

**ŽILINSKÁ UNIVERZITA V ŽILINE
FAKULTA RIADENIA A INFORMATIKY**



**Vývoj charakteristík pre hodnotenie simulácií pohybu
elastických objektov v toku tekutiny**

DIZERTAČNÁ PRÁCA

2018

Ing. Martin SLAVÍK

ŽILINSKÁ UNIVERZITA V ŽILINE
FAKULTA RIADENIA A INFORMATIKY

**Vývoj charakteristík pre hodnotenie simulácií pohybu
elastických objektov v toku tekutiny**

**DIZERTAČNÁ PRÁCA
28360020183003**

Študijný program: Aplikovaná informatika
Študijný odbor: 9.2.9. Aplikovaná informatika
Školiace pracovisko: Katedra softvérových technológií
Fakulta riadenia a informatiky
Žilinská univerzita v Žiline
Vedúci práce: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD.

Anotácia

Typ práce:	Dizertačná práca
Akademický rok:	2017/2018
Názov práce:	Vývoj charakteristík pre hodnotenie simulácií pohybu elastických objektov v toku tekutiny
Autor:	Ing. Martin Slavík
Školiteľ:	doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD.
Jazyk:	Slovenčina
Počet strán:	150
Počet obrázkov:	96
Počet tabuliek:	19
Počet referencií:	56
Kľúčové slová:	štatistické charakteristiky, kvantitatívne charakteristiky, model červenej krvinky, model krvi, výpočtový model, simulačný model, porovnanie modelov, validácia modelu

Podakovanie Touto cestou by som sa chcel úprimne poďakovať za pomoc, odborné vedenie, cenné rady, pripomienky a množstvo času doc. RNDr. Kataríne Bachratej, PhD., ktoré mi venovala pri vypracovaní mojej dizertačnej práce.

Tiež by som sa chcel veľmi pekne poďakovať celému výskumnému tímu Cell-in-fluid za pomoc a konzultácie pri problémoch počas realizácie mojej práce.

Vytvorenie práce by nebolo možné bez použitia technologických prostriedkov. Týmto by som sa chcel poďakovať Žilinskej univerzite a špeciálne Fakulte riadenia a informatiky za poskytnutie potrebného softvéru a výpočtových prostriedkov.

Veľká vďaka patrí aj mojej rodine a priateľom za trpezlivosť a podporu počas celého štúdia a najmä počas tvorby tejto práce.

Abstrakt

SLAVÍK, Martin: *Vývoj charakteristík pre hodnotenie simulácií pohybu elastických objektov v toku tekutiny*. [Dizertačná práca] Žilinská Univerzita v Žiline. Fakulta riadenia a informatiky. Katedra softvérových technológií. - Vedúci dizertačnej práce: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD. - Žilina: FRI ZU, 2018, 150 s.

Dizertačná práca sa zaoberá simuláciami toku krvnej suspenzie na úrovni krvných buniek pomocou výpočtového modelu. V práci použitý model je vytvorený výskumným tímom na Fakulte riadenia a informatiky Žilinskej univerzity, je implementovaný v softvéri ESSPResSo s voľne dostupným zdrojovým kódom a v súčasnosti sa stále vyvíja. V prvej časti práce je model predstavený a podrobne popísaný s dôrazom na kontext súčasnej situácie v tejto problematike a jeho doterajšiu kalibráciu, validáciu a aplikáciu. Cieľom dizertačnej práce je vývoj kvantitatívnych charakteristík, ktoré vyjadrujú úspešnosť modelu vzhľadom na jeho využitie. Tie by mali slúžiť na ďalšiu validáciu modelu, na porovnanie rôznych modelov medzi sebou alebo na verifikáciu modelu s rôznym nastavením simulačných parametrov. V práci sú tiež predstavené nové metódy spracovania simulačných výsledkov. Na základe známych faktov aj vlastných zistení a poznatkov je navrhnutý a vypracovaný postup pre porovnanie simulačných a laboratórnych experimentov a simulačných experimentov navzájom. Výsledky práce sú prínosné pre ďalší vývoj a zdokonalenie použitého modelu a iných podobných modelov.

Kľúčové slová: štatistické charakteristiky, kvantitatívne charakteristiky, model červenej krvinky, model krvi, výpočtový model, simulačný model, porovnanie modelov, validácia modelu

Abstract

SLAVÍK, Martin: *Development of characteristics for evaluating simulations of elastic objects' motion in the fluid flow*. [Dissertation thesis] - University of Žilina. Faculty of Management Science and Informatics. Department of Software Technology. - Supervisor: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD. - Žilina, FRI ZU, 2018, 150 p.

The dissertation thesis deals with simulations of the flow of blood suspension at the level of blood cells using the computational model. The model used in the works is created by the research team at the Faculty of Management and Informatics of the University of Žilina. It is implemented in ESSPResSo software with an open source licence and currently is still being developed. In the first part of the thesis the model is presented and described in detail with emphasis on the context of the current situation in this area and its previous calibration, validation and application. The aim of the dissertation is the development of quantitative characteristics that express the plausibility of the model with respect to its use. These should serve to validate the model, compare different models with each other, or verify the model with different simulation parameter settings. New methods for processing of the simulation results are also presented in the thesis. On the basis of known facts, knowledge and own findings, a procedure for comparison of simulation and laboratory experiments and simulation experiments to each other is proposed and elaborated. The results of the work are beneficial for further development and improvement of the used model and for other similar models.

Key words: statistical characteristics, quantitative characteristics, model of red blood cells, model of blood, computational model, simulation model, model comparison, model validation

Obsah

Zoznam obrázkov	15
Zoznam tabuliek	19
1 Úvod	21
1.1 Motivácia	21
1.2 Ciele práce	22
1.3 Prehľad práce	24
1.4 Technologické prostriedky	25
1.4.1 Použitý softvér	25
1.4.2 Výpočtové prostriedky	25
2 Súčasný stav	27
2.1 Biologické pozadie	27
2.2 Prístupy k modelovaniu krvi	28
2.3 Referenčný model	30
2.3.1 Model tekutiny	30
2.3.2 Model elastických objektov	31
2.3.3 Interakcia tekutiny a elastického objektu	35
2.3.4 Ostatné interakcie	36
2.4 Implementácia v softvéri ESPResSo	38
2.4.1 Fyzikálne jednotky v ESPResSo	39
2.4.2 Základné simulačné parametre	39
2.4.3 Implementácia modelu tekutiny	39
2.4.4 Implementácia modelu elastických objektov	42
2.4.5 Implementácia interakcií	43
2.4.6 Prechod na Python	43
2.5 Nastavenie a kalibrácia parametrov modelu	44
2.5.1 Kalibrácia elastických koeficientov	44
2.5.2 Kalibrácia viskózneho koeficientu	46
2.5.3 Kalibrácia interakcie medzi objektom a tekutinou	46

2.6	Využitie modelu	48
2.6.1	Trajektória CTC buniek a miera ich záchytu v poli periodických prekážok	49
2.6.2	Frekvencia nárazov objektov pri poli prekážok s posunutými polohami	49
2.6.3	Minimalizácia poškodenia buniek pri prechode cez vstupný konektor	49
2.6.4	Analýza drsnosti povrchu kanála	50
2.7	Validácia modelu	50
2.7.1	Prístupy k validácii modelov krvi	51
2.7.2	Validácia referenčného modelu	52
2.8	Tok v kanáloch	53
2.8.1	Laminárny tok	54
2.8.2	Objemový prietok	55
2.9	Záver	56
3	Analýza a nastavenie parametrov modelu tekutiny	57
3.1	Vplyv diskretizácie tekutiny na objemový prietok	57
3.2	Objemový prietok v komplexnejších kanáloch	59
3.2.1	Popis simulačných experimentov	59
3.2.2	Výsledky	63
3.3	Záver	67
4	Analýza modelu červenej krvinky	69
4.1	Štatistická analýza povrchových sietí	69
4.2	Analýza povrchových sietí červenej krvinky pomocou biologického experimentu	72
4.3	Záver	75
5	Štatistické charakteristiky toku červených krviniek	77
5.1	Popis experimentov	77
5.2	Výstupné dáta z experimentov	79
5.3	Spracovanie dát pohybu buniek	81

5.3.1	Absolútna rýchlosť buniek	81
5.3.2	Základné štatistické charakteristiky rýchlosti	81
5.3.3	Analýza periodických vlastností pohybu krvinky	83
5.3.4	Analýza rotácie buniek	85
5.4	Analýza časových snímok	87
5.4.1	Analýza polohy buniek v kanáli	88
5.4.2	Natočenie buniek v kanáli	90
5.5	Záver	95
6	Metódy merania rotácie červenej krvinky	97
6.1	Popis metód	97
6.2	Porovnanie metód	103
6.3	Záver	105
7	Metódy na analýzu trajektórií červených krviniek	107
7.1	Stabilita trajektórií jednotlivých červených krviniek	107
7.2	Analýza stability trajektórií pre veľké počty červených krviniek	110
7.3	Spracovanie trajektórií červených krviniek v celom kanáli	111
7.4	Predikcia trajektórií červených krviniek pomocou metódy strojového učenia	113
7.4.1	Návrh učiacej sa siete	113
7.4.2	Rekonštrukcia polohy a rýchlosti bunky	114
7.5	Predikcia trajektórií pohybu buniek	116
7.5.1	Aproximácia trajektórií v kanáloch s rôznou geometriou	116
7.6	Záver	118
8	Postup pre porovnanie experimentov	119
8.1	Porovnanie simulačného a laboratórneho experimentu	119
8.2	Porovnanie simulačných experimentov vykonaných rôznymi modelmi	126
8.3	Porovnanie simulačných experimentov vykonaných modelom s rôznymi parametrami	130
8.4	Záver	133

9 Záver	135
Publikácie	139
Zoznam použitej literatúry	141

Zoznam obrázkov

1	Tvar a rozmery červenej krvinky.	28
2	Mriežka D2Q9.	31
3	Mriežka D2Q9.	31
4	Ukážky povrchových triangulácií elastických objektov.	32
5	Modul pružnosti.	33
6	Modul ohybu.	33
7	Modul zachovania lokálnej plochy.	34
8	Modul zachovania objemu a modul zachovania celkovej plochy.	35
9	Ukážka dopočítavania rýchlosti kvapaliny v bode vnorenej hranice.	37
10	Príklad diskretizácie tekutiny s krokom 1.	40
11	Príklad diskretizácie tekutiny s krokom 2.	40
12	Ilustrácia rozhýbania tekutiny pomocou externej sily.	40
13	Ilustrácia rozhýbania tekutiny pomocou steny s danou rýchlosťou.	40
14	Hranica tekutiny <i>link bounce back</i>	41
15	Príklad periodických podmienok pri opakujúcej sa časti kanála.	42
16	Ilustrácia nťahovacieho experimentu.	45
17	Periodicky opakujúci sa výsek v poli periodických prekážok.	48
18	Poiseuille-Hagenov laminárny tok.	55
19	Ilustrácia objemového prietoku s jemnou diskretizáciou.	57
20	Ilustrácia objemového prietoku s hrubou diskretizáciou.	58
21	Tvar simulačného kanála I.	60
22	Tvar simulačného kanála II.	61
23	Tvar simulačného kanála III.	62
24	Ustálenie objemového prietoku v kanáli I.	64
25	Vzťah medzi externej silou a prietokom v kanáli I.	64
26	Ustálenie objemového prietoku v kanáli II.	65
27	Vzťah medzi externej silou a prietokom v kanáli II.	65
28	Ustálenie objemového prietoku v kanáli III.	66
29	Vzťah medzi externej silou a prietokom v kanáli II.	66
30	Sieť vytvorená nafukovacím experimentom, histogram uhlov.	70

31	Sieť vytvorená vyfukovacím experimentom, histogram uhlov.	70
32	Deformovaná sieť, histogram uhlov.	71
33	Krvinka vyrobená explicitne, histogram uhlov.	71
34	Ukážka seedingu uplatnením inflačného scenára.	72
35	Tvary štyroch testovaných povrchových sietí a ich prierezy.	73
36	Výsledok natáhovacieho experimentu rôznych povrchových sietí.	74
37	Tvar a rozmery kanála A.	78
38	Tvar kanála B.	78
39	Príklad náhodného počiatočného rozmiestnenia buniek v kanály A.	78
40	Pravidelné počiatočné rozmiestnenie buniek v kanály A.	78
41	Tvar a rozmery kanála C.	79
42	Tvar kanála D.	79
43	Tvar kanála E.	79
44	Kváder opisujúci bunku.	80
45	Absolútne rýchlosti vybraných buniek v A50a.	81
46	Základné rýchlostné charakteristiky simulácií.	82
47	Zhoda počtu dominantných a dôležitých frekvencií.	84
48	Rozdiel počtu dominantných a dôležitých frekvencií.	84
49	Porovnanie kumulatívnych frekvencií medzi experimentami.	85
50	Metóda merania rotácie červenej krvinky.	86
51	Základné rotačné charakteristiky simulácií.	86
52	Dominantné frekvencie rotácie.	87
53	Dôležité frekvencie rotácie.	87
54	Rozdiel rotácie pre tri náhodné bunky.	87
55	Grafy hodnôt x súradníc RBC pre rôzne hodnoty simulačných krokov.	88
56	Počet buniek v zónach pre experiment A50a pre rôzne časové snímky.	89
57	Porovnanie počtu buniek v zónach v 381-tisícim kroku simulácie	89
58	Grafy hodnôt x rozmerov kvádrov.	91
59	Grafy hodnôt z rozmerov kvádrov.	91
60	Porovnanie hodnôt x , y a z rozmerov kvádrov pre experiment A50a.	91
61	Porovnanie hodnôt x , y a z rozmerov kvádrov pre experiment B50a.	91

62	Stabilita charakteristiky kvadratických odchýlok natočenia kvádra I.	92
63	Stabilita charakteristiky kvadratických odchýlok natočenia kvádra II.	92
64	Porovnanie výsledkov PCA pre kanál A	93
65	Porovnanie výsledkov PCA pre kanál B	93
66	Porovnanie výsledkov PCA pre kanál C	93
67	Porovnanie výsledkov PCA pre kanál D	94
68	Porovnanie výsledkov PCA pre kanál E	94
69	Porovnanie výsledkov PCA pre kanál E a rôzne rýchlosti tekutiny.	95
70	Metóda B merania rotácie červenej krvinky.	98
71	Metóda C merania rotácie červenej krvinky.	99
72	Metóda C merania rotácie červenej krvinky.	99
73	Metóda D merania rotácie červenej krvinky.	101
74	Nevýhoda metódy D.	101
75	Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti metódami C a D I.	102
76	Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti metódami C a D II.	102
77	Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti metódami C a D III.	103
78	Štartovacie pozície pre experimenty so samostatnou bunkou.	107
79	Bunka zo štartovacieho miesta $15 \mu m$ od steny v kanáli A.	108
80	Bunka zo štartovacieho miesta $25 \mu m$ od steny v kanáli A.	109
81	Príklad výstupných dát pre prvý a posledný prechod cez jeden rez.	110
82	Závislosť y súradníc od x pre simulačné experimenty C50 a C50b.	112
83	Závislosť y súradníc od x pre simulačné experimenty A20, A50a a A100.	112
84	Rekoštrukcia trajektórie 4, 9 a 10 hlavných komponentov.	112
85	Porovnanie skutočných a predikovaných trajektórií I.	117
86	Porovnanie skutočných a predikovaných trajektórií II.	117
87	Rýchlosti získané simuláciami v kanáli A.	118
88	Rýchlosti získané simuláciami v kanáli C.	118
89	Rýchlosti získané modelom v kanáli A I.	118
90	Rýchlosti získané modelom v kanáli A II.	118
91	Modelovaný tvar kanála	122
92	Porovnanie výsledkov natáhovacieho experimentu.	123

93	Porovnanie výsledkov rýchlosti.	125
94	Porovnanie výsledkov deformácie.	126
95	Ukážka prechodu modelu červenej krvinky kanál.	128
96	Porovnanie modelov červenej krvinky počas deformácie.	132

Zoznam tabuliek

1	Výsledky analýzy objemového prietoku pri rôznej diskretizácii tekutiny.	58
2	Objemové prietoky pre kanál I.	64
3	Objemové prietoky pre kanál II.	65
4	Objemové prietoky pre kanál III.	66
5	Štatistické hodnoty rozloženia uhlov.	71
6	Hodnoty elastických koeficientov testovaných sietí.	73
7	Vybrané parametre testovaných sietí.	74
8	Výsledky K-S testu pre maximálne a priemerné rýchlosti.	83
9	Výsledky K-S testu pre priemerné rýchlosti.	83
10	Poradie 25 najdôležitejších frekvencií pre výsledky všetkých štyroch metód	104
11	Výsledky porovnania jednotlivých metód merania rotácie.	105
12	Výsledky K-S testu pre porovnanie dát prechodov cez rezy.	111
13	Veľkosť chyby medzi jednotlivými modelmi.	115
14	Veľkosť chyby pre testovaciu množinu.	116
15	Porovnanie vybraných charakteristík rýchlosti I.	129
16	Porovnanie vybraných charakteristík deformácie I.	129
17	Hodnoty elastických koeficientov testovaných sietí.	131
18	Porovnanie vybraných charakteristík rýchlosti II.	131
19	Porovnanie vybraných charakteristík deformácie II.	132

1 Úvod

Rozvoj informačno-komunikačných technológií za ostatné desaťročia napredoval obrovskými krokmi a v súčasnosti ovplyvňuje mnohé aspekty života na tejto planéte aj mimo nej. Nie je tomu inak ani vo vede a výskume. Najmä vďaka nárastu výpočtovej kapacity, ale aj vývoju nových metód a technológií je dnes možné vykonávať rozsiahle simulácie zložitých systémov. Táto práca sa zaoberá vývojom nástrojov pre hodnotenie simulačných výsledkov pohybu elastických objektov v toku tekutiny, čím prispieva k vývoju modelov na vykonávanie takýchto simulácií.

1.1 Motivácia

Deformácia elastických objektov v dôsledku toku v tekutine alebo interakcie s inými takými objektmi je dôležitým problémom v základnom výskume, ako aj v biomedicínskych, biochemických či farmakologických aplikáciách. Jedným z najvýraznejších príkladov je štúdium krvných buniek. Ich elastické vlastnosti majú významný vplyv na fyziologické bunkové funkcie a tiež ovplyvňujú reológiu celej krvi. Elasticita tiež zohráva dôležitú úlohu pri prúdení krviniek v mikrofluidických zariadeniach. Takéto zariadenia sa používajú na diagnostiku, triedenie či zachytávanie vybraných buniek alebo iných objektov nachádzajúcich sa v krvnej suspenzii. Prototypy takýchto zariadení existujú, avšak ich ďalší vývoj si vyžaduje nové pokusy.

Z toho plynie veľký záujem o pochopenie dynamiky krvných buniek. Experimentálne štúdie ich mechaniky sú však zvyčajne ťažko uskutočniteľné kvôli malým rozmerom a zložitej fyzikálnej interpretácii experimentov. Taktiež výroba mikrofluidických zariadení je technologicky, finančne a časovo náročná. Preto je hlavne vďaka rozvoju informačno-komunikačných technológií v ostatných desaťročiach výpočtové modelovanie dobrou alternatívou. Počítačové simulácie môžu slúžiť k lepšiemu pochopeniu vlastností buniek a ich správania v špecifických podmienkach a tým môžu napomôcť aj k ďalšiemu vývoju a optimalizácii mikrofluidických zariadení.

K modelovaniu krvi existujú rôzne prístupy a tejto oblasti sa venujú rôzne výskumné skupiny či jednotlivci po celom svete. Jeden takýto model bol vytvorený a ďalej sa vyvíja aj Fakulte riadenia a informatiky Žilinskej univerzity výskumnou skupinou

Cell-in-fluid. Tento model je implementovaný v softvéri ESPResSo s licenciou *Open Source* a umožňuje modelovanie krvi na úrovni krvných buniek ponorených v kvapaline. Doposiaľ bola najväčšia pozornosť venovaná modelovaniu jednotlivej červenej krvinky, správne zachyteniu jej viskoelastických vlastností. Boli uskutočnené kalibračné experimenty pre správne nastavenie parametrov modelu určujúcich tieto vlastnosti. Navrhnutá bola metóda na správnu kalibráciu interakcie objektov a tekutiny v ktorej sú vnorené. S modelom už bolo vykonaných aj niekoľko vzorových aplikačných štúdií, kde sa simulovali špecifické podmienky pri toku krvi alebo iných tečúcich objektov v častiach mikrofluidických zariadení.

Cielom tejto dizertačnej práce nie je ďalší vývoj a priame vylepšovanie tohto modelu. Na model sa v tejto práci pozeráme z hľadiska používateľa a slúži ako nástroj na dosiahnutie určených cieľov. Budeme ho označovať ako referenčný model.

1.2 Ciele práce

Ciele práce boli definované nasledovne:

- *Identifikovať charakteristiky simulačných výsledkov toku elastických objektov v kvapaline, ktoré vyjadrujú úspešnosť simulačného modelu vzhľadom na reálne experimenty.*
- *Urobiť analýzu simulačných výsledkov rôznymi metódami spracovania dát a navrhnúť vlastné metódy spracovania a získavania informácií zo simulačných výsledkov.*
- *Na základe získaných informácií navrhnúť postup pre komparáciu simulačného experimentu s laboratórnym experimentom, prípadne rôznych simulačných experimentov navzájom.*

Pri toku ľubovoľných objektov je dôležité správanie sa tekutiny v ktorej sú objekty ponorené. Preto sa zameriame aj na charakteristiky toku samotnej tekutiny v mikrofluidických kanáloch v závislosti od rôzneho nastavenia simulácie. Ako elastické objekty budú v práci použité červené krvinky, no mnohé výsledky a závery sú platné aj pre iné bunky, respektíve iné elastické aj pevné tečúce objekty. Modelovaniu a simuláciám jednotlivej červenej krvinky bol venovaný už veľký priestor. Je možné nájsť charakteristiky, či už kvantitatívne alebo kvalitatívne, ktoré musia modely spĺňať, aby

ich bolo možné považovať za validné. Preto sa v práci zameriame na doteraz málo skúmané charakteristiky toku väčšieho množstva červených krviniek založené na štatistickom správaní. Identifikované sú také kvantitatívne charakteristiky, ktoré považujeme za dôležité a dostatočne špecifické pre popis celkového správania sa krvných častíc počas ich toku. Tieto charakteristiky by mali slúžiť nielen na ďalšiu validáciu modelu, ale aj na porovnanie rôznych modelov medzi sebou alebo na verifikáciu simulačných výsledkov vzhľadom na rôzne nastavenie používaného modelu. Pre potreby validácie by malo byť možné tieto charakteristiky získať aj zo spracovania videí z laboratórnych experimentov. Navrhnuté charakteristiky sa týkajú rýchlosti, rotácie, náklonu a trajektórií buniek počas toku.

Všetky navrhnuté charakteristiky sú získavané spracovaním jednoduchých výstupných dát zo simulácie (prípadne videa) pomocou štatistických metód, ktorých použitie pre takýto prípad je nové. Použité sú jednoduché metódy, ako nájdenie miním, maxím, priemerov a následné triedenie podľa veľkosti. Ale aj pokročilé metódy ako aplikácia diskretnej Fourierovej transformácie, analýza hlavných komponentov alebo metód strojového učenia. Spracované dáta nemusia slúžiť len pre potreby porovnávania modelu. Často odhalia aj skryté informácie, umožňujúce lepšie pochopenie skúmaného systému. Navrhnuté sú aj metódy porovnania týchto charakteristík pomocou štandardných štatistických testov a iných metód.

Na záver je navrhnutý postup pre komparáciu simulačného experimentu s laboratórnym experimentom, prípadne viacerých simulačných experimentov navzájom. Simulačné experimenty sa môžu líšiť modelom, ktorý bol pre simuláciu použitý alebo iba rôznym nastavením parametrov jedného modelu. Zameriame sa na experimenty toku červených krviniek v mikrofluidických zariadeniach. Postup bude podobný aj pre iné objekty, prípadne iné prostredie, v ktorom sa objekty pohybujú. Porovnanie simulačného experimentu s laboratórnym experimentom slúži najmä na validáciu modelu. Porovnanie rôznych simulačných experimentov navzájom je vhodné na overenie korektnosti použitých modelov a môže viesť k rozhodnutiu, ktorý model je vhodné ďalej používať.

1.3 Prehľad práce

Práca je štruktúrovaná nasledovne:

- V kapitole 2 je stručne popísané biologické pozadie modelovania krvi, rôzne prístupy k modelovaniu krvi a následne je predstavený referenčný model, ktorý sme v práci ďalej používali. V ďalších častiach sa venujeme jeho doterajšej kalibrácii, validácii a aplikácii. Pri validácii sú popísané aj prístupy iných výskumníkov k tomuto problému a predstavené sú biologické experimenty, ktoré k tomuto účelu môžu slúžiť. Pri aplikácii sú popísané doterajšie aplikácie modelu, ale aj potenciálne možnosti, ako bude možné model využiť v budúcnosti. Na konci kapitoly sú uvedené fyzikálne východiská pre popis prúdenia tekutín v kanáloch.
- Od kapitoly 3 nasledujú výsledky vlastnej práce. Táto kapitola je venovaná modelu a modelovaniu tekutiny. Uvedené sú skutočnosti, na ktoré treba dbať pri nastavení a popísaní tekutiny pri použití referenčného modelu. Spracovaná je tu tiež štúdia, pri ktorej sme analyzovali prietokový objem v rôznych typoch mikrofluidických kanálov.
- V kapitole 4 analyzujeme samostatný model červenej krvinky najmä z hľadiska použitej diskretizácie jej povrchu. Povrchové siete vytvorené rôznymi metódami sú skúmané pomocou štatistických a experimentálnych metód.
- V nasledujúcej kapitole 5 sú navrhnuté vlastné metódy spracovania výstupných dát, pri simuláciách toku suspenzie červených krviniek. Predstavené sú na ich základe vytvorené štatistické charakteristiky, ktoré identifikujú experimenty pri rôznych vstupných nastaveniach (rýchlosti toku, geometrie zariadenia, počiatočného rozmiestnenia krviniek, hematokritu a pod.).
- V kapitole 6 sa porovnávajú rôzne metódy merania a vyhodnocovania rotácie červenej krvinky, ktoré sú použiteľné nie len pri simulačných, ale aj laboratórnych experimentoch.
- V kapitole 7 sú analyzované trajektórie červených krviniek a ich stability v priebehu experimentu. Navrhnuté sú rôzne metódy pre spracovanie trajektórii, či už jednotlivých buniek, alebo všetkých buniek nachádzajúcich sa v sledovanej

časti kanála. Načrtnutá je aj možná predikcia trajektórií pomocou pokročilejších metód strojového učenia.

- Na záver v kapitole 8 je navrhnutý a popísaný postup pre porovnanie výsledkov simulačného experimentu s výsledkami laboratórneho experimentu a postup na porovnanie výsledkov viacerých simulačných experimentov navzájom. Postupy sú demonštrované na jednoduchom ilustračnom príklade.

1.4 Technologické prostriedky

Vytvorenie práce by nebolo možné bez použitia technologických prostriedkov.

1.4.1 Použitý softvér

Na vykonávanie simulácií bol použitý softvér ESSPResSO ([4]) s licenciou typu *open source*, ktorý je podrobne popísaný v časti 2.4.

Na grafické zobrazovanie simulačných výsledkov bol použitý softvér Paraview ([57]), ktorý umožňuje 3D vizualizáciu štandardných výstupov softvéru ESSPResSO vo formáte *.vtk* ([16]). Na prvotné spracovanie simulačných výstupov boli použité vlastné programy napísané v jazykoch Tcl ([14]), Python ([12]) a C# ([1]). Na pokročilejšie spracovanie simulačných výstupov boli použité softvéry MS Excel ([10]), MATLAB ([9]) a Gnuplot ([8]).

1.4.2 Výpočtové prostriedky

Vykonávanie simulácii je výpočtovo náročné. Na jednoduché simulácie stačí aj osobný počítač, ktorý bol použitý aj na spracovávanie výsledkov. Na rozsiahle simulácie boli využité výpočtové prostriedky, ktoré poskytla Žilinská univerzita.

Server Tesla M2090 sa nachádza na Fakulte riadenia a informatiky a je financovaný z projektu „Modernizácia výskumnej infraštruktúry v oblastiach elektrotechniky, elektrotechnických materiálov a informačno-komunikačných technológií“ (ITMS 26210120021). Server má nasledovnú špecifikáciu:

2 procesory Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2609 0 @ 2.40GHz, dokopy 8 vlákien, RAM 64GB, HDD 2 × 1TB

grafická karta NVIDIA GF110 [Tesla M2090]

Klaster Žilinskej univerzity, ktorý je financovaný z projektu „Slovenská infraštruktúra pre vysokovýkonné počítanie“ (ITMS 26210120002) a má nasledovnú špecifikáciu: 46 výpočtových uzlov s parametrami: 2 × 6 jadrový procesor Intel(R) Xeon(R) CPU L5640 @ 2.27GHz, RAM 96GB, HDD 2 × 500GB

2 výpočtové uzly s parametrami: 2 × 10 jadrový Intel(R) Xeon(R) CPU E7- 8860 @ 2.27GHz, RAM 256GB, HDD 2 × 300GB

2 × grafická karta NVIDIA GF100 [Tesla M2070].

2 Súčasný stav

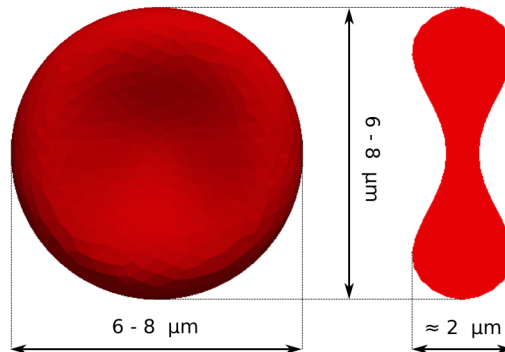
V tejto kapitole je popísaný súčasný stav riešenej problematiky. Každý model je abstrakcia reálneho objektu alebo systému. Preto si najskôr predstavíme zloženie reálnej krvi a fyziológiu červených krviniek. Ďalej si uvedieme rôzne prístupy k modelovaniu krvi. Najväčší dôraz v celej kapitole je kladený na predstavenie konkrétneho modelu, ktorý sa práci ďalej využíva. Popísané sú jeho matematicko-fyzikálne princípy, ale aj implementácia v softvéri. V ďalších častiach sú predstavené metódy pre nastavovanie dôležitých parametrov, spôsoby validácie modelu a možné aplikácie modelu. Model je určený na simulovanie toku krvi v umelých kanáloch, preto sú na konci kapitoly uvedené niektoré teoretické princípy popisujúce tok v kanáloch.

2.1 Biologické pozadie

Z ľudskej perspektívy je krv homogénna, viskózna kvapalina. V mikroskopických rozmeroch je však krv tvorená z menej viskóznej kvapaliny (krvnej plazmy) a vnorených elastických objektov (krvné bunky). Tieto objekty sú hlavne: červené krvinky (erytrocyty, ďalej aj RBC z angl. *red blood cell*), biele krvinky (leukocyty), krvné doštičky (trombocyty). Krvné bunky môžu byť v dôsledku chorôb rôzne deformované, prípadne majú pozmenené elastické vlastnosti. Pri rakovinovom ochorení sa v krvi môžu nachádzať aj nádorové bunky, ktoré sa uvoľnia z metastázy a v tele sa ďalej šíria v toku krvi (angl. *Circulating Tumour Cells*, ďalej CTC). Krvná plazma tvorí približne 55% objemu krvi, 44% predstavujú červené krvinky, biele krvinky a krvné doštičky v pomere 600 : 1 : 40. Ľudia majú približne $4 - 8 * 10^6$ červených krviniek na mm^3 krvi. Pomer CTC k RBC býva približne 1 : 10^9 . [24]

Pretože červené krvinky majú v krvi výrazne najväčšie zastúpenie v porovnaní s inými pevnými časťami, pozrieme sa bližšie na ich stavbu a vlastnosti. RBC je tvorená dvoma hlavnými časťami: bunkovou membránou na povrchu a cytoplazmou vo vnútri. Bunková membrána sa skladá z dvoch vrstiev, fosfolipidovej dvojvrstvy a cytoskeletonovej spektrínovej siete. Fosfolipidická dvojvrstva je zodpovedná za udržanie približne konštantného povrchu bunky. Tieto dve vrstvy bunkovej membrány sú navzájom poprepájané proteínmi. Obsahuje tiež iónové pumpy, ktoré udržiavajú vnútorný

objem červenej krvinky konštantný. Červená krvinka má tvar bikonkávneho elastickeho disku s priemerom $6 - 8 \mu m$ a hrúbkou približne $2 \mu m$ (Obr.1). Takýto tvar má veľký pomer povrchu ku objemu objektu, čo umožňuje efektívnejší prenos kyslíku a oxidu uhličitého v tele. Flexibilná membrána dovoľuje RBC stlačiť sa cez kapiláry až do šírky $\sim 5 \mu m$.



Obr. 1: Tvar a rozmery červenej krvinky. Vľavo pohľad spredu, vpravo prierez (podľa: [61])

Červené krvinky sa tvoria v kostnej dreni, kedy majú guľovitý tvar a nazývajú sa retikulocyty. Postupným dozrievaním strácajú bunkové jadro, znižujú svoj objem, ale povrch si zachovávajú konštantný. Výsledný povrch je $S_{RBC} \sim 136 \mu m^2$ a objem $V_{RBC} \sim 90 - 100 \mu m^3$ [24]. Tieto hodnoty sa potom počas života krvinky nemenia. Zaujímavou vlastnosťou je tvarová pamäť membrány ([51]), ktorá sa po deformácii externou silou znova vráti do pôvodného bikonkávneho tvaru.

2.2 Prístupy k modelovaniu krvi

Prístupy k modelovaniu, kde sa o krvi uvažuje ako o homogénnej tekutine, sú popísané napríklad v [90], [50]. Takéto modely sú vhodné najmä pri skúmaní toku krvi v cievach a jej interakcie s cievami. Ak však chceme skúmať jednotlivé krvné bunky, musíme mať model, kde ich modelujeme ako samostatné entity s elastickými vlastnosťami. Keďže hlavnú časť krvi tvoria červené krvinky, veľká pozornosť je venovaná hlavne ich modelovaniu. Existujú spojité modely [41], [45], kde sa krvinka modeluje pomocou metódy konečných prvkov a jej tvar je získaný explicitne z analytickej rovnice popisujúcej jej povrch [46]:

$$z = \pm 0.5R_0 \sqrt{\left(1 - \frac{x^2 + y^2}{R_0^2}\right)} \left(C_0 + C_1 \frac{x^2 + y^2}{R_0^2} + C_2 \left(\frac{x^2 + y^2}{R_0^2}\right)^2\right), \quad (1)$$

$$R_0 = 3.91, C_0 = 0.207161, C_1 = 2.002558, C_2 = -1.122762.$$

kde R_0 je polomer červenej krvinky.

Iný prístup je, keď sa povrch červenej krvinky diskretizuje. Porovnanie spojitého a diskrétného modelu je uvedené v [100]. Pri diskretizácii sa najčastejšie používa tzv. strunový model. Povrch je diskretizovaný trojuholníkovou sieťou a medzi jednotlivými vrcholmi trojuholníkov sú struny zabezpečujúce elastické vlastnosti bunky. Sú modely, kde sú v pružinách uchovávané energie, z ktorých sa následne počítajú sily, ktoré pôsobia na vrcholy povrchovej siete [97, 47, 75]. Iné modely v pružinách uchovávajú priamo sily [44].

Doposiaľ uvedené modely boli trojrozmerné. Dvojrozmerný pružinový model červenej krvinky je použitý v [80]. Membrána červenej krvinky je tu modelovaná ako dvojrivrsta. Autorka sleduje prichytávanie CTC na steny ciev a pomocou strún modeluje aj rakovinovú bunku obsahujúcu jadro, rovnako ako steny ciev a aj samotnú interakciu medzi nimi. Výhoda tohto modelu je menšia výpočtová náročnosť, nevýhoda je samozrejme zanedbanie tretieho rozmeru.

Predchádzajúce modely boli zväčša využité na simulácie samotnej bunky v špeciálnych situáciách, alebo toku malého počtu buniek. V [77] je porovnanie modelu popísaného v [47] a hrubého modelu krvinky, ktorý je tvorený iba niekoľkými časťami. Záver štúdie je, že kvôli veľkej výpočtovej náročnosti je prvý model vhodný na detailnejšie štúdie toku krvi, s priemerom ciev do $100 \mu m$. V [75] je popísaná simulácia až 10^4 RBC, ale prítomná je iba jednostranná interakcia medzi krvinkami a tekutinou. V [101] je simulácia až s 50 000 RBC, čo predstavuje skutočný hematokrit (vyše 40 %), ale model bunky je veľmi zjednodušený a nezachytáva skutočné elastické vlastnosti červenej krvinky. Ešte rozsiahlejšia simulácia je v [78], ale bunky sú reprezentované elipsoidami.

Tok kvapaliny, v ktorej sú bunky vnorené sa zvyčajne počíta pomocou Navier-Stokesových rovníc. V poslednej dobe sa však v tejto oblasti ujala Lattice-Boltzmannova metóda, pre jej relatívne jednoduchú implementáciu a súčasne zachovanie dostatočnej presnosti pri modelovaní daných podmienok. Kombinácia metód používajúcich siete

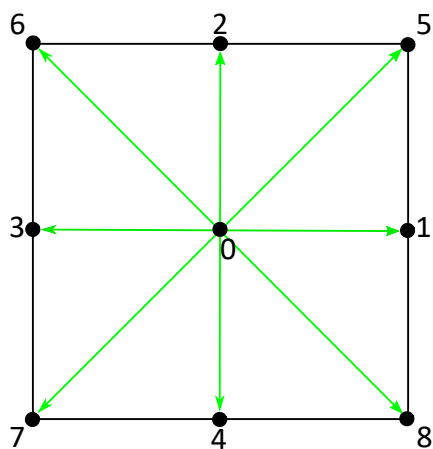
na modelovanie objektov a Lattice-Boltzmannovej metódy na modelovanie kvapaliny sú využité napríklad v prácach [40, 66, 67, 70, 79, 99].

2.3 Referenčný model

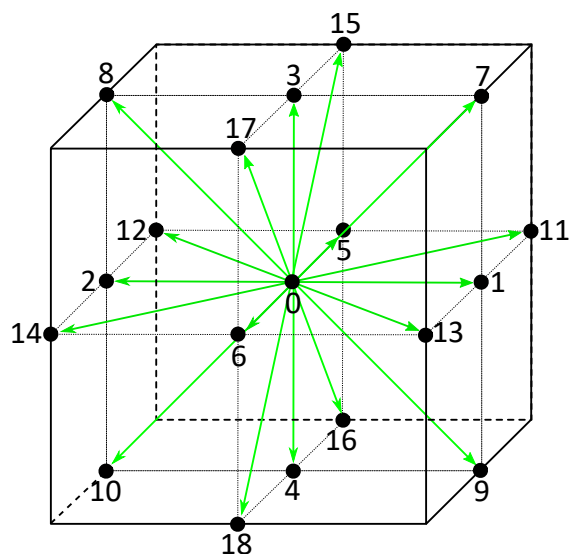
V tejto časti práce je popísaný referenčný model, ktorý budeme v práci ďalej analyzovať a používať. Model pozostáva z dvoch hlavných častí: z modelu tekutiny a modelu elastických objektov. Tekutina je modelovaná pomocou Lattice Boltzmannovej metódy. Model elastických objektov bol vyvinutý výskumnou skupinou *Cell-in-fluid* ([2]) pôsobiacou na našej fakulte. Tento model je diskretný a je inšpirovaný modelom popísaným v [44]. Pre správne fungovanie modelu je tiež potrebné zahrnúť vzájomné interakcie medzi týmito časťami a aj inými objektami prítomnými v simuláciách (steny kanála, prekážky a podobne). Celý model je implementovaný v softvéri ESPResSo, pričom model elastických objektov bol do softvéru doplnený výskumnou skupinou *Cell-in-fluid*. Špecifiká implementácie sú popísané v časti 2.4. V tejto časti je referenčný model popísaný z matematicko-fyzikálneho pohľadu.

2.3.1 Model tekutiny

Podstatou Lattice-Boltzmannovej metódy je diskretizácia kvapaliny do bodov rovnomerne rozmiestnených v trojdimenzionálnej Eulerovej mriežke, nemennej počas celej simulácie. Kvapalina je reprezentovaná fiktívnymi časticami, pričom každá častica obsahuje informáciu o veľkosti rýchlosti a smere, ktorým sa pohybujú. Keď do seba tieto častice narážajú, informácie si medzi sebou prenášajú. Funkcia $n_i(x, t)$ nám hovorí, koľko častíc na mieste mriežky x v čase t sa hýbe diskretným vektorom rýchlosti e_i . Diskrétny smery pohybu môžu byť definované rôzne. V $2D$ sa používa model s 9-timi smermi. Softvér ESPResSo na výpočet kvapaliny v $3D$ používa model s 19-timi smermi, teda $D3Q19$ verziu Lattice-Boltzmannovej metódy (3 dimenzie s 19-imi diskretnými smermi e_i , $i = 0, \dots, 18$). Obe metódy môžeme vidieť znázornené na Obr. 2 a 3.



Obr. 2: Mriežka D2Q9 (podľa: [27]).



Obr. 3: Mriežka D3Q19 (podľa: [27]).

V prípade prítomnosti externých síl dostávame podľa [17] rovnicu:

$$n_i(x + e_i \delta t, t + \delta t) = n_i(x, t) - \Delta_i(\mathbf{n}(x, t)) + f_i(x, t), \quad (2)$$

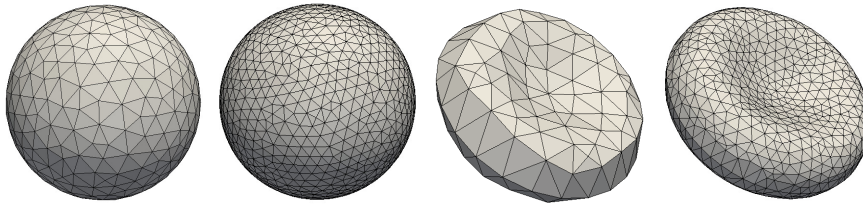
kde δt je časový krok, Δ_i označme ako kolízny operátor [43] a f_i je funkcia externej sily pôsobiacej na kvapalinu. Funkcia $n_i(x, t)$ nám hovorí o počte častíc, ktoré prúdia smerom e_i v mieste mriežky x v čase t . Pre úplné popísanie prúdiacej kvapaliny musíme dopočítať ešte makroskopické veličiny ako rýchlosť u a hustotu ρ . Tie vypočítame podľa [17] nasledovne:

$$\rho(x, t) = \sum_i n_i(x, t), \quad \rho(x, t)u(x, t) = \sum_i n_i(x, t)e_i, \quad (3)$$

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

2.3.2 Model elastických objektov

Model elastických objektov bol vyvinutý hlavne na modelovanie červených krviniek, ale je možné s ním modelovať aj objekty iných tvarov. Je založený na diskretizácii ich povrchu nepravidelnou trojuholníkovou sieťou (Obr. 4). Vo vnútri objektov sa nachádza rovnaká tekutina ako v ich okolí. Elastické vlastnosti objektu zabezpečuje päť elastických modulov. Neskôr bol do modelu zahrnutý aj viskóznny modul, ktorý zabezpečuje viskózne správanie objektu. Každý modul má definovanú silu pôsobiacu na vrchol siete. Veľkosť tejto sily závisí od veľkosti príslušného elastického koeficientu pre daný modul a od zmeny polohy vrcholu (viac v časti 2.3.3).



Obr. 4: Ukážky povrchových triangulácií elastických objektov. Zľava: dve gule s rôznou veľkosťou diskretizácie povrchu a dve červené krvinky s rôznou veľkosťou diskretizácie povrchu.

Modul pružnosti

Ako názov napovedá, úlohou modulu pružnosti je zachytiť základnú elastickú vlastnosť bunkovej membrány, teda pružnosti. Tento modul je najzákladnejší a najintuitívnejší elastický modul v modeli. Sila tohoto modulu pôsobí navzájom na vrcholy, ktoré sú spojené stranou jednotlivých trojuholníkov. Strany trojuholníkov si teda môžeme predstaviť ako pružiny s nelineárnym správaním (Obr. 5), ktoré vrcholy priťahujú, ak sú od seba ďalej ako počas relaxovaním stavu a naopak odtláčajú, ak sú bližšie ako počas relaxovaného stavu. Silu pružnosti pôsobiacu medzi bodmi A a B vyrátame podľa [35]:

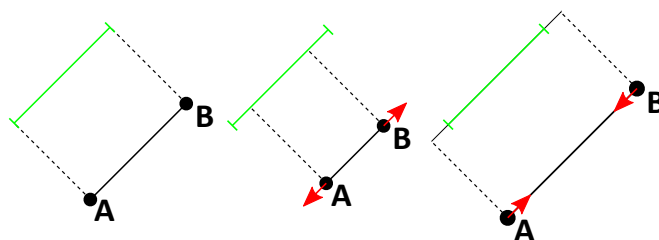
$$F_s(A, B) = k_s \cdot \kappa(\lambda_{AB}) \cdot \Delta L_{AB} \cdot n_{AB}, \quad (4)$$

kde k_s je koeficient pružnosti, L_{AB} je dĺžka hrany AB , L_{AB}^0 je jej relaxovaná dĺžka, $\lambda_{AB} = \frac{L_{AB}}{L_{AB}^0}$, n_{AB} je jednotkový vektor smerujúci z bodu A do bodu B , $\Delta L_{AB} = L_{AB} - L_{AB}^0$ je absolútna odchýlka struny z jej relaxovaného stavu L_{AB}^0 , κ je nasledovná nelineárna funkcia zodpovedajúca Neo-Hookeanovmu správaniu:

$$\kappa(\lambda_{AB}) = \frac{\lambda_{AB}^{0.5} + \lambda_{AB}^{-2.5}}{\lambda_{AB} + \lambda_{AB}^{-3}}. \quad (5)$$

Modul ohybu

Hlavná úloha modulu ohybu je zachovanie tvaru objektu, no taktiež umožňuje jeho deformáciu a následný návrat do relaxovaného stavu. Modul zachováva uhly medzi každou dvojicou susedných trojuholníkov (Obr. 6.). Veľkosť pôsobiacej sily vypočítame

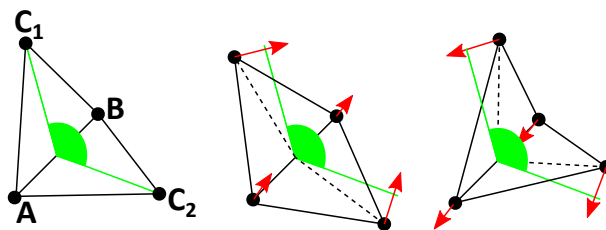


Obr. 5: Modul pružnosti (podľa: [36]).

podľa [35]:

$$F_b(A, B, C) = k_b \cdot \frac{\Delta\theta}{\theta^0} \cdot n_{ABC}, \quad (6)$$

kde k_b je koeficient ohybu, θ je uhol medzi dvoma trojuholníkmi, ktoré majú spoločnú hranu AB , θ^0 je ich relaxovaný uhol, $\frac{\Delta\theta}{\theta^0} = \frac{\theta - \theta^0}{\theta^0}$ je relatívna odchýlka uhlu medzi dvoma susednými trojuholníkmi so spoločnou hranou AB , n_{ABC} je jednotkový normálový vektor trojuholníka ABC .



Obr. 6: Modul ohybu (podľa: [36]).

Modul zachovania lokálnej plochy

Tento modul sa stará o zachovanie plochy jednotlivých trojuholníkov povrchovej triangulácie a tým zaručuje lokálne zachovanie povrchu objektu. Pôsobenie sily je znázornené na Obr. 7. Veľkosť sily zachovávajúcej plochu trojuholníkov triangulácie vypočítame ako ([35]):

$$F_{al}(A) = -k_{al} \cdot \frac{\Delta S_{ABC}}{\sqrt{S_{ABC}^0}} \cdot w_A, \quad (7)$$

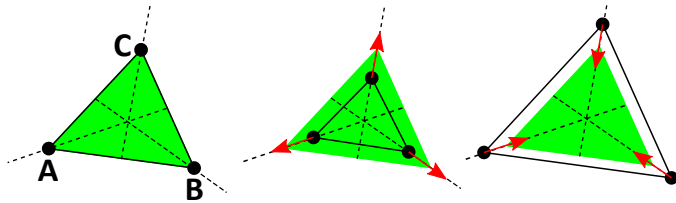
kde k_{al} je koeficient zachovania lokálnej plochy, S_{ABC} je obsah trojuholníka ABC , S_{ABC}^0 je jeho obsah v relaxovanom stave, $\Delta S_{ABC} = S_{ABC} - S_{ABC}^0$ je odchýlka lokálnej plochy trojuholníka ABC od jeho relaxovaného stavu, w_A je jednotkový vektor smerujúci z ťažiska trojuholníka ABC do vrcholu A . Silu F_{al} tak ako je spomenuté

v [94] normalizujeme $\sqrt{S_{ABC}^0}$, kvôli lepšiemu správaniu pri zmene hustoty diskretizácie objektu.

Neskoršou analýzou ([62]) bolo zistené, že je lepšie definovať silu F_{al} tak, aby bola proporčne rozdelená medzi vrcholy trojuholníka. Nový tvar je preto:

$$F_{al}(A) = k_{al} \cdot \frac{\Delta S_{ABC}}{|t_A|^2 + |t_B|^2 + |t_C|^2} \cdot w_A, \quad (8)$$

kde ak T je ťažisko trojuholníka ABC , potom pod t_A, t_B, t_C rozumieme vektory TA, TB a TC .



Obr. 7: Modul zachovania lokálnej plochy (podľa: [36]).

Modul zachovania celkovej plochy

Všetky predchádzajúce elastické moduly sa starali o lokálne zachovanie tvaru bunky. Nasledujúce dva moduly zabezpečujú konzistenciu globálnych vlastností objektu: povrchu a objemu. Ich pôsobenie je zobrazené na Obr. 8. Modul zachovania celkovej plochy má za úlohu udržať konštantný povrch objektu počas celej simulácie. Silu pôsobiacu z ťažiska trojuholníka ABC do vrcholu A vypočítame ako (podľa [35]):

$$F_{ag}(A) = -k_{ag} \cdot \frac{\Delta S}{S^0} \cdot w_A, \quad (9)$$

kde k_{ag} je koeficient zachovania celkovej plochy, S je povrch celého telesa, S^0 je jeho relaxovaný povrch, $\frac{\Delta S}{S^0} = \frac{S-S^0}{S^0}$ je relatívna odchýlka povrchu telesa od jeho relaxovaného stavu, w_A je jednotkový vektor smerujúci z ťažiska trojuholníka ABC do vrcholu A .

Neskôr sa definícia F_{ag} tiež zmenila, aby bola proporčne rozdelená medzi vrcholy jednotlivých trojuholníkov:

$$F_{ag}(A) = -k_{ag} \cdot \frac{\Delta S}{S^0} \cdot S_{ABC} \cdot \frac{t_A}{|t_A|^2 + |t_B|^2 + |t_C|^2} \cdot w_A, \quad (10)$$

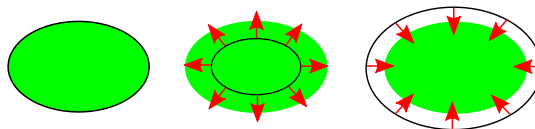
kde S_{ABC} plocha trojuholníka ABC a ak T je ťažisko trojuholníka ABC , potom pod t_A, t_B, t_C rozumieme vektory AT, BT a CT .

Modul zachovania objemu

Posledný modul je modul zachovania objemu telesa. Tento modul má na starosti udržiavať konštantný objem objektu počas celej simulácie. Pôsobenie sily je znázornené na Obr. 8. Veľkosť sily vypočítame ako (podľa [35]):

$$F_V(A, B, C) = -k_V \cdot \frac{\Delta V}{V^0} \cdot S_{ABC} \cdot n_{ABC}, \quad (11)$$

kde k_V je koeficient zachovania objemu, V je celkový objem telesa, V^0 je jeho relaxovaný objem, $\frac{\Delta V}{V^0} = \frac{V-V^0}{V^0}$ je relatívna odchýlka objemu telesa od jeho relaxovaného stavu, S_{ABC} je obsah trojuholníka ABC , n_{ABC} je jednotkový normálový vektor trojuholníka ABC .



Obr. 8: Modul zachovania objemu a modul zachovania celkovej plochy (podľa: [36]).

Modul viskozity

Neskôr bol do modelu pridaný modul viskozity. Tento modul má na starosti spomalenie pri zmene tvaru objektu a môžeme si ho predstaviť ako tlmič paralelne spojený so strunou. Sila tlmenia bude pôsobiť proti relatívnemu pohybu každého bodu triangulácie a jej veľkosť bude proporčná k jeho relatívnej rýchlosti. Silu pôsobiacu na vrchol A definujeme ako (podľa [76]):

$$F_{visc}(A) = -k_{visc} \frac{\Delta L_{AB}}{\delta t} = -k_{visc} (v_{AB} \cdot n_{AB}) n_{AB}, \quad (12)$$

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

2.3.3 Interakcia tekutiny a elastického objektu

Na zabezpečenie spolupráce oboch hlavných častí modelu 2.3.1, 2.3.2 sa využíva tzv. *dissipative force coupling*, prvý krát predstavená v [17]. Vnorené objekty sú charakterizované ich hranicami, teda vrcholmi ich povrchovej siete. Pri pohybe bodov vnorenej

hranice sa riadime Newtonovou rovnicou pohybu [17]:

$$F_j = m_{ib} \frac{\delta^2 X_j}{\delta t^2}, \quad (13)$$

kde m_{ib} je hmotnosť bodu vnorenej hranice, X_j je jeho pozícia a F_j sila pôsobiaca na tento bod. Zdrojom sily F_j sú elastické vlastnosti vnoreného objektu popísané v časti 2.3.2 a interakcia s tekutinou, ktorú popíšeme teraz.

Pohyb tekutiny popisuje rovnica (2) a pohyb vnoreného objektu rovnica (13). Pri pohybe objektov v tekutine by mala byť lokálne rýchlosť tekutiny totožná s rýchlosťou vnorenej hranice. Pre zabezpečenie tejto podmienky zadávame silu vyvíjanú tekutinou na bod vnorenej hranice F_j . Táto sila je úmerná rozdielu rýchlosti bodu vnorenej hranice v a rýchlosti tekutiny u v rovnakom mieste a teda [63]:

$$F_i = \xi(v - u), \quad (14)$$

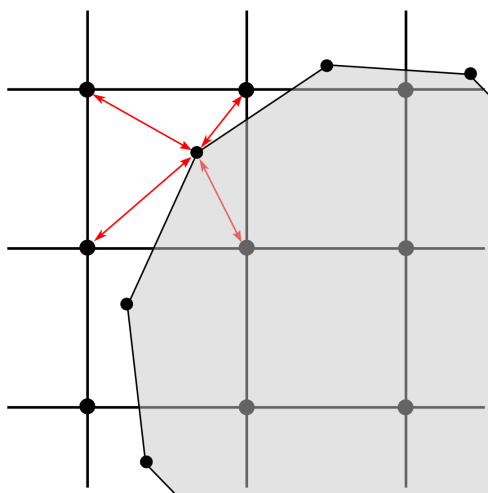
kde ξ je koeficient úmernosti, ktorý je fenomenologický [43] a teda nemá jasnú fyzikálnu interpretáciu.

Rovnica (14) predpokladá, že rýchlosť tekutiny u a rýchlosť bodu vnorenej hranice v sú počítané v rovnakých bodoch. Avšak v našom prípade majú kvapalina a vnorený objekt rôznu mieru diskretizácie (ich diskretizačné body sa nachádzajú na rôznych miestach). Preto je potrebné rýchlosť kvapaliny u dopočítať pomocou lineárnej interpolácie pre každý bod vnorenej hranice. Ukážku tejto aproximácie pre 2D model tekutiny môžeme vidieť na Obr. 9.

Pre správnu interakciu oboch častí modelu je treba uvažovať aj opačný efekt, a to vplyv vnorenej hranice na kvapalinu. Preto je potrebné, aby opačná sila $-F_i$ bola distribuovaná späť do kvapaliny. Potom F_j je rozložená do najbližších bodov eulerovskej mriežky diskretizujúcej kvapalinu a distribuovaná nepriamo úmerne objemom kvádrov, ktorých protilahlé rohy sú body vnorenej hranice a body mriežky ([37]).

2.3.4 Ostatné interakcie

Dôležité, sú tiež interakcie medzi objektami navzájom a medzi objektami a stenami kanála. Vo vývoji je aj model adhézie.



Obr. 9: Ukážka dopočítavania rýchlosti kvapaliny v bode vnorenej hranice pre $2D$. (podľa: [37])

Objekt-objekt

Ako vyplýva z časti 2.1, krv je veľmi hustá suspenzia, a preto veľmi často dochádza ku kontaktu vnorených objektov navzájom. Aj takúto situáciu treba pre správne fungovanie komplexného modelu ošetriť, aby sa objekty navzájom neprekrývali.

Algoritmus pre detekciu kolízií musí byť implementovaný medzi všetky páry existujúcich objektov v danej simulácii. V prvom kroku algoritmu sa objekty „uzavrú“ do priestorových boxov a kontroluje sa, či nedošlo ku vzájomnému kontaktu. Ak áno, znamená to, že sú pri sebe dostatočne blízko a musí sa skontrolovať, či skutočne došlo ku kolízii. Pri našom modeli elastických objektov sa interakcia objekt-objekt transformuje do interakcie častica-častica, kde častice sú všetky povrchové body siete daných objektov. Ak sú jednotlivé páry častíc príliš blízko pri sebe, potom na ne začnú pôsobiť odpudivé sily, ktorých potenciál je popísaný nasledovnou rovnicou:

$$V(d) = a \frac{1}{1 + e^{nd}} \quad d < d_{cut}, \quad (15)$$

kde d je vzdialenosť medzi dvomi časticami, d_{cut} je hranica, pri ktorej sila začne pôsobiť (pre väčšie vzdialenosti nie je na častice aplikovaná žiadna odpudivá sila), a je škálovací parameter a parameter n (typicky väčší ako 1) určuje ako „prudko“ sa udeje odozva keď sa k sebe častice približujú ([61])

Objekt-stena

Aby objekty nevchádzali do prekážok a stien v kanáli je potrebné, aby aj medzi nimi bola prítomná špeciálna interakcia. Keď sa objekt priblíži na určitú vzdialenosť ku stene prekážky, začne naň pôsobiť sila, ktorej potenciál popisuje rovnica:

$$V(d) = a \cdot d^{-n} \quad d < d_{cut}, \quad (16)$$

kde d je vzdialenosť medzi časticou a bodom hranice, d_{cut} je hranica, pri ktorej sila začne pôsobiť (pre väčšie vzdialenosti nie je na častice aplikovaná žiadna odpudivá sila), a je škálovací parameter a parameter n (typicky väčší ako 1) určuje ako „prudko“ sa udeje odozva keď sa k sebe častica a bod približujú. [61].

Adhézia

Adhézia predstavuje prilnutie dvoch (zväčša rozdielnych) materiálov, v našom prípade bunkovej membrány a povrchu prekážok alebo stien. V modeli zatiaľ adhézia nie je implementovaná, ale možný prístup je popísaný v [34].

2.4 Implementácia v softvéri ESPResSo

ESPResSo je *Open Source* softvér s licenciou GPU určený najmä na vykonávanie a analýzu simulácií molekulárnej dynamiky mnohočasticových systémov. Využíva sa najmä vo fyzike, chémii, či molekulárnej biológii. Je paralelizovateľný a dá sa nasadiť na PC, klastre alebo na superpočítače s mnohými procesormi. Jadro softvéru je napísané v jazyku C/C++ a používateľské rozhranie v staršej verzii zabezpečoval jazyk Tcl (Tool Command Language). V ostatnom roku sa realizoval prechod z Tcl na Python.

Softvér je podrobne popísaný v [18], softvérová dokumentácia pre Tcl verziu je dostupná na [6] a pre Python na [5]. V tejto časti sú uvedené dôležité informácie o softvéri z hľadiska používateľa, ako spôsob definovania fyzikálnych jednotiek alebo prehľad hlavných parametrov modelu a ich obmedzení. Popíšeme si aj proces prechodu do jazyka Python a špecifikácie tejto implementácie.

2.4.1 Fyzikálne jednotky v ESPResSo

ESPResSo nemá pevne definované žiadne fyzikálne jednotky. Používateľ si ich môže zvoliť podľa svojej potreby, pričom musí platiť nasledujúci vzťah:

$$[energia] = [hmotnosť] \frac{[dĺžka]^2}{[čas]^2}, \quad (17)$$

Pre naše potreby napríklad používame jednotku dĺžky μm , jednotku času μs a jednotku hmotnosti pg . Preto aj simulačné parametre a výsledky budú uvedené v takýchto alebo z nich odvodených jednotkách.

2.4.2 Základné simulačné parametre

Priestor v ktorom simulácie prebiehajú sa nazývajú *simulačný box*. Má tvar kvádra a jeho veľkosť sa zadáva pomocou parametrov: `boxX`, `boxY` a `boxZ`. Tento box sa dá virtuálne rozdeliť na viaceré menšie boxy rovnakej veľkosti, ktoré je možné počítať paralelne na viacerých výpočtových jednotkách. K tomu ESSPResSo využíva technológiu Open-MPI ([11]). Viac o paralelizácii je napísané napríklad v [33].

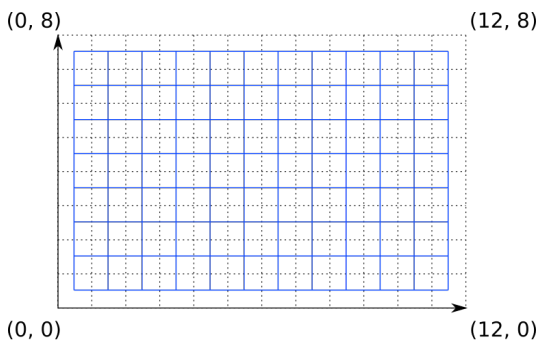
Dôležitý simulačný parameter je simulačný krok `time_step`. Udáva, ako často sa prepočítava stav modelu (polohy všetkých častíc, rýchlosti, sily a pod.).

2.4.3 Implementácia modelu tekutiny

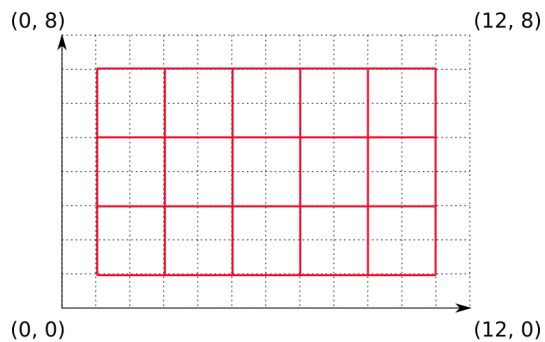
Popísaný model tekutiny zabezpečuje v Tcl verzii softvéra ESPResSo programový balík LB. Tento balík obsahuje dve nezávislé virtuálne implementácie. Jedna používa na výpočet CPU a druhá GPU, teda výpočet je paralelizovateľný na grafickej karte. Popis funkcionality modulu, jeho metód, parametrov, odporúčania pri jeho používaní a ukážky použitia v jazyku Tcl sú uvedené v [63], [18].

Tekutina do simulácie pridáva príkazom `lbfluid`, kde sa zadávajú všetky potrebné parametre. Parametre `dens` a `visc` predstavujú fyzikálnu hustotu a kinematickú viskozitu tekutiny. Parameter `tau` predstavuje časový krok pre prepočet tekutiny počas simulácie a zodpovedá δt vo vzťahu (2). Tento krok môže byť väčší alebo rovnaký ako `time_step`. Parameter `grid` predstavuje priestorový krok, teda je to vzdialenosť dvoch susedných uzlov trojdimenzionálnej mriežky Lattice-Boltzmannovej metódy. Parameter `grid` sa udáva v jednotkách dĺžky a platí, že všetky rozmery simulačného boxu

musia byť celočíselným násobkom `gridu`. Ďalej platí, že mriežka je oproti súradnicovej sústave simulačného boxu posunutá o $0.5 * \text{grid}$ teda: uzol mriežky s indexami $(0, 0, 0)$ je umiestnený v súradniciach $(0.5 * \text{grid}, 0.5 * \text{grid}, 0.5 * \text{grid})$ (Obr. 10, 11).

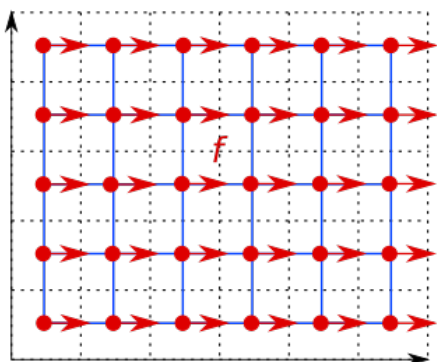


Obr. 10: Príklad diskretizácie tekutiny s priestorovým krokom (*grid*) 1.

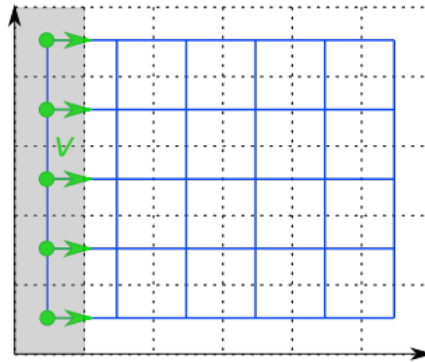


Obr. 11: Príklad diskretizácie tekutiny s priestorovým krokom (*grid*) 2.

Parameter `friction` predstavuje ξ vo vzťahu (14) a teda ovplyvňuje interakciu medzi tekutinou a časticami alebo objektami v nej ponorenými. Tekutina sa dá v softvéri rozhybať dvomi spôsobmi. Prvý spôsob je taký, že do každého bodu mriežky tekutiny pridáme externú silu, ktorú nastavujeme parametrom `ext_force` (Obr. 12). Druhý spôsob je taký, že vytvoríme stenu s určitou rýchlosťou, ktorá tekutinu postupne rozhybe (Obr. 13). Steny a iné prekážky sa do simulácie pridávajú príkazom



Obr. 12: Ilustrácia rozhybania tekutiny pomocou externej sily.

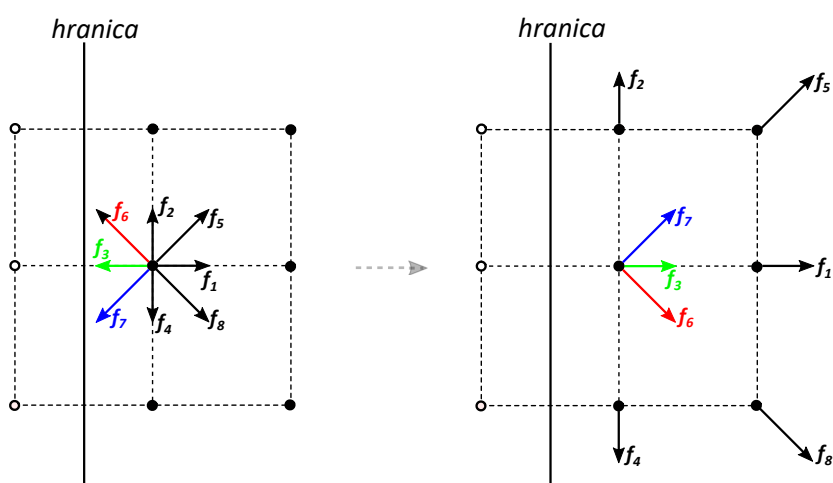


Obr. 13: Ilustrácia rozhybania tekutiny pomocou steny s danou rýchlosťou.

`lboundaries`, ktorá pre tekutinu definuje hranice. Okrem už spomínanej rýchlosti

(parameter *velocity*) je ďalším parametrom už len tvar prekážky (napr. *wall* pre stenu), *cylinder* pre valec alebo *rhomboid* pre kváder. Platí, že uzly tekutinovej mriežky, ktoré sa nachádzajú vo vnútri prekážky budú mať nulovú rýchlosť a hranica pre tekutinu sa bude nachádzať v strede medzi nulovým a susedným nenulovým uzlom tekutiny. Takýto typ hranice sa nazýva *link bounce back* a je znázornený na Obr.14.

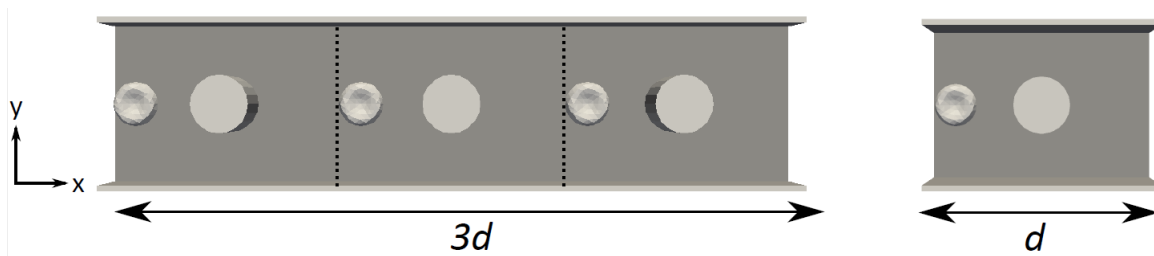
0



Obr. 14: Hranica tekutiny *link bounce back*. (podľa: [22])

Ak do simulačného boxu nepridáme žiadne hranice, tekutina sa nachádza v celom *simulačnom boxe* a na jeho okrajoch platia periodické podmienky. Môžeme si to predstaviť tak, akoby sa za týmito okrajmi nachádzalo nekonečné množstvo rovnakých simulačných kanálov, s rovnakou topológiou kanála, rovnakou tekutinou a rovnakými objektami. Táto vlastnosť umožňuje simulovať priestor, kde sú periodicky sa opakujúce časti, iba pomocou najmenšieho periodicky sa opakujúceho výseku. Jednoduchý príklad je znázornený na Obr. 15. Dlhší kanál vľavo obsahuje tri rovnaké, opakujúce sa oblasti a taktiež tri bunky sú vždy na rovnakej pozícii vzhľadom na takúto oblasť. Kratší kanál napravo znázorňuje presne jednu takúto oblasť. Periodické podmienky platia v smere x . Predstavme si, že v tomto smere aj tečie tekutina.

Vzhľadom na periodicky sa opakujúci výsek sa všetky tri bunky aj tekutina v dlhom kanáli budú správať rovnako, ako samostatná bunka a tekutina v krátkom kanáli. Aj bunky v dlhom kanáli sa budú navzájom ovplyvňovať rovnako, ako bunka v krátkom



Obr. 15: Príklad periodických podmienok pri opakujúcej sa časti kanála.

kanáli ovplyvňuje samú seba. Simulácia v krátkom kanáli vlastne simuluje experiment, kde je rovnaký kanál za sebou v smere x naskladaný nekonečne veľa krát.

Samozrejme, takýto prístup má svoje obmedzenia. Treba dávať pozor, aby simulovaný výsek nebol taký malý, aby objekty a tekutina „príliš“ neovplyvňovali samé seba.

2.4.4 Implementácia modelu elastických objektov

Model elastických objektov popísaný v časti 2.3.2 je v Tcl verzii implementovaný v module OIF (Object in fluid). Ten bol pridaný do softvéru výskumnou skupinou *Cell-in-fluid* pôsobiacou na našej fakulte. Modul umožňuje modelovať trojrozmerné objekty skladajúce sa z väčšieho množstva častíc, ktoré majú určitú hmotnosť.

Pomocou príkazu `oif_create_template` je možné vytvoriť šablónu pre želané objekty. Asi najdôležitejšou vlastnosťou objektu je jeho tvar. Ten sa definuje parametrami `nodes-file` a `triangles-file`, ktoré odkazujú na dátové súbory obsahujúce zoznam súradníc vrcholov a nimi definovaných trojuholníkov tvoriacich povrchovú sieť. Súbory musia mať špecifický formát. Ďalšou dôležitou vlastnosťou je veľkosť objektu, ktorá sa zadáva parametrom `stretch` ako trojica čísel reprezentujúcich násobky zväčšenia pôvodne definovanej siete v troch smeroch. Každá šablóna má tiež definované elastické vlastnosti pomocou piatich parametrov: `ks`, `kb`, `kal`, `kag` a `kv`. Tie zodpovedajú elastickým koeficientom vo vzťahoch: (4), (6), (7), (9) a (11).

Samotný objekt sa vytvára príkazom `oif_add_object`. Ten má ako parametre vopred definovanú šablónu, ďalej pozíciu stredu `origin` reprezentovanú trojicou súradníc, natočenie `rotate` reprezentované trojicou uhlov otočenia okolo osí x , y , a z uvedené v radiánoch a hmotnosť objektu. Podobne ako pri tekutine, aj pre objekty sa môžu definovať prekážky rovnakých tvarov pomocou príkazu `constraint`. V tomto prípade budú hranice presne na tých istých súradniciach ako ich používateľ definuje.

2.4.5 Implementácia interakcií

Interakciu tekutiny a objektu tak, ako je popísaná v časti 2.3.3, zabezpečuje implementácia tekutiny a ovplyvňuje ju spomínaný parameter `friction`. Interakciu medzi dvoma objektami zabezpečuje funkcia `inter` s parametrom `membrane`. Ďalšie parametre tejto funkcie sú dva objekty, medzi ktorými má interakcia fungovať a parametre `mc_A`, `mc_n` a `mc_cut` vyplývajúce zo vzťahu (15).

Interakciu medzi objektom a prekážkou zabezpečuje funkcia `inter` s parametrom `soft-sphere`. Ďalšie parametre tejto funkcie sú typy objektov (s rovnakou šablónou) a typy prekážok, medzi ktorými má daná interakcia fungovať a parametre `soft_A`, `soft_n` a `soft_cut` vyplývajúce zo vzťahu (16).

2.4.6 Prechod na Python

Hlavná zmena v implementácii je, že jazyk Python umožňuje objektové programovanie. A tak funkcionality spojená s modelom tekutiny sa nachádza v knižniciach `lb` pre samotnú tekutinu alebo `lboundaries` pre hranice tekutiny. Samotná tekutina je potom objekt typu `LBFluid` s rovnakými parametrami ako to bolo vo verzii Tcl.

Funkcionality spojená s elastickými objektami je implementovaná v knižniciach `oif_classes` a `oif_utils`. Šablóna je teraz definovaná ako objekt typu `OifCellType` s rovnakými parametrami ako v predchádzajúcej verzii, len veľkosť sa teraz udáva parametrom s názvom `resize`. Vo verzii Python sú už implementované novšie verzie modulov zachovania lokálnej a celkovej plochy (definované vzťahmi (8) a (10)). Samotný elastický objekt sa definuje pomocou objektu `OifType`, ktorý má rovnaké parametre ako predtým, ale pribudol parameter `kvisc` reprezentujúci koeficient modulu viskozity (12). Tiež hmotnosť sa teraz udáva pre jeden uzol siete (časticu).

Na programovaní a testovaní knižníc `oif_classes` a `oif_utils` som sa aktívne podieľal. Takýto typ testovania sa dá považovať za *verifikáciu* modelu. V tomto prípade verifikácia spočívala v dvoch fázach. V prvej fáze bolo treba overiť, či výsledky modelu majú predpokladané hodnoty aspoň v tom zmysle, že sa výstupy naozaj menia, majú dobrý rád, znamienko a podobne. V druhej fáze sme výsledky implementácie modelu v Python porovnávali s výsledkami z tej v Tcl. Tu sme testovali aj novú implementáciu modelu tekutiny a interakcií. Na testovanie sme využívali jednoduché simu-

lačné scenáre, kde sme objekty rôznych tvarov rozhýbali rôznymi spôsobmi do rôznych smerov a následne sme merali pozície, alebo rýchlosti určitých vrcholov, stredy objektu a podobne. Výsledky z oboch verzií sme porovnali s presnosťou na deväť desatinných miest. Takýmto spôsobom sme napríklad objavili chybu aj v novej implementácii tekutiny, kedy rozhýbavanie pomocou pohyblivej steny nezodpovedalo starej verzii. Na túto chybu sme následne upozornili autorov príslušnej knižnice ([63]).

2.5 Nastavenie a kalibrácia parametrov modelu

Mnohé parametre modelu, ako viskozita, hustota alebo rýchlosť tekutiny majú presnú fyzikálnu interpretáciu a dajú sa priamo nastaviť na základe vlastností modelovaného objektu. Podobne napríklad tvary a veľkosti kanálov, prekážok alebo aj samotných tečúcich objektov.

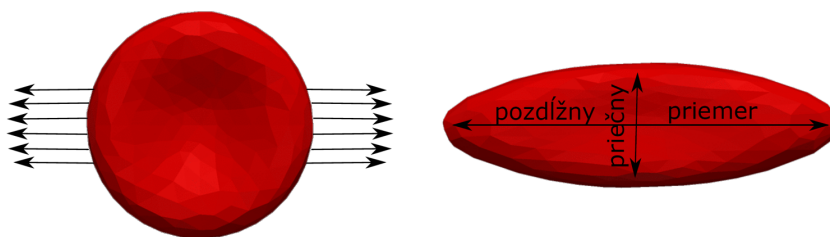
Iné parametre sú na zvážení používateľa a nie je možné jednoznačne povedať, ako ich treba nastaviť. Ide napríklad o veľkosť diskretizácie tekutiny alebo objektu. Týmto parametrom sa budeme v práci ďalej venovať v ďalších kapitolách.

A mnohé parametre modelu nemajú jednoznačnú priamu fyzikálnu interpretáciu. Je vhodné nastaviť/kalibrovať ich podľa známych fyzikálnych alebo laboratórnych experimentov. Do tejto kategórie patria napríklad visko-elastické koeficienty alebo koeficient úmernosti interakcie medzi objektom a tekutinou. Pre tieto si uvedieme možné metódy vhodnej voľby ich hodnôt. Takýto typ parametrov sú aj parametre ovplyvňujúce interakcie medzi objektami a medzi objektom a prekážkami. Tieto parametre zatiaľ neboli nastavované takýmto spôsobom. Je ťažké nájsť alebo vymyslieť experiment, kde by práve tieto parametre mali hlavný vplyv na výsledky experimentu. Preto je ich zatiaľ nutné zvoliť zmysluplne, aby sa napríklad objekty a prekážky navzájom neprekrývali alebo neprechádzali cez seba.

2.5.1 Kalibrácia elastických koeficientov

Voľba koeficientov elastických modulov (popísaných v časti 2.3.2), ktorým v softvéri zodpovedajú parametre: k_s , k_b , k_{al} , k_{ag} a k_v priamo ovplyvní elastické správanie modelovaného objektu. Ak pomocou koeficientov chceme želané elastické správanie dosiahnuť, musí byť toto správanie najskôr vhodné, ideálne kvantitatívne popísané.

Na kalibráciu elastického správania modelu RBC boli použité výsledky tzv. natahovacieho experimentu [42], [71], [41]. Laboratórny experiment spočíval v tom, že na opačné strany RBC (pozdĺžne) boli pripevnené silikónové guľôčky. Jedna strana bola pevne prichytená a druhá bola natahovaná pomocou optickej pinzety rôznymi silami známej veľkosti. Pri každej sile bol zmeraný finálny pozdĺžny a priečny priemer bunky. Tento experiment bol zopakovaný aj pomocou referenčného modelu.



Obr. 16: Ilustrácia natahovacieho experimentu (podľa: [33]).

Kalibrácia je detailne opísaná v [96], [95], kde bola vykonaná pre model s pôvodnou definíciou elastických modulov. Pre každý natahovací experiment, s rôznou veľkosťou sily a s rôznou kombináciou piatich elastických koeficientov, sa potom vypočítala chyba definovaná ako:

$$SE = \sum_i ((d_i^a - e_i^a)^2 + (d_i^b - e_i^b)^2), \quad (18)$$

kde d_i^a je finálna hodnota pozdĺžneho priemeru a d_i^b je finálna hodnota priečného priemeru zo simulácie pre i -tu aplikovanú silu, e_i^a a e_i^b sú zodpovedajúce hodnoty z biologických experimentov.

Hlavná myšlienka kalibrácie spočíva v nájdení takej sady elastických koeficientov, pre ktorý hodnota SE nadobúda minimum.

Rovnaká sada elastických koeficientov znamenala rozličné výsledky natahovacieho experimentu pre povrchové siete RBC s rôznym počtom vrcholov. Preto by sa pre každú sieť musel celý kalibračný proces zopakovať. Zistilo sa však, že hodnoty koeficientov sú od počtu vrcholov lineárne závislé. A tak ak poznáme vhodné hodnoty koeficientov už pre dve siete s rôznym počtom vrcholov, pre ostatné siete môžeme hodnoty koeficientov interpolovať.

V súčasnosti prebieha kalibračný proces pre model červenej krvinky s novou definí-

ciou elastických modulov.

2.5.2 Kalibrácia viskózneho koeficientu

Na kalibráciu správneho viskózneho správania modelu červenej krvinky je vhodné použiť výsledky biologického experimentu samostatnej bunky v tzv. šmykovom toku popísaného napr. v [52]. Šmykový tok znamená, že v polovici kanála tečie tekutina jedným smerom a v druhej polovici opačným smerom. Červená krvinka bola vložená do stredu takéhoto toku, čo mala za následok, že pri určitých rýchlostiach sa začala bunka rovnomerne otáčať. Rovnaký experiment bol vykonaný pomocou referenčného modelu v [76]. Bolo zistené, že prítomnosť viskózneho modulu a veľkosť sily ktorou pôsobil, mali výrazný vplyv frekvenciu otáčania bunky. Vhodná veľkosť viskózneho koeficientu `kvisc` sa dá teda určiť tak, že dosiahneme rovnakú rýchlosť otáčania bunky v simulačnom experimente ako v laboratórnom experimente.

2.5.3 Kalibrácia interakcie medzi objektom a tekutinou

Nastavenie takejto interakcie ovplyvňuje rýchlosť toku objektov ponorených do kvapaliny. To je jednou zo zásadných vlastností pri experimentoch, pre ktoré je model určený. Túto interakciu priamo ovplyvňuje veľkosť koeficientu úmernosti ξ zo vzťahu (14) (v softvéri parameter `friction`), ktorý má za úlohu vyrovnávanie rýchlostí tekutiny a vnorenej hranice objektu. Metóda na jeho kalibráciu je založená na porovnaní s analytickými riešeniami dvoch fyzikálnych experimentov. Metóda kalibrácie je podrobne popísaná v [30].

Prvý experiment spočíva v tom, že pevná guľa s určitým priemerom je vložená do stojatej tekutiny. Priestor, v ktorom sa tekutina nachádza je teoreticky nekonečný. Na guľu začneme pôsobiť konštantnou silou F_0 v jednom smere a tá sa začne pohybovať, až dosiahne terminálnu rýchlosť veľkosti:

$$v_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} v(t) = \frac{F_0}{6\pi\nu Kr}, \quad (19)$$

kde ν je dynamická viskozita kvapaliny, K je tvarový koeficient (pre guľu je rovný 1) a r je polomer gule.

Druhý experiment spočíval v tom, že pevná guľa s určitým priemerom je vložená do tečúcej tekutiny v jednom smere s konštantnou rýchlosťou. Opäť sa predpok-

ladá nekonečne veľký priestor, v ktorom tekutina tečie, čiže prúdnice sú dokonale rovnobežné. Tentokrát sila, ktorou musíme pôsobiť na guľu v opačnom smere ako tečie tekutina je rovná:

$$F_A = 6\pi\nu rKv, \quad (20)$$

kde ν je dynamická viskozita kvapaliny, K je tvarový koeficient (pre guľu rovný 1), r je polomer guľe a v je rýchlosť tekutiny.

Tieto experimenty boli vykonané aj pomocou referenčného modelu. Aby sa do simulácii zahrnul predpoklad nekonečného priestoru, bol zvolený simulačný box s dostatočne veľkými rozmermi. Predpoklad o pevnej guľi bol zabezpečený dostatočne veľkými elastickými koeficientami.

Veľkosť v_∞ aj vF_A boli výrazne ovplyvnené veľkosťou koeficientu úmernosti ξ . Výsledky simulačných experimentov sa zhodovali s výsledkami analytických riešení pre rovnakú hodnotu ξ , takže dva experimenty slúžili ako dvojité kontroly. Keďže tekutina pôsobí na jednotlivé častice, teda vrcholy povrchovej siete objektu, je prirodzené, že veľkosť ξ je závislá na počte vrcholov použitej siete a aj polomere objektu. Preto bol navrhnutý a testovaný vzťah na výpočet ξ na základe týchto dvoch parametrov tak, aby sa pre každý model guľe nemusel koeficient úmernosti nanovo kalibrovať.

Referenčný model je ale určený aj na modelovanie iných ako guľatých objektov, hlavne červených krviniek. Avšak pre takéto tvary neexistujú analytické riešenia navrhnutých experimentov. Existuje ale pre elipsoidy ľubovoľných polomerov. Vzorec na odhad koeficientu úmernosti ξ , závislý na počte vrcholov povrchovej siete objektu a druhej odmocniny povrchu bol navrhnutý v [33]:

$$\xi_{n,S} = \frac{n_{ref}}{n} \frac{\sqrt{S}}{\sqrt{S_{ref}}} \xi_{ref}, \quad (21)$$

kde n je počet vrcholov povrchovej siete želaného objektu a S je jeho povrch, n_{ref} je počet vrcholov referenčného objektu, S_{ref} je povrch referenčného objektu. Referenčný objekt je taký, pre ktorý poznáme (z predošlej kalibrácie) hodnotu ξ_{ref} .

Platnosť vzťahu (21) bola overená pre elipsoidy. Predpoklad je, že rovnaký prepočet bude možné použiť aj pre červené krvinky a objekty iných tvarov.

Kalibrácia prebehla pre jednu hodnotu dynamickej viskozity. Pri zmene tohoto parametra v simulačných experimentoch sa ukázalo, že výsledky sa znateľne líšia od a-

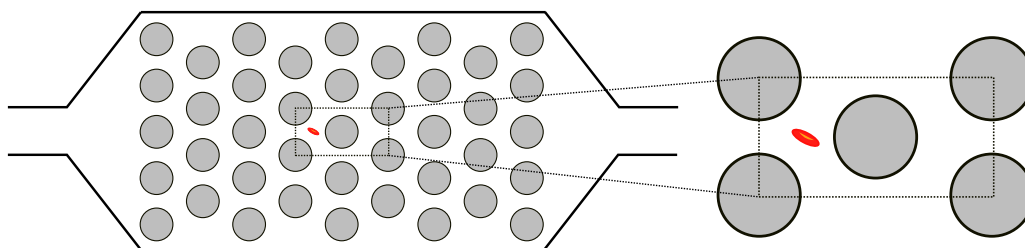
nalytických riešení. Preto je potrebné pre každú tekutinu s inou hodnotou dynamickej viskozity vykonať celý kalibračný proces zvlášť.

2.6 Využitie modelu

Mikrofluidické zariadenia alebo mikrofluidické čipy sú vo všeobecnosti kanály s rozmermi desiatok až stoviek mikrometrov, v ktorých prúdi tekutina. Sú využiteľné v rôznych oblastiach ako biochémia, biomedicína či farmakológia ([56]).

Medzi hlavné aplikácie ich možného použitia patria analýza, triedenie, filtrovanie a odchyťovanie buniek v krvnej suspenzii. Príklad štúdie, kde boli jednoduché kanály s prierezom niekoľko mikrometrov použité na skúmanie viskoelastických vlastností červenej krvinky je v [91]. Motivácia a príklady na použitie mikrofluidických zariadení pre triedenie buniek je podrobne spracovaná v [72]. V [25] sú opísané princípy triedenia buniek nie len na základe ich veľkosti a tvaru, ale aj na základe ich schopnosti sa deformovať. So separáciou úzko súvisí aj odchyťovanie buniek. Obe metódy slúžia na diagnostiku, či už priamu, alebo následnú, kedy sa takto získané bunky môžu ďalej skúmať a používať na ďalšie experimenty. Problematika zachytávania cirkulujúcich rakovinových buniek (CTC) pomocou mikrofluidických zariadení je popísaná v [74].

S referenčným modelom už bolo uskutočnených niekoľko aplikačných štúdií súvisiacich s mikrofluidickými zariadeniami. Uvedieme si tri z nich, ktoré vykonala výskumná skupina *Cell-in-fluid* a jednu zo zahraničia. Vďaka vlastnostiam modelu nie je nutné modelovať celé mikrofluidické zariadenia, ale stačí modelovať len určitý periodicky sa opakujúci výsek. Na Obr. 17 je znázornený príklad simulovaného výseku v kanáli s poľom periodicky sa opakujúcich prekážok.



Obr. 17: Periodicky opakujúci sa výsek v poli periodických prekážok.

2.6.1 Trajektória CTC buniek a miera ich záchytu v poli periodických prekážok

Štúdia [31] bola zameraná na overenie hypotézy, že väčší hematokrit (hustota buniek) a polomer prekážok vplyvajú na trajektóriu toku CTC buniek v kanáli s periodickým poľom prekážok a teda aj na pravdepodobnosť záchytu týchto buniek. Ďalším cieľom bol návrh modelu pre odhad miery záchytu buniek. V simuláciách sa sledoval iba predpokladaný záchyt CTC, kedy sa za záchyt považovalo priblíženie sa CTC k prekážke na dostatočne malú vzdialenosť a dostatočne dlhý čas pre vznik potenciálnej väzby s biologicky aktívnou látkou.

2.6.2 Frekvencia nárazov objektov pri poli prekážok s posunutými polohami

V predchádzajúcej štúdií bol kanál s poľom periodických prekážok, kde boli polohy prekážok fixné a menil sa ich priemer. V štúdií ([33], Kap. 6.2) je použitý kanál, kde je každý stĺpec prekážok vertikálne posunutý o určitú hodnotu. V štúdií sa sledovala frekvencia kolízií buniek s prekážkami v závislosti od veľkosti posunutia radov prekážok a hematokritu. Narozdiel od predchádzajúcej štúdie, kde boli použité rôzne modely pre RBC a CTC tu boli všetky bunky reprezentované len ako guľové objekty.

2.6.3 Minimalizácia poškodenia buniek pri prechode cez vstupný konektor

V tejto aplikačnej štúdií sa vyšetroval vplyv geometrie vstupného konektora mikrofluidického zariadenia na správanie sa RBC počas ich prechodu týmto konektorom ([95]). Konektor je súčasťou mikrofluidických zariadení, ktorou bunky vstupujú do hlavného kanála. Vyšetrovala sa hlavne miera poškodenia buniek. Na tento účel existuje ukazovateľ BDI (blood damage index) [68, 89]. Do výpočtu tohoto indexu však nevstupujú informácie o RBC v toku, ich deformáciách a vzájomných interakciách. Tie sa zo simulačného modelu dajú ľahko vytiahnuť, preto bol navrhnutý rozšírený index pre kvantifikáciu miery poškodenia buniek CDI (cell damage index) V štúdií boli ďalej navrhnuté a namodelované štyri rôzne geometrie vstupných konektorov, ktoré sa navzájom porovnávali a slúžili na analýzu navrhnutých indexov miery poškodenia buniek.

2.6.4 Analýza drsnosti povrchu kanála

V štúdiu [26] bol referenčný model použitý na simuláciu interakcie elastických objektov podobných krvným doštičkám so stenami kanálov rôznej drsnosti. Zatiaľ čo hranice pre tekutinu v modeli sú dokonale rovné, v skutočných mikrofluidických zariadeniach sa vyskytujú na stenách a prekážkach povrchové nerovnosti. Drsnosť bola modelovaná pomocou pravidelných výstupkov na stenách kanálov rôznej veľkosti. Elastické objekty sa prevažovali cez tieto prekážky a skúmal sa čas prechodu v závislosti od veľkosti prekážok a tvaru objektu.

2.7 Validácia modelu

Pojmy *verifikácia* a *validácia* sa medzi sebou často mýlia. Rozdiel medzi nimi sa dá jednoducho vysvetliť tak, že *verifikácia* odpovedá na otázku: "vytvorili sme model správne?", zatiaľčo *validácia* odpovedá na otázku: "vytvorili sme správny model?" Pri počítačovom modeli sa pri *verifikácii* sleduje najmä to, či implementácia spĺňa požadovanú špecifikáciu. Proces *verifikácie* referenčného modelu pri prechode na iný jazyk implementácie je stručne popísaný v časti 2.4.6.

Rozsiahlejšia definícia pojmu *validácia* (preložené z angl. z [85]) je: "potvrdenie, že má počítačový model v rámci svojej domény použiteľnosti uspokojivý rozsah presnosti v podmienkach zamýšľaného použitia modelu".

Pod slovným spojením „zamýšľané použitie modelu“ rozumieme účel, pre ktorý bol model vytvorený. Pre referenčný model je to simulovanie toku krvnej suspenzie v mikrofluidických zariadeniach, tak ako je popísané v predchádzajúcej časti. V súčasnom stave, v akom je model, môžeme toto tvrdenie redukovať na: simulovanie toku červených krviniek v mikrofluidických zariadeniach.

Pod „doménou použiteľnosti“ rozumieme množinu experimentálnych podmienok, pre ktoré má byť model validný. V našom prípade by to napríklad bolo, že model tekutiny je určený len pre modelovanie laminárneho toku, nie toku turbulentného. Alebo, že model predstavuje zdravé červené krvinky a nie je vhodný na simulovanie správania chorých alebo poškodených červených krviniek, napríklad pri *kosáčikovej anémii* ([88]).

Diskutabilné je slovné spojenie „rozsah presnosti“. V prípade modelovania krvi

situácia nie je taká jednoduchá, ako keď napríklad modelujeme vývoj jednej číselnej premennej. Vtedy si môžeme dopredu určiť, že model musí túto premennú predikovať s určitou maximálnou chybou. V našom prípade chceme modelom zachytiť rôznorodé správanie tečúcich elastických objektov, ktoré neustále narážajú do seba, do stien kanála, prípadne aj do prekážok vo vnútri kanála.

V tejto časti si popíšeme spôsoby validácie iných modelov krvi, doterajšiu validáciu referenčného modelu a možných spôsobov validácie v budúcnosti.

2.7.1 Prístupy k validácii modelov krvi

Validácia elastických vlastností modelu červenej krvinky sa najčastejšie robí porovnaním s natahovacím experimentom (popísaný v časti 2.5.1). Takýmto spôsobom boli validované modely červenej krvinky v [101], [44], [47]. V [49] bol navrhnutý a pomocou natahovacieho experimentu validovaný model červenej krvinky napadnutej maláriou. Natahovací experiment je však statický a model, ktorý dobre zachytáva takéto správanie, nemusí obstáť v dynamických podmienkach.

Ďalší experiment využívaný na validáciu viskoelastického správania modelu červenej krvinky je sledovanie jej správania v šmykovom toku (popísaný v časti 2.5.2). Takéto experimenty s výpočtovými modelmi červenej krvinky sú popísané v [44], [47], [75].

Validácia modelu červenej krvinky pomocou experimentu toku v úzkom kanáli s kruhovým prierezom, len o málo väčším ako priemer krvinky, bola vykonaná v [47]. Pre model červenej krvinky napadnutej maláriou v [49]. Krvinka kvôli Poiseuilleovmu toku nadobúda typický „padákový“ tvar a dajú sa sledovať jej rozmery pri rôznych rýchlostiach toku tekutiny. Tento experiment je dobrý na validáciu elastických vlastností modelu v dynamickom režime.

Validácia hromadného správania modelov červených krviniek je zriedkavejšia. V [101] bola vykonaná simulácia krvnej suspenzie s hematokritom až 45%, čo predstavuje hodnotu neriedenej krvi, v šmykovom toku pri rôznych rýchlostiach. Červené krvinky sa v takých podmienkach začnú usádzať na spodku kanála vo vrstvách. V tejto štúdií sa sledovali rýchlosti pohybu jednotlivých vrstiev a zhluky buniek, ktoré sa líšili pri rôznych rýchlostiach toku. Tieto charakteristiky boli porovnané s laboratórnym experimentom. V simulácii sa merali aj priemerné natočenia buniek, ktoré boli taktiež závislé

od rýchlosti toku, avšak túto charakteristiku nebolo možné porovnať s výsledkami z laboratórneho experimentu. V experimente bolo možné sledovať aj tzv. *bezbunkovú vrstvu* (*cell free layer*), tento jav je bežný pri toku krvi v cievach aj v kanáloch. Červené krvinky smerujú do stredu kanála a pri stenách sa vytvára konštantná vrstva bez buniek.

Bezbunková vrstva bola sledovaná a analyzovaná aj v simulačnej štúdii [48]. Jav bol sledovaný pre rôzne priemery kanálov a pre rôzne hematokrity a bol porovnaný s dostupnými experimentálnymi dátami. Takúto validáciu môžeme považovať za kvalitatívnu.

2.7.2 Validácia referenčného modelu

Všetky experimenty uvedené v časti o kalibrácii referenčného modelu (2.5) môžeme považovať zároveň za validáciu modelu. S modelom je možné taktiež simulovať nafaňovací experiment s výsledkami porovnateľnými s laboratórnym experimentom. Viskoe-elastické správanie bolo testované v experimente so šmykovým tokom. Rýchlosť toku pevných telies tvaru gule a elipsoidov bola zas validovaná pri kalibrácii interakcie objektu a tekutiny porovnaním s analytickými riešeniami.

Validácia elastických vlastností modelu červenej krvinky v dynamickom režime a rýchlosti jej toku sa v súčasnosti robí porovnaním s laboratórnym experimentom popísaným v [81]. V experimente sa sleduje rýchlosť a deformácia bunky pri prechode cez kanál, ktorý sa neustále rozširuje a opäť zužuje. Deformácia bunky sa sleduje pomocou tzv. *deformačného indexu* (DI), definovaného ako:

$$DI = \frac{L_{max} - L_{min}}{L_{max} + L_{min}}, \quad (22)$$

kde L_{min} a L_{max} sú dĺžky najkratšej a najdlhšej osi bunky získané z videozáznamu experimentu.

Aj DI aj rýchlosť bunky sa sledujú v štyroch rôznych zónach. No aj v rámci zón sa hodnoty týchto charakteristík výrazne menili. Ani po konzultáciách s autormi článku sme sa tento údaj nedozvedeli.

Validácií hromadného správania pri toku väčšieho počtu červených krviniek referenčným modelom zatiaľ nebola venovaná žiadna štúdia. Ideálny spôsob na validáciu je porovnanie simulačných výsledkov s výsledkami laboratórných biologických experi-

mentov pomocou kvantitatívnych charakteristík. Zdrojom takýchto výsledkov môžu byť už publikované štúdie, alebo videozáznam z experimentov.

Publikovaných štúdií v tejto oblasti nie je mnoho a nie vždy sú exaktne uvedené všetky podmienky, za ktorých sa experiment vykonal, aby ho bolo možné zopakovať. Sledované charakteristiky výsledkov tiež často nestačia na to, aby sme ich mohli považovať za dostatočné pre validáciu modelu. Niektoré experimenty sú už uvedené v predchádzajúcej časti o validácii iných modelov. Ďalšie príklady takýchto štúdií si uvedieme. V článku [28] je navrhnutá metóda na meranie rýchlostí červených krviniek pomocou tomografie a uvedené sú výsledky pre tok krvi cez jednoduchý kanál bez prekážok. V [69] sa sledujú trajektórie buniek pri prechode cez jednoduchý kanál bez prekážok počas tvorby *bezbunkovej vrstvy*. V štúdií [53] sa sledovali trajektórie červených krviniek a pevných guľôčok cez asymetricky zúžený kanál, v závislosti od hematokritu. Trajektórie sa porovnávali pomocou rozdielu ich súradníc v jednom rozmere. V práci [58] sa sledoval prechod rôznych krviniek cez kanál obsahujúci pole periodických prekážok s posunutými radmi (Obr. 17). Pre každý druh buniek a veľkosť posunu radu sa počítal priemerný počet prechodov z jedného radu do druhého.

Ideálny spôsob pre validáciu referenčného modelu je porovnanie s biologickými experimentami, ku ktorých výsledkom budeme mať priamy prístup alebo ich dokonca sami navrhujeme. Takáto možnosť sa v súčasnosti ponúka v rámci spolupráce s výskumnými skupinami v Donau-Universität v Kremse, Rakúsko ([3]) a na Technickej Univerzite v Pardubiciach, Česká republika ([15]). Výsledky sú poskytnuté vo forme videí, preto je potrebné vyvinúť špecifické metódy na ich spracovanie a získavanie informácií. Prvé výsledky zo spracovania videí sú zverejnené v diplomových prácach vypracovaných na Fakulte riadenia a informatiky Žilinskej univerzity [73], [93].

2.8 Tok v kanáloch

V tejto časti si predstavíme teoretické princípy, dôležité pre popis prúdenia tekutiny v kanáloch. Definujeme si laminárny tok a jeho špeciálny prípad Poiseuilleov. Ďalej si definujeme objemový prietok, ako veličinu často určujúcu rýchlosť toku v kanáloch. Uvedieme si aj vzťah medzi objemovým prietokom a rozdielom tlakov medzi začiatkom a koncom kanála.

2.8.1 Laminárny tok

Pod laminárnym tokom si môžeme predstaviť, že tekutina prúdi v pomyselných paralelných „vrstvách“, ktoré sa vzájomne neprekrývajú (Obr. 18). Tento tok sa tiež nazýva *prúdnicový* (angl. *streamline flow*). Okrem laminárneho toku, rozoznávame aj tok turbulentný. Povahu toku je možné rozlíšiť pomocou *Reynoldsovho čísla* (Re). Pri prúdení tekutiny v kanáli sa Re vypočíta ako:

$$Re = \frac{D_h v \rho}{\mu} = \frac{D_h v}{\nu}, \quad (23)$$

kde D_h je hydraulický priemer kanála (pri kruhovom priereze je to priemer), v je rýchlosť prúdenia tekutiny v kanáli, ρ je hustota tekutiny, μ je dynamická viskozita tekutiny a ν je kinematická viskozita tekutiny. Medzi kinematickou a dynamickou viskozitou platí vzťah: $\mu = \rho \cdot \nu$. Samotné Re je bezrozmerná veličina. Pri hodnotách do približne 2000 považujeme tok za laminárny, pri hodnotách nad 2100 za turbulentný. Hodnoty medzitým predstavujú tzv. prechodnú oblasť ([19])

Hydraulický priemer je definovaný ako:

$$D_h = \frac{4A}{P}, \quad (24)$$

kde A je plocha prierezu a P je obvod „namáčanej plochy“. Pre kanály s kruhovým prierezom je teda hydraulický prierez:

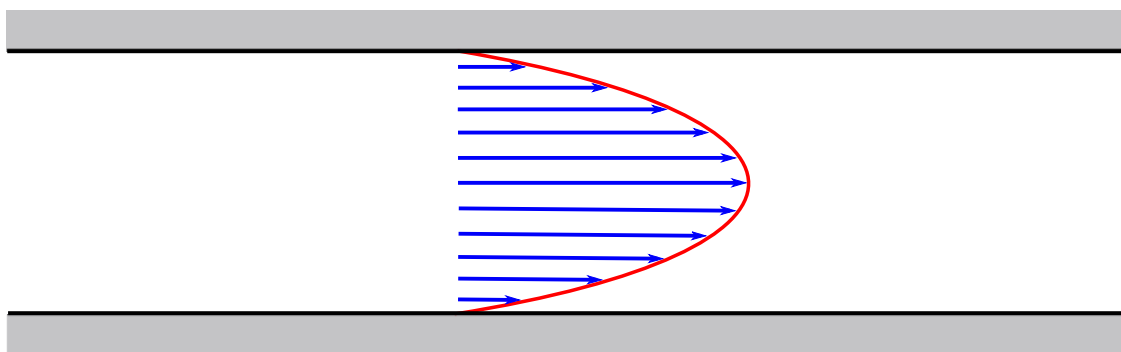
$$D_h = \frac{4 \cdot \frac{\pi D^2}{4}}{\pi D} = D, \quad (25)$$

kde D je priemer kanála. Pre kanály s obdĺžnikovým prierezom platí:

$$D_h = \frac{4ab}{2a + b}, \quad (26)$$

kde a a b sú šírka a výška kanála. Pre $b \gg a$ platí, že $D_h = 4a$ [98].

Medzi jednotlivými vrstvami toku pôsobí šmykové trenie, ktorého veľkosť je závislá od viskozity tekutiny. Za predpokladu, že pri hraniciach je nulová rýchlosť, v kanáloch s bočnými stenami vzniká tzv. Poiseuilleov laminárny tok v tvare paraboly (Obr. 18).



Obr. 18: Poiseuille-Hagenov laminárny tok.

2.8.2 Objemový prietok

V kanáloch sa rýchlosť tekutiny často uvádza pomocou objemového prietoku. Ten je definovaný ako množstvo tekutiny prechádzajúce daným prierezom za jednotku času:

$$Q = \frac{\partial V}{\partial t}, \quad (27)$$

kde ∂V je objem tekutiny za časová úsek ∂t . Pre výpočet je vhodnejší tvar:

$$Q = v \cdot A, \quad (28)$$

kde v je rýchlosť tekutiny a A je obsah prierezu, v ktorom objemový prietok meriame. Pri ustálenom prúdení *ideálnej kvapaliny* v uzavretom kanáli je objemový prietok na všetkých prierezoch kanála rovnaký. *Ideálna kvapalina* je nestlačiteľná a má nulové vnútorné trenie.

Inokedy je známy rozdiel tlakov na začiatku a na konci kanála. Pre nestlačiteľnú tekutinu v kanály s konštantným kruhovým prierezom, kde je laminárny tok a tekutina nezrýchľuje, platí tzv. Hagen–Poiseuille rovnica [64]:

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{8\nu Q}{\pi R^4}, \quad (29)$$

kde $\frac{\Delta P}{L}$ je rozdiel tlaku medzi začiatkom a koncom kanála, L je dĺžka kanála, ν je dynamická viskozita tekutiny, Q je objemový prietok a R je priemer kanála.

V kanáloch so štvoruholníkovým prierezom platí:

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{12\nu Q}{wh^3 \left[1 - 0,63 \frac{h}{w} \tanh\left(1,57 \frac{w}{h}\right)\right]}, \quad (30)$$

L je dĺžka kanála, ν je dynamická viskozita tekutiny, Q je objemový prietok a w a h sú šírka a výška kanála.

2.9 Záver

Kapitola ponúkla ucelený pohľad na problematiku vývoja modelu krvi na úrovni vnorených elastických objektov. Na začiatku boli uvedené základné poznatky o zložení krvi nutné k pochopeniu objektu modelovania. Predstavené boli rôzne prístupy k modelovaniu krvi a prehľad existujúcich modelov. Najväčšia časť kapitoly je venovaná popisu konkrétneho modelu a jeho implementácie v *open source* softvéri. Tento model budeme v práci ďalej používať, a preto sme popísali aj doposiaľ používané metódy na nastavenie a kalibráciu jeho základných parametrov. Popísali sme možnosti využitia modelu pre praktické aplikácie a predstavili sme aplikačné štúdie, na ktoré bol model zatiaľ použitý. V ďalšej časti sú popísané používané spôsoby validácie iných modelov červenej krvinky, doteraz spravená validácia nášho modelu a možné budúce spôsoby validácie s ich výhodami aj nevýhodami. Posledná časť bola venovaná fyzikálnym charakteristikám toku tekutiny v kanáloch.

V ďalších kapitolách sú popísané vlastné výsledky práce smerujúce k naplneniu cieľov práce tak, ako boli definované v úvode.

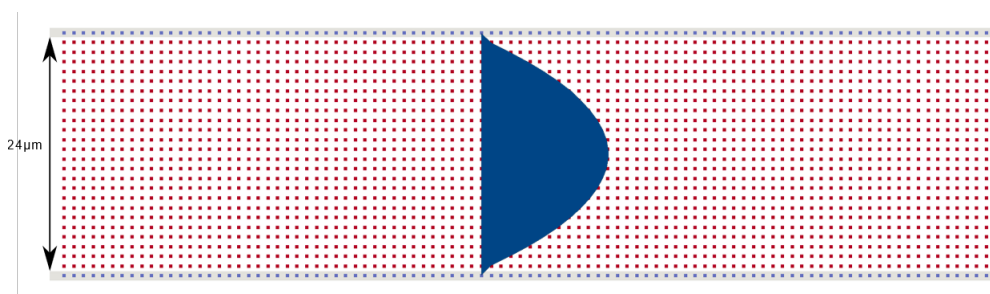
3 Analýza a nastavenie parametrov modelu tekutiny

Správanie sa tekutiny je pri experimentoch v mikrofluidických zariadeniach kľúčové. V tejto kapitole sa pozrieme na model tekutiny a niektoré jeho parametre, ktorých nastavenie nie je úplne zrejmé, a ktoré môžu byť zdrojom nepresností a odchýlok od reality. V ďalšej časti kapitoly sú uvedené výsledky štúdie, kde sme v kanáloch mikrofluidických zariadení rôznych tvarov merali a testovali správanie tekutiny v modeli vzhľadom na objemový prietok.

3.1 Vplyv diskretizácie tekutiny na objemový prietok

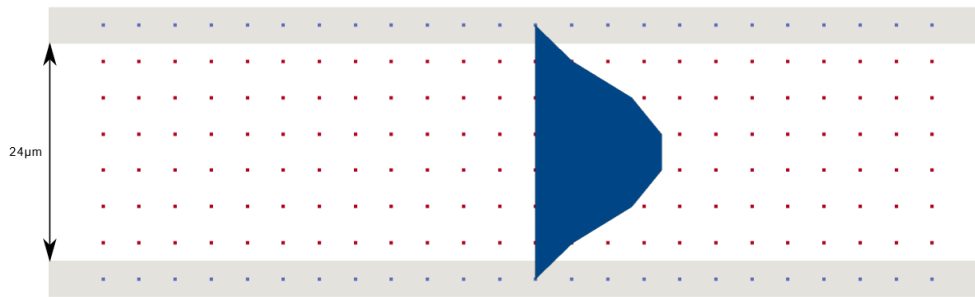
Podobne ako v [29] je v tejto časti vykonaná jednoduchá štúdia, kde meriame objemový prietok a čas ustálenia pre rôzne parametre priestorového kroku mriežky tekutiny `grid`. V spomínanom článku boli testované len veľkosti `gridu` 1 a 2 μm .

Pre potreby experimentu sme vytvorili jednoduchý kanál s dolnou a hornou stenou s rozmermi 24 x 24 x 96 μm . Tekutina bola pustená externou silou v x smere. Medzi dvoma stenami sa vytvoril Poiseuilleov tok, popísaný v časti 2.8.1. Objemový prietok sme počítali ako integrál profilu rýchlosti tekutiny. Rýchlostný profil v dvojdimensionálnej podobe v kolmom reze prechádzajúcom stredom je znázornený na Obr.19 a Obr.20.



Obr. 19: Diskretizácia tekutiny s `grid` = 0,5 a 2D ilustrácia objemového prietoku.

Takýto výpočet objemového prietoku však nie je úplne presný. Na obrázkoch vidíme, že vzhľadom na spôsob modelovania hraníc tekutiny (popísaný v časti 2.4.3) je nenulová rýchlosť aj vo vnútri prekážok. V skutočnosti by ale na hranici mala byť nulová rýchlosť. Vypočítaný objemový prietok v sebe zahŕňa aj „objem“ tekutiny v prekážkach a môže sa líšiť od reálneho objemového prietoku, ktorý chceme simulovať.



Obr. 20: Diskretizácia tekutiny s $\text{grid} = 4$ a 2D ilustrácia objemového prietoku.

Simulácia bežala so simulačným krokom $0,2 \mu\text{s}$ a objemový prietok sa počítal každých 200 krokov. Simulácia sa zastavila, keď sa objemový prietok zmenil oproti predchádzajúcemu meraniu o menej ako 1 %. Výsledky vidíme v Tab. 1.

a_{grid}	0.5	1	2	3	4
objemový prietok 1 $[\frac{\mu\text{m}^3}{\mu\text{s}}]$	898,51	878,16	835,62	790,75	743,91
rozdiel [%]	0,00	-2,27	-7,00	-11,99	-17,21
maximálna rýchlosť $[\frac{\mu\text{m}}{\mu\text{s}}]$	0,02349	0,02343	0,02319	0,02278	0,02221
rozdiel [%]	0,00	-0,26	-1,30	-3,03	-5,45
simulačný čas $[\mu\text{s}]$	824	824	824	824	824
dĺžka simulácie [s]	9661	1384	374	243	204

Tab. 1: Výsledky analýzy objemového prietoku pri rôznej diskretizácii tekutiny.

Z tejto analýzy vyplýva, že pri počítaní objemového prietoku navrhnutou metódou si musíme byť vedomí malej odchýlky od skutočného objemu modelovanej tekutiny tečúcej mimo stien. Pri väčších kanáloch je však táto chyba zanedbateľná.

Ďalej z výsledkov vyplýva, že dvojnásobné zjemnenie mriežky tekutiny predĺži čas výpočtu približne osemnásobne. Pri voľbe veľkosti diskretizácie modelu tekutiny teda musíme vždy zvoliť kompromis medzi presnosťou a výpočtovým časom.

3.2 Objemový prietok v komplexnejších kanáloch

V predchádzajúcej časti sme použili veličinu objemový prietok ako kritérium pre porovnanie modelov s rôznou diskretizáciou. V praxi, však býva situácia opačná. Ak chceme simulovať určitý laboratórny experiment, musíme poznať atribúty použitej kvapaliny. Niektoré, ako viskozita či hustota, sa dajú priamo nastaviť ako ekvivalentné parametre modelu. Iné, ako hematokrit, zasa jednoducho počtom objektov v simulácii. Pri rýchlosti tekutiny, čo je kľúčová vlastnosť pri skúmaní pohybu plávajúcich objektov, je to však zložitejšie. Často vieme informáciu o objemovom prietoku a musíme nastaviť také hodnoty vstupných parametrov modelu, aby sme požadovaný prietok dosiahli. Preto sme v [65] skúmali závislosť objemového prietoku a externej sily, ktorou rozhýbavame tekutinu (popísaná v časti 2.4.3, Obr. 12) v kanáloch používaných počas laboratórnych biologických experimentov. Je predpoklad, že objemový prietok je od externej sily lineárne závislý v rozsahu rýchlostí tekutiny, ktoré sa pri experimentoch bežne vyskytujú. Ak by to platilo, želaný objemový prietok by sa dal získať vďaka jednej testovacej simulácii. Pre tento účel sme vykonali niekoľko simulácií v troch rôznych kanáloch. Simulačný parameter vonkajšej sily bol nastavený na rôzne hodnoty, aby sa overil lineárny vzťah medzi objemovým prietokom a simulačným parametrom. Najskôr sme testovali objemový prietok v kanáli iba s tekutinou, potom aj s modelmi červených krviniek.

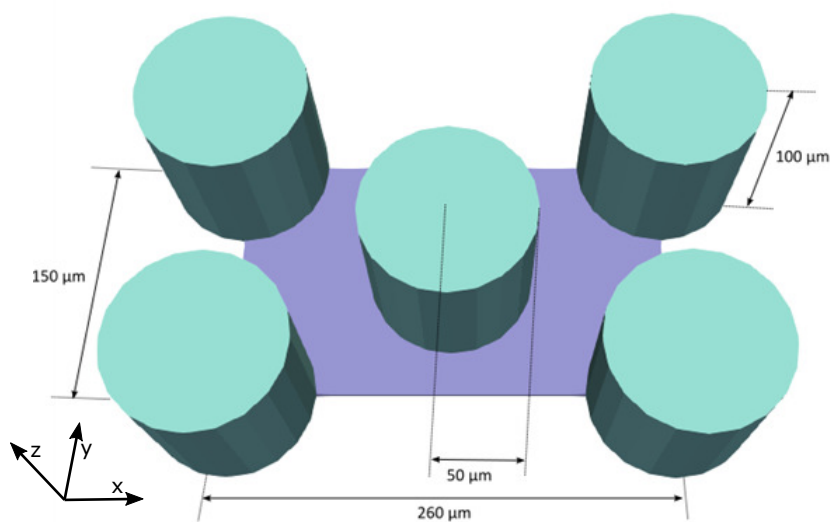
3.2.1 Popis simulačných experimentov

Prvý testovaný kanál je inšpirovaný prácami [74] a [55]. Obidva články sa zaoberajú zachytávaním cirkulujúcich rakovinových buniek. Na tento účel používajú mikrofluidické zariadenia s kanálom s periodickým polom valcových stĺpikov potiahnutých protilátkou. Rakovinové bunky sa pri kontakte s protilátkou na stĺpik prilepia, zatiaľ čo bežné bunky nie.

V práci [74] mikrofluidické zariadenie obsahuje valcové prekážky s polomerom $50 \mu m$. Prekážky sú umiestnené v rovnostrannom trojuholníkovom usporiadaní s $50 \mu m$ vzdialenosťou medzi prekážkami a $50 \mu m$ posunom po každých 3 radoch. Zariadenie má hĺbku $100 \mu m$. Aktívna oblasť zachytávania laboratórneho zariadenia bola $19 mm \times 51 mm$. Objemový prietok v zariadení bol približne $1-2 ml/h$.

V práci [55] boli experimenty vykonané na zariadení GEDI. To obsahuje valcové prekážky s polomerom $80 \mu m$. Medzery medzi prekážkami sú veľké $100 \mu m$ a každý nasledujúci riadok je posunutý o $7 \mu m$. Zariadenie má hĺbku $100 \mu m$, šírku $8 mm$ a dĺžku $25 mm$. Objemový prietok udržiavaný v zariadení bol $1 ml/h$.

Simulovať celé zariadenia takých rozmerov by bolo výpočtovo veľmi náročné. Vďaka periodicite popísaných kanálov nám však stačí simulovať len ich periodicky sa opakujúcu časť bez bočných stien (vysvetlené v časti 2.4.3 a na Obr. 17). Topológia simulačného kanála je uvedená na Obr. 21. Polomer prekážok je $50 \mu m$, rozmer medzery medzi prekážkami je $50 \mu m$ a prekážky sú umiestnené v rovnostrannom trojuholníkovom poli. Simulačný kanál má hĺbku $100 \mu m$, šírku $150 \mu m$ a dĺžku $260 \mu m$. Prítomná bola horná a dolná stena, v smeroch x a y boli periodické podmienky. Objemový prietok, ktorý by mal zodpovedať $1 ml/h$ pre celé zariadenie s priemerom $8 mm$, zodpovedá $4.47 \mu m^3/\mu s$ pre nami zvolený výsek. Tento kanál budeme ďalej označovať ako I.

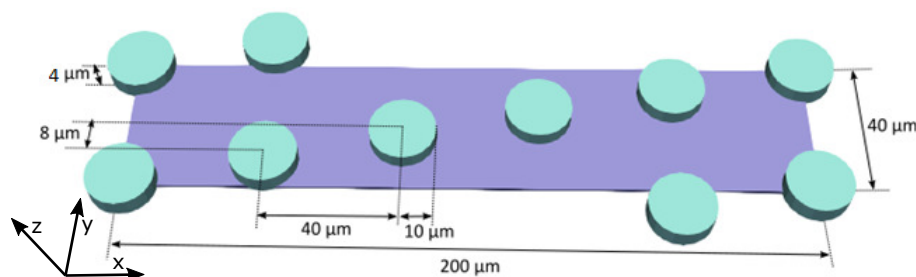


Obr. 21: Tvar simulačného kanála I inšpirovaný [74] a [55].

Druhý testovaný kanál je inšpirovaný zariadením používaným na detekciu krvných parazitov [59]. Cieľom je separácia parazitov *T. cyclops* od erytrocytov a leukocytov v ľudskej krvi pomocou štruktúry prekážok, ktoré triedia objekty v krvi podľa ich veľkosti. Mikrofluidické zariadenie sa skladá z 3 častí. Prvá časť oddeľuje veľké leuko-

cyty od menších erytrocytov a parazitov, ktoré majú podobné rozmery. Druhá časť zariadenia umiestňuje erytrocyty a parazity blízko stien zariadenia. A posledná časť zariadenia udržuje erytrocyty blízko hraníc, zatiaľ čo parazity sa dostávajú do stredného prúdu zariadenia. Simulovaný kanál je inšpirovaný druhou časťou mikročipu.

Túto druhú časť tvorí kanál s valcovými prekážkami s polomerom približne $10\ \mu\text{m}$. Medzera medzi prekážkami v rámci jedného radu je približne $20\ \mu\text{m}$ a medzera medzi radmi je približne $20\ \mu\text{m}$. Každý rad je posunutý o jednu pätinu vzdialenosti medzi stredovými osami prekážok, čo znamená približne $8\ \mu\text{m}$. Hĺbka zariadenia je $3.5\ \mu\text{m}$. Celková šírka zariadenia je približne $2\ \text{mm}$. Objemové prietoky použité v experimente boli v rozmedzí od 2 do $4\ \mu\text{l}/\text{min}$. Periodicky sa opakujúca časť kanála tohto zariadenia je uvedená na Obr. 22. Polomer prekážok je $10\ \mu\text{m}$. Rozpätie medzi prekážkami v rade a vzdialenosť medzi radmi je rovnako $20\ \mu\text{m}$. Každý riadok je posunutý o $8\ \mu\text{m}$. Hĺbka zariadenia je $4\ \mu\text{m}$. Celý simulovaný výsek má rozmery $200 \times 40 \times 4\ \mu\text{m}$. V simulácii bola prítomná horná a dolná stena, v smeroch x a y sa tekutina a bunky správali periodicky. Objemový pretok zodpovedajúci 2 až $4\ \mu\text{l}/\text{min}$ je pre daný výsek približne $0,7$ až $1,3\ \mu\text{m}^3/\mu\text{s}$. Tento kanál budeme ďalej v texte označovať ako II.

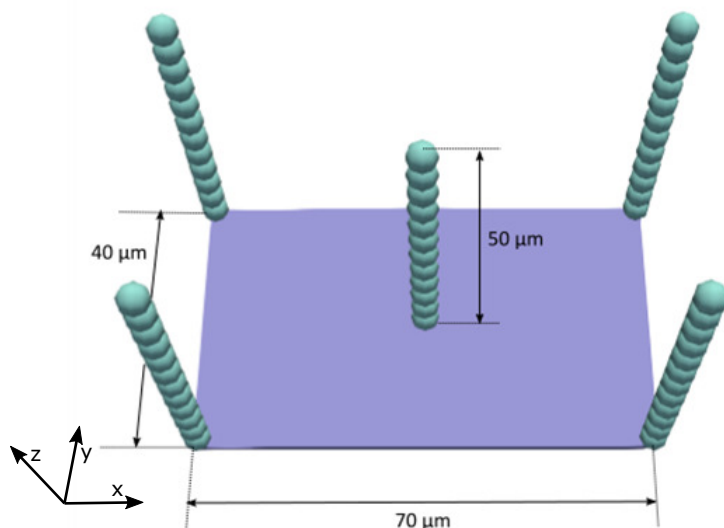


Obr. 22: Tvar simulačného kanála II inšpirovaný [59].

Posledná topológia je inšpirovaná prácou [84] a [60]. V oboch sa používajú magnetické guľôčky na vytvorenie stĺpkových prekážok. Myšlienkou, rovnako ako v [74] a [55], je použitie protilátok, ktoré by mohli zachytiť bunky a udržať ich prilepené na prekážke. Výhodou magnetických guľôčok je to, že nemusia byť ošetrované protilátkami vo vnútri kanála počas alebo po jeho konštrukcii, ako sa to robí v zariadeniach s valcovými prekážkami. Magnetické guľôčky môžu byť pripravené oddelene a až následne umiestnené do zariadenia, kde sa usporiadajú do správnej polohy pomocou externého magnetického poľa. Magnetické guľôčky používané v [60] majú priemer $4,5\ \mu\text{m}$.

Na spodnej stene kanála je umiestnený magnetický vzor, ktorý definuje rozmiestnenie stĺpikových prekážok. Keď sa guľôčky do kanála nalejú, aktivuje sa magnetické pole a guľôčky vytvoria reťazce na predom definovaných miestach v tvare rovnostranného trojuholníkového poľa. Vzďialenosť medzi reťazkami je $40 \mu m$. Hĺbka kanála je $50 \mu m$ široký je $0,5 mm$ a dlhý $10 mm$. Objemový prietok v kanáli pri laboratórnych pokusoch je niekoľko $\mu l/min$.

Simulovaný výsek inšpirovaný touto geometriou (Obr. 23) má rozmery $40 \times 70 \mu m$. Obsahuje päť reťazcov 12 perličiek s polomerom $2,25 \mu m$. V rohoch sú štyri reťazce a jeden je v strede. Vzhľadom na to, čo sme o modelovaní hraníc a prekážok uviedli v 2.4 je zrejmé, že model reťazkových prekážok dobre nezachytí ich skutočný tvar. To ale pre účel týchto simulačných experimentov nie je problém. Hĺbka kanála je $50 \mu m$. Simulačný kanál obsahoval spodnú a hornú stenu, v smeroch x a y boli periodické podmienky. Objemový prietok pre simulovaný výsek zodpovedajúci laboratórnemu pokusu je stanovený na $4 \mu m^3/\mu s$. Tento kanál budeme ďalej označovať ako III.



Obr. 23: Tvar simulačného kanála III inšpirovaný [84] a [60].

Dĺžka každého zo simulačných experimentov zodpovedala 380 000 simulačným krokom, čo s časovým krokom $0,2 \mu s$ zodpovedá reálnemu času experimentu $0,076 s$. Všetky experimenty boli vykonané v simulačnom softvéri ESPResSo v jazyku Tcl. Tekutina bola diskretizovaná trojrozmernou pravidelnou mriežkou s priestorovým kro-

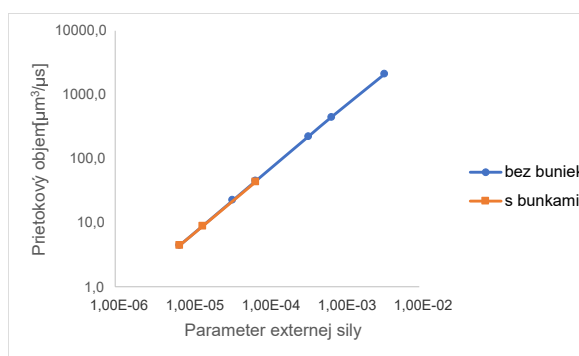
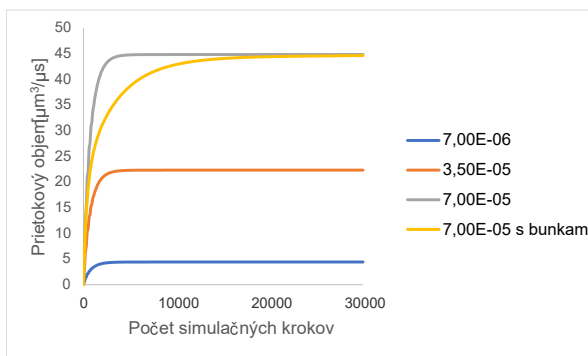
kom gridom veľkosti $1 \mu\text{m}$. Viskozita tekutiny bola $1,5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ a hustota bola $1000 \text{ kg}/\text{m}^3$, čo zodpovedá hodnotám krvnej plazmy. Parameter interakcie medzi kvapalinou a objektom nazývaný `friction` bol $0,0259$. Ako model každej z červených krviniek sme vybrali povrchovú sieť so 141 uzlami vytvorenú podľa rovnice analytického tvaru (vzťah (1)) v softvéri Gmsh ([54]) a rozmermi $7,82 \mu\text{m} \times 7,82 \mu\text{m} \times 2,56 \mu\text{m}$.

Na začiatku sme pre každý kanál pomocou niekoľkých simulácií našli veľkosť parametra externej sily tekutiny, ktorý zodpovedal objemovým prietokom používaným v laboratórnych pokusoch. Vo všetkých kanáloch tiekla tekutina v x -ovom smere, preto aj externá sila, ktorou sme tekutinu rozhýbali mala len x -ovú zložku. Výslednú silu sme potom pre každý kanál postupne zväčšovali a sledovali vývoj rýchlosti tekutiny. V každom kanáli sa objemový prietok meral v troch rôznych prierezoch, v rovine yz a to ako súčet x -ových zložiek rýchlostí tekutiny v uzloch tekutinovej mriežky v danom priereze (integrál rýchlostného profilu). Pre ideálnu tekutinu by mal byť objemový prietok rovnaký v každom priereze kanála. Jediná nezanedbateľná odchýlka medzi dvoma rezmi (nad 5%) nastala v kanáli II, pri 100x väčšej aplikovanej sile ako pôvodná. V ďalších častiach budeme pracovať s objemovými prietokmi meranými v prierezoch, ktoré neprechádzajú cez prekážky.

3.2.2 Výsledky

Pre kanál I bola počiatočná externá sila pre rozhýbanie tekutiny nastavená na hodnotu $0,000007$, čo zodpovedá objemovému prietoku $4.47 \mu\text{m}^3/\mu\text{s}$. Hodnota parametra vonkajšej sily sa potom vynásobila multiplikátormi: 5, 10, 50, 100 a 500. Výsledky sú uvedené na Obr.24 a Obr.25.

Ako je vidieť z Tab. 2, objemový prietok je lineárne závislý od parametra vonkajšej sily pre malé multiplikátory. Linearita je výrazne narušená, ak multiplikátor dosiahne hodnotu 500. Percentuálny rozdiel medzi získanou a očakávanou hodnotou je asi 7,5%. Ďalšie pozorovanie, ktoré môžeme urobiť, je podobnosť medzi hodnotami objemových prietokov získaných zo simulácií bez červených krviniek a hodnotami získanými zo simulácií s červenými krvinkami. Vzhľadom na veľkosť kanála, a s tým spojenú veľkú výpočtovú náročnosť, bol hematokrit v simulácii nastavený na hodnotu približne 0,5 %. Je zrejmé, že modely s bunkami potrebujú viac času na dosiahnutie stabilizovaného



Obr. 24: Počet krokov potrebných pre ustálenie objemového prietoku v kanáli I pre rôzne hodnoty externej sily. **Obr. 25:** Vzťah medzi hodnotou parametra externej sily a objemovým prietokom v kanáli I bez buniek.

Tab. 2: Objemové prietoky a prislúchajúce hodnoty parametra externej sily pre kanál I.

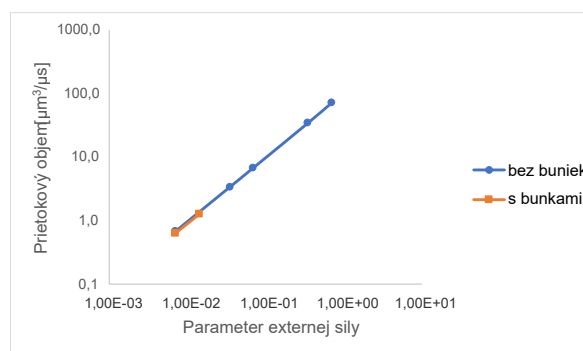
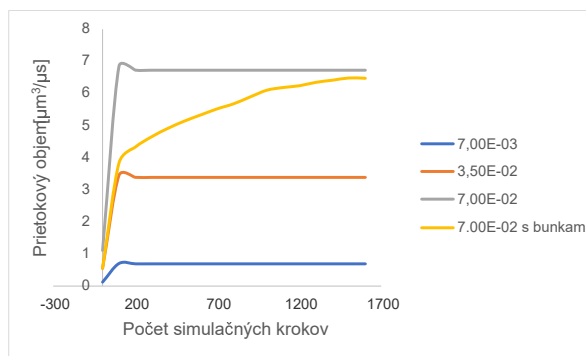
Ext_sila	Mult.	ObjPr [$\mu\text{m}^3/\mu\text{s}$]	Mult. exp.	Dif. [%]
bez buniek				
0,000007	1	4,5	1,0	0,0%
0,000035	5	22,4	5,0	0,0%
0,00007	10	44,8	10,0	0,0%
0,00035	50	223,6	49,9	-0,1%
0,0007	100	445,7	99,6	-0,4%
0,0035	500	2071,4	462,7	-7,5%
s bunkami				
0,000007	1	4,4	1,0	0,0%
0,000014	2	8,9	2,0	0,0%
0,00007	10	44,5	9,9	-0,6%

objemového prietoku, ale konečná hodnota je podobná simulácii bez buniek.

Pre kanál II bola počiatočná hodnota externej sily nastavená na hodnotu 0,007, čo zodpovedá objemovému prietoku je $0,67 \mu\text{m}^3/\mu\text{s}$. Príklady ustálenia objemového prietoku vidíme na Obr. 26. Nastavený hematokrit pre tento kanál mal hodnotu okolo 20%.

Z Obr. 27 a Tab. 3 môžeme tvrdiť, že objemový prietok je aj v tomto kanáli závislý od parametra externej sily.

Simulácie bez buniek s multiplikátorom 500 v kanáli II skončili skôr, než sa očakávalo, kvôli číselnej nestabilite. Očakávaná hodnota objemového prietoku v tejto simulácii



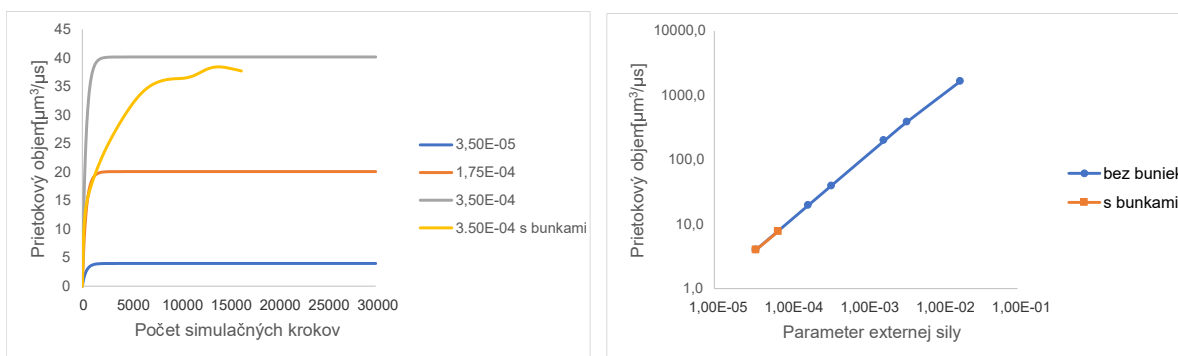
Obr. 26: Počet krokov potrebných pre ustálenie objemového prietoku v kanáli II pre rôzne hodnoty externej sily. **Obr. 27:** Vzťah medzi hodnotou parametra externej sily a objemovým prietokom v kanáli II bez buniek.

Tab. 3: Objemové prietoky a prislúchajúce hodnoty parametra externej sily pre kanál II.

Ext_sila	Mult.	ObjPr [$\mu m^3/\mu s$]	Mult. exp.	Dif. [%]
bez buniek				
0,000007	1	0,7	1,0	0,0%
0,000035	5	3,4	5,0	0,1%
0,00007	10	6,7	10,0	0,2%
0,00035	50	34,1	50,7	1,4%
0,0007	100	70,1	104,3	4,3%
s bunkami				
0,000007	1	0,6	1,0	0,0%
0,000014	2	1,3	2,1	3,0%

však zodpovedá $1000 \mu l/min$, hodnote 500 krát vyššej ako je hodnota skutočného objemového prietoku v laboratórnom experimente. V tomto kanáli tiež nezbehla simulácia s bunkami a s rýchlosťou tekutiny, ktorá je 10 krát väčšia ako pôvodná. Dôvod mohol nastať pri integrácii kvôli zlému pomeru rýchlosti tekutiny, časového kroku a diskretizácie tekutiny.

V kanáli III bola počiatočná hodnota parametra vonkajšej sily nastavená na 0.000035, čo má za následok objemový prietok $4.02 \mu m^3/\mu s$. Výsledky získané postupným násobením tohto parametra sú uvedené na Obr. 28, Obr. 29.



Obr. 28: Počet krokov potrebných pre ustálenie objemového prietoku v kanáli III pre rôzne hodnoty externej sily. **Obr. 29:** Vzťah medzi hodnotou parametra externej sily a objemovým prietokom v kanáli III bez buniek.

Tab. 4: Objemové prietoky a prislúchajúce hodnoty parametra externej sily pre kanál III.

Ext_sila	Mult.	ObjPr [μm ³ /μs]	Mult. exp.	Dif. [%]
bez buniek				
0,000007	1	4,0	1,0	0,0%
0,000035	5	20,1	5,0	0,0%
0,00007	10	40,2	10,0	0,0%
0,00035	50	199,6	49,6	-0,7%
0,0007	100	391,8	97,4	-2,6%
0,0035	500	1644,6	409,1	-18,2%
s bunkami				
0,000007	1	4,0	1,0	0,0%
0,000014	2	7,8	2,0	-2,1%

Výsledky v Tab. 4 tiež potvrdzujú lineárnu závislosť hodnoty parametra externej sily a objemového prietoku. Použitý hematokrit v simulácii s bunkami bol 15%.

Linearita pre kanál III platí pre multiplifikátory menšie a rovné ako 100. Pre multiplifikátor 500 je rozdiel medzi získaným a očakávaným objemovým prietokom už približne 18%. Taktiež prítomnosť buniek výsledný objemový prietok výrazne ovplyvnila. Simulácia s bunkami s očakávanou rýchlosťou 10 krát väčšou ako pôvodná nezbehla. Dôvod bude pravdepodobne rovnaký ako pri predchádzajúcom kanáli.

3.3 Záver

V tejto kapitole sme analyzovali model tekutiny, hlavne z hľadiska diskretizácie, nastavenia presných hraníc a rýchlosti vzhľadom na simulovaný experiment. Opísaná je tu aj štúdia, kde sme testovali lineárnu závislosť objemového prietoku na parametri vonkajšej sily, ktorou sa model tekutiny rozhybava. Túto hypotézu sme testovali v troch rôznych kanáloch inšpirovaných existujúcimi laboratórnymi experimentami. Výsledky ukazujú, že pre rozsah hodnôt bežne používaných v laboratóriu hypotéza platí. Pri objemových prietokoch, ktoré výrazne presahujú laboratórne podmienky, napríklad viac ako 100-násobne vyššia rýchlosť tekutiny, nie je linearita zachovaná. Ďalšie zistenie spočíva v tom, že pri vysokých hodnotách vonkajšieho parametra sily sú simulácie menej stabilné, najmä simulácie s bunkami. Zaujímavé pozorovanie sa dá urobiť z času potrebného na to, aby simulácia dosiahla stabilizovaný objemový prietok. Pri simuláciách bez buniek je táto doba 2 až 3 krát kratšia ako pri simuláciách s rovnakou topológiou, ale s bunkami v tekutine.

4 Analýza modelu červenej krvinky

Tvar červenej krvinky je jednou z jej zásadných vlastností. V modeli ju zachytáva povrchová sieť, ktorá môže mať rôzny počet uzlov a tie môžu byť na povrchu rôzne rozmiestnené. Záleží to od spôsobu, ako bola sieť vytvorená. Referenčný tvar krvinky je opísaný v 2.1, tento tvar môžeme získať dvoma procesmi. Prvý spôsob ako získať tvar relaxovanej červenej krvinky je explicitne, keď poznáme analytickú rovnicu popisujúcu jej povrch (vzťah (1)). Na povrchu potom môžeme vygenerovať body reprezentujúce vrcholy trojuholníkovej siete.

Siete, ktoré v našich simuláciách používame najviac, boli vytvorené touto metódou. V softvéri Gmsh ([54]) bol vygenerovaný jeden oktant krvinky podľa analytického tvaru a ten bol následne klonovaný, aby pokryl jej celý povrch. Celý postup je popísaný v [61]. Čím viac vrcholov (trojuholníkov) má povrchová sieť, tým je jej tvar presnejší, avšak zároveň sa zvyšuje výpočtová náročnosť. Preto sa najmä pri simuláciách s väčším počtom krviniek používajú siete s malým počtom vrcholov, pri simuláciách malého počtu krviniek si môžeme dovoliť použiť aj siete s väčším počtom vrcholov. Analýza výpočtovej náročnosti podľa počtu vrcholov povrchových sietí a počtu buniek bola urobená v [38].

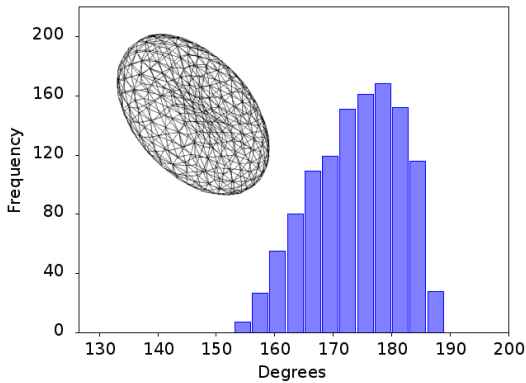
4.1 Štatistická analýza povrchových sietí

V prírode sa červená krvinka vyvinie z retikulocyту, ktorý má guľovitý tvar a postupným zmenšovaním objemu sa dostane do stavu s minimálnou potenciálnou energiou. Numerická metóda pre vytvorenie takéhoto bikonkávneho tvaru z gule, inšpirovaná biologickým dozrievaním erytrocytov bola skúmaná v [97].

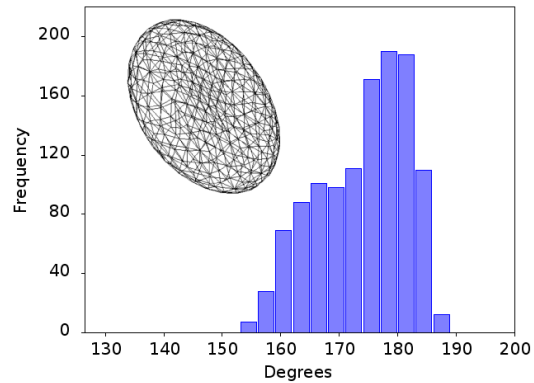
Pomocou nášho modelu je tiež možné simulovať takýto proces, ktorého výsledkom je povrchová sieť podobná tvaru červenej krvinky. Takýto scenár nazveme „vyfukovací“ (deflačný), kedy guli so žiadaným povrchom postupne znižujeme objem na potrebnú hodnotu.

Podobne môžeme uplatniť „nafukovací“ (inflačný) scenár, kedy guli so žiadaným objemom postupne zvyšujeme povrch na požadovanú hodnotu. V [39] sme sa zaoberali porovnaním takto vzniknutých povrchových sietí (Obr. 30 a Obr. 31) so sieťou vyge-

nerovanou podľa analytického tvaru.



Obr. 30: Sieť vytvorená nafukovacím experimentom, histogram uhlov.

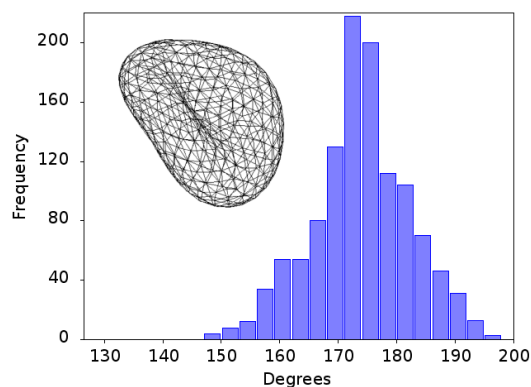


Obr. 31: Sieť vytvorená vyfukovacím experimentom, histogram uhlov.

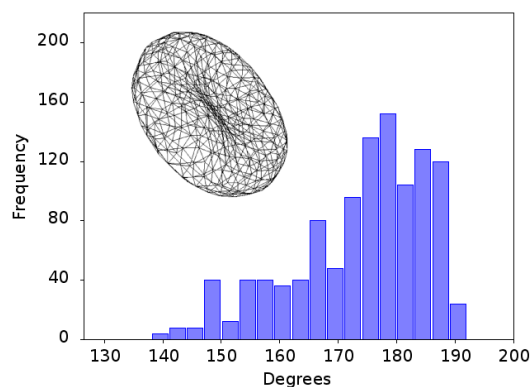
Vizuálna kontrola je vhodná pre odhalenie kvalitatívnych chýb, nie je však postačujúca na posúdenie výsledku. Tou môže byť v prvom rade hodnota povrchu a objemu získaných povrchových sietí, ktoré by mali korešpondovať s hodnotami biologickej bunky. Správne hodnoty pre tieto parametre však môžeme získať vhodným nastavením a riadením simulácie. Ďalšou kontrolou správnosti získaného tvaru bunky je overenie jej zakrivenia. Vzhľadom na diskretizáciu povrchu trojuholníkovou sieťou sa prirodzene ponúka možnosť charakterizovať jej krivosť pomocou štatistickej analýzy uhlov zvieraných incidentnými trojuholníkmi triangulácie. Na Obr. 30 a Obr. 31 vidíme histogram hodnôt týchto uhlov pre inflačný aj deflačný scenár a v Tab. 5 hodnoty ich maxima, minima, priemeru a smerodajnej odchýlky: ide o vnútorné uhly, hodnoty nad 180° zodpovedajú konkávnym a menšie ako 180° konvexným častiam povrchu bunky. Získané dáta naznačujú ich výraznú zhodu a teda aj podobnosť takto vytvorených sietí.

Tento výsledok sme posúdili aj štatistickými testami výberu dvoch zhodných empirických rozdelení. Nutným predpokladom porovnania výsledkov je použitie zrovnateľných sietí s takmer zhodným počtom vrcholov a susediacich trojuholníkov, ktorých veľkosť a tvar je blízky rovnostranným trojuholníkom. Naše modely tento predpoklad spĺňali a pre prácu sme mali k dispozícii vhodné regulárne siete. Konzistentnosť spôsobu charakterizácie zakrivenia červenej krvinky štatistikou rozdelenia uhlov trojuholníkovej povrchovej siete sme potom testovali dvomi ďalšími spôsobmi. Pri prvej sme

skúmali zmenu tejto charakteristiky (Obr. 32, Tab. 5) pri deformácii krvinky počas prechodu zúženým kanálom. Vieme odhadnúť, že hodnoty konvexných a konkávných uhlov v strednej deformovanej časti krvinky budú rozťahnuté do väčšieho rozsahu. Tvar histogramu a nárast smerodajnej odchýlky tomu zodpovedá. Druhou metódou je porovnanie histogramu krivosti simuláciou vzniknutej krvinky s povrchovou sieťou vytvorenou explicitne. Tu ale narážame na problém existujúcich triangulácií tohto povrchu. Tie vykazujú značnú pravidelnosť, ktorá sa prejavuje v málo rozptýlených histogramoch, ťažko porovnateľných s výrazne stochastickými trianguláciami „vyfúknutých“ a „nafúknutých“ sietí (Obr. 33).



Obr. 32: Deformovaná sieť, histogram uhlov.



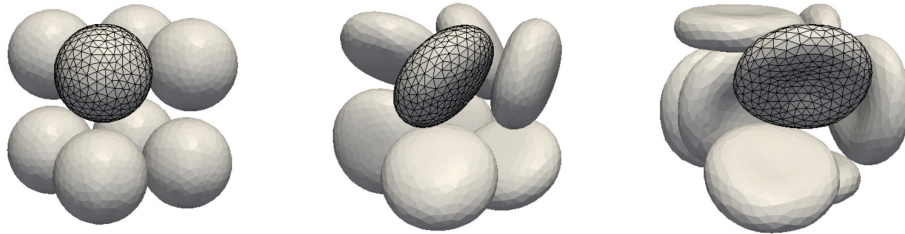
Obr. 33: Krvinka vyrobená explicitne, histogram uhlov.

Tab. 5: Štatistické hodnoty rozloženia uhlov.

siete	min	max	avg	stdev
Nafúknutá sieť	153,60	188,86	174,03	7,68
Vyfúknutá sieť	153,14	188,08	173,98	7,52
Deformovaná explicitná	148,69	197,18	173,91	8,38
Explicitná	140,79	191,67	173,66	11,17

Simulovanie vzniku červenej krvinky by malo v praxi význam najmä pri počiatočnom rozložení (*seeding*) krviniek pri simuláciách krvi s vysokým hematokritom. Počiatočné nasadenie guľ a ich následné nafúknutie je totiž algoritmicky aj výpočtovo menej náročné, ako nasadenie objektov neobvyklých tvarov, akými sú rôzne deformované červené krvinky. Ukážka takéhoto rozmiestnenia červených krviniek v malom

priestore je znázornená na Obr. 34.



Obr. 34: Ukážka seedingu uplatnením inflačného scenára.

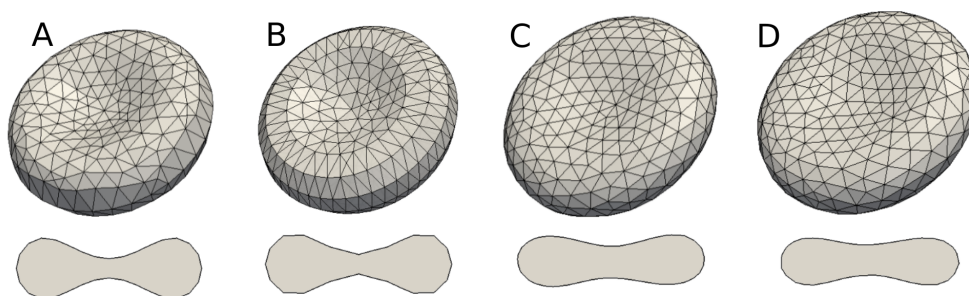
Hodnoty elastických koeficientov pri inflačnom a deflačnom scenári museli byť rádo iné ako ich nakalibrované (interpolované) hodnoty ([95]). Pri použití elastických koeficientov, ktoré mali uspokojivé výsledky pri naťahovacom experimente (popísaný v časti 2.5.1), sme uplatnením inflačného ani deflačného scenára žiadaný tvar červenej krvinky nedostali. Elastické vlastnosti retikulocytu sú pravdepodobne odlišné od elastických vlastností dospeljej krvinky, preto tento experiment nemôžeme považovať za validačný.

Pri *seeding* použitím inflačného a deflačného scenára by sa teda dodatočne museli nastaviť všetkým objektom vhodné hodnoty elastických koeficientov.

4.2 Analýza povrchových sietí červenej krvinky pomocou biologického experimentu

V štúdií ([32]) sme analyzovali povrchové siete červených krviniek pomocou experimentu. Navzájom sme porovnali štyri siete s približne rovnakým počtom vrcholov, ktoré však boli vytvorené rôznym spôsobom (Obr. 35):

- Sieť A má 374 vrcholov. Bola vytvorená v softvéri Gmsh [54]: jeden oktant červenej krvinky bol vygenerovaný podľa známej rovnice analytického tvaru a následne bol klonovaný, aby pokryl celú plochu krvinky.
- Sieť B má 400 vrcholov. Táto sieť je podobná sieti A, ale bola vytvorená v softvéri Salome [13]. Tvar je rovnaký, ale táto sieť má rovnaké horizontálne vzory



Obr. 35: Tvary štyroch testovaných povrchových sietí a ich prierezy.

opakujúce sa po celom okraji bunky.

- Sieť C má 393 vrcholov. Bola vytvorená nafukovacím experimentom z rovnakej povrchovej siete gule ako sieť B.
- Sieť D má 393 vrcholov. Bola vytvorená vyfukovacím experimentom z rovnakej povrchovej siete gule ako siete B a D.

Na týchto sieťach sme testovali aký efekt má rôzny tvar povrchovej siete a rôzne rozmiestnenie vrcholov tejto siete na elastické vlastnosti modelu červenej krvinky. Pre tento účel sme sa rozhodli na každej sieti vykonať natahovací experiment, popísaný v časti 2.5.1. Hodnoty elastických koeficientov (Tab. 6) sme odhadli pomocou lineárnej interpolácie z nakalibrovaných hodnôt ([96]).

Tab. 6: Hodnoty elastických koeficientov testovaných sietí.

počet vrcholov	ks	kb	kal	kag	kv
374	0,004454	0,1107	0,0040	7,291	1,250
393	0,004459	0,1139	0,0039	7,070	1,250
400	0,004460	0,1151	0,0039	6,988	1,250

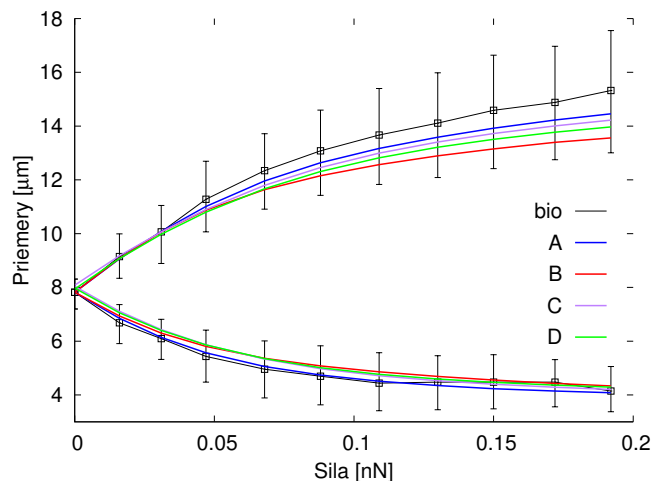
Model krvinky vytvorený pomocou každej siete mal približne rovnaký objem, ale mierne sa líšili v hodnotách povrchu a priemeru. Hodnoty pre relaxované tvary krviniek pre každú sieť sú v Tab. 7.

Na Obr. 36 môžeme vidieť grafické porovnanie výsledkov experimentu pre všetky štyri siete a výsledku biologického experimentu [41]. Aplikovali sme 10 rôznych síl, v

grafe sú zobrazené aj smerodajné odchýlky priemerov pre každú silu získanú z biologického experimentu. Vidíme, že žiadna sieť nemá chybu predĺženia a skrátene oproti biologickej bunke väčšiu ako táto odchýlka. Znamená to, že v simuláciách s červenými krvinkami môžeme použiť hociktorú z týchto povrchových sietí s príslušnými hodnotami elastických koeficientov so štatisticky správnym výsledkom vzhľadom na [41]. Hodnoty SE sú v Tab. 7. Sieť s najväčšou hodnotou SE je sieť B. Problém bude pravdepodobne v jej opakujúcich sa vzoroch. Nie je taká „hladká“ ako ostatné.

Tab. 7: Vybrané parametre testovaných sietí.

sieť	priemer	objem	povrch	štvorcová chyba
mesh A	7,82	90,75	132,91	2,83
mesh B	7,82	90,19	131,46	12,42
mesh C	8,08	90,11	130,25	5,45
mesh D	7,94	90,84	128,68	7,91



Obr. 36: Závislosť zmeny priečného a pozdĺžneho priemeru od aplikovanej externej sily. Čiernou krivkou sú znázornené výsledky z biologického experimentu spolu so smerodajnou odchýlkou hodnôt (biologické krvinky sa navzájom líšia).

4.3 Záver

V tejto kapitole sme analyzovali a porovnávali rôzne povrchové siete modelu červenej krvinky pomocou navrhutej štatistickej metódy a pomocou elastického experimentu. Použili sme aj siete vygenerované podľa známeho analytického tvaru červenej krvinky, ale aj siete vytvorené nafúknutím a vyfúknutím modelu gule. Záver je, že aj takýmto spôsobom vytvorené siete vhodne zachytávajú elastické správanie červenej krvinky a mohli by byť ďalej používané.

5 Štatistické charakteristiky toku červených krviniek

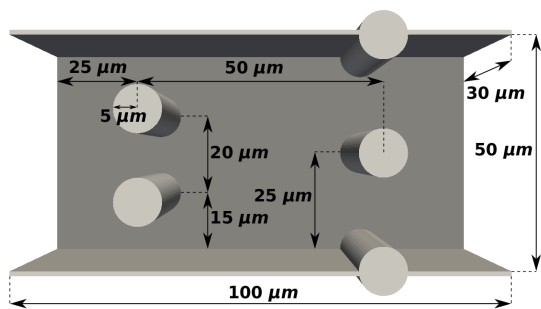
V štúdiu [20] sme navrhli kvantitatívne charakteristiky, ktoré dostatočne popisujú správanie sa červených krviniek počas toku v mikrofluidických zariadeniach. Pomocou týchto charakteristík by sme mali získať kvalifikovanú odpoveď na otázku, či sú dva porovnávané experimenty zhodné alebo nie. Metóda by mala slúžiť na porovnanie simulačných experimentov so vzorovým laboratórnym experimentom, ale aj viacerých simulačných experimentov medzi sebou. V prvom prípade by výsledok takéhoto porovnania slúžil na validáciu modelu, v druhom prípade by nám povedal, či dva modely (resp. nastavenie parametrov jedného modelu), dávajú rovnaké výsledky. Ak áno, ďalej by sme sa mohli rozhodnúť, ktorý z modelov (resp. nastavenia parametrov modelu) budeme ďalej používať, napríklad kvôli časovej úspore.

Vstupné dáta na vytvorenie charakteristík sme navrhli relatívne jednoduché, aby ich bolo možné a prirodzené získať ako výstupy ľubovoľného simulačného modelu, ale aj spracovaním videa z *in vitro* experimentu. Napriek jednoduchosti by mali dáta dostatočne detailne popisovať dynamiku pohybu desiatok až stoviek objektov počas experimentu. Zachytávajú zároveň stochastickosť experimentu, vzájomné interakcie medzi objektami či medzi objektami a kanálom. Priame porovnanie dvoch obdobných sád takýchto dát by nám žiadnu informáciu neprineslo, a preto je potrebné ich štatistické spracovanie, ktoré ich zredukuje do obsahu a formy vhodnej pre porovnanie. Pre ilustráciu sme porovnávali iba výsledky zo simulačných experimentov vykonaných pomocou referenčného modelu s rôznymi parametrami.

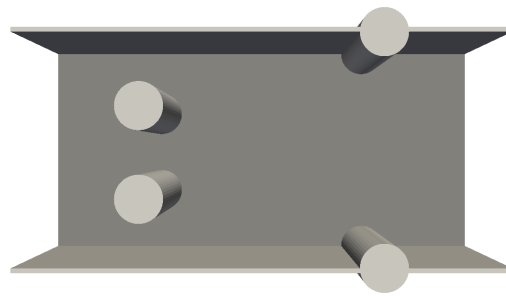
5.1 Popis experimentov

Pre naše potreby sme navrhli topológie kanálov, v ktorých sa krvinky počas toku správajú dostatočne reprezentatívne. Všetky kanály majú tvar kvádra, ktorý má štyri steny a v smere x je otvorený. V tomto smere dochádza k periodickému správaniu, čiže dĺžka kanála je teoreticky neobmedzená (vysvetlené v časti (2.4.3)). Vo vnútri kanálov sú rôzne rozmiestnené cylindrické prekážky. V [20] sme používali 2 typy kanálov, ktoré sú znázornené na Obr. 37, 38.

V článku [21], kde sme navrhli a testovali väčšinu charakteristík, sme použili dáta

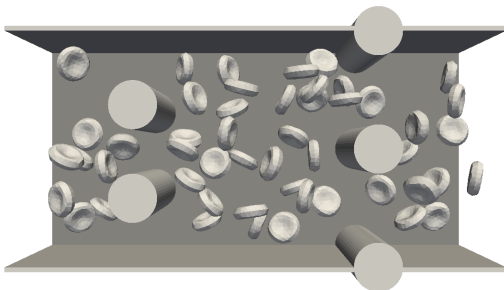


Obr. 37: Tvar a rozmery kanála A.

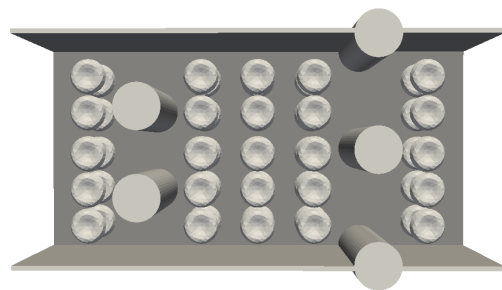


Obr. 38: Tvar kanála B.

zo štyroch experimentov. Tri z nich boli vykonané v kanály A a jeden v kanály B. Do kanála sme vždy umiestnili 50 modelov červených krviniek. Dve simulácie v kanáli A mali rôzne náhodné počiatkové rozmiestnenia buniek (Obr. 39) a ďalej ich budeme označovať ako A50a a A50b. Tretia simulácia v kanály A mala vopred definované pravidelné počiatkové rozmiestnenie a budeme ju označovať ako A50c (Obr. 40). Posledná, štvrtá simulácia bežala v kanály B a mala náhodné počiatkové rozmiestnenie. Ďalej ju budeme označovať ako B50a.

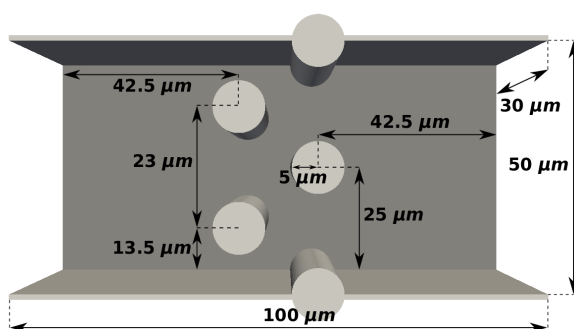


Obr. 39: Príklad náhodného počiatkového rozmiestnenia buniek v kanály A.

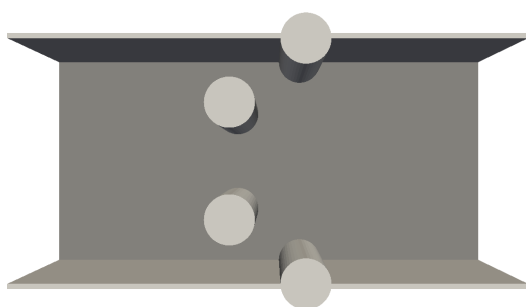


Obr. 40: Pravidelné počiatkové rozmiestnenie buniek v kanály A pre simuláciu A50c.

V článku [87] sme ďalej niektoré charakteristiky overovali a použili sme aj ďalšie topológie kanálov, ktoré budeme označovať C, D a E. V nich sme vždy použili už len náhodné počiatkové rozmiestnenia buniek, no v niektorých experimentoch sme simulovali tok iného počtu buniek. A tak napríklad označeniami C50a a C50b budeme rozumieť simulácie vykonané v kanály C s 50 bunkami, každú s iným náhodným počiatkovým rozmiestnením. Náhodné počiatkové rozdelenia sú vždy unikátne, napr. C50a a D50a nemajú rovnaké počiatkové rozmiestnenia. Pod označením E100a zas budeme rozumieť simuláciu, ktorá bežala v kanály E a bolo v nej 100 buniek.



Obr. 41: Tvar a rozmery kanála C.



Obr. 42: Tvar kanála D.



Obr. 43: Tvar kanála E.

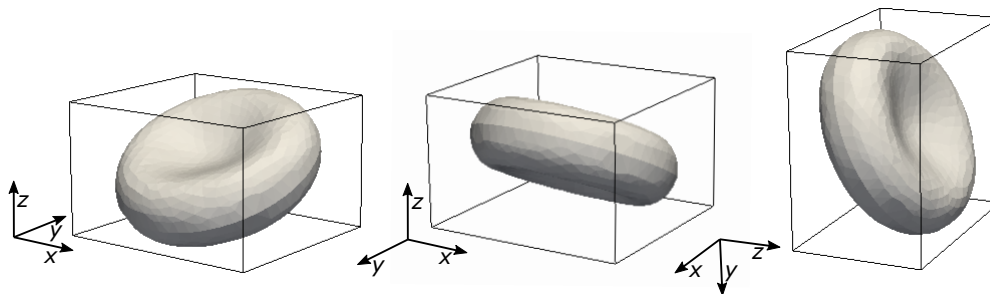
Vo všetkých simuláciách bola tekutina s parametrami $\text{grid}=1 \mu\text{m}$, $\text{tau} = 0,2 \mu\text{s}$, $\text{visc} = 1,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, $\text{dens} = 1000 \text{ kg/m}^3$, $\text{friction} = 0,0269$. Tekutina bola rozhýbaná externou silou, ak neuvedieme inak, tak veľkosťou $\text{ext_force} = 0,005$. Model bunky mal rozmery $7,82 \times 7,82 \times 2,56 \mu\text{m}$, 141 vrcholov, elastické koeficienty mali hodnoty $\text{ks} = 0,0044$, $\text{kb} = 0,0715$, $\text{ka1} = 0,005$, $\text{kag} = 1$, $\text{kv} = 1,25$, hmotnosť bola $8,4 \text{ pg}$. Interakcia medzi bunkami boli modelované pomocou $\text{membrane_collision}$ s parametrami $\text{mc_K} = 0.005$, $\text{mc_n} = 2.0$, $\text{mc_cut} = 0.5$. Interakcia medzi bunkami a prekážkami, resp. stenami pomocou soft_sphere s parametrami $\text{soft_K} = 0.00035$, $\text{soft_n} = 1.0$, $\text{soft_cut} = 0.5$. Integračný krok bol time_step celej simulácie bol rovnaký ako pre tekutinu, teda $0,2 \mu\text{s}$.

5.2 Výstupné dáta z experimentov

V priebehu experimentu boli zo simulačných algoritmov získavané dve skupiny dát. Prvá skupina zodpovedá tzv. časovým snímkam simulácie. Ich zmysel a obsah je motivovaný tým, že priebeh reálnych simulácií je naozaj často zachytávaný statickými

zábermi. Pre každú snímku v pevne zvolenom kroku simulácie sme zo simulačných algoritmov získavali sadu informácií o každej bunke, ktorá obsahovala nasledovné údaje:

- minimálna a maximálna hodnota x , y , z súradnice povrchu každej červenej krvinky (definuje sa tým kváder obsahujúci celú bunku a orientovaný v smere osí x , y , z) (Obr. 44),
- poloha (x , y , z súradnice) centra RBC, definovaného ako stred kvádra obsahujúceho celú bunku.



Obr. 44: Kváder opisujúci celú bunku. Steny kvádra sa dotýkajú extrémálnych bodov, ktorých súradnice meriame.

Druhá skupina dát vznikla sledovaním pohybu jednotlivých buniek počas celej simulácie. Cieľom bolo zachytiť dynamické správanie červených krviniek. Tieto údaje sme získavali každých 200 simulačných krokov, čiže v prepočte každých $40 \mu\text{s}$ v reálnom čase. Za ten čas sa RBC pohla o menej ako $0,5 \mu\text{m}$. Pre porovnanie, vysokorýchlostné kamery používané pri biologických experimentoch snímajú rýchlosťou až desiatistice snímok za sekundu (*frame rate* $> 10\,000$) [23]. Pri hodnote $50\,000$ to predstavuje vzorkovanie každých $20 \mu\text{s}$.

- poloha (x , y , z súradnice) centra bunky určeného ako priemer súradníc všetkých vrcholov povrchovej siete,
- x , y , z zložka rýchlosti centra bunky vypočítaná ako priemer týchto zložiek všetkých vrcholov povrchovej siete,
- absolútna rýchlosť centra vypočítaná z týchto zložiek,

- x , y , z zložka rýchlosti v šiestich extrémálnych bodoch červenej krvinky (minimálna a maximálna hodnota x , y , z súradnice povrchu každej červenej krvinky).

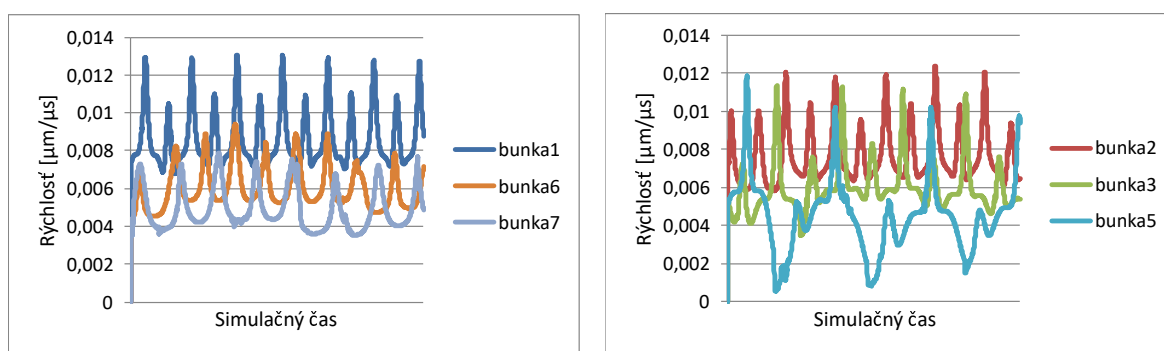
Pre všetky simulačné experimenty sme spracovali dáta v rozmedzí 1000 až 380000 simulačných krokov. Začiatok sme vynechali, kvôli predpokladanému rozbehu simulácie.

5.3 Spracovanie dát pohybu buniek

5.3.1 Absolútna rýchlosť buniek

Zo získaných dát sme vypočítali hodnoty absolútnej rýchlosti pre každú RBC. Analýza hodnôt jednotlivých zložiek rýchlostí ukazuje, že rozhodujúce sú hodnoty rýchlosti v smere x a y . Zanedbanie z -ovej zložky rýchlostí nespôsobí výraznú zmenu nižšie uvádzaných záverov. Táto vlastnosť je dôležitá pre porovnávanie simulačných experimentov a videozáznamov. Toto tvrdenie samozrejme platí len pre testované kanály aim podobné, kde je topológia nezávislá od smeru z .

Z vykreslených grafov (Obr. 45) rýchlostí je viditeľná veľká rozmanitosť získaných dát a výrazne odlišné správanie jednotlivých buniek. Pre získanie celkovej charakteristiky pohybu RBC je potrebné použiť ďalšie štatistické spracovanie, v ktorom bude nutná ďalšia redukcia rozsahu a prepojenie získaných dát.



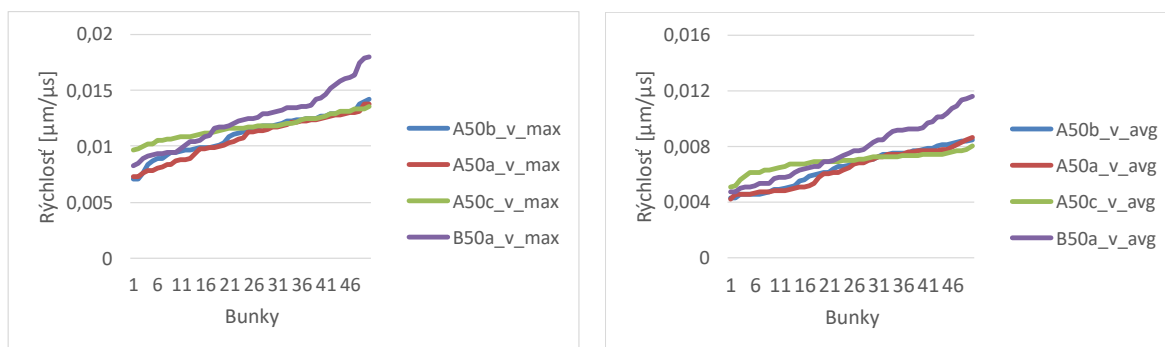
Obr. 45: Absolútne rýchlosti vybraných buniek v A50a.

5.3.2 Základné štatistické charakteristiky rýchlosti

V prvom kroku sme spracovali základné kvantitatívne hodnoty vektorov rýchlosti pre jednotlivé RBC. Pre každý vektor sme určili jeho minimálnu hodnotu, maximálnu hod-

notu, rozdiel maximálnej a minimálnej hodnoty a priemer nameraných hodnôt. Tento priemer nezodpovedá hodnote priemernej rýchlosti bunky, pretože určenie dĺžky jej trajektórie je len približné, lomenou čiarou závislou od presnosti vzorkovania, v našom prípade veľkosť integračného kroku, $0,2\mu s$. Napriek veľkému zjednodušeniu by tieto hodnoty pre každú RBC mali zachytiť spomalenie pri kolízii s prekážkou alebo pohybe v najširšom mieste kanála, vysokú rýchlosť pri bezkonfliktnom prekonaní miest zúženého prietoku, variabilitu pohybu bunky danú rozdielom týchto hodnôt a celkové zastúpenie „pomalých“ a „rýchlych“ miest v jej trajektórii.

Každú zo sledovaných charakteristík sme následne uložili do samostatného vektora a každý z nich nezávisle usporiadali podľa veľkosti. Tieto štyri vektory (v_{min} , v_{max} , v_{dif} , v_{avg}) predstavujú prvú celkovú charakteristiku pohybu viacerých červených krviniek. Porovnania ich grafov pre simulácie A až D (Obr. 46) vyjadrujú predpokladanú podobnosť resp. rozdielnosť jednotlivých experimentov.



Obr. 46: Rýchlostné charakteristiky v_{max} a v_{avg} pre simulácie A50a, A50b, A50c, B50a.

Túto podobnosť sme kvantitatívne charakterizovali použitím štandardného Kolmogorov-Smirnov testu (KS-test). Výsledky pre dve z týchto charakteristík sú uvedené v Tab. 8. Ako h_0 sme označili štatistický výsledok, pre ktorý nezamietame hypotézu H_0 , že namerané dáta pochádzajú z rovnakého rozdelenia, na hladine významnosti $\alpha = 0.05$ oproti alternatívnej hypotéze H_1 . Ak sme H_0 zamietli, označili sme to h_1 .

V štúdiu [87] sme potom pomocou rovnakých rýchlostných charakteristík testovali podobnosť simulácii vo viacerých typoch kanálov. Ako najspoľahlivejšia sa ukázala štatistika v_{avg} (Tab. 9).

Tab. 8: Výsledky Kolmogorov-Smirnov testu pre v_max a v_avg charakteristiku pre simulácie A50a, A50b, A50c, B50a.

max	A50a	A50b	A50c	B50a	avg	A50a	A50b	A50c	B50a
A50a	-	0,6779	0,0044	0,0021	A50a	-	0,9541	0,0021	0,0010
A50b	h_0	-	0,0089	0,0089	A50b	h_0	-	0,0021	0,0004
A50c	h_1	h_1	-	0,0044	A50c	h_1	h_1	-	0,0001
B50a	h_1	h_1	h_1	-	B50a	h_1	h_1	h_1	-

Tab. 9: Výsledky Kolmogorov-Smirnov testu pre v_avg charakteristiku pre simulácie A50a, A50b, B50a, B50b, C50a, C50b, D50a, D50b, E50a, E50b.

avg	A50a	A50b	B50a	B50b	C50a	C50b	D50a	D50b	E50a	E50b
A50a	-	0,9541	0,0009	2,76E-05	0,6779	0,3584	1,08E-08	7,16E-05	5,00E-19	7,29E-20
A50b	h_0	-	0,0004	1,02E-05	0,5077	0,3584	2,97E-09	2,76E-05	5,00E-19	7,29E-20
B50a	h_1	h_1	-	0,6779	0,0021	0,0021	1,78E-04	8,90E-03	2,07E-17	1,25E-16
B50b	h_1	h_1	h_0	-	0,0001	2,76E-05	9,66E-04	1,71E-02	2,07E-17	7,23E-16
C50a	h_0	h_0	h_1	h_1	-	0,8401	1,08E-08	7,16E-05	3,28E-18	7,29E-20
C50b	h_0	h_0	h_1	h_1	h_0	-	1,08E-08	7,16E-05	5,00E-19	7,29E-20
D50a	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	-	0,5077	4,81E-11	1,12E-11
D50b	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_0	-	4,81E-11	2,49E-12
E50a	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	-	0,9541
E50b	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_1	h_0	-

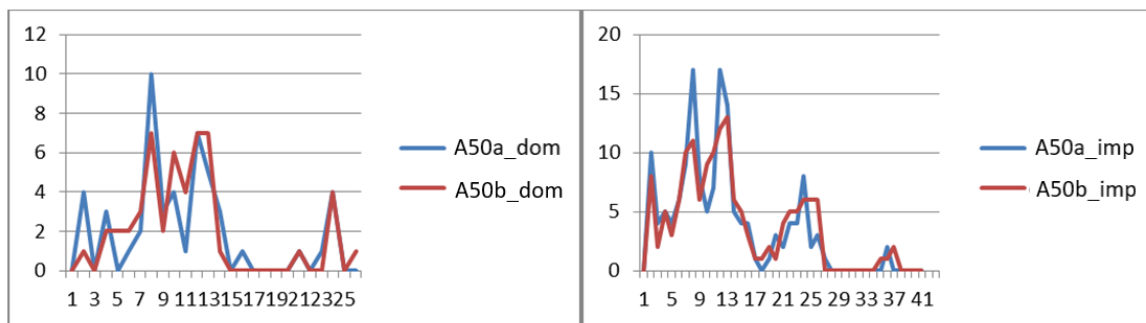
5.3.3 Analýza periodických vlastností pohybu krvinky

Grafy vektorov rýchlostí jednotlivých červených krviniek nás na prvý pohľad upozorňujú, že okrem extrémálnych a priemerných hodnôt je ďalšou kľúčovou vlastnosťou periodickosť ich správania. Tá ešte lepšie charakterizuje topológiu kanála vrátane pravidelnosti poľa prekážok (zrýchlený pohyb objektov v miestach zúženia, pomalší v širších pasážach kanála) a trajektóriu jednotlivých buniek v ňom (spomalenie pri náraze do prekážky a pri stene kanála, zrýchlenie pri bezkontaktnom prechode medzerou medzi prekážkami atď.). Nepravidelnosti a poruchy v periodicite zrejme zodpovedajú kolíziám s krvinkami. Počet periód charakterizuje aj celkovú rýchlosť bunky resp. vzdialenosť, ktorú kanálom prešla.

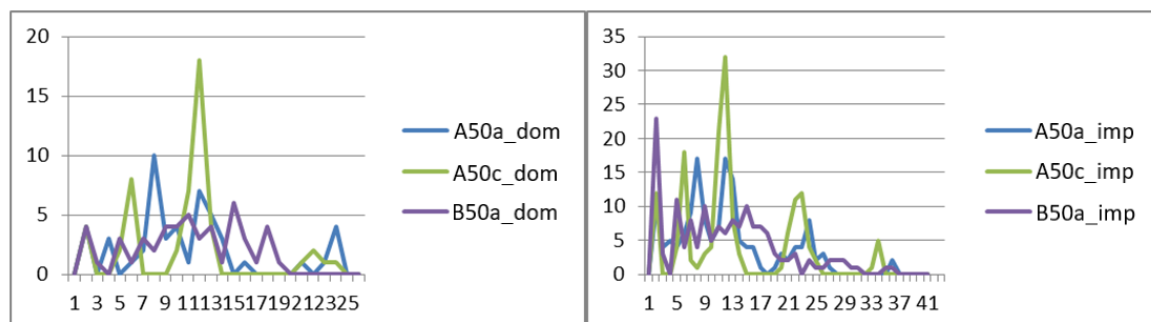
Na rýchlostné dáta sme preto použili štandardný spôsob analýzy periodických procesov, pomocou diskkrétnej Fourierovej transformácie (DFT). Pre každú z 50 buniek

sme určili jej 3 najvýznamnejšie frekvencie, pričom pre väčšinu buniek bola prvá z nich výrazne dominantná.

Získali sme tak sadu 50 dominantných a 150 dôležitých frekvencií. Tieto hodnoty sme usporiadali a uložili do vektorov *dom* a *imp*. Tým sme získali druhú, omnoho jemnejšiu charakteristiku pohybu objektov v toku. Grafy vektorov *v_dom* a *v_imp* na Obr.47 a Obr.48 ilustrujú mieru podobnosti tejto charakteristiky pre experimenty A50a a A50b a ich rozdiel pri porovnaní experimentov A50a, A50c a B50a. Ešte výraznejšie výsledky získame, keď hodnoty kumulujeme do skupín po piatich frekvenciách (Obr. 49). Pri porovnaní experimentov A50a a A50c je vidieť, že pravidelné počiatočné rozmiestnenie RBC zjednoduší rozdelenie hodnôt frekvencií. Číselné hodnoty KS-testov podobnosti rozdelení frekvencií potvrdila, že dáta pochádzajú z rovnakého rozdelenia, čo potvrdilo výsledky odpozorované z grafov.

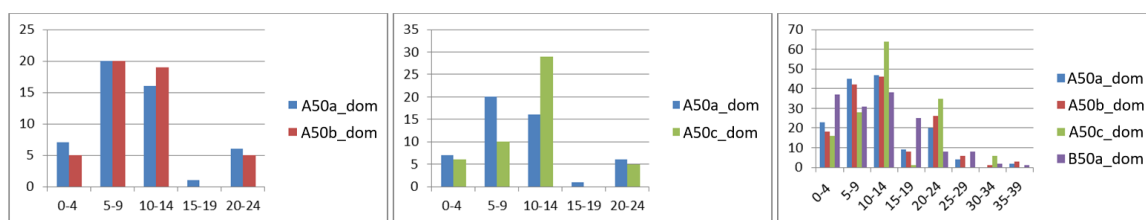


Obr. 47: Zhoda počtu dominantných a dôležitých frekvencií pre experimenty A50a a A50b.



Obr. 48: Rozdielny priebeh počtu dominantných a dôležitých frekvencií pre experimenty A50a, A50c a B50a.

Pre skupinu buniek s rovnakou frekvenciou sme pomocou videozáznamu zo simulácie overili, že bunky majú podobnú trajektóriu vzhľadom na topológiu kanála.



Obr. 49: Zhoda kumulovaných dominantných frekvencií pre experimenty A50a a A50b, rozdiel kumulovaných dominantných frekvencií pre experimenty A50a a A50c a počty kumulovaných dôležitých frekvencií pre všetky experimenty.

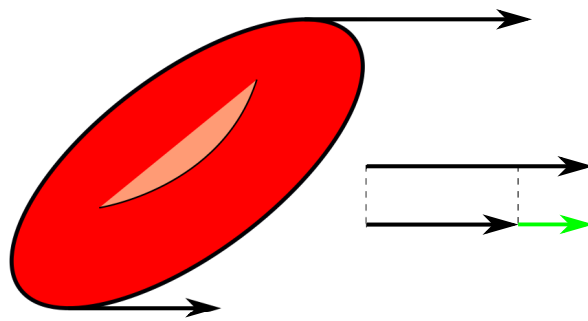
5.3.4 Analýza rotácie buniek

Miera rotácie RBC v toku predstavuje ďalšiu dôležitú charakteristiku priebehu experimentu. Umožňuje nám najmä zachytiť kvalitu a kvantitu interakcie buniek so stenami a prekážkami v kanáli, reakciu na nekonštantný profil rýchlosti toku kvapaliny v zariadení a pri hustých suspenziách aj interakciu medzi bunkami.

Pre meranie tejto charakteristiky využijeme dáta jednotlivých zložiek rýchlostí v extrémálnych bodoch povrchu bunky v smere jednotlivých osí. Obmedzili sme sa len na jednu ich kombináciu, ktorá je ale zrejme rozhodujúca a pripúšťa absenciu vstupných údajov v smere z -osi. V prípade potreby je možné analogicky spracovať ďalšie kombinácie parametrov. Za extrémálne body zoberieme minimálny a maximálny bod povrchu bunky v smere osi y („pravý“ a „ľavý“ bod) a v nich hodnotu rýchlosti v smere osi x (Obr. 50). Pokiaľ sú tieto hodnoty rovnaké, môžeme ich interpretovať ako skutočnosť, že bunka v rovine xy nerotuje. Vo výstupných dátach z experimentu sú ale tieto rýchlosti odlišné. Ich rozdiel zodpovedá okamžitej rotácii buniek a znamienko rozdielu smeru rotácie. Ako vstup do ďalších štatistík sme preto zvolili vektor rozdielu x -rýchlosti v extrémálnych bodoch v smere y -osi. Tento vektor máme k dispozícii pre každú z krviniek a počet jeho zložiek zodpovedá počtu tabelovaných hodnôt pohybu bunky.

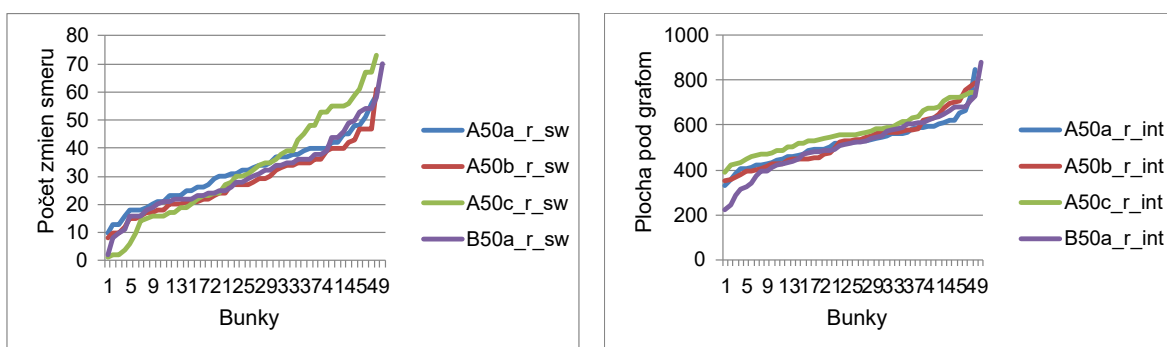
Po vykreslení do grafov pripomínali výsledné dáta vektory absolútnej rýchlosti a dalo sa pozorovať aj výrazné periodické správanie. Nakoľko aj formálne sú tieto údaje zhodné, zvolili sme podobné metódy ich ďalšej štatistickej redukcie a spracovania.

Pri analýze základných štatistických dát sme najskôr pre každú bunku z jej vektora rozdielov získali minimálnu a maximálnu hodnotu (teda maximálnu hodnotu rotácie



Obr. 50: Metóda merania rotácie červenej krvinky.

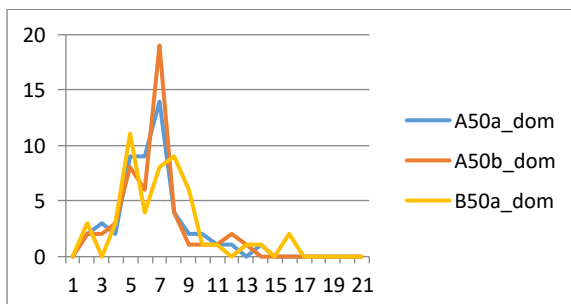
v jednom a druhom smere), priemernú hodnotu tabelovaných hodnôt, počet zmien smeru rotácie a integrál (plochu) medzi grafmi x -zložky rýchlosti v „ľavom“ a „pravom“ extrémnom bode. Táto hodnota by mala zodpovedať celkovej miere rotácie. V skutočnosti bola vypočítaná ako integrálny súčet absolútnych hodnôt tabelovaných rozdielov rýchlosti s určenou šírkou počtu simulačných krokov, čo predstavuje numerický odhad tohto integrálu. Získané hodnoty sme uložili do piatich vektorov r_{min} , r_{max} , r_{avg} , r_{sw} a rot_{int} s 50 zložkami, ktoré sme nezávisle usporiadali podľa veľkosti. Táto päťica vektorov je prvou charakteristikou rotačných vlastností celého experimentu. Grafy ich priebehov niektorých z nich vidíme na Obr. 51, opäť potvrdzujú očakávanú podobnosť resp. rozdiely pre jednotlivé experimenty, ktoré boli potvrdené aj KS-testom.



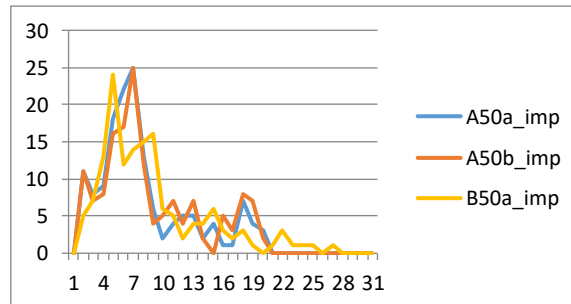
Obr. 51: Rotačné charakteristiky r_{sw} a r_{int} pre simulácie A50a, A50b, A50c, B50a.

Ďalšia charakteristika zachytáva periodickosť správania rozdielov rýchlostí a bola realizovaná podobne ako v 5.3.3 pomocou DFT. Výsledky sú zobrazené v nasledujúcich grafoch vektorov dom a imp na Obr. 52 a Obr. 53. Na prvom vidíme zhodu počtu dominantných frekvencií pre experimenty A50a a A50b a ich rozdiel pre simuláciu

B50a, na druhom období porovnania pre všetky dôležité frekvencie.

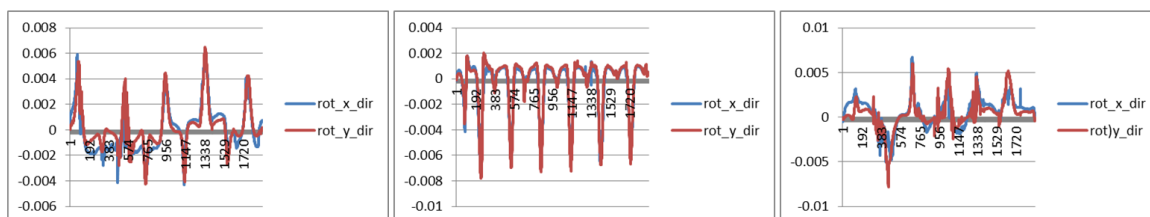


Obr. 52: Dominantné frekvencie pre experimenty A50a, A50b a B50a.



Obr. 53: Dôležité frekvencie pre experimenty A50a, A50b a B50a.

Posledné grafy na Obr.54 zobrazujú výsledky jednoduchého porovnávacieho experimentu. Pokiaľ je naša myšlienka meranie rotácie RBC správna, rozdiely x -zložiek rýchlostí v y -extremálnych bodoch by mali zodpovedať rozdielom y -zložiek rýchlostí v x -extremálnych bodoch („prvý“ a „posledný“ bod povrchu). Určité rozdiely ale vznikajú v prípade, keď je časť RBC nehybná alebo spomalená v dôsledku kontaktu s prekážkou alebo iným objektom. Porovnanie priebehov pre tri náhodne vybrané RBC potvrdzuje tieto predpoklady. Rôznym spôsobom merania rotácie bunky je venovaná Kap. (6)



Obr. 54: Rozdiel rotačných rýchlostí v zložky v smere x a v smere y pre tri náhodné RBC.

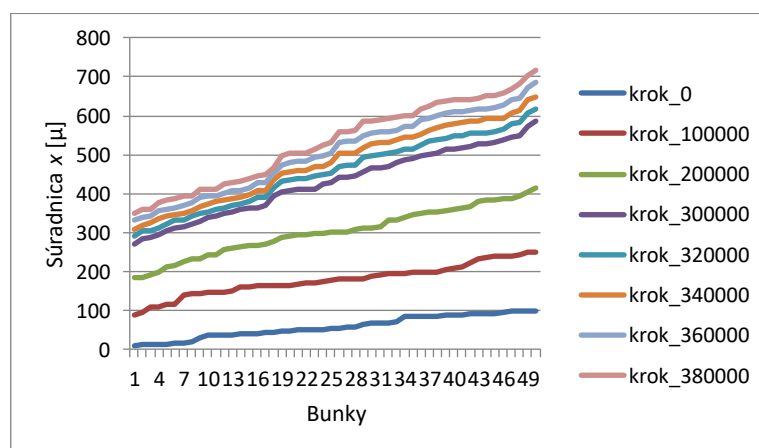
5.4 Analýza časových snímok

Ako bolo spomenuté, dáta získané z časových snímok sú značne jednoduchšie, statické a poskytnú menej informácií o dynamickom správaní buniek. Na druhej strane tieto údaje je omnoho jednoduchšie získať digitálnym spracovaním záberov skutočných experimentov. Počas experimentu sme získavali časové snímky po každých 1000 krokoch simulácie, využili sme ale len malú časť z nich. Pre sledovanie vývinu a ustálenia sa

jednotlivých charakteristík sme používali časové snímky po každých 100 000 krokoch, a od 300 000 kroku po každých 10 000 krokoch. Keďže integračný krok simulácie bol $0,2 \mu s$, 10 000 krokov predstavuje v reálnom čase $0,002 s$.

5.4.1 Analýza polohy buniek v kanáli

Prvá charakteristika toku častíc bude vychádzať z údajov o pozícii stredov jednotlivých RBC. V ďalšom sa obmedzíme len na analýzu x súradnice ich polohy, úvahy je možné rozšíriť na ďalšie súradnice. Vieme, že na začiatku simulácie boli x súradnice RBC v intervale $0 \mu m$ až $100 \mu m$. Na konci simulácie po 381 000 simulačných krokoch, v závislosti od štartovej polohy a kolíznosti trajektórií jednotlivých buniek, boli ich x súradnice v rozsahu od $352 \mu m$ a $718 \mu m$. Obr. 55 ilustruje vývoj hodnôt x súradníc zhľuku RBC počas behu simulácie.



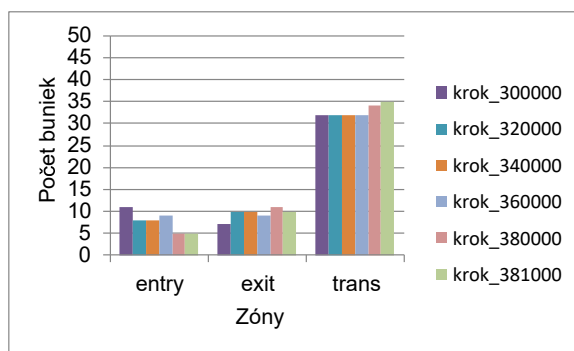
Obr. 55: Grafy hodnôt x súradníc RBC pre rôzne hodnoty simulačných krokov.

Táto charakteristika ale nie je našim cieľom. Pri skutočných experimentoch predpokladáme používanie mnohonásobne väčšieho kanála (s periodickým poľom prekážok), ktoré bude v okamihu časovej snímky súvislo zaplnené výrazne väčším množstvom elastických objektov. Charakteristickým preto nebude globálne rozmiestnenie RBC, ale skôr ich výskyt v jednotlivých typických oblastiach rozmiestnenia prekážok. Tie ale bude potrebné definovať špecificky podľa konkrétneho kanála.

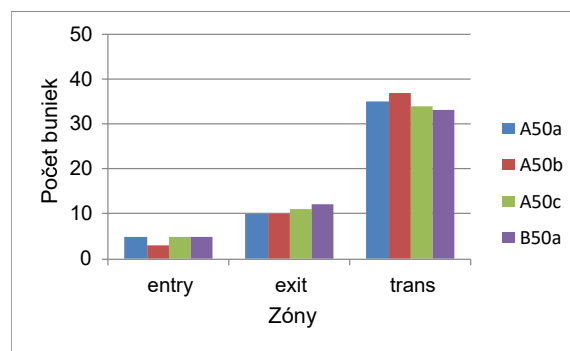
Pre experimenty A50a, A50b, A50c a B50a sme preto x -súradnice RBC spracovali v dvoch krokoch. V prvom sme ich hodnoty nahradili zvyškom po delení 100, čím sme

všetky „premiestnili“ do spoločného obdĺžnika reprezentujúceho základný vzor kanála. Následne sme ho v smere osi x rozdelili na tri typické zóny: vstupné zóny *entry* ktorými RBC vstupujú do zúženia pred poľami prekážok, výstupné zóny *exit*, ktorými z tohto zúženia odchádzajú a tranzitná zóna *trans* zodpovedajúca zvyšným častiam kanála bez prekážok. Vstupná zóna zodpovedá oblasti zrýchľovania pred oblasťou najrýchlejšieho toku kvapaliny, kde ale dochádza aj k väčšine kolízií krviniek s prekážkami a navzájom. Výstupná zóna predstavuje inverznú oblasť decelerácie rýchlosti toku a buniek s výrazným poklesom kolíznych situácií, a tranzitná zóna by mala zodpovedať „kludovej“ oblasti bezproblémového toku buniek.

Rozdelenie počtov buniek, ktorých x -súradnice patria do jednotlivých zón predstavuje ďalšiu navrhovanú charakteristiku toku častíc. Na Obr.56 je zobrazený vývoj tejto charakteristiky pre experiment A50a a pre časové snímky po 300 tisíc, 320 tisíc, 340 tisíc, 360 tisíc, 380 tisíc a 381 tisíc krokoch simulácie. Vidíme značnú stabilitu rozdelenia, ktoré potvrdzuje vhodnosť tejto charakteristiky. Druhý graf na Obr. 57 porovnáva rozdelenia po 381 tisíc krokoch pre experimenty A50a, A50b, A50c a B50a s očakávanou mierou podobnosti.



Obr. 56: Počet buniek v zónach pre experiment A50a pre rôzne časové snímky.



Obr. 57: Porovnanie počtu buniek v zónach v 381-tisícim kroku simulácie pre experimenty A50a, A50b, A50c a B50a.

Podobnú štatistiku je možno vytvoriť aj s menším prihliadnutím na špecifický tvar kanála. Obdobné výsledky rozdelenia počtu buniek sme skúšali aj pre umelo vytvorené zóny šírky $10\ \mu\text{m}$ pokrývajúce celú dĺžku základného vzoru kanála. Hodnoty vykazovali menšiu stabilitu, čo ale môže byť spôsobené nedostatočným počtom buniek v experimente. Kontrolný identický experiment s len 20 bunkami ukázal, že v tomto prípade

má rozdelenie početnosti buniek neustálený, ale periodický charakter. Pri náraste počtu buniek na 50 bol tento efekt potlačený, kvalita tejto charakteristiky ale zrejme stúpa s rastúcim počtom objektov a dĺžkou simulácie. Pre náš typ kanála a toku je rozhodujúca x súradnica RBC popisujúca hlavný smer ich pohybu. Ďalší kontrolný experiment ukázal, že v prípade potreby podobné výsledky získame aj pri obdobnej analýze y súradníc polohy objektov.

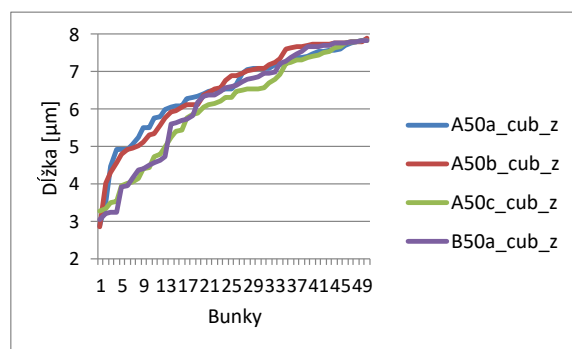
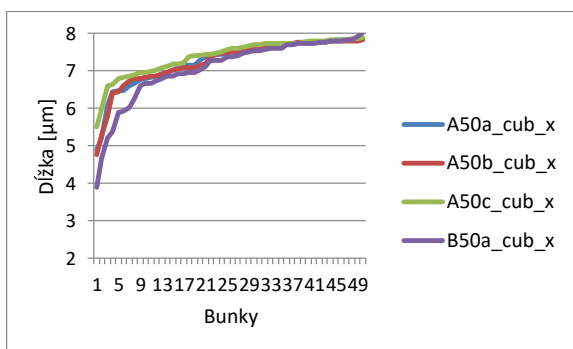
5.4.2 Natočenie buniek v kanáli

V časti 5.3.4 sme popísali dôležitosť skúmania charakteristík rotácie buniek v experimentoch. Zriedkavé časové snímky, ktoré nezachytávajú dynamiku simulácie nám k tomu poskytujú len obmedzené možnosti. V ich rámci sme navrhli spôsob charakterizácie natočenia červených krviniek pomocou rozmerov opísaného kvádra (Obr. 44). Pokiaľ je krvinka orientovaná niektorým zo spôsobov v smere osí x , y , z , rozmery kvádra zodpovedajú hlavným rozmerom RBC, ktoré v našom modeli majú hodnoty $7,82 \mu\text{m} \times 7,82 \mu\text{m} \times 2,56 \mu\text{m}$. Pri natočení bunky sa tieto rozmery zmenia a predstavujú jeho charakteristiku.

Získané rozmery kvádrov sme spracovali dvomi spôsobmi. Pri jednoduchšom sme hodnoty ich x , y a z rozmerov (po 380 tisíc krokoch simulácie) uložili a nezávisle od seba usporiadali do polí cub_x , cub_y and cub_z , ktoré tvoria prvú navrhnutú charakteristiku. Na grafoch na Obr. 58, 59 je pre pole cub_x vidieť značnú zhodu týchto vektorov pre všetky experimenty, zatiaľ čo pre hodnoty cub_z už vidíme rozdielne správanie dvojice experimentov A50a A50b a A50c, B50a.

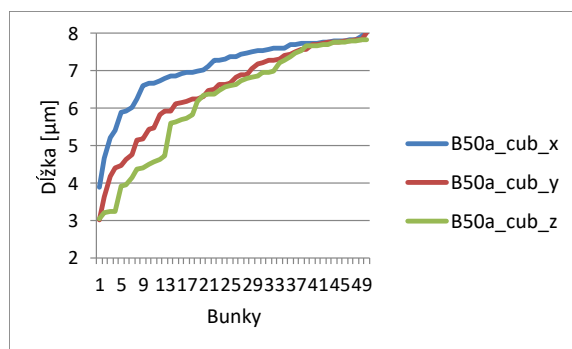
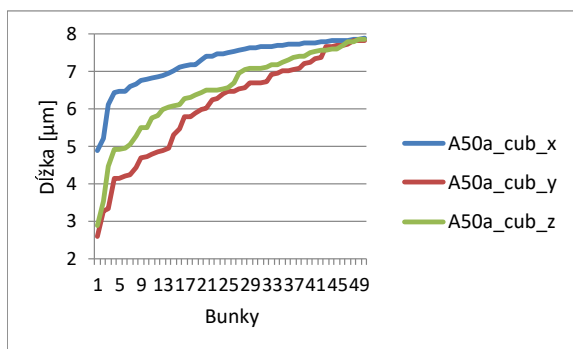
To súvisí so skutočnosťou, že rozdelenia hodnôt x , y a z rozmeru kvádrov nie sú zhodné a natočenie RBC je odlišné pre smery jednotlivých osí. Navyiac z porovnania simulácií A50a a B50a na Obr. 60 a 61 sa ukazuje, že rozdiely rozdelenia cub_x , cub_y a cub_z v smeroch osí môžu charakterizovať samotný experiment (zmena pozície grafov pri rozmeroch cub_y a cub_z).

Druhá charakteristika natočenia takmer štandardným spôsobom meria normovanú kvadratickú odchýlku rozdielov kvádra jednotlivých RBC od polohy kvádra orientovaného v smere súradnicových osí. Určitá úprava spočíva v tom, že hodnoty rozmerov



Obr. 58: Grafy hodnôt x rozmerov kvádrov pre experimenty A50a, A50b, A50c a B50a.

Obr. 59: Grafy hodnôt z rozmerov kvádrov pre experimenty A50a, A50b, A50c a B50a.

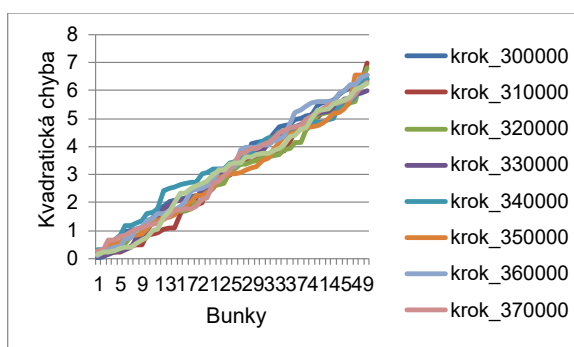


Obr. 60: Porovnanie hodnôt x , y a z rozmerov kvádrov pre experiment A50a.

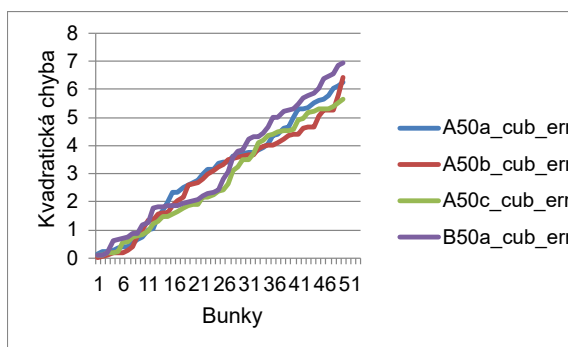
Obr. 61: Porovnanie hodnôt x , y a z rozmerov kvádrov pre experiment B50a.

kvádra usporiadame podľa veľkosti, u dvoch najväčších hodnôt meriame odchýlku od šírky a dĺžky RBC ($7,82 \mu\text{m}$) a u najmenšieho od výšky RBC ($2,56 \mu\text{m}$). Týmto spôsobom pre zjednodušenie úmyselne potláčame spomenutý rozdiel rozmerov v smere jednotlivých osí, získaná charakteristika napriek tomu vykazuje veľmi dobré vlastnosti. Namerané hodnoty sme uložili do vektora *cub_err*, ktorý po usporiadaní podľa veľkosti predstavuje ďalšiu charakteristiku naklonenia RBC v časovej snímke simulačného experimentu.

Obr. 62-63 ilustruje stabilitu tohto vektora pre časové snímky medzi 300 000 a 380 000 krokmi simulácie A50a, druhý porovnanie podobnosti tohto parametra pre časové snímky experimentov A50a, A50b, A50c a B50a po 380 000 krokoch simulácie. Zistenie z obrázkov Obr. 60 a 61 nás priviedlo na myšlienku bližšie skúmať natočenia buniek aj pre iné tvary kanálov a prípadne iné rýchlosti toku v kanáloch. V článku [87] sme na dáta pozostávajúce z rozmerov opísaných kvádrov všetkých buniek (x, y, z)



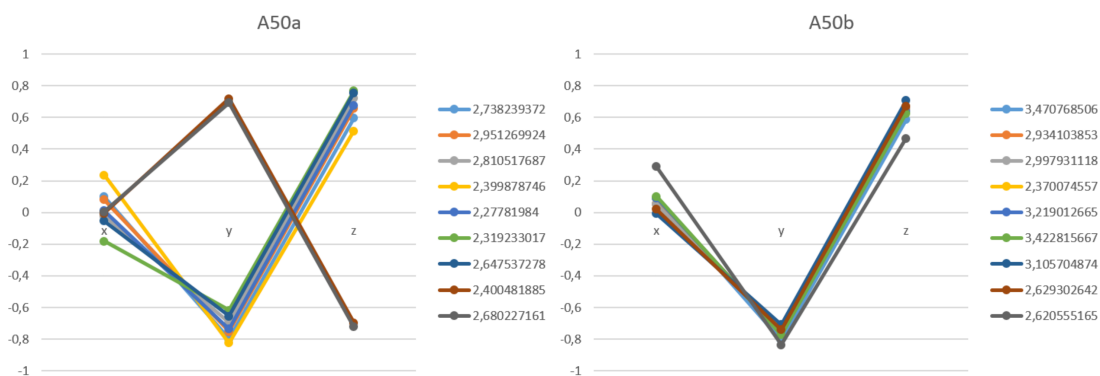
Obr. 62: Stabilita charakteristiky kvadratických odchýlok natočenia kvádra pre postupnosť snímok experimentu A50a.



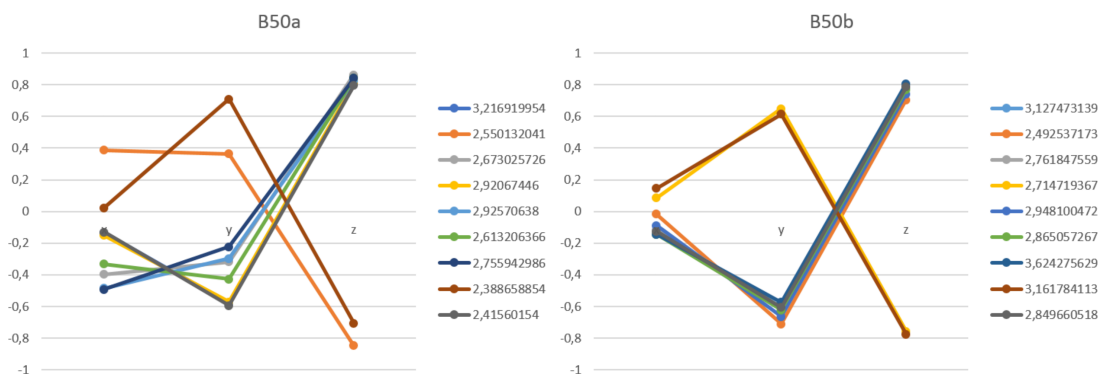
Obr. 63: Porovnanie hodnôt kvadratických odchýlok natočenia kvádra pre experimenty A50a, A50b, A50c a B50a.

v určitých časových rezoch a z rôznych simulácií aplikovali metódu hlavných komponentov (PCA). Táto metóda výrazne redukuje dimenziu dát, pričom zachováva podstatnú informáciu v dátach ukrytú. Najskôr sme pre každý simulačný experiment aplikovali PCA na všetky bunky v časových rezoch, keď už bola simulácia s veľkou pravdepodobnosťou ustálená ((300000, 310000, 320000, 330000, 340000, 350000, 360000, 370000, 380 000)). Pre každý časový rez sme tak dostali trojicu čísel, ktoré určitým spôsobom definujú hlavné natočenie všetkých buniek v danom okamihu. Použili sme dáta zo simulačných experimentov vykonaných v kanáloch A, B, C, D aj E, pričom v každom kanáli bežali dve simulácie s rozdielnym náhodným počiatočným rozmiestnením červených krviniek (A50a, A50b, B50a, B50b, C50a, C50b, D50a, D50b, E50a, E50b). Všetky ostatné parametre simulácii boli rovnaké, tak ako sú popísané na začiatku tejto kapitoly. Na Obr. 64, 65, 66, 67, 68 môžeme vidieť výsledky analýzy pre všetky simulačné experimenty.

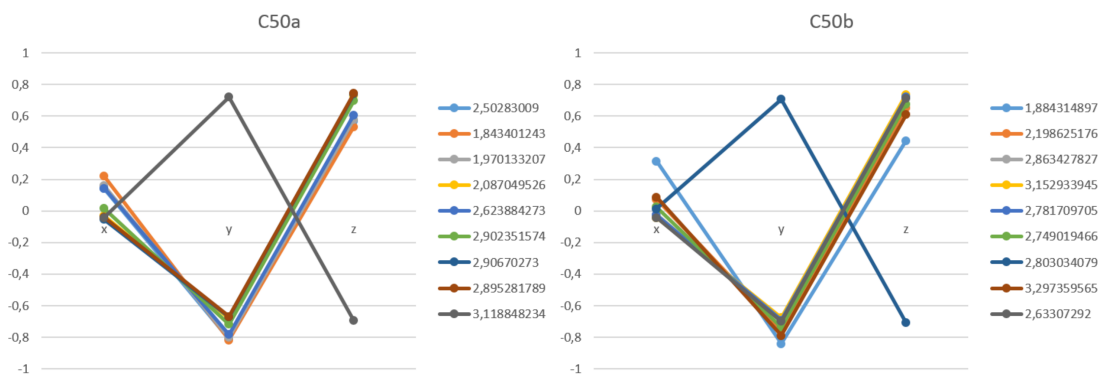
Vidíme, že táto charakteristika je podobná pre simulácie v rovnakom kanáli a naopak sa líši pre simulácie v rôznych kanáloch. Možno konštatovať, že charakteristika vyjadrujú určitú mieru rozptylu natočenia pre daný kanál, ale tiež typické natočenie buniek počas simulácie. Natočenie je samozrejme ovplyvnené umiestnením prekážok vo vnútri kanála. Napríklad keď sú prekážky blízko pri sebe, bunka musí „stáť“, je rovnobežná s rovinou x, z . Ďalej sme skúmali citlivosť tejto charakteristiky na rýchlosť toku. V kanáli E sme spustili simulácie s polovičnou (0,00025), dvojitou (0,001) a štvornásobnou (0,002) externou silou aplikovanou na tekutinu oproti pôvod-



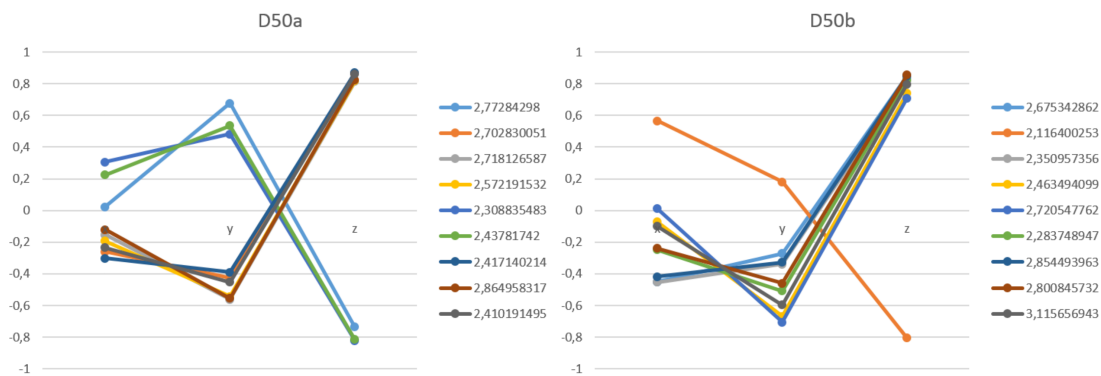
Obr. 64: Porovnanie výsledkov PCA pre experimenty A50a a A50b pre všetkých deväť časových rezov. Číslo v každom riadku reprezentuje dôležitosť daného komponentu.



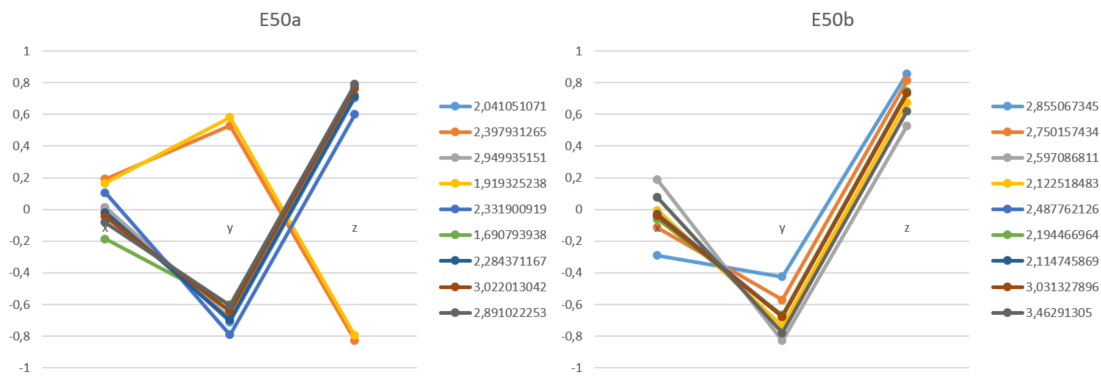
Obr. 65: Porovnanie výsledkov PCA pre experimenty B50a a B50b pre všetkých deväť časových rezov. Číslo v každom riadku reprezentuje dôležitosť daného komponentu.



Obr. 66: Porovnanie výsledkov PCA pre experimenty C50a a C50b pre všetkých deväť časových rezov. Číslo v každom riadku reprezentuje dôležitosť daného komponentu.



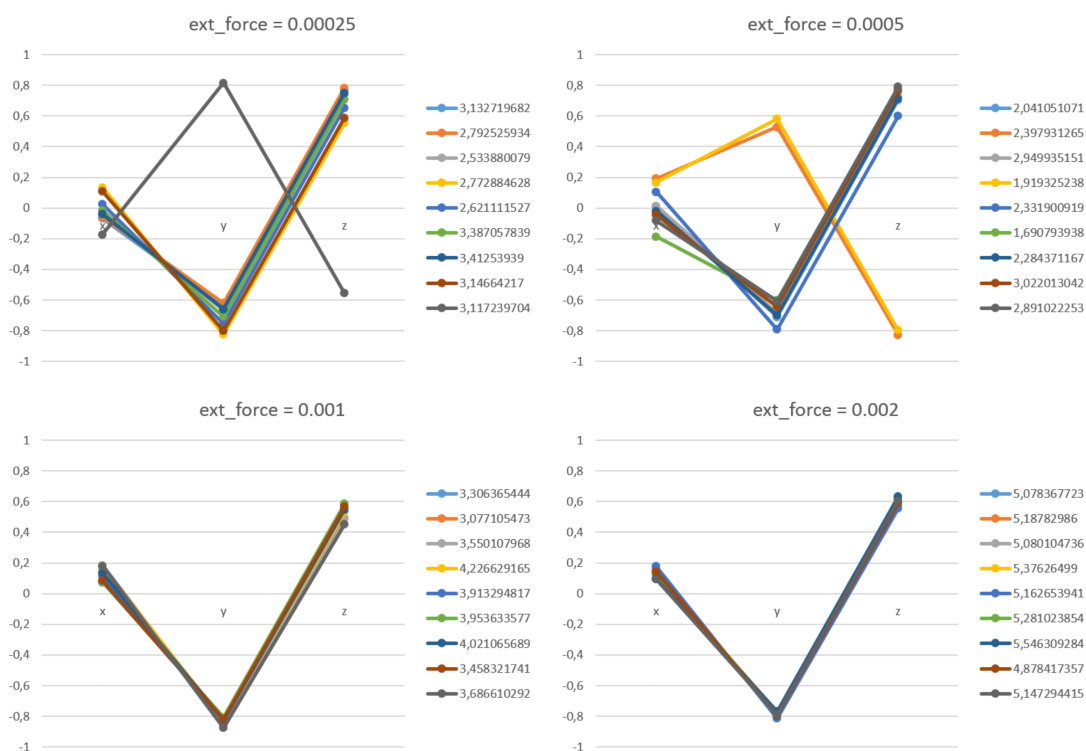
Obr. 67: Porovnanie výsledkov PCA pre experimenty D50a a D50b pre všetkých deväť časových rezov. Číslo v každom riadku reprezentuje dôležitosť daného komponentu.



Obr. 68: Porovnanie výsledkov PCA pre experimenty E50a a E50b pre všetkých deväť časových rezov. Číslo v každom riadku reprezentuje dôležitosť daného komponentu.

ným simuláciám E50. V každej simulácii bolo opäť 50 červených krviniek s unikátnym náhodným počiatočným rozmiestnením. Výsledky PCA pre takéto štyri simulácie sú na Obr. 69.

Môžeme pozorovať, že vyššia rýchlosť bunky viac „upratala“, teda táto charakteristika pre jednotlivé časové kroky je už takmer nemenná.



Obr. 69: Porovnanie výsledkov PCA pre experimenty v kanáli E s rôznymi rýchlosťami toku pre všetkých deväť časových rezov. Číslo v každom riadku reprezentuje dôležitosť daného komponentu.

5.5 Záver

Metódy pre vzájomné porovnanie podobnosti simulačných a laboratórnych experimentov s tokom veľkého počtu červených krviniek nie je doposiaľ veľmi rozšírená oblasť skúmania. V Kap. 2.7 sme si uviedli prístupy iných výskumníkov pri validácii modelov. Ich sledované charakteristiky však nezachytávali komplexné správanie krviniek, ktoré by simulácie mali napodobniť a predvídať. V tejto kapitole sme navrhli metódy pre porovnanie založené na takých štatistických charakteristikách, ktoré sú relatívne dobre získateľné a zároveň dobre popisujúce dynamické vlastnosti toku krviniek. Charakteristiky môžu slúžiť aj na porovnanie simulačných experimentov medzi sebou, čomu sa budeme viac venovať v Kap. 8.

6 Metódy merania rotácie červenej krvinky

V predchádzajúcej kapitole sme si ukázali význam merania uhlovej rýchlosti bunky počas simulácií toku červených krviniek v mikrofluidických zariadeniach. V štúdiu [21] sme skúmali ďalšie spôsoby ako zmerať uhlovú rýchlosť bunky počas simulácie, resp. laboratórneho experimentu. Záznamy z laboratórnych experimentov sú často videá alebo fotografie, teda zachytávajú iba 2 rozmery. Preto ak chceme tieto výsledky porovnať s numerickými simuláciami, popis rotácie buniek musí byť tiež dvojrozmerný parameter. Z tohto dôvodu pri všetkých metódach výpočtu uhlovej rýchlosti zanedbáme jednu dimenziu. Metódy určené na výpočet uhlovej rýchlosti z videozáznamu, musia vyžadovať ako vstup minimálne množstvo údajov. Tieto údaje by sa mali dať ľahko získať zo spracovania videa. Mali by však poskytnúť informácie, ktoré sú dostatočne podobné referenčnému výsledku.

Na každý graf uhlovej rýchlosti získaný rôznou metódou merania sme následne aplikovali diskretnú Fourierovu transformáciu (DFT). To nám umožnilo vidieť hlavné frekvencie a ich význam. Takéto súbory údajov sme ďalej porovnali výsledkami DFT z referenčného prístupu. DFT je našťastie necitlivá na sporadické šumové špičky signálu. Znamená to, že prítomnosť takéhoto šumu neruší analýzu a neznižuje vhodnosť použitia takéhoto prístupu.

6.1 Popis metód

V tejto časti popíšeme nami navrhnuté metódy na meranie rotácie červenej krvinky. Niektoré sú vhodné iba pre použitie v simulačných experimentoch, no iné by sa mali dať získať aj z laboratórnych experimentov z videozáznamu.

A. Zjednodušená metóda merania rotácie:

Rozdiel v x -zložke rýchlosti.

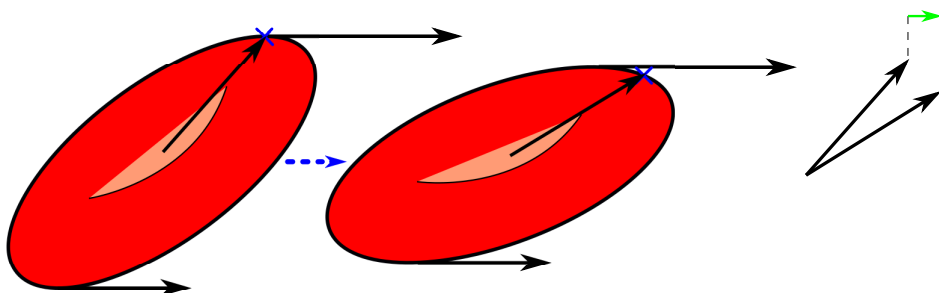
Uvedené počítačové zjednodušené meranie rotácie červenej krvinky použité v časti 5.3 (Obr. 50) je založené na špecifickom výstupe simulačného modelu každých 200 simulačných krokov. To zodpovedá časovej perióde 40 mikrosekúnd, za ktorú sa RBC posunie o približne 0,5 mikrometrov. Rotáciu RBC počítame ako rozdiel x -ových zložiek

rýchlostí v y -extrémnych bodoch. Znamienko tohto rozdielu zodpovedá smeru otáčania. Táto metóda však nemusí zachytávať skutočné otočenie bunky v nadchádzajúcom čase. Preto sme na overenie jej konzistentnosti vymysleli podobnú metódu, ktorá berie do úvahy skutočnú polohu sledovaného extrémálneho bodu po určitom časovom úseku.

B. Rozšírená metóda merania rotácie:

Rozdiel v x -zložke pozície pôvodného bodu.

Uvedený nedostatok prvej metódy sme napravili tým, že polohu y -extrémnych bodov sme zaznamenali ešte po 100 krokoch od ich identifikácie. Po ďalších 100 krokoch sme opäť zaznamenali aktuálne y -extrémne body. Pre priebeh simulácie to znamená, že výstupy sa musia vykonávať dvakrát tak často. Ako mieru rotácie sme použili rozdiel medzi x -súradnicami x -extrémneho bodu po 100 krokoch (Obr. 70).



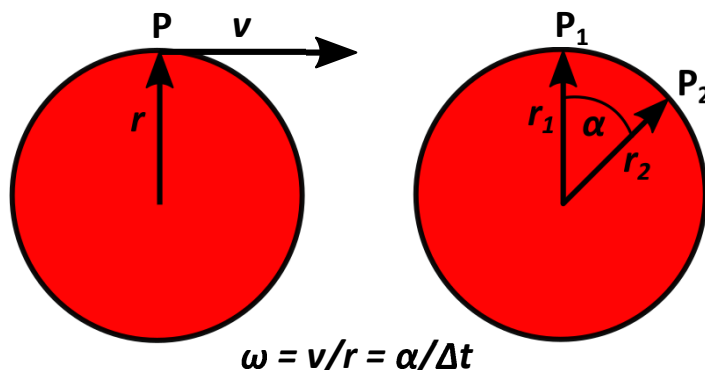
Obr. 70: Metóda B merania rotácie červenej krvinky.

C. Referenčná metóda :

Presný výpočet uhlovej rýchlosti.

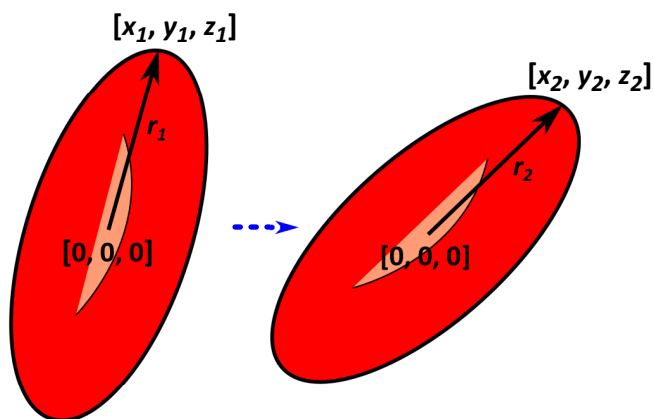
S cieľom overiť správnosť predchádzajúcich metód sme ďalej použili metódu založenú na presnej fyzikálnej definícii uhlovej rýchlosti. Vo všeobecnosti existujú dve ekvivalentné možnosti výpočtu (Obr. 71). Prvá z nich zohľadňuje vektor rýchlosti bodu (v) a jeho vzdialenosť od stredu otáčania (r). Potom sa uhlová rýchlosť vypočíta ako pomer v a r . Druhá možnosť berie do úvahy polohu sledovaného bodu v dvoch

po sebe idúcich okamihoch. Uhlová rýchlosť sa vypočíta tak, že rozdiel medzi dvoma polohovými vektormi vydáme časom, za ktorý zmena polohy bodu nastala.



Obr. 71: Metóda C merania rotácie červenej krvinky.

V referenčnej metóde počítame uhlovú rýchlosť pomocou druhej možnosti. Každých 200 krokov simulácie nájdeme a zapíšeme si polohu vybraného (okrajového) bodu bunky a taktiež aktuálnu polohu stredu bunky. Z týchto dvoch údajov vypočítame polohový vektor bodu. Stred bunky sa v modeli počíta ako priemer všetkých povrchových bodov bunky. Po 100 simulačných krokoch sa zaznamenajú nové polohy sledovaného bodu, aj stredu bunky, z ktorých získame nový polohový vektor (Obr. 72). Vzhľadom na dvoj-dimenzionálny charakter záznamov z laboratórnych pokusov, aj my pri výpočte jeden rozmer zanedbávame.



Obr. 72: Metóda C merania rotácie červenej krvinky.

Výsledný uhol potom vypočítame podľa vzťahu (31). Mieru rotácie určíme zo vzťahu (32). Kombináciou týchto dvoch vzťahov dostaneme kompletnú informáciu o uhlovej rýchlosti (33).

$$\cos(\alpha) = \frac{x_1 \cdot x_2 + y_1 \cdot y_2}{r_1 \cdot r_2} \quad (31)$$

$$\text{sign}(\omega) = x_1 \cdot y_2 - x_2 \cdot y_1 \quad (32)$$

$$\omega = \frac{\alpha}{\Delta t} \cdot \text{sign}(\omega), \quad (33)$$

kde r_1 a r_2 sú pozičné vektory sledovaného bodu v časoch t_1 a t_2 , α je uhol medzi týmito dvoma vektormi, x_1 , x_2 , y_1 a y_2 sú súradnice sledovaného bodu v časoch t_1 , t_2 a v časoch ω je uhlová rýchlosť bunky a Δt je rozdiel medzi t_1 a t_2 .

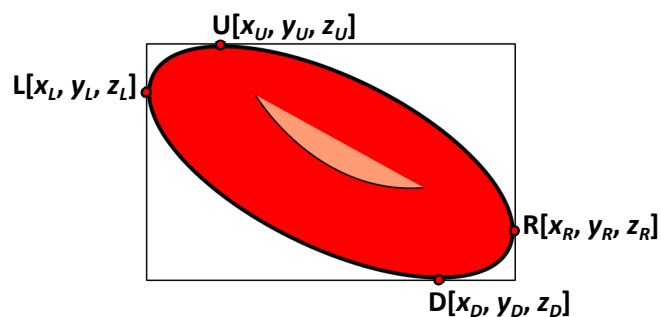
Zatiaľ čo prvé dve metódy boli aplikovateľné iba v simulačnom modeli, táto metóda by teoreticky mohla byť použiteľná aj pri videozázname. Na videu by sme museli sledovať určitý výrazný bod na bunke, mohlo by sa však stať, že ten prerotuje mimo pohľad kamery.

D. Video metóda :

Hodnotenie uhlovej rýchlosti podľa opísaného obdĺžnika okolo bunky.

Aby sme mohli porovnať presnosť výpočtu rotácie zo simulačných dát a z videa, potrebujeme tieto dva prístupy aplikovať na pohyb tej istej bunky. Preto budeme túto metódu skúmať na dátach získaných zo simulácie, ale rovnaké informácie by mali byť dostupné aj po spracovaní videa. Keďže video je sekvencia snímok, údaje o bunkách by mali byť získateľné zo statických obrázkov. Vstupné údaje do tejto metódy nie sú rýchlosti, ale postupnosť pozícií určitých bodov bunky. Navyše z videa máme explicitne informáciu iba o dvoch rozmeroch. Príklad údajov, ktoré by mali byť jednoducho získateľné z videozáznamu je na Obr.73. Obdĺžnik opisujúci bunku nám definuje extrémálne body, ktoré môžeme ďalej použiť na výpočet.

Tieto dáta sme zo simulácie získavali každých 200 simulačných krokov. Pomocou týchto štyroch bodov sme určili polohu ťažiska ako ich priemer. Následne sme určili napríklad polohu extrémálneho bodu v X-ovom smere L vzhľadom na ťažisko. V dvoch za sebou idúcich snímkach tak máme dva vektory, pomocou ktorých vieme určiť uhol

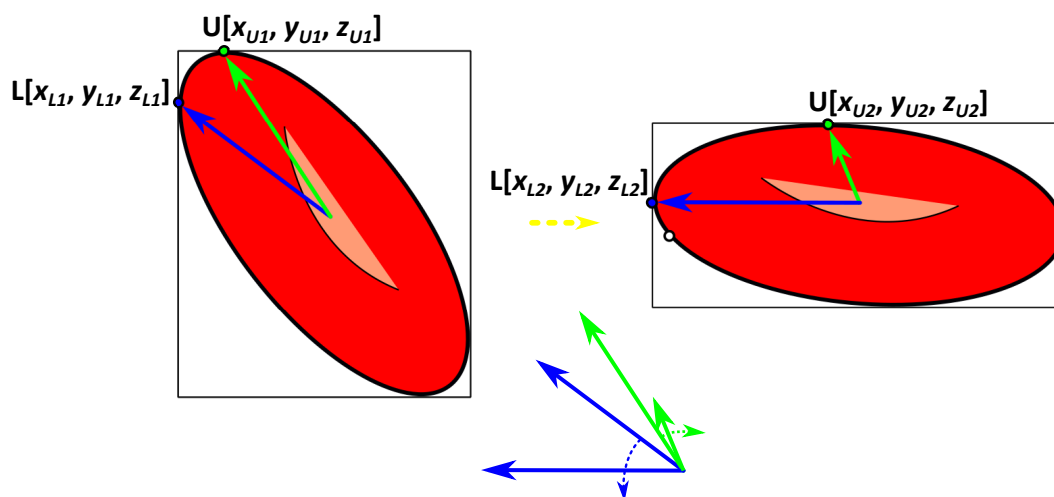


Obr. 73: Metóda D merania rotácie červenej krvinky.

ktorý zvierajú. Potom uhlovú rýchlosť vypočítame podobne, ako sme to robili s presnými dátami zo simulácie.

Táto metóda má však aj svoje nedostatky. Prvým nedostatkom je, že sledované body nie sú v každom kroku tie isté (Obr. 74). Vplyv tohto nedostatku však odstraňuje dostatočne veľká frekvencia zaznamenávania snímok. Vtedy sú body dostatočne blízke a môžeme ich považovať za totožné.

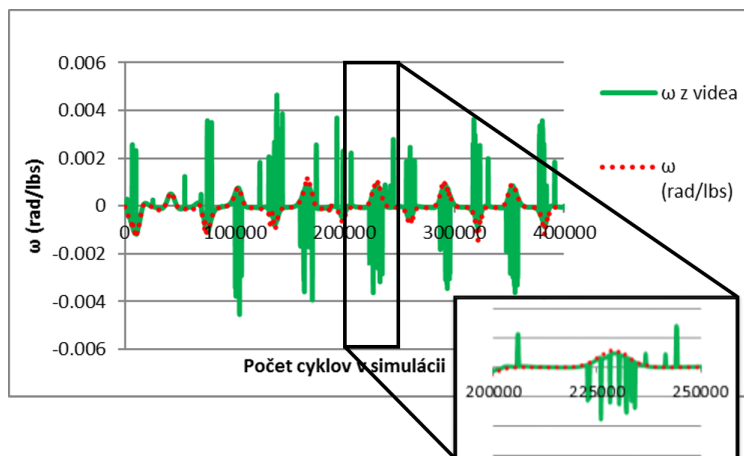
Existuje tiež dôvod, prečo treba pre výpočet použiť vzdialenejší bod. Ak by sme uvažovali bližší bod, môže nastať situácia, že výsledná rotácia bude mať dokonca opačný smer ako skutočná rotácia bunky.



Obr. 74: Nevýhoda metódy D.

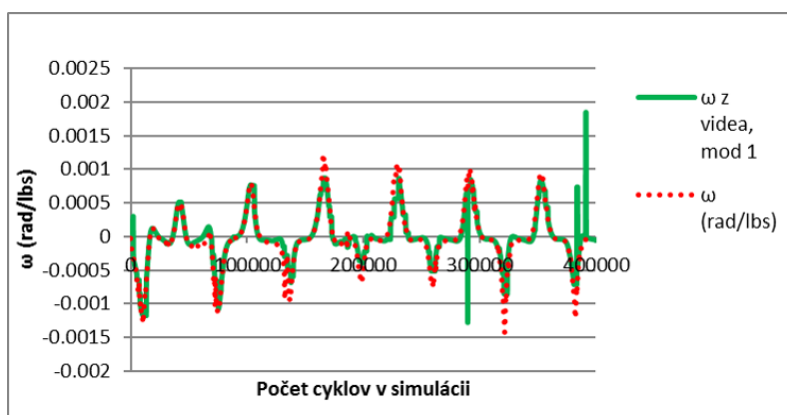
Na Obr. 75 vidíme graf uhlovej rýchlosti získanej predstaveným algoritmom v porovnaní so skutočnou uhlovou rýchlosťou vypočítanou metódou C. V grafe sa nachádza veľké množstvo šumu, ale podobnosť so skutočnou uhlovou rýchlosťou je zrejmalá. Šum

je zrejme spôsobený občasnou rotáciou bunky v treťom smere, čo náš prístup neberie do úvahy.



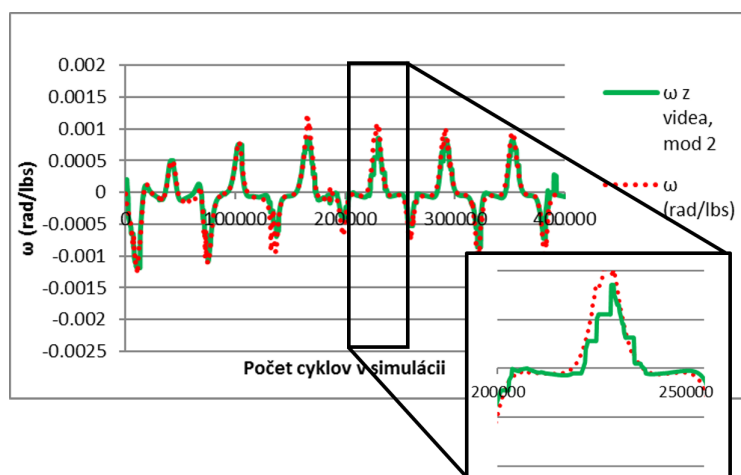
Obr. 75: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti vypočítanej metódou C (červená čiara) a metódou D (zelená čiara)

Šum je tvorený nesystematickými vrcholmi a tak sme navrhli metódu filtrovania. Filtrovanie spočíva v potlačení všetkých meraní, v ktorých sa vzdialenosť sledovaného bodu od ťažiska líši o viac ako 0,1 % oproti predchádzajúcemu meraniu. Graf takto ošetrených dát je zobrazený na Obr. 76. V grafe sú stále prítomné zriedkavé vrcholy, ale ako si ďalej ukážeme, takýto výstup je dostatočne presný.



Obr. 76: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti vypočítanej metódou C (červená čiara) a metódou D po aplikácii filtra (zelená čiara)

Ostatkový šum sa dá ďalej odstrániť (Obr. 77), ale stratíme aj informácie o skutočnej uhlovej rýchlosti.



Obr. 77: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti vypočítanej metódou C (červená čiara) a metódou D po aplikácii dvojnásobného filtrovania (zelená čiara)

6.2 Porovnanie metód

Porovnať všetky metódy by sme samozrejme mohli pomocou grafov priebehu. Pre exaktnejší výsledok sme však zvolili diskretnú Fourierovu transformáciu, ktorá dobre popisuje periodické správanie rôznych procesov. Pre štyri výstupy získané popísanými metódami z priebehu tej istej bunky sme definovali a utriedili 25 najvýznamnejších periód na základe hodnôt spektra amplitúd (Tab.10).

Rozsah 25 periód zodpovedá rozsahu od 100% do 10% maximálnej hodnoty amplitúdy. Zo skúsenosti je tento rozsah postačujúci na zachytenie podstatného periodického správania signálu, teda v našom prípade rotácie. Z Tab. 10 môžeme tušiť podobnosť medzi metódami, no chceli sme ju overiť aj štandardnými štatistickými metódami. Pre porovnanie sme zvolili Kendall tau koeficient, ktorý testuje koreláciu medzi poradiami pre rôzne množiny dát. Metódu sme však museli pre naše účely mierne prispôbiť. Pre všetky štyri metódy sme našli dokopy až 28 rozličných hodnôt periód. Každý metóde sme preto periód, ktoré pre ňu neboli v medzi prvými 25 pridali na 26. až 28 miesto. Takýto upravený vstup poradí periód pre všetky štyri metódy vidíme v Tab. 10. Medzi každou dvojicou metód sme potom vypočítali hodnotu Kendall tau, tabuľku výsledkov vidíme v Tab.11.

Môžeme vidieť, že všetky hodnoty sú blízke hodnote 1 (1 je výsledok pre dve identické sekvencie) a zamietame hypotézu o nezávislosti súborov dát na hladine významnosti $\alpha = 0,01$. Môžeme teda tvrdiť, že všetky štyri navrhnuté metódy merania

rotácie charakterizujú periodické správanie červených krviniek rovnocenne.

Tab. 10: Poradie 25 najdôležitejších frekvencií pre výsledky všetkých štyroch metód. Frekvencie spolu s poradím, v ktorom skončili pre výsledky danej metódy. Vstup pre výpočet Kendall's tau hodnoty.

poradie	A	B	C	D
1	6	6	6	6
2	7	7	19	19
3	19	19	7	7
4	12	12	12	12
5	1	1	1	8
6	20	20	20	5
7	5	5	32	32
8	8	8	5	1
9	32	32	8	11
10	0	0	0	20
11	17	17	17	18
12	25	25	18	25
13	16	16	4	17
14	3	3	25	4
15	18	18	16	21
16	11	11	3	24
17	4	4	11	10
18	10	10	21	16
19	33	21	10	9
20	21	15	33	2
21	15	33	9	3
22	13	13	24	0
23	28	28	15	13
24	2	2	2	27
25	27	27	45	15

perióda	A	B	C	D
6	1	1	1	1
7	2	2	3	3
19	3	3	2	2
12	4	4	4	4
1	5	5	5	8
20	6	6	6	10
5	7	7	8	6
8	8	8	9	5
32	9	9	7	7
0	10	10	10	22
17	11	11	11	13
25	12	12	14	12
16	13	13	15	18
3	14	14	16	21
18	15	15	12	11
11	16	16	17	9
4	17	17	13	14
10	18	18	19	17
33	19	21	20	27
21	20	19	18	15
15	21	21	23	25
13	22	22	26	23
28	23	23	27	26
2	24	24	24	20
27	25	25	28	24
24	26	26	22	16
9	27	27	21	19
45	28	28	25	28

Tab. 11: Výsledky porovnania jednotlivých metód merania rotácie pomocou Kendal tau. Pre hladinu významnosti $\alpha = 0,01$ stačí, aby hodnota presahovala kritickú hodnotu 0,312, pre $\alpha = 0,1$ je kritická hodnota 0,180.

metóda	A	B	C	D
A	1	0,989	0,857	0,646
B	0,989	1	0,857	0,656
C	0,857	0,857	1	0,714
D	0,646	0,656	0,714	1

6.3 Záver

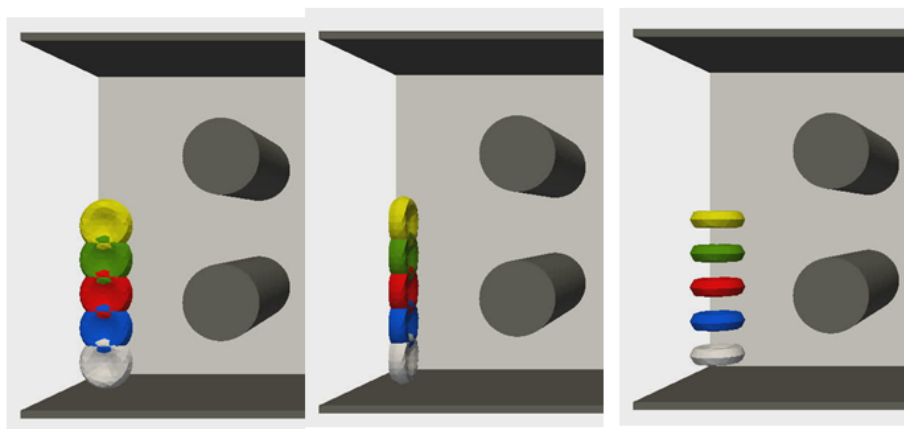
V tejto kapitole sme navrhli rôzne spôsoby merania rotácie červenej krvinky. Práca nadväzuje na časť 5.3.4, kde sme navrhli charakteristiky popisujúce rotáciu, ako dôležitú charakteristiku správania červených krviniek počas ich toku. Tam sme merali rotáciu metódou vhodnou iba pre simulačný model. Teraz sme túto metódu overili pomocou ďalšej metódy vychádzajúcej zo simulačného výstupu a porovnali ju aj s metódou odvodenou z fyzikálnej definície uhlovej rýchlosti. Posledná metóda bola navrhnutá pre získanie rotačnej charakteristiky z videozáznamu. Všetky štyri metódy sme potom porovnali použitím výstupov z diskkrétnej Fourierovej transformácie a Kendall tau testu. Výsledkom je, že popis periodického správania rotácie pomocou všetkých metód môžeme považovať za rovnaký.

7 Metódy na analýzu trajektórií červených krviniek

V článku [86] navrhujeme a overujeme niekoľko spôsobov spracovania a analýzy typológie a stability trajektórií v simuláciách s jednotlivými alebo veľkými počtami červených krviniek v mikrofluidických kanáloch s periodickým poľom cylindrických prekážok.

7.1 Stabilita trajektórií jednotlivých červených krviniek

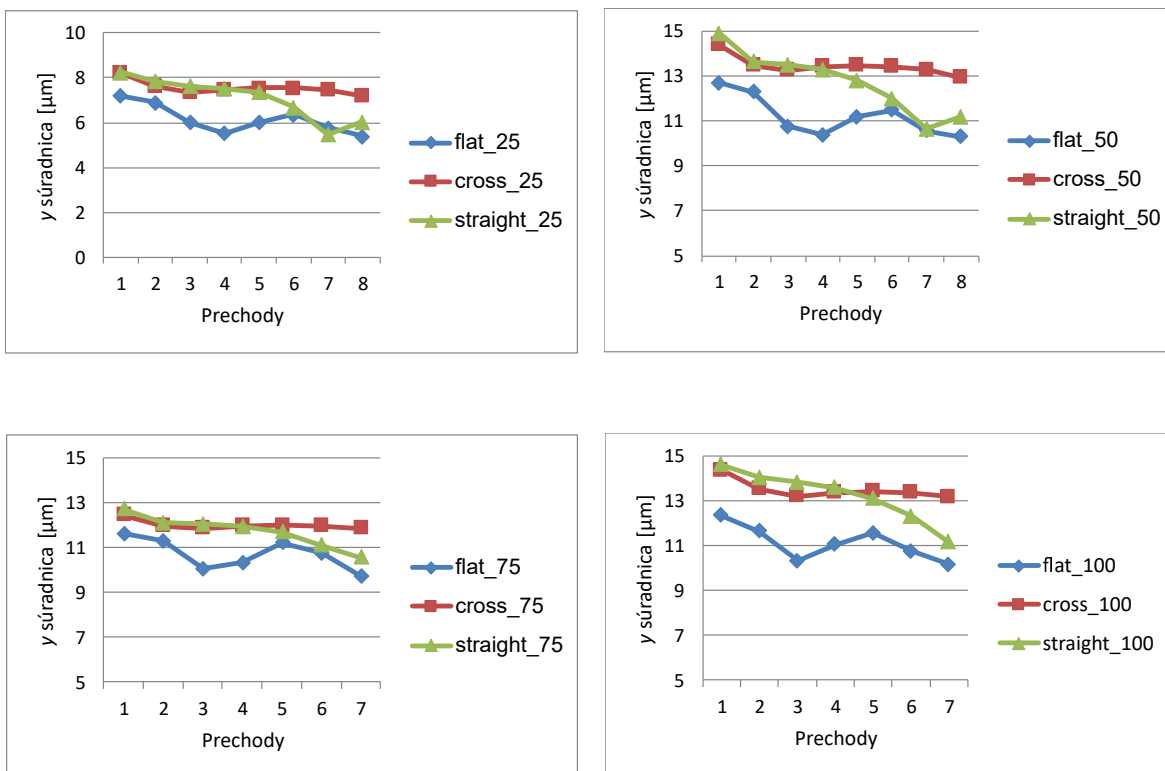
Na začiatok sme vykonali jednoduché simulácie, aby sme overili stabilitu trajektórie a citlivosť jej charakteristiky od počiatkovej pozície a polohy červenej krvinky. V každom z kanálov A a C (Obr. 37, 41) sme pustili samostatnú bunku z 15 rôznych štartovacích pozícií (Obr. 78) a sledovali sme jej prechod cez určité oblasti. Bunku sme púšťali z 5 rôznych miest (začiatok kanála s y súradnicou 5, 10, 15, 20 a 25 μm od steny kanála) a v 3 rôznych orientáciách (*flat*, *cross*, *straight*). Všetky ostatné parametre simulácii boli zhodné s experimentami popísanými v 5.1.



Obr. 78: Štartovacie pozície pre experimenty so samostatnou bunkou v kanáloch A a C.

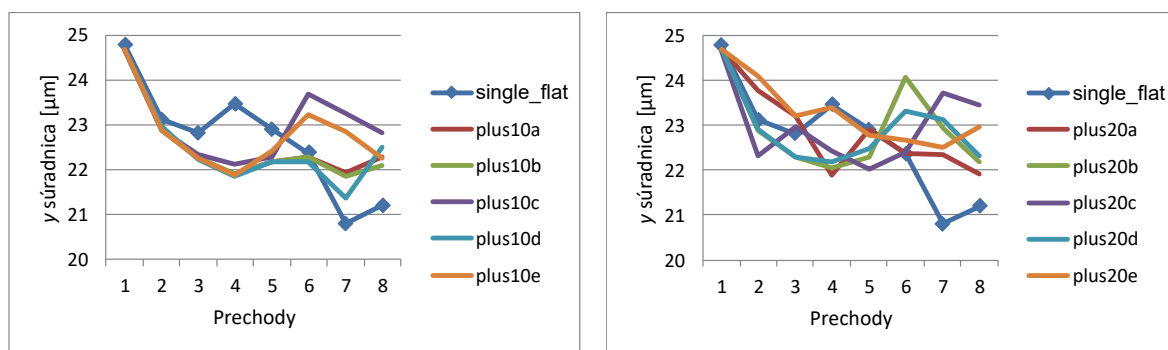
Sledovali sme y súradnicu stredu bunky, keď opakovane prechádzala rovnakou oblasťou kanála. Chceli sme zistiť, či trajektória bude mať stabilnú, náhodnú, stúpajúcu alebo klesajúcu tendenciu. Napriek jednoduchosti simulácii, popísanie celej trajektórie nie je jednoduché, preto je nutná určitá redukcia sledovaných údajov. Zamerali sme sa teda na prechod bunky okolo stĺpkových prekážok a sledovali sme y súradnicu v danom okamihu. V kanáli A to bolo pri x súradniciach $25 + k \cdot 100 \mu\text{m}$ a $75 + k \cdot 100 \mu\text{m}$, kde k je prirodzené číslo. V kanáli C to bolo na x súradniciach $42,5 + k \cdot 100 \mu\text{m}$ a $57,5 +$

$k \cdot 100 \mu\text{m}$. V oboch kanáloch sme tiež sledovali prechod cez stred ($50 + k \cdot 100 \mu\text{m}$) a koniec ($100 + k \cdot 100 \mu\text{m}$) kanála. Bunky počas simulácie prešli periodicky sa opakujúcim úsekom 6-8 krát, preto sme pre každú popísanú pozíciu získali najmenej šesticu y súradníc. Takýmito prechodmi sme potom preložili regresnú krivku a sledovali sme trend. Ak absolútna hodnota koeficientu sklonu prekročila 0,1, považovali sme prechod bunky okolo prekážok za nestabilný a táto hodnota vyjadrovala trend zmeny. Hodnota 0,3 zodpovedá zmene asi 5% z celkovej šírky kanála a 20% zo šírky priemernej medzery medzi prekážkami. Príklad výsledkov znázornených v grafe je na Obr.79.



Obr. 79: Bunka zo štartovacieho miesta $15 \mu\text{m}$ od steny v kanáli A, všetky počiatočné orientácie a prechody cez všetky sledované x rezy. Tendencia zmeny trajektórie je jasne viditeľná. Koeficienty sklonu pre preložené regresné krivky sú pre súradnice $x = 25$: -0,19813, -0,08924, -0,35882; $x = 50$: -0,26794, -0,12479, -0,54526; $x = 75$: -0,19956, -0,05978, -0,31496; $x = 100$: -0,25306, -0,13050, -0,51749.

Pre ďalšiu verifikáciu takýchto výsledkov sme pre jednu z 15 počiatočných pozícií v kanáli A uskutočnili simulácie s pridaním dodatočných buniek do kanála. V jednej päťici simulácií bolo 10 ďalších náhodne rozmiestnených buniek a v druhej päťici 20 náhodne rozmiestnených buniek.



Obr. 80: Bunka zo štartovacieho miesta $25 \mu\text{m}$ od steny v kanáli A, počiatková orientácia *flat*, prechod cez rez $x = 50 + k \cdot 100 \mu\text{m}$. V grafe naľavo porovnanie s piatimi simuláciami a s dodatočnými 10 bunkami, vpravo s 20 bunkami.

Zo získaných výsledkov môžeme zhrnúť niekoľko záverov:

- Sledovaná charakteristika (y súradnica stredu bunky pri prechode dôležitými rezmi kanála) silno závisí od miesta štartu bunky. Pre niektoré miesta je zmeraná sekvencia pre všetky prechody takmer konštantná, pre iné značne klesá alebo stúpa a neskôr sa ustáli na trajektórii danej topológiou kanála.
- Trajektória závisí taktiež od počiatkovej orientácie bunky. Najmä pri počiatkovej orientácii *flat* nastávajú veľmi chaotické zmeny v meranej charakteristike. Ako sme však zistili v 5.4.2, takáto orientácia počas toku veľmi zriedkavá. Možno predpokladať, že pri hustejších simuláciách sa po kontakte s ostatnými bunkami jej orientácia zmení.
- Správanie izolovaných buniek sa výrazne líši po pridaní ďalších buniek do simulácie (už pri hematokrite 2-5%). Sklon regresnej krivky našej charakteristiky pri prechodoch kanálom už v tomto prípade nemalo zmysel sledovať, pretože zmeny boli veľmi náhodné.

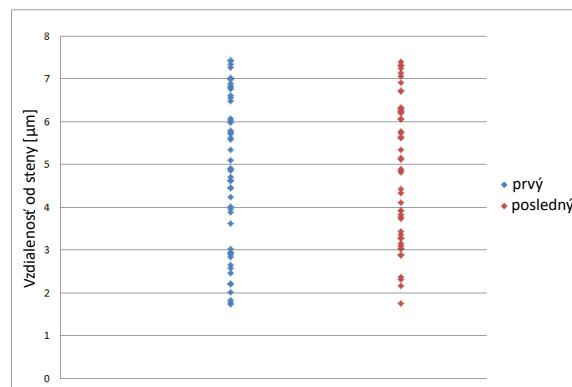
Na základe týchto zistení je zrejmé, že charakteristiky popisujúce trajektórie buniek a ich stability musia byť sledované na experimentoch s viacerými bunkami, ktorých počiatková poloha a orientácia bude veľmi rôznorodá. Takáto charakteristika musí vychádzať zo štatistických informácií čo najväčšieho počtu, ideálne všetkých buniek v experimente.

7.2 Analýza stability trajektórií pre veľké počty červených krviniek

V kontexte predchádzajúcich záverov sme navrhli metodiku pre štatistické monitorovanie a hodnotenie stability trajektórií pre veľký počet červených krviniek. Hlavným zámerom bolo spracovanie a redukcia väčšieho počtu dát a posúdenie stability trajektórií na základe štandardných štatistických metód.

Metódu sme navrhli a verifikovali na výsledkoch simulácií s 20, 50 a 100 červenými krvinkami s náhodným počiatočným rozmiestnením v kanáli A a 50 krviniek v kanáli C. Všetky parametre simulácií boli zhodné s tými popísanými v 5.1. Merané dáta boli podobné ako v predchádzajúcej kapitole. Opäť sme merali súradnice stredu všetkých buniek pri prechode cez rovnaké štyri rezy kanála, no tentoraz len počas prvého a posledného prechodu. Pre každú simuláciu sme tak dostali dve sady dát. Je predpoklad, že ak sú trajektórie stabilné, tieto sady pochádzajú z rovnakého štatistického rozdelenia.

Aby sme túto metódu mohli potenciálne použiť aj pre iné tvary kanálov, sledovali sme vzdialenosť stredu bunky (v smere y) od steny najbližšej prekážky keď okolo nich prechádzala (v kanáli A keď $x = 25 + k \cdot 100 \mu\text{m}$ a $75 + k \cdot 100 \mu\text{m}$). Na pozíciách $x = 50 + k \cdot 100 \mu\text{m}$ a $100 + k \cdot 100 \mu\text{m}$ sme merali vzdialenosť stredu bunky od steny kanála. Príklad graficky reprezentovaných výstupov je na Obr. 81



Obr. 81: Príklad výstupných dát pre prvý a posledný prechod 50 buniek cez pozíciu $75 + k \cdot 100$ v kanáli A.

Pre vyhodnotenie podobnosti výstupov pre prvý a posledný prechod buniek cez všetky rezy sme použili dvojjvýberový Kolmogorov-Smirnov test. Ten testuje nulovú hypotézu, že dve sady dát pochádzajú z rovnakého rozdelenia. Celkovo sme vyhodnotili

podobnosť pre 5 simulácií a v každej pre 4 rezy. Na základe kritéria KS testu môžeme hypotézu o rovnakom rozdelení akceptovať v 12 prípadoch. V dvoch prípadoch by sme hypotézu zamietli na hranici významnosti 5%, raz na hranici 10% a 5 krát na hranici významnosti 15% (Tab.12). Na základe týchto výsledkov považujeme túto metodiku za dostatočne citlivú a vhodnú na spracovanie a hodnotenie stability trajektórií červených krviniek v kanáloch s periodickým poľom prekážok.

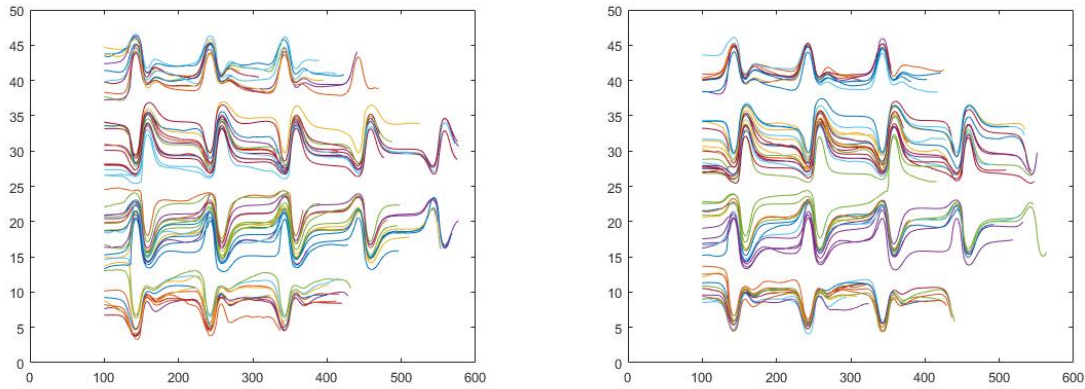
Tab. 12: Výsledky Kolmogorov-Smirnov testu pre dáta prechodov cez rezy. Hodnota 0 znamená prijatie hypotézy o rovnakom rozdelení. V opačnom prípade je znázornená hladina významnosti na akej môže byť hypotéza zamietnutá.

rez		A100	A50a	A50b	A20	rez	C50
$x = 25 \mu m$	výsledok	5%	h_0	15%	15%	$x = 42,5 \mu m$	h_0
	p-hodnota	0,260	0,954	0,508	0,497		0,678
$x = 50 \mu m$	výsledok	h_0	h_0	h_0	15%	$x = 50 \mu m$	h_0
	p-hodnota	0,556	0,678	0,678	0,497		0,841
$x = 75 \mu m$	výsledok	h_0	15%	h_0	h_0	$x = 57,5 \mu m$	10%
	p-hodnota	0,961	0,501	0,678	0,966		0,358
$x = 100 \mu m$	výsledok	h_0	15%	h_0	5%	$x = 100 \mu m$	h_0
	p-hodnota	0,961	0,508	0,841	0,275		0,841

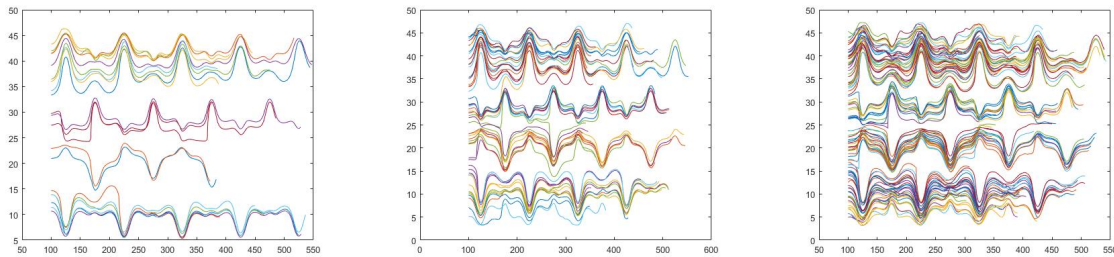
7.3 Spracovanie trajektórií červených krviniek v celom kanáli

V tejto časti by sme chceli nájsť charakteristiku trajektórií krviniek, ktorá by zachytávala celý priebeh toku všetkých buniek v kanáli, nezávisle od jeho tvaru. Pre tieto potreby sme opäť zobrali výsledky zo simulácií v kanáloch A a C, ktoré sú bližšie popísané v 5.1. Vzhľadom na topológiu kanálov a záujem hlavne o informácie týkajúce sa vzdialenosti buniek od prekážok, najzaujímavejšie pre nás sú informácie o x a y súradniciach polôh buniek. Ak si tieto dáta správne vykreslíme (Obr. 82, 83), vidíme že trajektórie dobre definujú topológiu kanála nezávisle od počiatočného rozmiestnenia buniek a ich počet.

Na predchádzajúcich obrázkoch vidíme, že bunky v určitých skupinách majú podobné trajektórie. Aby sme redukovali dimenziu takýchto dát a pritom zachovali podstatné informácie, aplikovali sme na dáta o trajektóriách metódu hlavných komponentov

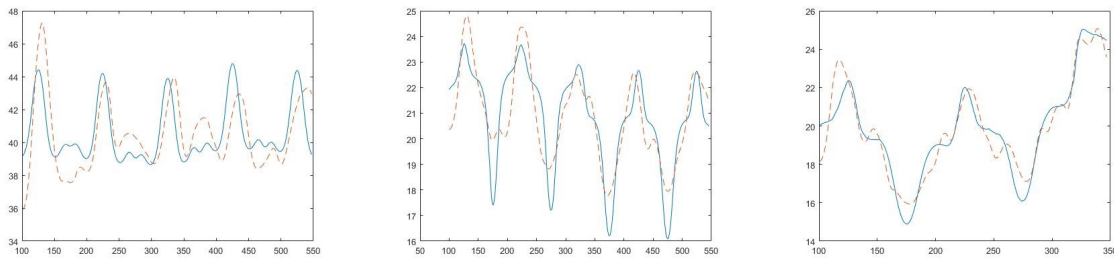


Obr. 82: Závislosť y súradníc od x pre simulačné experimenty C50 a C50b.



Obr. 83: Závislosť y súradníc od x pre simulačné experimenty A20, A50a a A100.

(PCA). Na Obr. 84 vidíme rekonštrukciu trajektórie určitej bunky pomocou niekoľkých hlavných komponentov.



Obr. 84: Rekonštrukcia trajektórie jednej z buniek z experimentu: A20 pomocou prvých 4 hlavných komponentov; A50a pomocou prvých 9 hlavných komponentov a A100 pomocou prvých 10 hlavných komponentov.

Ďalšími pokusmi sme zistili, že už prvé tri hlavné komponenty charakterizujú nie len topológiu kanála, ale aj počet buniek v danom experimente. Pomocou nich by sa tiež dali zrekonštruovať trajektórie, ktoré by neboli také presné ako na predchádzajúcom obrázku, ale dali by sa interpretovať ako typické, pre daný kanál.

7.4 Predikcia trajektórií červených krviniek pomocou metódy strojového učenia

Predchádzajúce výsledky pomocou PCA nás priviedli na myšlienku predikovania dráh toku červených krviniek. Urobíme tak pomocou metódy strojového učenia podobného Kohonenových neurónovým sieťam. Trénovacie dáta pre túto sieť boli výstupy zo simulačných experimentov, konkrétne polohy buniek a ich vektory rýchlosti v danom časovom kroku. Z týchto dát metóda vytvorí bázu, ktorá každému bodu v kanáli priradí vektor rýchlosti. Tieto bázy by mali byť pre každú jednu simuláciu špecifické. Očakávame však, že medzi bázami simulácií z rovnakého kanála bude zrejma korelácia a báza získaná zo všetkých takýchto experimentov bude dobrá charakteristika danej topológie. Na učenie sme použili dáta z experimentov A20, A50a, A100, A50b, A50d, C50a a C50b, bližšie popísané v 5.1.

7.4.1 Návrh učiacej sa siete

Pozície a rýchlosti buniek zo simulácií budú slúžiť na naučenie sa jednotlivých bazických funkcií. Ich počet si určíme dopredu a budeme ho označovať N . V prvom kroku, bazická funkcia B_i pre $i \in \{1, 2, \dots, K\}$ bude zvolená náhodne, ako 6-prvkový vektor reprezentujúci pozície a rýchlosti. V prvom priblížení bude model lineárnou kombináciou báz $B_i(r, v)$, ktoré sú náhodne pridelené. V ďalších krokoch bude aplikované nasledujúce pravidlo:

$$V_{i+1}(r, v) = \sum_{i=1}^N w_i(r) B_i(v), \quad (34)$$

kde N je počet bazických funkcií, B_i sú bázy a $B_i(v)$ predstavuje rýchlostný vektor i -tej bázy, $w_i(r)$ je váha i -tej bázy pre pozíciu bunky r a $V_{i+1}(r, v)$ je predikovaná rýchlosť bunky B_{i+1} na pozícii r .

Pre učenie báz sme zvolili učiaci mechanizmus veľmi podobný Kohonenovej sieti [82], kde sú váhy pri neurónoch nastavené tak, aby pokryli vstupný priestor čo najlepšie. Váhy sme volili podľa [83], kde bola Kohonenova sieť použitá na riešenie úlohy inverznej kinematiky ramena, čo je úloha podobná s problémom nášho experimentu, hľadá sa

asociácia medzi polohou a rýchlosťou v danom bode.

Pre každý experiment sme učenie spustili nezávisle. Počiatočné hodnoty bazových funkcií boli vybrané z náhodne vybraných polôh a rýchlostí krviniek. Učenie báz prebiehalo predkladaním polohy krvinky $C(r)$ a jej rýchlosti $C(v)$. Báza má dve zložky: polohu $B_i(r)$ a rýchlosť $B_i(v)$. Obe sa upravujú vzťahmi, ktoré zodpovedajú metóde *stochastic gradient descent* popísanej v [83].

$$B_i(r) = (1 - \eta\alpha_i)B_i(r) + \eta\alpha_i C(r) \quad (35)$$

$$B_i(v) = (1 - \eta\alpha_i)B_i(v) + \eta\alpha_i C(v) \quad (36)$$

Parameter $\eta \in (0, 1)$ predstavuje rýchlosť adaptácie báz a α_i je miera podobnosti polôh $B_i(r)$ a $C(r)$. Spočíta sa pomocou podobnostnej funkcie podľa nasledujúcich vzťahov:

$$\beta_i = \frac{k}{k + \|B_i(r) - C(r)\|^2} \quad (37)$$

$$\alpha_i = \frac{\beta_i}{\sum_{j=1}^N \beta_j}, \quad (38)$$

kde parameter $k > 0$ predstavuje strmlosť podobnostnej funkcie. Zo vzťahu je zrejmé, že hodnota parametra $\alpha_i \in (0, 1)$, pre blízke polohy krvinky C , sa blíži k jednej, pre vzdialené krvinky sa blíži k nule. Rovnica 38 predstavuje normovanie hodnôt α_i tak, aby ich súčet bol 1. V našom učení sme zvolili počet báz $N = 10000$, parameter $k = 0.01$ a rýchlosť učenia $\eta = 0.1$. Počet iterácií učenia bol 500000.

7.4.2 Rekonštrukcia polohy a rýchlosti bunky

Po natrénovaní báz je možné otestovať predikčné schopnosti modelu. Vstupom je ľubovoľná poloha bunky $T(r)$, cieľom je predpovedať aká bude rýchlosť $T(v)$ v tomto bode. Najskôr sa vypočítajú hodnoty α_i podľa vzťahov (37) a (38), ktoré korešpondujú s váhami $w_i \equiv \alpha_i$. Pomocou vzťahu (34) sa spočíta rýchlosť v danom bode. Numerickou integráciou je možné získať trajektóriu testovanej bunky:

$$T_{n+1}(r) = T_n(r) + T_n(v)dt$$

Následne môžeme určiť rýchlosti v celom priestore kanála, teda aj v miestach kde sa žiadna bunka z trérovacej množiny nevyskytovala. Vďaka tomu môžeme porovnávať experimenty medzi sebou.

Ani pri porovnaní výsledkov nemôžeme použiť všetky body, nakoľko ide o veľmi veľký objem dát. Preto sme metódou Monte Carlo vybrali 1000 náhodných pozícií $T(r)$. Výsledná vzdialenosť báz je počítaná normovanou euklidovskou metrikou. Najskôr sa určia rýchlostné zložky báz dvoch natrénovaných modelov X, Y pre polohu $T(r)$: $T_X(v) = T_X(r)$ a $T_Y(v) = T_Y(r)$, kde $T(r)$ predstavuje náhodnú testovaciu polohu. Rozdiel polôh je spočítaný ako $d_T = \|V_{xT} - V_{yT}\|$. Takto vybraných 1000 pozícií je spriemerovaných. Porovnával sa každý model s každým, výsledky rozdielu sú v tabuľke 13.

Tab. 13: Veľkosť chyby medzi jednotlivými modelmi.

	A20	A50a	A100	A50b	A50d	C50a	C50b
A20	0	0,024045	0,026852	0,029994	0,028294	0,069815	0,065913
A50a	0,024174	0	0,011605	0,025831	0,023463	0,062432	0,064022
A100	0,026618	0,011235	0	0,027454	0,026459	0,063747	0,061519
A50b	0,028648	0,025418	0,027196	0	0,022168	0,064810	0,066823
A50d	0,026980	0,026299	0,026794	0,022792	0	0,063020	0,062761
C50a	0,066236	0,067181	0,063129	0,067300	0,064338	0	0,020975
C50b	0,065729	0,066606	0,062175	0,063798	0,064817	0,022061	0

Experimenty kde sa očakáva menšia chyba (rovnaké kanály) majú rovnakú farbu. Kanály A sú červené a kanály C sú modré. Z hodnôt je zrejmé, že modely sa líšia s menšou chybou pre rovnaký kanál. Namerané priemerné hodnoty chýb sa dajú interpretovať ako rozdiel predikcie rýchlostí, a pohybujú sa na úrovni 10% rýchlosti skutočných buniek. Linearita a jednoduchosť modelu však spôsobuje aj rozdiely v spoločnom kanáli. Rozdiely v bázach pre rovnaký kanál sú zapríčinené rôznymi počiatočnými podmienkami experimentov, ale aj tým, že model neuvažuje kolízie buniek a nelinearitu vzťahov. V ďalšom smerovaní by preto bolo zaujímavé zamerať sa na nelineárne modelovanie, napríklad pomocou techník *deep learning*.

Pre porovnanie výsledkov sme vykonali aj test, kde sme dáta rozdelili na dve časti, na trérovaciu a testovaciu množinu a každý experiment sme urobili nezávisle. Na tes-

tovanie sme zvolili 25% dát. Merali sme odchýlku rýchlosti nameranej v simulácii od rýchlosti predikovanej modelom. Výsledky sú uvedené v tabuľke 14.

Tab. 14: Veľkosť chyby pre testovaciu množinu.

experiment	absolútna chyba	absolútna veľkosť vektoru	RME [%]
A20	0,029266	0,253014	11,047184
A50a	0,037301	0,253148	14,865701
A100	0,021849	0,131263	16,436213
A50b	0,038164	0,259319	14,196479
A50d	0,040760	0,255995	14,843164
C50a	0,034798	0,256949	13,244931
C50b	0,038682	0,246271	15,349910

7.5 Predikcia trajektórií pohybu buniek

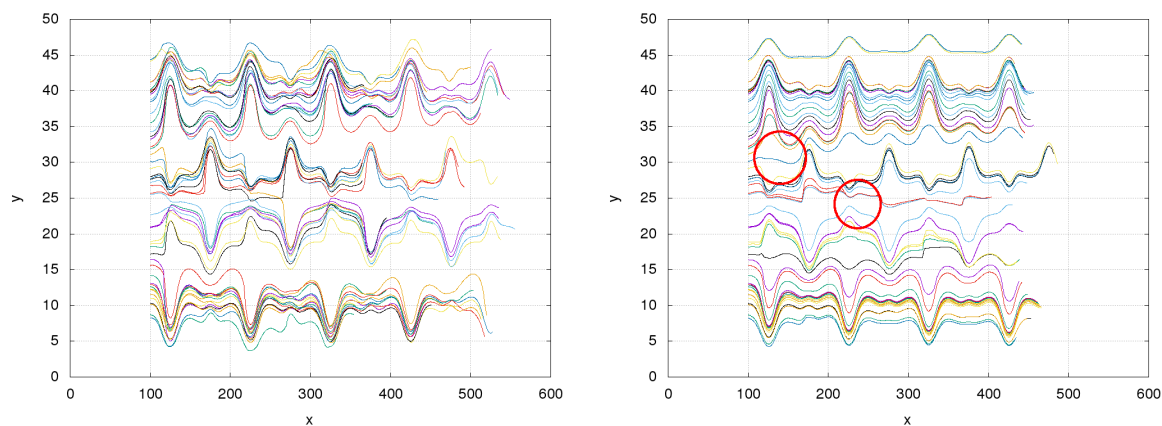
Tento model strojového učenia je možné použiť na predikciu výsledkov experimentu. Možná aplikácia je pri spracovaní videa, konkrétne trasovaní jednotlivých buniek. V zázname z experimentov s viacerými bunkami sa často stane, že bunky sa navzájom prekryjú a trasovací algoritmus jednu z buniek „stratí“. Vďaka predikcii by mohol dráhu skrytej bunky odhadnúť, potom ju znova nájsť a pokračovať v trasovaní.

Na otestovanie predikcie sme zvolili experiment *A50d*. Model sme natrénovali pomocou všetkých ostatných experimentov z kanála A, bez ohľadu na počiatočné rozmiestnenie a počet krviniek. Dráhy, ktoré sme získali simuláciou a dráhy získané z modelu sú na Obr. 85.

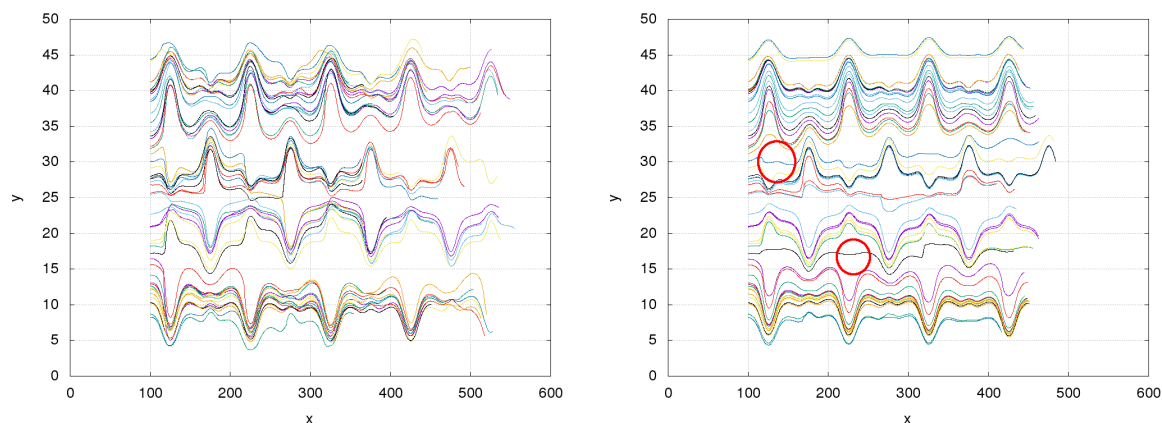
Druhý test vznikol trénovaním len na dátach zo simulácií v kanáli A s počtom krviniek 50 (Obr. 86). Na obrázkoch je vidieť, že tento model dokáže predpovedať trajektórie. Pre jeho jednoduchosť, však dochádza aj k chybám, napríklad keď krvinka prechádza cez pevnú prekážku alebo nevie zachytiť zmenu prúdnice krvinky. Chyby sú na obrázkoch vyznačené.

7.5.1 Aproximácia trajektórií v kanáloch s rôznou geometriou

Nasledujúce obrázky predstavujú rýchlosti buniek $\|C(v)\|$ v celom priereze kanálov A a C tak, ako boli získané z tréovania báz využitím dát zo simulácií. Model umožňuje



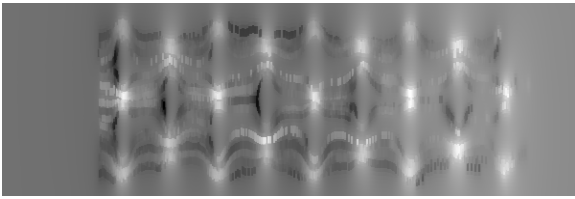
Obr. 85: Trajektórie 50 buniek získaných simuláciou A50d a trajektórie získané modelom naučenom na zvyšku simulácii v kanáli A.



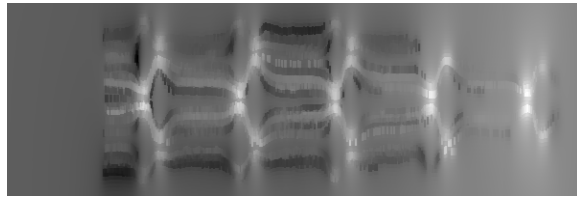
Obr. 86: Trajektórie 50 buniek získaných simuláciou A50d a trajektórie získané modelom naučenom na simuláciách A50a a A50b.

získať rýchlosť v ľubovoľnom bode. Vidíme, že pri rôznych geometriách kanála sa rýchlosti v jednotlivých miestach kanálov líšia. Na Obr. 87 sú rýchlosti prislúchajúce geometrii A s 50 krvinkami. Na Obr. 88 sú rýchlosti prislúchajúce geometrii C s 50 krvinkami.

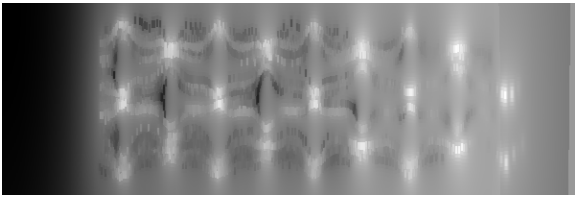
V rovnakom kanáli, pri rôznych počtoch krviniek sú odlišnosti menšie. Na Obr. 89 sú rýchlosti prislúchajúce geometrii A s 50 krvinkami. Na Obr. 90 sú rýchlosti prislúchajúce geometrii A so 100 krvinkami.



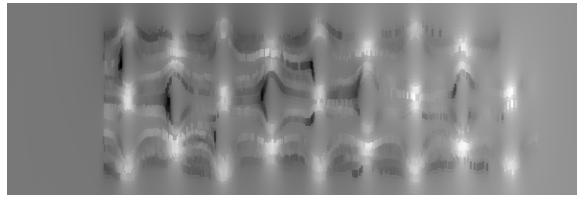
Obr. 87: Rýchlosti získané simuláciami v kanáli A so simuláciami A50 ako trénovacej množiny.



Obr. 88: Rýchlosti získané simuláciami v kanáli C ako trénovacej množiny.



Obr. 89: Rýchlosti získané modelom so simuláciou A100 ako trénovacej množiny.



Obr. 90: Rýchlosti získané modelom so simuláciou A50a ako trénovacej množiny.

7.6 Záver

V prvej časti tejto kapitoly sme navrhli metódu na analýzu stability trajektórií. Ukázali sme, že trajektória je silne závislá od počiatkovej pozície bunky, jej orientácie a od prítomnosti iných buniek prítomných v kanáli. Preto je táto metóda pre popis trajektórií nepostačujúca.

V druhej časti sme trajektórie veľkého počtu krviniek, merané podobnou metódou, vyhodnocovali pomocou štatistického testu. Porovnávali sme rozdelenia pravdepodobnosti pri prechode určitými časťami kanála na začiatku a na konci simulácie. Táto metóda sa ukázala pre overenie stability trajektórií ako dostatočne citlivá.

V ďalšej časti sme skúmali trajektórie v celom kanáli pomocou metódy hlavných komponentov. Metóda sa ukázala ako vhodná na popísanie typických trajektórií krviniek pre rôzne topológie a rôzne hematokrity.

V poslednej časti sme na výstupné dáta pozícií a vektorov rýchlostí červených krviniek z viacerých experimentov vykonaných v rovnakej topológii kanála aplikovali metódu strojového učenia. Jednotlivé simulácie sa líšili počiatkovým náhodným rozmiestnením krviniek. Metóda sa ukázala ako vhodná na popísanie topológie pomocou vytvorenej bázy a taktiež na rekonštrukciu a možnú predikciu trajektórií.

8 Postup pre porovnanie experimentov

V tejto kapitole je navrhnutý postup pre porovnanie simulačného experimentu s laboratórnym experimentom, prípadne viacerých simulačných experimentov navzájom. Simulačné experimenty sa môžu líšiť modelom, ktorý bol pre simuláciu použitý, alebo iba rôznym nastavením parametrov jedného modelu. Zameriame sa na experimenty toku červených krviniek v mikrofluidických zariadeniach. Postup bude podobný aj pre iné objekty, prípadne iné prostredie, v ktorom sa objekty pohybujú.

Postupy pre porovnanie experimentov vo všetkých troch prípadoch si v ďalších častiach všeobecne popíšeme. Zároveň ako ilustráciu uvedieme príklad pre experiment toku jednej červenej krvinky cez zúžený kanál. Laboratórny experiment je popísaný v štúdiu [92] a jeho výsledky sú uverejnené aj v [91].

8.1 Porovnanie simulačného a laboratórneho experimentu

Simulačný experiment s laboratórnym experimentom sa porovnáva najmä pre účely validácie modelu (viac v časti 2.7). Postup porovnania popíšeme z pohľadu používateľa modelu, ktorý chce simulovať daný experiment. Postup nemusí byť nutne vykonaný v navrhnutom poradí.

1. *Získanie výsledkov laboratórneho experimentu*

Výsledky laboratórných experimentov sa dajú najčastejšie získať z historických dát, ktoré sú publikované, zriedkavejšie aj zverejnené vo forme videa. Dôležité je poznať všetky podstatné okolnosti vykonávania experimentov a ich záznamu. Pri realizovaní experimentov toku tekutiny je zásadné vedieť informácie o toku (popísané v časti 2.8), hustote a viskozite tekutiny, tvare a veľkosti kanála. Vlastnosť, ktorú sme zatiaľ pri simuláciách zanedbávali, je povrch kanála. Ďalej je potrebné poznať informácie o tečúcich objektoch. Ak sú v experimente prítomné iba červené krvinky, tak najmä ich počet na jednotku objemu, teda hematokrit.

Ďalej je dobré poznať aj okolnosti experimentu, ktoré často nie sú publikované. Niektoré časti mikrofluidických zariadení alebo časti ich kanálov sa počas experimentu môžu bunkami upchať, čo ovplyvní tok v ostatku kanála.

Pri videozázname je tiež potrebné poznať rýchlosť záznamu, napríklad *frame rate*,

teda počet snímok za jednotku času.

Príklad

V laboratórnom experimente, ktorý chceme simulovať, sa púšťala veľmi riedka suspenzia zdravých červených krviniek cez kanál v tvare trúbky, vyhotovenou z kremíku dĺžky 4-5 mm a konštantným priemerom 10 μm . Tekutina sa púšťala rôznou rýchlosťou a prechody jednotlivých buniek sa zaznamenávali vysokorýchlostnou kamerou. Zo záznamu sa potom pomocou komerčne dostupného softvéru sledovali deformácie a rýchlosti buniek. Rýchlosť tekutiny v zariadení je uvedená pomocou zmeny tlaku na jednotku dĺžky $\frac{\Delta P}{L}$. Hustota použitej tekutiny bola $1000\text{kg}/\text{m}^3$ a dynamická viskozita bola $1.05\text{mPa} \cdot \text{s}$.

2. *Určenie kritérií pre porovnanie*

V tomto kroku treba identifikovať také charakteristiky výsledkov experimentu, ktoré dobre popisujú dôležité správanie sa červených krviniek počas toku. Kvantitatívne charakteristiky popisujúce hromadné správanie červených krviniek sme navrhli v Kap. 5. To, ktoré z nich budeme v experimente sledovať závisí od viacerých faktorov. Od topológie kanála, hematokritu, rýchlosti toku, ale aj od spôsobu záznamu a kvality videozáznamu. Napríklad rotácie krviniek budú viac prítomné pri experimentoch s menším hematokritom, kde bude dochádzať ku interakciám buniek medzi sebou a s prekážkami. V experimentoch s väčším hematokritom a v kanáloch bez prekážok bude lepšie sledovať natočenie buniek. Trajektórie a rýchlosti budú dôležité pre každý experiment.

Získané charakteristiky bude neskôr potrebné porovnať medzi výsledkami získanými z laboratórneho experimentu a výsledkami získanými zo simulácie. Preto je namieste si ešte predtým určiť, kedy budeme s modelom spokojní, teda aký veľký rozdiel medzi výstupom z modelu a realitou bude akceptovateľný. Táto hranica závisí od typu charakteristík. Pri štatistických charakteristikách, keď testujeme zhodnosť rozdelení, to bude hladina významnosti testovania. Pri číselných výstupoch to môže byť prijateľná veľkosť rôzne definovanej chyby, napríklad percentuálna chyba:

$$E\% = \left| \frac{B - S}{B} \right| * 100, \quad (39)$$

kde S je hodnota získaná zo simulačného experimentu a B je hodnota získaná z biologického experimentu.

Pri kvalitatívnych charakteristikách (napr. vytvorenie *bezbunkovej vrstvy*) stačí sledovať, či želaný jav nastal alebo nie.

Príklad

V ilustračnom experimente sa sleduje správanie iba jednej červenej krvinky, takže nami navrhnuté charakteristiky nie sú potrebné. V experimente nedochádza k rotácii a vzhľadom na tvar kanála ani trajektória nie je zaujímavá. V takomto úzkom kanáli sa však krvinka vplyvom Poiseuilleovho toku (Obr. 18) deformuje do typického „padákového“ tvaru. Zaujímať nás bude aj rýchlosť krvinky. Deformácia je meraná pomocou *deformačného indexu* (DI), ktorý je definovaný ako pomer priečného a pozdĺžneho priemeru bunky. Je to vlastne pomer rozmerov boxu opísaného bunke, čo je podobný spôsob, ako bol nami použitý pre meranie natočenia buniek (Obr. 44). Zaujímavá bude tiež rýchlosť krvinky vo vnútri kanála. Experiment bol vykonaný s desiatkami buniek a aj hodnoty rýchlosti, aj hodnoty DI sú udávané v intervale. Model môžeme teda považovať za úspešný, ak hodnoty zo simulačného experimentu budú patriť do nameraných intervalov. Ak by sme chceli rozdiel medzi výsledkami simulácie a laboratórneho experimentu vyjadriť exaktnejšie, mohli by sme vypočítať percentuálnu chybu medzi simulačným výstupom a priemerným laboratórnym výstupom.

3. **Získanie simulačných výsledkov** V tomto kroku je potrebné vybrať model, ktorým chceme laboratórny experiment simulovať a správne ho nastaviť. Úlohu sme ďalej rozdelili na 3 čiastkové úlohy. Na simulovanie bol použitý referenčný model a jeho implementácia vo verzii Python.

(a) **Modelovanie kanála, a nastavenie parametrov tekutiny**

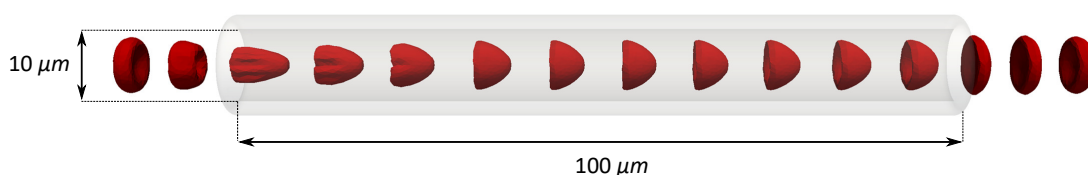
Model musí zachytiť správny tvar a veľkosť kanála, alebo jeho podstatných častí. Bežne napríklad nie je treba modelovať vstupné konektory, ak nás nezaujíma správanie sa krviniek práve tam. Ak sa niektoré úseky kanála periodicky opakujú, môžeme simulovať iba tie.

V modeli tekutiny je treba nastaviť parametre, ktoré majú fyzikálnu reprezentáciu (hustota a viskozita), na rovnaké hodnoty ako v laboratórnom experimente. Veľkosť diskretizácie je kompromisom medzi výpočtovou náročnosťou a presnosťou (viac v Kap. 3). Rýchlosť tekutiny treba nastaviť čo najvernejšie ako v laboratórnom experimente. V závislosti od toho, akú informáciu máme k dispozícii (objemový prietok, zmena tlaku), použijeme na prepočet vzťahy uvedené v časti 2.8.

Príklad

Keby sme mali modelovať skutočnú dĺžku kanála, bolo by to výpočtovo veľmi náročné. Predpokladajme, že k typickému správaniu dôjde aj na kratšom úseku. Pre model hraníc kanála sme použili v Python verzii ESPResSo tvar typu `Pore`, ktorý modeluje otvor kruhového prierezu definovanej šírky (Obr. 91).

Viskozita a hustota tekutiny boli nastavené tak, ako v laboratórnom experimente. Priestorový krok diskretizácie bol zvolený `grid = 1 μm`. Požadovaná rýchlosť bola nastavená pomocou objemového prietoku, prepočítaného podľa vzťahu (29). Tekutina bola rozhýbaná pomocou parametra `fluid_force`. Objemový prietok bol počítaný po ustálení tekutiny v kolmom reze prechádzajúcom stredom kanála ako integrál profilu rýchlosti tekutiny.



Obr. 91: Modelovaný tvar kanála a ukážka prechodu modelu červenej krvinky pri $\frac{\Delta P}{L} = 8,2 \text{ mmHg/mm}$.

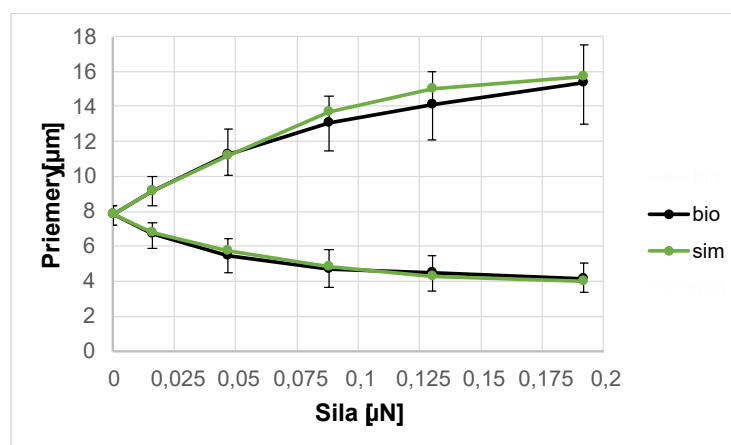
(b) *Nastavenie parametrov modelu červenej krvinky*

Povrchová sieť môže byť vytvorená pomocou analytickej rovnice jej tvaru (vzťah (1), časť 2.1) alebo ako sme predstavili v Kap.4 aj pomocou inflácie alebo deflácie modelu gule. Veľkosť diskretizácie je opäť voľbou medzi väčšou presnosťou a výpočtovou náročnosťou. Ak chceme zachytiť aj jemnejšie deformácie povrchu krvinky, vhodnejšia bude povrchová sieť s väčším počtom uzlov. Ale

už aj sieť so 141 uzlami dokáže zachytiť správanie pri natahovacom experimente (popísaný v časti 2.5.1). Tento experiment je vďaka exaktným a dobre zdokumentovaným výsledkom aj najlepšou skúškou, podľa ktorej môžeme nakalibrovať hodnoty elastických parametrov modelu. Viskózný parameter sa dá nastaviť porovnaním s experimentom v šmykovom toku (popísaný v časti 2.5.2).

Príklad

Krvinka bola modelovaná povrchovou sieťou s 374 vrcholmi vytvorenou v softvéri Gmsh [7]. Model obsahoval päť elastických modulov. Moduly zachovania lokálnej a globálnej plochy mali novšiu formu implementácie (vzťahy (8), (10)), a tak im nezodpovedali elastické koeficienty získané pri poslednej kalibrácii (popísaná v časti 2.5.1). Preto bolo potrebné najskôr nájsť takú sadu elastických koeficientov, pre ktoré bude model vyhovovať natahovaciemu experimentu. Parametre reprezentujúce elastické koeficienty sme zvolili nasledovne: $k_s = 0,0002$, $k_b = 0,00825$, $k_{a1} = 0,001$, $k_{ag} = 0,9$, $k_v = 0,05$. Výsledky natahovacieho experimentu pre zvolené hodnoty elastických koeficientov sú znázornené na Obr. 92.



Obr. 92: Porovnanie biologických výsledkov natahovacieho experimentu so simulačnými výsledkami pre zvolenú sadu elastických parametrov.

Viskózný modul sme v tejto simulácii nepoužili.

(c) *Nastavenie parametrov interakcií*

Interakciu medzi objektom a kvapalinou ovplyvňuje parameter *friction*, metóda kalibrácie a vzťah na výpočet jeho hodnoty pre rôzne typy objektov je popísaný v časti 2.5.3. Interakcie medzi dvoma objektami zatiaľ neboli kalibrované porovnaním s laboratórnym ani fyzikálnym experimentom. Tieto interakcie je zatiaľ potrebné nastaviť aspoň tak, aby sa objekty navzájom neprekrývali a neprechádzali cez prekážky. Model interakcií môže byť zdrojom odchýlok od reality pri simuláciách toku väčšieho počtu krviniek, ktoré na seba navzájom pôsobia a narážajú do prekážok. Pri experimentoch, kde sú použité aj rôzne chemické látky na povrchovú úpravu kanálov, bude potrebné do modelu pridať aj model adhézie.

Príklad

V simulovanom experimente je len jedna červená krvinka, preto nebol potrebný model interakcie medzi krvinkami. Rovnako nedochádza ku kontaktu medzi krvinkou a kanálom, takže ani model interakcie medzi objektami a prekážkami nebol prítomný. Interakcia medzi modelom krvinky a modelom tekutiny bola nastavená podľa vzťahu (21), pričom referenčný objekt bol nakalibrovaný na príslušnú hodnotu dynamickej viskozity.

4. *Porovnanie výsledkov*

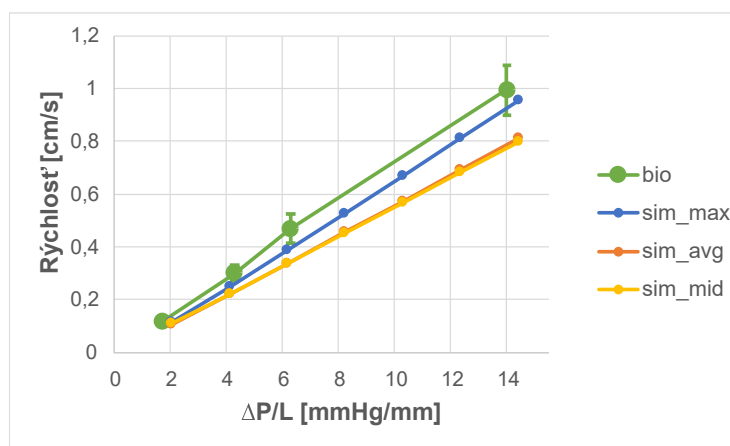
V tejto etape porovnáme výstupy s realitou na základe kritérií, ktoré sme si určili v bode 2. Ak s výsledkom nebudeme spokojní a model neakceptujeme, buď môže byť chybný model alebo iba hodnoty niektorých jeho parametrov. Preto sa môžeme vrátiť do bodu 3 a skúsiť iné hodnoty parametrov, ktoré by mali mať na sledované kritérium vplyv. Pri zmene hodnôt parametrov, ktoré boli predtým kalibrované musíme brať ohľad aj na výsledky kalibračných experimentov. Napríklad pri zmene hodnôt elastických koeficientov by mal model stále vyhovovať aj výsledku nafašovacího experimentu. Pri experimentoch toku viacerých buniek je priestor na variovanie hlavne pri nastavovaní parametrov interakcií.

Je tiež možné, že model v danom stave nebude vyhovovať simulovanému experimentu ani jemu podobným. Vtedy bude potrebné model upraviť alebo vytvoriť

nový model.

Príklad

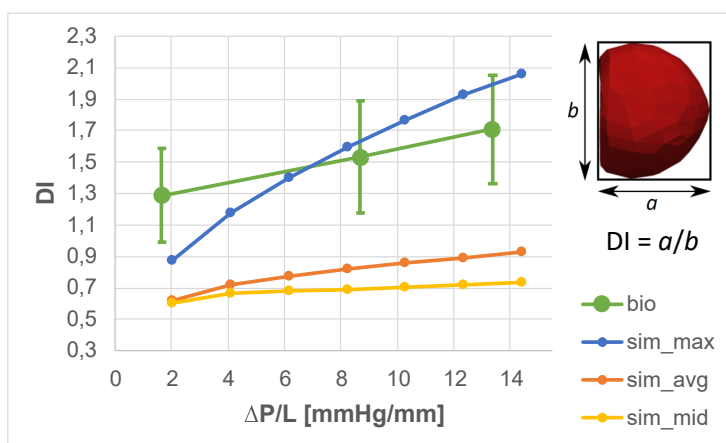
Porovnanie rýchlosti krvinky medzi laboratórnym a simulačným experimentom je znázornené na Obr. 93. V simulácii sa rýchlosť krvinky počas prechodu kanálom výrazne mení, preto sme vypočítali jej rýchlosť tromi spôsobmi: ako maximálnu (max), priemernú (avg) a rýchlosť v strede kanála (mid).



Obr. 93: Porovnanie biologických výsledkov rýchlosti červenej krvinky so simulačnými výsledkami pri rôznych hodnotách $\frac{\Delta P}{L}$. Zo simulácii je rýchlosť bunky počítaná ako: maximálna, priemerná a rýchlosť bunky v strede kanála (podľa: [91]).

Z grafu vidíme, že maximálne rýchlosti sa nachádzajú vo vnútri intervalu nameraných hodnôt z laboratórneho experimentu. Priemerná rýchlosť a rýchlosť v strede kanála sú trochu nižšie, čo môže byť spôsobené tvarom modelovaného kanála, ktorý sa mimo trubkovej časti rozširuje a tým tekutina spomalí.

Výsledky pre *deformačný index* sú znázornené na Obr. 94. Z Obr. 91 je zrejmé, že deformácia sa počas prechodu kanálom mení. Preto sme aj túto charakteristiku vypočítali tromi spôsobmi: ako maximálny DI (max), priemerný DI (avg) a DI v strede kanála (mid). Z grafu vidíme, že maximálne hodnoty DI pre všetky rýchlosti, okrem tej najnižšej, vyhovujú kritériu. Ich hodnoty sa nachádzajú vo vnútri intervalu nameraných hodnôt z laboratórneho experimentu. Priemerné hodnoty DI a hodnota DI nameraná v strede kanála sú nižšie. Potvrdzujú však takmer lineárnu závislosť DI od rýchlosti tekutiny a oproti maximálnej hodnote DI majú aj podobný sklon



Obr. 94: Porovnanie biologických výsledkov *deformačného indexu* (DI) červenej krvinky so simulačnými výsledkami pri rôznych hodnotách $\frac{\Delta P}{L}$. V simulácii je DI počítané ako: maximálne, priemerné a DI bunky v strede kanála. (podľa: [91])

pomyselnej regresnej priamky prechádzajúcej ich hodnotami ako *deformačné indexy* z laboratórneho experimentu.

Model červenej krvinky sa počas simulácie deformoval do typického „padákového“ tvaru, čo môžeme považovať za kvalitatívnu validáciu modelu.

Kvantitatívne odchýlky od reality môžu byť spôsobené nepresným modelom kanála, nevhodnou kombináciou elastických parametrov, ale aj zlým modelom.

8.2 Porovnanie simulačných experimentov vykonaných rôznymi modelmi

Za rozdielny model môžeme považovať aj referenčný model, ktorý nebude obsahovať rovnaké modelované časti, prípadne bude mať určité časti inak implementované. Napríklad všetky simulačné experimenty v tejto práci boli vykonané bez prítomnosti viskózneho modulu v modeli. Na iných častiach modelu, ako modul adhézie sa stále pracuje. V budúcnosti sa tiež uvažuje o tvorbe modelu skutočne uzavretého objektu, ktorý by vo vnútri obsahoval tekutinu s inou viskozitou. Porovnaním výstupov viacerých modelov pomocou jedného experimentu môžeme overiť korektnosť ich výstupov. Aj v tomto prípade môžeme hovoriť o validácii, ak jeden z modelov, ktorého výstupy porovnáваме, považujeme za validný. Vďaka výsledku porovnania potom môžeme dospieť k rozhodnutiu, že pre vykonávanie rozsiahlejších experimentov alebo

neskorších podobných experimentov stačí použiť jednoduchší model. Simulácie vykonané jednoduchším modelom môžu trvať nezanedbateľne kratšiu dobu. Tento proces napríklad je vhodné vykonať na jednoduchšom experimente predtým, ako sa chystáme vykonať rozsiahlejšie simulačné štúdie a chceme sa rozhodnúť, akú model použijeme.

Postup bude podobný ako pri porovnávaní simulačného a laboratórneho experimentu, okrem bodu jedna, pretože obe sady výsledkov budú získané ako simulačné výstupy. Preto jednotlivé body opíšeme iba veľmi stručne. Postup znázorníme na rovnakom ilustračnom príklade kedy budeme simulovať experiment prechodu modelu krvinky cez trubkový kanál. Jedna simulácia bude vykonaná modelom bez viskózneho modulu, druhá simulácia s modelom s viskóznym modulom.

1. *Určenie kritérií pre porovnanie*

V tomto bode je potrebné identifikovať také charakteristiky, ktoré budú definovať úspešnosť modelu pre daný experiment, teda dobre zachytia správanie červených krviniek počas toku. Na základe týchto charakteristík budeme výsledky získané z viacerých modelov medzi sebou porovnávať. Pri výstupoch z modelu nie sme natoľko obmedzovaní pri získavaní experimentálnych dát a ich podobe. Preto môžeme použiť aj ľubovoľné charakteristiky popisované v predchádzajúcich kapitolách. Opäť je dobré si určiť hranicu, kedy budeme považovať výsledok porovnania za uspokojivý. Pri porovnaní dvoch experimentálnych číselných výstupov to môže byť percentuálny rozdiel, definovaný ako:

$$D\% = \frac{|S_1 - S_2|}{\frac{1}{2}(S_1 + S_2)} * 100, \quad (40)$$

kde S_1 je hodnota získaná zo simulačného experimentu pomocou jedného modelu a S_2 je hodnota získaná zo simulačného experimentu pomocou druhého modelu. Pri výstupe tvorenom z viacerých dát sa môže testovať, či pochádzajú z rovnakého rozdelenia pravdepodobnosti, na určenej hladine významnosti.

Príklad

V ukázkovom experimente budeme sledovať rovnaké charakteristiky ako v časti o porovnaní s laboratórnym experimentom. Rýchlosť budeme sledovať pomocou troch charakteristík: maximálnej a priemernej rýchlosti a rýchlosti červenej krvinky

v strede kanála. Rovnako *deformačný index* budeme merať ako: maximálny DI, priemerný DI a DI krvinky v strede kanála. Pre všetky tieto charakteristiky vypočítame percentuálny rozdiel.

2. Získanie simulačných výsledkov

Všetky časti použitých modelov by mali byť nastavené čo najlepšie, tak ako sme popísali túto fázu postupu pri porovnaní simulačného a laboratórneho experimentu.

Príklad

V ilustračnom príklade sme porovnávali dve verzie referenčného modelu. V jednej verzii nebol prítomný modul viskozity a v druhom áno. Všetky ostatné hodnoty parametrov modelu boli nastavené rovnako, ako je popísané v postupe pri porovnaní simulačného a laboratórneho experimentu. Veľkosť viskózneho koeficientu bola nastavená podľa štúdie [76] (popísaný v časti 2.5.2) na hodnotu $k_{visc} = 1,5$.

3. Porovnanie výsledkov

V tejto etape porovnáme výstupy z použitých modelov podľa kritérií, ktoré sme definovali v bode 1. Ak modely vyhodnotíme ako rovnocenné, tak ďalej môžeme pre experimenty tohoto typu používať model, ktorý je menej výpočtovo náročný, jednoduchší na používanie alebo iným spôsobom „lacnejší“. Ak výstupy z modelov nevyhodnotíme ako rovnocenné, tak záleží, či niektorý z nich považujeme za validný. Ak áno, taký model si zvolíme pre ďalšie používanie.

Príklad

Experiment sme tentokrát uskutočnili len pre jednu hodnotu $\frac{\Delta P}{L} = 8,2 \text{ mmHg/mm}$. Na Obr. 95 vidíme ukážkový priebeh simulácie pre model bunky s viskozitou. Rovnaký experiment pre model bunky bez viskozity je znázornený na Obr. 91. Už vizuálnou kontrolou je zrejmé, že deformácia, hlavne na začiatku kanála sa líši.



Obr. 95: Ukážka prechodu modelu červenej krvinky s modulom viskozity cez modelovaný kanál pri $\frac{\Delta P}{L} = 8,2 \text{ mmHg/mm}$.

Porovnanie kvantitatívnych charakteristík rýchlosti je uvedené v Tab. 15, aj s uvedenými percentuálnymi rozdielmi. Všetky rozdiely sú menšie ako 5%. Ak by to bola nami zvolená prijateľná hranica chyby, modely budeme považovať za rovnocenné z hľadiska modelovania toku jednej červenej krvinky.

Tab. 15: Vybrané charakteristiky rýchlosti pre simulačné experimenty vykonané modelom bez viskózneho modulu a s viskóznym modulom.

Viskozita	Rmax [cm/s]	Ravg [cm/s]	Rmid [cm/s]
nie	0,526	0,453	0,450
áno	0,516	0,462	0,462
D% [%]	1,880	1,828	2,555

Porovnanie rôzne meraných *deformačných indexov* je znázornené v Tab. 16 aj s príslušnými percentuálnymi rozdielmi. Rozdiel je veľmi výrazný pri maximálnej hodnote DI, čo bolo zrejmé aj vizuálne. Model s viskóznym modulom sa na začiatku nedeformoval do „padákového“ tvaru, čo malo za následok menšiu hodnotu DI. V ďalšej časti kanála sa dajú modely považovať za rovnocenné z hľadiska zachytenia viskózneho správania červenej krvinky.

Tab. 16: Vybrané charakteristiky deformácie (DI) pre simulačné experimenty vykonané modelom bez viskózneho modulu a s viskóznym modulom.

Viskozita	DI _{max}	DI _{avg}	DI _{mid}
nie	1,595	0,819	0,692
áno	1,155	0,793	0,738
D% [%]	32,044	3,216	6,468

Aj keby sme modely považovali za rovnocenné pre tento typ experimentov, z hľadiska výpočtovej náročnosti je lepší model bez viskózneho modulu. Tak ako je tento modul v súčasnosti definovaný a implementovaný, si vyžaduje zníženie integračného kroku. Simulácia bez použitia viskózneho modulu trvala približne 3,4 krát kratšie.

8.3 Porovnanie simulačných experimentov vykonaných modelom s rôznymi parametrami

Pri porovnaní experimentálnych výsledkov získaných z modelov s rozdielnym nastavením parametrov modelu ide hlavne o simulačné parametre, ktorých nastavenie priamo nevyplýva zo simulovanej udalosti a ich voľba je na používateľovi. Môžu sa meniť napríklad veľkosť diskretizácie objektu a kvapaliny. Ak považujeme výsledok porovnania za kladný, na vykonávanie ďalších simulácií môžeme použiť parametre, ktoré prinesú časovú úsporu.

Postup porovnania je totožný s postupom uvedenom v predchádzajúcej časti, pre porovnanie simulačných experimentov vykonaných rôznymi modelmi. Preto si tento postup uvedieme iba na ilustračnom príklade. Opäť budeme simulovať rovnaký experiment (Obr. 91). V experimente použijeme štyri rôzne povrchové siete modelu červenej krvinky, vytvorené v softvéri Gmsh ([7]) podľa analytickej rovnice (vzťah (1)). Povrchové sa líšia počtom diskretizačných bodov, ktorý má hodnoty: 141, 374, 670 a 786.

1. *Určenie kritérií pre porovnanie*

Príklad

V ukázkovom experimente budeme sledovať rovnaké charakteristiky v časti o porovnaní simulačných experimentoch vykonaných rôznymi modelmi. Rýchlosť červenej krvinky budeme sledovať ako: maximálnu, priemernú a rýchlosť v strede kanála. Rovnako *deformačný index* červenej krvinky budeme merať ako: maximálny DI, priemerný DI a DI krvinky v strede kanála.

2. *Získanie simulačných výsledkov*

Príklad

Ako sa ukázalo v prácach [95] a [96], hodnoty elastických koeficientov (parametre k_s , k_b , k_{a1} , k_{ag} , k_v) sú závislé od počtu vrcholov povrchovej siete. Pre Python verziu ESPResSo, kde sú implementované niektoré elastické moduly (viac v časti 2.3.2) ešte nebola vykonaná kalibrácia elastických koeficientov. Pre potreby tohoto ilustračného príkladu sme preto zvolili hodnoty elastických koeficientov pre použité siete podľa [95] uvedené v Tab. 17. Tieto hodnoty dávajú aj pri novej implementácii

elastických modulov pre všetky siete porovnateľné výsledky nafahovacieho experimentu, aj keď nezodpovedajú biologickým výsledkom ako na Obr. 92.

Tab. 17: Hodnoty elastických koeficientov testovaných sietí.

	k_s	k_b	k_{al}	k_{ag}	k_v
141	0.00495	0.0605	0.005	1	1.25
374	0.00504	0.0725	0.011	1.29	1.95
670	0.00516	0.0877	0.0186	1.66	2.85
786	0.0052	0.0936	0.0216	1.8	3.2

Aj koeficient interakcie medzi objektom a tekutinou (parameter `friction`) je závislý od počtu vrcholov diskretizačnej siete. Preto sme na jeho prepočet pre každú testovanú sieť použili vzťah (21). Všetky ostatné simulačné parametre boli rovnaké, ako v predchádzajúcich častiach 8.1 a 8.2.

3. Porovnanie výsledkov

Príklad

Experiment sme uskutočnili len pre jednu hodnotu $\frac{\Delta P}{L} = 8,2 \text{ mmHg/mm}$. V Tab. 18 vidíme hodnoty kvantitatívnych charakteristík rýchlostí pre všetky testované siete. Rozdiely medzi jednotlivými sieťami pre všetky charakteristiky nie sú výrazné.

Tab. 18: Vybrané charakteristiky rýchlosti pre simulačné experimenty vykonané modelom s povrchovými sieťami s rôznym počtom vrcholov.

	Rmax [cm/s]	Ravg [cm/s]	Rmid [cm/s]
141	0,460	0,425	0,429
374	0,462	0,417	0,421
670	0,458	0,405	0,401
786	0,461	0,408	0,410

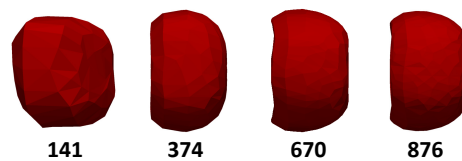
Ak by sme ich chceli exaktnejšie vyjadriť, mohli by sme pre každé dvojice spočítať percentuálny rozdiel.

V Tab. 19 sú uvedené hodnoty DI počítané všetkými tromi spôsobmi, pre všetky štyri testované siete.

Tab. 19: Vybrané charakteristiky deformácie (DI) pre simulačné experimenty vykonané modelom s povrchovými sieťami s rôznym počtom vrcholov.

Viskozita	DI _{max}	DI _{avg}	DI _{mid}
141	0,954	0,768	0,731
374	0,635	0,437	0,423
670	0,671	0,418	0,392
786	0,675	0,418	0,397

Výsledky deformácie sú pre tri siete podobné, no sú výrazne iné pre povrchovú sieť so 141 uzlami. Hodnota DI je až podozrivo veľká, preto je žiaduce overiť výsledok simulácie aj vizuálne. Na Obr.96 vidíme tvary modelov červenej krvinky pre všetky povrchové siete pri maximálnej deformácii.



Obr. 96: Porovnanie modelov červenej krvinky všetkých testovaných sietí pri maximálnej deformácii DI_{max}.

Model červenej krvinky s povrchovou sieťou so 141 uzlami sa na začiatku kanála mierne pootočil a tak pretiekol celým kanálom. Tu vidíme nedokonalosť *deformačného indexu*, ktorý takéto správanie nezachytil, a dôležitosť vizuálnej kontroly pri experimentoch.

Modely môžeme považovať z hľadiska rýchlosti aj deformácie rovnocenné aj napriek otočeniu sa modelu so 141 uzlami. Ten sa neukázal ako vhodný na simulovanie takéhoto experimentu. Napriek najmenšiemu počtu vrcholov sa neukázal ani ako najmenej výpočtovo náročný počas tejto simulácie. Sledovali sme dobu behu simulácie, za ktorú červená krvinka pretečie cez simulačný box. Najkratšie to trvalo modelu s 374 vrcholmi: 30h 37m, potom modelu so 670 vrcholmi: 31h 56m, modelu so 141 vrcholmi: 32h 9m a najdlhšie modelu so 786 vrcholmi: 32h 23m. Na ďalšie použitie by sme teda zvolili sieť s 374 vrcholmi.

8.4 Záver

V prvej časti tejto kapitoly sme navrhli postup na porovnanie laboratórneho a simulačného experimentu. Takéto porovnanie slúži najmä na validáciu modelu. Postup sme všeobecne popísali pre experimenty toku viacerých červených krviniek v tekutine a ilustrovali sme ho na experimente toku jednej červenej krvinky cez jednoduchý úzky kanál. Model splnil sledovanú kvalitatívnu charakteristiku, keď počas toku nadobudol typický „padákový“ tvar. Aj charakteristiky rýchlosti môžeme považovať za zhodné s tými nameranými v laboratórnych podmienkach. Hodnoty charakteristiky deformácie boli pri výsledkoch modelu mierne nižšie než hodnoty z laboratórneho experimentu. To môže byť spôsobené zlým modelom kanála alebo zlou kombináciou elastických parametrov.

V ďalšej časti sme navrhli postup na porovnanie simulačných experimentov vykonaných rôznymi modelmi. Ak jeden z modelov považujeme za validný, takéto porovnanie môže slúžiť pre druhý model ako validácia alebo ako verifikácia. Za rôzne modely považujeme aj rozličné verzie referenčného modelu. Ako ilustračný príklad sme ukázali porovnanie simulačných experimentov vykonaných s a bez modulu viskozity. Výsledky sme vyhodnotili ako rovnocenné, ale vzhľadom na výpočtovú náročnosť modelu s viskozitou by sme si pre ďalšie používanie vybrali druhý model.

Nakoniec sme popísali postup pre porovnanie simulačných experimentov vykonaných jedným modelom s rôznym nastavením parametrov. Takýto proces môže viesť k rozhodnutiu, aké parametre vybrať pre vykonávanie ďalších podobných experimentov. Ako príklad sme porovnávali modely krvinky s rôznym počtom diskretizačných bodov povrchu. Výsledky sme vyhodnotili pre tri siete ako rovnaké a na základe výpočtovej náročnosti by sme si pre ďalšie použitie zvolili jeden z modelov.

9 Záver

Práca sa zaoberá spracovaním a hodnotením simulačných výstupov modelu elastických objektov v toku tekutiny, ktorý je používaný na modelovanie krvi. Výsledky práce boli demonštrované na jednom konkrétnom modeli, prípadne jeho modifikáciách, no sú všeobecne platné aj pre iné podobné prístupy k modelovaniu.

Používaný model, v práci označovaný ako referenčný model, je vyvíjaný na Fakulte riadenia a informatiky výskumnou skupinou *Cell-in-fluid* a je podrobne popísaný v Kap. 2 o súčasnom stave riešenej problematiky. Táto kapitola ponúka ucelený pohľad na problematiku vývoja modelu krvi na úrovni vnorených elastických objektov. Sú v nej popísané aj iné prístupy k modelovaniu krvi, metódy na kalibráciu parametrov zabezpečujúcich vhodné správanie a možnosti validácie modelov.

V ďalších kapitolách sú zverejnené výsledky vlastnej práce. Zosumarizujeme ich vzhľadom na ciele, ktoré boli stanovené v úvode:

- *Identifikovať charakteristiky simulačných výsledkov toku elastických objektov v kvapaline, ktoré vyjadrujú úspešnosť simulačného modelu vzhľadom na reálne experimenty.*

Správanie tekutiny má výrazný vplyv na správanie objektov v nej ponorených. V Kap. 3 sme sa zaoberali analýzou modelu tekutiny a charakteristikou toku pomocou objemového prietoku.

Pri simuláciách toku červených krviniek je dôležité, aby aj jednotlivé modely dobre zachytávali vlastnosti skutočných červených krviniek. V Kap. 4 sme sa venovali tvaru modelov červených krviniek, ktorý je reprezentovaný povrchovou sieťou. Povrchové siete získané rôznymi metódami sme porovnávali pomocou navrhutej štatistickej charakteristiky uhlov medzi trojuholníkmi povrchových sietí. Rôzne povrchové siete sme tiež testovali porovnaním s výsledkami laboratórneho experimentu.

V Kap. 5 sme sa zaoberali simuláciami toku väčšieho množstva červených krviniek v tekutine. Identifikovali sme také charakteristiky ich správania, ktoré popisujú celkové správanie sa krviniek počas toku. Charakteristiky sú odvodené z výstupných dát o rýchlostiach, rotáciách, natočeniach a pozíciách krviniek počas toku. Väčšinu použitých výstupov by nemalo byť problém získať aj po spracovaní videí z laboratórnych experimentov. Citlivosť charakteristík sme testovali na simulačných ex-

perimentoch vykonaných s kanáloch rôznej topológie, so suspenziami rôznej hustoty a s rôznou rýchlosťou tekutiny. Navrhnuté charakteristiky môžu slúžiť na porovnanie rôznych simulačných experimentov, porovnanie simulačných experimentov s realitou. Na porovnanie sa môžu použiť štandardné štatistické testy tak, ako je v kapitole uvedené.

Ďalšou výraznou charakteristikou objektov počas toku sú ich trajektórie. Analýzu trajektórií pomocou rôznych metód sme vykonali v Kap. 7. Analyzovali sme trajektórie samostatných červených krviniek, štatisticky spracované trajektórie väčšieho počtu krviniek a pomocou pokročilejších metód sme skúmali typické trajektórie pre použitú topológiu kanála.

- *Urobiť analýzu simulačných výsledkov rôznymi metódami spracovania dát a navrhnúť vlastné metódy spracovania a získavania informácií zo simulačných výsledkov.*

Pr návrhu charakteristík v Kap. 5 boli použité rôzne metódy spracovania simulačných dát, pričom ich použitie bolo pre tieto účely nové. Použité boli jednoduché metódy, ako nájdenie miním, maxím, priemerov a následné triedenie podľa veľkosti. Ale aj pokročilé metódy ako aplikácia diskkrétnej Fourierovej transformácie, analýzy hlavných komponentov. Najmä výsledky po použití pokročilých metód odhalili informácie, ktoré môže hlbšie napomôcť k pochopeniu správania simulovaných objektov.

V Kap. 6 sme navrhli viacero metód spracovania výstupných dát popisujúcich rotáciu červenej krvinky. Niektoré je možné aplikovať iba na simulačné výsledky, no iné by sa mali dať získať aj z videozáznamu. Výstupy z navrhnutých metód sme otestovali pomocou štatistického testu.

Nové metódy spracovania dát sme uplatnili aj pri analýze trajektórií v Kap. 7. Trajektórie, ktoré sme popísali iba pomocou súradníc pri prechode určitými časťami kanála sme skúmali pomocou štandardných štatistických metód. Na dáta o pozíciách krviniek v celom kanáli počas simulácie sme metódu hlavných komponentov a metódu strojového učenia.

- *Na základe získaných informácií navrhnúť postup pre komparáciu simulačného experimentu s laboratórnym experimentom, prípadne rôznych simulačných experimentov navzájom.*

Na záver, v Kap. 8 sme navrhli postup pre porovnanie simulačného experimentu s laboratórnym experimentom, prípadne viacerých simulačných experimentov navzájom. Zamerali sme sa na experimenty toku červených krviniek v mikrofluidických zariadeniach. Postup sme demonštrovali aj na ilustračnom experimente. Simulačné experimenty sa líšili modelom, ktorý bol pre simuláciu použitý a rôznym nastavením parametrov jedného modelu. Za rôzne modely sme považovali aj rôzne verzie referenčného modelu. Porovnanie simulačného experimentu s laboratórnym experimentom slúži najmä na validáciu modelu. Porovnanie rôznych simulačných experimentov navzájom je vhodné na overenie korektnosti použitých model a môže viesť k rozhodnutiu, ktorý model je vhodné ďalej používať. Ak modely vyhodnotíme ako rovnocenné, ďalej môžeme používať model s menším výpočtovým nárokom alebo inak definovanou „cenou“ modelu.

Všetky stanovené ciele práce považujeme za splnené. Výsledky práce môžu byť prínosné pre ďalší vývoj a vylepšenie modelov na slúžiacich na simulovanie toku elastických objektov v toku tekutiny, najmä krvi. Majú praktické použitie pri validácii referenčného modelu, pri jeho ďalšom rozširovaní, ale aj pri vykonávaní aplikačných štúdií pomocou modelu. Výsledky môžu taktiež odhaliť skryté informácie vo výstupných dátach a tým napomôcť k lepšiemu pochopeniu správania sa objektov v simulačných, ale aj laboratórnych experimentoch.

Publikácie

- [1] Cimrák, I., Bachratá, K., Bachratý, H., Jančígová, I., Tóthová, R., Bušík, M., Slavík, M., Gusenbauer, M.: "Object-in-fluid framework in modeling of blood flow in microfluidic channels", *Communications, Scientific Letters of the University of Žilina*, vol. 18/1a, pp. 13-20, 2016, ISSN 1335-4205
- [2] Bušík, M., Kotus, M., Slavík, M.: "Data management system for computational experiments in blood cell modelling: mesh analysis showcase", *ELEKTRO 2016, International conference: Štrbské Pleso - High Tatras, Slovakia, May 16-18, 2016: Proceedings*, IEEE, pp. 495-499, 2016, ISBN 978-1-4673-8698-2
- [3] Bachratá, K., Bachratý, H., Slavík, M.: "Statistics for comparison of simulations and experiments of flow of blood cells", *Experimental Fluid Mechanics (EFM) 2016, International conference: Marienbad, Czech Republic, November 15-18, 2016*, EPJ Web of Conferences, vol. 143, EDP Sciences, pp. 2002-2016, 2017, eISSN 2100-014X
- [4] Kovalčíková, K., Slavík, M.: "Verification of steady state in blood flow experiments." *Central European researchers journal (CERES)*, vol. 3, iss. 1, pp. 21-27, 2017, ISSN 2453-7314
- [5] Bachratá, K., Slavík M., Bachratý, H., Kovalčíková, K.: "The sensitivity of the statistical characteristics to the selected parameters of the simulation model in the red blood cell flow simulations", *Information and Digital Technologies (IDT) 2017, International Conference: Žilina, Slovakia, July 5-7, 2017: Proceedings*, IEEE, pp. 344-349, 2017, ISBN 978-1-5090-5688-0
- [6] Bachratý, H., Kovalčíková, K., Bachratá, K., Slavík, M.: "Methods of exploring the red blood cells rotation during the simulations in devices with periodic topology" *Information and Digital Technologies (IDT) 2017, International Conference: Žilina, Slovakia, July 5-7, 2017: Proceedings*, IEEE, pp. 36-46, 2017, ISBN 978-1-5090-5688-0
- [7] Slavík, M.: "Computer simulation of the red blood cell deformation in a pipe channel flow" *Mathematics in Science and Technologies (MIST) 2017, Conference: Rajecká*

Lesná, Slovakia, January 3-7, 2018: Proceedings, CreateSpace Independent Publishing Platform, pp. 28-34, 2018, ISBN 978-1987603392

- [8] Slavík, M.: "Parameters' identification of the model for blood flow simulations" *Mathematics in Science and Technologies (MIST) 2017, Conference: Rajecká Lesná, Slovakia, January 3-7, 2018: Proceedings*, CreateSpace Independent Publishing Platform, pp. 21-27, 2018, ISBN 978-1987603392

Práce v tlači

- [1] Slavík, M., Kovalčíková, K., Bachratý, H., Bachratá, K., Smiešková, M.: "Processing of cells' trajectories data for blood flow simulation model", prezentované na *Experimental Fluid Mechanics (EFM) 2017, International conference: Mikulov, Czech Republic, November 21-24, 2017*
- [2] Kovalčíková, K., Slavík, M., Bachratá, K., Bachratý, H., Bohiniková, A.: "Volumetric flow rate in simulations of microfluidic device", prezentované na *Experimental Fluid Mechanics (EFM) 2017, International conference: Mikulov, Czech Republic, November 21-24, 2017*
- [3] Bachratý, H., Bachratá, K., Chovanec, M., Kajánek, F., Smiešková, M., Slavík, M.: "Simulation of Blood Flow in Microfluidic Devices for Analysing of Video from Real Experiments", prezentované na *International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWBBIO) 2018, International Conference: Granada, Spain, April 25-27, 2018*
- [4] Kovalčíková, K., Bohiniková, A., Slavík, M., Guimaraes, I. M., Cimrák, I.: "Red Blood Cell Model Validation in Dynamic Regime" *International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWBBIO) 2018, International Conference: Granada, Spain, April 25-27, 2018*
- [5] Bušík, M., Cimrák, I., Slavík, M.: "The calibration of fluid-object interaction in immersed boundary method for elliptical objects", zaslané do *ACM Transactions on Modelling and Computer Simulation*

Zoznam použitej literatúry

- [1] *C sharp*, <https://docs.microsoft.com/en-us/dotnet/csharp/>, online, prevzaté: apríl 2018
- [2] *Cell-in-fluid research group*, <http://cell-in-fluid.fri.uniza.sk>, online, prevzaté: apríl 2018
- [3] *Donau-Universität Krems*, <https://www.donau-uni.ac.at/en/>, online, prevzaté: apríl 2018
- [4] *ESPResSo*, <http://essomd.org>, online, prevzaté: apríl 2018
- [5] ‘Espresso python documentation’, <http://essomd.org/html/doc/>, accessed: 2018-01-23
- [6] ‘Espresso tcl documentation’, http://essomd.org/wordpress/wp-content/uploads/2017/06/ESPResSo_3.3.1_UsersGuide.pdf, accessed: 2018-01-23
- [7] *GMSH*, <http://gmsh.info/>, online, prevzaté: apríl 2018
- [8] *Gnuplot*, <http://www.gnuplot.info/>, online, prevzaté: apríl 2018
- [9] *MATLAB*, <https://uk.mathworks.com/products/matlab.html>, online, prevzaté: apríl 2018
- [10] *MS Excel*, <https://products.office.com/sk-sk/excel>, online, prevzaté: apríl 2018
- [11] *OpenMPI*, <https://www.open-mpi.org/>, online, prevzaté: apríl 2018
- [12] *Python*, <https://www.python.org/>, online, prevzaté: apríl 2018
- [13] ‘softvér elmer’, <https://www.csc.fi/web/elmer>, online, prevzaté: marec 2016
- [14] *Tcl*, <https://www.tcl.tk/about/language.html>, online, prevzaté: apríl 2018
- [15] *Univerzita Pardubice*, <https://www.upce.cz/>, online, prevzaté: apríl 2018

- [16] VTK, <http://www.vtk.org/>, online, prevzaté: apríl 2018
- [17] Ahlrichs, P., Dünweg, B.: ‘Lattice-boltzmann simulation of polymer-solvent systems’, *International Journal of Modern Physics C*, vol. 9, no. 08, pp. 1429–1438, 1998
- [18] Arnold, A., Lenz, O., et al.: ‘ESPREsSo 3.1 — Molecular dynamics software for coarse-grained models’, M. Griebel, M.A. Schweitzer, eds., *Meshfree Methods for Partial Differential Equations VI*, vol. 89 of *Lecture Notes in Computational Science and Engineering*, pp. 1–23, Springer, 2013
- [19] Avila, K., Moxey, D., et al.: ‘The onset of turbulence in pipe flow’, *Science*, vol. 333, no. 6039, pp. 192–196, 2011, doi:10.1126/science.1203223
- [20] Bachratá, K., Bachratý, H., Slavík, M.: ‘Statistics for comparison of simulations and experiments of flow of blood cells’, *EPJ Web Conf.*, vol. 143, p. 02002, 2017, doi:10.1051/epjconf/201714302002
- [21] Bachratý, H., Kovalčíková, K., et al.: ‘Methods of exploring the red blood cells rotation during the simulations in devices with periodic topology’, *2017 International Conference on Information and Digital Technologies (IDT)*, pp. 36–46, 2017, doi:10.1109/DT.2017.8024269
- [22] Bao, Y.B., Meskas, J.: ‘Lattice boltzmann method for fluid simulations’, *Department of Mathematics, Courant Institute of Mathematical Sciences, New York University*, 2011
- [23] Barthelat, F., Zavattieri, P., et al.: ‘Mechanics of biological systems and materials, volume 4’,
- [24] Baskurt, O.K.: *Handbook of hemorheology and hemodynamics*, IOS Press Inc., 2007
- [25] Beech, J.P., Holm, S.H., et al.: ‘Sorting cells by size, shape and deformability’, *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 6, pp. 1048–1051, 2012
- [26] Belyaev, A.V.: ‘Hydrodynamic repulsion of spheroidal microparticles from micro-rough surfaces’, *PLoS one*, vol. 12, no. 8, p. e0183093, 2017

- [27] Bhaumik, S., Lakshmisha, K.: ‘Lattice-Boltzmann simulation of lid-driven swirling flow in confined cylindrical cavity’, *Computers & Fluids*, vol. 36, no. 7, pp. 1163 – 1173, 2007
- [28] Bukowska, D.M., Derzsi, L., et al.: ‘Assessment of the flow velocity of blood cells in a microfluidic device using joint spectral and time domain optical coherence tomography’, *Optics express*, vol. 21, no. 20, pp. 24025–24038, 2013
- [29] Bušík, M.: ‘The analysis of fluid discretization and its impact on elastic object immersed in fluid’, *Mathematics in Science and Technologies: proceedings of the MiST conference 2016*, 2016, ISBN 978-1533605665
- [30] Bušík, M., Cimrák, I.: ‘The calibration of fluid-object interaction in immersed boundary method’, *EPJ Web of Conferences*, vol. 143, p. 02013, EDP Sciences, 2017
- [31] Bušík, M., Jančigová, I., et al.: ‘Simulation study of rare cell trajectories and capture rate in periodic obstacle arrays’, *Journal of Computational Science*, vol. 17, pp. 370–376, 2016
- [32] Bušík, M., Kotus, M., Slavík, M.: ‘Data management system for computational experiments in blood cell modelling: Mesh analysis showcase’, *ELEKTRO, 2016*, pp. 495–499, IEEE, 2016
- [33] Bušík, M.: ‘Vývoj a optimalácia modelu pre tok buniek v kvapaline’, Ph.D. thesis, University of Žilina, 2017
- [34] Cimrák, I.: ‘A simplified model for dynamics of cell rolling and cell-surface adhesion’, *Proceedings of ICNAAM 2014*, submitted
- [35] Cimrák, I.: ‘A simplified model for dynamics of cell rolling and cell-surface adhesion’, *AIP Conference Proceedings*, vol. 1648 (1), 2015
- [36] Cimrák, I., Gusenbauer, M., Jančigová, I.: ‘An ESPResSo implementation of elastic objects immersed in a fluid’, *Computer Physics Communications*, vol. 185, no. 3, pp. 900–907, 2014, ISSN 0010-4655

- [37] Cimrak, I., Gusenbauer, M., Schrefl, T.: ‘Modelling and simulation of processes in microfluidic devices for biomedical applications’, *Computers and Mathematics with Applications*, vol. 64, no. 3, pp. 278 – 288, 2012
- [38] Cimrak, I., Jancigova, I., et al.: ‘Mesh-based modeling of individual cells and their dynamics in biological fluids’, R. Bris, J. Majernik, K. Pancierz, E. Zaitseva, eds., *Applications of Computational Intelligence in Biomedical Technology*, vol. 606 of *Studies in Computational Intelligence*, pp. 1–28, Springer International Publishing, 2015, ISBN 978-3-319-19146-1
- [39] Cimrak, I., Bachrata, K nad Bachraty, H., et al.: ‘Object-in-fluid framework in modeling of blood flow in microfluidic channels’, *Comunications, Scientific Letters of the University of zilina*, vol. 18, no. 1a, pp. 13–20, 2016, ISSN 1335-4205
- [40] Clausen, J.R., Aidun, C.K.: ‘Capsule dynamics and rheology in shear flow: Particle pressure and normal stress’, *Physics of Fluids*, vol. 22, p. 123302, 2010
- [41] Dao, M., Li, J., Suresh, S.: ‘Molecularly based analysis of deformation of spectrin network and human erythrocyte’, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 26, no. 8, pp. 1232–1244, 2006
- [42] Dao, M., Lim, C., Suresh, S.: ‘Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers’, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, vol. 51, no. 11–12, pp. 2259 – 2280, 2003, ISSN 0022-5096, proceedings of a Symposium on Dynamic Failure and Thin Film Mechanics, honoring Professor L.B. Freund
- [43] Dunweg, B., Ladd, A.J.C.: ‘Lattice-Boltzmann simulations of soft matter systems’, *Advances in Polymer Science*, vol. 221, pp. 89–166, 2009
- [44] Dupin, M., Halliday, I., et al.: ‘Modeling the flow of dense suspensions of deformable particles in three dimensions’, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, vol. 75, 2007
- [45] Eggleton, C.D., Popel, A.S.: ‘Large deformation of red blood cell ghosts in a simple shear flow’, *Physics of Fluids*, vol. 10, no. 8, pp. 1834–1845, 1998

- [46] Evans, E., Waugh, R., Melnik, L.: ‘Elastic area compressibility modulus of red cell membrane’, *Biophysical Journal*, vol. 16, no. 6, pp. 585–595, 1976
- [47] Fedosov, D.A., Caswell, B., Karniadakis, G.E.: ‘A multiscale red blood cell model with accurate mechanics, rheology, and dynamics’, *Biophysical Journal*, vol. 98, no. 10, pp. 2215 – 2225, 2010
- [48] Fedosov, D.A., Caswell, B., et al.: ‘Blood flow and cell-free layer in microvessels’, *Microcirculation*, vol. 17, no. 8, pp. 615–628, 2010
- [49] Fedosov, D.A., Lei, H., et al.: ‘Multiscale modeling of red blood cell mechanics and blood flow in malaria’, *PLoS Comput Biol*, vol. 7, no. 12, p. e1002270, 2011, doi:10.1371/journal.pcbi.1002270
- [50] Figueroa, C.A., Vignon-Clementel, I.E., et al.: ‘A coupled momentum method for modeling blood flow in three-dimensional deformable arteries’, *Computer methods in applied mechanics and engineering*, vol. 195, no. 41, pp. 5685–5706, 2006
- [51] Fischer, T.M.: ‘Shape memory of human red blood cells’, *Biophys J.*, vol. 86, no. 5, pp. 3304–3313, 2004, doi:10.1016/S0006-3495(04)74378-7
- [52] Fischer, T.M.: ‘Tank-tread frequency of the red cell membrane: dependence on the viscosity of the suspending medium’, *Biophysical journal*, vol. 93, no. 7, pp. 2553–2561, 2007
- [53] Fujiwara, H., Ishikawa, T., et al.: ‘Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel’, *Journal of Biomechanics*, vol. 42, no. 7, pp. 838–843, 2009
- [54] Geuzaine, C., Remacle, J.: ‘Gmsh: a three-dimensional finite element mesh generator with built-in pre- and post-processing facilities’, *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 79(11), pp. 1309–1331, 2009
- [55] Gleghorn, J.P., et al.: ‘Capture of circulating tumor cells from whole blood of prostate cancer patients using geometrically enhanced differential immunocapture (gedi) and a prostate-specific antibody’, *Lab Chip*, vol. 10, pp. 27–29, 2010

- [56] Gomez, F.A.: *Biological applications of microfluidics*, John Wiley & Sons, 2008
- [57] Henderson, A.: ‘ParaView guide, A Parallel Visualization Application’, Tech. rep., Kitware Inc., 2007
- [58] Henry, E., Holm, S.H., et al.: ‘Sorting cells by their dynamical properties’, *Scientific reports*, vol. 6, 2016
- [59] Holm, S., Beech, J., et al.: ‘Simplifying microfluidic separation devices towards field-detection of blood parasites’, *Analytical Methods*, 2016
- [60] Horák, D.e.a.: ‘Albumin-coated monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with immobilized antibodies: Application to the capture of epithelial cancer cells’, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 101A, no. 1, pp. 23–32, 2013, ISSN 1552-4965, doi:10.1002/jbm.a.34297
- [61] Jančígová, I.: ‘Modeling elastic objects in fluid flow with biomedical applications’, Ph.D. thesis, University of Žilina, 2015
- [62] Jančígová, I., Cimrák, I.: ‘Non-uniform force allocation for area preservation in spring network models’, *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, vol. 32, no. 10, pp. e02757–n/a, 2016
- [63] Kesselheim S., R.G.: ‘The lattice boltzmann method in espresso: Polymer diffusion and electroosmotic flow’, 2016, <http://espressomd.org/html/ess2013/Day3/03-1-hydrodynamics.pdf>
- [64] Kirby, B.J.: *Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices*, Cambridge university press, 2010
- [65] Kovalčíková, K., Slavík, M., et al.: ‘Volumetric flow rate in simulations of microfluidic devices’, P. Dančová, J. Novosád, eds., *Proceedings of the International conference Experimental Fluid Mechanics 2017*, pp. 304–311, 2017
- [66] Kruger, T., Gross, M., et al.: ‘Crossover from tumbling to tank-treading-like motion in dense simulated suspensions of red blood cells’, *Soft Matter*, vol. 61, pp. 9008–9015, 2013

- [67] Kruger, T., Varnik, F., Raabe, D.: ‘Efficient and accurate simulations of deformable particles immersed in a fluid using a combined immersed boundary lattice boltzmann finite element method’, *Comput. Method. Appl.*, vol. 61, pp. 3485–3505, 2011
- [68] Li, H., Lykotrafitis, G.: ‘Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network’, *Biophysics Journal*, vol. 107, no. 3, pp. 642–653, 2014
- [69] Lima, R., Fernandes, C.S., et al.: ‘Microscale flow dynamics of red blood cells in microchannels: an experimental and numerical analysis’, *Computational vision and medical image processing*, pp. 297–309, Springer, 2011
- [70] MacMeccan, R.M., Clausen, J.R., et al.: ‘Simulating deformable particle suspensions using a coupled lattice-boltzmann and finite element method’, *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 618, pp. 13–39, 2009
- [71] Mills, J.P., Qie, L., et al.: ‘Nonlinear elastic and viscoelastic deformation of the human red blood cell with optical tweezers’, *Mechanics & chemistry of biosystems : MCB*, vol. 1, no. 3, pp. 169–180, 2004
- [72] Mohamed, H.: ‘Use of microfluidic technology for cell separation’, *Blood Cell-An Overview of Studies in Hematology*, InTech, 2012
- [73] Mučka, F.: ‘Algoritmy a ich implementácia pre analýzu a získavanie dát zo záznamov biologických experimentov’, Master’s thesis, University of Žilina, 2017
- [74] Nagrath, S., Sequist, L.V., et al.: ‘Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology’, *Nature*, vol. 450, pp. 1235–1239, 2007, ISSN 0028-0836
- [75] Nakamura, M., Bessho, S., Wada, S.: ‘Spring network based model of a red blood cell for simulating mesoscopic blood flow’, *International journal for numerical methods in biomedical engineering*, vol. 29, no. 1, pp. 114–128, 2013

- [76] Ondrušová, M., Cimrák, I.: ‘Dynamical properties of red blood cell model in shear flow’, *Information and Digital Technologies (IDT), 2017 International Conference on*, pp. 288–292, IEEE, 2017
- [77] Pan, W., Fedosov, D.A., et al.: ‘Predicting dynamics and rheology of blood flow: A comparative study of multiscale and low-dimensional models of red blood cells’, *Microvascular Research*, vol. 82, no. 2, pp. 163–170, 2011, ISSN 0026-2862
- [78] Rahimian, A., Lashuk, I., et al.: ‘Petascale direct numerical simulation of blood flow on 200k cores and heterogeneous architectures’, *Proceedings of the 2010 ACM/IEEE International Conference for High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis, SC ’10*, pp. 1–11, IEEE Computer Society, Washington, DC, USA, 2010, ISBN 978-1-4244-7559-9, doi:10.1109/SC.2010.42
- [79] Reasor, D., Clausen, J., Aidun, C.: ‘Coupling the lattice-boltzmann and spectrin-link methods for the direct numerical simulation of cellular blood flow’, *International Journal for Numerical Methods in Fluids*, vol. 68, pp. 767–781, 2012
- [80] Rejniak, K.A.: ‘Investigating dynamical deformations of tumor cells in circulation: predictions from a theoretical model’, *Frontiers in Oncology*, vol. 2, no. 111, 2012, ISSN 2234-943X
- [81] Rodrigues, R.O., Pinho, D., et al.: ‘A simple microfluidic device for the deformability assessment of blood cells in a continuous flow’, *Biomedical microdevices*, vol. 17, no. 6, p. 108, 2015
- [82] Rojas, R.: *Neural networks: a systematic introduction*, Springer Science & Business Media, 2013
- [83] Ruder, S.: ‘An overview of gradient descent optimization algorithms’, *arXiv preprint arXiv:1609.04747*, 2016
- [84] Saliba, A.e.a.: ‘Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays’, vol. 107, no. 33, pp. 14524–14529, 2010, doi: 10.1073/pnas.1001515107

- [85] Sargent, R.G.: ‘Verification and validation of simulation models’, *Simulation Conference (WSC), Proceedings of the 2009 Winter*, pp. 162–176, IEEE, 2009
- [86] Slavík, M., Kovalčíková, K., et al.: ‘Processing of cells’ trajectories data for blood flow simulation model’, P. Dančová, J. Novosád, eds., *Proceedings of the International conference Experimental Fluid Mechanics 2017*, pp. 560–570, 2017
- [87] Slavík, M., Bachratá, K., et al.: ‘The sensitivity of the statistical characteristics to the selected parameters of the simulation model in the red blood cell flow simulations’, *2017 International Conference on Information and Digital Technologies (IDT)*, pp. 344–349, 2017
- [88] Stuart, M.J., Nagel, R.L.: ‘Sickle-cell disease’, *The Lancet*, vol. 364, no. 9442, pp. 1343–1360, 2004
- [89] Taskin, M.E., Fraser, K.H., et al.: ‘Evaluation of Eulerian and Lagrangian models for hemolysis estimation’, *Asaio Journal*, vol. 58, no. 4, pp. 363–372, 2012
- [90] Taylor, C.A., Hughes, T.J., Zarins, C.K.: ‘Finite element modeling of blood flow in arteries’, *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, vol. 158, no. 1-2, p. 155–196, 1998
- [91] Tomaiuolo, G., Barra, M., et al.: ‘Microfluidics analysis of red blood cell membrane viscoelasticity’, *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 3, pp. 449–454, 2011
- [92] Tomaiuolo, G., Simeone, M., et al.: ‘Red blood cell deformation in microconfined flow’, *Soft Matter*, vol. 5, no. 19, pp. 3736–3740, 2009
- [93] Tomášiková, J.: ‘Spracovanie a analýza videosekvencií z biologických experimentov pomocou špeciálnych algoritmov pre detekciu a trasovanie objektov’, Master’s thesis, University of Žilina, 2017
- [94] Tóthová, R.: ‘Comparison of different formulas for local area conservation modulus in spring network models’, *MIST*, 2014
- [95] Tóthová, R.: ‘Vývoj a implementácia biomedicínskych modelov vhodných na modelovanie mikrofluidických zariadení’, Ph.D. thesis, Žilinská univerzita, 2016

- [96] Tóthová, R., Jančígová, I., Bušík, M.: ‘Calibration of elastic coefficients for spring-network model of red blood cell’, *Information and Digital Technologies (IDT), 2015 International Conference on*, pp. 376–380, IEEE, 2015
- [97] Tsubota, K., Wada, S.: ‘Elastic force of red blood cell membrane during tank-treading motion: Consideration of the membrane’s natural state.’, *International Journal of Mechanical Sciences*, vol. 52, pp. 356–364, 2010
- [98] White, F.: *Fluid Mechanics*, McGraw-Hill series in mechanical engineering, McGraw Hill, 2011, ISBN 9780073529349
- [99] Wu, J., Aidun, C.K.: ‘Simulating 3d deformable particle suspensions using lattice boltzmann method with discrete external boundary force’, *Int. J. Numer. Meth. Fluids*, vol. 62, pp. 765–783, 2010
- [100] X. Li, P. M. Vlahovska, G.K.: ‘Continuum- and particle-based modeling of shapes and dynamics of red blood cells in health and disease’, *Soft Matter*, vol. 9, pp. 28–37, 2013
- [101] Xu, D., Kaliviotis, E., et al.: ‘Large scale simulation of red blood cell aggregation in shear flows’, *Journal of Biomechanics*, vol. 46, no. 11, pp. 1810 – 1817, 2013, ISSN 0021-9290, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.05.010>