

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lovro Nuić i Luka Rogić

**Utjecaj optimizacije staničnih oblika na
dvočestični model rasta epitelnih tkiva**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Grupi za računalne bioznanosti Zavoda za fizikalnu kemiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu pod kometorstvom dr. sc. Ane Sunčane Smith te je pod mentorstvom prof. dr. sc. Matka Milina predan na natječaj zadodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Razvojna dinamika MDCK tkiva	2
1.2	Struktura stanica	4
2	Metode	6
2.1	Osnovni model	6
2.1.1	Fizička pozadina	6
2.1.2	Voronojev dijagram	7
2.1.3	Delaunayeva triangulacija	9
2.2	Lloydov algoritam	10
2.2.1	Lloydov algoritam - motivacija	10
3	Simulacija	11
3.1	Struktura podataka	12
3.2	Početa konfiguracija tkiva	13
3.3	Održavanje konzistentnosti Delaunayevog dijagrama	14
3.4	Generiranje Voronojeva dijagrama i rubne stanice	14
3.5	Korak simulacije	15
3.6	Dioba i umiranje stanica	17
4	Rezultati	19
4.1	Rezultati modificirane simulacije	19
4.2	Utjecaj promjene jačine Lloydovih iteracija	21
4.3	Utjecaj promjene veličine rubne stanice	23
4.4	Usporedba s eksperimentom	24
5	Zaključak	25
6	Sažetak	29
7	Summary	30

1 Uvod

Kako bi došli do raznih zaključaka mnogi znanstvenici danas koriste računalne simulacije problema. Uz pretpostavku da zadovoljavaju tražene kriterije točnosti, one često omogućuju manje zahtjevno, financijski povoljnije i brže *odvijanje* nekog stvarnog procesa. Ta efikasnost potiče razvijanje sve točnijih simulacija kako bi se smanjila potreba za izvođenjem pravog eksperimenta, te je zbog toga povezanost računarskih i prirodnih znanosti od iznimne važnosti. Simulacija u većini slučajeva neće u potpunosti zamijeniti realan eksperiment. Ipak, svakim danom prednosti korištenja simulacija dobivaju na značaju.

Simulacije su također numerički pristup rješavanju kompleksnih jednadžbi. One nam omogućuju modeliranje jednadžbi gibanja, a time i definiranje dinamike sustava. Nakon usporedbe s eksperimentom, moguće je provjeriti razumijevanje glavnih procesa u sustavu te jesu li na ispravan matematički način i prikazani. Time se postiže cilj kojem sve znanosti teže - objašnjavanje pozadine stvarnog događaja kako bi on postao predvidljiv.

Analiza i promatranje neživog svijeta čine srž mnogih znanosti, ali jednako intrige, ako ne i više, pruža razumijevanje živog. Tu u igru ulaze znanosti poput histologije ili citologije, koje zaključke korisne i na većim skalama donose na temelju razmatranja osnova organizama kao što su tkiva odnosno stanice.

Promatrajući ih fizikalno, tkivni su sustavi osobito interesantni jer su primjer neravnotežnih sustava koje postižu stabilno stanje. Priroda tih stanja zanimljiva je iz fundamentalne perspektive. Nadalje, jedno od ključnih pitanja u današnjim istraživanjima u području biofizike jest kako takvo stanje proizlazi iz interakcija među stanicama tkiva. Takva su istraživanja također važna za razumijevanje patologije rasta što ima direktnu primjenu u medicinskim znanostima.

Tkiva u razvoju od posebne su važnosti u poljima medicine i biologije, jer u njima leži ključ mnogih današnjih problema kao što su cijeljenje tjelesnih oštećenja ili razvitka tumora. Ona pokazuju određena svojstva koja se nastoje razumjeti, a mi ćemo se ograničiti na promatranje epitelnih tkiva.

Epitelna tkiva čine jednu od četiri osnovne vrste tkiva. Ono se nalazi na vanjskoj površini organizma, ali oblaže i unutarnje šupljine jasno određujući granice između pojedinih organa. Neke od njegovih osnovnih funkcija su osjet, izlučivanje sekreta, mehanička zaštita i selektivna apsorpcija. Složenost ovog tkiva varira od jednog sloja, primjerice na srcu, krvnim žilama ili bubregu, do dva i više slojeva, kao u ustima. Jedna od najčešćih vrsti tumora, karcinom, prouzrokovan je upravo mutacijom stanica epitelnog tkiva raznih organa.

U biologiji su se tokom vremena, a potom i u biofizici, razvili takozvani moderni sustavi koji omogućavaju standardizirana istraživanja. Jedno takvo tkivo je MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) tkivo. To se tkivo nalazi u distalnoj tubi bubrega koker španijela i svrstava se u takozvana besmrtna tkiva.

Ovo tkivo je bilo i jest fokus mnogih znanstvenih radova. Isprva korišteno za promatranje virusnih infekcija, MDCK tkivo kasnije je prihvaćeno kao model za razmatranje jednoslojnog epitelnog tkiva te se na njemu promatraju efekti poput prijenosa fluida, izdržljivosti pokrovnih tkiva, adhezije između stanica ili općenitih kretanja [Leighton, Stoker et al., 1987, Affolter et al., 2009].

Ovaj se scenarij pokušalo opisati s nekoliko teorijskih modela. U kontinuiranoj granici, prvo je primijenjena Fisher-Kolmogorljevljeva jednadžba (Marel et al. [2014]). Također je tkivo modelirano kao aktivni fluid, modificiranom Navier-Stokesovom jednadžbom vezanom na populacijsku jednadžbu Ranft et al. [2010]. Oba pristupa reproduciraju stvaranje odjeljaka, međutim ne reproduciraju raspodjelu brzina i ubrzanje ruba nakon stvaranja stabilnog neravnotežnog stanja u centralnom odjeljku tkiva. Upravo je opis te dinamike centralno pitanje ovog rada.

1.1 Razvojna dinamika MDCK tkiva

Već su rana istraživanja rasta MDCK tkiva pokazala zanimljivu dinamiku. Kako bi naša simulacija bila što točniji reprezentant pokusa, prvo ćemo promotriti rezultate eksperimentalnih razvoja MDCK tkiva. Većina eksperimentalnih radova opisuje slična pravila u ponašanju tkiva, te je zbog toga podosta jasno što se od simulacije razvoja očekuje.

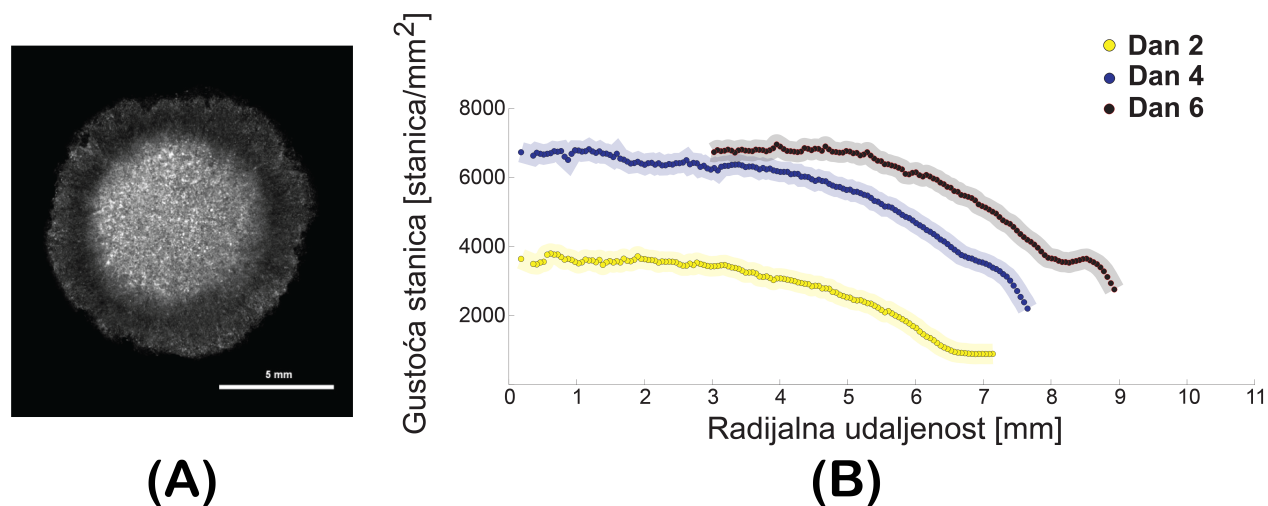
Svako tkivo svoj razvoj počinje iz početnog uzorka, koji može imati više ili manje stanica. Pokazuje se da odabir početnog trenutka ne utječe na generalno ponašanje dinamike tkiva, te da se općenito može razviti krivulja koja opisuje promjenu veličine kolonije u vremenu (Vurnek). Ipak, oblik početne konfiguracije utječe na tranzijentnu fazu. Taj je rezultat podosta važan, jer nam govori da krajnji rezultati ne bi smjeli previše ovisiti o početnim uvjetima, već bi, nakon neke prolazne faze, trebali konvergirati k istom.

Prema Kaliman [2018], površina bi u prvoj, vrlo ranoj fazi trebala pokazivati eksponencijalan rast jer je on većinom posljedica dijeljenja ako je početni uzorak mala, rijetko nasadna kolonija stanica. Taj je rast opisan bazom dva, zbog prirode diobe stanica gdje se stanice dijele u dvije nove. Kasnije zbog povećanja broja stanica, dioba nije tako značajna te povećanje površine prestaje biti eksponencijalno, ali tkivo ne prestaje rasti.

U početku se gustoća stanica povećava naglo (Puliafito et al. [2012]), što isprva usporava rast. Taj porast nije neograničen, te se nakon određenog vremena primjećuje razvoj dva odjeljka u koloniji (Slika 1A). Središnji odjeljak, poznat i kao *bulk*, gdje je gustoća stanica veća jer su one generalno manje, i rubnog odjeljka gdje veličina stanica postepeno raste, a gustoća pada. Jednom kada se ovi odjeljci formiraju, što otprilike traje četiri dana, morfologija tkiva se ne mijenja.

Prikaz gustoće tkiva u ovisnosti o udaljenosti od geometrijskog centra opisali su još 1980. Rosen and Misfeldt [1980] te kasnije Puliafito et al. [2012] koji govore o tome kako tkivo porast u broju stanica balansira povećanjem površine tkiva u svrhu održavanja konstantne gustoće središnjeg

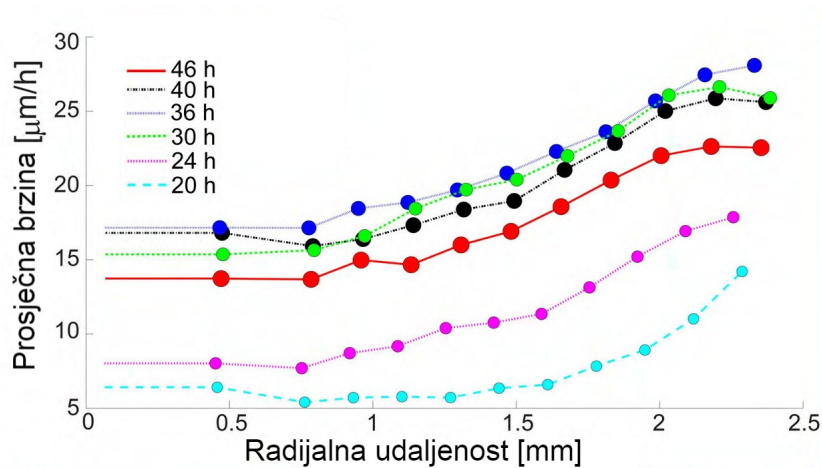
odjeljka. Na taj se način postiže spomenuta stabilnost odnosa rasta i diobe stanica. Dotični se efekt može lako vidjeti na slici eksperimentalnih rezultata (Slika 1B). Jedna od stvari koja se u istom profilu gustoće također može vidjeti jest razvitak slabe deformacije pri rubu tkiva. Pojava takozvane *noctice* primijećena je pri uzgoju stanica na staklu u rubnom odjeljku, te ju je kao jednu od opisnih kvaliteta vrijedno uočiti. Njeno podrijetlo objašnjavaju Kaliman et al. [2020] opisujući pojačanu adheziju između stanica u tom odjeljku tkiva.



Slika 1: **Eksperimentalni rezultati promatranja MDCK tkiva.** A) Eksperimentalna slika zastupljenosti aktina u MDCK tkivu; preuzeto iz Vurnek. B) Eksperimentalna ovisnost gustoće MDCK II tkiva na staklu o radijalnoj udaljenosti od geometrijskog centra; preuzeto iz Kaliman [2018].

Sljedeća bitna točka razumijevanja razvojne dinamike jest brzina stanica koju one postižu na temelju staničnih interakcija te djelovanja sa supstratom. Eksperimenti pokazuju da su rubne stanice posebnom vrstom aktivnosti odgovorne za širenje tkiva, što rezultira u drugačijoj fiziologiji. Naime, one su veće od ostatka stanica te nepravilnog oblika, što je posljedica njihovog izraženog radijalnog gibanja. Također, zanimljivo je opažanje da se same rubne stanice u principu vrlo rijetko dijele. Neka se obilježja brzine stanica mogu povezati s opisom formiranja profila gustoće, dok su druga vidljiva tek iz direktnih prikaza brzine. Jedan takav pruža Kaliman [2018] (Slika 2). Vidimo da brzina vrlo brzo postiže ponašanje koje, prema opisima, prati nadalje. Ona prvo u iznosu raste, te se nakon nekog vremena isti rast zaustavlja. Brzina središnjeg odjeljka je manja od brzine ruba, koji je zapravo dio odgovoran za širenje tkiva. Ovo opisuju Puliafito et al. [2012], koji govore da pokretljivost stanica pada s porastom gustoće, što se i događa u središnjem odjeljku. Na temelju raspodjele brzine te povišene gustoće u središnjem odjeljku, to jest manje veličine stanica, može se predvidjeti da se većina mladih stanica nalazi u rubnom odjeljku¹.

¹razlikujemo pojmove rubne stanice i stanice u rubnom odjeljku

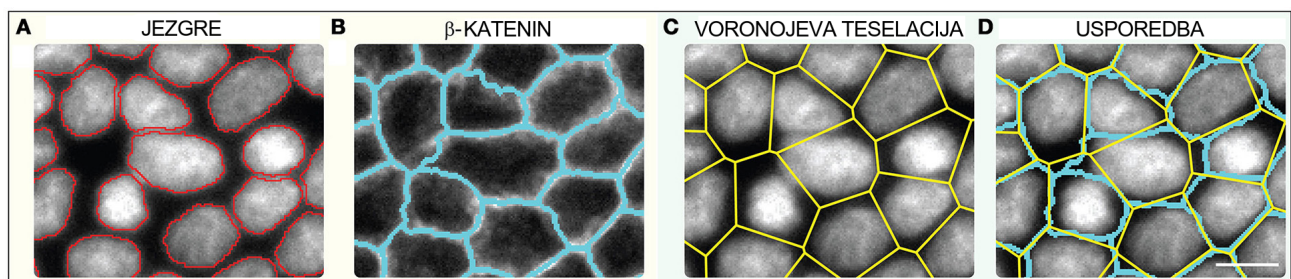


Slika 2: Ovisnost brzine stanica MDCK II tkiva na staklu o radijalnoj udaljenosti od geometrijskog centra; preuzeto iz Kaliman [2018]

1.2 Struktura stanica

Struktura stanica nezanemariva je razina proučavanja, jer poznavanje pravila koja stanice prate potencijalno bi moglo pružiti bolji uvid u dinamiku tkiva. Optimalan opis te organizacije stanica bio bi korištenjem matematičkim modelom, jer bi on omogućio olakšano računalno simuliranje.

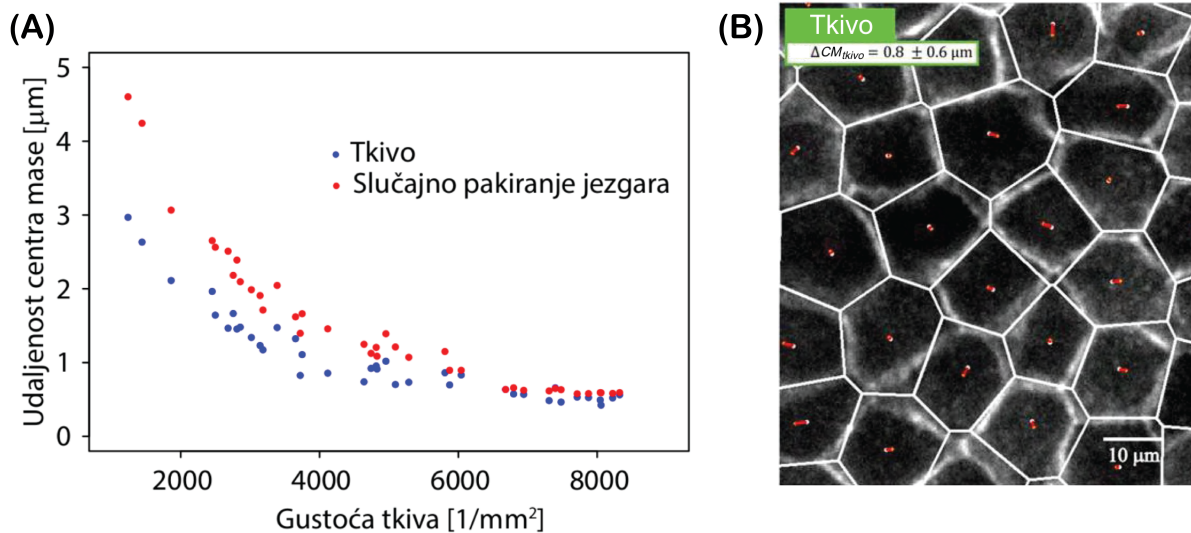
Jedan od pokušaja navedenog modeliranja uvode Honda [1978]. Ondje je podjela epitelnog tkiva opisana Voronojevom teselacijom. Daljnu analizu ovog postupka nalazimo u Kaliman [2018], gdje je korišten centralni Voronojev dijagram. Njegov je centar smješten u središtu stanične jezgre. Slika 3 jednostavno prikazuje relativno poklapanje stanične membrane, u kojoj je zastupljen β -katenin, s granicama određenim Voronojevim dijagramom konstruiranim na prethodno opisan način. Također je izračunata snažna korelacija između površine stanice i njenog opsega.



Slika 3: tUsporedba raspodjele stanica s Voronojevim dijagramom generiranim na centrima mase jezgara stanica; preuzeto iz Kaliman [2018]

Sljedeći važan rezultat nije kvantitativno prikazan za Voronojeve dijagrame generirane točkama, već likovima poput elipse. Ipak, kvalitativno, rezultat koji primijetimo u velikoj će mjeri biti primjenjiv i za nama signifikantne točkaste generatore. Proučavana je udaljenost između centra

stanične jezgre i centra mase stanice u realnom tkivu (ΔCM_{tkivo}) i u slučajno pakiranom Voronojevom dijagramu ($\Delta CM_{Voronoj}$). Slučajno pakiranje elipsi jest njihovo slaganje u prostoru bez preklapanja. Iz dotične se usporedbe (Slika 4) jasno vidi da je ΔCM_{tkivo} iznosom relativno mala, ali ipak postojana udaljenost za sve gustoće. Drugim riječima, centar mase i centar stanične jezgre gotovo se podudaraju, razlika čak dodatno pada s rastom gustoće tkiva, no ne dolazi do potpunog podudaranja. Važno je primijetiti i da je $\Delta CM_{Voronoj}$ uprosječen veći od ΔCM_{tkivo} što se može primijetiti i kod točkastih generatora, ali približavanje krivulja za veće gustoće rezultat vezano je isključivo uz generatore čija je površina različita od nule.



Slika 4: Ovisnost udaljenosti točkastog generatora Voronojeve ćelije od njenog centra mase o gustoći; preuzeto iz Cavaliere Lokas and Delić [2019] i Kaliman [2018]

2 Metode

Do danas se razvio niz metoda simuliranja tkiva. Jedan od njih naziva se verteks model, te se zasniva na ideji da se stanica epitela može prikazati kao šesterokut (Barton et al. [2017]). Taj model je isto posebno prilagođen simulacijama samostojećih tkiva, koji ne osjećaju trenje s podlogom. Druga važna klasa modela je model koji predstavljen u Sepúlveda et al. [2013] gdje je svaka stanica prikazana kao točkasta čestica.

Model koji mi koristimo opisuje stanicu tkiva pomoću dvije čestice, u kojem svaka od čestica u stvarnosti predstavlja pol diobenog vretena stanice u razvoju. Na taj se način pored ostalih bitnih obilježja razvoja može regulirati i rast stanice te njenog utjecaja na staničnu proliferaciju, što je očiti nedostatak primjerice jednočestičnog modela.

2.1 Osnovni model

2.1.1 Fizička pozadina

Samu ideju fizičke pozadine našeg dvočestičnog modela našli smo u radovima Basan et al. [2011], gdje se problem razmatra Newtonovom mehanikom. Zbog toga su uvedene sile kojima se nastoje opisati razne disipacije, rast stanica, zauzimanje prostora te toplinski efekti.

Širenje diobenog vretena opisujemo silom rasta \vec{F}_A koja djeluje između čestica i te j iste stanice, čija snaga pada s rastom stanice:

$$\vec{F}_{A,ij} = \frac{B}{(r_{ij} + r_0)^2} \hat{r}_{ij} \quad (1)$$

Njoj se suprotstavlja unutarstanična sila trenja \vec{F}_B kao posljedica gibanja čestica unutar stanice:

$$\vec{F}_{B,ij} = -\gamma_c \omega(r_{ij}) \hat{r}_{ij} (\vec{v}_j - \vec{v}_i) \hat{r}_{ij} \quad (2)$$

$$\omega(r_{ij}) = \begin{cases} 1 - \frac{r_{ij}}{R_t} & r_{ij} < R_t \\ 0 & r_{ij} \geq R_t \end{cases} \quad (3)$$

r_i i r_j označuju položaje i -te odn. j -te čestice ($\vec{r}_{ij} = \vec{r}_j - \vec{r}_i$, $r_{ij} = |\vec{r}_{ij}|$, $\hat{r}_{ij} = \frac{\vec{r}_{ij}}{r_{ij}}$), dok su \vec{v}_i te \vec{v}_j pripadne brzine. \vec{F}_{ij} biti će sila kojom i -ta čestica djeluje na j -tu. Funkcija $\omega(r_{ij})$ se prema Nikunen et al. [2003] standardno koristi kao težinska mjera dosega disipativnih sila, dok je R_t konstanta korištena za opis dosega disipativnih sila.

U našem modelu pretpostaviti ćemo i vanstanične sile, čiji smo doseg ograničili na bliske stanice.

Tako uvodimo adhezijsku silu između dvije stanice \vec{F}_C :

$$\vec{F}_{C,ij} = \begin{cases} -\frac{f_a \hat{r}_{ij}}{r_{ij}} & r_{ij} \geq R_{pp} \text{ i } r_{ij} \leq R_{pp} * f_d \\ 0 & \text{inače} \end{cases} \quad (4)$$

gdje je s f_a određena jačina, a s R_{pp} doseg adhezijske sile. Slično kao i unutar stanice, i za međudjelovanje čestica različitih stanica uvodimo disipativnu silu \vec{F}_D :

$$\vec{F}_{D,ij} = - \begin{cases} \gamma_{\perp} \\ \gamma_{\parallel} \end{cases} \times \omega(r_{ij}) \hat{r}_{ij} (\vec{v}_j - \vec{v}_i) \hat{r}_{ij} \quad (5)$$

koja je razložena koeficijentima γ_{\perp} i γ_{\parallel} kako bi se uzelo u obzir trenje u oba smjera.

Sljedeća sila, koja je ograničena na male udaljenosti čestica, nastaje kao posljedica volumne ekskluzije:

$$\vec{F}_{E,ij} = \begin{cases} f_v \left(\left(\frac{R_{pp}}{r_{ij}} \right)^5 - 1 \right) \hat{r}_{ij} & r_{ij} \leq R_{pp} \\ 0 & r_{ij} > R_{pp} \end{cases} \quad (6)$$

Za kraj nam ostaju dvije sile, koje se pojavljuju zbog okoline u kojoj se tkivo nalazi. Zbog trenja s podlogom uvodimo silu \vec{F}_F , a zbog topline uvesti ćemo nasumično, kaotično gibanje prouzrokovano silom \vec{F}_G :

$$\vec{F}_{F,i} = -\gamma_s \vec{v}_i \quad (7)$$

$$\vec{F}_{G,i} = f_r (\cos\phi, \sin\phi)^T \quad (8)$$

gdje je γ_s koeficijent trenja vezan uz podlogu, f_r nasumična snaga uzeta iz Gaussove raspodjele oko nule sa širinom $k_B T$ a ϕ nasumičan kut u intervalu $[0, 2\pi]$.

Basan et al. [2011] ipak nailaze na nekoliko problema. Ovaj model sam po sebi ne regulira oblik stanice. Zbog toga nije u mogućnosti odrediti njenu veličinu, ali niti njene prave susjede. To pak umanjuje točnost pri računanju međustaničnih sila. Kako bismo promotrili pravila u ponašanju veličine stanica te jednoznačno odredili granice stanica, te uzevši u obzir optimizaciju oblika stanice uvodimo Voronojev dijagram.

2.1.2 Voronojev dijagram

Na temelju navedenih nedostataka našeg dvočestičnog modela te poneseni eksperimentalnim rezultatima navedenim u uvodu u naš ćemo model uvesti ranije spomenutu Voronojevu teselaciju.

Promatranje jednoslojnog tkiva kao što je MDCK tkivo pojednostavljuje simulaciju njegova razvoja. Naime, njega se zbog navedene jednoslojnosti može aproksimirano promatrati u samo dvije dimenzije, što je osnova naše simulacije. Stoga ćemo općenitu definiciju Voronojeva dijagrama prikazati za, nama relevantan, dvodimenzionalan slučaj.

Definicija *Euklidska udaljenost* dviju točaka $T_1 = (x_1, y_1)$ i $T_2 = (x_2, y_2)$ u \mathbb{R}^2 dana je s :

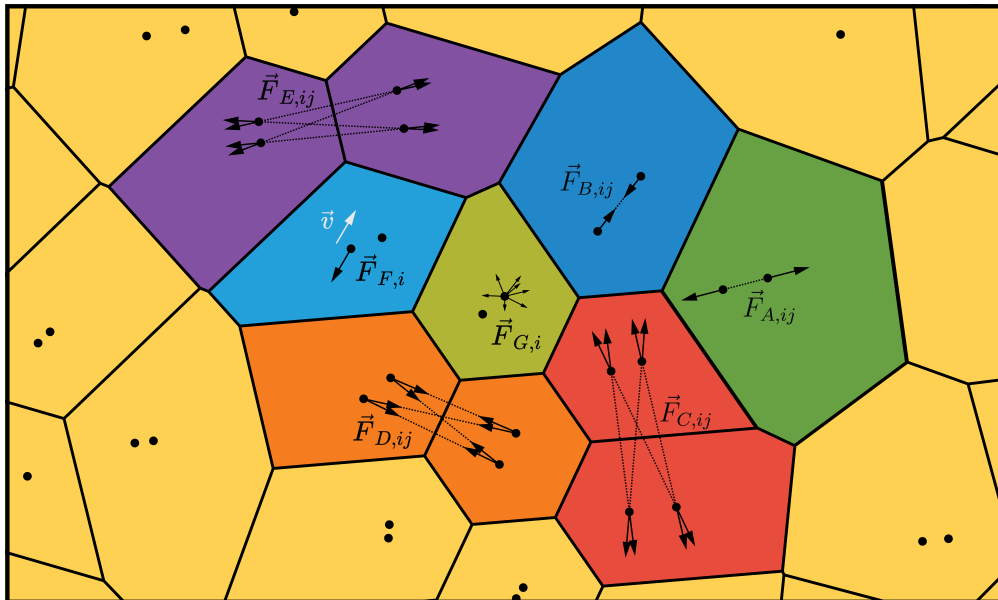
$$d(T_1, T_2) = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

Definicija *Voronojevu ćeliju* $V_i \subseteq S$ za dani skup točaka $\{C_1, \dots, C_n\}$ definira se kao:

$$V_i = \{s \in S \mid d(s, C_i) \leq d(s, C_j) \quad i \neq j\} \quad i, j = 1, \dots, n$$

Bridovi ruba Voronojevih ćelija završavaju u Voronojevim točkama za koje vrijedi da su jednako udaljene od tri točke generatora. Skup Voronojevih ćelija čini Voronojev dijagram.

Iz simetrije našeg modela, kao točkasti generatori Voronojevih ćelija kod naših stanica nameću se točke u sredini diobenog vretena, tj. polovišta dužine koja spaja naše dvije čestice koja ćemo nazivati centrima stanice. Uz takvu se podjelu vrlo lako mogu precizno definirati susjedne stanice kao sve stanice koje s promatranom dijele rub Voronojeve ćelije. Također postaje moguće promatrati površinu i oblik stanica, što dalje omogućuje stvaranje vizualne reprezentacije simulacije.



Slika 5: **Osnovni model.** Prikazane su stanične čestice, sile i granice određene Voronojevim teselacijom

2.1.3 Delaunayeva triangulacija

Iako u modelu koristimo Voronojeve dijagrame za definiranje podjele ravnine na stanice, zbog nepraktičnosti prilikom izračuna Voronojeva dijagrama uvodimo Delaunayevu triangulaciju i potrebne pojmove prema De Berg et al. [1997].

Neka je $P := \{p_1, p_2, \dots, p_n\}$ skup točaka u ravnini.

Definicija *Triangulacija T skupa točaka P je planaran pravocrtan graf kojemu su vrhovi P , a svakim dodavanjem brida nužno se narušava planarnost.*

Unutrašnje strane u grafu čine trokuti, dok vanjska beskonačna strana omeđuje poligon koji nazivamo konveksnom ljuskom. Također možemo primijetiti da bridove koji čine konveksnu ljusku sadrže sve triangulacije skupa točaka P .

Teorem *Neka je P skup od n točaka u ravnini, koje nisu sve kolinearne, i neka je k broj točaka iz P koje leže na rubu konveksne ljuske od P . Tada svaka triangulacija od P sadrži $2n - 2 - k$ trokuta i $3n - 3 - k$ bridova.*

Ovo svojstvo triangulacije dobiveno je uz pomoć Eulerove formule, a njegova važnost dolazi od izražaja prilikom određivanja potrebne količine memorije koju moramo rezervirati za triangulaciju.

Za određeni skup točaka P postoji više različitih triangulacija, ali za naše potrebe zanimljiva je Delaunayeva triangulacija zbog svoje dualnosti s Voronojevim dijagramom. Skup trokuta koji nastaju spajanjem točkastih generatora svih Voronojevih susjeda popločavaju površinu unutar konveksne ljuske skupa točaka P , te se takvo popločenje naziva Delaunayeva triangulacija skupa P ($DT(P)$). Svaki Voronojev točkasti generator korespondentan je s trokutom i svaki Voronojev brid je korespondentan s Delaunayevim bridom.

Nadalje navodimo nekoliko svojstva Delaunayeve triangulacije.

Lema *Za dani skup točaka P , proizvoljan brid (p_i, p_j) je Delaunayev brid od $DT(P)$ akko postoji točka x takva da se unutar kružnice s središtem u x koja prolazi točkama p_i i p_j ne nalazi ni jedna druga točka iz P .*

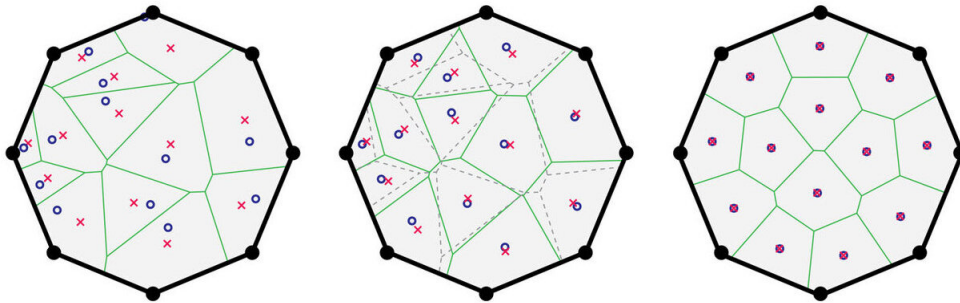
Lema *Svojstvo prazne opisane kružnice* Trokut $\triangle p_i p_j p_k$ je Delaunayev trokut od $DT(P)$ akko njegova opisana kružnica ne sadrži niti jednu drugu točku iz P .

2.2 Lloydov algoritam

U fizici je općenito poznato da su stabilne točke ravnoteže tijela u nekom potencijalu definirane kao točke u kojima isti potencijal postiže minimum. Stabilnost neke točke znači da će za male pomake tijelo težiti povratku u istu točku. Prema Klatt et al. [2019], minimumi energije za našu dvodimenzionalnu raspodjelu prostora dani su u obliku centralnog Voronojeva dijagrama. On je poseban slučaj općenitog Voronojeva dijagrama kod kojega se centri masa Voronojevih ćelija podudaraju s njenim točkastim generatorom.

Lloydov algoritam je jedan od provjerenih načina kojim se od općenitog Voronojeva dijagrama kreira centralni (Lloyd [1982]). Kod njega se pri svakoj iteraciji točkasti generator neke ćelije premješta u njen centar mase. Ta ponavljanja konvergentno vode upravo k centralnom Voronojevom dijagramu (Klatt et al. [2019]).

Kod naše simulacije ovakvo bi korištenje algoritma u potpunosti nadvladalo utjecaj sila, pa se pri svakom koraku centar stanice pomiče prema centru mase stanice samo za određen postotak njihove međusobne udaljenosti. Ovim se alternativnim izvođenjem zadržavaju tkivne i stanične interakcije, a efekt iteracija u konačnici voditi će na isto.



Slika 6: **Primjer djelovanja Lloydova algoritma** Istaknuti su točkasti generatori (kružići) i centri masa (križići) (Filipov et al. [2015])

2.2.1 Lloydov algoritam - motivacija

Dvojakost motivacije za uvođenje Lloydovih iteracija u našu simulaciju krije se u potrazi za strukturom stanica opisanoj u potpoglavlju 1.2, ali i brzini ruba koja bi trebala pokazivati konstantnu brzinu nakon određenog vremena.

Zbog modificiranog učinka koji djeluje blaže na Voronojeve ćelije, nadamo se da će nepodudaranje centra stanice i centra mase odgovarajuće Voronojeve ćelije ostati prisutno. Ipak, za stanice koje žive dovoljno dugo, ti bi se centri mogli poklapati. S druge strane, takve stare stanice očekujemo u središnjem odjeljku gdje je gustoća stanica visoka, pa bi navedeno poklapanje bilo donekle opravdano jer je poklapanje centara veće što je gustoća stanica veća (Slika 3).

Simetrija simulacije nagovještuje izraženost radialne komponente širenja, te je ona i potvrđena

u Kaliman [2018]. Rezultat ove dominantnosti kružni je oblik kolonije (Slika 1A). Zbog toga u našoj simulaciji tražimo gibanje stanica usmjereno prema van.

3 Simulacija

Naša se simulacija sastoji od dva dijela: (a) iterativni dio prilikom kojeg inicijaliziramo strukturu tkiva te prenosimo podatke na grafički procesor i (b) paralelnog dijela u kojem simuliramo rast tkiva. Na početku simulacije učitavamo početnu konfiguraciju stanica koja se sastoji od pozicija čestica svake pojedine stanice. Centar stanice definiramo kao točku u aritmetičkoj sredini pozicija tih čestica. Iako prilikom reprezentacije stanica koristimo Voronojeve ćelije čiji su točkasti generatori centri, radi jednostavnosti izrade i održavanja strukture zapravo koristimo Delaunayevu triangulaciju. Zbog toga prilikom izračuna morfoloških svojstva pojedinih stanica uz pomoć dualnosti dijagrama privremeno kreiramo Voronojev dijagram.

Delaunayevu triangulaciju može se dobiti iz već postojeće triangulacije primjenom određenih koraka ili gradnjom izravno iz točkastih generatora. Primjeri izravne gradnje iz točaka generatora su inkrementalni algoritmi koji dodavanjem određenog broja točaka generatora u privremenu strukturu i njenim prepravkom do Delaunayeve postepeno generiraju strukturu za sve točke generatore. Također postoje i algoritmi temeljeni na principima *podijeli pa vladaj* i pomične linije, ali zbog karakteristike naše simulacije da u svakog koraku točke generatori imaju male pomake te da je novonastala triangulacija već približno Delaunayeva, nama su zanimljiviji algoritmi koji iz postojeće triangulacije dolaze do Delaunayeve. Primjer takvog algoritma je Lawsonov algoritam koji uz pomoć metode okretanja bridova početnu triangulaciju prepravlja do Delaunayeve (Lawson [1972]). Potaknut idejom okretanja bridova Navarro et al. [2013] predlaže paralelnu verziju Lawsonovog algoritma koja je pogodna za provođenje na grafičkim procesorima, te koju mi u konačnici koristimo u simulaciji. Predloženi algoritam generira kvazi-Delaunayev dijagram u kojem postoje mala odustupanja od Delaunayeve triangulacije dobivne na CPU-u, što u našoj simulaciji ne predstavlja problem. Iako ubrzanje navedenog algoritma za nasumično odabranu početnu triangulaciju naspram naprednijih CPU algoritama nije značajno, bitno ubrzanje dolazi do izražaja kada je početna

triangulacija blizu Delaunayeve.

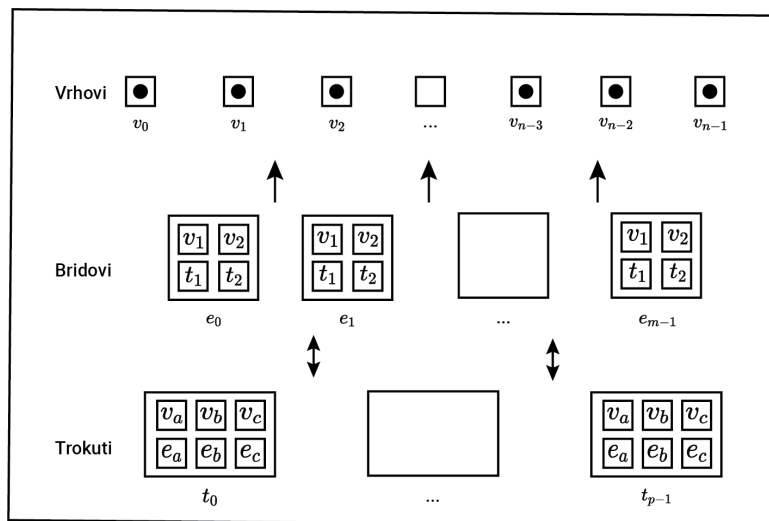
Algoritam 1: Simulacija rasta stanica

Ulaz: $P := \{p_1, p_2, \dots, p_n\}$ početna konfiguracija stanica u tkivu

- 1 **procedura** *GlavnaProcedura*(P)
- 2 izgradnja strukture podatka tkiva iz početne konfiguracije P ;
- 3 generiranje početne Delaunayeve triangulacije;
- 4 **za** $t \leftarrow 0$ **do** T_f **čini**
- 5 generiranje Voronojevih ćelija te izračun površine i centra mase izračun sila u sustavi ažuriranje brzine i pozicije stanice
- 6 **ponavlja**
- 7 popravi izokrenute trokute
- 8 **dok** postoje izokrenuti trokuti u dijagramu;
- 9 dioba ili umiranje određenih stanica
- 10 **ponavlja**
- 11 popravi ne-Delaunay bridove
- 11 **dok** postoje ne-Delaunay bridovi u dijagramu;

3.1 Struktura podataka

Strukturu podataka u ovom radu možemo podijeliti u dvije cjeline: podaci čestica stanica u tkivu i podaci potrebni za trokutastu rešetku Delaunayeve triangulacije. Kako simulaciju izvodimo na grafičkom procesoru nakon inicijalizacije, njih smo radi maksimalne iskoristivosti arhitekture oblikovali u strukturu nizova. Parametri čestica stanica sastoje se od pozicije, brzine i sile te su zapisani kao dvodimenzionalni vektori u obliku dva broja s decimalnom točkom².



Slika 7: Struktura podataka za spremanje trokutaste mreže

Struktura podataka trokutaste rešetke inspirirana je radom Navarro et al. [2013], uz nekoliko dodataka. Slika 7 prikazuje tri glavne komponente trokutaste rešetke: vrhove, bridove i trokute. Vrhovi su spremljeni u Vertex nizu te se sastoje od dvodimenzionalnog vektora. Bridovi se sastoje od niza indeksa vrhova koje povezuje v_1 i v_2 , te od niza indeksa trokuta koji dijele taj brid t_1 i t_2 .

²float ili double

Struktura trokuta sastoji se od niza indeksa vrhova koji čine pojedini trokut v_a, v_b i v_c , te uvodimo i dodatan niz indeksa e_a, e_b i e_c koji pokazuje na bridove koji čine trokut zbog potrebe za tom informacijom prilikom dodavanja i uklanjanja vrhova. t_1 i t_2 pokazuju točno na indeks mjesta u nizu trokuta gdje su spremljeni v_1 i v_2 , dok e_a, e_b, e_c pokazuju na indeks u nizu bridova gdje su spremljeni bridovi suprotni vrhovima v_a, v_b, v_c . Navedene strukture čuvaju se na globalnoj memoriji grafičkog procesora. U strukturi podataka postoji redundancija podataka koju koristimo prilikom prepravljanja podataka općenite triangulacije do Delaunayeve.

3.2 Početna konfiguracija tkiva

Početna konfiguracija sastoji se popisa pozicija čestica stanica koje učitavamo u strukturu tkiva. (**možda dodati početne konfiguracije koje smo probali**) Kako bismo dobili ispravnu strukturu tkiva nedostaje nam Delaunayev dijagram kojeg generiramo pomoću inkrementalnog algoritma na procesoru za dobivene stanice tkiva. Potom cijelo tkivo prebacujemo na globalnu memoriju grafički procesor, te nam glavni procesor nadalje služi samo da upravljanje svim izračunima koji se događaju na grafičkom procesoru.

Tablica 1: Iznosi konstanti korištenih u simulaciji

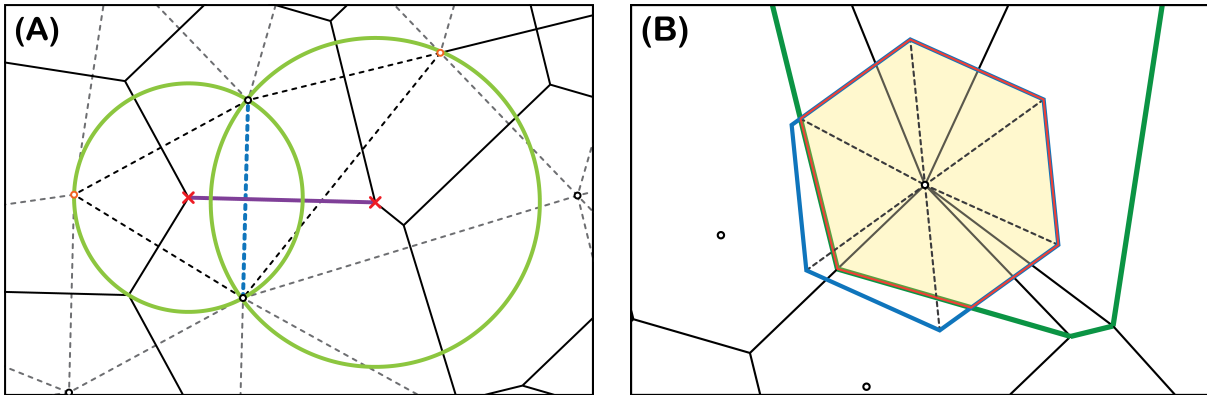
konstanta	značenje	iznos
B	koeficijent rasta	4.0
r_0	ograničavajući faktor rasta	1.12
γ_c	koeficijent unutarstaničnog trenja	1.1
R_t	doseg disipativnih sila	0.8
f_a	koeficijent adhezije	10.0 i 1.0
R_{pp}	doseg potencijala	1.0
f_d	koeficijent vezan uz doseg adhezije	1.4
γ_{\perp}	faktor vanstaničnog trenja okomitog na r_{ij}	0.15
γ_{\parallel}	faktor vanstaničnog trenja paralelnog na r_{ij}	0.2
f_v	koeficijent volumne ekskluzije	150.0
γ_s	koeficijent trenja stanice sa substratom	0.1
$k_B T$	intenzitet termalnog utjecaja	0.424
k_a	stopa smrti stanica	0.001
R_{c1}	donja granica stanične diobe	0.75
R_{c2}	gornja granica stanične diobe	0.85 i 2.85
r_c	udaljenost novonastale čestice stanične diobe	1.12×10^{-5}
m	masa čestice	5.76×10^{-4}
dt	interval vremena po koraku	10^{-5}
L	jačina Lloydovih iteracija	varijabla
A_{rubne}	odnos rubne stanice i osnovne	varijabla

Konstante koje koristimo u simulaciji, prikazane u Tablici 1, prebacujemo na konstantnu memoriju grafičkog procesora zbog učestalosti korištenja.

3.3 Održavanje konzistentnosti Delaunayevog dijagrama

Jedan od problema koji nastaje pri pomicanju stanica je pomicanje točaka trokutaste mreže zbog čega moramo nakon svakog koraka simulacije provjeravati zadovoljava li trenutna trokutasta mreža uvjete Delaunayeve triangulacije. U ovom radu koristimo algoritam predložen u Navarro et al. [2013] za održavanje trokutaste mreže Delaunayevom. Predloženi algoritam zapravo je paralelni pristup Lawsonovom algoritmu (Lawson [1972]), zbog čega je pogodan za izvršavanje na grafičkom procesoru. Kao ulaz algoritmu moramo predati proizvoljnu valjanu triangulaciju, te provođenjem paralelnih obrtanja bridova dolazimo do Delaunayeve triangulacije. Bitno je napomenuti da je složenost Lawsonovog algoritma $O(n^2)$, što zapravo i nije najbolje poznato rješenje jer postoje algoritmi složenosti $O(n \log n)$. Također, pokazano je da prilikom metode paralelnog obrtanja bridova, svake dvije triangulacije udaljene su za maksimalno $O(n \log n)$ paralelnih iteracija Hurtado et al. [1998], zbog čega bi se moglo zaključiti da paralelno obrtanje bridova ne ubrzava simulaciju. Međutim, trokutasta mreža zbog malog pomaka stanica već je skoro Delaunayeva te stoga je potreban puno manji broj paralelnih iteracija.

3.4 Generiranje Voronojeva dijagrama i rubne stanice



Slika 8: **Generiranje Voronojeve teselacije.** A): Prikaz generiranja Voronojeva dijagrama iz Delaunayeve triangulacije, zelene kružnice su opisane kružnice za promatrani brid s centrima kružnica crvenim križićima, ljubičasta dužina dio Voronojeva dijagrama. B): Prikaz generiranja rubne stanice, zeleni poligon Voronojeva ćelija, plavi konveksan poligon je definiran oblik rubne stanice, crveni poligon je završni izgled stanice nakon presijeka zelenog i plavog poligona

U simulaciji za prikaz stanica koristimo Voronojev dijagram, ali kako strukturu Voronojeva dijagrama ne spremamo u memoriju potrebno ju je u svakom koraku konstruirati. Na slici 8A prikazan je postupak generiranja brida Voronojeve ćelije korespondentnog označenom e_i bridu (v_i, v_j) Delaunayeve triangulacije. Neka su v_a i v_b suprotni vrhovi bridu e_i . Središte opisane kružnice trokuta $\Delta v_i v_j v_a$ i $\Delta v_i v_j v_b$ čine vrhove ruba Voronojeva ćelija od vrhova v_i i v_j . Trokuti $\Delta v_a v_b v_i$ i $\Delta v_a v_b v_j$

su zapravo dio trianguliranih Voronojevih ćelija kojima možemo izračunati površinu i centar mase. Navedeni postupak možemo pokrenuti za svaki brid generirajući tako sve triangulizirane Voronojeve ćelije.

Površinu svakog trokuta možemo atomarnim operacijama samo zbrojiti korespondentnoj stanici, dok centar mase stanice računamo prema formuli (9) gdje su c_i centri mase i a_i površina pojedinih trokuta triangulirane Voronojeve ćelije, dok je A_c ukupna površina Voronojeve ćelije.

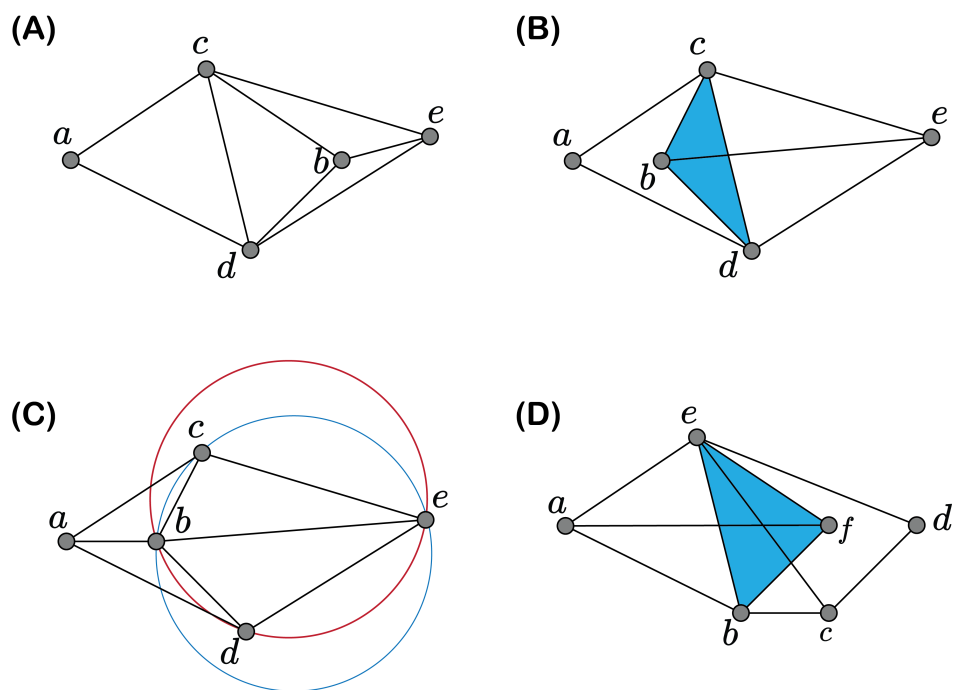
$$\vec{C} = \frac{1}{A_c} \sum_{i=0}^n \vec{c}_i a_i \quad (9)$$

Pogledamo li strukturu Voronojeva dijagrama primjećujemo da prema definiciji Voronojeve ćelije na rubu nisu omeđene ili imaju ekstremne površine, što naravno predstavlja problem prilikom reprezentiranja stanica. U ovom radu problem ruba je riješen korištenjem presjeka Voronojeve ćelije i definiranog konveksnog poligona. Površinu tog poligona nazivamo *osnovnom veličinom stanice*. Osnovna veličina stanice dobivena je kao uprosječena veličina stanice simulacija u kojima je djelovanje Lloydovih iteracija isključeno. Kako bi riješili problem ruba prvo označimo rubne stanice u svakom koraku usporedbom s računatom granicom površine A_M koju stanica može imati u tkivu (A_M je 70% veća od osnovne veličine stanice). Potom ponovno generiramo trokute Voronojevih ćelija prethodno opisanim postupkom i tražimo presjek svakog trokuta s definiranim konveksnim poligonom, te računamo novu površinu i centar mase. Postupak je prikazan na slici 8B, gdje je za konveksni poligon uzet pravilni šesterokut koji je odabran zbog sličnosti s stanicama.

3.5 Korak simulacije

Nakon što smo popravili trokutastu rešetku do Delaunayeve i izračunali površine i centre masa stanica prelazimo na korak simulacije utjecaja međustaničnih i unutarstaničnih sila. U poglavlju predstavljene su sve sile koje djeluju u modelu. Sile možemo rastaviti na dvije skupine: (a) unutarstanične i (b) međustanične. Izračun sila također radimo na grafičkim procesoru gdje u slučaju unutarstaničnih sila dretve pridružujemo svakoj stanici, dok kod međustaničnih sila dretve pridružujemo svakom bridu u Delaunayevoj triangulizaciji. Nakon što izračunamo sile u sustavu integriramo ih tako da dobijemo nove brzine u sustavu.

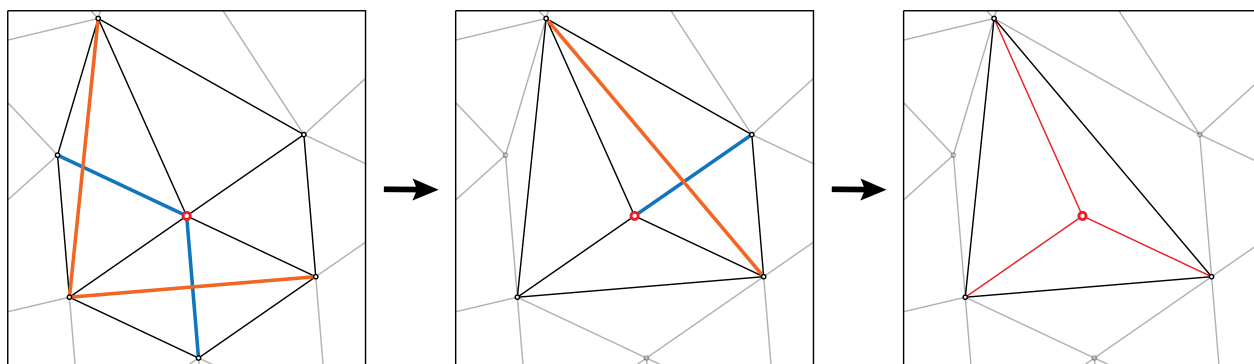
Za razliku od osnovnog modela na ovom mjestu dodajemo i Lloydov algoritam. Kako smo u prošlom koraku izračunali centre masa svakoj stanici, uzimamo razliku pozicija središta stanice i centra mase stanice te dijelimo s vremenom koraka dt , te tako dobivenu "Lloydovu brzinu" dodajemo novo izračunatoj brzini stanice.



Slika 9: Prikaz obrtanja trokuta

Integracijom brzine dobivamo nove pozicije stanica, nakon što pomaknemo stanice može nam se dogoditi da zapravo niti nemamo ispravnu trokutastu mrežu, zbog čega prije nego što probamo metodom obrtanja bridova Navarro et al. [2013] dobiti ponovno ispravnu Delaunayevu triangulaciju moramo ispraviti trokutastu mrežu. Primjer takve situacije prikazan je na slici 9. Ovaj problem je riješen algoritmom predloženom u radu Carter et al. [2018]. Algoritam se sastoji od detektiranja obrnutog trokuta. Obrnuti trokut nastaje kada konfiguracija s slike 9 zbog pomicanja točke b preko brida cd prelazi u nepravilnu trokutastu rešetku. Tada trokut nazivamo obrnutim trokutom. Ako se dogodi prelazak točke samo preko jednog brida, taj slučaj možemo detektirati i ispraviti (obrtnjem brida cd u brid ab sa slike 9), dok kod daljnjih slučajeva to nije moguće jednostavno ispraviti, ali postoji mogućnost vraćanja pomicanje točke i integracija za manji dt .

3.6 Dioba i umiranje stanica



Slika 10: Prikaz postupka uklanjanja točke iz trokutaste rešetke

Glavni cilj simulacije je opisati rast tkiva zbog čega moramo na neki način omogućiti da se stanice u tkivu diobom dijele. Kako se stanice sastoje od dvije čestice koje predstavljaju pol diobenog vretena možemo to postići tako da se dioba može dogoditi tek nakon što čestice budu udaljene za barem R_{c1} . Nakon što udaljenost čestica pređe početnu granicu vjerojatnost diobe raste linearno sve do udaljenosti R_{c2} kada se stanica sigurno dijeli. Kada se dioba dogodi nova čestica se postavlja na proizvoljnu točku kružnice radijusa r_c od stare čestice. Nove čestice nasljeđuju brzinu starih te svaka nova čestica s pripadajućom starom česticom tvori novu stanicu. U simulaciji stanice podliježu procesu apoptoze kojim stanica umire. Kako bi simulirali proces apoptoze generiramo proizvoljan broj iz uniformne distribucije te uspoređujemo s faktorom apoptoze pomnoženog sa starošću stanice i dt koraka ($\text{uniform}(0,1) < k_a \times dt \times \text{starost stanice}$). Zbog navedenog vjerojatnost apoptoze raste s starosti stanice. Kako bi izmjerili starost stanice uzimamo razliku trenutnog vremena i vremena zadnje podjele.

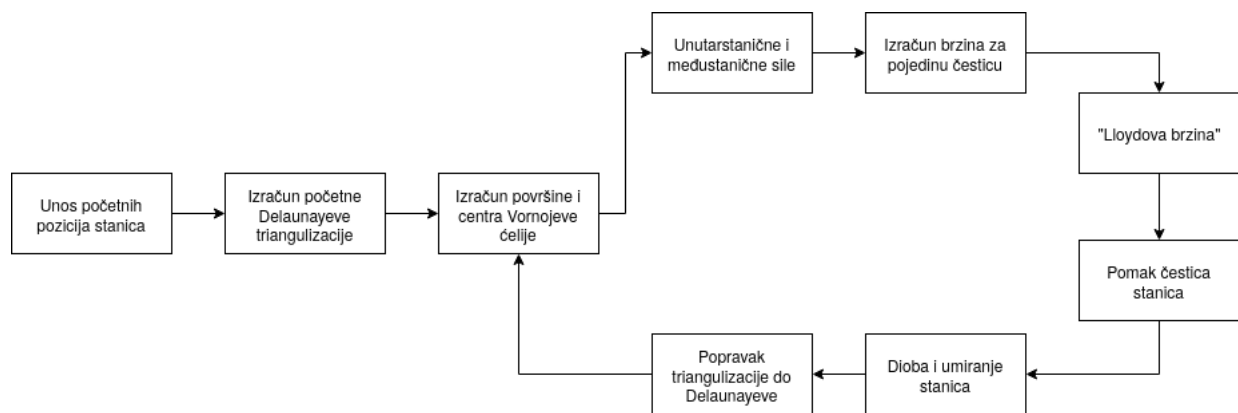
Kako u našoj simulaciji želimo samo jedanput izgraditi početnu Delaunayevu triangulaciju koju prebacimo na grafički procesor, te ne želimo prilikom promjene broja točaka koje generiraju samu triangulaciju ponovno graditi sve ispočetka, moramo omogućiti dodavanje i brisanje točaka iz triangulacije. Prvo ćemo opisati postupak brisanja točke iz triangulacije.

Nakon što smo označili točke koje planiramo obrisati, provodimo postupak traženja skupa točaka koji nisu susjedni u trenutnoj Delaunayevoj triangulaciji. Sve točke koje želimo obrisati dodamo u skup točaka P_d koje planiramo obrisati u ovom koraku, potom svakom bridu pridružimo dretvu u kojoj provjeravamo jesu li vrhovi koje taj brid povezuje u skupu P_d . Ako su oba vrha u skupu P_d , vrh s većom pozicijom u nizu vrhova izbacujemo iz skupa P_d . U ostalim slučajevima ne mijenjamo skup P_d . Nakon što smo odredili skup točaka koje možemo paralelno brisati pokrećemo novi *kernel* u kojem svakom bridu pridružujemo dretvu. U ovom koraku za svaki brid provjeravamo povezuje li vrh koji je u skupu P_d ; ako ih povezuje i ako okretanjem toga brida nećemo stvoriti izokrenuti trokut, uz pomoć atomarnih operacija tražimo ključ na susjednim trokutima toga brida kako bi spriječili

mogućnost okretanja dva susjedna brida. Ako je brid dobio ključ od oba trokuta taj brid okrećemo. Ovaj postupak vidimo na slici 3.6, gdje su plavi bridovi dobili ključ od oba svoja susjedna trokuta, te su narančasti bridovi rezultat obrtanja brida u tom koraku. Korak okretanja bridova provodimo sve dok svi vrhovi iz skupa P_d nisu incidentni s točno 3 brida. Nakon toga, iz trokutaste rešetke uklanjanjem bridova, trokuta i točaka koji su susjedni točkama u skupu P_d , a potom dodavanjem trokuta popunjavamo praznine u trokutastoj rešetki i dobivamo valjanu trokutastu rešetku, te taj postupak ponavljamo sve dok postoje točke koje želimo ukloniti.

Proces dodavanja točaka iz skupa P_i započinjemo traženjem trokuta u rešetki kojima pripadaju točke P_i . Taj postupak izvodimo u *kernelu* gdje je svakom trokutu pridružena dretva koja provjerava za sve točke iz P_i nalaze li se unutar tog trokuta. Nakon što smo našli pripadajući trokut za svaku točku, ručnim dodavanjem bridova, trokuta i vrhova ubacujemo maksimalno jednu točku za svaki trokut. Ako smo u neki početni trokut trebali dodati više od jedne točke, tražimo nove trokute kojima pripadaju ostale točke koje još nismo dodali te postupak ponavljamo sve dok postoje točke u skupu P_i .

Kako sada imamo omogućeno dodavanje i uklanjanje točaka iz Delaunayeve triangulacije bez uništavanja triangulacije, možemo provesti postupak diobe stanice tako da uklonimo staro središte stanica i dodamo dva nova središta stanica. Dok prilikom apoptoze samo uklanjamo središte stanice. Samo uklanjanje se provodi postavljanjem zastavice da se element u nizu više ne koristi, te u nekom trenutku se uklone svi takvi elementi.



Slika 11: Skica dijagrama simulacije

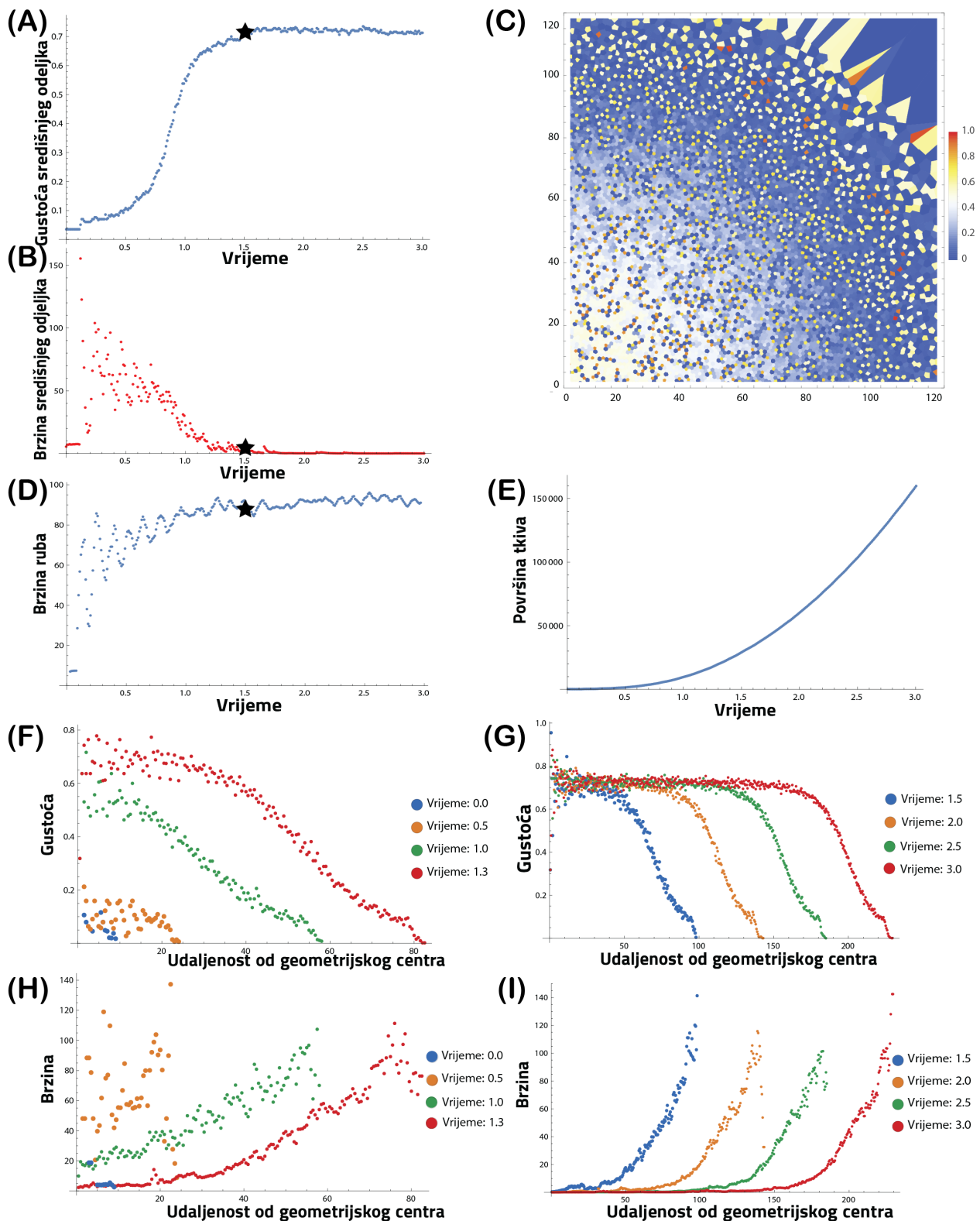
4 Rezultati

Rezultate naših simulacija uspoređujemo³ s eksperimentalnim ponašanjima opisanim u uvodu kako bi se vidjelo s čime se podudaraju, od čega odstupaju te gdje postoji prostor za napredak. Promotriti ćemo utjecaje dvaju bitnih faktora, jačine Lloydovih iteracija (L) i veličine rubne stanice (A_{rubne}).

4.1 Rezultati modificirane simulacije

Jačinu Lloydovih iteracija općenito biramo kao relativno malen broj, kako bi njegov utjecaj bio sumjerljiv utjecaju sila na stanicu. U ovoj ćemo simulaciji koristiti Lloydove iteracije jačine $5 * 10^{-6}$. Veličinu rubne stanice biramo četiri puta veću od osnovne veličine stanice. Također, promijenili smo doseg adhezijske sile na isključivo Voronojeve susjede, tj. one koji s promatranom stanicom dijele stijenku, pri čemu smo modificirali i njenu snagu ($f_a = 1$). Potaknuti diskretizacijom dijeljenja koja je posljedica osnovnog modela i vidljiva u rezultatima potonjih simulacija, mijenjamo i gornju granicu dijeljenja ($R_{c2} = 2.85$). Odabir točno ovih parametara biti će pojašnjen kasnije, dok će zasad opisivati konačne efekte koje naša simulacija postiže jednako dobro kao svi parametri unutar reda veličine. Simulaciju pokrećemo iz rijetke početne konfiguracije, kako bi sam prelazak u stabilno stanje dulje trajao omogućujući čišći pregled događanja.

³primijetimo da veličinama čije ovisnosti uspoređujemo nisu navedene dimenzije jer se koriste jedinične veličine svojstvene simulaciji



Slika 12: Rezultati simulacije pri korištenju Lloydovih iteracija jačine $5 \cdot 10^{-6}$ i rubne stanice četiri puta veće od osnovne. A) Ovisnost gustoće stanica u središnjem odjeljku o vremenu. B) Ovisnost brzine stanica u središnjem odjeljku o vremenu. C) Prikaz starosti i brzine stanica. D) Ovisnost brzine stanica u rubnom odjeljku o vremenu. E) Ovisnost površine kolonije o vremenu. F) i G) Ovisnost gustoće stanica o udaljenosti od geometrijskog centra kolonije u raznim trenucima. H) i I) Ovisnost brzine stanica o udaljenosti od geometrijskog centra kolonije u raznim trenucima.

Promotrimo prvo površinu kolonije u ovisnosti o vremenu (Slika 12E). Vidimo da njen rast u početku, kada svaka dioba drastično utječe na površinu kolonije, prati eksponencijalu. Ona ipak vrlo brzo prelazi u režim kada u tkivu do izražaja dolaze međustanična djelovanja, te tkivo kao cjelina počinje pratiti linearan rast.

Slika 12C prikazuje raspored stanica po starosti. Skala starosti pruža se od nule do starosti najstarije stanice u tkivu. Centar tkiva nalazi se u donjem lijevom uglu, te je vrlo lako vidljivo da starost stanica opada prema rubu. Ovaj je efekt posljedica činjenice da su stanice u središnjem odjeljku u pravilu manje, te se zbog toga u kombinaciji s temeljima diobe našeg modela rjeđe dijele.

Gustoća stanica u tkivu uistinu pokazuje nagli rast u početku (Slika 12F). Nakon određenog vremena, počinje slabo formiranje središnjeg odjeljka, gdje gustoća nastavlja rasti, i rubnog odjeljka u kojem zbog veličine stanica ona pada. Ovo pravilo tkivo prati do postizanja stabilnog neravnotežnog stanja (Slika 12G; 12A), gdje se gustoća središnjeg odjeljka više ne povećava. Nakon toga, daljnje povećanje broja stanica isprva rezultira oblikovanjem rubnog profila, koji se kasnije ne mijenja. Kasnije dolazi tek do širenja središnjeg odjeljka. U profilu gustoće može se primijetiti i razvoj ranije spomenute *nogice*, iako se ona nalazi pri nešto nižoj gustoći od eksperimentalnih podataka.

Stanicama u početnom trenutku pridjeljujemo nasumičnu brzinu, ali ona vrlo brzo postiže karakteristično ponašanje. Može se uočiti nagli rast brzine u početku razvoja (Slika 12H). Međutim, ovakvo ponašanje nije dugotrajno već stanice u središnjem odjeljku u pravilu usporavaju tijekom formiranja odjeljaka, dok stanice u rubnom ubrzavaju (Slika 12D). Nakon određenog vremena, brzina stanica u rubu pada do razine koja opisuje tek lokalne fluktuacije (Slika 12B). Taj se trenutak (označen *zvjezdicom*) poklapa sa saturacijom gustoće u središnjem odjeljku a prethodi saturaciji brzine u rubnom odjeljku.

4.2 Utjecaj promjene jačine Lloydovih iteracija

Sada promatramo utjecaje različitih jačina Lloydovih iteracija, uz konstantnu veličinu rubne stanice četiri puta veću od uprosječne. Uspoređujemo rezultate za Lloydove iteracije jačine 10^{-5} , $5 * 10^{-6}$, 10^{-6} , te prikazujemo i rezultate osnovnog modela bez djelovanja Lloydovih iteracija (osnovni model) kako bismo mogli vidjeti njihov pravi utjecaj.

U odsutnosti Lloydovih iteracija, primjećujemo da je profil gustoće znatno prestrm u usporedbi s eksperimentom. To nam govori da dolazi do formacije središnjeg odjeljka, ali rub gotovo ni ne postoji. Navedeno se najbolje vidi iz vizualne reprezentacije gdje možemo uočiti da stanice poprimaju pravilne oblike te nije moguće razlikovati dva odjeljka. Zbog navedenih nepodudaranja s eksperimentom, zaključujemo da osnovni model sam nije zadovoljavajuć.

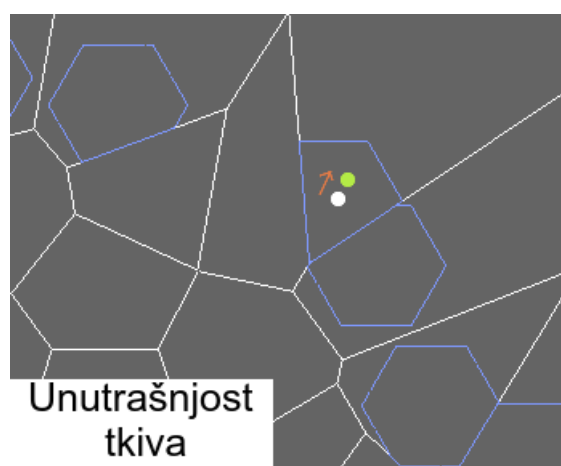
Jasno je vidljivo da je veličina kolonije pod direktnim utjecajem jačine Lloydovih iteracija. Jače Lloydove iteracije više rastežu tkivo prema van, te su središnji odjeljci veći. To se rastezanje događa jer rubne stanice ostvaruju konstantan pomak u približno radijalnom smjeru na temelju Lloydovih

iteracija. Naime, nepravilnost oblika rubne stanice vodi do pomaka centra mase rubne stanice dalje od središta tkiva. Slika 13 prikazuje opisani efekt. Bijelom je bojom označen centar stanice, a žutom centar mase iste rubne stanice što će rezultirati pomakom u narančastom smjeru nakon provođenja Lloydovih iteracija u narednom koraku simulacije. Naravno, postojati će i rubne stanice kod kojih će efekt biti obratnog učinka, ali će u konačnici ukupno djelovanje biti u pozitivnom radijalnom smjeru. To je posljedica slobodnog prostora koji okružuje tkivo, zbog kojeg će stijenke vanjskih stanica većinski divergirati prema van, što je, kao na primjeru na slici, glavni uzrok pomaka centra mase stanice.

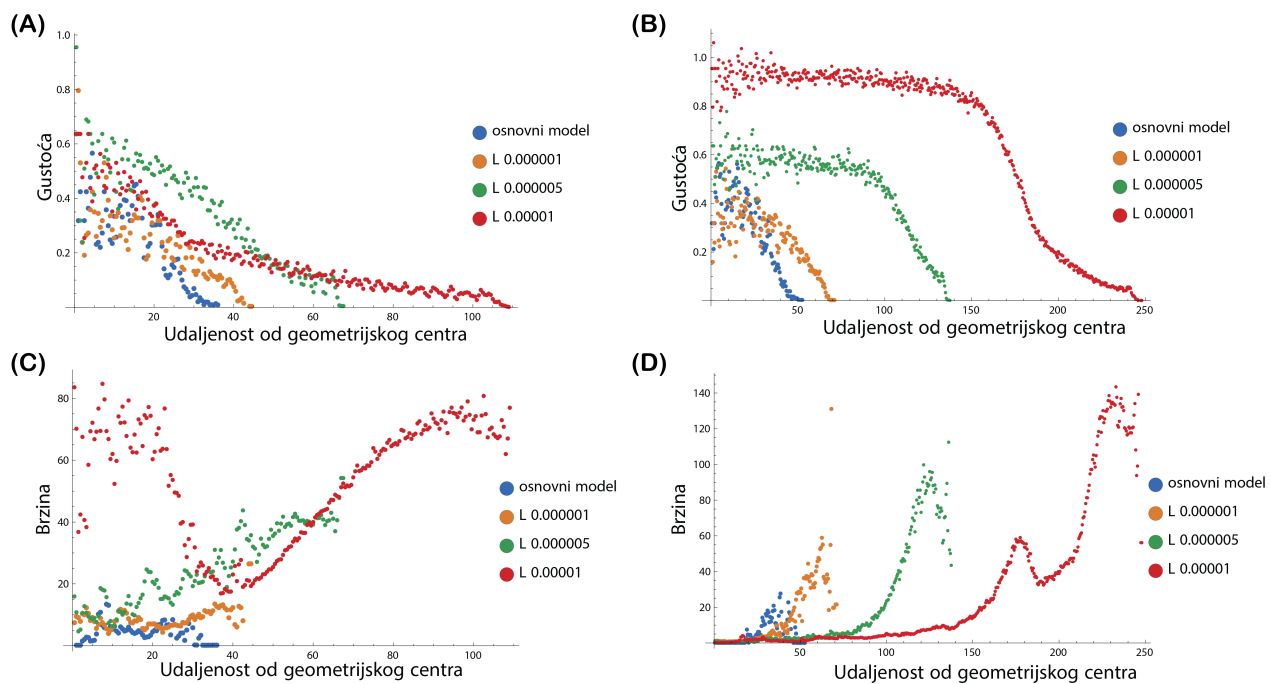
Ovaj efekt opisuje općenito ponašanje brzine koje smo vidjeli u prethodnom potpoglavlju. Može se vidjeti da s porastom jačine Lloydovih iteracija raste i brzina ruba u iznosu. Brzine stanica u središnjim odjeljcima pri postizanju konačne gustoće padaju. Može se primijetiti i razvitak deformacija u profilu brzine u rubnom odjeljku tkiva. Zbog tih abnormalnosti koje ne nalazimo u eksperimentu zaključujemo da niti prejake Lloydove iteracije ne vode na reprodukciju eksperimentalnih rezultata.

Gustoća pokazuje već opisana svojstva saturacije i razvitka odjeljaka, te je postizanje maksimuma i njegovo održavanje nauštrb površine uočljivije pri korištenju jačih Lloydovih iteracija. Također, tkivo tada postiže i veću gustoću. Uz optimizaciju staničnog oblika, uspijeva se postignuti neravnotežno stabilno stanje. Unatoč tome, očekujemo da postoji gornja granica jačine Lloydovih iteracija kada tkivo biva previše razvučeno te se gubi stabilnost.

Usporedbom naših rezultata s eksperimentalnim uočavamo da su Lloydove iteracije jačine $5 * 10^{-6}$ najbliže mjerenjima.



Slika 13: Lloydove iteracije u kombinaciji s definicijom rubne stanice



Slika 14: **Usporedba rezultata simulacija pod utjecajem različitih jačina Lloydovih iteracija ($L = 10^{-5}, 5 * 10^{-6}, 10^{-6}; A_{rubne} = 4$).** A) i B) Ovisnost gustoće stanica o udaljenosti od geometrijskog centra kolonije. C) i D) Ovisnost brzine stanica o udaljenosti od geometrijskog centra kolonije

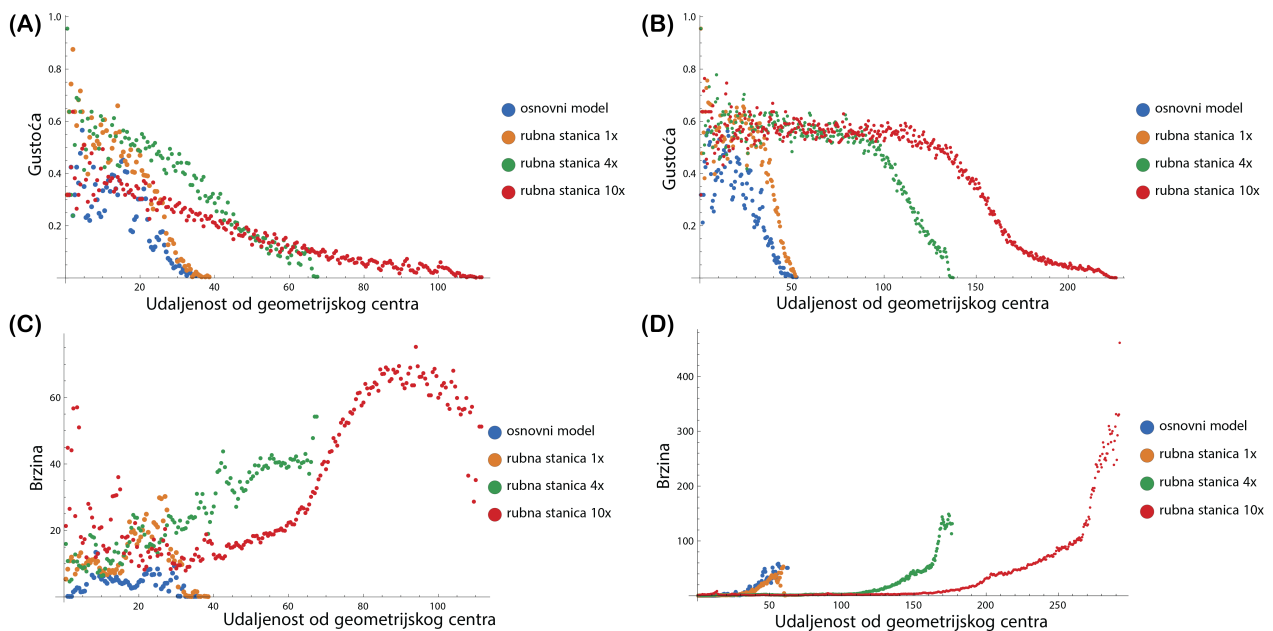
4.3 Utjecaj promjene veličine rubne stanice

Rubne su stanice uvedene u našu simulaciju kako bi se opisale ćelije koje okružuju tkivo. Sada možemo promotriti njihov utjecaj na morfologiju tkiva mijenjajući im veličinu. Usporediti ćemo rezultate simulacija u kojima koristimo rubne stanice *osnovne veličine*, te rubne stanice četiri odnosno deset puta većih dimenzija. U svakoj od ovih simulacija koristimo Lloydove iteracije jačine $5 * 10^{-6}$ na temelju zaključaka prethodnog potpoglavlja. Uz to prikazujemo i rezultate simulacije gdje je djelovanje Lloydovih iteracija izuzeto (Slika 15). Na ovaj ćemo način biti u mogućnosti izabrati faktor prikladan eksperimentu te provjeriti općenitu dinamiku naše simulacije.

Prvo promatramo profile gustoće (Slika 15A; 15B). Vidljivo je da veće rubne stanice usporavaju rast gustoće, te posredno i formiranje odjeljaka. Korištenje većih rubnih stanica rezultira i većom površinom kolonije u početnom trenutku, što se nastavlja tijekom čitavog rasta kolonije. Iako ju neće postići u istom trenutku, iznos konačne gustoće središnjeg odjeljka neće se mijenjati za različite veličine rubne stanice. U stabilnom neravnotežnom stanju, one određuju širinu rubnog odjeljka i brzinu pada gustoće stanica. Stanice u rubnom odjeljku u pravilu teže veličinom k veličini rubne stanice, što odgovara eksperimentalnim opažanjima jer u eksperimentu veličina stanice raste prema rubu. Što je ona manja, biti će i manji prijelaz u veličini između stanice u središnjem odjeljku i rubne. Ovo efektivno stanjuje rubni odjeljak, uzrokujući brži pad gustoće na rubu tkiva.

U profilu brzine vidimo daljnji utjecaj veličine rubne stanice. Za deset puta veće stanica primjećujemo poseban režim na rubu, gdje će profil brzine saturirati. S rastom veličine rubne stanice raste i širina dotične saturacije ali i općenita brzina ruba biti će veća što je veća i rubna stanica. Brzina ruba kasnije postiže svoju graničnu vrijednost kod većih stanica, što se poklapa sa sporijim rastom gustoće središnjeg odjeljka.

Može se primijetiti da se rezultati simulacije s rubnom stanicom *osnovne veličine* ponašaju slično simulaciji u kojoj Lloydove iteracije nisu korištene. Stanice u rubnom odjeljku pri razvoju postižu male brzine (relativno u odnosu na ostale simulacije gdje su korištene Lloydove iteracije) i površina kolonije se praktički poklapa s površinom simulacije bez Lloydovih iteracija. Ipak, može se primijetiti korištenje Lloydovih iteracija u većoj postignutoj gustoći i većoj brzini ruba.



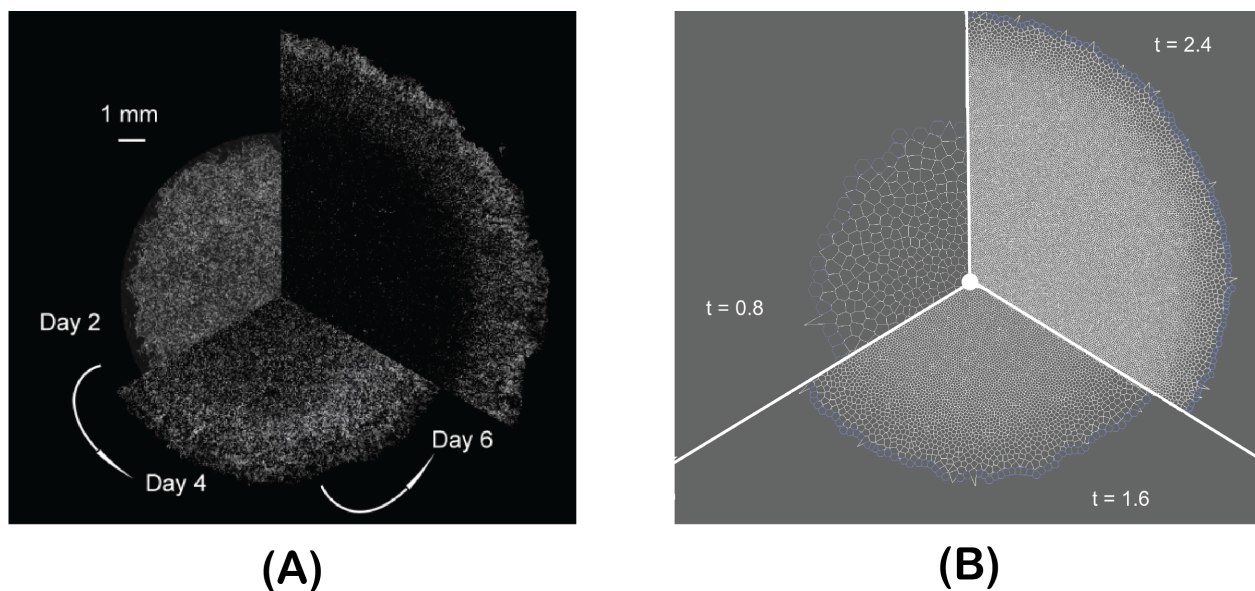
Slika 15: Usporedba rezultata simulacija pod utjecajem različitih veličina rubne stanice ($A_{rubne} = 1, 4, 10; L = 5 \cdot 10^{-6}$). A) i B) Ovisnost gustoće stanica o udaljenosti od geometrijskog centra kolonije. C) i D) Ovisnost brzine stanica o udaljenosti od geometrijskog centra kolonije

4.4 Usporedba s eksperimentom

Na kraju biramo optimalan skup parametara koji bi našu simulaciju u najvećoj mjeri poistovjetio s rezultatima eksperimenta. Nakon promatranja rezultata, smatramo da Lloydove iteracije jačine $5 \cdot 10^{-6}$ u kombinaciji s rubnom stanicom četiri puta većom od *osnovne* pružaju odgovarajuće ponašanje (Slika 16). Navedenim objašnjavamo odabir prve simulacije čije smo rezultate detaljnije prikazali (Slika 12).

Možemo promotriti i prikaz tkiva u različitim trenucima u simulaciji (Slika 16⁴). Jasno je vidljivo formiranje podjele na središnji i rubni odjeljak i u eksperimentalnom i u simuliranom tkivu.

⁴slike simulacije su radi kvalitete uzete pri jednakom povećanju, te zbog toga radijalna dimenzija nije uspoređena



Slika 16: **Usporedba eksperimentalnog razvoja i simuliranog**; eksperimentalna slika preuzeta iz Kaliman [2018]

U središnjem odjeljku prevladavaju manje stanice, što rezultira većom gustoćom. Jasno se vidi postepeni prijelaz u veličini stanica u rubnom odjeljku, od prosječne veličine stanice središnjeg odjeljka do veličine rubne stanice. Izraženost radijalnog rasta može se primijetiti u kružnom obliku kolonije.

5 Zaključak

Sažmimo sada rezultate naše simulacije. U dvočestični model uvodimo Voronojevu teselaciju i na nj djelujemo Lloydovim iteracijama. Voronojeva teselacija omogućuje nam ograničavanje djelovanja adhezije na stanice koje dijele brid s promatranom stanicom. Djelovanje Lloydovih iteracija rasteže tkivo rezultirajući većom kolonijom. Primjećuje se jasno formiranje središnjeg i rubnog odjeljka uočenih u eksperimentu. Promatramo utjecaj dvaju faktora, jačine Lloydovih iteracija (udjela udaljenosti između točkastog generatora Voronojeve ćelije i njenog centra mase za koji se generator pomakne) i veličine rubne stanice (umjetno stvorenih šesterokuta koji zamjenjuju prostor oko tkiva okružujući ga). Porastom jačine Lloydovih iteracija uočili smo rast gustoće središnjeg odjeljka, brzine stanica u rubnom odjeljku i površine kolonije. Veličina rubne stanice, čini se, određuje gornju granicu veličine stanica u tkivu. Ona pak ne utječe na maksimalnu gustoću središnjeg odjeljka. Ova dva rezultata spojena rezultiraju u direktnoj povezanosti širine rubnog odjeljka i veličine rubne stanice. Primjećuje se rast površine kolonije i rubne brzine s porastom rubne stanice. Primijećeno je kašnjenje saturacije brzine stanica na rubu za saturacijom gustoće i brzine u središnjem odjeljku, što je važan rezultat iz perspektive tkiva kao fizikalnog sustava jer još

nije razvijena teorija sličnog nepodudaranja.

Uvođenje Lloydove optimizacije, odnosno relaksacije staničnog oblika na brzim vremenskim skalama, u konačnici rezultira promjenama makroskopske strukture i globalne dinamike rasta.

Reference

Markus Affolter, Rolf Zeller, and Emmanuel Caussinus. Tissue remodelling through branching morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(12):831–842, 2009. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/nrm2797. URL <https://doi.org/10.1038/nrm2797>. 2

Daniel L. Barton, Silke Henkes, Cornelis J. Weijer, and Rastko Sknepnek. *Active Vertex Model for cell-resolution description of epithelial tissue mechanics*, volume 13. 2017. ISBN 1111111111. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005569. 6

Markus Basan, Jacques Prost, Jean François Joanny, and Jens Elgeti. Dissipative particle dynamics simulations for biological tissues: Rheology and competition. *Physical Biology*, 8(2), 2011. ISSN 14783975. doi: 10.1088/1478-3975/8/2/026014. 6, 7

Francisco Carter, Nancy Hitschfeld, Cristóbal A Navarro, and Rodrigo Soto. Gpu parallel simulation algorithm of brownian particles with excluded volume using delaunay triangulations. *Computer Physics Communications*, 229:148–161, 2018. 16

Luka Cavaliere Lokas and Karlo Delić. Utjecaj kratkodosežnih asimetričnih interakcija na amorfne strukture u dvije dimenzije. 2019. 5

Mark De Berg, Marc Van Kreveld, Mark Overmars, and Otfried Schwarzkopf. Computational geometry. In *Computational geometry*, pages 1–17. Springer, 1997. 9

Evgueni Filipov, Junho Chun, Glaucio Paulino, and Junho Song. Polygonal multiresolution topology optimization (PolyMTOP) for structural dynamics. *Structural and Multidisciplinary Optimization*, 53, 2015. doi: 10.1007/s00158-015-1309-x. 10

Hisao Honda. Description of cellular patterns by Dirichlet domains: The two-dimensional case. *Journal of Theoretical Biology*, 72(3):523–543, 1978. ISSN 10958541. doi: 10.1016/0022-5193(78)90315-6. 4

Ferran Hurtado, Marc Noy, and Jorge Urrutia. Parallel edge flipping. In *CCCG*, 1998. 14

Sara Kaliman. Morphological analysis of epithelial cells, PhD thesis. page 190, 2018. URL <https://opus4.kobv.de/opus4-fau/frontdoor/index/index/docId/9245>. 2, 3, 4, 5, 11, 25

- Sara Kaliman, Maxime Hubert, Carina Wollnik, Simone Gehrer, Damir Vurnek, Diana Dudziak, Florian Rehfeldt, and Ana-sunčana Smith. On the mechanical regulation of epithelial tissue homeostasis. 2020. 3
- Michael A. Klatt, Jakov Lovrić, Duyu Chen, Sebastian C. Kapfer, Fabian M. Schaller, Philipp W.A. Schönhöfer, Bruce S. Gardiner, Ana Sunčana Smith, Gerd E. Schröder-Turk, and Salvatore Torquato. Universal hidden order in amorphous cellular geometries. *Nature Communications*, 10(1), 2019. ISSN 20411723. doi: 10.1038/s41467-019-08360-5. 10
- Charles L Lawson. Transforming triangulations. *Discrete mathematics*, 3(4):365–372, 1972. 11, 14
- Joseph Leighton. Adenocarcinoma and of Renal Tubular Epithelium *. *Cancer*. 2
- Stuart P. Lloyd. Least Squares Quantization in PCM. *IEEE Transactions on Information Theory*, 28(2):129–137, 1982. ISSN 15579654. doi: 10.1109/TIT.1982.1056489. 10
- Anna Kristina Marel, Matthias Zorn, Christoph Klingner, Roland Wedlich-Söldner, Erwin Frey, and Joachim O Rädler. Flow and diffusion in channel-guided cell migration. *Biophysical Journal*, 107(5):1054–1064, 2014. ISSN 15420086. doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.017. 2
- Cristóbal Navarro, Nancy Hitschfeld, and Eliana Scheihing. Quasi-delaunay triangulations using gpu-based edge-flips. In *International Conference on Computer Vision, Imaging and Computer Graphics*, pages 36–49. Springer, 2013. 11, 12, 14, 16
- P. Nikunen, M. Karttunen, and I. Vattulainen. How would you integrate the equations of motion in dissipative particle dynamics simulations? *Computer Physics Communications*, 153(3):407–423, 2003. ISSN 00104655. doi: 10.1016/S0010-4655(03)00202-9. 6
- Alberto Puliafito, Lars Hufnagel, Pierre Neveu, Sebastian Streichan, Alex Sigal, D. Kuchnir Fygen-son, and Boris I. Shraiman. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3): 739–744, 2012. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.1007809109. 2, 3
- Jonas Ranft, Markus Basan, Jens Elgeti, Jean François Joanny, Jacques Prost, and Frank Jülicher. Fluidization of tissues by cell division and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49):20863–20868, 2010. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.1011086107. 2
- P. Rosen and D. S. Misfeldt. Cell density determines epithelial migration in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(8):4760–4763, 1980. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.77.8.4760. 2

Néstor Sepúlveda, Laurence Petitjean, Olivier Cochet, Erwan Grasland-Mongrain, Pascal Silberzan, and Vincent Hakim. Collective Cell Motion in an Epithelial Sheet Can Be Quantitatively Described by a Stochastic Interacting Particle Model. *PLoS Computational Biology*, 9(3), 2013. ISSN 1553734X. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002944. 6

Michael Stoker, Ermanno Gherardi, Marion Perryman, and Julia Gray. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*, 327(6119):239–242, 1987. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/327239a0. URL <https://doi.org/10.1038/327239a0>. 2

Damir Vurnek. Rad u izradi. 2, 3

6 Sažetak

Lovro Nuić i Luka Rogić

Utjecaj optimizacije staničnih oblika na dvočestični model rasta epitelnih tkiva

Stanične interakcije i razvitak tkiva bitni su procesi u medicini i biologiji danas. Od posebne su važnosti epitelna tkiva, čiji je reprezentant *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) tkivo, koje se koristi kao dobar modelni sustav. Iz fizikalne perspektive, rast tkiva je primjer makroskopske dinamike koja ovisi o neravnotežnim procesima na skalama jedne stanice. Način na koji se dobiva konačno neravnotežno stabilno stanje, upućuje na zanimljive pojave koje do sada nisu fizikalno obrađene.

Dosadašnji eksperimenti rasta MDCK kolonija pokazali su da neograničena tkiva rastu na izuzetno nelinearan način kojeg se do sada nije uspjelo povezati s međustaničnim interakcijama i aktivnošću u sustavu. Također je eksperimentalno pokazano da stanice u tkivu dijele prostor koji je dobro prikazan Voronojevom teselacijom. Nadalje, pokazano je da je regulacija oblika povezana s pomicanjem generatora Voronojeve teselacije u centar mase stanice.

Da bi opisali rast tog tkiva mi razvijamo simulaciju disipativnu dinamike čestica koristeći dvočestični model stanice, koji se prethodno pokazao korisnim u simulacijama ograničenog rasta krila vinske mušice. Taj model parametrizira disipativne sile trenja pri pomicanju stanica, međustaničnu adheziju, ekskluziju, a uzima u obzir i dijeljenje i umiranje stanica.

U svom osnovnom obliku, međutim, taj model ne reproducira neograničeni rast MDCK tkiva. Mi postavljamo hipotezu da brza optimizacija oblika stanice, koja nije dio osnovnog modela, doprinosi nelinearnom rastu na velikim prostornim i vremenskim skalama. Stoga proširujemo model i opisujemo oblik stanice Voronojevom teselacijom. Nadalje, uvodimo takozvani Lloydov algoritam radi postizanja optimizacije oblika stanica. Nalazimo da prošireni model može vrlo precizno opisati distribucije oblika stanica u tkivu, reproducira korektne profile gustoća i brzina, te da je indikativan pojačanoj nelinearnosti globalnoga rasta.

Povezanost procesa rasta i staničnih interakcija identificirana u ovom radu do sada nije bila razmatrana niti u fizikalnom, niti u biološkom kontekstu, dok posljedice na fiziologiju zdravih i bolesnih tkiva mogu biti dalekosežne.

Ključne riječi: epitelna tkiva, DPD simulacije, GPU kodiranje, dinamika rasta, optimizacija oblika

7 Summary

Lovro Nuić and Luka Rogić

Influence of cell structure optimization on a two-particle model of epithelial tissue growth

Cell interactions and tissue growth are important processes in medicine and biology and are often considered in the context of the epithelium. A particularly well-studied model system of epithelium is the *Madin-Darby Canine Kidney* tissue. From a physical perspective, tissue growth is a prime example of macroscopic dynamics which is influenced by non-equilibrium processes at single-cell levels.

After a transient behavior, typically the growth of tissue reaches the non-equilibrium steady state, the properties of which suggests interesting phenomena that have not yet been elucidated. More specifically, previous work on the unrestricted growth of MDCK tissue has shown effects that could not be related to cell-cell interactions and the intrinsic cellular activity. Besides, it has been demonstrated that the partitioning of space by cells strongly resembles the Voronoi tessellation. Finally, the regulation of the cell shape has been associated with the translation of the Voronoi generators, the cell nuclei, toward the center of mass of the Voronoi cell.

To theoretically describe the growth of MDCK tissue, we developed a dissipative particle dynamics simulation utilizing the two-particle model of a cell. This particular approach was proven useful for modeling of the epithelium on the wing of drosophila. It accounts for the dissipative friction of moving cells, cell-cell adhesion, and exclusion. It also considers cell division and death.

In this work, we find that in its basic form however, the two-particle model does not reproduce the unrestricted growth of the MDCK tissue. We hypothesize that rapid optimization of cell structure, which is not included in the basic mode, contributes to the nonlinear growth and the structuring of tissue. Therefore we expand the basic model and describe the structure of a cell via Voronoi tessellation. Also, we introduce the Lloyd algorithm to achieve the optimization of cell structure. We find that the expanded model very precisely describes the distribution of cell sizes in tissue, reproduces the correct speed and density profiles. It is also indicative of the intensified nonlinearity of global growth.

The interconnection of the growth process and cell interactions identified in this work has not been discussed in either physical or biological context so far. However, the consequences of this relation can have far-reaching effects in the physiology of healthy and diseased tissue, which remain to be explored in future studies.

Keywords: epithelial tissue, DPD simulation, GPU coding, growth dynamics, structure optimization