

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



**Metódy validácie numerických simulácií biologických  
experimentov s červenými krvinkami**

**DIZERTAČNÁ PRÁCA**

**2019**

**Mgr. Kristína Kovalčíková**



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

**Metódy validácie numerických simulácií biologických  
experimentov s červenými krvinkami**

**DIZERTAČNÁ PRÁCA**

**28360020193004**

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

**Žilina, 2019**

**Mgr. Kristína Kovalčíková**



## **Anotácia**

Typ práce: Dizertačná práca

Akademický rok: 2018/2019

Názov práce: Metódy validácie numerických simulácií biologických experimentov s červenými krvinkami

Autorka: Mgr. Kristína Kovalčíková

Školiteľka: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD.

Školiteľ špecialista: RNDr. Hynek Bachratý, PhD.

Jazyk: Slovenčina

Počet strán: 100

Počet obrázkov: 61

Počet tabuliek: 11

Počet referencií: 24

Kľúčové slová: numerická simulácia, červená krvinka, rotácia, nastavovanie a porovnávanie experimentov, validácia modelu



## **Pod'akovanie**

Chcela by som sa pod'akovať doc. RNDr. Katke Bachratej, PhD. a RNDr. Hynkovi Bachratému, PhD. za nekonečnú trpezlivosť, ľudský prístup, a veľa dobrých nápadov. Rovnako patrí vďaka aj doc. Mgr. Ivovi Cimrákovi, Dr. a Mgr. Ive Jančigovej, PhD. za veľkú pomoc pri spúšťaní simulácií a reprezentácii výsledkov. Ďakujem Maťovi a Martinovi za vysvetlenie elementárneho fungovania nášho simulačného nástroja ESPResSo, Mišovi za instantné riešenia mojich problémov s Pythonom, a ďakujem aj Marianke, Isabelle, Betke, Monike, Ferovi, Kati a Tomášovi za veselé a milé pracovné prostredie.





## **Abstrakt**

KOVALČÍKOVÁ, Kristína: *Metódy validácie numerických simulácií biologických experimentov s červenými krvinkami*. [Dizertačná práca] Žilinská univerzita v Žiline. Fakulta riadenia a informatiky. Katedra softvérových technológií. - Vedúca dizertačnej práce: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD. – Žilina: FRI ZU, 2019, 100 s.

Dizertačná práca sa zaoberá numerickým simulovaním pohybu červených krviniek v tekutine tečúcej cez mikrofluidické zariadenia. Numerické simulácie boli namodelované pomocou modulu, ktorý je vyvíjaný výskumnou skupinou Cell-in-fluid, a ktorý je súčasťou voľne šíriteľného programového balíka ESPResSo. Jedným z výsledkov práce je skúmanie rotácie buniek ako charakteristiky, pomocou ktorej môžeme porovnať správanie sa buniek v simulácii a v biologickom experimente. Táto charakteristika je vhodná na porovnávanie jednobunkových aj mnohobunkových simulácií. Ďalšie výsledky sú definovanie parametrov biologického experimentu, ktoré potrebujeme vedieť na prípravu numerickej simulácie. Simulácie sú pre nás iba zjednodušeným modelom reality, preto je potrebné ich numerické parametre nastaviť v závislosti od toho, ktorý výstup numerického experimentu je pre nás dôležitý. S tým súvisiacim výsledkom je ďalej popis postupu ako nastaviť numericke simuláciu tak, aby zodpovedala biologickému experimentu, a nakoniec validácia funkčnosti modelu a nastavenia parametrov. Ako ilustrácia tejto validácie sú na záver práce uvedené dva konkrétne príklady porovnania biologického experimentu a jemu zodpovedajúcej numerickej simulácie.

**Kľúčové slová:** numerická simulácia kvapaliny, numerický model elastických telies, model červenej krvinky, rotácia, nastavovanie a porovnávanie experimentov, validácia modelu



## **Abstract**

KOVALČÍKOVÁ, Kristína: *Validation methodology of numerical simulations of biological experiments with red blood cells*. [Dissertation thesis] - University of Žilina. Faculty of Management Science and Informatics. Department of Software Technology. - Supervisor: doc. RNDr. Katarína Bachratá, PhD. - Žilina, FRI ZU, 2019, 100 p.

This dissertation thesis deals with the numerical simulation of red blood cells movement in fluid flowing through microfluidic devices. The numerical simulations were modeled using a module developed by the Cell-in-fluid research group. This module is part of an open source ESPResSo software package. One of the results of this work is investigation of the cell rotation as a characteristic by which we can compare cell behavior in simulation and in a biological experiment. This method is applicable for a one-cell as well as for a multi-cell experiment. Another result is identification of parameters of a biological experiment that we need to know to prepare a numerical simulation. Simulations are a simplified model of reality, so we need to set their numerical parameters depending on which numerical experiment output is important for us. Therefore, we describe how to set up parameters of a numerical simulation to match a biological experiment. Our last result in this thesis is validation of the proposed methods. To illustrate this validation, we present in the end of this work two examples of numerical simulations, which were inspired by existing biological experiments. We compare the behavior of the cells in the biological and the numerical experiment.

**Key words:** numerical simulation of fluid, numerical model of elastic objects, model of red blood cell, rotation, experiment setting and comparison, model validation



---

## Obsah

Zoznam obrázkov .....	17
Zoznam tabuliek .....	23
Úvod .....	25
Spoločenská a biologická motivácia.....	25
Ciele dizertačnej práce.....	26
1    Všeobecný popis modelu.....	27
1.1    Pohyb tekutiny .....	27
1.2    Objekt vnorený v tekutine.....	28
1.3    Elastické vlastnosti vnoreného objektu.....	29
1.3.1    Modul pružnosti s parametrom $k_s$ .....	30
1.3.2    Ohýbací modul s parametrom $k_b$ .....	30
1.3.3    Modul zachovania lokálnej plochy s parametrom $k_{al}$ .....	31
1.3.4    Modul zachovania celkovej plochy s parametrom $k_{ag}$ .....	31
1.3.5    Modul zachovania objemu s parametrom $k_v$ .....	32
1.4    Interakcie vnorených objektov.....	33
1.4.1    Interakcia medzi bunkami a prekážkami .....	33
1.4.2    Interakcia povrchu bunky samého so sebou .....	33
1.4.3    Vzájomná interakcia medzi vnorenými objektami .....	34
2    Rotácie buniek v biologickom experimente a v numerickej simulácii.....	37
2.1    Fyzikálny koncept rotácie .....	37
2.2    Spôsoby merania rotácie v numerických modeloch .....	38
2.2.1    Presný výpočet rotácie zo simulačných dát.....	38
2.2.2    Zjednodušený výpočet rotácie zo simulačných dát .....	39

2.3	Vyhodnocovanie rotácie z videa urobeného zo simulácie .....	40
2.3.1	Princíp vyhodnocovania .....	40
2.3.2	Chyba presnosti polohy sledovaného bodu .....	42
2.3.3	Chyba odhadu rotácie .....	42
2.3.4	Ďalšie spracovanie grafických výsledkov .....	43
2.4	Skúmanie rotácie buniek v periodických poliach prekážok.....	45
2.4.1	Popis nastavenia numerického experimentu.....	45
2.4.2	Výpočet rotácie krviniek v simulácii a porovnávanie rotácie buniek....	46
2.5	Zhrnutie.....	48
3	Príprava a testovanie numerickej simulácie .....	49
3.1	Nastavovanie simulačného kanála a tekutiny .....	50
3.2	Nastavovanie parametrov objektov tečúcich simulačným kanálom.....	53
3.3	Paralelizácia výpočtu simulácie .....	55
3.4	Modifikácie nastavovania simulácie pre účely navrhovania biologického experimentu.....	56
4	Vylad'ovanie simulačného kódu a hľadanie funkčných limitov modelu bunky	57
4.1	Nepresnosť deformácie bunky pri kontakte s prekážkou.....	57
4.2	Prenikanie bunky cez seba pri prechode úzkymi priestormi.....	58
4.3	Deformácia bunky vo voľnom priestore .....	59
4.4	Prenikanie buniek do seba pri ich vzájomnej kolízii .....	61
4.5	Trajektória buniek pri ceste medzi prekážkami v kanáli nezodpovedá trajektórii buniek v biologickom experimente .....	62
4.6	Simulácia nefunguje s niektorými modelmi bunky .....	63
4.7	„Všetko funguje ako má“, ale simulácia aj tak spadne .....	64
5	Príklad aplikácie: Simulácia krvinky v rýchlo sa meniacom profile tekutiny...	65
5.1	Popis a dizajn pôvodného experimentu .....	65
5.1	Výpočet rýchlosti bunky z informácie o šmykovom toku v kanáli .....	66

---

5.2	Popis nastavenia numerického experimentu.....	66
5.3	Výsledky a ich spracovanie .....	68
5.4	Zhrnutie a diskusia.....	71
6	Príklad aplikácie: Modelovanie toku krviniek v úzkych priestoroch.....	73
6.1	Dizajn experimentu.....	73
6.2	Výpočet závislosti rýchlosti bunky od jej deformácie.....	74
6.3	Popis nastavenia numerického experimentu.....	76
6.4	Výsledky .....	79
6.5	Diskusia .....	84
	Záver.....	91
	Publikácie .....	95
	Práce v tlači .....	97
	Použitá literatúra .....	98





## Zoznam obrázkov

- Obr. 1: Smery pohybu častíc v lattice-Boltzmannovej metóde v trojrozmernom modeli tekutiny. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora.....27
- Obr. 2: Príklady rôznej triangulácie, zľava postupne model bunky s 12, 141, 347 a 642 povrchovými bodmi.....28
- Obr. 3: Vzájomné pôsobenie prúdiacej tekutiny na vnorený objekt a naopak .....29
- Obr. 4: Zobrazenie funkčnosti modulu pružnosti s parametrom  $k_s$ . Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora. ....30
- Obr. 5: Ohýbací modul s parametrom  $k_b$  pôsobí pri zmene uhla medzi dvoma susednými trojuholníkmi na povrchu triangulovanej bunky. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora..... 30
- Obr. 6: Modul zachovania lokálnej plochy spôsobuje to, že každý trojuholník na povrchu bunky má tendenciu zachovávať taký obsah, aký mal v pokojovom stave. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora. ....31
- Obr. 7: Symbolické znázornenie fungovania modulu zachovania celkovej plochy. Na tomto obrázku je trojrozmerná bunka reprezentovaná ako dvojrozmerný kruh, a jej dvojrozmerná plocha je reprezentovaná ako obvod kruhu. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora. ....32
- Obr. 8: Symbolické znázornenie zachovania celkového objemu bunky. Trojrozmerná bunka je tu znázornená ako dvojrozmerný kruh, a jej objem ako plocha tohto kruhu. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora. ....32
- Obr. 9: Interakcia bunkového povrchu so sebou samým. a) Ak je parameter  $d_{lim}$  nastavený na menej ako polovicu dĺžky hrany na povrchu bunky, body sa nedostatočne od seba odtláčajú, a povrch bunky sa môže prekryť. b) Parameter  $d_{lim}$  je nastavený na polovicu dĺžky hrany na povrchu bunky, povrch bunky sa neprekrýva. Obrázok je pre prehľadnosť iba schématický. ....34
- Obr. 10: Odpudivý potenciál v prípade mäkkej interakcie. Vľavo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa dostanú k sebe na vzdialenosť menej ako  $d_{lim}$ . Vpravo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa prekryjú. .... 35

Obr. 11: Odpudivý potenciál v prípade membránovej interakcie. Vľavo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa dostanú k sebe na vzdialenosť menej ako $d_{lim}$ . Vpravo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa prekryjú. ....	35
Obr. 12: Dva možné spôsoby výpočtu uhlovej rýchlosti .....	38
Obr. 13: Sledovanie polohy bodu v bunke.....	38
Obr. 14: Príklad vypočítanej uhlovej rýchlosti pre jednu z buniek .....	39
Obr. 15: Uhlová rýchlosť bunky je v zjednodušenom postupe počítaná ako rozdiel X-ovej zložky rýchlosti nameranej v bodoch s extrémálnou Y-ovou súradnicou .....	40
Obr. 16: Porovnanie presného a zjednodušeného postupu na počítanie uhlovej rýchlosti ..	40
Obr. 17: Extremálne body na bunke .....	41
Obr. 18: Princíp definovania extrémálnych bodov na bunke vo videu.....	41
Obr. 19: Vektory $r_1$ a $r_2$ , ktoré sú použité na výpočet uhlovej rýchlosti .....	42
Obr. 20: Nepresnosť určenia vektora $r_2$ , pri zmene relatívnej polohy sledovaného bodu L	42
Obr. 21: Chyba odhadu smeru rotácie pri použití nesprávnej dvojice vektorov.....	43
Obr. 22: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti pre dáta získané zo simulácie, a pre dáta získané zo simulačného videa. Na obrázku je vidieť, že zašumenie signálu je spôsobené len ojedinelými píkami. ....	44
Obr. 23: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti pre dáta získané zo simulácie, a pre fyzikálne vyhladené dáta získané zo simulačného videa.....	44
Obr. 24: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti pre dáta získané zo simulácie a pre numericky vyhladené dáta získané zo simulačného videa.....	45
Obr. 25: Simulačné boxy s počiatočnými polohami buniek použité na skúmanie rotácie krviniek v simuláciách s 50 krvinkami. ....	46
Obr. 26 Simulačné boxy s počiatočnými polohami buniek použité na skúmanie rotácie krviniek v simuláciách s 20, 50 a 100 krvinkami. ....	46
Obr. 27: Porovnanie frekvencií rotácií buniek v experimentoch A50, B50, C50 a D50. X-ová os: Hodnoty dominantných frekvencií odčítaných z rotácie krviniek, zoradené od najmenej po najväčšiu. Y-ová os: počet buniek s danou frekvenciou rotácie.	

---

Hodnoty pre experimenty A50 a B50 sa na seba výrazne podobajú, hodnoty zodpovedajúce experimentom C50 a D50 sú odlišné.....	47
Obr. 28: Porovnanie frekvencií rotácií buniek v experimentoch A20, A50, B50 a A100...	48
Obr. 29: Rôzne geometrie simulačných boxov, na ktorých sme skúmali vzťah medzi silou pôsobiacou na kvapalné elementy a objemovým prietokom v kanáli .....	52
Obr. 30: Hodnoty objemových prietokov v rôznych simulačných boxoch v priebehu simulácie.....	52
Obr. 31: Hodnoty objemových prietokov v rôznych simulačných boxoch na konci simulácie .....	53
Obr. 32: Príklad deformácie bunky spôsobenej príliš veľkou rýchlosťou tekutiny v kanáli .....	58
Obr. 33: Deformácia buniek spôsobená interakciou s prekážkami v simulačnom kanáli. Oproti simulácii s nadmernou rýchlosťou si bunky lepšie zachovávajú svoj tvar, aj ľahšie vojdú do zúženej časti simulačného kanála .....	58
Obr. 34: Príklad prechodu bunky cez úzku štrbinu, v ktorej sa zdeformuje tak, že sa jej povrch preliači cez seba dovnútra.....	59
Obr. 35: Tvar bunky v simulácii, ktorá má nastavené príliš veľké hodnoty pre interakciu bunkového povrchu samého so sebou. Bunka vľavo má správne nastavené interakčné koeficienty, smerom doprava sa zvyšuje hodnota interakčného koeficientu <code>cutoff</code> .....	60
Obr. 36: Deformácia bunky v dôsledku blízkosti stien simulačného kanála, pre model bunky s nízkym počtom povrchových uzlov (tu 12 uzlov). Vľavo je počiatočná poloha bunky, tak, ako bola inicializovaná na začiatku simulácie. Vpravo je bunka po niekoľkých krokoch simulácie, po započítaní interakcie medzi stenou a bunkou.	61
Obr. 37: Príklad nesprávneho usporiadania prekážok v simulačnom kanáli. Na spoji prekážok môže dôjsť ku nechcenému pretekaniu tekutiny, alebo pôvodne nastavené medzera medzi prekážkami nemusí byť pre tekutinu viditeľná. ....	62
Obr. 38: Porovnanie správania troch identických buniek v rôzne modelovanej tekutine. Zelená bunka je modelovaná v tekutine s diskretizáciou 1 $\mu$ m, modrá je v tekutine s diskretizáciou 0,5 $\mu$ m a červená je v tekutine s diskretizáciou 0,25 $\mu$ m. Naľavo	

môžeme vidieť porovnanie buniek v diskretizácii 1 $\mu\text{m}$ a 0,5 $\mu\text{m}$ , vidno, že tu nie je podstatný rozdiel. Napravo porovnáваме simuláciu v diskretizácii 0,5 $\mu\text{m}$ a 0,25 $\mu\text{m}$ . Bunka v jemnejšie diskretizovanej tekutine ľahšie vchádza do štrbiny.....	63
Obr. 39: a) Tvar a rozmery jednej z troch hyperbolických častí mikrokanála, ktoré sú v pôvodnom experimente zapojené za sebou. b) Štyri zóny hyperbolického kanála, v ktorých bola zisťovaná hodnota DI pre červené krvinky. Každá zóna má šírku 50 $\mu\text{m}$ .....	65
Obr. 40: Počiatočné polohy červenej krvinky v simulácii, znázornené čiernymi bodkami.	67
Obr. 41: Počiatočné náklony buniek .....	67
Obr. 42: Tvar bunky v rôznych častiach kanála.....	69
Obr. 43: Porovnanie rýchlostí buniek v kanáli v biologickom experimente a v numerickej simulácii. Dáta o rýchlosti v biologickom experimente sú vypočítané na základe informácií o šmykovom toku.....	70
Obr. 44: Priebeh rýchlosti jednej bunky v simulácii, v závislosti od polohy bunky v kanáli. Sivé plné čiary označujú miesto, kde bolo urobené meranie na porovnanie s biologickými dátami.....	70
Obr. 45: Porovnanie deformačného indexu buniek v kanáli v biologickom experimente a v numerickej simulácii. ....	71
Obr. 46: Priebeh deformačného indexu jednej bunky v simulácii, v závislosti od polohy bunky v kanáli. Sivé plné čiary označujú miesto, kde bolo urobené meranie na porovnanie s biologickými dátami.....	71
Obr. 47: Dizajn a rozmery mikrofluidického zariadenia – pohľad zvrchu. Tekutina v ňom tečie zľava doprava, v smere osi X.....	73
Obr. 48: Dizajn a rozmery mikrofluidického zariadenia – pohľad z boku. ....	73
Obr. 49 Znázornenie rozmerov kanála a rýchlostí buniek a tekutiny, potrebných na výpočet normovanej deformácie a normovanej rýchlosti bunky .....	75
Obr. 50: Model bunky použitý v simulácii .....	76
Obr. 51: Numerický model tekutiny, so znázornenými uzlami tvoriacimi lattice-Boltzmannovu mriežku. Tekutina je znázornená v okolí najužšej štrbiny s hrúbkou 2,55 $\mu\text{m}$ .....	78

- Obr. 52: Počiatočná poloha buniek v numerickej simulácii, a ich poloha po 300 simulačných krokoch. Príklad usporiadania je uvedený pre bunky s priemerom 7  $\mu\text{m}$ . ..... 79
- Obr. 53: Poloha rôzne veľkých buniek v rýchlostnom poli tekutiny, pohľad v smere toku. Menšia bunka je unášaná rýchlou tekutinou v strede kanála, v porovnaní s väčšou bunkou, ktorá je viac ovplyvnená pomalšou tekutinou pri stenách mikrofluidického kanála. .... 80
- Obr. 54: Efektívna šírka štrbiny pre bunku v numerickej simulácii je menšia ako jej reálna šírka, kvôli prítomnosti medzery medzi prekážkami a bunkami. Táto medzera je spôsobená interakčným koeficientom `cutoff` a pôsobí ako prevencia preniknutia bunky a prekážky ..... 81
- Obr. 55: Závislosť deformácie bunky od jej rýchlosti, dáta získané z numerickej simulácie. Oranžové štvorčeky sú pre zúženie šírky 4,29  $\mu\text{m}$ , zelené krúžky pre zúženie šírky 3,17  $\mu\text{m}$ , a modré trojuholníčky pre zúženie s rozmerom 2,55  $\mu\text{m}$ . ..... 82
- Obr. 56: Porovnanie výsledkov biologického experimentu (5 vzoriek) a numerickej simulácie. Legenda na obrázku zachytáva pre každú vzorku a pre simulačné dáta priamku ich lineárnej regresie. .... 83
- Obr. 57: Kalibračné krivky pre štyri rôzne krvinky, ktoré boli použité na štúdiu vplyvu tvrdosti červenej krvinky na rýchlosť jej pohybu v skúmaných štrbinách. Tenká modrá a červená čiara sú krivky reálnej krvinky, hrubá fialová a oranžová čiara sú krivky simulovanej krvinky. Svetlomodrá a svetločervená oblasť sú odchýlky od nameraných priemerných biologických hodnôt. .... 86
- Obr. 58: Priebeh rýchlosti rôzne tuhých buniek cez najširšiu štrbinu ..... 88
- Obr. 59: Porovnanie výsledkov z biologického experimentu a zo simulácie – namerané rýchlosti pre bunky prechádzajúce najširšou štrbinou sú navýšené o 10%. .... 88
- Obr. 60: Počiatočná poloha bunky v referenčnom experimente a v experimente, kde bola bunka od začiatku vychýlená od horizontálnej roviny. .... 89
- Obr. 61: Porovnanie rýchlosti referenčnej bunky B a naklonenej bunky s rovnakými elastickými parametrami. .... 89



## Zoznam tabuliek

Tab. 1: Hodnoty DI a rýchlosti šmyku v každej zo štyroch sledovaných zón v hyperbolickom kanáli. Rýchlosť šmyku je údaj z biologického experimentu, priemerná rýchlosť je dopočítaný údaj.....	66
Tab. 2: Hodnoty elastických koeficientov pre červené krvinky v simulácii .....	68
Tab. 3: Numerické parametre tekutiny a iné simulačné parametre .....	68
Tab. 4: Rozmery buniek použité v simulácii .....	76
Tab. 5: Hodnoty elastických koeficientov pre červené krvinky v simulácii .....	77
Tab. 6: Interakčné koeficienty pre interakciu medzi bunkou a stenou, a pre vzájomnú interakciu medzi bodmi na povrchu tej istej bunky .....	77
Tab. 7: Numerické parametre tekutiny a iné simulačné parametre .....	78
Tab. 8: Rýchlosti nedeformovaných buniek vo voľnom poli a im prislúchajúca priemerná rýchlosť tekutiny v redukovanom priereze, pre rôzne veľkosti buniek .....	81
Tab. 9: Hodnoty sklonu lineárnej regresie pre dáta získané z biologického experimentu a pre dáta získané z numerickej simulácie. Hodnoty sú zaokrúhlené na najbližší násobok 0,05.....	83
Tab. 10: Hodnoty rýchlosti kvapaliny namerané v jednotlivých štrbinách, aproximovaná hodnota normovanej rýchlosti $v_n$ a jej porovnanie s hodnotami získanými zo simulovaných buniek .....	85
Tab. 11: Elastické koeficienty štyroch krviniek, ktoré boli použité na štúdiu vplyvu tuhosti červenej krvinky na rýchlosť jej pohybu v skúmaných štrbinách. Bunka B je referenčná, to znamená, že táto bola použitá pri simulácii predošlých experimentov. ....	87





## Úvod

### Spoločenská a biologická motivácia

Mikrofluidické zariadenia sú v súčasnosti oblasťou, ktorej sa venuje mnoho výskumných skupín. Tieto zariadenia slúžia napríklad na triedenie, odchyťovanie a identifikovanie špecifických buniek zo vzoriek krvi [1], [2]. Na jednej strane máme biologické experimenty, ktoré zachytávajú správanie sa buniek „in-vitro“. Avšak výroba zariadení na takéto experimenty je finančne aj časovo náročná [3]. Parametre takéhoto experimentu preto nie sú ľahko modifikovateľné a optimalizácia zariadení pre odchyt chorých buniek cestou konštrukcie rôznych zariadení je finančne náročná. Na druhej strane máme numerické simulácie, ktoré modelujú tok buniek v mikrofluidických zariadeniach a veľmi ľahko sa v nich dajú meniť parametre a vyhodnocovať pohyb buniek v rôznych podmienkach. Preto je výhodnejšie najprv overiť funkčnosť navrhovaných zariadení pomocou numerického modelu, a až potom investovať do výroby zodpovedajúceho mikročipu [4], [5].

Simulačný nástroj pre modelovanie toku krvi v mikrofluidických zariadeniach bol vyvinutý výskumnou skupinou Cell-in-fluid na fakulte riadenia a informatiky [6], [7]. V našom výskume sa sústreďíme na modelovanie buniek v toku krvnej plazmy alebo podobnej tekutiny. Naším dlhodobým cieľom je výskum krvi ako širšieho celku, napríklad správanie sa rakovinových buniek v krvi, správanie sa toku krviniek v rôznych druhoch mikrofluidických zariadení, alebo skúmanie znehodnotenia krviniek pri prechode krvi cez medicínske zariadenia. Preto dôležitou časťou modelu je modelovanie červených krviniek. Objemový podiel červených krviniek v krvi je približne 45%, preto je na korektné fungovanie modelu ich presná reprezentácia nevyhnutná.

Numerický model bunky doteraz prebehol verifikáciou (kontrolou vnútornej konzistencie modelu) a kalibráciou červenej krvinky (nastavenie parametrov na základe porovnania simulácie a špecifického biologického experimentu). Keď už máme nastavené elastické správanie bunky, ďalším krokom je teraz jeho validácia. Cieľom validácie je overiť, či je nastavenie elastických koeficientov simulačného modelu bunky vhodné aj pre iné situácie než tie, na ktorých boli elastické koeficienty kalibrované.

### Ciele dizertačnej práce

Dlhodobým cieľom výskumnej skupiny je vývoj simulačného nástroja, pomocou ktorého sa dajú modelovať neznáme situácie. Model nám potom pomôže pochopiť správanie buniek aj v takej geometrii mikrofluidického zariadenia, ktorá ešte nebola overená biologickým experimentom. Príkladom takéhoto prístupu je [8]. Numerická simulácia nám môže pomôcť vybrať na biologické preskúmanie iba tie situácie, ktoré sa pri numerickej simulácii preukážu tým, že spĺňajú požiadavky, ktoré od mikrofluidického kanála očakávame.

Jednou zo záverečných častí vývoja modelu je jeho validácia, teda porovnanie výsledkov simulačných experimentov s výsledkami biologických experimentov s reálnymi bunkami. V rámci tejto validácie potrebujeme mať nástroj, pomocou ktorého budeme vedieť porovnať správanie sa buniek na lokálnej úrovni (pohyb izolovaných buniek) aj na globálnej úrovni (pohyb celej množiny buniek v zariadení).

V tejto dizertačnej práci sme si vymedzili nasledujúce ciele:

- Skúmanie rotácie buniek ako charakteristiky, pomocou ktorej môžeme porovnať správanie sa buniek v simulácii a v biologickom experimente.
- Definovanie parametrov biologického experimentu, ktoré potrebujeme vedieť na prípravu numerickej simulácie. Tieto parametre získavame z článkov, ktoré popisujú biologický experiment – v prípade, že pripravujeme simuláciu existujúceho experimentu. Pri príprave simulácie, ktorá nie je inšpirovaná existujúcim experimentom, si musíme tiež uvedomiť, ktoré parametre zo simulácie budú, naopak, dôležité pri príprave zodpovedajúceho biologického experimentu.
- Popis postupu ako nastaviť numericкую simuláciu tak, aby zodpovedala biologickému experimentu.
- Validácia funkčnosti modelu a nastavenia parametrov. Súčasťou tohto cieľa je simulácia existujúcich biologických experimentov, a porovnanie výsledkov experimentu nameraných v laboratóriu aj v numerickej simulácii.

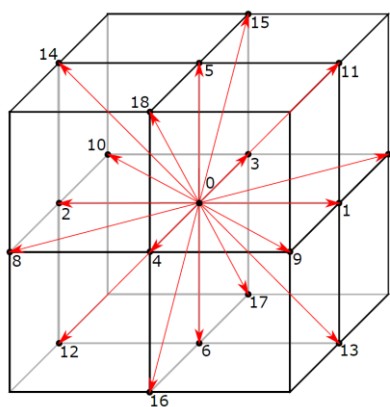
# 1 Všeobecný popis modelu

Model toku krvi je implementovaný vo voľne šíriteľnom programovom balíku ESPResSo [9]. ESPResSo, ktoré v súčasnosti používame, nie je vydávané v pravidelných verziách. Pre účely reprodukovania simulácii môžeme využiť, že softvér je verzionovaný systémom git. Git repozitár systému ESPResSo, ktorý používame, je možné nájsť na internete [10].

Tento simulačný nástroj pozostáva z dvoch častí: kvapaliny a elastických objektov, ktoré sú do nej vnorené. V nasledujúcej kapitole opíšeme fungovanie jednotlivých častí modelu, podrobnejšie vysvetlenie sa nachádza v [11].

## 1.1 Pohyb tekutiny

Tekutina v našom modeli reprezentuje krvnú plazmu alebo inú kvapalinu. V programovom balíku ESPResSo je znázornená nehybnou Eulerovou mriežkou. Je modelovaná pomocou lattice-Boltzmanovej metódy [12]. Model je použiteľný pre plyny aj pre kvapaliny, a je založený na pohybe fiktívnych častíc v troch rozmeroch. Ich pohyb je počítaný ako tok v jednotlivých bodoch tejto Eulerovej mriežky. Ide o numerické počítanie funkcie  $n_i(\mathbf{x}, t)$ , ktorá hovorí o tom, koľko fiktívnych častíc prúdi z miesta  $\mathbf{x}$  v čase  $t$  v smere jednotkového vektora  $\mathbf{e}_i$ . Verzia lattice-Boltzmannovej metódy, ktorú používame, je D3Q19, čo znamená, že v troch rozmeroch sa môžu fiktívne častice pohybovať devätnástimi rôznymi smermi (Obr. 1).



Obr. 1: Smery pohybu častíc v lattice-Boltzmannovej metóde v trojrozmernom modeli tekutiny. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora.

Rovnica pre pohyb fiktívnych častíc je nasledovná:

$$n_i(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i \Delta t, t + \Delta t) = n_i(\mathbf{x}, t) - \Delta_i(n(\mathbf{x}, t)) + f_i(\mathbf{x}, t) \quad (1)$$

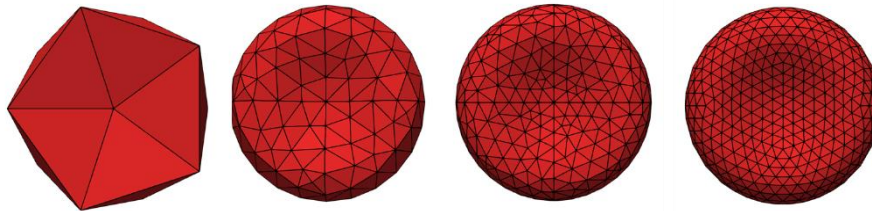
kde  $\Delta t$  je časový krok použitý v simulácii,  $\Delta_i$  je kolízny operátor, a  $f_i$  je externá sila pôsobiaca na kvapalinu. Táto sila môže pochádzať buď z interakcie medzi tekutinou a v nej vnorenými telesami alebo prekážkami, alebo to môže byť hybná sila, ktorou sa tekutina uvádza do pohybu, a ktorú užívateľ zadáva ako jeden zo vstupných parametrov na začiatok svojej simulácie. Detailnejší popis tohto prístupu je uvedený v [12].

S funkciou  $n_i$  úzko súvisia aj hustota  $\rho(\mathbf{x}, t)$  a rýchlosť tekutiny  $\mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$ :

$$\rho(\mathbf{x}, t) = \sum_i n_i(\mathbf{x}, t) \quad \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = \frac{\sum_i n_i(\mathbf{x}, t) \mathbf{e}_i}{\rho(\mathbf{x}, t)} \quad (2)$$

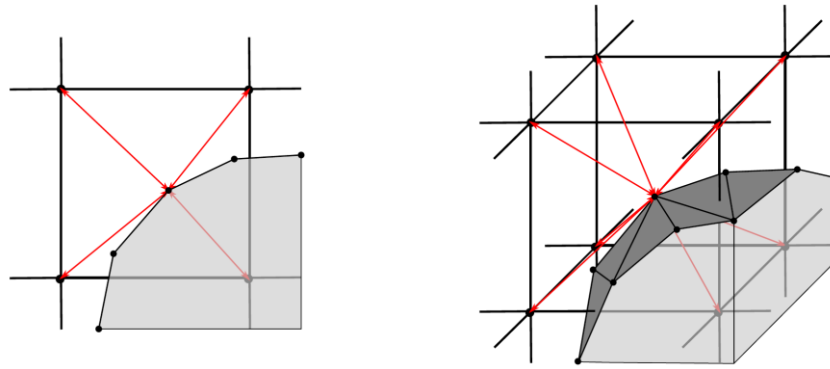
### 1.2 Objekt vnorený v tekutine

Povrch vnorených objektov je diskretizovaný, vďaka čomu sa môžu deformovať a interagovať s kvapalinou. Tieto objekty slúžia ako model krvínek a iných buniek. Bunky sú v modeli reprezentované iba ich povrchom, teda množinou bodov umiestnených na povrchu bunky, ktoré sú navzájom poprepájané elastickými väzbami. Proces vytvárania geometrickej štruktúry, teda definovanie pozície bodov a väzieb medzi nimi, sa volá triangulácia, lebo vzniknutá geometria pozostáva z navzájom pospájaných trojuholníkov. Príklady rôznej triangulácie sú zobrazené na Obr. 2.



Obr. 2: Príklady rôznej triangulácie, zľava postupne model bunky s 12, 141, 347 a 642 povrchovými bodmi.

Vnorené objekty sú, na rozdiel od modelu tekutiny, znázornené Lagrangeovou mriežkou, ktorá sa pohybuje spolu s modelovaným objektom. Sily, ktorými pôsobí tekutina na vnorený objekt (Obr. 3), a ktoré majú pôvod v tekutinovej Eulerovej mriežke, pôsobia na určitý bod Lagrangeovej mriežky. Výsledná sila pôsobiaca na jeden bod je počítaná ako vážený priemer spomedzi týchto Eulerových bodov. Interakcia medzi vnorenými bunkami a tekutinou je obojsmerná, teda sily, ktorými pôsobí vnorený objekt na tekutinu, sú vyhodnotené podobne ako sily, ktorými pôsobí tekutina na vnorený objekt [14]. Metóda použitá v programovom balíku ESPResSo sa nazýva metóda vnorenej hranice (IBM – immersed boundary method).



Obr. 3: Vzájomné pôsobenie prúdiacej tekutiny na vnorený objekt a naopak.

Sila, ktorou pôsobí kvapalina na bod na povrchu vnoreného objektu, je počítaná nasledovným spôsobom:

$$\mathbf{F}_j = \xi(\mathbf{v} - \mathbf{u}), \quad (3)$$

kde  $\mathbf{F}_j$  je súčet všetkých síl, ktorými pôsobí tekutina na bod  $j$  na povrchu vnoreného telesa,  $\mathbf{v}$  je rýchlosť bodu, a následne  $\mathbf{u}$  je rýchlosť tekutiny v mieste výskytu bodu  $j$ . Parameter  $\xi$  je koeficient prenosu síl, a reprezentuje lokálne trecie sily. Jeho nastavenie je závislé od viskozity kvapaliny a od geometrie vnoreného objektu. Jeho podrobnejšie vysvetlenie možno nájsť v [11] a [13].

Pohyb bodu  $j$  je riadený Newtonovou rovnicou:

$$m_j \cdot \ddot{\mathbf{x}}_j = \mathbf{F}_{jf} + \mathbf{F}_{je} + \mathbf{F}_{ext} \quad (4)$$

kde  $m_j$  je hmotnosť bodu  $j$ ,  $\ddot{\mathbf{x}}_j$  je druhá časová derivácia vektora polohy bodu  $j$ ,  $\mathbf{F}_{jf}$  je sila tekutiny pôsobiaca na bod  $j$ ,  $\mathbf{F}_{je}$  je súčet všetkých elastických síl pôsobiacich na bod  $j$  od ostatných bodov na povrchu vnoreného objektu, a  $\mathbf{F}_{ext}$  je výsledná externá sila pôsobiaca na bod  $j$ , ktorá môže vzniknúť napríklad pri zrážke s iným objektom alebo s pevnou hranicou.

### 1.3 Elastické vlastnosti vnoreného objektu

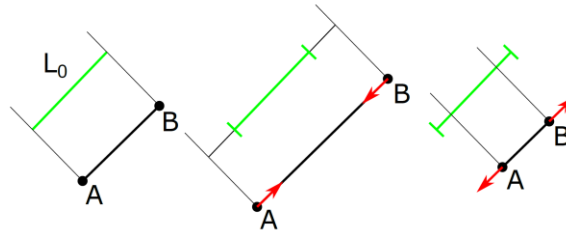
Elastické väzby určujúce deformačné vlastnosti objektu sú definované piatimi elastickými modulmi: modul pružnosti, ohýbací modul, potom modul zachovania lokálnej plochy, zachovanie celkovej plochy povrchu bunky, a modul zachovania objemu. Každý z týchto modulov má svoju vlastnú tuhosť, vyjadrenú elastickým koeficientom. Tieto koeficienty sú nakalibrované využitím simulácie naťahovacieho experimentu [15].

Implementácia elastických modulov  $k_s$ ,  $k_{al}$ ,  $k_{ag}$  a  $k_v$  je urobená tak, že výsledná sila aj výsledný moment sily pôsobiace na bunku sú nulové. Modul  $k_b$  je implementovaný s nulovou

výslednicou síl, ale výsledný moment nemusí byť nutne nulový. Tieto odchýlky sú však zanedbateľné, ak vezmeme do úvahy že sa simulovaná bunka pohybuje v toku tekutiny.

### 1.3.1 Modul pružnosti s parametrom $k_s$

Ide o modul, ktorého cieľom je zachovať pokojovú dĺžku jednotlivých väzieb medzi bodmi na povrchu objektu. Jeho názov je odvodený od anglického názvu „stretching modulus“. Funkčnosť tohto modulu je zobrazená na Obr. 4.



Obr. 4: Zobrazenie funkčnosti modulu pružnosti s parametrom  $k_s$ . Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora.

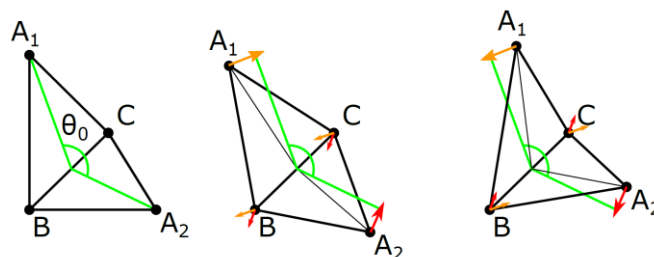
Úlohou modulu pružnosti je zachovávať lokálnu geometriu bunky. Je implementovaný nasledovným vzťahom:

$$\mathbf{F}_s(A) = k_s \kappa(\lambda) (L - L_0) \mathbf{n}_{AB} \quad (5)$$

V tomto vzťahu  $\mathbf{F}_s(A)$  je sila pôsobiaca na bod  $A$ ,  $k_s$  je koeficient naťahovania,  $\lambda = \frac{L}{L_0}$ ,  $L$  a  $L_0$  sú aktuálna a pokojová dĺžka väzby medzi bodmi  $A$  a  $B$ . Ďalej  $\kappa(\lambda) = \frac{\lambda^{0,5} - \lambda^{-2,5}}{\lambda + \lambda^{-3}}$ , a  $\mathbf{n}_{AB}$  je jednotkový vektor v smere spojnice bodov  $A$  a  $B$ . Aby bol súčet síl v celej sústave rovný nule, rovnako veľká sila opačného smeru pôsobí aj v bode  $B$ .

### 1.3.2 Ohýbací modul s parametrom $k_b$

Tento modul riadi lokálnu zmenu uhla medzi susednými trojuholníkmi na triangulovanom povrchu bunky. Jeho názov je odvodený od anglického pomenovania „bending modulus“. Spôsob, akým pôsobí na povrch bunky, je znázornený na Obr. 5.



Obr. 5: Ohýbací modul s parametrom  $k_b$  pôsobí pri zmene uhla medzi dvoma susednými trojuholníkmi na povrchu triangulovanej bunky. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora.

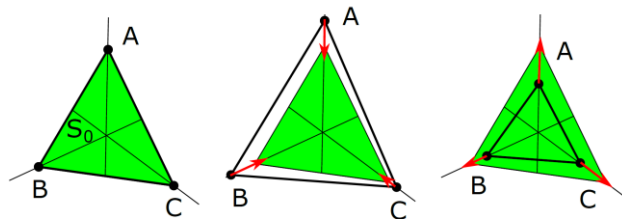
Podobne ako v prípade modulu pružnosti, aj implementácia ohýbacieho modulu je zameraná na lokálne zmeny na povrchu bunky. Ohýbací modulus je implementovaný nasledovným vzťahom:

$$\mathbf{F}_b(A, B, C) = k_b(\theta - \theta_0)\mathbf{n}_{ABC} \quad (6)$$

V tomto vzťahu  $k_b$  je koeficient ohybu,  $\theta$  je aktuálny uhol medzi dvoma susednými trojuholníkmi,  $\theta_0$  je uhol medzi týmito dvoma trojuholníkmi v pokojovom stave, a  $\mathbf{n}_{ABC}$  je jednotkový vektor v smere roviny  $ABC$ . Vypočítaná sila  $\mathbf{F}_b(A, B, C)$  je sila, ktorá pôsobí v bode  $A$ . Aby bol súčet síl v celej sústave rovný nule, v bodoch  $B$  a  $C$  pôsobí sila, ktorá má polovičnú veľkosť a opačný smer ako sila  $\mathbf{F}_b(A, B, C)$ .

### 1.3.3 Modul zachovania lokálnej plochy s parametrom $k_{al}$

Hlavnou úlohou tohto modulu je zachovanie lokálnej plochy v jednotlivých trojuholníkoch na povrchu bunky. Jeho označenie je odvodené od anglického názvu „local area“. Princíp jeho fungovania je znázornený na Obr. 6



Obr. 6: Modul zachovania lokálnej plochy spôsobuje to, že každý trojuholník na povrchu bunky má tendenciu zachovávať taký obsah, aký mal v pokojovom stave. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora.

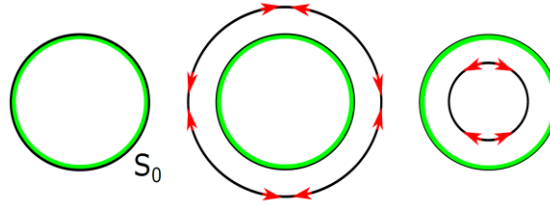
Implementácia tohto modulu je zabezpečená nasledujúcim vzťahom:

$$\mathbf{F}_{al}(A) = \frac{t_A}{t_A^2 + t_B^2 + t_C^2} k_{al} \Delta S_{ABC} \mathbf{n}_{AT} \quad (7)$$

V tomto vzťahu  $T$  je ťažisko trojuholníka  $ABC$ ,  $t_A = |AT|$ ,  $t_B = |BT|$  a  $t_C = |CT|$ . Ďalej  $k_{al}$  je koeficient zachovania lokálnej plochy,  $\Delta S_{ABC}$  je odchýlka aktuálnej plochy trojuholníka  $ABC$  od jeho pokojovej plochy a počíta sa ako  $\Delta S_{ABC} = S_{ABC} - S_{ABC}^0$ . Posledný parameter v rovnici  $\mathbf{n}_{AT}$  je jednotkový vektor v smere spojnice bodov  $AT$ . Výsledná sila  $\mathbf{F}_{al}(A)$  je aplikovaná do bodu  $A$ .

### 1.3.4 Modul zachovania celkovej plochy s parametrom $k_{ag}$

Tento modul je globálny modul, teda jeho pôsobenie sa neobmedzuje na individuálne trojuholníky na povrchu bunky, ale na povrch ako celok. Jeho označenie pochádza z anglického názvu „global area“. Jeho fungovanie je symbolicky znázornené na Obr. 7.



Obr. 7: Symbolické znázornenie fungovania modulu zachovania celkovej plochy. Na tomto obrázku je trojrozmerná bunka reprezentovaná ako dvojrozmerný kruh, a jej dvojrozmerná plocha je reprezentovaná ako obvod kruhu. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora.

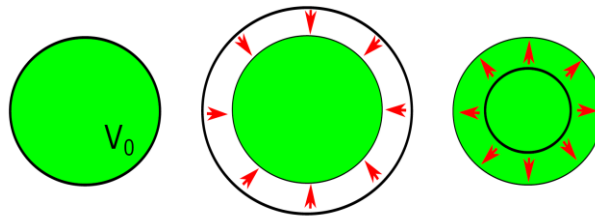
Modul zachovania globálnej plochy je implementovaný pomocou nasledujúceho vzťahu:

$$\mathbf{F}_{ag}(\mathbf{A}) = k_{ag} \frac{S-S_0}{S_0} S_{ABC} \frac{t_A}{t_A^2+t_B^2+t_C^2} \mathbf{n}_{AT}, \quad (8)$$

kde  $k_{ag}$  je koeficient zachovania globálnej plochy,  $S_0$  je veľkosť povrchu bunky v jej pokojovom stave, a  $S$  je jej aktuálny povrch. Ďalej  $S_{ABC}$  je aktuálny povrch trojuholníka  $ABC$ ,  $t_A = |AT|$ ,  $t_B = |BT|$  a  $t_C = |CT|$ . Nakoniec  $\mathbf{n}_{AT}$  je jednotkový vektor v smere spojnice bodov  $AT$ .

### 1.3.5 Modul zachovania objemu s parametrom $k_v$

Tento modul ovplyvňuje to, do akej miery sa zmenený objem bunky vracia do pokojového stavu. Jeho označenie je odvodené od anglického názvu „volume“. Jeho fungovanie je symbolicky znázornené na Obr. 8.



Obr. 8: Symbolické znázornenie zachovania celkového objemu bunky. Trojrozmerná bunka je tu znázornená ako dvojrozmerný kruh, a jej objem ako plocha tohto kruhu. Použitý obrázok pochádza z [13], s povolením autora.

Tento modul zachováva globálny objem bunky, takže podobne ako modul zachovania celkovej plochy, jeho pôsobenie nie je lokalizované a nezávisí len od lokálnej deformácie bunkového povrchu, ale od celkovej deformácie celej bunky. Jeho implementácia je zabezpečená nasledujúcim vzťahom:

$$\mathbf{F}_V(\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}) = -k_V \frac{V-V_0}{V_0} S_{ABC} \mathbf{n}_{ABC}, \quad (9)$$



kde  $k_v$  je koeficient zachovania objemu,  $V$  je aktuálny objem bunky,  $V_0$  je pokojový objem bunky,  $S_{ABC}$  je povrch trojuholníka  $ABC$ , a  $\mathbf{n}_{ABC}$  je jednotkový normálový vektor trojuholníka  $ABC$ . Výsledná sila  $\mathbf{F}_V(A,B,C)$  je potom rozdelená na tri rovnaké časti a každá je aplikovaná do jedného vrchola trojuholníka  $ABC$ .

## 1.4 Interakcie vnorených objektov

Okrem povrchových a objemových vlastností červenej krvinky vystupujú v modeli aj parametre, ktoré definujú interakcie medzi makroskopickými objektami vnorenými v tekutine. Jedná sa o tri typy interakcií.

### 1.4.1 Interakcia medzi bunkami a prekážkami

Táto interakcia je naimplementovaná pre kontakt medzi bunkami a stenami simulačného kanála, alebo medzi bunkami a inými pevnými prekážkami v kanáli. Je modelovaná pomocou nasledovného vzťahu:

$$\mathbf{F}(A, d) = ad^{-n} \cdot \mathbf{n}_{BA}, \quad d < d_{lim} \quad (10)$$

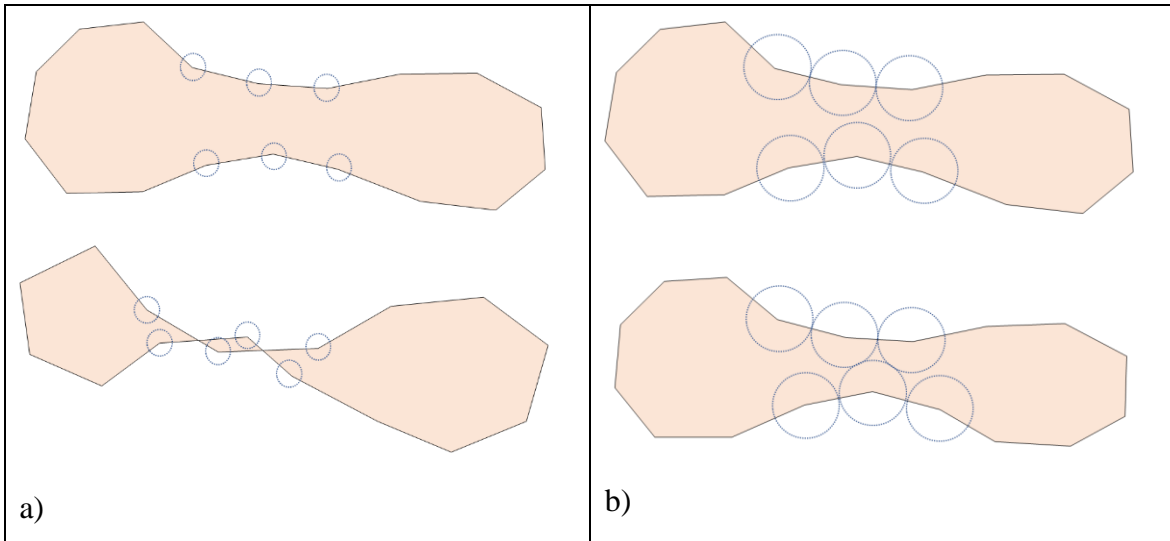
kde  $\mathbf{F}(A, d)$  je sila pôsobiaca na bod  $A$  na povrchu bunky, ďalej  $a$  je škálovací parameter, potom  $d$  je vzdialenosť bodu  $A$  na povrchu bunky od bodu  $B$  na prekážke, a  $\mathbf{n}_{AB}$  je jednotkový vektor v smere spojnice bodov  $B$  a  $A$ . Parameter  $n$  je tiež škálovací parameter, ktorý hovorí o tom, ako strmá bude táto odpudivá funkcia. Odpudivá sila pôsobí na body na povrchu bunky iba vtedy, ak je ich vzdialenosť ku prekážke menšia ako hraničná hodnota  $d_{lim}$ , ktorá vstupuje ako tretí parameter do nastavenia interakčných síl medzi vnoreným objektom a prekážkou. Tento typ interakcie sa po anglicky nazýva „soft sphere interaction“, v tejto práci ho budeme nazývať mäkká interakcia.

### 1.4.2 Interakcia povrchu bunky samého so sebou

Táto interakcia je dôležitá v prípade, keď sa bunka prehne a odlišné časti jej povrchu sa dostanú do kontaktu. V takomto prípade treba zamedziť tomu, aby sa bunka preliačila sama cez seba, a práve toto je zabezpečené prítomnosťou interakcie povrchu bunky so samým sebou. Táto interakcia je implementovaná rovnakým spôsobom ako interakcia medzi bunkami a prekážkami, čiže je to typ mäkkej interakcie.

Parameter  $d_{lim}$  tejto interakcie musí byť nastavený v závislosti od dĺžky hrán na povrchu bunky. Nesmie byť menší ako polovica hrany, v opačnom prípade by nebol funkčný a bunka by sa stále mohla preliačiť sama cez seba (Obr. 9). Toto je jeden z dôvodov, prečo by mali

mať simulované bunky čo možno najviac rovnomerne triangulovaný povrch, aby boli dĺžky hrán čo najpodobnejšie.



Obr. 9: Interakcia bunkového povrchu so sebou samým. a) Ak je parameter  $d_{lim}$  nastavený na menej ako polovicu dĺžky hrany na povrchu bunky, body sa nedostatočne od seba odtlačujú, a povrch bunky sa môže prekryť. b) Parameter  $d_{lim}$  je nastavený na polovicu dĺžky hrany na povrchu bunky, povrch bunky sa neprekrýva. Obrázok je pre prehľadnosť iba schématický.

Medzi implementáciou tejto interakcie a mäkkej interakcie, ako bola popísaná v odstavci 1.4.1, je jeden rozdiel. Týka sa toho, ako budú na seba reagovať tie body na povrchu bunky, ktoré sú priamo spojené elastickou väzbou. Tieto body by sa už navzájom nemali ovplyvňovať mäkkou interakciou. To preto, lebo ich vzájomná interakcia je už definovaná ňahovacím modulom, a prítomnosť ďalšej sily, ktorá má pôvod v interakcii bunkového povrchu samého so sebou, by menila elastické vlastnosti tejto hrany.

Preto je v implementácii využitá možnosť, kde každý bod na povrchu bunky interaguje iba s tými bodmi, ktoré nie sú jeho priamymi susedmi.

### 1.4.3 Vzájomná interakcia medzi vnorenými objektami

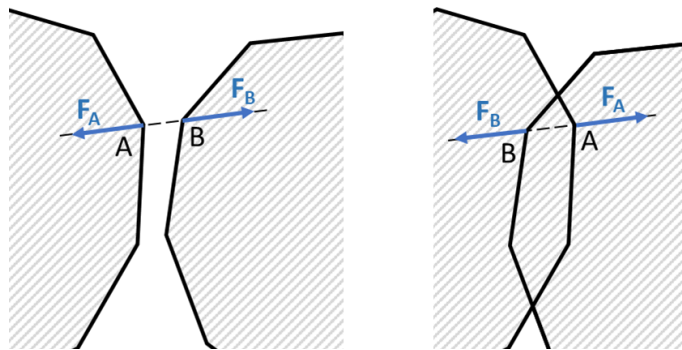
Táto interakcia slúži na to, aby sa mriežky dvoch krviniek pri zrážke neprekrýli, ale aby sa od seba odrazili. V modeli je táto interakcia implementovaná pomocou nasledujúceho vzťahu:

$$F(A, d) = a \frac{1}{1 + e^{nd}}, \quad d < d_{lim} \quad (11)$$

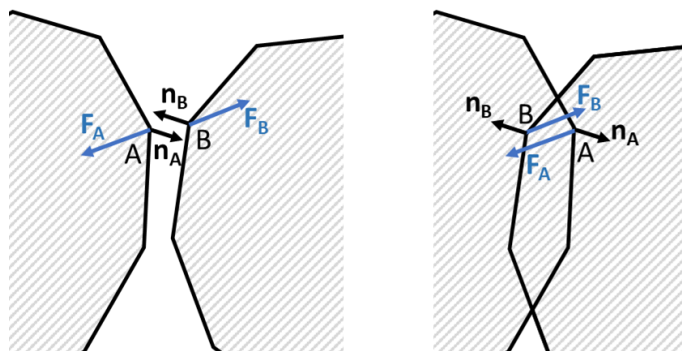
kde  $a$ ,  $n$  aj  $d_{lim}$  sú podobné škálovacie parametre ako vo vzťahu (10) pre interakciu medzi objektom a prekážkou, a  $e$  je Eulerove číslo. Smerovanie sily  $F(A, d)$  nezávisí len od polohy bodu B na susednej bunke, ale aj od toho, či sa bunky prekrývajú. Tento typ

interakcie sa po anglicky nazývajú „membrane collision“, v tejto práci ho budeme nazývať membránová interakcia.

Principiálny rozdiel medzi týmito dvoma implementáciami odpudivého potenciálu je v tom, ako na seba reagujú dva objekty, ktoré sa už prekrývajú. V prípade mäkkej interakcie sa dva body, ktoré sa ocitnú vo vnútri druhého objektu, naďalej odpudzujú. V niektorých prípadoch to môže znamenať, že objekty, ktoré sa prekrývajú, sa vďaka tejto „odpudivej“ sile ešte väčšmi prekrývajú. V prípade membránovej interakcie je odpudivá sila implementovaná tak, aby v každom prípade pôsobila na body na povrchu objektov tak, aby sa prekrývajúce sa membrány od seba globálne odpuzovali. A to aj za cenu lokálneho priblíženia niektorých bodov na ich povrchu. Grafické vysvetlenie je znázornené na Obr. 10 a Obr. 11.



Obr. 10: Odpudivý potenciál v prípade mäkkej interakcie. Vľavo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa dostanú k sebe na vzdialenosť menej ako  $d_{lim}$ . Vpravo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa prekrývajú.



Obr. 11: Odpudivý potenciál v prípade membránovej interakcie. Vľavo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa dostanú k sebe na vzdialenosť menej ako  $d_{lim}$ . Vpravo je pôsobenie síl v prípade, že objekty sa prekrývajú.



## 2 Rotácie buniek v biologickom experimente a v numerickej simulácii

V tejto kapitole budeme hovoriť o spôsobe porovnania numerickej simulácie a biologického experimentu, ktoré je založené na rotácii červených krviniek. Takéto porovnanie je jednou z možností, ako urobiť validáciu modelu a skontrolovať, či sa nasimulované bunky správajú podobne ako reálne bunky. Rotácia buniek môže byť využitá aj ako parameter pri porovnávaní mnohobunkových simulácií [16], [17] alebo [18].

Rotácia bunky je charakteristika, ktorá vypovedá o niekoľkých vlastnostiach simulácie. To, ako veľmi bunky v simulácii rotujú, je ovplyvnené jednak poľom prekážok v simulačnom boxe, potom rýchlosťou kvapaliny ktorá unáša bunky, a nakoniec aj hematokritom, teda počtom buniek v simulácii. Ak sa hociktorý z týchto parametrov zmení, ovplyvní to aj celkovú rotáciu buniek v experimente. Preto má zmysel zamerať sa na rotáciu buniek, skúmaním tohto parametra môžeme porovnávať jednotlivé simulácie medzi sebou.

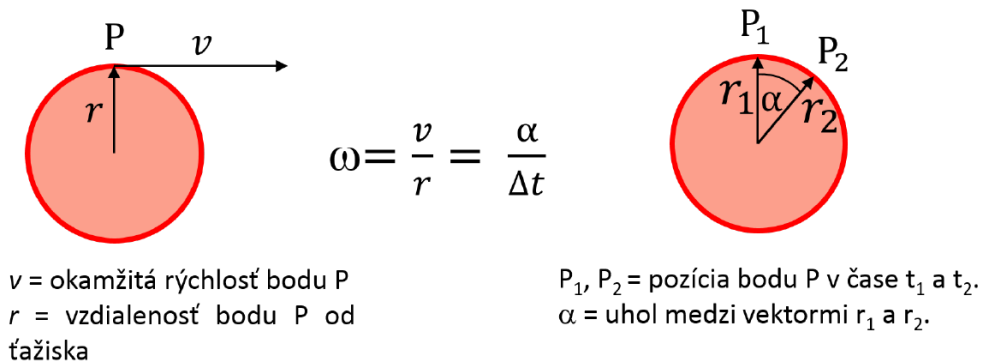
Rotácia sama o sebe je trojrozmerný jav. Pri skúmaní simulačných výsledkov ju aj dokážeme spracovať ako trojrozmerný jav, lebo o bunkách máme podrobné informácie. Vyhodnocovanie rotácie v simulácii nie je komplikované, keď vezmeme do úvahy, že máme informácie o každom bode na povrchu každej bunky. Takéto informácie ale nemáme k dispozícii z biologického experimentu. Preto, ak chceme metódu použiť na porovnanie biologického a simulačného experimentu, musíme ju navrhnuť tak, aby rotáciu buniek vyhodnocovala dostatočne presne, a aby bola použiteľná rovnakým alebo podobným spôsobom pri spracovaní výsledkov z biologického experimentu aj z numerickej simulácie.

Výsledky z biologického experimentu sú väčšinou dostupné vo forme obrázkov alebo videa. Z týchto výstupov sa dá iba ťažko získať informácia o trojrozmernom pohybe bunky. Preto koncept rotácie pre naše účely zjednodušíme, a rotáciu bunky budeme vyhodnocovať ako dvojrozmernú charakteristiku.

### 2.1 Fyzikálny koncept rotácie

Rotácia buniek je charakteristika, ktorú určujeme pomocou uhlovej rýchlosti. Tá sa dá vypočítať dvoma spôsobmi. Jeden z nich berie do úvahy okamžitú rýchlosť určitého bodu a jeho vzdialenosť od ťažiska bunky. Ďalší spôsob berie do úvahy polohu sledovaného bodu

v dvoch rôznych okamihoch – uhol medzi dvoma vektormi je vydelený časom, ktorý oddeľuje tieto dva časové okamihy (Obr. 12)

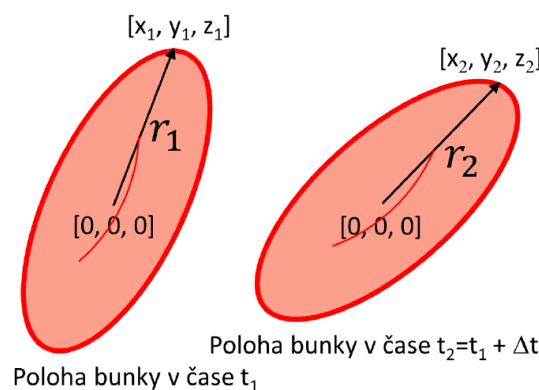


Obr. 12: Dva možné spôsoby výpočtu uhlovej rýchlosti.

## 2.2 Spôsoby merania rotácie v numerických modeloch

### 2.2.1 Presný výpočet rotácie zo simulačných dát

Napriek tomu, že simulačné dáta máme k dispozícii v troch rozmeroch, brali sme do úvahy iba dvojrozmerné dáta. To preto, lebo videozáznamy máme k dispozícii dvojrozmerné. Rovnaký prístup teda volíme pri výpočte uhlovej rýchlosti zo simulácie, aby sme potom mohli urobiť ich porovnanie. Uhlovú rýchlosť počítame tak, že sledujeme pozíciu jedného bodu v dvoch časových okamihoch. Každých 200 krokov definujeme, ktorý bod na povrchu bunky má extrémnu Y-ovú súradnicu. Po 100 nasledujúcich krokoch simulácie zaregistrujeme novú polohu tohto bodu. Každá z týchto dvoch polôh je charakterizovaná vektorom s dvoma súradnicami (po zanedbaní Z-ovej súradnice):  $r_1[x_1, y_1]$  a  $r_2[x_2, y_2]$  vzhľadom na ťažisko bunky. Ťažisko je v oboch prípadoch považované za bod so súradnicami  $[0, 0]$  – tak môžeme vyhodnotiť, ako sa bunka otáča okolo svojho stredu (Obr. 13).



Obr. 13: Sledovanie polohy bodu v bunke.

Na zistenie uhla  $\alpha$  medzi týmito dvoma vektormi sa dá použiť napríklad ich skalárny súčin:

$$\cos(\alpha) = \frac{x_1 \cdot x_2 + y_1 \cdot y_2}{r_1 \cdot r_2} \quad (12)$$

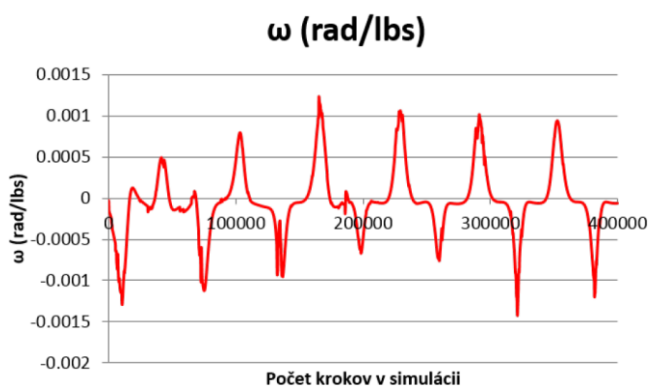
Takto získaný uhol bude kladný. Ak chceme do výpočtu zahrnúť aj orientáciu rotácie, treba zobrať do úvahy aj to, ktorý z vektorov  $r_1$  a  $r_2$  zodpovedá časovému okamihu  $t_1$  a  $t_2$ , teda ktorý z nich bol „skôr“. Na toto použijeme vektorový súčin. Ten je závislý od poradia vektorov, a zmena poradia vektorov sa prejavuje práve zmenou znamienka vo výsledku vektorového súčinu. Takže orientáciu uhlovej rýchlosti môžeme vypočítať nasledovne:

$$\text{sign}(\omega) = \text{sign}(x_1 \cdot y_2 - x_2 \cdot y_1) \quad (13)$$

Nakoniec je uhlová rýchlosť  $\omega$  v okamihu  $t_1$  vypočítaná nasledovne:

$$\omega = \frac{\alpha}{\Delta t} \cdot \text{sign}(\omega) \quad (14)$$

Pre jednu z buniek v skúmanej simulácii sme vypočítali takýmto spôsobom priebeh jej rotácie, ako môžeme vidieť na Obr. 14. Takéto hodnoty budeme v ďalšom prístupe považovať za skutočnú rotáciu, teda referenčnú, ktorú budeme porovnávať s výsledkami iných prístupov.

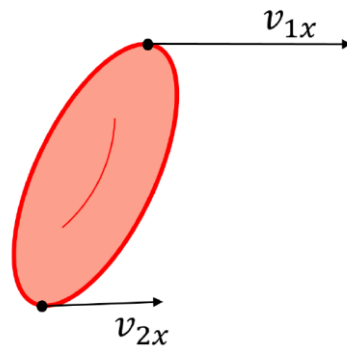


Obr. 14: Príklad vypočítanej uhlovej rýchlosti pre jednu z buniek.

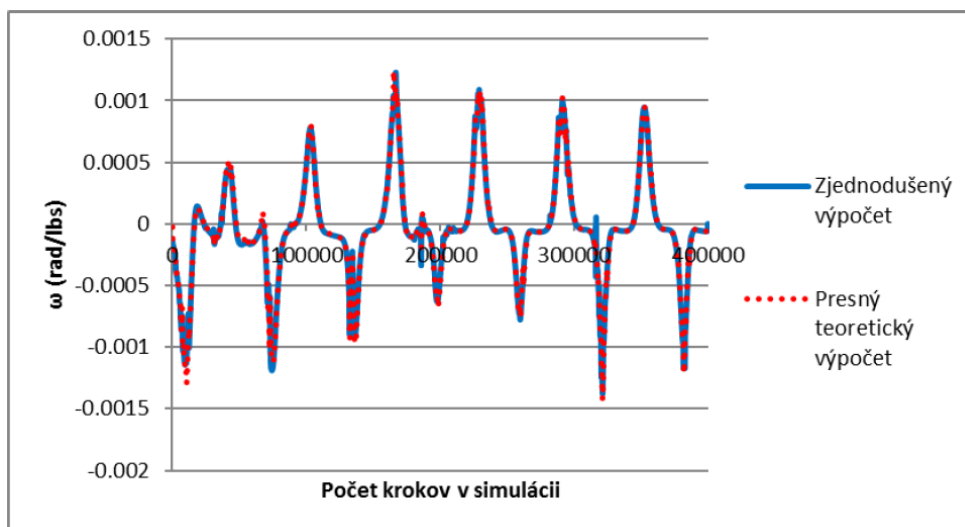
### 2.2.2 Zjednodušený výpočet rotácie zo simulačných dát

Zjednodušený výpočet rotácie bunky spočíva v tom, že zoberieme do úvahy len X-ovú zložku vektora rýchlosti dvoch špecifických bodov na bunke. Tieto dva špecifické body sú extrémne body bunky v Y-ovom smere (Obr. 15). Ak sa bunka neotáča, iba sa posúva v smere toku, rozdiel X-ových zložiek rýchlosti bodov s Y-ovou extrémnou súradnicou bude

nulový. Čím väčšia je uhlová rýchlosť bunky, tým väčší bude tento rozdiel. Preto sme otestovali, či takýto jednoduchý prístup, ktorý berie do úvahy len zložky rýchlosti v extrémnych bodoch bunky, bude dávať podobné výsledky, ako presný výpočet (Obr. 16). Podobnosť medzi výsledkami dosiahnutými presnou a približnou metódou je prekvapujúca, nielen po prvom pohľade na podobnosť grafov, ale aj po detailnejšom prešetrení oboch grafov pomocou diskrétnej Fourierovej transformácie (DFT) [12].



Obr. 15: Uhlová rýchlosť bunky je v zjednodušenom postupe počítaná ako rozdiel X-ovej zložky rýchlosti nameranej v bodoch s extrémnou Y-ovou súradnicou.



Obr. 16: Porovnanie presného a zjednodušeného postupu na počítanie uhlovej rýchlosti.

## 2.3 Vyhodnocovanie rotácie z videa urobeného zo simulácie

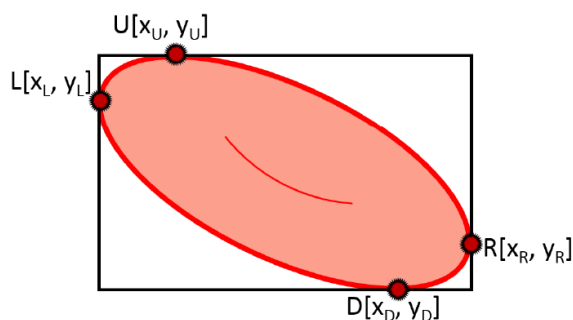
### 2.3.1 Princíp vyhodnocovania

Aby sme mohli porovnať presnosť výpočtu zo simulačných dát a z videa, potrebujeme tieto dva prístupy aplikovať na pohyb tej istej bunky, a na záver porovnať, či sme pomocou videových dát získali ten istý graf ako pomocou dát zo simulácie. Z toho dôvodu teraz nebudeme pracovať s dátami z reálneho videa z biologického experimentu, ale z videa, ktoré

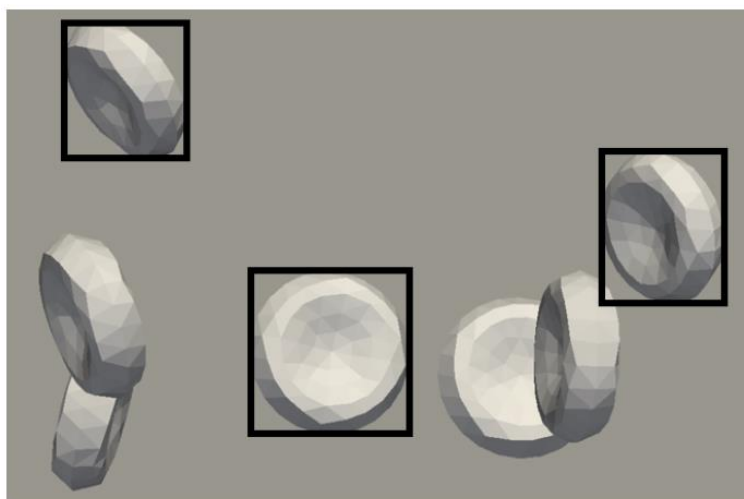


sme urobili počas simulácie. Inak by sme len veľmi ťažko hľadali dve bunky, ktoré sa v numerickej simulácii a v biologickom experimente pohybujú úplne identicky.

Z videa máme pre každú bunku k dispozícii iba informácie o polohe jej štyroch extrémálnych bodov. Na Obr. 17 je znázornené, akým spôsobom sú tieto extrémálne body definované. Obr. 18 ukazuje princíp, ako sú tieto body identifikované na videu zo simulácie.

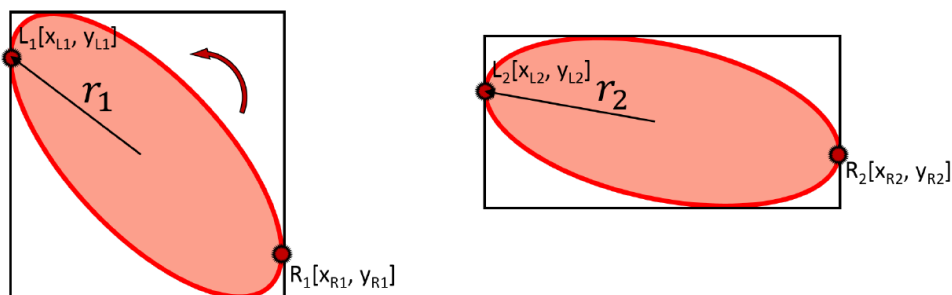


Obr. 17: Extrémálne body na bunke.



Obr. 18: Princíp definovania extrémálnych bodov na bunke vo videu.

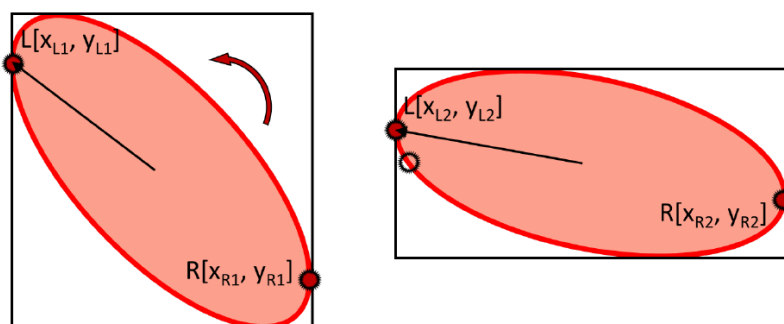
Pomocou týchto štyroch bodov vieme určiť polohu ťažiska ako ich priemer. Následne vieme určiť napríklad polohu extrémálneho bodu v X-ovom smere,  $L$ , vzhľadom na ťažisko. V dvoch za sebou idúcich snímkach tak máme dva vektory, pomocou ktorých vieme určiť uhol, ktorý zvierajú (Obr. 19). Potom uhlovú rýchlosť vypočítame podobne, ako sme to robili s presnými dátami zo simulácie. Pri takomto postupe však treba brať do úvahy aj nepresnosti, ktoré pri ňom vznikajú.



Obr. 19: Vektory  $r_1$  a  $r_2$ , ktoré sú použité na výpočet uhlovej rýchlosti.

### 2.3.2 Chyba presnosti polohy sledovaného bodu

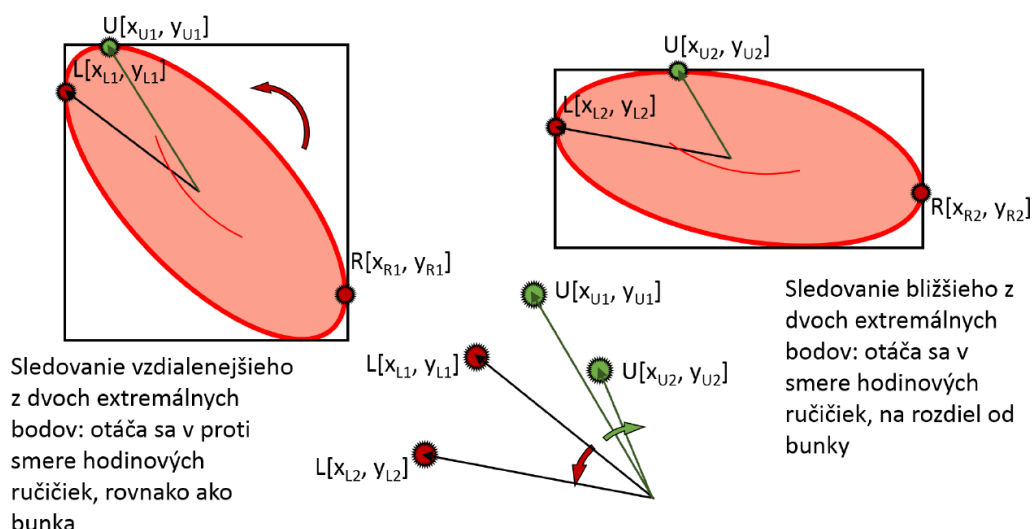
Keď sa bunka otočí, zmení sa aj relatívna poloha extrémálneho bodu vzhľadom na ťažisko. To znamená, že na výpočet uhlovej rýchlosti nie sú použité dva vektory, ktoré sledujú polohu toho istého bodu. Namiesto toho tieto dva vektory sledujú polohy dvoch blízkych bodov (Obr. 20). Riešenie tohto problému spočíva v tom, že vektory  $r_1$  a  $r_2$  musia byť zaznamenané vo veľmi krátkom časovom odstupe. Tak budú body  $L_1$  a  $L_2$  veľmi blízko seba, takže chyba spôsobená týmto prístupom bude zanedbateľná.



Obr. 20: Nepresnosť určenia vektora  $r_2$ , pri zmene relatívnej polohy sledovaného bodu L.

### 2.3.3 Chyba odhadu rotácie

Ďalšia chyba pri vyhodnocovaní rotácie bunky môže vzniknúť tým, že hoci bunka sa otáča napríklad doľava, nevhodne zvolený sledovaný bod sa môže dočasne otáčať opačným smerom vzhľadom na ťažisko (viď Obr. 21). Tento problém nastáva vtedy, ak na výpočet použijeme body, ktoré sú príliš blízko ťažiska. Riešením je teda používanie tej dvojice bodov, ktorá je od seba vzdialenejšia, a tým pádom aj vzdialenosť týchto bodov od ťažiska je väčšia.



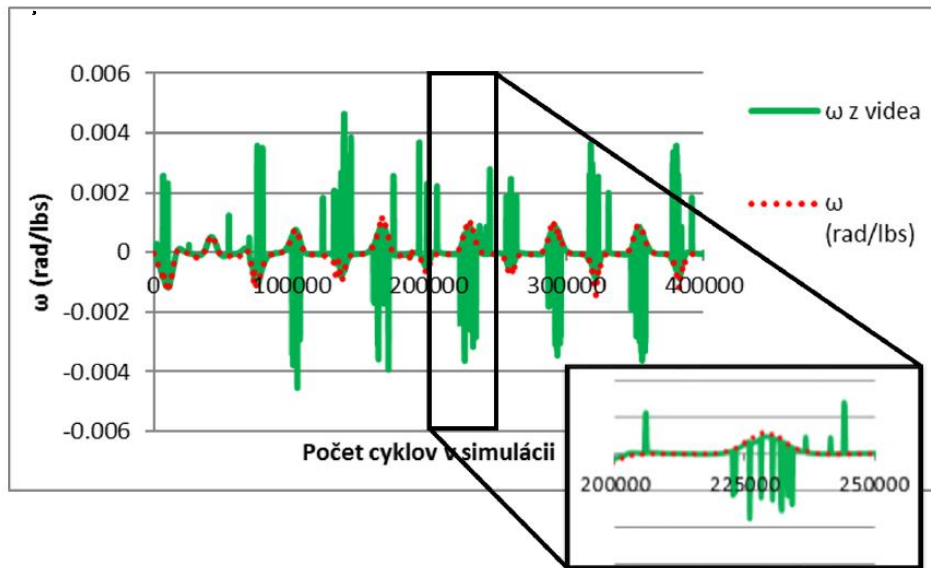
Obr. 21: Chyba odhadu smeru rotácie pri použití nesprávnej dvojice vektorov.

### 2.3.4 Ďalšie spracovanie grafických výsledkov

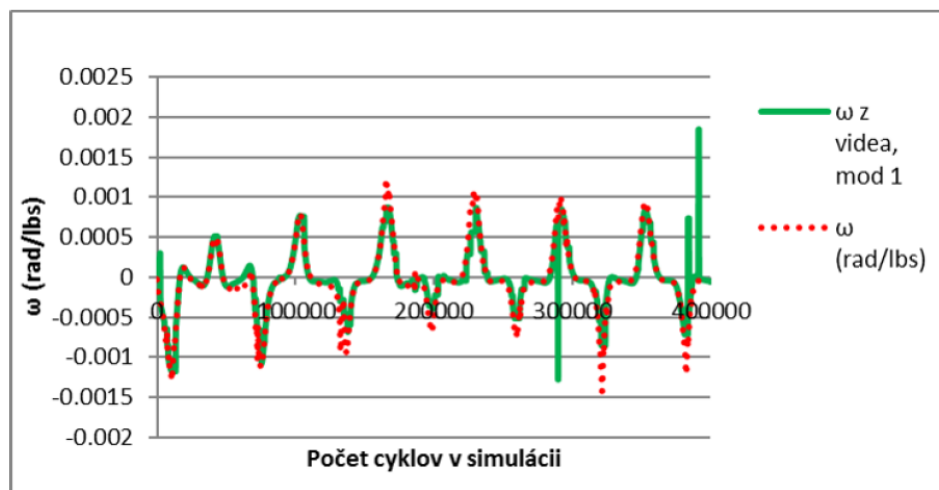
Na výpočet uhlovej rýchlosti boli použité tie isté vzťahy, ako aj pre výpočet v prípade presnejších simulačných dát (12), (13) a (14). Získaný graf je na Obr. 22. Na tom istom grafe je pre porovnanie aj presný priebeh uhlovej rýchlosti vypočítaný zo simulačných dát.

Z tohto porovnania vidno, že graf získaný z videa je zašumený niekoľkými píkami. Tie sú pravdepodobne spôsobené tým, že pri rotácii zanedbávame tretí rozmer, kam sa bunka môže otáčať. Ten spôsob výpočtu, ktorý sme použili pri presných dátach zo simulácie, na to nie je citlivý. Avšak prístup, kde počítame uhlovú rýchlosť zo štyroch extrémnych bodov, pri každom výraznejšom pootočení v treťom rozmere zaznamená pík. Takto vzniknuté píky sa dajú odstrániť napríklad sledovaním zmeny veľkosti polomeru  $r_1$  a  $r_2$ . Ak ich relatívna zmena prekročí 0,1 percenta, vypočítanú hodnotu uhlovej rýchlosti nezoberieme do úvahy, ale ju nahradíme hodnotou z predchádzajúceho kroku. Takýmto spôsobom sa dajú píky redukovať, a uhlová rýchlosť, ktorú dostaneme, je hladšia (Obr. 23).

## 2 Rotácie buniek v biologickom experimente a v numerickej simulácii

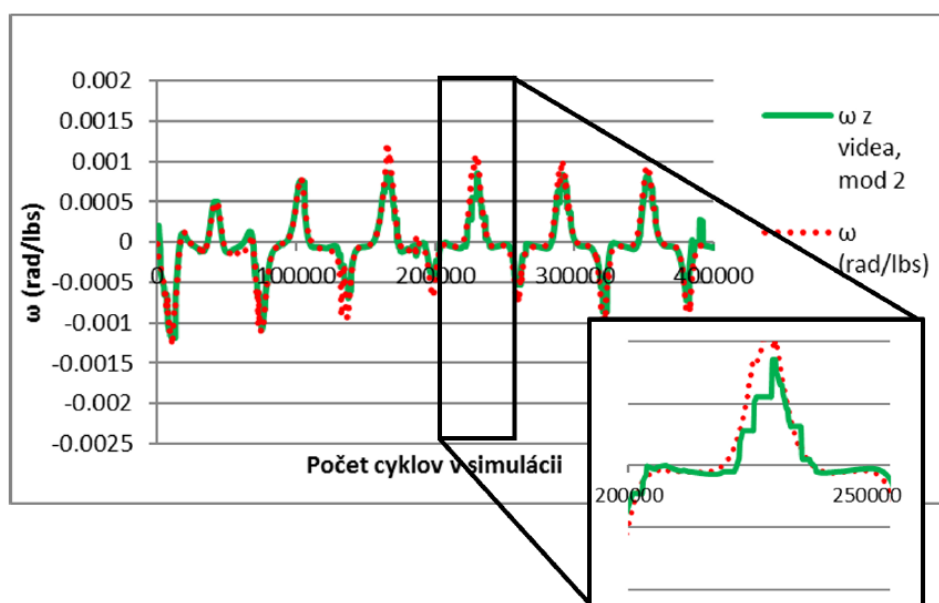


Obr. 22: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti pre dáta získané zo simulácie, a pre dáta získané zo simulačného videa. Na obrázku je vidieť, že zašumenie signálu je spôsobené len ojedinelými píkami.



Obr. 23: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti pre dáta získané zo simulácie, a pre fyzikálne vyhladené dáta získané zo simulačného videa.

Aj zostávajúce píky sa dajú odstrániť, použitím numerického vyhladzovania, ktoré nesúvisí s charakterom dát (teda vyhladzovacia podmienka nemá fyzikálny význam, ako v predošlom kroku). Avšak čím viac píkov sa odstráni, tým viac klesá všeobecná kvalita signálu, ako je vidieť na Obr. 24.



Obr. 24: Porovnanie priebehu uhlovej rýchlosti pre dáta získané zo simulácie a pre numericke vyhladené dáta získané zo simulačného videa.

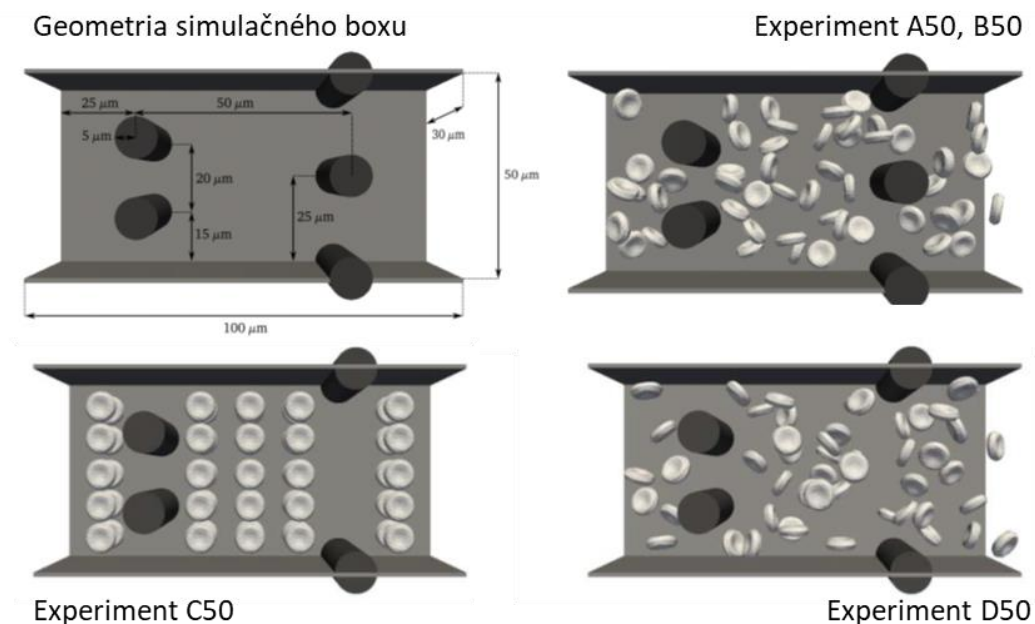
Ukazuje sa však, že aj keď je kvalita signálu zhoršená vyhladzovacími metódami, stále je jeho priebeh dostatočne reprezentatívny. Napríklad aplikácia DFT na graf na Obr. 23 a Obr. 24 generuje veľmi podobné frekvenčné spektrá [12].

## 2.4 Skúmanie rotácie buniek v periodických poliach prekážok

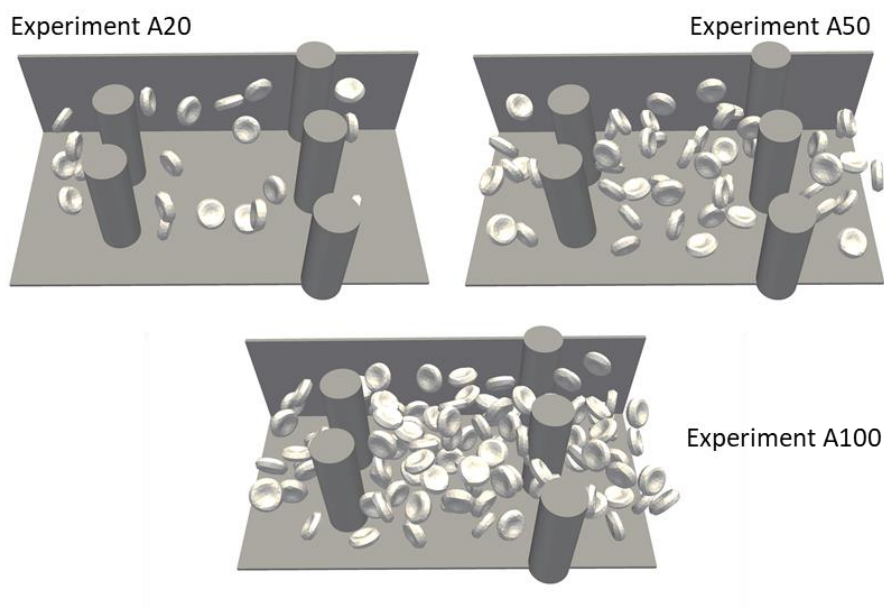
### 2.4.1 Popis nastavenia numerickeho experimentu

Experimenty, ktorý boli použité na skúmanie rotácie červených krviniek, sú detailne popísané v [16] a [19]. Na porovnanie rotácie tu bolo spolu použitých šesť rôznych simulácií v dvoch rôznych geometriách simulačného kanála, ktoré môžeme vidieť na Obr. 25 a Obr. 26. V experimentoch A50, B50 a D50 boli počiatočné polohy buniek náhodné, v experimente C50 boli bunky na začiatku simulácie pravidelne usporiadané. V experimente D50 bola pozmenená geometria simulačného boxu, jedna z prekážok v kanáli bola odstránená. V týchto experimentoch bolo simulovaných 50 buniek. Technické detaily nastavenia simulačných parametrov sú uvedené v článku [16].

V experimentoch A20 a A100 bola použitá rovnaká geometria simulačného boxu ako v simulácii A50 a B50, avšak počet buniek v simulácii bol odlišný. V simulácii A20 bolo v simulačnom kanáli len 20 buniek, v simulácii A100 bolo použitých 100 buniek.



Obr. 25: Simulačné boxy s počiatočnými polohami buniek použité na skúmanie rotácie krviniek v simuláciách s 50 krvinkami.

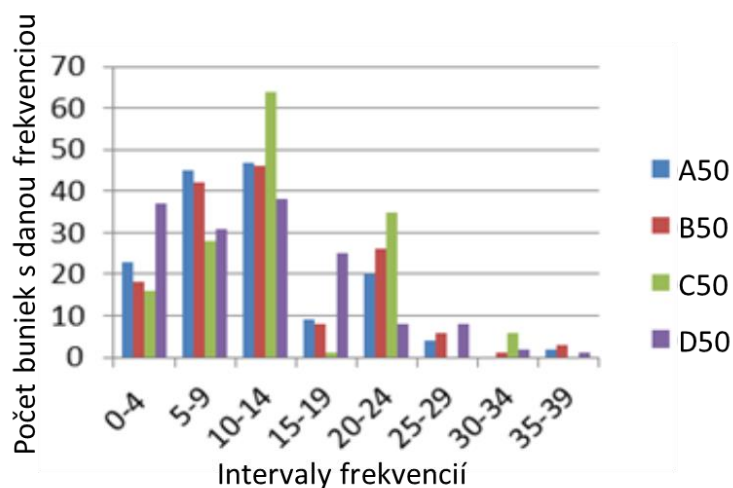


Obr. 26 Simulačné boxy s počiatočnými polohami buniek použité na skúmanie rotácie krviniek v simuláciách s 20, 50 a 100 krvinkami.

#### 2.4.2 Výpočet rotácie krviniek v simulácii a porovnanie rotácie buniek

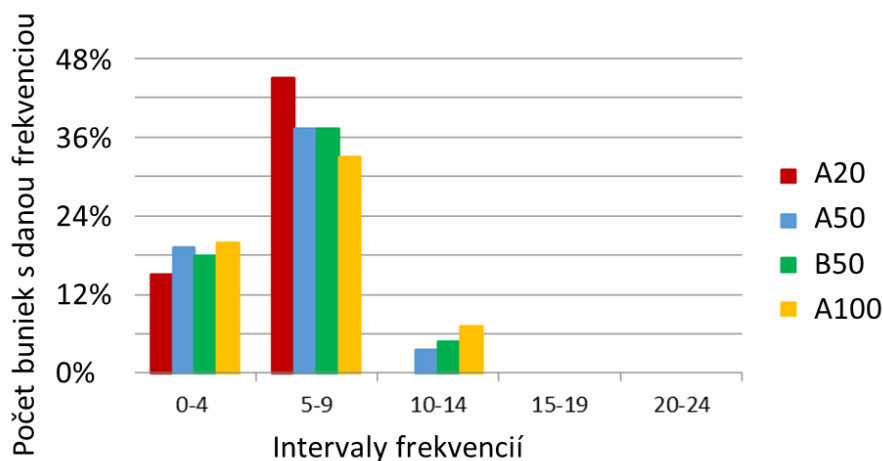
Na výpočet rotácie sme v tomto prípade použili zjednodušený vzťah reprezentovaný na Obr. 15. Graf uhlovej rýchlosti v závislosti od polohy bunky sme následne podrobili diskretnej Fourierovej transformácii. Túto frekvenčnú analýzu sme ďalej spracovali dvoma spôsobmi.

V prvom spôsobe sme pre každú z 50-tich krviniek vzali jej tri najvýznamnejšie frekvencie. Takto sme pre každú simuláciu získali súbor 150-tich frekvencií. Tieto frekvencie sme potom zoradili od najmenej po najväčšiu, a porovnali sme priebeh týchto čísel pre štyri rôzne simulácie. Porovnanie je zobrazené na Obr. 27. Ide tu o porovnanie štyroch rôznych experimentov s 50 bunkami.



Obr. 27: Porovnanie frekvencií rotácií buniek v experimentoch A50, B50, C50 a D50. X-ová os: Hodnoty dominantných frekvencií odčítaných z rotácie krviniek, zoradené od najmenej po najväčšiu. Y-ová os: počet buniek s danou frekvenciou rotácie. Hodnoty pre experimenty A50 a B50 sa na seba výrazne podobajú, hodnoty zodpovedajúce experimentom C50 a D50 sú odlišné.

Druhý spôsob spracovania je veľmi podobný, ale pre každú bunku sme zobrali do úvahy len jednu najvýraznejšiu frekvenciu charakteristickú pre jej rotáciu. Tieto frekvencie sme potom zoradili od najmenej po najväčšiu, avšak pre simulácie s rôznym počtom krviniek sú hodnoty na Y-ovej osi prepočítané na percentuálne zastúpenie, keďže absolútne hodnoty závisia od počtu krviniek v experimente. Výsledky takéhoto porovnania najvýraznejších frekvencií môžeme vidieť na Obr. 28.



Obr. 28: Porovnanie frekvencií rotácií buniek v experimentoch A20, A50, B50 a A100.

Na obrázkoch Obr. 27 a Obr. 28 je vidieť, že simulácie s rovnakou geometriou simulačného boxu a s rovnakým počtom buniek s náhodnou počiatočnou polohou sú si podobné z hľadiska rotácie červených krviniek. Zmena počtu krviniek, zmena geometrie simulačného boxu ako aj principiálna zmena ich počiatočnej polohy majú vplyv na priebeh rotácie krviniek v simulácii, a tieto zmeny sú viditeľné vo výslednom spracovaní rotácie červených krviniek.

### 2.5 Zhrnutie

V tejto kapitole sme navrhli metódu, pomocou ktorej by sme mohli porovnávať rotáciu bunky v biologickom a v numerickom experimente. Metóda vyžaduje relatívne presné spracovanie videozáznamu, identifikáciu buniek a jej okrajov. Napriek prípadným nedokonalostiam sa však ukazuje, že metodické nepresnosti, ktoré spôsobujú nefyzikálne píky v grafoch uhlovej rýchlosti, sa dajú odfiltrovať buď pomocou detailnejšieho preverenia výsledkov alebo pomocou Fourierovej transformácie. Dobrá vlastnosť rotácie buniek v mnohobunkovom experimente je prekvapivá spoľahlivosť, s akou vieme pomocou tejto charakteristiky určiť tvar kanála. Pre simulačný box s rôznymi náhodnými počiatočnými polohami buniek dostávame porovnateľné priebehy rotácie buniek, a pre rôzne simulčné boxy s rôznymi geometriami sa rotácie buniek odlišujú, aj keď boli simulácie spočítané s identickými počiatočnými polohami buniek.



### 3 Príprava a testovanie numerickej simulácie

V tejto kapitole budeme písať o tom, ktoré informácie si treba pri príprave a testovaní numerickej simulácie overiť, aby sme predišli neprirodzenému správaniu buniek v simulácii. Na začiatok uvedieme zoznam parametrov, ktorým sa treba venovať pri nastavovaní simulácie:

- Geometria simulačného boxu
- Diskretizácia tekutiny
- Rýchlosť prúdenia tekutiny
  - Súvisí s tlakom tekutiny udržiavaný v zariadení
  - Môže byť nahradená rýchlosťou častíc plávajúcich v tekutine
    - buď buniek, alebo ešte lepšie drobných nečistôt
  - Dá sa vypočítať z informácií o šmykovom toku v zariadení
- Viskozita tekutiny
  - Poznáme kinematickú a dynamickú viskozitu
  - Viskozita je ovplyvňovaná teplotou
- Jednotlivé bunky
  - Veľkosť buniek
  - Interakčné koeficienty
  - Diskretizácia povrchu bunky
  - Externé sily pôsobiace na bunky
- Hematokrit
- Paralelizácia

Overovanie toho, či sa simulované objekty správajú tak, ako by sme chceli, by malo byť uskutočnené v niekoľkých krokoch. V každom kroku treba overovať naraz iba jednu vec. Ak chceme v jednom kroku overovať viac nastaviteľných vlastností, je to možné iba vtedy, ak sa tieto vlastnosti navzájom neovplyvňujú, čo sa však stáva málokedy.

Postup, ktorý tu uvádzame, je aplikovateľný vtedy, ak je našim cieľom nastaviť numerickejšiu simuláciu na existujúci biologický experiment. Na konci uvedieme, čo treba zmeniť v prípade, ak spúšťame numerickejšiu simuláciu, ktorá nie je inšpirovaná existujúcim biologickým experimentom, ale slúži na jeho návrh.

#### 3.1 Nastavovanie simulačného kanála a tekutiny

Prvý krok je zoznámenie sa s geometriou skúmaného mikrofluidického zariadenia. Najdôležitejšie sú tie časti zariadenia, v ktorých sa bunky najviac deformujú, napríklad úzke kanáliky, cez ktoré bunky prechádzajú, alebo nerovnomerné prekážky so špecifickým tvarom. Pred vyrobením definitívnej geometrie treba vyrobiť menší kalibračný kanál, ktorý bude slúžiť na nastavenie rôznych parametrov buniek (napríklad medzibunkových interakcií). Tento testovací kanál by mal obsahovať také časti mikrofluidického zariadenia, kde bunky výrazne alebo rýchlo menia svoj tvar alebo rýchlosť. Ide napríklad o úzke štrbiny, kde sa bunka pri prechode výrazne deformuje, alebo časti zariadenia, kde sa prudko mení prierez kanála.

Geometria simulačného kanála ovplyvňuje aj diskretizáciu tekutiny, teda parameter s názvom `lb-grid`. Platí zásada, že v najužšom priestore by mala byť tekutina diskretizovaná aspoň desiatimi bodmi.

Druhý krok je nastavenie rýchlosti a viskozity tekutiny, ktorá prúdi v mikrofluidickom zariadení. Viskozita tekutiny je ovplyvnená jej chemickým zložením aj jej teplotou. V simuláciách zadávame kinematickú viskozitu. Ak máme informácie o dynamickej viskozite a o hustote kvapaliny, môžeme vypočítať kinematickú viskozitu ako podiel dynamickej viskozity a hustoty tekutiny. Ak v článku nie je údaj o teplote, v takom prípade sa dá predpokladať, že experimenty boli realizované pri izbovej teplote.

Rýchlosť tekutiny môže byť zadaná vo forme objemového prietoku cez mikrofluidické zariadenie. V takom prípade vieme v simulácii nastaviť priamo želaný objemový prietok, alebo ho vieme nastaviť pomocou parametra `external_force_density` na dve iterácie. Dve iterácie stačia preto, lebo vzťah medzi týmto parametrom a objemovým prietokom je pre danú geometriu lineárny.

Ďalší spôsob získania informácií o rýchlosti tekutiny sú videozáznamy – ak sú v tekutine drobné nečistoty, ktorých rozmer je aspoň o rád menší ako rozmer prekážok a buniek, môžeme rýchlosť týchto nečistôt asociovať s rýchlosťou tekutiny, a túto rýchlosť vieme opäť nastaviť na niekoľko iterácií pomocou parametra `external_force_density`. Ak vo videozázname nie sú drobné nečistoty, ale iba plávajúce bunky, môžeme tiež nastaviť rýchlosť tekutiny, avšak tento raz už nemôžeme povedať, že rýchlosť tekutiny je rovnaká ako rýchlosť buniek v tekutine. Môžeme si dovoliť urobiť túto aproximáciu na začiatku, pri púšťaní nastavovacích simulácií. Pri definitívnej

simulácii ale treba nastaviť rýchlosť tekutiny trochu väčšiu, aby bola rýchlosť bunky, ktorá je v nej unášaná, rovnaká ako rýchlosť bunky vo videozázname z experimentu.

Rýchlosť tekutiny v mikrofluidickom kanáli sa dá zistiť aj za pomoci informácie o šmykovom toku (shear flow) v skúmanom kanáli. Vzťah medzi rýchlosťou tekutiny a rýchlosťou šmyku v tekutine je nasledovný [20]:

$$\sigma = \frac{v}{D_h} \quad (15)$$

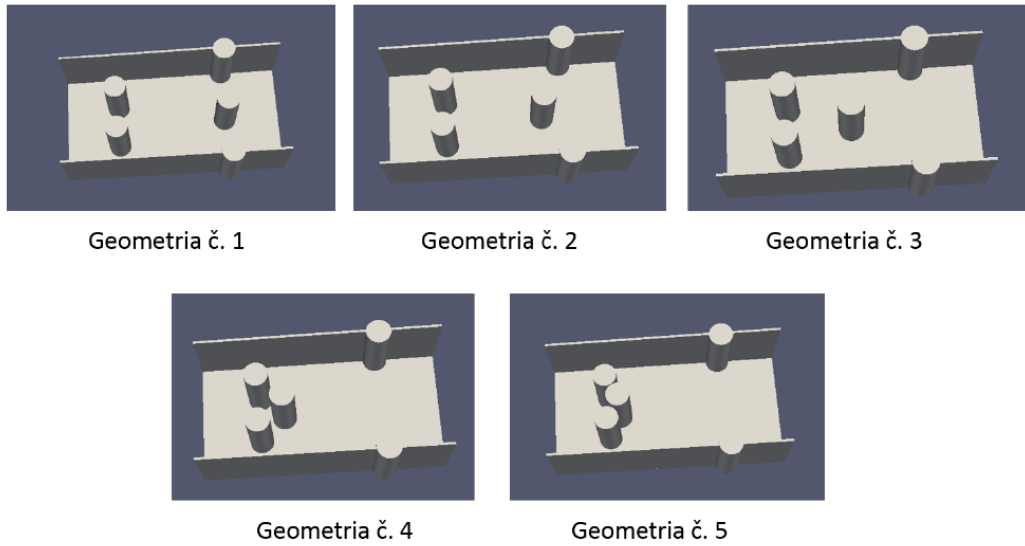
$$D_h = \frac{2wh}{w+h} \quad (16)$$

Kde  $D_h$  je hydraulický priemer,  $w$  a  $h$  je šírka a výška prierezu kanála,  $\sigma$  je rýchlosť šmyku v danom priereze kanála, a  $v$  je veľkosť priemernej rýchlosti v tomto priereze.

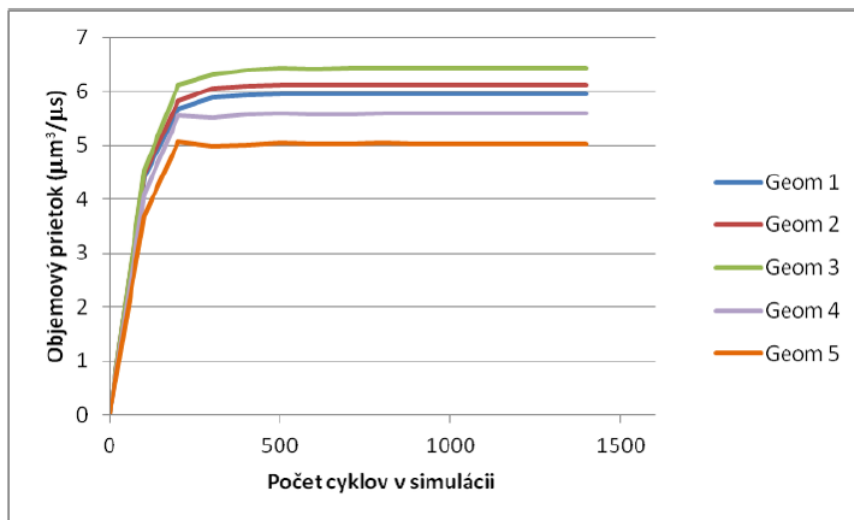
Niekedy je v záznamoch z experimentu uvedená hodnota tlaku, pomocou ktorej je v zariadení udržiavaný konštantný prietok. Bohužiaľ táto informácia nie je dostatočná na určenie rýchlosti tekutiny v simulácii. Väčšinou totiž ide o rozdiel tlakov meraný medzi vstupom a výstupom z mikrofluidického kanála. Avšak ak nepoznáme detailnú geometriu toho, ako kanál vyzerá na vstupe a na výstupe, nevieme dobre určiť, aký je tlakový rozdiel medzi začiatkom a koncom „efektívnej“ časti kanála. Tu máme na mysli tú časť, kde sa s bunkami dejú zaujímavé veci, ktoré sa v experimente sledovali – a teda tú časť kanála, ktorá je dôležitá pre nás z numerického hľadiska. Keby sme aj mali takýto detailný popis celej geometrie medzi vstupom a výstupom z mikrofluidického kanála, stále by nebolo triviálne určiť z týchto informácií rýchlosť tekutiny v zariadení. Vzťah medzi tlakom a rýchlosťou tekutiny totiž nelineárne závisí od geometrie kanála, nie len od objemu, ktorým tekutina preteká.

Na lepšie pochopenie tohto javu ukážeme priebeh simulácie v niekoľkých podobných simulačných kanáloch, ktoré majú mierne odlišnú geometriu. Tlak v týchto simuláciách bol udržiavaný na konštantnej úrovni pomocou numerického parametra `external_force_density`, ktorý súvisí s rozdielom tlakov na začiatku a na konci kanála. Skúmané geometrie kanála sú uvedené na Obr. 29, a líšia sa len x-ovou súradnicou polohy stredného stĺpika. Výsledný objemový prietok je znázornený na Obr. 30 a Obr. 31. Z grafu vidieť, že čím je kanál „zapchatejší“ prekážkami, tým je objemový prietok menší, a to všetko pri konštantnom rozdiel tlakov na vstupe a na výstupe z kanála, a pri konštantnom objeme kanála, ktorým tekutina preteká.

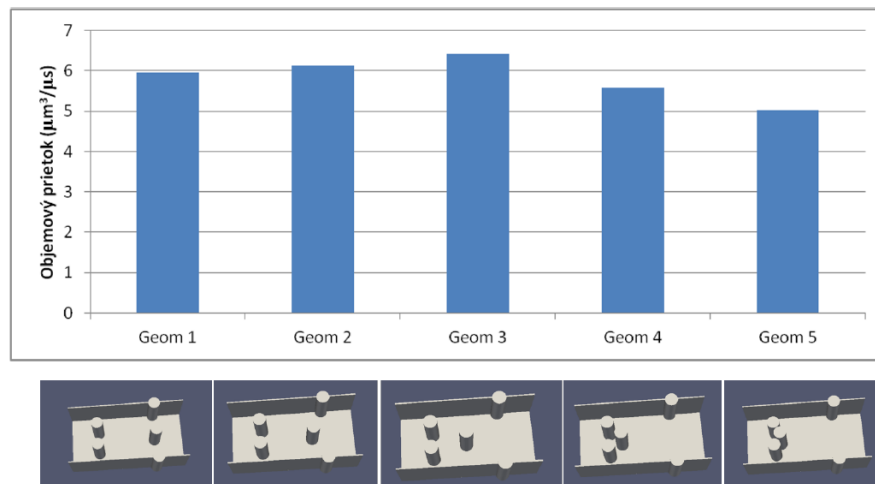
### 3 Príprava a testovanie numerickej simulácie



Obr. 29: Rôzne geometrie simulačných boxov, na ktorých sme skúmali vzťah medzi silou pôsobiacou na kvapalnú elementu a objemovým prietokom v kanáli.



Obr. 30: Hodnoty objemových prietokov v rôznych simulačných boxoch v priebehu simulácie.



Obr. 31: Hodnoty objemových prietokov v rôznych simulačných boxoch na konci simulácie.

### 3.2 Nastavovanie parametrov objektov tečúcich simulačným kanálom

Keď už máme predstavu o toku tekutiny a tvare simulačného kanála, potrebujeme nastaviť parametre pre model bunky.

Najprv musíme identifikovať, aké veľké krvinky boli použité v experimente. Typický model krvinky, pre ktorý sme urobili kalibráciu, má priemer  $7,82 \mu\text{m}$  a hrúbku  $2,57 \mu\text{m}$ . Bunky v krvi ale majú rôznu veľkosť, preto ak boli v experimente použité rôzne veľké bunky, treba tento fakt vziať do úvahy pri numerickej simulácii.

Následne musíme určiť, aká jemná by mala byť diskretizácia povrchu bunky. Táto závisí od veľkosti bunky, od diskretizácie tekutiny, ako aj od geometrie simulačného kanála a od veľkosti najužšieho priestoru v tejto geometrii. Následne potrebujeme určiť elastické koeficienty bunky, tie môžeme definovať na základe kalibračného natáhovacieho experimentu [15].

Ďalšie parametre, ktoré treba nastaviť, definujú tri typy interakcií. Interakčné parametre treba nastaviť zvlášť pre bunky s rôznymi diskretizáciami povrchu a s rôznymi elastickými koeficientami. Nie každý experiment vyžaduje kalibráciu všetkých troch typov interakcií, záleží od toho, aký typ kolízie bude musieť bunka v numerickej simulácii podstúpiť.

Prvý typ interakcie je interakcia medzi bunkou a prekážkou. Tento typ interakcie treba nastavovať v kalibračnej simulácii, kde bunka kolmo naráža na prekážku – samozrejme len v takej miere, v akej sa tento jav bude vyskytovať vo výslednej numerickej simulácii.

Druhý typ interakcie je interakcia povrchu bunky samého so sebou. Tento typ interakcie treba nastavovať v podmienkach, kde bunka prechádza cez úzky priestor, kde sa deformuje a kde by teoreticky mohlo dôjsť ku preliačeniu povrchu bunky. Preto je zrejmé, že tento typ interakcie treba nastavovať až po tom, ako sa nastaví interakcia medzi bunkou a prekážkou. Veľkosť úzkeho priestoru, na ktorom treba kalibrovať tento druhý typ interakcie, je definovaná veľkosťou najmenšej štrbiny, ktorá sa bude vyskytovať v simulovanej časti mikrofluidického zariadenia, a kam by sa bunka mohla dostať.

Posledný typ interakcie, ktorý treba nastaviť, je vzájomná interakcia medzi bunkami. Táto interakcia ovplyvňuje správanie viacerých buniek, ktoré sa navzájom zrážajú. Nastavenie tejto interakcie nie je závislé od nastavenia ostatných dvoch typov interakcií, takže môže byť urobené pred alebo aj po nastavení ostatných interakcií.

V niektorých simuláciách, napríklad v ňahovacom kalibračnom experimente [15], na bunky pôsobia externé sily. Môže to byť vo forme silikónovej guľôčky, ktorá je prilepená na bunku, a na ktorú pôsobí laser. Takýmto spôsobom je bunka ňahovaná externou silou. Iný príklad je, keď sa bunka dostane do laserového lúča, v ktorom sa zdeformuje pôsobením svetla. Ak chceme simulovať takéto situácie, musíme na základe tvaru a intenzity externej sily v biologickom experimente určiť, ako presne bude bunka namáhaná v numerickej simulácii. Musíme určiť, ktoré uzly v numerickom modeli bunky budú podrobené pôsobeniu sily, aká veľká táto sila bude, a ktorým smerom bude natočená jej normála. V takýchto typoch experimentov sa zväčša sústreďíme na modelovanie izolovaných buniek, a teda nemusíme riešiť otázky týkajúce sa napríklad interakcií alebo hematokritu. Aj geometria je v takýchto simuláciách väčšinou veľmi jednoduchá.

Keď už máme nastavené vlastnosti jednotlivých buniek a overenú ich funkčnosť v testovacom kanáli, môžeme pokračovať ďalej nastavením hematokritu v mnohobunkových simuláciách. Hematokrit vyjadruje objemové zastúpenie krviniek v plazme alebo v inej tekutine, v ktorej sú vnorené. Simulácie, ktoré skúmajú správanie buniek ako jednotlivých objektov v krvi, často pracujú so zriedenou krvou, kde je veľmi nízky hematokrit. Tieto simulácie majú tú výhodu, že vygenerovanie počiatkovej polohy buniek v balíku ESPResSo nie je komplikované. Generovanie hustejších bunkových suspenzií v balíku ESPResSo je komplikovanejšie a časovo náročné. Preto, ak potrebujeme pracovať s hodnotami hematokritu presahujúcimi 10%, máme na to k dispozícii nástroj, ktorý je detailne popísaný v [21].

### 3.3 Paralelizácia výpočtu simulácie

Posledná vec, ktorú treba v simulácii nastaviť, je paralelizácia výpočtu. Simulácie, ktoré púšťame, majú rôzne veľkosti a tým pádom aj rôzne časové náročnosti. Simulácie, kde je modelovaná iba jedna bunka, a ktoré modelujú priestor vo veľkosti o málo prevyšujúcom veľkosť bunky, nie sú veľmi náročné a môžeme ich spúšťať bez paralelizácie. Výsledky takejto simulácie získame do niekoľkých desiatok minút alebo do niekoľkých hodín. Ak však modelujeme situácie s väčším počtom buniek (rádovo desiatky), v simulačnom kanáli s rozmermi niekoľko 10  $\mu\text{m}$  alebo niekoľko 100  $\mu\text{m}$ , simuláciu už nemožno púšťať bez paralelizácie, ak chceme dostať výsledky v dohľadnom čase. Paralelizáciu je výhodné urobiť aj v prípade, že buniek v simulácii nie je veľa, ale tekutina je v dôsledku komplikovanej geometrie diskretizovaná na veľmi jemnú mriežku, teda 1  $\mu\text{m}$  alebo menej.

Nastavenie paralelizácie nie je náročné pre to, že by bol postup komplikovaný a bol by tu veľký priestor na chyby. Jeho náročnosť spočíva v tom, že možnosti jej otestovania na stolovom počítači sú obmedzené. Na stolovom počítači by sa dalo rýchlo nahliadnuť, v čom je problém, ak paralelizácia nefunguje tak, ako si želáme, ale tieto počítače bohužiaľ zatiaľ nemajú kapacity na púšťanie simulácií, ktoré sú rozdelené na viac ako 4 paralelné procesy. Niektoré parametre paralelizácie sa teraz dajú priamo overiť na stolovom počítači Snorlax s 32 jadrami. Ak však púšťame simulácie súčasne na viac ako 32 jadrách, alebo takýchto simulácií potrebujeme spustiť viacero naraz, potrebujeme použiť cluster a nastavenie parametrov treba overiť bez priamej kontroly výstupov, ktoré nás informujú o problémoch, kvôli ktorým simulácia nedokáže správne zbehnúť.

Najčastejšie problémy pri paralelizácii sú chybné „rozparcelovanie“ simulačného boxu. Pri tomto delení si treba dať pozor, aby jednotlivé oblasti boli dosť veľké na to, aby sa do nich zmestila jedna bunka. Taktiež si treba dať pozor na parameter `system.min_global_cut`, ktorý definuje prekryv medzi dvoma susednými oblasťami. Tento prekryv nemôže byť väčší ako najmenší rozmer oblasti. To znamená napríklad aj to, že rozmer tohto parametra je limitovaný najmenším rozmerom kanála. Ak modelujeme kanál s veľmi nízkou výškou, (napríklad taký, aký je popísaný v kapitole 6), môže sa stať, že pre potreby dobre fungujúcej paralelizácie bude treba simulačný box umelo zvýšiť. Prebytočný priestor treba vyplniť hrubšou stenou. To všetko preto, aby bola vertikálna výška minimálne taká veľká, aký veľký potrebujeme nastaviť v horizontálnych smeroch parameter prekryvu výpočtových oblastí.

Podrobnejší rozbor paralelizácie je uvedený v [13].

#### **3.4 Modifikácie nastavovania simulácie pre účely navrhovania biologického experimentu**

Ako bolo spomenuté na začiatku, doteraz popísaný postup je aplikovateľný vtedy, ak poznáme detailne biologický experiment a chceme podľa neho navrhnúť numericke simuláciu. Ak potrebujeme navrhnúť simuláciu, podľa ktorej by neskôr mohol byť navrhnutý biologický experiment, niektoré časti tohto postupu treba urobiť v obrátenom poradí. To znamená, že aj keď numericke simuláciu môžeme spustiť v podstate s akoukoľvek geometriou, tekutinou alebo hematokritom, treba sa pred spustením uistiť, či sú nami vybrané parametre použiteľné pre biologický experiment. Treba sa presvedčiť, či sa taká geometria mikrofluidického zariadenia vôbec dá vyrobiť, či tekutina s danou viskozitou existuje a dá sa použiť v biologických podmienkach na takýto druh experimentu, alebo sa v laboratóriu dá spustiť experiment s hematokritom, ktorý chceme použiť v numerickej simulácii. Treba si teda pred spustením overiť vhodnosť minimálne týchto častí a parametrov numerickej simulácie:

- geometria mikrofluidického zariadenia,
- rýchlosť a viskozita tekutiny,
- veľkosť a typ buniek,
- externé sily pôsobiace na bunky,
- hematokrit.



## 4 Vylad'ovanie simulačného kódu a hľadanie funkčných limitov modelu bunky

V tejto sekcii budeme písať o tom, čo treba so simuláciou robiť, ak je síce konvergujúca a na prvý pohľad funkčná, ale v porovnaní s existujúcim biologickým experimentom sa v nej červená krvinka nespráva tak, ako od nej očakávame. Postup budeme vysvetľovať na konkrétnych príkladoch, s ktorými sme sa počas simulovania rôznych situácií stretli. Budeme písať aj o niektorých limitných nastaveniach simulácie (napríklad diskretizácii tekutiny a bunky), ktoré spôsobujú, že model krvinky sa nespráva tak, ako reálna bunka.

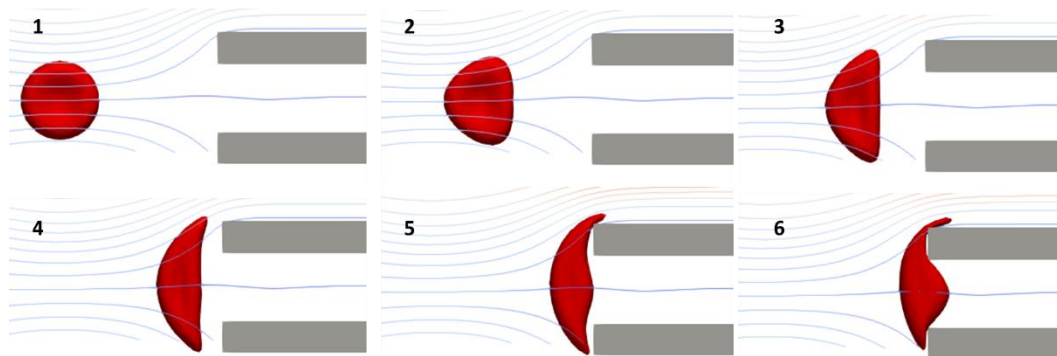
### 4.1 Nepresnosť deformácie bunky pri kontakte s prekážkou

Pod nepresnou deformáciou si v tomto prípade treba predstaviť situáciu podobnú ako vidíme na Obr. 32. Bunky sú tu značne deformované ešte pred tým, ako sa priblížia k prekážke dostatočne blízko na to, aby ich deformácia mohla byť spôsobená priamym kontaktom s prekážkou. Toto správanie sa dá vysvetliť chybou v nastavení rýchlosti v kvapaline. V tomto prípade bola rýchlosť tekutiny nastavená na hodnotu 15-krát väčšiu ako bola rýchlosť tekutiny v biologickom experimente. Na Obr. 33 je znázornené očakávané správanie sa červenej krvinky, ktoré sme dostali tým, že rýchlosť tekutiny sme upravili na hodnotu, ktorá bola použitá v biologickom experimente.

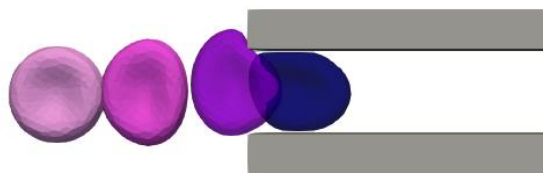
Takéto pochybenie a jeho vysvetlenie si zaslúži ešte doplňujúcu úvahu: model červenej krvinky, ktorý bol v tejto simulácii použitý, nemal v sebe použité žiadne viskózne parametre. Celý model bol dokonale elastický, čo znamená, že správanie bunky by nemalo byť ovplyvnené procesmi, ktoré sú nejakým spôsobom závislé od času. Všetky elastické reakcie sú okamžité, takže správanie bunky by nemalo závisieť od rýchlosti, ktorou sa pohybuje. Jedinou výnimkou by snáď mohol byť numerický problém s príliš veľkým časovým krokom, avšak tento problém by sa prejavoval v chybnej konvergencii simulácie – teda simulácia by vôbec nezbehla, alebo by po pár krokoch spadla. To ale nebol náš prípad, takže ako je možné, že správanie čisto elastickej bunky je závislé na rýchlosti tekutiny? Odpoveď sa skrýva v interakcii medzi krvinkou a tekutinou. Táto interakcia je definovaná koeficientom prenosu síl  $\xi$  vo vzorci (3). Tento koeficient definuje to, ako veľmi je každý uzol na povrchu bunky zviazaný s časticami tekutiny, ktoré prechádzajú cez pozíciu daného uzla. Správna hodnota tohto koeficientu závisí od viacerých faktorov, okrem iného aj od viskozity tekutiny. Takže

toto pozorované správanie, kde sa čisto elastická bunka pohybuje rozdielne v závislosti od rýchlosti tekutiny, je vlastne spôsobené viskozitou tekutiny.

Čím je tekutina viskóznejšia, tým je koeficient prenosu síl väčší, a tým viac tekutina unáša jednotlivé uzly bunkovej mriežky po prúdočiarač. Z tejto úvahy môžeme vyvodiť záver, že chyba, ktorú sme vyššie spomínali, môže byť spôsobená nie len vysokým nastavením rýchlosti kvapaliny, ale aj nesprávnym nastavením jej viskozity.



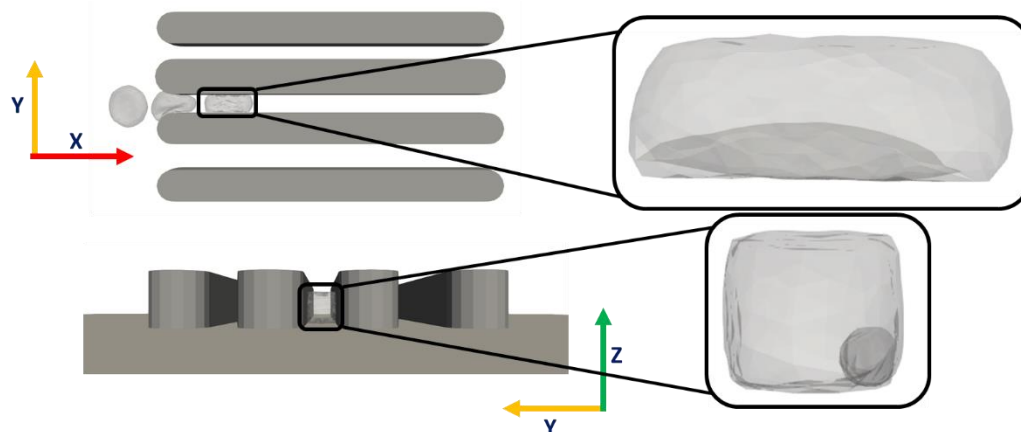
Obr. 32: Príklad deformácie bunky spôsobenej príliš veľkou rýchlosťou tekutiny v kanáli.



Obr. 33: Deformácia buniek spôsobená interakciou s prekážkami v simulačnom kanáli. Oproti simulácii s nadmernou rýchlosťou si bunky lepšie zachovávajú svoj tvar, aj ľahšie vojdú do zúženej časti simulačného kanála.

### 4.2 Prenikanie bunky cez seba pri prechode úzkymi priestormi

Prechod bunky cez úzke prostredie je komplikovaný jav, ktorý si vyžaduje správne nastavenie interakčných koeficientov. Jeden z možných problémov je prekryvanie bunkovej membrány samej cez seba. Napríklad tak, ako môžeme vidieť na Obr. 34.



Obr. 34: Príklad prechodu bunky cez úzku štrbinu, v ktorej sa zdeformuje tak, že sa jej povrch preliači cez seba dovnútra.

Tento problém sa dá vyriešiť zmenou interakčných parametrov povrchu bunky so sebou samým. Ich nastavenie závisí od veľkosti bunky, od hustoty uzlov na jej povrchu, ako aj od jej elastických parametrov. Ak sa bunka deformuje takým spôsobom, ako vidíme na Obr. 34, tieto interakčné parametre sú nastavené slabo.

Na správne nastavenie interakčných parametrov potrebujeme mať model s veľmi pravidelnou sieťou uzlov na povrchu červenej krvinky. Ak naopak interakčné parametre nastavíme príliš silné, môže to mať za následok špecifickú deformáciu bunky – narastú jej výstupky, vid' Obr. 35.

### 4.3 Deformácia bunky vo voľnom priestore

Ak sa nám počas simulácie stane, že bunka sa počas svojho pohybu deformuje bez zjavnej interakcie s prekážkami v kanáli, alebo sa jej deformácia nedá vysvetliť ani prudko sa meniacim smerom prúdočiar v tekutine, problém môže mať viacero príčin.

Jednou z nich je už raz spomínané zlé nastavenie interakcie bunkového povrchu so sebou samým. Nutnou požiadavkou na dobré fungovanie tejto interakcie je rovnomerná diskretizácia povrchu bunky. Ak je napríklad bunkový povrch nerovnomerný a vzdialenosti najbližších bodov sa veľmi líšia v závislosti od toho, kde na bunke sa nachádzajú, môže nastať problém s definovaním vhodných interakčných parametrov. Tie isté parametre totiž zdeformujú bunku na tom mieste, kde sú jej povrchové uzly blízko seba a táto interakcia spôsobí, že sa navzájom odpudzujú. Na druhú stranu, na miestach, kde sú uzly ďaleko od seba, zase vznikne priestor na to, aby pri kontakte s inou časťou bunkového povrchu uzly prenikli pomedzi seba. Na takýchto miestach môže dôjsť ku prevráteniu bunkového povrchu

do vnútra bunky. Na Obr. 35 môžeme vidieť, ako vyzerá nehybná bunka bez pôsobenia vonkajších vplyvov, ktorá má nastavené príliš veľké hodnoty pre tento typ interakcie.

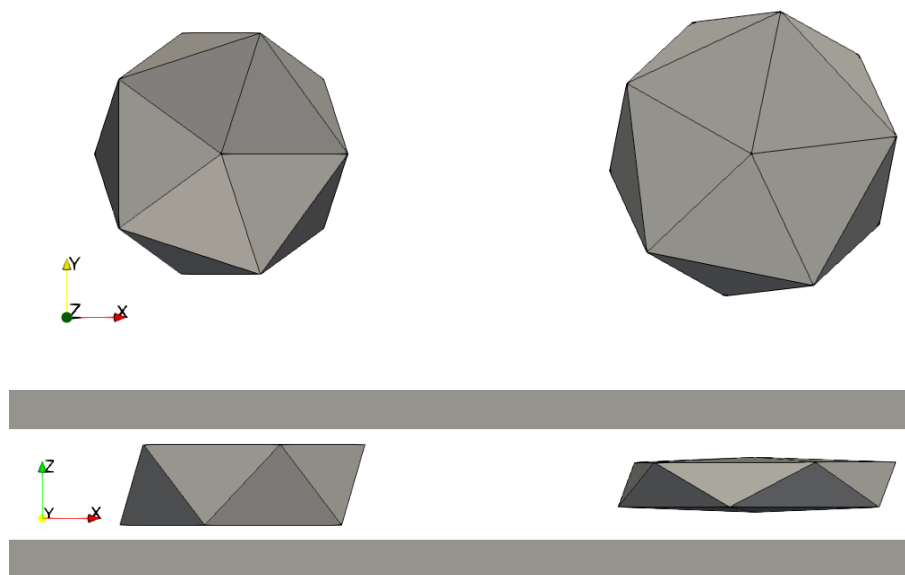


Obr. 35: Tvar bunky v simulácii, ktorá má nastavené príliš veľké hodnoty pre interakciu bunkového povrchu samého so sebou. Bunka vľavo má správne nastavené interakčné koeficienty, smerom doprava sa zvyšuje hodnota interakčného koeficientu `cutoff`.

Ďalšou možnou príčinou spontánnej deformácie buniek môže byť nedostatočná diskretizácia povrchu. V takom prípade sú veľkosti hrán na povrchu bunky veľmi veľké a je potrebné nastaviť silnejšie aj koeficienty interakcie bunkového povrchu so sebou samým, aj koeficienty interakcie medzi bunkami a prekážkami. V prvom prípade môže nastať nežiadaná deformácia preto, lebo dĺžka hrán na povrchu je väčšia ako vzdialenosť dvoch konkávných častí na povrchu červenej krvinky. Vtedy sa tieto dve konkávne časti budú navzájom odpudzovať, vplyvom interakcie bunkového povrchu so sebou samým, a krvinka tak nadobudne plošný, a nie bikonkávny tvar. V druhom prípade môže nastať problém vtedy, ak modelujeme krvinku v kanáli, kde sú prekážky blízko začiatočnej polohy buniek. Napríklad ak modelujeme krvinky v kanáli, ktorého výška je len o málo väčšia ako samotná hrúbka krvinky – v takomto prípade je spodná a vrchná stena kanála tak blízko bunky, že interakcia medzi stenou a bunkou spôsobí, že bunka bude zhora aj zdola stláčaná a opäť stratí svoj bikonkávny tvar.

Tieto poruchy však nastávajú len v relatívne extrémnych situáciách, napríklad vtedy, keď je bunkový povrch modelovaný 12 uzlami, ako môžeme vidieť na Obr. 36. Takéto nepresné modely nie sú vhodné pre simulovanie krvinky v úzkych priestoroch. Ak chcem simulovať detailnejšie deformačné procesy, kde rozmer prekážok je porovnateľný s rozmerom krvinky, musíme zvoliť jemnejšiu diskretizáciu jednak pre krvinku samotnú, jednak pre tekutinu, v ktorej sa pohybuje. Modely krvinky s malým počtom diskretizačných uzlov sú vhodnejšie pre simulácie hustých suspenzií, kde o krvinke nepotrebujeme vedieť podrobné informácie o jej deformácii. Aj tu však musíme byť opatrní, jemnosť modelu musí

byť dostatočná na to, aby sa dali rozumne nastaviť vzájomné interakcie medzi bunkami, ktoré sa navzájom zrážajú.



Obr. 36: Deformácia bunky v dôsledku blízkosti stien simulačného kanála, pre model bunky s nízkym počtom povrchových uzlov (tu 12 uzlov). Vľavo je počiatočná poloha bunky, tak, ako bola inicializovaná na začiatku simulácie. Vpravo je bunka po niekoľkých krokoch simulácie, po započítaní interakcie medzi stenou a bunkou.

S podivnou deformáciou bunky sa môžeme stretnúť aj v prípade, ak je zle nastavená orientácia jej povrchu. Bunka sa môže napríklad po niekoľkých simulačných krokoch nafúknuť, simulácia ale v takých prípadoch veľmi rýchlo padá. Tento problém sa dá vyriešiť tak, že v simulácii aktivujeme kontrolu orientácie povrchu bunky, počas ktorej bude orientácia opravená, ak je chybná. Tento spôsob je spoľahlivý, ale kontrola orientácie povrchu bunky spomaľuje spustenie simulácie. Druhá možnosť je opraviť priamo zdrojový súbor definujúci povrch bunky tak, aby bola jej orientácia správna. Tento spôsob si vyžaduje spustenie kontroly orientácie povrchu bunky iba raz, a v ďalších simuláciách už môžeme bez kontroly používať nový súbor so správnou orientáciou, ktorý sme získali pri prvej kontrole.

#### 4.4 Prenikanie buniek do seba pri ich vzájomnej kolízii

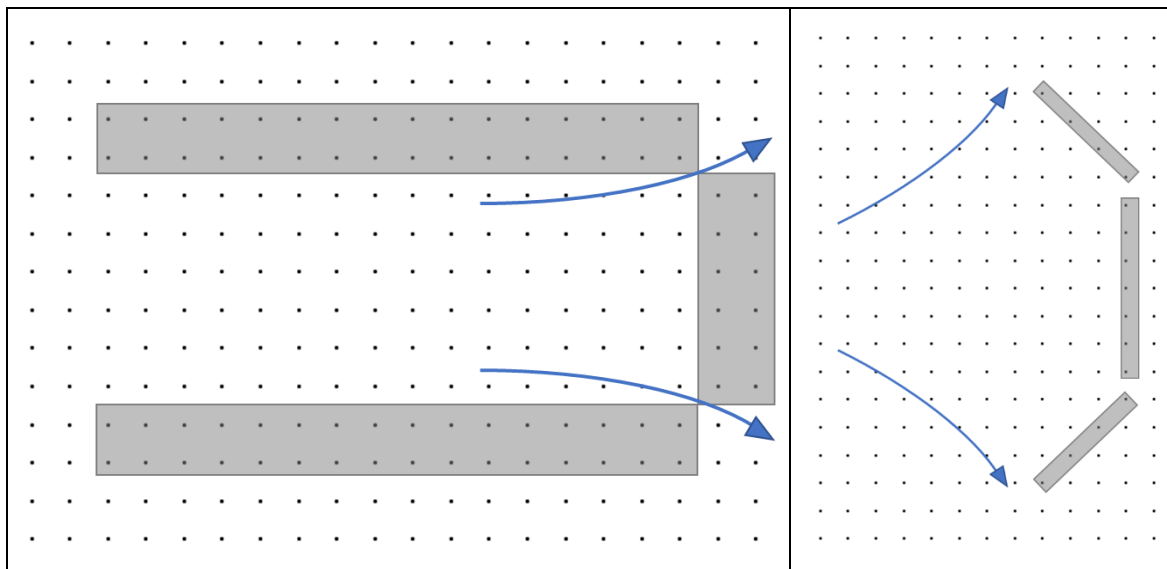
Tento problém má veľmi jednoduché zdôvodnenie – vzájomné interakcie medzi bunkami nie sú nastavené správne. Napriem tomu, že je dôvod tohto problému ľahko objasniteľný a jeho náprava principiálne jednoduchá (aj keď zdĺhavá), dochádza k nemu často. Je to spôsobené tým, že koeficienty pre všetky tri typy interakcie závisia od veľkosti bunky, od počtu uzlov na jej povrchu, aj od jej elastických koeficientov. Takže neexistuje

univerzálna sada parametrov, ktorá by sa dala použiť pre bunku. Pre každú novú simuláciu si treba overiť, či sa bunky pri kontakte s prekážkami a s inými bunkami správajú tak, ako od nich očakávame, a ak nie, treba upraviť interakčné parametre.

### 4.5 Trajektória buniek pri ceste medzi prekážkami v kanáli nezodpovedá trajektórii buniek v biologickom experimente

Pri vyhodnocovaní výsledkov simulácie si niekedy môžeme všimnúť, že bunka v našom modeli netečie cez prekážky rovnakým spôsobom, ako bunka v originálnom experimente v biologických podmienkach.

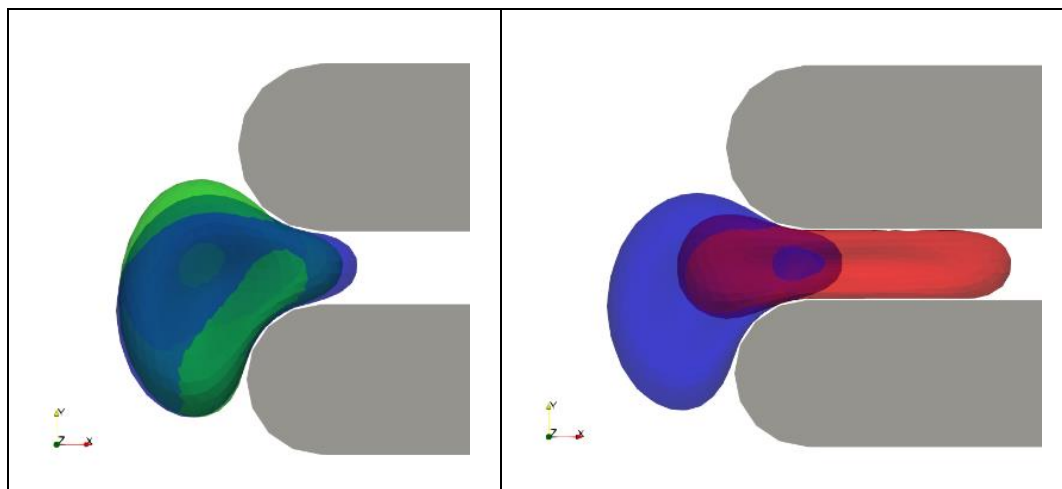
Prvú vec, ktorú treba v takej situácii skontrolovať, je prúdenie tekutiny. Treba overiť, či prúdočiary v modeli tečú očakávaným spôsobom. Chyba by mohla nastať v tom, že prekážky tvoriace simulačný kanál sú zle poukladané a dobre na seba nenadväzujú. Takže aj keď na prvý pohľad tvoria súvislú stenu, tekutina môže presakovať na spojoch v rohoch alebo cez šikmé úzke prekážky. S prekážkami a tekutinou môže nastať aj opačný problém – ak chceme úmyselne nechať medzi prekážkami štrbinu, ale poukladáme steny príliš blízko seba, môže sa stať, že vo vytvorenom priestore nezostane žiaden voľný bod v tekutinovej mriežke, a teda tadiaľ nič netečie. Príklady takýchto „nedorozumení“ medzi tekutinou a prekážkami sú na Obr. 37.



Obr. 37: Príklad nesprávneho usporiadania prekážok v simulačnom kanáli. Na spoji prekážok môže dôjsť ku nechcenému pretekaniu tekutiny, alebo pôvodne nastavené medzera medzi prekážkami nemusí byť pre tekutinu viditeľná.

Aj v prípade korektného toku tekutiny môže nastať situácia, kedy trajektórie buniek nezodpovedajú trajektóriám z biologického experimentu. S takýmto prípadom sme sa stretli,

keď mala bunka vojsť do úzkej štrbiny, ako sme to videli vo videu z laboratória, avšak v numerickej simulácii sa tejto štrbine zakaždým vyhla. Problém bol nakoniec v nedostatočne jemnej diskretizácii tekutiny v štrbine. Na Obr. 38 môžeme vidieť spomínanú geometriu štrbiny, a správanie tých istých buniek v závislosti od hustoty diskretizácie tekutinovej mriežky.



Obr. 38: Porovnanie správania troch identických buniek v rôzne modelovanej tekutine. Zelená bunka je modelovaná v tekutine s diskretizáciou  $1\mu\text{m}$ , modrá je v tekutine s diskretizáciou  $0,5\mu\text{m}$  a červená je v tekutine s diskretizáciou  $0,25\mu\text{m}$ . Naľavo môžeme vidieť porovnanie buniek v diskretizácii  $1\mu\text{m}$  a  $0,5\mu\text{m}$ , vidno, že tu nie je podstatný rozdiel. Napravo porovnáваме simuláciu v diskretizácii  $0,5\mu\text{m}$  a  $0,25\mu\text{m}$ .

Bunka v jemnejšie diskretizovanej tekutine ľahšie vchádza do štrbiny.

Ďalším dôvodom, prečo sa bunky nepohybujú medzi prekážkami po očakávanej trajektórii, môže byť ich tuhosť. Táto ovplyvňuje ich schopnosť stlačiť sa a vojsť do medzery, alebo udržať si tvar a oboplávať prekážku. Pre červené krvinky je takýto problém riešiteľný tak, že skontrolujeme elastické koeficienty bunky s tabuľkou nakalibrovaných prípustných hodnôt, v závislosti od použitého modelu povrchu krvinky a jeho počtu uzlov. Pre iné krvinky, alebo pre červené krvinky iných rozmerov (napríklad s iným priemerom ako  $7,82\mu\text{m}$ ), by sa dal takýto experiment, kde je správanie bunky závislé od jej tuhosti, použiť na kalibráciu elastických parametrov.

#### 4.6 Simulácia nefunguje s niektorými modelmi bunky

Ak je tekutinová mriežka príliš hustá, to znamená že hodnota parametra lb-grid je veľmi malá, redšie modely červenej krvinky v takejto mriežke nebudú fungovať správne. Napríklad ak je hodnota lb-gridu  $0,25\mu\text{m}$ , a na bunku s priemerom  $7,82\mu\text{m}$  použijeme model s 374 povrchovými uzlami (Obr. 2), simulácia nebude fungovať. Ak na takú istú situáciu použijeme pre červenú krvinku model s 642 uzlami, simulácia prebehne v poriadku.

Objekt vnorený v tekutine by mal mať aspoň 3 alebo 4 diskretizačné body vo vnútri jednej kocky definovanej disretizáciou simulačnej tekutiny (parameter `lb-grid`) [13].

### **4.7 „Všetko funguje ako má“, ale simulácia aj tak spadne**

Niekedy sa stane, že simulácia po spustení chvíľu beží s očakávanými výsledkami, ale po niekoľkých minútach alebo hodinách sa neočakávane zastaví. V takom prípade si treba častejšie nechať vypisovať výstupy zo simulácie. Môže sa napríklad stať, že v dôsledku pôsobenia interakcií sa povrch bunky rozvlní a rozkmitaný uzol na povrchu bunky vojde do prekážky. V takom prípade, a ak už sú interakčné koeficienty nastavené správne, treba zmenšiť časový krok simulácie.

Ak dôvod skolabovania simulácie nie je zjavný, problém môže byť v nesprávne nastavenej paralelizácii. Ten sa môže prejaviť napríklad tak, že bunka v poriadku prejde istú časť kanála, a simulácia prestane fungovať vtedy, keď sa bunka dostane na hranicu dvoch oblastí, ktoré vznikli po paralelizácii simulačného boxu. Ak je problém naozaj v paralelizácii, môžeme tento problém odhaliť podľa toho, že bunka sa dostane vždy na rovnaké miesto a simulácia predčasne skončí, aj keď zmeníme niektoré simulačné parametre – napríklad interakcie, tuhosť bunky, alebo rýchlosť tekutiny.

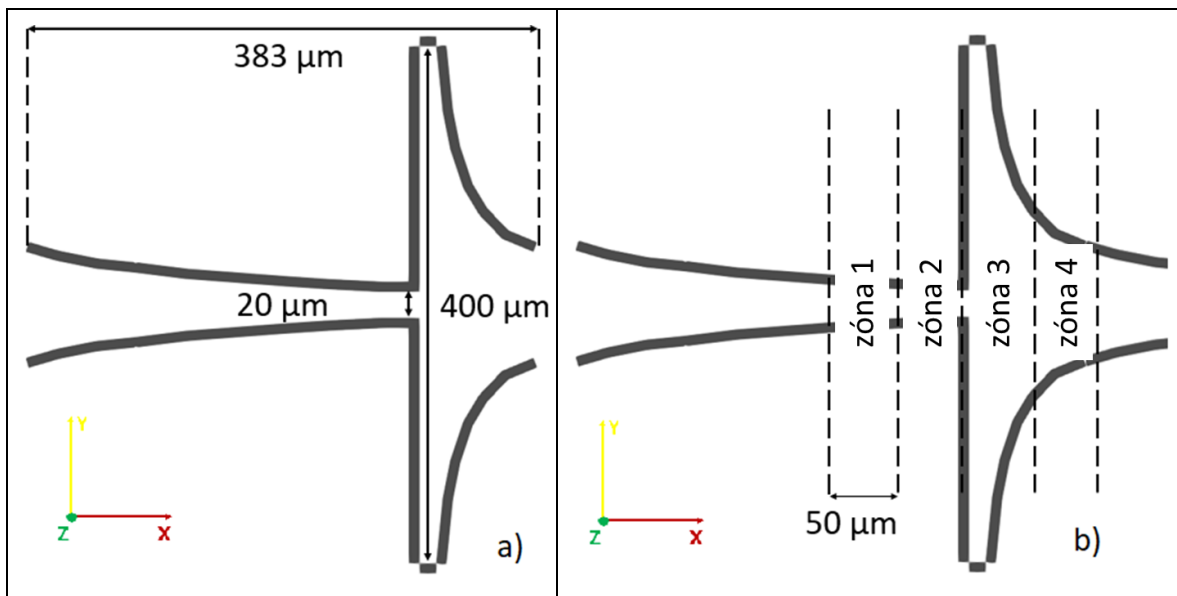


## 5 Príklad aplikácie: Simulácia krvinky v rýchlo sa meniacom profile tekutiny

### 5.1 Popis a dizajn pôvodného experimentu

Biologický experiment, ktorým bola inšpirovaná táto štúdia, je podrobne popísaný v [22][18]. Cieľom tejto práce bolo meranie deformačného indexu (DI) červených a bielych krviniek v mikrofluidickom zariadení s hyperbolickým mikrokanálom.

Experiment bol urobený na mikročipe s dvoma hlavnými časťami. Prvá časť kanála triedi bunky a posieľa izolované krvinky do druhej časti kanála. Druhá časť pozostáva z niekoľkých paralelných rovnakých mikrokanálov. Každý mikrokanál pozostáva z troch hyperbolických častí zapojených do série. Rozmery a geometria takejto hyperbolickéj časti sú znázornené na Obr. 39. Jej veľkosť je 55x383  $\mu\text{m}$  (výška x dĺžka), s meniacou sa šírkou od 20 do 400  $\mu\text{m}$ .



Obr. 39: a) Tvar a rozmery jednej z troch hyperbolických častí mikrokanála, ktoré sú v pôvodnom experimente zapojené za sebou. b) Štyri zóny hyperbolického kanála, v ktorých bola zisťovaná hodnota DI pre červené krvinky. Každá zóna má šírku 50  $\mu\text{m}$ .

Tekutina použitá v experimente bol roztok Dextran 40 (10% w/v). Hustota tohto roztoku je 10<sup>3</sup> kg/m<sup>3</sup>. Viskozita je 4·10<sup>-6</sup> m<sup>2</sup>/s, pri teplote 22±1 °C, pri ktorej experiment prebehol.

Bunky boli sledované pri svojom prechode najužšou časťou kanála. Ich deformačný index sa počíta nasledovným spôsobom:

$$DI = \frac{L_{max} - L_{min}}{L_{max} + L_{min}} \quad (17)$$

Kde  $L_{max}$  a  $L_{min}$  sú najväčší a najmenší rozmer bunky v smere osi X alebo Y – tieto dve dĺžky sú ľahko merateľné z videozáznamov experimentu.

Deformačný index buniek bol vyhodnocovaný v štyroch zónach, v blízkosti vyústenia úzkej časti hyperbolického kanála do tej širokej. Presná poloha týchto štyroch zón je znázornená na Obr. 39 b). Šírka týchto zón je 50  $\mu\text{m}$ , dve sa nachádzajú pred koncom zúženej časti, dve sa nachádzajú na začiatku širokej časti.

## 5.1 Výpočet rýchlosti bunky z informácie o šmykovom toku v kanáli

Rýchlosť šmyku tekutiny (pseudo shear rate) bola počas biologického experimentu vyhodnotená v každej z týchto štyroch zón. Hodnoty DI ako aj hodnoty tejto rýchlosti šmyku tak, ako boli uvedené v článku [22], sú v Tab. 1.

Tab. 1: Hodnoty DI a rýchlosti šmyku v každej zo štyroch sledovaných zón v hyperbolickom kanáli. Rýchlosť šmyku je údaj z biologického experimentu, priemerná rýchlosť je dopočítaný údaj.

Zóna	Rýchlosť šmyku ( $\text{s}^{-1}$ )	DI (-)	w ( $\mu\text{m}$ )	h ( $\mu\text{m}$ )	$D_h$ ( $\mu\text{m}$ )	Priemerná rýchlosť ( $\mu\text{m}/\mu\text{s}$ )
1	1400	0,36	25	55	34,375	0,0481
2	1761	0,44	21	55	30,395	0,0535
3	100	0,30	320	55	93,867	0,0094
4	30	0,24	160	55	81,860	0,0049

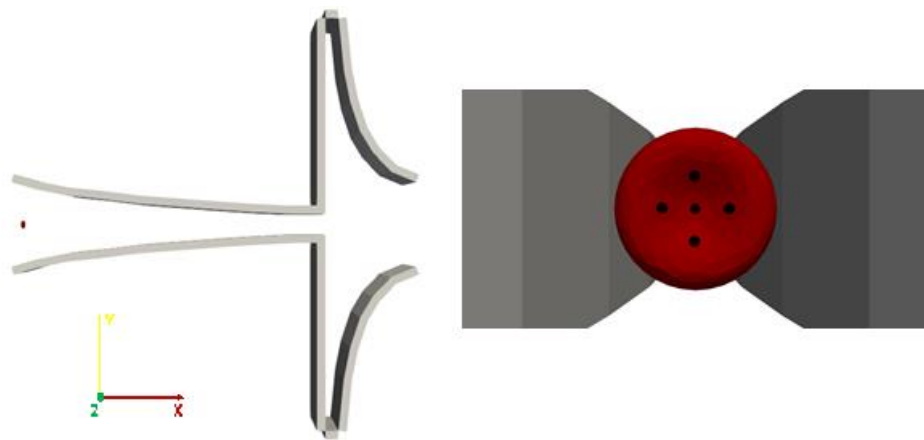
Na nastavenie toku v simulácii sme potrebovali informáciu o rýchlosti v kanáli. Túto informáciu sme získali z nameranej rýchlosti šmyku. Ako sme už spomenuli v kapitole 3.1, vzťah medzi rýchlosťou tekutiny a rýchlosťou šmyku v tekutine sa dá vypočítať pomocou vzťahov (15) a (16), presnejšie vyjadrenie je v prácach [20] a [22]. Výsledná rýchlosť je uvedená v Tab. 1.

## 5.2 Popis nastavenia numerického experimentu

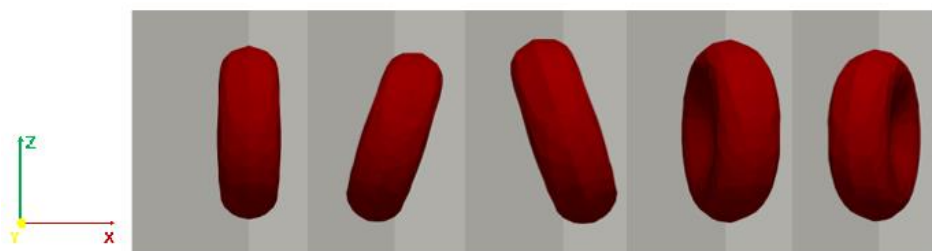
Verzia softvéru ESPResSo, ktorá bola použitá na simuláciu tohto problému, je commit hash `fa1dd798a deaa47cca9f2cd3eaae37ff6351224`.

Rozmery simulačného kanála, ktorý sme použili na simuláciu, môžeme vidieť na Obr. 39. Tekutina v kanáli je udržiavaná v pohybe externou silou, definovanou pomocou parametra `external_force_density`. Jeho hodnota bola nastavená tak, aby najväčšia rýchlosť tekutiny v zúženej časti kanála (zóna 2) bola 0,0535 m/s, taká, ako v biologickom experimente.

Orientácia buniek v experimente je vyobrazená na jednom z obrázkov v článku [22], kde je jedna z buniek zachytená na snímke z laboratória. Táto bunka má špecifický tvar, ktorý naznačuje, že bunka je orientovaná kolmo na smer toku. V článku [22] sú do vyhodnocovania výsledkov zaradené iba tie bunky, ktoré sa pohybovali pozdĺž osi kanála. V našej numerickej simulácii sme definovali päť počiatočných polôh pre bunky, ktoré nie sú presne v strede kanála, ale stále sme ich považovali za dostatočne blízke pri osi. Tieto polohy sú znázornené na Obr. 40. Pre každú z týchto počiatočných polôh sme pustili päť simulácií s rôznymi náklonmi bunky, ktoré sme považovali za dostatočne kolmé na smer toku. Tieto náklony sú znázornené na Obr. 41. Bunka bola rotovaná okolo Y-ovej a Z-ovej osi o  $\pm\pi/10$  radiánov. Pre zopakovateľnosť experimentu uvádzame v Tab. 2 a Tab. 3 simulačné parametre použité v simulácii.



Obr. 40: Počiatočné polohy červenej krvinky v simulácii, znázornené čiernymi bodkami.



Obr. 41: Počiatočné náklony buniek.

Tab. 2: Hodnoty elastických koeficientov pre červené krvinky v simulácii.

Parameter	LB jednotky	SI jednotky
Koeficient pružnosti $k_s$	$8 \cdot 10^{-3}$ LN/Lm	$8 \cdot 10^{-6}$ N/m
Ohýbací koeficient $k_b$	$3 \cdot 10^{-3}$ LNLm	$3 \cdot 10^{-18}$ N·m
Koeficient zachovania lokálnej plochy $k_{al}$	$3 \cdot 10^{-3}$ LN/Lm	$3 \cdot 10^{-6}$ N/m
Koeficient zachovania celkovej plochy $k_{ag}$	0,9 LN/Lm	$9 \cdot 10^{-4}$ N/m
Koeficient zachovania objemu $k_v$	0,5 LN/Lm <sup>2</sup>	$5 \cdot 10^2$ N/m <sup>2</sup>
Viskozita bunkovej membrány	0 Lm <sup>2</sup> /Ls	0 m <sup>2</sup> /s
Polomer bunky	3,91 Lm	$3,91 \cdot 10^{-6}$ m
Počet bodov na povrchu bunky	374 [-]	374 [-]

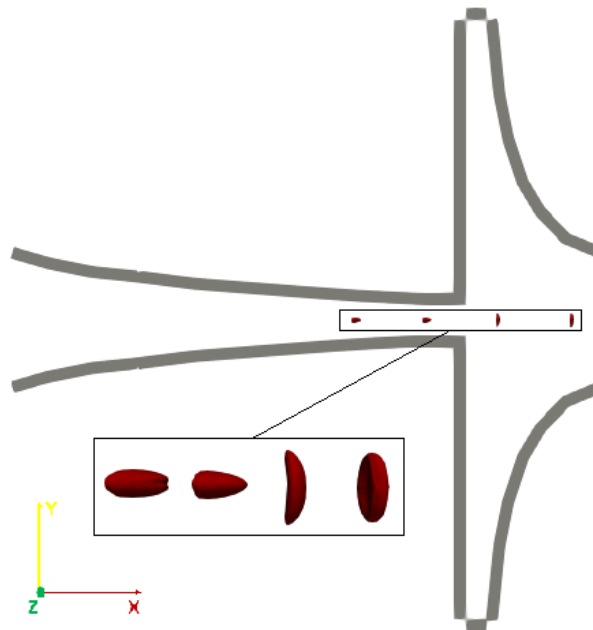
Tab. 3: Numerické parametre tekutiny a iné simulačné parametre.

Parameter	LB units	SI units
Hustota tekutiny	1 Lkg/Lm <sup>3</sup>	$1 \cdot 10^3$ kg/m <sup>3</sup>
Kinematická viskozita tekutiny	4 Lm <sup>2</sup> /Ls	$4 \cdot 10^{-6}$ m <sup>2</sup> /s
Koeficient trenia	3,39 LN·Ls/Lm	$3,39 \cdot 10^{-9}$ N·s/m
Priestorová diskretizácia - Lb-grid	1 Lm	$10^{-6}$ m
Časový krok	0,1 Ls	$10^{-7}$ s
Sila prúdenia tekutiny	$1,5 \cdot 10^{-3}$ LN/Lm <sup>3</sup>	$1,5 \cdot 10^6$ N/m <sup>3</sup>

### 5.3 Výsledky a ich spracovanie

Numerické simulácie boli urobené pre 25 rôznych počiatočných polôh bunky, ktoré vznikli kombináciou piatich rôznych pozícií a piatich natočení. Spomedzi týchto 25 polôh sú niektoré symetrické, a teda v takýchto symetrických simuláciách bola zaznamenaná rovnaká rýchlosť bunky aj rovnaký priebeh jej deformácie. Na Obr. 42 môžeme vidieť tvar bunky v rôznych častiach kanála pre jednu z týchto simulácií. V každej simulácii bunka

prebehla simulačným kanálom dva krát. To preto, aby sme mohli vidieť, do akej miery je jej prvý prechod odlišný od toho druhého, a nakoľko sú výsledky z prvého prechodu ovplyvnené nedokonalými počiatočnými podmienkami.



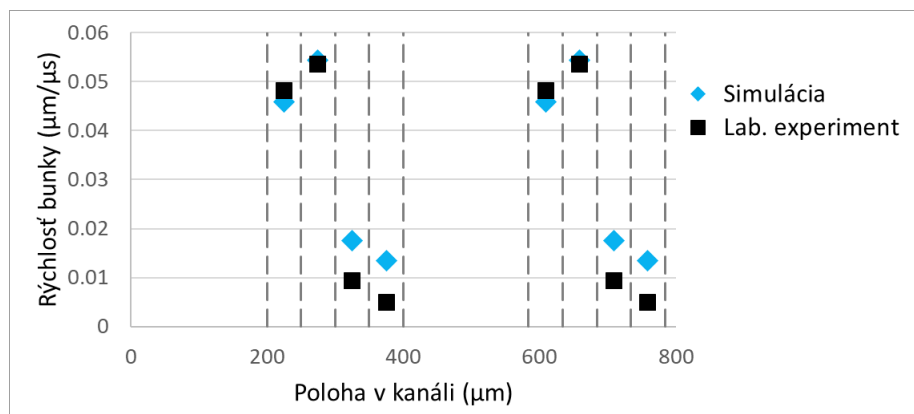
Obr. 42: Tvar bunky v rôznych častiach kanála.

Keďže každá bunka prešla kanálom dva krát, dohromady prešla vzdialenosť 800  $\mu\text{m}$ . Preto na grafoch na Obr. 43, Obr. 44, Obr. 45 a Obr. 46 môžeme vidieť, že X-ová os grafu predstavujúca polohu bunky v kanáli nadobúda hodnoty 0-800. Prerušované zvislé čiary znázorňujú polohu štyroch zón, v ktorých sme vyhodnocovali dáta.

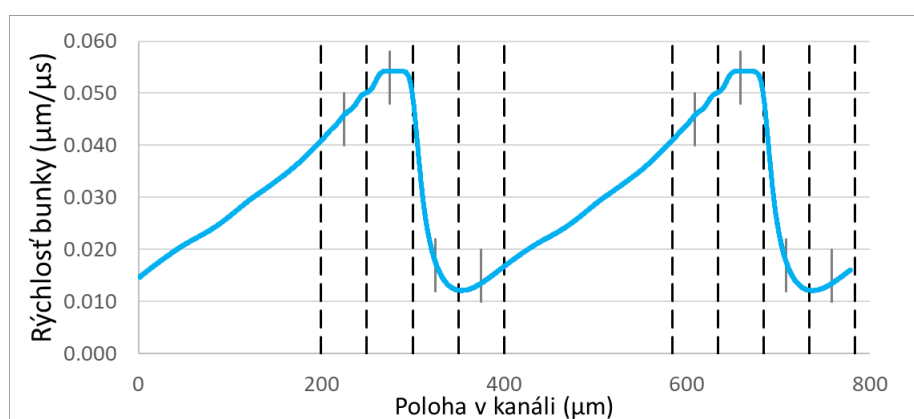
Naším prvým cieľom bolo porovnať priebeh rýchlosti bunky na vstupe a na výstupe zo zúženej časti kanála v simulácii a v experimente. Na Obr. 43 môžeme vidieť priebeh rýchlosti bunky v rôznych častiach kanála. Zobrazená rýchlosť bola získaná ako priemer zo všetkých 25 simulácií, ktoré sme spustili. Avšak štandardná odchýlka v týchto meraniach bola veľmi malá, rádovo 100-1000 krát menšia ako samotná nameraná rýchlosť, preto túto odchýlku do grafu neuvádzame. Ako príklad jednej z nameraných rýchlostí uvádzame priebeh X-ovej zložky rýchlosti jednej z buniek v Obr. 44.

Môžeme si všimnúť, že vypočítaná priemerná rýchlosť bunky nie je rovnaká ako rýchlosť nameraná v laboratóriu. Priebeh rýchlosti v simulácii je porovnateľný s biologickými výsledkami iba v prvej časti kanála, kde sa rýchlosť tekutiny mení postupne a nie nárazovo.

## 5 Príklad aplikácie: Simulácia krvinky v rýchlo sa meniacom profile tekutiny

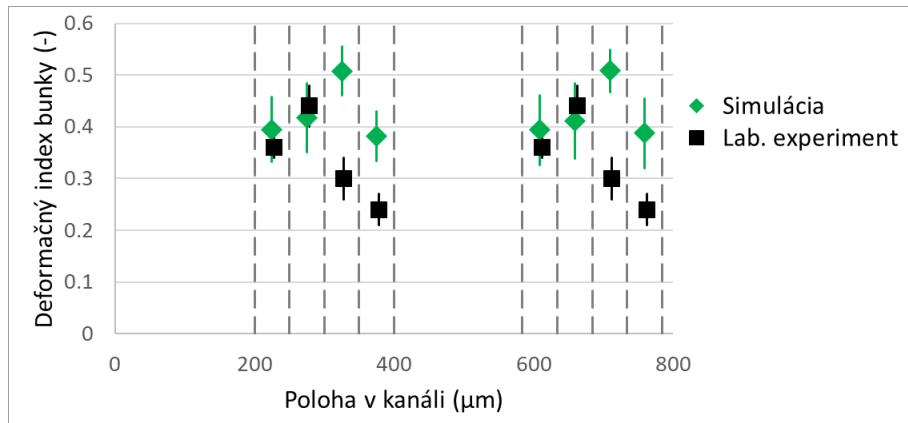


Obr. 43: Porovnanie rýchlostí buniek v kanáli v biologickom experimente a v numerickej simulácii. Dáta o rýchlosti v biologickom experimente sú vypočítané na základe informácií o šmykovom toku.

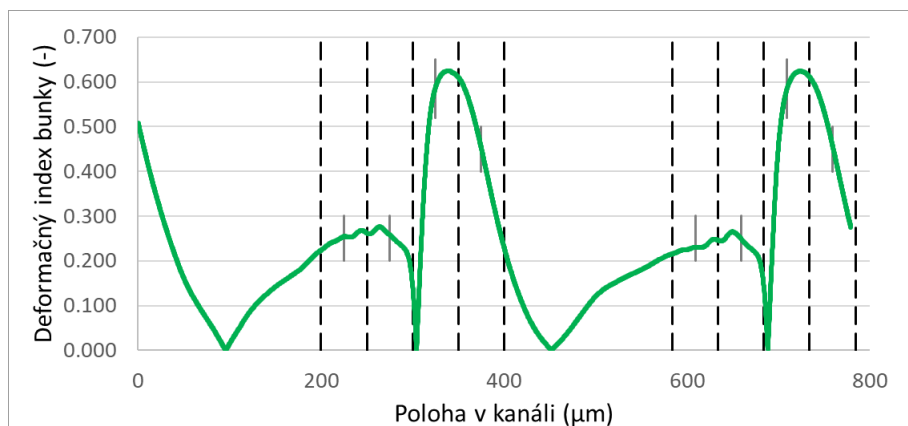


Obr. 44: Priebeh rýchlosti jednej bunky v simulácii, v závislosti od polohy bunky v kanáli. Sivé plné čiary označujú miesto, kde bolo urobené meranie na porovnanie s biologickými dátami.

Okrem rýchlosti bunky sme merali a porovnávali aj jej deformačný index. Výsledky tohto merania sú na Obr. 45. Môžeme si všimnúť, že hodnoty deformačného indexu sú porovnateľné s biologickými hodnotami v prvých dvoch zónach – teda v tej časti, kde je zhoda aj v rýchlosti numerickej a reálnej bunky. Na Obr. 45 môžeme vidieť priemerné hodnoty deformačného indexu vypočítané z priebehu 25 simulácií, so štandardnou odchýlkou, a ich porovnanie s dátami z biologického experimentu. Na Obr. 46 je uvedený konkrétny príklad priebehu deformačného indexu bunky zo simulácie, v závislosti od polohy bunky v kanáli.



Obr. 45: Porovnanie deformačného indexu buniek v kanáli v biologickom experimente a v numerickej simulácii.



Obr. 46: Pribeh deformačného indexu jednej bunky v simulácii, v závislosti od polohy bunky v kanáli. Sivé plné čiary označujú miesto, kde bolo urobené meranie na porovnanie s biologickými dátami.

## 5.4 Zhrnutie a diskusia

Cieľom tejto štúdie bolo porovnať výsledky numerickej simulácie s výsledkami z biologického experimentu, aby sme mohli overiť, či sú simulačné parametre nastavené dobre. Použili sme na to experiment s mikrofluidickým kanálikom s variabilnou šírkou. Rýchlosť tekutiny v kanáli bola vypočítaná na základe informácií o rýchlosti šmyku v biologickom experimente.

V numerickej simulácii sa nám podarilo nastaviť tok tekutiny tak, že jej rýchlosť je porovnateľná s rýchlosťou v laboratórnych podmienkach v zóne 1 a v zóne 2. S danými parametrami tekutiny – s danou hustotou a viskozitou – sa nám nepodarilo nastaviť tok v kanáli tak, aby rýchlosť tekutiny zodpovedala nameranej rýchlosti šmyku z experimentu vo všetkých častiach kanála. Jedným z dôvodov, prečo sme v niektorých častiach kanála dostali odlišnú rýchlosť v porovnaní s experimentom, môže byť nejednoznačná interpretácia niektorých parametrov vo vzťahu na výpočet rýchlosti tekutiny z rýchlosti šmyku.

Náš hlavný cieľ bolo ale sledovanie deformácie bunky. Prvým záverom je, že porovnávanie deformačného indexu bunky nemôžeme robiť spoľahlivo v tých častiach kanála, kde nemáme porovnateľnú rýchlosť toku tekutiny. Tok tekutiny v rýchlom režime bol v numerickom experimente väčší ako v tom biologickom. V zónach 1 a 2 sme namerali porovnateľnú rýchlosť, prechod zo zóny 2 do zóny 3 bol odlišný, a prechod zo zóny 3 do zóny 4 bol kvalitatívne podobný v biologickom aj numerickom experimente, kde rýchlosť tekutiny klesla pri prechode z tretej zóny do štvrtej na polovicu. Hodnota rýchlosti tekutiny v zóne 3 a 4 sa líši iba o násobiacu konštantu, ak medzi sebou porovnáваме simulačný a biologický experiment. Môžeme si všimnúť, že podobný vzťah možno nájsť aj v grafe pre deformačný index. Hodnoty DI v zónach 3 a 4 v simulácii sa od výsledkov z biologického experimentu líšia o konštantný násobok. Problematická časť kanála je prechod z úzkej časti (zóny 1 a 2) do širokej časti (zóny 3 a 4).

Preto sme z porovnávaní vyradili zónu 3 a zónu 4, a zamerali sme sa na dáta zo zón 1 a 2, kde sme dozišli zhodu v rýchlosti bunky. Ako môžeme vidieť na Obr. 43, priemerná rýchlosť v zóne 1 je o 4,6% menšia ako rýchlosť nameraná v biologickom experimente. Rýchlosť v zóne 2 je o 1,5% menšia ako v biologických podmienkach. Na Obr. 45 môžeme vidieť, že hodnoty deformačného indexu v týchto dvoch zónach sú tiež porovnateľné. Štandardná odchýlka od priemernej hodnoty DI v simulácii je 0,062 a 0,066 v zónach 1 a 2. Ak porovnáme priemerné hodnoty DI zo simulačného a biologického experimentu, dostaneme 9,7% rozdiel v hodnotách v zóne 1 a 5,1% rozdiel v hodnotách v zóne 2. Rozdiely medzi numerickými bunkami a tými reálnymi sú v tejto simulácii menšie ako 10%, v porovnateľných častiach experimentu.

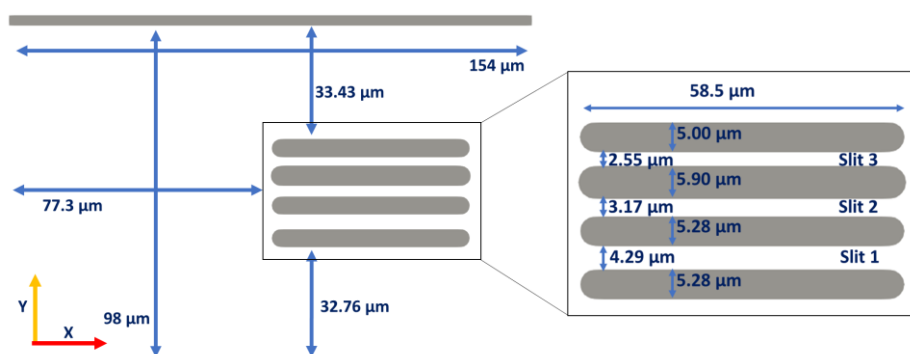


## 6 Príklad aplikácie: Modelovanie toku krviniek v úzkych priestoroch

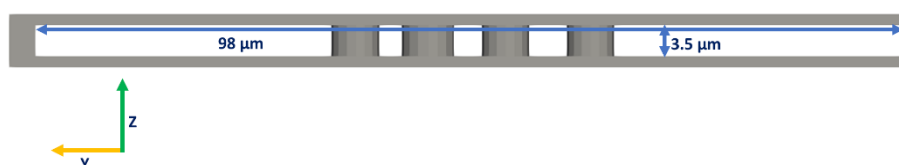
### 6.1 Dizajn experimentu

Mikrofluidné zariadenie a experiment, ktoré sme si vybrali na ďalšiu validáciu nášho numerického modelu, boli zostavené na Univerzite v Osake. Bunky v tomto zariadení sú deformované, keď prechádzajú cez úzke štrbiny, ktoré sú v ňom vytvorené. Z experimentu je k dispozícii aj videozáznam, ktorý tiež môže pomôcť pochopiť správanie buniek. Podrobný popis experimentu sa nachádza v [23].

Šírka zariadenia bola  $3,5 \mu\text{m}$ . Rozmery najväčšej bunky v našich numerických experimentoch sú  $7,82 \times 7,82 \times 2,57 \mu\text{m}$ . To znamená, že rotácia buniek v experimente je obmedzená na horizontálnu rovinu a tým pádom je deformácia v úzkych štrbinách dobre definovaná, a jasne určiteľná pri pohľade zvrchu. Na Obr. 47 a Obr. 48 je uvedená podrobná geometria mikrofluidického zariadenia, ktorá bola použitá pre numerický experiment.



Obr. 47: Dizajn a rozmery mikrofluidického zariadenia – pohľad zvrchu. Tekutina v ňom tečie zľava doprava, v smere osi X.



Obr. 48: Dizajn a rozmery mikrofluidického zariadenia – pohľad z boku.

Tekutina použitá v experimente je krv zriedená s roztokom soli, v pomere 1:50 pre krv:roztok. Vzorky krvi použité v experimente boli odobraté piatim rôznym mužským dobrovoľníkom. Rozloženie veľkosti krviniek bolo teda pre každú vzorku iné. Pre všetky vzorky ale platilo, že veľkosť priemeru krvinky sa pohybovala v rozmedzí  $5,3 \mu\text{m} - 8,0 \mu\text{m}$ .

Tlak tekutiny v zariadení bol udržiavaný v biologických podmienkach na konštantnej hodnote 0,7 kPa. Rýchlosť buniek v širokej časti kanála bez prekážok bola približne 0,6  $\mu\text{m}/\text{ms}$ , ako vidieť zo záznamov experimentu na obrázkoch v článku [23].

## 6.2 Výpočet závislosti rýchlosti bunky od jej deformácie

Ako bolo spomenuté v predošlej kapitole, bunky, ktoré vchádzajú do zúžených častí kanála, majú rôzny priemer. To znamená, že každá má pri prechode inú mieru deformácie. Normalizovaná deformácia, ktorá bola použitá v článku [23], a ktorú budeme používať aj my, je definovaná nasledovným spôsobom:

$$\varepsilon = \frac{D-w_i}{D} \quad (18)$$

Kde  $D$  je priemer bunky, a  $w_i$  je šírka  $i$ -tej zúženiny. V numerickej simulácii sú bunky dokonale kruhové v X-ovom a Y-ovom smere, takže sa netreba zaoberať odchýlkami, napríklad eliptickými bunkami. Čím väčšia je hodnota  $\varepsilon$ , tým viac je bunka deformovaná.

Rýchlosť bunky prechádzajúcej zúženinou bola v článku [23] tiež normalizovaná, vzhľadom na rýchlosť toku tekutiny v mikrofluidickom zariadení. Takáto normalizovaná rýchlosť sa počíta nasledujúcim spôsobom

$$v_n = \frac{v_c}{v_f} \quad (19)$$

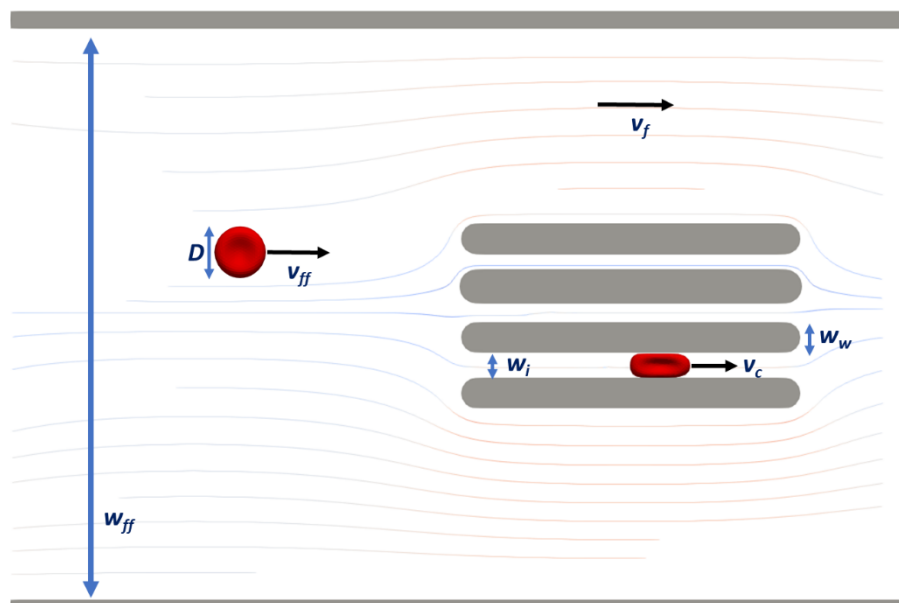
Kde  $v_c$  je rýchlosť bunky pohybujúcej sa v zúženine, a  $v_f$  je priemerná rýchlosť tekutiny tečúcej v časti kanála s redukovaným prierezom.

Hodnota rýchlosti  $v_f$  sa dá v numerickom experimente získať veľmi jednoducho, keďže o každom mieste v kanáli vieme, ako rýchlo tadiaľ tekutina preteká. Stačilo by vziať do úvahy všetky body v želanom priereze (v našom prípade pre konkrétnu hodnotu súradnice X), zistiť X-ovú zložku rýchlosti vo všetkých bodoch tekutiny nachádzajúcich sa na tomto priereze, a nakoniec urobiť aritmetický priemer z týchto všetkých hodnôt rýchlostí. Tento postup však z pochopiteľných dôvodov nie je použiteľný v biologických podmienkach, kde nepoznáme rýchlostné pole tekutiny do takých detailov ako v numerickej simulácii. Preto, ak chceme porovnať výsledky numerického a biologického experimentu, musíme vo vyhodnocovaní simulácie byť konzistentní s biologickým experimentom. Na určenie rýchlosti tekutiny  $v_f$  použijeme rovnaký postup, aký bol použitý v biologických podmienkach. Rýchlosť tekutiny budeme považovať za rovnakú ako rýchlosť nedeformovaných buniek, ktoré v nej plávajú, v najširšej časti kanála. S týmto

predpokladom, a s predpokladom, že objemový prietok tekutiny je konštantný na každom priereze kanála, môžeme spočítať rýchlosť  $v_f$  nasledujúcim spôsobom:

$$v_f = v_{ff} \frac{w_{ff}}{w_{ff} - \sum w_w} \quad (20)$$

Kde  $v_{ff}$  je rýchlosť voľnej bunky v najširšej časti kanála pred tým, ako vojde do štrbiny alebo do postrannej časti kanála,  $w_{ff}$  je vnútorná šírka kanála, a  $w_w$  je postupne šírka štyroch prekážok tvoriacich štrbinu. Schématická interpretácia použitých rozmerov a rýchlostí je zobrazená na Obr. 49.



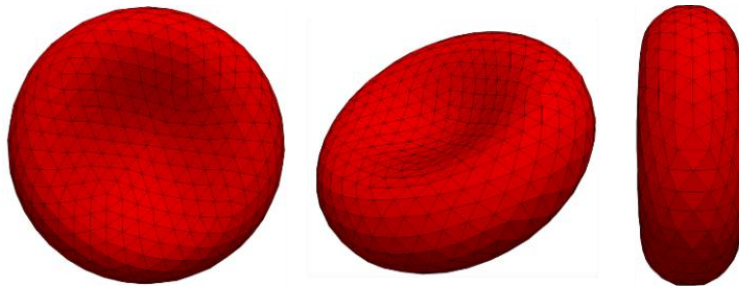
Obr. 49 Znáznornenie rozmerov kanála a rýchlostí buniek a tekutiny, potrebných na výpočet normovanej deformácie a normovanej rýchlosti bunky.

Takto sme získali normovanú deformáciu a normovanú rýchlosť buniek prechádzajúcimi tromi zúženiami v kanáli. Závislosť deformácie od rýchlosti buniek je vlastnosť, ktorá bola skúmaná v článku [23]. Táto závislosť bola vynesená do grafov, kde každá bunka bola v grafe reprezentovaná jedným bodom. Cieľom biologického experimentu bolo ukázať, že závislosť deformácie bunky od jej rýchlosti sa dá určiť presnejšie, ak je na experiment použitá geometria s viacerými rôznymi zúženiami, v porovnaní s experimentom s jedinou štrbinou. Výsledky boli použité na určenie korelačného koeficientu medzi nameranými hodnotami a ich lineárnou regresiou. Pre naše účely nie je zaujímavý tento korelačný koeficient, ale sklon priamky, ktorá je lineárnou regresiou nameraných biologických dát. Podrobnejší popis a porovnanie biologických výsledkov a výsledkov z numerickej simulácie bude v kapitole 6.4 Výsledky.

### 6.3 Popis nastavenia numerického experimentu

Verzia softvéru ESPResSo, ktorá bola použitá na simuláciu tohto problému, je commit hash f9a61c3f 6696da8d4de626ff11ae1a7534e4a2bd.

Numerický model bunky použitý pre túto simuláciu obsahuje 642 uzlov, pospájaných elastickými väzbami. Detail použitého modelu bunky je na Obr. 50. Tento model bol použitý pre štyri rôzne veľkosti buniek v experimente. Zoznam rôznych veľkostí použitých buniek je v Tab. 4. Hodnoty elastických koeficientov, ktoré definujú deformačné vlastnosti buniek, sme vybrali rovnaké pre všetky štyri rôzne veľkosti buniek. Tieto elastické koeficienty sú zhrnuté v Tab. 5. Interakcia medzi bunkami a prekážkami je definovaná štyrmi koeficientami, podobne ako aj vzájomná interakcia medzi uzlami definujúcimi povrch jednej bunky. Interakčné koeficienty pre tieto dva typy interakcií sú zhrnuté v Tab. 6. Zvyčajne treba definovať aj koeficienty pre medzibunkovú interakciu. Tentoraz však v simulácii nebude dochádzať k vzájomnej kolízii medzi bunkami, preto tento typ interakcie nie je nutné definovať.



Obr. 50: Model bunky použitý v simulácii.

Tab. 4: Rozmery buniek použité v simulácii.

Veľkosť bunky	Priemer	Hrúbka
Veľkosť 1	7,82 $\mu\text{m}$	2,57 $\mu\text{m}$
Veľkosť 2	7 $\mu\text{m}$	2,30 $\mu\text{m}$
Veľkosť 3	6 $\mu\text{m}$	1,97 $\mu\text{m}$
Veľkosť 4	5 $\mu\text{m}$	1,64 $\mu\text{m}$

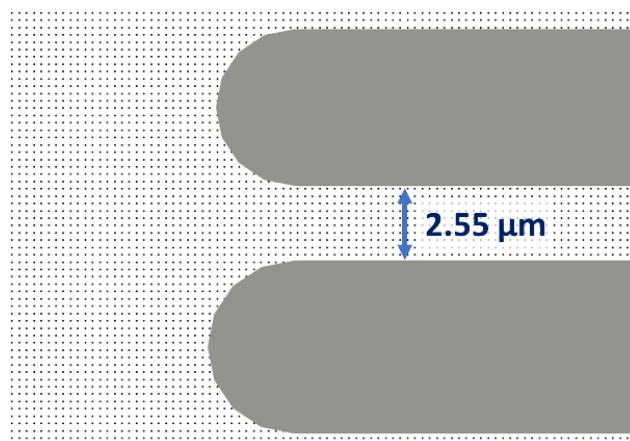
Tab. 5: Hodnoty elastických koeficientov pre červené krvinky v simulácii.

Parameter	LB jednotky	SI jednotky
Koeficient pružnosti $k_s$	$5,56 \cdot 10^{-3}$ LN/Lm	$5,56 \cdot 10^{-6}$ N/m
Ohýbací koeficient $k_b$	$7 \cdot 10^{-3}$ LNLm	$7 \cdot 10^{-18}$ Nm
Koeficient zachovania lokálnej plochy $k_{al}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$ LN/Lm	$2,3 \cdot 10^{-5}$ N/m
Koeficient zachovania celkovej plochy $k_{ag}$	0,7 LN/Lm	$7 \cdot 10^{-4}$ N/m
Koeficient zachovania objemu $k_v$	0,9 LN/Lm <sup>2</sup>	$9 \cdot 10^2$ N/m <sup>2</sup>
Viskozita bunkovej membrány	0 Lm <sup>2</sup> /Ls	0 m <sup>2</sup> /s

Tab. 6: Interakčné koeficienty pre interakciu medzi bunkou a stenou, a pre vzájomnú interakciu medzi bodmi na povrchu tej istej bunky.

Typ interakcie	a	n	cutoff	offset
Intrakcia bunka-stena	$1 \cdot 10^{-4}$ [-]	1,2 [-]	$7,5 \cdot 10^{-2}$ Lm $7,5 \cdot 10^{-8}$ m	0
Interakcia bunkovej steny samej so sebou	$2 \cdot 10^{-3}$ [-]	1,5 [-]	0,5 Lm $5 \cdot 10^{-7}$ m	0

Tekutina bola modelovaná s diskretizáciou 0,25  $\mu$ m. Táto diskretizácia bola definovaná vzhľadom na veľkosť najmenšieho priestoru, kam sa v simulácii bunky mohli dostať. Štúdia optimálneho vzorkovania tekutiny pre tento konkrétny prípad je uvedená v článku [24]. Na Obr. 51 môžeme vidieť, ako presne vyzerá rozloženie lb-gridu na modelovanie tekutiny, v porovnaní s rozmerom najužšej časti mikrofluidického zariadenia.



Obr. 51: Numerický model tekutiny, so znázornenými uzlami tvoriacimi lattice-Boltzmannovu mriežku. Tekutina je znázornená v okolí najužšej štrbiny s hrúbkou 2,55  $\mu\text{m}$ .

Simulačný box mal po stranách v smere osi Y a Z pevné steny, v smere osi X boli hranice kanála definované ako periodické. Numerické parametre tekutiny a všeobecné simulačné parametre sú zhrnuté v Tab. 7.

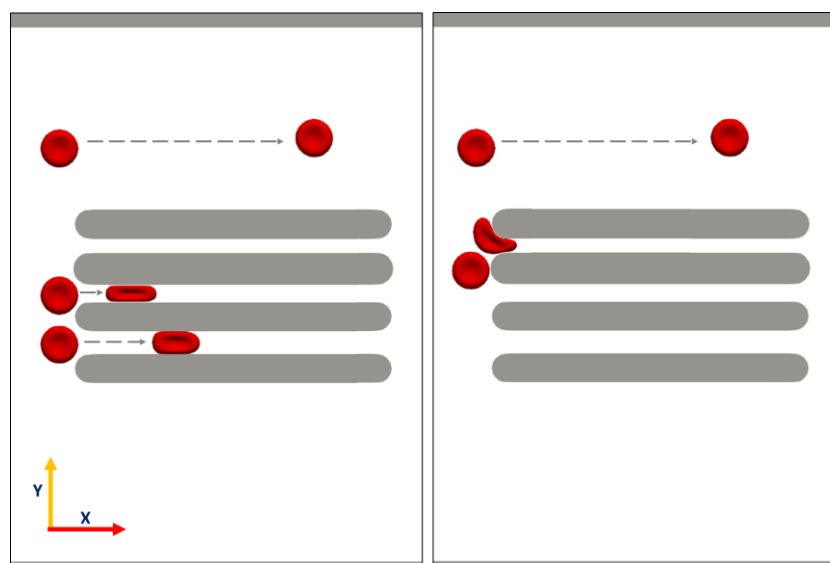
Tab. 7: Numerické parametre tekutiny a iné simulačné parametre.

Parameter	LB jednotky	SI jednotky
Hustota tekutiny	1 Lkg/Lm <sup>3</sup>	$1 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$
Kinematická viskozita tekutiny	1 Lm <sup>2</sup> /Ls	$1 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$
Koeficient trenia	0,43 LNLs/Lm	$4,3 \cdot 10^{-10} \text{ Ns/m}$
Priestorová diskretizácia - Lb-grid	0,25 Lm	$2,5 \cdot 10^{-7} \text{ m}$
Časový krok	0,05 Ls	$5 \cdot 10^{-8} \text{ s}$
Sila prúdenia tekutiny	$4,5 \cdot 10^{-4} \text{ LN/Lm}^3$	$4,5 \cdot 10^5 \text{ N/m}^3$

Simulácie s takouto jemnou tekutinovou mriežkou sú časovo náročné. Ak totiž zmenšíme priestorovú diskretizáciu tekutiny na polovicu, bude sa v nej nachádzať  $2^3$  krát viac bodov, a teda aj výpočtový čas potrebný na simuláciu môže byť 8 krát dlhší. Preto sme sa rozhodli pri ich spúšťaní nemodelovať pôvodný experiment s originálnym hematokritom. Namiesto toho sme do kanála umiestnili dve až štyri bunky na špecifické pozície, ktoré zaručovali, že bunky počas simulácie prejdú navrhnutými zúženiami. Takýmto spôsobom sme získali rýchlosti buniek v štrbinách. Na to, aby sme získali rýchlosť nedeformovanej bunky v otvorenej časti kanála, sme jednu bunku inicializovali na také miesto, aby prešla

postrannou časťou simulačného boxu popri zúženinách. Táto bunka sa rýchlo dostala do otvorenej časti kanála, kde sme namerali jej rýchlosť  $v_f$ .

Simulácie s bunkami o priemere  $7,82 \mu\text{m}$ ,  $7 \mu\text{m}$  a  $6 \mu\text{m}$  boli pustené dvakrát. Prvýkrát sme ich pustili s tromi bunkami, kde jedna prechádzala postrannou časťou kanála, druhá prechádzala stredne širokou štrbinou, a posledná prechádzala najširšou štrbinou. Druhýkrát sme ich pustili s dvoma bunkami, kde jedna prechádzala postrannou časťou kanála a druhá najužšou štrbinou. Počiatočná poloha buniek v týchto simuláciách je znázornená na Obr. 52.



Obr. 52: Počiatočná poloha buniek v numerickej simulácii, a ich poloha po 300 simulačných krokoch. Príklad usporiadania je uvedený pre bunky s priemerom  $7 \mu\text{m}$ .

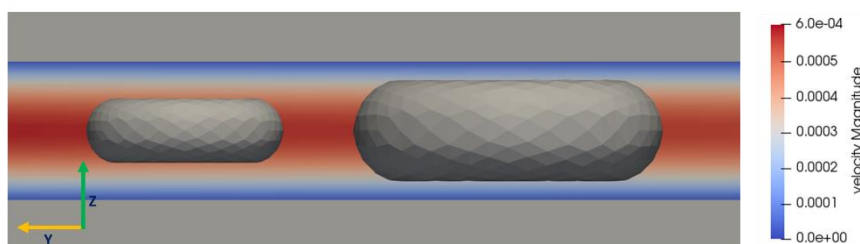
Príčinou toho, že sme nemohli pustiť všetky štyri bunky v jednej simulácii, bola veľkosť jednotlivých buniek. Ak porovnáme ľavú a pravú časť Obr. 52, môžeme si všimnúť, že ak by sme bunky v týchto simuláciách uložili do jednej spoločnej simulácie, prekrývali by sa navzájom. Ak by sme chceli modelovať všetky štyri bunky bez prekrývania, tak by sa bunka, ktorá by mala prejsť najvyššie položenou štrbinou, vyhla svojmu cieľu a obišla by ju zvrchu. Vložiť všetky štyri bunky do jednej simulácie bolo možné iba pre bunky s priemerom  $5 \mu\text{m}$ , ktoré sú dostatočne malé na to, aby sa vošli do jednej simulácie a aby každá z nich prešla tou medzerou, pre ktorú bola pripravená.

## 6.4 Výsledky

V tejto kapitole ukážeme, ako sme spracovávali výsledky z numerickeho experimentu a ako sme ich porovnávali s biologickým experimentom.

Najprv sme potrebovali určiť rýchlosť  $v_f$  tekutiny v redukovanej časti kanála a deformáciu buniek, ktoré prechádzajú cez zúžené časti. Určenie obidvoch týchto parametrov so sebou nesie určitú nepresnosť.

Najprv budeme hovoriť o rýchlosti tekutiny  $v_f$  v redukovanej časti kanála. V biologických podmienkach bola táto rýchlosť určená podľa rýchlosti nedeformovaných buniek v širokej časti kanála bez prekážok. V experimente sme však zistili, že nie všetky bunky plávajú rovnako rýchlo a že ich rýchlosť závisí od ich veľkosti. Menšie bunky plávali rýchlejšie a väčšie bunky plávali pomalšie. Tento jav sa dá vysvetliť, ak si všimneme polohu buniek rôznych veľkostí vzhľadom na rýchlostné pole tekutiny v simulácii, Obr. 53. Najmenšia bunka je viac ovplyvnená rýchlou tekutinou v strede kanála, kým väčšia bunka zaberá v kanáli viac miesta a je viac ovplyvnená pomalšie tečúcou tekutinou pri okrajoch kanála. Rôzne rýchlosti buniek, ako aj od nich závislá priemerná rýchlosť tekutiny na zredukovanom priereze kanála, sú zhrnuté v Tab. 8. Na vyhodnotenie dát zo simulácie sme použili priemernú rýchlosť tekutiny v redukovanom priereze kanála, ktorú sme vypočítali zo všetkých štyroch získaných hodnôt.



Obr. 53: Poloha rôzne veľkých buniek v rýchlostnom poli tekutiny, pohľad v smere toku. Menšia bunka je unášaná rýchlou tekutinou v strede kanála, v porovnaní s väčšou bunkou, ktorá je viac ovplyvnená pomalšou tekutinou pri stenách mikrofluidického kanála.

Ďalšia nejednoznačnosť sa objavuje pri určení deformácie buniek pohybujúcich sa v úzkych štrbinách. Zdrojom tejto nejednoznačnosti je medzera medzi prekážkou a bunkou, ktorá je v numerickom modeli prítomná a je nevyhnutná na konvergenciu modelu. Veľkosť tejto medzery je definovaná parametrom `cutoff` v interakcii medzi prekážkami a bunkami. Dôležitosť toho priestoru spočíva v tom, že pôsobí preventívne proti vniknutiu bunky do prekážky. Ak sa nejaká časť povrchu bunky dostane do tohto priestoru, v nasledujúcom kroku simulácie na ňu budú pôsobiť odpudivé sily, ktoré ju budú nútiť sa z tohto priestoru dostať preč. Táto medzera je dôležitá najmä v prípade, ak bunka smeruje priamo na prekážku a mohla by sa na ňu „napichnúť“. Ale tento interakčný koncept je prítomný v celej simulácii,



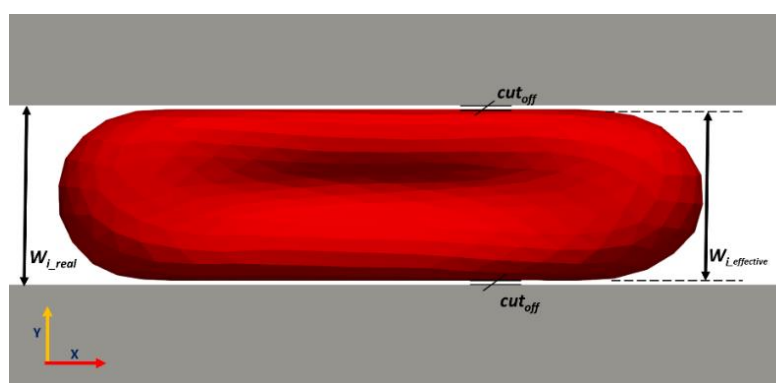
Tab. 8: Rýchlosti nedeformovaných buniek vo voľnom poli a im prislúchajúca priemerná rýchlosť tekutiny v redukovanom priereze, pre rôzne veľkosti buniek

Priemer bunky	Rýchlosť nedeformovanej bunky	Priemerná rýchlosť tekutiny v redukovanom priereze
7,82 $\mu\text{m}$	$3,9 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$	$5,1 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$
7 $\mu\text{m}$	$4,3 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$	$5,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$
6 $\mu\text{m}$	$4,6 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$	$6,0 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$
5 $\mu\text{m}$	$4,9 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$	$6,4 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$
Priemerná hodnota		$5,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$

na hociktorom okraji prekážky, a teda aj v kanálikoch, kde už bunka pláva v ustálenom stave. Detailnejšie vysvetlenie mechanizmu interakcie medzi bunkou a prekážkou sa dá nájsť v [11]. Efektívna šírka zúženiny pre pohyb bunky by sa teda dala vypočítať nasledovným spôsobom:

$$w_{i\_effective} = w_{i\_real} - 2cut_{off} \quad (21)$$

Kde  $w_{i\_real}$  je skutočný rozmer zúženiny, a  $cut_{off}$  je veľkosť medzery medzi prekážkou a bunkou. Rozdiel medzi veľkosťou  $w_{i\_real}$  a  $w_{i\_effective}$  je v tomto prípade približne 5%. Grafické znázornenie týchto parametrov si môžeme pozrieť na Obr. 54.

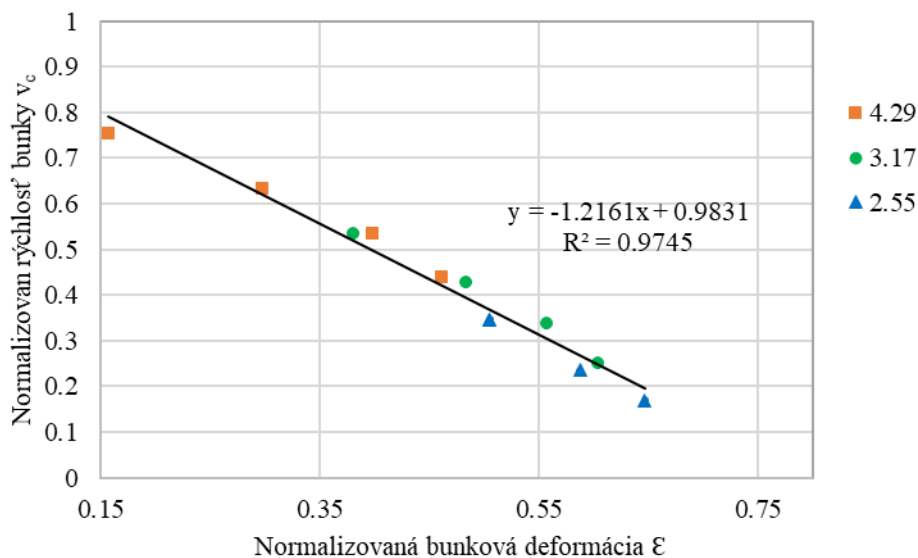


Obr. 54: Efektívna šírka štrbiny pre bunku v numerickej simulácii je menšia ako jej reálna šírka, kvôli prítomnosti medzery medzi prekážkami a bunkami. Táto medzera je spôsobená interakčným koeficientom  $cut_{off}$  a pôsobí ako prevencia preniknutia bunky a prekážky.

Na vyhodnotenie výsledkov numerickej simulácie sme vypočítali normalizovanú deformáciu bunky s obidvoma hodnotami  $w_i$ , a následne sme na ďalšie spracovanie použili priemernú hodnotu z týchto dvoch deformácií.

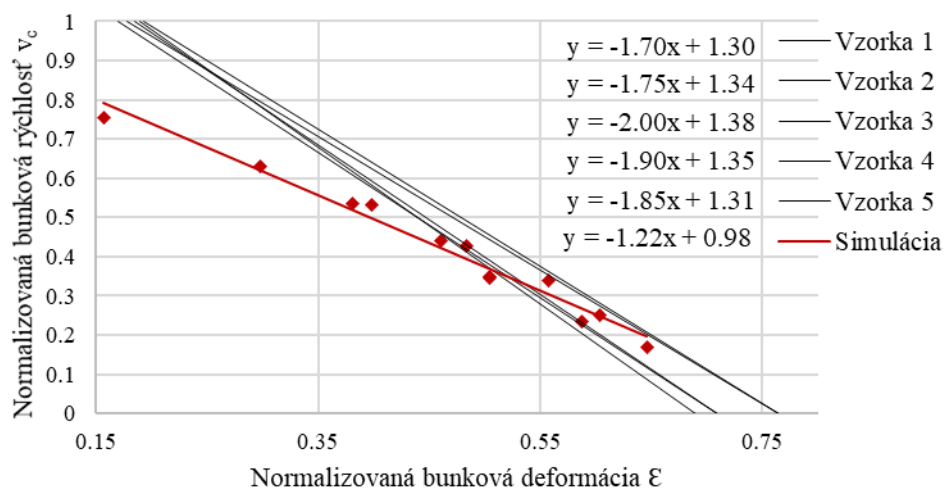
Zo simulačného experimentu sme nakoniec získali 11 meraní. Každou zúženinou prešli štyri bunky s rôznymi veľkosťami. Jediná výnimka bola najužšia štrbina so šírkou 2,55  $\mu\text{m}$ , kam sa najväčšia bunka nedostala. Pri každej simulácii sa tejto štrbine vyhla a obišla ju cez postrannú časť kanála.

Získaná závislosť deformácie bunky od jej rýchlosti je znázornená na Obr. 55.



Obr. 55: Závislosť deformácie bunky od jej rýchlosti, dáta získané z numerickej simulácie. Oranžové štvorcíky sú pre zúženinu šírky 4,29  $\mu\text{m}$ , zelené krúžky pre zúženinu šírky 3,17  $\mu\text{m}$ , a modré trojuholníčky pre zúženinu s rozmerom 2,55  $\mu\text{m}$ .

Priamka, ktorá vznikla ako lineárna regresia týchto nameraných bodov, má sklon -1,22. Túto hodnotu sme porovnávali so sklonmi priamok získanými z biologického experimentu. Ako sme už spomínali, v biologickom experimente bolo skúmaných 5 vzoriek odobratých piatim mužským dobrovoľníkom. Každá z týchto vzoriek bola vyhodnotená zvlášť, takže pre každú poznáme parametre priamky zodpovedajúcej jej lineárnej regresii. Porovnanie týchto biologických a simulačných výsledkov je uvedené na Obr. 56 a v Tab. 9.



Obr. 56: Porovnanie výsledkov biologického experimentu (5 vzoriek) a numerickej simulácie. Legenda na obrázku zachytáva pre každú vzorku a pre simulačné dáta priamku ich lineárnej regresie.

Tab. 9: Hodnoty sklonu lineárnej regresie pre dáta získané z biologického experimentu a pre dáta získané z numerickej simulácie. Hodnoty sú zaokrúhlené na najbližší násobok 0,05.

Lab. experiment vzorka 1	Lab. experiment vzorka 2	Lab. experiment vzorka 3	Lab. experiment vzorka 4	Lab. experiment vzorka 5	Numerickej simulácia
-1.70	-1.75	-2.00	-1.90	-1.85	-1.20

Môžeme si všimnúť, že absolútna hodnota sklonu získaného z numerickej simulácie je menšia ako priemerná hodnota pre sklon získaná z biologického experimentu. Ak by sme z numerických dát vynechali prvé dva body, sklon krivky by sa zvýšil na -1,39.

Z Obr. 56 je vidno, že rýchlosť buniek v numerickej simulácii je menšia ako v biologických podmienkach. Tento rozdiel je viditeľný hlavne pre bunky prechádzajúce najširšou štrbinou (4,29  $\mu\text{m}$ ). Tieto bunky sú o 20-30% pomalšie v porovnaní s ekvivalentnými bunkami z biologického experimentu. V ostatných štrbinách je rýchlosť buniek v simulácii a v biologickom experimente podobnejšia. Simulované bunky v strednej štrbine (3,19  $\mu\text{m}$ ) sú o 4% pomalšie ako reálne bunky, a v najužšej štrbine (2,55  $\mu\text{m}$ ) je rozdiel rýchlostí simulovanej a reálnej bunky iba 2%.

## 6.5 Diskusia

V tejto časti budeme rozoberať možné dôvody, prečo bunky tečúce najširšou štrbinou v simulácii majú značne menšiu rýchlosť ako bunky v biologickom experimente.

Prvým dôvodom by mohla byť rýchlosť tekutiny v kanáli a v jednotlivých zúženinách. Pre numerický model bunky, ktorá vošla do štrbiny, sa už nevyskytuje priamy kontakt medzi prekážkami v kanáli a bunkou. Ako sme napísali vyššie, medzi týmito dvoma elementami sa nachádza medzera pevnej šírky, ktorá slúži na zamedzenie preniknutia krvinky do vnútra prekážky. Zdeformovaná bunka sa pohybuje cez zúženie iba vplyvom tekutiny, ktorá ju unáša, a nie je priamo ovplyvnená tým, že sa po ceste ešte trie o prekážku. Toto trenie by sa dalo zaradiť do modelu vo forme adhézie, teda akéhosi priľnutia bunky o prekážku, zatiaľ však táto vlastnosť v modeli ešte nie je implementovaná. V každom prípade, jej prítomnosť by bunky na ich ceste pomedzi zúženiny určite nezrýchľila, práve naopak. Môžeme si však overiť, či rýchlosť kvapaliny v štrbinách, ktorá unáša bunky, nie je v našom numerickom modeli menšia ako očakávaná výsledná rýchlosť buniek.

Na preverenie toho, či je problém v rýchlosti kvapaliny, sme porovnali maximálnu rýchlosť kvapaliny v jednotlivých štrbinách a v otvorenej časti kanála. Ak aproximujeme rýchlosť buniek v jednotlivých častiach kanála takouto rýchlosťou tekutiny, môžeme podľa vzťahu (19) vypočítať normovanú rýchlosť buniek  $v_n$ . V Tab. 10 sú zhrnuté hodnoty rýchlosti kvapaliny v jednotlivých zúženinách, ako aj dopočítaná aproximácia rýchlosti  $v_n$ . Pre porovnanie uvádzame aj hodnoty  $v_n$  získané z nasimulovaných buniek, pomocou vzťahov (19) a (20), tak, ako to bolo popísané v kapitole 6.2.

Z hodnôt v tabuľke môžeme vidieť, že tekutina v simulácii prúdi cez štrbiny výrazne rýchlejšie ako tadiaľ prechádzajú bunky. Ďalej ak porovnáme hodnoty  $v_n$  získané zo simulovaných buniek a z biologického experimentu, môžeme konštatovať, že prakticky všetky hodnoty namerané v simulácii sú zastúpené aj v meraniach z biologického experimentu. Z týchto pozorovaní zatiaľ vyplýva, že prúdenie tekutiny v kanáli je v súlade s experimentom.

Na druhú stranu si môžeme všimnúť zaujímavú tendenciu, ak porovnáme aproximovanú hodnotu rýchlosti  $v_n$  s hodnotami z biologického experimentu (podobnú tendenciu, aj keď menej výraznú, si môžeme všimnúť aj keď porovnáme rýchlosť kvapaliny s rýchlosťou buniek zo simulácie). Pre úzku štrbinu je normovaná rýchlosť tekutiny ostro väčšia ako hodnoty  $v_n$  získané z biologického experimentu. Pre strednú štrbinu je normovaná rýchlosť

tekutiny porovnateľná s maximum nameraných hodnôt  $v_n$  z biologického experimentu. No a pre širokú štrbinu je normovaná rýchlosť tekutiny rovnaká ako maximum pre bunky namerané v biologických podmienkach.

Tab. 10: Hodnoty rýchlosti kvapaliny namerané v jednotlivých štrbinách, aproximovaná hodnota normovanej rýchlosti  $v_n$  a jej porovnanie s hodnotami získanými zo simulovaných buniek

	Rýchlosť tekutiny [ $\mu\text{m}/\mu\text{s}$ ]	Normovaná rýchlosť $v_n$ [-]		
		Aproximácia cez rýchlosť kvapaliny	Max a Min získané zo simulácie buniek	Max a Min získané z biologického experimentu
Úzka štrbina	$4,30 \cdot 10^{-4}$	0,61	0,17 - 0,35	0,07 - 0,40
Stredná štrbina	$5,74 \cdot 10^{-4}$	0,81	0,25 - 0,53	0,15 - 0,77
Široká štrbina	$6,94 \cdot 10^{-4}$	0,98	0,44 - 0,75	0,45 - 0,98
Otvorený kanál v oblasti bez štrbín ( $v_{ff}$ )	$5,5 \cdot 10^{-4}$	-	-	-
Postranná časť kanála ( $v_f$ )	$*7,79 \cdot 10^{-4}$	-	-	-

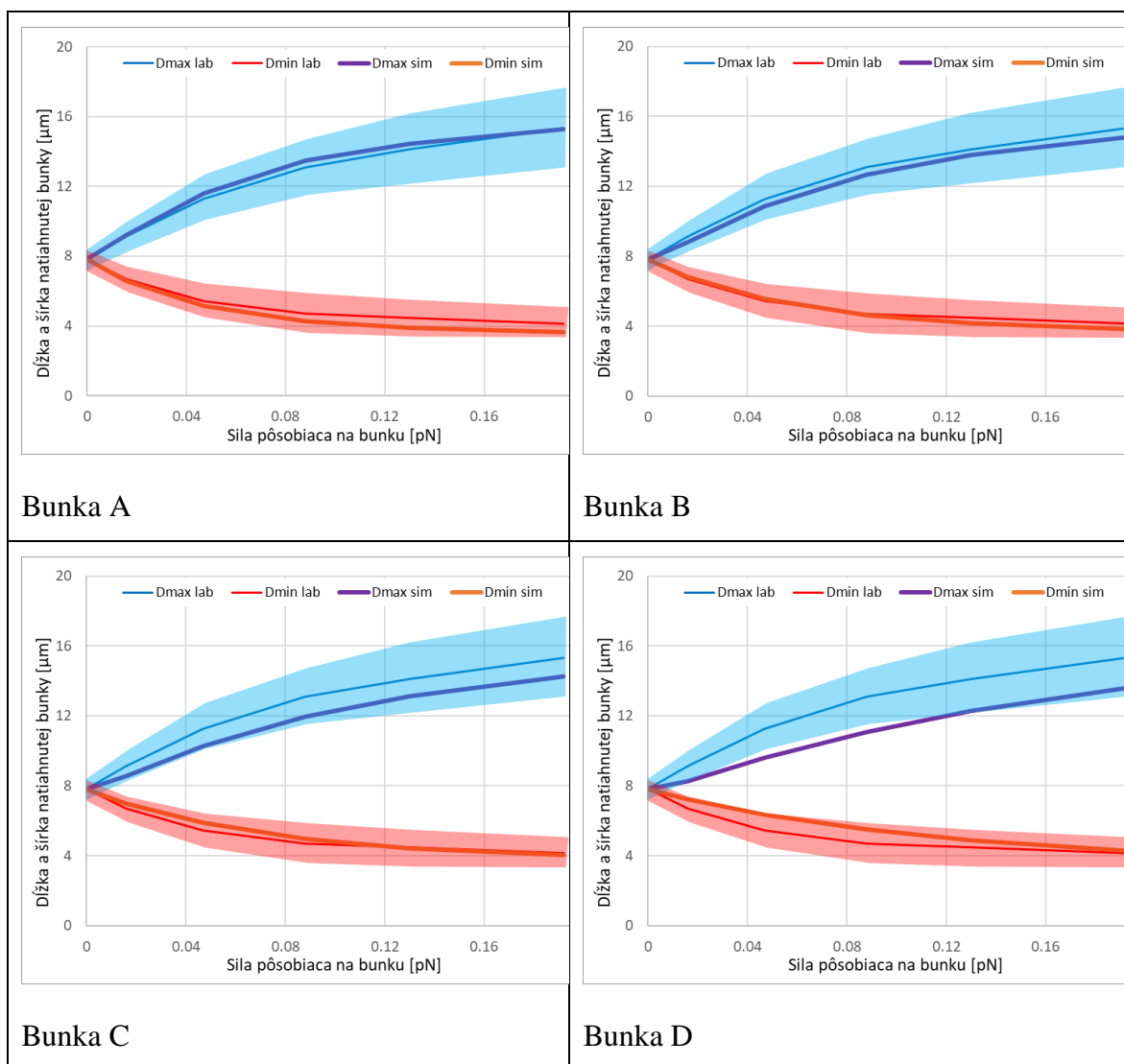
\* Rýchlosť tekutiny  $v_f$  v otvorenom kanáli na úrovni štrbín sa dá získať dvomi spôsobmi: buď ju priamo odmeriame, alebo ju môžeme dopočítať pomocou rýchlosti  $v_{ff}$  a rozmerov kanála. V tabuľke je uvedená druhá možnosť. Rozdiel medzi rýchlosťami dopočítanými týmito dvoma spôsobmi je približne 19%. Avšak pre účely porovnania normovanej rýchlosti kvapaliny a normovanej rýchlosti bunky tento rozdiel nie je až taký dôležitý, v oboch prípadoch môžeme urobiť kvalitatívne rovnaké závery.

Vo všeobecnosti je v numerickej simulácii rýchlosť kvapaliny rovnaká alebo väčšia ako rýchlosť buniek, ktoré sa v nej pohybujú. Z predošlého porovnania rýchlostí tekutiny a biologických buniek vidíme, že bunky sa väčšinou pohybujú ostro pomalšie ako tekutina. Jediná výnimka z tohto pozorovania sú práve bunky tečúce cez najširšiu štrbinu, kde by mala byť ich rýchlosť porovnateľná s rýchlosťou kvapaliny. Práve toto môže byť jeden z dôvodov, prečo sú naše simulované bunky pomalšie ako tie reálne. Pôvod odlišnosti medzi simuláciou a biologickým experimentom môže tkvieť práve v istej nedokonalosti toku kvapaliny cez simulované mikrofluidické zariadenie.

## 6 Príklad aplikácie: Modelovanie toku krviniek v úzkych priestoroch

Druhý dôvod značného rozdielu medzi rýchlosťami numerických a reálnych buniek by mohol tkvieť v samotnej kalibrácii bunky. Pokiaľ by kalibrácia bola dobre nastavená pre také situácie, kde je bunka značne deformovaná, ale menej dobre pre menšie deformácie, mohlo by to vysvetliť namerané dáta. Znamenalo by to, že bunky plávajúce cez najširšiu štrbinu, ktoré sú najmenej deformované, by mohli mať nastavené elastické koeficienty menej dobre ako bunky, ktoré sú deformované viac prechodom cez užšie štrbiny.

Na preverenie tejto hypotézy sme skontrolovali, ako vyzerá kalibračná krivka pre elastické parametre použité v tejto numerickej simulácii. Potom sme na experiment použili aj bunky, ktoré majú iné elastické koeficienty a ich kalibračná krivka je tiež odlišná od referenčnej krivky [15]. Kalibračné krivky štyroch rôznych krviniek použitých na porovnanie sú zobrazené na Obr. 57, elastické koeficienty sú zhrnuté v Tab. 11.



Obr. 57: Kalibračné krivky pre štyri rôzne krvinky, ktoré boli použité na štúdiu vplyvu tvrdosti červenej krvinky na rýchlosť jej pohybu v skúmaných štrbinách. Tenká modrá a červená čiara sú krivky reálnej krvinky, hrubá fialová a oranžová čiara sú krivky simulovanej krvinky. Svetlomodrá a svetločervená oblasť sú odchýlky od nameraných priemerných biologických hodnôt.

Tab. 11: Elastické koeficienty štyroch krviniek, ktoré boli použité na štúdiu vplyvu tuhosti červenej krvinky na rýchlosť jej pohybu v skúmaných štrbinách. Bunka B je referenčná, to znamená, že táto bola použitá pri simulácii predošlých experimentov.

	Bunka A	Bunka B (referenčná)	Bunka C	Bunka D
$k_s$ [LN/Lm]	$4,37 \cdot 10^{-3}$	$5,56 \cdot 10^{-3}$	$6,75 \cdot 10^{-3}$	$1,03 \cdot 10^{-2}$
$k_b$ [LNLm]	$4,60 \cdot 10^{-3}$	$7,00 \cdot 10^{-3}$	$1,06 \cdot 10^{-2}$	$1,06 \cdot 10^{-2}$
$k_{al}$ [LN/Lm]	$1,83 \cdot 10^{-2}$	$2,30 \cdot 10^{-2}$	$2,54 \cdot 10^{-2}$	$2,54 \cdot 10^{-2}$
$k_{ag}$ [LN/Lm]	0,7	0,7	0,7	0,7
$k_v$ [LN/Lm <sup>2</sup> ]	0,9	0,9	0,9	0,9

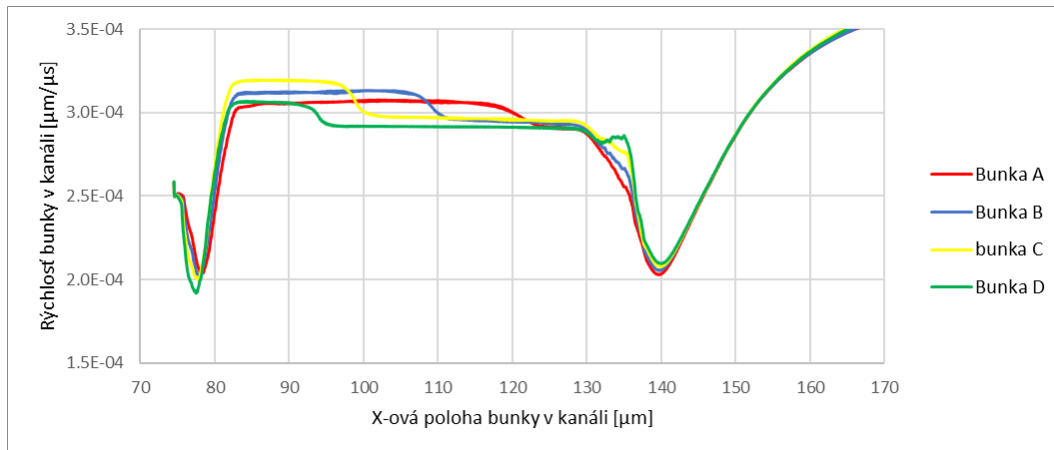
Experiment použitý na porovnanie bol taký, kde tri bunky s priemerom  $7 \mu\text{m}$  prechádzali cez postrannú časť kanála a cez dve najširšie štrbiny. Čo sa týka nastavení elastických koeficientov, bunka A je najmäkšia, bunka D je natvrďšia.

V spracovaní výsledkov sme sa zamerali na rýchlosť bunky v najširšej štrbine, a na porovnanie tejto rýchlosti pre rôzne tuhé bunky. Na Obr. 58 môžeme vidieť rýchlosť bunky v najširšej štrbine v štyroch rôznych simuláciách.

Prvá vec, ktorú si môžeme všimnúť, je rôzna rýchlosť jednej bunky počas toho, ako tečie cez štrbinu. Jednorazový pokles rýchlosti je spôsobený tým, že bunka sa v štrbine počas svojej cesty pootočí. Jednu časť štrbiny teda prepláva v horizontálnej polohe, a v druhej časti prechádza naklonená, podobne ako na Obr. 60.

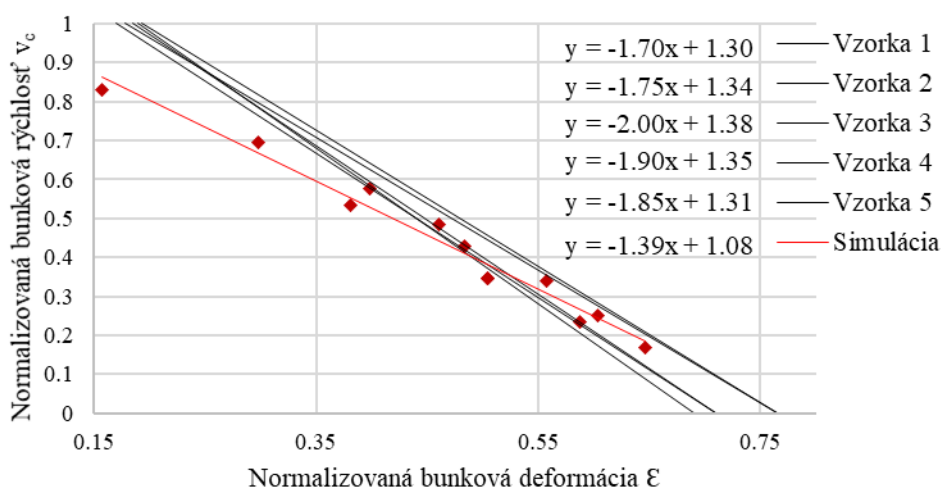
Hodnoty rýchlosti sa medzi bunkami líšia najviac o 10%. Neplatí ale, že čím je bunka „mäkšia“, tým je rýchlejšia, a neplatí to ani naopak. V horizontálnej polohe je najrýchlejšia bunka C, potom bunka B, a nakoniec bunky A a D sú rovnako rýchle.

## 6 Príklad aplikácie: Modelovanie toku krviniek v úzkych priestoroch



Obr. 58: Priebeh rýchlosti rôznych tuhých buniek cez najširšiu štrbinu.

Predpokladajme, že zmenou elastických koeficientov by sme mohli dosiahnuť o 10% vyššiu rýchlosť bunky v najširšej štrbine. Ak rýchlosti buniek zo simulácie v tejto najširšej štrbine vynásobíme koeficientom 1,1 a dáme do spoločného grafu s nezmenenými nameranými rýchlosťami v ostatných častiach kanála, dostaneme graf ako na Obr. 59. Sklon priamky, ktorou by sme tentoraz preložili naše dáta, by sa zmenil z -1,22 na -1,39. Táto hodnota ešte stále nie je dobre porovnateľná s nameranými dátami, avšak na tomto príklade vidno citlivosť simulácie na elastické vlastnosti krviniek.



Obr. 59: Porovnanie výsledkov z biologického experimentu a zo simulácie – namerané rýchlosti pre bunky prechádzajúce najširšou štrbinou sú navýšené o 10%.

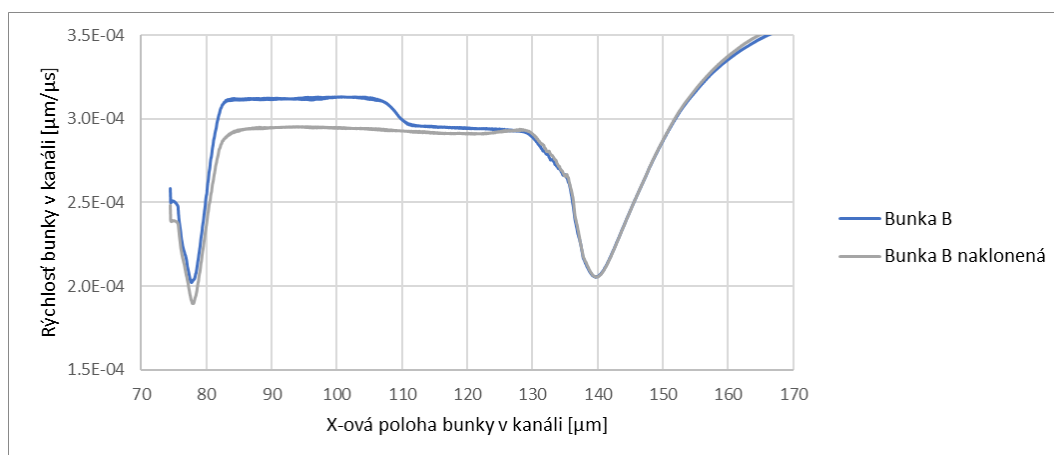
Ďalším dôvodom, prečo reálne a numerické krvinky nie sú rovnako rýchle, by mohla byť pozícia bunky v simulačnom kanáli. V ďalšom doplnujúcom experimente sme nechali cez najširšiu štrbinu prechádzať bunku, ktorá do nej nevstupovala priamo, ale s počiatočným vychýlením od horizontálnej roviny (Obr. 60). Porovnanie rýchlosti referenčnej bunky B



a naklonenej bunky, ktorá mala rovnaké nastavenie elastických parametrov ako bunka B, je na Obr. 61.



Obr. 60: Počiatočná poloha bunky v referenčnom experimente a v experimente, kde bola bunka od začiatku vychýlená od horizontálnej roviny.



Obr. 61: Porovnanie rýchlosti referenčnej bunky B a naklonenej bunky s rovnakými elastickými parametrami.

Môžeme si všimnúť, že naklonená bunka je približne o 6% pomalšia ako horizontálne orientovaná bunka. Takéto správanie je ľahko vysvetliteľné v simulácii – body na povrchu bunky, ktoré interagujú s tečúcou kvapalinou, sa pri naklonenej bunke nachádzajú bližšie ku okrajom štrbiny, a teda sú unášané pomalšou tekutinou. Horizontálne orientovaná bunka má väčšinu svojich povrchových bodov umiestnených v strede štrbiny, kde tekutina prúdi rýchlejšie.

Na mieste je otázka, či sa takéto správanie dá očakávať aj od reálnej bunky. Nebude sa táto pohybovať rýchlejšie, ak sa v úzkej štrbine nakloní, a tak sa bude menej trieť o steny prekážky? Odpoveď na túto otázku by sme sa mohli dozvedieť z podrobnejšieho skúmania reálneho experimentu.



## Záver

V tejto dizertačnej práci bolo rozobratých niekoľko tém, ktoré čiastočne nadväzujú na dizertačné práce [13] a [18]. V práci [13] sa okrem iného robila analýza výpočtového modelu. V práci bol prezentovaný vplyv diskretizácie kvapaliny na správanie objektov a na výpočtovú náročnosť. Boli tu ukázané a vysvetlené možnosti paralelizácie pri bunkových simuláciách. V práci [18] sa okrem iného riešila problematika určenia charakteristík modelu, pomocou ktorých by bolo možné vyhodnotiť podobnosť medzi biologickým a numerickým experimentom.

Na úvod tejto dizertačnej práce, v Kapitole 1, sme vysvetlili základné princípy modelovania tekutiny a vnoreného objektu v softvéri ESPResSo.

V Kapitole 2 sme sa venovali rotácii buniek. Rotácia buniek je charakteristika, pomocou ktorej môžeme porovnať správanie sa buniek v simulácii a v biologickom experimente. Zároveň je to aj charakteristika, ktorá vypovedá o tvare simulačného kanála, o rýchlosti kvapaliny, aj o bunkovom hematorite v zariadení. Rozobrali sme viacero prístupov, ako z dát zo simulácie a z videozáznamu možno vyhodnotiť rotáciu buniek. Zistili sme, že všetky použité prístupy určujú spoľahlivo rotáciu buniek, napriek tomu, že niektoré z nich využívali len obmedzené množstvo informácií o bunkách. Záver z tohto výskumu je taký, že ak budeme mať k dispozícii kvalitné videozáznamy z experimentov, budeme vedieť určiť rotáciu buniek v týchto experimentoch, a budeme ju vedieť porovnať s rotáciou nameranou v numerickej simulácii.

V Kapitole 3 sme sa venovali príprave a testovaniu numerickej simulácie. Cieľom bolo definovať parametre biologického experimentu, ktoré je treba poznať na prípravu numerickej simulácie. Tieto parametre treba mať na zreteli aj pri príprave simulácie, ktorá nie je inšpirovaná existujúcim experimentom. V takom prípade si treba uvedomiť, ktoré parametre zo simulácie budú, naopak, dôležité pri príprave ekvivalentného biologického experimentu.

V Kapitole 4 sme sa venovali vylad'ovaniu simulácie. Ak simulácia nie je prerušená žiadnou behovou chybou, ale napriek tomu správanie buniek v tejto simulácii nie je také, ako v biologickom experimente, problém môže byť práve v chybnom nastavení niektorých parametrov. V tejto kapitole ukazujeme, aké rôzne chyby môžu pri simulácii nastať, a aká by mohla byť ich príčina. Konkrétne sme poukázali na chyby, ktoré môžu vzniknúť

nesprávnym nastavením nasledujúcich parametrov: diskretizácia tekutinovej mriežky vzhľadom na geometriu simulačného kanála, diskretizácia bunkového povrchu, nesprávne nastavenie rýchlosti alebo viskozity kvapaliny, nesprávne nastavenie interakčných koeficientov, chybné rozostavenie prekážok v simulačnom boxe, alebo nesprávne nastavená paralelizácia.

V Kapitolách 5 a 6 sme sa venovali konkrétnej aplikácii vyššie spomenutých myšlienok. Cieľom bolo urobiť numerickú simuláciu už existujúceho biologického experimentu. Porovnaním výsledkov biologického a numerického experimentu môžeme vyhodnotiť, do akej miery je náš numerický model spoľahlivý a schopný nasimulovať správanie sa reálnej krvinky. Takáto validácia modelu je súčasťou jeho vývoja, nakoľko je potrebné overiť, či sa bunka nakalibrovaná na iných experimentoch správa ako reálna bunka aj v takých experimentoch, ktoré neboli použité na jej nastavenie.

V Kapitole 5 sme modelovali bunku, ktorá tiekla cez kanál s variabilnou šírkou. Cieľom tohto experimentu bolo preskúmať správanie sa bunky v rýchlo sa meniacom rýchlostnom poli tekutiny. Záverom tohto simulačného experimentu bolo, že v tej časti kanála, v ktorej sa nám podarilo zreprodukovať rýchlostné pole kvapaliny, bolo správanie sa numerickej bunky porovnateľné so správaním sa reálnej bunky. V niektorých častiach kanála sa nám však nepodarilo zreprodukovať rýchlostné pole, a v takýchto častiach kanála bola deformácia numerického modelu bunky odlišná od deformácie reálnej bunky.

V Kapitole 6 sme reprodukovali biologický experiment, ktorého cieľom bolo porovnať rýchlosť a deformáciu buniek pri ich prechode úzkymi štrbinami. Z tohto experimentu je dostupné aj video, čo rozširuje možnosti porovnania správania sa reálnych a simulovaných buniek. Na biologický experiment boli použité bunky rôznych veľkostí. Záver tejto práce je taký, že značná časť buniek v numerickom experimente má podobné správanie ako reálne bunky. V niektorých prípadoch sa numerické bunky mierne odlišovali od tých reálnych. Tento rozdiel by mohol byť do istej miery spôsobený elastickými koeficientami simulovaných buniek. Správna kalibrácia bunky je totiž možná s viacerými odlišnými sadami elastických koeficientov, pri ktorých je kalibračná krivka z numerického natáhovacieho experimentu stále porovnateľná s referenčnou krivkou z biologického natáhovacieho experimentu. Bunky s odlišnými elastickými koeficientami však majú mierne odlišné elastické vlastnosti, a teda aj iné správanie pri prechode úzkymi štrbinami.

Simulačný nástroj, ktorý naša výskumná skupina vyvíja, sa ukazuje ako funkčný nástroj na simulovanie reálnych krviniek v rôznych situáciách. Jeho vývoj ešte nie je dokončený,

---

a dá sa ďalej zdokonaľovať implementáciou dodatočných fyzikálnych konceptov, napríklad vnútorná viskozita buniek, adhézia buniek na rôzne povrchy, alebo vývoj buniek s jadrom.

Táto práca posunula vývoj simulačného modelu tým, že justifikovala rotáciu buniek ako jednu z charakteristík, ktorá je použiteľná na porovnanie výsledkov reálnych a simulačných experimentov s jednou alebo viacerými bunkami. Okrem toho táto práca identifikovala sadu parametrov, ktorú potrebujeme poznať na prípravu numerickej simulácie, a jej správnym nastavením sa môžeme vyhnúť nereálnemu priebehu simulácie a s tým súvisiacimi nereálnymi výsledkami. Nakoniec táto práca posunula vývoj modelu aj tým, že prispela k validácii modelu červenej krvinky.



---

## Publikácie

- [1] K. Kovalčíková, M. Slavík: *Verification of steady state in blood flow experiments*, In: Central European researchers journal (CERES) - ISSN 2453-7314. - Vol. 3, iss. 1 (2017), s. 21-27.
- [2] K. Kovalčíková, M. Slavík, K. Bachratá, H. Bachratý, A. Bohiniková: *Volumetric flow rate in simulations of microfluidic devices*, In: Experimental fluid mechanics 2017 [electronic]. - ISSN 2101-6275. - 1. vyd. - Les Ulis: Édition Diffusion Presse Sciences, 2018. - s. [1-8] [online].
- [3] M. Slavík, K. Kovalčíková, H. Bachratý, K. Bachratá, M. Smiešková: *Processing of cells' trajectories data for blood flow simulation model*, In: Experimental fluid mechanics 2017 [electronic]. - ISSN 2101-6275. - 1. vyd. - Les Ulis: Édition Diffusion Presse Sciences, 2018. - s. [1-11] [online].
- [4] K. Kovalčíková, A. Bohiniková, M. Slavík, I. M. Guimaraes, I. Cimrák: *Red blood cell model validation in dynamic regime*, In: Bioinformatics and biomedical engineering [print, electronic] : proceedings. - 1. vyd. - Cham: Springer International Publishing AG, 2018. - ISBN 978-3-319-78722-0. - s. 259-269 [print].
- [5] H. Bachratý, K. Kovalčíková, K. Bachratá, M. Slavík: *Methods of exploring the red blood cells rotation during the simulations in devices with periodic topology*, In: Information and digital technologies 2017 [elektronický zdroj] : proceedings of the international conference : 5-7 July 2017 Žilina, Slovakia. - [S.l.]: IEEE, 2017. - ISBN 978-1-5090-5688-0. - USB kľúč, s. 36-46.
- [6] K. Kovalčíková: *Modeling of a flow inside of a red blood cell*, In: Proceedings of the MIST conference 2018 [print]. - 1. vyd. - [s.l.]: CreateSpace Independent Publishing Platform, 2018. - ISBN 9781987603392. - s. [1-5] [print].
- [7] K. Kovalčíková: *Discretization of simulation elements - feasibility limits and accuracy of results*, In: Mathematics in science and technologies [print] : proceedings of the MIST conference 2019. - 1. vyd. - [S.l.]: [s.n.], 2019. - ISBN 9781794002180. - s. 51-55 [print].

- [8] M. Slavík, K. Bachratá, H. Bachratý, K. Kovalčíková: *The sensitivity of the statistical characteristics to the selected parameters of the simulation model in the red blood cell flow*, In: Information and digital technologies 2017 [elektronický zdroj] : proceedings of the international conference : 5-7 July 2017 Žilina, Slovakia. - [S.l.]: IEEE, 2017. - ISBN 978-1-5090-5688-0. - USB kľúč, s. 344-349.
- [9] K. Bachratá, H. Bachratý, K. Kovalčíková: *Use of computer technologies in development of mathematical thinking*, In: ICETA 2018 : Proceedings [print] : 16th IEEE International Conference on Emerging eLearning Technologies and Applications. - 1. vyd. - New Jersey: Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2018. - ISBN 978-1-5386-7912-8. - s. 43-50 [print].
- [10] K. Kovalčíková, K. Bachratá, H. Bachratý, M. Slavík: *Study on sensibility of statistical characteristics of flow of elastic objects in fluid*, In: Micro and nanoscale technologies for the life sciences : the 20th annual European conference : scientific program & proceedings : November 7-9 2016, Montreaux, Switzerland. - Lausanne: The NanoBiotech Assotiation, 2016. - USB kľúč, [2] s.
- [11] E. Antoinet, H. Buffiere, K. Kovalcikova: *Time dependent earthquake modeling of an earth dam*, In: Procedia Engineering, proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on the Material Point Method for “Modelling Large Deformation and Soil–Water–Structure Interaction”, January 10-13 2017, Delft, Netherlands



---

## Práce v tlači

- [1] K. Kovalčíková, K. Bachratá, H. Bachratý, K. Jasenčáková: *Influence of the red blood cell model on characteristics of a numerical experiment*, prezentované na Experimental Fluid Mechanics (EFM) 2018, International conference: Praha, Czech Republic, November 13-16, 2018.
- [2] K. Kovalčíková, I. Cimrák, K. Bachratá, H. Bachratý: *Comparison of numerical and biological experiment examining deformation of red blood cell*, článok je akceptovaný na prezentáciu na International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWBBIO) 2018, International Conference: Granada, Spain, Máj 8-10, 2019
- [3] H. Bachratý, K. Bachratá, M. Chovanec, I. Jančígová, M. Smiešková, K. Kovalčíková: *Applications of machine learning for simulations of red blood cells in microfluidic devices*, podané do BMC Bioinformatics

## Použitá literatúra

- [1] S. Nagrath et al.: *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*, Nature 450 (2007) s. 1235–1239, ISSN 0028–0836
- [2] L.R. Huang, E.C. Cox, R.H. Austin, J.C. Sturm,: *Continuous particle separation through deterministic lateral displacement*, Science 304 (5673) (2004) s. 987–990.
- [3] M. Figurová, D. Pudiš, P. Gašo and I. Cimrák,: *PDMS microfluidic structures for LOC applications*, 2016 ELEKTRO, Štrbské Pleso, 2016, s. 608–611, doi: 10.1109/ELEKTRO.2016.7512150
- [4] M. Bušík, I. Jančígová, R. Tóthová, I. Cimrák,: *Simulation study of rare cell trajectories and capture rate in periodic obstacle arrays*, Journal of Computational Science, doi: 10.1016/j.jocs.2016.04.009
- [5] I. Cimrák,: *Collision rates for rare cell capture in periodic obstacle arrays strongly depend on density of cell suspension*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Vol. 19, č. 14, s. 1525–1530, 2016, DOI:10.1080/10255842.2016.1165806
- [6] K. Bachratá, H. Bachratý,: *On modeling blood flow in microfluidic devices*, 2014 ELEKTRO: 10th International Conference, IEEE, May 2014, Slovakia, ISBN 978-4799-3720-2, s. 518–521
- [7] I. Cimrák, K. Bachratá, H. Bachratý, I. Jančígová, R. Tóthová, M. Bušík, M. Slavík, M. Gusenbauer,: *Object-in-fluid framework in modeling of blood flow in microfluidic channels*, Communications, Scientific Letters of the University of Žilina, vol. 18/1a, 2016, s. 13–20
- [8] A. V. Belyaev: *Catching platelets from the bloodflow: The role of the conformation of von Willebrand factor*. Mathematical Modelling of Natural Phenomena, vol. 13, iss. 5, art.n. 44, 2018
- [9] I. Cimrák, M. Gusenbauer, I. Jančígová,: *An ESPResSo implementation of elastic objects immersed in a fluid*, Computer Physics Communications, Vol. 185, Iss. 3, March 2014, s. 900–907, ISSN 0010-4655

- [10] Zdrojové kódy k simulačnému nástroju ESPResSo: (ku 13.4.2018)  
<https://github.com/icimrak/espresso/>
- [11] Cimrák, I., and Jancigova, I.: *Computational Blood Cell Mechanics: Road Towards Models and Biomedical Applications*, Chapman & Hall/CRC Mathematical and Computational Biology, CRC Press, 2018, ISBN 9781351378666
- [12] P. Ahlrichs, B. Dunweg: *Lattice-Boltzmann simulation of polymer-solvent systems*. International Journal of Modern Physics C 8, s. 1429-1438, 1998
- [13] M. Bušík: *Vývoj a optimalizácia modelu pre tok buniek v kvapaline*, Dizertačná práca, Žilinská univerzita, 2017
- [14] I. Cimrák, M. Gusenbauer, T. Schrefl,: *Modelling and simulation of processes in microfluidic devices for biomedical applications*, Computers and Mathematics with Applications, Vol 64(3), s. 278–288, 2012. Doi:10.1016/j.camwa.2012.01.062
- [15] M. Dao, C. T. Lim, and S. Suresh: *Large deformation of living cells using laser traps*, Acta Materialia 52, 2004 + Corrigendum
- [16] K. Bachratá, H. Bachratý, M. Slavík,: *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.
- [17] H. Bachratý, K. Kovalčíková, K. Bachratá, M. Slavík: *Methods of exploring the red blood cells rotation during the simulations in devices with periodic topology*, In: Information and digital technologies 2017 [elektronický zdroj] : proceedings of the international conference : 5-7 July 2017 Žilina, Slovakia. - [S.l.]: IEEE, 2017. - ISBN 978-1-5090-5688-0. - USB kľúč, s. 36-46.
- [18] M. Slavík: *Identifikácia simulacného modelu pohybu elastických objektov v toku tekutiny*, Dizertačná práca, Žilinská univerzita, 2018
- [19] K. Kovalčíková, K. Bachratá, H. Bachratý, M. Slavík: *Study on sensibility of statistical characteristics of flow of elastic objects in fluid*, In: Micro and nanoscale technologies for the life sciences : the 20th annual European conference : scientific

program & proceedings : November 7-9 2016, Montreaux, Switzerland. -  
Lausanne: The NanoBiotech Association, 2016. - USB kľúč, [2] s.

[20] K. Kovalčíková, et all: *Red blood cell model validation in dynamic regime*,  
In: Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in  
Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics) (Volume 10813 LNBI,  
2018). 6th International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical  
Engineering, IWBBIO 2018 : 25 - 27 April 2018 Granada, Spain. - ISBN 978-  
331978722-0.

[21] M. Holúbek: *Použitie fyzikálnej game engine na inicializáciu simulácií toku  
krvi*, Bakalárska práca, Žilinská univerzita, 2018

[22] R. O. Rodriguez, D. Pinho, V. Faustino, R. Lima: *A simple microfluidic  
device for the deformability assessment of blood cells in a continuous flow*, Biomed.  
Microdevices 17, 108, 2015

[23] C.H.D. Tsai, et all: *An on-chip RBC deformability checker significantly  
improves velocity-deformation correlation*, Micromachines, 7, 176, 2016

[24] K. Kovalčíková: *Discretization of simulation elements - feasibility limits and  
accuracy of results*, In: Mathematics in science and technologies [print] : proceedings  
of the MIST conference 2019. - 1. vyd. - [S.l.]: [s.n.], 2019. - ISBN 9781794002180.  
- s. 51-55 [print].