

POLITECHNIKA POZNAŃSKA

Wydział Informatyki i Telekomunikacji
Instytut Informatyki



**PODEJŚCIA SYSTEMOWE DO MODELOWANIA I
ANALIZY WYBRANYCH PROCESÓW ZWIĄZANYCH Z
POWSTAWANIEM I ROZWOJEM MIAŻDŻYCY**

Kaja Gutowska

Rozprawa doktorska
Promotor: prof. dr hab. inż. Piotr Formanowicz

Poznań 2023

Podziękowania

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, prof. dr hab. inż. Piotrowi Formanowiczowi, za wiedzę, poświęcony czas i nieocenioną pomoc, których uświadczyłam przez te wszystkie lata.

Dziękuję za wszelkie rady, które doprowadziły do powstania niniejszej rozprawy.

Kolejne podziękowania składam moim Rodzicom i Przyjaciołom,
dziękuję za życzliwe słowa oraz motywację.

Szczególne podziękowania adresuję mojemu mężowi,
bez Twojego wsparcia i zrozumienia nie udałoby mi się tego dokonać.

Dziękuję.

Kaja Gutowska

Streszczenie

Biologia obliczeniowa jest szybko rozwijającą się nauką na styku biologii, matematyki i informatyki. Ta szeroka dyscyplina dotyczy między innymi tworzenia modeli dla różnych danych eksperymentalnych, w tym złożonych systemów biologicznych, wykorzystując różne metody matematyczne i obliczeniowe. Przy dynamicznym rozwoju nauk biologicznych, medycyny oraz wykładniczym wzroście dostępności danych, pojawia się potrzeba tworzenia precyzyjnych modeli matematycznych. Modele te stają się w ostatnich latach coraz bardziej popularne jako narzędzia systematyzujące wiedzę, ale także jako narzędzia wspomagające prace eksperymentalne. Zapewniają one nie tylko wgląd w ogólne właściwości tych systemów, ale także pomagają w konkretnych zadaniach, takich jak poszukiwanie celów molekularnych dla leków, czy protokołów leczenia.

Problemem badawczym niniejszej rozprawy jest zbadanie przydatności różnych metod informatycznych do modelowania i analizy złożonych systemów biologicznych, a w szczególności procesów powstawania i rozwoju miażdżycy. Miażdżycza jest chorobą sercowo-naczyniową stanowiącą jedną z głównych przyczyn śmiertelności na świecie, a pomimo tego dalej brakuje jednoznacznych informacji o mechanizmach jej progresji. Badania naukowe ciągle koncentrują się na profilaktyce miażdżycy oraz na zwiększeniu możliwości terapeutycznych. Do realizacji tych celów przybliżyć mogą różne podejścia systemowe. Nadmienić należy, że wszelkie rozważane w tej pracy metody mają zastosowanie do dowolnych zjawisk biologicznych, od szlaków biochemicznych, przez ścieżki sygnałowe, po złożone mechanizmy patogenezы różnych jednostek chorobowych. W rozprawie, obok modeli traktujących o miażdżycy, rozpatrywano także inne zjawiska biologiczne, nie tylko bezpośrednio z nią związane.

Zgodnie z opisem problemu badawczego, rozprawa koncentruje się na dwóch ścieżkach badawczych. Jedna z nich dotyczy kontekstu biologicznego, czyli zaproponowania modeli złożonych systemów biologicznych. Dotyczą one w głównej mierze mechanizmów leżących bezpośrednio u podstaw powstawania i rozwoju miażdżycy, ale także jak wspomniano wcześniej, mechanizmów pośrednio z nią związanych oraz innych analizowanych zjawisk biologicznych. Druga ścieżka badawcza dotyczy metod informatycznych, a więc zastosowania różnych podejść systemowych do tworzenia modeli i ich analizy, a także oceny zastosowanych metodologii pod względem uzyskanych wyników. W realizacji celu metodologicznego skupiono się głównie na podejściach opartych o klasyczne sieci Petriego, w tym istniejące, klasyczne i rozszerzone metody analizy. Zaproponowano także rozszerzenia istniejących metod oraz własne, alternatywne metody analiz. Rozważono przy tym również aspekty kombinatoryczne wybranych problemów i zaproponowano ich algorytmiczne rozwiązania. Ponadto, podejście modelowania oparte o sieci Petriego porównano do podejścia opartego o równania różniczkowe zwyczajne, w efekcie czego zaproponowano podejście dualnego modelowania, umożliwiające przeprowadzenie kompleksowej analizy parametrycznej i strukturalnej. Poza metodą modelowania opartą o równania różniczkowe zwyczajne w pracy zastosowano także alternatywną metodę modelowania opartą o macierzowe modele dynamiki populacji.

Ocena istniejących metod do analizy klasycznych modeli opartych o sieci Petriego obejmuje

analizę zbiorów MCT, analizę t-klastrów oraz manualną analizę wybranych t-niezmienników, natomiast ocena rozszerzonych metod analizy obejmuje strukturalną analizę knockout i symulację knockout. Obok tych metod, zaproponowano własne metody analizy oraz rozszerzenie do metod istniejących. Wśród zaproponowanych metod wyróżnić można analizę ważności, porównawczą analizę ważności bazującą na dwóch modelach spełniających pokrycie przez t-niezmienniki oraz porównawczą analizę knockout. W ramach analizy modeli opartych o klasyczne sieci Petriego rozważono kombinatoryczne aspekty analizy t-niezmienników, w tym wybrane problemy występowania i anty-występowania podzbiorów tranzycji we wsparciach t-niezmienników oraz zaproponowano rozwiązania algorytmiczne dla wybranych z nich. W zakresie porównania metod modelowania, czyli podejść opartych o sieci Petriego i równania różniczkowe zwyczajne, skupiono się na konkretnych metodach analizy, na analizie ważności dla modeli opartych o sieci Petriego i analizie wrażliwości dla modeli opartych o równania różniczkowe zwyczajne. Badania nad tymi metodami pozwoliły na opracowanie dualnego podejścia modelowania.

W ramach części biologicznej tej rozprawy, zaproponowano przede wszystkim modele mające na celu usystematyzowanie wiedzy oraz poszukiwanie ciekawych interakcji i nieznanych dotąd właściwości w procesach powstawania i rozwoju miażdżycy. Z tego względu powstały następujące modele: model wpływu uszkodzeń śródbłonka na rozwój miażdżycy, model wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonka i rozwój miażdżycy, model wpływu wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego na rozwój miażdżycy, model wpływu interleukiny 18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy, w tym także zależności pomiędzy różnymi podtypami makrofagów, model zależności między hipercholesterolemią a niestabilnością blaszek miażdżycowych (czyli model dynamiki populacji makrofagów), a także model powiązań miażdżycy i tętniaków aorty brzusznej. Ponadto w rozprawie pojawił się model relacji między homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A, model relacji infekcji wirusowej między wirusem SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym, model równowagi między prooksydantami i antyoksydantami oraz model odpowiedzi systemu na uszkodzenia DNA na podstawie ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B.

Kompleksowa analiza modeli opisujących różne zjawiska biologiczne jest niezwykle trudna i pozostawia miejsce na kolejne rozważania. Niniejsza praca stanowi obszerne wprowadzenie do dalszych badań nad modelowaniem złożonych systemów biologicznych.

Abstract

Computational biology is a rapidly growing scientific discipline at the intersection of biology, mathematics and computer science. Among other things, this vast branch of science deals with creating models based on various experimental data, including complex biological systems, while utilising a variety of mathematical and computational methods. With the rapid development of biological sciences, medicine and the exponential increase in data availability, there is an emerging need to create accurate mathematical models. They allow to describe and analyse biological systems; they have become increasingly popular in recent years as tools to systematise knowledge, but also as tools to support experimental work. They not only provide insights into the general properties of these systems, but also help in specific tasks, such as the search for molecular targets for drugs or treatment protocols.

The research problem of this dissertation is to study the suitability of various computational methods for modelling and analysing complex biological systems, particularly atherosclerosis formation and its development processes. Atherosclerosis is a cardiovascular disease that is one of the leading causes of mortality worldwide, yet there is still a lack of clear information about the mechanisms of its progression. Published studies are constantly focusing on the prevention of atherosclerosis and increasing therapeutic possibilities. Various systemic approaches can bring these goals closer. It should be mentioned that all of the methods considered in this thesis apply to any biological phenomena, from biochemical pathways and signalling pathways to complex mechanisms of pathogenesis of various disease entities. In addition to models focusing on atherosclerosis, the thesis also considers other biological phenomena, not only ones directly related to it.

According to the description of the research problem, the dissertation focuses on two research paths. One concerns the biological context, that is, proposing models of complex biological systems. This mainly concerns the mechanisms directly underlying the formation and development of atherosclerosis, but also, as mentioned earlier, mechanisms indirectly related to it and other biological phenomena analysed.

The second research path concerns computing methods, that is, the application of different systems approaches to model development and analysis, as well as the evaluation of the methodologies used in terms of the results obtained. The methodological objective mainly focuses on approaches based on classical Petri nets, including existing, classical and extended methods of analysis. Extensions to existing methods and own alternative methods of analysis were also proposed. Combinatorial aspects of selected problems were also considered, and their algorithmic solutions were proposed. Furthermore, a modelling approach based on Petri nets was compared to an approach based on ordinary differential equations, resulting in a dual modelling approach being proposed, enabling a comprehensive parametric and structural analysis. In addition to the modelling approach based on ordinary differential equations, an alternative modelling approach based on matrix models of population dynamics was considered.

The evaluation of existing methods for analysing classical Petri net-based models includes

MCT sets analysis, t-clusters analysis and manual analysis of selected t-invariants, whereas the evaluation of extended analysis methods includes structural knockout analysis and knockout simulation. In addition to these methods, analysis methods and extensions to existing methods have been proposed. The proposed methods include importance analysis, comparative importance analysis based on two models fulfilling coverage by t-invariants and comparative knockout analysis. In the analysis of models based on classical Petri nets, combinatorial aspects of t-invariant analysis are considered, including selected problems of occurrence and anti-occurrence of transition subsets in supports of t-invariant. Moreover, algorithmic solutions for selected ones are proposed. Regarding the comparison of modelling methods, i.e. Petri nets and ordinary differential equations-based approaches, the focus was on specific methods of analysis, validity analysis for Petri nets-based models and sensitivity analysis for ordinary differential equations-based models. The research on these methods allowed for developing a dual modelling approach.

Within the biological part of this dissertation, models were mainly proposed to systematise knowledge and to search for interesting interactions and hitherto unknown properties in the processes of atherosclerosis formation and development. Therefore, the following models were developed: a model of the influence of endothelial damage on the development of atherosclerosis, a model of the influence of cigarette smoking on endothelial damage and the development of atherosclerosis, a model of the influence of selected aspects of prothrombotic states, inflammation and oxidative stress on the development of atherosclerosis, a model of the influence of interleukin 18 on the inflammatory processes underlying atherosclerosis, including the relationship between different macrophage subtypes, a model of the relationship between hypercholesterolemia and atherosclerotic plaque instability (i.e. a model of macrophage population dynamics), and a model of the relationship between atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. In addition, the dissertation includes a model of the relationship between iron homeostasis and vitamin A deficiency, a model of the viral infection relationship between the SARS-CoV-2 virus and the RAA system in essential hypertension, a model of the balance between prooxidants and antioxidants, and a model of the system's response to DNA damage based on ATM-p53-NF- κ B signalling pathways.

A comprehensive analysis of models describing various biological phenomena is exceptionally challenging and gives a possibility for further consideration. This thesis provides a comprehensive introduction to further research on modelling complex biological systems.

Spis treści

1	Wstęp	1
1.1	Wprowadzenie	1
1.2	Cel i zakres pracy	3
2	Podstawy teoretyczne	7
2.1	Wprowadzenie	7
2.2	Zagadnienia teorii grafów i sieci Petriego	7
2.2.1	Wprowadzenie w istniejące metody analizy modeli opartych o sieci Petriego	10
2.2.2	Istniejące narzędzia do modelowania i analizy modeli opartych o sieci Petriego	16
2.3	Zagadnienia złożoności obliczeniowej	16
2.4	Kombinatoryczne aspekty analizy t-niezmienników – istniejące problemy	18
2.5	Zagadnienia dotyczące innych niż sieci Petriego metod modelowania	22
3	Zaproponowane modele systemów biologicznych opartych na sieci Petriego i ich klasyczna analiza na podstawie istniejących metod	25
3.1	Wprowadzenie	25
3.2	Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu uszkodzeń śródbłonka na rozwój miażdżycy	26
3.2.1	Tło biologiczne - nieformalny opis problemu biologicznego	26
3.2.2	Model	28
3.2.3	Analiza i wyniki	34
3.2.4	Konkluzje	37
3.3	Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonka i rozwój miażdżycy	37
3.3.1	Tło biologiczne	37
3.3.2	Model	39
3.3.3	Analiza i wyniki	42
3.3.4	Konkluzje	45
3.4	Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego	46
3.4.1	Tło biologiczne	46
3.4.2	Model	49
3.4.3	Analiza i wyniki	53
3.4.4	Konkluzje	59
3.5	Dalsze motywacje	60
4	Zaproponowane modele systemów biologicznych opartych na sieci Petriego i ich analiza na podstawie rozszerzonych metod	61

4.1	Wprowadzenie	61
4.2	Bardziej dokładna analiza t-niezmienników – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy	65
4.2.1	Tło biologiczne	65
4.2.2	Model	71
4.2.3	Analiza i wyniki	75
	Analiza zbiorów MCT oraz analiza t-klastrów	75
	Bardziej dokładna analiza t-niezmienników oraz analiza strukturalna knockout	79
	Porównanie bardziej dokładnej analizy t-niezmienników i analizy t-klastrów	81
4.2.4	Konkluzje	82
4.3	Analiza ważności – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący relacji między homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A	83
4.3.1	Tło biologiczne	83
4.3.2	Model	88
4.3.3	Analiza i wyniki	90
	Analiza zbiorów MCT oraz analiza t-klastrów	90
	Analiza ważności	93
	Symulacja knockout	95
4.3.4	Konkluzje	97
4.4	Analiza ważności, porównawcza analiza ważności oraz porównawcza analiza knockout – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej	97
4.4.1	Tło biologiczne	98
4.4.2	Model	100
4.4.3	Analiza i wyniki	103
	Porównawcza analiza ważności	103
	Porównawcza analiza knockout	104
	Symulacja knockout	107
4.4.4	Konkluzje	107
4.5	Porównawcza analiza ważności z istotnymi różnicami – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym	108
4.5.1	Tło biologiczne	108
4.5.2	Model	110
4.5.3	Analiza i wyniki	113
	Analiza zbiorów MCT	113
	Analiza ważności	114
	Porównawcza analiza ważności	118
	Symulacja knockout	127
4.5.4	Konkluzje	129
4.6	Podsumowanie i dalsze motywacje	130
5	Kombinatoryczne aspekty analizy t-niezmienników – rozwiązania wybranych problemów	132
5.1	Wprowadzenie	132
5.2	Algorytm poszukiwania występujących we wsparciach t-niezmienników podzbiorów tranzycji	133

5.2.1	Kontekst badań	133
5.2.2	Formalny opis rozważanych problemów występowania	134
5.2.3	Zaproponowane przybliżone rozwiązanie wybranego problemu występowania	135
5.2.4	Zaproponowane dokładne rozwiązanie problemu – koncepcja algorytmu dla analizy występowania	138
5.2.5	Ewaluacja działania algorytmu dla analizy występowania	142
5.2.6	Konkluzje	148
5.3	Algorytm poszukiwania anty-występujących we wsparciach t-niezmienników podzbiorów tranzycji	149
5.3.1	Kontekst badań	149
5.3.2	Formalny opis rozważanych problemów anty-występowania wraz z dowodami dotyczącymi złożoności obliczeniowej	149
5.3.3	Zaproponowane rozwiązanie problemu – koncepcja algorytmu	154
5.3.4	Ewaluacja działania algorytmu	158
5.3.5	Konkluzje	169
5.4	Podsumowanie i dalsze motywacje	170
6	Inne podejścia systemowe – modelowanie oparte o macierzowy model dynamiki populacji oraz porównanie metod modelowania opartego o sieci Petriego i równania różniczkowe zwyczajne	171
6.1	Wprowadzenie	171
6.2	Przełożenie modelu opartego o równania różniczkowe na model model wyrażony za pomocą sieci Petriego – klasyczny model opaty o sieci Petriego dotyczący równowagi między prooksydantami i antyoksydantami (GSH–GSSG)	172
6.2.1	Tło biologiczne	172
6.2.2	Modele	173
6.2.3	Analiza i wyniki	176
6.2.4	Konkluzje	179
6.3	Dualne modelowanie jako narzędzie do kompleksowej analizy systemów biologicznych – Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący mechanizmu odpowiedzi na uszkodzenia DNA	179
6.3.1	Tło biologiczne	180
6.3.2	Modele	181
	Sposób transformacji modelu opartego na ODE do modelu opartego o sieci Petriego	181
	Model oparty o równania różniczkowe zwyczajne	184
	Model oparty o klasyczne sieci Petriego	184
	Weryfikacja poprawności konwersji modelu opartego na ODE do modelu opartego o sieci Petriego	187
6.3.3	Analiza i wyniki	190
	Analiza wrażliwości dla modelu opartego na ODE	190
	Analiza ważności dla modelu sieci Petriego	192
6.3.4	Porównanie wyników analiz obu modeli	193
6.3.5	Konkluzje	196
6.4	Macierzowy model dynamiki populacji – model zależności między hipercholesterolemią a niestabilnością blaszek miażdżycowych	197
6.4.1	Tło biologiczne	197

6.4.2	Model i wyniki	198
6.4.3	Konkluzje	202
6.5	Dalsze motywacje	205
7	Podsumowanie	207
8	Materiały dodatkowe	216
8.1	Materiały dodatkowe do rozdziału 6	216
	Literatura	221

Rozdział 1

Wstęp

1.1 Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój nauk biologicznych oraz medycyny uwidocznił potrzebę stosowania podejść systemowych do lepszego zrozumienia natury różnych procesów biochemicznych i złożonych chorób, aby w efekcie doprowadzić do opracowania skuteczniejszych terapii. W tym celu wykorzystywane są wszelkie podejścia umożliwiające tworzenie precyzyjnych modeli matematycznych, gdyż powszechnie wiadomo, że bez nich trudno byłoby w pełni pojąć naturę analizowanych zjawisk, zwłaszcza z uwagi na stopień złożoności systemów biologicznych, który jest zwykle bardzo duży. Modelowanie *in silico* jest jedną z bardzo skutecznych metod badania złożonych zjawisk biologicznych, gdyż jest środkiem nie tylko do systematyzowania wiedzy, testowania nowych hipotez, tworzenia nowych teorii, ale także do wyznaczenia dalszego kierunku badań, w tym sugerowania konkretnych eksperymentów.

Najczęściej do modelowania złożonych systemów biologicznych wykorzystywane są równania różniczkowe. Jednakże od pewnego czasu konstruowane i analizowane są modele przyjmujące postaci grafowe lub obiekty matematyczne je przypominające. Popularność tych metod wynika z intuicyjnej, a przy tym także precyzyjnej formy odzwierciedlenia struktury badanego zjawiska. Ponadto podejścia te umożliwiają odtworzenie sieci zależności bez uwzględnienia wartości parametrów, które na ogół nie są znane lub są znane tylko dla niewielkiej części badanego układu. Wśród wspomnianych rodzajów modeli na uwagę zasługują modele opisane formalizmem opartym o sieci Petriego. Od prawie trzech dekad są one z coraz to większym powodzeniem stosowane do modelowania złożonych systemów biologicznych [28, 88, 91, 96, 111, 116, 146, 182, 218, 237]. Modele oparte o sieci Petriego nie są grafami, ale charakteryzują się strukturą skierowanego, ważonego grafu dwudzielnego, przy czym ich atutem jest fakt, że poza intuicyjną reprezentacją struktury, mogą także opisywać dynamikę systemu [148, 198]. Pozwalają się one skupić na zjawiskach o dużej skali oddziaływań, aby nie tylko poznać ich naturę i uporządkować wiedzę, ale aby doprowadzić do odkrywania nowych właściwości czy zależności, przyczyniając się przede wszystkim do opracowania skuteczniejszych strategii leczenia.

Problem badawczy, o którym traktuje niniejsza rozprawa, dotyczy badania przydatności różnych metod informatycznych do modelowania i analizy złożonych systemów biologicznych. W ogólności zatem zagadnienia opisywane w rozprawie można podzielić na dwie kategorie. Pierwsza z nich dotyczy kontekstu biologicznego, a więc zaproponowanie modeli złożonych systemów biologicznych. Druga natomiast dotyczy kontekstu metodologicznego, a więc analizy za pomocą metod informatycznych i oceny zastosowanych metodologii pod względem uzyskanych wyników. Znaczenie tego problemu przekłada się zatem na lepsze poznanie badanych zjawisk, usystematyzowanie istniejącej

wiedzy, odkrywanie nieznanych dotąd właściwości modelowanych systemów, wyznaczanie dalszego kierunku badań, oceny istniejących metod, zarówno klasycznych, jak i rozszerzonych, rozważenia propozycji własnych dla istniejących metod, ale również zaproponowania alternatywnych metod analizy, w tym także rozważenia konkretnych problemów kombinatorycznych wraz z zaproponowaniem ich rozwiązania w formie algorytmicznej.

Kontekst biologiczny, o którym traktuje niniejsza praca, dotyczy przede wszystkim mechanizmów powstawania i rozwoju miażdżycy. Miażdżycą jest to choroba sercowo-naczyniowa związana z procesem zapalnym obejmującym ścianę naczynia, który rozwija się poprzez wiele szlaków sygnałowych i podlega modyfikacjom pod wpływem oddziaływania różnorodnych czynników. Można zatem stwierdzić, że patogenezą tej choroby jest niezwykle złożona. Ponadto, miażdżycą jest jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie [49, 181, 189], a pomimo tego ciągle brakuje jednoznacznych informacji na temat mechanizmów jej progresji i przejścia choroby od blaszek miażdżycowych bezobjawowych do blaszek niestabilnych, wysoce narażonych na pęknięcie [181, 289]. Pomimo postępu, jaki się dokonał na przestrzeni ostatnich lat, ciągle poszukuje się czynników promiażdżycowych, próbując tym samym zmniejszyć częstotliwość występowania tego zjawiska chorobowego, ale przede wszystkim zwiększyć możliwości terapeutyczne, przyczyniając się do poprawienia profilaktyki i leczenia. W tworzonych i analizowanych w tej rozprawie modelach rozważano różne czynniki sprzyjające powstawaniu blaszki, od dysfunkcji śródbłonna, przez stany zapalne i stres oksydacyjny, po zaburzenia hemostatyczne i wybrane stany protrombotyczne. W kontekście tych ostatnich w szczególności uwzględniono zewnątrzpochodne szlaki krzepnięcia wywołane dymem tytoniowym. Zaburzenia te są ściśle związane z powstawaniem zakrzepów i promowania chorób układu krążenia. Co więcej, rozważano też bardziej szczegółowe aspekty, jak rolę interleukiny-18 (IL-18). Ta zapalna cytokina jest odpowiedzialna za destabilizację blaszki miażdżycowej [71, 175], dlatego kluczowe jest poznanie jej relacji z makrofagami, które również odgrywają niemałą rolę w opisywanej chorobie. Funkcjonalność makrofagów jest ściśle związana z równowagą pomiędzy progresją a regresją blaszki miażdżycowej, gdyż różnicują się one w różne typy (prozapalne i przeciwzapalne) [17].

Obok czynników i mechanizmów bezpośrednio związanych z rozwojem miażdżycy rozważano także inne elementy, w tym relacje z innymi stanami patologicznymi. Jednym z nich jest relacja pomiędzy tętniakami aorty brzusznej (AAA) a miażdżycą. Badania sugerują, że te dwie jednostki są ze sobą ściśle związane (mają pewne wspólne czynniki ryzyka i podobne cechy patologiczne) [153, 294], choć coraz częściej pojawiają się sugestie, że AAA nie jest wynikiem miażdżycy, jak wcześniej sądzono [290]. Pod rozważyć wzięto przede wszystkim utlenioną formę LDL (oxLDL), która pełni istotną rolę w miażdżycy [317], natomiast pełni niejednoznaczną rolę w tętniakach aorty brzusznej [122, 152, 159, 163, 290, 224]. Drugim rozważanym stanem patologicznym jest relacja między żelazem a niedoborem witaminy A, co stanowi najbardziej powszechny niedobór żywieniowy na całym świecie. W 1981 roku pojawiła się „Hipoteza żelaza”, sugerująca iż wyższy poziom zmagazynowanego żelaza sprzyja chorobom sercowo-naczyniowym, podczas gdy niedobór żelaza może mieć działanie chroniące przed miażdżycą [282, 312]. Wydaje się zatem, że lepsze zrozumienie homeostazy żelaza może być kluczowe w kontekście prowadzonych prac. Co więcej, stanowi wartość dodaną biorąc pod uwagę skalę problemu rozważanych niedoborów i fakt, że dokładny mechanizm wpływu witaminy A na regulację metabolizmu żelaza pozostaje niejasny.

Nadmienić należy fakt, że wszelkie stosowane i zaproponowane w niniejszej rozprawie metody są aplikowalne do dowolnych zjawisk biologicznych. Przykłady takich zjawisk jak infekcja wirusem SARS-CoV-2 i jej rozwój u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym czy mechanizm odpowiedzi na uszkodzenia DNA również pojawiły się w tej pracy. Ich zasadność opisano w kolejnym podrozdziale dotyczącym celu i zakresu tej rozprawy oraz w rozdziałach o nich traktujących.

1.2 Cel i zakres pracy

Zgodnie z opisem zawartym we wprowadzeniu, problemem badawczym jest badanie przydatności różnych metod informatycznych do modelowania i analizy złożonych systemów biologicznych. W związku z czym w rozprawie wyróżnia się dwie ścieżki badawcze dotyczące różnych aspektów, pierwsza dotycząca kontekstu biologicznego, a druga kontekstu informatycznego, czyli metodologicznego i wszelkich problemów z nim powiązanych. Poniżej przytoczono cele realizowane dla poszczególnych kierunków badawczych. Nadmienić należy, że cele dla tych dwóch ścieżek wzajemnie się przenikają i są ze sobą związane.

Podstawowym celem jest lepsze zrozumienie procesów powstawania i rozwoju miażdżycy, w ramach realizacji którego powstały konkretne modele oparte o klasyczne sieci Petriego. Pierwszy model skupia się na mechanizmach uszkodzeń śródbłonka, które są jedną z głównych przyczyn powstawania blaszki miażdżycowej [30]. Model ten stanowi wstęp do zrozumienia patogenezы miażdżycy, niewątpliwie jednak nie wyczerpuje tego tematu, dając tym samym możliwość rozszerzenia badanych aspektów i zaproponowania modelu z dodatkowymi czynnikami ryzyka, m.in. wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonka i rozwój miażdżycy [31]. Ponadto badania ukierunkowano także na aspekty stanów prozakrzepowych wywołanych dymem tytoniowym, stanami zapalnymi i stresem oksydacyjnym, co przedstawiono w oddzielnym modelu [98]. Analiza tego modelu pozwala na głębsze rozumienie miażdżycy. Dla zaproponowanych modeli wykonano analizy oparte o klasyczne metody realizując tym sposobem jeden z celów drugiej kategorii, cel metodologiczny, dotyczący oceny istniejących metod i ich możliwości. Pod rozważę wzięto analizę zbiorów MCT, analizę klastrowania t-niezmienników i manualną analizę wybranych t-niezmienników. Ponadto w ramach tychże badań zaproponowano sposób modelowania reakcji hamujących, które to stanowią ograniczenie dla analizy modeli opartych o klasyczne sieci Petriego.

Kolejnym celem metodologicznym jest ocena istniejących rozszerzonych metod analizy, ocena własnych rozszerzeń dla istniejących metod oraz zaproponowanie metod alternatywnych, umożliwiających przeprowadzenie głębszych analiz. Metody te zastosowano na przykładzie różnych modeli biologicznych. Zaproponowane i przeanalizowane modele stanowią wartość dodaną, niezwykle istotną z punktu widzenia poznania natury tych powszechnych, a ciągle w pełni niepoznanych zjawisk. Pierwszym modelem zaproponowanym w ramach oceny wymienionych metod informatycznych jest model analizy wpływu interleukiny 18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy, który skupia się także na zależnościach pomiędzy różnymi typami makrofagów [64]. Drugi model dotyczy relacji żelaza i niedoboru witaminy A [100]. Zrozumienie relacji tych niedoborów jest, choć niebezpośrednio, powiązane z miażdżycą, a usystematyzowanie wiedzy z tym aspekcie jest istotne również ze względu na fakt, że niedobór witaminy A stanowi powszechny niedobór żywieniowy na świecie. Trzeci model dotyczy powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej, a więc bezpośredniej relacji pomiędzy miażdżycą a tętniakami aorty brzusznej [105]. Obok tematycznie spójnych modeli pozwalających lepiej poznać procesy powstawania, rozwoju miażdżycy, ale także pewnych korelacji między miażdżycą a innymi zjawiskami patologicznymi, pojawia się model relacji infekcji wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym [65]. Zmiana kontekstu prowadzonych badań podyktowana została pandemią koronawirusa, która skupiła uwagę całego świata oraz faktem, że model ten cechuje ciekawa charakterystyka, która wymusza zastosowanie innych niż zazwyczaj metod analizy, uwypuklając zalety jednych i ograniczenia drugich, co stanowi odpowiednie uzupełnienie realizowanego celu metodologicznego dotyczącego oceny rozszerzonych i zaproponowanych metod. Dla opisanych w tym akapicie modeli wykonano analizy oparte o rozszerzone istniejące metody, tj. analizę knockout t-niezmienników (zwaną także knockoutem strukturalnym) oraz knockout symulacyjny (zwany także analizą średniej liczby uruchomień tranzycji we

wszystkich symulacjach). Ponadto w tym rozdziale zaproponowano analizę ważności, porównawczą analizę ważności, w tym także z identyfikacją istotnych różnic, a także rozszerzenie istniejącej metody, czyli porównawczą analizę knockout. Analizy porównawcze wymagają szczególnego podejścia opartego o dwa pokryte modele, które zgodnie z wiedzą autora nie było do tej pory stosowane w podobnej formie.

W toku prowadzonej ewaluacji pojawiły się ciekawe aspekty kombinatoryczne, które stwarzają możliwości do zaproponowania kolejnych metod analizy modeli opartych o sieci Petriego. Tym sposobem jawi się kolejny cel dotyczący wyznaczania pewnych podzbiorów tranzycji, a dokładniej wybranych problemów występowania i anty-występowania, które mogą być istotne w analizie zależności pomiędzy podprocesami. Dla wybranych problemów przedstawiono ich formalne sformułowania, oszacowano złożoność i zaproponowano algorytmy. Zaproponowane algorytmy stanowią kolejne propozycje analizy modeli opartych o sieci Petriego i mogą być kolejnym elementem na drodze do uzyskania pełnej metodologii do przeprowadzania kompleksowej analizy złożonych systemów biologicznych.

Chcąc umożliwić przeprowadzenie wspomnianej, kompleksowej analizy, kolejnym celem niniejszej rozprawy stało się porównanie modeli opartych o równania różniczkowe zwyczajne (ODE) z modelami opartymi o sieci Petriego, w ramach którego zaproponowano podejście dualnego modelowania, a więc tworzenia dwóch modeli odpowiadających sobie wzajemnie i przeprowadzenia analiz, które byłyby względem siebie komplementarne. Podejście takie może dać dużo szersze spojrzenie na analizowany system i nie byłoby możliwe w przypadku zastosowania tych metod oddzielnie. Początkowo rozważono jak przetłumaczyć model ODE i zaproponować odpowiadający model sieci Petriego oraz czy można wykorzystać wyniki analizy jednego z modeli aby zawęzić symulacje drugiego modelu. Te rozważania przeprowadzono na niewielkim modelu dotyczącym równowagi między proooksydantami i antyooksydantami [150]. W następstwie tych badań, wykorzystano dużo większy system, kolejny istniejący model ODE, dotyczący ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B [104, 134], do analizy którego wykorzystano dwie różne metody, analizę wrażliwości i analizę ważności, na podstawie których można przeprowadzić kompleksową analizę strukturalną i parametryczną. Z uwagi na to, że wykorzystywano istniejący model ODE, to tematyka nieco odbiega o tytułowego schorzenia jakim jest miażdżycza. Jednakże niezależnie od kontekstu biologicznego analizowanego systemu, podejście dualnego modelowania jest aplikowalne do dowolnych szlaków biochemicznych, ścieżek sygnałowych czy złożonych systemów biologicznych. Ponadto, w pracy doktorskiej wykorzystano także podejście oparte o macierzowe modelowanie dynamiki populacyjnej, które zastosowano do analizy relacji między hipercholesterolemią a niestabilnością blaszek miażdżycowych.

Rozprawa ma następujący układ:

- Rozdział 1 zawiera wprowadzenie do tematyki rozprawy, w tym także jej cel i zakres prowadzonych badań.
- Rozdział 2 zawiera wprowadzenie teoretyczne, które podzielono na następujące zagadnienia: teoria grafów i sieci Petriego, przekrój przez istniejące metody analizy modeli opartych o klasyczne sieci Petriego, narzędzia tworzenia tychże modeli, zagadnienia złożoności obliczeniowej, kombinatoryczne aspekty wybranej analizy modeli opartych o klasyczne sieci Petriego oraz inne metody modelowania.
- Rozdział 3 zawiera przegląd istniejących metod analizy modeli opartych o klasyczne sieci Petriego na przykładzie zaproponowanych modeli dotyczących różnych aspektów powstawania i rozwoju miażdżycy. Rozdział ten podsumowuje wady i zalety istniejących klasycznych metod,

wyznaczając dalszy kierunek badań i jasną motywację do zaproponowania bardziej szczegółowych metod analizy. W ramach tego rozdziału zaproponowano/analizowano następujące modele: model wpływu uszkodzeń śródbłonka na rozwój miażdżycy [30], model wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonka i rozwój miażdżycy [31], oraz model wpływu wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego na rozwój miażdżycy [98]. Ponadto, na podstawie wyróżnionych modeli przeprowadzono analizę i oceniono efekty następujących istniejących metod analizy: analiza zbiorów MCT, analiza klastrowania t-niezmienników oraz manualna analiza wybranych t-niezmienników.

- Rozdział 4 zawiera przegląd istniejących rozszerzonych metod analizy, ale przede wszystkim zawiera propozycje własne oraz propozycje rozszerzenia znanych metod. Rozdział ten podsumowuje wady i zalety istniejących rozszerzonych metod, ale także metod zaproponowanych. Ponadto, wskazuje na ograniczenia metodologii w sytuacji ponadprzeciętnych modeli, charakteryzujących się nadzwyczaj dużą liczbą t-niezmienników i tym samym stwarza motywację do poszukiwania kolejnych metod analizy, opartych na szczególnych podzbiórach tranzykcji oraz rozważenia pewnych, ciekawych aspektów kombinatorycznych. W ramach tego rozdziału zaproponowano/analizowano następujące modele: model wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podstaw rozwoju miażdżycy [64], model relacji między homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A [100], modele powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej (w tym *model pełen* zawierający podprocesy związane z oxLDL i *model zredukowany* niezawierający podprocesów powiązanych z oxLDL) [105], modele relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym (w tym *model pełen* zawierający podprocesy związane z infekcją SARS-CoV-2 i *model zredukowany* niezawierający podprocesów powiązanych z infekcją SARS-CoV-2) [65]. Ponadto, na podstawie wyróżnionych modeli przeprowadzono analizę i oceniono efekty zarówno istniejących metod analizy (klasycznych metody analizy oraz rozszerzonych: analiza knockout t-niezmienników i analiza symulacyjna knockout) jak i zaproponowanych metod analizy, w tym także zaproponowanych rozszerzeń dla istniejących metod. Wśród metod zaproponowanych wyróżnia się bardziej dokładną analizę t-niezmienników, analizę ważności, porównawczą analizę ważności na podstawie dwóch modeli, porównawczą analizę ważności z identyfikacją istotnych różnic na podstawie dwóch modeli oraz porównawczą analizę knockout na podstawie dwóch modeli.
- Rozdział 5 zawiera kombinatoryczne aspekty analizy t-niezmienników, skupiające się na poszukiwaniu pewnych zbiorów tranzykcji. Problemy te można podzielić na kategorię występowania i anty-występowania. W ramach tych kategorii rozważano wybrane problemy, ich złożoność oraz zaproponowano algorytmy stanowiące kolejne rozwiązania metodologiczne wykorzystywane w analizie modeli opartych o sieci Petriego, w tym analizę występowania będącą rozszerzeniem analizy ważności. Ponadto nakreślono dalsze motywacje w tym obszarze.
- Rozdział 6 zawiera porównanie metod modelowania dla dwóch różnych podejść: sieci Petriego i równań różniczkowych zwyczajnych (ODE). Podejścia te różnią się nie tylko formalizmem tworzenia modeli, ale także metodami analizy i ich możliwościami. Te wstępne rozważania dały początek zaproponowanemu podejściu dualnego modelowania i przeprowadzeniu kompleksowej analizy parametrycznej i strukturalnej, która nie byłaby możliwa do przeprowadzenia oddzielnie. W obrębie tych badań porównano analizę wrażliwości dla modelu ODE i analizę ważności dla modelu sieci Petriego, co pozwala na wysnucie wniosku o komplementarności tych dwóch metod. W ramach tego rozdziału zaproponowano/analizowano następujące modele: model sieci Petriego i ODE dotyczące równowagi między prooksydantami i antyoksy-

dantami (GSH-GSSG) [150] oraz model sieci Petriego i ODE dotyczące ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B [104, 134]. Ponadto obok porównania metod modelowania opartych o sieci Petriego i równania różniczkowe zwyczajne, rozdział ten zawiera także metodę modelowania opartą o macierzowe modele dynamiki populacji, którą wykorzystano do zaproponowania i analizy modelu relacji między hipercholesterolemią a miażdżycą, ze szczególnym nastawieniem na dynamikę populacji makrofagów i ich wpływ na promowanie tworzenia i pęknięcia blaszki miażdżycowej [295].

- Rozdział 7 zawiera podsumowanie rozprawy, w tym wnioski i dalsze motywacje.
- Rozdział 8 zawiera materiały dodatkowe.

Rozdział 2

Podstawy teoretyczne

2.1 Wprowadzenie

W obecnym rozdziale wprowadzone zostały formalne definicje oraz pojęcia dotyczące zakresu niniejszej rozprawy doktorskiej; zostały one podzielone na poszczególne podrozdziały zgodnie z ich tematyką. Wyróżniono podrozdział dotyczący zagadnień teorii grafów i sieci Petriego, podrozdział skupiający się na zagadnieniach złożoności obliczeniowej, a także innych niż sieci Petriego metod modelowania.

2.2 Zagadnienia teorii grafów i sieci Petriego

W niniejszym podrozdziale wyszczególniono formalne definicje z teorii grafów oraz sieci Petriego, które są niezbędne dla zrozumienia dalszej części rozprawy doktorskiej, a w konkretnych przypadkach określono także ich biologiczne znaczenie. Ponadto wyróżniono paragraf skupiający się na istniejących metodach analizy sieci Petriego.

Sieci Petriego to obiekty matematyczne odpowiednie do modelowania szerokiej klasy systemów, zwłaszcza tych, które zawierają procesy współbieżne. Zostały one zaproponowane w 1962 roku przez Carla A. Petriego i są od wielu lat wykorzystywane do modelowania i analizy systemów technicznych [216]. Jednak w ciągu ostatnich prawie trzech dekad, tego typu sieci mogą być z powodzeniem wykorzystywane także do badania właściwości układów biologicznych [28, 66, 88, 91, 96, 111, 116, 146, 182, 218, 229, 237, 251]. Poniżej zamieszczono formalne definicje dotyczące sieci Petriego.

Definicja 2.2.1 (Graf skierowany [39, 95]). Niech V będzie niepustym zbiorem i niech $A \subseteq V \times V$. Parę $G = (V, A)$ nazywamy grafem skierowanym (digrafem), przy czym zbiór V nazywamy zbiorem wierzchołków, a zbiór A nazywamy zbiorem łuków.

Definicja 2.2.2 (Graf nieskierowany [39, 95]). Niech V będzie niepustym zbiorem i niech $E \subseteq \{\{v_i, v_j\} : v_i \in V \wedge v_j \in V\}$. Parę $G = (V, E)$ nazywamy grafem nieskierowanym, przy czym zbiór V nazywamy zbiorem wierzchołków, a zbiór E nazywamy zbiorem krawędzi.

Definicja 2.2.3 (Podgraf [39, 95]). Jeśli $G = (V, E)$ jest grafem (skierowanym lub nieskierowanym), $G' = (V', E')$ jest nazywany podgrafem grafu G , jeżeli $\emptyset \neq V' \subseteq V$ i $E' \subseteq E$, gdzie każda krawędź ze zbioru E' jest incydentna z wierzchołkami ze zbioru V' .

Definicja 2.2.4 (Graf spójny [39, 95]). Niech $G = (V, E)$ będzie grafem nieskierowanym. Mówimy, że G jest grafem spójnym, jeżeli istnieje ścieżka pomiędzy dowolnymi dwoma wierzchołkami grafu G . Niech $G = (V, E)$ będzie grafem skierowanym. Skojarzonym z nim grafem nieskierowanym

jest graf otrzymany z G poprzez usunięcie zwrotów łuków. Jeżeli skojarzony ze skierowanym grafem G graf nieskierowany jest spójny, to graf G jest również spójny. Graf, który nie jest grafem spójnym jest nazywany grafem niespójnym.

Definicja 2.2.5 (Skierowany graf dwudzielny [39, 95]). Graf skierowany $G = (V, A)$ nazywamy skierowanym grafem dwudzielnym, jeśli $V = V_1 \cup V_2 \wedge V_1 \cap V_2 = \emptyset$ oraz $A \subseteq (V_1 \times V_2) \cup (V_2 \times V_1)$. Oznacza to, że zbiór wierzchołków tego grafu jest sumą dwóch niepustych podzbiorów V_1 i V_2 oraz każdy łuk w grafie G łączy wierzchołek ze zbioru V_1 z wierzchołkiem ze zbioru V_2 lub odwrotnie.

Definicja 2.2.6 (Sieć Petriego [148, 198, 216, 239]). Siecią Petriego nazywamy piątkę $Q = (P, T, F, W, M_0)$, gdzie: $P = \{p_1, \dots, p_n\}$ jest skończonym zbiorem miejsc, $T = \{t_1, \dots, t_m\}$ jest skończonym zbiorem tranzycji, $F \subseteq (P \times T) \cup (T \times P)$ jest zbiorem łuków, $W : F \rightarrow \mathbb{Z}^+$ jest funkcją wagi łuków, $M_0 : P \rightarrow \mathbb{N}$ jest oznakowaniem początkowym (początkowy rozkład tokenów), $P \cap T = \emptyset \wedge P \cup T \neq \emptyset$.

Sieć Petriego ma strukturę skierowanego ważonego grafu dwudzielnego [246], w którym zbiór wierzchołków podzielony jest na dwa rozłączne podzbiory: miejsca i tranzycje. Z tej struktury wynika, że łuki łączą wierzchołki należące do różnych podzbiorów. Tym samym wierzchołki należące do tego samego podzbioru nie mogą być połączone. Jedną z ważnych właściwości sieci Petriego jest dynamika. Oczywiście w obiektach matematycznych jakimi są grafy ta dynamika nie występuje, jednak w sieci Petriego wyróżniamy elementy jeszcze jednego typu, czyli tokeny/znaczniki. Ta formalna, matematyczna definicja sieci Petriego ma także swoje biologiczne odwzorowanie według którego przytoczone poniższe opisy. Skończony zbiór miejsc $P = \{p_1, \dots, p_n\}$, w ujęciu biologicznym odpowiada skończonemu zbiorowi pasywnych komponentów sieci, takich jak substancje chemiczne (substraty/produkty). Miejsca w graficznej reprezentacji sieci Petriego oznaczane są jako okręgi. Natomiast skończony zbiór tranzycji $T = \{t_1, \dots, t_m\}$, odpowiada skończonemu zbiorowi aktywnych komponentów sieci, takich jak reakcje. Mianowicie są to pewne zdarzenia zachodzące w modelowanym systemie, które w graficznej reprezentacji sieci Petriego oznaczane są jako kwadraty/prostokąty. Ponadto innym elementem sieci Petriego są tokeny, które znajdując się w miejscach reprezentują informacje ilościowe poszczególnych składników. Należy je interpretować jako ilości zasobu reprezentowanego przez dane miejsce. Rozkład tokenów w poszczególnych miejscach zwany jest oznakowaniem (definicja 2.2.7).

Definicja 2.2.7 (Oznakowanie sieci [148, 198, 238]). Każde miejsce $p_i \in P$ zamodelowane w systemie może zawierać w każdym momencie zero lub pewną całkowitą dodatnią liczbę tokenów, czyli liczbę jednostek danego zasobu. Zatem oznakowaniem sieci nazywamy wektor liczb tokenów obecnych w każdym miejscu sieci Petriego. Oznakowanie sieci (rozkład tokenów) określa stan modelowanego systemu.

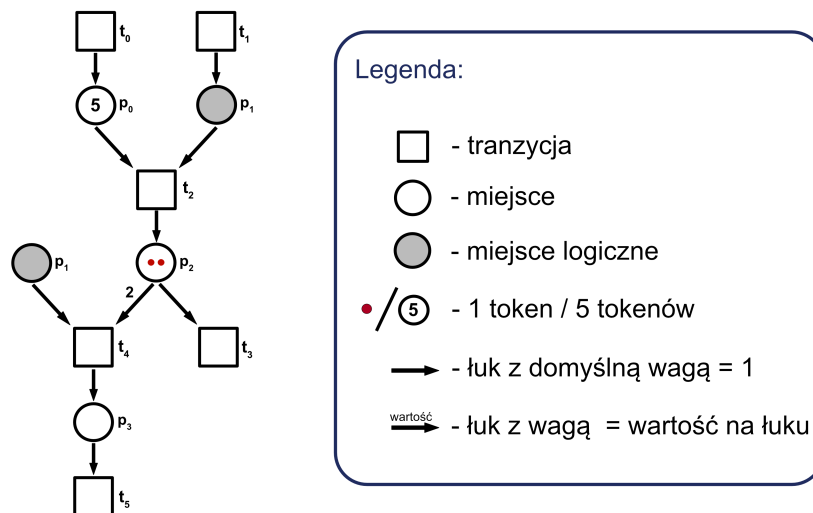
Tokeny wnoszą swoistą dynamikę do sieci, ponieważ przepływają z jednego miejsca do drugiego poprzez tranzycje. Przepływ ten odpowiada przepływowi informacji przez modelowany układ, można go rozumieć jako przepływ substancji czy sygnałów. Przepływ tokenów jest bezpośrednio związany z regułą aktywowania tranzycji (definicja 2.2.8).

Definicja 2.2.8 (Reguła aktywowania tranzycji [148, 252]). Tranzycja t_j jest aktywna, jeśli liczba tokenów we wszystkich miejscach bezpośrednio ją poprzedzających p_k (tj., miejscach wejściowych dla tej tranzycji) jest równa lub większa od wagi łuku łączącego te miejsca z daną tranzycją. Aktywna tranzycja t_j może, ale nie musi się uruchomić. Poprzez uruchomienie tranzycji rozumie się przepływ tokenów z miejsc wejściowych danej tranzycji do jej miejsc wyjściowych (tj., miejsc

bezpośrednio następujących po tej tranzycji). Liczba przepływających tokenów jest równa wagom odpowiednich łuków.

Istnieją dwa wyjątki od reguły opisanej powyżej. Pierwszy z nich dotyczy tranzycji wejściowych, takich które nie mają miejsc bezpośrednio je poprzedzających, są one aktywne w sposób ciągły i traktowane są jako tranzycje źródłowe, będące sygnałami wchodzącymi do modelowanego systemu z jego otoczenia. Drugi wyjątek dotyczy tranzycji wyjściowych, tj. takich które nie mają miejsc bezpośrednio następujących po nich. Takie tranzycje w wyniku uruchomienia nie generują żadnych tokenów [252]. Reguła aktywowania tranzycji w ujęciu biologicznym oznacza, że pewne reakcje/zdarzenia mogą zajść tylko przy spełnieniu koniecznych warunków, które wiążą się z obecnością konkretnych komponentów lub z konkretną ilością pewnych zasobów.

Przykładowa graficzna reprezentacja sieci Petriego została przedstawiona na Rysunku 2.1, gdzie miejsca – pasywne komponenty przedstawiono jako okręgi, miejsca logiczne jako koła, a tranzycje – aktywne komponenty przedstawiono jako kwadraty. Wspomniane miejsca logiczne, mogą być opisane przez takie same nazwy, wtedy są one traktowane jako identyczne i są graficznymi kopiami pojedynczego miejsca (patrz miejsce logiczne p_1 na Rysunku 2.1). Miejsca logiczne są często używane do reprezentowania pasywnych komponentów zaangażowanych w wiele reakcji. W ogólności stosowane są dla utrzymania czytelności modelu, gdyż pozwalają na uniknięcie pojawienia się wielu przecinających się łuków. Połączenia między pasywnymi i aktywnymi komponentami reprezentowane są za pomocą łuków je łączących. Każdy łuk ma przypisany wagę, jeśli na łuku nie określono wartości to znaczy, że przypisana jest wartość domyślna, równa 1, natomiast jeśli wartość jest > 1 , to pojawia się ona bezpośrednio na łuku. Co więcej, w miejscach zlokalizowane są tokeny, oznaczone jako czerwone kropki lub wartości liczbowe - to czy reprezentacja jest graficzna czy liczbowa zależy od liczby tokenów: tokeny przedstawione są jako czerwone kropki, jeśli ich liczba jest ≤ 4 lub jako liczby umieszczone w miejscach (gdy ich liczba jest > 4).



RYSUNEK 2.1: Przykładowa sieć Petriego z wyróżnionymi komponentami, gdzie miejsca są przedstawione jako okręgi, miejsca logiczne jako koła, tranzycje jako kwadraty, łuki jako strzałki, które mogą zawierać wagi (domyślnie ustawione na wartość 1) oraz tokeny przedstawione jako czerwone kropki (gdy ich liczba jest ≤ 4) lub liczby umieszczone w miejscach (gdy ich liczba jest > 4).

Obok tej intuicyjnej reprezentacji graficznej, która jest pomocna nie tylko w rozumieniu struktury, ale także w analizowaniu zachowania modelowanego systemu, wyróżniamy również matema-

tyczną reprezentację – macierz incydencji. Ten rodzaj reprezentacji nadaje się do formalnej analizy właściwości sieci Petriego.

2.2.1 Wprowadzenie w istniejące metody analizy modeli opartych o sieci Petriego

Metody analizy modeli opartych o formalizm sieci Petriego mogą przyjmować za podstawę analizę t-niezmienników. Do ich wyznaczenia wykorzystana jest wspomniana wcześniej reprezentacja, macierz incydencji. Poniżej opisano najważniejsze definicje i zawarto opisy wykorzystywanych, istniejących metod analizy.

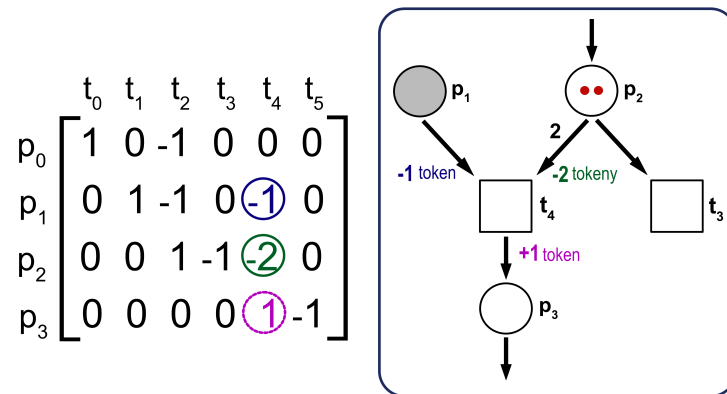
Definicja 2.2.9 (Macierz incydencji [148, 198, 252]). Macierz incydencji A jest macierzą o rozmiarze $n \times m$ ($A = [a_{ij}]_{n \times m}$), gdzie n to liczba miejsc, a m to liczba tranzycji. Zatem, wiersze odpowiadają miejscom, a kolumny odpowiadają tranzycjom. Każdy element macierzy będący liczbą całkowitą ($a_{ij} \in \mathbb{Z}$), jest równy $w(t_j, p_i) - w(p_i, t_j)$, tj. różnicy między liczbą tokenów umieszczonych w miejscu p_i po i przed uruchomieniu tranzycji t_j .

Przykład matematycznej reprezentacji sieci Petriego znajduje się na Rysunku 2.2, gdzie przedstawiona jest macierz incydencji dla przykładowej sieci Petriego zawartej na Rysunku 2.1. Zgodnie z Definicją 2.2.9, wartości w macierzy incydencji są bezpośrednio związane z aktywacją tranzycji oraz przepływem tokenów. Przykładowo, zaznaczona tranzycja t_4 jest aktywna, jeśli w miejscach bezpośrednio ją poprzedzających p_1 i p_2 liczba tokenów jest równa co najmniej wadze na łuku łączącym poszczególne miejsce z tą tranzycją. W przypadku łuku łączącego miejsce p_1 i tranzycję t_4 waga jest równa 1, natomiast waga na łuku łączącym miejsce p_2 i tranzycję t_4 wynosi 2, zatem tranzycja t_4 jest aktywna jeśli w miejscu p_1 pojawi się co najmniej jeden token oraz jednocześnie w miejscu p_2 pojawią się co najmniej dwa tokeny. Można to też rozumieć, że miejsce p_1 oddaje jeden token na rzecz aktywacji tranzycji t_4 , stąd w macierzy incydencji pojawia się wartość -1 ($a_{14} = -1$), natomiast miejsce p_2 oddaje 2 tokeny, więc $a_{24} = -2$. Aktywna tranzycja t_4 umożliwia przepływ tokenów z miejsc bezpośrednio ją poprzedzających do miejsc bezpośrednio po niej następujących. Ponadto, tranzycja t_4 ma jedno miejsce wyjściowe i jest nim p_3 . Łuk łączący tranzycję t_4 z miejscem p_3 ma wagę domyślną, a więc z aktywowanej tranzycji t_4 przepływa jeden token do miejsca p_3 ($a_{34} = 1$).

Definicja 2.2.10 (t-niezmiennik [92, 148]). t-niezmiennik to wektor $x \in \mathbb{N}^m$ będący rozwiązaniem równania $A \cdot x = 0$, gdzie A to macierz incydencji.

Definicja 2.2.11 (wsparcie t-niezmiennika [148]). Wsparcie t-niezmiennika x oznaczone jako $s(x)$, a dokładniej $s(x) = \{t_j : x_j > 0, j = 1, 2, \dots, m\}$. Oznacza to, że wsparcie jest to podzbiór zbioru tranzycji, ale tylko tych którym odpowiadają dodatnie wartości w wektorze x .

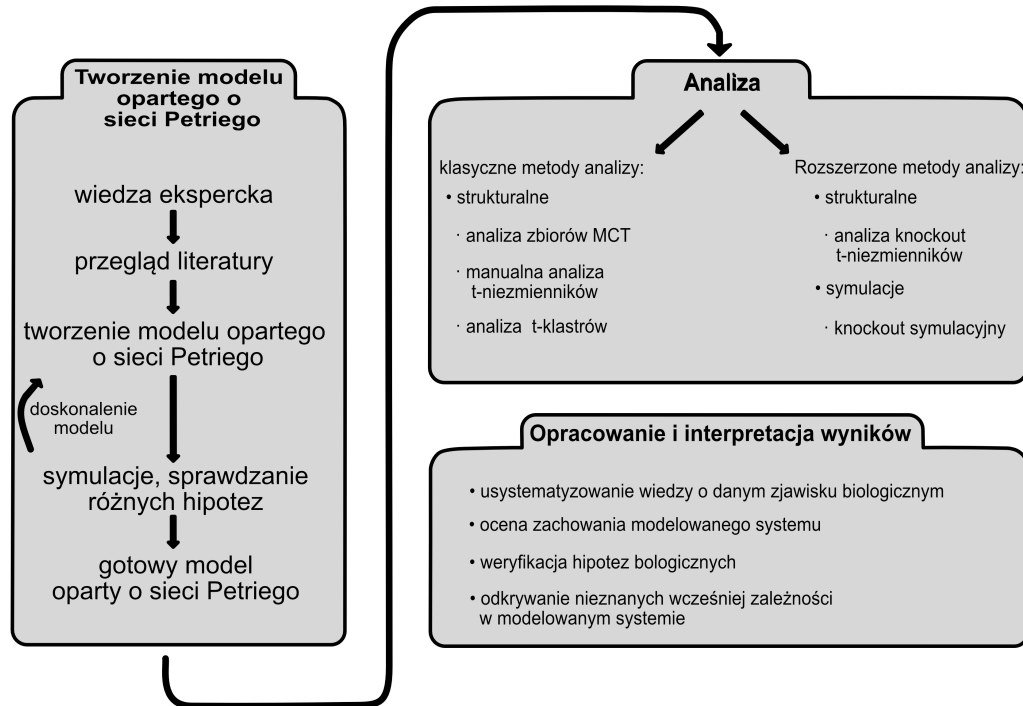
Jeżeli każda tranzycja t_j ze wsparcia t-niezmiennika x ($t_j \in s(x)$) zostanie uruchomiona x_j razy, to rozkład tokenów w miejscach w całej sieci się nie zmieni (przywrócony zostaje stan systemu taki, jaki był przed uruchomieniem jakiejkolwiek tranzycji ze wsparcia $s(x)$). Innymi słowy oznakowanie sieci się nie zmienia, a to ujednoznacznia, że stan modelowanego systemu pozostaje niezmienny. Zgodnie z definicją oznakowania sieci 2.2.7 – oznakowanie sieci odpowiada stanowi modelowanego systemu, co z kolei determinuje, że t-niezmienniki odpowiadają podprocesom, które nie zmieniają stanu analizowanego systemu i tym samym mogą odgrywać kluczowe znaczenie w analizie modeli opartych na sieciach Petriego. Liczba t-niezmienników jest własnością bezpośrednio skorelowaną z naturą badanego zjawiska biologicznego i nie sposób ją oszacować na podstawie liczby zamodelowanych komponentów (miejsc i tranzycji).



RYSUNEK 2.2: Matematyczna reprezentacja sieci Petriego – macierz incydencji dla przykładowej sieci Petriego przedstawionej na Rysunku 2.1.

Obok liczby t-niezmienników, która jest ważną własnością dla każdego modelu wyrażonego w postaci sieci Petriego, istotne jest także pokrycie przez t-niezmienniki, oznacza to, że każda tranzycja powinna znaleźć się w co najmniej jednym ze wsparć t-niezmienników [148, 252]. Z własności pokrycia przez t-niezmienniki wynika zatem, że każdy zamodelowany elementarny proces będzie uwzględniony w analizie opartej o t-niezmienniki.

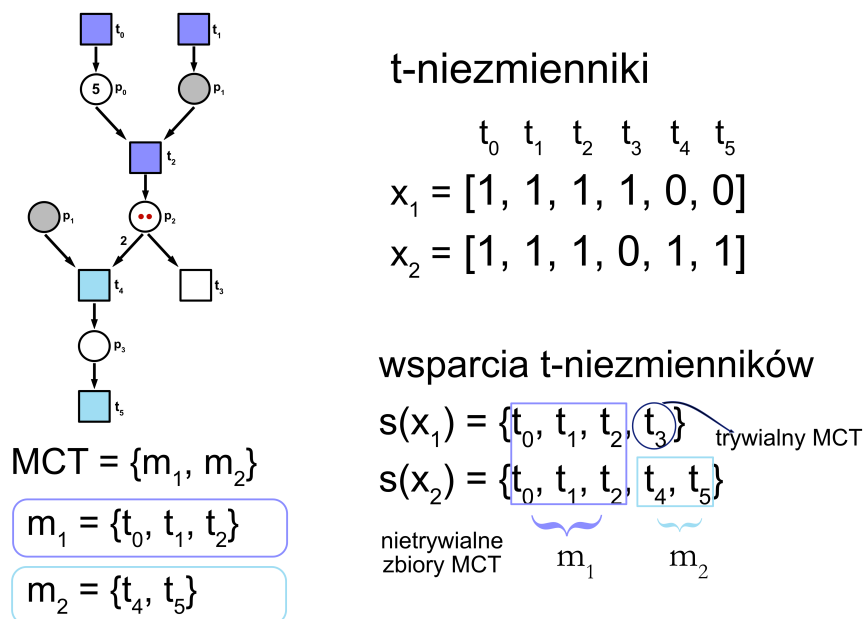
Wszystkie opisane w niniejszej rozprawie modele oparte o sieci Petriego spełniają założenie o pokryciu przez t-niezmienniki. Spełnienie tego założenia jest warunkiem koniecznym do przeprowadzenia poniżej opisanych metod analizy. Metody analiz można podzielić na klasyczne/podstawowe oraz rozszerzone lub ze względu na ich charakter jako strukturalne oraz symulacyjne. Na Rysunku 2.3 przedstawiono ogólny schemat tworzenia modelu, metody analizy i efekty interpretacji wyników. Schemat ten jest podsumowaniem stosowanych, istniejących metod, które rozważano w niniejszej rozprawie. Dokładny opis poszczególnych metod analiz znajduje się poniżej.



RYSUNEK 2.3: ogólny schemat tworzenia modelu, jego analizy za pomocą istniejących metod analizy, a także efekty wynikające z interpretacji wyników.

Pierwszą z klasycznych, strukturalnych metod analizy jest **analiza zbiorów MCT** (*ang. Maximal Common Transition sets*). Celem tej analizy jest pogrupowanie tranzycji w zbiory MCT, czyli zbiory zawierające tranzycje należące do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników [92, 148, 252]. Zbiory te stanowią zatem podział zbioru tranzycji na rozłączne podzbiory (tj. każda tranzycja należy do dokładnie jednego zbioru MCT). Należy zauważyć, że niektóre zbiory MCT mogą zawierać tylko jedną tranzycję — nazywa się je trywialnymi zbiorami MCT. W ogólności, nietrywialne zbiory MCT (zbiory o mocy ≥ 2) odpowiadają pewnym funkcjonalnym modułom zamodelowanego systemu. Z tego powodu dla każdego nietrywialnego zbioru MCT określa się znaczenie biologiczne [148, 252]. Można wręcz stwierdzić, że analiza zbiorów MCT zwykle dostarcza podstawowych informacji o właściwościach badanego zjawiska biologicznego. Na Rysunku 2.4 przedstawiono zidentyfikowane zbiory MCT dla przykładowej sieci Petriego przedstawionej na Rysunku 2.1. Jak można zauważyć, zaprezentowana sieć Petriego scharakteryzowana jest przez dwa nietrywialne zbiory MCT o mocy ≥ 2 (m_1 , m_2) oraz jeden zbiór trywialny o mocy równej 1, którego nie uwzględnia się w dalszych analizach. Wyszczególnione zbiory MCT są rozłącznymi zbiorami tranzycji: $m_1 = \{t_0, t_1, t_2\}$, $m_2 = \{t_4, t_5\}$. Zgodnie ze wspomnianym wcześniej opisem, zbiory MCT zawierają tranzycje należące do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników, co zostało odpowiednio zaznaczone na Rysunku 2.4. Przykładowo interpretując matematycznie jeden ze zbiorów MCT (m_1) należy zwrócić uwagę, że tranzycje t_0 , t_1 , t_2 są zawarte we wsparciach dwóch t-niezmienników ($s(x_1)$, $s(x_2)$). Natomiast zbiór MCT może zawierać także tranzycje należące tylko do jednego wsparcia t-niezmiennika o ile jest tych tranzycji więcej niż jedna, tak jak w przypadku m_2 , który zawiera dwie tranzycje, tj. t_4 i t_5 , będące elementami wsparcia t-niezmiennika $s(x_2)$.

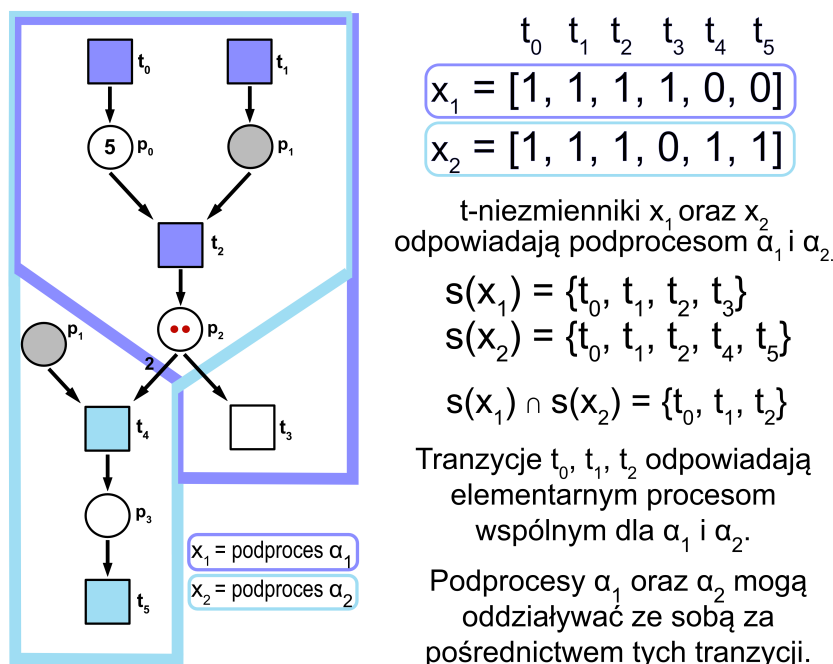
Kolejną klasyczną, strukturalną metodą analizy jest **analiza t-niezmienników**. Analiza t-niezmienników opiera się na poszukiwaniu podobieństw między nimi, co w kontekście biologicznym odpowiada poszukiwaniu podobieństw między podprocesami. Należy pamiętać, że podprocesy



RYСУNEK 2.4: Identyfikacja zbiorów MCT dla przykładowej sieci Petriego przedstawionej na Rysunku 2.1, gdzie x_i odpowiadają kolejnym t-niezmiennikom, $s(x_i)$ odpowiadają wsparciom poszczególnych t-niezmienników, a m_i odpowiadają kolejnym nietrywialnym zbiorom MCT ($|m_i| \geq 2$).

składają się z procesów elementarnych, którym odpowiadają pojedyncze tranzycje. W analizie t-niezmienników zasadniczo poszukiwane są części wspólne pomiędzy wsparciami t-niezmienników. Tranzycje będące elementami należącymi do części wspólnej odpowiadają pewnym procesom elementarnym, które mogą mieć kluczowe znaczenie dla modelowanego procesu. Ponadto mogą być również źródłem interesujących, nieznanych wcześniej właściwości analizowanego układu biologicznego, ponieważ podprocesy zawierające takie tranzycje mogą ze sobą oddziaływać za ich pośrednictwem. Dla przykładu można założyć, że x_1 i x_2 oznaczają parę t-niezmienników, które odpowiednio w kontekście biologicznym odpowiadają podprocesom α_1 i α_2 . Zatem, jeśli $s(x_1) \cap s(x_2) \neq \emptyset$, co oznacza że część wspólna wsparć t-niezmienników x_1 i x_2 jest zbiorem niepustym, to istnieją procesy elementarne będące wspólne dla podprocesów α_1 i α_2 . Te elementarne procesy mogą prowadzić do interakcji pomiędzy tymi podprocesami, co z kolei może być źródłem niektórych (czasami nieznanych dotąd) właściwości analizowanego układu biologicznego. Podobieństwa pomiędzy t-niezmiennikami zobrazowano także na Rysunku 2.5. Do tej pory szczegółową analizę t-niezmienników, czyli analizę wszystkich t-niezmienników wykonywano manualnie. Stało się to motywacją do zaproponowania algorytmów opisanych w dalszej części tej pracy.

W rzeczywistości poszukiwanie wspomnianych wyżej podobieństw pomiędzy t-niezmiennikami może być trudne, zwłaszcza gdy liczba t-niezmienników jest duża. W takim przypadku korzysta się algorytmów analizy skupień, za pomocą których podobne do siebie t-niezmienniki można pogrupować w zbiory zwane t-klastrami. Proces ten umożliwia prowadzenie dalszej analizy wewnątrz klastrów i określa się mianem **analizy t-klastrów**. Należy jednak podjąć decyzje, który algorytm analizy skupień, a także jaka miara podobieństwa i jaka liczba t-klastrów jest najbardziej odpowiednia. W ogólności decyzje te zależą od konkretnego systemu biologicznego i właściwości jego modelu. Nie istnieją ogólne zasady doboru odpowiedniego algorytmu i miary podobieństwa, dlatego też grupowanie t-niezmienników nie jest zadaniem trywialnym. Co istotne, takie podejście zaważy często analizę z kilku tysięcy czy kilkuset t-niezmienników do analizy kilkudziesięciu czy kilkunastu t-klastrów. Podobnie jak w przypadku zbiorów MCT, również dla t-klastrów określa się znaczenie biologiczne. Dzięki temu nie trzeba porównywać wszystkich t-niezmienników ze sobą



RYSUNEK 2.5: Podobieństwa pomiędzy t-niezmiennikami. Na Rysunku za pomocą x_1 i x_2 oznaczono parę t-niezmienników, które odpowiednio w kontekście biologicznym odpowiadają podprocesom α_1 i α_2 . Wsparcia tych t-niezmienników oznaczono jako $s(x_1)$ i $s(x_2)$. Na część wspólną wsparć t-niezmienników składają się tranzycje t_0, t_1, t_2 . Oznacza to, że procesy biologiczne α_1 i α_2 mogą ze sobą oddziaływać za pośrednictwem procesów elementarnych odpowiadających tranzycjom t_0, t_1, t_2 .

nawzajem, aby szukać zależności opisujących analizowany system biologiczny.

Pojawiające się niniejszej pracy analizy t-klastrów dla różnych problemów biologicznych zostały wykonane narzędziem *Holmes* [230] (zastosowane narzędzia opisano w kolejnym paragrafie niniejszego podrozdziału), które m.in. pozwala wykonać grupowanie z wykorzystaniem różnych algorytmów klastrowania, jak i szeregu różnych miar podobieństwa. Wyróżnić możemy następujące algorytmy: metoda średniego wiązania (*ang. average linkage (UPGMA)*), metoda środków ciężkości (*ang. centroid method*), metoda pełnego wiązania (*ang. complete linkage*), metoda McQuitty'ego (*ang. McQuitty's method*), metoda medianowa (*ang. median method*), metoda pojedynczego wiązania (*ang. single linkage*), metoda Warda (*ang. Ward's method*). Natomiast dla każdej z powyższych metod można zastosować różne miary odległości, są to: dystans binarny (*ang. binary distance*), dystans Euklidesa (*ang. Euclidean distance*), dystans Hamminga/Manhattan (*ang. Hamming/Manhattan distance*), dystans Canberra (*ang. Canberra distance*), maksymalny dystans (*ang. Maximum distance*), dystans Mińkowskiego (*ang. Minkowski distance*), nieskupiona miara Pearsona (*ang. not centered (uncentered) Pearson*), skupiona miara Pearsona/korelacja (*ang. centered Pearson/Correlation*). Wybór najlepszego klastrowania może być oparty o indeks MSS (*ang. Mean Split Silhouette*), który ocenia dopasowanie każdego t-niezmiennika do jego klastra oraz średnią jakość dla każdego klastrowania [138, 248]. Tak jak nadmieniono powyżej, poza podjęciem decyzji o algorytmie klastrowania i mierze podobieństwa, przychodzi określić odpowiednią liczbę klastrów. Jedną z metod rozwiązania tego problemu jest generowanie różnej liczby klastrów, a następnie ocena ich jakości. W ramach analizy t-klastrów stosowanej dla modeli opisanych w rozprawie (rozdziały 3 i 4) stosowano licznosc w zakresie od 2 do 20 klastrów. Oceny jakości klastrowania można dokonać za pomocą współczynnika Calińskiego–Harabasz [23].

W tej pracy testowano wszystkie wyżej wymienione algorytmy klastrowania i miary podobieństwa, jednak wykorzystano tylko algorytm średniego wiązania oparty na nieskupionej mierze Pearsona. Wybór ten został podyktowany właściwościami problemów biologicznych. Wydaje się,

że ze wszystkich opisanych wyżej podejść, właśnie to wydaje się być bardziej odpowiednie dla problemów biologicznych. Poniżej umieszczono formalne opisy tylko dla metod zastosowanych w ramach rozprawy doktorskiej, pozostałe można znaleźć w instrukcji do *Holmesa - Zintegrowanego Środowiska dla sieci Petriego* [228, 230].

Definicja 2.2.12 (metoda średniego wiązania/metoda średnich połączeń i nieskupiona miara Pearsona [228, 272]). W tej metodzie odległość między dwoma skupieniami oblicza się jako średnią odległość między wszystkimi parami elementów/obserwacji należących do dwóch różnych skupień. Średnia odległość między wszystkimi parami elementów należących do różnych klastrów obliczana jest na podstawie wzoru: $D(X, Y) = \frac{1}{n_x \cdot n_y} \sum_{i=1}^{n_x} \sum_{j=1}^{n_y} d(x_i, y_j)$, gdzie X i Y są klastrami, $d(x, y)$ jest odległością między obiektami należącymi do różnych skupień, a n_x , n_y reprezentują liczności poszczególnych klastrów. Odległość $d(x, y)$ obliczona jest za pomocą nieskupionej miary Pearsona: $d(x, y) = 1 - \frac{\sum_i x_i y_i}{\sqrt{\sum_i x_i^2 \sum_i y_i^2}}$.

Istotnym jest fakt, że klastrowanie t-niezmienników zwykle jest niewystarczające do znalezienia istotnych podobieństw między podprocesami, ale sugeruje, gdzie powinny one być poszukiwane, w obrębie jakich t-klasterów.

Oprócz wspomnianych, klasycznych analiz, można przeprowadzić dodatkowe/rozszerzone analizy, takie jak strukturalną analizę knockout (*ang. t-invariants Knockout Analysis*) oraz symulację knockout (*ang. Simulation Knockout*), określaną w niniejszej pracy także jako analizę średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach. Jak wskazują nazwy nadmienionych analiz, dotyczą one dwóch różnych aspektów sieci Petriego.

Strukturalna analiza knockout polega na wyłączeniu wybranej tranzycji (procesu elementarnego) lub zbioru tranzycji (podprocesu/modułu) i oszacowaniu, ile oraz które podprocesy (t-niezmienniki) zostały wykluczone w wyniku wyłączenia tych wybranych tranzycji [228]. W ramach tej analizy poza obliczoną początkowo liczbą t-niezmienników, oblicza się je także po analizie knockout (po wyłączeniu danej reakcji/podprocesu), co pozwala określić liczbę wykluczonych t-niezmienników. Oznacza to, że na analizie knockout pozwala oszacować znaczenie wybranej tranzycji na podstawie liczby wykluczonych podprocesów.

Definicja 2.2.13 (Strukturalna analiza knockout). Analiza knockout polega na wyznaczeniu liczby t-niezmienników przed jej wykonaniem (liczbę t-niezmienników przez analizą oznaczono jako $tin_{v_{przed}}$), gdzie uwzględniony jest cały zbiór tranzycji $T = \{t_1, \dots, t_m\}$ oraz wyznaczeniu liczby t-niezmienników po jej wykonaniu (liczbę t-niezmienników po analizie oznaczono jako $tin_{v_{po}}$), gdzie uwzględniony jest zbiór tranzycji $T \setminus T'$, gdzie $T' \subseteq T$ jest to podzbiór tranzycji, które są wyłączone. Wykorzystując liczbę t-niezmienników przed i po analizie knockout można oszacować procent wykluczonych t-niezmienników w rezultacie wyłączenia wybranej tranzycji lub zbioru tranzycji, a w efekcie wnioskować o istotności wyłączonego procesu elementarnego lub podprocesu, co można oznaczyć jako $E = \frac{(tin_{v_{przed}} - tin_{v_{po}}) \cdot 100}{tin_{v_{przed}}}$, gdzie E oznacza procent wykluczonych t-niezmienników.

Knockout symulacyjny, podobnie jak knockout strukturalny pozwala zebrać informacje o zachowaniu się systemu podczas wyłączenia wybranej tranzycji (procesu elementarnego) lub zbioru tranzycji (podprocesu/modułu). Jednak dostarcza on informacji o średniej liczbie uruchomień tranzycji we wszystkich wykonanych symulacjach, przy wyłączeniu konkretnych komponentów modelu [228]. Ta analiza pozwala porównać średnią liczbą uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach oszacowaną dla modelu bez wyłączonych tranzycji (zbiór referencyjny) ze średnią liczbą uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach oszacowaną dla modelu z wyłączoną tranzycjom lub wyłączonym zbiorem tranzycji. Na tej podstawie można zauważyć wzrost lub spadek średniej liczby uruchomień tranzycji i określić jakie niesie to za sobą implikacje biologiczne.

2.2.2 Istniejące narzędzia do modelowania i analizy modeli opartych o sieci Petriego

Wszystkie zaproponowane modele opierają się o klasyczne sieci Petriego i zostały utworzone za pomocą narzędzia *Snoopy* [117] lub za pomocą narzędzia *Holmes* [230, 228]. Oba ze wspomnianych narzędzi są aplikacjami o wolnym dostępie i umożliwiają nie tylko tworzenie modeli opartych o klasyczne sieci Petriego, ale także ich wybrane rozszerzenia, jak między innymi modele czasowe. Elementami powiązаныmi z modelami opartymi o formalizm sieci Petriego są t-niezmienniki, których istotność w kontekście analizy przedstawiono w poprzednim podrozdziale. Liczba t-niezmienników charakteryzująca dany model może zostać określona za pomocą narzędzi takich jak: *Charlie* [118], *MonaLisa* [52] czy wyróżniony już wcześniej *Holmes* [230, 228]. Dla zaproponowanych i opisanych w niniejszej rozprawie modeli złożonych procesów biologicznych wykorzystywane były wszystkie trzy narzędzia do obliczania liczby t-niezmienników charakteryzujących badane modele.

2.3 Zagadnienia złożoności obliczeniowej

W bieżącym podrozdziale opisano zagadnienia złożoności obliczeniowej, niezbędne dla zrozumienia opisanych w tej pracy dowodów złożoności wybranych problemów. Podstawowe zagadnienia teorii złożoności obliczeniowej wymagają wprowadzenia w klasy złożoności i relacji między nimi, formalnych definicji problemów, a także wybranych metod dowodzenia.

Wprowadzenie w definicję problemów jest konieczne dla zrozumienia klas złożoności i przynależności do nich konkretnych problemów. W dużej ogólności można powiedzieć, że problem jest pewnym ogólnym pytaniem, na które należy udzielić odpowiedzi. W pierwszej kolejności przytoczona zostanie formalna definicja *problemu* oraz wyróżnione zostaną szczególne rodzaje problemów.

Definicja 2.3.1 (Problem [72, 83]). Problem jest zbiorem X uporządkowanych par ciągów (I, A) należących do zbioru $\{0, 1\}^*$, gdzie I jest instancją, a A jest odpowiedzią dla tej instancji. Ponadto każdy ciąg ze zbioru $\{0, 1\}^*$ występuje w X jako pierwszy element co najmniej jednej pary.

Definicja 2.3.2 (Problem liczbowy [72, 83]). Problem Π jest problemem liczbowym, jeżeli nie istnieje wielomian p taki, że $Max(I) \leq p(Len(I))$ dla każdej instancji $I \in D_\Pi$. Zgodnie z zapisem, argumentem funkcji $Max()$ i $Len()$ jest instancja I , natomiast wartościami tych funkcji są odpowiednio: wartość największej liczby występującej w instancji I oraz długość łańcucha kodującego instancję I . Wartości obu tych funkcji mogą być obliczone przez deterministyczną maszynę Turinga (DTM) w czasie wielomianowym.

Definicja 2.3.3 (Deterministyczna maszyna Turinga (DTM) [20, 72, 83]). Deterministyczną maszyną Turinga nazywamy szóstkę $M = (Q, \Sigma, \Gamma, \delta, q_0, F)$, gdzie: Q jest skończonym zbiorem stanów, Σ jest skończonym zbiorem symboli wejściowych (zwanym także alfabetem wejściowym), Γ jest skończonym zbiorem symboli taśmy (zwanym także alfabetem taśmy), $\delta : Q \times \Gamma \rightarrow Q \times \Gamma \times \{\leftarrow, \rightarrow, \text{—}\}$ jest funkcją przejścia, q_0 jest stanem początkowym (stan q_0 jest elementem zbioru Q , w którym maszyna rozpoczyna działanie), F jest skończonym zbiorem stanów końcowych ($F \subset Q$ jest zbiorem stanów, w których maszyna kończy działanie). Wyróżnia się trzy stany, tj. q_k (stan końcowy), q_t (stan akceptujący), q_n (stan odrzucający). Zbiór Σ jest podzbiorem właściwym zbioru Γ , a do różnicy tych zbiorów należą dwa symbole specjalne: symbol początkowy (\triangleright) oraz symbol pusty (\sqcup). Zbiory Q i Γ są rozłączne. Symbole $\leftarrow, \rightarrow, \text{—}$ oznaczają ruchy głowicy o jedną komórkę w lewo, pozostawienie głowicy w miejscu i ruchy głowicy o jedną komórkę w prawo (żaden z elementów zbioru $\{\leftarrow, \rightarrow, \text{—}\}$ nie należy do $Q \cup \Gamma$).

Definicja 2.3.4 (Problem decyzyjny [20, 72, 83]). Problem decyzyjny Π składa się ze zbioru D_Π instancji oraz podzbioru $Y_\Pi \subseteq D_\Pi$. Problem jest problemem decyzyjnym, jeśli jego rozwiązaniem jest odpowiedź TAK lub NIE. Zbiór Y_Π zawiera te instancje, dla których odpowiedzią jest TAK.

Definicja 2.3.5 (Problem przeszukiwania [20, 72, 83]). Problem przeszukiwania Π składa się ze zbioru D_Π skończonych obiektów zwanych instancjami oraz, dla każdej instancji $I \in D_\Pi$, zbioru $S_\Pi(I)$ skończonych obiektów nazywanych odpowiedziami dla instancji I .

Opisane definicje problemów pozwalają dobrze zrozumieć klasy złożoności. W niniejszej pracy pojawiają się odwołania do następujących klas: klasa **P**, klasa **NP**, klasa problemów **NP**-zupełnych, klasa problemów silnie **NP**-zupełnych, klasa problemów **NP**-trudnych oraz klasa problemów silnie **NP**-trudnych, w związku z tym poniżej podano ich formalne definicje. Ponadto, nieodłącznym elementem teorii złożoności są także metody dowodzenia przynależności pewnych problemów do poszczególnych klas. W związku z tym opisano także formalną definicję transformacji wielomianowej umożliwiającą przeprowadzenie dowodu **NP**-zupełności, transformacji pseudowielomianowej umożliwiającą przeprowadzenie dowodu silnej **NP**-zupełności, oraz wielomianowej redukcji Turinga umożliwiającą przeprowadzenie dowodu **NP**-trudności.

Definicja 2.3.6 (Klasa **P** [20, 72, 83]). Klasa problemów decyzyjnych, które są rozwiązywalne przez deterministyczną maszynę Turinga w czasie co najwyżej wielomianowym.

Definicja 2.3.7 (Klasa **NP** [20, 72, 83]). Klasa problemów decyzyjnych, których to rozwiązanie może być zweryfikowane przez deterministyczną maszynę Turinga w czasie co najwyżej wielomianowym.

Definicja 2.3.8 (Transformacja wielomianowa [20, 72, 83]). Niech Π_1 i Π_2 będą problemami decyzyjnymi. Transformacja wielomianowa problemu Π_1 do Π_2 jest funkcją $f : D_{\Pi_1} \rightarrow D_{\Pi_2}$ posiadającą następujące własności:

- 1) istnieje DTM obliczająca f w czasie wielomianowym,
- 2) dla każdej instancji $I \in D_{\Pi_1}$ odpowiedź brzmi TAK wtedy i tylko wtedy, gdy dla $f(I)$ odpowiedź również jest TAK.

Definicja 2.3.9 (Klasa problemów **NP**-zupełnych [20, 72, 83]). Problem decyzyjny Π_2 należy do klasy problemów **NP**-zupełnych, jeżeli $\Pi_2 \in \mathbf{NP}$ oraz dla każdego problemu decyzyjnego $\Pi_1 \in \mathbf{NP}$ istnieje wielomianowa transformacja $\Pi_1 \times \Pi_2$.

Definicja 2.3.10 (Transformacja pseudowielomianowa [20, 72, 83]). Niech Π_1 i Π_2 będą problemami decyzyjnymi. Niech Len_1 i Max_1 będą funkcjami określającymi długość instancji problemu Π_1 i największą liczbę występującą w tej instancji oraz niech Len_2 i Max_2 będą funkcjami analogicznymi dla problemu Π_2 . Transformacja pseudowielomianowa problemu Π_1 do Π_2 jest funkcją $f : D_{\Pi_1} \rightarrow D_{\Pi_2}$ posiadającą następujące własności:

- 1) dla każdej instancji $I \in D_{\Pi_1}$ zachodzi $I \in Y_{\Pi_1}$ wtedy i tylko wtedy, gdy $f(I) \in Y_{\Pi_2}$,
- 2) funkcja f musi być obliczalna przez DTM w czasie ograniczonym przez wielomian od $Len_1(I)$ i $Max_1(I)$,
- 3) istnieje wielomian q_1 taki, że dla każdej instancji $I \in D_{\Pi_1}$ zachodzi nierówność $q_1(Len_2(f(I))) \geq Len_1(I)$,

4) istnieje wielomian dwóch zmiennych q_2 taki, że dla każdej instancji $I \in D_{\Pi_1}$ zachodzi $Max_2(f(I)) \leq q_2(Max_1(I), Len_1(I))$.

Definicja 2.3.11 (Klasa problemów silnie **NP**-zupełnych [20, 72, 83]). Problem decyzyjny Π należy do klasy problemów silnie **NP**-zupełnych, jeżeli $\Pi \in \mathbf{NP}$ oraz istnieje wielomian p taki, że problem Π_p jest **NP**-zupełny. Przez Π_p oznaczony jest podproblem problemu Π , którego zbiór instancji zawiera tylko te instancje I problemu Π , dla których zachodzi $Max(I) \leq p(Len(I))$ dla pewnego wielomianu p .

Rozważmy problemy Π_1 i Π_2 będące problemami decyzyjnymi, jeżeli Π_1 jest silnie **NP**-zupełny, $\Pi_2 \in \mathbf{NP}$ oraz istnieje pseudowielomianowa transformacja Π_1 do Π_2 , to Π_2 także jest silnie **NP**-zupełny. Ponadto, jeżeli Π jest **NP**-zupełny i nie jest problemem liczbowym to jest on problemem silnie **NP**-zupełnym.

Definicja 2.3.12 (Wielomianowa redukcja Turinga [20, 72, 83]). Niech Π_1 i Π_2 będą problemami przeszukiwania. Wielomianowa redukcja Turinga problemu Π_1 do Π_2 ($\Pi_1 \propto_T \Pi_2$) jest algorytmem A rozwiązującym problem Π_1 , który może zawierać wywołania procedury B rozwiązującej problem Π_2 takim, że jeżeli procedura B działa w czasie wielomianowym, to algorytm A również działa w czasie wielomianowym.

Definicja 2.3.13 (Klasa problemów **NP**-trudnych [20, 72, 83]). Problem przeszukiwania Π_2 jest **NP**-trudny, jeżeli istnieje **NP**-zupełny problem Π_1 , który można przekształcić za pomocą wielomianowej redukcji Turinga do problemu Π_2 .

Definicja 2.3.14 (Klasa problemów silnie **NP**-trudnych [20, 72, 83]). Problem przeszukiwania Π należy do klasy problemów silnie **NP**-trudnych, jeżeli istnieje wielomian p taki, że problem Π_p jest **NP**-trudny.

Wśród wymienionych klas istotne są relacje między nimi. Jedną z najbardziej interesujących jest relacja między klasą **P** i **NP**, a w tym pojawiające się pytanie czy $\mathbf{P} = \mathbf{NP}$? Zgodnie z formalnymi definicjami tych klas złożoności, można zauważyć, że jeśli $\mathbf{P} = \mathbf{NP}$ to znalezienie rozwiązania byłoby równie łatwe jak jego sprawdzenie. Wydaje się jednak, że łatwiej jest zweryfikować poprawność rozwiązania niż znaleźć rozwiązanie, zgodnie z tym, wynikałoby, iż $\mathbf{P} \neq \mathbf{NP}$.

2.4 Kombinatoryczne aspekty analizy t-niezmienników – istniejące problemy

Jedną z głównych analiz sieci Petriego jest analiza oparta o t-niezmienniki. W poprzednim podrozdziale pojawiała się formalna definicja t-niezmiennika (definicja 2.2.10), jego wsparcia (definicja 2.2.11), oraz opis poszukiwania podobieństw pomiędzy t-niezmiennikami i analizy t-klastrów, która ma ułatwić poszukiwanie podobieństw pomiędzy t-niezmiennikami. Natomiast obecny podrozdział traktuje o konieczności poszukiwania pewnych szczególnych podzbiorów tranzycji, będących lub niebędących elementami wsparć t-niezmienników i/lub klastrów t-niezmienników (t-klastrów). Potrzeba poszukiwania takich podzbiorów pojawiała się w toku analizy t-niezmienników, która to często wymaga przeprowadzenia głębszych analiz, aby umożliwić odkrywanie ciekawych właściwości analizowanych systemów. Poszukiwanie pewnych podzbiorów tranzycji jest istotne dla odkrywania zależności pomiędzy podprocesami, ale również dla zidentyfikowania braku występowania zależności pomiędzy podprocesami. W niniejszym podrozdziale przytoczono formalne definicje problemów kombinatorycznych poszukiwania pewnych podzbiorów tranzycji, które podzielono na kategorię problemów występowania i anty-występowania [73].

Problemy występowania związane są z poszukiwaniem zbioru tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które zawarte są w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmenników i/lub t-klastrów. Tranzycje należące do takiego zbioru odpowiadają elementarnym procesom, które występują w wielu podprocesach, przez co mogą być istotne dla funkcjonowania modelowanego systemu. Poniżej wyróżniono różne warianty problemów i przytoczono ich definicje.

Problemy poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które zawarte są w wsparciach t-niezmenników, które są zawarte w odpowiednio dużej liczbie t-klastrów:

Definicja 2.4.1 (Występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja przeszukiwania 1 [73, 74]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmenników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$ i $R \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: zbiór $W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k} \in C} W \subseteq d_{i_1}, W \subseteq d_{i_2}, \dots, W \subseteq d_{i_k}$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $k \geq K$ i $r \geq R$.

Problem występowania tranzycji w t-klastrach jest silnie **NP**-trudny, co można udowodnić przy pomocy problemu zrównoważonego pełnego podgrafu dwudzielnego [74].

Definicja 2.4.2 (Występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja decyzyjna 1 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmenników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$ i $R \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: TAK, jeżeli $\exists W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k} \in C} W \subseteq d_{i_1}, W \subseteq d_{i_2}, \dots, W \subseteq d_{i_k}$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $k \geq K$ i $r \geq R$; NIE w przeciwnym przypadku.

Problemy poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które są zawarte w sumie wsparć t-niezmenników należących do jednego t-klastra:

Definicja 2.4.3 (Występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja przeszukiwania 2 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmenników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$ i $R \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: zbiór $W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_i \in C} W \subseteq d_i$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $r \geq R$.

Definicja 2.4.4 (Występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja decyzyjna 2 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmenników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$ i $R \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: TAK, jeżeli $\exists W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_i \in C} W \subseteq d_i$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $r \geq R$; NIE w przeciwnym przypadku.

Problemy poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które zawarte są w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmenników (bez uwzględnienia liczby t-klastrów):

Definicja 2.4.5 (Występowanie tranzycji we wsparciach - wersja przeszukiwania 1 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, liczby $L \in \mathbb{N}^+$ i $R \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: zbiór $W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_l} \in S} W \subseteq s_{i_1}, W \subseteq s_{i_2}, \dots, W \subseteq s_{i_l}$ oraz $l \geq L$ i $r \geq R$.

Problem poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które zawarte są w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników i w odpowiednio dużej liczbie t-klastrów, bez uwzględnienia konkretnego rozłożenia wsparć t-niezmienników i t-klastrów:

Definicja 2.4.6 (Występowanie tranzycji w t-klastrach i we wsparciach - wersja przeszukiwania 1 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$, $R \in \mathbb{N}^+$ i $L \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: zbiór $W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k} \in C} W \subseteq d_{i_1}, W \subseteq d_{i_2}, \dots, W \subseteq d_{i_k}$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $\exists_{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_l} \in S} W \subseteq s_{i_1}, W \subseteq s_{i_2}, \dots, W \subseteq s_{i_l}$ i $r \geq R$, $k \geq K$ i $l \geq L$.

Problem poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które zawarte są w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników i w odpowiednio dużej liczbie t-klastrów, z uwzględnieniem konkretnego rozłożenia wsparć t-niezmienników i t-klastrów. To znaczy, że poszukiwany zbiór tranzycji musi być podzbiorem przynajmniej jednego t-klastra i jednocześnie podzbiorem pewnej minimalnej liczby wsparć t-niezmienników:

Definicja 2.4.7 (Występowanie tranzycji w t-klastrach i we wsparciach - wersja przeszukiwania 2 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$, $R \in \mathbb{N}^+$ i $L \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: zbiór $W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_i \in C} W \subseteq d_i$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $\exists_{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_l} \in S \cap c_i} W \subseteq s_{i_1}, W \subseteq s_{i_2}, \dots, W \subseteq s_{i_l}$ i $r \geq R$ oraz $l \geq L$.

Problem poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które zawarte są w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników i w odpowiednio dużej liczbie t-klastrów, z uwzględnieniem konkretnego rozłożenia wsparć t-niezmienników i t-klastrów. To znaczy, że poszukiwany zbiór tranzycji podzbiorem odpowiednio dużej liczby t-klastrów i jednocześnie podzbiorem odpowiednio dużej liczby wsparć t-niezmienników z każdego z tych t-klastrów:

Definicja 2.4.8 (Występowanie tranzycji w t-klastrach i we wsparciach - wersja przeszukiwania 3 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$, $R \in \mathbb{N}^+$ i $L \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: zbiór $W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{C' = \{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k}\} \subseteq C} W \subseteq d_{i_1}, W \subseteq d_{i_2}, \dots, W \subseteq d_{i_k}$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$, a ponadto $\forall_{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k} \in C'} \exists_{s_{\alpha_1}, s_{\alpha_2}, \dots, s_{\alpha_l}, \alpha \in \{i_1, i_2, \dots, i_k\}} [(s_{\alpha_1} \in c_{\alpha}, s_{\alpha_2} \in c_{\alpha}, \dots, s_{\alpha_l} \in c_{\alpha}) \wedge (W \subseteq s_{\alpha_1}, W \subseteq s_{\alpha_2}, \dots, W \subseteq s_{\alpha_l})]$ oraz $r \geq R$, $k \geq K$ i $l \geq L$.

Problemy anty-występowania związane są z poszukiwaniem zbioru tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które nie są zawarte w żadnym z wsparć t-niezmiennika i/lub t-klastra lub występują w stosunkowo niewielkiej liczbie wsparć t-niezmienników i/lub t-klastrów. Tranzycje należące do takiego zbioru odpowiadają elementarnym procesom, poprzez które niektóre podprocesy nie mogą ze sobą oddziaływać. Poniżej wyróżniono różne warianty problemów i przytoczono ich definicje.

Problemy poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które nie są podzbiorem żadnej sumy wsparć t-niezmienników będących elementami jednego t-klastra:

Definicja 2.4.9 (Anty-występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja przeszukiwania 1 [73]).

- *Instancja:* zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$ oraz liczba $U \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź:* zbiór $A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\nexists_{c_i \in C} A \subseteq d_i$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $u \leq U$.

Definicja 2.4.10 (Anty-występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja decyzyjna 1 [73]).

- *Instancja:* zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$ oraz liczba $U \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź:* TAK, jeżeli $\exists A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\nexists_{c_i \in C} A \subseteq d_i$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $u \leq U$; NIE w przeciwnym przypadku.

Problemy poszukiwania zbiorów tranzycji o pewnej minimalnej liczności, które nie są zawarte w pewnej minimalnej liczbie t-klastrów:

Definicja 2.4.11 (Anty-występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja przeszukiwania 2 [73]).

- *Instancja:* zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczba $U \in \mathbb{N}^+$ oraz $K \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź:* zbiór $A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\nexists_{C' = \{c_1, c_2, \dots, c_k\} \subseteq C} A \subseteq d_1, A \subseteq d_2, \dots, A \subseteq d_k$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $u \leq U$ i $k \geq K$.

Definicja 2.4.12 (Anty-występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja decyzyjna 2 [73]).

- *Instancja:* zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczba $U \in \mathbb{N}^+$ oraz $K \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź:* TAK, jeżeli $\exists A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\nexists_{C' = \{c_1, c_2, \dots, c_k\} \subseteq C} A \subseteq d_1, A \subseteq d_2, \dots, A \subseteq d_k$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $u \leq U$ i $k \geq K$; NIE w przeciwnym przypadku.

Problem, w którym poszukiwane są nieistniejące zbiory tranzycji o odpowiednio dużej liczności, które nie są zawarte w jakimkolwiek t-klastrze:

Definicja 2.4.13 (Anty-występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja decyzyjna 3 [73]).

- *Instancja:* zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$ oraz liczba $U \in \mathbb{N}^+$.

- *Odpowiedź:* TAK, jeżeli $\nexists A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_i \in C} A \subseteq d_i$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $u \geq U$; NIE w przeciwnym przypadku.

Problem, w którym poszukiwane są nieistniejące zbiory tranzycji o odpowiednio dużej liczności, które są zawarte w pewnej minimalnej liczbie t-klastrów:

Definicja 2.4.14 (Anty-występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja decyzyjna 4 [73]).

- *Instancja:* zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$ oraz liczba $U \in \mathbb{N}^+$ i $K \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź:* TAK, jeżeli $\nexists A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{C' = \{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k}\} \subseteq C} A \subseteq d_{i_1}, A \subseteq d_{i_2}, \dots, A \subseteq d_{i_k}$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $u \geq U$ i $k \geq K$; NIE w przeciwnym przypadku.

W tym podrozdziale przytoczono problemy poszukiwania występujących i anty-występujących zbiorów tranzycji. Dla niektórych z opisanych problemów określono złożoność obliczeniową [73, 74], a dla niektórych została ona rozważona w niniejszej rozprawie, patrz rozdział 5.

2.5 Zagadnienia dotyczące innych niż sieci Petriego metod modelowania

Obecny podrozdział zawiera opisy innych niż sieci Petriego metod modelowania i ich analizy, które są kluczowe dla lepszego zrozumienia dalszej części rozprawy doktorskiej. Przytoczona teoria skupia się między innymi na modelowaniu i analizie modeli opartych o równania różniczkowe zwyczajne (*ang. Ordinary Differential Equations (ODE)*), a także na macierzowych modelach dynamiki populacji.

Modele równań różniczkowych zwyczajnych opierają się na prawie działania mas i są głównie modelami deterministycznymi, w których odpowiedź modelu zależy od parametrów i warunków początkowych. Modele biologiczne oparte o ODE opisują zmiany stężeń lub liczby cząsteczek zaangażowanych w badany proces czy system. Przez wspomniane cząsteczki rozumiemy szeroką gamę elementów, m.in. transkrypty, białka czy kompleksy białkowe. Każdy rozważany podproces biologiczny jest reprezentowany przez pojedyncze wyrażenie algebraiczne zawierające jeden lub kilka parametrów. Takie wyrażenie może pojawić się w jednym lub kilku równaniach. Co istotne, wspomniane parametry wymagają estymacji na podstawie wyników eksperymentalnych.

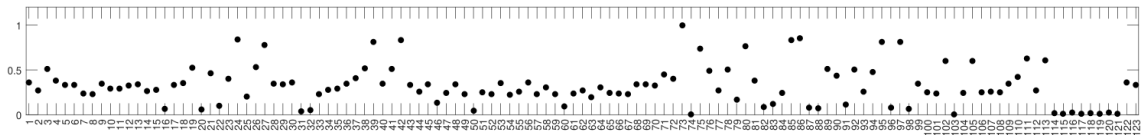
Jedną ze wspomnianych w niniejszej rozprawie metod analizy modeli ODE jest analiza wrażliwości (*ang. Sensitivity Analysis (SA)*). Analiza wrażliwości jest jednym z istotnych narzędzi w badaniu ścieżek sygnałowych *in silico*, ponieważ dostarcza informacji o zależnościach między wartościami parametrów a zachowaniem systemu. W ogólności można powiedzieć, że analiza ta pozwala na weryfikację poprawności modelu, wykrywania błędów technicznych w modelu, a przede wszystkim umożliwia znalezienie najważniejszych parametrów i powiązanych z nimi procesów/podprocesów biologicznych [227, 255]. Zatem, analiza wrażliwości może być wykorzystana do zidentyfikowania krytycznych regiony w przestrzeni parametrów lub może określić dalszy kierunek badań [255]. Ponadto, analiza ta może posłużyć do wskazywania potencjalnych celów molekularnych dla nowych leków i tym samym zapobiegać chorobom związanym z określonymi szlakami sygnałowymi [180, 271].

Istnieją różne metody analizy wrażliwości, jednak na potrzeby badań opisanych w niniejszej rozprawie przytoczona zostanie tylko jedna z nich, jest to prosta metoda globalna, w której parametry zmieniane są pojedynczo (*ang. one-at-a-time (OAT)*). Dokładniej, zastosowano metodę

OAT opartą na rozkładzie częstotliwości odpowiedzi czasowej systemu do tworzenia rankingów parametrów [137]. Takie rankingi można wykorzystać do znalezienia najważniejszych parametrów i procesów, a następnie wykorzystać m.in. do wskazania celów molekularnych dla nowych leków.

Procedurę opisaną w pracy [137] wykorzystano w podrozdziale 6.3 do przeprowadzenia licznych symulacji modelu ODE z losowo zmienianymi parametrami. Dla każdego parametru w modelu przeprowadzono 1000 symulacji, w których wartość tego parametru została losowo dobrana w zakresie $\pm 30\%$ jego wartości nominalnej z wykorzystaniem rozkładu równomiernego. Analizie podlegały jedynie parametry kinetyczne, takie jak szybkość reakcji biochemicznych, ponieważ tylko one mogą stać się możliwymi celami molekularnymi leków. Ponadto, tylko parametry związane z określonymi reakcjami biochemicznymi mają swoje odpowiedniki w modelach sieci Petriego. Ma to istotne znaczenie, gdyż opisywana analiza wrażliwości zostanie w dalszej części pracy porównana z analizą ważności – metodą analizy modeli opartych o sieci Petriego (patrz rozdział 4) [104].

Zgodnie z procedurą opisaną w [137], do badań przedstawionych w podrozdziale 6.3 utworzono rankingi parametrów dla każdej zmiennej modelu. Następnie obliczona została średnia arytmetyczna wskaźników wrażliwości dla parametrów ze wszystkich rankingów (dla wszystkich zmiennych modelu). Dzięki temu wynikowy ranking parametrów reprezentuje skumulowany wpływ zmiany wartości danego parametru na wszystkie zmienne w modelu. Z uwagi na to podejście, wysoka pozycja danego parametru w rankingu może sugerować, że zmiana wartości tego parametru powoduje istotną zmianę kilku zmiennych modelu lub umiarkowaną zmianę wielu zmiennych modelu. Jednakże, ranking parametrów nie umożliwia rozróżnienia między tymi dwoma przypadkami. Na Rysunku 2.6 umieszczono przykładowy ranking parametrów. Jak można zauważyć, wartości w tym rankingu mieszczą się w zakresie od 0 do 1, im wyższa wartość danego parametru tym istotniejszy może on być dla badanego systemu biologicznego.



RYSunEK 2.6: Przykładowy wyniki analizy wrażliwości dla modeli opartych o równania różniczkowe – ranking parametrów pochodzi z pracy [104].

Innym z podejść opisanym w niniejszej rozprawie są macierzowe modele dynamiki populacji. Modele tego rodzaju w ogólności są sposobem syntezy informacji demograficznych o populacji i są przydatne w rozwiązywaniu różnych problemów, w tym problemów ekologicznych i ewolucyjnych [139, 27, 196]. Najczęściej są wykorzystywane do prognozowania dynamiki populacji, oceny wpływu czynników stresogennych na populacje czy badania ewolucji historii życia [139, 253, 254]. W związku z tym podejście oparte na macierzowym modelu dynamiki populacji wydaje się odpowiednie do zbadania dynamiki populacji makrofagów w rozwoju blaszki miażdżycowej.

Zastosowane podejście można wyjaśnić za pomocą macierzy Lesliego, które wykorzystywane są do tworzenia dyskretnych modeli wzrostu populacji o strukturze wiekowej. Taki model pozwala na opisanie wzrostu populacji i przewidywanego rozkładu wieku, a więc w ogólności pozwala na opisanie zmian w populacji organizmów w pewnym okresie czasu [109, 155]. W takiej standardowej macierzy populacja jest podzielona na grupy wiekowe, przy czym, w każdym kroku czasowym populacja jest reprezentowana przez macierz zawierającą liczbę osobników dla każdej grupy wiekowej. W ogólności, macierz Lesliego $S(t)$ jest macierzą kwadratową o takiej samej liczbie wierszy i kolumn, jak liczba badanych grup. Komórka (i, j) w macierzy $S(t)$ wskazuje, ile osobników będzie w klasie wiekowej i w następnym kroku czasowym dla każdego osobnika w stadium j . W każdym kroku czasowym macierz Lesliego $S(t)$ jest mnożona przez macierz populacji $N(t)$, mając

na celu wygenerowanie macierzy populacji dla kolejnego kroku czasowego $N(t + 1)$. Oznacza to, że $N(t + 1) = S(t) \cdot N(t)$ [4, 26]. Ciągłe mnożenie macierzy Lesliego przez macierz populacji pozwala ostatecznie uzyskać populację o stabilnym rozkładzie wieku, w którym proporcja osobników w każdej klasie wiekowej pozostaje stała w czasie i ma stabilne tempo wzrostu.

Należy nadmienić, że aby lepiej odzwierciedlić zachowanie populacji makrofagów, opisane podejście wykorzystano jako inspirację, w ramach której zamiast standardowego równania $N(t + 1) = S(t) \cdot N(t)$, zastosowano równanie $N(t + 1) = S(t) \cdot Q(t)$, co dokładniej opisano w podrozdziale 6.4.

Teoria przytoczona w niniejszym podrozdziale stanowi wstęp teoretyczny do badań opisanych w rozdziale 6, traktującym o innych metodach modelowania niż podejścia oparte o sieci Petriego.

Rozdział 3

Zaproponowane modele systemów biologicznych opartych na sieci Petriego i ich klasyczna analiza na podstawie istniejących metod

3.1 Wprowadzenie

Modelowanie i analiza złożonych systemów biologicznych powiązanych ze sobą skomplikowaną siecią oddziaływań stała się możliwa dzięki podejściom systemowym. Jak wspomniano w rozdziale 2, podejście oparte o sieci Petriego jest stosowane z coraz to większym powodzeniem od prawie trzech dekad [28, 66, 88, 91, 96, 111, 116, 146, 182, 218, 229, 237, 251]. Podejście to narzuca konieczność wnikliwego poznania badanego zjawiska biologicznego, co może być utrudnione ze względu na braki danych, badania prowadzone na różnych poziomach szczegółowości, czy też wręcz wzajemnie wykluczające się informacje. Jednakże, należy pamiętać, że dzięki temu podejściu, skupiającemu się na dużej skali oddziaływań, jesteśmy w stanie poznać naturę tych procesów, a przede wszystkim uporządkować wiedzę na ich temat. Oczywiście nadrzędnym celem jest odkrywanie nowych zależności, które mogłyby mieć wpływ na opracowanie lepszych terapii leczenia.

W tym rozdziale przedstawiono istniejące metody analizy oraz zaproponowano modele oparte o sieci Petriego dotyczące różnych aspektów powstawania i rozwoju miażdżycy. Ponadto zinterpretowano i opisano uzyskane wyniki.

W podrozdziale 3.2 przedstawiono model i analizę uszkodzeń śródbłonka, będącego jedną z głównych przyczyn powstawania blaszki miażdżycowej. Efekty tej pracy opublikowano w artykule konferencyjnym [30]. W ramach tej pracy autor zaproponował model oparty o sieć Petriego, wykonał jego analizę w oparciu o istniejące, klasyczne metody analizy, a następnie zinterpretował wyniki w konsultacji ze współautorami. Opisana w tym podrozdziale praca stała się prologiem dla dalszych badań, prowadzonych w celu lepszego zrozumienia złożonego zjawiska jakim jest miażdżycy.

W podrozdziale 3.3 przedstawiono model i analizę wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonka i rozwój miażdżycy. Model ten jest rozszerzeniem modelu zaproponowanego w podrozdziale 3.2, który uwzględnia dodatkowe czynniki ryzyka. Efekty tej pracy opublikowano w artykule [31]. W ramach tej pracy autor zaproponował model oparty o sieć Petriego, wykonał jego analizę w oparciu o istniejące, klasyczne metody analizy, a następnie zinterpretował wyniki w konsultacji ze współautorami. Opisany w tym podrozdziale model jest rozszerzeniem modelu uszkodzeń śródbłonka i ma na celu dokładniejsze poznanie procesu jakim jest miażdżycy; procesu który w

dalszym ciągu nie został w pełni poznany.

Podrozdział 3.4, jako kontynuacja badań nad rozwojem miażdżycy, skupia się na modelu wybranych aspektów stanu prozakrzepowego wywołanego tytoniem, stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. Zaburzenia te są ściśle związane z powstawaniem zakrzepów i promowaniem chorób układu krążenia. Efekty tej pracy opublikowano w artykule [98]. W ramach tej pracy autor zaproponował model oparty o sieć Petriego, wykonał jego analizę w oparciu o istniejące, klasyczne metody analizy, a następnie zinterpretował wyniki w konsultacji ze współautorami. Opisana w tym podrozdziale praca pozwala na głębsze zrozumienie miażdżycy, przede wszystkim przez analizę interakcji na poziomie kluczowych podprocesów.

W podrozdziale 3.5 zawarto podsumowanie z naciskiem na efekty analizy zaproponowanych modeli uzyskane w wyniku użycia istniejących, klasycznych metod analizy, a w konsekwencji jasną motywację do zaproponowania bardziej szczegółowych metod analizy.

3.2 Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu uszkodzeń śródbłonka na rozwój miażdżycy

Celem badań opisanych w tym podrozdziale jest przedstawienie zaproponowanego modelu wpływu uszkodzeń śródbłonka na rozwój miażdżycy oraz jego analiza za pomocą znanych, klasycznych metod. Poza analizą wspomnianego modelu oceniono możliwości zastosowanych metod.

Miażdżycza tętnic, czyli powstawanie zmian włóknisto-tłuszczowych w ścianie tętnic, powoduje dużą zachorowalność i śmiertelność. Właściwie jest to jedna z głównych przyczyn zgonów na świecie [49, 181, 189]. W związku z tym niezwykle ważne jest lepsze poznanie mechanizmów leżących u podstaw tej jednostki chorobowej. Badacze nieustannie poszukują czynników promiażdżycowych, próbując zmniejszyć częstotliwość występowania tej choroby, a przede wszystkim zwiększyć możliwości terapeutyczne, które mogłyby zarówno poprawić profilaktykę, jak i leczenie.

Pomimo postępu, jaki dokonał się na przestrzeni ostatnich lat w kontekście poznania mechanizmów leżących u podłoża miażdżycy, wiedza ta w dalszym ciągu pozostaje niekompletna [181, 289], a to utrudnia w pełni skuteczne leczenie przyczynowe tego powszechnego schorzenia. W tej części pracy rozważamy jeden z fundamentalnych aspektów miażdżycy, jakim jest dysfunkcja śródbłonka. Zjawisko to jest procesem podlegającym różnym modyfikacjom pod wpływem oddziaływania różnorodnych czynników, a więc jego rozumienie nie jest możliwe bez rozważenia go jako całego systemu. Z tego względu do modelowania wykorzystano klasyczne sieci Petriego.

3.2.1 Tło biologiczne - nieformalny opis problemu biologicznego

W niniejszym paragrafie wyróżniono kontekst biologiczny mechanizmów wyraźnie wpływających na rozwój blaszki miażdżycowej, które to zostały przepisane na formalizm sieci Petriego. Aby lepiej zrozumieć, co kryje się za siecią powiązań miejsc i tranzycji wyróżniono następujące procesy:

1. Dysfunkcja śródbłonka

Patologia miażdżycy jest niezwykle złożona, jednak centralnym elementem jest śródbłonek naczyniowy [289]. Zainicjowanie uszkodzeń śródbłonka, zwane także aktywacją prozapalnego fenotypu śródbłonka, wiąże się z pojawieniem różnych niepożądanych czynników, które oddziałują na śródbłonek w sposób pośredni i bezpośredni. Wśród tych czynników znajduje się przede wszystkim wysokie stężenie lipidów, wysokie ciśnienie tętnicze krwi, podwyższony poziom glukozy w surowicy oraz stany zapalne m.in. spowodowane paleniem papierosów [144, 192, 200].

Rozwój zapalenia jest oczywistym następstwem uszkodzeń śródbłonka. Jednak odpowiedź uszkodzonego śródbłonka bierze swój początek w ekspresji białek dokujących znajdujących się na jego powierzchni, mowa o molekułach adhezyjnych-1 komórki naczyniowej (VECAM-1/VCAM-1). Rolą tych białek jest umożliwienie adhezji monocytów krwi, które przyciągane są przez obecność chemokin uwolnionych z uszkodzonego śródbłonka. Proces wnikania monocytów do ściany naczynia oraz przekształcenie w makrofagi, tzw. diapedeza, jest typowym procesem odpowiedzi zapalnej [200]. Wiąże się to z naturalną rolą makrofagów, które uwarunkowane są do zapobiegania infekcji oraz pozbywania się uszkodzonych lub szkodliwych komórek [283]. Makrofagi zazwyczaj po zakończeniu wykonanej czynności wracają do krwioobiegu, jednak miażdżycza scharakteryzowana przez utrzymujące się wysokie stężenie lipidów, sprawia, że obecność makrofagów jest trwała i może prowadzić do dalszych uszkodzeń.

2. Dalszy rozwój uszkodzeń śródbłonka

Dalszy rozwój uszkodzeń śródbłonka wiąże się z trwałym utrzymywaniem makrofagów w środowisku zapalnym. Jak wspomniano, głównym czynnikiem etiologii miażdżycy jest wysoki poziom lipoprotein o małej gęstości (LDL), który ulega modyfikacji oksydacyjnej (LDL → oxLDL) w wyniku długotrwałej ekspozycji na reaktywne formy tlenu (ROS). Precyzując, w utlenianie LDL zaangażowany jest anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) [211], o którym można powiedzieć, że jest jednym z kluczowych elementów złożonego procesu powodującego zwężanie światła naczynia. Wspomniane reaktywne formy tlenu są stymulowane przez makrofagi, których to pierwotną rolą jest naprawa uszkodzeń. Zmodyfikowany, utleniony LDL (oxLDL) wywołuje dalszą reakcję prozapalną – stymuluje śródbłonek do produkcji chemokin, czynników wzrostu, do ekspresji molekuł adhezyjnych, co umożliwia dalszą rekrutację monocytów. Jak widać jest to samonapędzający się mechanizm, w którym makrofag, naturalny obrońca, przestaje być zdolny do pełnienia swojej roli i napędza szkodliwy rozwój zapalenia.

Poza tym, że makrofagi wydzielają szereg czynników wzrostu i cytokin napędzając procesy zapalne, przyczyniają się one także do proliferacji (namnażania się) komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) [324]. Proliferujące komórki mięśni gładkich wydzielają kolagen oraz macierz glikoproteinową, tworząc czapkę włóknistą znajdującą się na płytce miażdżycowej.

Ponadto, makrofagi w jeszcze jeden sposób stają się bezpośrednią przyczyną postępu miażdżycy. Wyłapują one oxLDL – jest to działanie chroniące komórkę przed nadmiernym gromadzeniem się szkodliwego zmodyfikowanego LDL [16]. Proces ten prowadzi do utworzenia komórek piankowatych (komórek wypełnionych utlenionymi lipidami). Gdy ilość oxLDL jest wysoka, może dochodzić do lizy komórek piankowatych. Zazwyczaj jest to charakterystyczne dla późniejszych stadiów choroby. Obumierające komórki piankowate uwalniają rdzeń nekrotyczny zbudowany z utlenionych lipidów (zwany również rdzeniem martwiczym) o naturze wysoce zakrzepowej [16, 77, 200].

W trakcie rozwoju miażdżycy dochodzi do wielokrotnego powtarzania się fazy odkładania lipidów oraz formowania czapki włóknistej, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju blaszki miażdżycowej, a w ostateczności może prowadzić do jej pęknięcia [200].

3. **Synteza tlenu azotu i jego rola** Tlenek azotu (NO) jest produkowany w wyniku konwersji L-argininy do cytruliny przez grupę enzymów zwaną syntazami tlenu azotu (NOS). W zależności od umiejscowienia w tkance wyróżnia się trzy główne izoformy NOS: neuronalna – nNOS, endotelialna zwana także śródbłonkową – eNOS i indukowalna iNOS [200, 247]. Reakcja ta wymaga obecności tlenu (O_2), dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) i tetrahydrobiopteryny (BH_4). Rolą ostatniego z nich jest zwiększenie powinowactwa syntazy

eNOS do L-argininy [200]. W wyniku reakcji konwersji L-argininy do cytruliny, obok tlenu azotu powstaje także NADP^+ , będący utlenioną formą dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Co istotne, synteza NO może być hamowana w przypadku, gdy dojdzie do zahamowania syntazy lub innego ważnego kofaktora. Jednak poza bezpośrednim hamowaniem, jak w przypadku pojawienia się inhibitora syntaz, jakim jest asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), może dojść do zmniejszenia biodostępności NO w wyniku uszkodzenia śródbłonka, który w normalnych warunkach wydziela syntazę eNOS konieczną do zajścia syntezy tlenu azotu [200].

Tlenek azotu uczestniczy w ważnych procesach fizjologicznych takich jak regulacja przepływu i ciśnienia krwi (poprzez rozszerzanie naczyń krwionośnych), angiogeneza, apoptoza [200, 324]. Jednak NO wzbudza duże zainteresowanie niekoniecznie ze względu na mnogość procesów w jakich uczestniczy, a raczej przez wzgląd na dualną charakterystykę ściśle związaną z biodostępnością. Oznacza to, że w zależności od jego stężenia może mieć działanie korzystne lub szkodliwe przyczyniające się do promowania rozwoju miażdżycy [303].

a) **Wysokie stężenie NO → działanie korzystne**

Jeśli syntetyzowana jest odpowiednia ilość tlenu azotu, co jest efektem prawidłowo działających mechanizmów wpływających na jego biodostępność, to tlenek azotu odgrywa pozytywną rolę w modelowanym systemie. Oznacza to przede wszystkim zapobieganie utlenianiu LDL (produkcji oxLDL). Obok tego, tlenek azotu odgrywa istotną rolę również w innych ważnych podprocesach, takich jak regulacja płytek krwi, adhezja monocytów, zmniejszenie ciśnienia krwi czy zapobieganie proliferacji komórek mięśni gładkich. Tym samym można powiedzieć, że tlenek azotu prowadzi do ograniczenia odpowiedzi zapalnej [200].

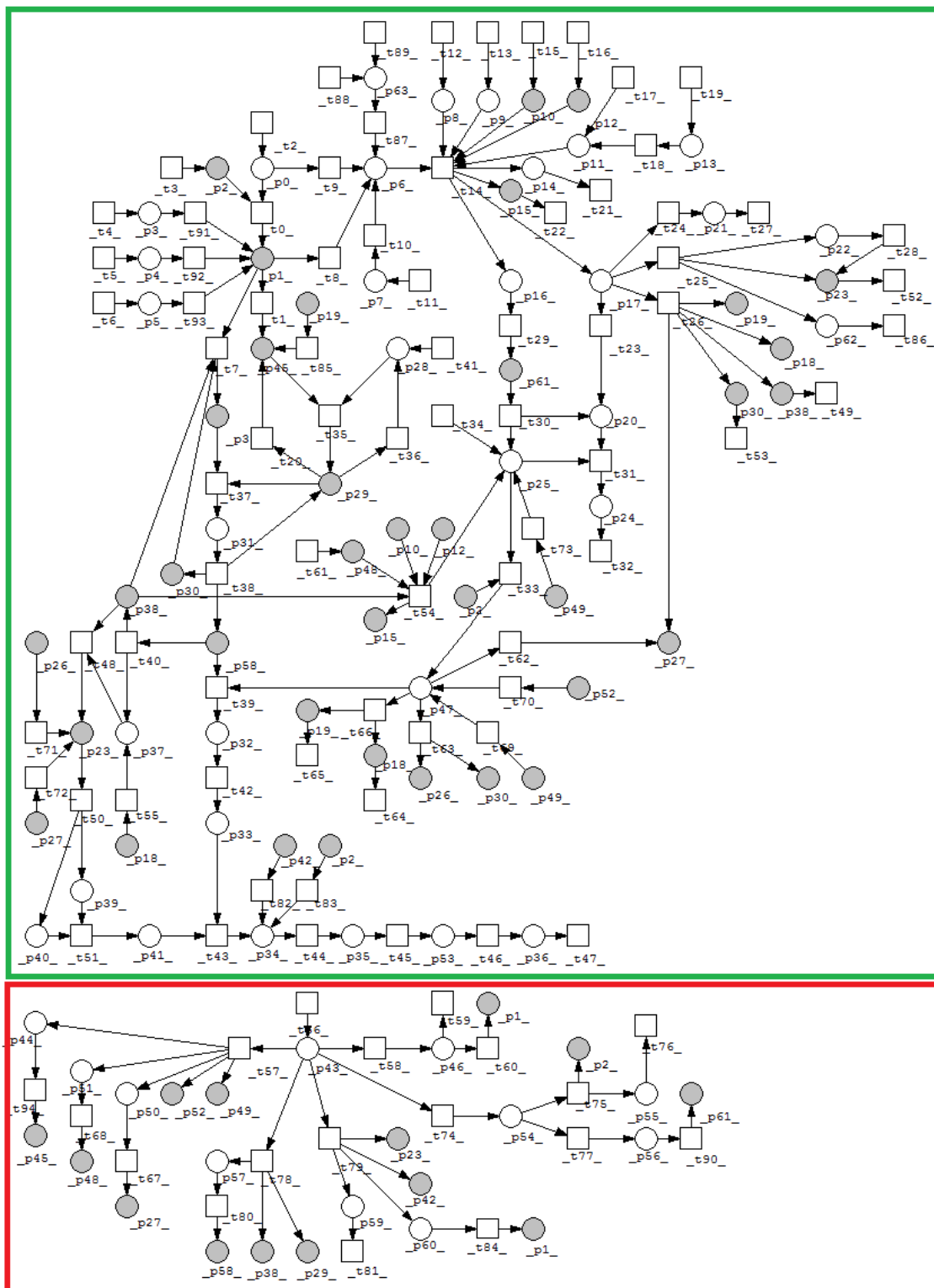
b) **Niskie stężenie NO → działanie niekorzystne**

Jeśli syntetyzowana ilość tlenu azotu nie jest wystarczająca z uwagi na nieprawidłowe działanie mechanizmów wpływających na jego biodostępność, to tlenek azotu ujawnia swoje szkodliwe działanie [144, 192, 200]. W głównej mierze przyczynia się to do promowania utlenienia LDL, co jest równoznaczne z jawną propagacją zapalenia i progresji miażdżycy.

3.2.2 Model

Model matematyczny oparty o formalizm sieci Petriego został stworzony za pomocą narzędzia *Snoopy* [117], t-niezmienniki wyznaczono za pomocą narzędzia *Charlie* [118], do analizy modelu wykorzystano skrypty własne napisane w języku R. Zastosowane metody analizy są obecnie dostępne w programie *Holmes* [228, 230].

Zaproponowana sieć Petriego została przedstawiona na Rysunku 3.1, gdzie za pomocą kolorowych ram wyróżniono dwie główne podsieci, połączone ze sobą za pomocą miejsc logicznych (patrz Rysunek 2.1 w rozdziale teoretycznym). Podsieć oznaczona zieloną ramą obejmuje podstawę całego modelu miażdżycowego, jej kluczowe mechanizmy, podczas gdy podsieć wyróżniona czerwoną ramą obejmuje wybrane mechanizmy związane z dymem tytoniowym i szkodliwymi procesami charakterystycznymi dla palaczy. Nazwy pasywnych komponentów – miejsc (oznaczonych okręgami) znajdują się w Tabeli 3.1, natomiast nazwy aktywnych komponentów – tranzycji (oznaczonych kwadratami) umieszczono w Tabeli 3.2. Obie te Tabele zawierają dwie kolumny: *ID* – zawierająca identyfikator miejsca/tranzycji oraz *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca nazwę miejsca/tranzycji określająca jej przeznaczenie w systemie.



RYСУNEK 3.1: Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu uszkodzeń śródbłonki na rozwój miażdżycy podzielono na dwie podsieci oznaczone kolorowymi ramami. Pierwsza, oznaczona zieloną ramą, obejmuje podstawę całego modelu, przede wszystkim uszkodzenia śródbłonki i jego odpowiedź zapalną. Druga, oznaczona czerwoną ramą, dotyczy mechanizmów związanych ze szkodliwym wpływem palenia papierosów na rozwój miażdżycy. Rysunek pochodzi z pracy [30].

TABELA 3.1: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc (patrz [30]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	zdrowy śródbłonek	p_{32}	komórka piankowata
p_1	uszkodzony śródbłonek	p_{33}	rdzeń nekrotyczny
p_2	LDL	p_{34}	blaszka miażdżycowa
p_3	wysokie ciśnienie krwi	p_{35}	czynnik tkankowy
p_4	toksyny	p_{36}	miażdżycyca
p_5	inne czynniki	p_{37}	czynnik wzrostu
p_6	eNOS	p_{38}	cytokiny
p_7	ADMA	p_{39}	macierz glikoproteinowa
p_8	iNOS	p_{40}	kolagen
p_9	nNOS	p_{41}	czapeczka włóknista
p_{10}	NADPH	p_{42}	białe krwinki krwi
p_{11}	L-arginina	p_{43}	dym tytoniowy
p_{12}	O ₂	p_{44}	policykliczne węglowodory aromatyczne
p_{13}	L-NMMA (N-monometyloarginina)	p_{45}	chemokiny
p_{14}	cytrulina	p_{46}	FMD (dysplazja włóknisto-mięśniowa)
p_{15}	NADP	p_{47}	oxLDL
p_{16}	NO jeśli jest uszkodzenie śródbłonna	p_{48}	ROS
p_{17}	NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	p_{49}	wolne rodniki
p_{18}	czynnik stymulujący kolonie makrofagów	p_{50}	kadmi
p_{19}	białko chemotaktyczne 1 monocytów	p_{51}	aldehydy
p_{20}	NO	p_{52}	metale
p_{21}	ciśnienie krwi	p_{53}	skrzep
p_{22}	agregacja płytek krwi	p_{54}	profil lipidowy
p_{23}	namnożone komórki mięśni gładkich VSMC	p_{55}	triglicerydy
p_{24}	nadtlenoazotyn	p_{56}	mniejsza ilość BH ₄
p_{25}	anionrodnik ponadtlenkowy	p_{57}	czynniki prozapalne
p_{26}	ICAM-1 (międzykomórkowa molekula adhezyjna-1)	p_{58}	makrofag
p_{27}	cząsteczki adhezyjne	p_{59}	markery stresu oksydacyjnego
p_{28}	nieaktywny monocyt	p_{60}	endotelina-1
p_{29}	aktywny monocyt	p_{61}	mniej NO
p_{30}	VECAM-1 (molekula adhezyjna-1 komórki naczyń)	p_{62}	inne zahamowane cząsteczki
p_{31}	kompleks VECAM-1 i monocyt	p_{63}	BH ₄

TABELA 3.2: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji (patrz [30]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_0	uszkodzenie powodowane przez LDL	t_{48}	prolifracja
t_1	sekrecja chemokin przez uszkodzony śródbłonek	t_{49}	inne mechanizmy angażujące cytokiny
t_2	utrzymanie zdrowego śródbłonna	t_{50}	sekrecja kolagenu i macierzy glikoproteinowej przez namnożone VSMC
t_3	źródło LDL	t_{51}	tworzenie czapeczki włóknistej przez kolagen i macierz glikoproteinową
t_4	źródło wysokiego ciśnienia krwi	t_{52}	inne mechanizmy na które wpływa namnożenie komórek mięśni gładkich VSMC
t_5	źródło toksyn	t_{53}	inne mechanizmy angażujące VECAM-1
t_6	źródło innych czynników	t_{54}	wybuch tlenowy
t_7	ekspresja białek VECAM-1 przez uszkodzony śródbłonek	t_{55}	stymulowanie czynnika wzrostu
t_8	hamowanie eNOS przez uszkodzony śródbłonek	t_{56}	źródło dymu tytoniowego

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_9	sekrecja eNOS przez zdrowy śródbłonek	t_{57}	wydzielanie kadmu, metali, wolnych rodników, aldehydów, policykliczne węglowodory aromatyczne przez dym papierosowy
t_{10}	zahamowanie eNOS przez ADMA	t_{58}	bezpośrednie uszkodzenie powodowane dymem, prowadzące do dysplazji włóknisto-mięśniowej
t_{11}	źródło ADMA	t_{59}	remodelowanie tkanki
t_{12}	źródło iNOS	t_{60}	uszkodzenie wywołane przez FMD powodujące uszkodzenie śródbłonna
t_{13}	źródło nNOS	t_{61}	źródło ROS
t_{14}	synteza NO	t_{62}	ekspresja cząsteczek adhezyjnych przez oxLDL (utleniony LDL)
t_{15}	źródło NADPH	t_{63}	ekspresja ICAM-1 przez oxLDL
t_{16}	źródło O_2	t_{64}	inne mechanizmy angażujące czynnik stymulujący kolonie makrofagów
t_{17}	źródło L-argininy	t_{65}	inne mechanizmy angażujące białko chemotaktyczne 1 monocytów
t_{18}	zahamowanie L-argininy przez L-NMMA	t_{66}	stymulowanie czynnika stymulującego kolonie makrofagów i białka chemotaktycznego 1 monocytów przez oxLDL
t_{19}	źródło L-NMMA	t_{67}	ekspresja cząsteczek adhezyjnych przez kadm
t_{20}	źródło chemokin	t_{68}	wzrost ilości ROS przez aldehydy
t_{21}	reakcje angażujące cytrulinę	t_{69}	stymulowanie oksydacji przez wolne rodniki
t_{22}	reakcje wykorzystujące NADP	t_{70}	stymulowanie oksydacji przez metale
t_{23}	wysoka ilość NO	t_{71}	stymulowanie namnażania VSMC przez ICAM-1
t_{24}	regulacja ciśnienia krwi przez NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	t_{72}	stymulowanie namnażania VSMC przez cząsteczki adhezyjne
t_{25}	hamowanie agregacji płytek krwi, namnażania VSMC oraz innych cząsteczek przez NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	t_{73}	stymulowanie wybuchu tlenowego
t_{26}	zahamowanie cząsteczek adhezyjnych przez NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	t_{74}	modyfikacja profilu lipidowego powodowana dymem papierosowym
t_{27}	inne mechanizmy związane na które wpływ ma ciśnienie krwi	t_{75}	wzrost LDL i triglicerydów powodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_{28}	prolifracja VSMC	t_{76}	inne reakcje wykorzystujące triglicerydy
t_{29}	niska ilość NO	t_{77}	spadek ilości BH_4 powodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_{30}	wysoka ilość anionrodnika ponadtlennkowego	t_{78}	rozwój środowiska zapalnego
t_{31}	redukcja z NO i anionrodnika ponadtlennkowego do nadtlenoazotynu	t_{79}	wzrost ilości markerów stresu oksydacyjnego, białych krwinek krwi, namnażania VSMC, endoteliny-1 spowodowany dymem tytoniowym
t_{32}	zahamowanie oksydacji oxLDL przez redukcję do nadtlenoazotynu	t_{80}	stymulowanie makrofagów przez rozwój środowiska zapalnego
t_{33}	oksydacja LDL	t_{81}	inne mechanizmy angażujące markery stresu oksydacyjnego
t_{34}	źródło anionrodnika ponadtlennkowego	t_{82}	tworzenie blaszki miażdżycowej przez białe krwinki krwi
t_{35}	aktywacja monocytu	t_{83}	tworzenie blaszki miażdżycowej przez LDL
t_{36}	inaktywacja monocytu	t_{84}	uszkodzenie śródbłonna powodowane endoteliną-1
t_{37}	adhezja monocytu	t_{85}	stymulowanie chemokin przez białko chemotaktyczne 1 monocytów
t_{38}	transformacja do makrofaga	t_{86}	inne mechanizmy
t_{39}	wychwył oxLDL przez makrofagi	t_{87}	wzrost powinowactwa eNOS do L-argininy

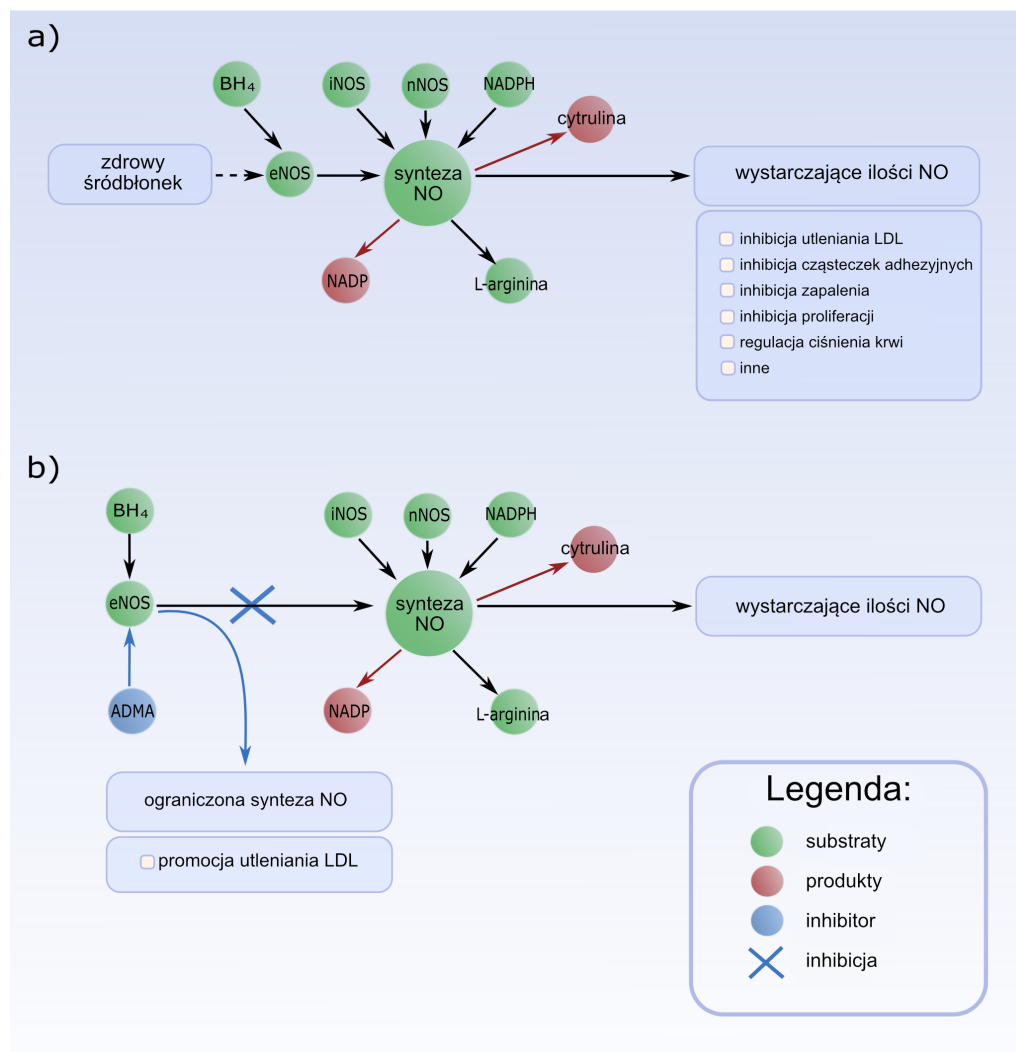
ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{40}	sekrecja cytokin i czynnika wzrostu przez makrofagi	t_{88}	zahamowanie kofaktora BH ₄
t_{41}	źródło nieaktywnych monocytów	t_{89}	źródło kofaktora BH ₄
t_{42}	rozpad komórek piankowatych	t_{90}	spadek NO powodowany małą ilością BH ₄
t_{43}	tworzenie się blaszki miażdżycowej	t_{91}	uszkodzenie śródbłonka powodowane wysokim ciśnieniem krwi
t_{44}	pęknięcie blaszki miażdżycowej	t_{92}	uszkodzenie śródbłonka powodowane toksynami
t_{45}	aktywacja płytek krwi	t_{93}	uszkodzenie śródbłonka powodowane innymi czynnikami
t_{46}	zablokowanie wieńcowych naczyń krwionośnych	t_{94}	indukowanie chemokin przez policykliczne węglowodory aromatyczne
t_{47}	progresja miażdżycy		

W Tabeli 3.2 zawierającej nazwy tranzykcji, często pojawiają się opisy rozpoczynające się wyrażeniami: *inne mechanizmy angażujące* lub *inne reakcje wykorzystujące*. Takie tranzykcje są najczęściej tranzykcjami wyjściowymi modelu, pozwalającymi zachować własność pokrycia sieci.

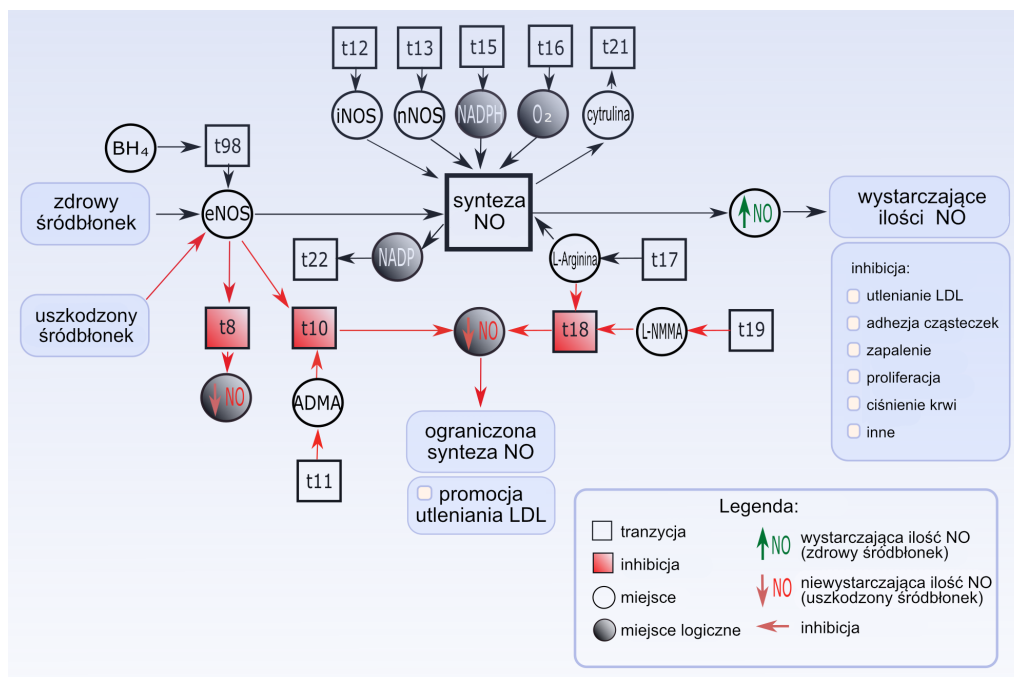
Zaprezentowany model, jako swoiste przybliżenie rzeczywistości, zawiera pewne uproszczenia wynikające zarówno ze stosowanej metodologii, jak i ograniczeń bezpośrednio związanych z ilością dostępnych danych. Pierwsze z nich, ograniczenie metodologiczne, związane jest z reakcjami hamującymi, takimi które z definicji zmniejszają ilość konkretnych komponentów, spowalniają pewne reakcje, czy też takimi które mogłyby prowadzić do degradacji białek lub śmierci komórek. Narzędzia do modelowania sieci Petriego dysponują łukami hamującymi, jednak tego typu łuki nie są uwzględniane w matematycznej reprezentacji modelu (macierzy incydencji), a więc nie są uwzględniane w analizach opartych o t-niezmienniki. Jak wspomniano we wcześniejszym rozdziale, metody przyjmujące za podstawę t-niezmienniki stanowią filar klasycznych metod analizy. W związku z powyższym, przyjęto uproszczenie, zgodnie z którym utworzono tranzykcje o nazwie *hamowanie* i za ich pośrednictwem zamodelowano mechanizmy będące konsekwencją tego hamowania. Oznacza to, że w takiej sieci Petriego stworzone zostały dwa scenariusze dla konkretnej reakcji; jeden dotyczący sytuacji, w której reakcja jest poprawnie stymulowana oraz drugi, dotyczący sytuacji, w której reakcja jest hamowana, uwzględniając całą kaskadę następujących zależności. Drugie ograniczenie, powszechne w modelowaniu procesów biologicznych, dotyczy braków dokładnych danych. Z tego względu pojawiają się tranzykcje o nazwach *wzrost*, *spadek* oraz miejsca zawierające w nazwach informacje o ilościach: *mniej*, *więcej*. Przykład obu tych ograniczeń zobrazowano na Rysunku 3.2 oraz Rysunku 3.3.

Rysunek 3.2 przedstawia dwa schematy: pierwszy z nich oznaczony jako a) ukazuje poprawną syntezę tlenku azotu (która w efekcie umożliwia zahamowanie szkodliwych procesów) oraz schemat b) przedstawiający zahamowanie syntezy tlenku azotu, a w efekcie promowanie szkodliwych mechanizmów. Obie te sytuacje są zamodelowane w zaproponowanym modelu sieci Petriego, co uwidoczniło na Rysunku 3.3. Na Rysunku 3.3 synteza tlenku azotu oznaczona została zielonymi łukami, podczas gdy jej hamowanie oznaczone zostało czerwonymi łukami. Tranzykcje przyjęły symbole z numerami, które mogą być tranzykcjami wejściowymi lub wyjściowymi. Pierwsze z wymienionych, tranzykcje wejściowe, odpowiadają reakcjom produkcji konkretnych pasywnych komponentów, podczas gdy tranzykcje wyjściowe odpowiadają dalszym reakcjom, które nie są istotne dla zamodelowanego procesu, ale zapewniają jego pokrycie (patrz paragraf 2.2.1 rozdziału 2). Łuki oznaczone na zielono na Rysunku 3.3 związane są z pozytywną rolą tlenku azotu, czyli z sytuacją, gdy ilość NO jest wystarczająca do prawidłowego działania. Rozważając sytuacje w pojedynczych krokach, tranzykcja nazwana jako *synteza NO* może zostać uruchomiona, gdy co najmniej jeden token znajdzie się w każdym miejscu bezpośrednio poprzedzającym tę tranzykcję (*eNOS*, *iNOS*,

nNOS, *NADPH*, O_2 , *L-arginina*). Gdy tranzycja *synteza NO* jest aktywna, umożliwia przepływ tokenów do miejsc bezpośrednio następujących po tej tranzycji ($\uparrow NO$) – prowadząc do prawidłowej produkcji NO. Jeśli rozważymy sytuację, w której łuki na Rysunku 3.3 oznaczone są na czerwono, to zwrócimy uwagę na jedną z możliwych sytuacji prowadzących do zmniejszenia biodostępności NO, czyli sytuacji w której niewystarczająca ilość NO prowadzi do promowania szkodliwych procesów. Podobnie jak wyżej można przeanalizować przepływ tokenów; jeśli co najmniej jeden token znajduje się w miejscu nazwanym *L-NMMA* (inhibitor *L-argininy*) i miejscu *L-arginina*, to możliwe jest uruchomienie tranzycji określonej jako *hamowanie L-argininy przez L-NMMA*. Aktywacja tej tranzycji ogranicza syntezę tlenku azotu, gdyż ta nie może zajść bez dostępności *L-argininy*.



RYSUNEK 3.2: Schemat ukazujący rozwiązanie dla ograniczenia metodologicznego dotyczącego łuków hamujących jak i braków dokładnych danych na przykładzie syntezy tlenku azotu a) i jej hamowania b). Rysunek uwzględnia mechanizmy, na które ma wpływ biodostępność NO. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [98].



RYСУNEK 3.3: Fragment sieci Petriego ukazujący rozwiązanie dla ograniczenia metodologicznego dotyczącego luk hamujących, jak i braków dokładnych danych na przykładzie syntezy tlenku azotu i jej hamowania. Rysunek ten przedstawia dwie sytuacje prowadzące do uzyskania dwóch różnych scenariuszy: do osiągnięcia efektów pożądanych, gdy ilość tlenku azotu jest wystarczająca ($\uparrow NO$) lub do zaobserwowania efektów szkodliwych, gdy ilość tlenku azotu jest ograniczona ($\downarrow NO$, odpowiadający nazwie miejsca – *mniej NO*). Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [98]. Jednak podobny przykład znajduje się także w artykule konferencyjnym, przedstawiającym podejście systemowe do modelowania systemów biologicznych na przykładzie uogólnionego modelu progresji miażdżycy [99]. Ponadto, więcej przykładów reakcji hamujących znajduje się w pracy [30], która stała się podstawą tego podrozdziału.

3.2.3 Analiza i wyniki

Analiza modelu omówionego w tej części pracy obejmuje analizę zbiorów MCT oraz analizę t-niezmienników, których formalne definicje opisano w podrozdziale 2.2.

Zaproponowany model uszkodzeń śródbłonna zawiera 19 nietrywialnych zbiorów MCT zebranych w Tabeli 3.3. Tabela ta podzielona została na trzy kolumny: *ID* – zawierająca identyfikatory kolejnych zbiorów MCT, *Zawarte tranzycje* – składająca się z tranzycji należących do poszczególnych zbiorów MCT, *Znaczenie biologiczne* – kolumna w której sens biologiczny przypisano do odpowiednich zbiorów MCT po uprzedniej analizie zawartych w nich procesów elementarnych.

TABELA 3.3: Lista nietrywialnych zbiorów MCT – zbiorów składających się z co najmniej dwóch tranzycji należących do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników (Tabela pochodzi z artykułu konferencyjnego [30]).

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	$t_{12}, t_{13}, t_{14}, t_{21}, t_{29}$	Synteza tlenku azotu
m_2	$t_{39}, t_{42}, t_{43}, t_{50}, t_{51}$	Niepożądane działanie makrofagów: wychwyt dużej ilości utlenionych LDL w efekcie rozpad komórek i tworzenie się blaszki miażdżycowej.
m_3	$t_{57}, t_{67}, t_{68}, t_{70}, t_{94}$	Wydzielanie z dymu papierosowego substancji takich jak kadm, wolne rodniki, aldehydy oraz policykliczne węglowodory aromatyczne. Kadm indukuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych, aldehydy zwiększają liczbę reaktywnych form tlenu co ma swoje następstwa w wybuchu tlenowym, z kolei metale stymulują oksydację, a węglowodory uwalniają chemokiny. Zatem dym papierosowy ma bardzo duży udział w utlenianiu LDL i rozwoju mikrośrodowiska zapalnego.
m_4	$t_{44}, t_{45}, t_{46}, t_{47}$	Proces miażdżycowy: tworzenie się blaszki miażdżycowej, aktywacja płytek krwi - co wpływa na zwężenie wieńcowych naczyń krwionośnych,

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_5	$t_{79}, t_{81}, t_{82}, t_{84}$	Dym papierosowy ma wpływ na wzrost ilości markerów stresu oksydacyjnego, leukocytów, namnażania VSMC, enoteliny-1, co z kolei stymuluje tworzenie blaszki miażdżycowej i uszkodzenie śródbłonka.
m_6	t_{15}, t_{16}, t_{22}	Substraty NADPH i O_2 oraz produkt NADP zaangażowane w proces syntezy tlenku azotu i wybuch tlenowy.
m_7	t_{25}, t_{28}, t_{86}	Hamowanie wielu szkodliwych procesów w sytuacji, gdy śródbłonek jest zdrowy i dochodzi do syntezy wystarczającej ilości NO.
m_8	t_{30}, t_{31}, t_{32}	Hamowanie oksydacji LDL w wyniku redukcji anionrodnika ponadtlenowego i NO do nadtlenoazotynu. Taka redukcja zmniejsza ilość anionrodnika wymaganego do utlenienia LDL.
m_9	t_4, t_{91}	Uszkodzenie śródbłonka spowodowane wysokim ciśnieniem krwi.
m_{10}	t_5, t_{92}	Uszkodzenie śródbłonka spowodowane toksynami.
m_{11}	t_6, t_{93}	Uszkodzenia śródbłonka spowodowane innymi czynnikami.
m_{12}	t_{10}, t_{11}	Hamowanie syntazy tlenku azotu eNOS przez inhibitor ADMA co wpływa na ograniczenie produkowanej ilości NO.
m_{13}	t_{18}, t_{19}	Wpływ L-argininy na syntezę NO oraz zahamowanie L-argininy przez inhibitor L-NMMA.
m_{14}	t_{24}, t_{27}	Regulacja ciśnienia krwi w sytuacji, gdy śródbłonek nie jest uszkodzony i produkowana ilość NO jest wystarczająca.
m_{15}	t_{37}, t_{38}	Adhezja monocytu do białka VECAM-1, stymuluje utworzenie kompleksu, który może przejść transformację do makrofaga.
m_{16}	t_{63}, t_{71}	Utlenione LDL (oxLDL) mają wpływ na ekspresję białek ICAM-1, które stymulują proliferację komórek mięśni gładkich VSMC.
m_{17}	t_{75}, t_{76}	Wzrost ilości LDL i trójglicerydów powodowany modyfikacją profilu lipidowego.
m_{18}	t_{77}, t_{90}	Spadek stężenia BH_4 (powodowany modyfikacją profilu lipidowego) wpływa na ilość produkowanego NO ze względu na to, że jest kofaktorem syntazy tlenku azotu eNOS.
m_{19}	t_{78}, t_{80}	Stymulowanie makrofagów przez rozwój mikrośrodowiska zapalnego będącego wynikiem palenia papierosów.

Powyższa analiza pozwoliła na identyfikację 19 nietrywialnych, funkcjonalnych bloków, które charakteryzują model uszkodzeń śródbłonka. Chcąc jednak określić, które podprocesy mogą być kluczowe dla funkcjonowania badanego zjawiska, przeprowadzono analizę t-klastrów.

Analiza t-klastrów pozwala na zgromadzenie podobnych względem siebie t-niezmienników. Podprocesy odpowiadające tym t-niezmiennikom mogą być od siebie zależne. Dlatego też dla każdego skupienia określa się znaczenie biologiczne, co często pozwala nakierować dalsze analizy na konkretne podprocesy lub wyróżnić podprocesy, które wydają się ważniejsze od nich w kontekście funkcjonowania całego modelu. Zaproponowany model jest pokryty przez 8481 t-niezmienników. Docelowa liczba t-klastrów (klastrów t-niezmienników) zależy ściśle od natury analizowanego systemu. Dla zaproponowanego modelu do analizy wybrano 20 klastrów, które uzyskano stosując algorytm klastrowania oparty na metodzie średniego wiązania, przy czym zastosowano nieskupioną miarę dystansu Pearsona. Wyboru najlepszego klastrowania dokonano w oparciu o indeks MSS, podczas gdy wybór liczby t-klastrów została oparty o współczynnik Calińskiego-Harabasa. Zidentyfikowane t-klastry przedstawiono w Tabeli 3.4, która została podzielona na dwie kolumny: *ID* – kolumna zawierająca kolejne identyfikatory t-klastrów oraz kolumna *Interpretacja biologiczna* – zawierająca opis znaczenia biologicznego dla danego klastra.

TABELA 3.4: Lista t-klastrów – skupień składających się z podobnych do siebie t-niezmienników (Tabela pochodzi z artykułu konferencyjnego [30]).

ID	Interpretacja biologiczna	ID	Interpretacja biologiczna
c ₁	Odpowiedź uszkodzonego śródbłonna - chemokiny indukują monocyty, które w następstwie przejdą transformację do makrofaga.	c ₁₁	Palenie powoduje wzrost ilości wielu szkodliwych czynników wywołujących odpowiedź zapalną uszkodzonego śródbłonna oraz dodatkowo stymulujących zapalenie przez indukowanie makrofagów i proliferacji, a w konsekwencji wpływając na rozwój miażdżycy.
c ₂	Bezpośrednie uszkodzenie śródbłonna powodowane przez dysplazję włóknisto-mięśniową (FMD), co prowadzi do remodelowania tkanki.	c ₁₂	Uszkodzenia śródbłonna powodowane paleniem oraz innymi czynnikami, stymulujące wszystkie opisane w modelu mechanizmy. Bez uwzględnienia szkodliwego działania makrofagów stymulującego rozwój miażdżycy i kilku mechanizmów hamowania w przypadku wystarczającej ilości NO.
c ₃	Spadek kofaktora BH ₄ (spowodowany dymem papierosowym) hamuje syntezę NO. W efekcie jest mniejsza ilość NO i wyższa ilość anionrodnika ponadtlenkowego co wpływa na ograniczenie hamowania oksydacji LDL.	c ₁₃	Uszkodzenia śródbłonna powodowane paleniem oraz innymi czynnikami, stymulują wszystkie opisane w modelu mechanizmy.
c ₄	Uszkodzenie śródbłonna powodowane zwiększeniem ilości LDL oraz modyfikowanie profilu lipidowego ma wpływ na proces tworzenia się blaszki miażdżycowej i w następstwie prowadzi do rozwoju miażdżycy.	c ₁₄	Uszkodzenia śródbłonna oraz inne czynniki (ADMA, L-NMMA) wpływające na zahamowanie syntezy NO. W klastrze umieszczone są dwa przeciwstawne procesy: pierwszy prowadzący do zmniejszenia ilości NO, a drugi do zahamowania wielu szkodliwych mechanizmów. Można zatem powiedzieć, że niezależnie od pojawienia się inhibitorów, funkcje NO zostają zachowane jednak mogą mieć znacznie mniejszy efekt.
c ₅	Uszkodzenie śródbłonna powodowane wysokim ciśnieniem tętniczym krwi stymuluje odpowiedź uszkodzonego śródbłonna.	c ₁₅	Uszkodzenia śródbłonna powodowane paleniem oraz innymi czynnikami, stymulują wszystkie opisane w modelu mechanizmy.
c ₆	Uszkodzenie śródbłonna powodowane toksynami stymuluje jego odpowiedź zapalną.	c ₁₆	Odpowiedź zapalna śródbłonna powodowana uszkodzeniem przez wysoki poziom LDL oraz oksydacja LDL stymulująca białko chemotaktyczne 1 monocytów i czynnik stymulujący kolonie makrofagów (stymulowanie zapalenia).
c ₇	Uszkodzenie śródbłonna powodowane innymi czynnikami stymuluje jego odpowiedź.	c ₁₇	Uszkodzenia śródbłonna oraz rozwój zapalenia powodowany paleniem stymulują odpowiedź zapalną uszkodzonego śródbłonna i wpływają na znaczny rozwój miażdżycy z uwzględnieniem procesu utlenienia LDL.
c ₈	Bezpośrednie uszkodzenie śródbłonna powodowane przez dysplazję włóknisto-mięśniową, co prowadzi do remodelowania tkanki i odpowiedzi zapalnej uszkodzonego śródbłonna.	c ₁₈	Rozwój miażdżycy stymulowany uszkodzeniami śródbłonna, ale przede wszystkim rozwojem zapalenia na skutek palenia. W dużej mierze zaangażowane jest utlenianie LDL oraz stres oksydacyjny.
c ₉	Wzrost ilości LDL i triglicerydów powodowany modyfikacją profilu lipidowego, prowadzi do uszkodzenia śródbłonna i wywołania jego odpowiedzi zapalnej.	c ₁₉	Oksydacja LDL, wpływa na ekspresję molekuł adhezyjnych oraz białek ICAM-1 i VECAM, które stymulują proliferację komórek mięśni gładkich.

ID	Interpretacja biologiczna	ID	Interpretacja biologiczna
c ₁₀	Stymulowanie proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń, przez tworzenie się kompleksu VECAM-1 i aktywnego monocytu, który ulega transformacji do makrofaga i wydziela cytokiny oraz czynniki wzrostu. Dodatkowo uwzględnione zostało hamowanie tego mechanizmu w sytuacji, gdy śródbłonek jest zdrowy, a ilość syntezowanego NO jest prawidłowa.	c ₂₀	Rozwój miażdżycy stymulowany uszkodzeniami śródbłonna, ale przede wszystkim rozwojem zapalenia na skutek palenia. W dużej mierze zaangażowane jest utlenianie LDL oraz stres oksydacyjny.

Na podstawie interpretacji biologicznej zawartej w Tabeli 3.4 można potwierdzić, że stres oksydacyjny i proces zapalny stanowią kluczowe zjawiska leżące u podłoża dysfunkcji śródbłonna. Efektem działania obu tych podprocesów jest nadmierne wydzielanie się reaktywnych form tlenu, co powoduje zwiększenie ilości utlenionych lipoprotein o małej gęstości, w kaskadzie następstw prowadzi do niekorzystnego działania tlenu azotu (poprzez zmniejszenie jego biodostępności), aby ostatecznie promować rozwój miażdżycy. To jak szeroka i zawiła jest sieć wpływów wymienionych podprocesów prezentuje analiza t-klastrów – procesy zapalne oraz stres oksydacyjny zaangażowane są w niemal wszystkie podprocesy opisane w wynikach analizy t-klastrów w Tabeli 3.4.

3.2.4 Konkluzje

Zaproponowany model uszkodzeń śródbłonna naczyniowego, będący jedną z fundamentalnych przyczyn powstawania blaszki miażdżycowej, rzuca światło na złożoność i dynamiczność zjawiska biologicznego, jakim jest miażdżycy. Dynamika ta wynika z uwikłania wielu czynników i podprocesów, które uzależnione są od zmian ilościowych i jakościowych innych czynników. Zaproponowany model interakcji oraz jego analiza za pomocą wybranych klasycznych metod (analiza zbiorów MCT oraz analiza t-klastrów) pozwala uporządkować i zrozumieć niektóre procesy leżące u rozwoju miażdżycy. Uwidacznia, że kluczową rolę w rozwoju tej choroby odgrywa proces zapalny i stres oksydacyjny. Wyniki te nie są odkrywcze, są jawnym odzwierciedleniem znanej wiedzy dostępnej w literaturze. Niemniej jednak potwierdzają one istotność wyróżnionych podprocesów, a więc ukazują zasadność korzystania z klasycznych metod analizy, aby poznać naturę badanego zjawiska i zidentyfikować potencjalne znaczące podprocesy. Opisana w tym podrozdziale praca stała się załącznikiem dla dalszych badań, mających na celu jeszcze głębsze zrozumienie badanego procesu z nadzieją na znalezienie istotnych, nieznanych właściwości.

3.3 Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonna i rozwój miażdżycy

Celem badań opisanych w tym podrozdziale jest przedstawienie zaproponowanego modelu wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonna i rozwój miażdżycy, jako rozszerzenie modelu opisanego w podrozdziale 3.2. Utworzony model obejmuje wybrane aspekty oddziaływania dymu tytoniowego. Analizę tego modelu przeprowadzono za pomocą znanych, klasycznych metod analizy. Na podstawie uzyskanych wyników oceniono możliwości zastosowanych metod.

3.3.1 Tło biologiczne

Zaproponowany w tym podrozdziale model jest bezpośrednim rozszerzeniem modelu opisanego w poprzednim podrozdziale, a zatem w obecnym paragrafie opisano tylko ten kontekst biologiczny, który dotyczy samych rozszerzeń. Wobec tego paragraf 3.2.1 opisujący tło biologiczne modelu

uszkodzeń śródbłonna jest podstawą również dla modelu wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonna i rozwój miażdżycy.

Dodatkowe biologiczne aspekty zamodelowane w tej pracy zostały podzielone na następujące mechanizmy:

1. Dysfunkcja śródbłonna

Inicjacja dysfunkcji śródbłonna związana jest z występowaniem różnych czynników, które mogą mieć bezpośredni lub pośredni wpływ na badane zjawisko, palenie papierosów jest jednym z nich [93, 144, 192]. Pośrednie uszkodzenia śródbłonna wywołane paleniem papierosów rozumiane są m.in. jako: zmniejszona ilość tetrahydrobiopteryny (BH_4) – będącej kofaktorem syntezy tlenu azotu, zwiększona ilość LDL, reaktywnych form tlenu, innych wolnych rodników oraz metali. Odpowiedź zapalna uszkodzonego śródbłonna oraz mechanizmy obronne zostały opisane w poprzednim podrozdziale, w paragrafie 3.2.1.

2. Rola tlenu azotu

Tlenek azotu bierze udział w wielu procesach komórkowych (patrz paragraf 3.2.1). Przede wszystkim odgrywa kluczową rolę w chorobach sercowo naczyniowych, gdzie istotne funkcje pełnią mechanizmy biochemiczne i molekularne regulujące biodostępność NO. Mechanizmy te mogą zmieniać stężenie tlenu azotu, powodując przeciwstawne działanie NO wykazujące efekt pozytywny lub negatywny. Ograniczenie dostępności NO przez upośledzenie mechanizmów, sprzyja promowaniu miażdżycy [93, 192, 200, 247, 303]. W literaturze pojawiają się dowody, iż kolejnym źródłem prowadzącym do zmniejszenia biodostępności NO jest dym tytoniowy [93, 144, 192, 200].

3. Wpływ palenia papierosów – mechanizmy powiązane

Palenie papierosów jest jednym z głównych czynników ryzyka, odgrywającym ważną rolę w wielu szkodliwych procesach. Zaproponowany model oparty o sieci Petriego obejmuje wybrane aspekty, są to m.in. modyfikacje profilu lipidowego, promocja stanu prozakrzepowego oraz tworzenie zakrzepów.

Palenie papierosów powoduje uwalnianie różnych substancji w tym m.in. kadmu, metali, wolnych rodników, nikotyny, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych czy aldehydów. Wymienione substancje zaangażowane są w różne mechanizmy, wśród nich znajdują się: dysfunkcja śródbłonna, procesy zapalne, stres oksydacyjny, wybuchy tlenowe czy utlenianie LDL – procesy mające istotny wpływ na rozwój miażdżycy. Widocznie zwiększona u palaczy ilość ROS, wolnych rodników i metali stymuluje utlenianie LDL, co skutkuje zmniejszeniem biodostępności NO [144, 192, 200]. Ponadto nikotyna, katecholamina, CO_2 prowadzą do zwiększenia lepkości krwi, co sprzyja powstawaniu zakrzepów. Obok tego, procesy takie jak wzrost i aktywacja płytek krwi, zwiększona ilość fibrynogenu, czynnika tkankowego, inhibitora aktywatora plazminogenu-1, zmniejszona ilość aktywatora plazminogenu i inne pozostałe elementy są dodatkowymi czynnikami, które mogą stymulować powstawanie zakrzepów. Do tego tromboksan A2 i prostacyklina I2 również wydzielane przez dym tytoniowy blokują naczynia wieńcowe. Wszystkie opisane procesy mają bardziej bezpośredni wpływ na progresję miażdżycy. Z drugiej strony istnieją mechanizmy oddziałujące pośrednio, takie jak stymulowanie stanu zapalnego i dysfunkcja śródbłonna. Dysfunkcja śródbłonna promowana paleniem papierosów wiąże się z modyfikacją profilu lipidowego (zmniejszona ilość HDL oraz zwiększona ilość LDL i triglicerydów) – jak powszechnie wiadomo, wysoki poziom LDL jest jedną z przy-

czyn uszkodzeń śródbłonna. Można zatem zauważyć, że dym papierosowy jest dodatkowym źródłem, które pobudza stany zapalne i wzmacnia powstawanie blaszki miażdżycowej.

3.3.2 Model

Niniejszy paragraf zawiera zaproponowany matematyczny model oparty o sieci Petriego, który został stworzony przy użyciu oprogramowania *Snoopy* [117]. Przeprowadzona analiza opiera się głównie na t-nieziemiennikach, które wyznaczono za pomocą narzędzia *Charlie* [118], a analizy wykonano za pomocą skryptów napisanych w języku R. Opisane metody analizy są jednak obecnie dostępne w programie *Holmes* [228, 230].

Zaproponowana sieć Petriego została przedstawiona na Rysunku 3.4 w postaci dwóch podsieci oznaczonych kolorowymi ramami. Pierwsza podsieć wyróżniona w zielonej ramie dotyczy podprocesów leżących u podstaw miażdżycy, są to: dysfunkcja śródbłonna, utlenianie LDL, stres oksydacyjny, dualna rola NO. Natomiast druga podsieć zawiera mechanizmy oraz substancje bezpośrednio powiązane z dymem tytoniowym, które zaangażowane są we wszelkie niepożądane mechanizmy promujące nie tylko rozwój blaszki miażdżycowej, ale także zwiększenie lepkości krwi czy powstawanie skrzepów. Nazwy pasywnych komponentów – miejsc znajdują się w Tabeli 3.5, natomiast nazwy aktywnych komponentów – tranzycji umieszczono w Tabeli 3.6. Każda z tych tabel zawiera dwie kolumny: *ID* – zawierająca identyfikator miejsca/tranzycji, oraz *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca nazwę miejsca/tranzycji określającą jej przeznaczenie w systemie. Opisany model zawiera uproszczenia związane z łukami hamującymi oraz uproszczenia ilościowe, które opisano na przykładnie modelu zawartego w poprzednim podrozdziale 3.2 w paragrafie dotyczącym modelu (3.2.2).

TABELA 3.5: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc (patrz [31]).

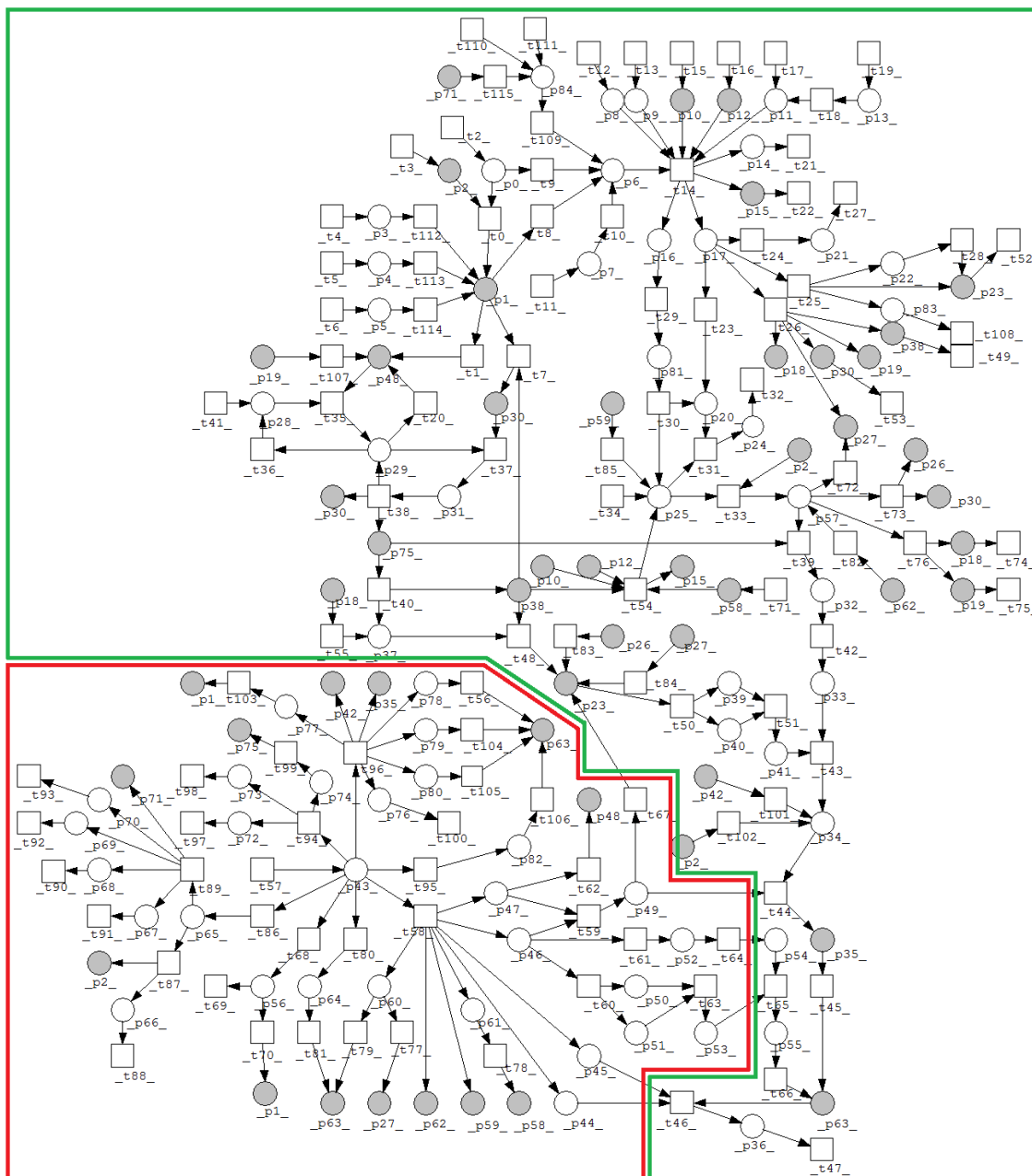
ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	zdrowy śródbłonek	p_{43}	dym tytoniowy
p_1	uszkodzony śródbłonek	p_{44}	tromboksan A2
p_2	LDL	p_{45}	prostacyklina I2
p_3	wysokie ciśnienie krwi	p_{46}	nikotyna
p_4	toksyny	p_{47}	policykliczne węglowodory aromatyczne
p_5	inne czynniki	p_{48}	chemokiny
p_6	eNOS	p_{49}	MMPs
p_7	ADMA	p_{50}	adrenalina
p_8	iNOS	p_{51}	noradrenalina
p_9	nNOS	p_{52}	katecholamina
p_{10}	NADPH	p_{53}	CO
p_{11}	L-arginina	p_{54}	receptory α
p_{12}	O ₂	p_{55}	wysoka lepkość krwi
p_{13}	L-NMMA	p_{56}	dysplazja włóknisto-mięśniowa
p_{14}	cytrulina	p_{57}	oxLDL
p_{15}	NADP	p_{58}	ROS
p_{16}	NO jeśli jest uszkodzenie śródbłonna	p_{59}	wolne rodniki
p_{17}	NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	p_{60}	kadm
p_{18}	czynnik stymulujący kolonie makrofagów	p_{61}	aldehydy
p_{19}	białko chemotaktyczne 1 monocytów	p_{62}	metale
p_{20}	NO	p_{63}	skrzep
p_{21}	ciśnienie krwi	p_{64}	płytki krwi
p_{22}	agregacja płytek krwi	p_{65}	profil lipidowy
p_{23}	namnożone komórki mięśni gładkich VSMC	p_{66}	triglicerydy
p_{24}	nadtlenoazotyn	p_{67}	HDL
p_{25}	anionrodnik ponadtlenkowy	p_{68}	FMD

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_{26}	ICAM-1	p_{69}	apolipoproteina A1
p_{27}	cząsteczki adhezyjne	p_{70}	selen
p_{28}	nieaktywny monocyt	p_{71}	mniejsza ilość BH ₄
p_{29}	aktywny monocyt	p_{72}	limfocyty
p_{30}	VCAM-1	p_{73}	neutrofile
p_{31}	kompleks VCAM-1 i monocyt	p_{74}	czynniki prozapalne
p_{32}	komórka piankowata	p_{75}	makrofag
p_{33}	rdzeń nekrotyczny	p_{76}	markery stresu oksydacyjnego
p_{34}	blaszka miażdżycowa	p_{77}	endotelina-1
p_{35}	czynnik tkankowy	p_{78}	inhibitor aktywatora plazminogenu-1
p_{36}	miażdżycyca	p_{79}	fibrynogen
p_{37}	czynnik wzrostu	p_{80}	czynnik von Willebranda
p_{38}	cytokiny	p_{81}	less NO
p_{39}	macierz glikoproteinowa	p_{82}	aktywator plazminogenu
p_{40}	kolagen	p_{83}	inne zahamowane cząsteczki
p_{41}	cząpeczka włóknista	p_{84}	BH ₄
p_{42}	białe krwinki krwi		

TABELA 3.6: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji (patrz [31]). Nazwa *tranzycja pomocnicza* została wprowadzona na potrzeby reprezentacji tranzycji wejściowych i wyjściowych, koniecznych do spełnienia warunku pokrycia sieci przez t-niezmienniki.

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_0	uszkodzenia spowodowane przez LDL	t_{58}	sekrecja spowodowana dymem tytoniowym
t_1	wydzielanie spowodowane uszkodzonym śródbłonkiem	t_{59}	aktywacja spowodowana nikotyną i policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi
t_2	tranzycja pomocnicza	t_{60}	uwalnianie spowodowane przez nikotynę
t_3	tranzycja pomocnicza	t_{61}	indukowanie przez nikotynę
t_4	tranzycja pomocnicza	t_{62}	indukowanie przez policykliczne węglowodory aromatyczne
t_5	tranzycja pomocnicza	t_{63}	spadek O ₂ oraz wzrost CO
t_6	tranzycja pomocnicza	t_{64}	aktywacja spowodowana katecholaminą
t_7	ekspresja spowodowana uszkodzonym śródbłonkiem	t_{65}	zwiększenie lepkości krwi
t_8	hamowanie eNOS spowodowane uszkodzeniem śródbłonna	t_{66}	stymulacja spowodowana przez wysoką lepkość krwi
t_9	wydzielanie spowodowane zdrowym śródbłonkiem	t_{67}	stymulacja przez MMPs
t_{10}	hamowanie eNOS spowodowane przez ADMA	t_{68}	bezpośrednie szkody spowodowane przez dymem tytoniowym
t_{11}	tranzycja pomocnicza	t_{69}	przebudowa tkanki
t_{12}	tranzycja pomocnicza	t_{70}	szkody wywołane przez FMD
t_{13}	tranzycja pomocnicza	t_{71}	tranzycja pomocnicza
t_{14}	synteza NO	t_{72}	ekspresja cząsteczek adhezyjnych przez oxLDL
t_{15}	tranzycja pomocnicza	t_{73}	ekspresja spowodowana oxLDL
t_{16}	tranzycja pomocnicza	t_{74}	tranzycja pomocnicza
t_{17}	tranzycja pomocnicza	t_{75}	tranzycja pomocnicza
t_{18}	hamowanie powodowane przez L-NMMA	t_{76}	stymulacja spowodowana oxLDL
t_{19}	tranzycja pomocnicza	t_{77}	wydzielanie przez kadm
t_{20}	tranzycja pomocnicza	t_{78}	wzrost powodowany przez aldehydy
t_{21}	tranzycja pomocnicza	t_{79}	rola w śmierci komórek śródbłonna
t_{22}	tranzycja pomocnicza	t_{80}	wzrost i aktywacja wywołana dymem tytoniowym
t_{23}	dużo NO	t_{81}	stany prozakrzepowe spowodowane przez wzrost płytek krwi

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{24}	pozytywna regulacja przez NO (przy zdrowym śródbłonku)	t_{82}	stymulowanie oksydacji przez metale
t_{25}	hamowanie namnożonych komórek przez NO (przy zdrowym śródbłonku)	t_{83}	stymulowanie przez ICAM-1
t_{26}	hamowanie cząsteczek adhezyjnych	t_{84}	stymulowanie przez cząsteczki adhezyjne
t_{27}	tranzycja pomocnicza	t_{85}	stymulowanie wybuchu tlenowego
t_{28}	tranzycja pomocnicza	t_{86}	modyfikacje powodowane dymem tytoniowym
t_{29}	mało NO	t_{87}	wzrost spowodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_{30}	duża ilość anionorodnika ponadtlenkowego	t_{88}	tranzycja pomocnicza
t_{31}	redukcja	t_{89}	spadek spowodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_{32}	hamowanie oxLDL	t_{90}	przebudowa tkanek spowodowana FMD
t_{33}	oksydacja	t_{91}	tranzycja pomocnicza
t_{34}	tranzycja pomocnicza	t_{92}	tranzycja pomocnicza
t_{35}	tranzycja pomocnicza	t_{93}	tranzycja pomocnicza
t_{36}	tranzycja pomocnicza	t_{94}	wzrost spowodowany rozwojem środowiska zapalnego
t_{37}	adhezja monocytów	t_{95}	spadek spowodowany dymem tytoniowym
t_{38}	transformacja	t_{96}	wzrost spowodowany dymem tytoniowym
t_{39}	wychwył	t_{97}	tranzycja pomocnicza
t_{40}	wydzielanie przez makrofagi	t_{98}	tranzycja pomocnicza
t_{41}	tranzycja pomocnicza	t_{99}	stymulowanie przez środowisko zapalne
t_{42}	destrukcja komórek piankowatych	t_{100}	tranzycja pomocnicza
t_{43}	tworzenie blaszki miażdżycowej składającej się z rdzenia nekrotycznego i czapeczki włóknistej	t_{101}	tworzenie się spowodowane przez białe krwinki
t_{44}	pęknięcie blaszki miażdżycowej	t_{102}	tworzenie spowodowane LDL
t_{45}	aktywacja płytek krwi	t_{103}	uszkodzenia spowodowane przez endotelinę-1
t_{46}	blokada naczyń wieńcowych	t_{104}	stany protrombotyczne promowane przez fibrynogen
t_{47}	tranzycja pomocnicza	t_{105}	stany protrombotyczne promowane przez czynnik von Willebranda
t_{48}	prolifracja spowodowana czynnikiem wzrostu i cytokinami	t_{106}	stany protrombotyczne promowane przez aktywator plazminogenu
t_{49}	tranzycja pomocnicza	t_{107}	stymulowanie chemokin
t_{50}	wydzielanie spowodowane przez namnożone komórki	t_{108}	tranzycja pomocnicza
t_{51}	tworzenie czapeczki włóknistej	t_{109}	zwiększenie powinowactwa eNOS do L-argininy
t_{52}	tranzycja pomocnicza	t_{110}	hamowanie BH ₄
t_{53}	tranzycja pomocnicza	t_{111}	tranzycja pomocnicza
t_{54}	wybuch tlenowy	t_{112}	uszkodzenia spowodowane wysokim ciśnieniem krwi
t_{55}	stymulowanie czynnika wzrostu	t_{113}	uszkodzenia spowodowane toksynami
t_{56}	stany prozakrzepowe wywołane przez inhibitor aktywatora plazminogenu-1	t_{114}	uszkodzenia spowodowane innymi czynnikami
t_{57}	tranzycja pomocnicza	t_{115}	hamowanie BH ₄ przez palenie



RYSUNEK 3.4: Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonna i rozwój miażdżycy, podzielono na dwie podsieci oznaczone kolorowymi ramami. Pierwsza, oznaczona zieloną ramą, obejmuje podstawę całego modelu: mechanizmy dysfunkcji śródbłonna, utleniania LDL, stresu oksydacyjnego i mechanizmy wpływające na biodostępność NO. Druga, oznaczona czerwoną ramą, dotyczy mechanizmów związanych ze szkodliwym wpływem palenia papierosów na rozwój miażdżycy, w tym wzrost lepkości krwi czy powstawanie zakrzepów. Rysunek pochodzi z pracy [31].

3.3.3 Analiza i wyniki

Analiza modelu omówionego w tej części pracy obejmuje analizę zbiorów MCT oraz analizę t-niezmienników, których formalne definicje opisano w podrozdziale 2.2

Zaproponowany model wpływu palenia na rozwój uszkodzeń śródbłonna zawiera 21 nietrywialnych zbiorów MCT zebranych w Tabeli 3.7. Tabela ta zawiera trzy kolumny, pierwsza z nich – *ID* zawiera identyfikatory kolejnych zbiorów MCT, druga – *Zawarte tranzycje* składa się z tranzycji należących do poszczególnych zbiorów MCT, natomiast trzecia – *Znaczenie biologiczne*, to kolumna, w której każdemu zbiorowi MCT nadano znaczenie biologiczne.

TABELA 3.7: Lista nietrywialnych zbiorów MCT – zbiorów składających się z co najmniej dwóch tranzycji należących do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników (patrz [31]).

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	$t_{12}, t_{13}, t_{14}, t_{15}, t_{16},$ $t_{21}, t_{22}, t_{29}, t_{30}, t_{31},$ t_{32}	Brak L-argininy powoduje spadek ilość tlenu azotu (L-arginina jest niezbędna do prawidłowej syntezy NO). Ten zbiór MCT obejmuje dwa przeciwstawne procesy: promowanie utleniania LDL i hamowanie utleniania LDL poprzez redukcję anionrodnika ponadtlenowego.
m_2	$t_{56}, t_{96}, t_{100}, t_{101}, t_{103},$ t_{104}, t_{105}	Wzrost ilości różnych pierwiastków spowodowany dymem papierosowym. Pierwiastki te mają wpływ na uszkodzenia śródbłonna i rozwój stanów prozakrzepowych, a więc stymulują powstawanie zakrzepów i sprzyjają miażdżycy.
m_3	$t_{60}, t_{61}, t_{62}, t_{63}, t_{64},$ t_{65}, t_{66}	Nikotyna indukuje katecholaminę i uwalnia adrenalinę oraz noradrenalinę, co prowadzi do zwiększenia lepkości krwi. Ten zbiór MCT zawiera stymulowanie odpowiedzi zapalnej, wywoływanej przez policykliczne węglowodory aromatyczne stymulujące chemokiny.
m_4	$t_{46}, t_{47}, t_{58}, t_{78}, t_{82},$ t_{85}	Wydzielanie aldehydów, ROS, metali, wolnych rodników, tromboksanu A2 i prostacykliny I2 – co w ogólności poprzez różne mechanizmy prowadzi do zwężenia naczyń wieńcowych.
m_5	$t_{89}, t_{90}, t_{91}, t_{92}, t_{93},$ t_{115}	Modyfikacja profilu lipidowego (spowodowana dymem tytoniowym) prowadzi do zmniejszenia ilość HDL, apolipoproteiny A1, seleniu i BH ₄ (zmniejszona ilość BH ₄ prowadzi do zahamowania syntezy NO).
m_6	$t_{39}, t_{42}, t_{43}, t_{50}, t_{51}$	Odpowiedź uszkodzonego śródbłonna – wydzielanie makrofagów i ich rola przy wychwytywaniu oxLDL. Powstawanie oraz pęknięcie komórek piankowatych w sytuacji wysokiego poziomu oxLDL jest wysoki. Co w konsekwencji prowadzi do uwolnienia rdzeń nekrotycznego i bezpośredniego rozwoju miażdżycy.
m_7	$t_{94}, t_{97}, t_{98}, t_{99}$	Rozwój stanu zapalnego wywołany dymem tytoniowym poprzez pobudzenie makrofagów do zwiększenia wydzielania cytokin.
m_8	t_{25}, t_{28}, t_{108}	Hamowanie szkodliwych mechanizmów, gdy ilość tlenu azotu jest wystarczająca (brak procesów hamujących syntezę NO).
m_9	t_4, t_{112}	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana wysokim ciśnieniem krwi.
m_{10}	t_5, t_{113}	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana toksynami.
m_{11}	t_6, t_{114}	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana innymi czynnikami.
m_{12}	t_{10}, t_{11}	Hamowanie syntezy NO przez ADMA (inhibitor eNOS).
m_{13}	t_{18}, t_{19}	Hamowanie syntezy NO przez L-NMMA (inhibitor L-argininy).
m_{14}	t_{20}, t_{41}	Odpowiedź uszkodzonego śródbłonna, rekrutacja monocytów i ich przekształcenie w makrofagi.
m_{15}	t_{24}, t_{27}	Regulacja ciśnienia krwi w przypadku prawidłowej syntezy NO.
m_{16}	t_{37}, t_{38}	Powstawanie kompleksu VCAM-1 i monocytów, prowadzący do transformacji w makrofagi.
m_{17}	t_{44}, t_{45}	Rozwojowi miażdżycy poprzez pęknięcie blaszki miażdżycowej i tworzenie się skrzepów.
m_{18}	t_{73}, t_{83}	Proliferacja VSMC stymulowana przez mechanizm utleniania LDL do oxLDL.
m_{19}	t_{80}, t_{81}	Rozwój miażdżycy poprzez wzrost i aktywację płytek krwi.
m_{20}	t_{87}, t_{88}	Zwiększona ilość LDL i triglicerydów spowodowana modyfikacją profilu lipidowego.
m_{21}	t_{95}, t_{106}	Stymulowanie stanu prozakrzepowego i tworzenie zakrzepów poprzez zmniejszona ilość aktywatora plazminogenu (wywołane dymem tytoniowym).

Powyższa analiza pozwoliła na identyfikację 21 nietrywialnych, funkcjonalnych bloków, które charakteryzują model uszkodzeń śródbłonna. Chcąc jednak określić, które podprocesy mogą być kluczowe dla funkcjonowania badanego zjawiska, przeprowadzono analizę t-klastrów dla 5344 t-niezmienników.

Dzięki analizie t-klastrów, otrzymano skupienia zawierające podobne do siebie t-niezmienniki. Podprocesy odpowiadające t-niezmiennikom będącym elementami tego samego skupienia mogą

być w jakiś sposób powiązane i wzajemnie na siebie oddziaływać. Z tego powodu analiza skupień może być kluczowa dla potwierdzenia niektórych hipotez lub odkrycia nieznanymi właściwościami modelowanego systemu, zazwyczaj jednak pozwala na zidentyfikowanie kluczowych podprocesów.

Dla zaproponowanego modelu do analizy wybrano 18 klastrów, które uzyskano dokładnie tak samo jako w rozdziale poprzednim – stosując algorytm klastrowania oparty na metodzie średniego wiązania i nieskupioną miarę dystansu Pearsona. Wyboru najlepszego klastrowania dokonano w oparciu o indeks MSS, natomiast wybór liczby t-klastrów oparto o współczynnik Calińskiego-Harabasz. Znaczenie biologiczne dla zidentyfikowanych t-klastrów przedstawiono w Tabeli 3.8, która została podzielona na dwie kolumny. Pierwsza z nich o nazwie *ID* – zawiera kolejne identyfikatory t-klastrów, druga kolumna *Interpretacja biologiczna* – zawiera opis znaczenia biologicznego dla poszczególnych klastrów.

TABELA 3.8: Lista t-klastrów – skupień składających się z podobnych do siebie t-niezmienników (patrz [31]).

ID	Interpretacja biologiczna	ID	Interpretacja biologiczna
c ₁	Odpowiedź zapalna uszkodzonego śródbłonna – adhezja monocytów, diapedeza, transformacja do makrofagów.	c ₁₀	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana wysokim poziomem LDL. LDL może ulegać utlenieniu do oxLDL, które stymulują szkodliwe mechanizmy proliferacji i adhezji cząsteczek. Klaster ten obejmuje również hamowanie adhezji i proliferacji cząsteczek, w sytuacji prawidłowej syntezy NO.
c ₂	Przebudowa tkanek spowodowana dysplazją włóknisto-mięśniową (FMD) co przekłada się na bezpośredni wpływ na dysfunkcję śródbłonna.	t ₁₁	Modyfikacja profilu lipidowego spowodowana dymem tytoniowym ma wpływ na zwiększenie ilości LDL. LDL może ulegać utlenieniu do oxLDL, które stymulują szkodliwy mechanizm proliferacji. Klaster ten obejmuje również hamowanie adhezji i proliferacji cząsteczek, w sytuacji prawidłowej syntezy NO.
c ₃	Powstawanie kompleksu VCAM-1 i monocytów, co prowadzi do transformacji do makrofagów. Makrofagi wydzielają cytokiny i czynnik wzrostu, które prowadzą do proliferacji VSMC.	c ₁₂	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana wysokim poziomem LDL. LDL może ulegać utlenieniu do oxLDL, które stymulują szkodliwy mechanizm proliferacji. Klaster ten obejmuje również hamowanie adhezji i proliferacji cząsteczek, w sytuacji prawidłowej syntezy NO.
c ₄	Wpływ dymu papierosowego na rozwój zapalenia poprzez stymulację makrofagów. Klaster ten obejmuje również szkodliwą aktywność makrofagów, która prowadzi do proliferacji.	c ₁₃	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana wysokim poziomem LDL stymuluje odpowiedź zapalną, która jest związana z utlenianiem LDL.
c ₅	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana wysokim ciśnieniem krwi wywołuje odpowiedź zapalną; wydzielanie chemokin i adhezję monocytów.	c ₁₄	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana modyfikacją profilu lipidowego u palaczy stymuluje odpowiedź zapalną, która jest związana z utlenianiem LDL
c ₆	Dysfunkcja śródbłonna wywołana przez toksyny indukuje odpowiedź zapalną; wydzielanie chemokin i adhezję monocytów.	c ₁₅	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana różnymi czynnikami stymuluje odpowiedź zapalną. Uszkodzenia te są dodatkowo stymulowane poprzez modyfikację profilu lipidowego u palaczy. Upośledzenie śródbłonna ma wpływ na oksydację LDL i zmniejszenie biodostępności NO. Z drugiej strony klaster ten ukazuje, że odpowiednie ilości NO wpływają na regulację naczyń krwionośnych i mogą hamować utlenianie LDL.

ID	Interpretacja biologiczna	ID	Interpretacja biologiczna
c ₇	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana innym czynnikiem (na przykład wysokim poziomem glukozy w cukrzycy) wywołuje odpowiedź zapalną: wydzielanie chemokin i adhezję monocytów.	c ₁₆	Ten klaster zawiera prawie wszystkie mechanizmy. Charakterystyczne procesy: wybuch tlenowy i utlenianie LDL. Oba są dodatkowo stymulowane dymem papierosowym i stymulują rozwój miażdżycy.
c ₈	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana dysplazją włóknisto-mięśniową indukuje odpowiedź zapalną: wydzielanie chemokin i adhezję monocytów.	c ₁₇	Ten klaster zawiera prawie wszystkie mechanizmy. Charakterystyczne procesy: synteza NP i mechanizmy stanu zapalnego, które są dodatkowo stymulowane przez dym tytoniowy.
c ₉	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana modyfikacją profilu lipidowego wywołuje odpowiedź zapalną: wydzielanie chemokin i adhezja monocytów.	c ₁₈	Ten klaster zawiera prawie wszystkie mechanizmy. Charakterystyczne procesy: synteza NO i mechanizmy stanu zapalnego, które są dodatkowo stymulowane przez dym tytoniowy.

Wyniki uzyskane z analizy t-klastrów potwierdzają, że stres oksydacyjny oraz proces zapalny są głównymi ścieżkami powiązаныmi z dysfunkcją śródbłonna (procesy te zostały również zidentyfikowane podczas analizy t-klastrów dla modelu opisanego w poprzednim podrozdziale 3.2). Procesy te prowadzą do zwiększonego wydzielania reaktywnych form tlenu, które z kolei prowadzą do nadmiernego utleniania LDL. Zmodyfikowany LDL związany jest ze szkodliwymi mechanizmami sprzyjającymi zmniejszeniu biodostępności tlenu azotu. Co więcej, wymienione procesy promują zwężanie się światła naczyń wieńcowych, stymulują wzrost lepkości krwi i tworzenie zakrzepów, a więc w konsekwencji bezpośrednio wpływają na progresję miażdżycy. Analiza t-klastrów podobnych t-niezmienników wykazała również znaczący wpływ palenia papierosów na rozwój i progresję miażdżycy. Oznacza to, że palenie papierosów ma zarówno bezpośredni jak i pośredni wpływ na uszkodzenia śródbłonna. Ten czynnik ryzyka wpływa na utrzymywanie się stanu zapalnego poprzez zwiększoną ilość makrofagów i cytokin. Ponadto, u palaczy obserwuje się zaburzenia w stanach prozakrzepowych, które przekładają się na powstawanie zakrzepów i zwiększenie lepkości krwi, co jak wspomniano powyżej, w sposób bardziej bezpośredni stymuluje tworzenie blaszek miażdżycowych. Obok tych wymienionych, istotnych mechanizmów, ważna jest także dualna rola tlenu azotu, który w zależności od koncentracji wpływa pozytywnie lub negatywnie na promowanie rozwoju miażdżycy. Podsumowując, analiza t-klastrów ujawniła, jak złożone i szerokie są interakcje procesu zapalnego i stresu oksydacyjnego. Oba te procesy są bezpośrednio lub pośrednio zaangażowane w prawie wszystkie mechanizmy opisane w Tabeli 3.8.

3.3.4 Konkluzje

Zaproponowany model wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonna naczyniowego i rozwój miażdżycy pozwala lepiej zrozumieć w jakim sposób dym tytoniowy – jeden z dobrze znanych czynników uszkodzeń śródbłonna – wpływa na rozwój blaszki miażdżycowej. Model obok wybranych aspektów wpływu dymu tytoniowego zawiera mechanizmy dotyczące dualnej roli tlenu azotu (wpływ różnych mechanizmów na jego biodostępność), stresu oksydacyjnego sprzyjającego utlenianiu lipoprotein o niskiej gęstości, znaczenia makrofagów i innych procesów prowadzących do promowania rozwoju i progresji miażdżycy.

Zaproponowany model oparty o sieci Petriego został przeanalizowany przy użyciu klasycznych metod takich jak analiza zbiorów MCT i analiza t-klastrów. Wyniki analizy pozwalają usystematyzować wiedzę na temat miażdżycy i jej kluczowych procesów, a także wyróżnić najbardziej istotne komponenty modelowanego systemu. Oznacza to, że zastosowane podejście systemowe potwierdza istotną rolę stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w rozwoju miażdżycy, a ponadto wykazało znaczny wpływ dymu tytoniowego, co jest zgodne z literaturą. Praca ta pozwoliła zwrócić uwagę

na promowanie stanów prozakrzepowych u palaczy. Aspekty te wydają się być interesujące w kontekście dalszych prac nad dokładnym zrozumieniem mechanizmów rozwoju i progresji miażdżycy.

3.4 Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego

Celem badań opisanych w tym podrozdziale jest przedstawienie zaproponowanego modelu wpływu wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego na rozwój miażdżycy oraz jego analiza, za pomocą znanych, klasycznych metod analizy. Poza analizą wspomnianego modelu oceniono możliwości zastosowanych metod. Jak wynika z wiedzy dostępnej w literaturze, ale także z wyników analiz dwóch poprzednich modeli opisanych w podrozdziałach 3.2 i 3.3, na powstawanie blaszki miażdżycowej wpływa wiele czynników, główne z nich to dysfunkcja śródbłonna, stany zapalne i stres oksydacyjny. Ponadto innym istotnym czynnikiem wydają się być zaburzenia hemostatyczne. W związku z tym nadrzędnym celem pracy opisanej w niniejszym podrozdziale jest bliższe poznanie zależności związanych z zaburzeniami hemostazy, ze szczególnym uwzględnieniem zewnątrzpochodnych szlaków krzepnięcia. Głównie rozważano zaburzenia w stanach prozakrzepowych wywołanych dymem tytoniowym. Jest to kontynuacja pracy i dalsze rozszerzenia wcześniejszych modeli. Zaburzenia te wraz z towarzyszącym stanem zapalnym są ściśle związane z powstawaniem zakrzepów i promocją chorób układu krążenia.

3.4.1 Tło biologiczne

Jak wielokrotnie nakreślano, miażdżycą jest chorobą głównie scharakteryzowaną przez dysfunkcjonujący śródbłonek oraz przewlekłe rozwijający się stan zapalny, który jest napędzany stresem oksydacyjnym. Obok tych mechanizmów, istotne dla rozwoju miażdżycy, jak i jej następstw klinicznych, wydają się być zaburzenia hemostazy [40]. Przypomnieć należy, że wszystkie te mechanizmy są w mniejszej lub większej mierze powiązane w szkodliwy sposób z dymem tytoniowym, który jest kluczowym modulatorem zaburzeń protrombotycznych. Można zatem powiedzieć, że miażdżycą jest przewlekłym zapaleniem naczyń krwionośnych, w którym to procesy zapalne, jak i procesy zakrzepowe, oddziałują między sobą.

1. Związek między miażdżycą a krzepnięciem krwi

Informacje na temat bezpośredniego związku między krzepnięciem a miażdżycą u ludzi nie są tak oczywiste jakby się można tego było spodziewać [166]. Podstawowa relacja między tymi złożonymi procesami rozpoczyna się w sytuacji, gdy blaszka miażdżycowa jest podatna na pęknięcie w efekcie czego krew przenika przez pękniętą płytkę do jej rdzenia i wchodzi w kontakt z czynnikiem tkankowym (TF) – głównym czynnikiem aktywującym zewnętrzny układ krzepnięcia, zwany także zewnątrzpochodnym szlakiem krzepnięcia. Wiele danych doświadczalnych wskazuje, że płytki krwi i układ krzepnięcia są ważnymi czynnikami w rozwoju miażdżycy i zakrzepicy miażdżycowej. Dzieje się tak, ponieważ płytki krwi wykazują szereg działań będących łącznikiem między hemostazą, odpornością wrodzoną a procesem zapalnym leżącym u podstaw miażdżycy.

Hemostaza obejmuje proces krzepnięcia krwi oraz fibrynolizę, procesy będące w swoistej równowadze. Ten ściśle regulowany proces można podzielić na hemostazę pierwotną i wtórną. Pierwotna hemostaza odnosi się do agregacji płytek krwi, adhezji i tworzenia czopów

plytkowych, podczas gdy hemostaza wtórna obejmuje odkładanie się nierozpuszczalnej fibryny, generowanej przez proteolityczną kaskadę krzepnięcia. Można zatem powiedzieć, że celem wtórnej hemostazy jest utworzenie skrzepu. Istnieją dwa powiązane ze sobą szlaki krzepnięcia, tj. szlak aktywacji kontaktowej (zwany także szlakiem wewnątrzpochodnym) i szlak czynnika tkankowego (znany szlakiem zewnątrzpochodnym).

2. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia

Badany system biologiczny uwzględnia wybrane aspekty procesu krzepnięcia, ze szczególnym wyróżnieniem szlaku zewnątrzpochodnego. Schemat tego procesu zamieszczono na rysunku 3.5. Natomiast szlak aktywacji kontaktowej został pominięty w modelu, ponieważ nie jest kluczowy dla badanego zjawiska [21].

Koagulacja jest procesem dynamicznym i reprezentuje równowagę między tworzeniem się skrzepów a mechanizmami, które je hamują [207]. W sytuacji, gdy zmniejsza się aktywność prokoagulacyjna naturalnie występujących inhibitorów lub zwiększa się aktywność czynników krzepnięcia, ta delikatna równowaga zostaje zakłócona.

Szlak prokoagulacyjny rozpoczyna się od uszkodzenia tkanki, prowadzącego do sekrecji czynnika tkankowego (TF), a tym samym do konwersji czynnika VII do VIIa (większość czynników krzepnięcia to prekursorzy enzymów proteolitycznych zwanych zymogenami, które krążą w postaci nieaktywnej). Uwolniony czynnik tkankowy tworzy kompleks katalityczny z czynnikiem VIIa. Kompleks VIIa-TF jest niezbędny do aktywacji czynnika IX, jak i X. W następstwie tych aktywacji, czynnik Xa prowadzi do proteolitycznego przekształcenia protrombiny w trombinę. Trombina jest plejotropowym, ośrodkowym enzymem krzepnięcia, który reguluje równowagę prokoagulant-antykoagulant. Trombina między innymi przekształca fibrynogen w fibrynę, ale także odgrywa istotną rolę w aktywacji płytek krwi oraz w aktywacji innych czynników. Trombina aktywuje czynnik XIII w celu indukowania polimeryzacji fibryny, podstawowego procesu tworzenia stabilnego skrzepu. Obok tego aktywuje także czynniki V, VIII i XI. Zewnątrzpochodne szlaki krzepnięcia obejmują dodatkowo sprzężenia zwrotne tworzenia trombiny i można wyróżnić trzy takie szlaki [21]:

a) Ścieżka pierwsza

Trombina prowadzi do aktywacji czynnika V ($V \rightarrow Va$). Aktywowany czynnik V może tworzyć kompleks protrombinazy z czynnikiem Xa. Kompleks protrombinazy prowadzi do transformacji protrombiny do trombiny.

b) Ścieżka druga

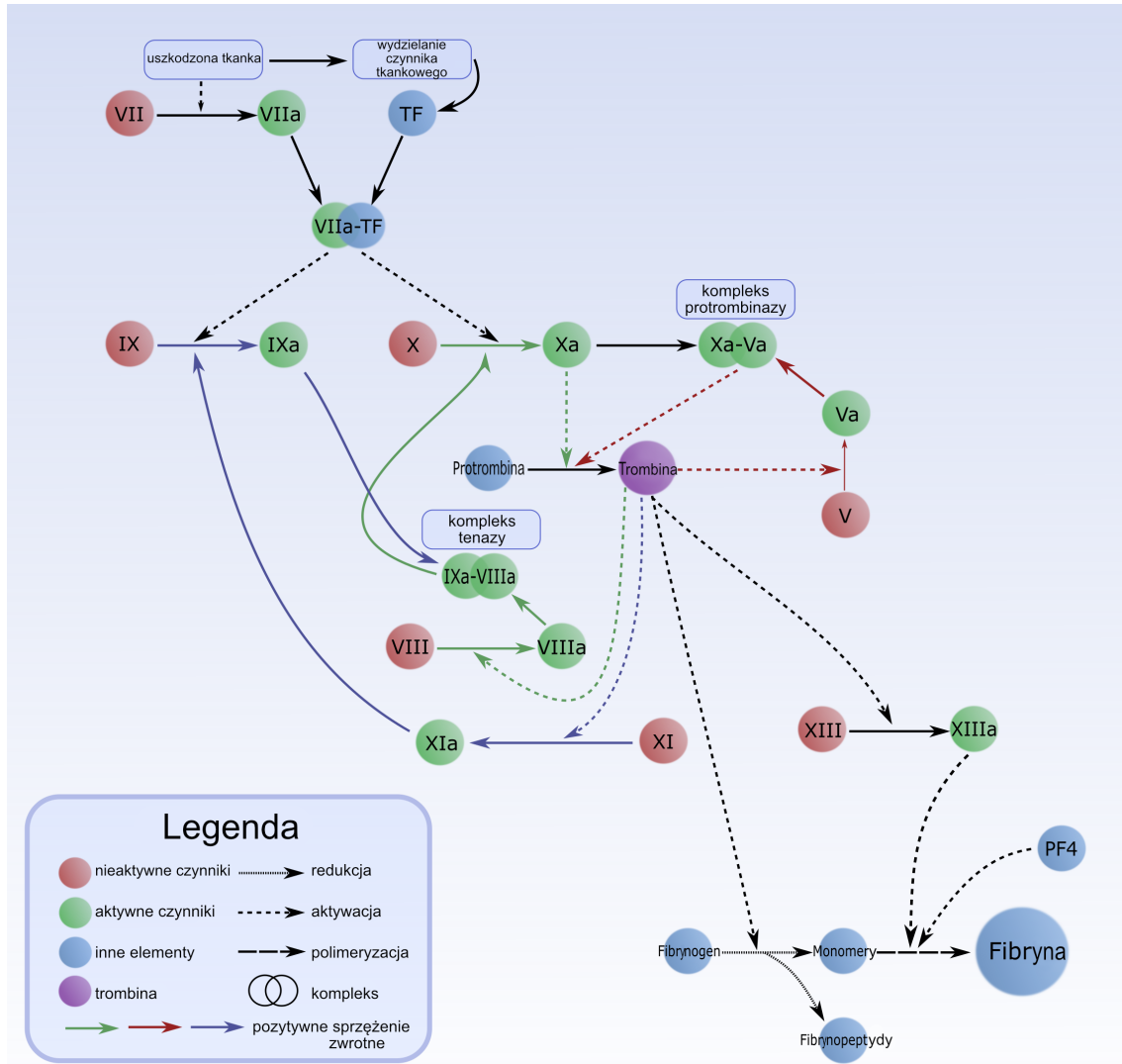
Trombina prowadzi do aktywacji czynnika VIII. Aktywowany czynnik VIII wraz z czynnikiem IXa tworzy kompleks tenazy, który zaangażowany jest w aktywację czynnika X do Xa, powodującego transformację protrombiny w trombinę.

c) Ścieżka trzecia

Trombina prowadzi do aktywacji czynnika XI ($XI \rightarrow XIa$), w dalszej konsekwencji prowadząc do aktywacji czynnika IX. Aktywowany czynnik IX wchodzi w skład kompleksu tenazy. Jak wspomniano w ścieżce powyżej, kompleks tenazy aktywuje czynnik X, co powoduje przemianę protrombiny w trombinę.

3. Wybrane aspekty wpływu dymu tytoniowego

Wiele badań donosi, że palenie papierosów wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zakrzepicy tętniczej [143, 193, 256], pomimo tego mechanizmy związane z incydentami zakrzepowymi u



RYSUNEK 3.5: Schemat zewnątrzpochoźnego szlaku krzepnięcia, gdzie różnymi kolorami łuków (zielony, czerwony i niebieski) oznaczono odpowiednio trzy ścieżki dodatniego sprzężenia zwrotnego tworzenia trombiny. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [98]. Na schemacie pokazano, iż uszkodzenie tkanek prowadzi do wydzielania TF i aktywacji czynnika VIIa. Kompleks VIIa-TF jest natomiast niezbędny do aktywacji czynnika IX do IXa, a także aktywacji czynnika X do Xa. Aktywowany czynnik X umożliwia przejście protrombiny do trombiny, która to prowadzi do aktywacji czynnika XIII do XIIIa, a także do przejścia fibrynogenu do fibryny. Aktywowany czynnik XIIIa bierze udział w polimeryzacji fibryny. Schemat pokazuje również trzy szlaki dodatniego sprzężenia zwrotnego dla tworzenia trombiny. Pierwszy szlak – trombina prowadzi do aktywacji czynnika V, który tworzy kompleks z czynnikiem Xa, zwany kompleksem protrombinazy. Kompleks ten umożliwia przejście protrombiny do trombiny. Drugi szlak – trombina prowadzi do aktywacji czynnika VIII do VIIIa, który wraz z aktywowanym czynnikiem IX może tworzyć kompleks zwany kompleksem tenazy. Kompleks ten jest zaangażowany w aktywację czynnika X do Xa, co w konsekwencji prowadzi do przejścia protrombiny do trombiny. Trzeci szlak – trombina prowadzi do aktywacji czynnika XI do XIa, który aktywuje czynnik IX wchodzący w skład kompleksu tenazy.

osób palących nie są w pełni poznane. Powszechną informacją jest natomiast fakt, że dym tytoniowy jest jednym z czynników ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Palenie stymuluje wiele mechanizmów bezpośrednio związanych z miażdżycą i tym samym sprzyja zaburzeniom w stanach prozakrzepowych. W zaproponowanym modelu uwzględniono tylko wybrane aspekty palenia. Wybrany kontekst dotyczy wydzielania i stymulowania różnych cząstek odgrywających ważną rolę w wielu szkodliwych procesach. Między innymi, wydzielane metale czy wzrost reaktywnych form tlenu stymulują oksydację lipoprotein o niskiej gęstości LDL. Tromboksan A2 i prostacyklina I2 blokują naczynia wieńcowe bezpośrednio przyczyniając się do rozwoju miażdżycy. Nikotyna natomiast indukuje katecholaminy, które

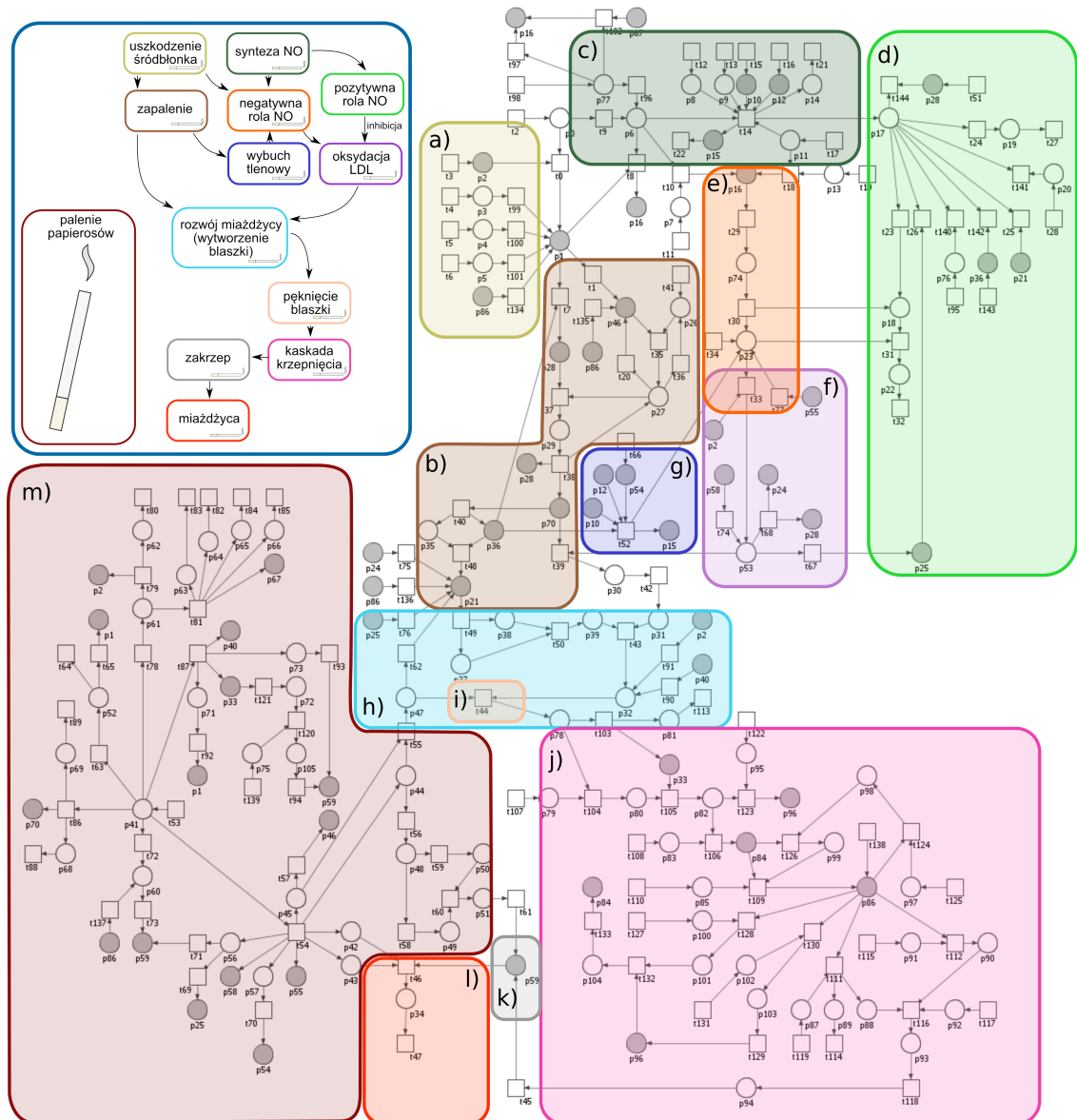
prowadzą do zmniejszenia ilości tlenu (O_2) i zwiększenia ilości tlenku węgla (CO). Ponadto, dym tytoniowy prowadzi do rozwoju środowiska zapalnego poprzez wzrost ilości neutrofilów, limfocytów i makrofagów, a także poprzez wydzielanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych indukujących sekrecję chemokin. Obok tych wszystkich zmian, palenie prowadzi do modyfikacji profilu lipidowego, która objawia się zwiększeniem ilości LDL i triglicerydów (które mogą być zaangażowane w uszkodzenie śródbłonna) oraz zmniejszeniem ilości HDL i BH_4 . Zmniejszona ilość BH_4 wpływa na zmniejszenie biodostępności tlenku azotu, sprzyjając utlenianiu LDL. W zaproponowanym modelu skupiono się na wybranych aspektach stanów prozakrzepowych, które dodatkowo pobudza palenie papierosów wpływając na zwiększenie ilości TF, hamowanie aktywatora plazminogenu (PA) i zwiększenie ilości inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1).

Inne mechanizmy zawarte w modelu, takie jak inicjacja i dalszy rozwój dysfunkcji śródbłonna oraz mechanizmy wpływające na biodostępność tlenku azotu zostały opisane we wcześniejszych rozdziałach, a przede wszystkim w podrozdziale 3.2.1.

3.4.2 Model

Niniejszy paragraf zawiera zaproponowany matematyczny model oparty o sieci Petriego, który został stworzony przy użyciu oprogramowania *Snoopy* [117]. W odróżnieniu od poprzednich modeli opisanych w tym rozdziale, w tym przypadku całościowa analiza, włącznie z generowaniem t-nieziemienników została przeprowadzana za pomocą narzędzia *Holmes* [230, 228].

Zaproponowana sieć Petriego została przedstawiona na Rysunku 3.6. Obok sieci Petriego wyróżniono także schemat blokowy znajdujący się w lewym górnym rogu Rysunku 3.6. Wspomniany schemat wyróżnia główne elementy i mechanizmy zawarte w zaproponowanym modelu opartym na sieci Petriego. Jak można zauważyć, w niemal wszystkich blokach użyto piktogramu papierosa, który jak można się spodziewać, symbolizuje wpływ dymu tytoniowego na poszczególne procesy. Ponadto sama sieć Petriego została podzielona na 13 bloków oznaczonych kolorowymi ramami. Oznaczenia te wyróżniają odpowiednie mechanizmy i kolorystyka ta jest spójna z diagramem w lewym górnym rogu. Wyróżniono następujące procesy: a) dysfunkcja śródbłonna spowodowana różnymi czynnikami (np. wysoki poziom LDL, wysokie ciśnienie krwi, toksyny, trombina), b) odpowiedź zapalna uszkodzenia śródbłonna (pobudzająca adhezję chemokin i monocytów), c) synteza tlenku azotu, d) pozytywna rola NO (gdy ilość NO jest wystarczająca do prawidłowego funkcjonowania i hamowania szkodliwych procesów), e) negatywna rola NO (gdy ilość NO jest niewystarczająca do poprawnego funkcjonowania i stymuluje utlenianie LDL), f) utlenianie LDL, g) wybuch tlenowy, h) rozwój miażdżycy (powstawanie blaszki miażdżycowej), i) pęknięcie płytki miażdżycowej, j) koagulacja (kaskada krzepnięcia), k) tworzenie zakrzepów, l) miażdżycy, m) palenie papierosów. Dym papierosowy jest bezpośrednio lub pośrednio skorelowany z prawie wszystkimi tymi procesami i dodatkowo stymuluje szkodliwe mechanizmy, co właśnie obrazuje mniejszy schemat znajdujący się w lewym górnym rogu Rysunku 3.6. Wszystkie nazwy komponentów można znaleźć w Tabeli 3.9 oraz Tabeli 3.10, które odpowiednio zawierają nazwy pasywnych komponentów – miejsc i nazwy aktywnych komponentów – tranzykcji. W obu tabelach wyróżniono dwie kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikator miejsca/tranzykcji i kolumna *Znaczenie biologiczne* – zawierająca nazwę miejsca/tranzykcji określającą jej przeznaczenie w systemie. Opisany model zawiera uproszczenia związane z łukami hamującymi oraz uproszczenia ilościowe, które opisano na przykładzie modelu zawartego w poprzednim podrozdziale 3.2 w paragrafie dotyczącym modelu (3.2.2). Jednakże rysunki przedstawiające reakcje hamowania oryginalnie pochodzą w pracy opisanej w tym podrozdziale [98].



RYСУNEK 3.6: Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego na rozwój miażdżycy. Zaproponowana sieć Petriego została podzielona na 13 bloków odpowiadających mechanizmom biologicznym wyróżnionym na schemacie blokowym znajdującym się w lewym górnym rogu. Blok nazwany “palenie papierosów” nie jest powiązany łukami z pozostałymi blokami ze względu na mnogość interakcji. Jednak w celu określenia tych relacji wykorzystano piktogram papierosa symbolizujący wpływ dymu tytoniowego na określone procesy. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [98], gdzie również znajdują się dokładne opisy poszczególnych bloków.

TABELA 3.9: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc (patrz [98]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	zdrowy śródbłonek	p_{53}	utleniony LDL (oxLDL)
p_1	uszkodzony śródbłonek	p_{54}	reaktywne formy tlenu (ROS)
p_2	lipoproteiny o małej gęstości (LDL)	p_{55}	wolne rodniki
p_3	wysokie ciśnienie krwi	p_{56}	kadm
p_4	toksyny	p_{57}	aldehydy
p_5	inne czynniki	p_{58}	metale
p_6	eNOS	p_{59}	zakrzep
p_7	ADMA	p_{60}	płytki krwi
p_8	iNOS	p_{61}	profil lipidowy
p_9	nNOS	p_{62}	triglicerydy

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_{10}	NADPH	p_{63}	lipoproteiny o dużej gęstości (HDL)
p_{11}	L-arginina	p_{64}	dysplazja włóknisto-mięśniowa (FMD)
p_{12}	O ₂	p_{65}	apolipoproteina A1
p_{13}	L-NMMA	p_{66}	selen
p_{14}	cytrulina	p_{67}	mniej więcej ilość BH ₄
p_{15}	NADP	p_{68}	limfocyty
p_{16}	niewystarczająca ilość NO (uszkodzony śródbłonek)	p_{69}	neutrofile
p_{17}	wystarczająca ilość NO (zdrowy śródbłonek)	p_{70}	makrofagi
p_{18}	NO	p_{71}	endotelina-1
p_{19}	ciśnienie krwi	p_{72}	inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1)
p_{20}	zagregowane płytki krwi	p_{73}	czynnik von Willebranda
p_{21}	zamplifikowane komórki	p_{74}	zmniejszona ilość NO
p_{22}	nadtlenoazotyn	p_{75}	aktywator plazminogenu
p_{23}	anionorodnik ponadtlenkowy	p_{76}	inne czynniki
p_{24}	ICAM-1	p_{77}	BH ₄
p_{25}	cząsteczki adhezyjne	p_{78}	uszkodzona tkanka
p_{26}	nieaktywny monocyt	p_{79}	VII
p_{27}	aktywny monocyt	p_{80}	VIIa
p_{28}	VCAM-1	p_{81}	jony wapnia
p_{29}	kompleks VCAM-monocyt	p_{82}	TF-VIIa complex
p_{30}	komórka piankowa	p_{83}	X
p_{31}	rdzeń nekrotyczny	p_{84}	Xa
p_{32}	blaszka miażdżycowa	p_{85}	protrombina
p_{33}	TF	p_{86}	trombina
p_{34}	miażdżycyca	p_{87}	fibrynogen
p_{35}	czynnik wzrostu	p_{88}	monomery
p_{36}	cytokiny	p_{89}	fibrynopeptydy
p_{37}	glikoproteiny macierzy	p_{90}	XIIIa
p_{38}	kolagen	p_{91}	XIII
p_{39}	czapeczka włóknista	p_{92}	czynnik płytkowy 4 (PF4)
p_{40}	białe krwinki	p_{93}	luźna fibryna
p_{41}	dym tytoniowy	p_{94}	fibryna
p_{42}	tromboksan A2	p_{95}	IX
p_{43}	zmniejszona ilość prostacykliny	p_{96}	IXa
p_{44}	nikotyna	p_{97}	V
p_{45}	policykliczne węglowodory aromatyczne	p_{98}	Va
p_{46}	chemokiny	p_{99}	kompleks protrombinazy
p_{47}	metaloproteinazy macierzy (MMP)	p_{100}	VIII
p_{48}	katecholaminy	p_{101}	VIIIa
p_{49}	CO	p_{102}	XI
p_{50}	receptory α	p_{103}	XIa
p_{51}	wysoka lepkość krwi	p_{104}	tenza
p_{52}	nasilone FMD	p_{105}	stany prozakrzepowe

TABELA 3.10: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji (patrz [98]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_0	uszkodzenia powodowane przez LDL	t_{73}	stymulowanie stanów protrombotycznych przez wzrost płytek krwi
t_1	sekrecja przez uszkodzony śródbłonek	t_{74}	stymulowanie oksydacji przez metale
t_2	tranzycja pomocnicza	t_{75}	stymulowanie przez ICAM-1
t_3	tranzycja pomocnicza	t_{76}	stymulowanie przez cząsteczki adhezyjne
t_4	tranzycja pomocnicza	t_{77}	stymulowanie wybuchów tlenowych przez wolne rodniki

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_5	tranzycja pomocnicza	t_{78}	modyfikacje powodowane dymem tytoniowym
t_6	tranzycja pomocnicza	t_{79}	wzrost spowodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_7	ekspresja z uszkodzonego śródbłonka	t_{80}	tranzycja pomocnicza
t_8	hamowanie eNOS spowodowane uszkodzonym śródbłonkiem	t_{81}	spadek spowodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_9	sekrecja przez zdrowy śródbłonek	t_{82}	remodelowanie tkanki spowodowane przez FMD
t_{10}	hamowanie eNOS spowodowane przez ADMA	t_{83}	tranzycja pomocnicza
t_{11}	tranzycja pomocnicza	t_{84}	tranzycja pomocnicza
t_{12}	tranzycja pomocnicza	t_{85}	tranzycja pomocnicza
t_{13}	tranzycja pomocnicza	t_{86}	wzrost spowodowany przez rozwój środowiska zapalnego
t_{14}	synteza NO	t_{87}	wzrost spowodowany przez dym tytoniowy
t_{15}	tranzycja pomocnicza	t_{88}	tranzycja pomocnicza
t_{16}	tranzycja pomocnicza	t_{89}	tranzycja pomocnicza
t_{17}	tranzycja pomocnicza	t_{90}	tworzenie spowodowane przez białe krwinki
t_{18}	zahamowanie L-argininy powodowane przez L-NMMA	t_{91}	tworzenie spowodowane przez LDL
t_{19}	tranzycja pomocnicza	t_{92}	uszkodzenie spowodowane endoteliną-1
t_{20}	tranzycja pomocnicza	t_{93}	stymulowanie stanów protrombotycznych spowodowane przez czynnik von Willebranda
t_{21}	tranzycja pomocnicza	t_{94}	stymulowanie stanów protrombotycznych spowodowane przez aktywator plazminogenu
t_{22}	tranzycja pomocnicza	t_{95}	tranzycja pomocnicza
t_{23}	wysoka ilość NO	t_{96}	zwiększenie powinowactwa eNOS do L-argininy
t_{24}	pozytywna regulacja przez NO (przy zdrowym śródbłonku)	t_{97}	hamowanie BH ₄
t_{25}	hamowanie namnożonych komórek przez NO (przy zdrowym śródbłonku)	t_{98}	tranzycja pomocnicza
t_{26}	hamowanie cząsteczek adhezyjnych	t_{99}	uszkodzenia powodowane przez wysokie ciśnienie krwi
t_{27}	tranzycja pomocnicza	t_{100}	uszkodzenia powodowane przez toksyny
t_{28}	tranzycja pomocnicza	t_{101}	uszkodzenia powodowane przez inne czynniki
t_{29}	mała ilość NO	t_{102}	hamowanie BH ₄ przez dym tytoniowy
t_{30}	duża ilość anionorodnika ponadtlenkowego	t_{103}	wydzielanie TF
t_{31}	redukcja	t_{104}	aktywacja VII
t_{32}	hamowanie oxLDL	t_{105}	tworzenie kompleksu TF-VIIa
t_{33}	oksydacja	t_{106}	aktywacja X
t_{34}	tranzycja pomocnicza	t_{107}	tranzycja pomocnicza
t_{35}	aktywacja monocytów	t_{108}	tranzycja pomocnicza
t_{36}	tranzycja pomocnicza	t_{109}	aktywacja II
t_{37}	adhezja monocytów	t_{110}	tranzycja pomocnicza
t_{38}	transformacja	t_{111}	redukcja fibrynogenu
t_{39}	wychwyt	t_{112}	aktywacja XII
t_{40}	wydzielanie przez makrofagi	t_{113}	tranzycja pomocnicza
t_{41}	tranzycja pomocnicza	t_{114}	tranzycja pomocnicza
t_{42}	destrukcja komórek piankowatych	t_{115}	tranzycja pomocnicza
t_{43}	tworzenie blaszki miażdżycowej przez rdzeń nekrotyczny i czapeczkę włóknistą	t_{116}	polimeryzacja
t_{44}	pęknięcie blaszki miażdżycowej	t_{117}	tranzycja pomocnicza
t_{45}	aktywacja płytek krwi	t_{118}	stabilizacja fibryny
t_{46}	blokowanie naczyń wieńcowych	t_{119}	tranzycja pomocnicza
t_{47}	tranzycja pomocnicza	t_{120}	hamowanie aktywatora plazminogenu

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{48}	prolifracja spowodowana czynnikiem wzrostu i cytokinami	t_{121}	wzrost ilości PAI-1
t_{49}	wydzielanie przez namnożone komórki	t_{122}	tranzycja pomocnicza
t_{50}	tworzenie czapeczki włóknistej	t_{123}	aktywacja IX
t_{51}	tranzycja pomocnicza	t_{124}	aktywacja V
t_{52}	wybuch tlenowy	t_{125}	tranzycja pomocnicza
t_{53}	tranzycja pomocnicza	t_{126}	tworzenie kompleksu protrombinazy
t_{54}	wydzielanie przez dym tytoniowy	t_{127}	tranzycja pomocnicza
t_{55}	aktywacja wywołana nikotyną i policyklicznym węglowodorem aromatycznym	t_{128}	aktywacja VIII
t_{56}	indukowanie poprzez nikotynę	t_{129}	aktywacja IXa poprzez XIa
t_{57}	indukowanie poprzez policykliczne węglowodory aromatyczne	t_{130}	aktywacja XI
t_{58}	spadek ilości 2 wzrost ilości CO	t_{131}	tranzycja pomocnicza
t_{59}	aktywacja spowodowana przez katecholaminy	t_{132}	tworzenie kompleksu tenazy
t_{60}	zwiększenie lepkości krwi	t_{133}	aktywacja X spowodowane przez kompleks tenazy
t_{61}	stymulowanie poprzez wysoką lepkość krwi	t_{134}	uszkodzenie śródbłonna spowodowane trombiną
t_{62}	stymulacja wywołana przez metaloproteinazy macierzy	t_{135}	zwiększona ekspresja chemokin przez trombinę
t_{63}	bezpośrednie uszkodzenia spowodowane dymem tytoniowym	t_{136}	stymulacja wywołana trombiną
t_{64}	przebudowa tkanki spowodowana FMD	t_{137}	aktywacja płytek spowodowana trombiną
t_{65}	uszkodzona spowodowane przez nasilone FMD	t_{138}	tranzycja pomocnicza
t_{66}	tranzycja pomocnicza	t_{139}	tranzycja pomocnicza
t_{67}	ekspresja cząsteczek adhezyjnych wywołana przez oxLDL	t_{140}	hamowanie innych mechanizmów
t_{68}	ekspresja powodowana oxLDL	t_{141}	hamowanie agregacji płytek
t_{69}	ekspresja przez kadm	t_{142}	hamowanie cytokin
t_{70}	wzrost spowodowany aldehydami	t_{143}	tranzycja pomocnicza
t_{71}	rola w śmierci komórek śródbłonna	t_{144}	hamowanie VCAM-1
t_{72}	wzrost i aktywacja spowodowana dymem tytoniowym		

3.4.3 Analiza i wyniki

Analiza modelu omówionego w tej części pracy obok analizy zbiorów MCT i analizy t-niezmienników, wykorzystuje także manualną analizę wybranych t-niezmienników.

Zaproponowany model wpływu wybranych aspektów protrombotycznych na rozwój miażdżycy zawiera 31 nietrywialnych zbiorów MCT zebranych w Tabeli 3.11. Tabela ta została podzielona na trzy kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory kolejnych zbiorów MCT, *Zawarte tranzycje* – kolumna składająca się z tranzycji należących do poszczególnych zbiorów MCT, *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca opis znaczenia biologicznego, przypisany do każdego zbioru MCT.

TABELA 3.11: Lista nietrywialnych zbiorów MCT – zbiorów składających się z co najmniej dwóch tranzycji należących do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników (patrz [98]).

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	$t_{45}, t_{111}, t_{112}, t_{114}, t_{115}, t_{116}, t_{117}, t_{118}, t_{119}$	Redukcja fibrynogenu do fibrynopeptydów i monomerów przy udziale trombiny. Trombina prowadzi również do aktywowania czynnika XIII do XIIIa. Aktywowany czynnik XIII bierze udział w polimeryzacji fibryny, która aktywuje płytki krwi i stymuluje tworzenie skrzepu.
m_2	$t_{12}, t_{13}, t_{14}, t_{15}, t_{16}, t_{21}, t_{22}$	Częściowa synteza NO, gdzie kofaktor eNOS (BH_4) i L-arginina nie występują.
m_3	$t_{46}, t_{47}, t_{54}, t_{70}, t_{74}, t_{77}$	Dym tytoniowy stymuluje wydzielanie tromboksanu A2 i prowadzi do upośledzenia produkcji prostacykliny, która może blokować naczynia wieńcowe i bezpośrednio promuje rozwój miażdżycy. Dym tytoniowy wydziela także reaktywne formy tlenu, wolne rodniki i metale, które stymulują stres oksydacyjny, wubuch tlenowy i tworzenie anionorodnika ponadtlenkowego – ten mechanizm sprzyja utlenianiu LDL.
m_4	$t_{56}, t_{57}, t_{58}, t_{59}, t_{60}, t_{61}$	Nikotyna indukuje katecholaminy, które prowadzą do zmniejszenia ilości O_2 i zwiększenia ilości CO, a dodatkowo prowadzą do aktywacji receptorów α . Mechanizmy te prowadzą do zwiększenia lepkości krwi i sprzyjają powstawaniu zakrzepów. W skład tego zbioru MCT wchodzi także policykliczne węglowodory aromatyczne indukujące chemokiny – stymulowanie rozwoju stanów zapalnych u palaczy.
m_5	$t_{81}, t_{82}, t_{83}, t_{84}, t_{85}, t_{102}$	Dym tytoniowy prowadzi do modyfikacji profilu lipidowego, a także do zmniejszenia ilości kofaktora eNOS, co skutkuje ograniczeniem syntezy tlenu azotu.
m_6	$t_{39}, t_{42}, t_{43}, t_{49}, t_{50}$	Szkodliwe działanie makrofagów. Makrofagi wydzielają cytokiny i czynniki wzrostu, które prowadzą do proliferacji. Te namnożone komórki wydzielają kolagen i glikoproteiny macierzy, co powoduje tworzenie czapeczki włóknistej. Dodatkowo celem makrofagów jest pozbycie się uszkodzonych komórek, w tym przypadku makrofagi wychwytyują utlenioną formę LDL. Mechanizm ten prowadzi do powstania komórek piankowatych, a w następstwie może prowadzić do śmierci i uwolnienia rdzenia nekrotycznego. Rdzeń nekrotyczny i czapeczka włóknista są zaangażowane w tworzenie blaszki miażdżycowej.
m_7	$t_{109}, t_{110}, t_{124}, t_{125}, t_{126}$	Pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego tworzenia trombiny. Trombina aktywuje czynnik V do Va, który może tworzyć kompleks protrombinazy z czynnikiem Xa. Kompleks protrombinazy prowadzi do przejścia protrombiny w trombinę.
m_8	$t_{87}, t_{90}, t_{92}, t_{93}$	Dym tytoniowy prowadzi do zwiększenia ilości czynnika von Willebranda, endoteliny-1 oraz liczby białych krwinek co może promować stany protrombotyczne, a także dysfunkcję śródbłonna czym sprzyja rozwojowi miażdżycy.
m_9	$t_{94}, t_{120}, t_{121}, t_{139}$	TF prowadzi do hamowania aktywatora plazminogenu. Zaburzenie to w stanach protrombotycznych sprzyja powstawaniu zakrzepów, a w konsekwencji również incydentom sercowo-naczyniowym.
m_{10}	$t_{127}, t_{128}, t_{132}, t_{133}$	Pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego tworzenia trombiny. Aktywacja czynnika VIII do VIIIa, który może tworzyć kompleks tenazy z czynnikiem IXa. Kompleks tenazy aktywuje czynnik X do Xa, co może prowadzić do przejścia protrombiny w trombinę.
m_{11}	t_{86}, t_{88}, t_{89}	Dym tytoniowy stymuluje rozwój zapalenia poprzez zwiększenie ilości makrofagów, które wydzielają cytokiny.
m_{12}	$t_{104}, t_{105}, t_{107}$	Tworzenie kompleksu TF-VIIa, który jest niezbędny do aktywacji czynnika Xa i prowadzi do przejścia protrombiny w trombinę.
m_{13}	$t_{129}, t_{130}, t_{131}$	Aktywacja czynnika XI do IXa poprzez trombinę.
m_{14}	t_4, t_{99}	Uszkodzenie śródbłonna spowodowane wysokim ciśnieniem krwi.
m_{15}	t_5, t_{100}	Uszkodzenie śródbłonna spowodowane toksynami.
m_{16}	t_6, t_{101}	Uszkodzenie śródbłonna spowodowane innymi czynnikami.
m_{17}	t_{10}, t_{11}	Ograniczenie syntezy NO przez obecność ADMA (inhibitora eNOS).
m_{18}	t_{18}, t_{19}	Ograniczenie syntezy NO przez obecność L-NMMA (inhibitora L-argininy).

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_{19}	t_{20}, t_{41}	Odpowiedź zapalna uszkodzonego śródbłonka: wydzielanie chemokin, adhezja monocytów, diapedeza i transformacja do makrofagów.
m_{20}	t_{24}, t_{27}	Prawidłowa synteza NO: ilość NO jest wystarczająca do regulacji ciśnienia krwi.
m_{21}	t_{28}, t_{141}	Prawidłowa synteza NO: ilość NO jest wystarczająca do hamowania agregacji płytek krwi.
m_{22}	t_{29}, t_{30}	Nieprawidłowa synteza NO: ilość NO jest niewystarczająca do prawidłowego działania, sprzyja utlenianiu LDL.
m_{23}	t_{31}, t_{32}	Pozytywna rola NO – ograniczenie utleniania LDL.
m_{24}	t_{37}, t_{38}	Typowa odpowiedź zapalna: adhezja monocytów, tworzenie się kompleksów monocytów i VCAM-1 co prowadzi do diapedezy, a następnie transformacji w makrofagi.
m_{25}	t_{40}, t_{48}	Makrofagi prowadzą do wydzielania cytokin i czynników wzrostu, które są zaangażowane w proliferację.
m_{26}	t_{68}, t_{75}	Szkodliwe formy LDL (oxLDL) prowadzą do zwiększonej ekspresji ICAM-1, która jest zaangażowana w proliferację.
m_{27}	t_{79}, t_{80}	Modyfikacje profilu lipidowego (u palaczy) prowadzą między innymi do zwiększonej ilości LDL i triglicerydów.
m_{28}	t_{95}, t_{140}	Poprawna synteza NO może prowadzić do zahamowania szkodliwych mechanizmów (np.: zahamowanie czynników stymulujących kolonie makrofagów (MCSF), która pośrednio zaangażowana w proliferację).
m_{29}	t_{103}, t_{113}	Uszkodzenie tkanki prowadzi do wydzielania czynnika tkankowego i jonów wapnia. TF jest skorelowany z zaburzeniami w stanach protrombotycznych (u palaczy) i zaburzeniami kaskady krzepnięcia.
m_{30}	t_{106}, t_{108}	Aktywacja czynnika X do Xa przez kompleks VIIa-TF.
m_{31}	t_{122}, t_{123}	Aktywacja czynnika IX do IXa przez kompleks VIIa-TF.

Powyższa analiza pozwoliła na identyfikację 31 nietrywialnych, funkcjonalnych bloków charakteryzujących zaproponowany model. W związku z tym, że 18 zbiorów MCT zawiera tylko dwie tranzycje, sieć została podzielona na większe procesy/mechanizmy ułatwiające jej dalszą analizę. Zaproponowany podział znajduje w paragrafie 3.4.2 – *Model*. W drugiej kolejności przeprowadzono analizę t-klastrów dla 2090 t-niezmienników.

Analiza t-klastrów pozwoliła zidentyfikować 19 t-klastrów, które uzyskano stosując algorytm klastrowania oparty na metodzie średniego wiązania i nieskupioną miarę dystansu Pearsona. Wyboru najlepszego klastrowania dokonano w oparciu o indeks MSS, podczas gdy wybór liczby t-klastrów oparto o współczynnik Calińskiego-Harabasa. Znaczenie biologiczne zidentyfikowanych t-klastrów przedstawiono w Tabeli 3.12, podzielonej na dwie kolumny. Kolumna *ID* – zawiera kolejne identyfikatory t-klastrów, kolumna *Interpretacja biologiczna* – zawiera opis znaczenia biologicznego poszczególnych klastrów.

TABELA 3.12: Lista t-klastrów – skupień składających się z podobnych do siebie t-niezmienników (patrz [98]).

ID	Interpretacja biologiczna	ID	Interpretacja biologiczna
c ₁	Ograniczona synteza NO spowodowana przez inhibitor L-argininy (L-NMMA). Pomimo mechanizmów wpływających na ograniczoną syntezę, NO może hamować utlenianie LDL.	c ₁₁	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana przez różne czynniki (np. wysokie ciśnienie krwi, LDL, toksyny, trombinę) prowadzi do zahamowania eNOS i w efekcie do ograniczonej syntezy NO. Pomimo mechanizmów wpływających na ograniczenie syntezy, NO może działać pozytywnie i może hamować utlenianie LDL.
c ₂	Odpowiedź zapalna uszkodzonego śródbłonna: indukcja chemokin, adhezję monocytów, diapedeza i transformacja w makrofagi.	c ₁₂	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana przez wszystkie modelowane czynniki w tym wysoki poziom LDL (dodatkowo stymulowany przez modyfikację profilu lipidowego u palaczy), wysokie ciśnienie krwi, toksyny, trombina. Klaster ten obejmuje również prawidłową syntezę NO, która może hamować niektóre szkodliwe mechanizmy (np. hamowanie stanu zapalnego).
c ₃	Dym tytoniowy prowadzi do nasilenia dysplazji włóknisto-mięśniowej (bezpośrednie uszkodzenie prowadzi do przebudowy tkanek).	c ₁₃	Dysfunkcja śródbłonna wywołana przez toksyny stymuluje odpowiedź zapalną.
c ₄	Ograniczona synteza NO spowodowana hamowaniem kofaktora eNOS (BH ₄). Pomimo mechanizmów wpływających na ograniczoną syntezę, NO może działać pozytywnie i może hamować utlenianie LDL.	c ₁₄	Dysfunkcja śródbłonna spowodowana innymi czynnikami (np. wysokim poziomem glukozy w cukrzycy) stymuluje odpowiedź zapalną.
c ₅	Dym tytoniowy prowadzi do modyfikacji profilu lipidowego i zmniejszenia ilości kofaktora eNOS (BH ₄), co skutkuje ograniczoną syntezą NO.	c ₁₅	Dym tytoniowy prowadzi do uszkodzenia śródbłonna poprzez nasilenie dysplazji włóknisto-mięśniowej, co indukuje odpowiedź zapalną.
c ₆	Trombina prowadzi do dysfunkcji śródbłonna i stymuluje stan zapalny poprzez indukcję chemokin.	c ₁₆	Dym tytoniowy prowadzi do modyfikacji profilu lipidowego i zwiększenia ilości LDL oraz triglicerydów, co skutkuje dysfunkcją śródbłonna i rozwojem stanu zapalnego.
c ₇	Dodatnie sprzężenie zwrotne tworzenia trombiny. Trombina prowadzi do aktywowania czynnika V do Va, który może tworzyć kompleks protrombinazy z Xa. Ten kompleks prowadzi do przejścia protrombiny do trombiny. Ponadto, trombina prowadzi również do aktywacji czynnika VIII do VIIIa, który wraz z IXa tworzy kompleks tenazy. Kompleks tenazy jest zaangażowany w aktywację czynnika X do Xa, który bierze udział w przejściu protrombiny do trombiny. Dodatkowo trombina prowadzi do aktywacji czynnika XI do XIa, który aktywuje czynnik IX do IXa (aktywowany czynnik IXa wchodzi w skład kompleksu tenazy).	c ₁₇	Dym tytoniowy prowadzi do uszkodzenia śródbłonna, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania eNOS i ograniczonej syntezy NO.
c ₈	Prawie wszystkie podprocesy zawarte w modelu znajdują się w jednym klastrze.	c ₁₈	Dym papierosowy prowadzi do modyfikacji profilu lipidowego i zwiększenia ilości LDL, co skutkuje uszkodzeniem śródbłonna, prowadzi do zahamowania eNOS i ostatecznie ogranicza syntezę NO.

ID	Interpretacja biologiczna	ID	Interpretacja biologiczna
c ₉	Ograniczona synteza NO spowodowana przez inhibitor eNOS (ADMA). Pomimo mechanizmów wpływających na zmniejszenie ilości NO, może on działać pozytywnie i hamować utlenianie LDL.	c ₁₉	Dym tytoniowy wpływa na rozwój zapalenia poprzez stymulowanie makrofagów. Makrofagi wydzielają cytokiny, które są zaangażowane w stres oksydacyjny, wybuchy tlenowe, promowanie utleniania LDL, ale także biorą udział w proliferacji wraz z czynnikiem wzrostu. Namnożone komórki wydzielają kolagen i glikoproteiny macierzy, co skutkuje tworzeniem się włóknistej czapeczki i promowaniem miażdżycy. Proliferacja może być zahamowana przez NO, gdy synteza NO jest prawidłowa.
c ₁₀	Dysfunkcja śródbłónka spowodowana wysokim ciśnieniem krwi stymuluje odpowiedź zapalną.		

Na podstawie wyników analizy t-klastrów można zauważyć, że dysfunkcja śródbłónka, odpowiedź zapalna (indukcja chemokin, adhezja monocytów, transformacja monocytów do makrofagów) oraz stres oksydacyjny wywołany różnymi czynnikami prowadzą do ograniczenia syntezy NO i mogą sprzyjać utlenianiu LDL. Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi dla analizy dwóch poprzednich modeli opisanych w tym rozdziale (patrz [30, 31]).

Ponadto wykazano, że dym tytoniowy stymuluje niemal wszystkie ścieżki w modelu. Przede wszystkim zapewnia dodatkowe czynniki prowadzące do dysfunkcji śródbłónka, takie jak modyfikacja profilu lipidowego czy przebudowa tkanki związana z dysplazją włóknisto-mięśniową. Przy tym dym tytoniowy sprzyja zaburzeniom stanów prozakrzepowych, które prowadzą do powstania zakrzepów, a w konsekwencji bezpośredniego promowania rozwoju miażdżycy. Wpływ palenia papierosów na rozwój miażdżycy opisano w poprzednim podrozdziale (patrz [31]).

Jednak analiza t-klastrów okazuje się być zbyt ogólna w kontekście badania zaburzeń w stanach prozakrzepowych i ich wpływu na rozwój miażdżycy. Niezbyt szczegółowe informacje zawarte są w biologicznych opisach klastrów c_6 , c_7 i c_{11} z Tabeli 3.12. Jak można zauważyć, klaster c_7 zawiera opis dodatniego sprzężenia zwrotnego tworzenia trombiny, natomiast opisy skupień c_6 i c_{11} dotyczą uszkodzeń śródbłónka oraz stanów zapalnych indukowanych poprzez trombinę. W celu uzyskania dodatkowych informacji o zaburzeniach w stanach prozakrzepowych wykonano bardziej szczegółową, manualną analizę wybranych t-niezmienników.

W pierwszej kolejności wykonano dokładną analizę t-niezmienników dotyczących zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia, który w zaproponowanym modelu składa się z trzech ścieżek dodatniego sprzężenia zwrotnego, jak pokazano na Rysunku 3.5. Analiza wykazała, że wybrane t-niezmienniki można pogrupować względem wystąpień poszczególnych ścieżek dodatniego sprzężenia zwrotnego, a więc można ocenić, które z nich wydają się być bardziej istotne z punktu widzenia struktury modelu. Wyróżniono następujące podprocesy:

1. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z trzech pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego (pętle sprzężenia zwrotnego prowadzące do aktywacji czynnika V, VIII i XI): spośród wszystkich t-niezmienników, istnieje tylko jeden, który odpowiada temu podprocesowi i stanowi on zaledwie 0,05% wszystkich t-niezmienników.
2. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z dwóch pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego (bez pętli sprzężenia zwrotnego prowadzącej do aktywacji czynnika XI): t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 33,7% wszystkich t-niezmienników.
3. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z jednej pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego (bez pętli sprzężenia zwrotnego prowadzącej do aktywacji czynnika VIII oraz

aktywacji czynnika XI): t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 33,9% wszystkich t-niezmienników.

Z powyższej analizy wybranych grup t-niezmienników wynika, że w kontekście struktury modelu, zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia składający się z trzech pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego jest najmniej ważny, gdyż stanowi tylko 0,05% wszystkich t-niezmienników. Natomiast zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia składający się z dwóch pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego oraz jednej pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego są zdecydowanie bardziej kluczowe, gdyż każdy z tych podprocesów stanowi około 34% wszystkich zamodelowanych podprocesów. Zatem te dwa podprocesy są w porównaniu do siebie równie ważne.

W drugiej kolejności rozważano t-niezmienniki odpowiadające podprocesom zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia prowadzącego do redukcji fibrynogenu do fibryny oraz podprocesowi zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia bez uwzględnienia wspomnianej redukcji fibrynogenu. Podobnie jak wcześniej wyróżniono następujące grupy t-niezmienników:

1. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z trzech pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, który nie prowadzi do redukcji fibrynogenu do fibryny: t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 0,05% wszystkich t-niezmienników.
2. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z dwóch pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, który nie prowadzi do redukcji fibrynogenu do fibryny: t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 26,7% wszystkich t-niezmienników.
3. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z jednej pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, który nie prowadzi do redukcji fibrynogenu do fibryny: t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 26,8% wszystkich t-niezmienników.
4. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z jednej pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, który prowadzi do redukcji fibrynogenu do fibryny: t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 7,13% wszystkich t-niezmienników.
5. Zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, składający się z dwóch pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, który prowadzi do redukcji fibrynogenu do fibryny: t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 7,03% wszystkich t-niezmienników.
6. Redukcja fibrynogenu do fibryny (bez obecności trzech pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego): t-niezmienniki odpowiadające temu podprocesowi stanowią 3,25% wszystkich t-niezmienników.

Opisane powyżej podprocesy promują tworzenie się skrzepów i mogą wpływać na rozwój miażdżycy. Niezależnie od tych podprocesów zamodelowany system obejmuje także inne mechanizmy zaangażowane w tworzenie zakrzepów, jak dym tytoniowy, który indukuje tromboksan A₂ i prowadzi do upośledzenia produkcji prostacykliny, co może prowadzić do blokowania naczyń wieńcowych i w efekcie sprzyjać powstawaniu zakrzepów (bezpośrednio wpływając na rozwój miażdżycy).

Dodatkowo przeprowadzono analizę t-niezmienników, w której rozważono intensywność zaangażowania trombin w mechanizmy stymulujące progresję miażdżycy. t-niezmienniki odpowiadające bezpośredniemu wpływowi trombin na kluczowe procesy zaangażowane w rozwój miażdżycy stanowią 23% wszystkich t-niezmienników. Poniżej określono dokładny podział:

1. Podproces dotyczący zaangażowania trombin w proliferację obejmuje 110 t-niezmienników, co stanowi 5,26% wszystkich t-niezmienników.

2. Podproces dotyczący zaangażowania trombiny w rozwój zapalenia obejmuje 1 t-niezmiennik, co stanowi 0,05% wszystkich t-niezmienników.
3. Podproces dotyczący zaangażowania trombiny w dysfunkcję śródbłonna obejmuje 5 t-niezmienników, co stanowi 0,24% wszystkich t-niezmienników.
4. Podproces dotyczący zaangażowania trombiny w aktywację płytek krwi obejmuje 364 t-niezmienniki, co stanowi 17,42% wszystkich t-niezmienników.

Analiza ta daje pogląd na to, jak zaburzenia w stanach protrombotycznych, ze szczególnym uwzględnieniem zewnątrzpochodnych szlaków krzepnięcia, wpływają na progresję miażdżycy.

3.4.4 Konkluzje

Zaproponowany model wpływu wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego na rozwój miażdżycy pozwala lepiej zrozumieć rolę układu homeostazy. W literaturze nie ma jasnych, klinicznych dowodów, które wskazywałyby rolę układu w progresji miażdżycy, chociaż wiele badań wskazuje, że układ krzepnięcia może wpływać na jej rozwój. Analiza modelu opartego o sieci Petriego opiera się o klasyczne metody analizy. Jednak w odróżnieniu od wcześniej opisanych analiz, w tym przypadku obok analizy zbiorów MCT i analizy t-klastrów przeprowadzono także manualną analizę wybranych t-niezmienników.

Analiza t-klastrów wyodrębniła główne podprocesy i mechanizmy zaangażowane w rozwój miażdżycy oraz pozwoliła na potwierdzenie pewnych zależności zachodzących między modelowanymi podprocesami, w tym wykazała jak bardzo zaangażowany w rozwój miażdżycy jest dym tytoniowy. Istotnymi podprocesami, zgodnymi z literaturą, są: stres oksydacyjny i procesy zapalne. W ogólności, wspomniane procesy prowadzą do powstania blaszki miażdżycowej, a w stanach patologicznych nawet do jej pęknięcia i rozpoczęcia aktywacji kaskady krzepnięcia, która może być dodatkowo stymulowana zaburzeniami w stanach prozakrzepowych.

Analiza t-klastrów nie pozwala jednak na uzyskanie informacji o zależnościach związanych z zaburzeniami w stanach prozakrzepowych, w związku z tym przeprowadzono manualną analizę wybranych t-niezmienników, zwaną także bardziej szczegółową analizą poszczególnych t-niezmienników. Analiza ta potwierdziła, że proces krzepnięcia, który prowadzi do tworzenia trombiny, może przebiegać prawidłowo nawet bez dwóch ścieżek dodatniego sprzężenia zwrotnego. Ponadto, niektóre z t-niezmienników pokazują, że redukcja fibrynogenu do fibryny przez trombinę nie jest konieczna do promowania tworzenia zakrzepów. Wynika to z faktu, że zaproponowana sieć Petriego zawiera także inny mechanizm, który może prowadzić do powstania zakrzepu. Analiza wybranych t-niezmienników niewątpliwie daje dokładniejszy pogląd na to, jak zaburzenia w stanach protrombotycznych wpływają na rozwój miażdżycy. Dokładniej rzecz ujmując, pozwoliła oszacować intensywność zaangażowania trombiny w mechanizmy stymulujące progresję miażdżycy z uwzględnieniem podziału na konkretne mechanizmy.

Zastosowanie podejścia systemowego do wybranych aspektów stanu prozakrzepowego indukowanego tytoniem pozwala na lepsze zrozumienie miażdżycy i zależności między jej ważnymi podprocesami. Jednak przede wszystkim ukazuje, że klasyczne metody analizy, bez dokładnej manualnej analizy t-niezmienników pozwalają raczej na wyróżnienie istotnych mechanizmów, bez uzyskania informacji o głębszych zależnościach. Może być to spowodowane faktem, że na ponad dwa tysiące t-niezmienników do jednego klastra trafia większość z nich. Jednak opisana sytuacja nie jest pod tym względem wyjątkowa, jest raczej pewną tendencją, którą można zaobserwować przy analizie t-klastrów złożonych systemów biologicznych.

3.5 Dalsze motywacje

Perspektywy dalszych prac można podzielić na te dotyczące kontekstu biologicznego i te skupiające się na kontekście metodologicznym. W rozdziale 3 przedstawiono trzy zaproponowane modele oparte o klasyczne sieci Petriego, tj.:

- 1) model wpływu uszkodzeń śródbłonka na rozwój miażdżycy (właściwości: 64 miejsca, 95 tranzycji, 8481 t-niezmienników, 19 zbiorów MCT, 20 t-klastrów) [30],
- 2) model wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonka i rozwój miażdżycy (właściwości: 85 miejsc, 116 tranzycji, 5344 t-niezmienniki, 21 zbiorów MCT, 18 t-klastrów) – model rozszerzony, uwzględniający dodatkowe czynniki ryzyka [31],
- 3) model wpływu wybranych aspektów stanów protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego na rozwój miażdżycy (właściwości: 106 miejsc, 145 tranzycji, 2090 t-niezmienników, 31 zbiorów MCT, 19 t-klastrów) [98].

Zaznaczyć należy fakt, że zaproponowane modele są jak najlepszym odwzorowaniem rzeczywistości. Jednak przybliżenie jest wypadkową dostępnej wiedzy, a także ograniczeń metodologicznych, które pojawiają się m.in. w kontekście tworzenia modeli opartych o klasyczne sieci Petriego. W opisanym rozdziale autor przedstawił sposób radzenia sobie z reakcjami hamującymi (mechanizmami zmniejszającymi ilość wybranych pasywnych komponentów), tak aby móc uwzględnić je w analizie.

W celu przeprowadzenia analizy wyżej wymienionych zjawisk biologicznych zastosowano klasyczne metody analizy tj., analizę zbiorów MCT i analizę t-klastrów, a także analizę wybranych t-niezmienników.

Wyniki biologiczne uzyskane na drodze tych analiz nie są nadzwyczaj odkrywcze, są natomiast bezpośrednim potwierdzeniem znanej wiedzy dostępnej w literaturze. Można zatem stwierdzić, że klasyczne metody analizy pozwalają oszacować, które z zamodelowanych podprocesów są bardziej istotne niż inne, a tym samym nakierować dalsze analizy na konkretny obszar badanego zjawiska. Niewątpliwie w celu odkrycia ciekawych, nieznanych dotąd właściwości modelowanych systemów należy rozważyć bardziej szczegółowe analizy. W związku z tym wykonano manualną analizę t-niezmienników (przeprowadzona dla modelu zaburzeń stanów protrombotycznych). Okazuje się, że na jej podstawie można określić, które podprocesy są bardziej kluczowe od innych, z dokładnym ujęciem ich stosunku względem wszystkich t-niezmienników – daje to znacznie głębszy wgląd w analizowany system. Co więcej, wydaje się, że taka analiza pozwala wysnuwać wnioski, że pewne procesy zachodzą częściej niż inne. Jedynym ograniczeniem tej analizy jest fakt, że jest zależna od liczby t-niezmienników, co nie jest trywialne nawet w sytuacji ograniczenia analizy tylko do wybranych t-niezmienników. Niemniej jednak opracowane modele stanowią dużą wartość dodaną dla usystematyzowania wiedzy badanych zjawisk biologicznych.

Niezaprzeczalnie prace opisane w tym rozdziale pokazują potrzebę stosowania rozszerzonych metod analizy, dlatego też kolejny rozdział rozprawy, obok istniejących rozszerzonych metod analizy, zawiera także propozycje własne na przeprowadzenie głębszych analiz.

Rozdział 4

Zaproponowane modele systemów biologicznych opartych na sieci Petriego i ich analiza na podstawie rozszerzonych metod

4.1 Wprowadzenie

Klasyczne metody analizy modeli złożonych systemów biologicznych opisanych formalizmem sieci Petriego bezsprzecznie umożliwiają uporządkowanie wiedzy na temat badanych zjawisk, jednak nie zawsze pozwalają odkryć ich nieznane dotąd własności. Z drugiej strony, metody te pozwalają podzielić sieć na mniejsze funkcjonalne fragmenty oraz znaleźć kluczowe mechanizmy, a ta wiedza pozwala ograniczyć dalsze poszukiwania do konkretnych obszarów badanych systemów biologicznych. Chcąc zatem wydobyć dokładniejsze informacje potrzebne są bardziej wyrafinowane metody analizy.

W tym rozdziale obok istniejących rozszerzonych metody analizy przedstawiono także propozycje własne dla zastosowanych istniejących, rozszerzonych metod oraz zaproponowano metody alternatywne. Wspomniane metody badano na przykładzie modeli opartych o klasyczne sieci Petriego dla problemów nie tylko bezpośrednio powiązanych z rozwojem miażdżycy.

Podrozdział 4.2 zawiera model i analizę wpływu interleukiny 18 (IL-18) na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy. Wyróżniono dwa szlaki syntezy IL-18: szlak zależny od kaspazy 1 i szlak od niej niezależny. Model pozwolił na określenie interesujących zależności między IL-18 a różnymi typami makrofagów, co było możliwe po przeprowadzeniu manualnej analizy wybranych t-niezmienników. Wyniki potwierdziły, że analiza t-klastrów może być zbyt zgrubna, by umożliwić znalezienie ciekawych własności modelowanego systemu. Efekty tej pracy opublikowano w artykule [64]. W ramach tej pracy autor, w oparciu o istniejący model, zaproponował modyfikacje własne oraz doprowadził do pokrycia przez t-niezmienniki (własności koniecznej do przeprowadzenia analiz opisywanych w niniejszej pracy), wykonał jego analizę w oparciu o istniejące, klasyczne metody analizy, rozszerzoną metodę knockoutu strukturalnego oraz przeprowadził bardziej dokładną analizę wybranych t-niezmienników, a następnie zinterpretował wyniki w konsultacji ze współautorami.

Podrozdział 4.3 zawiera model i analizę relacji między żelazem a niedoborem witaminy A, co stanowi najbardziej powszechny niedobór żywieniowy na całym świecie. Zaproponowany model nie jest bezpośrednio związany z badaną do tej pory miażdżycą, ale jego zrozumienie jest istotne

i może być powiązane z miażdżycą. Już w 1981 roku dr Jerome Sullivan sformułował "Hipotezę żelaza", zgodnie z którą sugeruje się, iż wyższy poziom zmagazynowanego żelaza sprzyja chorobom sercowo-naczyniowym, podczas gdy niedobór żelaza może mieć działanie chroniące przed miażdżycą [282, 312]. Jak można się spodziewać, hipoteza stała się podstawą do przeprowadzenia szeregu badań i zarówno badania przedkliniczne jak i kliniczne dostarczają sprzecznych wyników [312]. Wydaje się zatem uzasadnione lepsze zrozumienie homeostazy żelaza. Wspomniany model relacji pomiędzy homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A oraz jego analiza zostały opublikowane w artykule [100]. W ramach tej pracy autor zaproponował model oparty o sieci Petriego, wykonał jego analizę w oparciu o istniejące, klasyczne metody analizy, o rozszerzoną analizę jaką jest symulacja knockout, a także o zaproponowaną analizę ważności, a następnie zinterpretował wyniki w konsultacji ze współautorami. Istotnym jest, że wykorzystane metody pozwoliły rozstrzygnąć nieścisłości pojawiające się w literaturze.

Podrozdział 4.4 zawiera model i analizę powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej, a zatem relacji między miażdżycą a tętniakami. Na przykładzie tego modelu obok zaproponowanej analizy ważności, wykonano także porównawczą analizę knockout oparte o dwa modele. Podejście tego typu nie było wcześniej zastosowane. Efekty tej pracy zostały opublikowane w artykule [105], która rozszerza wersję modelu przedstawionego w pracy [75]. W ramach tej pracy autor utworzył model oparty o sieci Petriego w oparciu o utworzony model koncepcyjny współautora, wykonał jego analizę w oparciu o istniejące, klasyczne oraz rozszerzone metody analizy, a także w oparciu o zaproponowane, własne metody analizy i rozszerzenia istniejących metod tj., analizę ważności, porównawczą analizę ważności i porównawczą analizę knockout na bazie dwóch modeli. Analizy te oraz interpretacja wyników została wykonana w konsultacji ze współautorami.

Podrozdział 4.5 zawiera model i analizę relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w naciśnieniu pierwotnym. Nie jest to temat związany z miażdżycą, jednak zmiana kontekstu podyktowana została pandemią koronawirusa SARS-CoV-2, która rozpoczęła się w 2019 roku i skupiła uwagę naukowców na całym świecie. Celem zawarcia wyników tych badań w niniejszej pracy jest przede wszystkim uwydatnienie możliwości porównawczej analizy ważności ze znacznymi różnicami między badanymi dwoma modelami. W odróżnieniu od analizy opisanej w podrozdziale 4.4, analiza modelu infekcji wirusowej pozwoliła nie tylko na wyróżnienie nieznacznych różnic, ale także różnic znaczących. Ponadto, te znaczące różnice, zwane także różnicami istotnymi, mogą być dodatnie (większe od zera) lub ujemne (mniejsze od zera). Ich znaczenie biologiczne zostało dokładnie zinterpretowane. Zatem opisane wyniki są istotne dla pełnego zrozumienia zaproponowanej porównawczej analizy ważności. Ponadto, opisywane metody są stosowalne do wszelkich złożonych systemów biologicznych, niezależnie od rozważanego kontekstu. Badania te zostały opublikowane w artykule [65]. W ramach tej pracy autor wprowadził nieznaczne poprawki do istniejącego modelu (zaproponowanego przez współautorkę artykułu), tak aby możliwe było wykonanie analiz porównawczych. Autor wykonał porównawczą analizę ważności dla wszystkich t-niezmienników oraz wyselekcjonowanych, powiązanych tylko z infekcją wirusową (zbiór t-niezmienników wyselekcjonowanych został wyznaczony przez współautora), porównawczą analizę ważności dla modelu pełnego (z wirusem) oraz modelu bez wirusa, co pozwoliło na detekcję znaczących różnic oraz symulację knockout. Interpretacja wyników została wykonana w konsultacji ze współautorami.

W podrozdziale 4.6 zawarto podsumowanie ze szczególnym wyróżnieniem efektów uzyskanych za pomocą rozszerzonych analiz, w tym zarówno zaproponowanych rozszerzeń istniejących metod jak i własnych, alternatywnych metod. Obok wyników nakreślono także motywację dalszych prac.

Celem lepszego zrozumienia zarówno zaproponowanych rozszerzeń dla znanych metod analizy oraz rozwiązań własnych, poniżej opracowano opisy i definicje. Ten rozdział nie powiela jednak

znanych definicji opisanych w podrozdziale 2.2.

Analiza ważności opiera się na liczbie wystąpień pojedynczej tranzycji (procesu elementarnego) we wsparciach t-niezmienników (podprocesów). Poniżej opisano definicję ważności, która jest wyznaczana w rezultacie analizy ważności (definicja 4.1.1).

Definicja 4.1.1 (Ważność). Ważność wyznaczana jest dla pojedynczej tranzycji za pomocą wzoru $\frac{f}{Wt}$, gdzie f to liczba wsparć t-niezmienników zawierających daną tranzycję, a Wt to liczba wsparć wszystkich t-niezmienników. Ważność jest oznaczana jako *tranz./t-inw.* lub może być oznaczona jako [%] czyli odsetek wsparć t-niezmienników, które zawierają daną tranzycję, tj., $\frac{f \cdot 100}{Wt}$ [%].

Analiza ważności pozwala wyróżnić, które procesy elementarne są bardziej kluczowe dla funkcjonowania modelowanego systemu niż inne. Oprócz określenia najistotniejszych tranzycji można określić również te nieistotne.

Co istotne, analiza ważności jest spójna z analizą knockout (patrz definicja 2.2.13 w rozdziale 2) dla pojedynczej tranzycji. Oznacza to, że ważność tranzycji przekłada się na procent wyłączonych t-niezmienników w wyniku wyłączenia tej tranzycji. Kolejnym ważnym faktem, powiązanim z analizą ważności jest to, że do jej zastosowania spełnione powinno być założenie o pokryciu sieci przez t-niezmienniki, zgodnie z którym każda tranzycja występuje w co najmniej jednym ze wsparć t-niezmienników.

Analiza ważności dostarcza ważnych wyników strukturalnych i można na niej oprzeć dalsze analizy. Jednak jak wiele innych metod, również ta, ma pewne ograniczenia, które w tym przypadku wynikają ze struktury modelu i wspomnianej wcześniej własności, tj. pokrycia sieci. Właściwość ta wymusza pewną konkretną strukturę, która warunkuje, że model ma pewien początek lub początki będące tranzycjami źródłowymi nieposiadającymi miejsc poprzedzających, ale posiadającymi miejsca następujące oraz koniec lub końce będące tranzycjami wyjściowymi posiadającymi miejsca poprzedzające, ale nieposiadającymi miejsc następujących. Wspomnianym ograniczeniem w analizie ważności są tranzycje wyjściowe, gdyż z uwagi na brak dalszych powiązań, nie umożliwiają przepływu tokenów. Jeśli tranzycje nie wpływają bezpośrednio lub pośrednio na inne modelowane mechanizmy, wówczas charakteryzują się niską ważnością. Ważność danej tranzycji będzie tym większa w im więcej zaangażowanych jest podprocesów. Jeśli pewna tranzycja, a raczej odpowiadający jej proces elementarny, jest zaangażowany w większość mechanizmów badanego systemu biologicznego to będzie on dużo bardziej ważny dla jego funkcjonowania niż reakcja zaangażowana w jeden podproces lub reakcja modelowana jako tranzycja wyjściowa. Oczywiście istota tranzycji wyjściowych nie wyklucza, że takie tranzycje mogą mieć istotne znaczenie pod kątem aspektów biologicznych. Co więcej, są przypadki, w których tranzycje wyjściowe są niezwykle istotne dla poprawnego funkcjonowania systemu, ale pomimo tego są zidentyfikowane przez analizę ważności jako nieważne strukturalnie i wiąże się to tylko i wyłącznie z brakiem miejsc następujących. Przykładem takich procesów elementarnych są reakcje degradacji.

Pomimo tego ograniczenia można analizę ważności stosować z powodzeniem w kontekście wykrycia najbardziej kluczowych procesów elementarnych, a w przypadku porównawczej analizy ważności, także do określenia wpływu wybranego podprocesu/modułu na pozostałe zamodelowane procesy. Do tego analiza ta wykazała interesujący potencjał jako analiza komplementarna do analizy wrażliwości, metody analizy modeli opartych o równania różniczkowe zwyczajne, co rozważono w rozdziale 6 tej rozprawy.

Porównawcza analiza ważności wraz z istotnymi różnicami, jak wskazuje nazwa, dotyczy analizy ważności przeprowadzonej dla co najmniej dwóch modeli opartych o klasyczne sieci Petriego. Pierwszy model, dotyczy przedmiotu zainteresowań, a więc pełnego badanego systemu i

z tego powodu zwany jest *modelem pełnym*. Drugi model jest wariantem *modelu pełnego* pozbawionego pewnego konkretnego modułu/podprocesu, którego rolę chce się zbadać. Podejście to pozwala ocenić jak zmienia się ważność (rośnie/maleje) pod wpływem modułu, który został pominięty w *modelu zredukowanym*.

Analiza porównawcza dostarcza informacji o ważności dla każdej tranzycji z *modelu pełnego* oraz z *modelu zredukowanego*, jednak aby przeprowadzić poprawne wnioskowanie powinno być spełnione założenie o pokryciu sieci przez t-niezmienniki w obu tych przypadkach. Spełnienie tego założenia oznacza, że t-niezmienniki, które nie są powiązane z badanym podprocesem, pominiętym w sieci zredukowanej, nie ulegają zmianie, są dokładnie takie same w obu modelach. Innymi słowy, t-niezmienniki *modelu pełnego* są to wszystkie t-niezmienniki *modelu zredukowanego* plus t-niezmienniki wyłącznie powiązane z analizowanym podprocesem – pominięty w *modelu zredukowanym*. Zgodnie z tym, liczba t-niezmienników *modelu zredukowanego* jest pomniejszona dokładnie o liczbę t-niezmienników powiązanych z analizowanym podprocesem (pominiętym w *modelu zredukowanym*). Przez t-niezmienniki powiązane z pominiętym podprocesem rozumie się tylko te, które w swoich wsparciach zawierają tranzycje będące elementami analizowanego podprocesu.

W wyniku analizy porównawczej obok ważności dla *modelu pełnego* oraz *modelu zredukowanego* otrzymujemy różnicę pomiędzy tymi ważnościami i jest ona wyrażona w punktach procentowych. Na tym etapie analizy należy odpowiedzieć na pytanie, jak duże różnice można zidentyfikować jako znaczące dla naszego modelu. Na dalsze potrzeby opisu tej analizy określimy tę wartość jako *wartość progową* (również wyrażaną w punktach procentowych). Wspomniana *wartość progowa*, tak jak w przypadku wielu analiz, jest ściśle związana z naturą badanego zjawiska. Znaczące różnice ważności określone przez *wartość progową* mogą być dodatnie i ujemne. Zwróćmy zatem uwagę na możliwe scenariusze wyników:

- 1) nieznacząca różnica: $-wartość\ progowa < różnica < wartość\ progowa$
- 2) znacząca dodatnia różnica: $różnica \geq wartość\ progowa$
- 3) znacząca ujemna różnica: $różnica \leq -wartość\ progowa$

Znaczącym różnicom ważności przypisuje się następującą interpretację:

1. Znacząca dodatnia różnica

Tranzycja charakteryzująca się znaczącą dodatnią różnicą oznacza, że jej ważność, a tym samym odpowiadającego jej elementarnego procesu, jest większa w *modelu pełnym*, a mniejsza w *modelu zredukowanym*.

Wydaje się, że jeśli ważność danej tranzycji rośnie w *modelu pełnym* to odpowiadający tej tranzycji proces elementarny jest dodatkowo stymulowany przez analizowany podproces pominięty w *modelu zredukowanym* lub stymuluje on wiele mechanizmów powiązanych z analizowanym podprocesem. Można zatem powiedzieć, że im większa jest znacząca dodatnia różnica ważności, tym dany proces elementarny jest bardziej związany z analizowanym procesem/modułem.

2. Znacząca ujemna różnica

Tranzycja charakteryzująca się znaczącą ujemną różnicą oznacza, że jej ważność, a tym samym odpowiadającego jej elementarnego procesu, jest mniejsza w *modelu pełnym*, a większa w *modelu zredukowanym*.

Wydaje się, że jeśli ważność danej tranzycji maleje w *modelu pełnym* to odpowiadający tej tranzycji proces elementarny może być osłabiony przez analizowany podproces, pominięty w

modelu zredukowanym lub jego znaczenie może być przysłonięte przez inne ważne procesy w *modelu pełnym*. Można zatem powiedzieć, że im większa jest znacząca ujemna różnica ważności (im mniejsza od zera), tym dany proces elementarny jest mniej powiązany z analizowanym procesem/modułem.

Inną porównawczą analizą jest **porównawcza analiza knockout**. Zasadnicza różnica między porównawczą analizą ważności a porównawczą analizą knockout jest taka sama, jak w przypadku analizy ważności i analizy knockout – ta pierwsza dotyczy pojedynczych tranzycji (procesów elementarnych), podczas gdy ta druga dotyczy zbiorów tranzycji (podprocesów/modułów). Podobnie jest w przypadku analiz porównawczych, porównawcza analiza ważności pozwala wykrywać różnice ważności dla poszczególnych tranzycji pod wpływem jakiegoś badanego podprocesu, podczas gdy porównawcza analiza knockout pozwala wykrywać różnice ważności dla większych podprocesów czy modułów. Obie analizy pozwalają na uzyskanie ciekawych informacji strukturalnych. W tym miejscu należy zaznaczyć, że moduły są to zbiory procesów elementarnych, zatem ważność danego modułu jest powiązana z ważnością jego składowych. Jednakże, często pojawiają się sytuacje, w których tranzycje należące do tego samego modułu należą jednocześnie do tych samych wsparć t-niezmienników, a zatem łączy je pewna część wspólna wsparć, do których należą. Z tego powodu należy oddzielnie analizować pojedyncze tranzycje jak i zbiory tranzycji.

Pomimo iż celem niniejszego rozdziału jest ocena rozszerzonej metody analizy, to w dużej liczbie przypadków poprzedza je także klasyczna analiza. Jednak w analizie niektórych modeli zrezygnowano z analizy t-klastrów, gdyż nie wносиła ona znaczących rezultatów. Ponadto, okazuje się, że zaproponowane metody analizy (analiza ważności i analizy porównawcze wykorzystujące dwa modele z zachowaniem pokrycia sieci przez t-niezmienniki) umożliwiają wykonanie kompleksowych analiz w sytuacji, gdy liczba t-niezmienników jest wyjątkowo duża i nie jest możliwe przeprowadzenie innych analiz.

4.2 Bardziej dokładna analiza t-niezmienników – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy

Celem niniejszego podrozdziału jest przedstawienie zaproponowanego modelu opartego o klasyczne sieci Petriego dotyczącego wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy oraz jego analiza. Do analizy matematycznego modelu, obok klasycznych metod analizy opartych o zbiory MCT i analizę t-klastrów, wykonano bardziej dokładną analizę t-niezmienników. Badany system dotyczy wpływu interleukiny 18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy. IL-18 jest jedną z prozapalnych cytokin wydzielanych przez makrofagi, co sugeruje, że pełni ważne funkcje fizjologiczne i immunologiczne. Pierwotnie, IL-18 została zidentyfikowana jako czynnik indukujący interferon gamma, a obecnie jest nazywana wielofunkcyjną cytokiną, która odgrywa rolę w regulacji wrodzonych i adaptacyjnych odpowiedzi immunologicznych. Z tego względu istotne jest zbadanie udziału IL-18 w procesach immunozapalnych leżących u podstaw miażdżycy. Okazuje się, że bardziej dokładna analiza t-niezmienników pozwala na odkrycie interesujących zależności, których odkrycie nie jest możliwe przy zastosowaniu klastrowania t-niezmienników.

4.2.1 Tło biologiczne

Wielokrotnie zaznaczano, iż miażdżycza jest przewlekłą chorobą wywołaną zatrzymaniem lipidów w ścianach tętnic i jest wynikiem złożonych interakcji wielu szlaków biologicznych, w tym prze-

wlekłych stanów zapalnych. Jedną z cytokin zapalnych, odpowiedzialną za destabilizację blaszki miażdżycowej, jest interleukina-18. W niniejszym badaniu skupiliśmy się na zależnościach między IL-18, cytokiną odpowiedzialną za szkodliwy wpływ tworzenia i pęknięcia blaszek miażdżycowych [71, 175], a makrofagami charakteryzującymi się dużą heterogenicznością i wszechstronnością odpowiedzi immunologicznej. Ogólna funkcjonalność makrofagów ma kluczowe znaczenie dla równowagi między progresją a regresją blaszki miażdżycowej [17]. Mogą one polaryzować się na różne fenotypy funkcjonalne w odpowiedzi na odmienne sygnały środowiskowe (np. produkty drobnoustrojów, uszkodzone komórki, aktywowane limfocyty) lub w różnych stanach patologicznych. Wyróżnić można w dużej ogólności prozapalny podtyp M1, znany również jako klasycznie aktywowany oraz przeciwzapalny podtyp M2 znany, jako alternatywnie aktywowany [141]. Opis kontekstu biologicznego podzielono na moduły zgodne ze schematem zależności przedstawionym na Rysunku 4.1. Każdy moduł jest opatrzony symbolem $a) - y)$ – oznaczenia te są zgodne z blokami znajdującymi się na modelu opartym o sieci Petriego przedstawionym na Rysunku 4.2.

1. Szlak JAK-STAT stymulowany przez $IFN\gamma$ (moduł a)

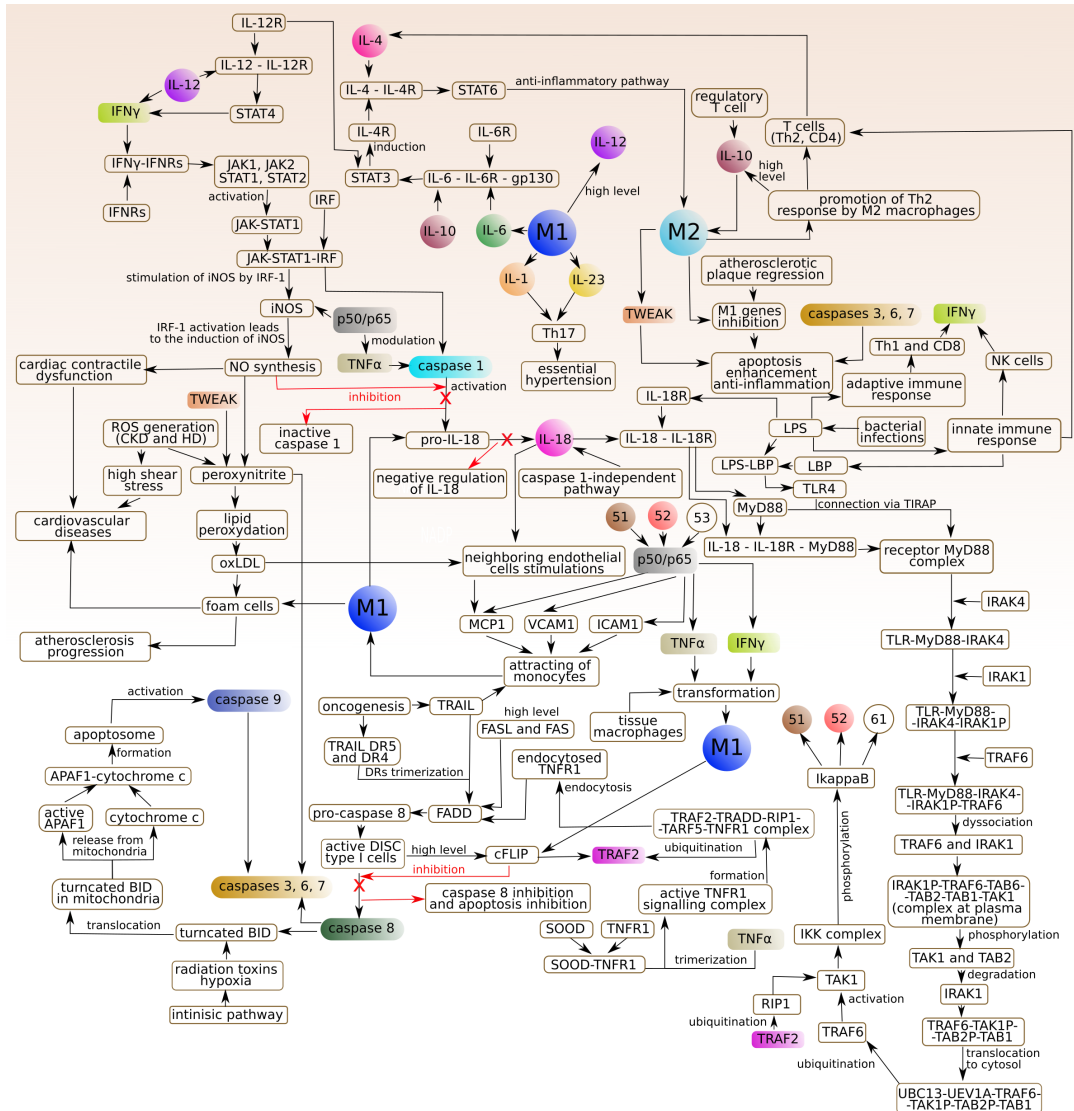
$IFN\gamma$ wyzwała przeciwwirusową i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną poprzez ścieżkę sygnałową JAK-STAT, która jest wysoce konserwatywną wewnątrzkomórkową ścieżką sygnałową zapewniającą prostą i bezpośrednią drogę od receptorów błonowych do jądra w celu pośredniczenia w odpowiedziach komórkowych dla licznych cytokin [80, 173, 280]. Szlak transdukcji sygnału JAK-STAT jest odpowiedzialny za przekazywanie sygnałów ponad pięćdziesięciu cytokin [107].

2. Wrodzona odpowiedź immunologiczna i zakażenie bakteriami Gram-ujemnymi (moduł b i d)

Odporność wrodzona stanowi pierwszą linię obrony przed drobnoustrojami i opiera się na rodzinie receptorów rozpoznających wzorce (receptory PRR). Niektóre z unikalnych składników ściany komórkowej bakterii stymulują komórki odpornościowe i służą jako wzorce molekularne związane z patogenami, rozpoznawane przez poszczególne receptory Toll-podobne (TLR). Lipopolisacharyd (LPS) jest odpowiedzialny za większość patogennych zjawisk związanych z zakażeniem bakteriami Gram-ujemnymi. Jest uwalniany z bakterii Gram-ujemnych i wiąże się z białkiem wiążącym LPS (LBP), białkiem ostrej fazy obecnym w krwiobiegu, a następnie z CD14, białkiem znajdującym się na powierzchni fagocytów. LPS jest następnie przenoszony do MyD2, który wiąże się z zewnątrzkomórkową częścią TLR4, po czym następuje oligomeryzacja TLR4. Skutkuje to inicjacją odpowiedzi immunologicznej [288]. W dalszej kolejności, w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne dochodzi do łączenia MyD88 z TLR4, a następnie do produkcji prozapalnych cytokin [297]. Indukowana przez cytokiny aktywacja NF- κ B zostaje przeprowadzona na ścieżce fosforylacji κ B przez kompleks receptorów MyD88 [288, 304]. Ponadto, LPS indukuje aktywację nie tylko odporności wrodzonej, ale także nabytej [213]. Częścią wrodzonej odpowiedzi odpornościowej są komórki NK (“naturalni zabójcy”) [231, 260]. Komórki NK produkują $IFN\gamma$, podobnie jak komórki Th1. Co więcej, komórki Th1 wydzielają czynnik martwicy nowotworu (TNF), podczas gdy komórki Th2 produkują IL-4 [33].

3. Translokacja p50/p65 do jądra w makrofagach M1, komórkach mięśni gładkich (SMC) i komórkach śródbłonna (EC) (moduł c)

Makrofagi M1 odpowiadają na heterodimer czynnika transkrypcyjnego NF- κ (p50/p65). Gdy p50/p65 zostanie przeniesiony do jądra, aktywuje polaryzację M1 i umożliwia ekspresję mediatorów prozapalnych [84].



RYSUNEK 4.1: Schemat zjawisk leżących u podstaw powstawania zmian miażdżycowych z uwzględnieniem roli IL-18. Elementy oznaczone tym samym kolorem i nazwą odpowiadają tej samej cząsteczce (miejscu logicznemu). Element oznaczony "51" odpowiada kompleksowi p50/p65 i ufosforylowanemu I κ B w makrofagach. Element "52" odpowiada heterodimerowi czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (p50/p65) we wczesnej fazie aktywowanych komórek śródbłonna (EC) w miażdżycy. Element "53" odpowiada heterodimerowi czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (p50/p65) we wczesnej fazie aktywowanych komórek mięśni gładkich (SMC). Element "61" odpowiada kompleksowi p50/p65 i ufosforylowanemu I κ B w SMC. Element "p50/p6" odpowiada translokacji p50/p60 do jądra w makrofagach M1, SMC oraz EC. Rysunek pochodzi z pracy [64].

4. Aktywacja NF- κ B – szlak kanoniczny spowodowany fosforylacją I κ B α przez IKK, ścieżka sygnałowa zależna od MyD88 (moduł e)

NF- κ B reprezentuje rodzinę czynników transkrypcyjnych obecnych we wszystkich komórkach eukariotycznych, które regulują ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedzi immunologiczne i regulację cyklu komórkowego [164, 204]. NF- κ B jest aktywowany zarówno przez ścieżkę zależną od MyD88, jak i niezależną od MyD88, związaną ze szlakami sygnałowymi TLR4. Do aktywacji NF- κ B dochodzi poprzez fosforylację i degradację inhibitora NF- κ B (I κ B) przez kompleks IKK, co pozwala na translokację NF- κ B do jądra.

5. Aktywacja kaspazy 1 (przez TNF, a także przez wiązanie IRF1 z sekwencjami SBE) (moduł f)

Kaspaza 1 odgrywa ważną rolę we wrodzonej odporności i chorobach zapalnych, ponieważ jest

niezbędna do powstawania aktywnych form cytokin z ich prekursorów: pro-IL-1 β i pro-IL-18. Aktywacja kaspazy 1 jest ściśle kontrolowana przez wielobiałkowe kompleksy – inflamasomy [275]. Geny kodujące kaspazę 1 to geny docelowe IRF1, który jest aktywowany przez wiele cytokin, w tym IFN i TNF, a także składniki bakteryjne. W początkowej sygnalizacji pośredniczy szlak JAK-STAT1, prowadzący do aktywacji promotora IRF1 przez STAT i czynniki transkrypcyjne NF- κ B. Kiedy sygnał jest transdukowany przez receptor IFN, ufosforylowany STAT1 przemieszcza się do jądra, gdzie indukuje transkrypcję genów odpowiedzi na IFN γ [264].

6. Synteza IL-18 – szlak zależny od kaspazy 1 (moduł g)

Kaspaza 1 wyzwalana przez stymulację TNF α [130], sprzyja konwersji pro-IL-18 w dojrzałą, biologicznie aktywną formę [48, 265].

7. Tworzenie kompleksu IL-18–IL-18R (moduł h)

W funkcji IL-18 pośredniczy wiązanie z receptorem IL-18 (IL-18R), który zawiera dwie podjednostki: IL-18R α (łańcuch wiążący ligand) i IL-18R β (łańcuch przewodzący sygnał) [311]. Ekspresja IL-18R jest zwiększana przez LPS [2].

8. Negatywna regulacja IL-18 (moduł i)

Negatywna regulacja IL-18 związana z hamowaniem kaspazy 1 przez tlenek azotu. NO indukuje S-nitrozylację NLRP3 i kaspazy 1 oraz zapobiega powstawaniu inflamasomu (którego rolą jest aktywacja kaspazy 1) [176].

9. Synteza NO (moduł j)

NO reguluje stopień skurczu komórek mięśni gładkich naczyń. NO wytwarzane jest w ścianie naczyń krwionośnych, głównie z L-argininy przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS), ale może być również uwalniana nieenzymatycznie z S-nitrozotoli lub z azotanów/azotynów [320]. W warunkach fizjologicznych ekspresja indukowalnego NOS (iNOS) jest minimalna, ale stwierdzono, że indukuje ją infekcja, przewlekły stan zapalny i nowotwory. Jego aktywacja wymaga IRF1 i NF- κ B [45]. NO może pełnić dualną rolę w procesie rozwoju miażdżycy zależną od jego stężenia o czym wielokrotnie wspomniano we wcześniejszym rozdziale.

10. Choroba układu krążenia pod wpływem szlaku zależnego od NO (moduł k)

iNOS może mieć istotny, przewlekły, szkodliwy wpływ na mięsień sercowy spowodowany zwiększoną produkcją NO lub, co bardziej prawdopodobne, spowodowany nadtlenoazotynem [266].

11. Ubikwitynacja TRAF2 i RIP1 (moduł l)

RIP1 jest cząsteczką o podwójnej funkcji, która może sprzyjać przetrwaniu lub sprzyjać śmierci komórki w zależności od stanu ubikwitynacji. W przypadku braku ubikwitynacji, RIP1 służy jako proapoptotyczna cząsteczka sygnałowa poprzez angażowanie kaspazy 8. Można powiedzieć, że RIP1 służy jako niezależny od NF- κ B przełącznik śmierci komórkowej na wczesnym etapie sygnalizacji TNF [205].

12. Polaryzacja makrofagów – wybrane zagadnienia (moduł m)

Polaryzacja makrofagów M1/M2 jest wyzwalana przez sygnały obecne w otaczającym środowisku i to one determinują końcowy stan aktywacji polaryzacji makrofagów. Istotne jest, że po ekspozycji M2 na sygnały M1 lub M1 na sygnały M2, może wystąpić re-polaryzacja (przełączanie się typów) [234, 318]. Makrofagi odgrywają ważną rolę w organizmie, w tym modelu rozważa się ich rolę w procesie

rozwoju miażdżycy, co dokładnie opisano już w rozdziale poprzednim. Rozróżnia się dwa typy makrofagów: makrofagi klasycznie aktywowane – M1, oraz alternatywnie aktywowane – M2 [304].

- Makrofagi M1 (stymulowane przez $IFN\gamma$ i $TNF\alpha$), są głównie zaangażowane w produkcję cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-12 i IL-23. Aktywacja typu M1 wiąże się z aktywacją kaspazy 1 i konwersją pro-IL-18 do aktywnej IL-18.
- Makrofagi M2 są głównie zaangażowane w produkcję cytokin przeciwzapalnych, m.in. IL-10. IL-10 wzmacnia fenotyp makrofagów M2 indukowanych przez IL-4. IL-4 działa poprzez kompleks z receptorem IL-4 (IL-4–IL-4R), który aktywuje STAT6, podczas gdy IL-10 promuje fenotyp M2 poprzez aktywację STAT3 przez receptor IL-10 [35].

13. Peroksydacja lipidów (moduł n)

NO jest zaangażowany w redukcję anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenoazotynu. Mechanizm ten jest ściśle związany z utlenianiem LDL i wytwarzaniem utlenionej lipoproteiny o niskiej gęstości – oxLDL [200].

14. Synteza IL-18 – szlak niezależny od kaspazy 1 (moduł o)

W syntezie IL-18 może pośredniczyć kaspaza 8. Zależność tę wykryto poprzez bardziej szczegółową analizę t-niezmienników (patrz paragraf 4.2.3 Analiza i wyniki).

15. Regulacja sygnalizacji TNFR1 (moduł p)

TNFR1 ma działanie plejotropowe, takie jak indukcja apoptozy i aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Stymulacja TNF indukuje wiązanie kompleksu TRADD–RIP1–TRAF2–TRAF5 z TNFR1. Białka TRAF katalizują następnie poliubikwitinację kinazy RIP1, indukując asocjację RIP1 z kompleksem IKK (IKK1/IKK2/NEMO) [129]. Kompleks TRADD-RIP1-TRAF2 dysocjuje od TNFR1 i rekrutuje FADD, inne białko efektorowe TNF, do utworzenia kompleksu apoptotycznego, który aktywuje kaspazę 8 [219].

16. Rola interleukin uwalnianych przez klasycznie aktywowane makrofagi M1 (moduł r)

Interleukiny uwalniane przez makrofagi M1: IL-1, IL-23, IL-6, IL-10 (wysoki poziom) i IL-12 (wysoki poziom). Cytokiny te są wytwarzane przez kilka wrodzonych i szpikowych komórek układu odpornościowego, w tym makrofagi i komórki dendrytyczne [79]. IL-10 i IL-12 odgrywają bardzo ważną rolę immunoregulacyjną w obronie gospodarza i homeostazie immunologicznej organizmu ludzkiego [170]. IL-23 działa prozapalnie i bierze udział w różnicowaniu i stabilizacji komórek Th17 poprzez oddziaływanie na limfocyty T pamięci [79, 299]. Podczas długotrwałej i rozregulowanej ekspozycji na IL-1 β i IL-23, komórki Th17 rekrutują zapalne komórki szpiku, aby wywołać miejscowe zapalenie tkanek [36]. IL-17 sprzyja nadciśnieniu samoistnemu, prawdopodobnie nadciśnieniu indukowanemu angiotensyną II [172, 203].

17. Rozwój miażdżycy (moduł s)

Monocyty przyciągane przez różne bodźce prozapalne przyczepiają się do objętego stanem zapalnym śródbłonna naczyniowego i przenikają do błony wewnętrznej tętnicy, gdzie różnicują się do makrofagów. Makrofagi błony wewnętrznej fagocytują oxLDL [29]. Zmodyfikowany LDL pochłaniany przez makrofagi prowadzi do utworzenia komórek piankowatych. W wyniku nagromadzenia oxLDL w komórkach piankowatych dochodzi do ich rozpadu i tworzenia pozakomórkowych złogów cholesterolu [212]. Nagromadzenie lipoprotein w zmianach miażdżycowych prowadzi do ich progresji i powstawania złożonych blaszek miażdżycowych. Rozwijają

się one w tych obszarach, w których nasilenie nacieczeń (smug) tłuszczowych jest największe. Złożone blaszki miażdżycowe charakteryzują się znacznym zwłóknieniem i współistnieniem pozakomórkowych złogów cholesterolu, które tworzą tzw. rdzeń lipidowy blaszki wypełniony cholesterolem i martwiczymi pozostałościami tkanek. Objawy kliniczne tego procesu zależą od umiejscowienia blaszki miażdżycowej i występowania zjawisk zakrzepowo-zatorowych [269].

18. Przyciąganie monocytów – klasycznie aktywowane makrofagi M1 (moduł t)

Wiadomo, że monocyty odgrywają kluczową rolę w homeostazie tkanek, odporności ochronnej oraz promowaniu i zwalczaniu stanu zapalnego, pochodzą ze szpiku kostnego z komórek progenitorowych, a następnie są uwalniane do krwi obwodowej. Po 10 do 20 godzinach wnika do tkanek, aby zostać zaktywowane i różnicować się w makrofagi [233, 85]. Makrofagi mogą nabywać różne fenotypy i funkcje biologiczne w zależności od mikrośrodowiska i stanu metabolicznego. Makrofagi M1 wywołane bodźcami prozapalnymi mają cechy prozapalne. Makrofagi o fenotypie M1 pośredniczą w odporności na wewnątrzkomórkowe patogeny i nowotwory w kontekście odpowiedzi wywoływanych przez Th1 [179].

19. Tworzenie apoptosomu i aktywacja kaspaz efektorowych: kaspaza 3, 6 i 7 (moduł u)

Aktywacja kaspaz w komórkach ssaków odbywa się za pośrednictwem dwóch głównych dróg, określanych jako “szlak wewnętrzny” i “szlak zewnętrzny”. Szlak wewnętrzny jest zależny od mitochondriów, a szlak zewnętrzny związany jest z receptorami błonowymi i ich ligandami. Kluczowym elementem w szlaku wewnętrznym (mitochondrialnym) jest kompleks białkowy – apoptosom, który umożliwia aktywację kaspazy 9 [11]. Kaspaza 9 może bezpośrednio aktywować kaspazy efektorowe [210].

20. Wysoki poziom aktywnej kaspazy 8 (moduł w)

Zewnętrzny szlak apoptozy jest indukowany przez aktywację rodziny receptorów powierzchniowych komórek TNF za pośrednictwem ligandów [205]. Główne receptory śmierci, DR4 i DR5, oraz Fas indukują śmierć komórki po ligacji odpowiednio z TRAIL lub ligandem Fas (FasL), po czym następuje rekrutacja prokaspazy 8 [168]. W błonie komórkowej tworzy się duży kompleks białkowy (degradosom), który aktywuje kaspazę 8. Aktywna kaspaza 8 bezpośrednio aktywuje kaspazy efektorowe. TNFR1 może wywołać przeciwstawne odpowiedzi w tej samej komórce: jedna prowadzi do odpowiedzi sprzyjającej przeżyciu (poprzez aktywację szlaku sygnałowego NF- κ B), podczas gdy druga prowadzi do śmierci komórki (aktywacja kaspazy 8 i 3) [185].

21. Hamowanie kaspazy 8 (moduł x)

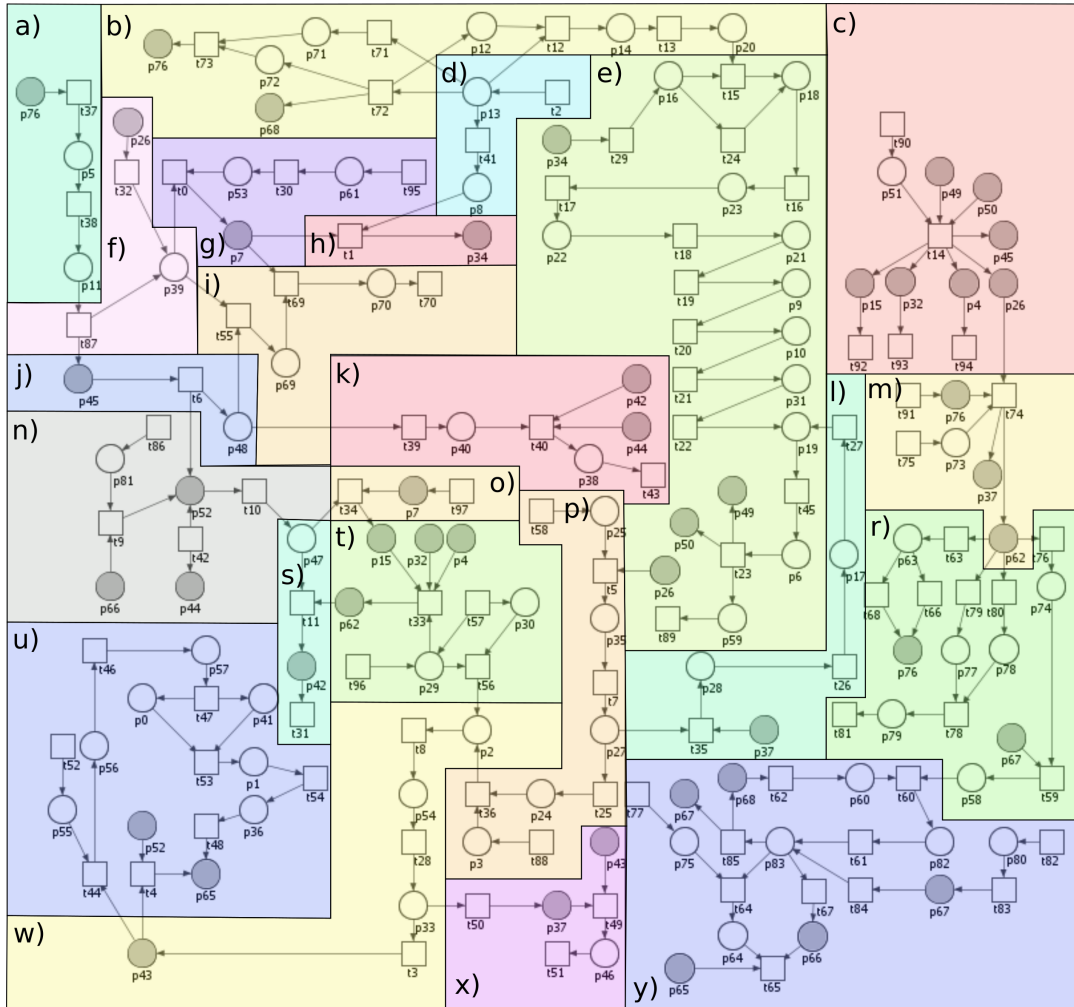
Hamowanie kaspazy 8 i hamowanie apoptozy spowodowane wysokim poziomem białka cFLIP. cFLIP hamuje apoptozę za pośrednictwem receptorów śmierci, zapobiegając aktywacji kaspazy 8 [126].

22. Pozytywna regulacja STAT6 – promowanie polaryzacji makrofagów M2 (moduł y)

Pozytywna regulacja STAT6 promuje polaryzację makrofagów M2 w celu zahamowania rozwoju miażdżycy. Stwierdzono, że STAT3 i STAT6 są potencjalnie zaangażowane w regulację przełącznika fenotypowego z M1 na M2 [32]. Przeciwwzapalne właściwości M2 indukowane przez IL-4 lub IL-13 są związane z naprawą tkanek i klirensiem endocytowym poprzez wydzielanie czynników przeciwzapalnych [90]. IL-10 wzmacnia fenotyp M2 indukowany przez IL-4 [174].

4.2.2 Model

Zaproponowany model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy został utworzony za pomocą narzędzia *Snoopy* [117]. Model przedstawiony jest na Rysunku 4.2 i został podzielony na podprocesy oznaczone od a) do y), które odpowiadają modułom opisanym w poprzednim paragrafie.



RYСУNEK 4.2: Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy. Zaproponowany model został podzielony na części odpowiadające poszczególnym zjawiskom biologicznym: a) szlak kinaz janusowych oraz przetwornika sygnału i aktywatora transkrypcji (JAK-STAT) stymulowany przez interferon gamma ($IFN\gamma$); b) wrodzona odpowiedź immunologiczna; c) translokacja p50/p65 do jądra w makrofagach M1, komórkach mięśni gładkich (SMC) i komórkach śródbłonna (EC); d) infekcja bakteryjna (bakterie gram-ujemne); e) aktywacja NF- κ B – ścieżka kanoniczna poprzez fosforylację I κ B α przez kompleks kinaz (IKK) (ścieżka sygnałowa zależna od MyD88); f) aktywacja kaspazy 1 przez czynnik martwicy nowotworów (TNF), a także wiązanie STAT1 z czynnikiem regulacyjnym interferonowym 1 (IRF1) (za pośrednictwem sekwencji elementu wiążącego STAT (SBE)); g) synteza IL-18 (szlak zależny od kaspazy 1); h) tworzenie kompleksu IL-18-IL-18R; i) negatywna regulacja IL-18, wynikająca z hamowania kaspazy 1 przez tlenek azotu; j) synteza NO; k) zdarzenia sercowo-naczyniowe wywołane przez szlaki zależne od NO; l) ubiquitynacja TRAF2 (czynnik aktywujący 2 zależny od TNF) i RIP1 (białko oddziałujące z receptorem 1); m) polaryzacja makrofagów; n) peroksydacja lipidów (oxLDL); o) synteza IL-18 (szlak niezależny od kaspazy 1) i stymulacja sąsiadujących komórek śródbłonna; p) regulacja sygnalizacji TNFR1; r) rola IL-1, IL-23, IL-6, wysoki poziom IL-10 i IL-12 (uwalniane przez klasycznie aktywowane makrofagi M1); s) progresja miażdżycy; t) przyciąganie monocytów (klasycznie aktywowane makrofagi M1); u) tworzenie apoptosomu i aktywacja kaspaz efektorowych: kaspazy 3, 6, 7; w) wysoki poziom aktywnej kaspazy 8; x) hamowanie kaspazy 8 i hamowanie apoptozy (przez wysoki poziom cFLIP); y) pozytywna regulacja (regulacja “w górę”) STAT6 promuje polaryzację makrofagów M2 w celu zahamowania miażdżycy. Rysunek pochodzi z pracy [64]

Zaproponowany model jest zawiera 84 pasywne komponenty (miejsca), 98 aktywnych komponentów (tranzycji) i jest scharakteryzowany przez 22 nietrywialne zbiory MCT, 15 t-klasterów

oraz jest pokryty przez 78 t-niezmienników. Nazwy miejsc i tranzycji zawarte zostały odpowiednio w Tabelach 4.1 i 4.2. Tabele te zawierają dwie kolumny: *ID* – zawierająca identyfikator miejsca/tranzycji oraz *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca odpowiadającą identyfikatorowi nazwę miejsca/tranzycji, która określa jej przeznaczenie w systemie.

TABELA 4.1: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc (patrz [64]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	aktywny czynnik aktywujący peptydazę apoptotyczną 1 (APAF1) [133]	p_{42}	komórki piankowate [200]
p_1	kompleks APAF1 i cytochromu c [133]	p_{43}	wysoki poziom aktywnej kaspazy 8 [42]
p_2	zrekrutowane białko FADD (domena śmierci związana z Fas) [42]	p_{44}	duże naprężenia ścinające [200]
p_3	duże ilości FAS i FASL [42]	p_{45}	iNOS [200]
p_4	ICAM1	p_{46}	niski poziom aktywnej kaspazy 8
p_5	kompleks $IFN\gamma$ i IFNRs [221]	p_{47}	oxLDL [200]
p_6	kompleks kinaz IKK oraz udział podjednostki regulatorowej NEMO [128]	p_{48}	tlenek azotu [200]
p_7	IL-18 [130, 265, 304]	p_{49}	kompleks p50/p65 i ufosforylowanego $I\kappa B$ w obrębie makrofagów [128]
p_8	IL-18R [311]	p_{50}	heterodimer czynnika transkrypcyjnego NF- κB (p50/p65) we wczesnej fazie aktywowanych komórek śródbłonna (EC) w miażdżycy [128]
p_9	kompleks IRAK1P-TRAF6-TAB2-TAB1-TAK1 na błonie komórkowej	p_{51}	heterodimer czynnika transkrypcyjnego NF- κB (p50/p65) we wczesnej fazie aktywowanych komórek mięśni gładkich (SMC) [302]
p_{10}	zdegradowany IRAK1	p_{52}	nadtlenoazotyn [200]
p_{11}	aktywowana ścieżka JAK-STAT1	p_{53}	pro-IL-18 [265, 304]
p_{12}	białko wiążące lipopolisacharyd (LBP) [145, 288]	p_{54}	zrekrutowana pro-kaspaza 8
p_{13}	lipopolisacharyd (LPS) [2, 145, 213, 288, 304]	p_{55}	promieniowanie i/lub toksyny i/lub niedotlenienie
p_{14}	kompleks LPS i LBP [145, 288]	p_{56}	skrótowa forma białka BID
p_{15}	MCP1	p_{57}	skrótowa forma białka BID w mitochondriach
p_{16}	MyD88 [288, 304]	p_{58}	aktywowane białka STAT3 [304]
p_{17}	ubikwitynowany RIP1	p_{59}	kompleks p50/p65 i ufosforylowanego $I\kappa B$ w SMC [128]
p_{18}	kompleks receptorów IL-18 i MyD88 [288, 304]	p_{60}	IL-4 [304]
p_{19}	aktywowany TAK1	p_{61}	klasycznie aktywowane makrofagi M1 [304]
p_{20}	aktywowany TLR4 [145, 288]	p_{62}	wysoki poziom klasycznie aktywowanych makrofagów M1 [304]
p_{21}	kompleks TLR-MyD88-IRAK4-IRAK1P-TRAF6	p_{63}	wysoki poziom IL-12 [304]
p_{22}	kompleks TLR-MyD88-IRAK4-IRAK1P	p_{64}	brak zapalenia
p_{23}	kompleks TLR-MyD88-IRAK4	p_{65}	aktywna kaspaza 3, 6 i 7 [133]
p_{24}	endocytozowany TNFR1	p_{66}	Podobny do czynnika martwicy nowotworów induktor apoptozy (TWEAK) [24]
p_{25}	stabilny TNFR1 przez wiązanie z SODD [302]	p_{67}	wysoki poziom IL-10 [304]
p_{26}	TNF α [130]	p_{68}	subpopulacja aktywowanych limfocytów T, limfocytów T pomocniczych 2 (Th2) i CD4 [33]
p_{27}	kompleks TRAF2-TRADD-RIP1-TRAF5-TNFR1	p_{69}	nieaktywna kaspaza 1 [156]
p_{28}	autoubikwitynowany TRAF2	p_{70}	brak IL-18 [156]
p_{29}	TRAIL	p_{71}	limfocyty Th1 i limfocyty T CD8 ⁺
p_{30}	DR5 i DR4 (receptory TRAIL)	p_{72}	komórki NK [231, 260]
p_{31}	kompleks UBC13-UEV1A-TRAF6-TAK1P-TAB2P-TAB1	p_{73}	makrofagi tkankowe

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
<i>p</i> ₃₂	VCAM1	<i>p</i> ₇₄	IL-6 [304]
<i>p</i> ₃₃	aktywny kompleks DISC typu I [42]	<i>p</i> ₇₅	rozwój procesów przeciwzapalnych
<i>p</i> ₃₄	kompleks IL-18 i receptora IL-18 (IL-18R α and IL-18R β) [10, 311]	<i>p</i> ₇₆	IFN γ
<i>p</i> ₃₅	aktywny kompleks sygnalizacyjny TNFR1	<i>p</i> ₇₇	IL-1 β [240, 285, 304]
<i>p</i> ₃₆	apoptosom [133]	<i>p</i> ₇₈	IL-23 [240, 285, 304]
<i>p</i> ₃₇	cFLIP [42]	<i>p</i> ₇₉	cytokiny wydzielane przez komórki Th17 (IL-17, IL-21 i IL-22) [157, 285]
<i>p</i> ₃₈	choroba sercowo-naczyniowa[200]	<i>p</i> ₈₀	limfocyty T regulatorowe
<i>p</i> ₃₉	ICE/kaspaza 1 proteaza [265]	<i>p</i> ₈₁	oksydaza NADPH [300]
<i>p</i> ₄₀	zaburzenie kurczliwości [200]	<i>p</i> ₈₂	kompleks IL-4 i IL-4R [304]
<i>p</i> ₄₁	cytochrom c [133]	<i>p</i> ₈₃	alternatywnie aktywowane makrofagi M2 z SRA1 i CD163 [304]

TABELA 4.2: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji (patrz [64]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
<i>t</i> ₀	aktywacja pro-interleukiny 18 przez kaspazę 1 [8, 48]	<i>t</i> ₄₉	hamowanie aktywnej kaspazy
<i>t</i> ₁	wiązanie IL-18 z receptorem IL-18R [286]	<i>t</i> ₅₀	zwiększenie ilość cFLIP [154, 305]
<i>t</i> ₂	infekcja bakteryjna	<i>t</i> ₅₁	hamowanie apoptozy [154, 286]
<i>t</i> ₃	dimeryzacja kaspazy 8 i aktywacja komórek typu I (komórki, w których aktywacja kaspazy 8 jest wystarczająca do wywołania apoptozy) [185, 305]	<i>t</i> ₅₂	szlak wewnętrzny apoptozy [186, 305]
<i>t</i> ₄	rozszczerzenie i aktywacja kaspaz 3, 6 i 7	<i>t</i> ₅₃	wiązanie cytochromu c z APAF1 [186]
<i>t</i> ₅	trimeryzacja TNFR1 [302]	<i>t</i> ₅₄	wywołanie tworzenia apoptosomu [186]
<i>t</i> ₆	synteza NO	<i>t</i> ₅₅	hamowanie kaspazy 1 [156]
<i>t</i> ₇	tworzenie kompleksu TRAF2-TRADD-RIP1-TRAF5-TNFR1 [302]	<i>t</i> ₅₆	trimeryzacja receptorów śmierci TRIAL [154]
<i>t</i> ₈	rekrutacja pro-kaspazy 8 pod wpływem FADD [136, 154]	<i>t</i> ₅₇	onkogeneza/stan zapalny [154]
<i>t</i> ₉	wzmocnienie aktywności oksydazy NADPH przez TWEAK [24, 300]	<i>t</i> ₅₈	SODD wiąże się z TNFR1 prowadząc do jego stabilizacji [302]
<i>t</i> ₁₀	peroksydacja lipidów	<i>t</i> ₅₉	aktywacja STAT3 przez kompleks IL-6, receptor IL-6 i glikoproteinę 130 (klasyczny szlak sygnałowy) [307]
<i>t</i> ₁₁	przekształcenie w komórki piankowate	<i>t</i> ₆₀	indukowanie IL-4R i wiązanie z IL-4 [296]
<i>t</i> ₁₂	wiązanie LPS i LBP [145, 209]	<i>t</i> ₆₁	promowanie procesów przeciwzapalnych przez STAT6 [296]
<i>t</i> ₁₃	prezentowanie LPS dla TLR4, CD14 i Myd2[145, 209]	<i>t</i> ₆₂	synteza IL-4 indukowana przez makrofagi M2
<i>t</i> ₁₄	translokacja p50/p65 do jądra w makrofagach M1, komórek mięśni gładkich i komórek śródbłonna [128]	<i>t</i> ₆₃	uwalnianie IL-12 przez klasycznie aktywowane makrofagi M1
<i>t</i> ₁₅	łączenie TLR4 i MyD88 poprzez TIRAP [209]	<i>t</i> ₆₄	hamowanie ekspresji genów specyficznych dla makrofagów M1 [318]
<i>t</i> ₁₆	rekrutowanie IRAK4 [286]	<i>t</i> ₆₅	nasilenie apoptozy i odpowiedzi przeciwzapalnej [318]
<i>t</i> ₁₇	łączenie z IRAK1 i jego fosforylacja [286]	<i>t</i> ₆₆	synteza INF γ poprzez IL-12
<i>t</i> ₁₈	rekrutowanie TRAF6 i wiązanie do IRAK1 [286]	<i>t</i> ₆₇	sekwestracja TWEAK
<i>t</i> ₁₉	dysocjacja IRAK1P i TRAF6 [286]	<i>t</i> ₆₈	synteza INF γ poprzez kompleks IL-12 i IL-12R za pośrednictwem STAT3 i STAT4
<i>t</i> ₂₀	fosforylacja TAK1 i TAB2 [286]	<i>t</i> ₆₉	negatywna rola IL-18 [156]

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{21}	translokacja kompleksu TRAF6-TAK1P-TAB2P-TAB1 do cytozolu [286, 302]	t_{70}	brak działania IL-18 [156]
t_{22}	ubikwitynacja TRAF6 [286]	t_{71}	odpowiedź immunologiczna adaptacyjna [209]
t_{23}	fosforylacja IKK- β – aktywacja NF- κ B – kanoniczna (klasyczna) ścieżka [128]	t_{72}	wrodzona odpowiedź immunologiczna [209]
t_{24}	połączenie aktywnej IL-18, IL-18R α i β oraz Myd88 (IL-18-IL-18R α -IL-18R β -MyD88)	t_{73}	synteza IFN γ
t_{25}	internalizacja TNFR1 zależna od klatryny [259]	t_{74}	transformacja makrofagów tkankowych do M1 [304]
t_{26}	ubikwitynacja RIP1	t_{75}	poziom normalny/norma [304]
t_{27}	RIP1 rekrutuje TAK1 poprzez TAB2	t_{76}	uwalnianie IL-6 przez klasycznie aktywowane makrofagi M1 [307]
t_{28}	połączenie przez domeny śmierci w obrębie FADD [136, 154]	t_{77}	procesy prowadzące do regresji blaszki miażdżycowej [318]
t_{29}	rekrutowanie MyD88	t_{78}	różnicowanie w Th17 [157, 240]
t_{30}	synteza pro-IL-18 [48]	t_{79}	uwolnienie IL-1 β przez klasycznie aktywowane makrofagi M1 [157, 285]
t_{31}	progresja blaszki miażdżycowej	t_{80}	uwalnianie IL-23 przez klasycznie aktywowane makrofagi M1 [157, 285]
t_{32}	modulowanie poprzez TNF	t_{81}	zapalenie autoimmunologiczne, nadciśnienie samoistne [157, 285]
t_{33}	przyciąganie monocytów	t_{82}	zmiany środowiska immunologicznego stymulowane przez ludzkie limfocyty T regulatorowe (Treg)
t_{34}	stymulacja sąsiednich komórek śródbłonka	t_{83}	produkcja IL-10 przez Treg
t_{35}	ubikwitynacja TRAF2	t_{84}	IL-10 wzmacnia fenotyp M2 indukowany przez IL-4 [174]
t_{36}	rekrutowanie FADD [259]	t_{85}	wzmocnienie funkcji efektor M2
t_{37}	wiązanie IFN γ i jego receptorów (IFNGR1 i IFNGR2), a następnie interakcja między podjednostkami IFNR i JAK1 (IFNGR1) oraz IFNR i JAK2 (IFNGR2), co aktywuje utajone cytoplazmatyczne STAT1 [199]	t_{86}	źródło oksydazy NADPH [300]
t_{38}	oligomeryzacja receptora IFN γ i aktywacja poprzez transfosforylację JAK1 i JAK2 związanych z receptorem, a następnie aktywacja STAT1 [199, 221]	t_{87}	wiązanie STAT1 z sekwencją SBE IRF1 [199]
t_{39}	zaburzenia kurczliwości serca [200]	t_{88}	interakcja FAS-FASL [259]
t_{40}	objawy choroby sercowo-naczyniowej [200]	t_{89}	szlak proteasomu w aktywowanym SMC [128]
t_{41}	różnicowanie się limfocytów Th w podtyp Th1 przy infekcji	t_{90}	mechanizmy aktywacji SMC [128]
t_{42}	wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) w przewlekłej chorobie nerek, zwłaszcza podczas hemodializy [200]	t_{91}	wydzielanie IFN γ
t_{43}	zdarzenia sercowo-naczyniowe [200]	t_{92}	regulacja migracji i infiltracji monocytów/makrofagów
t_{44}	rozpad BID pod wpływem wysokiego poziomu aktywnej kaspazy 8 [186]	t_{93}	rola VCAM1 [190]
t_{45}	aktywacja kompleksu kinaz [128]	t_{94}	rola ICAM1 [190]
t_{46}	translokacja skróconej formy białka BID do mitochondriów [186, 305]	t_{95}	środowisko zapalne [48]
t_{47}	uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytozolu poprzez zaburzenia mitochondrialne [186]	t_{96}	Produkcja TRAIL przez różne komórki
t_{48}	aktywacja kaspazy 9 [186]	t_{97}	synteza IL-18 za pośrednictwem szlaku niezależnego od kaspazy 1

4.2.3 Analiza i wyniki

Analiza modelu wpływu IL-18 na procesy zapalne w miażdżycy opiera się zarówno o klasyczne metody analizy jak i rozszerzone. Przede wszystkim zawiera bardziej dokładną, manualną analizę t-niezmienników i analizę strukturalną knockout. Wspomnianą, szczegółową analizę t-niezmienników porównano z analizą klastrów, dając tym samym pogląd na ogólność klastrowania.

Analiza zbiorów MCT oraz analiza t-klastrów

Zaproponowany model zawiera 22 nietrywialne zbiory MCT opisane w Tabeli 4.3. Precyzując, Tabela 4.3 została podzielona na cztery kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory kolejnych zbiorów MCT, *Zawarte podprocesy (Rys. 4.2)* – kolumna określająca, które podprocesy z Rysunku 4.2 są związane z poszczególnymi zbiorami MCT, *Zawarte tranzycje* – kolumna składająca się z tranzycji należących do poszczególnych zbiorów MCT, oraz *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca opis znaczenia biologicznego poszczególnych zbiorów MCT.

TABELA 4.3: Lista nietrywialnych zbiorów MCT – zbiorów składających się z co najmniej dwóch tranzycji należących do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników (patrz [64]).

ID	Zawarte podprocesy (Rys. 4.2)	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	d, e, h	$t_1, t_2, t_{16}, t_{17}, t_{18}, t_{19}, t_{20}, t_{21}, t_{22}, t_{29}, t_{41}$	Szlak sygnałowy Myd88 w którym pośredniczy IL-18R.
m_2	u	$t_{44}, t_{46}, t_{47}, t_{48}, t_{52}, t_{53}, t_{54}$	Wewnętrzny szlak apoptozy. Szlak ten powstaje w wyniku sygnałów pochodzących z wnętrza komórki i jest związany z rozszczepieniem BID przez promieniowanie, toksyny lub niedotlenienie. Następnie rozszczepiony BID przemieszcza się do mitochondriów, gdzie bierze udział w uwalnianiu aktywnego APAF1 i cytochromu c z mitochondriów do cytozolu. Aktywny APAF1 i cytochrom c tworzą kompleks, który prowadzi do powstania apoptosomu i aktywacji kaspazy 9, która inicjuje apoptozę i aktywację kaspaz wykonawczych.
m_3	b, e	$t_{12}, t_{13}, t_{15}, t_{71}, t_{72}, t_{73}$	Rozpoznawanie wzorca lipopolisacharydu przez kompleksy TLR4. Aktywowany TL4 jest zaangażowany w połączenie TLR i MyD88 poprzez TIRAP.
m_4	c, e	$t_{14}, t_{23}, t_{45}, t_{89}, t_{90}$	Aktywacja NF- κ B (szlak kanoniczny) poprzez fosforylację I κ B α przez IKK (szlak sygnałowy zależny od MyD88). Translokacja p50/p65 do jądra w makrofagach M1, SMC i EC.
m_5	y, r	$t_{59}, t_{60}, t_{61}, t_{62}, t_{76}$	Polaryzacja M2 indukowana przez IL-4 wywołana szeregiem reakcji, począwszy od aktywacji kompleksu IL-6-IL6-R-gp130 przez STAT3 (pod wpływem wysokiego poziomu IL-10), który indukuje wiązanie IL-4 z IL-4R, co skutkuje aktywacją szlaku STAT6.
m_6	k, n	$t_{39}, t_{40}, t_{42}, t_{43}$	Duże naprężenia ścinające (spowodowane obecnością ROS) i dysfunkcja kurczliwości serca (spowodowana obecnością tlenu azotu) prowadzą do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych.
m_7	r	$t_{78}, t_{79}, t_{80}, t_{81}$	Wysoki poziom klasycznie aktywowanych makrofagów M1 uwalnia IL-1 i IL-23, które wpływają na tworzenie Th17. Komórki Th17 są zaangażowane w nadciśnienie samoistne.
m_8	g	t_0, t_{30}, t_{95}	Klasycznie aktywowane makrofagi M1, pod wpływem mikrośrodowiska zapalnego, indukują syntezę IL-18 poprzez rozszczepienie pro-IL-18 przez kaspazę-1.

ID	Zawarte podprocesy (Rys. 4.2)	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_9	p	t_5, t_7, t_{58}	Szereg reakcji wpływających na w utworzenie kompleksu TRAF2-TRADD-RIP1-TRAF5-TNFR1.
m_{10}	p	t_{25}, t_{36}, t_{88}	Internalizacja TNFR1 wyzwala sygnały proapoptotyczne (za pośrednictwem FADD).
m_{11}	l	t_{26}, t_{27}, t_{35}	Kompleks TRAF2-TRADD-RIP1-TRAF5-TNFR1 i cFLIP prowadzą do ubikwitynacji TRAF2, a następnie ubikwitynacji RIP1, która rekrutuje TAK1 (przez TAB2).
m_{12}	a, f	t_{37}, t_{38}, t_{87}	Szlak JAK-STAT stymulowany przez $IFN\gamma$. Proces prowadzący do syntezy NO.
m_{13}	i	t_{55}, t_{69}, t_{70}	Tlenek azotu prowadzi do zahamowania kaspazy 1 poprzez S-nitrozylację reszt cysteinowych w miejscach aktywnych. Negatywna regulacja syntezy IL-18.
m_{14}	y	t_{64}, t_{65}, t_{77}	Procesy prowadzące do regresji blaszki miażdżycowej, a więc stymulowanie szlaków przeciwzapalnych. Skutkuje to hamowaniem ekspresji genów specyficznych dla makrofagów M1 i promowaniem ekspresji genów specyficznych dla makrofagów M2.
m_{15}	y	t_{67}, t_{82}, t_{83}	Interakcja TWEAK-CD163 w makrofagach.
m_{16}	w	t_8, t_{28}	TRAIL lub FasL wiążą swoje receptory, co indukuje trimeryzację receptora i tworzenie kompleksu sygnałowego indukującego śmierć komórki (DISC), komórki typu I składające się z FADD i kaspazą-8.
m_{17}	n	t_9, t_{86}	Tworzenie nadtlenoazotynu katalizowane przez oksydazę NADPH.
m_{18}	t	t_{33}, t_{96}	Przyciąganie monocytów (pod wpływem TRAIL).
m_{19}	x	t_{49}, t_{51}	Zwiększona ilość cFLIP może hamować tworzenie DISC poprzez konkurowanie z kaspazą-8/10 o wiązanie z FADD.
m_{20}	t	t_{56}, t_{57}	TRAIL i jego pokrewne receptory: trimeryzacja receptorów śmierci (DR5 i DR4).
m_{21}	m	t_{74}, t_{75}	Transformacja makrofagów tkankowych do M1 (wysoki poziom klasycznie aktywowanych makrofagów M1).
m_{22}	c	t_{93}, t_{94}	Rola VCAM1 i ICAM1.

Analiza zbiorów MCT pozwoliła na określenie funkcjonalnych bloków badanego procesu. W następnej kolejności przeprowadzono klastrowanie 78 t-niezmenników, gdzie zastosowano algorytm oparty na metodzie średniego wiązania i wybrano nieskupioną miarę dystansu Pearsona. Wskaźnikiem najlepszego klastrowania był indeks MSS, podczas gdy liczba t-klastrów została określona przy użyciu współczynnika Calińskiego-Harabasa. W wyniku analizy t-klastrów otrzymano 15 t-klastrów, którym przypisano znaczenie biologiczne – opisy zawarto w Tabeli 4.4. Ponadto, informacje o rozkładzie t-niezmenników w obrębie poszczególnych t-klastrów są zawarte w pracy [64].

TABELA 4.4: Lista t-klastrów – skupień składających się z podobnych do siebie t-niezmenników (Tabela pochodzi z artykułu konferencyjnego [64]).

ID	Interpretacja biologiczna
c_1	Szlaki sygnałowe apoptozy indukowane przez TRAIL. Zahamowanie kaspazy 8 przez zwiększoną ilość cFLIP.
c_2	Aktywacja wewnętrznego szlaku apoptotycznego z udziałem mitochondriów, w wyniku sygnałów pochodzących z komórki, w tym stresu komórkowego lub uszkodzenia DNA. Rozwój procesów przeciwzapalnych w odpowiedzi na wysoki poziom IL-10. Uszkodzenie mitochondriów i późniejsza aktywacja kaspazy 9 za pośrednictwem apoptosomu, co bezpośrednio aktywuje kaspazę 3, będącą kaspazą efektorową.
c_3	Wewnętrzny szlak apoptotyczny z udziałem mitochondriów, podobnie jak w klastrze c_2 , któremu towarzyszy rozszczepienie i aktywacja kaspaz 3, 6 i 7.

ID	Interpretacja biologiczna
c ₄	Produkcja nadtlenoazotynu, w którą zaangażowany jest TWEAK, poprzez doprowadzenie do reakcji katalizowanej przez oksydazę NADPH. Makrofagi M2 powodują sekwestrację TWEAK, gdy obserwuje się wysoki poziom IL-10. Nadtlenoazotyn jest zaangażowany w peroksydację lipidów i prowadzi do utworzenia zmodyfikowanego utlenionego LDL, który to wraz z IL-18 prowadzi do stymulacji sąsiednich komórek śródbłonna i wydzielania MCP1 (IL-18 jest wytwarzana przez szlak niezależny od kaspazy 1).
c ₅	Klaster zawiera niemal wszystkie procesy zawarte w modelu, z wyłączeniem następujących podprocesów: <ul style="list-style-type: none"> • Hamowanie kaspazy 1 spowodowane przez NO. • Endocytoza TNFR1 z kompleksu TRAF2-TRADD-RIP1-TRAF5. • Uszkodzenie mitochondriów i późniejsza aktywacja kaspazy 9 za pośrednictwem apoptosomu.
c ₆	Przyciąganie monocytów spowodowane przez MCP1, VCAM1, ICAM1 i TRAIL (w onkogenezie) prowadzi do wysokiego poziomu klasycznie aktywowanych makrofagów M1. W onkogenezie trimeryzacja TRAIL i receptorów śmierci prowadzi do rekrutacji prokaspazy 8 przez FADD. Połączenie w obrębie FADD i TNFR prowadzi do aktywacji komórek DISC typu I i zwiększonej ilości cFLIP. cFLIP wraz z kompleksem TRAF2-TRADD-RIP1-TRAF5-TNFR1 prowadzi do ubikwitynacji TRAF2, a w konsekwencji do ubikwitynacji RIP1. RIP1 rekrutuje TAK1 poprzez TAB2, który jest częścią kompleksu IKK zaangażowanego w fosforylację I κ B (która stymuluje translokację p50/p65 do jądra w makrofagach M1, SMC i EC). translokacja p50/p65 do jądra w makrofagach M1 i SMC i EC prowadzi do wydzielania iNOS, który wpływa na syntezę NO. Synteza NO prowadzi między innymi do produkcji nadtlenoazotynu, który wraz z wysokim poziomem kaspazy 8 powoduje aktywację kaspaz 3, 6 i 7. Wysoki poziom kaspazy 8 jest spowodowany trimeryzacją TRAIL i receptorów śmierci TRAIL (w onkogenezie). Aktywne kaspazy 3, 6, 7, a także TWEAK prowadzą do przeciwwzpalnego wzmocnienia apoptozy. Sekwestracja TWEAK jest spowodowana przez makrofagi M2 w przypadku gdy obserwuje się wysoki poziom IL-10. Ponadto NO jest zaangażowany w dysfunkcję skurczową serca, prowadząc do wystąpienia objawów i zdarzeń sercowo-naczyniowych. Objawy te są dodatkowo stymulowane przez generowanie reaktywnych form tlenu i komórek piankowatych, które są związane z syntezą NO.
c ₇	Klaster zawiera niemal wszystkie procesy zawarte w modelu, z wyłączeniem następującego podprocesu: hamowanie kaspazy 1 spowodowane przez NO.
c ₈	Klaster zawiera niemal wszystkie procesy zawarte w modelu, z wyłączeniem następujących podprocesów: <ul style="list-style-type: none"> • Synteza IL-18 wytwarzana przez szlak zależny od kaspazy 1, jednakże klaster ten zawiera syntezę IL-18 wytwarzaną przez szlak niezależny od kaspazy 1. • Uwalnianie IL-12, IL-1, IL-23 przez klasycznie aktywowane makrofagi M1. • Synteza IFNγ, co w efekcie skutkuje pominięciem JAK1, JAK2 i STAT1, pominięciem aktywacji STAT2, a także aktywacji białka STAT1 poprzez IFNγ i IFNR. Pominięcie aktywacji szlaku JAK-STAT1 powoduje natomiast brak obecności kaspazy 1. • Trimeryzacja TNFR1 (który może tworzyć kompleks z TRAF2-TRADD-RIP1-TRAF5) prowadzi do pominięcia rekrutacji FAD i ubikwitynacji TRAF2.
c ₉	Klaster zawiera niemal wszystkie procesy zawarte w modelu, z wyłączeniem następujących podprocesów: <ul style="list-style-type: none"> • Synteza IL-18 wytwarzana przez szlak zależny od kaspazy 1, jednakże klaster ten zawiera syntezę IL-18 wytwarzaną przez szlak niezależny od kaspazy 1. • Uwalnianie IL-12, IL-1, IL-23, IL-6 przez klasycznie aktywowane makrofagi M1. • Wysoki poziom uwalniania IL-10 przez alternatywnie aktywowane makrofagi M2. • Synteza IFNγ, co w efekcie skutkuje pominięciem JAK1, JAK2 i STAT1, pominięciem aktywacji STAT2, a także aktywacji białka STAT1 poprzez IFNγ i IFNR. Pominięcie aktywacji szlaku JAK-STAT1 powoduje natomiast brak obecności kaspazy 1. • Hamowanie kaspazy 8.

ID	Interpretacja biologiczna
c ₁₀	<p>Przyciąganie monocytów stymulowanych przez TRAIL, MCP1, VCAM1, ICAM1 prowadzi do wystąpienia wysokiego poziomu klasycznie aktywowanych makrofagów M1, które uwalniają IL-6, IL-12, IL-1, IL-23. Makrofagi M1 są również zaangażowane w przekształcanie oxLDL w komórki piankowe poprzez syntezę NO i peroksydację lipidów, czym przyczyniają się do progresji blaszki miażdżycowej. IL-18 jest produkowana przez szlak niezależny od kaspazy 1 i może tworzyć kompleks z IL-18R. Aktywny kompleks IL-18-IL-18Rα-IL-18Rβ rekrutuje MyD88, który jest zaangażowany w szlak fosforylacji IκB. Fosforylacja IκB stymuluje przyciąganie monocytów poprzez translokację p50/p65 do jądra w makrofagach M1 i SMC i EC, co stymuluje MCP1, VCAM1, ICAM1, TNFα i iNOS. IL-1 i IL-23 prowadzą do powstawania Th17. Komórki Th17 są zaangażowane w nadciśnienie tętnicze. IL-6 i wysoki poziom IL-10 prowadzą natomiast do aktywacji białka STAT3, które jest zaangażowane w indukcję IL-4Rα i wiązanie z IL-4. Kompleks IL-4 i IL-4R stymuluje szlak przeciwwzapalny i w konsekwencji powoduje zwiększenie ilości IL-10. Klaster ten obejmuje również negatywną regulację IL-18. Precyzując, szlak JAK-STAT stymulowany przez IFNγ przyczynia się do syntezy NO indukowanej przez iNOS. NO jest zaangażowany w hamowanie kaspazy 1, a to w konsekwencji wpływa na negatywną regulację IL-18.</p>
c ₁₁	<p>Przyciąganie monocytów stymulowanych przez TRAIL, MCP1, VCAM1, ICAM1 prowadzi do wystąpienia wysokiego poziomu klasycznie aktywowanych makrofagów M1, które uwalniają IL-6, IL-12, IL-1, IL-23. IL18 jest produkowana przez szlak niezależny od kaspazy 1 i może tworzyć kompleks z IL-18R. Aktywny kompleks IL-18-IL-18Rα-IL-18Rβ rekrutuje MyD88, który jest zaangażowany w szlak fosforylacji IκB. Co więcej, kompleks MyD88 może być dodatkowo stymulowany przez kompleks LPS-LBP. Fosforylacja IκB stymuluje przyciąganie monocytów poprzez translokację p50/p65 do jądra w makrofagach M1 oraz SMC i EC, które stymulują MCP1, VCAM1, ICAM1, TNFα, iNOS. IL-1 i IL-23 prowadzą do powstawania Th17. Komórki Th17 są zaangażowane w nadciśnienie tętnicze. IL-6 i wysoki poziom IL-10 prowadzą natomiast do aktywacji białka STAT3, które jest zaangażowane w indukcję IL-4Rα i wiązanie z IL-4. Kompleks IL-4 i IL-4R stymuluje szlak przeciwwzapalny i w konsekwencji przyczynia się do zwiększenia poziomu IL-10. Klaster ten obejmuje również negatywną regulację IL-18. Wiązanie TRAIL z receptorami śmierci (DR5 i DR4) prowadzi do rekrutacji białka adaptorowego FADD, a to indukuje rekrutację prokaspazy 8. Połączenie w obrębie FADD i TNFR indukuje aktywację komórek DISC typu I. Wysoki poziom kaspazy 8 wraz z produkcją nadtlenoazotynu skutkuje aktywacją kaspaz 3, 6 i 7. Aktywne kaspazy 3, 6, 7, a także TWEAK zaangażowane są w przeciwwzpalne wzmocnienie apoptozy.</p>
c ₁₂	<p>Przyciąganie monocytów stymulowanych przez TRAIL, MCP1 oraz VCAM1, ICAM1 prowadzi do wystąpienia wysokiego poziomu klasycznie aktywowanych makrofagów M1, które uwalniają IL-6, IL-12, IL-1, IL-23. Makrofagi M1 są również zaangażowane w przekształcanie oxLDL w komórki piankowe poprzez syntezę NO i peroksydację lipidów, czym przyczyniają się do progresji blaszki miażdżycowej. IL-18 jest produkowana przez szlak niezależny od kaspazy 1 i może tworzyć kompleks z IL-18R. Aktywny kompleks IL-18-IL-18Rα-IL-18Rβ rekrutuje MyD88, który jest zaangażowany w szlak fosforylacji IκB. Fosforylacja IκB stymuluje przyciąganie monocytów poprzez translokację p50/p65 do jądra w makrofagach M1 i SMC i EC, co stymuluje MCP1, VCAM1, ICAM1, TNFα i iNOS. IL-1 i IL-23 prowadzą do powstawania Th17. Komórki Th17 są zaangażowane w nadciśnienie tętnicze. IL-6 i wysoki poziom IL-10 prowadzą natomiast do aktywacji białka STAT3, które jest zaangażowane w indukcję IL-4Rα i wiązanie z IL-4. Kompleks IL-4 i IL-4R stymuluje szlak przeciwwzapalny i w konsekwencji przyczynia się do zwiększenia ilości IL-10. Wiązanie TRAIL z receptorami śmierci (DR5 i DR4) prowadzi do rekrutacji białka adaptorowego FADD, co indukuje rekrutację prokaspazy 8. Połączenie w obrębie FADD i TNFR wpływa na aktywację komórek DISC typu I, a zwiększona ilość cFLIP prowadzi do zahamowania kaspazy 8.</p>
c ₁₃	<p>Szlak JAK-STAT stymulowany przez IFNγ jest procesem prowadzącym do syntezy NO indukowanej przez iNOS. NO jest zaangażowany w hamowanie kaspazy 1, a to w konsekwencji prowadzi do negatywnej regulacji IL-18. Ponadto, synteza NO prowadzi również do produkcji nadtlenoazotynu, który wraz z wysokim poziomem kaspazy 8 prowadzi do aktywacji kaspaz 3, 6 i 7. Wysoki poziom kaspazy 8 jest spowodowany trimeryzacją TRAIL i receptorów śmierci TRAIL (w onkogenezie). Aktywne kaspazy 3, 6, 7, a także TWEAK prowadzą do przeciwwzpalnego wzmocnienia apoptozy. Sekwestracja TWEAK jest spowodowana przez makrofagi M2 w przypadku gdy obserwuje się wysoki poziom IL-10.</p>

ID	Interpretacja biologiczna
c ₁₄	Szlak JAK-STAT stymulowany przez IFN γ jest procesem prowadzącym do syntezy NO indukowanej przez iNOS. NO jest zaangażowany w hamowanie kaspazy 1, co w konsekwencji prowadzi do negatywnej regulacji IL-18. Ponadto, synteza NO prowadzi również do produkcji nadtlenoazotynu, który jest zaangażowany w peroksydację lipidów i prowadzi do produkcji oxLDL. Zmodyfikowany LDL wraz z IL-18 prowadzi do stymulacji sąsiednich komórek śródbłonna i wydzielania MCP1 (IL-18 jest wytwarzana poprzez szlak niezależny od kaspazy 1).
c ₁₅	Klaster zawiera niemal wszystkie procesy zawarte w modelu, z wyłączeniem następujących podprocesów: <ul style="list-style-type: none"> • Synteza IL-18 wytwarzana przez szlak zależny od kaspazy 1, jednakże klaster ten zawiera syntezę IL-18 wytwarzaną przez szlak niezależny od kaspazy 1. • Zwiększenie ilości cFLIP, co skutkuje pominięciem procesu hamowania kaspazy 8 (i hamowania apoptozy) oraz pominięciem ubikwitynacji TRAF2 i RIR1. • Różnicowanie w kierunku klasycznie aktywowanych makrofagów M1. W związku z tym nie dochodzi do uwolnienia IL-1, IL-23 i L-12, przy czym IL-1 i IL-23 są zaangażowane w tworzenie komórek Th17, a IL-12 jest zaangażowana w syntezę IFNγ. W tym klastrze jednak dochodzi do syntezy IFNγ przez LPS (infekcję bakteryjną).

Powyższa analiza t-klastrów, pomimo iż zawiera szczegółowe biologiczne opisy t-niezmienników, nie pozwala na odkrycie nowych własności. Co więcej, można zauważyć, że 1/3 wszystkich klastrów zawiera niemal wszystkie zamodelowane podprocesy – przy opisie takich klastrów łatwiej wykluczyć podprocesy, które nie wchodzą w skład tego t-klustra. Można zatem stwierdzić, że wyniki analizy t-klastrów dla modelu IL-18 są zbyt ogólne, by prowadziły do głębszych wniosków i dają powód do przeprowadzenia bardziej szczegółowych i rozszerzonych analiz. Jednakże, analiza t-klastrów pozwala zwrócić uwagę na wyróżniające się elementy. Przykładowo, podprocesy związane z IL-18 występują w 12 na 15 klastrów, co stanowi 80% wszystkich klastrów. Do tego wyróżnia się także rola makrofagów, podprocesy, w które zaangażowane są różne podtypy makrofagów, występują w 13 na 15 klastrów i stanowią tym samym 87% wszystkich analizowanych skupień. Analiza t-klastrów może być relatywnie ogólna i może nie uwidocznić nowych własności, jednak jak wykazano, pozwala ukierunkować dalsze analizy.

Bardziej dokładna analiza t-niezmienników oraz analiza strukturalna knockout

Bardziej dokładna, manualna analiza t-niezmienników z uwagi na swój charakter dotyczy tylko wybranych t-niezmienników. Na tym etapie rozważano t-niezmienniki powiązane z działaniem interleukiny 18 oraz podprocesy dotyczące dwóch podtypów makrofagów – kierunek dalszych analiz zidentyfikowany dzięki klasycznym analizom.

Bardziej szczegółowa analiza t-niezmienników polega na wyszukiwaniu t-niezmienników, które powiązane są z danym podprocesem w celu określenia ile spośród wszystkich zamodelowanych podprocesów jest w relacji z badanymi podprocesami. Prowadzi to do wyznaczenia, które z rozważanych podprocesów mają większe znaczenie dla modelowanego systemu. W tym przypadku bardziej szczegółowa analiza t-niezmienników wykazała, że 94% t-niezmienników odpowiada podprocesom, w które zaangażowana jest IL-18, wśród nich wyróżnić można następujący podział:

- 1) 66 t-niezmienników (85%) odpowiada podprocesom, w których uczestniczy IL-18 wytwarzana przez szlak niezależny od kaspazy 1,
- 2) 3 t-niezmienniki (4%) odpowiadają podprocesom, w których uczestniczy IL-18 wytwarzana przez szlak zależny od kaspazy 1,
- 3) 4 t-niezmienniki (5%) odpowiadają podprocesom, w których IL-18 jest wytwarzana przez dwa wspomniane szlaki (szlak niezależny od kaspazy 1 i szlak zależny od kaspazy 1),

4) 5 t-niezmienników (6%) odpowiada podprocesom, w których nie bierze udziału IL-18.

Obok t-niezmienników związanych z IL-18 rozważono także podprocesy, w działanie których zaangażowana jest kaspaza 8 (takie t-niezmienniki stanowią 74% wszystkich t-niezmienników). Poza liczbą t-niezmienników związanych z kaspazą 8 istotny wydaje się także fakt, iż szlak niezależny od kaspazy 1 jest związany z kaspazą 8. Dokładna analiza t-niezmienników została przedstawiona poniżej:

- 1) 49 t-niezmienników (63%) odpowiada podprocesom, w których występuje kaspaza 8 wraz z IL-18 wytwarzaną przez szlak niezależny od kaspazy 1,
- 2) 3 t-niezmienniki (4%) odpowiadają podprocesom, w których występuje kaspaza 8 wraz z IL-18 wytwarzaną przez szlak zależny od kaspazy 1,
- 3) 2 t-niezmienniki (3%) odpowiadają podprocesom, w których występuje kaspaza 8 wraz z IL-18 wytwarzaną przez dwa wspomniane szlaki (szlak niezależny od kaspazy 1 i szlak zależny od kaspazy 1),
- 4) 20 t-niezmienników (26%) odpowiada podprocesom, w których nie bierze udziału kaspaza 8,
- 5) 4 t-niezmienniki (5%) odpowiadają podprocesom, w których bierze udział tylko kaspaza 8.

Analiza t-klastrów pozwoliła także nakierować dalszą analizę na makrofagi. Podprocesy związane z różnymi typami makrofagów dotyczą 96% wszystkich t-niezmienników, można więc stwierdzić, że makrofagi są powiązane z prawie wszystkimi mechanizmami, które zawarto w badanym modelu. Poniżej wyróżniono ile t-niezmienników dotyczy tylko wybranego podtypu, ile dotyczy obu podtypów jednocześnie oraz ile t-niezmienników nie ma powiązań z żadnymi z makrofagów:

- 1) 16 t-niezmienników (21%) odpowiada podprocesom, w które zaangażowany jest podtyp M1,
- 2) 5 t-niezmienników (6%) odpowiada podprocesom, w których uczestniczy podtyp M2,
- 3) 54 t-niezmienniki (69%) odpowiadają podprocesom, w których biorą udział dwa podtypy makrofagów,
- 4) 3 t-niezmienniki (4%) odpowiadają podprocesom, w które makrofagi nie są zaangażowane.

Analizując powyższe podzbiory t-niezmienników dokładnie określono, w jakie podprocesy angażują się konkretne podtypy makrofagów. Podtyp M1 zaangażowany jest w hamowanie kaspazy 8, pozytywną regulację IL-18 (poprzez hamowanie syntezy tlenu azotu) oraz w szlak fosforylacji I κ B przez kompleks receptorów MyD88. Natomiast podtyp M2 angażuje się w aktywację kaspazy 3, 6, 7 i 8, ujemną regulację IL-18 przez jej hamowanie, wzmocnienie apoptozy i odpowiedzi przeciwzapalnej oraz powiązany jest z wysokim poziomem IL-10.

Jako dopełnienie bardziej dokładnej analizy t-niezmienników przeprowadzono strukturalną analizę knockout, która nakierowana została na regulację IL-18 przez różne podtypy makrofagów. Analiza knockout pozwala określić, które podprocesy zostaną wyłączone z modelowanego systemu, jeśli wyłączony/dezaktywowany będzie wybrany proces lub procesy elementarne. W utworzonym modelu jest kilka różnych tranzykcji odpowiadających indukcji aktywacji makrofagów M1 jak i M2. Wyróżniono reakcje odpowiadające następującym tranzykcjom: t_{33} , t_{74} , t_{95} dla makrofagów M1 i t_{61} , t_{84} dla makrofagów M2 (patrz znaczenie tranzykcji w Tabeli 4.2). W Tabeli 4.5 przedstawiono wyniki analizy knockout, w tym także informacje o tym, jakie tranzykcje zostały wyłączone oraz ile zostało wyłączonych podprocesów (t-niezmienników) w efekcie ich wyłączenia.

TABELA 4.5: Wyniki strukturalnej analizy knockout, w której dezaktywowano tranzycje aktywujące różne podtypy makrofagów.

Knockout tranzycji aktywujących podtyp M1		Knockout tranzycji aktywujących podtyp M2	
Wyłączana tranzycja	Liczba wyłączonych t-niezmienników (%)	Wyłączana tranzycja	Liczba wyłączonych t-niezmienników (%)
t_{33}	68 (87%)	t_{61}	26 (33%)
t_{74}	47 (60%)	t_{84}	29 (37%)
t_{95}	7 (9%)	t_{61}, t_{84}	49 (63%)
t_{33}, t_{74}, t_{95}	70 (90%)		

Można zauważyć, że jednoczesne wyłączenie wszystkich tranzycji aktywujących podtyp M1 powoduje wyłączenie 70 t-niezmienników (90% wszystkich podprocesów). Przeprowadzono zatem dokładną analizę pozostałych ośmiu t-niezmienników. Wśród analizowanych 8 t-niezmienników, 5 z nich związanych jest z IL-18, a dokładniej:

- 1) 4 t-niezmienniki (80%) odpowiadają podprocesom, w których IL-18 jest negatywnie regulowana,
- 2) 1 t-niezmiennik (20%) odpowiada podprocesowi, w którym IL-18 jest pozytywnie regulowana.

Podobne wnioskowanie przeprowadzono dla makrofagów o podtypie M2. Jednoczesne wyłączenie wszystkich tranzycji aktywujących podtyp M2 powoduje wyłączenie 49 t-niezmienników (63% wszystkich podprocesów). Podobnie jak wcześniej, przeprowadzono dokładną analizę pozostałych 29 t-niezmienników. Wśród analizowanych 28 t-niezmienników, aż 28 z nich powiązanych jest z IL-18, a dokładniej:

- 1) 1 t-niezmiennik (20%) odpowiada podprocesowi, w którym IL-18 jest negatywnie regulowana,
- 2) 22 t-niezmienniki (79%) odpowiadają podprocesom, w których IL-18 jest pozytywnie regulowana.

Analiza knockout dla tranzycji odpowiadających aktywacji makrofagów M1 pokazała w rezultacie, że większość niewyłączonych podprocesów jest związana z negatywną regulacją IL-18, a więc może być związana z obecnością M2. Odwrotna sytuacja ma miejsce przy wyłączeniu tranzycji odpowiadających aktywacji makrofagów M2, gdzie większość podprocesów niewyłączonych w efekcie analizy knockout, jest związana z dodatnią regulacją IL-18, a więc może być związana z obecnością M1. Wyniki analizy knockout są zgodne z wynikami uzyskanymi w rezultacie manualnej analizy knockout, gdyż mogą sugerować, iż makrofagi M1 mają wpływ na pozytywną regulację IL-18, podczas gdy makrofagi M2 mają wpływ na negatywną regulację IL-18.

Porównanie bardziej dokładnej analizy t-niezmienników i analizy t-klastrów

Analiza t-klastrów nie zawsze pozwala na znalezienie kluczowych czy interesujących zależności. Niekiedy otrzymane wyniki są zbyt ogólne, by przeprowadzić głębsze wnioskowanie. W przypadku badań nad IL-18 otrzymano 15 klastrów, gdzie 5 z nich (33%) to klastry zawierające niemal wszystkie zamodelowane podprocesy (Tabela 4.4). Jednakże nawet w takich przypadkach analiza skupień pozwala ukierunkować dalszą analizę, co umożliwia przeprowadzenie dokładnej analizy t-niezmienników dla wybranych podprocesów. Niemniej jednak przeprowadzono porównanie analizy t-klastrów i manualnej, bardziej dokładnej analizy t-niezmienników. Wyniki tego porównania przedstawiono w Tabeli 4.6.

Wyniki przedstawione w Tabeli 4.6 potwierdzają powyższe stwierdzenie – analiza skupień dla modelu wpływu IL-18 na procesy zapalne w miażdżycy może być zbyt ogólna. Znaczne rozbieżności można zauważyć m.in. dla procesów odpowiednio związanych z podtypem makrofagów M1

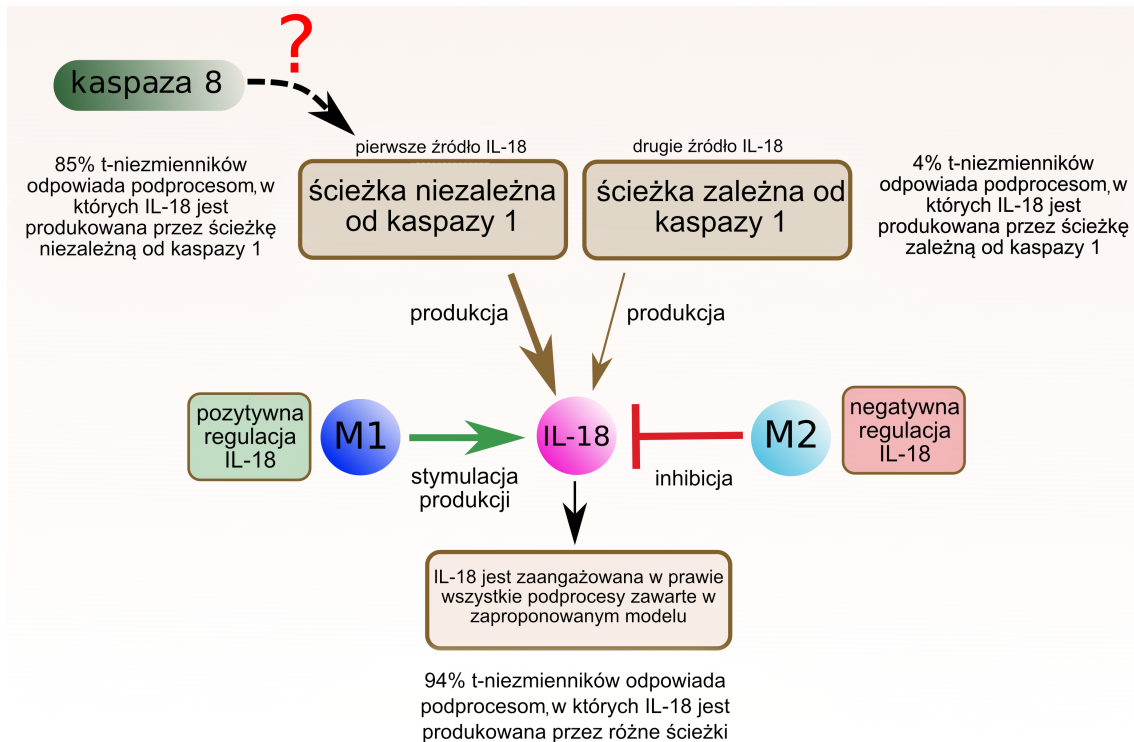
TABELA 4.6: Porównanie analizy klastrowania i bardziej dokładnej analizy t-niezmienników z naciskiem na obecność IL-18 i makrofagów w badanych podprocesach. Liczba otrzymanych t-klastrów: 15, liczba wyznaczonych t-niezmienników: 78 (patrz [64]).

	Analiza t-klastrów	Manualna analiza wybranych t-niezmienników
Podprocesy, w które zaangażowana jest IL-18		
Źródła IL-18:	Liczba wystąpień w t-klastrach (%)	Liczba wystąpień w t-niezmiennikach
ścieżka niezależna od kaspazy 1	10 (67%)	66 (85%)
ścieżka zależna od kaspazy 1	0 (0%)	3 (4%)
ścieżka niezależna od kaspazy 1 i ścieżka zależna od kaspazy 1	2 (13%)	4 (5%)
brak obecności IL-18	3 (20%)	5 (6%)
Podprocesy w które zaangażowane są makrofagi		
Podtypy makrofagów:	Liczba wystąpień w t-klastrach (%)	Liczba wystąpień w t-niezmiennikach
M1	1 (7%)	16 (21%)
M2	4 (27%)	5 (6%)
M1 i M2	8 (53%)	54 (69%)
brak obecności makrofagów	2 (13%)	3 (4%)

i M2, wyniki dla manualnej analizy t-niezmienników znacznie się różnią od wyników uzyskanych z analizy t-klastrów. Rozbieżności te mogą wynikać ze wspomnianego wcześniej faktu, iż większość podprocesów trafia często do jednego t-klastra. Jednakże wyniki obu tych analiz pokazują istotne znaczenie zarówno IL-18 jak i makrofagów (obu podtypów), gdyż są zaangażowane w prawie wszystkie mechanizmy występujące w modelowanym systemie.

4.2.4 Konkluzje

Analiza modelu relacji między IL-18 a stanem zapalnym leżącym u podstaw miażdżycy pozwoliła pokazać wady i zalety klasycznych metod analizy, a także uwydatniła korzyści płynące ze stosowania metod rozszerzonych. Na przykładzie tego modelu podsumowano także i porównano jedną z klasycznych metod wraz z jedną z metod rozszerzonych. Podsumować należy, że analiza zbiorów MCT jak i analiza klastrów jako jedne z podstawowych metod mogą być przydatne na początkowym etapie analizy, co wykazano. Jednakże, pokazano także, że analiza t-klastrów może być zbyt ogólna, nawet jeśli liczba t-niezmienników nie jest relatywnie duża. Niemniej jednak, analiza klastrów pozwoliła wyznaczyć i ukierunkować poszukiwania własności w konkretnych podprocesach. Zastosowane metody, zarówno manualna, bardziej dokładna analiza t-niezmienników, jak i strukturalna analiza knockout, pozwoliły na odkrycie ciekawej właściwości, którą jest zależność między IL-18 a różnymi typami makrofagów. Wykazano, że makrofagi o podtypie M1, biorą udział w pozytywnej regulacji IL-18, podczas gdy makrofagi o podtypie M2 biorą udział w negatywnej regulacji tej cytokiny. Co istotne, w większości badanych podprocesów te dwa podtypy występowały razem. Co więcej, analiza skupiona na IL-18 pozwoliła na odkrycie, że IL-18 wytwarzana przez szlak niezależny od kaspazy 1 jest zaangażowana w znacznie więcej podprocesów niż IL-18, która jest wytwarzana przez szlak zależny od kaspazy 1. Ponadto na podstawie analiz wysnuto stwierdzenie, że szlak niezależny od kaspazy 1 może być związany z działaniem kaspazy 8. Ponad połowa t-niezmienników (63%) odpowiada podprocesom, w których występuje kaspaza 8 wraz z IL-18, która została wytworzona na drodze niezależnej od kaspazy-1. Graficzne podsumowanie tych konkluzji znajduje się na Rysunku 4.3.



RYSUNEK 4.3: Wpływ różnych podtypów makrofagów na działanie IL-18. Wyniki sugerują, że szlak niezależny od kaspazy 1 może być powiązany z działaniem kaspazy 8. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [64].

4.3 Analiza ważności – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący relacji między homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A

Celem niniejszego podrozdziału jest przedstawienie zaproponowanego modelu dotyczącego relacji między homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A opartego o klasyczne sieci Petriego oraz jego analiza. Do analizy matematycznego modelu, obok klasycznych metod analizy, wykorzystano rozszerzone metody analizy. Jedną z nich jest istniejący knockout symulacyjny, zwany też analizą średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach. Drugą natomiast jest zaproponowana metoda oceny strukturalnej istotności tranzycji, zwana analizą ważności. Wybrany model jest potwierdzeniem, iż sieci Petriego można zastosować również w kwestii rozwiązania wątpliwości co do rozbieżności w doniesieniach literaturowych. Badany system dotyczy relacji między żelazem a niedoborem witaminy A, co stanowi najbardziej powszechny niedobór żywieniowy dotyczący ludzi na całym świecie. Biorąc pod uwagę skalę problemu, interakcje pomiędzy witaminą A a poziomem żelaza są szeroko badane. Jednakże dokładny mechanizm wpływu witaminy A na regulację metabolizmu żelaza pozostaje niejasny. Niezwykle istotną kwestią staje się lepsze zrozumienie natury badanego zjawiska biologicznego, co umożliwia zastosowanie podejść systemowych.

4.3.1 Tło biologiczne

Rozważania dotyczące roli deficytu witaminy A w regulacji ekspresji hepcydyny, a w konsekwencji wpływu na metabolizm żelaza, były i są w dalszym ciągu podejmowane przez wielu badaczy [9, 41, 191, 245, 262, 281]. Pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące powiązania niedoboru witaminy A oraz niskiego poziomu żelaza pochodzą z badań prowadzonych w latach dwudziestych [19, 59, 149]. Dodatkowo niedobory witaminy A i żelaza są najbardziej rozpowszechnionymi niedo-

borami mikroelementów wpływając na miliony ludzi na świecie [9, 191, 262, 281]. Jednak podstawy mechanizmu wpływu witaminy A na homeostazę żelaza nie został w pełni poznany [41, 262]. Co więcej, badania tych zależności budzą wiele kontrowersji wśród badaczy, o czym świadczą rozbieżności w doniesieniach literaturowych.

Jako że system opisywany w tym podrozdziale nie jest bezpośrednią konsekwencją wcześniejszych prac, wymaga on dokładnego wprowadzenia w tło biologiczne leżące u podstaw badań wspomnianych relacji. Opis kontekstu biologicznego podzielono na kilka głównych części.

1. Metabolizm żelaza

Żelazo jest składnikiem odżywczym niezbędnym dla zachodzenia podstawowych procesów metabolicznych, stąd kluczowe jest ogólnoustrojowe zaopatrzenie w ten mikroelement. Konieczne jest jednak utrzymanie odpowiednich ilości żelaza w organizmie, gdyż zarówno niedobór jak i nadmiar żelaza prowadzą do niepożądanych efektów, w tym poważnych chorób [81, 120]. Istotą wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza jest zarówno dostarczenie odpowiednich ilości żelaza dla zachowania ciągłości odpowiednich procesów biologicznych, jak i ograniczenie toksyczności jonów Fe^{2+} , zaangażowanych w reakcję Fentona prowadzącą do zwiększania reaktywnych form tlenu [68, 81]. Żelazo różni się od innych minerałów tym, że ze względu na brak fizjologicznego mechanizmu wydalania jego równowaga w organizmie jest ściśle kontrolowana na poziomie wchłaniania. Jony żelaza w postaci Fe^{3+} podlegają redukcji do Fe^{2+} przez dwunastniczy cytochrom b (Dcytb), aby w następnym etapie zostać przetransportowane do enterocyту przez białko zwane transporterem metali dwuwartościowych (DMT1). Następnie, jony Fe^{2+} mogą ulegać absorpcji przez ferrytynę (Ft) lub mogą zostać przetransportowane do krwi przez ferroportynę (FPN) przy udziale hefajstyny (Heph). Hefajstyna utlenia jony Fe^{2+} do Fe^{3+} , które następnie są absorbowane przez komórki ssaków [120]. Nowo wchłonięty Fe^{3+} wiąże się z transferyną osocza (Tf). Następnie Tf naładowany żelazem wiąże się z receptorem transferyny 1 (TfR1) na powierzchni większości komórek i tworzy kompleks. Kompleks Tf-TfR1 jest internalizowany przez endocytozę za pośrednictwem klatryny [7]. W konsekwencji endocytozy tego kompleksu żelazo przedostaje się do cytoplazmy poprzez DMT1. Jeśli żelazo jest potrzebne, może trafić bezpośrednio do miejsc wykorzystania, takich jak mitochondria. Jeśli w danym momencie nie ma zapotrzebowania na żelazo, można je przechować do późniejszego wykorzystania w ferrytynie — białku magazynującym. Komórka może również pozbyć się żelaza eksportując je przez FPN. Jednak, ta ścieżka eksportu może działać jak zawór bezpieczeństwa, jeśli w komórce zgromadzą się bardzo duże ilości żelaza.

Istotnym elementem jest cytoplazmatyczna zmienna pula żelaza (LIP), wskazująca na niedobór lub nadmiar żelaza. Pula ta w odpowiedzi na zaburzenie poziomu żelaza uruchamia systemy regulujące homeostazę żelaza [120].

Metabolizm żelaza jest kontrolowany przez dwa mechanizmy regulacyjne, pierwszy z nich działa na poziomie komórki, podczas gdy drugi działa na poziomie całego ustroju.

2. Mechanizm regulacyjny działający na poziomie komórkowym

Mechanizm regulacyjny działający na poziomie komórki (mechanizm IRP/IRE) [120, 242, 262] obejmuje cytoplazmatyczne białka regulatorowe (IRP1 i IRP2), które wiążą się do swoich sekwencji RNA regulując w ten sposób ekspresję białek zaangażowanych w utrzymanie homeostazy. Mowa o błonowym receptorze transferyny 1 (TfR1) – umożliwiającym pobieranie jonów żelaza przez komórki ssaków na drodze endocytozy, transporterze metali dwuwartościowych (DMT1), ferrytynie (Ft) – białku magazynującym, ferroportynie (Fpn)

– transporterze żelaza [7, 81, 120]. W zależności od poziomu żelaza w komórce mechanizm IRP/IRE kontroluje syntezę tych białek i ich działanie. Szczegółowe mechanizmy modulacji translacji szlaku sygnałowego IRP/IRE można znaleźć w [323]. Niedobór żelaza indukuje powstanie apo-IRP1, który wiąże się do sekwencji IRE w regionie 5'UTR mRNA Ft i Fpn, co prowadzi do zahamowania ich translacji. Natomiast wiązanie się apo-IRP1 do sekwencji IRE w regionie 3'UTR mRNA TfR1 i DMT1 prowadzi do wzrostu poziomu kodowanych przez nie białek. W przeciwnej sytuacji nadmiar żelaza indukuje powstanie holo-IRP1, którego efekt działania jest wprost przeciwny (hamuje translację TfR1 i DMT1 oraz prowadzi do wzrostu poziomu białek Fpn i Ft) [319].

3. Mechanizm regulacyjny działający na poziomie ogólnoustrojowym

Mechanizm regulacyjny działający na poziomie całego ustroju jest zależny od hepcydyny, hormonu wytwarzanego w wątrobie [81, 206]. Główne czynniki regulujące transkrypcję hepcydyny obejmują stężenie żelaza we krwi, zapasy żelaza w wątrobie, stan zapalny oraz erytropoezę [257]. Hepcydyna wiąże się z ferroportyną występującą w błonie enterocyta. Konsekwencją tego wiązania jest przyłączenie kinazy Janusowej (Jak2), która prowadzi do fosforylacji reszt tyrozynowych w ferroportynie, co stanowi sygnał do translokacji białka z błony do cytoplazmy. W następstwie, ferroportyna jest defosforylowana, ubikwitynowana, by ostatecznie ulec degradacji. W efekcie degradacji ferroportyny żelazo zostaje zablokowane w enterocytach, prowadząc do zmniejszenia się ilości żelaza transportowanego do krwi [120, 319].

4. Rola hepcydyny

Na tle powyższego tekstu wybrzmiała już istotna rola hepcydyny. Należy jednak przyjrzeć się możliwości regulowania ekspresji hepcydyny, co bezpośrednio przekłada się na regulację ilości żelaza. Jeden z mechanizmów regulacji hepcydyny obejmuje białko transportowe, jakim jest transferyna (Tf) i białka hemochromatozy (HFE), które to konkurują o wiązanie błonowego receptora transferyny 1 (TfR1) [9]. W sytuacji, gdy poziom żelaza utrzymuje się w normie lub jest w nadmiarze, Tf wiąże się z wysokim powinowactwem do TfR1, tym samym uniemożliwiając wiązanie HFE–TfR1. W tej sytuacji wolny HFE wysyła sygnały do jądra hepatocytów, zwiększając ekspresję hepcydyny. Z kolei, w sytuacji deficytu żelaza, HFE wiąże się do TfR1 prowadząc do obniżenia ekspresji hepcydyny [120, 206].

Drugi mechanizm prowadzący do ekspresji hepcydyny wiąże się z występowaniem procesów zapalnych [257]. Nadprodukcja cytokin, takich jak $IL1\beta$, $TNF-\alpha$ i $IL-6$ przez makrofagi oraz $IFN-\gamma$ przez limfocyty osłabia syntezę erytropoetyny (EPO), zmniejsza odpowiedź na erytropoezę, zwiększa poziom hepcydyny i może aktywować erytrofagocytozę, zwłaszcza w postaci ostrej [9, 41, 206]. Cytokina $IL-6$ indukuje ekspresję genu *Hamp* przez szlak JAK–STAT3, czyli szlak kinazy janusowej (JAK) i przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3 (STAT3). Precyzując, $IL-6$ wiąże się z białkiem JAK, wyzwalając jego autofosforylację i aktywację, co skutkuje fosforylacją czynnika transkrypcyjnego STAT3. Z kolei STAT3 ulega translokacji do jądra, gdzie prowadzi do pobudzenia promotora genu dla hepcydyny, wpływając na wzrost ekspresji hepcydyny [120, 206].

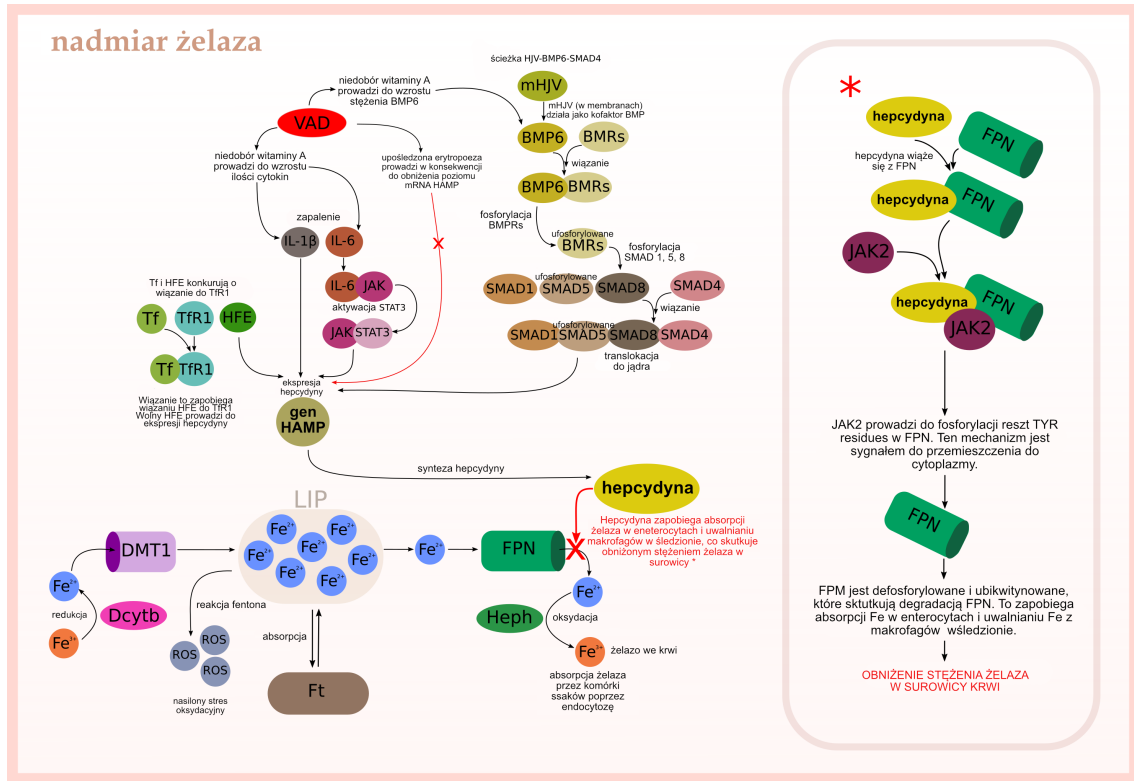
Trzeci szlak modulujący ekspresję hepcydyny w odpowiedzi na wewnątrzkomórkowy status żelaza jest to szlak HJV–BMP6–SMAD4, czyli szlak hemojuweliny (HJV), białka morfogenetycznego kości 6 (BMP6) i białka sygnałowego 4 (SMAD4) [191]. Hemojuwelina jest kofaktorem niezbędnym do wiązania BMP6 z receptorem BMP (BMPR) prowadząc do fosforylacji białek sygnałowych SMAD 1, 5 i 8 (białka przenoszące sygnał do jądra komórko-

wego). Ufosforylowane białka SMAD tworzą kompleks, aby w następnym etapie przyłączyć kolejne białko – SMAD4, co stanowi sygnał do przemieszczenia się do jądra komórkowego i stymulowania transkrypcji genu hepcydyny [242]. Wspomniany mechanizm jest uruchamiany w sytuacji nadmiaru żelaza. W przypadku niedoboru żelaza dochodzi do hamowania szlaku HJV–BMP6–SMAD4 przy udziale furyny, a dokładniej przez działanie rozpuszczalnej postaci hemojuweliny (sHJV). sHJV jest uwalniana z błony komórkowej przez furynę, aby następnie związać się z białkiem BMP6, uniemożliwiając jego wiązanie się z receptorem, w efekcie czego dochodzi do hamowania szlaku HJV–BMP6–SMAD4 i tym samym do ograniczenia stężenia hepcydyny [120].

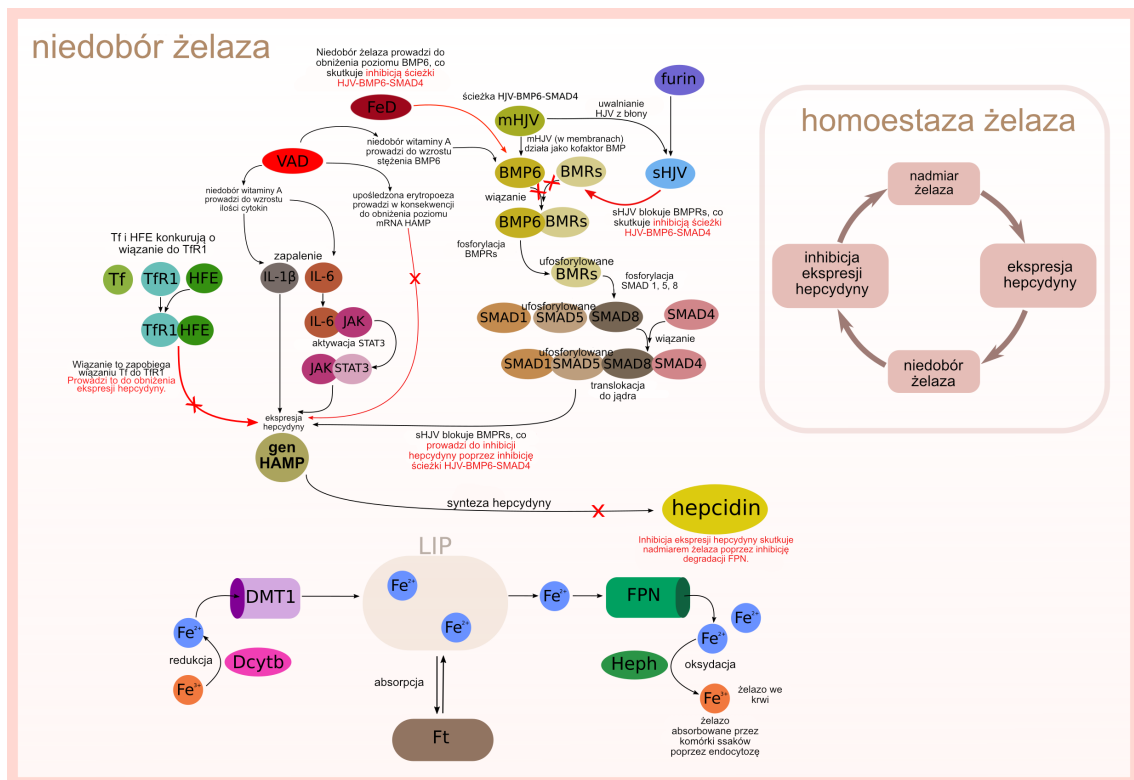
5. Wpływ deficytu witaminy A

Ekspresja hepcydyny może być także modulowana przez deficyt witaminy A (VAD). Okazuje się, że witamina A może wpływać na zwiększenie ekspresji hepcydyny lub jej obniżenie. VAD charakteryzuje się wzrostem poziomu cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 i IL-1 β , które wpływają na wzrost ekspresji hepcydyny [9, 41]. Deficyt witaminy A ma także wpływ na wzrost poziomu białka BMP6, niezbędnego w szlaku HJV–BMP6–SMAD4 również stymulującego transkrypcję genu hepcydyny [41, 191]. Z drugiej jednak strony, poziom białka BMP6 jest obniżony w przypadku niedoboru żelaza [41, 191], co z kolei wpływa na spadek ekspresji hepcydyny poprzez uniemożliwienie aktywacji ścieżki HJV–BMP6–SMAD4. Obok tych mechanizmów równie ważnym jest proces modulowania ekspresji hepcydyny w wyniku upośledzenia erytropoezy, zarówno w sytuacji niedoboru żelaza, jak i niedoboru witaminy A [41]. Niedobór witaminy A prowadzi do upośledzenia erytropoezy poprzez obniżenie ekspresji erytropoetyny, co prowadzi do wad rozwojowych erytrocytów i w konsekwencji gromadzenia się grupy hemowej w śledzionie [41].

Powyżej omówione zagadnienia, jak i pełen mechanizm regulacji metabolizmu żelaza został graficznie przedstawiony na Rysunkach 4.4 i 4.5. Rysunek 4.4 dotyczy schematu interakcji między modelowanymi podprocesami w sytuacji nadmiaru, podczas gdy Rysunek 4.5 dotyczy sytuacji niedoboru żelaza.



RYSUNEK 4.4: Schemat interakcji między modelowanymi podprocesami w sytuacji nadmiaru żelaza. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [100].



RYSUNEK 4.5: Schemat interakcji między modelowanymi podprocesami w sytuacji niedoboru żelaza. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [100].

4.3.2 Model

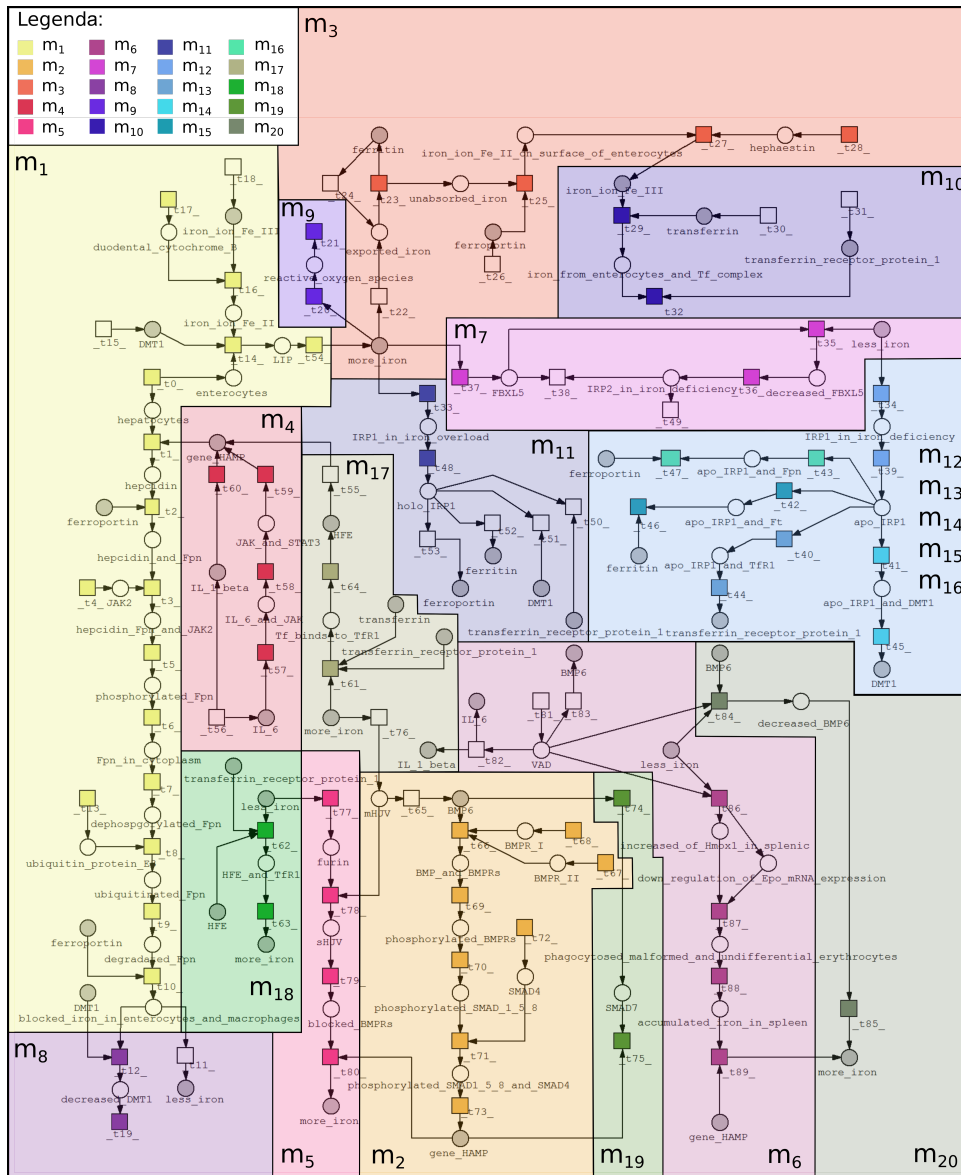
Zaproponowany model dotyczy mechanizmów opisanych powyżej, jednak głównym powodem jego utworzenia modelu jest usystematyzowanie wiedzy i zrozumienie zależności między niedoborem witaminy A a niedoborem żelaza. Wiadomo, że deficyt witaminy A ma wpływ na regulację homeostazy żelaza, jednak mechanizm ten pozostaje nieznanym. Model matematyczny oparty o formalizm klasycznych sieci Petriego, został on stworzony za pomocą narzędzia *Snoopy* [117], natomiast wyznaczenie t-niezmienników, zbiorów MCT, t-klastrów, a także analizę knockout oraz symulację knockout przeprowadzono przy użyciu narzędzia *Holmes* [230, 228]. Ponadto, analiza ważności została przeprowadzona w oparciu o wygenerowane t-niezmienniki i opiera się o skrypt własny. Podobnie forma reprezentacji wyników klastrowania jest to koncepcja autora.

Model oparty o sieci Petriego przedstawiono na Rysunku 4.6, zaproponowana sieć jest scharakteryzowana przez następujące właściwości: 69 pasywnych komponentów (miejsc), 90 aktywnych komponentów (tranzyjni), 20 zbiorów MCT, 20 t-klastrów oraz 402 t-niezmienniki (podprocesy). Model zilustrowany na Rysunku 4.6 zawiera tylko nazwy pasywnych komponentów – miejsca, natomiast nazwy aktywnych komponentów – tranzyjni umieszczono w Tabeli 4.7. Tabela ta zawiera dwie kolumny: *ID* – zawierająca identyfikator tranzyjni, oraz *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca odpowiadającą identyfikatorowi nazwę tranzyjni, która określa jej przeznaczenie w systemie.

TABELA 4.7: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzyjni (patrz [100]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_0	komórki zaangażowane w homeostazę żelaza	t_{45}	wzrost DMT1 przez apo-IRP1
t_1	synteza hepcydyny	t_{46}	hamowanie Ft przez apo-IRP1
t_2	hepcydyna wiąże się z Fpn	t_{47}	hamowanie Fpn przez apo-IRP1
t_3	hepcydyna i Fpn wiążą JAK2	t_{48}	tworzenie holo-IRP1
t_4	źródło JAK2	t_{49}	tworzenie apo-IRP2
t_5	fosforylacja reszt Tyr w Fpn przez JAK2	t_{50}	spadek TfR1 przez holo-IRP1
t_6	sygnał przemieszczenia do cytoplazmy	t_{51}	spadek DMT1 przez holo-IRP1
t_7	defosforylacja Fpn	t_{52}	wzrost Ft przez holo-IRP1
t_8	ubikwitynacja Fpn	t_{53}	wzrost Fpn przez holo-IRP1
t_9	lizosomalna degradacja Fpn	t_{54}	poziom żelaza
t_{10}	zdegradowana Fpn zapobiega uwalnianiu żelaza z enterocytów i makrofagów śledziony	t_{55}	ekspresja hepcydyny
t_{11}	akumulacja żelaza prowadzi do zmniejszenia stężenia żelaza w surowicy	t_{56}	zapalenie
t_{12}	obniżenie poziomu DMT1 („regulacja w dół” (<i>ang. down-regulation</i>) DMT1) przez zablokowane żelazo w enterocytach	t_{57}	wiązanie IL-6 z JAK
t_{13}	źródło białka ubikwityny E3	t_{58}	aktywacja STAT3
t_{14}	eksport żelaza do enterocytów przez DMT1	t_{59}	ekspresja hepcydyny przez JAK-STAT3
t_{15}	źródło DMT1	t_{60}	regulacja ekspresji hepcydyny
t_{16}	redukcja jonów żelaza Fe^{3+} do Fe^{2+} przez Dcytb	t_{61}	Tf wiąże się z TfR1 w przypadku normy (prawidłowego poziomu) żelaza
t_{17}	źródło Dcytb	t_{62}	HFE wiąże się z TfR1 w przypadku niedoboru żelaza
t_{18}	źródło jonów żelaza Fe^{3+}	t_{63}	HFE wiąże się z TfR1 i zapobiega wiązaniu Tf z TfR1, co zmniejsza ekspresję hepcydyny
t_{19}	obniżenie poziomu DMT1 prowadzi do zmniejszenia wchłaniania żelaza	t_{64}	Tf wiąże się z TfR1 i zapobiega wiązaniu HFE
t_{20}	reakcje Fentona	t_{65}	mHJV działa jako kofaktor BMP
t_{21}	wzrost stresu oksydacyjnego poprzez ROS	t_{66}	BMP6 wiąże się do BMPR I and II
t_{22}	eksport żelaza z LIP do komórek	t_{67}	źródło BMPR I

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t ₂₃	absorpcja żelaza	t ₆₈	źródło BMPR II
t ₂₄	magazynowanie żelaza w enterocytach	t ₆₉	BMP i BMPRs indukują fosforylację BMPRs
t ₂₅	eksport żelaza z enterocytów do krwiobiegu przez Fpn	t ₇₀	fosforylację SMAD 1,5 i 8
t ₂₆	źródło ferroportyny	t ₇₁	fosforylowane SMAD 1,5 i 8 wiążą SMAD4
t ₂₇	utlenienie Fe ²⁺ do Fe ³⁺ przez Heph	t ₇₂	źródło SMAD4
t ₂₈	źródło hefestyny	t ₇₃	translokacja do jądra
t ₂₉	żelazo z enterocytów wiąże się z Tf	t ₇₄	BMP6 indukuje SMAD7



RYSUNEK 4.6: Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący wpływu relacji pomiędzy żelazem i witaminą A. Zaproponowana sieć Petriego została podzielona na 20 podprocesów odpowiadających zbiorom MCT z Tabeli 4.8; wyróżnione podprocesy: m₁ – eksport żelaza do enterocytu, m₂ – ekspresja hepcydyny poprzez szlak HJV–BMP6–SMAD4, m₃ – absorpcja żelaza przez Ft, m₄ – ekspresja hepcydyny przez cytokiny IL-6 i IL-1β, m₅ – hamowanie ekspresji hepcydyny przez rozpuszczalny HJV, m₆ – upośledzenie erytropoezy, m₇ – zmniejszenie ilości Ft i Fpn w przypadku niedoboru żelaza, m₈ – degradacja i internalizacja Fpn, m₉ – reakcja Fentona, m₁₀ – absorpcja żelaza przez komórki ssaków, m₁₁ – tworzenie holo-IRP1 (w przypadku nadmiaru żelaza), m₁₂ – m₁₆ – tworzenie apo-IRP1 w przypadku niedoboru żelaza, m₁₇ – wzrost ekspresji hepcydyny w przypadku, gdy stężenie żelaza jest w normie oraz gdy jest w nadmiarze, m₁₈ – zmniejszenie ekspresji hepcydyny w przypadku niedoboru żelaza, m₁₉ – negatywna regulacja hepcydyny przez SMAD7, m₂₀ – hamowanie szlaku HJV–BMP6–SMAD4 (w przypadku niedoboru żelaza i niedoboru witaminy A). Wspomniana Tabela 4.8 obok bardziej szczegółowych opisów zawiera także informacje o tranzycjach zawierających się w poszczególnych zbiorach MCT. Rysunek pochodzi z pracy [100].

4.3.3 Analiza i wyniki

Analiza modelu przedstawionego w poprzednim paragrafie opiera się zarówno o klasyczne, jak i rozszerzone metody analizy, w tym także na zaproponowanej metodzie – analizie ważności.

Analiza zbiorów MCT oraz analiza t-klastrów

Zaproponowany model wpływu deficytu witaminy A na homeostazę żelaza zawiera 20 nietrzywalnych zbiorów MCT wyróżnionych w Tabeli 4.8. Tabelę 4.8 podzielono na trzy kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory kolejnych zbiorów MCT, *Zawarte tranzycje* – kolumna składająca się z tranzycji należących do poszczególnych zbiorów MCT, *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca opis znaczenia biologicznego, przypisany do każdego zbioru MCT. Ponadto wyróżnione w Tabeli 4.8 zbiory MCT znalazły się również na schemacie modelu na Rysunku 4.6.

TABELA 4.8: Lista nietrzywalnych zbiorów MCT – zbiorów składających się z co najmniej dwóch tranzycji należących do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników (patrz [100]).

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	$t_0, t_1, t_2, t_3, t_4,$ $t_5, t_6, t_7, t_8, t_9,$ $t_{10}, t_{13}, t_{14}, t_{16},$ t_{17}, t_{54}	Jony żelaza Fe^{3+} ulegają redukcji do Fe^{2+} przez Dcytb i są transportowane do enterocyty przez DMT1 (żelazo trafia do puli – LIP). Hepcydyna wiąże się z Fpn, aby następnie przyłączyć kinazę Jak2. Kinaza prowadzi do fosforylacji reszt tyr w Fpn, co stanowi sygnał do przemieszczenia się do cytoplazmy. Fpn jest defosforylowana, ubikwitynowana, by następnie ulec degradacji – mechanizm ten prowadzi do zablokowania żelaza w enterocytach i makrofagach.
m_2	$t_{66}, t_{67}, t_{68}, t_{69},$ $t_{70}, t_{71}, t_{72}, t_{73}$	Ekspresja hepicydyny przez szlak HJV–BMP6–SMAD4.
m_3	$t_{23}, t_{25}, t_{27}, t_{28}$	Jony żelaza Fe^{2+} ulegają absorpcji przez Ft lub pozostają przetransportowane do krwi przez Fpn przy udziale hefajstyny (utleniającej jony Fe^{2+} do Fe^{3+}).
m_4	$t_{57}, t_{58}, t_{59}, t_{60}$	Ekspresja hepicydyny przez cytokiny IL-6 (szlak JAK–STAT3) i IL-1 β .
m_5	$t_{77}, t_{78}, t_{79}, t_{80}$	Niedobór żelaza aktywuje furynę, która uwalnia hemojuwelinę z błony komórkowej. sHJV wiąże białkiem BMP6, uniemożliwiając jego wiązanie się z receptorem, prowadząc do hamowania szlaku HJV–BMP6–SMAD4.
m_6	$t_{86}, t_{87}, t_{88}, t_{89}$	Zarówno niedobór żelaza jaki i niedobór witaminy A wpływa na upośledzenie erytropoezy, co prowadzi do gromadzenia się grupy hemowej w śledzionie i obniżenia ekspresji hepicydyny.
m_7	t_{35}, t_{36}, t_{37}	Niski poziom żelaza prowadzi do degradacji FBXL5, co powoduje wzrost białka IRP2. IRP2 odgrywa tę samą rolę co IRP1 – prowadzi do wzrostu poziomu Tfr1 i DMT1 oraz do zmniejszenia Ft i Fpn.
m_8	t_{12}, t_{19}	Negatywna regulacja DMT1 prowadzi do spadku absorpcji żelaza.
m_9	t_{20}, t_{21}	Jony żelaza Fe^{2+} zaangażowane w reakcję Fentona prowadzą do zwiększania reaktywnych form tlenu, zwiększając poziom stresu oksydacyjnego.
m_{10}	t_{29}, t_{32}	Absorpcja żelaza przez komórki ssaków.
m_{11}	t_{33}, t_{48}	Nadmiar żelaza indukuje powstanie holo-IRP1 (mechanizm IRP/IRE).
m_{12}	t_{34}, t_{39}	Niedobór żelaza indukuje powstanie apo-IRP1 (mechanizm IRP/IRE).
m_{13}	t_{40}, t_{44}	Wiązanie się apo-IRP1 do sekwencji IRE w regionie 3'UTR mRNA Tfr1, prowadzi do wzrostu poziomu białka Tfr1.
m_{14}	t_{41}, t_{45}	Wiązanie się apo-IRP1 do sekwencji IRE w regionie 3'UTR mRNA DMT1, prowadzi do wzrostu poziomu białka DMT1.
m_{15}	t_{42}, t_{46}	Wiązanie się apo-IRP1 do sekwencji IRE w regionie 5'UTR mRNA Ft, prowadzi do zahamowania translacji Ft.
m_{16}	t_{43}, t_{47}	Wiązanie się apo-IRP1 do sekwencji IRE w regionie 5'UTR mRNA Fpn, prowadzi do zahamowania translacji Fpn.
m_{17}	t_{61}, t_{64}	W sytuacji normy lub nadmiaru żelaza Tf wiąże się do Tfr1 (uniemożliwiając wiązanie HFE). Wolny HFE wysyła sygnały do jądra hepatocytów, zwiększając ekspresję hepicydyny.

TABELA 4.10: Lista podprocesów zawartych w t-klastrach (patrz [100]).

Podproces	Interpretacja biologiczna
a	Jony żelaza są transportowane do krwi przez Fpn, aby ulec absorpcji przez komórki ssaków na drodze endocytozy.
b	Jony żelaza Fe^{2+} zaangażowane są reakcją Fentona, ale reakcja ta zachodzi rzadziej niż absorpcja żelaza w enterocytach.
c	Mechanizm IRP/IRE: nadmiar żelaza indukuje powstanie holo-IRP1, prowadząc do zwiększenia poziomu białek Fpn i Ft oraz prowadząc do zmniejszenia poziomu DMT1 and TfR1.
d	Jony żelaza transportowane są do enterocyty przez DMT1, gdzie następnie są absorbowane przez Ft.
e	Mechanizm IRP/IRE: niedobór żelaza indukuje powstanie apo-IRP1, prowadząc do zwiększenia poziomu białek DMT1 i TfR1 oraz prowadząc do zmniejszenia poziomu Fpn i Ft.
f	W sytuacji normy lub nadmiaru żelaza Tf wiąże się do TfR1 (uniemożliwiając wiązanie HFE). Wolny HFE wysyła sygnały do jądra hepatocytów, zwiększając ekspresję hepcydyny.
g	W sytuacji deficytu żelaza, HFE wiąże się do TfR1 prowadząc do obniżenia ekspresji hepcydyny.
h	Ekspresja hepcydyny przez cytokiny IL-6 (szlak JAK-STAT3) i IL-1 β .
i	Niedobór witaminy A stymuluje ekspresję hepcydyny poprzez wzrost cytokin IL-6 i IL-1 β .
j	Hepcydyna wiąże się z Fpn i następnie przyłącza Jak2. Kinaza prowadzi do fosforylacji reszt tyr w Fpn, co stanowi sygnał do przemieszczenia się do cytoplazmy. Fpn jest defosforylowana, ubikwitynowana i następnie ulega degradacji prowadząc do zablokowania żelaza w enterocytach i makrofagach (co skutkuje obniżeniem poziomu żelaza w osoczu).
k	BMP6 indukuje SMAD7, który negatywnie reguluje ekspresję hepcydyny.
l	Ekspresja hepcydyny przez zapalenie.
m	TfR1 konieczny do absorpcji żelaza przez komórki ssaków.
n	Ekspresja hepcydyny przez szlak HJV-BMP6-SMAD4.
o	Niedobór żelaza aktywuje furynę, która uwalnia hemojuwelinę z błony komórkowej. sHJV wiąże białkiem BMP6, uniemożliwiając jego wiązanie się z receptorem, prowadząc do hamowania szlaku HJV-BMP6-SMAD4.
p	Deficyt witaminy A powoduje wzrost poziomu BMP6.
r	BAMP6 zaangażowany w szlak HJV-BMP6-SMAD4 wpływa na ekspresję hepcydyny.
s	Niedobór żelaza powoduje spadek poziomu BMP6, co skutkuje zahamowaniem szlaku HJV-BMP6-SMAD4 i zahamowaniem ekspresji hepcydyny.
t	Zarówno niedobór żelaza jaki i niedobór wit. A wpływa na upośledzenie erytropoezy, co prowadzi do gromadzenia się grupy hemowej w śledzionie i obniżenia ekspresji hepcydyny.

Celem każdej analizy t-klastrów jest znalezienie podprocesów, które mogą odgrywać istotną rolę w funkcjonowaniu modelowanego systemu. Wydaje się, że jeśli pewien podproces występuje w większej liczbie t-klastrów, to może on być stymulowany przez różne, niezależne procesy lub może on stymulować te procesy. W związku z tym, na podstawie tych wyników i znajomości struktury modelu, m.in. można wnioskować czy podproces ten jest stymulowany częściej czy rzadziej. Z pewnością natomiast można wysnuć wniosek, które podprocesy są ważniejsze od innych. Jednakże, analiza t-klastrów bywa dość ogólna, przez co niektóre zjawiska mogą być ignorowane, niezauważane lub nawet jeśli zostają zidentyfikowane, to często wymagają potwierdzenia poprzez zastosowanie bardziej precyzyjnych analiz. Na przykład, dla modelu opisanego w niniejszym podrozdziale wykazano, że zasadniczym mechanizmem badanego układu jest regulacja ekspresji hepcydyny – jest to dość oczywisty wniosek. Wszakże przedstawiony model obejmuje kilka niezależnych szlaków zaangażowanych w ekspresję hepcydyny, w tym szlak HJV-BMP6-SMAD4 (podproces *n* – oznaczenia zgodne z Tabela 4.10), wolny HFE (podproces *f*) oraz szlak JAK-STAT3 modulowany przez cytokiny IL-6 i IL-1 β (podproces *h*). W związku z tym uwzględniono częstotliwość tych podprocesów we wszystkich t-klastrach i jak wykazano w Tabeli 4.9: podproces *n* występuje w 6 t-klastrach, podproces *f* również występuje w 6 t-klastrach, natomiast podproces *h* występuje aż w 13 t-klastrach. Wydaje się zatem, iż ekspresja hepcydyny jest częściej indukowana przez cytokiny (podproces *h*) niż inne szlaki. Tego typu wnioski wymagają jednak dodatkowego potwierdzenia po-

przez przeprowadzenie bardziej szczegółowych analiz, przez co rozumie się zaproponowaną analizę ważności, ale także znane rozszerzone metody analiz, takie jak knockout symulacyjny.

Analiza ważności

Analiza ważności została wykonana dla wybranych procesów elementarnych związanych z ekspresją hepcydyny, zarówno dla mechanizmów stymulujących, jak i hamujących. Ważność jest rozumiana jako liczba wystąpień danej tranzycji we wsparciach t-niezmienników podzielona przez liczbę wszystkich wsparć t-niezmienników, co można oznaczyć jako *tranz./t-inw.* lub może być wyrażone procentowo [%]. Formalna definicja znajduje się we wprowadzeniu tego rozdziału, patrz definicja 4.1.1. Dodatkowo, obok tej analizy wykonano także symulację knockout dla tego samego zbioru wybranych procesów elementarnych (tranzycji), w wyniku której otrzymano średnią liczbę uruchomień danej tranzycji we wszystkich symulacjach. Formalny opis knockoutu symulacyjnego znajduje się w podrozdziale 2.2.1. Wyniki wspomnianych analiz przedstawiono w Tabeli 4.11, która zawiera następujące kolumny: *Podprocesy* – kolumna zawierająca nazwy wybranych podprocesów, gdzie każdy podproces składa się z co najmniej jednego procesu elementarnego, *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory odpowiednich tranzycji, *Nazwa procesu elementarnego* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane do każdej tranzycji, *Ważność* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%]. Ponadto, Tabela 4.11 zawiera również kolumnę *AvgF_T* – zawierającą wyniki symulacji knockout, a więc średnią liczbę uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach. Poza podziałem pionowym można także zauważyć, że Tabela 4.11 została podzielona w poziomie, gdzie górna część dotyczy podprocesów stymulujących pozytywnie ekspresję hepcydyny, a dolna część dotyczy podprocesów hamujących ekspresję hepcydyny.

TABELA 4.11: Wyniki bardziej szczegółowych analiz, analizy ważności oraz symulacji knockout, dla wybranych procesów elementarnych związanych z pozytywną i negatywną regulacją ekspresji hepcydyny (patrz [100]).

Podproces	ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność		AvgF _T
			tranz./t-inw.	[%]	
Podprocesy pozytywnie regulujące ekspresję hepcydyny					
szlak HJV–BMP6–SMAD4	<i>t</i> ₇₃	translokacja do jądra	118/402	29%	13,98
cytokiny IL-6 i IL-1β	<i>t</i> ₅₉	ekspresja hepcydyny przez JAK–STAT3	252/402	63%	46,94
	<i>t</i> ₆₀	modulowanie ekspresji hepcydyny	252/402	63%	49,86
	<i>t</i> ₈₂	VAD prowadzi do upośledzenia odpowiedzi zapalnej, która powoduje wzrost cytokin	126/402	31%	24,38
wolny HFE	<i>t</i> ₅₅	ekspresja hepcydyny	40/402	10%	5,80
	<i>t</i> ₆₄	Tf wiąże się do TfR1, zapobiegając wiązaniu HFE	106/402	26%	6,01
Podprocesy negatywnie regulujące ekspresję hepcydyny					
hamowanie szlaku HJV–BMP6–SMAD4	<i>t</i> ₈₀	zahamowanie ekspresji hepcydyny	48/402	12%	2,00
	<i>t</i> ₈₅	spadek BMP6 hamuje szlak BMP i ekspresję hepcydyny	78/402	19%	0,26
wiązanie HFE do TfR1	<i>t</i> ₆₂	HFE wiąże się do TfR1 w przypadku niedoboru żelaza	68/402	17%	0,19
	<i>t</i> ₆₃	HFE wiąże się do TfR1, zapobiegając wiązaniu Tf do TfR1, co skutkuje spadkiem ekspresji hepcydyny	68/402	17%	0,19
indukowanie SMAD7 przez BMP6	<i>t</i> ₇₄	BMP6 indukuje SMAD7	41/402	10%	13,99
	<i>t</i> ₇₅	negatywna regulacja hepcydyny	41/402	10%	13,96
	<i>t</i> ₈₆	upośledzenie erytropoezy	38/402	9%	0,89

Analiza ważności pozwala określić, który elementarny proces ma większe znaczenie dla funkcjonowania całego modelu. Na przykład, na podstawie Tabeli 4.11 można zauważyć, że wśród procesów elementarnych stymulujących ekspresję hepcydyny najważniejsze są tranzycje *t*₅₉ i *t*₆₀ – tranzycje te odpowiadają procesom elementarnym, które pozytywnie regulują ekspresję hepcy-

dyny przez cytokiny. W tym przypadku wyniki potwierdzają wnioski z analizy t-klastrów, która wykazała, że ekspresja hepcydyny indukowana przez cytokiny (podproces h) może być bardziej znacząca niż stymulacja przez pozostałe mechanizmy. Ponadto wyniki analizy średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach pozwoliły wskazać, że tranzycja t_{60} jest najczęściej uruchamiana spośród wszystkich procesów elementarnych pozytywnie regulujących ekspresję hepcydyny. Dlatego też elementarny podproces, jakim jest dodatnia regulacja ekspresji hepcydyny przez cytokiny, występuje częściej niż inne podstawowe procesy pozytywnie regulujące hepcydynę.

Przyglądając się tym wynikom w sposób kompleksowy, a zatem porównując wyniki ogólnych i bardziej szczegółowych analiz można zauważyć, że analiza klastrów wyłania główny czynnik regulacji homeostazy żelaza – hepcydynę. Poniższe wyniki podzielono względem mechanizmów pozytywnie i negatywnie regulujących ekspresję hepcydyny oraz wpływ deficytu witaminy A na regulację homeostazy żelaza.

1. Wyniki analizy mechanizmów pozytywnie regulujących ekspresję hepcydyny

Istnieje kilka niezależnych mechanizmów i elementów biologicznych wpływających pozytywnie na ekspresję hepcydyny, są to:

- a) HJV–BMP6–SMAD4 (podproces n zawarty w 6 klastrach, patrz Tabela 4.9);
- b) cytokina IL-6 (ścieżka JAK–STAT3) i IL-1 β (podproces h zawarty w 13 t-klastrach, patrz Tabela 4.9);
- c) wolny HFE; w przypadku normy lub nadmiaru żelaza, Tf wiąże się z TfR1 zapobiegając wiązaniu HFE (podproces f zawarty w 6 t-klastrach, patrz Tabela 4.9).

Wydaje się zatem, iż ekspresja hepcydyny indukowana przez cytokiny może być bardziej znacząca niż promowanie pozytywnej regulacji przez inne mechanizmy. Fakt ten można wiązać z niedoborem witaminy A, która dodatkowo stymuluje stan zapalny poprzez wzrost wspomnianych cytokin. Natomiast inne podprocesy, jak podproces n odpowiadający ścieżce HJV–BMP6–SMAD4 oraz podproces f odpowiadające sytuacji, w której istnieje wolny HFE, występują w tej samej liczbie klastrów. Dlatego rola tych podprocesów powinna być równie ważna dla funkcjonowania systemu.

Wyniki te porównano z wynikami uzyskanymi z bardziej szczegółowej analizy, jaką jest analiza ważności (patrz Tabela 4.11, kolumna *Ważność*). Wyniki analizy ważności wykazały, że najważniejszymi procesami elementarnymi są tranzycje związane z indukcją ekspresji hepcydyny przez cytokiny (t_{59} , t_{60} ważność na poziomie 63%). Z drugiej strony, procesy elementarne związane ze stymulacją ekspresji hepcydyny przez szlak HJV–BMP6–SMAD4 oraz przez wolny HFE mają względem siebie podobny poziom ważności (t_{73} – 29%, t_{64} – 26%, odpowiednio). Tym samym, wyniki analizy istotności potwierdzają wyniki analizy t-klastrów dla podprocesów związanych z pozytywną stymulacją ekspresji hepcydyny.

Oprócz oszacowania ważności wybranych tranzycji uwzględniono również ich średnią liczbę uruchomień (patrz kolumna $AvgF_T$ w Tabeli 4.11). Jak widać najczęściej uruchamiane są tranzycje t_{59} , t_{60} i t_{82} odpowiadające stymulacji ekspresji hepcydyny przez cytokiny, następną w kolejności jest tranzycja t_{73} odpowiadająca stymulowaniu ekspresji hepcydyny przez szlak HJV–BMP6–SMAD4 i w końcu tranzycje t_{55} i t_{64} odpowiadające obecności wolnego HFE. Pomimo tego, że dwa ostatnie procesy elementarne są równie ważne w sensie struktury całego modelu, mogą zachodzić z różną częstotliwością, być uruchamiane z różną częstością. Należy mieć na uwadze fakt, że analiza ważności jest analizą strukturalną, podczas gdy analiza

średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach, jak nazwa wskazuje, jest analizą symulacyjną.

2. Wyniki analizy mechanizmów negatywnie regulujących ekspresję hepcydyny

Podobnie jak wyżej, istnieje kilka niezależnych mechanizmów i elementów biologicznych wpływających negatywnie na ekspresję hepcydyny, są to:

- a) hamowanie szlaku HJV–BMP6–SMAD4 (podproces *o* zawarty w 6 t-klastrach i podproces *y* zawarty w 12 t-klastrach, patrz Tabela 4.9);
- b) wiązanie HFE do TfR1 (podproces *g* zawarty w 7 t-klastrach, patrz Tabela 4.9);
- c) indukcja SMAD7 przez BMP6 (podproces *k* zawarty w 6 t-klastrach, patrz Tabela 4.9);
- d) upośledzenie erytropoezy (podproces *t* zawarty w 12 t-klastrach, patrz Tabela 4.9).

Analiza t-klastrów wykazała, że spośród podprocesów hamujących ekspresję hepcydyny bardziej istotne niż pozostałe mechanizmy wydają się być: hamowanie szlaku HJV–BMP6–SMAD4 i upośledzenie erytropoezy. Szlak HJV–BMP6–SMAD4 może być hamowany przez dwa różne mechanizmy. Pierwszy jest związany z aktywacją furyny w przypadku niedoboru żelaza. Furyna uwalnia HJV z błony w wyniku reakcji proteolitycznej, a w następstwie rozpuszczalny sHJV blokuje receptory BMPRs, powodując hamowanie szlaku HJV–BMP6–SMAD4. Drugi mechanizm związany jest z redukcją BMP6 w przypadku niedoboru żelaza i VAD. Jak wiadomo BMP6 jest niezbędnym elementem szlaku HJV–BMP6–SMAD4, a więc bez niego nie dojdzie do pozytywnej regulacji ekspresji hepcydyny.

Podobnie jak w przypadku podprocesów związanych ze stymulacją ekspresji hepcydyny, również w tym przypadku przeprowadzono bardziej szczegółową analizę mechanizmów hamujących. Analiza ważności wykazała, że najważniejszym procesem elementarnym jest tranzycja związana z hamowaniem szlaku HJV–BMP6–SMAD4 (t_{85} o ważności na poziomie 19%), następnie w kolejności są procesy elementarne związane z wiązaniem HFE do TfR1 (t_{62} i t_{63} , oba z ważnością 17%), a następnie procesy elementarne związane z indukcją SMAD7 przez BMP6 (t_{74} i t_{75} o ważności 10%), a na koniec elementarny proces odpowiadający upośledzeniu erytropoezy (t_{85} z ważnością 9%). Te wyniki analizy istotności nie są zgodne z analizą klastrowania, która to wykazała, że podproces *o* odpowiadający hamowaniu szlaku HJV–BMP6–SMAD4 oraz podproces *t* odpowiadający zaburzeniu erytropoezy, wydają się być najbardziej istotne, podczas gdy tylko pierwszy z nich jest naprawdę ważny. Ponadto podproces *t* ma najmniejsze znaczenie w analizie ważności wybranych procesów elementarnych. Należy jednak mieć na uwadze, że analiza t-klastrów może być zbyt ogólna i często stanowi naprowadzenie na dalsze analizy. Podsumowując, analiza ważności wykazała, że najważniejszymi mechanizmami hamującymi ekspresję hepcydyny jest hamowanie szlaku HJV–BMP6–SMAD4, a także wiązanie HFE i TfR1.

Symulacja knockout

Oprócz analizy istotności wykonano również symulację knockout – analizę średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach (1000 kroków, 100 powtórzeń). Podkreślić należy, że fakt, iż dany elementarny proces jest istotny z punktu widzenia struktury systemu, nie oznacza, że jest on uruchamiany najczęściej. W Tabeli 4.11 w kolumnie $AvgF_T$ można zaobserwować, że najczęściej uruchamiana jest tranzycja odpowiadająca indukcji SMAD7 przez BMP6, a więc mechanizm pośrednio hamujący szlak HJV–BMP6–SMAD4. Jednak tranzycje t_{74} i t_{75} odpowiadające wspomnianemu podprocesowi nie mają tak dużego znaczenia

dla struktury modelowanego systemu. Inne mechanizmy hamowania ekspresji hepcydyny (tj. hamowanie szlaku HJV–BMP6–SMAD4 lub wiązanie HFE z TfR1), które są ważne strukturalnie, występują ze znacznie mniejszą częstotliwością niż indukcja SMAD7 przez BMP6.

3. Wyniki analizy relacji między żelazem a deficytem witaminy A

Analiza t-klastrów zidentyfikowała kilka podprocesów bezpośrednio związanych z niedoborem witaminy A; wyróżniamy następujące:

- a) VAD dodatkowo stymuluje ekspresję hepcydyny poprzez wzrost IL-6 i IL-1 β (podproces *i* zawarty w 12 t-klastrach, patrz Tabela 4.9);
- b) VAD prowadzi do wzrostu BMP6 (podproces *p* zawarty w 6 t-klastrach, patrz Tabela 4.9);
- c) VAD i niski poziom żelaza prowadzą do spadku BMP6, skutkując zahamowaniem ekspresji hepcydyny (podproces *y* zawarty w 12 t-klastrach, patrz Tabela 4.9);
- d) VAD i niedobór żelaza zaburzają erytropoezę prowadząc do negatywnej regulacji ekspresji hepcydyny (podproces *t* zawarty w 12 t-klastrach, patrz Tabela 4.9).

Wyniki analizy t-klastrów wykazały niewątpliwą rolę niedoboru witaminy A i żelaza na hamowanie ekspresji hepcydyny. Jednak w tej kwestii istnieją różne doniesienia literaturowe. Wyniki przedstawione w [9] jasno opisują, że witamina A utrzymuje homeostazę żelaza poprzez pozytywne modulowanie ekspresji hepcydyny w wątrobie. Z drugiej jednak strony, wyniki przedstawione w [41] wskazują, że niedobór witaminy A sprzyja redukcji poziomu wątrobowego mRNA *Hamp*, a nie oczekiwanej podwyższeniu ekspresji tego genu (genu ekspresji hepcydyny). Procedury eksperymentalne tych badań ([9, 41]) zostały krótko podsumowane w pracy [100].

Biorąc pod uwagę te rozbieżności, w tym etapie analizy uwzględniono dwa różne podprocesy. Pierwszy, podproces w którym niedobór witaminy A wpływa na wzrost BMP6, prowadząc do ekspresji hepcydyny poprzez szlak HJV–BMP6–SMAD4 (patrz podproces *p* w Tabeli 4.9). Drugi, podproces w którym BMP6 indukuje SMAD7, a zatem negatywna regulacja hepcydyny (patrz podproces *k* w Tabeli 4.9). Te dwa przeciwstawne mechanizmy są zawarte w tej samej liczbie t-klastrów. Wydawać by się zatem mogło, że są one równie ważne dla zamodelowanego systemu. Wniosek ten nie rozwiązuje problemu istniejących różnych doniesień literaturowych.

Jak wykazano wcześniej, wyniki analizy t-klastrów mogą być zgrubne, dlatego też przeprowadzanie klastrowania jako jedynej analizy może prowadzić do pominięcia niektórych znaczących zależności. Niemniej jednak, jak również wykazano, klastrowanie może prowadzić do zawężenia obszaru poszukiwań i wyznaczać dalszy kierunek badań. W związku z tym przeprowadzono analizę średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach dla wspomnianych wcześniej podprocesów *k* i *p*. Wyniki przedstawiono poniżej:

- a) podproces stymulujący ekspresję hepcydyny (t_{83} – VAD prowadzi do wzrostu BMP6): średnia liczba uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach wynosi 24.30;
- b) podproces hamujący ekspresję hepcydyny (t_{74} – BMP6 indukuje SMAD7): średnia liczba uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach wynosi 13.99.

Analiza ta wykazała, że elementarny proces związany z aktywacją szlaku HJV–BMP6–SMAD4, który pozytywnie reguluje ekspresję hepcydyny, jest częściej uruchamiany niż podproces prowadzący do jej negatywnej regulacji poprzez udział BMP6 w indukcji SMAD7.

4.3.4 Konkluzje

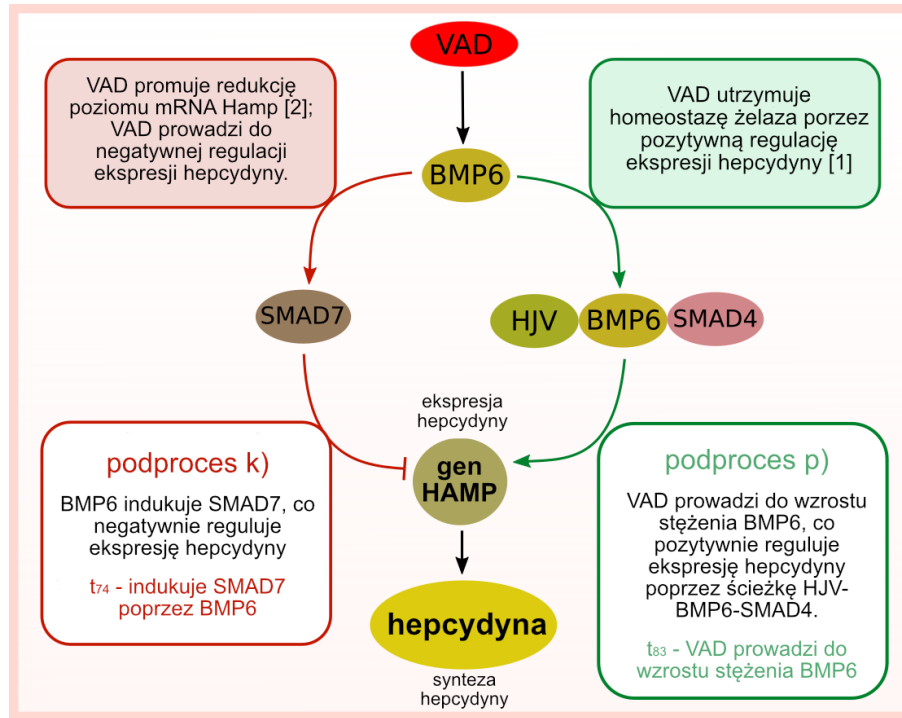
Zastosowanie podejścia systemowego oparte o klasyczne sieci Petriego pozwoliło na przeanalizowanie modelu wpływu deficytu witaminy A na regulację homeostazy żelaza, jako złożonego systemu interakcji powiązanych ze sobą skomplikowaną siecią oddziaływań. Obok klasycznych metod analizy (zbiorów MCT oraz analizy t-klastrów), wykonano rozszerzoną analizę opartą o knockout symulacyjny (analiza średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach) oraz zaproponowaną analizę ważności. Analiza ważności pozwoliła wyróżnić najważniejsze mechanizmy pozytywnie oraz negatywnie stymulujące ekspresję hepcydyny. Oprócz wyodrębnienia najbardziej istotnych z punktu widzenia struktury modelu podprocesów oraz procesów elementarnych, za pomocą symulacji knockout określono także średnią liczbę uruchomień poszczególnych tranzycji, a więc częstotliwość występowania poszczególnych procesów elementarnych.

Dogłębne poznanie badanego systemu wpływu niedoboru witaminy A na regulację homeostazy żelaza jest utrudnione z uwagi na pojawiające się wzajemnie wykluczające informacje literaturowe, a jak wiadomo, analiza zaproponowanego modelu ma w podstawowym celu lepsze zrozumienie natury analizowanego systemu i usystematyzowanie wiedzy. Niemniej jednak, podejścia systemowe oparte o sieci Petriego w ostatecznej analizie pozwalają także na rozwianie niektórych wątpliwości co do rozbieżności w doniesieniach literaturowych. W tym przypadku sprzeczne doniesienia traktują o deficycie witaminy A. W pracy [41] nadmieniono, iż VAD prowadzi do negatywnej regulacji ekspresji hepcydyny. Ponadto autorzy podkreślają, że uzyskane wyniki różnią się od wyników oczekiwanych. Z drugiej natomiast strony, w pracy [9] jasno zaznaczono, iż VAD jest związany z pozytywną regulacją ekspresji hepcydyny. Graficzne przedstawienie tego problemu znajduje się na Rysunku 4.7, gdzie mechanizm, w którym VAD negatywnie reguluje ekspresję hepcydyny, jest związany z indukcją SMAD7 przez BMP6, natomiast mechanizm, gdzie VAD pozytywnie reguluje ekspresję hepcydyny, jest związany ze stymulacją szlaku HJV–BMP6–SMAD4.

Analiza t-klastrów wykazała, że te dwa przeciwstawne podprocesy mogą być równie ważne dla funkcjonowania modelowanego systemu. Jednak bardziej szczegółowe analizy wykazały różnice między tymi dwoma mechanizmami. Analiza średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach wykazała, że VAD częściej pozytywnie stymuluje ekspresję hepcydyny. Podobny wynik przedstawia analiza ważności, wedle której VAD pozytywnie regulujący ekspresję hepcydyny jest bardziej istotny strukturalnie niż mechanizm pośrednio hamujący jej ekspresję przez VAD.

4.4 Analiza ważności, porównawcza analiza ważności oraz porównawcza analiza knockout – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej

W obecnym podrozdziale przedstawiono zaproponowany model powiązań między tętniakiem aorty brzusznej i miażdżycą. Model wyrażono w formalizmie klasycznych sieci Petriego, w odróżnieniu od wcześniej opisywanych analiz w tym przypadku zaproponowano podejście obejmujące porównanie dwóch modeli. Pierwszy z nich nazwany *modelem pełnym* jest modelem tytułowym tego podrozdziału, a więc zawiera wszystkie zamodelowane podprocesy powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej. Drugi model, zwany *modelem zredukowanym* jest pomniejszony o podproces utleniania LDL oraz wszystkie podprocesy, w których uczestniczy oxLDL. Istotnym jest, iż *model zredukowany* został ograniczony w taki sposób, aby zachować własność pokrycia sieci przez t-niezmienniki. Aby dobrze zrozumieć istotę takiej analizy, należy wspomnieć, że *model pełny* może zostać poddany analizie knockout. Na podstawie analizy knockout można określić, które elemen-



RYСУNEK 4.7: Schemat graficznie przedstawiający mechanizm pozytywnej i negatywnej regulacji ekspresji hepcydyny przez deficyt witaminy A – przedmiot sprzeczności literaturowej. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [100].

tarne procesy zostały wyłączone w wyniku jej działania (w konsekwencji wyłączenia określonych tranzycji), jednak nie można dokonać innych analiz pozwalających lepiej zrozumieć strukturę modelu po takim wyłączeniu. Między innymi nie jest możliwe wykonanie analizy ważności, która pozwala na określenie, które elementarne procesy są ważniejsze od innych pod względem strukturalnym. Zatem, zaproponowane podejście w tej pracy obok opisanej wcześniej analizy ważności i znanej symulacji knockout, prezentuje porównawczą analizę ważności oraz porównawczą analizę knockout. Analiza porównawcza umożliwia przeprowadzenie dokładnych analiz dla *modelu pełnego* jak i *modelu zredukowanego* i jest pierwszym takim zaproponowanym podejściem (patrz artykuł [105]). Celem biologicznym stosowania analizy porównawczej modelu jest ocena jak duży wpływ na powiększanie i pęknięcie tętniaka aorty brzusznej (AAA, *ang. abdominal aortic aneurysm*) mają podprocesy związane z oxLDL.

Celem modelowania stała się relacja między tętniakami aorty brzusznej (AAA) i miażdżycą. Badania sugerują, że te dwie jednostki chorobowe są ze sobą ściśle powiązane. Choć tętniak aorty brzusznej jest powszechną chorobą naczyniową i wiąże się z wysoką śmiertelnością, to pełna patogeneza tętniaka AAA wciąż pozostaje nieznaną. Ponadto, obecnie coraz częściej sugeruje się, że rozwój AAA nie jest wynikiem miażdżycy, jednak poszczególne czynniki mogą działać niezależnie lub synergistycznie z miażdżycą. Jednym z takich czynników jest LDL i jego utleniona forma — oxLDL. Jak powszechnie wiadomo, a także wykazano w tej pracy, oxLDL odgrywa ważną rolę w patogenezie miażdżycy, istnieje zatem możliwość synergistycznego rozwoju obu chorób, co postanowiliśmy zbadać tworząc model wpływu oxLDL na rozwój AAA za pomocą sieci Petriego.

4.4.1 Tło biologiczne

Tętniak aorty brzusznej definiuje się jako powiększenie aorty przekraczające 1,5-krotność normalnego rozmiaru w danym segmencie [106]. Podobnie jak w przypadku miażdżycy, pomimo tego

że pęknięcie tętniaka jest bardzo częstą przyczyną śmierci na całym świecie, to pełny mechanizm patogenezy tętniaka aorty brzusznej jest wciąż nieznan.

Miażdżycza tętnic i tętniaki aorty brzusznej są ze sobą silnie powiązane i dlatego budzą kontrowersje co do indywidualności tych jednostek chorobowych [89, 294]. Obecnie coraz częściej sugeruje się, że rozwój tętniaka aorty brzusznej nie jest wynikiem miażdżycy, istnieją też odrębne czynniki, które mogą działać niezależnie lub synergistycznie z miażdżycą [290]. Z drugiej strony, oba zaburzenia mają pewne wspólne czynniki ryzyka i podobne cechy patologiczne [153, 294]. Pojawiają się zatem pytania o czynniki, które mogą być wspólne w rozwoju obu zaburzeń. Jednym z takich czynników jest lipoproteina o niskiej gęstości i jej utleniona forma – oxLDL. Wiadomo, że oxLDL odgrywa ważną rolę w patogenezie miażdżycy [317]. Niemniej jednak wyniki badań dotyczące roli oxLDL w AAA są niejednoznaczne. Niektóre z tych badań nie wykazują związku [152, 159, 290], podczas gdy inne donoszą o udziale LDL w rozwoju tętniaków aorty brzusznej [122, 163, 224].

Zaproponowany model oparty o sieci Petriego opisuje współzależności między wieloma procesami, takimi jak powstawanie oxLDL, wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez syntazę tlenu azotu (NOS) i enzymy oksydazy NADPH (NOX) oraz ich wpływ na rozwój stanu zapalnego, wzrost ilości metaloproteinaz, a w rezultacie rozwój i pęknięcie AAA. Opis kontekstu biologicznego podzielono w następujący sposób:

1. oxLDL i inne kluczowe czynniki w rozwoju tętniaka aorty brzusznej

Najważniejszą reaktywną formą tlenu w rozwoju tętniaka jest anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) [82, 197]. Został on także opisany w poprzednim rozdziale poświęconym wyłącznie procesom leżącym u podstaw miażdżycy. $O_2^{\bullet-}$ jest syntetyzowany przez niesprężone indukowalne i śródbłonkowe NOS (iNOS i eNOS) oraz NOX [197]. NOS z kofaktorem tetrahydrobiopteryną (BH_4) wytwarza tlenek azotu (NO) w warunkach fizjologicznych. Jednak utlenianie BH_4 do BH_2 w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzi do odłączenia enzymu i produkcji $O_2^{\bullet-}$. Rodnik ten nasila rozprężanie enzymu, choć znacznie szybciej dochodzi do niego pod wpływem nadtlenoazotynu ($ONOO^-$), który powstaje w wyniku reakcji $O_2^{\bullet-}$ i NO [184, 263]. OxLDL wpływa również na NOS, prowadząc do jego defosforylacji [60, 124, 309], a w konsekwencji do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego zamiast NO. Anionorodnik ponadtlenkowy jest redukowany do nadtlenu wodoru (H_2O_2) przez enzym dysmutazę (SOD) [315]. H_2O_2 jest rozkładany na wodę i tlen przez enzym katalazę. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 i $ONOO^-$ to reaktywne formy tlenu i azotu (ROS/RNS), które mają istotny wpływ na rozwój stresu oksydacyjnego, który odgrywa istotną rolę w patogenezie AAA. Leukocyty polimorfojądrowe (PMN) uwalniają mieloperoksydazę (MPO), która wytwarza inny ROS – kwas podchlorawy (HOCl) z H_2O_2 i Cl^- . HOCl pośrednio stymuluje aktywność proteolityczną. Produkty MPO mogą prowadzić do peroksydacji lipidów [140]. ROS regulują aktywność kinazy Akt zaangażowanej w proces apoptozy komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) [53, 261, 314] i aktywować białka aktywującego-1 (AP-1) poprzez MAPK, co prowadzi do produkcji chemokin i cytokin prozapalnych [78, 261]. Najważniejszymi cytokinami w tej jednostce chorobowej są IL-6, IL-1 β , IL-8 i TNF α . Produkcja niektórych z nich, jak np. IL-6, mogłaby zostać zwiększona m.in. przez rozciąganie ściany aorty [5]. ROS uszkadzają DNA, co prowadzi do aktywacji czynnika jądrowego κB (NF- κB). NF- κB prowadzi również do produkcji prozapalnych chemokin i cytokin oraz cząsteczek adhezyjnych: międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (ICAM-1) i naczyniowej cząsteczki adhezyjnej komórek-1 (VCAM-1) [261]. Stres oksydacyjny zwiększa ekspresję enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) [53]. Uczestniczy w procesie konwersji angiotensyny I w angiotensynę II. Angiotensyna II aktywuje NF- κB i NOX poprzez aktywację ich podjednostek [261]. NOX jest również stymulowany przez TNF α , oxLDL i stres

hemodynamiczny [236, 270]. $\text{TNF}\alpha$ aktywuje również $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [232]. ROS może utleniać LDL do oxLDL. OxLDL aktywuje wytwarzanie anionu nadadtlenkowego przez NOX poprzez aktywację jego podjednostek [171, 317]. OxLDL wpływa również na wzrost stężenia $\text{O}_2^{\bullet-}$ w inny sposób: prowadzi do defosforylacji NOS (w wyniku czego $\text{O}_2^{\bullet-}$ jest wytwarzany zamiast NO) [60, 124, 309] i hamuje aktywność dysmutazy (zmniejsza redukcję $\text{O}_2^{\bullet-}$ do H_2O_2) [317]. OxLDL zwiększa aktywność metaloproteinazy 2 (MMP2) [171] oraz produkcję cząstek adhezyjnych ICAM i VCAM [309].

2. Istotna rola metaloproteinaz w rozwoju i pękaniu tętniaka aorty brzusznej

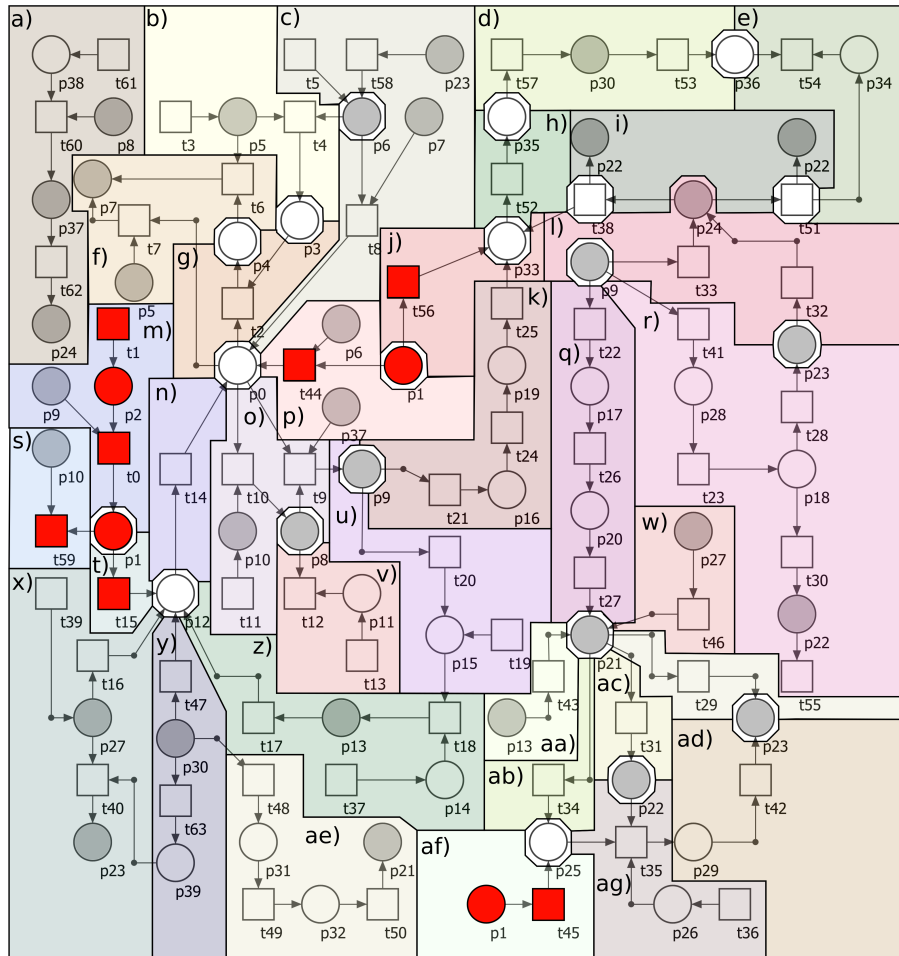
Zwiększenie liczby cząsteczek adhezyjnych i chemokin sprzyja naciekaniu ściany aorty przez komórki zapalne. Komórki te nasilają syntezę cytokin prozapalnych, pogłębiając stan zapalny i prowadząc do syntezy proteaz, głównie metaloproteinaz [43, 278, 306]. Wspomniane wielokrotnie reaktywne formy tlenu odgrywają także tutaj istotną rolę, gdyż biorą również udział w ekspresji genów i aktywacji utajonych MMP [122]. Podstawowe metaloproteinazy, jakie można wyróżnić w patogenezie tętniaka aorty brzusznej, to MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, MMP13 – ich główną rolą jest degradacja tkanki łącznej. Produktami proteolizy są chemoatraktanty, które nasilają infiltrację komórek zapalnych [34]. Z wyróżnionych metaloproteinaz MMP2, MMP7, MMP9 i MMP12 są głównie odpowiedzialne za degradację elastyny, co skutkuje rozszerzeniem aorty [34]. Proces ten nasila wspomniana wcześniej apoptoza VSMC, ponieważ komórki te są odpowiedzialne za syntezę elastyny [34, 184]. Powiększenie tętniaka zwiększa stres hemodynamiczny, co prowadzi do kompensacyjnego odkładania się kolagenu w ścianie aorty. Pozwala to na utrzymanie odporności na nacisk wywierany na ścianę naczynia [34]. Z kolei metaloproteinazy MMP1, MMP8 i MMP13 są głównie odpowiedzialne za degradację kolagenu. Jeśli kolagen dominuje w ścianie aorty, długotrwałe działanie MMP1, MMP8 i MMP13 może spowodować pęknięcie tętniaka.

4.4.2 Model

W ramach pracy opisanej w tym podrozdziale zaproponowano dwa modele bazujące na klasycznych sieciach Petriego. Pierwszy model, zwany *modelem pełnym*, jest modelem relacji między oxLDL a powstawaniem i pękaniem tętniaka aorty brzusznej, a więc zawiera wszystkie zamodelowane podprocesy. Drugi model, zwany *modelem zredukowanym*, jest w zasadzie *modelem pełnym* pomniejszonym o podproces utleniania LDL oraz wszystkie podprocesy, w które zaangażowany jest oxLDL. Dokładniej, model ten nie zawiera podprocesu utleniania LDL do oxLDL oraz wszystkich podprocesów, w których uczestniczy oxLDL, tj. stymulacja NOX, stymulacja cząsteczek adhezyjnych, hamowanie SOD, aktywacja proteolizy elastyny przez MMP2 oraz synteza anionorodnika nadadtlenkowego wraz z NOS. Oba modele spełniają jednak założenie o pokryciu sieci przez t-niezmienniki, co oznacza, że każda tranzycja występuje w co najmniej jednym ze wsparć t-niezmienników – umożliwia to przeprowadzenie analiz opartych o t-niezmienniki. Modele te zostały utworzone za pomocą narzędzia *Holmes* [228, 230].

Pełen model zawiera 64 tranzycje, 40 miejsc i jest pokryty przez 736 t-niezmienników. Nazwy pasywnych komponentów – miejsca znajdują się w Tabeli 4.12, natomiast nazwy aktywnych komponentów – tranzycje umieszczono w Tabeli 4.13. Tabele te zawierają dwie kolumny: *ID* – zawierająca identyfikator miejsca/tranzycji oraz *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca nazwę miejsca/tranzycji określającą jej przeznaczenie w systemie. *Model zredukowany* – model niezawierający podprocesów związanych z oxLDL zawiera 57 tranzycji, 38 miejsc i 325 t-niezmienników. Innymi słowy, *model zredukowany* jest to *model pełny*, z którego usunięto wybrane pasywne i

aktywne komponenty. Elementy te są oznaczone pogrubioną czcionką w Tabeli 4.12 i 4.13. Za-proponowany *pełny model* oparty o sieci Petriego znajduje się na Rysunku 4.8, gdzie pasywne i aktywne komponenty powiązane z oxLDL oznaczono kolorem czerwonym. Można zatem zaznaczyć, że usunięcie tych czerwonych elementów z *pełnego modelu* pozwala uzyskać *model zredukowany*.



RYСУNEK 4.8: Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący relacji między oxLDL a rozwojem tętniaka aorty brzusznej – *model pełny*, został podzielony na następujące podprocesy: a) produkcja HOCl, b) synteza NO, c) synteza $O_2^{\bullet-}$ przez NOS i BH_2 , d) kompensowanie odkładania kolagenu przez stres hemodynamiczny, e) pęknięcie AAA, f) utlenianie BH_4 do BH_2 , g) synteza ONOO⁻ przez $O_2^{\bullet-}$ i NO, h) powiększenie AAA, i) proteoliza elastyny i kolagenu przez MMP, j) dodatkowa aktywacja MMP2 przez oxLDL, k) apoptoza VSMC, l) ekspresja MMPs przez cytokiny zapalne i ROS, m) utlenianie LDL, n) synteza $O_2^{\bullet-}$ przez NOX, o) zamiana $O_2^{\bullet-}$ na H_2O_2 , p) synteza $O_2^{\bullet-}$ przez NOS i oxLDL, q) aktywacja NF- κ B spowodowana uszkodzeniem DNA przez ROS, r) stymulacja AP1 przez ROS, s) hamowanie SOD przez oxLDL, t) stymulacja NOX przez oxLDL, u) aktywacja ACE przez ROS, v) redukcja H_2O_2 przez katalazę, w) stymulacja NF- κ B przez TNF α , x) aktywacja NOX przez TNF α , y) aktywacja NOX, COX2 i IL-6 przez stres hemodynamiczny, z) aktywacja NOX przez ANGII (konwersja ANGI na ANGII przez ACE), aa) stymulacja NF- κ B przez ANGII, ab) wytwarzanie cząsteczek adhezyjnych przez NF- κ B, ac) stymulacja produkcji chemokin przez NF- κ B, ad) stymulacja produkcji cytokin zapalnych przez NF- κ B, ae) aktywacja NF- κ B przez PGE2 aktywowana przez COX2, af) stymulacja cząsteczek adhezyjnych przez oxLDL, ag) diapedeza, ah) naciekanie przez komórki zapalne. Jeśli jakieś miejsce lub tranzycja jest wspólne dla więcej niż jednego z wyżej wymienionych podprocesów a) - ah), to jest umieszczone w ośmiokącie (przykładowo p_{12} lub t_{38}). Dodatkowo, pasywne i aktywne komponenty związane z utlenianiem LDL oznaczono, odpowiednio, czerwonymi okręgami i czerwonymi kwadratami – te wyróżnione elementy są pominięte w *modelu zredukowanym*. Rysunek pochodzi z pracy [105].

TABELA 4.12: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc (patrz [105]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	anionorodnik ponadtlenny	p_{20}	PKC
p_1	utleniony LDL (oxLDL)	p_{21}	NF- κ B
p_2	LDL	p_{22}	chemokiny
p_3	NO	p_{23}	cytokiny zapalne

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_4	nadtlenoazotyn	p_{24}	MMPs
p_5	BH ₄	p_{25}	cząsteczki adhezyjne
p_6	NOSs	p_{26}	krążące komórki zapalne
p_7	BH ₂	p_{27}	TNF α
p_8	H ₂ O ₂	p_{28}	p38MAPK
p_9	ROS	p_{29}	krążące komórki zapalne
p_{10}	dysmutaza	p_{30}	stres hemodynamiczny
p_{11}	katalaza	p_{31}	COX2
p_{12}	NOX	p_{32}	PGE2
p_{13}	ANGII	p_{33}	mniej elastyny
p_{14}	ANGI	p_{34}	mniej kolagenu
p_{15}	ACE	p_{35}	powiększony AAA
p_{16}	kinaza tyrozynowa	p_{36}	zdeponowany kolagen
p_{17}	polimeraza PARP	p_{37}	HOCl
p_{18}	AP1	p_{38}	MPO
p_{19}	Akt	p_{39}	IL-6

TABELA 4.13: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji (patrz [105]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_0	oksydacja LDL	t_{32}	ekspresja MMP przez zapalne cytokiny
t_1	krw jako źródło LDL	t_{33}	aktywacja MMPs przez ROS
t_2	synteza nadtlenoazotynu	t_{34}	produkcją cząsteczek adhezyjnych
t_3	synteza BH ₄	t_{35}	diapedeza
t_4	synteza NO	t_{36}	źródło komórek zapalnych
t_5	źródło NOSs	t_{37}	źródło ANGI
t_6	utlenianie BH ₄ do BH ₂ przez nadtlenoazotyn	t_{38}	proteoliza elastyny przez MMP
t_7	utlenianie BH ₄ do BH ₂ przez O ₂ ^{•-}	t_{39}	źródło TNF α
t_8	synteza O ₂ ^{•-} przez NOSs i BH ₂	t_{40}	pula cytokin zapalnych
t_9	pula reaktywnych form tlenu	t_{41}	aktywacja p38MAPK
t_{10}	dysmutacja	t_{42}	produkcja cytokin zapalnych
t_{11}	źródło dysmutazy	t_{43}	bezpośrednia stymulowanie NF- κ B przez AN-GII
t_{12}	H ₂ O ₂ redukcja	t_{44}	synteza O₂^{•-} przez NOSs i oxLDL
t_{13}	źródło katalazy	t_{45}	stymulacja cząstek adhezyjnych
t_{14}	synteza O ₂ ^{•-} poprzez NOX	t_{46}	stymulowanie NF- κ B przez TNF α
t_{15}	pośrednie stymulowanie NOX przez oxLDL	t_{47}	aktywacja NOX przez stres hemodynamiczny
t_{16}	aktywacja NOX przez TNF α	t_{48}	aktywacja COX2 przez stres hemodynamiczny
t_{17}	aktywacja NOX przez ANGI	t_{49}	produkcja PGE2 przez COX2
t_{18}	konwersja ANGI do ANGI	t_{50}	aktywacja NF- κ B przez PGE2
t_{19}	źródło ACE	t_{51}	proteoliza kolagenu przez MMP
t_{20}	aktywacja ACE przez ROS	t_{52}	powiększenie AAA
t_{21}	stymulowanie kinazy tyrozynowej	t_{53}	kompensacja odkładania się kolagenu
t_{22}	uszkodzenie DNA i uwolnienie PARP	t_{54}	pękanie AAA
t_{23}	stymulowanie AP1	t_{55}	degradacja chemokin
t_{24}	pośrednie stymulowanie Akt	t_{56}	dotatkowa aktywacja proteolizy elastyny przez MMP2
t_{25}	apoptoza VSMC	t_{57}	wzrost stresu hemodynamicznego
t_{26}	stymulowanie PKC przez PARP	t_{58}	aktywacja iNOS przez cytokiny zapalne
t_{27}	aktywacja NF- κ B przez PKC	t_{59}	hamowanie SOD
t_{28}	stymulowanie produkcji cytokin zapalnych przez AP1	t_{60}	produkcja HOCl przez MPO
t_{29}	stymulowanie produkcji cytokin zapalnych przez NF- κ B	t_{61}	źródło MPO

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{30}	stymulowanie produkcji chemokin przez AP1	t_{62}	aktywacja MMPs przez HOCl
t_{31}	stymulowanie produkcji chemokin przez NF- κ B	t_{63}	stymulowanie IL-6

Pełny model sieci Petriego, pomimo intuicyjnej reprezentacji graficznej, jest skomplikowany ze względu na dużą liczbę składników pasywnych i aktywnych. Z tego też względu na Rysunku 4.9 zamieszczono schemat relacji/interakcji zawartych w modelu, gdzie różnymi kolorami oznaczono konkretne czynniki: na zielono reaktywne formy tlenu/azotu, na niebiesko NOX i NOS, na pomarańczowo udział angiotensyny, na żółto procesy związane z oxLDL, na fioletowo czynniki wpływające na powiększanie i pęknięcie AAA, a na różowo mechanizm powiększania i pęknięcia tętniaków aorty brzusznej.

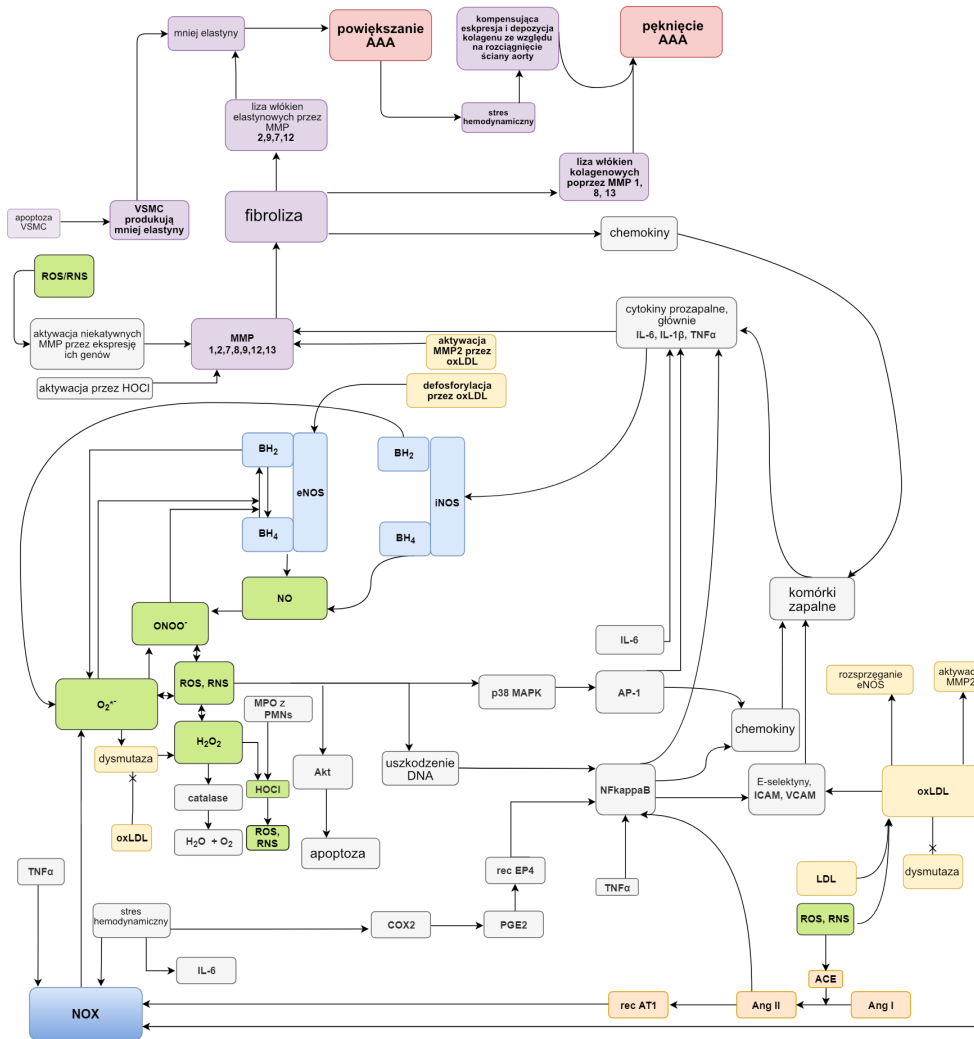
4.4.3 Analiza i wyniki

Podobnie jak w przypadku wcześniejszych modeli, analizę zaproponowanego *modelu pełnego* rozpoczęto od klasycznej analizy opartej o zbiory MCT i analizę t-klastrów. Jednak tym razem, analizy te są zbyt ogólne i nie pozwalają na znalezienie odpowiedzi na nadrzędne pytanie – jak duży wpływ na powiększanie i pęknięcie AAA mają podprocesy związane z oxLDL. Niemniej jednak analiza zbiorów MCT, a także analiza t-klastrów, znajdują się w dodatku artykułu [105].

Analizy wykonane w następnej kolejności to porównawcza analiza ważności dla *modelu pełnego* – modelu z oxLDL oraz dla *modelu zredukowanego* – modelu bez oxLDL, porównawcza analiza knockout t-niezmienników oraz knockout symulacyjny – analiza średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach. Formalne opisy zaproponowanych metod znajdują się we wprowadzeniu do niniejszego rozdziału (podrozdział 4.1). Analizy te skupiają się na podprocesach mających pośredni i bezpośredni wpływ na rozwój i pęknięcie tętniaka aorty brzusznej. Wyróżnione w tych analizach podprocesy to: utlenianie LDL, stres oksydacyjny, produkcja cytokin zapalnych, wpływ MMPs oraz wpływ NOX.

Porównawcza analiza ważności

Porównawcza analiza ważności została wykonana zarówno dla *modelu pełnego* – modelu z oxLDL, jak i dla *modelu zredukowanego* – modelu bez oxLDL i opiera się na wybranych procesach elementarnych. Pozwala określić częstość występowania danej tranzycji we wszystkich wsparciach t-niezmienników, a więc ważność danego procesu elementarnego. Można zatem zauważyć, czy ważność wybranego procesu elementarnego jest wyższa czy niższa w *modelu pełnym* zawierającym wszystkie zamodelowane podprocesy. Wyniki porównawczej analizy ważności dla wybranych procesów elementarnych przedstawiono w Tabeli 4.14. Tabela ta zawiera następujące kolumny: *Podproces* – zawierająca nazwę wybranego podprocesu, *Proces elementarny* – nazwa wybranego procesu elementarnego (tranzycji), *Model pełny z oxLDL (736 t-inw.)* – kolumna zawierająca ważność tranzycji dla *modelu pełnego* wyrażona w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%] oraz *Model zredukowany bez oxLDL (325 t-inw.)* – kolumna zawierająca ważność tranzycji dla *modelu zredukowanego* wyrażona także na dwa sposoby: *tranz./t-inw.* oraz [%].



RYСУNEK 4.9: Schemat zaproponowanego pełnego modelu rozwoju AAA. Rysunek pochodzi z pracy [105], gdzie dodatkowo na każdym łuku można znaleźć odniesienie literaturowe.

W wyniku przeprowadzenia porównawczej analizy ważności dla wybranych procesów elementarnych zarówno dla *modelu pełnego* – modelu z oxLDL, jak i dla *modelu zredukowanego* – modelu bez oxLDL można wyciągnąć wnioski, które podprocesy są bardziej istotne dla funkcjonowania modelowanego systemu niż inne. W Tabeli 4.14 można zauważyć, że proces elementarny, jakim jest utlenianie oxLDL, występuje w 55,84% wszystkich modelowanych podprocesów w *pełnym modelu*. Ten wynik może sugerować, że oxLDL ma duże znaczenie dla całego systemu. Można też zauważyć, które elementarne procesy są bardziej istotne w którym modelu, przykładowo elementarny proces, jakim jest produkcja cytokin zapalnych, ma wyższą ważność w *modelu pełnym* w porównaniu z *modelem zredukowanym* – jest to spodziewany efekt, gdyż *model zredukowany* nie zawiera procesu utleniania LDL, który napędza proces zapalny.

Porównawcza analiza knockout

Celem uzupełnienia powyższej analizy przeprowadzono porównawczą analizę knockout. Wyłączenie pewnych aktywnych składników sieci Petriego prowadzi w konsekwencji do wykluczenia innych. Wyłączona tranzycja może wyłączyć duże fragmenty sieci, gdy odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu całego modelu. Zaproponowana porównawcza analiza knockout wykorzystuje *model zredukowany*, który odpowiada *modelowi pełnemu* z wyłączeniem poszczególnych podprocesów,

TABELA 4.14: Porównawcza analiza ważności dla wybranych procesów elementarnych zarówno dla modelu pełnego – modelu z oxLDL, jak i dla modelu zredukowanego – modelu bez oxLDL (patrz [105]).

		Model pełny z oxLDL (736 t-inw.)		Model zredukowany bez oxLDL (325 t-inw.)	
Podproces	Proces elementarny	tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]
stres oksydacyjny	produkcja $O_2^{\bullet-}$ przez NOX	713	96,88%	302	92,92%
	produkcja $O_2^{\bullet-}$ przez NOS i oxLDL	205	27,85%	-	-
	produkcja $O_2^{\bullet-}$ przez NOS i BH ₂	364	49,46%	218	67,08%
	produkcja ONOO ⁻ przez $O_2^{\bullet-}$ i NO	182	24,73%	109	33,54%
	produkcja H ₂ O ₂ poprzez dysmutacje	713	96,88%	302	92,92%
	produkcja HOCl przez MPO i H ₂ O ₂	707	96,06%	296	91,08%
wpływ MMPs	aktywacja przez ROS	197	26,77%	88	27,08%
	aktywacja przez cytokines	192	26,09%	99	30,46%
	aktywacja MMP2 przez oxLDL	132	17,93%	-	-
	aktywacja MPO przez HOCl	184	25,00%	75	23,08%
oksydacja LDL	oksydacja LDL	411	55,84%	-	-
wpływ NOX	aktywacja przez oxLDL	6	0,82%	-	-
	aktywacja przez TNF α	342	46,47%	143	44,00%
	aktywacja przez stres hemodynamiczny	145	19,70%	79	24,31%
	aktywacja przez ANGII	291	39,54%	115	35,38%
produkcja cytokin zapalnych	produkcja przez komórki zapalne	552	75,00%	211	64,92%
	produkcja przez TNF α	108	14,67%	53	16,31%
	produkcja przez NF- κ B	115	15,63%	55	16,92%
	produkcja przez AP1	26	3,53%	20	6,15%
	stymulowanie IL-6	108	14,67%	53	16,31%
powiększenie AAA	powiększenie AAA	629	85,46%	274	84,31%
pękanie AAA	pękanie AAA	260	35,33%	106	32,62%

do ponownego obliczenia t-nieziemienników i przeprowadzenia wniosku o ważności podprocesów. W efekcie mamy informację o tym, jak ważny jest dany podproces w modelu pełnym i jak ważny jest w modelu zredukowanym. Wyniki porównawczej analizy knockout dla wybranych podprocesów (zbiorów procesów elementarnych) przedstawiono w Tabeli 4.15. Tabela ta zawiera w kolumnach nazwy poszczególnych podprocesów, które były wyłączane, natomiast wiersze można podzielić na Model pełny z oxLDL (736 t-inw.) – wiersz zawierający ważność dla wybranego podprocesu w modelu pełnym, która jest obliczona na podstawie liczby t-inwariantów wyłączonych w efekcie analizy knockout i jest wyrażona w procentach, Model zredukowany bez oxLDL (325 t-inw.) – wiersz zawierający ważność dla wybranego podprocesu w modelu zredukowanym, która jest obliczona na podstawie liczby t-inwariantów wyłączonych w efekcie analizy knockout i jest wyrażona w procentach, wyłączone tranzycje – wiersz zawierający identyfikatory wyłączonych tranzycji w celu przeprowadzenia analizy knockout danego podprocesu.

TABELA 4.15: Porównawcza analiza knockout dla wybranych procesów elementarnych zarówno dla modelu pełnego – modelu z oxLDL, jak i dla modelu zredukowanego – modelu bez oxLDL (patrz [105]).

	Stres oksydacyjny	Wpływ MMPs	Oksydacja LDL	Wpływ NOX	Produkcja cytokin zapalnych	Powiększenie AAA	Pęknięcie AAA
Model pełny z oxLDL (736 t-inw.)	98,78%	80,84%	55,84%	96,88%	93,75%	85,46%	35,33%
Model zredukowany bez oxLDL (325 t-inw.)	97,23%	78,15%	-	92,92%	90,15%	84,31%	32,62%
Wyłączone tranzycje	t ₂ , t ₈ , t ₁₀ , t ₁₄ , t ₄₄ , t ₆₀	t ₃₂ , t ₃₃ , t ₅₆ , t ₆₂	t ₀	t ₁₅ , t ₁₆ , t ₁₇ , t ₄₇	t ₂₈ , t ₂₉ , t ₄₀ , t ₄₂ , t ₆₃	t ₅₂	t ₅₄

Należy zauważyć, że w wierszu *Ważność – model zredukowany bez oxLDL (325 t-inw.)* w Tabeli 4.15 nie ma wyniku dla podprocesu utleniania LDL. wynika to z faktu, że model zredukowany nie zawiera żadnych mechanizmów związanych z oxLDL. Wyniki zawarte w Tabeli 4.15, zawierające porównanie modelu pełnego (z oxLDL) i modelu zredukowanego (bez oxLDL), pozwalają oszacować procentowy udział oxLDL w wybranych podprocesach, tj. w stresie oksydacyjnym, wpływie metaloproteinaz, wpływie NOX, produkcji cytokin zapalnych czy bezpośrednio w mechanizmach powiększenia i pęknięcia AAA.

Chcąc upewnić się, że wnioskowanie na podstawie analiz porównawczych dwóch modeli jest spójne, wykonano podsumowanie głównych wyników na podstawie analizy ważności dla modelu pełnego oraz analizę knockout, gdzie w modelu pełnym wyłączono proces elementarny odpowiadający utlenianiu LDL (wyłączenie tranzycji t₀). Efekty znajdują się w Tabeli 4.16, która zawiera następujące kolumny: *Podprocesy* – kolumna zawierająca dwa kluczowe podprocesy, kolumna *Analiza ważności modelu pełnego (736 t-inw.)* – zawiera wyniki analizy ważności wyrażone w dwójki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%], kolumna *Analiza knockout modelu pełnego z wyłączeniem tranzycji t₀ (325 t-inw.)* również zawiera wyniki analizy ważności wyrażone w dwójki sposób, oraz kolumna *Różnica w p.p.* – zawierająca różnicę między ważnościami poszczególnych tranzycji wyrażonymi w procentach dla modelu pełnego oraz modelu zredukowanego, różnica ta wyrażona jest w punktach procentowych (p.p.).

TABELA 4.16: Wyniki analizy ważności dla modelu pełnego oraz analizy knockout dla modelu pełnego z wyłączeniem tranzycji t₀ – równoważność analizy knockout z analizą ważności dla modelu zredukowanego (patrz [105]).

Podprocesy	Analiza ważności modelu pełnego (736 t-inw.)		Analiza knockout modelu pełnego z wyłączeniem tranzycji t ₀ (325 t-inw.)		Różnica w p.p.
	tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]	
powiększenie AAA	629	85,46%	274	84,31%	1,15 p.p.
pęknięcie AAA	260	35,33%	106	32,62%	2,71 p.p.

W ostatniej kolumnie Tabeli 4.16 obliczono różnicę między procentowym udziałem ważności w całym systemie dla modelu pełnego i modelu pełnego z wyłączeniem tranzycji t₀. Na tej podstawie określono wpływ oxLDL na powiększenie tętniaka (1,15 p.p.) i jego pęknięcie (2,71 p.p.). Można zauważyć, że analiza knockout dla modelu pełnego, gdzie wyłączono tranzycję t₀ (związaną z utlenianiem LDL), daje takie same wyniki jak analiza ważności dla modelu zredukowanego (patrz Tabela 4.14). Zatem, zaproponowane podejście porównawczych analiz opartych na modelu pełnym i zredukowanym z zachowaniem własności pokrycia sieci przez t-niezmienniki, pozwala odwzorować wyłączenie wybranego podprocesu, umożliwiając przy tym pełniejszą analizę.

Symulacja knockout

Wszystkie wyżej wymienione metody analiz należą do grupy analiz strukturalnych. Przeprowadzono także analizę symulacyjną – knockout symulacyjny. Knockout symulacyjny pozwala na uzyskanie średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach, zbiera zatem szczegółowe dane o zachowaniu się modelu, zarówno dla *modelu pełnego*, jak i *modelu pełnego z wyłączeniem* tranzycji t_0 . Symulację knockout przeprowadzono dla dwóch kluczowych tranzycji: t_{52} – odpowiadającej powiększaniu AAA i t_{54} – odpowiadającej pękaniu AAA (parametry symulacji: 10000 kroków, 1000 powtórzeń). Wyniki średniej liczby uruchomień dla wspomnianych tranzycji we wszystkich symulacjach ($AvgF_T$) są następujące:

1. $AvgF_T$ dla t_{52} w *modelu pełnym* wynosi 19,40, natomiast $AvgF_T$ dla t_{52} w modelu *modelu pełnym z wyłączeniem* tranzycji t_0 wynosi 19,46.
2. $AvgF_T$ dla t_{54} w *modelu pełnym* wynosi 4,85, natomiast $AvgF_T$ dla t_{54} w modelu *modelu pełnym z wyłączeniem* tranzycji t_0 wynosi 4,86.

Jak można zauważyć powyżej, różnice $AvgF_T$ dla t_{52} i t_{54} zarówno przed jak i po wyłączeniu tranzycji t_0 są nieznaczne. Potwierdza to obserwacje podsumowane w Tabeli 4.16, wedle których wyróżnione kluczowe podprocesy nie uległy zmianie po wyłączeniu procesów związanych z oksydacją LDL, a to oznacza, że podprocesy powiększania się i pękania AAA mogą zachodzić bez wpływu oxLDL.

4.4.4 Konkluzje

W środowisku naukowym nie ma zgody co do wpływu LDL i jego utlenionej formy na powstawanie tętniaka aorty brzusznej. Zgodnie z powszechnym przekonaniem mogłoby się wydawać, że oxLDL powinien być zaangażowany nie tylko w patogenezę miażdżycy, ale także w patogenezę tętniaka aorty brzusznej, jednakże porównawcza analiza ważności, porównawcza analiza knockout, a także analiza średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach (knockout symulacyjny) dla zaproponowanych modeli opartych na sieci Petriego z (*model pełny*) i bez oxLDL (*model zredukowany*) wykazały, że oxLDL nie ma prawie żadnego wpływu na powiększanie i pęknięcie tętniaka. Niemniej jednak należy zauważyć, że w naszym modelu oxLDL jest powiązany z 55,84% wszystkich zamodelowanych podprocesów zaangażowanych w patogenezę tętniaka. Pomimo zaangażowania oxLDL w ponad połowę podprocesów, jego udział nie przekłada się znacząco na powiększanie lub pęknięcie AAA. Nasze wyniki zdają się zgadzać z niektórymi ze sprzecznych doniesień: oxLDL rzeczywiście bierze udział w powstawaniu tętniaka, ale nie znajduje znaczącego odzwierciedlenia w jego powiększeniu lub pęknięciu – cały proces może zachodzić bez jego udziału.

Obok tej istotnej konkluzji biologicznej jawi się także konkluzja względem zastosowanych metod analizy. Klasyczne metody analizy oparte o zbiory MCT czy klastrowanie t-niezmienników nie pozwoliły na odkrycie ciekawych zależności. Niewątpliwie, obok zalet związanych z zaproponowaną analizą ważności i detekcją istotnych podprocesów, obiecująca jest również propozycja porównawczej analizy ważności, która to jest możliwa do przeprowadzenia w sytuacji, gdy model przed i po redukcji jest pokryty przez t-niezmienniki. Porównanie takich modeli pozwala na wnioskowanie w jaki sposób wyłączony proces wpływa na zachowanie się systemu. Analiza ważności jest jednak analizą na poziomie procesów elementarnych. Chcąc przeprowadzić wnioskowanie na poziomie podprocesów (zbiorów procesów elementarnych) należy przeprowadzić porównawczą analizę knockout, która w dalszym ciągu opiera się na dwóch modelach (takie podejście zostało zaproponowane po raz pierwszy). Co ważne, wyniki porównawczej analizy ważności otrzymane na przykładzie modelu

opracowanego w tym podrozdziale nie wykazały znaczących różnic. Należy się jednak zastanowić, co by było gdyby były one znaczące? Oraz co, jeśli różnice nie byłyby dodatnie a ujemne? Ta kwestia zostanie rozstrzygnięta w kolejnym podrozdziale.

4.5 Porównawcza analiza ważności z istotnymi różnicami – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym

Metody analizy modeli opartych o sieci Petriego są aplikowalne do wszelakich złożonych systemów biologicznych. Odbiegając nieco od tematów powiązanych z miażdżycą, w tym podrozdziale przeprowadzono analizy dla modelu opartego o klasyczne sieci Petriego dotyczącego relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym. Ta zmiana kontekstu biologicznego wywołana została pandemią koronawirusa SARS-CoV-2, która rozpoczęła się w 2019 roku i skupiła uwagę większości naukowców. Niemniej jednak to, jaki model staje się przedmiotem analizy jest kwestią drugorzędą, gdyż celem jest ocena zaproponowanych metod analizy, a wręcz uwydatnienie ich możliwości. W niniejszym podrozdziale skupiono się przede wszystkim na porównawczej analizie ważności, która w odróżnieniu od analizy opisanej w poprzednim podrozdziale, pozwoliła na zidentyfikowanie istotnych różnic pomiędzy ważnościami. Te znaczące różnice, zwane także różnicami istotnymi, mogą być dodatnie lub ujemne, a ich znaczenie biologiczne zostało dokładnie zinterpretowane.

4.5.1 Tło biologiczne

Koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2 (SARS-CoV-2), odpowiedzialny za pandemię choroby koronawirusowej (COVID-19), niemal zatrzymał świat, gdyż dotknął i nadal dotyka miliony ludzi na całym świecie [46, 217, 249, 321, 322]. Nie zaskakuje zatem fakt, że trwają intensywne badania mające na celu lepsze zrozumienie mechanizmów działania SARS-CoV-2 i znalezienie skutecznego leczenia. W toku tych badań już na początku zidentyfikowano grupy zwiększonego ryzyka dla ciężkiego przebiegu tej choroby. W tym wyróżniono, iż pacjenci z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym i powikłaniami nerkowymi są szczególnie narażeni na śmiertelny przebieg tej infekcji.

W ramach tych badań skupiono się na analizie zależności między infekcją SARS-CoV-2 a nadciśnieniem pierwotnym, duży nacisk kładąc na funkcję układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA). Zaproponowany model odzwierciedla hipotetycznego pacjenta, cierpiącego na nadciśnienie samoistne oraz przewlekłą chorobę nerek (PChN), u którego doszło do infekcji wirusem SARS-CoV-2. Stosując podejście systemowe przeanalizowano, jak SARS-CoV-2 może wpływać na organizm, ale także rozważono relację pomiędzy przyjmowaniem wybranych leków hipotensyjnych a współwystępowaniem COVID-19. Będąc precyzyjnym, zasymulowano leczenie nadciśnienia pierwotnego poprzez przyjmowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI) i/lub blokerów receptora angiotensyny (ARB), aby ocenić czy terapia lekami hipotensyjnymi może wpływać na ciężkość zakażenia. Ponadto oceniliśmy, czy leki te skutecznie obniżają ciśnienie krwi w przypadku zakażenia SARS-CoV-2. Na moment publikowania wyników, żadne badania nie wykorzystywały takich modeli do analizy wpływu infekcji SARS-CoV-2 na pacjenta z nadciśnieniem, który jest znacznie bardziej podatny na poważny przebieg tej szkodliwej infekcji wirusowej. Opis tła biologicznego został podzielony na kilka odrębnych sekcji.

1. Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA)

System RAA pomaga utrzymać równowagę między napięciem naczyniowym, ciśnieniem krwi i normalną funkcją narządów w organizmach ludzkich. Rozregulowanie układu RAA niesie za sobą poważne konsekwencje sercowo-naczyniowe [183]. W zaproponowanym modelu system RAA działa w kilku etapach, aby wytworzyć angiotensynę II. Rozpoczyna się od proreniny syntetyzowanej przez komórki przykłębuszkowe nerki i angiotensynogenu syntetyzowanego przez wątrobę, poprzez fizjologicznie nieaktywną angiotensynę I, która jest dalej przekształcana przez enzym konwertujący angiotensynę (ACE), syntetyzowany głównie przez komórki śródblonka naczyniowego w płucach, do angiotensyny II. Następnie angiotensyna II działa na korę nadnerczy, stymulując uwalnianie aldosteronu. Aldosteron działa na komórki gromadzące przewody w nefronie.

Angiotensyna II jest kluczową, wielofunkcyjną cząsteczką, która bierze udział w wielu mechanizmach, głównie za pośrednictwem receptorów angiotensyny 1 i 2 (AT1R i ATR2). Receptory te odgrywają istotną rolę w utrzymaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego. Oprócz tego bezpośredniego działania, przewlekle podwyższona angiotensyna II stymuluje produkcję reaktywnych form tlenu, aktywację układu odpornościowego i zmiany w dynamice nerek, które, jak wykazano, przyczyniają się do rozwoju nadciśnienia [13, 25].

2. Rozwój nadciśnienia pierwotnego

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej dowodów na rolę odporności i stanu zapalnego w rozwoju nadciśnienia pierwotnego [50, 244]. Stąd w zaproponowanym modelu nadciśnienie pierwotne może rozwinąć się przez kilka współistniejących dróg:

- a) dysregulacja układu RAA (który w szczegółach opisano powyżej);
- b) zaburzenia równowagi sodowej według nowego modelu Tietze [132];
- c) wpływ zjawisk immunologicznych na regulację równowagi sodowej i utrzymanie nadciśnienia indukowanego angiotensyną II [121];
- d) wpływ procesów zapalnych, w tym rola neoantygenów swoistych dla nadciśnienia oraz nowo powstałych antygenów, które nie zostały wcześniej rozpoznane przez układ odpornościowy [50, 167];
- e) rola stresu oksydacyjnego – rola reaktywnych form tlenu oraz tlenku azotu [292];
- f) rola stresu oksydacyjnego w PChN [220];
- g) dysfunkcja śródblonka będąca częścią odpowiedzi zapalnej w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia [284].

Szczegółowy opis wszystkich wyżej wymienionych mechanizmów znajduje się w pracy [65].

3. Infekcja wirusem SARS-CoV-2 oraz rola ACE2

Wirus SARS-CoV-2 replikuje się i namnaża w organizmie gospodarza, zanim jednak do tego dojdzie musi wnikać do komórek gospodarza. SARS-CoV-2 wiąże się z receptorem błonowym ACE2 (enzymem konwertującym angiotensynę 2) dzięki domenie wiążącej receptor, kodowanej w białku fuzyjnym (glikoproteinie S) [214]. SARS-CoV-2 używa ACE2 do wejścia oraz transbłonowej proteazy serynowej 2 (TMPRSS2) do pobudzania białka S [123]. Jak udowodniono, ACE2 odgrywa istotną rolę w progresji zakażenia SARS-CoV-2 [22, 277]. Ponadto ACE2 odgrywa także inną zasadniczą rolę w organizmie człowieka [108], katalizuje rozkład angiotensyny I do angiotensyny 1-9 (ANG-(1-9)) oraz rozkład angiotensyny II na angiotensynę 1-7 (ANG-(1-7)) – przeciwdziałając w ten sposób działaniu angiotensyny II [301].

Angiotensyna II wiąże się z AT1R, powodując zwężenie naczyń, podczas gdy ANG-(1-7) wywołuje rozszerzenie naczyń za pośrednictwem AT2R. Można zatem powiedzieć, że równowaga między angiotensyną II a ANG-(1-7) jest krytyczna w chorobach serca [58, 127]. Poza tym ANG-(1-7) jest obecnie uważana za biologicznie aktywny element układu RAA, który działając poprzez receptor Mas, wywiera hamujący wpływ na stany zapalne oraz mechanizmy wzrostu naczyń i komórek [268]. Liczne badania wykazały rolę osi ANG-(1-7)/ACE2/Mas w rozwoju nadciśnienia, regulacji czynności nerek i progresji choroby nerek. Dodatkowo zasugerowano, że zmniejszenie aktywności tej osi może być krytycznym czynnikiem w zaawansowaniu choroby sercowo-naczyniowej [57]. Zatem, ACE2 odgrywa ważną rolę kontrregulacyjną w układzie RAA, promując ogólnoustrojowe działanie rozszerzające naczynia krwionośne i działanie przeciwzapalne [1, 325].

4. Leczenie nadciśnienia a infekcja SARS-CoV-2

Z uwagi na wymienione powyżej zaangażowanie ACE-2 w regulacji ciśnienia tętniczego pojawiły się doniesienia o możliwych negatywnych skutkach przyjmowania leków hipotensyjnych w sytuacji wystąpienia infekcji SARS-CoV-2. Badania na zwierzętach sugerują, że ACEI lub ARB/sartany mogą zwiększać ekspresję ACE2 [58, 273], zwiększając w ten sposób dostępność cząsteczek docelowych dla SARS-CoV-2 [131]. Badania te doprowadziły do pojawienia się hipotezy, wedle której ACEI i ARB mogą być szkodliwe dla pacjentów z COVID-19 [37, 54, 56, 279].

Z tego powodu pojawiło się wiele badań, których wyniki dostarczyły odpowiedzi na pytanie, czy ACEI i ARB są rzeczywiście szkodliwe w kontekście epidemii COVID-19 [308]. Przesłanie tych badań jest spójne, nie ujawniono żadnych dowodów na szkodliwy wpływ wynikający ze stałego przyjmowania ACEI i ARB u pacjentów z COVID-19 [38, 158, 177, 188, 241, 313]. Co więcej, pojawiły się także doniesienia, iż zwiększenie poziomu ACE2 może nawet prowadzić do poprawy wyników klinicznych u pacjentów z infekcją SARS-CoV-2 poprzez ochronę przed uszkodzeniami płuc [97].

Należy mieć jednak na uwadze, że wiele z tych badań ma charakter obserwacyjny i wiąże się z prowadzeniem obserwacji w stosunkowo krótkim okresie. Jednakże, istnieją ważne badania, które poparły specjalistyczne wytyczne, aby nie przerywać leczenia ACEI/ARB u pacjentów z COVID-19, gdy jest to klinicznie wskazane [18, 208, 267].

4.5.2 Model

Celem lepszego zrozumienia, w jaki sposób SARS-CoV-2 wpływa na pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym i PChN, a więc grupą pacjentów o wyższym ryzyku niekorzystnych wyników klinicznych i złym rokowaniu, wykorzystano i zmodyfikowano istniejący już model oparty na sieci Petriego [70, 69]. Wspominany model koncentruje się przede wszystkim na wpływie wrodzonej i adaptacyjnej odporności oraz procesów zapalnych niskiego stopnia na samoistne nadciśnienie tętnicze i przewlekłą chorobę nerek (patrz [70]). Do tego istniejącego modelu dodano infekcję SARS-CoV-2, którą potraktowano jako dodatkowy “sygnał” w stosunkowo niestabilnym systemie.

Z uwagi na zastosowane metody porównawcze w tych badaniach wyróżnić należy dwa modele oparte o formalizm klasycznych sieci Petriego. *Model pełny*, zwany także modelem z infekcją SARS-CoV-2, który zawiera 87 tranzycji, 55 miejsc i jest pokryty przez 139451 t-niezmienników oraz *model zredukowany*, zwany także modelem bez infekcji SARS-CoV-2, który zawiera 76 tranzycji, 49 miejsc i jest pokryty przez 22997 t-niezmienników. *Model zredukowany* jest to *model pełny*, który nie zawiera konkretnego modułu, a więc miejsc i tranzycji powiązanych z infekcją wirusem SARS-

CoV-2, z zachowaniem pokrycia sieci przez t-niezmienniki. Model z infekcją wirusem SARS-CoV-2 przedstawiono na Rysunku 4.10, na którym różnymi kolorami wyróżniono zawarte podprocesy. Wszystkie nazwy pasywnych i aktywnych komponentów zawarto w Tabeli 4.17 i 4.18. W obu Tabelach wyróżniono dwie kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikator miejsca/tranzycji i kolumna *Znaczenie biologiczne* – zawierająca nazwę miejsca/tranzycji określającą jej przeznaczenie w systemie.

TABELA 4.17: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc dla modelu z infekcją SARS-CoV-2. Nazwy miejsc, które oznaczono pogrubioną czcionką oznaczają komponenty, które są pominięte w *modelu zredukowanym* – modelu niezawierającym modułu infekcji SARS-CoV-2 (patrz [65]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	neoantygeny	p_{28}	wysokie ciśnienie krwi
p_1	komórki APC z neoantygenami	p_{29}	wysoki poziom sprężonego eNOS
p_2	limfocyty Th1	p_{30}	rozprężony eNOS
p_3	RANTES i CCR5	p_{31}	ADMA
p_4	aktywowana oksydaza NADPH	p_{32}	angiotensynogen
p_5	limfocyty T w przydancie i około-naczyniowej tkance tłuszczowej	p_{33}	angiotensyna I
p_6	wzrost w IFN- γ	p_{34}	oś prorenina–renina
p_7	IL-17	p_{35}	ACE na śródbłonku naczyniowym płuc i nerek
p_8	APC (makrofagi, limfocyty B, komórki dendrytyczne)	p_{36}	ET1
p_9	CRP	p_{37}	kompleks TNF- α i TNFR1
p_{10}	limfocyty T CD4 ⁺	p_{38}	funkcjonalny receptor białka ACE2 dla SARS-CoV-2 w różnych narządach ludzkich
p_{11}	ROS (anion rodnik nadtlenkowy (O ₂ ^{•-}))	p_{39}	ANG-(1-7)
p_{12}	Na ⁺ powiązany z GAG w tkance śródmiąższowej	p_{40}	białko S wirusa SARS-CoV-2
p_{13}	przyciągnięte MPS	p_{41}	kompleks białka S i ACE2
p_{14}	VEGFC	p_{42}	zainfekowana komórka
p_{15}	TonEBP	p_{43}	ANG-(1-9)
p_{16}	VEGFR3	p_{44}	wirusowe RNA
p_{17}	kompleks VEGFC-VEGFR3	p_{45}	zainfekowana komórka po odczytaniu RNA
p_{18}	VEGFR2	p_{46}	receptor Mas
p_{19}	kompleks VEGFC-VEGFR2	p_{47}	angiotensyna II
p_{20}	TNFR1	p_{48}	aldosteron
p_{21}	wysoki poziom NO	p_{49}	aktywowane TACE
p_{22}	wysoki poziom PGI2	p_{50}	TMPRSS2
p_{23}	niski poziom NO	p_{51}	IL-6
p_{24}	AT1R	p_{52}	IL-1 β
p_{25}	AT2R	p_{53}	IL-23
p_{26}	nadtlenoazotyn (ONOO ⁻)	p_{54}	TNF- α
p_{27}	obniżone ciśnienie krwi		

TABELA 4.18: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji. Nazwy tranzycji, które oznaczono pogrubioną czcionką oznaczają komponenty, które są pominięte w *modelu zredukowanym* – modelu niezawierającym modułu infekcji SARS-CoV-2 (patrz [65]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_0	formowanie neoantygenów	t_{44}	wiązanie angiotensynogenu i reniny
t_1	przewlekły proces zapalny	t_{45}	wiązanie angiotensyny I i ACE
t_2	aktywacja układu immunologicznego poprzez zapalenie bakteryjne	t_{46}	synteza ACE przez śródbłonek naczyniowy w płucach i nerkach

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_3	migracja limfocytów Th do naczyń krwionośnych	t_{47}	obniżona perfuzja nerkowa i obniżone obciążenie sodem w dystalnym kanaliku krętym
t_4	źródło cytokin	t_{48}	aktywacja baroreceptorów
t_5	reakcja ostrej fazy w wątrobie	t_{49}	stymulacja wytwarzania VEGFC przez kompleks bradykinina-B2R
t_6	zwiększenie ilości AT1R w komórkach mięśni gładkich naczyń	t_{50}	stymulacja syntezy i wydzielania
t_7	źródło AT1R	t_{51}	„regulacja w dół” ACE
t_8	aktywacja i proliferacja limfocytów T poprzez AT1R	t_{52}	stymulacja współczulna pod wpływem stresu
t_9	redukcja aktywności eNOS przez CRP	t_{53}	ekspresja AT2R
t_{10}	niezależne od osmotyczności wiązanie Na^+ w obrębie tkanki śródmiąższowej	t_{54}	wpływ osi TNF-TNFR na RANTES
t_{11}	aktywacja układu immunologicznego w tkance śródmiąższowej pod wpływem lokalnej hipertonii	t_{55}	naprężenia ścinające wywołane wysokim ciśnieniem krwi
t_{12}	aktywacja VEGFC	t_{56}	konwersja angiotensyny II
t_{13}	modyfikacja sieci kapilarnych naczyń limfatycznych poprzez VEGFR3	t_{57}	wiązanie ACE2 i białka S
t_{14}	wzrost stężenia NO	t_{58}	wejście do podatnej komórki
t_{15}	indukcja Th17	t_{59}	połączenie błony wirusa z błoną komórkową
t_{16}	synteza TonEBP pod wpływem lokalnej hipertonii	t_{60}	konwersja angiotensyny I
t_{17}	wiązanie VEGFR3 i VEGFC	t_{61}	infekcja SARS-CoV-2
t_{18}	wiązanie VEGFR2 VEGFC (szlak kanoniczny)	t_{62}	wiązanie Ang-(1-7) do receptora Mas indukuje wazodylatację, działanie przeciwzakrzepowe i antyarytmogenne
t_{19}	rozluźnienie mięśni	t_{63}	synteza ACE2
t_{20}	wydzielanie przez śródbłonek limfatyczny	t_{64}	uwalnianie wirusowego RNA i przejęcie komórki
t_{21}	ekspresja receptora 2 dla czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGFR2)	t_{65}	konwersja
t_{22}	wiązanie TNF- α i TNFR1	t_{66}	zmniejszenie ilości AT1R
t_{23}	ekspresja TNFR1	t_{67}	działanie ANG-(1-9)
t_{24}	śródbłonkowa stymulacja ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1	t_{68}	wytwarzanie białek wirusowych, składanie nowych kopii i rozprzestrzenianie infekcji
t_{25}	wazokonstrykcja	t_{69}	ekspresja Mas
t_{26}	obniżanie ciśnienia krwi przez PGI2	t_{70}	zwiększone stężenie PGI2 przez ANG-(1-7) i AT2R
t_{27}	znacząco osłabiona ekspresja eNOS poprzez TNF- α	t_{71}	stymulacja wydzielania aldosteronu
t_{28}	wiązanie neoantygenów z APC	t_{72}	zwiększone stężenie aldosteronu we krwi i zwiększona objętość płynu pozakomórkowego
t_{29}	zwiększenie ciśnienia krwi	t_{73}	progresja przewlekłej choroby nerek
t_{30}	indukcja syntezy eNOS zależna od wapnia i fosforylacji	t_{74}	fosforylacja TACE zależna od MAPK
t_{31}	wytwarzanie nadtlenoazotynu (ONOO^-)	t_{75}	proteolityczny rozpad ACE2
t_{32}	oksydacja aktywnego kofaktora eNOS - BH_4	t_{76}	źródło TMPRSS2
t_{33}	synteza anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\bullet-}$) przez rozprężony eNOS	t_{77}	działanie IL-1 β action
t_{34}	niska synteza NO	t_{78}	aktywacja układu immunologicznego poprzez infekcję wirusową
t_{35}	wytwarzanie rozprężonego eNOS	t_{79}	migracja limfocytów
t_{36}	aktywacja oksydazy NADPH przez AT1R	t_{80}	wzmocnienie działania TNF- α

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{37}	aktywacja oksydazy NADPH przez VEGFR2	t_{81}	„regulacja w górę” AT1R
t_{38}	szlak niekanoniczny	t_{82}	wzmożona produkcja angiotensynogenu
t_{39}	wytwarzanie anionorodnika nadciśnieniowego poprzez niski poziom NO	t_{83}	źródło limfocytów
t_{40}	wytwarzanie anionorodnika nadciśnieniowego poprzez oksydazę NADPH	t_{84}	wzmożona stymulacja IFN-γ przez produkty transkrypcji wirusowego RNA
t_{41}	wytwarzanie anionorodnika nadciśnieniowego poprzez wysokie ciśnienie krwi	t_{85}	wzmożona stymulacja IL-1β przez produkty transkrypcji wirusowego RNA
t_{42}	indukcja syntezy ADMA przez stres oksydacyjny	t_{86}	wzmożona stymulacja IL-6 przez produkty transkrypcji wirusowego RNA
t_{43}	synteza angiotensynogenu przez wątrobę		

4.5.3 Analiza i wyniki

Analiza modelu relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a nadciśnieniem samoistnym została przeprowadzona na kilku różnych poziomach. Z uwagi na niezwykle dużą liczbę t-niezmienników jaka charakteryzuje ten model – 139451 t-niezmienników, analizy były utrudnione. Z klasycznych analiz przeprowadzono analizę zbiorów MCT. Natomiast z rozszerzonych metod analiz przeprowadzono analizę ważności, porównawczą analizę ważności oraz symulację knockout.

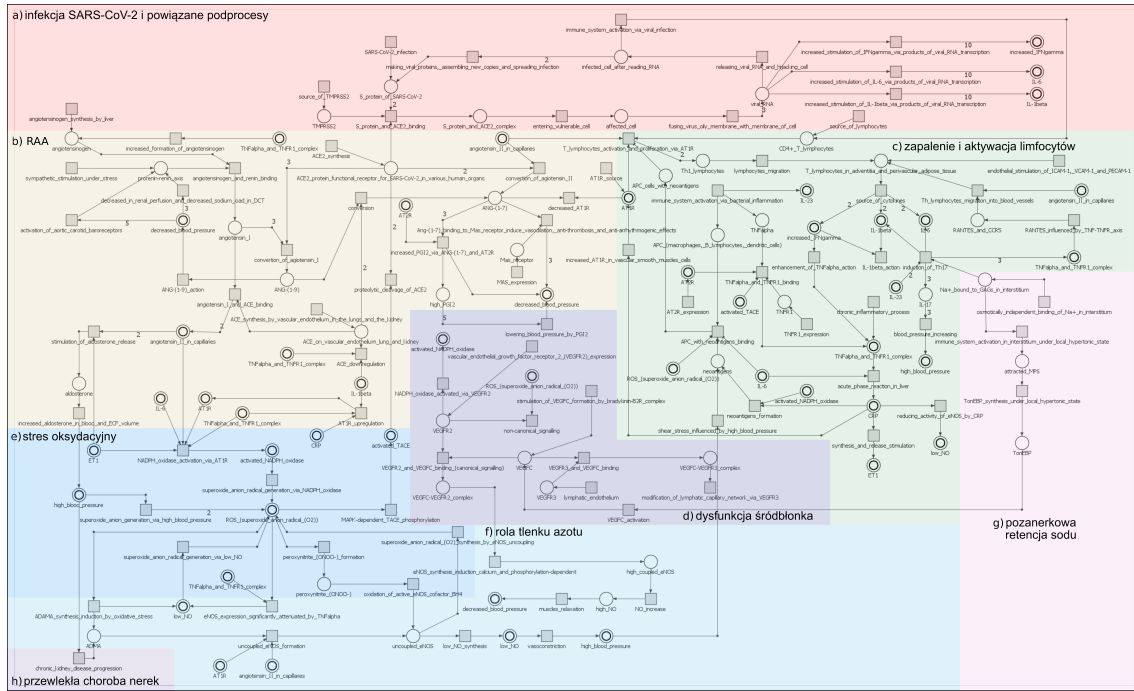
Analiza zbiorów MCT

Zaproponowany model z modułem wirusa SARS-CoV-2 zawiera 10 nietrywialnych zbiorów MCT zebranych w Tabeli 4.19. Tabela ta została podzielona na trzy kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory kolejnych zbiorów MCT, *Zawarte tranzycje* – kolumna składa się z tranzycji należących do poszczególnych zbiorów MCT, *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca opis znaczenia biologicznego przypisany do każdego zbioru MCT.

TABELA 4.19: Lista nietrywialnych zbiorów MCT – zbiorów składających się z co najmniej dwóch tranzycji należących do wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników (patrz [65]).

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	$t_2, t_8, t_{15}, t_{22}, t_{23}, t_{28}, t_{29}, t_{79}$	Odpowiedź układu odpornościowego na stan zapalny
m_2	$t_{57}, t_{58}, t_{59}, t_{61}, t_{76}$	Proces wnikania wirusa SARS-CoV-2 do komórek gospodarza
m_3	$t_{14}, t_{18}, t_{19}, t_{30}$	Obniżenie ciśnienia krwi spowodowane wysokim poziomem tlenu azotu
m_4	t_{11}, t_{12}, t_{16}	Pozanerkowa retencja sodu
m_5	t_{13}, t_{17}, t_{20}	Modyfikacja sieci naczyń limfatycznych przez VEGFR3
m_6	t_3, t_{54}	Migracja limfocytów Th do naczyń krwionośnych
m_7	t_{26}, t_{70}	Obniżenie ciśnienia krwi spowodowane podwyższony poziom PGI2 przez ANG-(1-7) i AT2R
m_8	t_{31}, t_{32}	Rozprężanie eNOS przez nadciśnieniowy (ONOO ⁻)
m_9	t_{62}, t_{69}	Rozszerzenie naczyń krwionośnych spowodowane przez wiązanie ANG-(1-7) z receptorem Mas (działanie przeciwzakrzepowe i anty-arytmogenne)
m_{10}	t_{71}, t_{72}	Wzrostu ciśnienia krwi spowodowany stymulowaniem uwalniania aldosteronu

Analiza zbiorów MCT pozwoliła określić kontekst biologiczny dla nietrywialnych bloków funkcjonalnych. Taką samą analizę przeprowadzono także dla wybranego zbioru t-niezmienników, który dotyczy t-niezmienników tylko powiązanych z modułem wirusa SARS-CoV-2. Okazuje się, że większość zbiorów MCT się nie zmienia, niezależnie czy analizowane są wszystkie t-niezmienniki modelu czy tylko te powiązane z modułem wirusowym. Różnica pojawia się jednak w jednym ze zbiorów MCT, w zbiorze m_2 , który w przypadku zbioru t-niezmienników wirusowych zawiera dodatkową



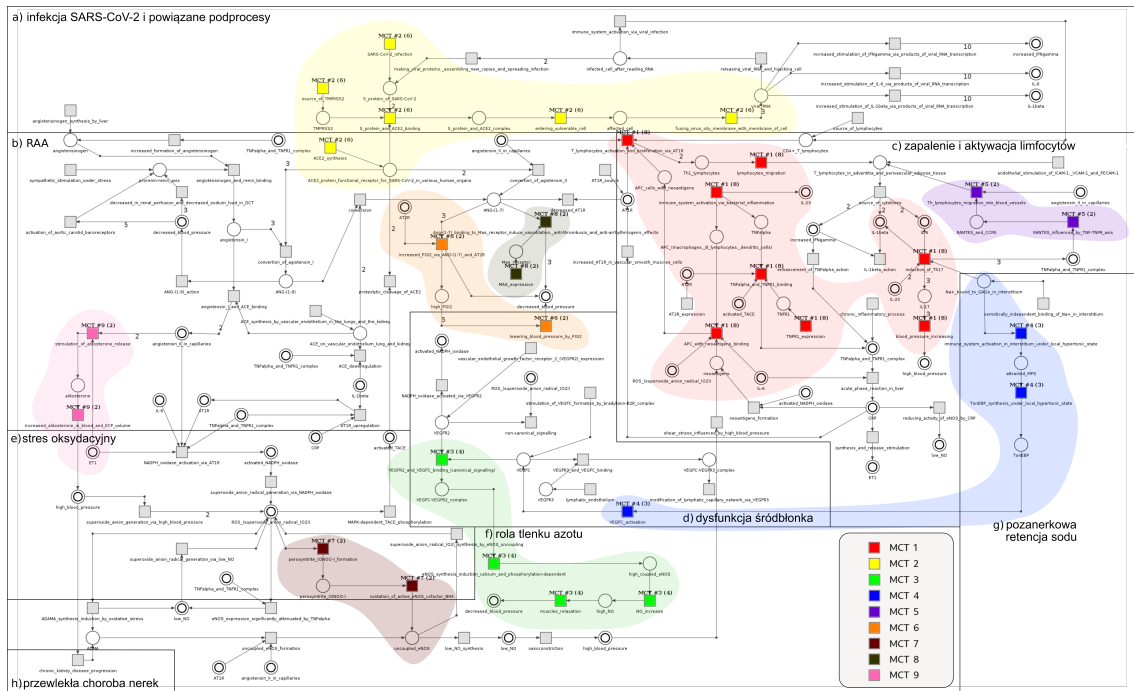
RYСУNEK 4.10: Model pełny dotyczący związku między SARS-CoV-2 a nadciśnieniem pierwotnym, w którym wyróżniono następujące moduły: a) infekcja wirusem SARS-CoV-2 i związane z nim podprocesy, b) RAA: układ renina-angiotensyna-alдостерон, c) stan zapalny i aktywacja limfocytów, d) dysfunkcja śródbłonnka, e) stres oksydacyjny, f) rola tlenu azotu, g) pozanerkowa retencja sodu, h) przewlekła choroba nerek. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [65].

tranzycję t_{63} . Tranzycja ta nie zmienia ogólnego biologicznego znaczenia tego zbioru MCT. Kolejna zmiana, której można się spodziewać, dotyczy zbiorów MCT, które tylko i wyłącznie zawierają tranzycje niezależne od obecności wirusa SARS-CoV-2, a więc takie zbiory nie istnieją w przypadku analizy tylko t-niezmienników wirusowych. W związku z tą zależnością, zbiór m_5 nie występuje w zbiorach MCT zidentyfikowanych dla t-niezmienników wybranych, wirusowych. Zbiory MCT dla t-niezmienników wyłącznie powiązanych z wirusem SARS-CoV-2 znajdują się na Rysunku 4.11.

Zbiory MCT dla t-niezmienników wirusowych zostały przeanalizowane pod kątem ważności poszczególnych tranzycji w nich zawartych. Analiza ta wykazała, że spośród wszystkich zbiorów MCT, zbiór m_1 zawiera najważniejsze tranzycje (procesy elementarne). Ważność tranzycji należących do zbioru m_1 wynosi około 95% (Tabela 4.20, kolumna dotycząca t-niezmienników wyłącznie powiązanych z infekcją wirusa SARS-CoV-2). Oprócz nietrywialnych zbiorów MCT, istnieją również zbiory trywialne, czyli pojedyncze tranzycje. W związku z tym w kolejnym etapie przeprowadzono pełną analizę ważności.

Analiza ważności

Analiza ważności została przeprowadzona dla modelu z modułem SARS-CoV-2, uwzględniając wszystkie t-niezmienniki oraz wybrany zbiór t-niezmienników wyłącznie powiązanych z modułem SARS-CoV-2. Przeprowadzono analizę na dwóch poziomach, gdyż analiza ważności koncentrująca się na wszystkich t-niezmiennikach modelu pełnego daje pogląd na to, które tranzycje są istotne/nieistotne dla funkcjonowania całego modelu relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a nadciśnieniem pierwotnym, podczas gdy analiza ważności skupiająca się wyłącznie na t-niezmiennikach powiązanych z modułem wirusowym pozwoli określić, które procesy elementarne są najbardziej kluczowe z punktu widzenia tego konkretnego modułu, a do tego pozwoli zidentyfikować procesy niezależne, w żaden sposób niepowiązane z modułem wirusowym.



RYСУNEK 4.11: Graficzna reprezentacja zbiorów MCT dla t-niezmienników wyłącznie powiązanych z wirusem SARS-CoV-2. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [65].

Celem zrozumienia co kryje się za wybranym zbiorem t-niezmienników powiązanych z modułem wirusowym, należy przypomnieć, iż *model pełny* pokryty jest przez 139451 t-niezmienników, w tym 113454 (około 81%) stanowią t-niezmienniki wyłącznie powiązane z modułem SARS-CoV-2. Przez t-niezmienniki wirusowe rozumiane są tylko te, które w swoich wsparciach zawierają co najmniej jedną tranzycję z modułu SARS-CoV-2 (t_{57} , t_{58} , t_{59} , t_{61} , t_{64} , t_{68} , t_{76} , t_{78} , t_{84} , t_{85} , t_{86}).

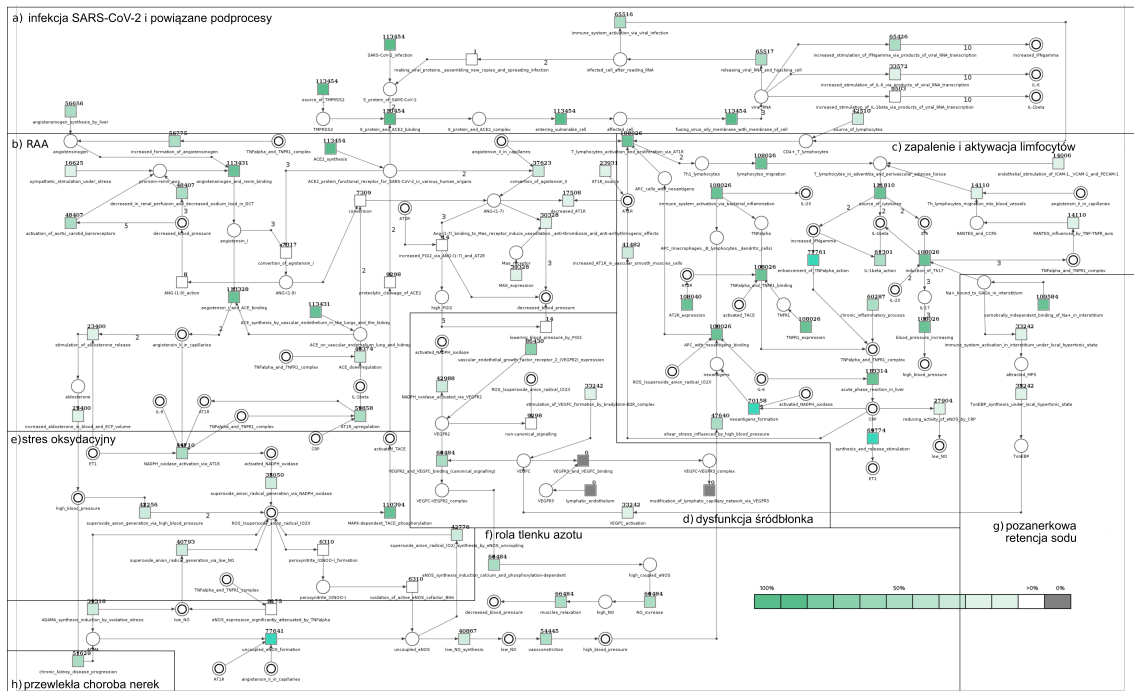
Identyfikacja t-niezmienników wirusowych była możliwa poprzez odjęcie zbioru t-niezmienników otrzymanych dla *modelu pełnego* z wyłączeniem modułu SARS-CoV-2 (taki model odpowiada *modelowi zredukowanemu*, czyli modelowi niezawierającego modułu wirusowego) od zbioru t-niezmienników *modelu pełnego* z modułem wirusowym. W efekcie tego działania, od zbioru t-niezmienników o mocy 139451 odjęto zbiór t-niezmienników o mocy 25997 i otrzymano zbiór t-niezmienników wyłącznie powiązanych z modułem wirusowym o mocy 113454. Wyniki analizy ważności dla wybranych procesów elementarnych dla wszystkich t-niezmienników jak i t-niezmienników wyłącznie związanych z modułem wirusowym przedstawiono w Tabeli 4.20. Tabela ta zawiera tylko te procesy elementarne, których ważność wyniosła powyżej 50%.

Tabela 4.20 zawiera pięć kolumn: *Moduł* – kolumna zawierająca moduły odpowiadające modułom przedstawionym na Rysunku 4.10, *Nazwa tranzycji* – kolumna zawierająca nazwy procesów elementarnych, które odpowiadają zamodelowanym tranzycjom, *ID* – kolumna zawierająca poszczególne identyfikatory tranzycji oraz kolumny *Ważność tranzycji we wszystkich t-niezmiennikach modelu pełnego zawierającego infekcję SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)* i *Ważność tranzycji w wybranych t-niezmiennikach modelu pełnego – dotyczy wyłącznie t-niezmienników wirusowych (113454 t-inw.)*. Ostatnie dwie wymienione kolumny zawierają ważność tranzycji wyrażoną w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%]. Ponadto, dodatkiem do formy tabelarycznej jest graficzna reprezentacja ważności tranzycji dla t-niezmienników powiązanych z modułem wirusowym, znajdująca się na Rysunku 4.12. Każda tranzycja na Rysunku 4.12 oznaczona jest gradientem koloru od białego do zielonego o różnym nasyceniu (im większe nasycenie tym dany proces elementarny ma większe znaczenie) lub kolorem szarym (jeżeli tranzycje nie są związane z t-niezmiennikami wirusowymi).

TABELA 4.20: Wyniki analizy ważności dla wybranych procesów elementarnych dla modelu z modułem SARS-CoV-2, gdzie wyróżniono dwa zbiory t-niezmienników: wszystkie t-niezmienniki i t-niezmienniki wyłącznie powiązane z modułem infekcji wirusem SARS-CoV-2. Tabela zawiera tylko te tranzycje, dla których ważność wyniosła powyżej 50%, zarówno w analizie wszystkich t-niezmienników, jak i t-niezmienników związanych tylko z modułem SARS-CoV-2 (patrz [65]).

Moduł	Nazwa tranzycji	ID	Ważność tranzycji we wszystkich t-niezmiennikach modelu pełnego zawierającego infekcję SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji w wybranych t-niezmiennikach modelu pełnego – dotyczy wyłącznie t-niezmienników wirusowych (113454 t-inw.)	
			tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]
b)	wiązanie angiotensynogenu i reniny	t_{44}	139409	99,97%	113431	99,98%
b)	synteza ACE przez śródbłonek naczyniowy w płucach i nerkach	t_{46}	139401	99,96%	113431	99,98%
b)	wiązanie angiotensyny I i ACE	t_{45}	13923	99,84%	113328	99,89%
c)	reakcja ostrej fazy w wątrobie	t_5	139048	99,71%	113314	99,88%
c)	źródło cytokin	t_4	137544	98,63%	111810	98,55%
e)	fosforylacja TACE zależna od MAPK	t_{74}	134681	96,58%	110394	97,30%
g)	niezależne od osmotyczności wiązanie Na^+ w obrębie tkanki śródmiąższowej	t_{10}	133447	95,69%	109584	96,59%
b)	ekspresja AT2R	t_{53}	131074	93,99%	108040	95,23%
c)	aktywacja układu immunologicznego poprzez zapalenie bakteryjne	t_2	131032	93,96%	108026	95,22%
c)	aktywacja i proliferacja limfocytów T poprzez AT1R	t_8	131032	93,96%	108026	95,22%
c)	indukcja Th17	t_{15}	131032	93,96%	108026	95,22%
c)	wiązanie $\text{TNF-}\alpha$ i TNFR1	t_{22}	131032	93,96%	108026	95,22%
c)	ekspresja TNFR1	t_{23}	131032	93,96%	108026	95,22%
c)	wiązanie neoantygenów z APC	t_{28}	131032	93,96%	108026	95,22%
c)	zwiększenie ciśnienia krwi	t_{29}	131032	93,96%	108026	95,22%
c)	migracja limfocytów	t_{79}	131032	93,96%	108026	95,22%
b)	synteza ACE2	t_{63}	125129	89,73%	113454	100,00%
a)	wiązanie ACE2 i białka S	t_{57}	113454	81,36%	113454	100,00%
a)	wejście do podatnej komórki	t_{58}	113454	81,36%	113454	100,00%
a)	połączenie błony wirusa z błoną komórkową	t_{59}	113454	81,36%	113454	100,00%
a)	infekcja SARS-CoV-2	t_{61}	113454	81,36%	113454	100,00%
a)	źródło TMPRSS2	t_{76}	113454	81,36%	113454	100,00%
d)	ekspresja receptora 2 dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR2)	t_{21}	106674	76,50%	86430	76,18%
f)	wytwarzanie rozprężonego eNOS	t_{35}	94871	68,03%	77641	68,43%
c)	wzmocnienie działania $\text{TNF-}\alpha$	t_{80}	91981	65,96%	77761	68,54%
c)	przewlekły proces zapalny	t_1	86157	61,78%	60287	53,14%
c)	formowanie neoantygenów	t_0	84808	60,82%	70158	61,84%
c)	stymulacja syntezy i wydzielania	t_{50}	84624	60,68%	69774	61,50%
f)	wzrost stężenia NO	t_{14}	81628	58,54%	66484	58,60%
d)	wiązanie VEGFR2 VEGFC (szlak kanoniczny)	t_{18}	81628	58,54%	66484	58,60%
f)	rozluźnienie mięśni	t_{19}	81628	58,54%	66484	58,60%
f)	indukcja syntezy eNOS zależna od wapnia i fosforylacji	t_{30}	81628	58,54%	66484	58,60%
c)	działanie $\text{IL-1}\beta$	t_{77}	76537	54,88%	61301	54,03%
b)	„regulacja w górę” AT1R	t_{81}	7306	52,39%	59858	52,76%

Moduł	Nazwa tranzycji	ID	Ważność tranzycji we wszystkich t-niezmiennikach modelu pełnego zawierającego infekcję SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji w wybranych t-niezmiennikach modelu pełnego – dotyczy wyłącznie t-niezmienników wirusowych (113454 t-inw.)	
			tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]
b)	wzmoczona produkcja angiotensynogenu	t_{82}	69764	50,03%	56775	50,04%
b)	synteza angiotensynogenu przez wątrobę	t_{43}	69645	49,94%	56656	49,94%
f)	wazokonstrykcja	t_{25}	66781	47,89%	54445	47,99%
e)	aktywacja oksydazy NADPH przez AT1R	t_{36}	65728	47,13%	54710	48,22%
a)	uwalnianie wirusowego RNA i przejście komórki	t_{64}	65517	46,98%	65517	57,75%
a)	aktywacja układu immunologicznego poprzez infekcję wirusową	t_{78}	65516	46,98%	65516	57,75%
c)	źródło limfocytów	t_{83}	65516	46,98%	42510	37,47%
a)	wzmoczona stymulacja IFN- γ przez produkty transkrypcji wirusowego RNA	t_{84}	65426	46,92%	65426	57,67%



RYSUNEK 4.12: Analiza ważności tranzycji przeprowadzona dla t-niezmienników wyłącznie powiązanych z wirusem SARS-CoV-2. Tranzycje oznaczone są gradientem koloru od białego, przez jasno zielony do ciemno zielonego – im ciemniejszy odcień zielonego tym dany proces elementarny ma większe znaczenie. Jeżeli tranzycje oznaczone są kolorem szarym, to są to procesy elementarne niezależne od modułu wirusowego. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [65].

Analiza ważności przeprowadzona dla modelu opisującego związek między infekcją SARS-CoV-2 a nadciśnieniem pierwotnym (dla wszystkich 139451 t-niezmienników) wykazała, że najważniejsze procesy elementarne obejmują głównie układ RAA, zapalenie i aktywację limfocytów oraz infekcję wirusem SARS-CoV-2. Niemniej jednak istnieją również istotne procesy elementarne znajdujące się w innych modułach. Analiza ważności przeprowadzona tylko dla t-niezmienników powiązanych

z modułem SARS-CoV-2 pozwoliła określić, jak istotne są tranzycje odpowiadające procesom elementarnym w tych tylko t-niezmiennikach. Pozwala to określić, które procesy elementarne są kluczowe dla infekcji wirusowej, a które są niezależne od obecności wirusa SARS-CoV-2. Jako że Tabela 4.20 zawiera tylko te tranzycje, których ważność wynosi więcej niż 50%, to nie można w niej zidentyfikować tranzycji niezależnych od modułu wirusowego, można je natomiast zobaczyć na Rysunku 4.12, gdyż są oznaczone na szaro. Jak widać wyróżnić można trzy procesy elementarne niezależne od modułu wirusowego: modyfikacja sieci kapilarnych naczyń limfatycznych poprzez VEGFR3 (t_{13}), wiązanie VEGFR3 i VEGFC (t_{17}) oraz wydzielanie przez śródbłonek limfatyczny (t_{20}) należący do modułu uszkodzenia śródbłonka.

Na podstawie powyższych analiz ważności, zarówno dla wszystkich t-niezmienników, jak i wyłącznie powiązanych z modułem wirusowym, można zauważyć, że ważności procesów elementarnych są podobne. Dzieje się tak, ponieważ t-niezmienniki związane z modułem SARS-CoV-2 stanowią większość wszystkich modelowanych podprocesów/t-niezmienników (około 81%).

Porównawcza analiza ważności

Poza wyżej opisaną analizą ważności dla *modelu pełnego* zawierającego moduł infekcji wirusa SARS-CoV-2, wykonano tę samą analizę dla *modelu zredukowanego*, czyli *modelu pełnego* z pominiętym modułem wirusowym, a więc dla modelu niezawierającego infekcji wirusa SARS-CoV-2 i wszystkich procesów powiązanych. Wyniki porównania tych dwóch analiz przedstawiono w Tabeli 4.21 i w Tabeli 4.22. Tabela 4.21 zawiera porównawczą analizę ważności dla wszystkich tranzycji, natomiast Tabela 4.22 zawiera tylko wybrane tranzycje, dla których zidentyfikowano znaczące różnice – w ogólności jest podsumowaniem wyników zebranych w Tabeli 4.21. Obie wspomniane Tabele zawierają pięć kolumn: *Moduł* – kolumna zawierająca informację o przynależności danego procesu elementarnego do konkretnego modułu biologicznego zgodnego z Rysunkiem 4.10, *Procesy elementarne* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane poszczególnym tranzycjom, *Ważność tranzycji dla modelu pełnego – z infekcją SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwóch postaciach: *tranz./t-inw.* oraz [%] dla *modelu pełnego*, *Ważność tranzycji dla modelu zredukowanego – bez infekcji SARS-CoV-2 (25997 t-inw.)* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwóch postaciach *tranz./t-inw.* oraz [%] dla *modelu zredukowanego*, *Różnica w p.p.* – kolumna zawierająca informację o różnicy w ważności pomiędzy tranzycjami w *modelu pełnym* i w *modelu zredukowanym* wyrażoną w punktach procentowych.

Różnice ważności można podzielić na następujące kategorie: nieznacząca różnica, znacząca dodatnia różnica i znacząca ujemna różnica. W przypadku modelu relacji między infekcją SARS-CoV-2 a nadciśnieniem samoistnym określono jako znaczącą różnicę ± 5 punktów procentowych (p.p.):

- 1) nieznacząca różnica: $-5 \text{ p.p.} < \text{różnica} < 5 \text{ p.p.}$,
- 2) znacząca dodatnia różnica: $\text{różnica} \geq 5 \text{ p.p.}$,
- 3) znacząca ujemna różnica: $\text{różnica} \leq -5 \text{ p.p.}$

Tranzycja charakteryzująca się znaczącą dodatnią różnicą oznacza, że ważność odpowiadającego tej tranzycji procesu elementarnego jest większa w modelu z infekcją SARS-CoV-2 w porównaniu do modelem bez modułu wirusowego. Odwrotna zależność dotyczy tranzycji charakteryzującej się znaczącymi ujemnymi różnicami, co oznacza że ważność odpowiadającego tej tranzycji procesu elementarnego jest mniejsza w modelu z infekcją SARS-CoV-2 w porównaniu z modelem bez infekcji tym wirusem. Jeśli ważność pewnego procesu elementarnego zmniejsza się w modelu z wirusem,

może się to wiązać z faktem, że w przypadku obecności wirusa ten proces zostaje przysłonięty przez inne, bardziej znaczące podprocesy – przez co maleje jego ważność. W przypadku dużych różnic dodatnich, można stwierdzić, że im większa znacząca dodatnia różnica tym dany proces elementarny jest bardziej związany z modułem wirusa. Oznacza to, że taki proces elementarny może być bezpośrednio stymulowany przez infekcję SARS-CoV-2 lub on może stymulować wiele podprocesów związanych z infekcją wirusową. Z drugiej strony, im większa znacząca różnica ujemna, tym dany proces elementarny jest bardziej niezależny od modułu wirusowego.

Należy mieć na uwadze fakt, że analiza ważności jest analizą na poziomie procesów elementarnych (tranzycji), które są elementami składowymi większych podprocesów czy nawet modułów biologicznych. Wobec tego, może się zdarzyć sytuacja, że pewne procesy elementarne mogą być mniej ważne w danym module, jednak sam moduł może być uznany za niezbędny do funkcjonowania całego systemu, gdyż liczy się szerszy kontekst i większa sieć oddziaływań.

TABELA 4.21: Porównanie analizy ważności pomiędzy modelem pełnym z modułem SARS-CoV-2 (139451 t-inw.) i modelem zredukowanym bez wirusa (25997 t-inw.) (patrz [65])*.

Moduł	Procesy elementarne	Ważność tranzycji dla modelu pełnego – z infekcją SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji dla modelu zredukowanego – bez infekcji SARS-CoV-2 (25997 t-inw.)		Różnica w p.p.
		tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]	
a)	wiązanie ACE2 i białka S	113454	81,36%	Procesy elementarne niezawarte w modelu zredukowanym		
a)	wejście do podatnej komórki	113454	81,36%			
a)	połączenie błony wirusa z błoną komórkową	113454	81,36%			
a)	infekcja SARS-CoV-2	113454	81,36%			
a)	uwalnianie wirusowego RNA i przejście komórki	65517	46,98%			
a)	wytwarzanie białek wirusowych, składanie nowych kopii i rozprzestrzenianie infekcji	1	0,00%			
a)	źródło TMPRSS2	113454	81,36%			
a)	aktywacja układu immunologicznego poprzez infekcję wirusową	65516	46,98%			
a)	wzmoczona stymulacja IFN- γ przez produkty transkrypcji wirusowego RNA	65426	46,92%			
a)	wzmoczona stymulacja IL-1 β przez produkty transkrypcji wirusowego RNA	9503	6,81%			
a)	wzmoczona stymulacja IL-6 przez produkty transkrypcji wirusowego RNA	33572	24,07%			
h)	progresja przewlekłej choroby nerek	62887	45,10%			
e)	wytwarzanie nadtlenuazotynu (ONOO $^-$)	7696	5,52%	1386	5,33%	0,19
e)	oksydacja aktywnego kofaktora eNOS - BH $_4$	7696	5,52%	1386	5,33%	0,19
e)	synteza anionorodnika ponadtlenkowego (O $_2^{\bullet-}$) przez rozprężony eNOS	52323	37,52%	9547	36,72%	0,80
e)	aktywacja oksydazy NADPH przez AT1R	65728	47,13%	11018	42,38%	4,75
e)	aktywacja oksydazy NADPH przez VEGFR2	53530	38,39%	10542	40,55%	-2,16
e)	wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego poprzez niski poziom NO	49735	35,66%	8942	34,40%	1,27
e)	wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego poprzez oksydazę NADPH	42986	30,83%	7936	30,53%	0,30
e)	wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego poprzez wysokie ciśnienie krwi	52626	37,74%	10370	39,89%	-2,15
e)	fosforylacja TACE zależna od MAPK	134681	96,58%	24287	93,42%	3,16
c)	formowanie neoantygenów	84808	60,82%	14650	56,35%	4,46

Moduł	Procesy elementarne	Ważność tranzycji dla modelu pełnego – z infekcją SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji dla modelu zredukowanego – bez infekcji SARS-CoV-2 (25997 t-inw.)		Różnica w p.p.
		tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]	
c)	przewlekły proces zapalny	86157	61,78%	25870	99,51%	-37,73
c)	aktywacja układu immunologicznego poprzez zapalenie bakteryjne	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	migracja limfocytów Th do naczyń krwionośnych	19180	13,75%	5070	19,50%	-5,75
c)	źródło cytokin	137544	98,63%	25734	98,99%	-0,36
c)	reakcja ostrej fazy w wątrobie	139048	99,71%	25734	98,99%	0,72
c)	aktywacja i proliferacja limfocytów T poprzez AT1R	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	redukcja aktywności eNOS przez CRP	34440	24,70%	6536	25,14%	-0,44
c)	indukcja Th17	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	wiązanie TNF- α i TNFR1	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	ekspresja TNFR1	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	śródbłonkowa stymulacja ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1	18972	13,60%	4966	19,10%	-5,50
c)	wiązanie neoantygenów z APC	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	zwiększenie ciśnienia krwi	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	stymulacja syntezy i wydzielania	84624	60,68%	14850	57,12%	3,56
c)	wpływ osi TNF-TNFR na RANTES	19180	13,75%	5070	19,50%	-5,75
c)	działanie IL-1 β	76537	54,88%	15236	58,61%	-3,72
c)	migracja limfocytów	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	wzmocnienie działania TNF- α	91981	65,96%	14220	54,70%	11,26
c)	źródło limfocytów	65516	46,98%	23006	88,49%	-41,51
f)	wzrost stężenia NO	81628	58,54%	15144	58,25%	0,28
f)	rozluźnienie mięśni	81628	58,54%	15144	58,25%	0,28
f)	wazokonstrykcja	66781	47,89%	12336	47,45%	0,44
f)	znacząco osłabiona ekspresja eNOS przez TNF- α	9938	7,13%	1763	6,78%	0,34
f)	indukcja syntezy eNOS zależna od wapnia i fosforylacji	81628	58,54%	15144	58,25%	0,28
f)	niska synteza NO	49796	35,71%	8929	34,35%	1,36
f)	wytwarzanie rozprężonego eNOS	94871	68,03%	17230	66,28%	1,75
f)	indukcja syntezy ADMA przez stres oksydacyjny	47978	34,40%	8660	33,31%	1,09
d)	aktywacja VEGFC	40815	29,27%	7573	29,13%	0,14
d)	modyfikacja sieci kapilarnych naczyń limfatycznych przez VEGFR3	2	0,00%	2	0,01%	-0,01
d)	wiązanie VEGFR3 i VEGFC	2	0,00%	2	0,01%	-0,01
d)	wiązanie VEGFR2 VEGFC (szlak kanoniczny)	81628	58,54%	15144	58,25%	0,28
d)	wydzielanie przez śródbłonek limfatyczny	2	0,00%	2	0,01%	-0,01

4.5. Porównawcza analiza ważności z istotnymi różnicami – model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym 122

Moduł	Procesy elementarne	Ważność tranzycji dla modelu pełnego – z infekcją SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji dla modelu zredukowanego – bez infekcji SARS-CoV-2 (25997 t-inw.)		Różnica w p.p.
		tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]	
d)	ekspresja receptora 2 dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR2)	106674	76,50%	20244	77,87%	-1,37
d)	obniżanie ciśnienia krwi przez PGI2	42	0,03%	28	0,11%	-0,08
d)	szlak niekanoniczny	12021	8,62%	2723	10,47%	-1,85
d)	stymulacja wytwarzania VEGFC przez kompleks bradykinina-B2R	40815	29,27%	7573	29,13%	0,14
d)	naprężenia ścinające wywołane wysokim ciśnieniem krwi	58160	41,71%	10520	40,47%	1,24
g)	niezależne od osmotyczności wiązanie Na ⁺ w obrębie tkanki śródmiąższowej	133447	95,69%	23863	91,79%	3,90
g)	aktywacja układu immunologicznego w tkance śródmiąższowej pod wpływem lokalnej hipertonii	40815	29,27%	7573	29,13%	0,14
g)	synteza TonEBP pod wpływem lokalnej hipertonii	40815	29,27%	7573	29,13%	0,14
b)	zwiększenie ilości AT1R w komórkach mięśni gładkich naczyń	53444	38,32%	11962	46,01%	-7,69
b)	źródło AT1R	31067	22,28%	7136	27,45%	-5,17
b)	synteza angiotensynogenu przez wątrobę	69645	49,94%	12989	49,96%	-0,02
b)	wiązanie angiotensynogenu i reniny	139409	99,97%	25978	99,93%	0,04
b)	wiązanie angiotensyny I i ACE	139230	99,84%	25902	99,63%	0,21
b)	synteza ACE przez śródbłonek naczyniowy w płucach i nerkach	139401	99,96%	25970	99,90%	0,07
b)	obniżona perfuzja nerkowa i obniżone obciążenie sodem w dystalnym kanalikule krętym	59507	42,67%	11100	42,70%	-0,02
b)	aktywacja baroreceptorów	59507	42,67%	11100	42,70%	-0,02
b)	regulacja w dół ACE	55806	40,02%	15432	59,36%	-19,34
b)	stymulacja współczulna pod wpływem stresu	20419	14,64%	3794	14,59%	0,05
b)	ekspresja AT2R	131074	93,99%	23034	88,60%	5,39
b)	konwersja angiotensyny II	45995	32,98%	8372	32,20%	0,78
b)	konwersja angiotensyny I	8681	6,23%	1364	5,25%	0,98
b)	wiązanie Ang-(1-7) do receptora Mas indukuje wazodylację działanie przeciwzkrzepowe i antyarytmogenne	37380	26,81%	7052	27,13%	-0,32
b)	synteza ACE2	125129	89,73%	11675	44,91%	44,82
b)	konwersja	8657	6,21%	1348	5,19%	1,02
b)	zmniejszenie ilości AT1R	20676	14,83%	3168	12,19%	2,64
b)	działanie ANG-(1-9)	24	0,02%	16	0,06%	-0,04

Moduł	Procesy elementarne	Ważność tranzycji dla modelu pełnego – z infekcją SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji dla modelu zredukowanego – bez infekcji SARS-CoV-2 (25997 t-inw.)		Różnica w p.p.
		tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]	
b)	ekspresja Mas	37380	26,81%	7052	27,13%	-0,32
b)	zwiększone stężenie PGI2 przez ANG-(1-7) i AT2R	42	0,03%	28	0,11%	-0,08
b)	stymulacja wydzielania aldosteronu	28968	20,77%	5568	21,42%	-0,64
b)	zwiększone stężenie aldosteronu we krwi i zwiększona objętość płynu pozakomórkowego	28968	20,77%	5568	21,42%	-0,64
b)	proteolityczny rozpad ACE2	12021	8,62%	2723	10,47%	-1,85
b)	regulacja w górę ⁷ AT1R	73060	52,39%	13202	50,78%	1,61
b)	wzmocniona produkcja angiotensynogenu	69764	50,03%	12989	49,96%	0,06

* Jako znaczące różnice przyjęto: dodatnie różnice ≥ 5 p.p., natomiast ujemne różnice ≤ -5 p.p.

TABELA 4.22: Zestawienie najważniejszych różnic uzyskanych z porównawczej analizy ważności pomiędzy modelem pełnym z modulem SARS-CoV-2 (139451 t-inw.) i modelem zredukowanym bez wirusa (25997 t-inw.) (patrz [65])^{*}.

Moduł	Procesy elementarne	Ważność tranzycji dla modelu pełnego – z infekcją SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji dla modelu zredukowanego – bez infekcji SARS-CoV-2 (25997 t-inw.)		Różnica w p.p.
		tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]	
b)	synteza ACE2	125129	89,73%	11675	44,91%	44,82
c)	wzmocnienie działania TNF- α	91981	65,96%	14220	54,70%	11,26
c)	aktywacja układu immunologicznego poprzez zapalenie bakteryjne	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	aktywacja i proliferacja limfocytów T poprzez AT1R	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	indukcja Th17	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	wiązanie TNF- α i TNFR1	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	ekspresja TNFR1	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	wiązanie neoantygenów z APC	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	zwiększenie ciśnienia krwi	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
c)	migracja limfocytów	131032	93,96%	23006	88,49%	5,47
b)	ekspresja AT2R	131074	93,99%	23034	88,60%	5,39
b)	źródło AT1R	31067	22,28%	7136	27,45%	-5,17
c)	śródbłonkowa stymulacja ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1	18972	13,60%	4966	19,10%	-5,50
c)	migracja limfocytów Th do naczyń krwionośnych	19180	13,75%	5070	19,50%	-5,75
c)	wpływ osi TNF-TNFR na RANTES	19180	13,75%	5070	19,50%	-5,75
b)	zwiększenie ilości AT1R w komórkach mięśni gładkich naczyń	53444	38,32%	11962	46,01%	-7,69

Moduł	Procesy elementarne	Ważność tranzycji dla modelu pełnego – z infekcją SARS-CoV-2 (139451 t-inw.)		Ważność tranzycji dla modelu zredukowanego – bez infekcji SARS-CoV-2 (25997 t-inw.)		Różnica w p.p.
		tranz./t-inw.	[%]	tranz./t-inw.	[%]	
b)	regulacja w dół ACE	55806	40,02%	15432	59,36%	-19,34
c)	przewlekły proces zapalny	86157	61,78%	25870	99,51%	-37,73
c)	źródło limfocytów	65516	46,98%	23006	88,49%	-41,51

* Jako znaczące różnice przyjęto: dodatnie różnice ≥ 5 p.p., natomiast ujemne różnice ≤ -5 p.p.

Wyniki powyższych analiz pozwalają na identyfikację procesów elementarnych, które są ważniejsze dla modelu z SARS-CoV-2, a które z nich są ważniejsze w modelu bez wirusa. Innymi słowy, znaczenie pewnych procesów elementarnych może wzrosnąć lub zmaleć w obecności wirusa. Przypomnieć należy, że moduł wirusowy zawarty jest tylko w *modelu pełnym* i nie występuje w *modelu zredukowanym*, dlatego dla tranzycji należących do modułu wirusowego nie można wykonać porównania ważności. Porównawcza analiza ważności ma więc zastosowanie w sytuacji, gdy dany moduł występuje w obu modelach (*pełnym* i *zredukowanym*). Jak się okazuje, znaczące różnice ważności zidentyfikowano tylko w przypadku dwóch modułów, tj. modułu zapalenia i aktywacji limfocytów oraz modułu RAA.

Dokładną analizę ważności oraz różnic w ważnościach przeanalizowano dla modułu infekcji SARS-CoV-2, modułu zapalenia i aktywacji limfocytów oraz modułu RAA.

1. Moduł infekcji SARS-CoV-2 i powiązanych podprocesów

Analiza ważności dla modułu wirusowego (Tabela 4.21) wykazała, że tranzycje z tego modułu mają największe znaczenie w *modelu pełnym*. Można powiedzieć, że moduł wirusowy ma dla badanego systemu duże znaczenie. Jeśli jednak rozważy się każdą pojedynczą tranzycję (poszczególne procesy elementarne), a nie cały moduł, to zauważy się, że niektóre procesy elementarne są mniej lub bardziej ważne. W tym miejscu należy przypomnieć, że analiza ważności jest analizą na poziomie tranzycji, które są składowymi modułów biologicznych, a więc istotność modułu jest ściśle związana z ważnością wszystkich tranzycji do niego należących.

Najważniejsze procesy elementarne z modułu wirusowego dotyczą wnikania wirusa i infekcji wirusowej. Oprócz tych procesów istnieją nieco mniej istotne, ale nadal ważne procesy elementarne, które dodatkowo pobudzane są obecnością SARS-CoV-2, mowa o: wzmożonej stymulacji IFN- γ (centralnego mediatora przeciwwirusowego), wzmożonej stymulacji IL-1 β i IL-6. Wśród wymienionych procesów interesujące jest to, że stymulacja IFN- γ jest najbardziej znacząca (ważność = 46,92%), w następnej kolejności jest ważność procesu związanego ze stymulacją IL-6 (24,07%), a na samym końcu ważność procesu związanego ze stymulacją IL-1 β (6,81%).

Ponadto, przeanalizowano także elementarny proces związany z inną kluczową cytokiną, jaką jest TNF- α . TNF- α występuje w modelu jako składnik modułu zapalnego i aktywacji limfocytów (patrz moduł c) w Tabeli 4.21). Ważność TNF- α jest wyższa w modelu z wirusem SARS-CoV-2 w porównaniu z modelem bez wirusa i jest wyższa o 11,26 p.p. Dodatkowa stymulacja cytokin w modelu z wirusem SARS-CoV-2 jest bezpośrednio związana z burzą cytokin. Burza cytokinowa jest natomiast efektem nadprodukcji cytokin zapalnych o szerokim zakresie aktywności biologicznej z różnych tkanek i komórek. Cytokiny te aktywują zwrótnie

również inne komórki układu odpornościowego prowadząc do ich dalszej rekrutacji do miejsc zapalenia [276].

2. Moduł zapalenia i aktywacji limfocytów

Większość procesów elementarnych z modułu zapalenia i aktywacji limfocytów charakteryzuje się znaczącymi różnicami, zarówno dodatnimi, jak i ujemnymi. W związku z tym dokładną analizę różnic przeprowadzono zgodnie z tym podziałem.

a. **Znaczące różnice dodatnie** (ważność tranzycji jest większa w modelu z wirusem SARS-CoV-2), znaleziono dla następujących procesów elementarnych:

- i. Wzmocnienie działania $\text{TNF-}\alpha$ (11,26 p.p. – patrz Tabela 4.21), wiązanie $\text{TNF-}\alpha$ i TNFR1 (5,47 p.p.) oraz ekspresja TNFR1 (5,47 p.p.) – $\text{TNF-}\alpha$ jest jedną z cytokin biorących udział w burzy cytokin, zatem wzrost ważności tych tranzycji w modelu z wirusem jest oczekiwany.
- ii. Aktywacja układu immunologicznego poprzez zapalenie bakteryjne (5,47 p.p.) i wiązanie neoantygenów z APC (5,47 p.p.) – wzrost ważności tych procesów elementarnych w modelu z wirusem nie jest całkowicie intuicyjny. Jednakże, gdy wirus dostanie się do komórek gospodarza, stymulowany jest układ odpornościowy, prowadząc do nasilenia wywołanego przez bakterie przewlekłego zapalenia, które jest obecne jeszcze przed infekcją SARS-CoV-2. Aktywacja odpowiedzi immunologicznej jest ściśle regulowanym, skoordynowanym mechanizmem, którego celem jest kontrola i eliminacja patogenów. Ustalenie właściwej równowagi stanu zapalnego jest kluczowe, ponieważ przewlekłe procesy zapalne prowadzą do różnych patologii. Patogeny bakteryjne mogą wywoływać przewlekłe stany zapalne poprzez różnorodne wyewoluowane strategie unikania, które zakłócają regulację odporności [14]. Pojawienie się SARS-CoV-2 dodatkowo zaburza ten układ i jest najprawdopodobniej przyczyną nasilenia procesów zapalnych pochodzenia bakteryjnego.
- iii. Aktywacja i proliferacja limfocytów T poprzez AT1R (5,47 p.p.), indukcja Th17 (5,47 p.p.) oraz migracja limfocytów (5,47 p.p.) – odpowiedź układu odpornościowego jest pierwszą linią obrony występującą podczas infekcji wirusowej. Wzrost ważności tych tranzycji w modelu z wirusem jest oczekiwany.
- iv. Zwiększenie ciśnienia krwi (5,47 p.p.) – ten proces elementarny ma większe znaczenie (rośnie jego ważność) w modelu z wirusem. Wydaje się, że może być to uzasadnione, gdyż infekcja SARS-CoV-2 może obniżać ilość ACE2, prowadząc do zmniejszenia aktywności ACE2 w zainfekowanych narządach. Obniżenie ilości ACE2 w odpowiedzi na wiązanie SARS-CoV2 może służyć jako mechanizm przeciwdziałania infekcji wirusowej kosztem zwiększenia ilości angiotensyny II. Obecność wirusa indukuje „regulację w dół” ACE2, a tym samym przyczynia się do wzrostu ciśnienia krwi. Należy zauważyć, że model odpowiada pacjentowi, który oprócz infekcji wirusa SARS-CoV-2 cierpi dodatkowo na zaburzenia towarzyszące, takie jak nadciśnienie pierwotne i PChN.

Niewątpliwie uwagę zwraca fakt, że niemal wszystkie wymienione powyżej procesy elementarne charakteryzują się taką samą dodatnią różnicą ważności w wysokości 5,47 punktów procentowych. Wszystkie te procesy występują w dokładnie takiej samej liczbie wsparć t-niezmienników – 131032 (patrz Tabela 4.21). Co więcej, tranzycje odpowiadające tym procesom elementarnym należą do tego samego zbioru MCT – m_1 . Wyjątkiem jest elementarny proces dotyczący wzmocnienia działania $\text{TNF-}\alpha$, który występuje w mniejszej

liczbie wsparć t-niezmienników – 91981, a pomimo tego wykazuje większą dodatnią różnicę niż inne procesy elementarne z tego samego modułu. Można to wytłumaczyć faktem, że proces ten jest bezpośrednio związany z cytokiną $IFN\gamma$, która jest dodatkowo stymulowana przez moduł SARS-CoV-2, natomiast pozostałe wymienione procesy elementarne nie są bezpośrednio stymulowane przez ten moduł.

b. **Znaczące różnice ujemne** (ważność tranzycji jest mniejsza w modelu z wirusem SARS-CoV-2), znaleziono dla następujących procesów elementarnych:

- i. Źródło limfocytów ($-41,51$ p.p.) – źródło limfocytów w ogólności aktywuje odpowiedź immunologiczną, która nie jest wyłącznie zależna od obecności wirusa SARS-CoV-2. To tranzycja odpowiada dodatkowemu napływowi limfocytów i może być traktowana jako dodatkowe źródło limfocytów, które mogą być aktywowane niezależnie od obecności SARS-CoV-2. Stąd zgodnie z oczekiwaniami ważność tej tranzycji jest zdecydowanie mniejsza w modelu z wirusem.
- ii. Przewlekły proces zapalny ($-37,73$ p.p.) – ujemna różnica charakteryzująca ten proces elementarny wydaje się być sprzeczna z intuicją, gdyż oznacza to, że ten proces jest mniej istotny w modelu z wirusem SARS-CoV-2. Co więcej, wydaje się to nieuzasadnione, gdyż wykazano dodatnią różnicę (oznaczającą większe znaczenie w modelu z wirusem) dla elementarnego procesu odpowiadającego wzmocnieniu $TNF-\alpha$, a jak wiadomo, przewlekły proces zapalny stymuluje tę cytokinę. Należy jednak zauważyć, że modelowany system znajduje się w stanie przewlekłego stanu zapalnego jeszcze przed pojawieniem się wirusa. W modelu bez wirusa proces zapalny leżący u podłoża nadciśnienia jest jednym z kluczowych czynników w utrzymaniu nadciśnienia pierwotnego, dlatego jego ważność jest bardzo wysoka (99,51%). Z drugiej strony, wnikanie wirusa do komórek pacjenta z uporczywym nadciśnieniem pierwotnym, które jest podtrzymywane przez przewlekły proces zapalny, może spowodować, że ten proces zapalny, choć jest ważny, straci na znaczeniu.
- iii. Migracja limfocytów Th do naczyń krwionośnych ($-5,75$ p.p.), wpływ osi $TNF-TNFR$ na RANTES (RANTES należą do cytokin aktywujących limfocyty T) ($-5,75$ p.p.), śródbłonkowa stymulacja ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 (elementarny proces odpowiedzialny za stymulację limfocytów T) ($-5,50$ p.p.) – te procesy elementarne są ważnymi składnikami odpowiedzi układu odpornościowego i dlatego wydaje się, że powinno zaobserwować się dodatnie różnice, a nie ujemne, które oznaczają, że ich ważność jest mniejsza w modelu z SARS-CoV-2. Może to być związane z faktem, że u pacjentów z ciężkim przypadkiem COVID-19 obserwuje się zmniejszenie liczby limfocytów [47].

Można zauważyć, że im większa różnica ujemna, tym bardziej dany proces elementarny jest niezależny od modułu wirusowego. Procesy elementarne, jakimi są „źródło limfocytów” oraz „przewlekły proces zapalny”, mogą zachodzić oraz mogą być ważne w modelu bez obecności SARS-CoV-2. Co więcej, należy mieć na uwadze, że w proponowanym modelu współwystępują różne jednostki chorobowe, przy których proces zapalny jest stale utrzymywany.

3. Moduł RAA

Większość procesów elementarnych z modułu RAA w odróżnieniu od modułu zapalenia i aktywacji limfocytów nie wyróżnia się znaczącymi różnicami ważności. Można zatem przy-

puszczać, że reakcje te zachodzą z taką samą intensywnością niezależnie od obecności wirusa. Niemniej jednak należy zauważyć kilka ważnych różnic.

a. **Znaczące różnice dodatnie** (ważność tranzycji jest większa w modelu z wirusem SARS-CoV-2), znaleziono dla następujących procesów elementarnych:

- i. Synteza ACE2 (44,82 p.p. – patrz Tabela 4.21) – ACE2 odgrywa rolę funkcjonalnego receptora gospodarza dla SARS-CoV-2. Zatem, zwiększona ekspresja ACE2 może prowadzić do zwiększonej podatności na wnikanie SARS-CoV-2 do komórek gospodarza. Wzrost ważności tej tranzycji w modelu z wirusem jest oczekiwany.
- ii. Ekspresja AT2R (5,39 p.p.) – AT2R jest receptorem przeciwzapalnym i pojawia się w odpowiedzi na obecność infekcji wirusowej. Wzrost ważności tej tranzycji w modelu z wirusem jest oczekiwany.

b. **Znaczące różnice ujemne** (ważność tranzycji jest mniejsza w modelu z wirusem SARS-CoV-2), znaleziono dla następujących procesów elementarnych:

- i. „Regulacja w dół” ACE (–19,34 p.p.) – obniżenie ilości ACE2 (regulacji w dół) jest spowodowana obecnością wirusa SARS-CoV-2. W związku z tym zaburzona jest równowaga między ACE i ACE2, prowadząc tym samym do wzrostu ilości ACE. Spadek ważności tej tranzycji w modelu z wirusem (wzrost ważności tej tranzycji w modelu bez wirusa) jest oczekiwany.
- ii. Zwiększenie ilości AT1R w komórkach mięśni gładkich naczyń (–7,69 p.p.) i źródło AT1R (–5,17 p.p.) – wydaje się, że AT1R, jako receptor prozapalny, powinien wykazywać większe znaczenie (ważność) w modelu z SARS-CoV-2, ale wynik jest odwrotny. Symulacja knockout AT1R (patrz ostatnia analiza opisana w niniejszym paragrafie 4.5.3) wykazała, że przyjmowanie ARB (leku hipotensyjnego) nie prowadzi do obniżenia ciśnienia krwi, co prowadzi do założenia, że ten lek hipotensyjny nie działa prawidłowo u pacjentów z COVID-19. Dotyczy to jednak tylko ARB, a nie ACEI. Działanie przeciwnadciśnieniowe antagonisty AT1 może częściowo wynikać ze zwiększonego metabolizmu Ang II przez ACE2. Jeśli więc dochodzi do infekcji SARS-CoV-2, dostępność ACE2 spada. Stąd nie dochodzi do wzmożonego metabolizmu Ang II, co z kolei powoduje wzrost stężenia Ang II, a nawet może spowodować wzrost ciśnienia krwi.

Symulacja knockout

Poza analizami strukturalnymi przeprowadzono także symulacyjną analizę knockout chcąc rozważyć wpływ leków hipotensyjnych na rozwój infekcji wirusowej. W związku z tym przeprowadzono trzy różne symulacje knockout skupiające się na module RAA. Dokładniej, wykorzystując model przede wszystkim opisujący hipotetycznego pacjenta cierpiącego na nadciśnienie samoistne i infekcję wirusa SARS-CoV-2, zasymulowano trzy warianty leczenia wybranymi lekami hipotensyjnymi:

1. Symulacja leczenia poprzez przyjmowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI).

Symulacja, w której hipotetyczny pacjent z nadciśnieniem pierwotnym i PChN był leczony ACEI. Knockout symulacyjny dotyczył procesów elementarnych związanych z ACE, którymi są: synteza ACE przez śródbłonek naczyń w płucach i nerkach (t_{46} – Tabela 4.18) oraz „regulacja w dół” ACE (t_{51}). W wyniku symulacji knockout tych tranzycji wykluczono wszystkie podprocesy bezpośrednio związane z ACE i angiotensyną II.

Następnie oceniono czy blokowanie ACE obniża ciśnienie krwi. W związku z tym przeanalizowano średnią liczbę uruchomień tranzycji ($AvgF_T$), których odpowiadające procesy elementarne związane są ze wzrostem ciśnienia tętniczego. Przy symulacji knockout można porównać $AvgF_T$ dla zbioru po wykonaniu symulacji knockout i dla zbioru przed wykonaniem symulacji knockout (zwanego także zbiorem referencyjnym), a więc sytuacja, w której pacjent z nadciśnieniem pierwotnym nie otrzymuje leków na nadciśnienie). Analiza średniej liczby uruchomień tranzycji związanych ze wzrostem ciśnienia tętniczego wykazała oczekiwany spadek częstości uruchomienia tranzycji, co odpowiada obniżeniu ciśnienia krwi przy zastosowaniu leczenia przez ACEI.

Na zasadzie jak powyżej, rozważano czy ACEI stosowane w leczeniu nadciśnienia mogą zwiększać ekspresję ACE2, a tym samym przyczynić się do nasilenia rozwoju infekcji wirusowej poprzez umożliwienie SARS-CoV-2 bardziej intensywnego wnikania do wrażliwych komórek. Jednakże, w tym przypadku nie zaobserwowano zmian w średniej liczbie uruchomień tranzycji związanych z syntezą ACE2 i wiązaniem białka S z ACE2. Można zatem stwierdzić, iż symulacja ta wykazała, że stosowanie ACEI nie zwiększa rozwoju infekcji SARS-CoV-2 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i współistniejącą PChN. Zatem, ACEI mogą być stosowane w COVID-19 bez znaczącego ryzyka.

2. Symulacja leczenia poprzez przyjmowanie blokerów receptora angiotensyny (ARB/sartanów).

Symulacja, w której hipotetyczny pacjent z nadciśnieniem pierwotnym i PChN był leczony ARB/sartanami. Knockout symulacyjny dotyczył procesów elementarnych związanych z AT1R, którymi są: zwiększenie ilości AT1R w komórkach mięśni gładkich naczyń (t_6 – Tabela 4.18), źródło AT1R (t_7), zmniejszenie ilości AT1R (t_{66}) i „regulacja w górę” AT1R (t_{81}). W wyniku symulacji knockout tych tranzycji wykluczono wszystkie podprocesy bezpośrednio związane z At1R.

Podobnie jak w przypadku pierwszej symulacji knockout, oceniono czy blokowanie AT1R obniża ciśnienie krwi. W związku z tym przeanalizowano średnią liczbę uruchomień tranzycji ($AvgF_T$) po symulacji knockout oraz przed symulacją knockout, czyli sytuacją, w której pacjent z nadciśnieniem pierwotnym nie otrzymuje leków na nadciśnienie. Analiza tranzycji związanych ze wzrostem ciśnienia tętniczego nie wykazała oczekiwanego spadku, co więcej, wykazała wzrost $AvgF_T$, co oznacza wzrost ciśnienia tętniczego pomimo przyjmowania leków hipotensyjnych. Wydaje się zatem, że w przypadku infekcji SARS-CoV-2 u pacjentów ze współistniejącymi chorobami, takimi jak samoistne nadciśnienie tętnicze i PChN, należy rozważyć, o ile to możliwe, nie przepisywanie antagonistów AT1R do leczenia nadciśnienia tętniczego. Na podstawie przeprowadzonych analiz wydaje się, że leki te mogą nie być wystarczająco skuteczne.

Obok analizy skuteczności leczenia nadciśnienia przez ARB rozważano czy ARB mogą zwiększać ekspresję ACE2, a tym samym przyczynić się do nasilenia rozwoju infekcji SARS-CoV-2. Wyniki są podobne jak w przypadku symulacji pierwszej – nie zaobserwowano zmian w średniej liczbie uruchomień tranzycji związanych z syntezą ACE2 i wiązaniem białka S z ACE2. Można zatem stwierdzić, że stosowanie ARB nie zwiększa rozwoju infekcji SARS-CoV-2 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i współistniejącą PChN. Należy mieć jednak na uwadze, że skuteczność działania tych leków może nie być wystarczająca do prawidłowego obniżenia ciśnienia krwi.

3. Symulacja leczenia poprzez jednoczesne przyjmowanie ACEI i ARB.

Symulacja, w której hipotetyczny pacjent z nadciśnieniem pierwotnym i PChN był jednocześnie leczony ACEI i ARB. Knockout symulacyjny dotyczył procesów elementarnych związanych z ACE i AT1R, którymi są: zwiększenie ilości AT1R w komórkach mięśni gładkich naczyń (t_6 – Tabela 4.18), źródło AT1R (t_7), synteza ACE przez śródbłonek naczyń w płucach i nerkach (t_{46}), „regulacja w dół” ACE (t_{51}), zmniejszenie ilości AT1R (t_{66}) i „regulacja w górę” AT1R (t_{81}). Tranzycje wyłączone na potrzebę przeprowadzenia trzeciej symulacji tworzą zbiór tranzycji z symulacji pierwszej i drugiej. Oznacza to, że w wyniku symulacji knockout, wykluczone zostają dokładnie te same procesy co w poprzednich symulacjach. Innymi słowy, wyłączone zostają procesy będące sumą procesów elementarnych wykluczonych podczas symulacji pierwszej i drugiej i odpowiadają one podprocesom bezpośrednio związanym z ACE i AT1R.

Następnie oceniono czy jednoczesne blokowanie ACE i AT1R obniża ciśnienie krwi. W wyniku porównania średniej liczby uruchomień tranzycji przed i po symulacji knockout zaobserwowano nieznaczny jej spadek, a więc nieznaczne obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Należy jednak zauważyć, że zarówno ACE, jak i AT1R zostały zablokowane jednocześnie, więc obserwowane jest pewne uśrednienie opisanych wcześniej efektów. Dokładniej, zaobserwowano nieznaczny spadek ciśnienia krwi, co jest korzystniejsze dla hipotetycznego pacjenta w porównaniu z wynikami drugiej symulacji (gdzie zastosowanie ARB nie spowodowało spadku ciśnienia krwi, a może nawet spowodować niewielki jego wzrost). Należy zauważyć, że wspomniane obniżenie ciśnienia tętniczego krwi jest jednak zdecydowanie mniej znaczące lub wręcz nieznaczne w porównaniu ze stosowaniem ACEI. Dlatego wydaje się, że jednoczesne stosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny i blokerów receptora angiotensyny może nie działać zgodnie z oczekiwaniami, gdyż nie obniżają one znacząco ciśnienia krwi u pacjentów z infekcją wirusa SARS-CoV-2.

Dopełnieniem tej analizy była ocena czy jednoczesne stosowanie ACEI i ARB może zwiększyć ekspresję ACE2, a tym samym przyczynić się do nasilenia rozwoju infekcji wirusa SARS-CoV-2. Podobnie jak we wcześniejszych symulacjach, tak i w tym przypadku nie zaobserwowano zmiany średniej liczby uruchomień dla tranzycji związanych z syntezą ACE2 oraz wiązaniem białka S i ACE2. Wyniki te sugerują, że jednoczesne stosowanie ACEI i ARB nie przyczynia się do zwiększenia rozwoju infekcji SARS-CoV-2.

4.5.4 Konkluzje

Nadciśnienie samoistne jest nieodłącznym elementem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, a zaawansowana przewlekła choroba nerek wiąże się ze zwiększonym ryzykiem ciężkiego przebiegu COVID-19, w związku z tym optymalne leczenie czy też kontrola nadciśnienia może przyczynić się do lepszego rokowania przy infekcji wirusem SARS-CoV-2. Z tego względu należało dobrze zrozumieć badany model, ale także skoncentrować się na związku między przyjmowaniem leków na samoistne nadciśnienie a stymulowaniem rozwoju infekcji SARS-CoV-2.

Badania nad tym systemem pozwoliły odkryć, że przyjmowanie leków hipotensyjnych, takich jak inhibitory konwertazy angiotensyny lub blokery receptora angiotensyny, nie nasilają rozwoju infekcji wirusem SARS-CoV-2. Jednakże, wykazano spadek skuteczności działania jednego z symulowanych leków hipotensyjnych przy obecności wirusa SARS-CoV-2. Dokładniej, potwierdzono skuteczność leczenia nadciśnienia tętniczego u pacjentów przyjmujących ACEI, natomiast nie potwierdzono tej skuteczności w przypadku pacjentów przyjmujących ARB, ponadto zaobserwowano, że ta grupa leków może nawet mieć nieco odwrotny skutek. Do tego przeprowadzono ocenę jedno-

czesnego stosowanie ARB oraz ACEI i, jak można się było spodziewać, wynik jest uśrednieniem przyjmowania obu leków, więc prowadzi do nieznacznego obniżenia ciśnienia krwi.

Oprócz wyników uzyskanych z badania związku między przyjmowaniem leków hipotensyjnych a współwystępowaniem choroby COVID-19 wykonano inne analizy, skupiające się na lepszym zrozumieniu całego systemu, a więc m.in. znalezieniu elementarnych procesów o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania modelu. Zidentyfikowano, że najbardziej istotne procesy elementarne są składowymi trzech modułów: RAA, zapalenia i aktywacji limfocytów oraz infekcji SARS-CoV-2. Ponadto zdefiniowano procesy elementarne niezależne od obecności wirusa. Są to procesy należące do modułu uszkodzenia śródbłonna. Ponadto ustalono, które procesy elementarne są ważniejsze dla modelu z SARS-CoV-2, a które z nich są ważniejsze w modelu bez wirusa. Ta analiza porównawcza wykazała, że znaczące różnice zaobserwowano tylko w dwóch modułach: w module zapalenia i aktywacji limfocytów oraz w module RAA.

Obok konkluzji biologicznych jawią się także konkluzje metodologiczne. Można zauważyć, że klasyczne metody analizy, takie jak analiza t-klastrów czy bardziej dokładne, manualna analiza t-niezmienników, przestają być aplikowalne w sytuacji, gdy liczba t-niezmienników pokrywająca zaproponowany model jest niezwykle duża. W takiej sytuacji zaproponowana analiza ważności i porównawcza analiza ważności z identyfikacją znaczących różnic pozwoliła na przeprowadzenie szczegółowej strukturalnej analizy, która umożliwiła identyfikację procesów elementarnych o kluczowym znaczeniu dla wszystkich t-niezmienników oraz dla t-niezmienników wyłącznie powiązanych z modułem wirusowym, umożliwiła identyfikację procesów elementarnych niezależnych od modułu wirusowego, a przy tym pozwoliła określić, które procesy elementarne są ważniejsze dla modelu z SARS-CoV-2, a które z nich są ważniejsze w modelu bez wirusa, co daje pogląd na wpływ infekcji wirusowej na zamodelowany system. Ponadto obok analizy strukturalnej, istotne znaczenie miało zastosowanie rozszerzonej metody analizy, jaką jest symulacja knockout, która pozwoliła ocenić wpływ leków hipotensyjnych na rozwój infekcji wirusowej.

4.6 Podsumowanie i dalsze motywacje

W rozdziale 4 przedstawiono cztery modele oparte o klasyczne sieci Petriego i przeprowadzono ich analizę, tj.:

- 1) model wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podstaw rozwoju miażdżycy (właściwości: 84 miejsca, 98 tranzycji, 78 t-niezmienników, 22 zbiory MCT, 15 t-klastrów) [64],
- 2) model relacji między homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A (właściwości: 69 miejsc, 90 tranzycje, 402 t-niezmienniki, 20 zbiorów MCT, 20 t-klastrów) [100],
- 3) modele powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej [105]:
 - a) *model pełny* – zawierający podprocesy związane z oxLDL (właściwości: 40 miejsc, 64 tranzycje, 736 t-niezmienników);
 - b) *model zredukowany* – niezawierający podprocesów powiązanych z oxLDL (właściwości: 38 miejsc, 57 tranzycji, 325 t-niezmienników).
- 4) modele relacji między infekcją wirusa SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym [65]:
 - a) *model pełny* – zawierający podprocesy związane z infekcją SARS-CoV-2 (właściwości: 55 miejsc, 87 tranzycji, 139451 t-niezmienników, 10 zbiorów MCT);

- b) *model zredukowany* – niezawierający podprocesów powiązanych z infekcją SARS-CoV-2 (właściwości: 49 miejsc, 76 tranzycji, 22997 t-niezmienników).

Należy zaznaczyć, że istotą tego rozdziału było zaprezentowanie możliwości analiz rozszerzonych, w tym także propozycji własnych. Analiza złożonych systemów biologicznych może opierać się wyłącznie na podstawie rozszerzonych metod analizy, jednak często, poprzedzają je także klasyczne analizy, takie jak analiza zbiorów MCT czy analiza t-klastrów. Jednakże, zdarza się, że te analizy nie prowadzą do odkrycia ciekawych własności. Analiza t-klastrów bywa zbyt ogólna i nierzadko zawiera skupienia złożone z niemal wszystkich t-niezmienników, dlatego w tym rozdziale porównano analizę t-klastrów z bardziej dokładną, manualną analizą t-niezmienników. Niemniej jednak w wielu przypadkach to właśnie analiza klastrów wyznacza dalszy kierunek badań.

Robiąc przegląd zastosowanych w tym rozdziale metod można wyróżnić istniejące metody rozszerzone, propozycje własne dla zastosowania istniejących metod oraz zaproponowane alternatywne metody analizy. Do tej pierwszej kategorii zalicza się strukturalna analiza knockout i knockout symulacyjny (analiza średniej liczby uruchomień tranzycji). W drugiej kategorii wyróżniamy porównawczą analizę knockout i porównawczą symulację knockout. Natomiast do trzeciej kategorii zalicza się bardziej dokładna, manualna analiza t-niezmienników, analiza ważności, porównawcza analiza ważności (w tym także z interpretacją znaczących różnic dodatnich i ujemnych) oraz porównawcza analiza knockout.

Bardziej dokładna analiza t-niezmienników wraz z analizą knockout pozwoliły odkryć ciekawe własności wśród wybranych t-niezmienników, które nie były możliwe do znalezienia przez analizę t-klastrów. Jednakże analiza ta jest ograniczona przez liczbę t-niezmienników pokrywającą sieć. Stwarza to jednak motywację do zautomatyzowania tego podejścia i daje tym samym podstawę do rozważenia analizy podzbiorów tranzycji. Ta z kolei zawiera wiele ciekawych aspektów kombinatorycznych i stwarza możliwości do zaproponowania własnych metod analizy, co opisano w kolejnym rozdziale niniejszej rozprawy.

Zaproponowana analiza ważności pozwala na detekcję zarówno istotnych jak i nieistotnych tranzycji, co umożliwia skupienie się na kluczowych elementach w dalszej analizie. Wydaje się jednak, że zdecydowana siła tej analizy leży w dużej mierze w porównawczej analizie ważności, która to pozwala oszacować, jak zmienia się ważność poszczególnych elementów pod wpływem danego podprocesu. Inaczej mówiąc, pozwala określić wpływ badanego podprocesu na zachowanie się wszystkich pozostałych procesów elementarnych w analizowanym systemie. Opisane porównanie jest jednym z podejść, które nie było wcześniej stosowane, a do zastosowania w praktyce wymaga przygotowania dwóch modeli *pełnego* i *zredukowanego*, oba z zachowaniem pokrycia sieci przez t-niezmienniki. W oparciu o to podejście zaproponowano także rozszerzone zastosowanie znanej strukturalnej analizy knockout, którą nazwano porównawczą analizą knockout. Porównawcza analiza knockout jest rozszerzeniem porównawczej analizy ważności, która pozwala określić wpływ badanego podprocesu na zachowanie się wszystkich większych podprocesów/modułów (a nie pojedynczych procesów elementarnych) w analizowanym systemie.

Wszelkie uzyskane konkluzje biologiczne wynikające z opisanych wyżej analiz zostały opisane w podrozdziałach dotyczących poszczególnych modeli. Podsumowując jednak, można stwierdzić, że zastosowane metody analizy pozwalają wyciągać ciekawe wnioski, a zdecydowanie pozwalają lepiej zrozumieć podłoże badanych zjawisk. Niewątpliwie jednak w kontekście analiz jest jeszcze wiele ciekawych aspektów do rozważenia, w tym chociażby problemy podzbiorów tranzycji rozważane w kolejnym rozdziale.

Rozdział 5

Kombinatoryczne aspekty analizy t-niezmienników – rozwiązania wybranych problemów

5.1 Wprowadzenie

Wielokrotnie wspomniano w tej pracy, iż modele oparte o formalizm klasycznych sieci Petriego mogą być analizowane na poziomie strukturalnym oraz symulacyjnym. Te pierwsze, analizy strukturalne, opierają się w istocie o t-niezmienniki, które odpowiadają pewnym podprocesom biologicznym wchodzącym w skład badanego systemu. Nadmienić trzeba, że podprocesy odpowiadające t-niezmiennikom nie zmieniają stanu modelowanego systemu, a więc są dla jego funkcjonowania niezwykle ważne (patrz formalna definicja 2.2.10). Istniejące metody analizy t-niezmienników wydają się być jednak niewystarczające do przeprowadzenia głębokich analiz i wyekstrahowania tego, co kryją w sobie podzbiory t-niezmienników lub cały ich zbiór. Poprzednie rozdziały uwypukliły, że odkrywanie zależności między t-niezmiennikami wiąże się z potrzebą poszukiwania i wyznaczenia pewnych podzbiorów tranzycji, które odpowiadają pewnym zbiorom procesów elementarnych biorących udział w interakcjach pomiędzy podprocesami wyższego rzędu.

Podrozdział 5.2 zawiera rozważania wybranych problemów poszukiwania pewnych podzbiorów tranzycji należących do kategorii problemów występowania oraz zaproponowane rozwiązania, które stały się podstawą metodologiczną dla analizy występowania dla klasycznych sieci Petriego. Pierwsze efekty tych badań pojawiły się w artykule konferencyjnym [101], w ramach którego autor zaproponował algorytm przybliżony. Dalsze badania dotyczą zaprojektowania *analizy występowania* opartej na dokładnym algorytmie z różnymi ograniczeniami, który nadaje się do analizowania modeli złożonych systemów biologicznych opartych o sieci Petriego. W ramach tych badań autor zaproponował algorytm dokładny, umożliwiającą przeprowadzenie analizy występowania oraz dokonał wspomnianej analizy występowania na wybranym przykładzie klasycznej sieci Petriego i zinterpretował wyniki. Efekty tej pracy zgłoszono do publikacji [103].

Podrozdział 5.3 zawiera rozważania wybranych problemów poszukiwania pewnych podzbiorów tranzycji należących do kategorii problemów anty-występowania. Przedstawiono dokładne sformułowania wybranych problemów, ich złożoność oraz propozycję rozwiązania wraz z oceną działania dla jednego wybranego problemu. W rozprawie rozważane są modele oparte o klasyczne sieci Petriego, jednakże zaproponowany algorytm może być z powodzeniem zastosowany do innych typów sieci Petriego – dla tych, dla których możliwe jest obliczanie t-niezmienników. Rezultaty opisane w tym podrozdziale zostały opublikowane w pracy [102]. W ramach tych badań autor zajmował się

opracowaniem złożoności jednego problemu, opracowaniem jego rozwiązania dokładnego, a także oceną działania zaproponowanego algorytmu.

W podrozdziale 5.4 zawarto podsumowanie ze szczególnym wyróżnieniem możliwości przedstawionych rozwiązań, a także nakreślono kierunek dalszych badań.

Celem lepszego zrozumienia kontekstu prowadzonych rozważań kombinatorycznych i zaproponowanych metod analizy, poniżej wyjaśniono, jak należy interpretować pojęcia bezpośrednio dotyczące problemów występowania i anty-występowania. Ten rozdział nie powiela jednak istniejącej wiedzy teoretycznej opisanej w podrozdziale teoretycznym 2.4.

Występujący zbiór tranzycji Poszukiwany jest pewien zbiór tranzycji T' , będący podzbiorem zbioru tranzycji T , który zawarty jest w we wsparciach t -niezmienników. Najczęściej poszukiwane są zbiory występujące (zwane także kombinacjami), które występują w odpowiednio dużej liczbie wsparć t -niezmienników. Im więcej wsparć t -niezmienników zawiera daną kombinację, tym może być ona ważniejsza dla funkcjonowania analizowanego systemu, z punktu widzenia struktury tego modelu.

Anty-występujący zbiór tranzycji Poszukiwany jest pewien zbiór tranzycji T' , będący podzbiorem zbioru tranzycji T , który nie jest zawarty we wsparciach t -niezmienników. Można wyróżnić zbiory niewystępujące w żadnym wsparciu t -niezmiennika lub zbiory niewystępujące w odpowiednio małej liczbie wsparć t -niezmienników.

5.2 Algorytm poszukiwania występujących we wsparciach t -niezmienników podzbiorów tranzycji

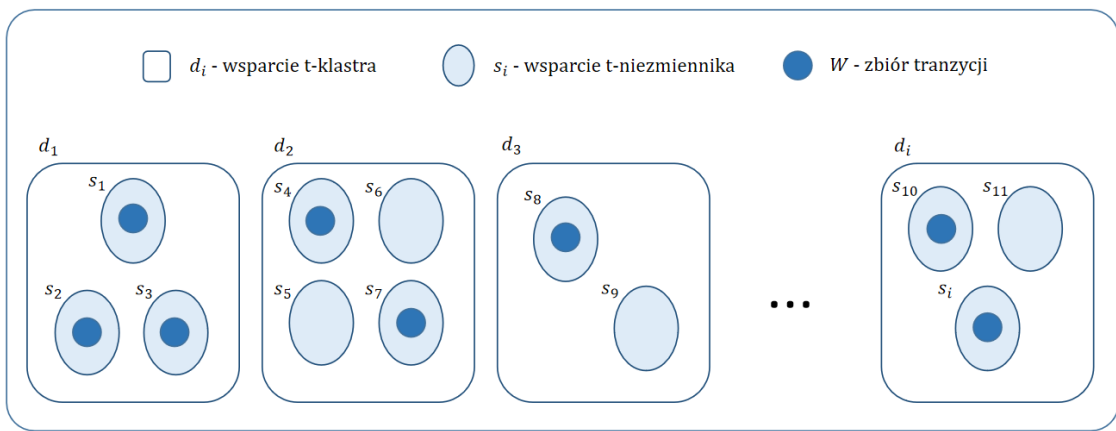
5.2.1 Kontekst badań

W niniejszej rozprawie przedstawiono różne metody analizy modeli opartych na formalizmie klasycznych sieci Petriego, jednak dla analiz biologicznych szczególnie użyteczne są metody oparte o t -niezmienniki. Wspominane wielokrotnie t -niezmienniki odpowiadają podprocesom biologicznym, które nie zmieniają stanu modelowanego systemu, są więc dla funkcjonowania systemu biologicznego bardzo ważne. Jednakże jak wykazano w poprzednich rozdziałach, analiza oparta o t -niezmienniki nie jest wystarczająco głęboka i może wymagać wyznaczenia szczególnych podzbiorów tranzycji (zbiorów procesów elementarnych). Potrzeba ta wynika z własności analiz opartych o t -niezmienniki, gdyż w ogólności opierają się one na poszukiwaniu podobieństw pomiędzy t -niezmiennikami. Podobieństwa te dotyczą zatem tranzycji powtarzających się we wsparciach t -niezmienników – im więcej t -niezmienników w zawiera taki sam zbiór tranzycji, tym bardziej ten zbiór może być istotny dla funkcjonowania analizowanego systemu. Można zatem stwierdzić, że analizowane są części wspólne wsparć t -niezmienników. Opisane zbiory tranzycji pojawiające się w wielu wsparciach t -niezmienników są niczym innym jak zbiorem procesów elementarnych, które zaangażowane są w wiele zamodelowanych podprocesów, a ich analiza może dostarczyć ważnych informacji o zachowaniu całego złożonego systemu biologicznego.

W niniejszym podrozdziale rozważane są pewne problemy występowania tranzycji we wsparciach t -niezmienników. To za ich pośrednictwem mogą na siebie oddziaływać podprocesy badanego systemu. Dla wybranych problemów przybliżone zostaną dokładne sformułowania i propozycje rozwiązania. Ponadto podrozdział ten jasno podkreśla, że przedstawione rozwiązania mogą stanowić dodatkową analizę opartą o t -niezmienniki, zwaną analizą występowania, którą z powodzeniem można zastosować do analizy modeli złożonych systemów biologicznych opartych o sieci Petriego. Analiza występowania jest dopełnieniem analizy ważności opisanej w rozdziale poprzednim.

5.2.2 Formalny opis rozważanych problemów występowania

Interesującym problemem jest poszukiwanie pewnych podzbiorów tranzycji, innymi słowy, podzbiorów procesów elementarnych o pewnej minimalnej liczności, które są zawarte w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników, a więc są zawarte w odpowiednio dużej liczbie podprocesów badanego systemu. Podprocesy te mogą oddziaływać ze sobą za pośrednictwem tych konkretnych procesów elementarnych. Ponadto, takie podzbiory mogą mieć kluczowe znaczenie dla działania całego, złożonego układu biologicznego. Opisujący problem w formie graficznej wizualizacji znajduje się na Rysunku 5.1, gdzie istnieje pewien zbiór tranzycji W (będący podzbiorem tranzycji), który jest zawarty w dostatecznie dużej liczbie wsparć t-niezmienników s_i , które z kolei są zawarte w dostatecznie dużej liczbie t-klastrów, a właściwie w dostatecznie dużej liczbie wsparć t-klastrów d_i . Wsparcie t-klastra jest więc zbiorem tranzycji zawartych we wsparciach t-niezmienników należących do tego t-klastra.



RYСУNEK 5.1: Problem występowania podzbioru tranzycji w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników będących elementami odpowiednio dużej liczby wsparć t-klastrów. Rysunek opracowany na podstawie ilustracji pochodzącej z pracy [101].

Formalna definicja tego problemu została przytoczona w rozdziale teoretycznym w podrozdziale 2.4 (wersja przeszukiwania patrz definicja 2.4.1, wersja decyzyjna patrz definicja 2.4.2), jednak dla spójności tekstu, przytoczono je także poniżej:

Definicja 5.2.1 (Występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja przeszukiwania 1 [73, 74]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$ i $R \in \mathbb{N}^+$.
- *Odpowiedź*: zbiór $W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k} \in C} W \subseteq d_{i_1}, W \subseteq d_{i_2}, \dots, W \subseteq d_{i_k}$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $k \geq K$ i $r \geq R$.

Rozwiązaniem powyższego problemu jest zbiór W zawierający nie mniej niż R tranzycji, który byłby zawarty w odpowiednio dużej, czyli nie mniejszej niż K liczbie wsparć t-klastrów. Poniżej wersja decyzyjna tego problemu.

Definicja 5.2.2 (Występowanie tranzycji w t-klastrach - wersja decyzyjna 1 [73]).

- *Instancja*: zbiór $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ tranzycji, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$, zbiór $C = \{c_1, c_2, \dots, c_q\}$ klastrów, gdzie $\forall_{c_i \in C} c_i = \{s_{i_1}, s_{i_2}, \dots, s_{i_{|c_i|}}\}$, $\forall_{i=1,2,\dots,q; j=1,2,\dots,q; i \neq j} c_i \cap c_j = \emptyset$, liczby $K \in \mathbb{N}^+$ i $R \in \mathbb{N}^+$.

- *Odpowiedź:* TAK, jeżeli $\exists W = \{w_1, w_2, \dots, w_r\} \subseteq T$ taki, że $\exists_{c_{i_1}, c_{i_2}, \dots, c_{i_k} \in C} W \subseteq d_{i_1}, W \subseteq d_{i_2}, \dots, W \subseteq d_{i_k}$, gdzie $\forall_{c_i \in C} d_i = \bigcup_{j=1}^{|c_i|} s_{i_j}$ oraz $k \geq K$ i $r \geq R$; NIE w przeciwnym przypadku.

PROBLEM WYSTĘPOWANIA TRANZYJCJI W t -KLASTRACH jest silnie **NP**-trudny. Do przeprowadzenia silnej **NP**-trudności wykorzystano PROBLEM ZRÓWNOWAŻONEGO PEŁNEGO PODGRAFU DWUDZIELNEGO, jak opisano w pracy [74]. Z uwagi na złożoność tego problemu rozważono jego przybliżone rozwiązanie i zaproponowano algorytm heurystyczny, który opisano w podrozdziale 5.2.3 niniejszego rozdziału. Rozwiązanie tego problemu jest istotne, gdyż umożliwia znalezienie kluczowych elementów modelu. Jednakże obok tego istotna wydaje się pełna ocena modeli opartych o sieci Petriego, a więc dokładne rozwiązanie, które dostarcza informacji o tym, ile istnieje podzbiorów tranzycji występujących (patrz opis w podrozdziale 5.1) oraz w ilu wsparciach t -niezmienników są one zawarte. W nawiązaniu do tego powstał algorytm dokładny umożliwiający przeprowadzenie analizy występowania, który opisano w podrozdziale 5.2.4.

5.2.3 Zaproponowane przybliżone rozwiązanie wybranego problemu występowania

Problem poszukiwania pewnego podzbioru tranzycji zawartego w odpowiednio dużej liczbie wsparć t -klastrów został rozwiązany za pomocą algorytmu przeszukiwania tabu [87], gdyż należy do klasy problemów **NP**-trudnych.

Schemat blokowy zaproponowanego rozwiązania umieszczono na Rysunku 5.2. Kluczowe etapy które się pojawiają na Rysunku 5.2 dotyczą generowania rozwiązania początkowego, przeglądu sąsiedztwa, aktualizacji najlepszego rozwiązania, warunku stopu i dywersyfikacji. Szczegółowy opis tych etapów zawarto poniżej.

- Generowanie rozwiązania początkowego:

Danymi wejściowymi dla algorytmu jest kolekcja wsparć t -niezmienników, a więc zbiorów tranzycji. Generowanie rozwiązania początkowego opiera się na zidentyfikowaniu najczęściej występujących tranzycji, a więc tranzycji występujących w największej liczbie wsparć t -niezmienników. W efekcie otrzymuje się informację ile tranzycji charakteryzuje się maksymalną liczbą wystąpień i wyznacza się wartość zmiennej r , czyli liczbę tranzycji znajdujących się w rozwiązaniu początkowym, po czym następuje sprawdzenie zgodności wsparć t -niezmienników dla zidentyfikowanych wcześniej tranzycji i wyznaczenie wartości dla zmiennej k , oznaczającej liczbę wsparć t -niezmienników, które zawierają wszystkie znalezione tranzycje o maksymalnej liczbie wystąpień. Dla lepszego zrozumienia poniżej zamieszczono przykładowe dane wejściowe i sposób wygenerowania rozwiązania początkowego.

Dane wejściowe wymiaru 5×11 :

$$s_0 = \{t_3, t_9\}$$

$$s_1 = \{t_1, t_2, t_4, t_5, t_{10}\}$$

$$s_2 = \{t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t_5, t_8, t_{10}\}$$

$$s_3 = \{t_1, t_2, t_3, t_4, t_5, t_6, t_7, t_8, t_{10}\}$$

$$s_4 = \{t_0, t_1, t_2, t_3, t_6, t_7, t_8\}$$

Powyższe dane zawierają 5 wsparć t -niezmienników i 11 tranzycji, można zauważyć, że tranzycje o maksymalnej liczbie wystąpień, a więc te występujące w największej liczbie wsparć t -niezmienników to tranzycje: t_1, t_2, t_3 . Każda z nich zawarta jest w 4 wsparciach t -niezmienników. Zgodność wsparć t -niezmienników polega na wyznaczeniu ich części wspólnej, a więc tranzycji, które są wspólne dla wszystkich analizowanych wsparć. Wsparcia t -niezmienników należące do części wspólnej oznaczono na czerwono.

$$t_1 \subseteq s_1 \wedge t_1 \subseteq s_2 \wedge t_1 \subseteq s_3 \wedge t_1 \subseteq s_4$$

$$t_2 \subseteq s_1 \wedge t_2 \subseteq s_2 \wedge t_2 \subseteq s_3 \wedge t_2 \subseteq s_4$$

$$t_3 \subseteq s_0 \wedge t_3 \subseteq s_2 \wedge t_3 \subseteq s_3 \wedge t_3 \subseteq s_4$$

Tym sposobem zidentyfikowano rozwiązanie początkowe, które zawiera 3 tranzycje (t_1, t_2, t_3), należące jednocześnie do 3 wsparć t -niezmienników (s_2, s_3, s_4), zgodnie z tym aktualne wartości zmiennych przedstawiają się następująco: $r = 3$ i $k = 3$.

- Przegląd sąsiedztwa, możliwe ruchy do wykonania i aktualizacja najlepszego rozwiązania:
Rozwiązanie początkowe jest poprawianie na podstawie sekwencji ruchów, takich jak dodawanie nowej tranzycji lub wymiany tranzycji.

Dodawanie tranzycji odbywa się zgodnie z zasadami algorytmu przeszukiwania tabu, co oznacza, że do bieżącego rozwiązania dodawana jest najlepsza tranzycja. Aby taką tranzycję znaleźć, sprawdzane są wszystkie możliwe tranzycje, które nie występują na liście tabu. Optymalna wielkość listy tabu jest wyznaczana na podstawie wzoru $n/2$, gdzie n to liczba iteracji możliwych do wykonania ruchów, podczas których algorytm nie znalazł rozwiązania spełniającego określone kryteria, a wartość zmiennej n jest równa połowie liczby tranzycji analizowanego modelu. Po dodaniu wybranej tranzycji do bieżącego rozwiązania, oceniana jest wartość r (wielkość znalezionej zbioru), oceniana jest zgodność wsparć t -niezmienników, a na jej podstawie wartość k (liczba wsparć t -niezmienników zawierających dany zbiór o wielkości r). Najlepsza tranzycja, jak sama nazwa wskazuje, to tranzycja, która najbardziej poprawia bieżące rozwiązanie. Jeśli taka tranzycja zostanie zidentyfikowana i zostanie dodana do bieżącego rozwiązania, to aktualizowane są także wartości r i k .

Wymiana tranzycji rozumiana jest jako proces dwuetapowy, czyli usunięcie tranzycji z bieżącego rozwiązania i dodanie nowej tranzycji. W związku z takim podziałem, poszukiwana jest tranzycja będąca najlepszą tranzycją do usunięcia. Określenie najlepsza tranzycja do usunięcia wiąże się ze zmienną k (z liczbą wsparć t -niezmienników zawierających poszukiwany zbiór), która może się poprawić po usunięciu jakiejś tranzycji. Przykładowo, jeśli z rozwiązania początkowego, które zawiera 3 tranzycje: t_1, t_2, t_3 , należące jednocześnie do 3

wsparć t -niezmienników: s_2, s_3, s_4 , usuniemy tranzycję t_3 , to zauważymy, że liczba wsparć t -niezmienników zawierających zaktualizowany zbiór tranzycji ($\{t_1, t_2\}$) zmieni się z 3 na 4 wsparcia t -niezmienników:

$$t_1 \subseteq s_1 \wedge t_1 \subseteq s_2 \wedge t_1 \subseteq s_3 \wedge t_1 \subseteq s_4$$

$$t_2 \subseteq s_1 \wedge t_2 \subseteq s_2 \wedge t_2 \subseteq s_3 \wedge t_2 \subseteq s_4$$

Po wyeliminowaniu najlepszej możliwej tranzycji do usunięcia, do rozwiązania dodawana jest najlepsza możliwa tranzycja do dodania. Odbywa się to zgodnie z zasadami opisanymi powyżej i podobnie jak wcześniej, po takiej procedurze, aktualizowane jest bieżące rozwiązanie i wartości r oraz k .

- Warunek stopu:

Zaproponowany algorytm nie należy do rodzaju algorytmów maksymalizujących dany parametr, lecz jest algorytmem poszukującym rozwiązania spełniającego określone kryteria stopu. Warunki stopu są następujące: jeśli wartość r najlepszego rozwiązania (wielkość poszukiwanego zbioru tranzycji) jest co najmniej taka sama jak oczekiwana wartość R oraz jeśli wartość k najlepszego rozwiązania (liczba wsparć t -niezmienników zawierających dany zbiór tranzycji) jest co najmniej taka sama jak oczekiwana wartość K , to algorytm kończy swoje działanie zwracając najlepsze rozwiązanie. Jeśli algorytm nie spełnia zadanych warunków stopu przez określoną liczbę iteracji, wtedy kończy on swoje działanie zwracając najlepsze do tej pory rozwiązanie, które nie jest rozwiązaniem oczekiwanym.

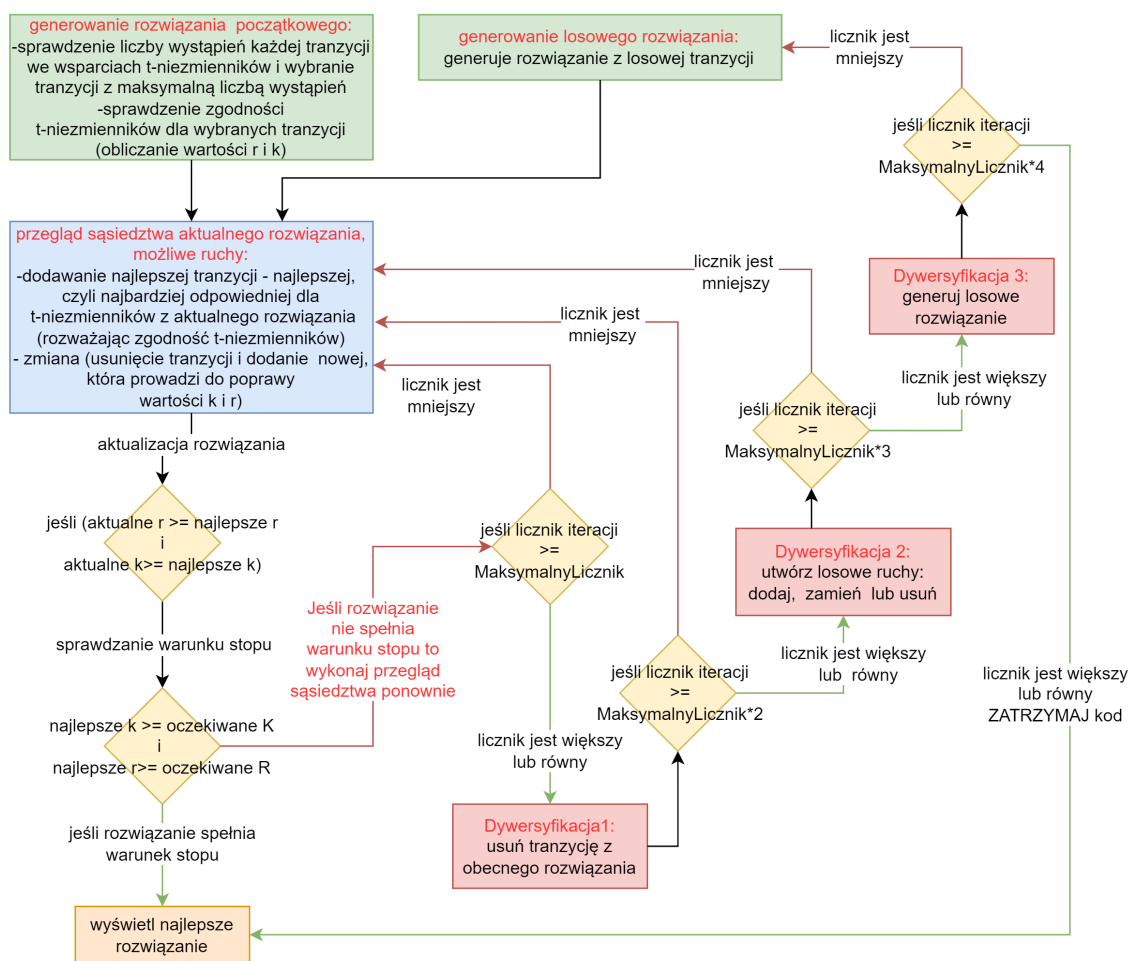
- Dywersyfikacja:

Opracowany algorytm zawiera trzy poziomy dywersyfikacji. Pierwsza z nich wykonywana jest wtedy, gdy algorytm po określonej liczbie iteracji możliwych do wykonania ruchów, nie znalazł rozwiązania spełniającego określone kryteria i polega ona na usunięciu losowej tranzycji (liczba możliwych do wykonania iteracji oznaczana jest jako n , gdzie $n = \text{liczba Tranzycji} / 2$). Podejście to zawsze prowadzi do pogorszenia rozwiązania względem wielkości poszukiwanego zbioru (zmniejszenie wartości r), ale może jednocześnie prowadzić do zwiększenia liczby wsparć t -niezmienników zawierających dany zbiór (zwiększenie wartości k). Przykład takiej sytuacji przedstawiono w punkcie przeglądu sąsiedztwa przy opisie ruchu, jakim jest usuwanie tranzycji.

Druga dywersyfikacja wykonywana jest w sytuacji, gdy algorytm po $2n$ iteracjach możliwych do wykonania ruchów nie znalazł rozwiązania spełniającego określone kryteria i polega na wykonaniu losowych ruchów: losowe dodanie, losowa wymiana, losowe usunięcie tranzycji. Te losowe ruchy są zgodne z listą tabu, a więc jeśli wylosowana tranzycja znajduje się na liście tabu to nie może zostać dodana, wymieniona lub usunięta z rozwiązania, algorytm musi wylosować tranzycję, która nie znajduje się na liście tabu.

Ostatnia, trzecia dywersyfikacja, wykonywana jest w sytuacji, gdy algorytm po $3n$ iteracjach możliwych do wykonania ruchów nie znalazł rozwiązania spełniającego określone kryteria i polega na utworzeniu całkowicie losowego rozwiązania (utworzonego z losowych tranzycji).

Zaproponowany algorytm stanowi wstęp do dalszych rozważań nad problemami występowania. Wstępne testy algorytmu opisano w pracy [101], niemniej jednak w tej materii jest jeszcze wiele dalszych motywacji, w tym zaproponowanie algorytmów maksymalizujących dany parametr lub rozważenie innych problemów występowania. Algorytm w obecnej formie można zastosować do



RYСУNEK 5.2: Schemat blokowy działania algorytmu przybliżonego. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [101].

dopełnienia analizy złożonych systemów biologicznych, ponieważ umożliwia znalezienie kluczowych zbiorów reakcji. Jedno z zastosowań do analizy złożonych systemów biologicznych zawarto w pracy [101], gdzie znaleziono istotny podzbiór reakcji dla modelu dotyczącego wpływu IL-18 na procesy zapalne leżące u podłoża miażdżycy (model opisano w podrozdziale 4.2). Innym przykładem zastosowania jest model mechanizmu odpowiedzi na uszkodzenia DNA (opisany w podrozdziale 6.3), gdzie również zidentyfikowano zbiór elementarnych procesów, kluczowych dla działania analizowanego systemu. W kontekście tych badań pojawiła się potrzeba zrozumienia, jak wiele podzbiorów występujących może się pojawiać w modelach złożonych systemów biologicznych i to ten kierunek dalszych badań obrano.

5.2.4 Zaproponowane dokładne rozwiązanie problemu – koncepcja algorytmu dla analizy występowania

Analiza występowania jest rozszerzeniem analizy ważności na wszystkie możliwe podzbiory tranzycji. Analiza ważności, formalnie i wraz zastosowaniem, została opisana w poprzednim rozdziale (formalna definicja patrz podrozdział 4.1). Analiza występowania opiera się na tej samej zasadzie co analiza ważności, jednak w jej wyniku otrzymuje się ważności dla wszystkich możliwych podprocesów (zbiorów procesów elementarnych/tranzycji). Dokładnie rzecz ujmując dla zbioru tranzycji T , liczba wszystkich możliwych podzbiorów (kombinacji) jest równa $2^{|T|} - 1$ (zbiór pusty jest w tej analizie pomijany). W tym paragrafie opisano algorytm umożliwiającą

wykonanie analizy występowania. Rozważono dokładne rozwiązanie, które zawiera kilka możliwości ograniczenia przestrzeni przeszukiwania. Danymi wejściowymi dla algorytmu jest kolekcja wsparć t-niezmienników. Użytkownik może zdecydować czy algorytm ma ocenić występowanie dla wszystkich możliwych kombinacji (podzbiorów tranzykcji) otrzymanych na podstawie całego zbioru tranzykcji T , czy wszystkich możliwych kombinacji otrzymanych dla pewnego wybranego podzbioru zbioru T , oznaczonego dalej jako T' ($T' \subseteq T$). W obu przypadkach generowane są wszystkie możliwe kombinacje z pominięciem zbioru pustego, gdyż nie jest on rozważany w analizach biologicznych. Dla przykładu przytoczone zostaną dane wejściowe o rozmiarze 3×3 , zapis ten należy rozumieć jako kolekcję zawierającą 3 wsparcia t-niezmienników oraz 3 tranzykcje w zbiorze T . Jak można zauważyć, przykład ten jest niewielkiego rozmiaru, ale należy go traktować poglądowo:

Dane wejściowe wymiaru 3×3 :

$$s_0 = \{t_1\}$$

$$s_1 = \{t_0\}$$

$$s_2 = \{t_1, t_2\}$$

Powyższy zapis można czytać następująco: wsparcie t-niezmiennika s_0 składa się z tranzykcji t_1 , wsparcie t-niezmiennika s_1 składa się z tranzykcji t_0 , itd. Modele zaproponowane w niniejszej rozprawie są modelami opartymi o klasyczne sieci Petriego i charakteryzują się pokryciem sieci przez t-niezmienniki. Oznacza to, że każda tranzykcja ze zbioru T występuje w co najmniej jednym ze wsparć t-niezmienników. W związku z tym, w przypadku analizowanych modeli nie pojawia się przypadek, w którym to pojedyncza tranzykcja ze zbioru T nie jest zawarta w żadnym ze wsparć t-niezmienników. Ponadto, nadmienić należy, że nie istnieje korelacja między liczbą pasywnych i aktywnych komponentów a liczbą t-niezmienników pokrywających modele oparte o sieci Petriego. Liczba t-niezmienników jest ściśle związana z naturą modelowanego systemu biologicznego i najczęściej mieści się w zakresie od kilkuset do kilku tysięcy. Natomiast liczba tranzykcji/reakcji często oscyluje wokół 100, liczba ta stanowi relatywnie duży zestaw procesów elementarnych.

Dane wejściowe algorytmu, a zatem kolekcja wsparć t-niezmienników może zostać posortowana lub też nie. Wyjaśnić należy, że poprzez sortowanie, rozumie się ułożenie wsparć t-niezmienników, porządkując je w kolejności od najmniejszego (zawierającego najmniej tranzykcji) do największego (zawierającego najwięcej tranzykcji). Motywacja tego działania została wyjaśniona w dalszej części. Na podstawie danych wejściowych generowane są wszystkie możliwe podzbiory tranzykcji (kombinacje) albo dla całego zbioru tranzykcji T , albo dla jego wybranego podzbioru T' . Kombinacje generowane są w kolejności leksykograficznej, a więc dla przykładowych danych o wymiarze 3×3 , wszystkie możliwości dla zbioru tranzykcji T są następujące: $\{t_0\}$, $\{t_1\}$, $\{t_2\}$, $\{t_0, t_1\}$, $\{t_0, t_2\}$, $\{t_1, t_2\}$, $\{t_0, t_1, t_2\}$.

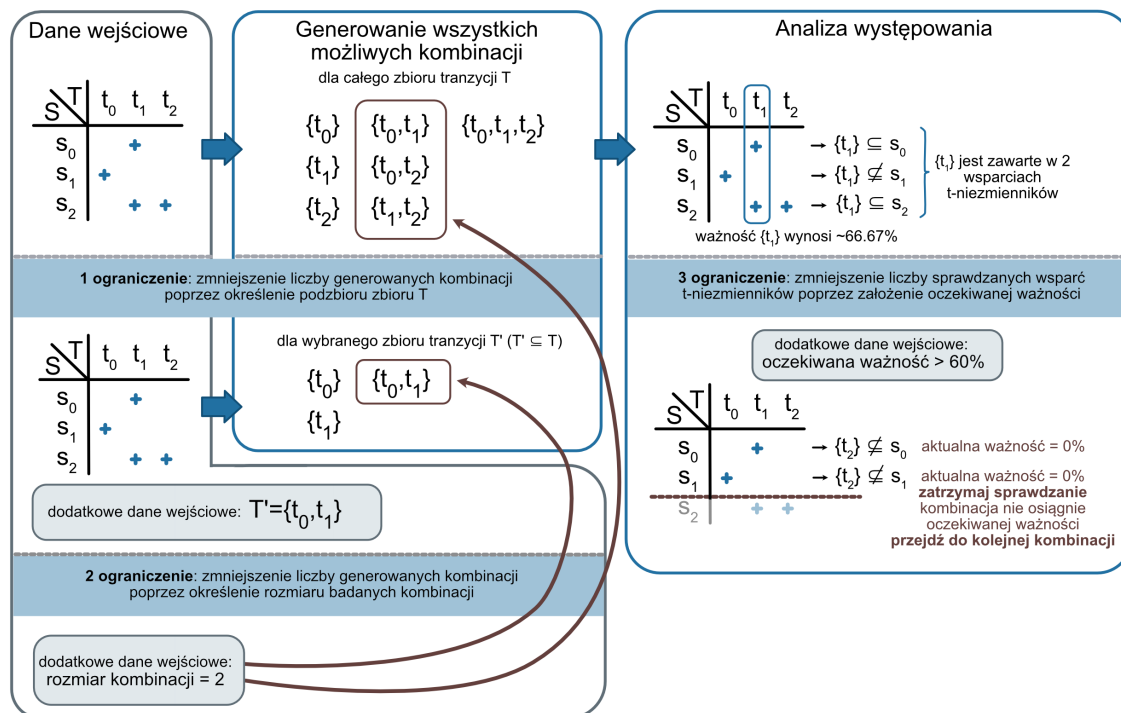
Po wygenerowaniu kombinacji każda z nich jest oceniana pod względem występowania. Oznacza to, że algorytm sprawdza, w ilu wsparciach t-niezmienników występuje dany podzbiór tranzykcji i oblicza ważność zgodnie ze wzorem obliczania ważności dla poszczególnych tranzykcji: $\frac{f}{Wt}$, gdzie f jest liczbą wsparć t-niezmienników zawierających daną tranzycję, Wt jest liczbą wsparć wszystkich t-niezmienników. Ważność jest oznaczana jako *tranz./t-inw.* lub może być oznaczona jako [%] czyli odsetek wsparć t-niezmienników, które zawierają daną tranzycję, a więc jest obliczana ze wzoru: $\frac{f \cdot 100}{Wt}$ [%] (analiza ważności została opisana w podrozdziale 4.1, patrz definicja 4.1.1). Opisany wyżej scenariusz sprawdzania ważności dla wszystkich kombinacji nie zawiera żadnych ograniczeń, a więc każda kombinacja jest sprawdzana po kolei w każdym wsparciu z kolekcji wsparć t-niezmienników. Oczywiście analiza występowania może zostać przeprowadzona w różnych wariantach ograniczających, wyróżniono 3 ograniczenia:

- Pierwsze ograniczenie: zmniejszenie liczby generowanych kombinacji poprzez określenie podzbioru zbioru T , a więc wyznaczenie elementów należących do wybranego zbioru tranzycji T' . W tym przypadku, zamiast przeprowadzenia analizy występowania dla całego zbioru tranzycji T , wykonuje się ją dla dowolnego podzbioru zbioru T (określanego jako T'), co w oczywisty sposób ogranicza liczbę generowanych i następnie ocenianych pod względem występowania kombinacji.
- Drugie ograniczenie: zmniejszenie liczby generowanych kombinacji poprzez określenie rozmiaru poszukiwanych kombinacji, a więc określenie jak duże podprocesy są obiektem zainteresowania (pamiętając, że podprocesy odpowiadają zbiorom reakcji elementarnych). Kombinacje są podzbiorami tranzycji, więc rozmiar oznacza w rzeczywistości liczbę tranzycji w podzbiornie. Gdy zostanie określona wielkość kombinacji, generowane są tylko kombinacje o tej właśnie określonej liczności, zamiast wszystkich możliwych kombinacji dla zbioru T lub T' .
- Trzecie ograniczenie: zmniejszenie liczby sprawdzanych wsparć *t*-niezmienników podczas oceny występowania poprzez założenie wartości dla oczekiwanej ważności (I_e) wyrażonej w procentach. Przez oczekiwaną ważność rozumie się odsetek wsparć *t*-niezmienników, które zawierają daną kombinację ($[\%]$), co odpowiada występowaniu tej kombinacji w odpowiednio dużej liczbie wsparć *t*-niezmienników. Przykładowo, jeśli użytkownik ustawi oczekiwaną ważność na 80%, będzie to oznaczało, że odpowiednio dużą liczbą wsparć *t*-niezmienników dla tego przykładu jest co najmniej 80% wszystkich wsparć. W przypadku zmniejszenia liczby sprawdzanych wsparć *t*-niezmienników wyróżnia się dwie sytuacje. Pierwsza z nich, gdy założona oczekiwana ważność jest względnie niska (przykładowo około 30%), w momencie osiągnięcia oczekiwanej ważności nie sprawdza się kolejnych wsparć *t*-niezmienników. Druga sytuacja, gdy założona oczekiwana ważność jest relatywnie wysoka (przykładowo około 70%), szacuje się, czy jest możliwe spełnienie oczekiwanej ważności. Jeśli nie jest, to przerywa się dalsze sprawdzanie. Obie sytuacje zostały przedstawione na konkretnych przykładach w dalszej części paragrafu.

Jak opisano powyżej, analiza występowania może zostać wykonana w kilku wariantach, albo dla wszystkich możliwych kombinacji wygenerowanych na podstawie zbioru T , albo dla wszystkich możliwych kombinacji wygenerowanych na podstawie zbioru T' . Niezależnie od tego wyboru, przed przystąpieniem do analizy możliwe jest określenie oczekiwanej ważności i wielkości poszukiwanych kombinacji. Oznacza to, że opisane wyżej ograniczenia można zastosować oddzielnie lub łącznie. Reprezentacja graficzna zaproponowanego algorytmu z różnymi ograniczeniami została zawarta na Rysunku 5.3.

Celem uzupełnienia Rysunku 5.3 przygotowano opis działania algorytmu na konkretnych przykładach.

Pierwszy przykład dotyczy wariantu algorytmu z wykorzystaniem ograniczenia pierwszego i trzeciego (zgodnie z Rysunkiem 5.3). Na jego potrzeby wykorzystano dane opisane na tym samym rysunku w sekcji „Dane wejściowe”. Pierwsze ograniczenie dotyczące zmniejszenia liczby generowanych kombinacji wymusza określenie podzbioru tranzycji będącego podstawą do wygenerowania kombinacji; na potrzeby przykładu przyjęto, że $T' = \{t_0, t_1\}$. Trzecie ograniczenie dotyczące zmniejszenia liczby sprawdzanych wsparć *t*-niezmienników wymusza podanie oczekiwanej ważności, przyjęto $I_e \geq 30\%$. Poniżej wypunktowano wszystkie kombinacje wygenerowane dla tego przykładu i opisano działanie analizy występowania:



RYSUNEK 5.3: Schemat zaproponowanych ograniczeń algorytmu: zmniejszenie liczby generowanych kombinacji poprzez określenie podzbioru wybranych tranzycji na podstawie zbioru T i/lub określenie wielkości badanych kombinacji i/lub zmniejszenie liczby sprawdzanych wsparć t -niezmienników poprzez przyjęcie oczekiwanej ważności I_e . Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [103].

- $\{t_0\} \subseteq s_1$ – kombinacja $\{t_0\}$ występuje tylko w jednym wsparciu t -niezmiennika, a więc jej ważność wynosi ~33,33% (gdyż w dokładnie tylu wsparciach t -niezmienników występuje). Jej ważność jest większa niż ważność oczekiwana, zatem kombinacja spełnia kryterium ważności.
- $\{t_1\} \subseteq s_0$ i $\{t_1\} \subseteq s_2$ – kombinacja $\{t_1\}$ występuje w dwóch wsparciach t -niezmienników, a więc jej ważność wynosi ~66,67% czym spełnia kryterium oczekiwanej ważności.
- $\{t_0, t_1\} \not\subseteq s_0$, $\{t_0, t_1\} \not\subseteq s_1$ i $\{t_0, t_1\} \not\subseteq s_2$ – kombinacja $\{t_0, t_1\}$ jest kombinacją antywystępującą, gdyż nie występuje w żadnym wsparciu t -niezmienników, a więc nie spełnia kryterium oczekiwanej ważności.

W powyższym przypadku wygenerowano tylko 3 kombinacje, a liczba sprawdzanych wsparć t -niezmienników jest ograniczona na podstawie określonej oczekiwanej ważności większej lub równej 30%. Każda kombinacja jest oceniana pod względem występowania, ale nie w każdym przypadku konieczne będzie sprawdzenie każdego wsparcia t -niezmienników. Dla tych 3 kombinacji całkowita liczba sprawdzeń jest równa 6, 3 sprawdzenia zostały pominięte. Jak to rozumieć wyjaśniono na przykładzie wybranej kombinacji: t_1 występuje we wsparciu s_0 , które jest pierwszym sprawdzonym wsparciem t -niezmienników, oznacza to, że aktualna ważność tej kombinacji jest równa ~33,33%. Aktualna ważność w tym przypadku jest większa od oczekiwanej ważności, a więc dalsze sprawdzanie występowania dla tej kombinacji nie jest konieczne.

Drugi przykład dotyczy wariantu algorytmu z wykorzystaniem tylko trzeciego ograniczenia i jest to przykład zawarty na Rysunku 5.3, a więc podobnie jak wcześniej, również w tym przypadku wykorzystano dane opisane w sekcji „Dane wejściowe”. Dla tego przykładu generowane są wszystkie możliwe kombinacje na podstawie zbioru T , a więc siedem kombinacji. Natomiast liczba sprawdzanych wsparć t -niezmienników jest ograniczona na podstawie określenia oczekiwanej ważności,

przyjęto $I_e \geq 60\%$. Dla tego przykładu każda wygenerowana kombinacja jest oceniana pod względem występowania, ale nie w każdym przypadku konieczne będzie sprawdzenie każdego wsparcia t -niezmienników. Chcąc przedstawić konkretny przypadek, rozważono przykładową kombinację, składającą się z pojedynczej tranzycji, $\{t_2\}$ (patrz Rysunek 5.3, sekcja „3 ograniczenie”). Dla kombinacji $\{t_2\}$ analiza występowania rozpoczyna się od sprawdzenia wsparcia s_0 . Jak można zauważyć na Rysunku 5.3, kombinacja ta nie występuje we wsparciu s_0 , zatem jej aktualna ważność jest równa 0%. Ponadto po tym sprawdzeniu wiadomo, że maksymalna ważność jaką może osiągnąć ta kombinacja wynosi $\sim 66,67\%$ (gdyby kombinacja występowała w pierwszym wsparciu i jej ważność wynosiłaby na wstępie $\sim 33,33\%$, to jej maksymalna ważność dalej mogłaby wynieść 100%). Po pierwszym sprawdzeniu nie można było przerwać działania algorytmu, więc sprawdzanie występowania przechodzi do następnego wsparcia. Kombinacja $\{t_2\}$ nie występuje w wsparciu s_1 , zatem jej aktualna ważność nadal wynosi 0%. Ponadto, po tym sprawdzeniu wiadomo, iż maksymalna ważność jaką ta kombinacja może osiągnąć wynosi $\sim 33,33\%$, a jest to mniej niż założona oczekiwana ważność 60%. Wobec tego, dalsze sprawdzanie wsparć t -niezmienników dla tej kombinacji nie jest kontynuowane.

Dla dwóch opisanych powyżej przykładów wykorzystania oczekiwanej ważności do zmniejszenia liczby sprawdzanych wsparć t -niezmienników istotne okazuje się ułożenie wsparć t -niezmienników w danych wejściowych. Jeśli oczekiwana ważność jest stosunkowo niska (około 30%), to pożądane byłoby ułożenie wsparć t -niezmienników w kolejności od największego do najmniejszego wsparcia. Przy takim ułożeniu istnieje większe prawdopodobieństwo, że oczekiwana ważność zostanie osiągnięta szybciej, gdyż w większych wsparciach jest większa szansa na znalezienie kombinacji występującej niż w mniejszych, dzięki temu można szybciej pominąć sprawdzanie występowania danej kombinacji w kolejnych wsparciach t -niezmienników. W odwrotnym przypadku, gdy oczekiwana ważność jest stosunkowo wysoka (około 70%), to pożądane byłoby ułożenie wsparć t -niezmienników w kolejności odwrotnej jak wcześniej, czyli od najmniejszego do największego wsparcia. Przy takim ułożeniu algorytm może szybciej ocenić, że dana kombinacja nie spełni oczekiwanej ważności. Przykładowo, jeśli założona oczekiwana ważność jest większa lub równa 80%, to wystarczy ocenić, że kombinacja nie występuje w więcej niż 20% wsparć t -niezmienników. Ten wariant dokładnie opisano powyżej na przykładzie drugiego wykorzystania oczekiwanej ważności.

W przypadku analizy modeli biologicznych częściej obiektem zainteresowania jest wysoka wartość oczekiwanej ważności. W takiej sytuacji kluczowe jest jak najszybsze wykluczenie kombinacji, które nie spełniają założenia o oczekiwanej ważności i takie podejście zastosowano w algorytmie.

5.2.5 Ewaluacja działania algorytmu dla analizy występowania

W ogólności paragraf ten zawiera zastosowanie analizy występowania (zaproponowanego algorytmu) w oparciu o konkretny model złożonego systemu biologicznego. Ponadto wykorzystano nie tylko analizę występowania, ale także analizę ważności, aby uwypuklić potrzebę zastosowania analiz tego typu. Oznacza to, że w rezultacie rozważań dotyczących istotnych reakcji i podprocesów wykonano analizę ważności oraz analizę występowania dla przykładowego modelu opartego o sieci Petriego. Wybrany model można znaleźć w pracy [104] oraz w kolejnym rozdziale niniejszej rozprawy, dokładniej w podrozdziale 6.3, analizowany model dotyczy ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B. Model zawiera 170 tranzycji, 89 miejsc oraz jest pokryty przez 451 t -niezmienników. Rozważany model zawiera bardzo dużo tranzycji, które odpowiadają procesom elementarnym, średnio złożone systemy biologiczne są reprezentowane przez około 80-100 tranzycji. Wydaje się zatem, że wybrany do analizy model stanowi odpowiedni przykład do oceny jakości działania zaproponowanej analizy pod względem liczby tranzycji. Natomiast liczba t -niezmienników jest wartością

zależną od natury badanego zjawiska, często modele zawierają kilkaset t -niezmienników, a czasami kilka lub kilkanaście tysięcy. Liczbie t -niezmienników nie koreluje z liczbą tranzycji.

Początkowo dla wspomnianego modelu wykonano analizę ważności, która to objęła wszystkie zamodelowane tranzycje, a więc 170 procesów elementarnych. W Tabeli 5.1 zamieszczono tylko te tranzycje, których ważność została oceniona na większą od 70%. W Tabeli 5.1 wyróżniono następujące kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory odpowiednich tranzycji, *Nazwa tranzycji* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane do każdej tranzycji, *Ważność tranzycji* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%].

TABELA 5.1: Wybrane wyniki analiza ważności dla pojedynczych tranzycji dla modelu ATM-p53-NF- κ B. Tabela pochodzi z pracy [103], podczas gdy model można znaleźć w pracach [104, 134].

ID	Nazwa tranzycji	Ważność tranzycji	
		tranz./t-inw.	[%]
t_1	creation of DSB stimulated by IR	418/541	77,26
t_2	source of IR	418/541	77,26
t_{42}	transcription to ATM mRNA transcript	418/541	77,26
t_{13}	source of DNA	416/541	76,89
t_{14}	transcription from DNA to p53 mRNA transcript	416/541	76,89
t_{52}	phosphorylation of ATMn by DSB	415/541	76,71
t_{16}	translation from p53 mRNA to p53n	414/541	76,52
t_{43}	translation from ATM mRNA to ATMn	414/541	76,52
t_{54}	transition of ATMpn to ATMan by MRNpn	407/541	75,23
t_{162}	creation of pool of MRNpn	407/541	75,23

Analiza ważności wskazuje, które elementarne reakcje są najbardziej kluczowe dla funkcjonowania badanego systemu, ale także które reakcje są najmniej istotne. W tym przypadku najważniejsze procesy elementarne związane są z tworzeniem pęknięć podwójnej nici DNA (DSB) przez promieniowanie jonizujące (IR), a także są związane z modułami ATM i p53. Pojawiają się także istotne reakcje elementarne należące do modułu NF- κ B, jednak charakteryzują się one ważnością na poziomie około 47%. Zatem najważniejsze reakcje wchodzą w skład podprocesów prowadzących do uszkodzenia i naprawy DNA. Analiza ważności poza określeniem ważności strukturalnej każdej tranzycji, pozwala ukierunkować kolejne analizy poprzez możliwość zawężenia analizy występowania do konkretnych procesów elementarnych. W ten sposób można zawęzić liczbę generowanych kombinacji tylko do tych opartych na istotnych tranzycjach.

Wykorzystując najważniejsze reakcje (najważniejsze z punktu widzenia struktury modelu) w kolejnych kroku przeprowadzono analizę występowania dla wybranego zbioru tranzycji $T' = \{t_1, t_2, t_{13}, t_{14}, t_{16}, t_{42}, t_{43}, t_{52}, t_{54}, t_{162}\}$ (wybrano tranzycje o ważności większej niż 70%, które znajdują się w Tabeli 5.1). Analiza ta została przeprowadzana dla wszystkich możliwych kombinacji tranzycji otrzymanych na podstawie zbioru T' bez ograniczenia co do konkretnego rozmiaru kombinacji, z tym że wykonano ją przy różnych oczekiwanych ważnościach (różne wartości I_e). Najpierw analizę wykonano bez ograniczeń co do ważności kombinacji ($I_e \geq 0$), a później z ograniczeniem co do oczekiwanej ważności ($I_e \geq 70\%$). Poniżej przedstawiono Tabelę 5.2 zawierającą porównanie otrzymanych wyników dla wspomnianych analiz. W Tabeli 5.2 wyróżniono dwie główne kolumny: *Analiza występowania dla T' bez określenia oczekiwanej ważności* oraz kolumna *Analiza występowania dla T' z określeniem oczekiwanej ważności*. Dla tych dwóch kolumn wyróżniono właściwości i wyniki, tak aby określić jak właściwości dla wybranych analiz przekładają się na konkretne wyniki, w tym ile jest kombinacji spełniających określone kryteria oraz jaki jest czas sprawdzania niewystępowania (szacowania ważności kombinacji).

TABELA 5.2: Właściwości analizy występowania dla wybranego podzbioru tranzycji T' z i bez określenia oczekiwanej ważności dla modelu ATM-p53-NF- κ B. Tabela pochodzi z pracy [103], podczas gdy model można znaleźć w pracach [104, 134].

	Analiza występowania dla T' bez określenia oczekiwanej ważności		Analiza występowania dla T' z określeniem oczekiwanej ważności	
właściwości				
rozmiar danych wejściowych	541 (t-niezmienniki) \times 170 (tranzycje)			
liczba wszystkich kombinacji dla T	1,496578 \cdot 10 ⁵¹			
liczba wszystkich kombinacji dla T'	1023			
oczekiwana ważność	$I_e \geq 0\%$		$I_e \geq 70\%$	
wybrany rozmiar kombinacji	-		-	
liczba wszystkich badanych kombinacji	1023			
wyniki				
liczba kombinacji występujących spełniających określone kryteria	1023		258	
czas trwania oceny występowania	0,14 s		0,074 s	

* Czasy analizowano przy użyciu komputera z następującymi parametrami: procesor i5-10210U 2.11GHz oraz 12 GB pamięci RAM.

W Tabeli 5.2 można zauważyć znaczne zmniejszenie liczby badanych kombinacji poprzez wygenerowanie wszystkich możliwych kombinacji przejść dla wybranego podzbioru zbioru T (oznaczonego jako T') zamiast samego zbioru T . Z Tabeli 5.2 wynika przede wszystkim, że możliwe jest skrócenie czasu trwania oceny występowania oraz ograniczenie liczby rozwiązań do tych spełniających określone kryteria, jeśli założona zostanie oczekiwana ważność. Podejście to prowadzi do odfiltrowania olbrzymiej liczby rozwiązań, które są matematycznie poprawnie, a niekoniecznie są pożądane dla dalszej analizy biologicznej. Poza określeniem oczekiwanej ważności, wyniki mogą być zawężone poprzez określenie wielkości kombinacji stanowiących przedmiot zainteresowania. W Tabeli 5.3 umieszczono tylko największe kombinacje, które wygenerowano dla wybranego zbioru T' i których oczekiwana ważność jest wyższa niż 70%. Przez największe kombinacje, w tym przypadku, rozumie się kombinacje zawierające 7 i 8 tranzycji. Tabela 5.3 jest podzielona na następujące kolumny: *Kombinacje* – kolumna zawierająca kombinacje o wielkości 7 i 8 tranzycji, kolumna *Liczba wsparć t-niezmienników zawierających wybrane kombinacje* i *Liczba wsparć t-niezmienników niezawierających wybranych kombinacji* – jak nazwy wskazują kolumny te zawierają liczbę wsparć t-niezmienników, w których, odpowiednio, występują lub nie występują dane kombinacje, kolumny *Ważność kombinacji występujących [%]* i *Ważność kombinacji niewystępujących [%]* – zawierają ważności, gdzie ważność kombinacji występujących oznacza odsetek wsparć t-niezmienników, które zawierają badaną kombinację, a ważność niewystępujących kombinacji oznacza odsetek wsparć t-niezmienników, które nie zawierają badanej kombinacji. Zatem jeśli kombinacja nie wystąpiła w żadnym wsparciu t-niezmienników, to ważność kombinacji występujących jest równa 0%, a ważność kombinacji niewystępujących jest równa 100%. Kombinacja która nie wystąpiła w żadnym wsparciu t-niezmiennika nazywa się kombinacją anty-występującą.

Analiza występowania nie musi być ograniczona przy generowaniu kombinacji do wybranego zbioru tranzycji, może zostać przeprowadzona dla całego zbioru tranzycji T . Należy jednak zauwa-

TABELA 5.3: Wyselekcjonowane kombinacje tranzycji otrzymane w wyniku analizy występowania dla wybranego zbioru tranzycji T' z i bez określenia oczekiwanej ważności na podstawie modelu ATM-p53-NF- κ B. Rozpatrywano wszystkie wielkości kombinacji, jednak wyniki obejmują tylko kombinacje o wielkości 7 i 8 tranzycji. Tabela pochodzi z pracy [103], podczas gdy model można znaleźć w pracach [104, 134].

Kombinacje	Liczba wsparć t -niezmienników zawierających wybrane kombinacje	Ważność kombinacji występujących [%]	Liczba wsparć t -niezmienników niezawierających wybranych kombinacji	Ważność kombinacji niewystępujących [%]
analiza występowania dla T' z $I_e \geq 70\%$				
{1, 2, 13, 42, 43, 52, 54}	402	74,31	139	25,69
{1, 2, 13, 42, 43, 52, 162}	402	74,31	139	25,69
{1, 2, 13, 42, 43, 54, 162}	402	74,31	139	25,69
{1, 2, 13, 42, 52, 54, 162}	402	74,31	139	25,69
{1, 2, 13, 43, 52, 54, 162}	402	74,31	139	25,69
{1, 2, 42, 43, 52, 54, 162}	402	74,31	139	25,69
{1, 13, 42, 43, 52, 54, 162}	402	74,31	139	25,69
{2, 13, 42, 43, 52, 54, 162}	402	74,31	139	25,69
{1, 2, 13, 42, 43, 52, 54, 162}	402	74,31	139	25,69

żyć, że im większy zbiór tranzycji, tym większa będzie liczba wszystkich możliwych kombinacji do wygenerowania i sprawdzenia pod względem występowania. Z drugiej strony, w takim przypadku, podobnie jak powyżej, liczba sprawdzanych kombinacji może być ograniczona na podstawie określenia oczekiwanej ważności i/lub określenia wybranej wielkości poszukiwanych kombinacji. Wyniki porównania analizy występowania dla całego zbioru T z $I_e \geq 70\%$, ale z różnymi rozmiarami poszukiwanych kombinacji, które ustalono na 4 i 5 tranzycji zamieszczono w Tabeli 5.4. W Tabeli 5.4 wyróżniono jedną główną kolumnę: *Analiza występowania dla T z określeniem oczekiwanej ważności i wybranymi rozmiarami kombinacji*, która jest podzielona na dwie pod-kolumny powiązane z dwoma różnymi *wybranymi rozmiarami kombinacji*. Dla tych dwóch wybranych rozmiarów kombinacji wyróżniono właściwości i wyniki, tak aby określić, jak wymiar kombinacji wraz z określoną oczekiwaną ważnością przekłada się na konkretne wyniki, w tym ile jest kombinacji spełniających określone kryteria oraz jaki jest czas sprawdzania niewystępowania (szacowania ważności kombinacji).

W Tabeli 5.4 zaprezentowano wyniki analizy występowania z ograniczeniem co do oczekiwanej ważności ($I_e \geq 70\%$) oraz ograniczeniem co do rozmiarów przeszukiwanych kombinacji (wybrane wielkości kombinacji równe 4 i 5). Nie może ująć uwadze fakt, że zmiana rozmiaru poszukiwanych kombinacji z 4 na 5 tranzycji, dla analizowanego modelu zawierającego 170 tranzycji, znacznie zwiększa liczbę badanych kombinacji, a tym samym czas analizy występowania. W obu przypadkach, tzn. dla obu wybranych rozmiarów kombinacji, liczba kombinacji spełniających kryteria jest odpowiednia do dalszej analizy biologicznej (odpowiednio 70 i 56 zestawów tranzycji). Tabela 5.5 zawiera tylko kombinacje o wielkości 4 i 5 tranzycji, dla których ważność przekracza 75%, jednakże wyniki wskazują na znaczne podobieństwo znalezionych kombinacji dla obu analizowanych rozmiarów. Tranzycje wchodzące w skład tych kombinacji charakteryzują się wysoką ważnością,

TABELA 5.4: Właściwości analizy występowania dla zbioru tranzycji T z określeniem oczekiwanej ważności oraz z określeniem różnych rozmiarów badanych kombinacji dla modelu ATM-p53-NF- κ B. Tabela pochodzi z pracy [103], podczas gdy model można znaleźć w pracach [104, 134].

Analiza występowania dla T z określeniem oczekiwanej ważności i wybranymi rozmiarami kombinacji		
właściwości		
rozmiar danych wejściowych	541 (t -niezmienniki) \times 170 (tranzycje)	
liczba wszystkich kombinacji dla T	$1,496578 \cdot 10^{51}$	
oczekiwana ważność	$I_e \geq 70\%$	
wybrany rozmiar kombinacji	4	5
liczba wszystkich badanych kombinacji	33 585 370	1 115 034 284
wyniki		
liczba kombinacji występujących spełniających określone kryteria	70	56
czas trwania oceny występowania	8,8 min.	5,2 godz.

* Czasy analizowano przy użyciu komputera z następującymi parametrami: procesor i5-10210U 2.11GHz oraz 12 GB pamięci RAM.

co można zauważyć w wynikach analizy ważności dla pojedynczych procesów elementarnych zawartych w Tabeli 5.1. Dodatkowo, kombinacje zawarte w Tabeli 5.5 zostały przeanalizowane pod względem zawartych w nich tranzycji i liczby wsparć t -niezmienników, w jakich te tranzycje występują. Okazuje się, że tranzycje te występują razem w 408 wsparciach t -niezmienników, podczas gdy w 426 wsparciach t -niezmienników pojawia się co najmniej jedna tranzycja. Można zauważyć, że w większości podprocesów pojawiają się analizowane reakcje elementarne, nie dziwi więc fakt, że analizy występowania dały podobne wyniki dla różnych rozmiarów poszukiwanych kombinacji. Tabela 5.5 jest podzielona na następujące kolumny: *Kombinacje* – kolumna zawierająca kombinacje o wielkości 7 i 8 tranzycji, kolumna *Liczba wsparć t -niezmienników zawierających wybrane kombinacje* i *Liczba wsparć t -niezmienników niezawierających wybranych kombinacji* – jak nazwy wskazują, kolumny te zawierają liczbę wsparć t -niezmienników, w których, odpowiednio, występują lub nie występują dane kombinacje, kolumny *Ważność kombinacji występujących [%]* i *Ważność kombinacji niewystępujących [%]* – zawierają ważności, gdzie ważność kombinacji występujących oznacza odsetek wsparć t -niezmienników, które zawierają badaną kombinację, a ważność niewystępujących kombinacji oznacza odsetek wsparć t -niezmienników, które nie zawierają badanej kombinacji. Zatem jeśli kombinacja nie wystąpiła w żadnym wsparciu t -niezmienników to ważność kombinacji występujących jest równa 0%, a ważność kombinacji niewystępujących jest równa 100%. Kombinacja która nie wystąpiła, w żadnym wsparciu t -niezmiennika nazywa się kombinacją anty-występującą.

Analizowany model dotyczy ścieżek ATM, p53 i NF- κ B. Ścieżki te determinują losy komórki, a więc ich zrozumienie jest bardzo ważne z perspektywy klinicznej. Analizy zawarte w tym paragrafie pozwalają zidentyfikować, zarówno istotne reakcje, jak i podprocesy, czym przyczyniają się do lepszego zrozumienia badanego systemu.

Analizując wyniki otrzymane z powyższych analiz, należy zwrócić uwagę, że są one podobne pomimo zastosowania różnych wariantów ograniczających generowanie wszystkich możliwych pod-

TABELA 5.5: Wyselekcjonowane kombinacje tranzycji otrzymane w wyniku analizy występowania dla zbioru tranzycji T z określeniem oczekiwanej ważności oraz różnymi rozmiarami badanych kombinacji na podstawie modelu ATM-p53-NF- κ B. Rozpatrywano kombinacje zawierające 4 i 5 tranzycji. Tabela pochodzi z pracy [103], podczas gdy model można znaleźć w pracach [104, 134].

Kombinacje	Liczba wsparć t -niezmienników zawierających wybrane kombinacje	Ważność kombinacji występujących [%]	Liczba wsparć t -niezmienników niezawierających wybranych kombinacji	Ważność kombinacji niewystępujących [%]
analiza występowania dla T z $I_e \geq 75\%$ i wybranym rozmiarem kombinacji = 5				
{1, 2, 13, 42, 43}	410	75,79	131	24,21
{1, 2, 13, 42, 52}	410	75,79	131	24,21
{1, 2, 13, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{1, 2, 42, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{1, 13, 42, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{2, 13, 42, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
analiza występowania dla T z $I_e \geq 75\%$ i wybranym rozmiarem kombinacji = 4				
{1, 2, 13, 52}	415	76,71	126	23,29
{1, 2, 13, 42}	410	75,79	131	24,21
{1, 2, 13, 43}	410	75,79	131	24,21
{1, 2, 42, 43}	410	75,79	131	24,21
{1, 2, 42, 52}	410	75,79	131	24,21
{1, 2, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{1, 13, 42, 43}	410	75,79	131	24,21
{1, 13, 42, 52}	410	75,79	131	24,21
{1, 13, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{1, 42, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{2, 13, 42, 43}	410	75,79	131	24,21
{2, 13, 42, 52}	410	75,79	131	24,21
{2, 13, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{2, 42, 43, 52}	410	75,79	131	24,21
{13, 42, 43, 52}	410	75,79	131	24,21

zbiorów reakcji (kombinacji) oraz wariantów ograniczających sprawdzanie tych kombinacji. Analiza ważności dla tranzycji, czyli dla pojedynczych reakcji, wskazała 10 reakcji o ważności powyżej 70%. Reakcje te dotyczą uszkodzenia DNA oraz odpowiedzi systemu, czyli reakcje z dwóch kluczowych modułów. Jeden z nich to moduł regulacyjny p53 decydujący o przeżyciu komórki oraz jej odpowiedzi na czynniki stresowe [202, 291], podczas gdy drugi moduł jest modułem aktywatorowym ATM wykrywającym pęknięcia podwójnej nici DNA [134].

Jako główną analizę przeprowadzono analizę występowania w dwóch wariantach. Pierwszym wariantem była analiza występowania dla pełnego zbioru tranzycji (T), gdzie poszukiwane są kombinacje o oczekiwanej ważności powyżej 75%, zawierające 4 i 5 reakcji. Drugim wariantem była analiza występowania przeprowadzona dla wybranego podzbioru tranzycji T' , który zawierał 10 tranzycji zidentyfikowanych jako najbardziej istotne przez analizę ważności. Ponadto dodatkowym kryterium była określona oczekiwana ważność powyżej 70% oraz rozmiar kombinacji (poszukiwano kombinacji zawierających 7 i 8 reakcji). Wyniki obu tych analiz są zbliżone i w obu przypadkach znalezione podzbiory tranzycji zawierają reakcje, które zostały zidentyfikowane jako najważniejsze przez analizę ważności dla pojedynczych tranzycji, choć nie są to wszystkie najistotniejsze tranzycje zidentyfikowane przez tę analizę (patrz Tabela 5.1). Dla pierwszego wariantu analizy występowania (dla całego zbioru T , oczekiwanej ważności $I_e \geq 75\%$ oraz rozmiarów kombinacji równych 4 i 5 tranzycji) znalezione podzbiory reakcji nie obejmują modułu regulacyjnego p53, natomiast obejmują uszkodzenie DNA (tranzycje: t_1 , t_2 , t_{13}) i reakcje należące do modułu akty-

watorowego ATM wykrywającego pęknięcia DNA (tranzycje: t_{42} , t_{43} , t_{52}). Dla drugiego wariantu (dla wybranego zbioru T' , oczekiwanej ważności $I_e \geq 70\%$ oraz rozmiarów kombinacji równych 7 i 8 tranzycji) znalezione podzbiory reakcji obejmują te same moduły, jednakże z uwagi na to, że poszukiwane podzbiory są większe, to obejmują także dodatkowe tranzycje dla modułu ATM (tranzycje: t_{42} , t_{43} , t_{52} , t_{54} , t_{162}). Wyniki te są bardzo istotne biologicznie, gdyż szlak ATM jest odpowiedzialny za wykrywanie uszkodzeń DNA, ale także wzmocnienie sygnału i przekazanie go do innych modułów regulatorowych, takich jak p53 czy NF- κ B. Nieprawidłowe działanie tego modułu jest bardzo groźne, gdyż umożliwia przekazanie uszkodzonego DNA do komórek potomnych, prowadząc tym m.in. do chorób nowotworowych [243].

Jak widać analiza występowania pozwala znaleźć reakcje należące do kluczowych modułów, nawet jeśli poszukiwane są kombinacje składające się z różnej liczby tranzycji i nawet wtedy gdy analiza opiera się nie o cały zbiór tranzycji, ale także gdy opiera się o podzbiór tranzycji najważniejszych.

5.2.6 Konkluzje

Analiza ważności dla pojedynczych reakcji (pojedynczych tranzycji) pozwala na określenie najbardziej istotnych elementarnych reakcji. Jest to istotność strukturalna, a więc im wyższa ważność tym dana reakcja jest bardziej niezbędna do prawidłowego funkcjonowania całego systemu. Analiza ważności poza znalezieniem najbardziej kluczowych reakcji, pozwala także znaleźć te najmniej ważne, których wyłączenie podczas analizy knockout prowadzi do wyłączenia tylko niewielkich obszarów badanego modelu, a czasami wyłącza tylko pojedyncze podprocesy. Takie elementarne procesy nie są istotne dla funkcjonowania analizowanego układu biologicznego (z punktu widzenia struktury), ponieważ są zaangażowane w mniej ważne lub wręcz nieistotne podprocesy. Informacja o istotnych i nieistotnych elementach badanego systemu może wyznaczyć dalszy kierunek badań lub może być wykorzystana do zawężenia kolejnych analiz. Niewątpliwie istotnym dopełnieniem tej analizy jest możliwość oceny ważności dla większych podprocesów, co umożliwia analiza występowania. Analiza występowania umożliwia przeprowadzenie analizy ważności dla wszystkich możliwych podzbiorów reakcji odpowiadających mniejszym i większym podprocesom. I podobnie jak dla pojedynczych reakcji i w tym przypadku ocenić możemy, które podprocesy są ważniejsze od innych. Ponadto, analiza ta pozwala znaleźć wszystkie możliwe podprocesy o założonej (podanej przez użytkownika) oczekiwanej ważności. Z uwagi na fakt, że im większy model, tym więcej możliwych podprocesów do sprawdzenia, zaproponowany algorytm może zostać uruchomiony z różnymi ograniczeniami. Ograniczenia te dotyczą zmniejszenia liczby generowanych kombinacji poprzez określenie podzbioru reakcji (tranzycji), zmniejszenia liczby generowanych kombinacji poprzez określenie rozmiaru badanych podprocesów (określenie rozmiaru kombinacji) i/lub zmniejszenia liczby sprawdzanych wsparć t -niezmienników poprzez przyjęcie oczekiwanej ważności, czyli określenie minimalnej ważności dla podprocesów. Algorytm wykorzystujący jedno lub więcej z wymienionych ograniczeń nadaje się do analizy złożonych systemów biologicznych, co zostało pokazane na przykładowym systemie ATM/p53/NF- κ B [104, 134]. Wyznaczenie ważności wydaje się być istotne dla pełnego rozumienia analizowanych modeli złożonych systemów biologicznych. W przypadku analizowanego modelu tego typu analiza może prowadzić do opracowania bardziej efektywnych terapii w medycynie poprzez wyszukiwanie potencjalnych celów molekularnych dla leków. Oczywiście nie jest to jedyne zastosowanie opisanych analiz, przykładowo analiza ważności ma duży potencjał i może być stosowana także jako ważny element porównawczej analizy modeli opartych o sieci Petriego przed i po wyłączeniu wybranego podprocesu (w ramach analizy knockout) [65], co opisano w podrozdziale 4.5 poprzedniego rozdziału, ale także analiza ważności okazała

się metodą komplementarną do analizy wrażliwości dla modeli opartych o równania różniczkowe zwyczajne [104], co opisano w podrozdziale 6.3 rozdziału kolejnego. Opisana analiza występowania jest oparta na algorytmie dokładnym i jak wykazano jest odpowiednia dla badanych złożonych systemów biologicznych, jednak może się zdarzyć, że analizowane układy będą scharakteryzowane przez tak dużą liczbę tranzycji i wsparć t -niezmienników, że konieczne i lepsze będzie zastosowanie heurystycznego algorytmu poszukiwania zbiorów kluczowych elementów. Wtedy kluczowe może się okazać rozwinięcie zaproponowanego algorytmu przeszukiwania tabu.

5.3 Algorytm poszukiwania anty-występujących we wsparciach t -niezmienników podzbiorów tranzycji

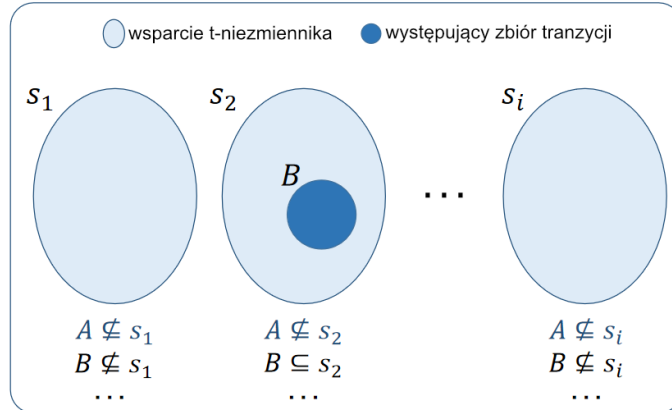
5.3.1 Kontekst badań

Niejednokrotnie zaznaczano, że analiza t -niezmienników opiera się na poszukiwaniu podobieństw między nimi, co w przełożeniu na kontekst biologiczny odpowiada poszukiwaniu podobieństw między podprocesami. Należy pamiętać, że podprocesy składają się z procesów elementarnych, którym odpowiadają pojedyncze reakcje, w nomenklaturze sieci Petriego zwane tranzycjami. W związku z poszukiwaniem podobieństw między podprocesami w rzeczywistości poszukiwane są części wspólne pomiędzy wsparciami t -niezmienników. Tranzycje będące elementami należącymi do części wspólnej odpowiadają pewnym procesom elementarnym, które mogą mieć kluczowe znaczenie dla modelowanego procesu. Mogą być one źródłem interesujących, nieznanych wcześniej właściwości analizowanego układu biologicznego, ponieważ podprocesy zawierające takie tranzycje mogą ze sobą oddziaływać za pomocą tych tranzycji. Zatem poszukiwanie zbiorów procesów elementarnych, które są wspólne dla niektórych podprocesów, może prowadzić do odkrycia pewnych właściwości systemu. Istotność tych zagadnień została opisana w poprzednim podrozdziale, jednakże do rozważenia zostają także podzbiory tranzycji, które nie są składowymi pewnych lub żadnych podprocesów. Takie podprocesy nie mogą na siebie oddziaływać za pośrednictwem tych tranzycji. Można zatem powiedzieć, że przedmiotem niniejszego podrozdziału jest poszukiwanie tranzycji, które anty-występują, czyli nie występują we wsparciach t -niezmienników. Podzbiory tranzycji anty-występujących wydają się być równie istotne jak podzbiory tranzycji występujących. Niezależnie od kategorii występowania/anty-występowania, poszukiwanie podzbiorów tranzycji prowadzi do sformułowania ciekawych problemów kombinatorycznych, które wzięto pod uwagę w dalszej części podrozdziału.

5.3.2 Formalny opis rozważanych problemów anty-występowania wraz z dowodami dotyczącymi złożoności obliczeniowej

Interesującym problemem jest poszukiwanie pewnych podzbiorów tranzycji (odpowiadających pewnym procesom elementarnym), które nie występują w żadnym z analizowanych podprocesów (wsparć t -niezmienników) lub występują w pojedynczych podprocesach albo w bardzo niewielkiej liczbie podprocesów. Występowanie takich podzbiorów tranzycji oznacza, że badane podprocesy nie mogą oddziaływać ze sobą za ich pośrednictwem. W niniejszym paragrafie rozważany jest problem znalezienia podzbioru tranzycji (o pewnej minimalnej liczności), który nie występuje w żadnym ze wsparć t -niezmienników. Graficzna wizualizacja tego problemu znajduje się na Rysunku 5.4. Rysunek 5.4 przedstawia sytuację, zgodnie z którą zbiór A , będący podzbiorem zbioru tranzycji ($A \subseteq T$), nie jest zawarty w żadnym ze wsparć t -niezmienników $s_i \in S$ (oznaczonych błękitnymi

elipsami). Zbiór A nie wyklucza jednak możliwości występowania innych zbiorów tranzycji, jak na przykład zbiór B , taki że $B \subseteq T$ (zbiory występujące oznaczone są jako niebieskie koło).



RYSUNEK 5.4: Problem anty-występowania podzbioru tranzycji we wszystkich wsparciach t -niezmienników. Rozwiązanie problemu dotyczy poszukiwania podzbioru tranzycji, który nie występuje w żadnym ze wsparć t -niezmienników. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

PROBLEM ANTY-WYSTĘPOWANIA wersja decyzyjna 1 – P1 [73, 102]:

- *Instancja*: zbiór tranzycji $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t -niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$ oraz liczba całkowita dodatnia $U \leq |T|$.
- *Odpowiedź*: TAK, jeżeli $\exists A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\nexists_{s_i \in S} A \subseteq s_i$, oraz $u \leq U$; NIE w przeciwnym przypadku.

Udowodniona została **NP**-zupełność problemu P1 została udowodniona przez transformację z problemu HITTING SET, który jest znanym problemem należącym do klasy problemów **NP**-zupełnych [83].

PROBLEM HITTING SET:

- *Instancja*: Kolekcja $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_{|Y|}\}$ podzbiorów zbioru skończonego X oraz liczba całkowita dodatnia $L \leq |X|$.
- *Odpowiedź*: TAK, jeżeli istnieje podzbiór $X' \subseteq X$ taki, że $|X'| \leq L$ i $\forall_{i=1,2,\dots,|Y|} X' \cap y_i \neq \emptyset$ (czyli X' zawiera co najmniej jeden element z każdego podzbioru z kolekcji Y); NIE w przeciwnym przypadku.

W niniejszym paragrafie udowodniono następujące twierdzenie:

Twierdzenie 5.3.1 (Twierdzenie 1). PROBLEM ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 jest **NP**-zupełny.

Dowód NP-zupełności PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1. Dowód przeprowadzono poprzez transformację PROBLEMU HITTING SET do PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1. Jego zwięzła forma została opublikowana w pracy [102], natomiast poniżej zawarto szczegółowy opis wraz z konkretnymi przykładami.

Każdą Instancję PROBLEMU HITTING SET można przekształcić tak aby odpowiadała PROBLEMOWI ANTY-WYSTĘPOWANIA P1, należy zauważyć, że $T = X$, stała $U = L$, natomiast $S = Y^*$, gdzie $S = \{s_1, \dots, s_p\}$, $Y^* = \{\bar{y}_1, \dots, \bar{y}_{|Y|}\}$ i $p = |Y| = |Y^*|$. Jeśli utworzymy kolekcję Y^* zawierającą dopełnienia zbiorów y_i względem zbioru X ($\forall_{y_i \in Y} \bar{y}_i = X \setminus y_i$), to taka kolekcja

będzie odpowiadała zbiorowi S z PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA, a liczność zbioru S oznaczona jako p jest zatem równa zarówno mocy zbioru Y jak i Y^* . Ponieważ w PROBLEMIE HITTING SET poszukujemy pewnego zbioru X' , którego co najmniej jeden element występuje w każdym zbiorze y_i z kolekcji Y , to jeśli rozważymy kolekcję Y^* zawierającą dopełnienia zbiorów y_i (\bar{y}_i) to będziemy mieli pewność, że co najmniej jeden element nie będzie zawarty w każdym $\bar{y}_i \in Y^*$, co pasuje do rozwiązania PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA, gdzie poszukujemy pewnego zbioru A , który nie występuje w żadnym zbiorze s_i z kolekcji S (wystarczy, że tylko jeden element ze znalezionej zbioru nie będzie zawarty w każdym zbiorze z kolekcji S , aby powiedzieć że taki zbiór nie występuje w żadnym zbiorze z kolekcji S), a więc kolekcja $S = Y^*$. Przykładowa konwersja Instancji znajduje się w Tabeli 5.6, natomiast w opisie znajdującym się bezpośrednio pod wspomnianą Tabelą znajduje się dokładne wyjaśnienie jak rozumiemy kolekcję Y^* . Należy także dodać, że skoro istnieje kolekcja Y^* (utworzona na podstawie kolekcji Y) z PROBLEMU HITTING SET, która odpowiada kolekcji S z PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA, to istnieje także kolekcja S^* (utworzona na podstawie kolekcji S) z PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA, która będzie odpowiadała kolekcji Y z PROBLEMU HITTING SET. Kolekcja S^* uzyskana jest na podstawie kolekcji S w sposób analogiczny do uzyskania kolekcji Y^* na podstawie kolekcji Y .

\Rightarrow Jeżeli odpowiedzią dla PROBLEMU HITTING SET jest TAK, to istnieje pewien zbiór X' ($|X'| \leq L$ i $X' \subseteq X$), który zawiera co najmniej jeden element z każdego podzbioru z kolekcji Y . Co innymi słowy oznacza, że każdy zbiór y_i z kolekcji Y zawiera co najmniej jeden element ze zbioru X' ($X' \cap y_i \neq \emptyset, \forall i=1,2,\dots,|Y|$). Jeśli zamiast kolekcji Y , rozważymy kolekcję Y^* , która zawiera zbiory \bar{y}_i , będące dopełnieniem zbiorów y_i względem zbioru X ($\forall y_i \in Y \bar{y}_i = X \setminus y_i$) to możemy zauważyć, że Y^* odpowiada zbiorowi X (każdy zbiór $\bar{y}_i = s_i$) z PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1; własność ta wprost wynika z konstrukcji instancji. W tej sytuacji możemy powiedzieć, że każdy zbiór s_i zawarty w kolekcji S , nie zawiera co najmniej jednego elementu ze zbioru X' , a więc $X' \cap s_i \neq X'$. Oznacza to, że X' nie występuje w żadnym zbiorze $s_i \in S$, można zatem powiedzieć, że zbiór X' będący odpowiedzią dla PROBLEMU HITTING SET jest jednocześnie odpowiedzią dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1.

Jeśli odpowiedź jest TAK dla PROBLEMU HITTING SET to istnieje zbiór $X' \subseteq X$, taki że $|X'| \leq L$ i $\forall y_i \in Y X' \cap y_i \neq \emptyset$, co oznacza także, że $\forall \bar{y}_i \in Y^* X' \cap \bar{y}_i \neq X'$, a to implikuje że $\forall \bar{y}_i \in Y^* X' \not\subseteq \bar{y}_i$. Jak można zauważyć zbiór X' jest także odpowiedzią TAK DLA PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 ponieważ kolekcja S z PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 odpowiada kolekcji Y^* , czyli $\forall s_i \in S$ i $\forall \bar{y}_i \in Y^* s_i = \bar{y}_i$. W takiej sytuacji $\forall s_i \in S X' \cap s_i \neq X' \implies \forall s_i \in S X' \not\subseteq s_i$, można więc zauważyć, że X' jest także odpowiedzią dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA, czyli $X' = A$. Jeśli $X' = A$, to $\forall s_i \in S A \not\subseteq s_i$, co oznacza, że odpowiedź TAK dla PROBLEMU HITTING SET jest jednocześnie odpowiedzią TAK dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1.

Powyższe rozumowanie można wyjaśnić wykorzystując przykładową instancję z Tabeli 5.7. Dla tej instancji, odpowiedzią dla PROBLEMU HITTING SET może być zbiór $X' = \{x_1, x_2\}$. Zbiór X' jest podzbiorem zbioru X o liczności $\leq L$, gdzie $L \leq |X|$. Zbiór X' zawiera co najmniej jeden element z każdego zbioru z kolekcji Y : $X' \cap y_1 = \{x_1\}$, $X' \cap y_2 = \{x_2\}$, $X' \cap y_3 = \{x_2\}$. To rozwiązanie może być także rozwiązaniem problemu ANTY-WYSTĘPOWANIA P1. Zakładając, że $A = X'$ otrzymujemy zbiór zawierający co najmniej jeden element, który nie należy do żadnego ze zbiorów s_i , wynika to z tego, że zbiór ten zawiera co najmniej jeden element z każdego zbioru y_i , a elementy tych zbiorów nie należą do zbiorów s_i , zatem dla każdego $s_i \in S$, gdzie $i = 1, \dots, p$ istnieje co najmniej jeden element w X' (a także w A), który nie jest elementem s_i . Dla dodatkowego zobrazowania można rozważyć kolekcję dopełnień Y^* PROBLEMU HITTING SET ($Y^* = \{\bar{y}_1, \bar{y}_2, \bar{y}_3\}$), to można zauważyć, że zbiór $X' = \{x_1, x_2\}$ nie występuje w żadnym zbiorze

rze z kolekcji Y^* . Zatem jeśli zbiór X' odpowiada zbiorowi A i kolekcja Y^* odpowiada kolekcji S z PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 to można powiedzieć, że odpowiedź dla PROBLEMU HITTING SET jest jednocześnie odpowiedzią dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1. Dla analizowanego przykładu zbiór $A = \{t_1, t_2\}$, nie występuje w żadnym zbiorze z kolekcji S : $\{t_1, t_2\} \not\subseteq s_1$, $\{t_1, t_2\} \not\subseteq s_2$ i $\{t_1, t_2\} \not\subseteq s_3$, przy czym każdy zbiór $s_i \in S$ zawiera co najmniej jeden element ze zbioru A : $A \cap s_1 = \{t_1\}$, $A \cap s_2 = \{t_2\}$, $A \cap s_3 = \{t_2\}$.

Rozważmy jeszcze jedną odpowiedź dla PROBLEMU HITTING SET, gdzie $X' \cap y_i = X'$ dla dowolnego zbioru y_i z kolekcji Y . Zbiorem spełniającym te założenia dla przykładowej instancji z Tabeli 5.7 może być $X' = \{x_5\}$. W tej sytuacji, podobnie jak wyżej, co najmniej jeden element ze zbioru X' (a dokładniej każdy element ze zbioru X') nie występuje w każdym ze zbiorów \bar{y}_i z kolekcji Y^* , a więc X' nie jest zawarty w żadnym ze zbiorów z kolekcji Y^* ; odpowiedź dla PROBLEMU HITTING SET jest także odpowiedzią dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1.

\Leftarrow Jeżeli odpowiedzią dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 jest TAK, to oznacza, że istnieje zbiór A o odpowiednio małej liczności ($|A| \leq U$). Zbiór A jest podzbiorem zbioru tranzycji T , który nie jest zawarty w żadnym ze wsparć t -niezmienników z kolekcji S . Można to zapisać jako $A \not\subseteq s_i$, $\forall s_i \in S$, co oznacza także, że $A \cap s_i \neq A$, $\forall s_i \in S$. Jeśli zamiast kolekcji S , rozważmy kolekcję S^* , która zawiera zbiory \bar{s}_i , będące dopełnieniem zbiorów s_i względem zbioru T ($\forall s_i \in S \bar{s}_i = T \setminus s_i$) to możemy zauważyć, że S^* odpowiada zbiorowi Y ($\bar{s}_i = y_i$) z PROBLEMU HITTING SET. W tej sytuacji możemy powiedzieć, że $\forall y_i \in Y A \cap y_i \neq \emptyset$. Sformułowanie $\forall y_i \in Y A \cap y_i \neq \emptyset$ oznacza, że każdy zbiór y_i z kolekcji Y zawiera co najmniej jeden element ze zbioru A . Można zatem powiedzieć, że zbiór A będący odpowiedzią dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 jest jednocześnie odpowiedzią dla PROBLEMU HITTING SET (a więc zbiór A odpowiada zbiorowi X').

Jeśli odpowiedź jest TAK dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 to istnieje zbiór A taki, że $\forall s_i \in S A \not\subseteq s_i$, co oznacza, że $A \cap s_i \neq A$, zatem $\forall \bar{s}_i \in S^* A \cap \bar{s}_i \neq \emptyset$. Jak można zauważyć zbiór A jest także odpowiedzią TAK DLA PROBLEMU HITTING SET ponieważ kolekcja Y z PROBLEMU HITTING SET odpowiada kolekcji S^* , czyli $\forall y_i \in Y$ i $\forall \bar{s}_i \in S^* y_i = \bar{s}_i$. W takiej sytuacji $\forall y_i \in Y A \cap y_i \neq \emptyset$, można więc zauważyć, że A jest także odpowiedzią dla PROBLEMU HITTING SET, czyli $A = X'$. Jeśli $A = X'$, to $\forall y_i \in Y X' \cap y_i \neq \emptyset$, co oznacza, że odpowiedź TAK dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 jest jednocześnie odpowiedzią TAK dla PROBLEMU HITTING SET.

Powyższe rozumowanie można wyjaśnić wykorzystując przykładową instancję z Tabeli 5.7. Dla tej instancji, odpowiedzią dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 tranzycji we wsparciach t -niezmienników może być zbiór $A = \{t_3, t_4\}$ o liczności $\leq U$, gdzie $U \leq |T|$. Zbiór A nie występuje w żadnym ze wsparć z kolekcji S ($A \not\subseteq s_1$, $A \not\subseteq s_2$, $A \not\subseteq s_3$). To rozwiązanie może być także rozwiązaniem PROBLEMU HITTING SET. Jeśli A jest rozwiązaniem PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1, to znaczy, że każdy $s_i \in S$, gdzie $i = 1, \dots, p$, zawiera przynajmniej jeden element, który nie należy do s_i (w przeciwnym razie zbiór A zawierałby się w s_i dla tego i). Zatem, ze względu na zbiory s_i , A zawiera co najmniej jeden element, który należy do y_i dla każdego $i = 1, \dots, p$. Stąd, zakładając, że $X' = A$, otrzymujemy rozwiązanie PROBLEMU HITTING SET na podstawie rozwiązania PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1. Dla dodatkowego zobrazowania można rozważyć kolekcję dopełnień S^* ($S^* = \{\bar{s}_1, \bar{s}_2, \bar{s}_3\}$). W takiej sytuacji zbiór $A = \{t_3, t_4\}$ zawiera co najmniej jeden element z każdego podzbioru z kolekcji S^* : $A \cap \bar{s}_1 = \{t_4\}$, $A \cap \bar{s}_2 = \{t_3, t_4\}$, $A \cap \bar{s}_3 = \{t_3\}$. Zatem jeśli zbiór A odpowiada zbiorowi X' i kolekcja S^* odpowiada kolekcji Y to odpowiedź dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 jest jednocześnie odpowiedzią dla PROBLEMU HITTING SET.

□

TABELA 5.6: Utworzenie instancji PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 na podstawie instancji PROBLEMU HITTING SET

Problem HITTING SET		Problem ANTY-WYSTĘPOWANIA TRANZYCJI
$Y = \{y_1, \dots, y_{ Y }\}$	\iff	$S^* = \{\overline{s_1}, \dots, \overline{s_p}\}$
$Y^* = \{\overline{y_1}, \dots, \overline{y_{ Y }}\}^{**}$	\iff	$S = \{s_1, \dots, s_p\}$
X	\iff	$T = \{t_1, \dots, t_m\}$
$ Y $	\iff	p
stała $L \leq X $	\iff	stała $U \leq T $
$\exists X' \subseteq X$, taki że $ X' \leq L$ i $X' \cap y_i \neq \emptyset, \forall y_i \in Y$	\iff	$\exists A \subseteq T$ taki, że $\nexists_{s_i \in S} A \subseteq s_i$ oraz $ A \leq U$

****** $\forall_{y_i \in Y} y_i \subseteq X$, na tej podstawie możemy stworzyć dopełnienie dla każdego zbioru y_i względem zbioru X i oznaczyć je jako $\overline{y_i}$. Dokładniej, $\forall_{y_i \in Y} \overline{y_i} = X \setminus y_i$. Tak utworzone dopełnienia zbiorów y_i tworzą kolekcję zbiorów oznaczoną jako Y^* , a więc $Y^* = \{\overline{y_1}, \dots, \overline{y_{|Y|}}\}$. Analogicznie do podanego przykładu możemy uzyskać kolekcję S^* dla PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA, z tym że tworzymy dopełnienia zbiorów s_i względem zbioru T , gdzie $\forall_{s_i \in S} \overline{s_i} = T \setminus s_i$, a więc $S^* = \{\overline{s_1}, \dots, \overline{s_p}\}$. Można zatem stwierdzić, że $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i = \overline{y_i} = X \setminus y_i$.

TABELA 5.7: Przykładowa instancja PROBLEMU HITTING SET i ANTY-WYSTĘPOWANIA P1*

		HITTING SET								ANTY-WYSTĘPOWANIE						
Y		X							S^*		T					
			x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6			t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
y_1			+			+	+		\iff	$\overline{s_1}$	+			+	+	
y_2				+	+	+	+			$\overline{s_2}$		+	+	+	+	
y_3				+	+		+			$\overline{s_3}$		+	+		+	
				\Downarrow								\Downarrow				
Y^*		X							S		T					
			x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6			t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
$\overline{y_1}$				+	+			+	\iff	s_1		+	+			+
$\overline{y_2}$			+					+		s_2	+					+
$\overline{y_3}$			+			+		+		s_3	+			+		+

Na podstawie zbiorów y_i należących do kolekcji Y z PROBLEMU HITTING SET utworzono ich dopełnienia oznaczane jako $\overline{y_i}$ (gdzie $\overline{y_i} = X \setminus y_i$), te zbiory tworzą kolekcję oznaczoną jako Y^ ; tak utworzona kolekcja odpowiada kolekcji S z PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA. Podobnie jest w przypadku PROBLEMU HITTING SET, gdzie na podstawie zbiorów s_i należących do kolekcji S utworzono ich dopełnienia oznaczane jako $\overline{s_i}$ (gdzie $\overline{s_i} = T \setminus s_i$), te zbiory tworzą kolekcję oznaczoną jako S^* ; tak utworzona kolekcja odpowiada kolekcji Y z PROBLEMU HITTING SET.

Inny problem, nazwany P2, będący niejako rozszerzeniem problemu ANTY-WYSTĘPOWANIA P1, dotyczy poszukiwania zbioru tranzycji, który nie jest podzbiorem pewnej kolekcji wsparć t-niezmienników. Zatem poszukiwany jest podzbiór tranzycji niewystępujący w pewnej podkolekcji wsparć t-niezmienników, a nie we wszystkich t-niezmiennikach z kolekcji. Poniżej formalna definicja tego problemu [73, 102].

PROBLEM ANTY-WYSTĘPOWANIA wersja decyzyjna 2 – P2:

- *Instancja*: zbiór tranzycji $T = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$, zbiór $S = \{s_1, s_2, \dots, s_p\}$ wsparć t-niezmienników, gdzie $\forall_{i=1,2,\dots,p} s_i \subseteq T$ oraz liczby całkowite dodatnie $U \leq |T|$ i stała $K \leq |T|$.
- *Odpowiedź*: TAK, jeżeli $\exists A = \{a_1, a_2, \dots, a_u\} \subseteq T$ taki, że $\nexists_{S'=\{s_{j_1}, s_{j_2}, \dots, s_{j_K}\} \subseteq S} A \subseteq s_{j_1}, A \subseteq s_{j_2}, \dots, A \subseteq s_{j_K}$ oraz $u \leq U$; NIE w przeciwnym przypadku.

Dla wyżej zdefiniowanego problemu, udowodniono następujące twierdzenie:

Twierdzenie 5.3.2 (Twierdzenie 2). PROBLEM ANTY-WYSTĘPOWANIA P2 jest **NP**-zupełny.

Dowód NP-zupełności PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P2. Można zauważyć, że PROBLEM ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 jest szczególnym przypadkiem PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P2, gdzie $K = 1$. Stąd, jeśli P1 jest **NP**-zupełny, to P2 również jest **NP**-zupełny. \square

Ponadto, stosunkowo łatwo wykazać, że PROBLEMY ANTY-WYSTĘPOWANIA w wersji P1 i P2 są problemami silnie **NP**-zupełnymi.

Twierdzenie 5.3.3 (Twierdzenie 3). PROBLEMY ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 i P2 są silnie **NP**-zupełne.

Dowód silnej NP-zupełności PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 i P2. Można zauważyć, że PROBLEMY ANTY-WYSTĘPOWANIA P1 i P2 nie są problemami liczbowymi i są problemami **NP**-zupełnymi, a zatem są też problemami silnie **NP**-zupełnymi. \square

Zarówno dowód **NP**-zupełności jak i silnej **NP**-zupełności PROBLEMU ANTY-WYSTĘPOWANIA dla wersji P1 jak i wersji P2 znalazły się w opublikowanej pracy [102].

5.3.3 Zaproponowane rozwiązanie problemu – koncepcja algorytmu

Zdefiniowany w poprzednim paragrafie problem P1 dotyczący niewystępowania zbioru tranzycji we wszystkich wsparciach t-niezmienników należy do problemów **NP**-zupełnych. W związku z tym należałoby zaproponować algorytm heurystyczny. Jednakże w pierwszej kolejności zaproponowano algorytm dokładny, który jak się okazuje, może być z powodzeniem stosowany do badania modeli złożonych systemów biologicznych, wyrażonych za pomocą sieci Petriego. Wynika to przede wszystkim z wielkości poszukiwanego zbioru niewystępującego.

Danymi wejściowymi dla algorytmu jest kolekcja wsparć t-niezmienników. Użytkownik może zdecydować czy algorytm ma ocenić anty-występowanie dla wszystkich możliwych kombinacji otrzymanych na podstawie zbioru tranzycji T , czy dla jego pewnego, wybranego podzbioru T' . Niezależnie od tego, czy rozważany jest cały zbiór tranzycji T , czy jego pewien podzbiór (T') to zawsze generowane są wszystkie możliwe podzbiory tranzycji (z pominięciem zbioru pustego). Zbiór pusty jest pomijany, gdyż nie jest obiektem zainteresowania w kontekście problemów biologicznych,

które są rozwiązywane. Dla przykładu, przytoczone zostaną przykładowe dane wejściowe o rozmiarze 4×3 . Jak można zauważyć, przykład ten jest niewielkiego rozmiaru, ale należy traktować go poglądowo:

Dane wejściowe wymiaru 4×3 :

$$s_0 = \{t_1, t_2\}$$

$$s_1 = \{t_0\}$$

$$s_2 = \{t_1\}$$

$$s_3 = \{t_2\}$$

Powyższy zapis można czytać następująco: wsparcie t -niezmiennika s_0 składa się z tranzycji t_1 i t_2 , wsparcie t -niezmiennika s_1 składa się z tranzycji t_0 , itd. Rozważane w niniejszej pracy modele oparte o sieci Petriego charakteryzują się pokryciem sieci przez t -niezmienniki. Oznacza to, że każda tranzycja ze zbioru T występuje w co najmniej jednym ze wsparć t -niezmienników. Zatem, w przypadku analizowanych modeli nie występuje sytuacja, w której dowolna tranzycja ze zbioru T nie jest zawarta w żadnym ze wsparć t -niezmienników.

W dalszej części tego podrozdziału poprzez anty-występujące podzbiory tranzycji, określane także niewystępującymi podzbiorami tranzycji, rozumiany jest tylko jeden przypadek, w którym to znaleziony podzbiór tranzycji nie występuje w żadnym ze wsparć t -niezmienników. Rozważmy dla przykładu model oparty o sieć Petriego, który zawiera 100 tranzycji. Dla tego przypadku liczba wszystkich kombinacji, na które składają się wszystkie podzbiory tranzycji (bez zbioru pustego), wynosi $(2^{100}) - 1$. Wszystkie te kombinacje należy ocenić pod względem anty-występowania we wsparciach t -niezmienników. Jak wśród takiej liczby danych upatrywać tych niewystępujących podzbiorów tranzycji, które są istotne z punktu widzenia analizy biologicznej? Starając się odpowiedzieć na to pytanie, rozważono sytuację, w której użytkownik może zdefiniować własny, wybrany podzbiór tranzycji i dla takiego zbioru wygenerować wszystkie podzbiory. Mogą to być podzbiory tranzycji o licznosci około 10 tranzycji, gdyż już właśnie takie zbiory mogą charakteryzować pewne podprocesy, często jednak nie wiadomo jaki to miałyby być podzbiór.

Dane wejściowe algorytmu będące kolekcją wsparć t -niezmienników, mogą zostać posortowane lub też nie. Oceniając jakość działania algorytmu sprawdzono oba te scenariusze. Przez sortowanie rozumie się ułożenie wsparć t -niezmienników od największego (zawierającego najwięcej tranzycji) do najmniejszego (zawierającego najmniej tranzycji). Natomiast umotywowanie tej czynności wyjaśniono przy okazji opisu oceny anty-występowania.

Na podstawie danych wejściowych generowane są wszystkie możliwe podzbiory tranzycji (kombinacje), niezależnie od tego, czy rozważany jest cały zbiór tranzycji T , czy wybrany jego podzbiór T' . Przykładowo dla danych wejściowych algorytmu o wymiarze 4×3 , wszystkie kombinacje dla zbioru tranzycji T , są następujące: $\{t_0\}, \{t_1\}, \{t_2\}, \{t_0, t_1\}, \{t_0, t_2\}, \{t_1, t_2\}, \{t_0, t_1, t_2\}$.

Następnie każda wygenerowana kombinacja jest oceniana pod względem anty-występowania. Oznacza to, że algorytm sprawdza czy dany podzbiór tranzycji występuje w kolekcji wsparć t -niezmienników, poczynawszy od pierwszego do ostatniego wsparcia. Jeśli podzbiór wystąpi w jakimkolwiek wsparciu t -niezmiennika, to nie ma konieczności sprawdzania pozostałych wsparć t -niezmienników. Wsparcie, w którym wystąpi dana kombinacja jest traktowane jak kontrprzykład niewystępowania podzbioru tranzycji. Sortowanie danych wejściowych, a zatem sortowanie wsparć t -niezmienników od największego (zawierającego najwięcej tranzycji) do najmniejszego (zawierającego najmniej tranzycji) umożliwia szybsze znalezienie zbioru występującego i tym samym ograniczenie się do minimalnej liczby sprawdzeń. Wynika to z faktu, że prawdopodobieństwo wystąpienia

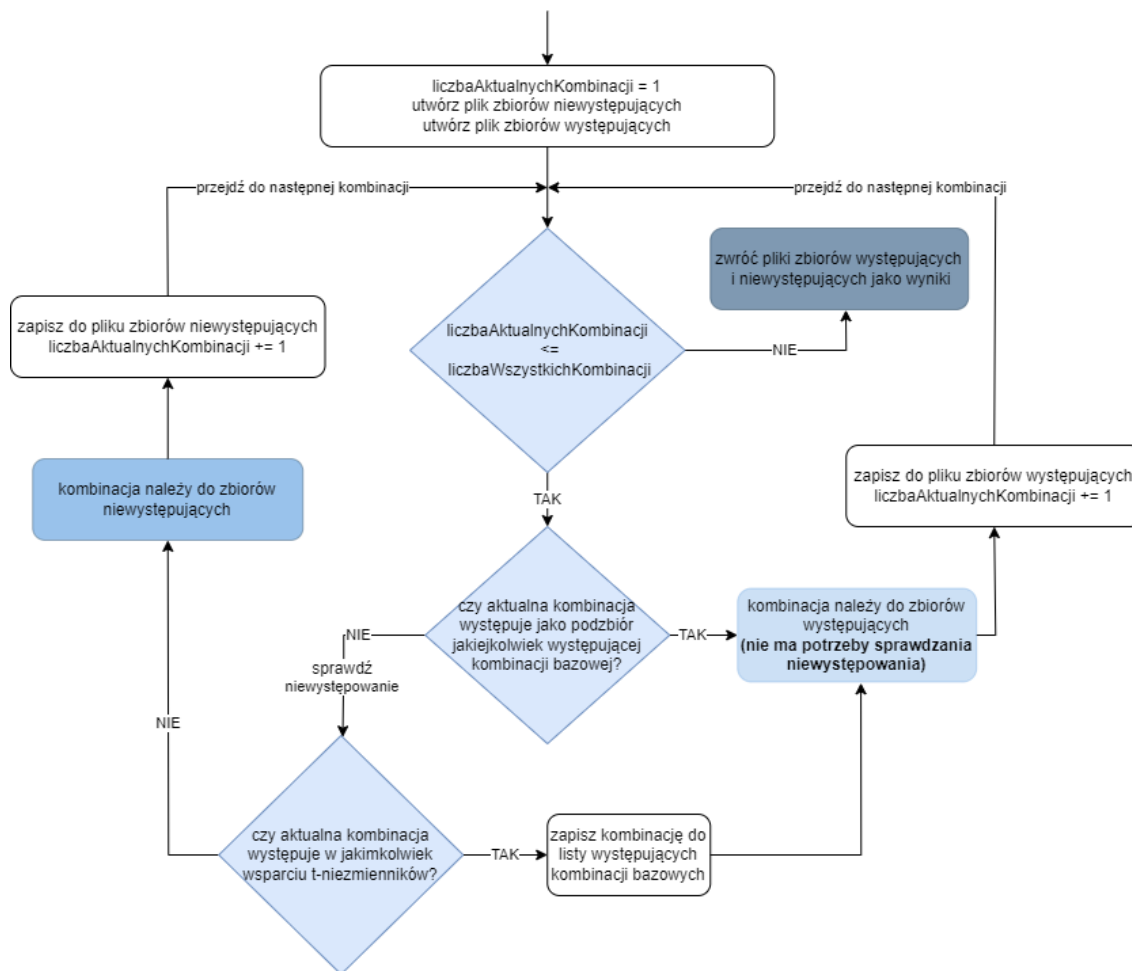
danej kombinacji będzie tym większe, im więcej tranzycji będzie zawarte w sprawdzanym wsparciu t -niezmiennika.

Analizując przykładowe dane wejściowe, pierwszy sprawdzany podzbiór to $\{t_0\}$, tranzycja t_0 nie występuje w pierwszym wsparciu t -niezmiennika s_0 (jest to wsparcie zawierające najwięcej tranzycji w kolekcji), zatem algorytm przechodzi do następnego wsparcia t -niezmiennika. Tranzycja t_0 występuje we wsparciu s_1 , więc wiadomo, iż podzbiór $\{t_0\}$ nie jest rozwiązaniem badanego problemu, dlatego algorytm przechodzi do następnej kombinacji. Proces ten powtarza się do momentu sprawdzenia wszystkich możliwości, w efekcie czego wiemy, które podzbiory są zbiorami anty-występującymi. Dla analizowanego przykładu są to: $\{t_0, t_1\}$, $\{t_0, t_2\}$, $\{t_0, t_1, t_2\}$. Opisane rozwiązanie nie pozwala jednak ograniczyć sprawdzenia kombinacji. Celem wprowadzenia takiego ograniczenia sprawdzania kombinacji zaproponowano, aby kombinacje były sprawdzane od ostatniej do pierwszej, a więc od największego podzbioru do najmniejszego. Wyznaczona kolejność jest następująca: $\{t_0, t_1, t_2\}$, $\{t_1, t_2\}$, $\{t_0, t_2\}$, $\{t_0, t_1\}$, $\{t_2\}$, $\{t_1\}$, $\{t_0\}$. Podejście to jest istotne, gdyż na podstawie zbiorów występujących można stwierdzić, że ich podzbiory również będą występować. Tym sposobem, im większy występujący zbiór zostanie znaleziony wcześniej, tym więcej kombinacji algorytm będzie mógł pominąć. Na potrzeby działania algorytmu określono pojęcie bazowych kombinacji. Bazowa kombinacja jest kombinacją należącą do zbioru występującego (a więc jest zawarta w co najmniej jednym wsparciu t -niezmiennika) i jednocześnie nie są podzbiorem żadnej innej kombinacji występującej, wygenerowanej dla analizowanego zbioru T lub T' . Rozważmy przykład konkretnej kombinacji, np. $\{t_1, t_2\}$. Podzbiór $\{t_1, t_2\} \subseteq s_0$, więc jest zbiorem występującym, występuje w co najmniej jednym z badanych wsparć t -niezmienników i nie jest podzbiorem żadnej innej kombinacji wygenerowanej dla T , dlatego jest bazową kombinacją występującą. Na podstawie tej kombinacji $\{t_1, t_2\}$ można zatem stwierdzić, że wszystkie jej podzbiory także będą zbiorami występującymi i nie trzeba sprawdzać kombinacji $\{t_1\}$ i $\{t_2\}$. Zgodnie z podanym przykładem, $\{t_1\} \subseteq s_0$ oraz $\{t_1\} \subseteq s_2$, podczas gdy $\{t_2\} \subseteq s_0$ oraz $\{t_2\} \subseteq s_3$. Ograniczenie sprawdzania kombinacji tranzycji oparte na zbiorach występujących będzie tym lepsze, im większe będą zbiory występujące. Im większa moc danego zbioru występującego, tym więcej jest jego podzbiorów, które nie wymagają oceny anty-występowania, gdyż wiadomo o nich, że są zbiorami występującymi. Podobnej analogii nie można zastosować do zbiorów niewystępujących. Dokładny schemat działania procesu sprawdzenia anty-występowania znajduje się na Rysunku 5.5.

Uzupełnieniem tego schematu jest Rysunek 5.6, na którym zobrazowano działanie algorytmu w oparciu o przykładowe dane wejściowe. Wspomniany rysunek jest podzielony na kilka części: Rysunek 5.6a) zawiera przykładową kolekcję wsparć t -niezmienników oraz wszystkie wygenerowane kombinacje tranzycji dla całego zbioru tranzycji T . Rysunek 5.6b) zawiera zestaw pytań i powiązanych z nimi scenariuszy działania algorytmu (dotyczy bezpośrednio Rysunku 5.5). Natomiast Rysunek 5.6c) ilustruje zachowanie algorytmu na przykładzie kilku iteracji dla wybranych kombinacji tranzycji (uwzględnione kombinacje: pierwsza – $\{t_0, t_1, t_2\}$, druga – $\{t_1, t_2\}$, piąta – $\{t_2\}$ i siódma – $\{t_0\}$). Wyselekcjonowano kombinacje w taki sposób, aby móc zobrazować różne scenariusze działania.

Dokładny opis działania algorytmu dla wszystkich wygenerowanych kombinacji (będący uzupełnieniem Rysunku 5.6) znajduje się poniżej:

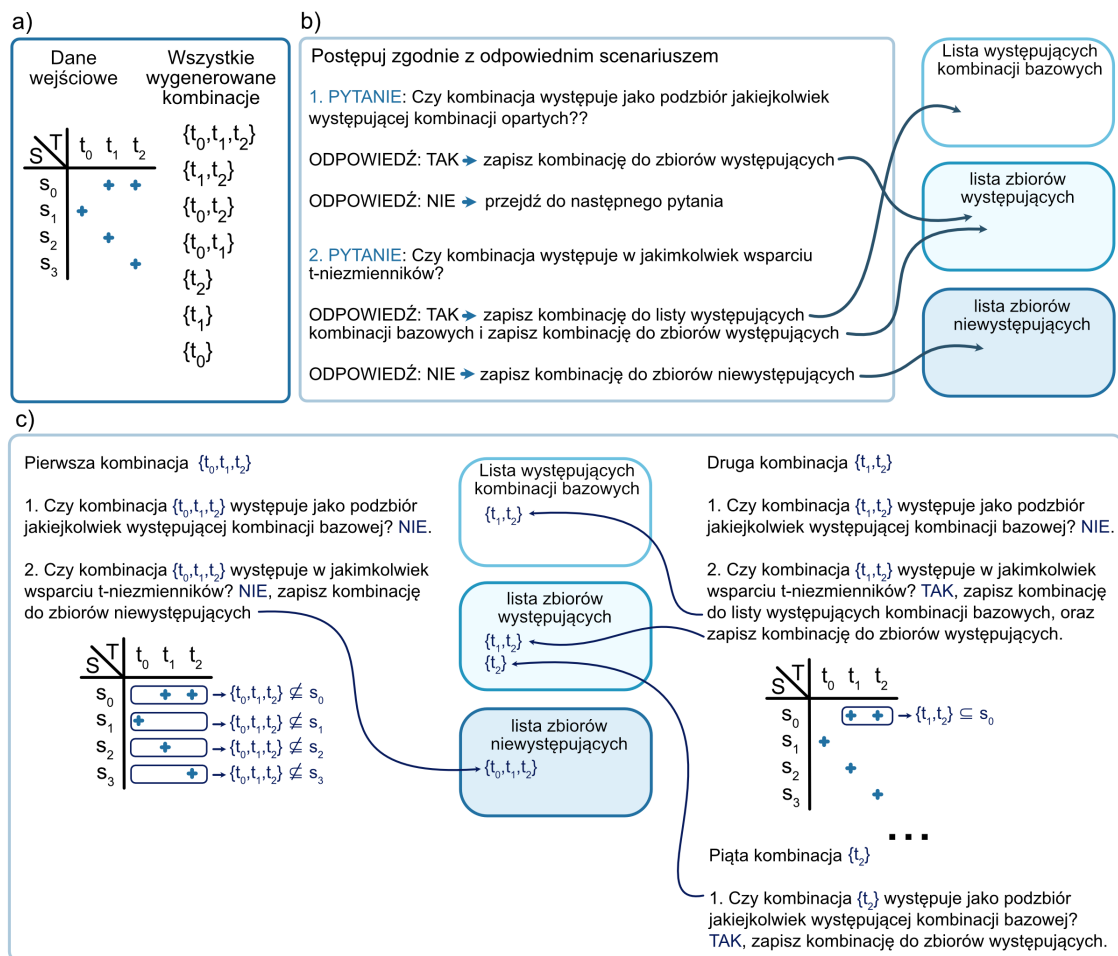
1. Kombinacja $\{t_0, t_1, t_2\}$ jest pierwszą sprawdzaną kombinacją, więc nie można sprawdzić czy jest podzbiorem jakiegokolwiek występującej kombinacji bazowej (odpowiedź NIE na pierwsze pytanie). W związku z tym nie jest możliwe określenie, czy dana kombinacja jest występująca, czy anty-występująca bez jej sprawdzenia. Ocena anty-występowania wskazuje, że kombinacja $\{t_0, t_1, t_2\}$ nie jest zawarta w żadnym ze wsparć t -niezmienników: $\{t_0, t_1, t_2\} \not\subseteq s_0$,



RYСУNEK 5.5: Fragment schematu blokowego działania algorytmu dotyczący oceny anty-występowania z ograniczeniem opartym na podstawie zbiorów występujących. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

$\{t_0, t_1, t_2\} \not\subseteq s_1$, $\{t_0, t_1, t_2\} \not\subseteq s_2$, $\{t_0, t_1, t_2\} \not\subseteq s_3$ (odpowieź NIE na drugie pytanie). Ocena anty-występowania została graficznie przedstawiona na Rysunku 5.6c).

2. Kombinacja $\{t_1, t_2\}$, podobnie jak kombinacja wyżej, nie jest podzbiorem żadnej z występujących kombinacji bazowych (odpowieź NIE na pierwsze pytanie). W związku z tym przeprowadzona zostaje ocena anty-występowania, która wskazuje, że $\{t_1, t_2\}$ jest kombinacją występującą, gdyż występuje we wsparciu s_0 (odpowieź TAK na drugie pytanie). Twierdzącą odpowiedź na pytanie drugie powoduje, iż badana kombinacja zostaje określona jako występująca bazowa kombinacja, a tym samym przyczynia się do ograniczenia liczby sprawdzeń występowania, czyli ograniczenia liczby wykonywanych procedur oceny anty-występowania.
3. Kombinacje $\{t_0, t_2\}$ i $\{t_0, t_1\}$ wymagają zastosowania takiej samej procedury jak dla pierwszej kombinacji ($\{t_0, t_1, t_2\}$). Na dwa kluczowe pytania uzyskana odpowiedź jest negatywna, a więc badane kombinacje należą do zbioru kombinacji anty-występujących.
4. Kombinacja $\{t_2\}$ jest podzbiorem jednej z występujących bazowych kombinacji ($\{t_2\} \subseteq \{t_1, t_2\}$) (odpowieź TAK na pierwsze pytanie). W związku z tym, nie ma konieczności wykonywania oceny anty-występowania, gdyż o danej kombinacji wiadomo, iż jest kombinacją występującą. Taka sama sytuacja dotyczy kombinacji $\{t_1\}$.
5. Kombinacja $\{t_0\}$ nie jest podzbiorem żadnej z występujących kombinacji bazowych (od-



RYСУNEK 5.6: Schemat działania algorytmu w oparciu o przykładowe dane wejściowe. Część a) zawiera charakterystykę danych wejściowych algorytmu i wygenerowane kombinacje, część b) zawiera zestaw warunków (pytań) i związanych z nimi scenariuszy działania dla oceny anty-występowania, a część c) przedstawia kilka iteracji algorytmu dla określonych kombinacji obrazując działanie algorytmu. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

powieź NIE na pierwsze pytanie). W związku z tym kolejnym krokiem jest ocena anty-występowania, która dostarcza informacji, że $\{t_0\}$ jest kombinacją występującą, gdyż występuje we wsparciu s_1 (odpowieź TAK na drugie pytanie).

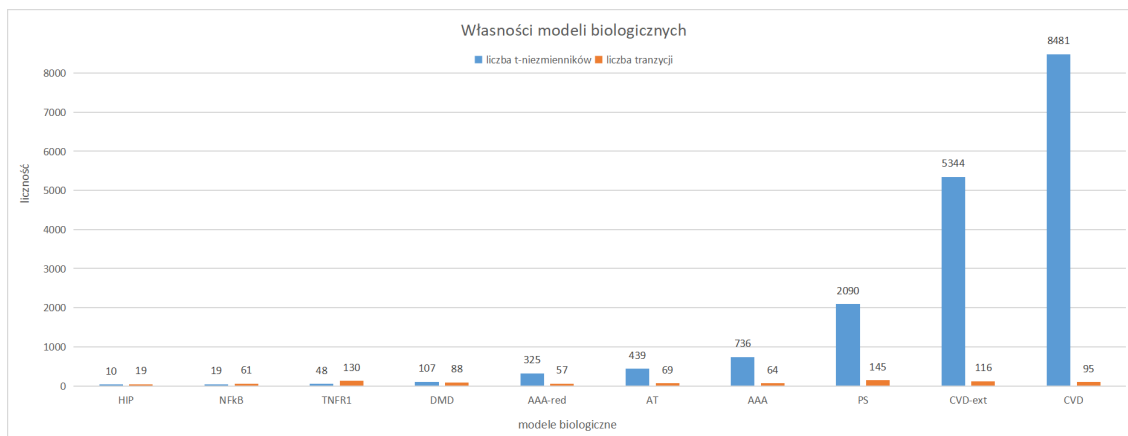
5.3.4 Ewaluacja działania algorytmu

Ewaluacji działania algorytmu dokonano na podstawie dwóch zestawach danych. Pierwszy skupiał rzeczywiste dane wejściowe otrzymane dla modeli złożonych systemów biologicznych opartych o sieci Petriego. Drugi skupiał losowo wygenerowane dane wejściowe. W obu przypadkach dane wejściowe są kolekcjami wsparć t -niezmienników, a więc są zasadniczo zbiorami składającymi się z pewnych tranzycji. Dane rzeczywiste, oparte o istniejące modele biologiczne, charakteryzują się spełnieniem własności pokrycia sieci przez t -niezmienniki, ale własność ta nie jest warunkiem koniecznym. Zestaw danych rzeczywistych oparto a podstawie 10 modeli dotyczących różnych procesów biologicznych, które wymieniono poniżej.

1. HIP – model oparty o sieci Petriego dotyczący odpowiedzi na hipoksję [115].
2. NF κ B – model oparty o sieci Petriego dotyczący kanonicznej i niekanonicznej ścieżki NF- κ B [293].

3. TNFR1 – model oparty o sieci Petriego dotyczący transdukcji sygnału TNFR1 [6].
4. AAA – model oparty o sieci Petriego dotyczący zależności pomiędzy oxLDL a tętniakami aorty brzusznej (pełen model AAA) [105].
5. AAA-red – model oparty o sieci Petriego dotyczący zależności pomiędzy oxLDL a tętniakami aorty brzusznej (zredukowany model AAA) [105].
6. DMD – model oparty o sieci Petriego dotyczący regulacji genów w dystrofii mięśniowej Duchenne’a [92],
7. AT – model oparty o sieci Petriego dotyczący wybranego fragmentu metabolizmu *Arabidopsis thaliana*; do badań wykorzystano tylko jeden moduł (podsieć cytrynianów) z całego modelu opublikowanego w [147].
8. PS – model oparty o sieci Petriego dotyczący wybranych aspektów stanów protrombotycznych, zapalenia i stresu oksydacyjnego [98].
9. CVD – model oparty o sieci Petriego dotyczący wpływu uszkodzenia śródbłonna na rozwój miażdżycy (podstawowy model CVD) [30].
10. CVD-ext – model oparty o sieci Petriego dotyczący wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonna i rozwój miażdżycy (rozszerzony model CVD) [31].

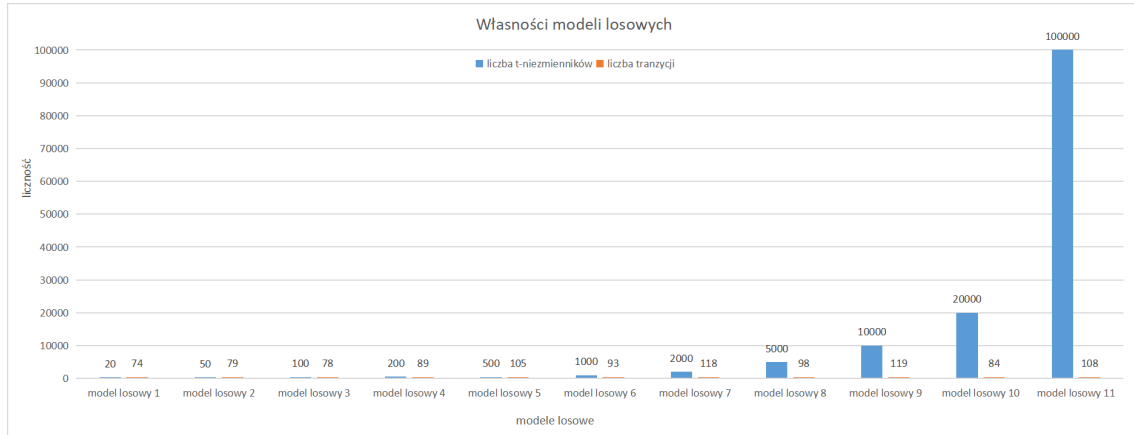
Dodatkowe informacje o własnościach powyższych modeli zawarto na Rysunku 5.7, gdzie wyróżniono liczbę tranzycji i liczbę t -niezmienników. Skrótów nazw pojawiających się na Rysunku 5.7 są spójne z nazwami zawartymi w powyżej i wskazują na znaczenie biologiczne modeli. Na wykresie zawartym na Rysunku 5.7 kolejność występowania kolejnych słupków związana jest z rosnącą liczbą t -niezmienników.



RYSUNEK 5.7: Właściwości analizowanych modeli biologicznych (rzeczywiste dane wejściowe). Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

Oprócz istniejących biologicznych danych wejściowych, do oceny działania algorytmu wykorzystano także losowo wygenerowane dane wejściowe. Wygenerowano 10 losowych kolekcji wsparć t -niezmienników, które nazywane są modelami losowymi o numerach od 1 do 10. Dla wspomnianych modeli liczba t -niezmienników została ustalona arbitralnie celem zbadania odpowiedniego zakresu t -niezmienników. Natomiast liczba tranzycji, licznosc wsparć poszczególnych t -niezmienników jak i ich zawartość określono losowo. Liczba tranzycji została wylosowana w zakresie od 70 do 120,

gdz są to zakresy odpowiadające w dużej mierze liczbie tranzycji zawartych w modelach biologicznych. Własności modeli losowych zawarto na Rysunku 5.8, gdzie wyróżniono liczbę tranzycji i t -niezmienników.



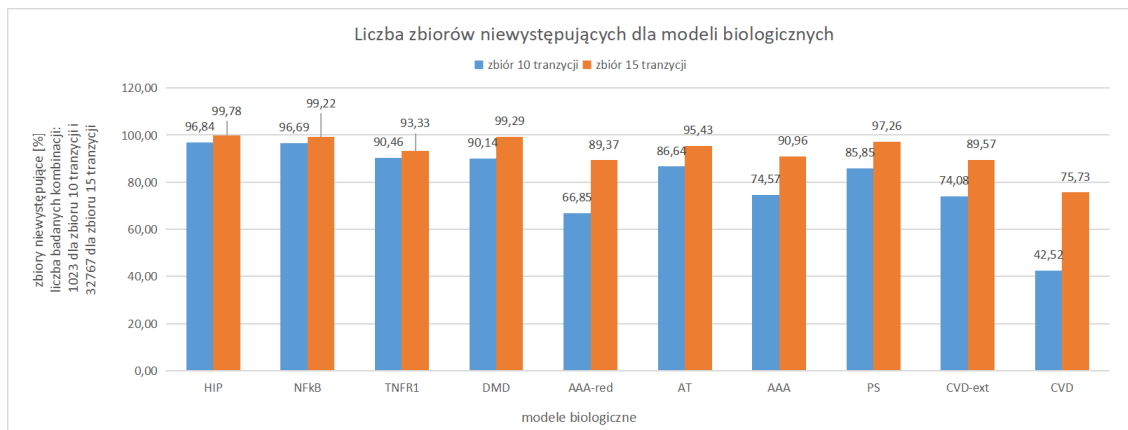
RYСУNEK 5.8: Właściwości analizowanych modeli losowych (wygenerowane dane wejściowe). Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

Dla każdego modelu (zarówno biologicznego, jak i losowego) wygenerowano także pewne zbiory tranzycji T' , określane wybranymi zbiorami tranzycji, które są podzbiorami zbioru tranzycji T ($T' \subseteq T$). Uściślając, dla każdego modelu wygenerowano losowo 10 różnych wybranych podzbiorów tranzycji o mocy równej 10 oraz 10 różnych wybranych podzbiorów tranzycji o mocy równej 15 (wyniki w tym podrozdziale są uśrednione dla tych 10 obserwacji). Zatem, dla każdego modelu wykonano 20 powtórzeń z innym zestawem wybranych tranzycji (10 powtórzeń dla zbioru tranzycji T' , gdzie $|T'| = 10$, oraz 10 powtórzeń dla zbioru tranzycji T' , gdzie $|T'| = 15$).

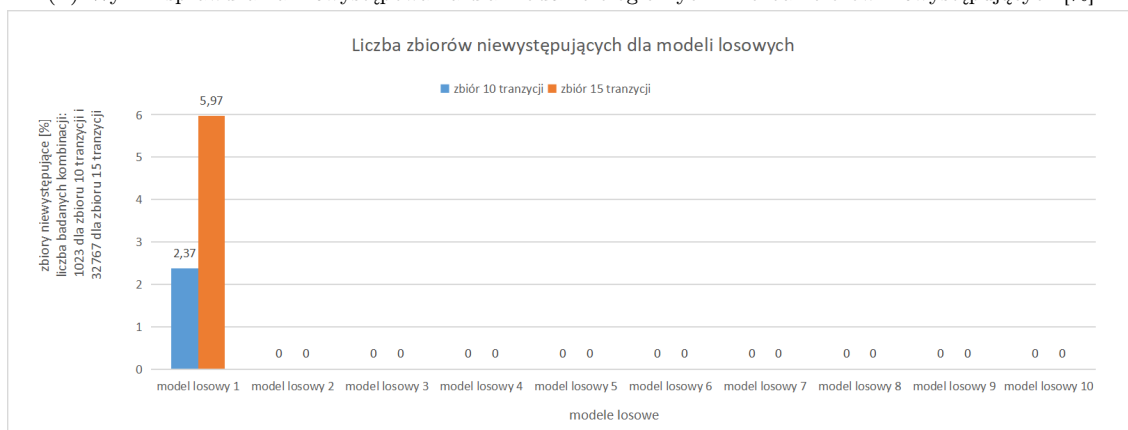
Dla opisanych powyżej zestawów danych wejściowych uruchomiono algorytm pozwalający na ocenę niewystępowania dla wszystkich podzbiorów tranzycji wygenerowanych dla wybranych zbiorów tranzycji T' o wielkości 10 i 15 tranzycji. Wyniki te znajdują się na Rysunku 5.9, który został podzielony na część dotyczącą wyników niewystępowania dla modeli biologicznych (Rysunek 5.9a) oraz część dotyczącą wyników niewystępowania dla modeli losowych (Rysunek 5.9b). Liczbę zbiorów niewystępujących przedstawiono w procentach, gdyż pozwala to na porównanie wyników dla zbiorów T' o różnej mocy. Dla zbioru T' , gdzie $|T'| = 10$ liczba wszystkich możliwych kombinacji wynosi 1023 (dla przypomnienia, nie uwzględnia się \emptyset), a dla $|T'| = 15$ liczba wszystkich możliwych kombinacji wynosi 32767. Jak można zauważyć na Rysunku 5.9a, dla modeli biologicznych zbiorów niewystępujących jest więcej dla wybranych zbiorów tranzycji o licznosci równej 15, ale nie jest to wynik zaskakujący. Ważniejszy jest wniosek, iż nie ma tu tendencji, zgodnie z którą można by wysnuć wniosek, że im więcej t -niezmienników (im większa kolekcja wsparć t -niezmienników), tym więcej jest zbiorów niewystępujących. Wydaje się, że liczba zbiorów niewystępujących jest zależna od natury badanego zjawiska, podobnie jak liczba t -niezmienników. Natomiast wyniki niewystępowania dla modeli losowych, przedstawione na Rysunku 5.9b, są zdecydowanie bardziej specyficzne, gdyż na 10 modeli losowych tylko 1 z nich zawiera zbiory niewystępujące. Wydaje się zatem, że należałoby lepiej zrozumieć naturę t -niezmienników, które pokrywają modele złożonych systemów biologicznych.

Aby lepiej zrozumieć, z czego wynikają uzyskane wyniki, przeanalizowano właściwości wsparć t -niezmienników, przez co rozumie się średnią, minimalną i maksymalną liczbę tranzycji zawartych we wsparciach dla danego modelu. Wyniki opisanych charakterystyk zawarto w Tabeli 5.8.

Jak można zauważyć na podstawie Tabeli 5.8, maksymalna liczba tranzycji zawarta we wsparciach t -niezmienników w modelach biologicznych stanowi około 30-60% wszystkich tranzycji. Na



(A) Wyniki sprawdzania niewystępowania dla modeli biologicznych – liczba zbiorów niewystępujących [%].



(B) Wyniki sprawdzania niewystępowania dla modeli losowych – liczba zbiorów niewystępujących [%].

RYСУNEK 5.9: Liczba zbiorów niewystępujących dla wszystkich możliwych kombinacji wygenerowanych na podstawie podzbiorów tranzycji T' , gdzie $|T'| = 10$ i $|T'| = 15$. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

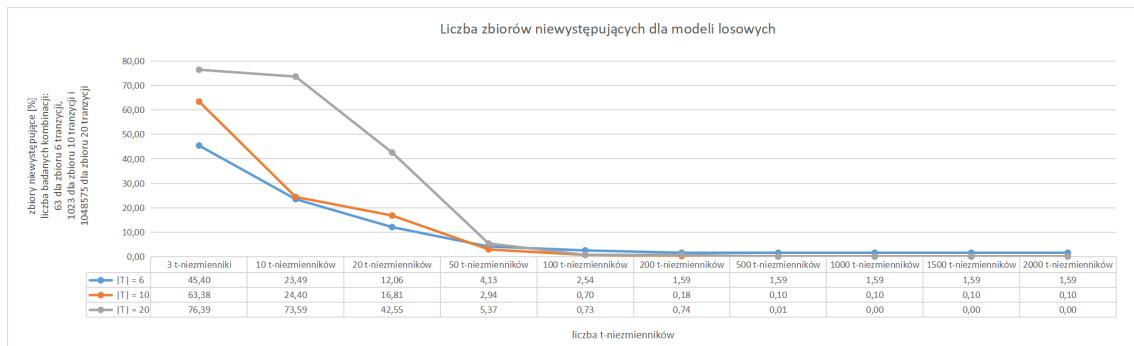
przykład dla modelu biologicznego *AAA-red* maksymalna liczba tranzycji zawarta we wsparciach t-niezmienników wynosi 32 tranzycje, podczas gdy liczba wszystkich tranzycji tego modelu wynosi 57. Oznacza to, że tranzycje należące do wsparcia t-niezmiennika o największej liczności dla modelu *AAA-red* stanowią 56,14% wszystkich tranzycji tego modelu. Właściwości wsparć t-niezmienników dla modeli losowych charakteryzują się większą maksymalną liczbą tranzycji. Co więcej, maksymalna liczba tranzycji zawartych we wsparciach t-niezmienników w modelach losowych obejmuje ponad 95% wszystkich tranzycji. Własności te potwierdzają, że uzyskana liczba zbiorów niewystępujących zależy od natury t-niezmienników.

Jako że wśród losowych zestawów danych zbiory niewystępujące pojawiły się tylko w jednym przypadku na dziesięć, przeprowadzono jeszcze jedno badanie dla danych losowych. Nadmienić trzeba, że wyniki otrzymano dla każdego modelu, dla którego wykonano 20 powtórzeń z różnym zestawem tranzycji (10 powtórzeń dla zbioru tranzycji T' o mocy 10 oraz 10 powtórzeń dla zbioru tranzycji T' o mocy 15). Badane zbiory wybranych tranzycji T' , niezależnie od wielkości, są podzbiorem oryginalnego zbioru tranzycji T . Obok analiz na wybranych zbiorach tranzycji T' , wykonano także analizy dla całego zbioru T o mocy $|T| = 6$, $|T| = 10$ i $|T| = 20$, a więc liczba wszystkich możliwych kombinacji wynosi odpowiednio 1023, 1 048 575 i 1 073 741 823. Takie zbiory tranzycji testowano dla kolekcji wsparć t-niezmienników zawierających 3, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 oraz 2000 t-niezmienników i wyniki uśredniono dla 5 powtórzeń. Efekty tego badania znajdują się na Rysunku 5.10, gdzie widać, że liczba zbiorów niewystępujących spada wraz

TABELA 5.8: Właściwości wsparć t-niezmienników dla modeli biologicznych i losowych. Tabela pochodzi z pracy [102].

	Liczba t-niezmienników	Liczba tranzycji	Właściwości wsparć t-niezmienników		
			minimalna liczba zawartych tranzycji	maksymalna liczba zawartych tranzycji	średnia liczba zawartych tranzycji
Modele biologiczne					
HIP	10	19	2	7	2,80
NFkB	19	61	2	20	6,21
TNFR1	48	130	2	67	37,71
DMD	107	88	3	32	20,54
AAA-red	325	57	4	32	22,66
AT	439	69	2	32	22,45
AAA	736	64	4	32	23,78
PS	2090	145	3	71	48,96
CVD-ext	5344	116	3	61	42,77
CVD	8481	95	3	52	41,44
Modele losowe					
model losowy 1	20	74	7	71	40,25
model losowy 2	50	79	7	77	39,72
model losowy 3	100	78	1	77	36,37
model losowy 4	200	89	1	88	44,42
model losowy 5	500	105	1	104	52,59
model losowy 6	1000	93	1	92	47,64
model losowy 7	2000	118	1	117	59,60
model losowy 8	5000	98	1	97	48,83
model losowy 9	10000	119	1	118	59,68
model losowy 10	20000	84	1	83	41,83

z większą liczbą t-niezmienników. Zatem tendencja uzyskana dla zbiorów wybranych tranzycji T' oraz dla zbiorów tranzycji T jest podobna.



RYСУNEK 5.10: Liczba zbiorów niewystępujących dla wszystkich możliwych kombinacji wygenerowanych na podstawie oryginalnego zbioru tranzycji T , gdzie $|T| = 6$, $|T| = 10$ i $|T| = 20$. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

Poza zidentyfikowaniem zbiorów niewystępujących dla modeli biologicznych i losowych, badania skupiały się na czasie działania zaproponowanego algorytmu. Rozważano kilka wariantów algorytmu, które różniły się zastosowanymi ograniczeniami. W wariantach tych uwzględniono ograniczenie sprawdzenia kombinacji i sortowanie kolekcji wsparć t -niezmienników. Ograniczenia te mają na celu przyspieszenie otrzymania wyników. Uzyskane rezultaty przedstawiono na dwóch grupach wykresów: wykresy dotyczące modeli biologicznych znajdują się na Rysunku 5.11, a wykresy dotyczące modeli losowych znajdują się na Rysunku 5.12. W obu tych przypadkach wyróżnia się cztery różne wykresy dotyczące sprawdzenia różnych wariantów głównej metody, w tym: metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji tranzycji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników (Rysunek 5.11a i 5.12a), metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji tranzycji, ale z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników (Rysunek 5.11b i 5.12b), metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji, ale bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników (Rysunek 5.11c i 5.12c), metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników (Rysunek 5.11d i 5.12d). Dla wspomnianych wyżej metod obliczono czasy sprawdzania zbiorów niewystępujących dla wszystkich możliwych kombinacji wygenerowanych na podstawie podzbiorów tranzycji T' , gdzie rozważano wariant, dla którego $|T'| = 10$ i $|T'| = 15$. Każdy wykres zawiera punkty oznaczające czasy, które wyróżniono czterema kolorami: punkty niebieskie – czas trwania metody sprawdzania niewystępowania dla $|T'| = 10$, pomarańczowe – czas trwania całego algorytmu dla $|T'| = 10$, szare – czas trwania metody sprawdzania niewystępowania dla $|T'| = 15$, a żółte – czas trwania całego algorytmu dla $|T'| = 15$. Czas trwania metody uwzględnia jedynie zasadniczą część algorytmu (metoda sprawdzania zbiorów niewystępujących) oraz zapisanie wyników (zarówno pliku ze zbiorami niewystępującymi jak i występującymi). Natomiast czas trwania całego algorytmu uwzględnia również czas odczytu danych wejściowych i wybranych zbiorów tranzycji z plików, czas sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników (jeśli dotyczy) oraz zapis pliku podsumowującego wyniki. Ze względu na znaczne różnice w czasach i trudności w dopasowaniu skali, każdy punkt na wykresie jest również zawarty w formie tabelarycznej bezpośrednio pod wykresem. Wyniki znajdujące się w tabelach umieszczonych na wykresach są wynikami uśrednionymi dla 10 powtórzeń dla każdego modelu (dla każdego modelu o określonej liczbie tranzycji i t -niezmienników generowano 10 losowych podzbiorów tranzycji T' o mocy 10 i 10 losowych podzbiorów tranzycji T' o mocy 15). Każda kolumna w takiej tabeli odpowiada konkretnemu modelowi, a wiersze odpowiadają czasom działania dla danej metody lub całego algorytmu z uwzględnieniem różnych wybranych podzbiorów tranzycji T' . Jako że nie wszystkie punkty są dobrze widoczne przy zastosowanych skalach, w niektórych przypadkach dołączono również powiększenia wybranych części wykresu, co oznaczono za pomocą granatowej ramki z dostosowaną skalą i nazwą modeli, których dotyczą. Czasy obliczeń algorytmu analizowano przy użyciu komputera z następującymi parametrami: procesor i5-10210U 2.11GHz oraz 12 GB pamięci RAM.

1. Ocena czasu działania algorytmu i metody oceniającej niewystępowanie dla modeli biologicznych

- a. **Metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji, ale z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.11a kontra 5.11b):

W przypadku 4 na 10 modeli biologicznych dla wybranego zbioru tranzycji o liczności równej 10 ($|T'| = 10$), czasy działania metody oceniającej niewystępowanie z sortowaniem są niższe. W pozostałych modelach obserwuje się nieznaczny wzrost w przedziale od 1 do

22 milisekund. Istotne jest, że niższe czasy zaobserwowano dla większych kolekcji wsparć t -niezmienników od około 700 t -niezmienników. Można zatem stwierdzić, że sortowanie kolekcji wsparć t -niezmienników przyspiesza metodę dla odpowiednio dużych kolekcji.

Dla wybranego zbioru tranzycji o liczności równej 15 ($|T'| = 15$) wyniki wyglądają trochę inaczej. W przypadku 3 na 10 modeli czasy działania metody oceniającej niewystępowanie z sortowaniem są niższe, ale dla kolekcji wsparć t -niezmienników o małym wymiarze, w tym przypadku sortowanie nie poprawia znacząco czasu działania metody. Jednakże, analizując czasy działania całego algorytmu można zauważyć, że czas sortowania nie wpływa znacząco na wydłużenie czasu działania całego algorytmu dla średniej wielkości kolekcji wsparć t -niezmienników, dopiero dla większych kolekcji powyżej kilku tysięcy t -niezmienników (tylko dla $|T'| = 15$) czasy rosną od około 18 do 28 sekund (dokładniej dla danych wejściowych zawierających odpowiednio 2090, 5344 i 8481 t -niezmienników), co jest spodziewane.

- b. **Metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji, ale bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.11c kontra 5.11d):

W większości modeli biologicznych, tj. w 7 przypadkach na 10 modeli dla $|T'| = 10$, oraz w 10 przypadkach na 10 modeli dla $|T'| = 15$, czasy działania metody oceniającej niewystępowanie z sortowaniem są niższe. W odróżnieniu od pierwszego przypadku opisanego powyżej (patrz podpunkt a.), tutaj porównywane są metody z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji, a więc porównanie dotyczy metody z jednym ograniczeniem i z dwoma ograniczeniami, w efekcie czego można powiedzieć, że oba stosowane ograniczenia poprawiają czasy działania samej metody oceniającej niewystępowanie. Ponadto, analizując czasy działania całego algorytmu, w 5 przypadkach na 10 dla $|T'| = 10$ i w 10 przypadkach na 10 dla $|T'| = 15$ uzyskano niższe czasy, a zatem koszt sortowania t -niezmienników jest stosunkowo niski i wart zastosowania.

- c. **Metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.11a kontra 5.11c):

W porównaniu metody niezawierającej żadnych ograniczeń i metody zawierającej tylko ograniczenie dotyczące sprawdzania kombinacji tranzycji można zauważyć pewne rozbieżności dla różnych wielkości zbiorów wybranych tranzycji. W 4 przypadkach na 10 modeli dla $|T'| = 10$ czasy działania metody z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji są niższe (dla pozostałych modeli te czasy są nieznacznie wyższe, od kilku do kilkunastu milisekund). Natomiast w 10 przypadkach na 10 modeli dla $|T'| = 15$ te czasy są wyższe. Różnice te wynikają z liczby zbiorów występujących charakteryzujących poszczególne modele. Jak wcześniej wspomniano ograniczenie metody sprawdzania kombinacji tranzycji opiera się o zbiory występujące – im więcej zbiorów występujących, tym szybciej zadziała metoda sprawdzania, gdyż będzie zmuszona ocenić zdecydowanie mniejszą liczbę kombinacji. Liczby zbiorów niewystępujących są zawarte na Rysunku 5.9a, który potwierdza, że w przypadku uruchomienia algorytmu dla $|T'| = 15$ w 10 przypadkach na 10, liczba zbiorów niewystępujących jest większa niż w przypadku $|T'| = 10$. Co więcej, można zauważyć, że w 5 przypadkach na 10, liczba zbiorów niewystępujących stanowi ponad 95% wszystkich kombinacji, w 4 przypadkach 10 stanowi ponad 89%, a w 1 przypadku na 10 stanowi

ponad 75%. Na wspomnianym Rysunku 5.9a liczba zbiorów niewystępujących wyrażona jest w procentach, aby móc porównać wyniki dla różnych liczości wybranych zbiorów T' . Ponadto, na podstawie liczby zbiorów niewystępujących można określić liczbę zbiorów występujących, a więc dzięki informacjom zawartym na Rysunku 5.9a można oszacować, że liczba zbiorów występujących dla $|T'| = 15$ jest mniejsza niż w przypadku $|T'| = 10$. Dokładniej, liczba zbiorów występujących w porównaniu do liczby zbiorów niewystępujących dla $|T'| = 15$ jest mniejsza niż w przypadku $|T'| = 10$. Oznacza to, że metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji może być mniej efektywna dla $|T'| = 15$ niż dla $|T'| = 10$.

- d. **Metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji, ale z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.11b kontra 5.11d):

Porównanie wyników dla metody zawierającej jedno ograniczenie (sortowanie kolekcji wsparć t -niezmienników) i metody zawierającej dwa ograniczenia (ograniczenie sprawdzania kombinacji i sortowanie) pozwala uzyskać podobne wyniki. W 6 przypadkach na 10 modeli dla $|T'| = 10$, oraz w 5 przypadkach na 10 modeli dla $|T'| = 15$ uzyskano czasy niższe dla działania metody z dwoma ograniczeniami.

Różnice w czasach, tak jak wspomniano w podpunkcie c. wynikają z liczby zbiorów występujących dla poszczególnych modeli. Jednak należy zauważyć zdecydowanie większy niż w innych przypadkach zysk czasowy (od około 11 do ponad 15 sekund) dla dużych rozmiarów danych wejściowych przy $|T'| = 15$ (patrz modele: PS - 2090 t -niezmienników, CVD-ext - 5344 t -niezmienników i CVD - 8481 t -niezmienników), co stanowi istotną przewagę w kontekście użycia metod z dwoma ograniczeniami w porównaniu z jednym ograniczeniem.

2. Ocena czasu działania algorytmu i metody oceniającej niewystępowanie dla modeli losowych

- a. **Metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji, ale z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.12a kontra 5.12b):

We wszystkich przypadkach, zarówno w 10 na 10 modeli losowych dla $|T'| = 10$, jak i w 10 na 10 modeli losowych dla $|T'| = 15$ zaobserwowano niższe czasy działania metody oceniającej niewystępowanie z sortowaniem, co jest zgodne z założeniem, iż sortowanie kolekcji wsparć t -niezmienników przyspiesza metodę.

Ponadto, czasy działania całego algorytmu w 5 przypadkach na 10 modeli dla $|T'| = 10$ oraz we wszystkich przypadkach dla $|T'| = 15$ są niższe dla metody z sortowaniem. Dzieje się tak z uwagi na przyspieszenie oceny niewystępowania przez sortowanie; sama metoda działa na tyle szybko, że sortowanie w większości przypadków nie spowalnia czasu działania całego algorytmu. Przeanalizowano, że sortowanie spowalnia cały algorytm maksymalnie o około 3 sekundy dla największej kolekcji wsparć t -niezmienników (CVD - 8481 t -niezmienników, dla $|T'| = 15$).

- b. **Metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji, ale bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.12c kontra 5.12d):

W 7 przypadkach na 10 modeli losowych dla $|T'| = 10$ oraz w 5 przypadkach na 10 modeli losowych dla $|T'| = 15$ czasy działania metody oceniającej niewystępowanie z sortowaniem są niższe, a więc podobnie jak w podpunkcie a. jest to zgodne z założeniem, iż sortowanie kolekcji wsparć t -niezmienników przyspiesza metodę. W odróżnieniu powyższego przypadku (podpunkt a.), tutaj porównywane są metody z ograniczeniem sprawdzania kombinacji, a więc porównanie dotyczy metody z jednym ograniczeniem i z dwoma ograniczeniami, w efekcie czego można powiedzieć, że oba stosowane ograniczenia poprawiają czasy działania samej metody oceniającej niewystępowanie.

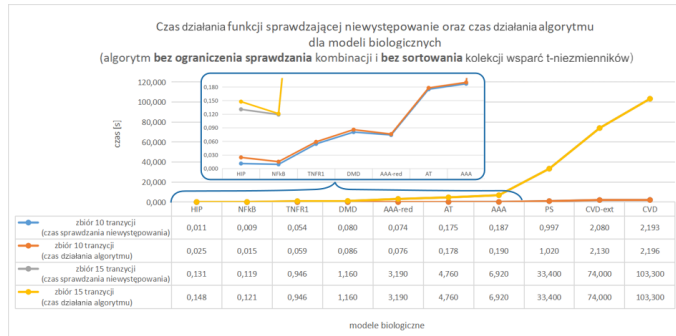
Natomiast analizując czasy działania całego algorytmu można zauważyć, że w przypadku 3 na 10 modeli dla $|T'| = 10$ i w przypadku 4 na 10 modeli dla $|T'| = 15$ uzyskano niższe czasy. Wyniki te są gorsze niż wyniki uzyskane dla modeli biologicznych, jednak wielkości badanych losowych danych wejściowych są większe. Wzrost czasu działania algorytmu przekracza 1 sekundę dopiero dla danych zawierających 10 tysięcy t -niezmienników, a w pozostałych nie przekracza nawet 1 sekundy. Wyniki te potwierdzają, że metoda z dwoma ograniczeniami jest korzystniejsza niż z jednym ograniczeniem.

- c. **Metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.12a kontra 5.12c):

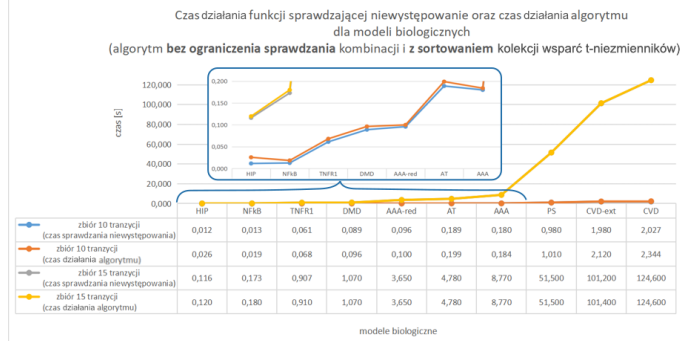
Porównanie metody niezawierającej żadnych ograniczeń i metody zawierającej tylko ograniczenie sprawdzania kombinacji wykazało, że we wszystkich przypadkach (10 na 10 modeli losowych dla $|T'| = 10$ oraz 10 na 10 modeli losowych dla $|T'| = 15$) zaobserwowano niższe czasy działania dla metody oceniającej niewystępowanie z ograniczaniem. Wyniki te są zgodne z charakterystyką modeli losowych, gdyż jak wskazuje Rysunek 5.9b, w większości przypadków nie istnieją żadne zbiory niewystępujące. Oznacza to, że metoda ograniczająca działająca na bazie zbiorów występujących działa dla swojego najlepszego przypadku (sprawdza tylko jedną kombinację).

- d. **Metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji tranzycji, ale z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników kontra metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników** (Rysunek 5.12b kontra 5.12d):

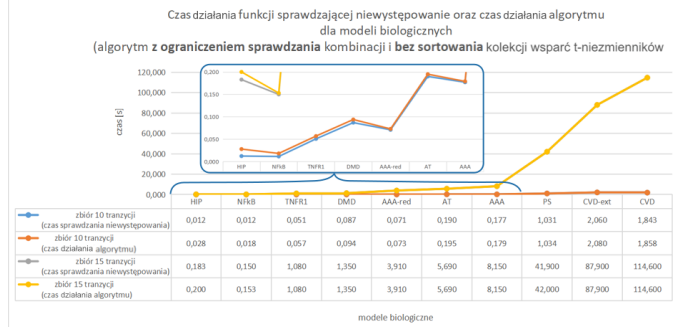
Porównanie metody zawierającej jedno ograniczenie (sortowanie kolekcji wsparć t -niezmienników) i metody zawierającej dwa ograniczenia (ograniczenie sprawdzania kombinacji tranzycji i sortowanie) wykazało, że we wszystkich przypadkach (10 na 10 modeli losowych dla $|T'| = 10$ oraz 10 na 10 modeli losowych dla $|T'| = 15$) zaobserwowano niższe czasy działania dla metody oceniającej niewystępowanie z ograniczaniem. Wyniki są dokładnie takie jak wyżej (patrz podpunkt c.) i w większości przedstawiają działanie metody dla najlepszego przypadku.



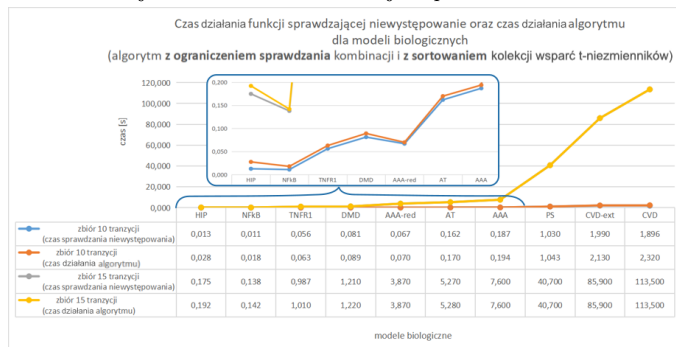
(A) Metoda sprawdzania niewystępowania bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników.



(B) Metoda sprawdzania niewystępowania bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników.

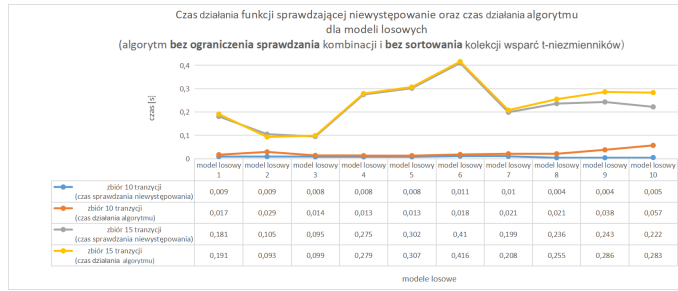


(C) Metoda sprawdzania niewystępowania z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników.

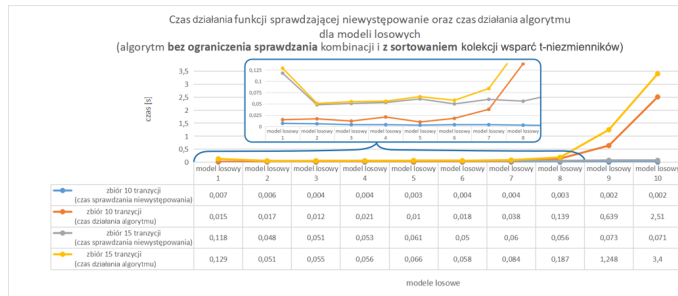


(D) Metoda sprawdzania niewystępowania z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników.

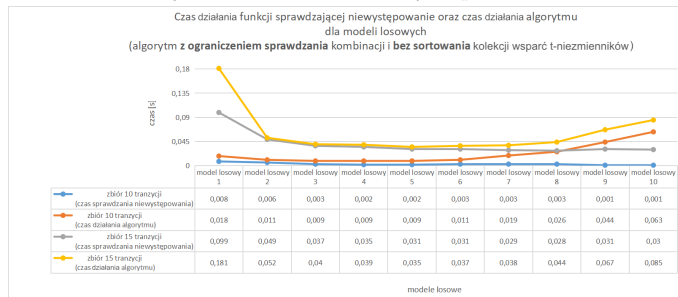
RYСУNEK 5.11: Czasy działania algorytmu i czasy działania metody sprawdzającej niewystępowanie dla wszystkich możliwych kombinacji wygenerowanych na podstawie podzbiorów tranzycji T' , gdzie $|T'| = 10$ i $|T'| = 15$. Czasy wygenerowano dla różnych wariantów algorytmu dla modeli biologicznych. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].



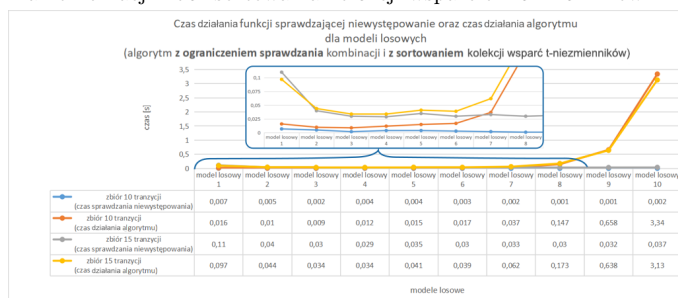
(A) Metoda sprawdzania niewystępowania bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników.



(B) Metoda sprawdzania niewystępowania bez ograniczenia sprawdzania kombinacji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników.



(C) Metoda sprawdzania niewystępowania z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników.



(D) Metoda sprawdzania niewystępowania z ograniczeniem sprawdzania kombinacji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników.

RYСУNEK 5.12: Czasy działania algorytmu i czasy działania metody sprawdzającej niewystępowanie dla wszystkich możliwych kombinacji wygenerowanych na podstawie podzbiorów tranzycji T' , gdzie $|T'| = 10$ i $|T'| = 15$. Czasy wygenerowano dla różnych wariantów algorytmu dla modeli losowych. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [102].

5.3.5 Konkluzje

Kompleksowa analiza złożonych zjawisk biologicznych jest niezwykle trudna. Wydaje się, że znalezienie procesów elementarnych, które nie wpływają na podprocesy należące do całego badanego systemu, może mieć istotne znaczenie. Znajdowanie takich niewystępujących zbiorów tranzycji wydaje się być równie ważne jak poszukiwanie zbiorów występujących. Umożliwienie przeprowadzenia głębokiej analizy t -niezmienników może być szczególnie przydatne w poszukiwaniu celów terapeutycznych i może ułatwić opracowanie nowych, skuteczniejszych terapii. Wydaje się zatem, że rozważania kombinatorycznych problemów występowania i niewystępowania pewnych podzbiorów tranzycji we wsparciach t -niezmienników są niezwykle istotne. Opisane badania dotyczą rozwiązania tylko jednego z wybranych problemów – problemu poszukiwania podzbiorów tranzycji niewystępujących w żadnym ze wsparć t -niezmienników. W niniejszym podrozdziale przedstawiono dowód **NP**-zupełności i silnej **NP**-zupełności dla wspomnianego problemu i jednego z jego wariantów. Następnie przedstawiono rozwiązanie problemu za pomocą dokładnego algorytmu, który efektywnie nadaje się do rozwiązywania rzeczywistych danych biologicznych, gdyż przedmiotem poszukiwań są zbiory anty-występujące o relatywnie małej wielkości. W tych badaniach rozważano zbiory tranzycji o liczności od 6 do 20 tranzycji, które przetestowano metodą poszukiwania zbiorów niewystępujących w kilku wariantach: metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji tranzycji i bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników, metoda bez ograniczenia sprawdzania kombinacji tranzycji, ale z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników, metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji, ale bez sortowania kolekcji wsparć t -niezmienników, metoda z ograniczeniem sprawdzania kombinacji tranzycji i z sortowaniem kolekcji wsparć t -niezmienników. Przez sortowanie rozumie się ułożenie wsparć t -niezmienników w kolejności od największego (zawierającego najwięcej tranzycji) do najmniejszego (zawierającego najmniej tranzycji).

Wyniki badania różnych wariantów metody pozwoliły potwierdzić, iż metoda ograniczenia sprawdzania kombinacji tranzycji jest tym bardziej skuteczna, im więcej dany model zawiera zbiorów występujących. Porównanie modeli biologicznych i losowych w tym aspekcie pokazało, iż te pierwsze zawierają więcej zbiorów niewystępujących. Ponadto, w modelach losowych liczba zbiorów niewystępujących maleje wraz ze wzrostem liczby wsparć t -niezmienników. Co więcej, kolejne ograniczenie, jakim jest sortowanie wsparć t -niezmienników, ma na celu zwiększenie prawdopodobieństwa jak najszybszego znalezienia zbiorów występujących i tym samym wcześniejszego ograniczenia liczby sprawdzanych kombinacji tranzycji. Uzasadnienie zastosowania sortowania zależy jednak od natury wsparć t -niezmienników. W procesach biologicznych często wsparcia t -niezmienników zawierają podobną liczbę tranzycji i tym samym nie dochodzi do znacznego zwiększenia wspomnianego prawdopodobieństwa.

Jednakże wykazano, iż sortowanie może poprawiać wyniki. Co więcej, sortowanie wsparć t -niezmienników w badanych danych nie wpływa znacząco na wydłużenie czasu działania algorytmu. Wydaje się, że uzyskane czasy działania są akceptowalne dla testowanych wielkości danych wejściowych, zwłaszcza dla modeli dotyczących rzeczywistych zjawisk biologicznych.

Ewentualne, przyszłe badania mogłyby dotyczyć zaproponowania algorytmu heurystycznego, gdyż mogą pojawić się modele złożonych systemów biologicznych o wyjątkowo dużych rozmiarach danych wejściowych. Wówczas zaproponowany algorytm dokładny może nie będzie odpowiedni z uwagi na czas działania. Tudzież, do rozważenia i rozwiązania pozostają inne problemy anty-występowania podzbiorów tranzycji.

5.4 Podsumowanie i dalsze motywacje

W rozdziale 5 opisano problemy występowania i anty-występowania zbiorów tranzycji, dla wybranych z nich przeanalizowano złożoności i zaproponowano rozwiązania algorytmiczne. Rozwiązania te mogą zostać wykorzystane jako metody analizy modeli złożonych systemów biologicznych opartych o sieci Petriego.

Pierwszy z algorytmów, dotyczący poszukiwania pewnych, odpowiednio dużych podzbiorów tranzycji, zawartych w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników jest algorytmem heurystycznym opartym na przeszukiwaniu tabu i ma na celu znalezienie istotnego, z punktu widzenia funkcjonowania modelu, zbioru tranzycji. Oczywiście ze względu na specyfikę, otrzymane rozwiązanie jest rozwiązaniem przybliżonym. Może jednak stanowić dopełnienie analiz strukturalnych. Rozszerzeniem rozwiązań dla problemów występowania jest analiza występowania, oparta na algorytmie dokładnym. Oprócz analizy dla wszystkich możliwych podzbiorów procesów elementarnych, analiza ta może zostać ograniczona do konkretnych kryteriów. Niewątpliwie analiza ta dostarcza dodatkowych informacji o kluczowych procesach, umożliwiając także ograniczenie się do procesów o konkretnej ważności. Powyższe rozwiązania pozwalają na szukanie elementów mających wpływ i tworzących zależności pomiędzy większymi procesami należącymi do analizowanego systemu. Dopełnieniem tej analizy wydaje się poszukiwanie zbiorów tranzycji anty-występujących, takich za pośrednictwem których pewne podprocesy nie mogą oddziaływać. Problem znalezienia anty-występujących zbiorów tranzycji, a więc zbiorów tranzycji, które nie występują w żadnym ze wsparć t-niezmienników, został rozwiązany za pomocą algorytmu dokładnego. Wszystkie dokładne rozwiązania przeanalizowano na rzeczywistych danych biologicznych i oceniono ich skuteczność. Jednakże może się okazać, że w przyszłości pojawią się bardziej złożone układy biologiczne, zawierające nie tylko więcej komponentów aktywnych, ale także więcej t-niezmienników i wtedy dokładne rozwiązania nie będą wystarczające. Świadczy o tym także złożoność analizowanych problemów. Zatem dalszą motywacją mogłoby być rozwinięcie istniejącego algorytmu heurystycznego dla problemu występowania, w tym zaproponowanie algorytmów maksymalizujących konkretne parametry, oraz zaproponowanie algorytmu heurystycznego dla problemu anty-występowania. W dalszym ciągu pozostają do rozważenia także inne problemy występowania i anty-występowania, które mogą dopełniać strukturalną analizę modeli opisanych formalizmem sieci Petriego.

Rozdział 6

Inne podejścia systemowe – modelowanie oparte o macierzowy model dynamiki populacji oraz porównanie metod modelowania opartego o sieci Petriego i równania różniczkowe zwyczajne

6.1 Wprowadzenie

Do modelowania złożonych systemów biologicznych stosuje się różne narzędzia i metody. W tym rozdziale obok opisanych wcześniej sieci Petriego przedstawione zostaną metody matematyczne oparte o równania różniczkowe zwyczajne (*ang. Ordinary Differential Equations (ODE)*).

W podrozdziale 6.2 opisano wykorzystanie dwóch wspomnianych metod modelowania. Precyzując, utworzono model sieci Petriego na podstawie istniejącego modelu wyrażonego za pomocą ODE. Celem takiego podejścia było wykonanie analizy modelu opartego o sieci Petriego i znalezienie kluczowych reakcji, aby w konsekwencji skupić się tylko na wybranych zagadnieniach w symulacjach modelu opartego na równaniach różniczkowych. Zatem, zidentyfikowane istotne dla modelu opartego o sieci Petriego reakcje zweryfikowano w symulacjach modelu opartego na ODE. Wykorzystano relatywnie niewielki model wyrażony za pomocą ODE, aby stwierdzić czy tego typu podejście może być stosowane z powodzeniem dla bardziej złożonych systemów biologicznych. Efekty tej pracy opublikowano w artykule konferencyjnym [150]. W ramach tej pracy autor zaproponował model oparty o sieci Petriego, który powstał na podstawie istniejącego modelu opartego na ODE, wykonał jego analizę, a następnie razem ze współautorami porównał i zinterpretował wyniki. Opisana w tym podrozdziale praca stała się punktem wyjścia dla dalszych badań nad porównaniem metod modelowania opartych o sieci Petriego i metod opartych o równania różniczkowe zwyczajne.

W podrozdziale 6.3 zawarto rozważania dotyczące konkretnych metod analizy dla wybranych metod modelowania, tj., analizę ważności dla modeli opisanych językiem sieci Petriego i analizę wrażliwości (*ang. Sensitivity Analysis (SA)*) dla modeli opartych o równania różniczkowe. Do tej pory wspomniane metody analiz stosowano oddzielnie, podczas gdy mogą się one wzajemnie uzupełniać, dając w efekcie znacznie szerszy wgląd w badany system. Rezultaty opisane w tym podrozdziale zostały opublikowane w pracy [104]. W ramach tej pracy autor zajmował się opracowaniem modelu opartego o sieci Petriego, częścią formalnej analizy, w ramach której wykonał

analizę ważności, a następnie we współpracy porównał i zinterpretował wyniki uzyskane, zarówno dla analizy ważności, jak i analizy wrażliwości.

W podrozdziale 6.4 wykorzystano macierzowe podejście do modelowania do dynamiki populacji makrofagów. Celem tych badań było zaproponowanie modelu i przeprowadzenie symulacji wpływu hipercholesterolemii na dynamikę populacji makrofagów w blaszce miażdżycowej. Przeanalizowano rozwój tworzenia się rdzenia nekrotycznego i tym samym przejście z bezobjawowej do objawowej, niestabilnej blaszki miażdżycowej. Efekty tej pracy opisano do publikacji [295]. W ramach tej pracy autor dokonał analizy literatury pod względem uzyskania odpowiednich danych ilościowych i przygotował wstępny model koncepcyjny. We współpracy z pozostałymi współautorami dokonał symulacji i analizy wyników modelu.

6.2 Przełożenie modelu opartego o równania różniczkowe na model wyrażony za pomocą sieci Petriego – klasyczny model opaty o sieci Petriego dotyczący równowagi między prooksydantami i antyoksydantami (GSH–GSSG)

Celem badań opisanych w tym podrozdziale było wykorzystanie dwóch różnych podejść do modelowania i analizy zjawiska biologicznego dotyczącego równowagi między prooksydantami i antyoksydantami. Wykorzystano modelowanie matematyczne oparte o sieci Petriego i równania różniczkowe zwyczajne. Zastosowane metody pozwalają na przeprowadzenie analiz dotyczących innych aspektów modelu tj. analizy strukturalnej lub analizy symulacyjnej. Utworzony model sieci Petriego powstał na podstawie istniejącego modelu ODE, a jego analiza pozwoliła na określenie kluczowych reakcji. Podczas gdy analiza symulacyjna modelu opartego na ODE nie pozwalała na uzyskanie tego typu wyników. Ponadto to podejście, poprzez identyfikację istotnych procesów elementarnych, pozwala w efekcie skupić się tylko na wybranych zagadnieniach w symulacjach modelu opartego na równaniach różniczkowych. Wydaje się, że jest to pożądana właściwość, zwłaszcza dla relatywnie dużych modeli. Jednakże ocena opisanego podejścia została wykonana na stosunkowo niewielkim, ale biologicznie istotnym, procesie dotyczącym równowagi między prooksydantami i antyoksydantami (GSH–GSSG) [150] i stanowi punkt wyjścia do dalszych rozważań.

6.2.1 Tło biologiczne

Regulacja ekspresji genów jest częstym przedmiotem zainteresowania w biologii systemowej. Mechanizm regulacji opiera się między innymi na oddziaływaniu mRNA z miRNA, którego główną funkcją jest posttranskrypcyjna regulacja ekspresji genów prowadząca do ich wyciszenia. Odbywać się to może poprzez hamowanie translacji lub przez degradację mRNA. W jeden z mechanizmów regulacji ekspresji genów zaangażowane są reaktywne formy tlenu (ROS), których poziom jest regulowany przez istniejące w komórce systemy antyoksydacyjne [235].

W opisanych w tym podrozdziale badaniach skupiono się na ścieżce sygnałowej dotyczącej regulacji ekspresji genów opartej na reaktywnych formach tlenu, a więc na równowadze między prooksydantami i antyoksydantami. Równowaga pomiędzy produkcją i eliminacją reaktywnych form tlenu, zwana także homeostazą redoks, wpływa na prawidłowe funkcjonowanie komórek. Pożądanym jest umiarkowany poziom reaktywnych form tlenu, gdyż jest on wymagany do regulacji białek wrażliwych na redoks zaangażowanych w proliferację i transdukcję sygnałów [235]. W innym przypadku dochodzi do zaburzenia równowagi i pojawienia się szkodliwych efektów. Obniżony poziom ROS prowadzi do upośledzenia proliferacji i funkcji immunologicznych, podczas gdy podwyższony poziom ROS prowadzi do uszkodzenia DNA, białek i lipidów w obrębie komórki, a w kon-

sekwencji do mutacji i apoptozy [258]. Zaburzenia homeostazy redoks, określane również stresem oksydacyjnym, związane są z patogenezą różnych chorób, w tym nowotworów, choroby Alzheimera, Parkinsona, cukrzycy [161, 178] czy miażdżycy [303]. Niezwykle istotne są zatem mechanizmy antyoksydacyjne utrzymujące opisywaną równowagę redoks. Wśród takich mechanizmów wyróżnić można mechanizm oparty na glutationie, który jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych niskocząsteczkowych związków tiolowych, uważany za najcenniejszy antyoksydant syntetyzowany w komórkach [63].

Glutation istnieje w dwóch formach, utlenionej (GSSG) i zredukowanej (GSH), gromadzony jest głównie w cytoplazmie, a reszta znajduje się w mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym i jądrze [12, 169]. Zredukowana forma glutationu, GSH, jest główną formą, która może być wykorzystana do redukcji reaktywnych form tlenu, np. nadtlenku wodoru (H_2O_2) do H_2O i utlenionej formy glutationu (GSSG). Reakcja ta jest katalizowana przez białka z rodziny peroksydazy glutationowej (GP), ale GSH może także spontanicznie reagować z innymi rodnikami neutralizując je. Utleniony glutation (GSSG) może być zredukowany z powrotem do postaci zredukowanej (GSH) przez reduktazę glutationową (GR) lub tioredoksynę (TRX) i ponownie użyty do eliminacji reaktywnych form tlenu. Stosunek formy zredukowanej i utlenionej glutationu (GSH–GSSG) jest ważnym wskaźnikiem warunków oksydoredukcyjnych, a podwyższony poziom GSSG służy jako marker stresu oksydacyjnego [12].

Obok glutationu w mechanizmy regulacji homeostazy redoks zaangażowane jest także białko p53, znane przede wszystkim ze swojej roli w regulacji śmierci komórki, jednakże białko to zostało także zidentyfikowane jako czynnik dwukierunkowo regulujący środowisko redoks, zarówno prooksydacyjnie jak i antyoksydacyjnie [250]. Literatura dowodzi, że wiele elementów związanych ze szlakiem antyoksydacyjnym opartym na glutationie jest jednocześnie zależnych od p53, w tym gen GCLC regulowany na poziomie transkrypcji przez p53 oraz białka regulowane pośrednio poprzez czynnik transkrypcyjny NRF2 i miRNA [201].

Schemat biologiczny dotyczący systemu kontroli poziomu reaktywnych form tlenu poprzez glutation zawarto na Rysunku 6.1, gdzie strzałki o klasycznym grocie (ostro zakończone) oznaczają stymulację procesu, na który skierowany jest grot, a tępe końce oznaczają zahamowanie procesu. Ponadto różnymi kształtami wyróżniono dwie grupy związków: owal reprezentuje białka, a prostokąty reprezentują pozostałe grupy związków.

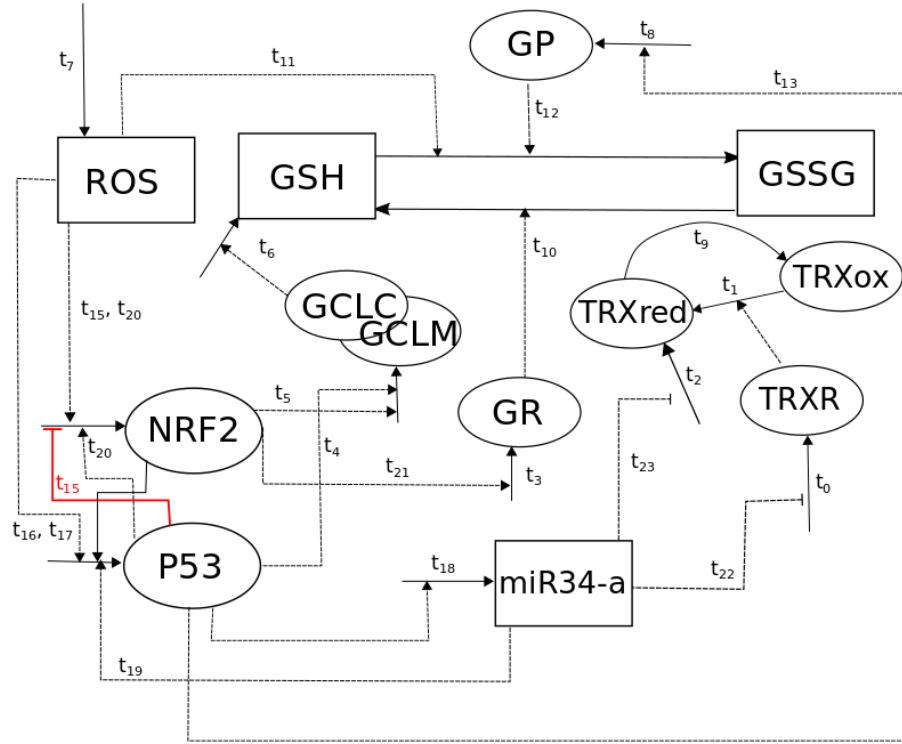
6.2.2 Modele

W oparciu o zamieszczony na Rysunku 6.1 schemat układu biologicznego zaproponowano dwa modele, jeden z nich oparty o równania różniczkowe zwyczajne oraz model mu odpowiadający oparty o klasyczne sieci Petriego.

Zaproponowany model ODE jest modelem deterministycznym opartym na prawie oddziaływania masy i wszystkie jego równania zostały oparte na schemacie znajdującym się na Rysunku 6.1. Dokładniej, model zawiera dwanaście równań (6.1) – (6.12) (patrz [150]), które reprezentują stężenie każdej molekuly w układzie oraz ich oddziaływania z innymi molekułami. Współczynniki znajdujące się w równaniach oznaczane t_i opisują szybkość reakcji, która zależy od innych cząsteczek (ich znaczenie biologiczne znajduje się w Tabeli 6.2 w kolumnie *Znaczenie biologiczne (ODE)*).

$$\frac{dROS}{dt} = t_7 - (t_{11}ROS(t) + t_2GP(t))GSH(t) \quad (6.1)$$

$$\frac{dGSH}{dt} = t_6GCL(t) + t_{10}GR(t)GSSG(t) - (t_{11}ROS(t) + t_{12}GP(t))GSH(t) \quad (6.2)$$



RYSUNEK 6.1: Schemat regulacji ROS poprzez glutation zawarty w modelu opartym na ODE i modelu opartym o sieci Petriego. Rysunek pochodzi z pracy [150].

$$\frac{dGSSG}{dt} = (t_{11}ROS(t) + t_{12}GP(t))GSH(t) - t_{10}GR(t)GSSG(t) \quad (6.3)$$

$$\frac{dGCL}{dt} = t_5NRF2(t) + t_4p53(t) \quad (6.4)$$

$$\frac{dNRF2}{dt} = t_{20}p53(t) + t_{20}ROS(t) \quad (6.5)$$

$$\frac{dp53}{dt} = t_{19}miR34a(t) + t_{24}NRF2(t) + t_{16}ROS(t) \quad (6.6)$$

$$\frac{dmiR34a}{dt} = t_{18}p53(t) - t_{22}miR34a(t) \quad (6.7)$$

$$\frac{dTRX_{red}}{dt} = \frac{t_2}{t_2 + miR34a(t)} - t_9GSSG(t)TRX_{red}(t) + t_1TRX_{ox}(t)TRX_R(t) \quad (6.8)$$

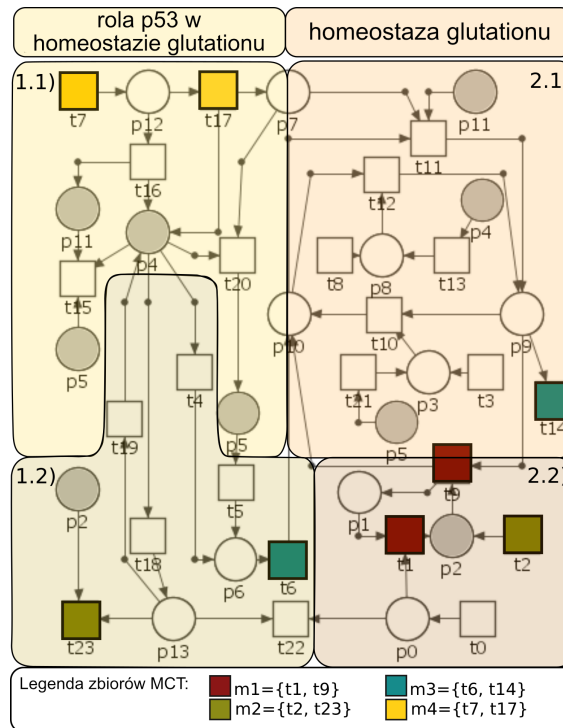
$$\frac{dTRX_R}{dt} = \frac{t_0}{t_0 + miR34a(t)} \quad (6.9)$$

$$\frac{dTRX_{ox}}{dt} = t_9TRX_{red}GSSG(t) - t_1TRX_{ox}TRX_R(t) \quad (6.10)$$

$$\frac{dGR}{dt} = t_3NRF2(t) \quad (6.11)$$

$$\frac{dGP}{dt} = t_8p53(t) \quad (6.12)$$

Model oparty o klasyczne sieci Petriego, odpowiadający modelowi ODE, został przedstawiony na Rysunku 6.2, gdzie wyróżniono kilka bloków funkcjonalnych: 1.1) odpowiada relacjom między p53 a NRF2, 1.2) odpowiada relacjom między p53 a miR34a, 2.1) odpowiada reakcjom oksydacyjno-redukcyjnym GSH i GSSG oraz 2.2) odpowiada reakcjom oksydacyjno-redukcyjnym TRX_{red} i TRX_{ox} . Model zawiera 24 tranzycje, 14 miejsc, jest scharakteryzowany przez 4 nietrywialne zbiory MCT, 12 t-klastrów oraz jest pokryty przez 22 t-niezmienniki. Wszystkie nazwy pasywnych i aktywnych komponentów zawarto w Tabeli 6.1 i 6.2. W obu Tabelach wyróżniono kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikator miejsca/tranzycji i *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca nazwę miejsca/tranzycji, określająca jej przeznaczenie w systemie. Należy zwrócić jednak uwagę, że w Tabeli 6.2 wyróżniono dwie kolumny zawierające znaczenie biologiczne, jedna z nich dotyczy znaczenia tranzycji w modelu opartym o sieci Petriego (kolumna *Znaczenie biologiczne (PN)*), druga natomiast dotyczy znaczenia współczynników w modelu opartym na równaniach różniczkowych (kolumna *Znaczenie biologiczne (ODE)*). Wiersze Tabeli 6.2 można interpretować jako odpowiadające sobie relacje tranzycja – współczynnik dla modelu PN – ODE.



RYСУNEK 6.2: Model oparty o klasyczne sieci Petriego zaproponowany na podstawie modelu wyrażonego za pomocą równań różniczkowych zwyczajnych. Model dotyczy równowagi między prooksydantami a antyoksydantami. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [150].

TABELA 6.1: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc (patrz [150]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	TRX_R	p_7	ROS
p_1	TRX_{ox}	p_8	GP
p_2	TRX_{red}	p_9	GSSG
p_3	GR	p_{10}	GSH
p_4	p53	p_{11}	wysoki poziom ROS
p_5	NRF2	p_{12}	pula ROS
p_6	syntetaza glutationowa	p_{13}	miR34a

TABELA 6.2: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji (patrz [150]).

ID	Znaczenie biologiczne (PN)	Znaczenie biologiczne (ODE)
t_0	źródło TRX_R	produkowanie TRX_R
t_1	redukowanie TRX_{ox} do TRX_{red}	redukowanie TRX_{ox} do TRX_{red}
t_2	źródło TRX_{red}	produkowanie TRX_{red}
t_3	źródło GR	produkowanie GR
t_4	stymulowanie ekspresji kompleksu GCL	stymulowanie ekspresji kompleksu GCL przez p53
t_5	regulowanie aktywności kompleksu GCL poprzez NRF2	stymulowanie aktywności kompleksu GCL poprzez NRF2
t_6	synteza GSH	synteza GSH
t_7	źródło ROS	produkowanie ROS
t_8	źródło GP	produkowanie GP
t_9	redukcja GSSG do GSH katalizowana z jednoczesnym utlenianiem TRX_{red} do TRX_{ox}	redukcja GSSG do GSH katalizowana z jednoczesnym utlenianiem TRX_{red} do TRX_{ox}
t_{10}	redukcja GSSG do GSH katalizowana przez GR	redukcja GSSG do GSH katalizowana przez GR
t_{11}	oksydacja GSH do GSSG katalizowana przez ROS	oksydacja GSH do GSSG katalizowana przez
t_{12}	oksydacja GSH do GSSG katalizowana przez GP	oksydacja GSH do GSSG katalizowana przez GP
t_{13}	aktywacja GP	produkcja GP stymulowana białkiem p53
t_{14}	obniżenie poziomu ROS	-
t_{15}	hamowanie NRF2	hamowanie NRF2 przez p53
t_{16}	wysoki poziom ROS i aktywacja p53 w warunkach cytotoksycznego poziomu ROS	regulacja produkcji p53 za pomocą ROS
t_{17}	niski poziom ROS i aktywacja p53 w warunkach fizjologicznego poziomu ROS	regulacja produkcji p53 za pomocą ROS
t_{18}	transkrypcja miR34a	transkrypcja miR34a
t_{19}	wzmocnienie aktywności p53	wzmocnienie aktywności p53 przez miR34a
t_{20}	zwiększanie poziomu białka NRF2 przez p53	zwiększanie poziomu białka NRF2 przez p53
t_{21}	modulacja stanu redoks GSH poprzez regulację GR	stymulowanie produkcji GR przez NRF2
t_{22}	hamowanie ekspresji TRX_R	hamowanie ekspresji TRX_R
t_{23}	hamowanie TRX_{red}	hamowanie TRX_{red}

Opisane powyżej modele zawierają pewne uproszczenia wynikające z ograniczeń stosowanych metod. W modelu opartym o sieci Petriego zameldowano dwa różne mechanizmy działania zależne od warunków środowiskowych, a precyzując zależne od poziomu ROS (poziom cytotoksyczny i poziom fizjologiczny). W obu sytuacjach aktywowane jest białko p53, jednakże w zależności od warunków środowiskowych może ono hamować lub aktywować NRF2. W warunkach cytotoksycznych p53 hamuje NRF2, podczas gdy w warunkach fizjologicznych p53 aktywuje NRF2. Dodatkowym uproszczeniem zastosowanym w modelach jest obecność pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy białkiem p53 a miR34a. Jej zastosowanie wskazuje na bezpośrednią aktywację p53 przez miR34, co w rzeczywistości jest procesem bardziej złożonym i nie w pełni poznany.

6.2.3 Analiza i wyniki

Analiza została przeprowadzona począwszy od analizy modelu opartego na sieci Petriego i zawiera ona klasyczne metody analizy (analizę zbiorów MCT, analizę klastrowania oraz manualną analizę t-niezmienników) oraz analizę knockout należącą do rozszerzonych metod analizy. Formalne definicje metod opisano w podrozdziale 2.2 rozdziału teoretycznego. Zaproponowany model homeostazy redoks zawiera 4 nietrywialne zbiory MCT zebrane w Tabeli 6.3. Tabela ta zawiera trzy kolumny, pierwsza z nich – *ID* zawiera identyfikatory kolejnych zbiorów MCT, druga – *Zawarte tranzycje* składa się z tranzycji należących do poszczególnych zbiorów MCT, natomiast trzecia – *Znaczenie biologiczne*, to kolumna, w której każdemu zbiorowi MCT nadano znaczenie biologiczne.

TABELA 6.3: Lista nietrywialnych zbiorów MCT – zbiorów składających się z co najmniej dwóch tranzycji należących do wsparć dokładnie tych t-samyh niezmienników (patrz [150]).

ID	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	t_1, t_9	Reakcje redoks tioredoksyny.
m_2	t_2, t_{23}	Hamowanie TRX _{red} przez miR34a.
m_3	t_6, t_{14}	Synteza GSH
m_4	t_7, t_{17}	Pula ROS (zamodelowano 2 sytuacje: cytotoksyczny poziom ROS i fizjologiczny poziom ROS, które są związane z poszczególnymi miejscami modelu, odpowiednio p_{11} – <i>wysoki poziom ROS</i> , i p_7 – <i>ROS</i>).

Obok zidentyfikowania bloków funkcjonalnych przeprowadzono analizę t-klastrów, która zidentyfikowała 12 skupień zawierających podobne t-niezmienniki (dla przypomnienia sieć jest pokryta przez 22 t-niezmienniki). Przy opisie analizy t-klastrów posłużono się następującą notacją opisaną na przykładzie klastra c_{12} : $c_{12} = \{x_{21}, x_{22}\}$, gdzie c_{12} jest symbolem klastra, a x_{21} i x_{22} są symbolami t-niezmienników należących do tego klastra. Opis analizy t-klastrów znajduje się poniżej:

- $c_1 = \{x_1\}$: Aktywacja p53 pod wpływem środowiska, w którym poziom ROS jest cytotoksyczny i prowadzi do zahamowania NRF2, natomiast aktywacja p53 pod wpływem środowiska, w którym poziom ROS utrzymuje się na poziomie fizjologicznym i prowadzi do zwiększenia poziomu białka NRF2.
- $c_2 = \{x_2\}$: Dodatkowo sprzężenie zwrotne pomiędzy p53 a miR34a (model zawiera uproszczenie, gdyż miR34a nie wpływa bezpośrednio na zwiększenie aktywności p53, jest to bardziej złożony i nie w pełni poznany mechanizm).
- $c_3 = \{x_3\}$: GSH jest utleniane do GSSG przez GP, natomiast redukcja GSSG do GSH zachodzi z jednoczesnym utlenieniem TRX_{red} do TRX_{ox}.
- $c_4 = \{x_4\}$: GSH jest utleniane do GSSG przez GP oraz przez ROS, natomiast redukcja GSSG do GSH zachodzi przy jednoczesnym utlenianiu TRX_{red} do TRX_{ox}.
- $c_5 = \{x_5, x_9, x_{13}, x_{17}\}$: Aktywacja p53 pod wpływem środowiska, w którym poziom ROS utrzymuje się na poziomie fizjologicznym, prowadzi do zwiększenia poziomu białka NRF2, które jest zaangażowane w syntezę GSH poprzez regulację aktywności GCL. GSH jest utleniane do GSSG przez ROS, natomiast do redukcji GSSG do GSH dochodzi przez GR. Ponadto redukcja do GSH zachodzi również przy jednoczesnym utlenianiu TRX_{red} do TRX_{ox}. Dodatkowo p53 ma wpływ na transkrypcję miR34a, które hamuje TRX_{red}.
- $c_6 = \{x_6, x_{10}, x_{14}, x_{18}\}$: Ten klaster zawiera wszystkie podprocesy opisane w klastrze c_5 , z jedną różnicą, w której to miR34a hamuje ekspresję TRX_R.
- $c_7 = \{x_7\}$: Utlenianie GSH do GSSG przez GP i redukcja do GSH przez GR.
- $c_8 = \{x_8\}$: GSH jest utleniane do GSSG przez GP (aktywacja przez p53) i przez ROS, natomiast redukcja GSSG do GSH jest katalizowana przez GR.
- $c_9 = \{x_{11}, x_{12}\}$: Utlenianie GSH do GSSG przez GP (które może być dodatkowo aktywowane przez p53), a redukcja GSSG do GSH przez GR. Aktywacja p53 pod wpływem środowiska, w którym poziom ROS utrzymuje się na poziomie fizjologicznym prowadzi do zwiększenia poziomu białka NRF2, które moduluje stan redoks GSH poprzez regulację GR.

- $c_{10} = \{x_{15}, x_{16}\}$: Aktywacja p53 pod wpływem środowiska, w którym poziom ROS utrzymuje się na poziomie fizjologicznym, prowadzi do zwiększenia poziomu białka NRF2, które może wpływać na syntezę GSH poprzez regulację aktywności GCLC. GSH jest utleniane do GSSG przez ROS, a także przez GP (który może być dodatkowo aktywowany przez p53).
- $c_{11} = \{x_{19}, x_{20}\}$: Wpływ p53 na syntezę GSH poprzez regulację ekspresji GCLC. GSH jest utleniany do GSSG przez ROS, a także przez GP (który może być dodatkowo aktywowany przez p53).
- $c_{12} = \{x_{21}, x_{22}\}$: Wpływ p53 na syntezę GSH poprzez regulację ekspresji GCLC. GSH jest utleniane do GSSG przez ROS. Ponadto p53 bierze udział w transkrypcji miR34a, co hamuje ekspresję TRX_{red} i TRX_R .

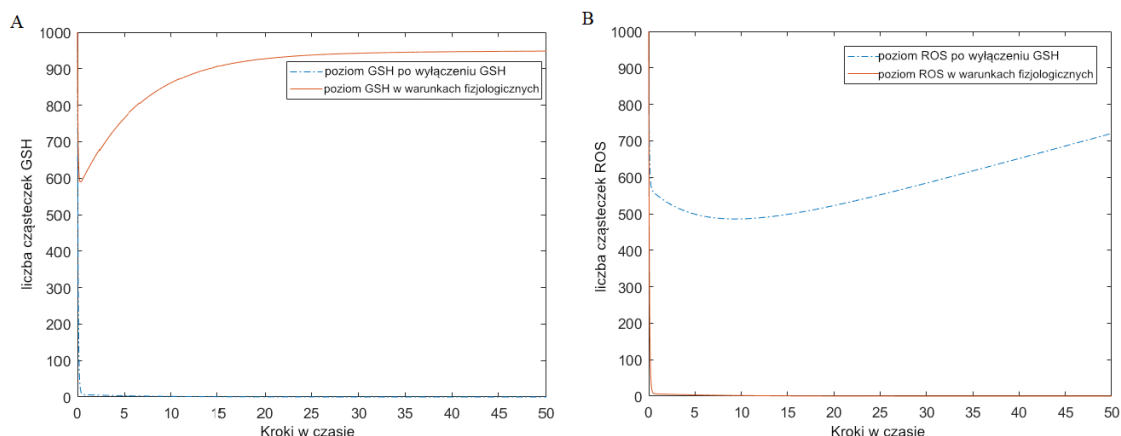
Obok analizy t-klastrów wykonano także manualną analizę wybranych t-niezmienników. Analiza ta skupiła się na analizie t-niezmienników, których znaczenie biologiczne jest związane z reakcjami utleniania i redukcji glutationu. Poniżej przedstawiono analizę dla t-niezmienników o konkretnym znaczeniu biologicznym:

- Reakcja utleniania GSH do GSSG przez ROS stanowi około 73% wszystkich zamodelowanych podprocesów (16 z 22 t-niezmienników).
- Reakcja utleniania GSH do GSSG przez GP stanowi około 46% wszystkich zamodelowanych podprocesów (10 z 22 t-niezmienników).
- Reakcja redukcji GSSG do GSH przez GR stanowi około 36% wszystkich zamodelowanych podprocesów (8 z 22 t-niezmienników).
- Reakcja redukcji GSSG do GSH zachodząca z jednoczesnym utlenianiem TRX_{red} do TRX_{ox} stanowi około 18% wszystkich zamodelowanych podprocesów (4 z 22 t-niezmienników).

Ponadto, zdolność do wymiatania reaktywnych form tlenu w modelowanym układzie jest na tyle znacząca, że podproces hamowania NRF2 (będący konsekwencją aktywacji p53 w warunkach charakteryzujących się wysokim poziomem ROS) występuje z bardzo niską częstotliwością około 4% (1 z 22 t-niezmienników).

Dopełnieniem powyższych analiz jest analiza knockout pozwalająca na dezaktywację wybranych procesów elementarnych. W tym przypadku analiza knockout dotyczyła wyłączenia tranzykcji odpowiadających za syntezę GSH. W jej efekcie wyłączone zostały wszystkie procesy wymiatania ROS, a stanowią one 20 z 22 wszystkich t-niezmienników. Znaczenie biologiczne dwóch t-niezmienników, które nie zostały wyłączone w konsekwencji tego analizy knockout dotyczą aktywacji p53 w środowisku charakteryzującym się cytotoksycznym poziomem ROS prowadząc do zahamowania NRF2 oraz mechanizmu dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy p53 i miR34a. Analiza knockout potwierdza, że dezaktywacja tranzykcji odpowiadającej za syntezę GSH może prowadzić do szkodliwej akumulacji ROS.

Analiza sieci Petriego pozwala określić, który z modelowanych podprocesów jest najważniejszy dla całego systemu biologicznego, a to z kolei zostało wykorzystane przy przeprowadzaniu symulacji dla modelu opartego na równaniach różniczkowych. Symulacje modelu opartego na ODE skupiają się na reakcji utleniania GSH do GSSG przez ROS. Aby sprawdzić, czy reakcja ta odgrywa kluczową rolę także w modelu wyrażonym na podstawie ODE, przeprowadzono symulacje w dwóch scenariuszach: w warunkach fizjologicznych oraz z wyłączeniem GSH (do modelu wprowadzono silny czynnik degradacji GSH). Jako dane wyjściowe przyjęto poziom ROS ze względu na najsilniejsze zależności pomiędzy tymi zmiennymi. Wyniki symulacji zawarto na Rysunku 6.3



RYСУNEK 6.3: Wyniki symulacji modelu ODE, gdzie rysunek A przedstawia różnice między poziomem GSH przed i po wyłączeniu GSH, a rysunek B przedstawia poziom ROS przed i po wyłączeniu GSH. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [150].

Rysunek 6.3 przedstawia zdecydowanie różne wyniki symulacji dla poszczególnych warunków. W warunkach fizjologicznych poziom ROS jest bardzo niski, ponieważ wysoki poziom GSH wpływa na wymiatanie reaktywnych form tlenu przez procesy utleniania. W sytuacji wyłączenia GSH poziom ROS gwałtownie wzrasta, ponieważ utlenianie jest jednym sposobem pozbywania się reaktywnych form tlenu z systemu. Można zatem stwierdzić, że wyłączenie glutationu może rozregulować badany system, prowadząc do poważnych zaburzeń.

6.2.4 Konkluzje

Przedstawiono podejście, w którym poprzez analizę modelu opartego o sieci Petriego zidentyfikowano istotne procesy elementarne, co w następstwie umożliwiło ukierunkować symulację modelu opartego na ODE na wybrane zagadnienia. Tego rodzaju ukierunkowanie wydaje się być tym bardziej pożądane, im bardziej złożony/rozbudowany będzie badany model matematyczny. Reasumując, obie metody prowadzą do uzyskania podobnych wniosków, a zatem mogą być traktowane jako alternatywne podejścia. Jednak ten wstępny wniosek został wyciągnięty po analizie stosunkowo prostego modelu biologicznego. Tym samym stał się motywacją dla dalszego rozwoju tych badań, gdzie przeprowadzono analizę dla znacznie bardziej złożonego układu biologicznego wykazując, że podejścia oparte o sieci Petriego jak i ODE wzajemnie się uzupełniają, a zastosowanie ich obu jednocześnie pozwala wydobyć z analizy więcej informacji niż przy użyciu jednego z nich - wyniki te opisano w kolejnym podrozdziale 6.3.

6.3 Dualne modelowanie jako narzędzie do kompleksowej analizy systemów biologicznych – Model oparty o klasyczne sieci Petriego dotyczący mechanizmu odpowiedzi na uszkodzenia DNA

Badania opisane w niniejszym podrozdziale są kontynuacją badań opisanych w podrozdziale 6.2. Podobnie jak wcześniej, wykorzystane zostały dwa podejścia do modelowania, z tym że w tym przypadku stosowane są specyficzne metody analizy. W przypadku modelu opartego o równania różniczkowe zwyczajne rozważana jest analiza wrażliwości, podczas gdy w przypadku modelu opartego o klasyczne sieci Petriego rozpatrywana jest analiza ważności. Same podejścia do modelowania, zarówno równania różniczkowe zwyczajne, jak i sieci Petriego są szeroko stosowane do modelowania systemów biologicznych, począwszy od prostych reakcji biochemicznych, przez ścieżki sygnałowe i

sieci regulatorowe do złożonych systemów biologicznych [51, 125, 94, 111, 116, 146]. Zazwyczaj w literaturze spotyka się wykorzystanie jednego z tych podejść niezależnie, ale zdarzają się też badania, w których podejścia te są łączone [86, 119, 274]. Jednakże we wspomnianych pracach stosuje się w większości ciągle sieci Petriego, które między innymi mogą być podstawą do automatycznego generowania modeli opartych na ODE [112]. W zaproponowanym dualnym modelowaniu skupiono się na wykorzystaniu konkretnych metod analizy, a te dotychczas były stosowane oddzielnie w różnych celach. Przeprowadzone badania pokazują, że zastosowane metody mogą się wzajemnie uzupełniać. Analiza wrażliwości wykorzystywana jest do znalezienia parametrów, których zmiana powoduje największe zmiany ilościowe i jakościowe w odpowiedzi modelu. Analiza ważności, będąca analizą strukturalną, pozwala zidentyfikować najważniejsze podprocesy pod względem przepływu informacji w sieci Petriego. Ostatecznie obie te metody ułatwiają znalezienie istotnych procesów w badanym zjawisku biologicznym i wydają się mieć potencjał we wspomaganie rozwoju terapii medycznych. Podejście, w którym wykorzystane zostały dwa modele opisane różnymi formalizmami, zostało określone mianem dualnego modelowania i zostało przeprowadzone na przykładzie szlaku ATM-p53-NF- κ B. Podejście to pozwoliło postawić wniosek o komplementarności badanych metod i tym samym umożliwia przeprowadzenie kompleksowej analizy strukturalnej i parametrycznej dając wyniki, których otrzymanie nie byłoby możliwe w oddzielnym zastosowaniu wspomnianych metod. Zatem, zaproponowane łączone podejście ułatwia znalezienie nie tylko kluczowych procesów, z którymi związane są istotne parametry, ale także istotnych modułów, odpowiadających podsystemom sieci regulacyjnych. Uzyskane wyniki mogą dawać szerszy wgląd w cele terapeutyczne i prowadzić do opracowania bardziej efektywnych terapii w medycynie.

6.3.1 Tło biologiczne

Badane zjawisko biologiczne dotyczy mechanizmów odpowiedzi systemu na uszkodzenia DNA, opiera się na ścieżkach sygnałowych ATM-p53-NF- κ B opisanych w pracy [134]. Moduł ATM jest modułem aktywowanym odpowiedzialnym za detekcję pęknięć podwójnej nici DNA (DSB, *ang. double strand-breaks*), podczas gdy moduły p53 i NF- κ B są modułami regulatorowymi, decydującymi o odpowiedzi na czynniki stresowe. Dogłębne zrozumienie tego złożonego systemu biologicznego jest ważne z perspektywy klinicznej dla terapii antynowotworowych, gdyż system ten determinuje losy komórek. Poniżej opisano tło biologiczne badanego zjawiska.

Moduł ATM, zwany także modułem detekcji, jest odpowiedzialny za wykrywanie uszkodzeń DNA (w szczególności pęknięć podwójnej nici DNA), ale także jest odpowiedzialny za wzmacnianie sygnału i przekazywanie go do modułów regulacyjnych p53 i NF- κ B [134]. Z uwagi na to nieprawidłowe działanie modułu ATM jest najgroźniejsze z perspektywy komórki, ponieważ umożliwia przekazanie uszkodzonego DNA do komórek potomnych. Konsekwencją tego może być m.in. przedwczesne starzenie się, ale także rozwój nowotworów [243, 310].

Pierwszy ze wspomnianych modułów regulacyjnych, moduł p53, jak nazwa wskazuje, jest ściśle związany z białkiem p53. Wymienione białko jest czynnikiem transkrypcyjnym zwanym także strażnikiem genomu. To określenie jest odpowiednio zasłużone i wynika z pełnionych przez to białko funkcji [291]. Jedną z głównych ról tego białka jest inicjowanie procesów naprawy DNA, a także zatrzymywanie cyklu komórkowego po uszkodzeniu DNA, zapobiegając tym samym podziałom uszkodzonych komórek. Inną pełnioną przez p53 funkcją jest inicjowanie apoptozy, programowanej śmierci komórki, która ma miejsce, gdy naprawa uszkodzeń DNA nie jest już możliwa lub gdy zajmuje zbyt dużo czasu [202, 226]. Jak można się zatem spodziewać, dysfunkcje białka p53 są bardzo szkodliwe i prowadzą do wielu chorób, w tym pojawiają się w wielu typach nowotworów oraz sprzyjają ich progresji. Doniesienia literaturowe wskazują, że mutacje w genie p53 występują w

około połowie typów nowotworów, a w wielu innych zaobserwować można nieprawidłowe działanie innych białek uczestniczących w szlaku sygnałowym p53 [3].

Drugim ze wspomnianych modułów regulacyjnych jest moduł NF- κ B. NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym przede wszystkim za wczesną odpowiedź immunologiczną [113, 162] i jest aktywowany przez różnego rodzaju bodźce, w tym między innymi przez czynnik martwicy nowotworów (TNF) [215]. Ponadto, NF- κ B reguluje wiele istotnych procesów, obejmując apoptozę, angiogenezę, metastazę czy progresję cyklu komórkowego, a więc może odgrywać kluczową rolę w progresji nowotworów [114, 298].

Oba opisane moduły regulacyjne, p53 i NF- κ B, wspólnie kontrolują odpowiedź komórek na stres [215, 222]. Istnieje wiele ścieżek łączących te dwa moduły, przy czym niektóre interakcje między nimi p53 są kooperatywne, a niektóre odwrotnie, antagonistyczne. Najbardziej oczywista interakcja występuje na poziomie transkrypcyjnym, gdzie NF- κ B zwiększa transkrypcję p53, podczas gdy p53 tłumi transkrypcję inhibitorów NF- κ B (I κ B i A20) [225]. Te właśnie mechanizmy, a więc system odpowiedzi na uszkodzenia DNA, oparty na relacjach między ścieżkami sygnałowymi ATM–p53–NF- κ B, stały się przedmiotem badań przytoczonych w tym podrozdziale.

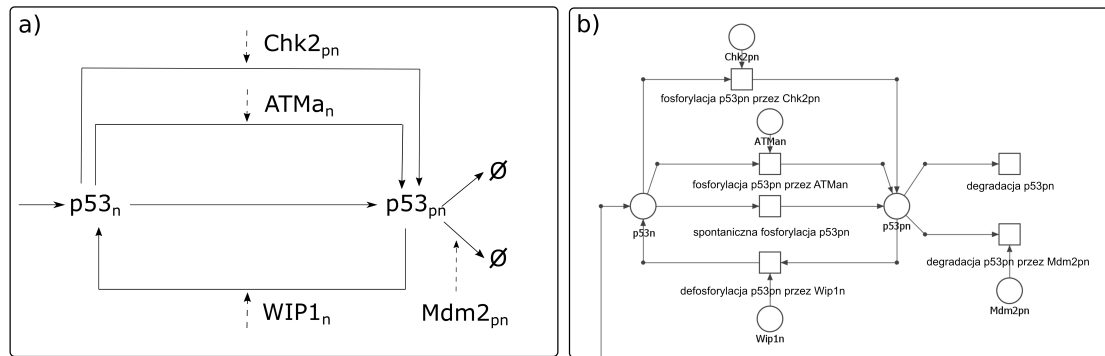
6.3.2 Modele

Obecny paragraf zawiera opis dwóch modeli wyrażonych za pomocą różnych formalizmów, jednakże opisujących to samo zjawisko biologiczne. Wykorzystano istniejący model oparty na ODE dotyczący mechanizmu systemu odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ścieżki ATM–p53–NF- κ B) [134]. Model ten został wykorzystany jako podstawa do opracowania odpowiadającego mu modelu opartego na klasycznych sieciach Petriego. Ten rodzaj sieci Petriego umożliwia utworzenie modelu jakościowego opartego na interakcjach pomiędzy komponentami, bez żadnych informacji ilościowych.

Sposób transformacji modelu opartego na ODE do modelu opartego o sieci Petriego

W opisywanym badaniu kluczowy jest sposób na przełożenie formalizmu jednego modelu na drugi wraz z pełną świadomością ograniczeń, które mogą przekładać się na późniejsze wnioski i interpretację wyników. Modelowane systemy opisywane za pomocą równań różniczkowych mogą być przedstawiane jako diagramy sieci reakcji biochemicznych. Te diagramy w pewnym stopniu przypominają graficzną reprezentację modelu opartego o sieci Petriego. Jednak transformacja modeli wyrażonych za pomocą ODE do modeli opartych o sieci Petriego nie jest wcale tak oczywista. Aby wyjaśnić, w jaki sposób dokonać tej translacji, wykorzystano fragment badanego systemu biologicznego, który przedstawiono w dwóch reprezentacjach na Rysunku 6.4.

Rysunek 6.4 a) ilustruje diagramu sieci reakcji biochemicznych, będący wybranym fragmentem modelu opartym na ODE, gdzie tekstowo opisano cząsteczki biorące udział w danych procesach, tj. syntetyzowane transkrypty, białka oraz ich kompleksy. Strzałki ciągłe reprezentują reakcje, w tym także przejście cząsteczek w inną formę, np. z nieaktywnej w aktywną. Strzałki przerywane wskazują, że dana cząsteczka wpływa na reakcję reprezentowaną przez strzałkę ciągłą. Ponadto, strzałka zakończona ostrym grotem oznacza stymulację reakcji przez dany komponent, natomiast tępe zakończenie strzałki oznacza reakcję hamowania. Rysunek 6.4 b) zawiera odpowiadający Rysunkowi 6.4 a) fragment sieci Petriego, gdzie cząsteczki opisane tekstowo na schemacie modelu opartego na ODE, zostały zastąpione miejscami, a reakcje wraz z ich mechanizmami regulacyjnymi zostały zastąpione tranzycjami. Na uwadze należy mieć fakt, że model oparty na klasycznej sieci Petriego ma charakter jakościowy, dlatego też przełożenie modelu wyrażonego za pomocą ODE na ten rodzaj sieci Petriego wiąże się z zachowaniem struktury modelu z jednoczesną utratą in-



RYСУNEK 6.4: Porównanie reprezentacji graficznych dla modelu opartego na ODE i modelu opartego o sieci Petriego. Rysunek pochodzi z pracy [104].

formacji ilościowych, takich jak wartości kinetycznych szybkości reakcji. Ponadto, w klasycznych sieciach Petriego nie wyróżnia się różnych typów łuków, w przeciwieństwie do łuków stosowanych na diagramach opisujących model oparty na ODE. Innymi słowami, w modelu opartym o klasycznym sieci Petriego nie wyróżnia się łuków hamujących, w tym przypadku różne typy reakcji, tj. przejście danego związku w formę aktywną, wymuszenie reakcji, zahamowanie reakcji czy degradacja są oznaczone tym samym klasycznym łukiem skierowanym. Z uwagi na te ograniczenia zaproponowany model oparty o sieci Petriego został odpowiednio dostosowany. Szczególną uwagę poświęcono mechanizmom hamowania określonych reakcji i degradacji, ale także reakcji enzymatycznych. Ograniczenie związane z reakcjami hamowania i degradacji zostało rozwiązane w sposób opisany w rozdziale 3 w paragrafie 3.2.2 (schemat graficzny rozwiązania tego problemu znajduje się na Rysunku 3.2). Sam mechanizm hamowania w klasycznych sieciach Petriego opiera się na stworzeniu dodatkowej tranzycji zapobiegającej aktywowaniu innej reakcji poprzez podbieranie tokenów z jej miejsc poprzedzających. W ten sposób określona reakcja zostaje osłabiona (zahamowana). Poza ograniczeniem zasobów i uniemożliwieniem częstego aktywowania danej reakcji, można ją także całkowicie zahamować poprzez analizę knockout (patrz rozdział teoretyczny 2, definicja 2.2.13). Kolejne ograniczenie, które wymagało rozwiązania, dotyczy reakcjami enzymatycznych. Zgodnie z rzeczywistością biologiczną enzymy biorące udział w danej reakcji nie powinny być usuwane, powinny być dostępne i gotowe do katalizowania kolejnych reakcji. Z tego względu w modelu utworzono pule poszczególnych składników, tak aby zapewnić powrót enzymów do obiegu.

Chcąc dopełnić obraz opisywanej translacji modelu opartego o ODE do modelu wyrażonego za pomocą sieci Petriego, rozważono poniżej wybrane równanie. Równanie to opisuje zmianę poziomu jądrowego ufosforylowanego białka p53 ($p53_{pn}$), a jego graficzna reprezentacja została przedstawiona na omówionym wyżej Rysunku 6.4 a).

$$\begin{aligned} \frac{dp53_{pn}}{dt} = & (pa_1 + pa_2 \frac{ATM_{an}(t)}{ATM_{an}(t) + pm_1} + pa_3 \frac{CHK2_{pn}(t)}{CHK2_{pn}(t) + pm_2})p53_n(t) - \\ & - pc_1 P53_{pn}(t)WIP1_n(t) - (pd_4 + pd_5 MDM2_{pn}^2(t))p53_{pn}(t) \end{aligned} \quad (6.13)$$

W równaniu (6.13) kolejne wyrażenia opisują odpowiednio: spontaniczną aktywację p53, aktywację p53 zależną od ATM i Chk2, inaktywację zależną od Wip1, degradację spontaniczną i degradację zależną od Mdm2. Jak można zauważyć, wyrażenia te bezpośrednio odpowiadają poszczególnym fragmentom sieci Petriego zawartym na Rysunku 6.4 b). Poniżej zawarto szczegółowy opis sposobu modelowania wspomnianych wyrażen w postaci sieci Petriego:

- Spontaniczna aktywacja p53:

Do zamodelowania tego podprocesu potrzebne są trzy komponenty sieci Petriego – dwa miejsca i jedna tranzycja, tzn. miejsce ($p53n$) poprzedzające tranzycję (*spontaniczna fosforylacja p53n*), wspomniana tranzycja oraz miejsce ($p53pn$) następujące po tej tranzycji, co w graficznej postaci wygląda następująco: $p53n \rightarrow \text{spontaniczna fosforylacja p53n} \rightarrow p53pn$. Ze względu na fakt, że jest to reakcja spontaniczna, do jej aktywacji nie jest potrzebny żaden dodatkowy składnik (dodatkowe miejsca poprzedzające).

- Aktywacja p53 zależna od ATM:

Do zamodelowania tego podprocesu potrzebne są cztery komponenty sieci Petriego – trzy miejsca i jedna tranzycja, tzn. dwa miejsca ($p53n$ i ATM) poprzedzające tranzycję (*fosforylacja p53n przez ATM*), wspomniana tranzycja oraz miejsce ($p53pn$) następujące po tej tranzycji, co w graficznej postaci wygląda następująco: $p53n$ i $ATM \rightarrow \text{fosforylacja p53n przez ATM} \rightarrow p53pn$. Oznacza to, że do uruchomienia tej tranzycji wymagane są dwa komponenty: $p53n$ i ATM .

- Aktywacja p53 zależna od Chk2:

Do zamodelowania tego podprocesu potrzebne są cztery komponenty sieci Petriego – trzy miejsca i jedna tranzycja. Modelowanie odbywa się w dokładnie w taki sam sposób, jak przedstawiono powyżej dla procesu aktywacji p53 zależnej od ATM.

- Inaktywacja p53 zależna od Wip1:

Aktywacja/inaktywacja (fosforylacja/defosforylacja) dowolnych elementów jest modelowana w podobny sposób, różniący się jedynie kierunkiem łuków, przykładowo:

- aktywacja: $p53n \rightarrow \text{aktywacja} \rightarrow p53pn$,
- inaktywacja: $p53pn \leftarrow \text{inaktywacja} \leftarrow p53pn$.

Do zamodelowania podprocesu inaktywacji p53 zależnej od Wip1 potrzebne są cztery komponenty sieci Petriego – trzy miejsca i jedna tranzycja, tzn. dwa miejsca ($p53pn$ i $Wip1n$) poprzedzające tranzycję (*defosforylacja p53pn przez Wip1n*), wspomniana tranzycja i miejsce ($p53n$) następujące po tej tranzycji, co w graficznej postaci wygląda następująco: $p53pn$ i $Wip1n \rightarrow \text{defosforylacja p53pn przez Wip1n} \rightarrow p53n$.

- Spontaniczna i zależna od Mdm2 degradacja p53:

Tranzycje odpowiadające degradacjom, w przeciwieństwie do innych reakcji, nie posiadają miejsc następujących, a więc są to tranzycje wyjściowe. Do zamodelowania spontanicznej degradacji wymagane są dwa komponenty sieci Petriego: miejsce ($p53pn$) poprzedzające tranzycję (*degradacja p53pn*) oraz wspomniana tranzycja, co w graficznej postaci wygląda następująco: $p53pn \rightarrow \text{degradacja p53pn}$.

W przypadku degradacji zależnej od Mdm2 potrzebne są dwa miejsca ($p53pn$ i $Mdm2pn$) poprzedzające tranzycję (*degradacja p53pn przez Mdm2pn*) oraz wspomniana tranzycja, co w graficznej postaci wygląda następująco: $p53pn$ i $Mdm2 \rightarrow \text{degradacja p53pn}$.

- Produkcja p53:

Podobnie jak w przypadku diagramu dla modelu opartego na ODE (Rysunek 6.4 a)) proces elementarny, jakim jest produkcja p53, jest tylko symbolicznie reprezentowany przez łuk skierowany (Rysunek 6.4 b)), gdyż opisywany jest tylko fragment badanego systemu biologicznego.

Model oparty o równania różniczkowe zwyczajne

W opisywanych badaniach wykorzystano istniejący model oparty na ODE [134], w którym to równania różniczkowe zwyczajne zostały wykorzystane do opisu dynamiki 61 składników (białek i transkryptów). Model zawiera 135 parametrów, w tym 123 parametry opisujące szybkość reakcji biochemicznych i 12 parametrów opisujących właściwości fizyczne symulowanej komórki.

Symulacje przeprowadzono przy użyciu funkcji *ode23tb* w *Matlabie* z wykorzystaniem parametrów opisanych w pracy źródłowej [134]. Przeprowadzono symulacje z różnymi kombinacjami sygnałów wejściowych. Pierwszy sygnał wejściowy reprezentuje czynnik martwicy nowotworów α (TNF), który stymuluje kanoniczną ścieżkę sygnałową NF- κ B. Drugi zaś reprezentuje promieniowanie jonizujące (IR), które prowadzi do uszkodzenia DNA i w następstwie do aktywacji ścieżki sygnałowej p53, jak również NF- κ B.

Do dalszej analizy zdefiniowano dwa protokoły symulacyjne, różniące się całkowitą dawką napromieniowania. W każdym protokole symulacje podzielone zostały na trzy następujące fazy:

- Faza 0 — 24-godzinna faza, podczas której model osiąga stan ustalony (bez sygnałów wejściowych: brak IR i brak TNF).
- Faza 1 — faza stymulacji, podczas której szlaki sygnałowe są stymulowane przez jednoczesną aktywację TNF (10 ng/ml) i IR (1 h napromieniania dawką całkowitą 4 lub 10 Gy).
- Faza 2 — faza po napromieniowaniu trwająca 240 godzin, podczas której naprawiane są uszkodzenia DNA spowodowane w fazie 2 (brak IR, TNF nadal obecny w stężeniu 10 ng/ml).

Model oparty o klasyczne sieci Petriego

Proponowany model koncentruje się na szlakach ATM, p53, NF- κ B oraz wzbudzeniach związanych z obecnością TNF i IR. Model ten zawiera 170 tranzycji, 89 miejsc i jest pokryty przez 541 t-nieziemienników. Wszystkie nazwy pasywnych i aktywnych komponentów zawarto w Tabeli 6.4 i 6.5. W obu tych tabelach wyróżniono kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikator miejsca/tranzycji i *Znaczenie biologiczne* – kolumna zawierająca nazwę miejsca/tranzycji określającą jej przeznaczenie w systemie. Model oparty o sieci Petriego został przedstawiony na Rysunku 6.5, gdzie kolorystycznie oznaczono pojawiające się moduły: ATM (zielony), p53 (szary), NF- κ B (czerwony), WIP1 (niebieski), CREB (fioletowy) oraz wymuszenia systemu (żółty). Model został utworzony przy użyciu narzędzia Holmes [230].

TABELA 6.4: Lista nazw pasywnych komponentów sieci – miejsc (patrz [104]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_0	DNA	p_{45}	$I\kappa B\alpha_n$
p_1	DSB	p_{46}	IKKa
p_2	IR	p_{47}	IKKi
p_3	mRNA p21	p_{48}	IKKii
p_4	mRNA Bax	p_{49}	IKK
p_5	p21	p_{50}	NF- κ Bn
p_6	Bax	p_{51}	$I\kappa B\alpha$
p_7	p53pn	p_{52}	kompleks $I\kappa B\alpha$ i NF- κ B w jądrze
p_8	p53n	p_{53}	kompleks $I\kappa B\alpha$ i NF- κ B w cytoplazmie
p_9	mRNA p53	p_{54}	NF- κ B
p_{10}	mRNA Mdm2	p_{55}	$I\kappa B\alpha$ przeznaczony do degradacji
p_{11}	mRNA PTEN	p_{56}	shRNA
p_{12}	PTEN	p_{57}	$I\kappa B\alpha_p$
p_{13}	PIP3	p_{58}	kompleks $I\kappa B\alpha_p$ i NF- κ B w cytoplazmie

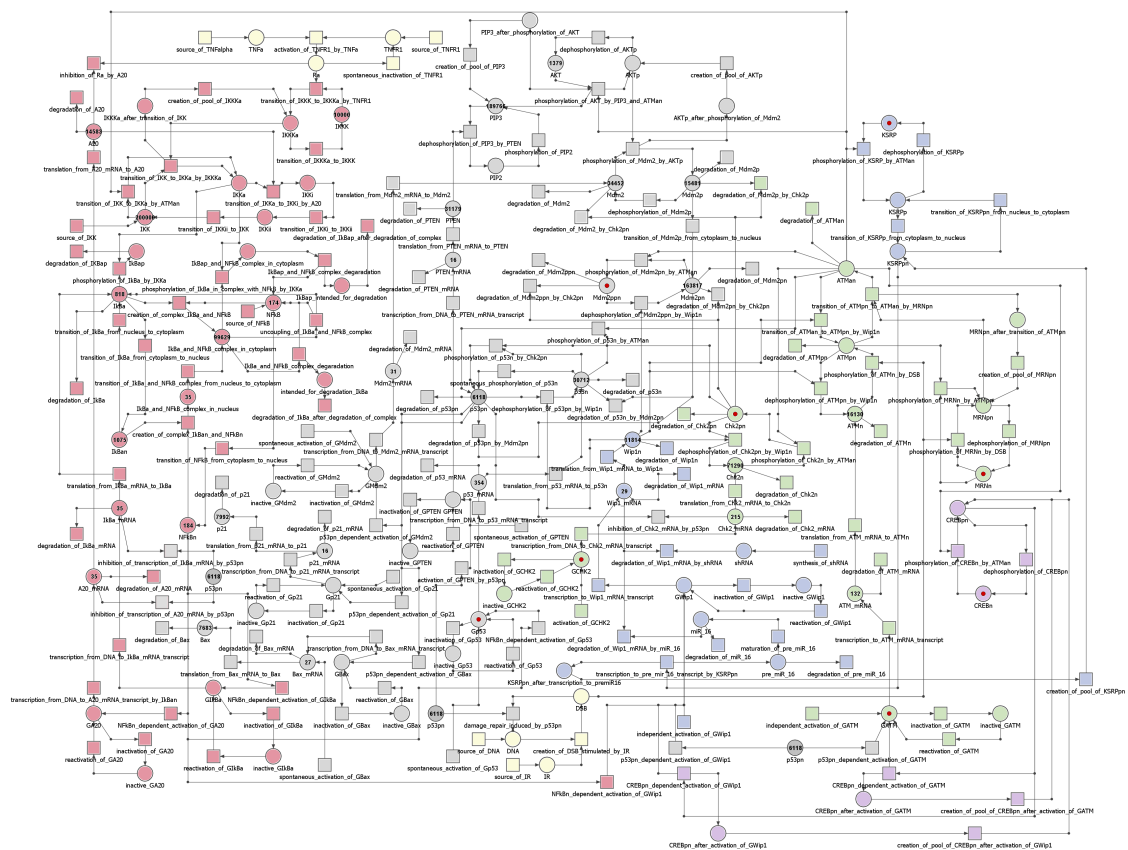
ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
p_{14}	PIP2	p_{59}	I κ B α przeznaczony do degradacji
p_{15}	AKT	p_{60}	GATM
p_{16}	AKTp	p_{61}	GCHK2
p_{17}	Mdm2	p_{62}	GPTEN
p_{18}	Mdm2p	p_{63}	GMdm2
p_{19}	mRNA Wip1	p_{64}	Gp21
p_{20}	Wip1n	p_{65}	GBax
p_{21}	mRNA Chk2	p_{66}	GA20
p_{22}	Chk2n	p_{67}	GI κ B α
p_{23}	Chk2pn	p_{68}	GWip1
p_{24}	mRNA ATM	p_{69}	Gp53
p_{25}	ATMn	p_{70}	nieaktywne GA20
p_{26}	pre-miR-16	p_{71}	nieaktywne GATM
p_{27}	miR-16	p_{72}	nieaktywne GBax
p_{28}	ATMpn	p_{73}	nieaktywne GCHK2
p_{29}	ATMan	p_{74}	nieaktywne GI κ B α
p_{30}	CREBn	p_{75}	nieaktywne GMdm2
p_{31}	MRNn	p_{76}	nieaktywne Gp21
p_{32}	MRNpn	p_{77}	nieaktywne Gp53
p_{33}	KSRP	p_{78}	nieaktywne GPTEN
p_{34}	KSRPpn	p_{79}	nieaktywne GWip1
p_{35}	Mdm2pn	p_{80}	CREBpn
p_{36}	Mdm2ppn	p_{81}	KSRPp
p_{37}	TNF α	p_{82}	PIP3 po fosforylacji AKT
p_{38}	TNFR1	p_{83}	AKTp po fosforylacji Mdm2
p_{39}	Ra	p_{84}	KSRPpn po transkrypcji do pre-miR-16
p_{40}	IKKKa	p_{85}	CREBpn po aktywacji GATM
p_{41}	IKKK	p_{86}	CREBpn po aktywacji GWip1
p_{42}	A20	p_{87}	MRNpn po przejściu ATMpn
p_{43}	mRNA A20	p_{88}	IKKKa po przejściu IKK
p_{44}	mRNA I κ B α		

TABELA 6.5: Lista nazw aktywnych komponentów sieci – tranzycji (patrz [104]).

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_0	naprawa uszkodzeń indukowana przez p53pn	t_{85}	przejście z IKKi do IKKii
t_1	tworzenie DSB stymulowane przez IR	t_{86}	przejście z IKKii do IKK
t_2	źródło IR	t_{87}	przejście z IKK do IKKa przez IKKKa
t_3	transkrypcja z DNA do mRNA Bax	t_{88}	hamowanie Ra przez A20
t_4	transkrypcja z DNA do mRNA p21	t_{89}	przejście z IKK do IKKa przez ATMan
t_5	translacja z mRNA p21 do p21	t_{90}	hamowanie transkrypcji mRNA I κ B α przez p53pn
t_6	translacja z mRNA Bax do Bax	t_{91}	hamowanie transkrypcji mRNA A20 przez p53pn
t_7	degradacja p21	t_{92}	degradacja mRNA p21
t_8	degradacja Bax	t_{93}	degradacja mRNA Bax
t_9	defosforylacja p53pn przez Wip1n	t_{94}	degradacja p53pn
t_{10}	fosforylacja p53n przez Chk2pn	t_{95}	degradacja p53n
t_{11}	degradacja p53pn przez Mdm2pn	t_{96}	degradacja Mdm2ppn
t_{12}	degradacja p53n przez Mdm2pn	t_{97}	degradacja Mdm2pn
t_{13}	źródło DNA	t_{98}	degradacja Mdm2
t_{14}	transkrypcja z DNA do mRNA p53	t_{99}	degradacja Mdm2p
t_{15}	degradacja mRNA p53	t_{100}	przejście I κ B α z jądra do cytoplazmy
t_{16}	translacja z mRNA p53 do p53n	t_{101}	przejście I κ B α z cytoplazmy do jądra
t_{17}	transkrypcja z DNA do mRNA Mdm2	t_{102}	tworzenie kompleksu I κ B α n i NF- κ Bn

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{18}	transkrypcja z DNA do mRNA PTEN	t_{103}	przejście kompleksu $I\kappa B\alpha$ i $NF-\kappa B$ z jądra do cytoplazmy
t_{19}	degradacja mRNA Mdm2	t_{104}	degradacja $I\kappa B\alpha$
t_{20}	degradacja mRNA PTEN	t_{105}	tworzenie kompleksu $I\kappa B\alpha$ i $NF-\kappa B$
t_{21}	translacja z mRNA PTEN do PTEN	t_{106}	degradacja kompleksu $I\kappa B\alpha$ i $NF-\kappa B$
t_{22}	degradacja PTEN	t_{107}	przejście $NF-\kappa B$ z cytoplazmy do jądra
t_{23}	defosforylacja PIP3 przez PTEN	t_{108}	źródło IKK
t_{24}	fosforylacja PIP2	t_{109}	degradacja $I\kappa B\alpha$ po degradacji kompleksu
t_{25}	defosforylacja AKTp	t_{110}	transkrypcja do mRNA Wip1
t_{26}	fosforylacja AKT przez PIP3 i ATMan	t_{111}	degradacja mRNA Wip1 przez shRNA
t_{27}	fosforylacja Mdm2 przez AKTp	t_{112}	synteza shRNA
t_{28}	defosforylacja Mdm2p	t_{113}	przejście KSRPpn z jądra do cytoplazmy
t_{29}	degradacja Mdm2p przez Chk2p	t_{114}	spontaniczna fosforylacja p53n
t_{30}	degradacja Mdm2 przez Chk2pn	t_{115}	rozłączenie kompleksu $I\kappa B\alpha$ i $NF-\kappa B$
t_{31}	translacja z mRNA Mdm2 do Mdm2	t_{116}	fosforylacja $I\kappa B\alpha$ przez IKKa
t_{32}	translacja z mRNA Wip1 do Wip1n	t_{117}	degradacja $I\kappa B\alpha p$
t_{33}	degradacja Wip1n	t_{118}	fosforylacja $I\kappa B\alpha$ w kompleksie z $NF-\kappa B$ przez IKKa
t_{34}	degradacja mRNA Wip1	t_{119}	degradacja kompleksu $I\kappa B\alpha p$ i $NF-\kappa B$
t_{35}	transkrypcja z DNA do mRNA Chk2	t_{120}	degradacja $I\kappa B\alpha p$ po degradacji kompleksu
t_{36}	degradacja mRNA Chk2	t_{121}	spontaniczna inaktywacja TNFR1
t_{37}	translacja z mRNA Chk2 do Chk2n	t_{122}	niezależna aktywacja GATM
t_{38}	defosforylacja Chk2pn przez Wip1n	t_{123}	aktywacja GATM zależna od p53pn
t_{39}	fosforylacja Chk2n przez ATMan	t_{124}	aktywacja GATM zależna od CREBpn
t_{40}	degradacja Chk2n	t_{125}	aktywacja GCHK2
t_{41}	degradacja Chk2pn	t_{126}	aktywacja GPTEN przez p53pn
t_{42}	transkrypcja do mRNA ATM	t_{127}	aktywacja GMdm2 zależna od p53pn
t_{43}	translacja z mRNA ATM do ATMn	t_{128}	aktywacja Gp21 zależna od p53pn
t_{44}	degradacja ATMn	t_{129}	aktywacja GBax zależna od p53pn
t_{45}	degradacja mRNA ATM	t_{130}	aktywacja GA20 zależna od $NF-\kappa Bn$
t_{46}	degradacja mRNA Wip1 przez miR-16	t_{131}	inaktywacja GATM
t_{47}	dojrzewanie pre-miR-16	t_{132}	inaktywacja GCHK2
t_{48}	transkrypcja do pre-miR-16 przez KSRPpn	t_{133}	inaktywacja GPTEN
t_{49}	degradacja miR-16	t_{134}	inaktywacja GMdm2
t_{50}	degradacja pre-miR-16	t_{135}	inaktywacja Gp21
t_{51}	defosforylacja ATMpn przez Wip1n	t_{136}	inaktywacja GBax
t_{52}	fosforylacja ATMn przez DSB	t_{137}	inaktywacja GA20
t_{53}	degradacja ATMpn	t_{138}	inaktywacja $GI\kappa B\alpha$
t_{54}	przejście ATMpn do ATMan przez MRNpn	t_{139}	aktywacja $GI\kappa B\alpha$ zależna od $NF-\kappa Bn$
t_{55}	przejście ATMan do ATMpn przez Wip1n	t_{140}	niezależna aktywacja GWip1
t_{56}	degradacja ATMan	t_{141}	inaktywacja GWip1
t_{57}	defosforylacja CREBpn	t_{142}	aktywacja GWip1 zależna od p53pn
t_{58}	fosforylacja CREBn przez ATMan	t_{143}	aktywacja GWip1 zależna od $NF-\kappa Bn$
t_{59}	fosforylacja MRNn przez DSB	t_{144}	aktywacja GWip1 zależna od CREBpn
t_{60}	defosforylacja MRNpn	t_{145}	źródło $NF-\kappa B$
t_{61}	fosforylacja MRNn przez ATMpn	t_{146}	inaktywacja Gp53
t_{62}	fosforylacja KSRP przez ATMan	t_{147}	aktywacja Gp53 zależna od $NF-\kappa Bn$
t_{63}	defosforylacja KSRPp	t_{148}	reaktywacja GA20
t_{64}	przejście KSRPp z cytoplazmy do jądra	t_{149}	reaktywacja GATM
t_{65}	przejście Mdm2p z cytoplazmy do jądra	t_{150}	reaktywacja GBax
t_{66}	degradacja Mdm2pn przez Chk2pn	t_{151}	reaktywacja GCHK2
t_{67}	fosforylacja Mdm2pn przez ATMan	t_{152}	reaktywacja $GI\kappa B\alpha$
t_{68}	defosforylacja Mdm2ppn przez Wip1n	t_{153}	reaktywacja GMdm2
t_{69}	degradacja Mdm2ppn przez Chk2pn	t_{154}	reaktywacja Gp21
t_{70}	fosforylacja p53n przez ATMan	t_{155}	reaktywacja Gp53
t_{71}	hamowanie mRNA Chk2 przez p53pn	t_{156}	reaktywacja GPTEN

ID	Znaczenie biologiczne	ID	Znaczenie biologiczne
t_{72}	źródło TNF α	t_{157}	reaktywacja GWip1
t_{73}	źródło TNFR1	t_{158}	tworzenie puli PIP3
t_{74}	aktywacja TNFR1 przez TNF α	t_{159}	tworzenie puli AKTp
t_{75}	przejście IKKK do IKKKa przez TNFR1	t_{160}	tworzenie puli KSRPpn
t_{76}	przejście IKKKa do IKKK	t_{161}	tworzenie puli CREBpn po aktywacji GATM
t_{77}	transkrypcja z DNA do mRNA A20 przez I κ B α n	t_{162}	tworzenie puli MRNpn
t_{78}	translacja z mRNA A20 do A20	t_{163}	tworzenie puli IKKKa
t_{79}	degradacja mRNA A20	t_{164}	tworzenie puli CREBpn po aktywacji GWip1
t_{80}	transkrypcja z DNA do mRNA I κ B α	t_{165}	spontaniczna aktywacja GBax
t_{81}	degradacja A20	t_{166}	spontaniczna aktywacja Gp21
t_{82}	degradacja mRNA I κ B α	t_{167}	spontaniczna aktywacja GMdm2
t_{83}	translacja z mRNA I κ B α do I κ B α	t_{168}	spontaniczna aktywacja GPTEN
t_{84}	przejście IKKa do IKKi przez A20	t_{169}	spontaniczna aktywacja Gp53



RYСУNEK 6.5: Zaproponowany model ścieżki ATM–p53–NF- κ B z dwoma wymuszeniami (TNF i IR) (541 t-inw). Rysunek pochodzi z pracy [104].

Weryfikacja poprawności konwersji modelu opartego na ODE do modelu opartego o sieci Petriego

Adekwatność modelu wyrażonego w formalizmie sieci Petriego do modelu opartego na ODE została potwierdzona poprzez porównanie kluczowych punktów kontrolnych, uzyskanych dla różnych konfiguracji modelu. Rozumie się przez to analizę knockout odpowiednich modułów, tj. wyłączenie pojedynczego modułu wejściowego (TNF lub IR) oraz wyłączenie obu modułów wejściowych jednocześnie (TNF i IR) – ten ostatni odpowiada stanowi ustaleniemu. W ten sposób odpowiedź

systemu na aktywację TNF może być analizowana poprzez analizę knockout dla modułu IR, a odpowiedź systemu na aktywację IR może być analizowana poprzez analizę knockout modułu TNF. Tego rodzaju podejście pozwala określić czy model oparty o sieci Petriego odpowiada modelowi opartemu na ODE w różnych stanach modelowanego systemu.

W przypadku aktywacji TNF należy spodziewać się znaczącej aktywacji szlaku NF- κ B i modułów ściśle z nim związanych. Dla wzbudzenia IR oczekiwana jest znaczna aktywacja szlaku p53. Natomiast w przypadku homeostazy (stanu bez wzbudzenia związanego z TNF i IR) obserwowane są niskie poziomy Chk2, ATM, p53p oraz bardzo niski poziom p21 i BAX. Wymienione charakterystyczne właściwości poszczególnych stanów są również charakterystyczne dla modelu opartego o sieci Petriego. Poniżej przedstawiono szczegółową analizę potwierdzającą powyższe wnioskowanie:

1. Stan ustalony – analiza modelu opartego o sieci Petriego z wyłączeniem modułu TNF i IR:

Zakłada się, że stan ustalony reprezentowany jest przez niskie poziomy Chk2, ATM, p53p oraz bardzo niskie poziomy p21 i BAX.

Analiza knockout modułu TNF i IR w modelu opartym o sieci Petriego potwierdza powyższe założenia. W efekcie tej analizy dochodzi do wyłączenia modułów Chk2 i ATM. Elementarne podprocesy związane z fosforylacją p53 są osłabione, ponieważ wyłączone zostały reakcje fosforylacji p53 z udziałem Chk2pn i ATMan. Jediną niewyłączoną w konsekwencji analiz knockout reakcją jest spontaniczna fosforylacja. Reakcja ta stanowi około 49% wszystkich zamodelowanych podprocesów – tranzycja odpowiadająca tej reakcji występuje w 40 z 82 t-nieziemników. Procesy translokacji do Bax i p21 stanowią około 4% wszystkich zamodelowanych podprocesów. Ponadto, analiza knockout wykazała, że wyłączone zostały również inne podprocesy, tj. moduły CREB, MRN, AKT, KSRP, Mdm, IKK, IKKK, miR-16.

Obok analizy knockout przeprowadzono także analizę ważności. Analiza ważności dla modelu bez wzbudzeń związanych z TNF i IR została przedstawiona w formie tabelarycznej i zawiera tylko najbardziej znaczące procesy elementarne, patrz Tabela 6.6. Tabela 6.6 zawiera następujące kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory odpowiednich tranzycji, *Nazwa procesu elementarnego* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane do każdej tranzycji, *Ważność* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%]. Jak pokazuje Tabela 6.6, kluczowe dla funkcjonowania całego systemu reakcje związane są z p53 (od aktywacji genu, transkrypcji do translacji p53 i jego fosforylacji) oraz NF- κ B (przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra i dodatkowa aktywacja Gp53).

TABELA 6.6: Analiza ważności dla modelu ATM–p53–NF- κ B z wyłączeniem TNF i IR (82 t-inw).

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność tranzycji	
		tranz./t-inw.	[%]
t_7	transkrypcja z DNA do mRNA p53	42/82	51,22
t_{t9}	translacja z mRNA p53 do p53n	40/82	48,78
t_{t57}	spontaniczna fosforylacja p53n	40/82	48,78
t_{t52}	przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra	34/82	41,46
t_{t80}	źródło NF- κ B	33/82	40,24
t_{t82}	aktywacja Gp53 zależna od NF- κ Bn	21/82	25,61
t_{t97}	spontaniczna aktywacja Gp53	21/82	25,61

2. Stan z uwzględnieniem wzbudzenia przez TNF - analiza modelu sieci opartego o Petriego z wyłączeniem modułu IR:

Zakłada się, że stan wzbudzenia przez TNF reprezentowany jest przez znacznie zwiększoną aktywację szlaku NF- κ B i modułów ściśle z nim związanych.

Wyłączenie IR w modelu opartym o sieci Petriego, odpowiadające modelowi ze wzbudzeniem przez TNF, potwierdza powyższe założenia. W konsekwencji analizy knockout modułu IR wyłączone zostały następujące moduły: Chk2, ATM, CREB, MRN, AKT, KSRP, Mdm, miR-16. Elementarne procesy związane z fosforylacją p53 są osłabione, ponieważ wyłączono reakcje fosforylacji p53 z udziałem Chk2pn i ATMan. Aktywną reakcją pozostaje jedynie fosforylacja spontaniczna. Natomiast w module IKK wyłączono tylko jeden elementarny proces, jakim jest fosforylacja IKK za pośrednictwem ATMan.

Analiza ważności przeprowadzona dla modelu ze wzbudzeniem TNF przedstawiona została w Tabeli 6.7, jednak zawarto tam tylko najistotniejsze procesy elementarne. Tabela 6.7 zawiera następujące kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory odpowiednich tranzycji, *Nazwa procesu elementarnego* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane do każdej tranzycji, *Ważność* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%]. Wyniki wskazują, że najbardziej kluczowe reakcje dla funkcjonowania układu z wymuszeniem TNF związane są z modułem p53 (od aktywacji genu, transkrypcji do translacji p53 i jego fosforylacji) oraz NF- κ B (przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra i dodatkowa aktywacja Gp53). Wyniki te potwierdzają znaczne zwiększenie aktywacji ścieżki NF- κ B przez TNF.

TABELA 6.7: Analiza ważności dla modelu ATM–p53–NF- κ B z wyłączeniem IR (89 t-inw).

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność tranzycji	
		tranz./t-inw.	[%]
t_7	transkrypcja z DNA do mRNA p53	42/89	47,19
t_9	translacja z mRNA p53 do p53n	40/89	44,94
t_{68}	spontaniczna fosforylacja p53n	40/89	44,94
t_{62}	przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra	39/89	43,82
t_{97}	źródło NF- κ B	38/89	42,70
t_{99}	aktywacja Gp53 zależna od NF- κ Bn	21/89	23,60
t_{115}	spontaniczna aktywacja Gp53	21/89	23,60

3. Stan z uwzględnieniem wzbudzenia przez IR - analiza modelu opartego o sieci Petriego z wyłączeniem modułu TNF:

Zakłada się, że stan wzbudzenia przez IR reprezentowany jest przez znacznie zwiększoną aktywację szlaku p53 i może również zwiększać aktywację szlaku NF- κ B.

Wyłączenie modułu TNF w modelu opartym o sieci Petriego, odpowiadające modelowi ze wzbudzeniem przez IR potwierdza powyższe założenia. W konsekwencji analizy knockout wyłączone zostały pętle IKK i IKKa, odpowiadające podprocesom fosforylacji IKK do IKKa i defosforylacji IKKa do IKK. Można zatem zauważyć, że proces fosforylacji IKK do IKKa został znacznie osłabiony, jednak dalej ta reakcja może być stymulowana przez ATMan.

Analiza ważności przeprowadzona dla modelu ze wzbudzeniem przez IR przedstawiona została w Tabeli 6.8, jednak zawarto tam tylko najistotniejsze procesy elementarne. Tabela 6.8 zawiera następujące kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory odpowiednich tranzycji, *Nazwa procesu elementarnego* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane do każdej tranzycji, *Ważność* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%]. Wyniki wskazują, że najbardziej kluczowe reakcje dla funkcjonowania układu z wymuszeniem IR związane są, podobnie jak w innych stanach, z tworzeniem uszkodzeń DSB, ATM (od transkrypcji, przez translację, do jego fosforylacji i zaangażowania w fosforylację Chk2n), p53 (od transkrypcji, przez translację, do fosforylacji) oraz NF- κ B (przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra). Takie wyniki potwierdzają znaczne

zwiększenie aktywacji szlaków p53 i NF- κ B przez IR, jednak równie kluczowe są elementarne procesy wchodzące w skład modułu ATM.

TABELA 6.8: Analiza ważności dla modelu ATM–p53–NF- κ B z wyłączeniem TNF (534 t-inw).

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność tranzycji	
		tranz./t-inw.	[%]
t_1	tworzenie DSB stymulowane przez IR	418/534	78,28
t_2	źródło IR	418/534	78,28
t_{42}	transkrypcja do mRNA ATM	418/534	78,28
t_{13}	źródło DNA	416/534	77,90
t_{14}	transkrypcja z DNA do mRNA p53	416/534	77,90
t_{52}	fosforylacja ATMn przez DSB	415/534	77,72
t_{16}	translacja z mRNA p53 do p53n	414/534	77,53
t_{43}	translacja z mRNA ATM do ATMn	414/534	77,53
t_{54}	przejście ATMpn do ATMan przez MRNpn	407/534	76,22
t_{154}	tworzenie puli MRNpn	407/534	76,22
t_{100}	przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra	254/534	47,57
t_{137}	źródło NF- κ B	253/534	47,38
t_{39}	fosforylacja Chk2n przez ATMan	222/534	41,57

Niezależnie od tego, który stan podlegał analizie (stan ustalony, stan z wymuszeniem TNF, stan z wymuszeniem IR) to kluczowe reakcje dla funkcjonowania modelowanego systemu zawsze związane są z obecnością NF- κ B i p53. Wyjątkiem jest stan ze wzbudzeniem IR, gdzie równie ważny jest moduł ATM.

6.3.3 Analiza i wyniki

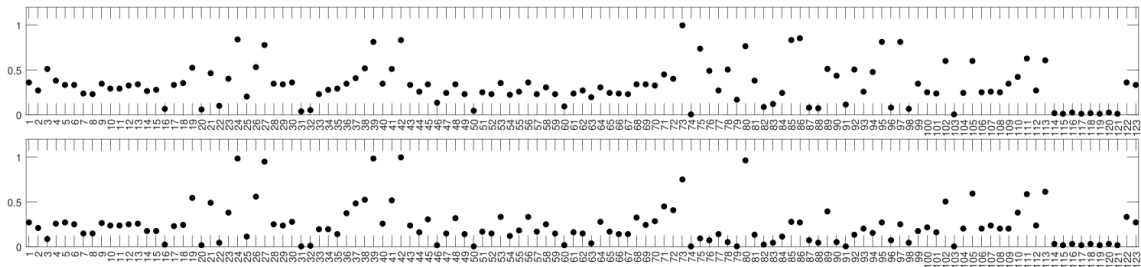
Analiza wrażliwości dla modelu opartego na ODE

Analiza wrażliwości opisana w tym paragrafie nie została wykonana przez autora rozprawy, jest natomiast wynikiem współpracy i badań opublikowanych w [104], dokładny wkład autora został opisany we wprowadzeniu do tego rozdziału (patrz podrozdział 6.1).

Analiza wrażliwości wykorzystana w tych badaniach opiera się na rozkładzie częstotliwości odpowiedzi czasowej systemu do tworzenia rankingów parametrów [137] i została opisana w podrozdziale 2.5 rozdziału teoretycznego. Niemniej jednak, otrzymywane rankingi można wykorzystać do znalezienia najważniejszych parametrów i procesów, a następnie wykorzystać m.in. do wskazania celów molekularnych dla nowych leków. Należy jednak zaznaczyć, że analizie wrażliwości poddano jedynie parametry kinetyczne modelu, a więc takie jak szybkość reakcji biochemicznych, gdyż tylko one mogą stać się możliwymi celami molekularnymi dla leków. Co więcej, tylko parametry związane z konkretnymi reakcjami biochemicznymi mają swoje odpowiedniki w sieci Petriego w postaci tranzycji. W rezultacie liczba analizowanych parametrów została zredukowana do 123 (z początkowych 135). Parametry te zostały wymienione w Tabeli 8.1 w materiałach dodatkowych (patrz podrozdział 8.1 rozdziału 8).

Ranking parametrów otrzymany w wyniku analizy wrażliwości reprezentuje skumulowany efekt zmiany danej wartości parametru na wszystkie zmienne w modelu. Należy zauważyć, że wysoka pozycja danego parametru w rankingu może sugerować, że zmiana wartości tego parametru powoduje istotną zmianę kilku zmiennych modelu lub umiarkowaną zmianę wielu zmiennych modelu. Jednakże ranking parametrów nie pozwala na rozróżnienie tych dwóch przypadków. Wyniki dla badanego modelu opartego na ODE, pokazują, że wiele parametrów istotnie wpływa na odpowiedź modelu, co można zauważyć na schemacie zawierającym ten ranking, patrz Rysunek 6.6. Na Rysunku 6.6 pojawiają się dwa rankingi parametrów dla dwóch różnych symulacji, tzn. z niską (górny ranking) i wysoką (dolny ranking) dawką promieniowania. Wartości w tych rankingach mieszczą

się w zakresie od 0 do 1, a im wyższa wartość danego parametru tym istotniejszy może on być dla badanego systemu. Interpretacja obu rankingów znajduje się poniżej.



RYSUNEK 6.6: Rankingi parametrów dla modelu ścieżki sygnalizacyjnej ATM–p53–NF- κ B opisanego w [134]. Symulacja została przeprowadzona dla dwóch sygnałów wejściowych: (górny ranking) 10 ng/ml TNF i 4 Gy IR; (dolny ranking) 10 ng/ml TNF i 10 Gy IR. Nazwy parametrów odpowiadające numerom na rankingu podano w Tabeli 8.1 znajdującej się w rozdziale z materiałami dodatkowymi. Rysunek pochodzi z pracy [104].

1. Analiza wyników symulacji z użyciem 10 ng/ml TNF i 4 Gy IR:

- Analiza wrażliwości dla symulacji z niską dawką promieniowania wykazała, że parametrem mającym największy wpływ na odpowiedź modelu jest parametr związany z szybkością uszkodzeń DSB wywołanych przez IR. Odkrycie to nie jest zaskakujące i nie prowadzi do żadnych wniosków dotyczących perspektywicznych celów molekularnych leków.
- W module p53 analiza wrażliwości pozwoliła na identyfikację wielu istotnych parametrów, w tym parametrów bezpośrednio wpływających na poziom białka p53 i jego inhibitora Mdm2, tj. synteza mRNA p53, degradacja transkryptu p53, szybkość translacji p53, synteza mRNA Mdm2, degradacja transkryptu Mdm2, szybkość translacji Mdm2, spontaniczna degradacja białka Mdm2p i degradacja Mdm2 przez Chk2.
- W module NF- κ B analiza wrażliwości wykazała zaskakujące wyniki, zgodnie z którymi moduł ten jest bardzo odporny na zmiany parametrów i żaden z jego parametrów nie wpływa istotnie na odpowiedź modelu. Własność ta prawdopodobnie wynika z faktu, że NF- κ B bardzo szybko reaguje na obecność wzbudzeń związanych z TNF lub IR, przez co jego odpowiedź może być równie szybko tłumiona. To w konsekwencji mogłoby skutkować niskim poziomem białek biorących udział w tym procesie.
- W module ATM, zwanym też modułem detekcji uszkodzeń DNA, analiza wrażliwości wykazała wysoką czułość. Moduł ATM jest bardzo wrażliwy na zmiany parametrów i wiele parametrów należących do tego modułu silnie wpływa na odpowiedź całego modelu. Niezwykle istotne okazały się parametry reprezentujące szybkość powstawania uszkodzeń DNA i ich naprawy, ale także inne parametry, takie jak aktywacja genu ATM, transkrypcja, synteza ATM, w tym także parametry związane z szybkością degradacji zarówno białka ATM, jak i transkryptu ATM. Ponadto zidentyfikowano jako istotne także inne parametry, tj. szybkość aktywacji ATM przez tworzenie DSB, szybkość aktywacji ATM przez tworzenie kompleksu MRN, szybkość aktywacji i inaktywacji genu Chk2, oraz szybkość aktywacji kompleksu MRN przez ATM.
- W module Wip1 analiza wrażliwości wskazała, że istotne są tylko parametry związane z syntezą mRNA WIP1 i spontaniczną degradacją transkryptu, a także translacją WIP1 i degradacją białka WIP1.

- Analiza wrażliwości wykazała bardzo niski wpływ parametrów związanych z dynamiką białek Bax i p21, co jest zgodne z naszymi przewidywaniami. Białka Bax i p21 nie wpływają na inne procesy opisane w modelu, są uważane za sygnał wyjściowy modelu.

2. Analiza wyników symulacji z użyciem 10 ng/ml TNF i 10 Gy IR:

- W symulacji z wysoką dawką promieniowania analiza wrażliwości wykazała, że parametrem o największym wpływie na odpowiedź modelu jest szybkość translacji Mdm2. Parametr ten pojawił się jako istotny także w powyżej opisanej analizie (symulacji z niską dawką promieniowania), ale nie był najważniejszy.
- Analiza wrażliwości dla symulacji z wysoką dawką promieniowania wykazała w ogólności wyniki zbliżone do symulacji z niską dawką promieniowania. Precyzując, dla modułu p53 wszystkie istotne parametry pojawiające się we wcześniejszej analizie są również istotne obecnie. Oprócz nich kluczowe znaczenie dla odpowiedzi modelu mają także dodatkowe parametry dotyczące procesów tworzących pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego w systemie kontroli p53, tj. inaktywacja genów Mdm2 i PTEN, ale także parametr degradacji p53 przez Mdm2. Podobne wyniki, zarówno dla symulacji z niską, jak i wysoką dawką promieniowania obserwujemy także dla modułów NF- κ B, Wip1, Bax i p21.
- Analiza wrażliwości w symulacji z wysoką dawką promieniowania wykazuje znaczne różnice dla modułu ATM w porównaniu z wynikami z niską dawką promieniowania. Jak można zauważyć, analiza zidentyfikowała tylko dwa parametry jako istotne dla odpowiedzi modelu i są to parametry szybkości tworzenia uszkodzeń DNA i ich naprawy. Jest to znacznie mniej istotnych parametrów niż w przypadku symulacji z niską dawką promieniowania.

Analiza ważności dla modelu sieci Petriego

Analiza dla modelu opartego o sieci Petriego skupiła się głównie na analizie ważności poszczególnych procesów elementarnych, ale także na znalezieniu istotnego podprocesu odpowiadającego podzbirowi tranzycji, który jest zawarty w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników.

Analiza ważności pozwala na znalezienie elementarnych procesów, które są najbardziej kluczowe dla funkcjonowania badanego systemu. Dokładniej, teoria stojąca za analizą ważności została dokładnie opisana w rozdziale 4, w podrozdziale 4.1 (patrz definicja 4.1.1).

Wyniki analizy ważności dla modelu relacji ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B zostały przedstawiono w dwóch Tabelach: Tabeli 8.2 (patrz rozdział 8 – *Materiały dodatkowe*) zawierającej ważności dla wszystkich tranzycji i Tabeli 6.9 zawierającej tylko te tranzycje, dla których ważność wynosi więcej niż 40%. W obu tych tabelach zawarto następujące kolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory odpowiednich tranzycji, *Nazwa procesu elementarnego* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane do każdej tranzycji, *Ważność* – kolumna zawierająca ważność tranzycji wyrażoną w dwojaki sposób: *tranz./t-inw.* oraz [%].

Wyniki analizy ważności dla modelu opartego o sieci Petriego pokazują, że najważniejsze procesy elementarne związane są z tworzeniem DSB przez IR, procesy związane z modułami ATM, p53 i NF- κ B. Proces elementarny, jakim jest tworzenie DSB przez IR, jest zaangażowany w ponad 77% wszystkich zamodelowanych podprocesów. Procesy elementarne należące do modułów ATM i p53 są zaangażowane w ponad 75% wszystkich zamodelowanych podprocesów, podczas gdy moduł NF- κ B jest zaangażowany w ponad 47% wszystkich zamodelowanych podprocesów. Wszystkie te wartości znajdują się w Tabeli 6.9.

TABELA 6.9: Analiza ważności dla modelu ATM–p53–NF- κ B z dwoma wzbudzeniami: TNF i IR (541 t-inw). Tabela pochodzi z pracy [104].

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność tranzycji	
		tranz./t-inw.	[%]
t_1	tworzenie DSB stymulowane przez IR	418/541	77,26
t_2	źródło IR	418/541	77,26
t_{42}	transkrypcja do mRNA ATM	418/541	77,26
t_{13}	źródło DNA	416/541	76,89
t_{14}	transkrypcja z DNA do mRNA p53	416/541	76,89
t_{52}	fosforylacja ATMn przez DSB	415/541	76,71
t_{16}	translacja z mRNA p53 do p53n	414/541	76,52
t_{43}	translacja z mRNA ATM do ATMn	414/541	76,52
t_{54}	przejście ATMpn do ATMan przez MRNpn	407/541	75,23
t_{162}	tworzenie puli MRNpn	407/541	75,23
t_{107}	przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra	259/541	47,87
t_{145}	źródło NF- κ B	258/541	47,69
t_{39}	fosforylacja Chk2n przez ATMan	222/541	41,04

Analiza ważności obejmuje także poszukiwanie zbioru tranzycji, który jest zawarty w wystarczająco dużej liczbie wsparć t-niezmienników, a więc podprocesu (zbioru tranzycji) będącego kluczowym elementem funkcjonowania całego systemu. Do znalezienia takiego zbioru wykorzystano algorytm opisany w pracy [101] oraz w paragrafie 5.2.3 podrozdziału 5.2. W efekcie działania algorytmu znaleziono istotny podproces składający się z następujących tranzycji: t_1 , t_2 , t_{13} , t_{14} , t_{16} , t_{42} , t_{43} , t_{52} , t_{70} , t_{107} , t_{147} (patrz Tabela 6.5). Wymienny zbiór tranzycji w ujęciu biologicznym wskazuje na kluczowe elementy mechanizmu systemu odpowiedzi na uszkodzenia DNA opartego na ścieżkach ATM–p53–NF- κ B. Dokładniej, są to procesy obejmujące utworzenie uszkodzeń DNA, mechanizmy modułu detekcji ATM, który w następstwie aktywuje procesy z modułów p53 i NF- κ B, które współpracują w celu określenia odpowiedzi komórki na bodziec. Ważność wymienionego zbioru tranzycji potwierdza jego analiza knockout, która prowadzi do wyłączenia około 92% wszystkich zamodelowanych podprocesów, potwierdzając tym samym bezsprzecznie jego istotność.

6.3.4 Porównanie wyników analiz obu modeli

Niniejszy paragraf zawiera porównanie wyników dwóch niezależnych analiz przeprowadzonych dla dwóch różnych modeli, ale opisujących to samo zjawisko. Obie zastosowane metody, analiza ważności dla modelu opartego na klasycznej sieci Petriego, jak i analiza wrażliwości dla modelu opartego na równaniach różniczkowych zwyczajnych, identyfikują istotne komponenty analizowanego systemu. Zagłębiając się w szczegóły, analiza ważności jest analizą strukturalną, która pozwala wskazać procesy elementarne jak i podprocesy będące istotne pod względem przepływu informacji w takiej sieci. Natomiast analiza wrażliwości pozwala na wskazanie parametrów, których zmiana powoduje największe zmiany ilościowe i jakościowe w odpowiedzi modelu. Wyniki tej analizy są zależne od wartości parametrów, jak i wejść, dlatego analizę przeprowadza się dla różnych warunków symulacji. Niemniej jednak obie analizy pozwalają na uzyskanie informacji o kluczowych komponentach badanego systemu. Porównanie wyników tych dwóch analiz zawarto w Tabelach 6.10 i 6.11. Tabela 6.10 zawiera najistotniejsze wyniki analizy wrażliwości i odpowiadające im wyniki analizy ważności, wyróżniono w niej trzy główne kolumny: *Proces biologiczny* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne parametru/tranzycji, *Analiza wrażliwości dla modelu ODE* – zawierająca w dwóch podkolumnach informację o numerze parametru i jego pozycji w rankingu (gdzie 1 oznacza najważniejszy parametr), *Analiza ważności dla modelu sieci Petriego* – zawierająca w dwóch podkolumnach identyfikator tranzycji i jej ważność podaną w procentach. Ponadto tabela ta została podzielona na dwie części w sposób horyzontalny, wykorzystując oznaczenia *A* i *B*,

gdzie A oznacza analizę wrażliwości dla symulacji z niską dawką promieniowania, a B z wysoką dawką promieniowania. Natomiast Tabela 6.11 zawiera najistotniejsze wyniki analizy ważności i odpowiadające im wyniki analizy wrażliwości, umieszczono w niej dwie główne kolumny: *Analiza ważności dla modelu sieci Petriego* i *Analiza wrażliwości dla modelu ODE*. *Analiza ważności dla modelu sieci Petriego* podzielona jest na następujące podkolumny: *ID* – kolumna zawierająca identyfikatory odpowiednich tranzycji, *Nazwa procesu elementarnego* – kolumna zawierająca znaczenie biologiczne przypisane do każdej tranzycji, oraz *Ważność* – kolumna zawierająca wagę tranzycji wyrażoną w procentach. Kolumna *Analiza wrażliwości dla modelu ODE* również została podzielona na kilka podkolumn, wyróżniono: *nr parametru* – zawierająca numery odpowiednich parametrów modelu ODE oraz kolumny *4Gy* i *10BGy*, odpowiadające dwóm różnym warunkom symulacji: z niską i wysoką dawką promieniowania. Kolumny te zawierają oznaczenia „+” i „-”, pierwsze z nich przedstawia parametry istotne, a drugie parametry „nieistotne”, wyróżnione na podstawie rankingu parametrów.

TABELA 6.10: Porównanie najistotniejszych wyników analizy wrażliwości modelu opartego na ODE z wynikami analizy ważności modelu opartego o sieci Petriego. Analiza wrażliwości przeprowadzona dla dwóch symulacji z różnymi sygnałami wejściowymi: A – $10\mu M$ TNF i 4 Gy IR, B – $10\mu M$ TNF i 10 Gy IR. Tabela pochodzi z pracy [104].

A*				
Proces biologiczny	Analiza wrażliwości dla modelu opartego na ODE		Analiza ważności dla modelu opartego o sieci Petriego	
	nr parametru	pozycja w rankingu	ID tranzycji	ważność [%]
tworzenie DSB zależne od IR	73	1	t1	77,26
degradacja ATMn/ATMpn/ATMan	86	2	t44/53/56	0,74
degradacja mRNA Mdm2	24	3	t19	2,03
translacja Mdm2	42	4	t31	28,65
degradacja mRNA ATM	85	5	t45	0,74
transkrypcja ATM	97	6	t42	77,26
transkrypcja Mdm2	39	7	t17	30,68
translacja ATM	95	8	t43	76,52
degradacja Mdm2p indukowana przez Chk2p	27	9	t29	3,32
naprawa uszkodzeń DNA indukowana przez p53	80	10	t0	1,84
B*				
translacja Mdm2	42	1	t31	28,65
transkrypcja Mdm2	39	2	t17	30,68
degradacja mRNA Mdm2	24	3	t19	2,03
naprawa uszkodzeń DNA indukowana przez p53	80	4	t0	1,84
degradacja Mdm2p indukowana przez Chk2p	27	5	t29	3,32
tworzenie DSB zależne od IR	73	6	t1	77,26
translacja Wip1	11	7	t32	21,44
degradacja mRNA Wip1	10	8	t34	2,40
transkrypcja Wip1	11	9	t110	28,65
degradacja Mdm2p	26	10	t99	2,03

* W powyższej Tabeli tranzycje o ważności $\geq 20\%$ oznaczono pogrubioną czcionką. Co więcej, można zauważyć, że 50% wyników jest wspólnych dla obu analiz.

Jak można zauważyć w Tabelach 6.10 i 6.11, część wyników analizy ważności i wrażliwości jest zgodna, w szczególności wyniki dla symulacji z niską dawką promieniowania 4Gy. Poza częścią wspólną wyników dla obu tych metod, można zauważyć, że każda z badanych metod dostarcza także dodatkowych, indywidualnych wniosków, których ta druga nie zapewnia. Otrzymane wyniki wskazują zatem na komplementarność tych metod. Wniosek ten staje się jeszcze bardziej umocniony w świetle następujących dwóch obserwacji.

Po pierwsze, jedne z najważniejszych procesów elementarnych w modelu opartym o sieci Petriego należą do modułu ATM i są to tranzycje: t_{42} , t_{43} , t_{52} , t_{54} . Ich dokładne znaczenie biolo-

TABELA 6.11: Porównanie najistotniejszych wyników analizy ważności modelu opartego o sieci Petriego z wynikami analizy wrażliwości modelu opartego na ODE dla dwóch symulacji z różnymi sygnałami wejściowymi: $A - 10\mu M$ TNF i 4 Gy IR, $B - 10\mu M$ TNF i 10 Gy IR.

Analiza ważności dla modelu opartego o sieci Petriego			Analiza wrażliwości dla modelu opartego na ODE		
ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność [%]	nr parametru	4Gy*	10Gy*
t_1	tworzenie DSB stymulowane przez IR	77,26	73	+	+
t_2	źródło IR	77,26	brak parametru		
t_{42}	transkrypcja do mRNA ATM	77,26	97	+	-
t_{13}	źródło DNA	76,89	brak parametru		
t_{14}	transkrypcja z DNA do mRNA p53	76,89	38	+	+
t_{52}	fosforylacja ATMn przez DSB	76,71	75	+	-
t_{16}	translacja z mRNA p53 do p53n	76,52	41	+	+
t_{43}	translacja z mRNA ATM do ATMn	76,52	95	+	-
t_{54}	przejście z ATMpn do ATMan przez MRNpn	75,23	76	-	-
t_{162}	tworzenie puli MRNpn	75,23	brak parametru		

* W powyższej Tabeli za pomocą „+” oznaczono te parametry modelu opartego na ODE, które zostały zidentyfikowane jako ważne w rankingu parametrów, a „-” parametry nieistotne.

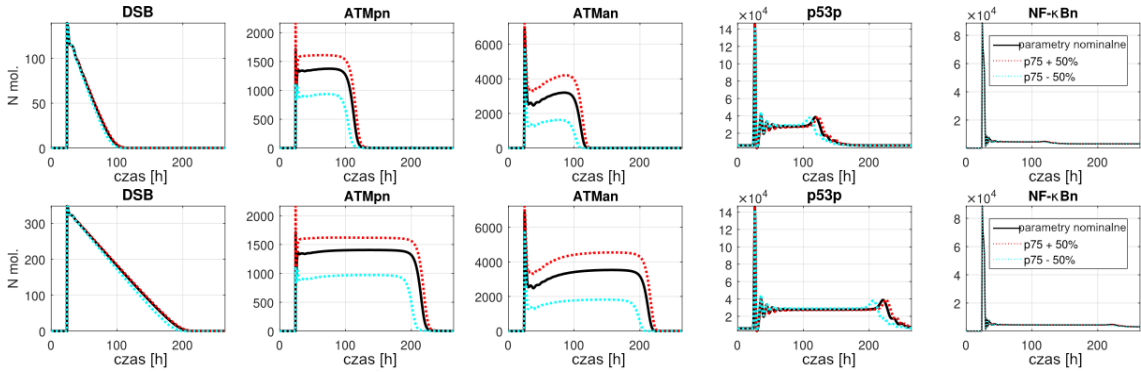
giczne można znaleźć w Tabeli 6.5. Jak wiadomo, moduł ATM jest kluczowym modułem wykrywania uszkodzeń w odpowiedzi na promieniowanie IR, uruchamia on dalszą kaskadę mechanizmów poprzez aktywację szlaku p53 i NF- κ B. Analiza wrażliwości również zidentyfikowała istotne parametry w module ATM, tj. p_{75} , p_{76} , p_{95} , p_{97} . Dokładne znaczenie biologiczne tych parametrów można znaleźć w Tabeli 8.1, w rozdziale *Materiały dodatkowe*. Jednakże, wymienione istotne parametry z modułu ATM zidentyfikowano tylko dla symulacji z niską dawką promieniowania (4Gy). W warunkach ekstremalnych, z wysoką dawką promieniowania (10Gy), znaczenie tych parametrów jest zdecydowanie mniejsze. Wydaje się, że może się to wiązać z obecnością silnej, dodatniej pętli sprzężenia zwrotnego w tym systemie regulacyjnym.

Po drugie, analiza wrażliwości wykazała istotny wpływ parametrów związanych z naprawą DNA, degradacją białek i degradacją transkryptów ATM i Mdm2. Jednak odpowiadające tym parametrom procesy elementarne nie zostały wykryte jako istotne w analizie ważności. Fakt ten ma jednak swoje uzasadnienie. W przypadku degradacji, można się spodziewać, że nie zostaną one wykryte jako kluczowe w modelu sieci Petriego, gdyż analiza ta jest bezpośrednio związana ze strukturą modelu. Oznacza to, że im większa liczba podprocesów jest zależna od danej reakcji, tym jest ona ważniejsza, a tranzycje odpowiadające degradacji są modelowane jako tranzycje wyjściowe. Jak wspomniano w podrozdziale 4.1 przy opisie analizy ważności, tranzycje wyjściowe nie wpływają na inne reakcje czy podprocesy, gdyż nie ma po nich miejsc następujących, a więc takie tranzycje mogą jedynie podbierać tokeny z miejsc poprzedzających.

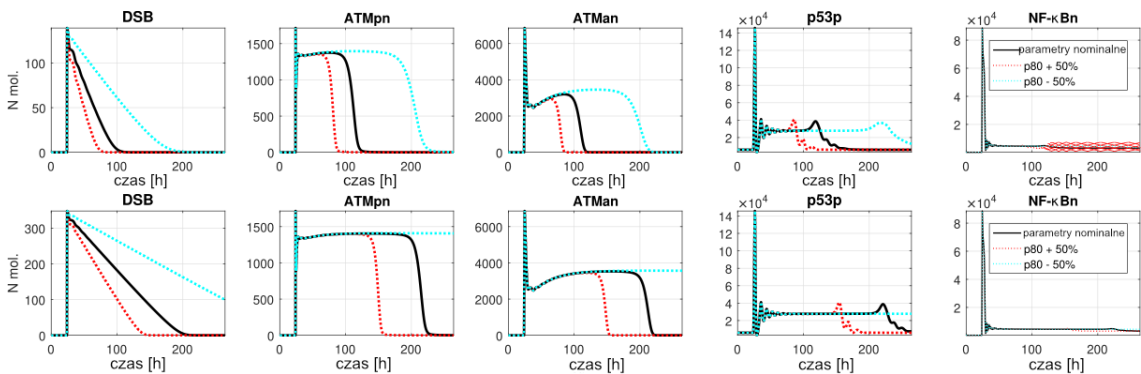
Podoba sytuacja może się pojawić także dla innych reakcji, niekoniecznie związanych z degradacjami. Przykładowo, można przytoczyć tutaj parametr p_{80} w modelu opartym na ODE i odpowiadającą mu tranzycję t_0 w modelu opartym na sieci Petriego. Komponenty te odpowiadają naprawie uszkodzeń DNA, jednak należy zwrócić uwagę, że w systemie działają moduły naprawcze, które nie są bezpośrednio związane z tą konkretną tranzycją, gdyby tak było, to jej znaczenie w istocie byłoby większe. Jednakże, elementarny proces odpowiadający wspomnianej tranzycji w modelu opartym o sieci Petriego jest zaangażowany w wiele innych podprocesów, a więc token pojawiający się w tym miejscu szybko jest wykorzystywany do aktywowania innych reakcji. W związku z tym, choć większość tranzycji związanych pośrednio z naprawą DNA lub tranzycji z innych modułów naprawczych, jest w rzeczywistości zidentyfikowana jako istotne, to ta jedna konkretna tranzycja niekoniecznie.

Obok powyższych wniosków pojawia się jeszcze jeden niezmiernie ciekawy dotyczący komponentów istotnych w jednym modelu a nieistotnych w drugim. Przykładowo, w symulacji modelu

opartego na ODE dla zmiennego parametru p_{75} , zidentyfikowanego jako istotny w analizie ważności (modelu opartego o sieci Petriego), a mniej istotny w analizie wrażliwości (modelu opartego na ODE), zauważono różnice w poziomach różnych form białka ATM, ale nie zaobserwowano różnic w czasie ustalania odpowiedzi. Własność ta została zaprezentowana na Rysunku 6.7. Przeciwną zależność zaobserwowano dla zmiany parametru p_{80} , zidentyfikowanego jako nieistotny w analizie ważności (modelu opartego o sieci Petriego), a istotny w analizie wrażliwości (modelu opartego na ODE). Dokładniej, nie obserwuje się różnic w poziomach białka, ale obserwuje się różne czasy ustalania odpowiedzi. Opisana charakterystyka znajduje się na Rysunku 6.8. Niewątpliwie należy rozważyć, czy opisane obserwacje są przypadkowe, czy jest to może ogólna zasada. Ponadto, pozostaje pytanie, jak wyjaśnić te zależności.



RYSUNEK 6.7: Wpływ zwiększenia/zmniejszenia wartości parametru p_{75} na odpowiedź modelu. Symulacja została przeprowadzona dla dwóch sygnałów wejściowych: (wykresy w górnym rzędzie) 10 ng/ml TNF i 4 Gy IR; (wykresy w dolnym rzędzie) 10 ng/ml TNF i 10 Gy IR. Stymulacja TNF jest stała podczas symulacji, natomiast promieniowanie IR włączono po 24-godzinnej symulacji na okres jednej godziny. Rysunek pochodzi z pracy [104].



RYSUNEK 6.8: Wpływ zwiększenia/zmniejszenia wartości parametru p_{80} na odpowiedź modelu. Symulacja została przeprowadzona dla dwóch sygnałów wejściowych: (wykresy w górnym rzędzie) 10 ng/ml TNF i 4 Gy IR; (wykresy w dolnym rzędzie) 10 ng/ml TNF i 10 Gy IR. Stymulacja TNF jest stała podczas symulacji, natomiast promieniowanie IR włączono po 24-godzinnej symulacji na okres jednej godziny. Rysunek pochodzi z pracy [104].

6.3.5 Konkluzje

Zaproponowane podejście dualnego modelowania, polegające na wykorzystaniu dwóch różnych metod modelowania, umożliwia przeprowadzenie kompleksowej analizy strukturalnej i symulacyjnej. W tym przypadku, w oparciu o istniejący model oparty na ODE, utworzono klasyczny model oparty o sieci Petriego. Następnie, w celu przeprowadzenia kompleksowej analizy, zastosowano analizę ważności, będącą analizą strukturalną przeprowadzoną dla modelu wyrażonego za pomocą sieci Petriego oraz analizę wrażliwości, skupioną na dynamice odpowiedzi modelu, dla modelu

wyrażonego za pomocą ODE. Taka analiza doprowadziła do znalezienia procesów, które są najważniejsze dla złożonej odpowiedzi systemu, patrząc z dwóch różnych perspektyw. Wcześniejsze badania wykazały, że obie metody prowadzą do podobnych wniosków i mogą być traktowane jako alternatywne podejścia, jednak ten wstępny wniosek został wyciągnięty po analizie stosunkowo prostego modelu biologicznego [150] (patrz podrozdział 6.2). Tutaj wnioski, opracowane w efekcie analizy zdecydowanie bardziej złożonego układu biologicznego, pokazują, że podejścia te wzajemnie się uzupełniają, a ich jednoczesne zastosowanie pozwala wydobyć z analizy więcej informacji. Obok tak istotnego wyniku, pojawia się także inne, nieoczekiwane odkrycie, które pokazuje, że zmiana parametru wskazanego jako istotny w modelu opartym o sieci Petriego i jednocześnie jako mniej istotny w modelu opartym na ODE prowadzi do zmiany poziomu białka, bez zmiany czasu ustalenia. Natomiast zmiana parametru uznanego za istotny w modelu opartym na ODE, który jest mniej istotny w modelu oparty o sieci Petriego, prowadzi do przeciwnego wniosku. Ta właściwość powinna zostać zweryfikowana w kolejnych badaniach.

Opisane badania pokazują, że przeprowadzenie kompleksowej analizy, zarówno strukturalnej, jak i parametrycznej, dzięki zastosowaniu dualnego modelowania, może nie tylko pozwolić na lepsze zrozumienie badanego zjawiska, ale także umożliwi znalezienie istotnych parametrów i znaczących modułów. To w konsekwencji może okazać się istotne dla opracowania nowych, bardziej skutecznych terapii, gdyż znalezione kluczowe elementy mogą stać się przedmiotem znacznie bardziej szczegółowych badań eksperymentalnych.

6.4 Macierzowy model dynamiki populacji – model zależności między hipercholesterolemią a niestabilnością blaszek miażdżycowych

6.4.1 Tło biologiczne

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną zgonów na całym świecie, w związku z tym od wielu lat badania naukowe koncentrują się na poznaniu ich przyczyn. Jak wspomniano już wielokrotnie w rozprawie, jedną z najczęstszych chorób sercowo-naczyniowych jest miażdżyca, która jest przewlekłą chorobą zapalną ściany tętnicy [61, 200]. Jedną z głównych przyczyn jej powstawania jest uszkodzenie śródbłonna, a więc tak zwana aktywacja prozapalnego fenotypu śródbłonna, która powodowana jest przez wiele pośrednich i bezpośrednich czynników, w tym między innymi poprzez zwiększenie LDL oraz oxLDL [144, 192, 200]. Można zatem stwierdzić, że zapalenie pojawia się wewnątrz ściany tętnicy, gdzie gromadzą się zmodyfikowane lipoproteiny o niskiej gęstości. W ramach odpowiedzi immunologicznej na zapalenie dochodzi do rekrutacji monocytów, które uczestniczą w diapedezie, a więc w przejściu przez ścianę naczynia i różnicują się do makrofagów [194, 195]. W ogólności makrofagi mają na celu pozbycie się LDL poprzez fagocytozę jak i komórek apoptotycznych przez eferocytozę, a więc ich działaniem jest ochrona komórki przed nadmiernym gromadzeniem się wymienionych elementów [61, 62]. Gdy makrofagi gromadzą zinternalizowane lipidy, to wytwarzają sygnały zapalne promujące dalszą rekrutację monocytów i w następstwie aktywację makrofagów [16, 287]. Stale utrzymujący się napływ LDL i monocytów do ściany tętnicy powoduje powstawanie dużej liczby makrofagów obciążonych lipidami, prowadząc tym samym do powstawania komórek piankowatych. Większość makrofagów znajdująca się w blaszce miażdżycowej ostatecznie ulega apoptozie. Gdy sytuacja jest stabilna, makrofagi apoptotyczne są produkowane niemal tak szybko, jak monocyty dostają się do blaszki miażdżycowej. W związku z tym szybkie usuwanie komórek apoptotycznych na drodze eferocytozy zapobiega martwicy post-apoptotycznej [61, 151]. Nieefektywna eferocytoza może jednakże prowadzić do akumulacji makrofagów apoptotycznych obciążonych lipidami i do rozwoju rdzenia

nekrotycznego [61, 151]. Gdy komórki piankowate umierają, pozostawiają rdzeń nekrotyczny zbudowany z utlenionych lipidów, których depozyty prowadzą do zwężenia światła naczynia i tworzenia blaszki miażdżycowej [195, 200]. Charakterystyka rdzenia nekrotycznego związana jest z zaawansowaniem blaszki, duże rdzenie nekrotyczne są charakterystyczne dla objawowych, niestabilnych blaszek miażdżycowych [61, 195]. Blaszkami miażdżycowymi mogą rosnać przez całe życie i gromadzić bogate w lipidy nekrotyczne szczątki, tworzące rdzeń nekrotyczny [61, 151, 195]. Proces chorobowy prowadzi do wielokrotnego odkładania się lipidów i wzrostu rdzenia nekrotycznego, prowadząc do niestabilności blaszki miażdżycowej, a nawet do jej pęknięcia i utworzenia zakrzepu.

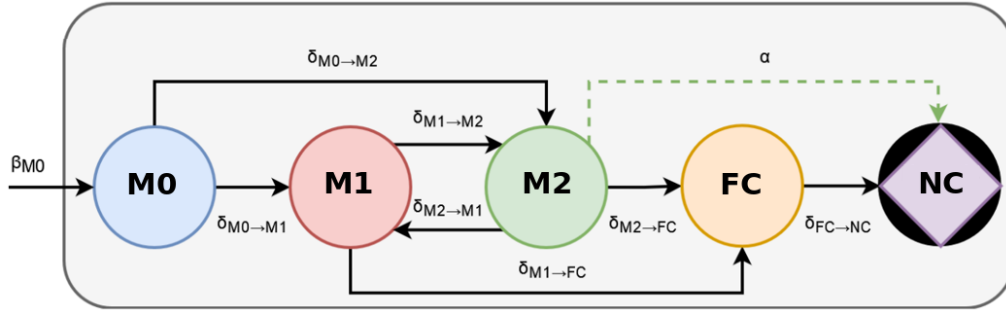
Nasilenie stanu zapalnego jest w szczególności związane z liczbą cząstek LDL i obecnością makrofagów wewnątrz ściany tętnicy. Stan populacji makrofagów zależy od równowagi między szybkością rekrutacji monocytów, proliferacją makrofagów, apoptozą i emigracją makrofagów poza ścianę tętnic [61]. Dlatego równowaga między różnymi typami makrofagów ma kluczowe znaczenie. Wśród makrofagów można wyróżnić dwa ogólne typy: prozapalny typ M1 i przeciwzapalny typ M2. Makrofagi M1 aktywowane są przez limfocyty T pomocnicze 1 (Th1), podczas gdy makrofagi M2 aktywowane są przez cytokiny Th2 [160, 187]. Co istotne, makrofagi mogą przełączać się z jednego fenotypu na drugi pod wpływem bodźców środowiskowych [160, 187]. Ostatnie badania pokazują, że potencjalne strategie terapeutyczne w leczeniu miażdżycy można uzyskać poprzez ukierunkowanie na mikrośrodowisko makrofagów w blaszkach miażdżycowych [160]. Dlatego też zrozumienie zależności i równowagi pomiędzy różnymi typami makrofagów jest kluczowe dla lepszego zrozumienia miażdżycy.

Miażdżycy ma wiele różnych czynników ryzyka. Jednym z czynników sprawczych rozwoju miażdżycy jest hipercholesterolemia [142]. Hipercholesterolemia może być spowodowana różnymi przyczynami, w tym czynnikami genetycznymi, dietą i stylem życia. Niezależnie od podłoża jest to zaburzenie metaboliczne charakteryzujące się znacznie podwyższonym poziomem cholesterolu LDL (LDL-C) [15]. Ponadto badania wykazują, że hipercholesterolemia i miażdżycy tętnic u ludzi są związane z prozapalną nierównowagą w krążących populacjach monocytów [55].

6.4.2 Model i wyniki

Zaproponowany macierzowy model populacji ma na celu ocenę rozwoju rdzenia nekrotycznego na podstawie dynamiki populacji makrofagów. Wśród tej populacji wyróżnia się makrofagi M0, M1, M2 i komórki piankowate. Na dynamikę badanego systemu wpływać może wiele różnych parametrów, chcąc jednak ocenić rolę hipercholesterolemii, wykorzystano dwa parametry reprezentujące dietę pacjenta, tj. napływ lipidów (L_{influx}) i mieszaninę lipidów prozapalnych oraz przeciwzapalnych (L_{mix}). Model został zaimplementowany w języku programowania *Python 3.10*. Symulacje koncentrowały się na wspomnianych dwóch parametrach dietetycznych. Parametry sprawdzano zgodnie z metodą przeszukiwania siatki (*ang. grid search*), odwzorowując przestrzeń parametrów od 0 do 1 z krokiem próbkowania równym 0,01. Schemat dynamiki, która została zawarta w modelu umieszczono na Rysunku 6.9, wszystkie interakcje zawarte w modelu opisano za pomocą odpowiednich wyrażeń matematycznych.

W zaproponowanym modelu wyróżnia się następujące składowe: dwie główne macierze (macierz populacji N i macierz przejść S) oraz parametry i funkcje potrzebne do aktualizacji macierzy. Macierz populacji N zawiera informacje o liczbie komórek dla poszczególnych badanych grup, tj. makrofagów M0, M1, M2, komórek piankowatych i rdzenia nekrotycznego. Natomiast, macierz S zawiera parametry, które w rezultacie mnożenia przez macierz populacji, pozwalają uzyskać macierz populacji dla kolejnego kroku czasowego. Działanie to można zatem opisać równaniem 6.14.



RYSUNEK 6.9: Schemat zaproponowanego modelu odzwierciedlającego dynamikę populacji makrofagów. Czarne strzałki na schemacie oznaczają kierunek transformacji konkretnych komponentów, a zielona strzałka symbolizuje, potencjalną redukcję rdzenia nekrotycznego (redukcję blaszki) przez makrofagi M2. Rysunek pochodzi z pracy [295].

$$N(t + 1) = S(t) \cdot Q(t) \quad (6.14)$$

W równaniu (6.14) można zauważyć, że zarówno macierz S , jak i N zmieniają się w czasie. Aby obliczyć macierz przejść w kolejnym kroku czasowym ($S(t + 1)$), konieczna jest aktualizacja wszystkich parametrów. Kolejne równanie, równanie (6.15), pokazuje w jaki sposób obliczana jest macierz populacji w kolejnym kroku czasowym $N(t + 1)$ na podstawie macierzy populacji w danym kroku czasowym $Q(t)$ i macierzy przejść w danym kroku czasowym $S(t)$. Wymieniona macierz $Q(t)$ jest zmodyfikowaną macierzą $N(t)$, gdyż liczba rekrutowanych makrofagów nie zależy bezpośrednio od jej poprzednich stanów, ale istotny jest także rozmiar rdzenia martwiczego, który jest zmniejszany przez obliczony parametr $M2(t)$ (gdyż makrofagi M2 mogą redukować rdzeń nekrotyczny). Macierz populacji $N(t)$ opisana w równaniu (6.15) zawiera wielkości populacji wszystkich analizowanych typów komórek: $N_{M0}(t)$ jest to liczba monocytów/nieznaczonych makrofagów w kroku czasowym t (w praktyce jest to liczba równa całkowitemu napływowi $\beta_{M0}(t)$, ponieważ w założeniu wszystkie komórki M0 różnicują się do makrofagów), $N_{M1}(t)$ jest to liczba klasycznie aktywowanych makrofagów M1 w kroku czasowym t , $N_{M2}(t)$ jest to liczba alternatywnie aktywowanych makrofagów M2 w kroku czasowym t , $N_{FC}(t)$ jest to liczba komórek piankowatych w kroku czasowym t , natomiast $N_{NC}(t)$ jest to rozmiar rdzenia martwiczego w kroku czasowym t . Wszystkie równania potrzebne do aktualizacji parametrów zawarto poniżej, patrz równania (6.16) - (6.27).

$$\begin{pmatrix} N_{M0}(t + 1) \\ N_{M1}(t + 1) \\ N_{M2}(t + 1) \\ N_{FC}(t + 1) \\ N_{NC}(t + 1) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \delta_{M0 \rightarrow M1}(t) & \delta_{M1 \rightarrow M1}(t) & \delta_{M2 \rightarrow M1}(t) & 0 & 0 \\ 1 - \delta_{M0 \rightarrow M1}(t) & \delta_{M1 \rightarrow M2}(t) & \delta_{M2 \rightarrow M2}(t) & 0 & 0 \\ 0 & \delta_{M1 \rightarrow FC}(t) & \delta_{M2 \rightarrow FC}(t) & 1 - \delta_{FC \rightarrow NC}(t) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \delta_{FC \rightarrow NC}(t) & \delta_{NC \rightarrow NC} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \beta_{M0}(t) \\ N_{M1}(t) \\ N_{M2}(t) \\ N_{FC}(t) \\ N_{NC}(t) - \alpha_{M2}(t) \end{pmatrix} \quad (6.15)$$

Równania (6.16) - (6.27) zostały opracowane aby zamodelować istotne procesy miażdżycowe, które koncentrują się na roli makrofagów. Rozwiązania równań (6.17) - (6.19) oraz (6.26) i (6.27) są ograniczone do przedziałów $[0, 1]$. Równanie (6.16) modeluje napływ monocytów obwodowych M0 (β_{M0}) do ściany naczynia. Zawsze istnieje pewna podstawowa liczba monocytów napływających (β_{M0}^{basic}), jednak liczba ta może być znacznie zwiększona przez dodatkową rekrutację monocytów ($\beta_{M0}^{recruited}$), która jest zależna od prozapalnych i przeciwzapalnych cytokin C , ale również od poziomu wolnych lipidów $L_{free}(t)$.

$$\beta_{M0}(t + 1) = \beta_{M0}^{basic} + \beta_{M0}^{recruited} \cdot |(C(t) - 0, 5) \cdot (L_{free}(t) \cdot 0, 5)| \quad (6.16)$$

Równanie (6.17) jest wykorzystywane do obliczenia procentu makrofagów M0, które w kolejnej iteracji przekształcą się w makrofagi M1. Proces ten zależy od cytokin, wolnych lipidów i mieszaniny lipidów (z uwzględnieniem dodatkowych parametrów, które skalują wielkość wpływu lipidów).

$$\delta_{M0 \rightarrow M1}(t+1) = C(t) + L_{free}(t) \cdot \lambda_{LCE}^{M0} + (L_{mix} - 0,5) \cdot \lambda_{LCE}^{M0} \quad (6.17)$$

Równania (6.18) i (6.19) są odpowiednio wykorzystywane do obliczenia procentu M1 i M2, które pozostaną w niezmiennym stanie w następnej iteracji. Liczba ta jest zależna od aktualnego poziomu cytokin oraz odpowiednio od komórek M1 i M2, które mogą przełączyć swój fenotyp na odwrotny lub mogą przekształcić się w komórki piankowate. Ponadto, ostatecznie zarówno pula makrofagów M1, jak i M2 jest mnożona przez współczynnik przeżycia, odpowiednio $S_{M1 \rightarrow M1}$ i $S_{M2 \rightarrow M2}$.

$$\begin{aligned} \delta_{M1 \rightarrow M1}(t+1) = & s_{M1 \rightarrow M1} \cdot (C(t) - s_{M1 \rightarrow M2} \cdot (C(t) + (L_{mix} - 0,5) \cdot \lambda_{LMC})) \\ & - L_{free}(t) \cdot \lambda_{LCE}^{M1} \end{aligned} \quad (6.18)$$

$$\begin{aligned} \delta_{M2 \rightarrow M2}(t+1) = & s_{M2 \rightarrow M2} \cdot ((1 - C(t)) - s_{M2 \rightarrow M1} \cdot ((1 - C(t)) + ((1 - L_{mix}) - 0,5) \cdot \lambda_{LMC})) \\ & - L_{free}(t) \cdot \lambda_{LCE}^{M2} \end{aligned} \quad (6.19)$$

Równania (6.20) i (6.21) modelują przełączanie się jednego fenotypu w drugi, zapalny na przeciwzapalny (M1 \rightarrow M2) oraz przeciwzapalny na zapalny (M2 \rightarrow M1). Przełączenie fenotypu jest zależne od poziomu cytokin i lipidów. Należy zwrócić uwagę na fakt, że tylko pewna część komórek będzie się przełączać fenotypowo, a ta zmiana jest ogólnie ograniczona przez $\delta_{M1 \rightarrow M2}^{max}$ i $\delta_{M2 \rightarrow M1}^{max}$.

$$\delta_{M1 \rightarrow M2}(t+1) = s_{M1 \rightarrow M2} \cdot (C(t) + (L_{mix} - 0,5) \cdot \lambda_{LMC}) \quad (6.20)$$

$$\delta_{M2 \rightarrow M1}(t+1) = s_{M2 \rightarrow M1} \cdot ((1 - C(t)) + ((1 - L_{mix}) - 0,5) \cdot \lambda_{LMC}) \quad (6.21)$$

Równania (6.22) i (6.23) modelują akumulację lipidów oraz transformację makrofagów w komórki piankowate. Związek między wolnymi lipidami a ich akumulacją w makrofagach wynika z zależności między transformacją M1 i M2 w komórki piankowate w oparciu o wartość $L_{free}(t)$.

$$\delta_{M1 \rightarrow FC}(t+1) = L_{free}(t) \cdot \lambda_{LCE}^{M1} \quad (6.22)$$

$$\delta_{M2 \rightarrow FC}(t+1) = L_{free}(t) \cdot \lambda_{LCE}^{M2} \quad (6.23)$$

Równanie (6.24) modeluje związek między śmiercią komórek piankowatych a ich akumulacją w postaci nekrotycznego rdzenia. Proces ten jest konsekwencją wysokiej wartości $L_{free}(t)$.

$$\delta_{FC \rightarrow NC}(t+1) = L_{free}(t) \cdot \lambda_{LCE}^{FC} \quad (6.24)$$

Rdzeń nekrotyczny może być częściowo zredukowany przez makrofagi M2, dlatego równanie (6.25) modeluje wpływ M2 na wielkość rdzenia nekrotycznego.

$$\alpha_{M2}(t+1) = N_{M2}(t) \cdot a \quad (6.25)$$

W powyższych równaniach wyróżniono dwie kluczowe zmienne, które zmieniają się w czasie: poziom cytokin $C(t)$ i wolnych lipidów $L_{free}(t)$. Cytokiny reprezentują stan zapalny w obrębie blaszki miażdżycowej i przyjmują wartości z przedziału $[0, 1]$, gdzie 0 oznacza stan najbardziej przeciwzapalny, a 1 oznacza pełny stan zapalny. Zgodnie z naturą analizowanego zjawiska, cytokiny są wydzielane przez makrofagi M1 i M2, a proces ten opisano za pomocą równania 6.26. Natomiast wolne lipidy obrazują zdolność przetwarzania lipidów. W każdej iteracji modelu do blaszki miażdżycowej napływa nowa porcja lipidów, która musi zostać przetworzona przez makrofagi w celu zachowania równowagi. Nadmiar wolnych lipidów działa prozapalnie na komórki, dochodzi do ich gromadzenia i stymulowania powiększania się rdzenia nekrotycznego. Sposób obliczania wartości wolnych lipidów ($L_{free}(t)$) opisuje równanie (6.27).

$$C(t+1) = C(t) + \left(\frac{N_{M1}(t)}{N_{M1}(t) + N_{M2}(t)} - 0,5 \right) \cdot \gamma \quad (6.26)$$

$$L_{free}(t+1) = L_{free}(t) - L_{free}(t) \cdot \log_{10}(N_{FC}(t)) \cdot \lambda_{ACC}^{FC} + L_{influx} \quad (6.27)$$

Definicje stałych użytych oraz ich wartości użyte w symulacjach zostały zawarte w Tabeli 6.12. Tabela ta zawiera następujące kolumny: *stała* – kolumna zawierająca nazwy stałych, *opis* – kolumna zawierająca opis znaczenia biologicznego oraz *wartość* – kolumna zawierająca wartości stałych, które zostały wykorzystane w symulacjach. Wartości te wybrano na podstawie przeglądu literatury i wstępnych testów.

TABELA 6.12: Definicje stałych oraz ich wartości użyte w symulacji zaproponowanego modelu. Tabela pochodzi z pracy [295].

Stała	Opis	Wartość
$\beta_{M0}^{basic}; \beta_{M0}^{recruited}$	Minimalna i maksymalna liczba komórek M0, które mogą być rekrutowane w pojedynczym kroku czasowym	20; 120
$\delta_{NC \rightarrow NC}$	Procent rdzenia nekrotycznego, który nie ulega redukcji	0,99
$\delta_{M1 \rightarrow M2}^{max}; \delta_{M2 \rightarrow M1}^{max}$	Maksymalny procent komórek, które mogą przełączyć się z fenotypu M1 do M2 i z fenotypu M2 do M1	0,2; 0,2
λ_{LMC}^{M0}	Regulator wpływu mieszanki lipidów na komórki	0,05
$\lambda_{LCE}^{M0}; \lambda_{LCE}^{M1}; \lambda_{LCE}^{M2}; \lambda_{LCE}^{FC}$	Specyficzne dla komórek regulatory działania lipidów	0,1; 0,1; 0,2; 0,05
λ_{ACC}^{FC}	Czynnik akumulacji lipidów	0,1
$s_{M1 \rightarrow M1}; s_{M2 \rightarrow M2}; s_{M1 \rightarrow M2}; s_{M2 \rightarrow M1}$	Współczynnik przeżycia/przejścia	0,5; 0,5; 0,1; 0,1
a	Wydaźność M2 związana z redukcją rdzenia nekrotycznego	0,5
γ	Czynnik wydzielania cytokin	0,005

W ramach analizy zaproponowanego modelu przeprowadzono symulacje mające na celu sprawdzenie dynamiki populacji makrofagów i komórek piankowatych oraz ocenę rozwoju rdzenia nekrotycznego. W związku z tym, przy wykorzystaniu metody przeszukiwania siatki, przeanalizowano przestrzeń parametrów dla napływu lipidów (L_{influx}) i mieszanki lipidów (L_{mix}). Symulowano wszystkie możliwe kombinacje tych dwóch parametrów, próbując 100 wartości dla każdego w przedziale $[0, 1]$ z krokiem 0,01. Wyniki zostały zwizualizowano na Rysunku 6.10 i 6.11. Rysunek 6.10 przedstawia dynamikę populacji makrofagów oraz zmiany cytokin i wolnych lipidów w czasie dla czterech scenariuszy (1 – niski L_{influx} i niski L_{mix} , 2 – wysoki L_{influx} i niski L_{mix} , 3 – niski L_{influx} i wysoki L_{mix} , 4 – wysoki L_{influx} i wysoki L_{mix}). Natomiast końcowe stany

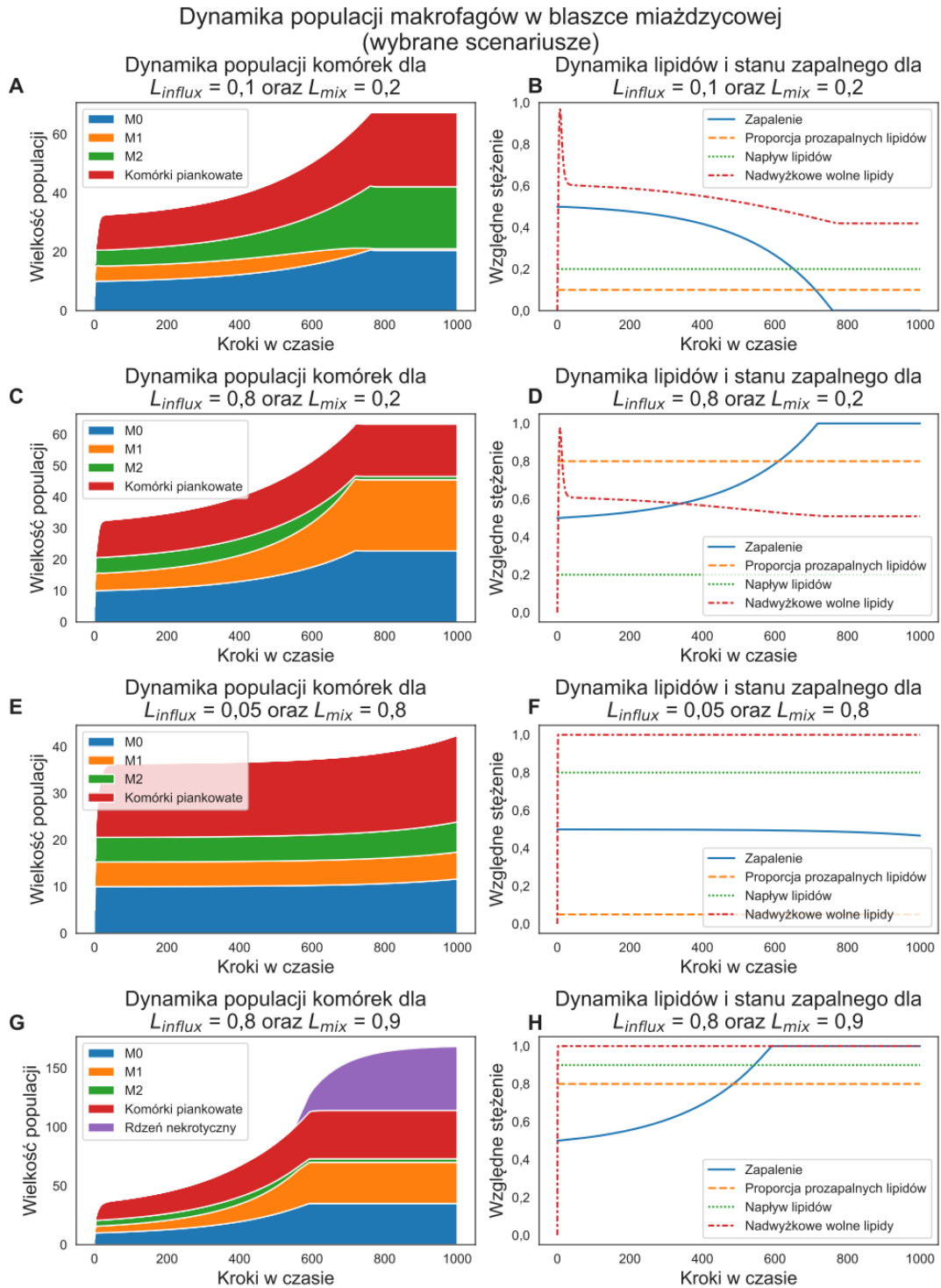
symulacji przedstawiono na Rysunku 6.11, które przedstawiają zachowania systemu w oparciu o różne parametry i ujawniają ich atraktory.

Ostateczne wyniki scharakteryzowano zgodnie z czterema stanami układu: stanem przeciwzapalnym z niskim stężeniem wolnych lipidów (Rysunek 6.10A), stanem przeciwzapalnym z wysokim stężeniem lipidów (Rysunek 6.10C), stanem zapalnym bez rdzenia nekrotycznego (Rysunek 6.10B) i stanem zapalnym z rdzeniem nekrotycznym (Rysunek 6.10D). W ogólności, stany przeciwzapalne nie promują wzrostu rdzenia nekrotycznego, co można zauważyć na Rysunku 6.11A. Makrofagi M2 przekształcają się w komórki piankowate, które wychwytyują wolne lipidy i usuwają komórki apoptotyczne, dzięki czemu nawet przy wysokim napływie lipidów, rdzeń martwiczy się nie rozwija, patrz Rysunek 6.10E. Jednak stany przeciwzapalne z wysokim stężeniem wolnych lipidów są niestabilne i nawet niewielkie przejścia w kierunku prozapalnego składu lipidów spowodują stan zapalny i stworzą warunki do stymulowania wzrostu rdzenia nekrotycznego. Należy zwrócić uwagę, że na Rysunku 6.11B, 6.11C i 6.11D widoczna jest rozmyta linia, która obrazuje granicę przejścia M1-M2, gdzie ostatecznie dominuje tylko jeden z tych stanów. Stan zapalny stymuluje rozwój rdzenia nekrotycznego, a zmniejszająca się populacja makrofagów M2 nie jest już w stanie pozbyć się nagromadzonych lipidów i resztek komórkowych. W sytuacji, gdy napływ lipidów jest stosunkowo niski, to komórki piankowate mogą w dalszym ciągu zapobiegać rozwojowi blaszki miażdżycowej. W niektórych przypadkach rozwój rdzenia martwiczego jest tak nieznaczny, że nie wpływa negatywnie na naczynie w ciągu życia człowieka, co odwzorowuje Rysunek 6.10C. Oczywiście zgodnie z naturą badanego systemu, im wyższe stężenie wolnych lipidów, tym szybciej przyrasta rdzeń nekrotyczny (patrz Rysunek 6.11). To niepożądane zachowanie można zauważyć na Rysunku 6.10G. Ogólnie rzecz biorąc, połączenie czynników prozapalnych i nagromadzonego nadmiaru lipidów wyraźnie przyczynia się do rozwoju blaszki miażdżycowej i oba powinny być brane pod uwagę w celu zahamowania procesów patologicznych.

6.4.3 Konkluzje

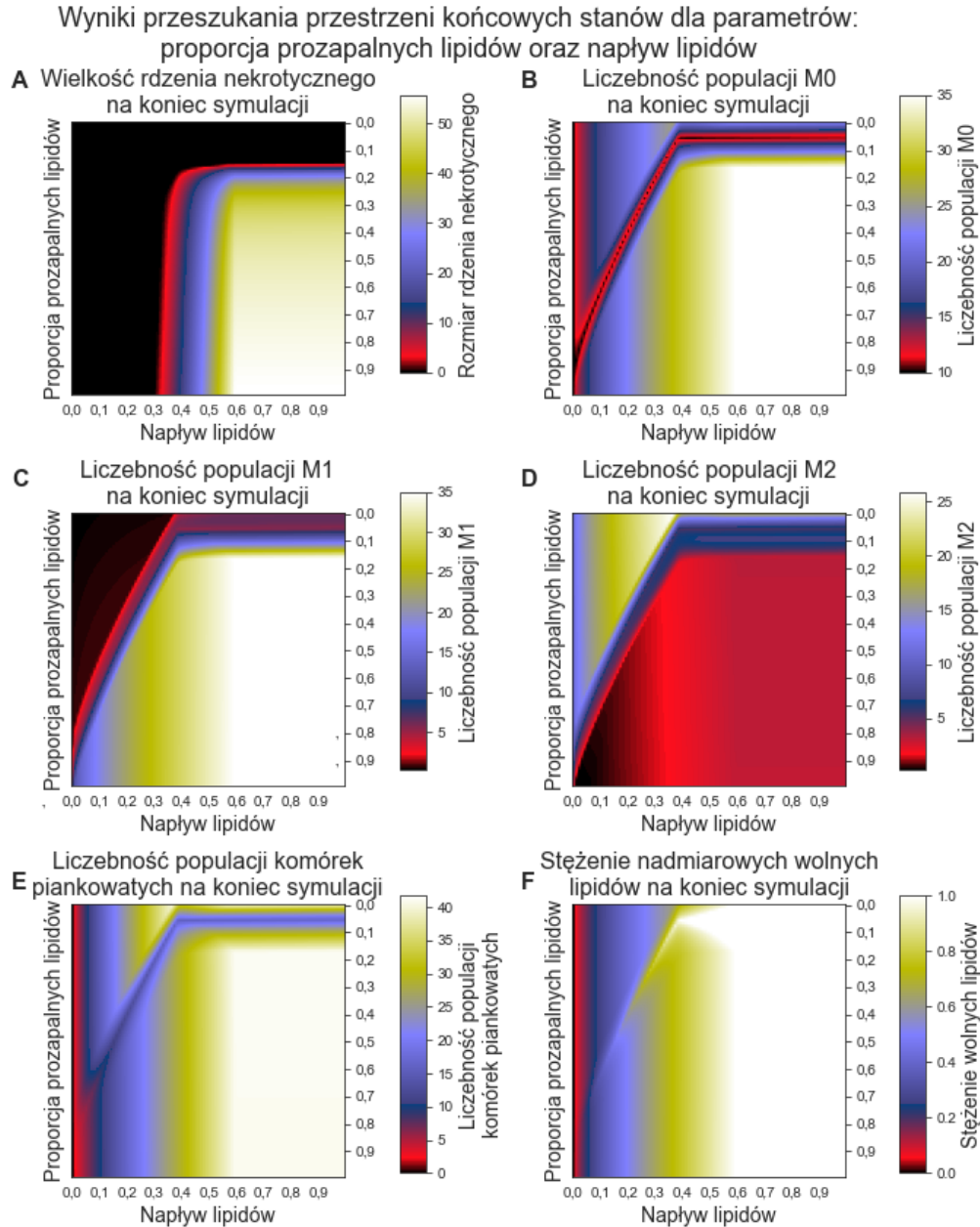
Hipercholesterolemia bierze udział w rozwoju miażdżycy tętnic poprzez wzrost aterogennych biomolekuł, między innymi takich jak reaktywne formy tlenu, cytokiny, cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ICAM-1), cząsteczki adhezji komórkowej naczyń (VCAM-1), białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (GM-CSF) czy czynniki wzrostu [223]. Nie ulega więc wątpliwości, że hipercholesterolemia ma znaczący wpływ na tempo progresji zmian chorobowych. Opublikowane badania wprost pokazują, że hipercholesterolemia i miażdżycza tętnic u ludzi jest związana z prozapalną nierównowagą w krążących populacjach monocytów [55]. Wobec tego hipercholesterolemia powoduje przyspieszony rozwój miażdżycy i może prowadzić do wcześniejszych incydentów sercowo-naczyniowych.

Charakterystykę populacji makrofagów można podzielić ze względu na wczesny i późny etap rozwoju blaszki miażdżycowej. We wczesnym rozwoju blaszki miażdżycowej monocyty różnicują się głównie w makrofagi M2, które wychwytyują zmodyfikowane lipidy, prowadząc do utworzenia komórek piankowatych. Przewagą makrofagów M2 nad komórkami M1 jest większa zdolność do eferocytozy, czyli fagocytozy apoptotycznych makrofagów, która przyczynia się do ustąpienia stanu zapalnego [160]. Natomiast na późniejszym etapie, gdy zapalenie nasila się monocyty różnicują się w kierunku fenotypu M1. Jednocześnie może także dochodzić do przełączenia się fenotypów [160, 187]. Makrofagi M1 nie mają takiej zdolności do eferocytozy jak makrofagi M2. W związku z tym, w środowisku zapalnym, gdy dominuje fenotyp M1, apoptotyczne komórki piankowate ulegają wtórnej martwicy i sprzyjają rozwojowi rdzenia martwiczego [187]. Wielkość rdzenia nekrotycznego jest powiązana ze stabilnością blaszki miażdżycowej. Stabilne blaszki miażdżycowe charakteryzują



RYSUNEK 6.10: Populacje makrofagów i zmienna dynamika w wybranych scenariuszach symulacji. Rysunki A, C, E przedstawiają wykresy dynamiki populacji (wartości po lewej stronie wykresów są skumulowane) dla L_{influx} równego odpowiednio 0,1; 0,8; 0,05; 0,8 i L_{mix} równego odpowiednio 0,2; 0,2; 0,8; 0,9. Natomiast Rysunki B, D, F przedstawiają wykresy zmian lipidów i stanu zapalnego w czasie dla L_{influx} równego odpowiednio 0,1; 0,8; 0,05; 0,8 i L_{mix} równego odpowiednio 0,2; 0,2; 0,8; 0,9. Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [295].

się stosunkowo małym rdzeniem nekrotycznym, który otoczony jest grubą włóknistą czapczką, podczas gdy niestabilne blaszki miażdżycowe charakteryzują się dużym rdzeniem nekrotycznym, który pokryty jest cienką włóknistą czapczką podatną na pęknięcie [160, 223].



RYSUNEK 6.11: Wyniki przeszukiwania siatki wizualizujące ostateczne rozmiary populacji, a także stężenie wolnych lipidów. Rysunek A przedstawia ostateczny rozmiar rdzenia martwiczego, Rysunek B przedstawia ostateczny rozmiar populacji makrofagów M0, Rysunek C przedstawia ostateczny rozmiar populacji makrofagów M1, Rysunek D przedstawia ostateczny rozmiar populacji makrofagów M2, Rysunek E przedstawia ostateczny rozmiar populacji komórek piankowatych, a Rysunek F przedstawia nadmiar stężenia wolnych lipidów. Wyniki przedstawione na wykresie zawierają informacje pobrane z symulacji w 1000 kroku czasowym. Każdy wykres składa się z 10000 punktów, które odpowiadają wszystkim rozważanym układom napływu lipidów i mieszaniny lipidów (każda para wartości od 0 do 1, z krokiem 0,01). Rysunek jest adaptacją ilustracji pochodzącej z pracy [295].

Doniesienia literaturowe wskazują, że makrofagi w blaszkach bezobjawowych stanowią 57% wszystkich makrofagów w blaszkach objawowych [44]. W blaszkach objawowych makrofagi M1 stanowią około 77%, a makrofagi M2 tylko 23% [44]. Stosunek tych dwóch podtypów różni się w płytkach bezobjawowych, gdzie makrofagi M1 stanowią 58%, a makrofagi M2 42% [44]. Ta informacja nie zapewnia poglądu na liczbę komórek piankowatych. Jednak, jak wspomniano wcześniej, w początkowej fazie rozwoju blaszki miażdżycowej dominują makrofagi M2, a co za tym idzie komórki piankowane o fenotypie M2 [187]. Na dalszym etapie rozwoju sytuacja ulega odwróceniu

i dominują zarówno makrofagi M1, jak i komórki piankowate o fenotypie M1 [187]. W literaturze brakuje dokładnych informacji ilościowych lub w wielu przypadkach są one niejednoznaczne. W kontekście prowadzonych badań nie znaleziono informacji o tym ile z makrofagów określonego podtypu przełącza się na inny fenotyp. Wobec tego w proponowanym modelu przyjęto założenie, że im bardziej zapalne środowisko, tym częściej makrofagi M2 przełączają się na fenotyp M1 i odwrotnie w warunkach przeciwzapalnych. Ponadto wiele badań nad makrofagami obejmuje modele inne niż ludzkie, w tym na przykład modele mysie [135, 316]. Pomimo tego, że brakuje dokładnych wartości, to wiedza dostępna w literaturze pozwala na oszacowanie danych parametrów. Ponadto, na uwadze należy mieć fakt, że model jest pewnym przybliżeniem rzeczywistości.

W opisywanych badaniach zaproponowano model wpływu hipercholesterolemii na dynamikę populacji makrofagów w blaszce miażdżycowej i oceniono rozwój tworzenia się rdzenia nekrotycznego w symulacji relacji miażdżycy i hipercholesterolemii. Wśród przeprowadzonych symulacji i uzyskanych wyników wyróżniono różne stany systemu, w tym stan przeciwzapalny z niskimi i wysokimi stężeniami lipidów oraz stan zapalny bez i z martwiczym tworzeniem rdzenia. Wyniki potwierdzają, że utrzymujący się stan zapalny, wywołany wysokimi stężeniami wolnych lipidów prowadzi do promowania rozwoju martwiczego rdzenia i jego szybszego wzrostu. Oznacza to, że hipercholesterolemia może przyspieszać rozwój miażdżycy poprzez stymulowanie tworzenia się rdzenia nekrotycznego, promując w konsekwencji szybsze przejście ze stabilnej do niestabilnej blaszki miażdżycowej narażonej na pęknięcie.

Uzyskane wyniki są spójne z innymi badaniami opartymi na modelu rozwoju blaszki miażdżycowej, skupiającymi się na dynamice lipidów i zapaleniu [61]. Model ten został zaprojektowany w celu pokazania, w jaki sposób stan zapalny wpływa na akumulację lipidów przez makrofagi, generowanie komórek apoptotycznych i powstawanie martwiczego rdzenia [61]. Wyniki pokazują między innymi, że wysokie tempo napływu LDL i nieskuteczna eferocytoza skutkują powstaniem dużego rdzenia nekrotycznego i dużych ilości makrofagów przeładowanych lipidami [61]. Istnieje jednak wiele innych modeli matematycznych powstawania blaszek miażdżycowych, skupiających się na różnych aspektach [67, 76, 110, 165].

6.5 Dalsze motywacje

Opisane w tym rozdziale metody, u podstaw których leżą równania różniczkowe zwyczajne oraz sieci Petriego, są szeroko stosowane w modelowaniu i analizie systemów biologicznych. Ich zastosowanie można zauważyć już w prostych reakcjach biochemicznych, przez wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe czy sieci regulacyjne, aż po złożone systemy biologiczne [51, 94, 111, 116, 125, 146]. Zwykle wykorzystuje się jedno konkretne podejście, choć doniesienia literaturowe przedstawiają także badania łączące te metody [86, 119, 274]. Jednakże zawarte w tych pracach badania wykorzystują inne niż opisane w niniejszej rozprawie sieci Petriego – ciągle sieci Petriego (*ang. continuous Petri nets*). Co więcej, skupiają się na innym problemie niż kompleksowa analiza jako korzyść wynikająca z dualnego modelowania. Zaproponowane w tym rozdziale alternatywne podejście – podejście dualnego modelowania, umożliwia utworzenie modelu opartego o sieci Petriego na podstawie dobrze poznanego modelu opartego na ODE i tym samym przeprowadzenie analiz skoncentrowanych na różnych aspektach. Pierwszym aspektem jest analiza strukturalna opracowana dla modelu wyrażonego za pomocą sieci Petriego. Drugim aspektem jest analiza dynamiki odpowiedzi modelu zastosowana dla modelu wyrażonego za pomocą ODE. W efekcie dwóch różnych perspektyw otrzymujemy procesy oraz związane z nimi parametry, które są najistotniejsze dla zachowania systemu. Wydaje się, że takie wyniki powinny się stać przedmiotem dalszych badań, w tym badań ekspery-

mentalnych jako potencjalne cele w opracowywaniu nowych leków i opracowywaniu skutecznych terapii leczenia.

Obok tych wyników, pojawiła się ciekawa zależność między ważnością procesów dla modeli opartych o sieci Petriego i ważnością parametrów dla modeli opartych na ODE a różnicami w poziomie danego białka i różnicami w czasie ustalania się odpowiedzi. Czy jest to przypadek, czy tendencja oraz jak wyjaśnić te relacje pozostaje kwestią otwartą, a także perspektywą dla dalszych badań.

Inne opisane w tym rozdziale podejście, oparte o macierzowe modele dynamiki populacji, jest w odróżnieniu od powyżej przytoczonego dualnego modelowania, podejściem w pełni niezależnym od sieci Petriego. Pozwala ono na przeprowadzenie symulacji, których nie da się w podobny sposób przeprowadzić na modelach opartych na formalizmie sieci Petriego. Zatem macierzowy model populacji traktujący o dynamice populacji makrofagów stanowi ciekawe dopełnienie dla modeli miażdżycowych zawartych w niniejszej rozprawie.

Rozdział 7

Podsumowanie

Celem nadrzędnym niniejszej rozprawy było badanie przydatności różnych metod informatycznych do modelowania i analizy złożonych systemów biologicznych, a w szczególności procesów powstawania i rozwoju miażdżycy. Wszelkie rozważane metody mogą być z powodzeniem zastosowane do dowolnym zjawisk biologicznych poczynając od szlaków biochemicznych, przez ścieżki sygnałowe, aż po złożone mechanizmy patogenezы różnych jednostek chorobowych. Zgodnie z opisanym celem można wyróżnić dwie ścieżki badawcze koncentrujące się na innych aspektach. Jedną z nich skupiającą się na metodach informatycznych, różnych podejściach systemowych i metodologicznych oraz wszelkich problemach z nimi powiązanych, w tym aspektach kombinatorycznych wybranych problemów. Druga natomiast skupia się na tle biologicznym, a więc przede wszystkim na mechanizmach leżących u podstaw powstawania i rozwoju miażdżycy, ale także na bardziej szczegółowych aspektach, jak między innymi wpływ konkretnej cytokiny prozapalnej, wybranych aspektów protrombotycznych czy relacji pomiędzy różnymi typami makrofagów, których relacja wpływa na tworzenie i niestabilność blaszki miażdżycowej. Przeanalizowano również znacznie większe sieci interakcji, tj. powiązanie miażdżycy z innymi jednostkami chorobowymi, w tym tętniakiem aorty brzusznej czy hipercholesterolemią. Ponadto w pracy rozważano także inne zjawiska biologiczne, w tym takie które mogą mieć pośredni wpływ na rozwój miażdżycy, tudzież inne, zupełnie z nią niezwiązane. Poniżej zawarto szczegółowy opis zrealizowanych celów oraz dalsze motywacje.

W ramach pierwszej ścieżki badawczej dotyczącej oceny przydatności metod informatycznych zrealizowano następujące cele:

- Ocena istniejących metod klasycznych do analizy modeli złożonych systemów biologicznych opartych o sieci Petriego, w tym analiza zbiorów MCT, analiza t-klastrów i manualna analiza wybranych t-nieziemienników.

Wykorzystane klasyczne metody analizy pozwalają uwypuklić, które z analizowanych podprocesów mają największy udział w analizowanych układach biologicznych. Jednakże w przypadku analizowanych w niniejszej rozprawie problemów biologicznych, metody te nie pozwalają uzyskać dodatkowych informacji o właściwościach czy zależnościach, które nie byłyby znane i opisane w literaturze. Można zatem stwierdzić, że dla rozważanych systemów biologicznych, klasyczne metody pozwalają usystematyzować wiedzę, wyodrębnić ważne mechanizmy zaangażowane w funkcjonowanie badanego systemu i potwierdzić zależności pomiędzy podprocesami. Jednakże nie umożliwiają przeprowadzenia głębszej analizy. Z drugiej jednak strony, klasyczne metody pozwalają wyznaczyć dalszy kierunek badań, jak to było m.in. w przypadku analizowanego modelu stanów protrombotycznych w modelach miażdżycowych.

Przeprowadzając przegląd każdej z klasycznych metod oddzielnie, można zauważyć, że ana-

liza zbiorów MCT i analiza t-klastrów są przydatne na początkowym etapie analizy, gdyż analiza zbiorów MCT pozwala zidentyfikować pewne nietrywialne bloki funkcjonalne, a analiza t-klastrów umożliwia wyodrębnienie głównych podprocesów i mechanizmów zaangażowanych w podłoże analizowanego układu biologicznego. Ponadto, analiza t-klastrów sprzyja potwierdzeniu pewnych zależności zachodzących między podprocesami, choć nie pozwala na zidentyfikowanie interesujących zależności na głębszym poziomie analizy. Na uwagę należy mieć fakt, że analiza t-klastrów może być zbyt ogólna, zwłaszcza w sytuacji w której skupienia zawierają niemal wszystkie t-niezmienniki. W takim przypadku, kluczowa może okazać się manualna analiza wybranych t-niezmienników, gdyż wydaje się, że pozwala na wysnucie wniosków o pewnej częstości zachodzenia reakcji, czyli o tym, że niektóre reakcje mogą zachodzić częściej niż inne. Oczywiście manualna analiza też ma swoje ograniczenia i wiążą się one z liczbą modelowanych komponentów i liczbą t-niezmienników pokrywających dany model. Klasyczne analizy niewątpliwie potwierdzają potrzebę zaproponowania innych, rozszerzonych analiz.

- Ocena istniejących metod rozszerzonych do analizy modeli złożonych systemów biologicznych opartych o sieci Petriego, w tym analiza knockout, zwana także strukturalną analizą knockout i knockout symulacyjny, zwany także analizą średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach.

Analiza knockout, będąca analizą strukturalną, pozwala oszacować znaczenie wybranej tranzycji na podstawie liczby wyłączonych podprocesów i jest dopełnieniem zaproponowanej analizy ważności. Do rozszerzonych metod analizy należy także knockout symulacyjny (analiza średniej liczby uruchomień tranzycji we wszystkich symulacjach), który pozwala zebrać informacje o zachowaniu się systemu podczas wyłączenia wybranego procesu elementarnego lub całego podprocesu. Symulacyjna analiza knockout w odróżnieniu od strukturalnej analizy knockout dostarcza informacji o średniej liczbie uruchomień tranzycji we wszystkich wykonanych symulacjach. Na tej podstawie pozwala symulować konkretne sytuacje (np. przyjmowanie konkretnych leków u hipotetycznego pacjenta) i ocenić zachowanie się systemu w tych szczególnych warunkach. Prowadzi to do otrzymania ciekawych zależności, jak w przypadku modelu dotyczącego infekcji wirusem SARS-CoV-2. Analiza ta stanowi często dopełnienie innych analiz.

- Zaproponowanie własnych metod rozszerzonych do analizy modeli złożonych systemów biologicznych opartych o sieci Petriego, w tym także rozszerzeń do istniejących metod umożliwiających przeprowadzenie głębszych analiz. Wśród metod zaproponowanych wyróżnia się analizę ważności, porównawczą analizę ważności na podstawie dwóch modeli, porównawczą analizę ważności z identyfikacją istotnych różnic na podstawie dwóch modeli oraz porównawczą analizę knockout na podstawie dwóch modeli.

Analiza ważności pozwala na detekcję, zarówno istotnych, jak i nieistotnych procesów elementarnych (tranzycji) umożliwiając skupienie się na kluczowych elementach w dalszej analizie. Określana ważność jest ważnością strukturalną, a więc im wyższa ważność, tym dana reakcja jest bardziej niezbędna do prawidłowego funkcjonowania całego systemu. Wydaje się, że zdecydowaną zaletą tej analizy jest jej możliwość wykorzystania w porównawczej analizie ważności, która pozwala oszacować, jak zmienia się ważność poszczególnych elementów pod wpływem danego podprocesu, co znaczy, że można określić wpływ danego podprocesu lub modułu na zachowanie się wszystkich pozostałych procesów elementarnych w analizowanym systemie. Porównawcza analiza ważności umożliwia przeprowadzenie szczegółowej strukturalnej

ralnej analizy, gdyż identyfikuje procesy elementarne o kluczowym znaczeniu dla wszystkich t-niezmienników oraz dla t-niezmienników tylko i wyłącznie powiązanych z konkretnym modulem, dając tym samym znacznie szerszy pogląd na analizę systemu. Należy jednak mieć na uwadze, że analiza ważności i jej wariant porównawczy są analizami dotyczącymi pojedynczych tranzycji, a więc pojedynczych procesów elementarnych. Analiza na poziomie zbiorów procesów elementarnych, czyli na poziomie podprocesów, może zostać dokonana dzięki porównawczej analizie knockout.

Opisana porównawcza analiza opiera się na dwóch modelach, pełnym i zredukowanym, oba z zachowaniem pokrycia sieci. W oparciu o to podejście zaproponowano także rozszerzenie znanej strukturalnej analizy knockout, którą nazwano porównawczą analizą knockout. Porównawcza analiza knockout może być traktowana jako rozszerzenie porównawczej analizy ważności, gdyż skupia się na większych podprocesach i modułach, a nie tylko na pojedynczych procesach elementarnych.

- Przeprowadzenie rozważań dotyczących kombinatorycznych aspektów analizy t-niezmienników, w tym przeanalizowanie konkretnych problemów występowania i anty-występowania podzbiorów tranzycji we wsparciach t-niezmienników oraz przeprowadzenie dowodów przynależności wybranych problemów do konkretnych klas i zaproponowanie ich rozwiązań:

- Zaproponowanie algorytmu przeszukiwania tabu dla wybranego problemu występowania.

Algorytm poszukiwania pewnego odpowiednio dużego podzbioru tranzycji, który jest zawarty w odpowiednio dużej liczbie wsparć t-niezmienników ma na celu znalezienie podprocesu istotnego z punktu widzenia funkcjonowania modelu. Badania te stanowią dopełnienie analiz strukturalnych i jednocześnie wstęp do dalszych rozważań nad problemami występowania. Ponadto otwierają ścieżkę do dalszych kierunków badań, w tym zaproponowania algorytmów maksymalizujących dany parametr (wielkość poszukiwanego zbioru, liczbę wsparć t-niezmienników, czy oba te parametry). W obecnej formie algorytm ten stanowi dopełnienie analiz, które umożliwiają znalezienie kluczowych elementów, jednak pojawia się potrzeba szerszego przeanalizowania charakterystyki proponowanych modeli, w tym zdeterminowania, jak wiele w zaproponowanych modelach zawiera się zbiorów tranzycji występujących i w ilu wsparciach one występują.

- Zaproponowanie algorytmu dokładnego dla wybranego problemu występowania stanowiącego analizę występowania i jednocześnie dopełnienie zaproponowanej wcześniej analizy ważności.

Zaproponowany dokładny algorytm umożliwia przeprowadzenie analizy występowania, a więc wykonanie analizy ważności dla wszystkich możliwych podzbiorów reakcji odpowiadających mniejszym i większym podprocesom. Analiza występowania jest w ogólności rozszerzeniem analizy ważności opisanej powyżej, z tym rozróżnieniem, że zamiast dla pojedynczych reakcji, pozwala ocenić, które podprocesy są ważniejsze od innych. Ponadto wyniki analizy ważności pozwalają na znalezienie elementów mających duży wpływ na cały system i elementów tworzących kluczowe zależności pomiędzy większymi procesami. Co więcej, analiza ta pozwala na znalezienie wszystkich możliwych podprocesów o konkretnej zadanej oczekiwanej ważności. Jak można się spodziewać, wraz ze wzrostem wielkości modelu (liczby zamodelowanych reakcji) rośnie także liczba możliwych podprocesów do sprawdzenia, dlatego też zaproponowany algorytm może

zostać uruchomiony z różnymi ograniczeniami: ograniczenie skupiające się na zmniejszeniu liczby generowanych kombinacji poprzez określenie podzbioru reakcji, zmniejszeniu liczby generowanych kombinacji poprzez określenie rozmiaru badanych podprocesów i/lub zmniejszeniu liczby sprawdzanych wsparć t-niezmienników poprzez przyjęcie oczekiwanej ważności dla podprocesów. Algorytm wykorzystujący jedno lub więcej z wymienionych ograniczeń nadaje się do analizy złożonych systemów biologicznych, a wyznaczenie ważności wydaje się być istotne dla pełnego rozumienia analizowanych modeli. Opisana analiza występowania jest oparta na algorytmie dokładnym i jak wykazano, jest odpowiednia dla badanych złożonych systemów biologicznych, jednak może się zdarzyć, że analizowane układy będą scharakteryzowane przez tak dużą liczbę tranzycji i wsparć t-niezmienników, że konieczne i lepsze będzie zastosowanie heurystycznego algorytmu poszukiwania zbiorów kluczowych elementów.

- Przeprowadzenie dowodu przynależności wybranego problemu anty-występowania do konkretnej klasy i zaproponowanie dla niego algorytmu dokładnego.

Znajdowanie niewystępujących zbiorów tranzycji wydaje się być równie ważne jak poszukiwanie zbiorów występujących. W ramach analizowanego problemu poszukiwano takich podzbiorów tranzycji, za pośrednictwem których pewne podprocesy nie mogą oddziaływać. Oznacza to, że poszukiwane są podzbiory tranzycji niewystępujące w żadnym ze wsparć t-niezmienników. Dla wyróżnionego problemu przeanalizowano złożoność i opisano dowód **NP**-zupełności i silnej **NP**-zupełności. Badania nad rozwiązaniem tego problemu skupiły się w pierwszej kolejności na rozwiązaniu dokładnym, a uzyskane wyniki wskazały, że efektywnie nadaje się do rozwiązywania rzeczywistych danych biologicznych, gdyż przedmiotem poszukiwań są zbiory anty-występujące o relatywnie małej wielkości. Podobnie jak dla algorytmu występowania tak i tutaj dla algorytmu anty-występowania pojawiają się warianty ograniczające sprawdzanie kombinacji tranzycji. Oczywiście na uwadze należy mieć fakt, że mogą pojawić się modele złożonych systemów biologicznych o wyjątkowo dużych rozmiarach (mając na uwadze zarówno liczbę tranzycji jak i liczbę t-niezmienników) i wtedy zaproponowany algorytm może nie będzie odpowiedni. W dalszej perspektywie z uwagi na złożoność problemu należy rozważyć algorytmy przybliżone.

Kombinatoryczne aspekty opisane w niniejszej rozprawie dotyczą wybranych zagadnień, do dalszego rozważania pozostają inne problemy występowania i anty-występowania, w tym złożoność niektórych z nich i propozycje rozwiązań.

- Porównanie metod modelowania dla dwóch różnych podejść: sieci Petriego i równań różniczkowych zwyczajnych (ODE). W ramach tego porównania zaproponowano podejście dualnego modelowania, umożliwiające przeprowadzenie kompleksowej analizy parametrycznej i strukturalnej.

Zaproponowane podejście dualnego modelowania polega na wykorzystaniu dwóch różnych metod modelowania (ODE i sieci Petriego) celem przeprowadzenia kompleksowej analizy strukturalnej i symulacyjnej. Dokładniej, w oparciu o analizę ważności, będącą analizą strukturalną przeprowadzoną dla modelu opartego o sieci Petriego, oraz analizę wrażliwości, skupioną na dynamice odpowiedzi modelu, dla modelu opartego na ODE. Taka analiza prowadzi do znalezienia procesów, które są najważniejsze dla analizowanego modelu z dwóch różnych perspektyw, gdyż stosowane podejścia wzajemnie się uzupełniają, a ich jednoczesne zastosowanie pozwala wydobyc z analizy więcej informacji. Obok tego pojawia się także ciekawa

zależność dotycząca elementów istotnych w jednym modelu, ale mniej istotnych w drugim, którą opisano poniżej w części dotyczącej modeli (dokładniej dla modelu ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B), gdyż może być to własność bezpośrednio związana z modelem. Niemniej jednak, stwarza to motywację do kolejnych prac nad dualnym modelowaniem.

Praca nad porównaniem dwóch różnych metod pokazuje, że jednoczesne zastosowanie analizy strukturalnej i parametrycznej (dualnego modelowania) może nie tylko pozwolić na lepsze zrozumienie badanego systemu biologicznego, ale przede wszystkim pozwala na zidentyfikowanie istotnych parametrów i znaczących procesów elementarnych. Przykładowo może się przyczynić do opracowania nowych, bardziej skutecznych terapii, gdyż znalezione kluczowe elementy mogą stać się przedmiotem znacznie bardziej szczegółowych badań eksperymentalnych.

- Zastosowanie innej metody modelowania opartej o macierzowe modele dynamiki populacji.

Macierzowe modele dynamiki populacji są najczęściej wykorzystywane do prognozowania dynamiki populacji, w tym przypadku wykorzystano je do zbadania dynamiki populacji makrofagów w rozwoju blaszki miażdżycowej, co nie byłoby możliwe do przeprowadzenia w takim stopniu na podstawie klasycznych sieci Petriego. Zastosowana metoda stanowi punkt wyjścia do dalszych badań.

W zakresie drugiej ścieżki badawczej dotyczącej aspektów biologicznych zrealizowano następujące cele i zaproponowano/analizowano poniższe modele. Przy każdym z modeli przytoczono główne wnioski wysnute z analiz, jednak nie są to jedyne wyniki. Dokładne, szczegółowe opisy analiz znajdują się w poszczególnych podrozdziałach niniejszej rozprawy.

- Zrozumienie, usystematyzowanie wiedzy oraz poszukiwanie ciekawych interakcji i nieznanymi dotąd właściwościami w procesach powstawania i rozwoju miażdżycy na podstawie zaproponowanych i przeanalizowanych modeli opartych o klasyczne sieci Petriego:

- Model dotyczący wpływu uszkodzeń śródbłonna na rozwój miażdżycy [30], będącego jednym z głównych powodów powstawania blaszki miażdżycowej.

W rezultacie analizy tego modelu uporządkowano wiedzę o tym dynamicznym i złożonym systemie. Otrzymane wyniki są odzwierciedleniem istniejącej wiedzy, zgodnie z którą głównymi czynnikami leżącymi u podstaw tej choroby są procesy zapalne i stres oksydacyjny. Wyniki analizy tego modelu są wprowadzeniem do badań dotyczących miażdżycy, a model został przeanalizowany przy użyciu istniejących klasycznych metod.

- Model wpływu palenia papierosów na uszkodzenia śródbłonna i rozwój miażdżycy [31].

W oparciu o klasyczne metody analizy potwierdzono, że kluczowa w progresji miażdżycy jest rola stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego oraz że znaczący wpływ na jej rozwój ma analizowany dodatkowy czynnik ryzyka, jakim jest dym tytoniowy. Badania te nakierowały dalsze prace na aspekt promowania stanów prozakrzepowych u palaczy, co rozważono w kolejnym modelu.

- Model wpływu wybranych aspektów w stanach protrombotycznych, stanów zapalnych i stresu oksydacyjnego na rozwój miażdżycy [98].

Analiza tego modelu pozwoliła na lepsze zrozumienie mechanizmu układu krzepnięcia i jego roli w rozwoju miażdżycy. Podobnie jak dwa wcześniejsze modele, potwierdziła

literaturową wiedzę i zidentyfikowała kluczowe mechanizmy. W tym przypadku przeprowadzono także manualną analizę t-niezmenników (zwaną także bardziej szczegółową analizą poszczególnych t-niezmenników), która pozwoliła na uzyskanie informacji o zależnościach na większym poziomie szczegółowości. Analiza ta potwierdziła, że proces krzepnięcia prowadzący do tworzenia trombiny, może przebiegać prawidłowo nawet bez dwóch ścieżek dodatniego sprzężenia zwrotnego. Co więcej, niektóre t-niezmenniki pokazują, że redukcja fibrynogenu do fibryny przez trombinę nie jest konieczna do promowania tworzenia zakrzepów. Wynika to z faktu, że zaproponowany model zawiera także inny mechanizm, który może prowadzić do powstania zakrzepu. O ile standardowe metody nie pozwoliły na znalezienie ciekawych zależności, to manualna analiza t-niezmenników pozwoliła oszacować intensywność zaangażowania trombiny w mechanizmy stymulujące progresję miażdżycy.

- Model wpływu interleukiny-18 na procesy zapalne leżące u podstaw miażdżycy, w tym także zależności pomiędzy różnymi typami makrofagów [64].

Klasyczne metody dostarczyły wyników podobnych jak w przypadku powyżej opisanych modeli, natomiast zastosowanie rozszerzonych metod istniejących i manualnej analizy wybranych t-niezmenników, pozwoliło na zidentyfikowanie ciekawych zależności pomiędzy interleukiną-18 a różnymi typami makrofagów. Precyzując, wykazano, że typ prozapalny M1 zaangażowany jest w pozytywną regulację IL-18, podczas gdy typ anty-zapalny zaangażowany jest w negatywną regulację IL-18. Co ważne, te dwa wymienione mechanizmy w większości podprocesów występują jednocześnie. Ponadto, w analizie skupiono się także na ścieżkach wytwarzania IL-18. W tym kontekście wykazano, że omawiana cytokina wytwarzana przez szlak niezależny od kaspazy 1 jest zaangażowana w znacznie więcej podprocesów niż IL-18 wytwarzana przez szlak zależny od tej kaspazy. Wysłano więc wniosek, że szlak niezależny od kaspazy 1 może być związany z działaniem kaspazy 8, gdyż w ponad połowie podprocesów (t-niezmenników) kaspaza 8 występuje razem z IL-18, która została wytworzona na drodze niezależnej od kaspazy 1.

- Zrozumienie, usystematyzowanie wiedzy oraz poszukiwanie ciekawych interakcji i nieznanymi dotąd właściwościami w różnych jednostkach chorobowych na podstawie zaproponowanych i przeanalizowanych modeli opartych o klasyczne sieci Petriego:

- Model powiązań między oxLDL a tętniakami aorty brzusznej [105], jest modelem bezpośredniej relacji między miażdżycą a tętniakami aorty brzusznej, gdyż mają one wspólne czynniki ryzyka i podobne cechy patologiczne.

W przypadku badań dotyczących powyższego zagadnienia pojawiały się niezgodności literaturowe co do wpływu LDL i jego utlenionej formy na powstawanie tętniaka aorty brzusznej. W ogólności pojawia się przekonanie, że utlenione formy LDL (oxLDL) są zaangażowane zarówno w patogenezę miażdżycy, jak i w patogenezę tętniaka aorty brzusznej. Przeprowadzone rozszerzone analizy istniejące i zaproponowane, takie jak porównawcza analiza ważności, porównawcza analiza knockout, a także knockout symulacyjny wykazały, że oxLDL nie wywierają prawie żadnego bezpośredniego wpływu na powiększanie i pęknięcie tętniaka. Co jednak ważne, w zaproponowanym modelu oxLDL jest powiązany z ponad połową wszystkich zamodelowanych podprocesów zaangażowanych w patogenezę tętniaka, a pomimo tego jego udział nie przekłada się znacząco na powiększanie lub pęknięcie AAA. Oznacza to, że uzyskane wyniki sugerują, iż oxLDL

rzeczywiście bierze udział w powstawaniu tętniaka, ale nie znajduje znaczącego odzwierciedlenia w jego powiększeniu lub pęknięciu, a więc cały ten proces może zachodzić bez jego udziału.

- Model relacji między homeostazą żelaza a niedoborem witaminy A [100]. Niedobory te stanowią powszechny problem żywieniowy na świecie, a do tego odpowiednia regulacja żelaza może mieć działanie protekcyjne przed chorobami sercowo-naczyniowymi, a więc również przed miażdżycą.

W przypadku powyższego modelu pojawiły się sprzeczne doniesienia literatury: zgodnie z jednym nurtem badawczym deficyt witaminy A prowadzi do negatywnej regulacji ekspresji hepcydyny, drugi nurt natomiast podkreśla, że deficyt witaminy A jest związany z pozytywną regulacją hepcydyny. Bardziej ogólna analiza, oparta o t-klastrowanie, wskazała, że oba te mechanizmy są równie ważne, natomiast bardziej szczegółowe analizy, w tym analiza średniej liczby uruchomień tranzykcji we wszystkich symulacjach i analiza ważności, przechyliły szalę na rzecz drugiego mechanizmu, zgodnie z którym deficyt witaminy A jest związany z pozytywną regulacją hepcydyny. Wskazuje to na niewątpliwą zaletę wykorzystywania rozszerzonych analiz do rozwiania rozbieżności literaturowych, które nie są wcale rzadkim zjawiskiem.

- Modele relacji między infekcją wirusem SARS-CoV-2 a układem RAA w nadciśnieniu pierwotnym [65]. Model ten cechuje ciekawa charakterystyka, jest pokryty przez ogromną liczbę t-niezmienników i chociaż odbiega od myśli przewodniej rozprawy, to jest skrajnym przypadkiem, który m.in., uwydatnił ograniczenia stosowanych metod analizy. Niemniej jednak część analizowanych aspektów, takich jak nadciśnienie, jest bezpośrednio związana z rozwojem chorób sercowo-naczyniowych, w tym jednak przypadku analizowano zwiększone ryzyko przejścia choroby COVID-19.

Analizy nacelowane na lepsze zrozumienie całego systemu pozwoliły na znalezienie elementarnych procesów o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania modelu. Wśród nich zidentyfikowano, że najbardziej istotne procesy elementarne należą do modułu RAA, zapalenia i aktywacji limfocytów oraz infekcji SARS-CoV-2. Ponadto zdefiniowano procesy elementarne, które są niezależne od obecności wirusa i są to elementy należące do modułu uszkodzenia śródbłonna. Ustalono także, które procesy elementarne są ważniejsze dla modelu z SARS-CoV-2, a które z nich są ważniejsze w modelu bez infekcji tym wirusem. Taka analiza porównawcza wykazała, że znaczące różnice zaobserwowano tylko w dwóch modułach: w module zapalenia i aktywacji limfocytów oraz w module RAA.

Obok powyższych analiz przeprowadzono także bardziej szczegółowe analizy, które pozwoliły określić związek między przyjmowaniem leków hipotensyjnych a współwystępowaniem choroby COVID-19. Badania te pozwalają zaobserwować, że leki hipotensyjne, tj. inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI) i blokery receptora angiotensyny (ARB) nie nasilają rozwoju infekcji wirusem SARS-CoV-2. Co równie ważne, symulacje wykazały ciekawe zależności co do skuteczności działania przyjmowanych leków przy obecności infekcji wirusowej. Oznacza to, że potwierdzono skuteczność leczenia nadciśnienia tętniczego u pacjentów przyjmujących ACEI, lecz nie potwierdzono tej skuteczności w przypadku pacjentów przyjmujących ARB. Co więcej, w przypadku tej drugiej grupy zaobserwowano nawet nieco odwrotny skutek. Te niezwykle ciekawe wyniki wymagają jednak dalszych badań.

- Zaproponowanie modeli opartych o klasyczne sieci Petriego na podstawie istniejących modeli

opartych na ODE, co umożliwi porównanie innych niż sieci Petriego metod modelowania i umożliwi zaproponowanie złożonej analizy strukturalnej i parametrycznej opartej o podejście dualnego modelowania:

- Modele równowagi między prooksydantami i antyoksydantami (GSH-GSSG) [150].

Zaproponowany model oparty o sieci Petriego został utworzony na podstawie modelu opartego na ODE i posłużył do wytworzenia pewnego schematu modelowania. Miał on na celu przede wszystkim zrozumienie relacji pomiędzy tymi różnymi metodami modelowania i stworzenie pewnego sposobu komunikacji, tak aby umożliwić przeprowadzenie analiz, które do tej pory nie były możliwe. W związku z tym konkluzje biologiczne stanowią sprawę drugorzędą, zwłaszcza, że model jest stosunkowo niewielki i jego analiza nie jest w stanie doprowadzić do odkrycia nowych właściwości. Jednakże przeprowadzona analiza, skupiona na t-niezmiennikach, pozwoliła odkryć, która reakcja w modelu równowagi między prooksydantami i antyoksydantami jest najważniejsza. Znalaziona jako najbardziej kluczowa jest reakcja utleniania GSH do GSSG przez ROS. Wiedza ta została wykorzystana, aby nacelować symulacje modelu opartego na ODE na konkretne aspekty. Tego rodzaju ukierunkowanie wydaje się być tym bardziej pożądane, im bardziej złożony jest analizowany układ biologiczny. Na tym etapie obie metodologie prowadzą do uzyskania podobnych wniosków i mogą być traktowane jako alternatywne podejścia, badania te wykonano jednak na małym procesie biologicznym, a więc stanowią wstęp do koncepcji dualnego modelowania i dalszych rozważań.

- Model odpowiedzi systemu na uszkodzenia DNA na podstawie ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B [104].

Zaproponowany model oparty o sieci Petriego został utworzony na podstawie istniejącego modelu opartego o równania różniczkowe zwyczajne i posłużył do zaproponowania dualnego modelowania i umożliwienia przeprowadzenia kompleksowej analizy strukturalnej i parametrycznej.

Badany proces biologiczny został wykorzystany w dużej mierze do oceny metodologicznej, na jego podstawie wykonano dwie niezależne analizy przeprowadzone dla dwóch różnych modeli (analiza ważności dla modelu opartego na klasycznej sieci Petriego i analiza wrażliwości dla modelu opartego na ODE). Obie z zastosowanych metod identyfikują istotne komponenty badanego systemu. Część wyników analizy ważności i wrażliwości jest ze sobą zgodna, głównie wyniki dla symulacji z niską dawką promieniowania 4Gy. Poza częścią wspólną wyników dla obu tych metod obserwuje się także odrębne wnioski, stąd zatem wniosek o komplementarności. Wniosek ten wynika z dokładnych biologicznych obserwacji. Pierwsza z nich pokazuje, że najważniejsze procesy elementarne w modelu opartego o sieci Petriego należą do modułu ATM, będącego kluczowym modułem wykrywania uszkodzeń w odpowiedzi na promieniowanie IR. Podobne wyniki obserwuje się dla analizy wrażliwości, ale tylko dla symulacji z niską dawką promieniowania (4Gy). W warunkach ekstremalnych z wysoką dawką promieniowania (10Gy) znaczenie tych parametrów jest zdecydowanie mniejsze. Druga obserwacja pokazuje, że analiza wrażliwości wykazała istotny wpływ parametrów związanych z naprawą DNA, degradacją białek i degradacją transkryptów ATM i Mdm2. Wyniki te nie pokrywają się jednak z analizą ważności dla modelu opartego o sieci Petriego. Uzasadnienie tych obserwacji można znaleźć w podrozdziale traktującym o tych badaniach. Obok wniosku o komplementarności tych metod i sensowności stosowania podejścia dualnego modelowania pojawia się jeszcze jedna ciekawa zależność, która pokazuje, że zmiana parametru

wskazanego jako istotny w modelu opartego o sieci Petriego i jednocześnie jako mniej istotny w modelu opartym na ODE prowadzi do zmiany poziomu białka, bez zmiany czasu ustalenia. Natomiast zmiana parametru uznanego za istotny w modelu opartym na ODE, który jest mniej istotny w modelu opartym o sieci Petriego, prowadzi do przeciwnego wniosku. Niewątpliwie należy rozważyć czy opisane obserwacje są przypadkowe czy jest to może ogólna zasada.

Wspomniany model oparty o sieci Petriego dotyczący ścieżek sygnałowych ATM-p53-NF- κ B posłużył także jak biologiczny przypadek do oceny analizy występowania, gdyż zawiera względnie dużo aktywnych komponentów sieci. Analiza występowania w przypadku tego modelu może dać szerszy wgląd w cele terapeutyczne, prowadząc tym samym do opracowania bardziej efektywnych terapii w medycynie. Jest to jednak zastosowanie wynikające z natury analizowanego procesu, sama analiza ma dużo większy potencjał i może być chociażby zastosowana jako ważny element porównawczej analizy modeli.

- Zaproponowanie macierzowego modelu dynamiki populacji dotyczącego zależności między hipercholesterolemią i niestabilnością blaszek miażdżycowych [295]. Zaproponowany model wpływu hipercholesterolemii na dynamikę populacji makrofagów w blaszce miażdżycowej pozwolił skoncentrować się na ocenie rozwoju rdzenia nekrotycznego będącego elementem charakterystycznym dla rozróżniania zaawansowania rozwoju blaszki miażdżycowej. Wyniki potwierdzają, że utrzymujący się przewlekły stan zapalny, spowodowany wysokim stężeniem wolnych lipidów, prowadzi do promowania rozwoju rdzenia nekrotycznego i jego szybszego wzrostu. Główna konkluzja pokazuje, że hipercholesterolemia może przyspieszać rozwój miażdżycy poprzez stymulowanie powstawania rdzenia martwiczego, przyczyniając się do szybszej progresji do objawowej, niestabilnej blaszki miażdżycowej, narażonej na pęknięcie i spowodowanie zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Kompleksowa analiza modeli opisujących zjawiska biologiczne jest niezwykle trudna i w dalszym ciągu pozostawia duże pole do rozważań. Niniejsza praca nie wyczerpuje tematu, lecz stanowi obszerne wprowadzenie do ewentualnych dalszych badań nad modelowaniem złożonych systemów biologicznych z wykorzystaniem różnych metod informatycznych.

Rozdział 8

Materiały dodatkowe

8.1 Materiały dodatkowe do rozdziału 6

Tabela 8.1 zawiera listę parametrów dla modelu opartego na ODE dotyczącego ścieżki sygnałowej ATM-p53-NFκB.

TABELA 8.1: Lista parametrów modelu opartego na ODE dotyczącego ścieżki sygnałowej ATM-p53-NFκB opisanego w pracy [134]. Tabela pochodzi z materiałów dodatkowych pracy [104].

nr	Znaczenie biologiczne	nr	Znaczenie biologiczne
1	całkowita liczba AKT	63	degradacja IκBa w kompleksie z NFκB
2	całkowita liczba CREB	64	szybkość asocjacji IκBa-NFκB
3	całkowita liczba KMRN	65	MM dla wpływu Wip1 na geny zależne od NFκB
4	całkowita liczba KSRP	66	MM dla hamowania IKKK przez A20
5	całkowita liczba PIP	67	MM dla inaktywacji IKKa przez A20
6	spontaniczna aktywacja p53	68	MM dla inaktywacji IKKa przez A20
7	aktywacja p53 przez ATM	69	aktywacja genów zależna od NFκB
8	aktywacja p53 przez Chk2	70	inaktywacja genów IκBa i A20
9	fosforylacja Mdm2 przez AKT	71	synteza mRNA A20 i IκBa
10	reaktywacja jądrowego Mdm2 przez Wip1	72	translacja IκBa
11	inaktywacja jądrowego Mdm2 przez ATM	73	uszkodzenia DSB spowodowane przez IR
12	aktywacja PIP3	74	degradacja apoptotycznego DSB
13	aktywacja AKT przez PIP	75	aktywacja ATM przez tworzenie DSB
14	aktywacja AKT przez ATM	76	aktywacja ATM przez tworzenie kompleksu MRN
15	inaktywacja p53 przez Wip1	77	aktywacja Chk2 i CREB przez ATM
16	szybkość defosforylacji Mdm2	78	aktywacja kompleksu MRN przez ATM
17	inaktywacja PIP przez PTEN	79	aktywacja kompleksu MRN przez DSB
18	inaktywacja AKT	80	szybkość naprawy DSB
19	degradacja transkryptu p53	81	inaktywacja ATM przez Wip1
20	spontaniczna degradacja białka p53	82	inaktywacja Chk2 przez Wip1
21	degradacja p53 przez Mdm2	83	inaktywacja kompleksu MRN
22	spontaniczna degradacja białka p53p	84	inaktywacja kompleksu CREB
23	degradacja p53p przez Mdm2	85	degradacja transkryptu ATM
24	degradacja transkryptu Mdm2	86	degradacja białka ATM
25	spontaniczna degradacja białka Mdm2	87	degradacja transkryptu Chk2
26	spontaniczna degradacja białka Mdm2p	88	degradacja białka Chk2
27	degradacja Mdm2 przez Chk2	89	MM dla naprawy DSB
28	szybkość degradacji transkryptu PTEN	90	MM dla aktywacji ATM przez DSB
29	szybkość degradacji PTEN	91	MM dla aktywacji kompleksu MRN przez DSB
30	import jądrowego Mdm2	92	aktywacja genów Chk2 i ATM
31	MM dla aktywacji p53 przez ATM	93	aktywacja genów Wip1 i ATM przez CREB

nr	Znaczenie biologiczne	nr	Znaczenie biologiczne
32	MM dla wpływu Chk2 na system	94	inaktywacja genu Chk2
33	MM dla p53 hamowania translacji spowodowanej przez p53	95	synteza ATM
34	spontaniczna aktywacja genu p53	96	synteza Chk2
35	spontaniczna aktywacja genów Mdm2 i PTEN	97	transkrypcja ATM
36	aktywacja genów Mdm2, PTEN, ATM i Wip1 zależna od p53	98	transkrypcja Chk2
37	inaktywacja genów Mdm2 i PTEN	99	aktywacja KSRP
38	synteza mRNA p53	100	dojrzewanie miR-16
39	synteza mRNA Mdm2	101	deaktywacja KSRP
40	synteza mRNA PTEN	102	spontaniczna degradacja mRNA Wip1
41	szybkość translacji p53	103	degradacja mRNA Wip1 spowodowana przez siRNA
42	szybkość translacji Mdm2	104	degradacja mRNA Wip1 spowodowana przez miR-16
43	szybkość translacji PTEN	105	szybkość degradacji białka Wip1
44	całkowita liczba receptorów	106	degradacja mRNA Wip1 spowodowana przez miR-16
45	fosforylacja IκBα w kompleksach pośredniczona przez IKKα	107	degradacja mRNA Wip1 spowodowana przez miR-16
46	fosforylacja IκBα pośredniczona przez IKKα	108	eksport jądrowego KSRP
47	aktywacja IKKκ	109	import jądrowego KSRP
48	transformacja IKKι	110	deaktywacja genu Wip1
49	aktywacja IKK	111	szybkość syntezy mRNA WIP1
50	aktywacja IKK przez ATM	112	szybkość produkcji pre-miR-16
51	aktywacja receptora spowodowana przez TNF	113	szybkość translacji WIP1
52	szybkość inaktywacji IKKκ	114	degradacja mRNA Bax
53	szybkość inaktywacji IKK	115	degradacja Bax
54	szybkość inaktywacji receptora	116	synteza mRNA Bax
55	degradacja ufosforylowanego IκBα	117	translacja Bax
56	degradacja transkrypty A20 i IκBα	118	szybkość degradacji p21t
57	degradacja wolnego IκBα	119	szybkość degradacji p21
58	szybkość degradacji A20	120	synteza mRNA p21
59	eksport jądrowego IκBα	121	translacja p21
60	eksport jądrowego IκBα-NFκB	122	translacja A20
61	import jądrowego NFκB	123	spontaniczna inaktywacja genu p53
62	import jądrowego IκBα		

Tabela 8.2 zawiera wyniki analizy ważności dla modelu opartego o sieci Petriego dotyczącej ścieżki sygnałowej ATM–p53–NFκB (model z dwoma wzbudzeniami zawierający 541 niezmienników).

TABELA 8.2: Analiza ważności dla wszystkich procesów elementarnych modelu opartego o sieci Petriego dotyczącego ścieżki sygnałowej ATM–p53–NFκB. Tabela pochodzi z materiałów dodatkowych pracy [104].

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność	
		trans./t-inv.	[%]
t_1	tworzenie DSB stymulowane przez IR	418	77.26
t_2	źródło IR	418	77.26
t_{42}	transkrypcja do mRNA ATM	418	77.26
t_{13}	źródło DNA	416	76.89
t_{14}	transkrypcja z DNA do mRNA p53	416	76.89
t_{52}	fosforylacja ATMn przez DSB	415	76.71
t_{16}	translacja z mRNA p53 do p53n	414	76.52
t_{43}	translacja z mRNA ATM do ATMn	414	76.52
t_{54}	przejście ATMpn do ATMan przez MRNpn	407	75.23

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność	
		trans./t-inv.	[%]
t_{162}	tworzenie puli MRNpn	407	75.23
t_{107}	przejście NF- κ B z cytoplazmy do jądra	259	47.87
t_{145}	źródło NF- κ B	258	47.69
t_{39}	fosforylacja Chk2n przez ATMan	222	41.04
t_{35}	transkrypcja z DNA do mRNA Chk2	208	38.45
t_{125}	aktywacja GCHK2	208	38.45
t_{147}	aktywacja Gp53 zależna od NF- κ Bn	208	38.45
t_{169}	spontaniczna aktywacja Gp53	208	38.45
t_{37}	translacja z mRNA Chk2 do Chk2n	201	37.15
t_{122}	niezależna aktywacja GATM	176	32.53
t_{124}	aktywacja GATM zależna od CREBpn	176	32.53
t_{161}	tworzenie puli CREBpn po aktywacji GATM	176	32.53
t_{17}	transkrypcja z DNA do mRNA Mdm2	166	30.68
t_{31}	translacja z mRNA Mdm2 do Mdm2	155	28.65
t_{110}	transkrypcja do mRNA Wip1	155	28.65
t_{114}	spontaniczna fosforylacja p53n	145	26.80
t_{10}	fosforylacja p53n przez Chk2pn	140	25.88
t_{70}	fosforylacja p53n przez ATMan	140	25.88
t_{127}	aktywacja GMdm2 zależna od p53pn	130	24.03
t_{27}	fosforylacja Mdm2 przez AKTp	127	23.48
t_{159}	tworzenie puli AKTp	127	23.48
t_{32}	translacja z mRNA Wip1 do Wip1n	116	21.44
t_{142}	aktywacja GWip1 zależna od p53pn	98	18.11
t_{65}	przejście Mdm2p z cytoplazmy do jądra	97	17.93
t_{123}	aktywacja GATM zależna od p53pn	66	12.20
t_{67}	fosforylacja Mdm2pn przez ATMan	62	11.46
t_{167}	spontaniczna aktywacja GMdm2	36	6.65
t_{18}	transkrypcja z DNA do mRNA PTEN	33	6.10
t_{126}	aktywacja GPTEN przez p53pn	30	5.55
t_{80}	transkrypcja z DNA do mRNA I κ B α	29	5.36
t_{139}	aktywacja GI κ B α zależna od NF- κ Bn	29	5.36
t_{38}	defosforylacja Chk2pn przez Wip1n	26	4.81
t_{68}	defosforylacja Mdm2ppn przez Wip1n	26	4.81
t_9	defosforylacja p53pn przez Wip1n	25	4.62
t_4	transkrypcja z DNA do mRNA p21	22	4.07
t_{21}	translacja z mRNA PTEN do PTEN	22	4.07
t_3	transkrypcja z DNA do mRNA Bax	20	3.70
t_{11}	degradacja p53pn przez Mdm2pn	20	3.70
t_{128}	aktywacja Gp21 zależna od p53pn	20	3.70
t_{129}	aktywacja GBax zależna od p53pn	20	3.70
t_{140}	niezależna aktywacja GWip1	19	3.51
t_{143}	aktywacja GWip1 zależna od NF- κ Bn	19	3.51
t_{144}	aktywacja GWip1 zależna od CREBpn	19	3.51
t_{164}	tworzenie puli CREBpn po aktywacji GWip1	19	3.51
t_{29}	degradacja Mdm2p przez Chk2p	18	3.33
t_{30}	degradacja Mdm2 przez Chk2pn	18	3.33
t_{66}	degradacja Mdm2pn przez Chk2pn	18	3.33
t_{69}	degradacja Mdm2ppn przez Chk2pn	18	3.33
t_{77}	transkrypcja z DNA do mRNA A20 przez I κ B α n	18	3.33
t_{83}	translacja z mRNA I κ B α do I κ B α	18	3.33
t_{96}	degradacja Mdm2ppn	18	3.33
t_{130}	aktywacja GA20 zależna od NF- κ Bn	18	3.33
t_{89}	przejście IKK do IKKa przez ATMan	16	2.96
t_{48}	transkrypcja do pre-miR-16 przez KSRPpn	15	2.77
t_{108}	źródło IKK	15	2.77

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność	
		trans./t-inv.	[%]
t ₁₆₀	tworzenie puli KSRPpn	15	2.77
t ₄₇	dojrzewanie pre-miR-16	14	2.59
t ₃₃	degradacja Wip1n	13	2.40
t ₃₄	degradacja mRNA Wip1	13	2.40
t ₄₆	degradacja mRNA Wip1 przez miR-16	13	2.40
t ₅₁	defosforylacja ATMpn przez Wip1n	13	2.40
t ₅₅	przejście ATMan do ATMpn przez Wip1n	13	2.40
t ₁₁₁	degradacja mRNA Wip1 przez shRNA	13	2.40
t ₁₁₂	synteza shRNA	13	2.40
t ₁₂	degradacja p53n przez Mdm2pn	12	2.22
t ₅	translacja z mRNA p21 do p21	11	2.03
t ₆	translacja z mRNA Bax do Bax	11	2.03
t ₇	degradacja p21	11	2.03
t ₈	degradacja Bax	11	2.03
t ₁₉	degradacja mRNA Mdm2	11	2.03
t ₂₀	degradacja mRNA PTEN	11	2.03
t ₂₂	degradacja PTEN	11	2.03
t ₂₃	defosforylacja PIP3 przez PTEN	11	2.03
t ₂₄	fosforylacja PIP2	11	2.03
t ₉₂	degradacja mRNA p21	11	2.03
t ₉₃	degradacja mRNA Bax	11	2.03
t ₉₇	degradacja Mdm2pn	11	2.03
t ₉₈	degradacja Mdm2	11	2.03
t ₉₉	degradacja Mdm2p	11	2.03
t ₀	naprawa uszkodzeń indukowana przez p53pn	10	1.85
t ₇₁	hamowanie mRNA Chk2 przez p53pn	10	1.85
t ₉₀	hamowanie transkrypcji mRNA IκBα przez p53pn	10	1.85
t ₉₁	hamowanie transkrypcji mRNA of A20 przez p53pn	10	1.85
t ₉₄	degradacja p53pn	10	1.85
t ₁₁₈	fosforylacja IκBα w kompleksie z NF-κB przez IKKa	10	1.85
t ₁₁₉	degradacja kompleksu IκBαp i NF-κB	10	1.85
t ₁₂₀	degradacja IκBαp po degradacji kompleksu	10	1.85
t ₁₀₁	przejście IκBα z cytoplazmy do jądra	8	1.48
t ₇₈	translacja z mRNA A20 do A20	7	1.29
t ₁₀₂	tworzenie kompleksu IκBαn i NF-κBn	7	1.29
t ₁₀₃	przejście kompleksu IκBα i NF-κB z jądra do cytoplazmy	7	1.29
t ₁₀₅	tworzenie kompleksu IκBα i NF-κB	7	1.29
t ₆₀	defosforylacja MRNpn	5	0.92
t ₈₄	przejście IKKa do IKKi przez A20	5	0.92
t ₈₅	przejście IKKi do IKKii	5	0.92
t ₈₆	przejście IKKii do IKK	5	0.92
t ₁₁₆	fosforylacja IκBα przez IKKa	5	0.92
t ₁₁₇	degradacja IκBαp	5	0.92
t ₂₅	defosforylacja AKTp	4	0.74
t ₂₆	fosforylacja AKT przez PIP3 and ATMan	4	0.74
t ₄₁	degradacja Chk2pn	4	0.74
t ₄₄	degradacja ATMn	4	0.74
t ₄₅	degradacja mRNA ATM	4	0.74
t ₅₃	degradacja ATMpn	4	0.74
t ₅₆	degradacja ATMan	4	0.74
t ₅₇	defosforylacja CREBpn	4	0.74
t ₅₈	fosforylacja CREBn przez ATMan	4	0.74
t ₆₁	fosforylacja MRNn przez ATMpn	4	0.74
t ₆₂	fosforylacja KSRP przez ATMan	4	0.74
t ₆₃	defosforylacja KSRPp	4	0.74

ID	Nazwa procesu elementarnego	Ważność	
		trans./t-inv.	[%]
t ₈₇	przejście IKK do IKKa przez IKKKa	4	0.74
t ₁₅₈	tworzenie puli PIP3	4	0.74
t ₁₆₃	tworzenie puli IKKKa	4	0.74
t ₇₂	źródło TNF α	3	0.55
t ₇₄	aktywacja TNFR1 przez TNF α	3	0.55
t ₁₆₈	spontaniczna aktywacja GPTEN	3	0.55
t ₁₅	degradacja mRNA p53	2	0.37
t ₇₃	źródło TNFR1	2	0.37
t ₉₅	degradacja p53n	2	0.37
t ₁₀₆	degradacja kompleksu I κ B α i NF- κ B	2	0.37
t ₁₀₉	degradacja I κ B α po degradacji kompleksu	2	0.37
t ₁₁₅	rozłączenie kompleksu I κ B α i NF- κ B	2	0.37
t ₁₆₅	spontaniczna aktywacja GBax	2	0.37
t ₁₆₆	spontaniczna aktywacja Gp21	2	0.37
t ₂₈	defosforylacja Mdm2p	1	0.18
t ₃₆	degradacja mRNA Chk2	1	0.18
t ₄₀	degradacja Chk2n	1	0.18
t ₄₉	degradacja miR-16	1	0.18
t ₅₀	degradacja pre-miR-16	1	0.18
t ₅₉	fosforylacja MRNn przez DSB	1	0.18
t ₆₄	przejście KSRPp z cytoplazmy do jądra	1	0.18
t ₇₅	przejście IKKK do IKKKa przez TNFR1	1	0.18
t ₇₆	przejście IKKKa do IKKK	1	0.18
t ₇₉	degradacja mRNA A20	1	0.18
t ₈₁	degradacja A20	1	0.18
t ₈₂	degradacja mRNA I κ B α	1	0.18
t ₈₈	hamowanie Ra przez A20	1	0.18
t ₁₀₀	przejście I κ B α z jądra do cytoplazmy	1	0.18
t ₁₀₄	degradacja I κ B α	1	0.18
t ₁₁₃	przejście KSRPpn z jądra do cytoplazmy	1	0.18
t ₁₂₁	spontaniczna inaktywacja TNFR1	1	0.18
t ₁₃₁	inaktywacja GATM	1	0.18
t ₁₃₂	inaktywacja GCHK2	1	0.18
t ₁₃₃	inaktywacja GPTEN	1	0.18
t ₁₃₄	inaktywacja GMdm2	1	0.18
t ₁₃₅	inaktywacja Gp21	1	0.18
t ₁₃₆	inaktywacja GBax	1	0.18
t ₁₃₇	inaktywacja GA20	1	0.18
t ₁₃₈	inaktywacja GI κ B α	1	0.18
t ₁₄₁	inaktywacja GWip1	1	0.18
t ₁₄₆	inaktywacja Gp53	1	0.18
t ₁₄₈	reaktywacja GA20	1	0.18
t ₁₄₉	reaktywacja GATM	1	0.18
t ₁₅₀	reaktywacja GBax	1	0.18
t ₁₅₁	reaktywacja GCHK2	1	0.18
t ₁₅₂	reaktywacja GI κ B α	1	0.18
t ₁₅₃	reaktywacja GMdm2	1	0.18
t ₁₅₄	reaktywacja Gp21	1	0.18
t ₁₅₅	reaktywacja Gp53	1	0.18
t ₁₅₆	reaktywacja GPTEN	1	0.18
t ₁₅₇	reaktywacja GWip1	1	0.18

Literatura

- [1] T. M. Abd El-Aziz, A. Al-Sabi, and J. D. Stockand. Human recombinant soluble ACE2 (hrsACE2) shows promise for treating severe COVID19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1):1–2, 2020.
- [2] M. Abu Elhija, E. Lunenfeld, and M. Huleihel. LPS increases the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in mouse testes. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(4):361–371, 2008.
- [3] R. Airley. Cancer chemotherapy: basic science to the clinic. *John Wiley & Sons*, 2009.
- [4] H. R. Akçakaya, M. A. Burgman, and L. R. Ginzburg. *Applied Population Ecology*. Applied Biomathematics, Setauket, NY, 1997.
- [5] A. W. Akerman, R. E. Stroud, R. W. Barrs, R. T. Grespin, L. T. McDonald, R. A. C. LaRue, R. Mukherjee, J. S. Ikonmidis, J. A. Jones, and J. M. Ruddy. Elevated wall tension initiates interleukin-6 expression and abdominal aortic dilation. *Annals of Vascular Surgery*, 46:193–204, 2018.
- [6] L. K. Amstein, J. Ackermann, J. Hannig, I. Đikić, S. Fulda, and I. Koch. Mathematical modeling of the molecular switch of TNFR1-mediated signaling pathways applying Petri net formalism and in silico knockout analysis. *PLoS Computational Biology*, 18(8):e1010383, 2022.
- [7] G. J. Anderson and D. M. Frazer. Current understanding of iron homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(suppl_6):1559S–1566S, 2017.
- [8] G. Arango Duque and A. Descoteaux. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5:491, 2014.
- [9] S. F. Arruda, E. M. de Almeida Siqueira, and F. F. de Valência. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition*, 25(4):472–478, 2009.
- [10] T. Azam, D. Novick, P. Bufler, D.-Y. Yoon, M. Rubinstein, C. A. Dinarello, and S. H. Kim. Identification of a critical Ig-like domain in IL-18 receptor α and characterization of a functional IL-18 receptor complex. *The Journal of Immunology*, 171(12):6574–6580, 2003.
- [11] B. Baliga and S. Kumar. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death and Differentiation*, 10(1):16–18, 2003.
- [12] N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, and C. L. Hammond. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390(3):191–214, 2009.
- [13] I. R. Barrows, A. Ramezani, and D. S. Raj. Inflammation, Immunity, and Oxidative Stress in Hypertension-Partners in Crime? *Advances in Chronic Kidney Disease*, 26(2):122–130, 2019.
- [14] K. Barth, D. G. Remick, and C. A. Genco. Disruption of immune regulation by microbial pathogens and resulting chronic inflammation. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7):1413–1422, 2013.
- [15] E. Berta, N. Zsíros, M. Bodor, I. Balogh, H. Lőrincz, G. Paragh, and M. Harangi. Clinical Aspects of Genetic and Non-Genetic Cardiovascular Risk Factors in Familial Hypercholesterolemia. *Genes*, 13(7):1158, 2022.

- [16] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1):9–19, 2012.
- [17] L. S. Bisgaard, C. K. Mogensen, A. Rosendahl, H. Cucak, L. B. Nielsen, S. E. Rasmussen, and T. X. Pedersen. Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression—implications for atherosclerosis research. *Scientific Reports*, 6(1):1–10, 2016.
- [18] M. Biswas, M. Kali, and S. Khatun. Association of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin-receptor blockers with risk of mortality, severity or SARS-CoV-2 test positivity in COVID-19 patients: meta-analysis. *Scientific reports*, 11(1):1–8, 2021.
- [19] K. D. Blackfan and S. B. Wolbach. Vitamin A deficiency in infants: a clinical and pathological study. *The Journal of Pediatrics*, 3(5):679–706, 1933.
- [20] J. Błażewicz. *Złożoność obliczeniowa problemów kombinatorycznych*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1988.
- [21] J. I. Borissoff, H. M. Spronk, and H. ten Cate. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 364(18):1746–1760, 2011.
- [22] L. Cai, X. Guo, Y. Cao, P. Ying, L. Hong, Y. Zhang, G. Yi, and M. Fu. Determining available strategies for prevention and therapy: Exploring COVID-19 from the perspective of ACE2. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(4):43, 2021.
- [23] T. Caliński and J. Harabasz. A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics-theory and Methods*, 3(1):1–27, 1974.
- [24] J. Canton, D. Neculai, and S. Grinstein. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9):621–634, 2013.
- [25] R. M. Carey and S. H. Padia. Physiology and regulation of the renin–angiotensin–aldosterone system. In *Textbook of nephro-endocrinology*, pages 1–25. Elsevier, 2018.
- [26] H. Caswell. Matrix methods for population analysis. *Structured-population models in marine, terrestrial, and freshwater systems*, pages 19–58, 1997.
- [27] H. Caswell. *Matrix population models*, volume 1. Sinauer Sunderland, MA, 2000.
- [28] C. Chaouiya. Petri net modelling of biological networks. *Briefings in Bioinformatics*, 8(4):210–219, 07 2007.
- [29] D. A. Chistiakov, Y. V. Bobryshev, and A. N. Orekhov. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(1):17–28, 2016.
- [30] K. Chmielewska, D. Formanowicz, and P. Formanowicz. Modelowanie i analiza uszkodzeń śródbłonna za pomocą sieci Petriego. *Automatyzacja Procesów Dyskretnych. Teoria i Zastosowania*, 2:41–56, 2016.
- [31] K. Chmielewska, D. Formanowicz, and P. Formanowicz. The effect of cigarette smoking on endothelial damage and atherosclerosis development—modeled and analyzed using Petri nets. *Archives of Control Sciences*, 27(2), 2017.
- [32] J.-W. Choi, M.-J. Kwon, I.-H. Kim, Y.-M. Kim, M.-K. Lee, and T.-J. Nam. Pyropia yezoensis glycoprotein promotes the M1 to M2 macrophage phenotypic switch via the STAT3 and STAT6 transcription factors. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(2):666–674, 2016.
- [33] P. Choi and H. Reiser. IL-4: role in disease and regulation of production. *Clinical and Experimental Immunology*, 113(3):317, 1998.

- [34] E. Choke, G. Cockerill, W. Wilson, S. Sayed, J. Dawson, I. Loftus, and M. Thompson. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 30(3):227–244, 2005.
- [35] Y. Chuang, M. E. Hung, B. K. Cangelose, and J. N. Leonard. Regulation of the IL-10-driven macrophage phenotype under incoherent stimuli. *Innate Immunity*, 22(8):647–657, 2016.
- [36] Y. Chung, S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30(4):576–587, 2009.
- [37] M. M. Ciulla. Switching to another antihypertensive effective drug when using ACEIs/ARBs to treat arterial hypertension during COVID-19. *European Heart Journal*, 41(19):1856, 2020.
- [38] J. B. Cohen, T. C. Hanff, P. William, N. Sweitzer, N. R. Rosado-Santander, C. Medina, J. E. Rodriguez-Mori, N. Renna, T. I. Chang, V. Corrales-Medina, et al. Continuation versus discontinuation of renin–angiotensin system inhibitors in patients admitted to hospital with COVID-19: a prospective, randomised, open-label trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 9(3):275–284, 2021.
- [39] H. Cormen Thomas, E. Leiserson Charles, L. Rivest Ronald, and C. Stein. Wprowadzenie do algorytmów, 2007.
- [40] K. Croce and P. Libby. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Hematology*, 14(1):55–61, 2007.
- [41] M. S. da Cunha, E. M. Siqueira, L. S. Trindade, and S. F. Arruda. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism via ineffective erythropoiesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(10):1035–1044, 2014.
- [42] A. R. Davis, G. Lotocki, A. E. Marcillo, W. D. Dietrich, and R. W. Keane. FasL, Fas, and death-inducing signaling complex (DISC) proteins are recruited to membrane rafts after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 24(5):823–834, 2007.
- [43] J. Dawson, G. W. Cockerill, E. Choke, A.-M. Belli, I. Loftus, and M. M. Thompson. Aortic aneurysms secrete interleukin-6 into the circulation. *Journal of Vascular Surgery*, 45(2):350–356, 2007.
- [44] M. De Gaetano, D. Crean, M. Barry, and O. Belton. M1-and M2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis. *Frontiers in immunology*, 7:275, 2016.
- [45] D. De Stefano, M. C. Maiuri, B. Iovine, A. Ialenti, M. A. Bevilacqua, and R. Carnuccio. The role of NF- κ B, IRF-1, and STAT-1 α transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN- γ in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Molecular Medicine*, 84(1):65–74, 2006.
- [46] W. Di, W. Tiantian, L. Qun, and Y. Zhicong. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *International Journal of Infectious Diseases*, 94:44–48, 2020.
- [47] B. Diao, C. Wang, Y. Tan, X. Chen, Y. Liu, L. Ning, L. Chen, M. Li, Y. Liu, G. Wang, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, page 827, 2020.
- [48] C. Dinarello, D. Novick, S. Kim, and G. Kaplanski. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in Immunology*, 4:289, 2013.
- [49] A. C. Doran. Inflammation Resolution: Implications for Atherosclerosis. *Circulation Research*, 130(1):130–148, 2022.
- [50] G. R. Drummond, A. Vinh, T. J. Guzik, and C. G. Sobey. Immune mechanism of hypertension. *Nature Reviews Immunology*, 19(8):517–532, 2019.
- [51] L. Edelstein-Keshet. *Mathematical models in biology*. SIAM, 2005.

- [52] J. Einloft, J. Ackermann, J. Nöthen, and I. Koch. MonaLisa—visualization and analysis of functional modules in biochemical networks. *Bioinformatics*, 29(11):1469–1470, 2013.
- [53] T. I. Emeto, J. V. Moxon, M. Au, and J. Golledge. Oxidative stress and abdominal aortic aneurysm: potential treatment targets. *Clinical Science*, 130(5):301–315, 2016.
- [54] M. Esler and D. Esler. Can angiotensin receptor-blocking drugs perhaps be harmful in the COVID-19 pandemic? *Journal of Hypertension*, 38:781–782, 2020.
- [55] G. P. Fadini, F. Simoni, R. Cappellari, N. Vitturi, S. Galasso, S. V. de Kreutzenberg, L. Previato, and A. Avogaro. Pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization imbalance in human hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237(2):805–808, 2014.
- [56] L. Fang, G. Karakiulakis, and M. Roth. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respiratory Medicine*, 8(4):e21–e21, 2020.
- [57] C. M. Ferrario. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(1):1–6, 2011.
- [58] C. M. Ferrario, J. Jessup, M. C. Chappell, D. B. Averill, K. B. Brosnihan, E. A. Tallant, D. I. Diz, and P. E. Gallagher. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation*, 111(20):2605–2610, 2005.
- [59] G. Findlay and R. Mackenzie. The bone marrow in deficiency diseases. *J Pathol*, 25:402–403, 1922.
- [60] I. Fleming, A. Mohamed, J. Galle, L. Turchanowa, R. P. Brandes, B. Fisslthaler, and R. Busse. Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC α . *Cardiovascular Research*, 65(4):897–906, 2005.
- [61] H. Z. Ford, H. M. Byrne, and M. R. Myerscough. A lipid-structured model for macrophage populations in atherosclerotic plaques. *Journal of Theoretical Biology*, 479:48–63, 2019.
- [62] H. Z. Ford, L. Zeboudj, G. S. Purvis, A. Ten Bokum, A. E. Zarebski, J. A. Bull, H. M. Byrne, M. R. Myerscough, and D. R. Greaves. Efferocytosis perpetuates substance accumulation inside macrophage populations. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1904):20190730, 2019.
- [63] H. J. Forman, H. Zhang, and A. Rinna. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 2009.
- [64] D. Formanowicz, K. Gutowska, and P. Formanowicz. Theoretical studies on the engagement of interleukin 18 in the immuno-inflammatory processes underlying atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11):3476, 2018.
- [65] D. Formanowicz, K. Gutowska, B. Szawulak, and P. Formanowicz. The Crosstalk between SARS-CoV-2 Infection and the RAA System in Essential Hypertension—Analyses Using Systems Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19):10518, 2021.
- [66] D. Formanowicz, A. Kozak, T. Głowacki, M. Radom, and P. Formanowicz. Hemojuvelin–hepcidin axis modeled and analyzed using Petri nets. *Journal of biomedical Informatics*, 46(6):1030–1043, 2013.
- [67] D. Formanowicz, J. B. Krawczyk, B. Perek, and P. Formanowicz. A control-theoretic model of atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3):785, 2019.
- [68] D. Formanowicz, M. Radom, A. Rybarczyk, and P. Formanowicz. The role of Fenton reaction in Ros-induced toxicity underlying atherosclerosis—modeled and analyzed using a Petri net-based approach. *Biosystems*, 165:71–87, 2018.
- [69] D. Formanowicz, A. Rybarczyk, and P. Formanowicz. Factors influencing essential hypertension and cardiovascular disease modeled and analyzed using stochastic Petri nets. *Fundamenta Informaticae*, 160(1-2):143–165, 2017.

- [70] D. Formanowicz, A. Rybarczyk, M. Radom, and P. Formanowicz. A Role of Inflammation and Immunity in Essential Hypertension—Modeled and Analyzed Using Petri Nets. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9):3348, 2020.
- [71] D. Formanowicz, M. Wanic-Kossowska, E. Pawliczak, M. Radom, and P. Formanowicz. Usefulness of serum interleukin-18 in predicting cardiovascular mortality in patients with chronic kidney disease—systems and clinical approach. *Scientific Reports*, 5(1):1–13, 2015.
- [72] P. Formanowicz. *Teoria złożoności obliczeniowej: wybrane zagadnienia, Tom 16 z Poznan Monographs in Computing and its Applications*. Wydawnictwo Nakom, 2013.
- [73] P. Formanowicz. Kombinatoryczne aspekty analizy t-niezmienników w modelach systemów biologicznych opartych na sieciach petriego. *Automatyzacja Procesów Dyskretnych. Teoria i Zastosowania*, 2:65–76, 2016.
- [74] P. Formanowicz. Złożoność obliczeniowa problemu poszukiwania podzbiorów tranzycji. *Automatyzacja Procesów Dyskretnych. Teoria i Zastosowania*, 2:59–65, 2018.
- [75] P. Formanowicz, M. Nowicki, and D. Formanowicz. Mathematical modeling of aortic aneurysm progression. In *New Approaches to Aortic Diseases from Valve to Abdominal Bifurcation*, pages 85–89. Elsevier, 2018.
- [76] A. Friedman and W. Hao. A mathematical model of atherosclerosis with reverse cholesterol transport and associated risk factors. *Bulletin of mathematical biology*, 77:758–781, 2015.
- [77] J. Frostegård. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Medicine*, 11(1):1–13, 2013.
- [78] H. Fukatsu, N. Koide, S. Tada-Oikawa, K. Izuoka, A. Ikegami, S. Ichihara, T. Ukaaji, N. Morita, Y. Naiki, T. Komatsu, et al. NF- κ B inhibitor DHMEQ inhibits titanium dioxide nanoparticle-induced interleukin-1 β production: Inhibition of the PM2. 5-induced inflammation model. *Molecular Medicine Reports*, 18(6):5279–5285, 2018.
- [79] S. L. Gaffen, R. Jain, A. V. Garg, and D. J. Cua. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews Immunology*, 14(9):585–600, 2014.
- [80] A. Gambin, A. Charzyńska, A. Ellert-Miklaszewska, and M. Rybiński. Computational models of the JAK1/2-STAT1 signaling. *JAK-STAT*, 2(3):e24672, 2013.
- [81] T. Ganz. Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews*, 93(4):1721–1741, 2013.
- [82] L. Gao, K. L. Siu, K. Chalupsky, A. Nguyen, P. Chen, N. L. Weintraub, Z. Galis, and H. Cai. Role of uncoupled endothelial nitric oxide synthase in abdominal aortic aneurysm formation: treatment with folic acid. *Hypertension*, 59(1):158–166, 2012.
- [83] M. R. Garey and D. S. Johnson. *Computers and intractability. A Guide to the Theory of NP-Completeness*. W.H. Freeman and Company New York, 1979.
- [84] G. Genard, S. Lucas, and C. Michiels. Reprogramming of tumor-associated macrophages with anti-cancer therapies: radiotherapy versus chemo- and immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, 8:828, 2017.
- [85] T. Gerhardt and K. Ley. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovascular Research*, 107(3):321–330, 2015.
- [86] D. Gilbert and M. Heiner. From Petri nets to differential equations—an integrative approach for biochemical network analysis. In *International Conference on Application and Theory of Petri Nets*, pages 181–200. Springer, 2006.
- [87] F. Glover and M. Laguna. *Tabu Search: Modern Heuristic Techniques for Combinatorial Problems.*, 1992.

- [88] A. Gogolińska and W. Nowak. Bipartite Graphs—Petri Nets in Biology Modeling. In *Graph-Based Modelling in Science, Technology and Art*, pages 175–200. Springer, 2022.
- [89] J. Golledge and P. E. Norman. Atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm: cause, response, or common risk factors? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(6):1075–1077, 2010.
- [90] M. Gong, X. Zhuo, and A. Ma. STAT6 upregulation promotes M2 macrophage polarization to suppress atherosclerosis. *Medical Science Monitor Basic Research*, 23:240, 2017.
- [91] P. J. Goss and J. Peccoud. Quantitative modeling of stochastic systems in molecular biology by using stochastic Petri nets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12):6750–6755, 1998.
- [92] E. Grafahrend-Belau, F. Schreiber, M. Heiner, A. Sackmann, B. H. Junker, S. Grunwald, A. Speer, K. Winder, and I. Koch. Modularization of biochemical networks based on classification of Petri net t-invariants. *BMC Bioinformatics*, 9(1):1–17, 2008.
- [93] D. Grassi, G. Desideri, L. Ferri, A. Aggio, S. Tiberti, and C. Ferri. Oxidative stress and endothelial dysfunction: say NO to cigarette smoking! *Current Pharmaceutical Design*, 16(23):2539–2550, 2010.
- [94] D.-E. Gratie, B. Iancu, and I. Petre. ODE analysis of biological systems. In *International School on Formal Methods for the Design of Computer, Communication and Software Systems*, pages 29–62. Springer, 2013.
- [95] R. Grimaldi. *Discrete and Combinatorial Mathematics: An Applied Introduction*. Addison-Wesley, 1998.
- [96] S. Gupta, S. Kumawat, and G. P. Singh. Validation and Analysis of Metabolic Pathways Using Petri Nets. In *Soft Computing: Theories and Applications*, pages 361–374. Springer, 2022.
- [97] D. Gurwitz. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. *Drug Development Research*, 81(5):537–540, 2020.
- [98] K. Gutowska, D. Formanowicz, and P. Formanowicz. Selected aspects of tobacco-induced prothrombotic state, inflammation and oxidative stress: Modeled and analyzed using petri nets. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 11(3):373–386, 2019.
- [99] K. Gutowska, D. Formanowicz, and P. Formanowicz. Systems Approach Based on Petri Nets as a Method for Modeling and Analysis of Complex Biological Systems Presented on the Example of Atherosclerosis Development Process. In *Advanced, Contemporary Control*, pages 579–586. Springer, 2020.
- [100] K. Gutowska, D. Formanowicz, and P. Formanowicz. Interrelations between Iron and Vitamin A—Studied Using Systems Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3):1189, 2022.
- [101] K. Gutowska and P. Formanowicz. Algorytm przeszukiwania tabu dla problemu znajdowania podzbiorów kluczowych tranzycji w modelach biologicznych opartych na sieciach Petriego. *Automatyzacja Procesów Dyskretnych. Teoria i Zastosowania*, 2:67–74, 2018.
- [102] K. Gutowska and P. Formanowicz. On anti-occurrence of subsets of transitions in Petri net-based models of complex biological systems. *Biosystems*, 222:104793, 2022.
- [103] K. Gutowska and P. Formanowicz. How to find relevant reactions and subprocesses in models of biological systems based on Petri nets. *Wystane do publikacji*, 2023.
- [104] K. Gutowska, D. Kogut, M. Kardynska, P. Formanowicz, J. Smieja, and K. Puszyński. Petri nets and ODEs as complementary methods for comprehensive analysis on an example of the ATM–p53–NF- κ B signaling pathways. *Scientific Reports*, 12(1):1–13, 2022.
- [105] Ł. Gutowski, K. Gutowska, M. Pioruńska-Stolzmann, P. Formanowicz, and D. Formanowicz. Systems approach to study associations between OxLDL and abdominal aortic aneurysms. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16):3909, 2019.

- [106] B. Guzik. *Rola anionu ponadtlenkowego w etiopatogenezie tętniaków aorty brzusznej*. PhD thesis, Institute of Cardiology, Jagiellonian University Collegium Medicum Krakow, 2006.
- [107] H. M. Hammarén, A. T. Virtanen, J. Raivola, and O. Silvennoinen. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. *Cytokine*, 118:48–63, 2019.
- [108] I. Hamming, M. Cooper, B. Haagmans, N. Hooper, R. Korstanje, A. Osterhaus, W. Timens, A. Turner, G. Navis, and H. van Goor. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *The Journal of Pathology*, 212(1):1–11, 2007.
- [109] P. E. Hansen. Leslie matrix models. *Mathematical Population Studies*, 2(1):37–67, 1989.
- [110] W. Hao and A. Friedman. The LDL-HDL profile determines the risk of atherosclerosis: a mathematical model. *PloS one*, 9(3):e90497, 2014.
- [111] S. Hardy and P. N. Robillard. Modeling and simulation of molecular biology systems using petri nets: modeling goals of various approaches. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2(04):619–637, 2004.
- [112] A. Hassane and D. René. Continuous and hybrid Petri nets. *Journal of Circuits, Systems, and Computers*, 8(01):159–188, 1998.
- [113] M. Hayden, A. West, and S. Ghosh. NF- κ B and the immune response. *Oncogene*, 25(51):6758–6780, 2006.
- [114] M. S. Hayden and S. Ghosh. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 132(3):344–362, 2008.
- [115] M. Heiner. Understanding network behavior by structured representations of transition invariants. In *Algorithmic Bioprocesses*, pages 367–389. Springer, 2009.
- [116] M. Heiner, D. Gilbert, and R. Donaldson. Petri nets for systems and synthetic biology. In *International school on formal methods for the design of computer, communication and software systems*, pages 215–264. Springer, 2008.
- [117] M. Heiner, M. Herajy, F. Liu, C. Rohr, and M. Schwarick. Snoopy—a unifying Petri net tool. In *International Conference on Application and Theory of Petri Nets and Concurrency*, pages 398–407. Springer, 2012.
- [118] M. Heiner, M. Schwarick, and J.-T. Wegener. Charlie—an extensible Petri net analysis tool. In *International Conference on Applications and Theory of Petri Nets and Concurrency*, pages 200–211. Springer, 2015.
- [119] M. Heiner and K. Sriram. Structural analysis to determine the core of hypoxia response network. *PloS One*, 5(1):e8600, 2010.
- [120] M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, B. Galy, and C. Camaschella. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142(1):24–38, 2010.
- [121] A. Higaki, A. U. Mahmoud, P. Paradis, and E. L. Schiffrin. Role of interleukin-23/interleukin-17 axis in T-cell-mediated actions in hypertension. *Cardiovascular Research*, 117(5):1274–1283, 2021.
- [122] S. Hobbs, M. Claridge, C. Quick, N. Day, A. Bradbury, and A. Wilmkink. LDL cholesterol is associated with small abdominal aortic aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 26(6):618–622, 2003.
- [123] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N.-H. Wu, A. Nitsche, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 181(2):271–280, 2020.
- [124] T. Honjo, K. Otsui, R. Shiraki, S. Kawashima, T. Sawamura, M. Yokoyama, and N. Inoue. Essential role of NOXA1 in generation of reactive oxygen species induced by oxidized low-density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Endothelium*, 15(3):137–141, 2008.

- [125] F. C. Hoppensteadt and C. S. Peskin. *Modeling and simulation in medicine and the life sciences*, volume 10. Springer Science & Business Media, 2012.
- [126] M. Irmeler, M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.-L. Bodmer, M. Schröter, K. Burns, C. Mattmann, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388(6638):190–195, 1997.
- [127] Y. Ishiyama, P. E. Gallagher, D. B. Averill, E. A. Tallant, K. B. Brosnihan, and C. M. Ferrario. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension*, 43(5):970–976, 2004.
- [128] A. Israël. The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3):a000158, 2010.
- [129] E. Jacque and S. C. Ley. RNF11, a new piece in the A20 puzzle. *The EMBO Journal*, 28(5):455–456, 2009.
- [130] N. Jain, C. Sudhakar, and G. Swarup. Tumor necrosis factor- α -induced caspase-1 gene expression: role of p73. *The FEBS Journal*, 274(17):4396–4407, 2007.
- [131] J. A. Jarcho, J. R. Ingelfinger, M. B. Hamel, R. B. D’Agostino, and D. P. Harrington. Inhibitors of the renin–angiotensin–aldosterone system and Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(25):2462–2464, 2020.
- [132] T. Jens. Sodium balance is not just a renal affair. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(2):101–105, 2014.
- [133] X. Jiang and X. Wang. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40):31199–31203, 2000.
- [134] K. Jonak, M. Kurpas, K. Szoltysek, P. Janus, A. Abramowicz, and K. Puszynski. A novel mathematical model of ATM/p53/NF- κ B pathways points to the importance of the DDR switch-off mechanisms. *BMC Syst Biol*, 10(1):75, 2016.
- [135] A. Kadl, A. K. Meher, P. R. Sharma, M. Y. Lee, A. C. Doran, S. R. Johnstone, M. R. Elliott, F. Gruber, J. Han, W. Chen, et al. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation research*, 107(6):737–746, 2010.
- [136] C. Kantari and H. Walczak. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4):558–563, 2011.
- [137] M. Kardynska and J. Smieja. Sensitivity analysis of signaling pathways in the frequency domain. In *Information Technologies in Medicine: 5th International Conference, ITIB 2016 Kamień Śląski, 2016 Proceedings, Volume 2*, pages 275–285. Springer, 2016.
- [138] L. Kaufman and P. J. Rousseeuw. *Finding groups in data: an introduction to cluster analysis*. John Wiley & Sons, 2009.
- [139] B. E. Kendall, M. Fujiwara, J. Diaz-Lopez, S. Schneider, J. Voigt, and S. Wiesner. Persistent problems in the construction of matrix population models. *Ecological modelling*, 406:33–43, 2019.
- [140] H. W. Kim, A. L. Blomkalns, M. Ogbi, M. Thomas, D. Gavrila, B. S. Neltner, L. A. Cassis, R. W. Thompson, R. M. Weiss, P. D. Lindower, et al. Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 313(6):H1168–H1179, 2017.
- [141] Y. Kim, S. Nurakhayev, A. Nurkesh, Z. Zharkinbekov, and A. Saparov. Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5):2715, 2021.

- [142] Y. R. Kim and K. H. Han. Familial hypercholesterolemia and the atherosclerotic disease. *Korean Circulation Journal*, 43(6):363–367, 2013.
- [143] S. Kimura, M. Nishinaga, T. Ozawa, and K. Shimada. Thrombin generation as an acute effect of cigarette smoking. *American Heart Journal*, 128(1):7–11, 1994.
- [144] M. Kitami and M. K. Ali. Tobacco, metabolic and inflammatory pathways, and CVD risk. *Global Heart*, 7(2):121–128, 2012.
- [145] S. Knapp, A. F. de Vos, S. Florquin, D. T. Golenbock, and T. van der Poll. Lipopolysaccharide binding protein is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. *Infection and Immunity*, 71(12):6747–6753, 2003.
- [146] I. Koch. Petri nets in systems biology. *Software & Systems Modeling*, 14(2):703–710, 2015.
- [147] I. Koch, J. Nöthen, and E. Schleiff. Modeling the metabolism of *Arabidopsis thaliana*: application of network decomposition and network reduction in the context of Petri nets. *Frontiers in genetics*, 8:85, 2017.
- [148] I. Koch, W. Reisig, and F. Schreiber. *Modeling in systems biology: the Petri net approach*, volume 16. Springer Science & Business Media, 2010.
- [149] K. K. Koessler, S. Maurer, and R. Loughlin. The relation of anemia, primary and secondary, to vitamin A deficiency. *Journal of the American Medical Association*, 87(7):476–482, 1926.
- [150] D. Kogut, K. Gutowska, A. Poterala-Hejmo, J. Smieja, D. Formanowicz, and P. Formanowicz. Petri nets and ODE as complementary tools in analysis of signaling pathways. *Proceedings of 11th International Conference on Bioinformatics and Computational Biology*, 60:150–160, 2019.
- [151] Y. Kojima, I. L. Weissman, and N. J. Leeper. The role of efferocytosis in atherosclerosis. *Circulation*, 135(5):476–489, 2017.
- [152] Y. Kubota, A. R. Folsom, C. M. Ballantyne, and W. Tang. Lipoprotein (a) and abdominal aortic aneurysm risk: The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis*, 268:63–67, 2018.
- [153] H. Kuivaniemi, E. J. Ryer, J. R. Elmore, and G. Tromp. Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 13(9):975–987, 2015.
- [154] J. Lemke, S. von Karstedt, J. Zinngrebe, and H. Walczak. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death & Differentiation*, 21(9):1350–1364, 2014.
- [155] P. H. Leslie. On the use of matrices in certain population mathematics. *Biometrika*, 33(3):183–212, 1945.
- [156] J. Li, T. R. Billiar, R. V. Talanian, and Y. M. Kim. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(2):419–424, 1997.
- [157] J. Li, H.-C. Hsu, and J. D. Mountz. The Dynamic Duo—Inflammatory M1 macrophages and Th17 cells in Rheumatic Diseases. *Journal of Orthopedics & Rheumatology*, 1(1):4, 2013.
- [158] J. Li, X. Wang, J. Chen, H. Zhang, and A. Deng. Association of renin-angiotensin system inhibitors with severity or risk of death in patients with hypertension hospitalized for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) infection in Wuhan, China. *JAMA Cardiology*, 5(7):825–830, 2020.
- [159] W. Li, S. Luo, J. Luo, Y. Liu, B. Ning, W. Huang, L. Xue, and J. Chen. Predictors associated with increased prevalence of abdominal aortic aneurysm in Chinese patients with atherosclerotic risk factors. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 54(1):43–49, 2017.
- [160] P. Lin, H.-H. Ji, Y.-J. Li, and S.-D. Guo. Macrophage plasticity and atherosclerosis therapy. *Frontiers in molecular biosciences*, 8:679797, 2021.

- [161] G.-Y. Liou and P. Storz. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 2010.
- [162] T. Lipniacki, K. Puszynski, P. Paszek, A. R. Brasier, and M. Kimmel. Single TNF α Trimers Mediating NF- κ B Activation: Stochastic Robustness of NF- κ B Signaling. *BMC Bioinformatics*, 9(8):376, 2007.
- [163] J. Liu, H. Lu, D. A. Howatt, A. Balakrishnan, J. J. Moorleghen, M. Sorci-Thomas, L. A. Cassis, and A. Daugherty. Associations of ApoAI and ApoB-containing lipoproteins with AngII-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(8):1826–1834, 2015.
- [164] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, and S.-C. Sun. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1):1–9, 2017.
- [165] Y. Liu. Mathematical modeling and simulation of atherosclerotic formation and progress at arterial bifurcations. *Biomedical Signal Processing and Control*, 80:104266, 2023.
- [166] R. Loeffen, H. Spronk, and H. Ten Cate. The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(7):1207–1216, 2012.
- [167] C. A. Lopez Gelston and B. M. Mitchell. Recent Advances in Immunity and Hypertension. *American Journal of Hypertension*, 30(7):643–652, 2017.
- [168] C. Loreto, G. La Rocca, R. Anzalone, R. Caltabiano, G. Vespasiani, S. Castorina, D. J. Ralph, S. Cellek, G. Musumeci, S. Giunta, et al. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie’s disease. *BioMed Research International*, 2014, 2014.
- [169] S. C. Lu. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 2013.
- [170] X. Ma, W. Yan, H. Zheng, Q. Du, L. Zhang, Y. Ban, N. Li, and F. Wei. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research*, 4, 2015.
- [171] N. R. Madamanchi and M. S. Runge. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 61:473–501, 2013.
- [172] M. S. Madhur, H. E. Lob, L. A. McCann, Y. Iwakura, Y. Blinder, T. J. Guzik, and D. G. Harrison. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*, 55(2):500–507, 2010.
- [173] A. Majoros, E. Platanitis, E. Kernbauer-Hözl, F. Rosebrock, M. Müller, and T. Decker. Canonical and non-canonical aspects of JAK–STAT signaling: lessons from interferons for cytokine responses. *Frontiers in Immunology*, 8:29, 2017.
- [174] N. Makita, Y. Hizukuri, K. Yamashiro, M. Murakawa, and Y. Hayashi. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *International Immunology*, 27(3):131–141, 2015.
- [175] Z. Mallat, A. Corbaz, A. Scoazec, S. Besnard, G. Lesèche, Y. Chvatchko, and A. Tedgui. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation*, 104(14):1598–1603, 2001.
- [176] S. M. Man and T.-D. Kanneganti. Regulation of inflammasome activation. *Immunological Reviews*, 265(1):6–21, 2015.
- [177] G. Mancina, F. Rea, M. Ludergnani, G. Apolone, and G. Corrao. Renin–angiotensin–aldosterone system blockers and the risk of Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(25):2431–2440, 2020.
- [178] S. Manoharan, G. J. Guillemin, R. S. Abiramasundari, M. M. Essa, M. Akbar, and M. D. Akbar. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of alzheimer’s disease, parkinson’s disease, and huntington’s disease: a mini review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

- [179] A. Mantovani and P. Allavena. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 212(4):435–445, 2015.
- [180] A. Marin-Sanguino, S. K. Gupta, E. O. Voit, and J. Vera. Biochemical pathway modeling tools for drug target detection in cancer and other complex diseases. *Methods in Enzymology*, 487:319–369, 2011.
- [181] A. M. Markin, I. A. Sobenin, A. V. Grechko, D. Zhang, and A. N. Orkhov. Cellular mechanisms of human atherogenesis: focus on chronification of inflammation and mitochondrial mutations. *Advances in Medical Biochemistry, Genomics, Physiology, and Pathology*, pages 405–424, 2021.
- [182] H. Matsuno, A. Doi, M. Nagasaki, and S. Miyano. Hybrid Petri net representation of gene regulatory network. In *Biocomputing 2000*, pages 341–352. World Scientific, 1999.
- [183] K. Matsushita, B. Marchandot, L. Jesel, P. Ohlmann, and O. Morel. Impact of COVID-19 on the cardiovascular system: A review. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 2020.
- [184] M. L. McCormick, D. Gavrilu, and N. L. Weintraub. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(3):461–469, 2007.
- [185] M. McDonnell, D. Wang, S. Khan, M. Vander Heiden, and A. Kelekar. Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNF α -induced apoptosis in murine cells. *Cell Death & Differentiation*, 10(9):1005–1015, 2003.
- [186] D. R. McIlwain, T. Berger, and T. W. Mak. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4):a008656, 2013.
- [187] H. J. Medbury, H. Williams, and J. P. Fletcher. Clinical significance of macrophage phenotypes in cardiovascular disease. *Clinical and translational medicine*, 3:1–10, 2014.
- [188] M. R. Mehra, S. S. Desai, S. Kuy, T. D. Henry, and A. N. Patel. Cardiovascular disease, drug therapy, and mortality in Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(25):e102, 2020.
- [189] M. Mehu, C. A. Narasimhulu, and D. K. Singla. Inflammatory Cells in Atherosclerosis. *Antioxidants*, 11(2):233, 2022.
- [190] P. Melotti, E. Nicolis, A. Tamanini, R. Rolfini, A. Pavirani, and G. Cabrini. Activation of NF- κ B mediates ICAM-1 induction in respiratory cells exposed to an adenovirus-derived vector. *Gene Therapy*, 8(18):1436–1442, 2001.
- [191] J. F. R. Mendes, E. M. d. A. Siqueira, J. G. M. de Brito e Silva, and S. F. Arruda. Vitamin A deficiency modulates iron metabolism independent of hemojuvelin (Hfe2) and bone morphogenetic protein 6 (Bmp6) transcript levels. *Genes & Nutrition*, 11(1):1–7, 2016.
- [192] B. Messner and D. Bernhard. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(3):509–515, 2014.
- [193] G. Miller, K. Bauer, J. Cooper, and R. Rosenberg. Activation of the coagulant pathway in cigarette smokers. *Thrombosis and Haemostasis*, 79(03):549–553, 1998.
- [194] K. J. Moore, F. J. Sheedy, and E. A. Fisher. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*, 13(10):709–721, 2013.
- [195] K. J. Moore and I. Tabas. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3):341–355, 2011.
- [196] W. Morris and D. Doak. Quantitative Conservation Biology: Theory and Practice of Population Viability Analysis. Sinauer and Associates. Inc. Publishers, Sunderland, MA, 2002.

- [197] G. Muller and H. Morawietz. Nitric oxide, NAD (P) H oxidase, and atherosclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7):1711–1731, 2009.
- [198] T. Murata. Petri nets: Properties, analysis and applications. *Proceedings of the IEEE*, 77(4):541–580, 1989.
- [199] F. R. Nascimento, E. A. Gomes, M. Russo, and A. P. Lepique. Interferon regulatory factor (IRF)-1 is a master regulator of the cross talk between macrophages and L929 fibrosarcoma cells for nitric oxide dependent tumoricidal activity. *PLoS One*, 10(2):e0117782, 2015.
- [200] K. M. Naseem. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(1-2):33–65, 2005.
- [201] F. Navarro and J. Lieberman. mir-34 and p53: new insights into a complex functional relationship. *PloS One*, 10(7), 2015.
- [202] C. J. Norbury and B. Zhivotovsky. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23(16):2797–2808, 2004.
- [203] J. Nordlohne and S. von Vietinghoff. Interleukin 17A in atherosclerosis—Regulation and pathophysiologic effector function. *Cytokine*, 122:154089, 2019.
- [204] M. Noursadeghi, J. Tsang, T. Haustein, R. F. Miller, B. M. Chain, and D. R. Katz. Quantitative imaging assay for NF- κ B nuclear translocation in primary human macrophages. *Journal of Immunological Methods*, 329(1-2):194–200, 2008.
- [205] M. A. O’Donnell, D. Legarda-Addison, P. Skountzos, W. C. Yeh, and A. T. Ting. Ubiquitination of RIP1 regulates an NF- κ B-independent cell-death switch in TNF signaling. *Current Biology*, 17(5):418–424, 2007.
- [206] A. Pagani, A. Nai, L. Silvestri, and C. Camaschella. Hepcidin and anemia: a tight relationship. *Frontiers in Physiology*, page 1294, 2019.
- [207] S. Palta, R. Saroa, and A. Palta. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(5):515, 2014.
- [208] R. Parit and S. Jayavel. Association of ACE inhibitors and angiotensin type II blockers with ACE2 overexpression in COVID-19 comorbidities: A pathway-based analytical study. *European Journal of Pharmacology*, 896:173899, 2021.
- [209] B. S. Park and J.-O. Lee. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12):e66–e66, 2013.
- [210] A. B. Parrish, C. D. Freel, and S. Kornbluth. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6):a008672, 2013.
- [211] S. Parthasarathy, A. Raghavamenon, M. O. Garelnabi, and N. Santanam. Oxidized low-density lipoprotein. *Free Radicals and Antioxidant Protocols*, pages 403–417, 2010.
- [212] T. Pasiński. Patogeneza miażdżycy i występowania zdarzeń wieńcowych. *Postępy Nauk Medycznych*, 1:6–8, 2002.
- [213] R. Pastelin-Palacios, C. Gil-Cruz, C. I. Pérez-Shibayama, M. A. Moreno-Eutimio, L. Cervantes-Barragán, L. Arriaga-Pizano, B. Ludewig, A. F. Cunningham, E. A. García-Zepeda, I. Becker, et al. Subversion of innate and adaptive immune activation induced by structurally modified lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. *Immunology*, 133(4):469–481, 2011.
- [214] L. Pawlik, E. Śpiótek, J. Fichna, and A. Tarasiuk. Charakterystyka wirusa SARS-CoV-2 i potencjalne farmakologiczne sposoby leczenia. *Postępy Biochemii*, 66(2):83–90, 2020.
- [215] N. D. Perkins. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(1):49–62, 2007.

- [216] C. A. Petri. Kommunikation mit automaten. *Institut für Instrumentelle Mathematik, Bonn, Germany*, 1962.
- [217] A. L. Phelan, R. Katz, and L. O. Gostin. The Novel Coronavirus Originating in Wuhan, China: Challenges for Global Health Governance. *JAMA*, 323(8):709–710, 2020.
- [218] J. W. Pinney, D. R. Westhead, and G. A. McConkey. Petri Net representations in systems biology. *Biochemical Society Transactions*, 31(6):1513–1515, 2003.
- [219] Y. L. Pobezinskaya, Y.-S. Kim, S. Choksi, M. J. Morgan, T. Li, C. Liu, and Z. Liu. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 9(9):1047–1054, 2008.
- [220] A. Podkowińska and D. Formanowicz. Chronic kidney disease as oxidative stress-and inflammatory-mediated cardiovascular disease. *Antioxidants*, 9(8):752, 2020.
- [221] K. M. Pollard, P. Hultman, C. B. Toomey, D. M. Cauvi, H. M. Hoffman, J. C. Hamel, and D. H. Kono. Definition of IFN- γ -related pathways critical for chemically-induced systemic autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 39(4):323–331, 2012.
- [222] Y. Pommier, O. Sordet, S. Antony, R. L. Hayward, and K. W. Kohn. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, 23(16):2934–2949, 2004.
- [223] K. Prasad and M. Mishra. Mechanism of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 23(6):212, 2022.
- [224] P. A. Prins, M. F. Hill, D. Airey, S. Nwosu, P. R. Perati, H. Tavori, M. F. Linton, V. Kon, S. Fazio, and U. K. Sampson. Angiotensin-induced abdominal aortic aneurysms in hypercholesterolemic mice: role of serum cholesterol and temporal effects of exposure. *PLoS One*, 9(1):e84517, 2014.
- [225] K. Puszynski, R. Bertolusso, and T. Lipniacki. Crosstalk between p53 and nuclear factor- κ B systems: pro-and anti-apoptotic functions of NF- κ B. *IET systems biology*, 3(5):356–367, 2009.
- [226] K. Puszynski, B. Hat, and T. Lipniacki. Oscillations and Bistability in the Stochastic Model of p53 Regulation. *J Theor Biol*, 254(2):452 – 465, 2008.
- [227] K. Puszyński, P. Lachor, M. Kardynańska, and J. Śmieja. Sensitivity analysis of deterministic signaling pathways models. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Technical Sciences*, 60(3):471–479, 2012.
- [228] M. Radom. HOLMES – Zintegrowane Środowisko dla Sieci Petriego (Wersja: 2.00). <https://www.cs.put.poznan.pl/mradom/Holmes/Holmes.pdf>, 2015. [Online; accessed 11 Jul 2023].
- [229] M. Radom, M. A. Machnicka, J. Krwawicz, J. M. Bujnicki, and P. Formanowicz. Petri net-based model of the human DNA base excision repair pathway. *Plos one*, 14(9):e0217913, 2019.
- [230] M. Radom, A. Rybarczyk, B. Szawulak, H. Andrzejewski, P. Chabelski, A. Kozak, and P. Formanowicz. Holmes: A graphical tool for development, simulation and analysis of Petri net based models of complex biological systems. *Bioinformatics*, 33(23):3822–3823, 2017.
- [231] C. V. Ramana, M. P. Gil, R. D. Schreiber, and G. R. Stark. Stat1-dependent and-independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends in Immunology*, 23(2):96–101, 2002.
- [232] M. Ramella, F. Boccafoschi, K. Bellofatto, A. Follenzi, L. Fusaro, R. Boldorini, F. Casella, C. Porta, P. Settembrini, and M. Cannas. Endothelial MMP-9 drives the inflammatory response in abdominal aortic aneurysm (AAA). *American Journal of Translational Research*, 9(12):5485, 2017.
- [233] X. Rao, J. Zhong, and Q. Sun. The heterogenic properties of monocytes/macrophages and neutrophils in inflammatory response in diabetes. *Life Sciences*, 116(2):59–66, 2014.
- [234] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E. I. Closs, and M. Munder. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5:532, 2014.

- [235] P. D. Ray, B.-W. Huang, and Y. Tsuji. Reactive oxygen species (ros) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 2012.
- [236] R. Ray and A. M. Shah. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science*, 109(3):217–226, 2005.
- [237] V. N. Reddy, M. L. Mavrovouniotis, and M. N. Liebman. Petri net representations in metabolic pathways. In *ISMB*, volume 93, pages 328–336, 1993.
- [238] W. Reisig. *Understanding Petri nets: modeling techniques, analysis methods, case studies*. Springer, 2013.
- [239] D. René and A. Hassane. *Discrete, continuous, and hybrid Petri nets*, volume 1. Springer, 2010.
- [240] S. Revu, J. Wu, M. Henkel, N. Rittenhouse, A. Menk, G. M. Delgoffe, A. C. Poholek, and M. J. McGeachy. IL-23 and IL-1 β drive human Th17 cell differentiation and metabolic reprogramming in absence of CD28 costimulation. *Cell Reports*, 22(10):2642–2653, 2018.
- [241] H. R. Reynolds, S. Adhikari, C. Pulgarin, A. B. Troxel, E. Iturrate, S. B. Johnson, A. Hausvater, J. D. Newman, J. S. Berger, S. Bangalore, et al. Renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors and risk of covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(25):2441–2448, 2020.
- [242] G. Rishi and V. N. Subramaniam. The liver in regulation of iron homeostasis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313(3):G157–G165, 2017.
- [243] N. J. Roberts, Y. Jiao, J. Yu, L. Kopelovich, G. M. Petersen, M. L. Bondy, S. Gallinger, A. G. Schwartz, S. Syngal, M. L. Cote, et al. ATM Mutations in Patients With Hereditary Pancreatic Cancer. *Cancer Discoveries*, 2(1):41–46, 2012.
- [244] B. Rodriguez-Iturbe, H. Pons, and R. J. Johnson. Role of the Immune System in Hypertension. *Physiological Reviews*, 97(3):1127–1164, 2017.
- [245] A. C. Roodenburg, C. E. West, R. Hovenierl, and A. C. Beynen. Supplemental vitamin A enhances the recovery from iron deficiency in rats with chronic vitamin A deficiency. *British Journal of Nutrition*, 75(4):623–636, 1996.
- [246] K. A. Ross, C. R. Wright, E. Sepko-Guzicka, W. Guzicki, and P. Zakrzewski. *Matematyka dyskretna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2012.
- [247] M. Rosselli, R. Keller, and R. K. Dubey. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*, 4(1):3–24, 1998.
- [248] P. J. Rousseeuw. Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20:53–65, 1987.
- [249] M. Y. Sabbah. The novel coronavirus disease (COVID-19) outbreak: The israeli experience. *Journal of Medical Science*, 89(1):e413–e413, 2020.
- [250] A. A. Sablina, A. V. Budanov, G. V. Ilyinskaya, L. S. Agapova, J. E. Kravchenko, and P. M. Chumakov. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine*, 11(12), 2005.
- [251] A. Sackmann, D. Formanowicz, P. Formanowicz, I. Koch, and J. Blazewicz. An analysis of the Petri net based model of the human body iron homeostasis process. *Computational Biology and Chemistry*, 31(1):1–10, 2007.
- [252] A. Sackmann, M. Heiner, and I. Koch. Application of Petri net based analysis techniques to signal transduction pathways. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 2006.
- [253] R. Salguero-Gómez, O. R. Jones, C. R. Archer, C. Bein, H. de Buhr, C. Farack, F. Gottschalk, A. Hartmann, A. Henning, G. Hoppe, et al. COMADRE: a global data base of animal demography. *Journal of Animal Ecology*, 85(2):371–384, 2016.

- [254] R. Salguero-Gómez, O. R. Jones, C. R. Archer, Y. M. Buckley, J. Che-Castaldo, H. Caswell, D. Hodgson, A. Scheuerlein, D. A. Conde, E. Brinks, et al. The compadre Plant Matrix Database: an open online repository for plant demography. *Journal of Ecology*, 103(1):202–218, 2015.
- [255] A. Saltelli, M. Ratto, T. Andres, F. Campolongo, J. Cariboni, D. Gatelli, M. Saisana, and S. Tarantola. Global sensitivity analysis: the primer. *John Wiley & Sons*, 2008.
- [256] A. Sambola, J. Osende, J. Hathcock, M. Degen, Y. Nemerson, V. Fuster, J. Crandall, and J. J. Badimon. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation*, 107(7):973–977, 2003.
- [257] V. Sangkhae and E. Nemeth. Regulation of the iron homeostatic hormone hepcidin. *Advances in Nutrition*, 8(1):126–136, 2017.
- [258] M. Schieber and N. S. Chandel. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), 2014.
- [259] W. Schneider-Brachert, U. Heigl, and M. Ehrenschwender. Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7):14475–14503, 2013.
- [260] J. R. Schoenborn and C. B. Wilson. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*, 96:41–101, 2007.
- [261] A. Schramm, P. Matusik, G. Osmenda, and T. J. Guzik. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular Pharmacology*, 56(5-6):216–231, 2012.
- [262] S. E. Schroeder, M. B. Reddy, and K. L. Schalinske. Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory proteins. *The Journal of Nutrition*, 137(12):2686–2690, 2007.
- [263] E. Schulz, T. Gori, and T. Münzel. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension Research*, 34(6):665–673, 2011.
- [264] J. Schwartz, A. Shajahan, and R. Clarke. The role of interferon regulatory factor-1 (IRF1) in overcoming antiestrogen resistance in the treatment of breast cancer. *International Journal of Breast Cancer*, 2011, 2011.
- [265] A. Sekiyama, H. Ueda, S.-i. Kashiwamura, R. Sekiyama, M. Takeda, K. Rokutan, and H. Okamura. A stress-induced, superoxide-mediated caspase-1 activation pathway causes plasma IL-18 upregulation. *Immunity*, 22(6):669–677, 2005.
- [266] A. M. Shah and P. A. MacCarthy. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacology & Therapeutics*, 86(1):49–86, 2000.
- [267] A. K. Shukla and M. Banerjee. Angiotensin-converting-enzyme 2 and renin-angiotensin system inhibitors in COVID-19: an update. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 28(2):129–139, 2021.
- [268] A. Simões e Silva, K. Silveira, A. Ferreira, and M. Teixeira. ACE2, angiotensin-(1-7) and M as receptor axis in inflammation and fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, 169(3):477–492, 2013.
- [269] R. B. Singh, S. A. Mengi, Y.-J. Xu, A. S. Arneja, and N. S. Dhalla. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Experimental & Clinical Cardiology*, 7(1):40, 2002.
- [270] K. L. Siu, Q. Li, Y. Zhang, J. Guo, J. Y. Youn, J. Du, and H. Cai. NOX isoforms in the development of abdominal aortic aneurysm. *Redox Biology*, 11:118–125, 2017.
- [271] J. Smieja, M. Kardyńska, and M. Pudło. Sensitivity Analysis Aimed at Finding Potential Molecular Drug Targets. *Mathematica Applicanda*, 47(2), 2019.
- [272] R. R. Sokal and C. D. Michener. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas, Sci. Bull.*, 38:1409–1438, 1958.

- [273] M. J. Soler, M. Ye, J. Wysocki, J. William, J. Lloveras, and D. Batlle. Localization of ACE2 in the renal vasculature: amplification by angiotensin II type 1 receptor blockade using telmisartan. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296(2):F398–F405, 2009.
- [274] S. Soliman and M. Heiner. A unique transformation from ordinary differential equations to reaction networks. *PLoS One*, 5(12):e14284, 2010.
- [275] G. Sollberger, G. E. Strittmatter, M. Garstkiewicz, J. Sand, and H.-D. Beer. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immunity*, 20(2):115–125, 2014.
- [276] P. Song, W. Li, J. Xie, Y. Hou, and C. You. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clinica Chimica Acta*, 509:280–287, 2020.
- [277] M. A. Sparks, A. M. South, A. D. Badley, C. M. Baker-Smith, D. Batlle, B. Bozkurt, R. Cattaneo, S. D. Crowley, L. J. Dell’Italia, A. L. Ford, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, COVID-19, and the renin-angiotensin system: pressing needs and best research practices. *Hypertension*, 76(5):1350–1367, 2020.
- [278] A. H. Sprague and R. A. Khalil. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 78(6):539–552, 2009.
- [279] K. Sriram and P. A. Insel. Risks of ACE Inhibitor and ARB Usage in COVID-19: Evaluating the Evidence. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 108(2):236–241, 2020.
- [280] G. R. Stark and J. E. Darnell Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 36(4):503–514, 2012.
- [281] Y. N. J. Strube, J. L. Beard, and A. C. Ross. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *The Journal of Nutrition*, 132(12):3607–3615, 2002.
- [282] J. Sullivan. Iron and the sex difference in heart disease risk. *The Lancet*, 317(8233):1293–1294, 1981.
- [283] B. Sun, B. B. Boyanovsky, M. A. Connelly, P. Shridas, D. R. van der Westhuyzen, and N. R. Webb. Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *Journal of Lipid Research*, 48(12):2560–2570, 2007.
- [284] H.-J. Sun, Z.-Y. Wu, X.-W. Nie, and J.-S. Bian. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. *Frontiers in Pharmacology*, page 1568, 2020.
- [285] C. E. Sutton, S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Brereton, E. C. Lavelle, and K. H. Mills. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, 31(2):331–341, 2009.
- [286] K. Takeda and S. Akira. TLR signaling pathways. In *Seminars in Immunology*, volume 16, pages 3–9. Elsevier, 2004.
- [287] A. R. Tall and L. Yvan-Charvet. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(2):104–116, 2015.
- [288] Y. Tan and J. C. Kagan. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Molecular Cell*, 54(2):212–223, 2014.
- [289] X. Tang, Y. Zhang, X. Liu, X. Li, H. Zhao, H. Cui, Y. Shi, Y. Chen, H. Xu, Z. Meng, et al. Aloe-emodin derivative produces anti-atherosclerosis effect by reinforcing AMBRA1-mediated endothelial autophagy. *European Journal of Pharmacology*, 916:174641, 2022.
- [290] B. J. Toghiani, A. Saratzis, and M. J. Bown. Abdominal aortic aneurysm—an independent disease to atherosclerosis? *Cardiovascular Pathology*, 27:71–75, 2017.

- [291] E. Toufektchan and F. Toledo. The guardian of the genome revisited: p53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers*, 10(5):135, 2018.
- [292] R. M. Touyz, F. J. Rios, R. Alves-Lopes, K. B. Neves, L. L. Camargo, and A. C. Montezano. Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5):659–670, 2020.
- [293] K. Trares, J. Ackermann, and I. Koch. The canonical and non-canonical NF- κ B pathways and their crosstalk: A comparative study based on Petri nets. *Biosystems*, 211:104564, 2022.
- [294] A. F. Trollope and J. Golledge. Angiotensins, abdominal aortic aneurysm and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 214(2):237–243, 2011.
- [295] M. Twardawa, K. Gutowska, and P. Formanowicz. Exploring relationship between hypercholesterolemia and instability of atherosclerotic plaque – an approach based on a matrix population model. *Wystane do publikacji*, 2023.
- [296] Z. Ul-Haq, S. Naz, and M. A. Mesaik. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 32:3–15, 2016.
- [297] E. Valkov, A. Stamp, F. DiMaio, D. Baker, B. Verstak, P. Roversi, S. Kellie, M. J. Sweet, A. Mansell, N. J. Gay, et al. Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36):14879–14884, 2011.
- [298] S. Vallabhapurapu and M. Karin. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, 27:693–733, 2009.
- [299] T. Van der Heijden, I. Bot, and J. Kuiper. The IL-12 cytokine family in cardiovascular diseases. *Cytokine*, 122:154188, 2019.
- [300] L. Van Heerebeek, C. Meischl, W. Stoker, C. Meijer, H. Niessen, and D. Roos. NADPH oxidase (s): new source (s) of reactive oxygen species in the vascular system? *Journal of Clinical Pathology*, 55(8):561–568, 2002.
- [301] P. Verdecchia, C. Cavallini, A. Spanevello, and F. Angeli. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Internal Medicine*, 76:14–20, 2020.
- [302] P. Viatour, M.-P. Merville, V. Bours, and A. Chariot. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(1):43–52, 2005.
- [303] V. M. Victor, M. Rocha, E. Sola, C. Banuls, K. Garcia-Malpartida, and A. Hernandez-Mijares. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26):2988–3002, 2009.
- [304] N. Wang, H. Liang, and K. Zen. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*, 5:614, 2014.
- [305] S. Wang and W. S. El-Deiry. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22(53):8628–8633, 2003.
- [306] S. K. Wang, L. A. Green, A. R. Gutwein, N. A. Drucker, R. L. Motaganahalli, A. K. Gupta, A. Fajardo, and M. P. Murphy. Description of human AAA by cytokine and immune cell aberrations compared to risk-factor matched controls. *Surgery*, 164(2):354–358, 2018.
- [307] S.-W. Wang and Y.-M. Sun. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 44(4):1032–1040, 2014.
- [308] W. Wang, X. Zhao, W. Wei, W. Fan, K. Gao, S. He, and X. Zhuang. Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) or angiotensin receptor blockers (ARBs) may be safe for COVID-19 patients. *BMC Infect Dis*, 21(114), 2021.

- [309] Y. Wang, J. Che, H. Zhao, J. Tang, and G. Shi. Osthole alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced vascular endothelial injury through suppression of transforming growth factor- β 1/Smad pathway. *International Immunopharmacology*, 65:373–381, 2018.
- [310] K.-K. Wong, R. S. Maser, R. M. Bachoo, J. Menon, D. R. Carrasco, Y. Gu, F. W. Alt, and R. A. DePinho. Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*, 421(6923):643 – 648, 2003.
- [311] C. Wu, P. Sakorafas, R. Miller, D. McCarthy, S. Scesney, R. Dixon, and T. Ghayur. IL-18 receptor β -induced changes in the presentation of IL-18 binding sites affect ligand binding and signal transduction. *The Journal of Immunology*, 170(11):5571–5577, 2003.
- [312] F. Wunderer, L. Traeger, H. H. Sigurslid, P. Meybohm, D. B. Bloch, and R. Malhotra. The role of hepcidin and iron homeostasis in atherosclerosis. *Pharmacological Research*, 153:104664, 2020.
- [313] J. Wysocki, E. Lores, M. Ye, M. J. Soler, and D. Batlle. Kidney and lung ACE2 expression after an ACE inhibitor or an Ang II receptor blocker: implications for COVID-19. *Journal of the American Society of Nephrology*, 31(9):1941–1943, 2020.
- [314] W. Xiong, J. Mactaggart, R. Knispel, J. Worth, Z. Zhu, Y. Li, Y. Sun, B. T. Baxter, and J. Johanning. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis*, 202(1):128–134, 2009.
- [315] H. Yang, M. Shi, A. Richardson, J. Vijg, and Z. Guo. Attenuation of leukocyte-endothelium interaction by antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3):266–276, 2003.
- [316] S. Yang, H.-Q. Yuan, Y.-M. Hao, Z. Ren, S.-L. Qu, L.-S. Liu, D.-H. Wei, Z.-H. Tang, J.-F. Zhang, and Z.-S. Jiang. Macrophage polarization in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 501:142–146, 2020.
- [317] Y. Yao, Y. Wang, Y. Zhang, and C. Liu. Klotho ameliorates oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced oxidative stress via regulating LOX-1 and PI3K/Akt/eNOS pathways. *Lipids in Health and Disease*, 16(1):1–10, 2017.
- [318] Y.-H. Zhang, M. He, Y. Wang, and A.-H. Liao. Modulators of the balance between M1 and M2 macrophages during pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 8:120, 2017.
- [319] N. Zhao, A.-S. Zhang, and C. A. Enns. Iron regulation by hepcidin. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(6):2337–2343, 2013.
- [320] Y. Zhao, P. M. Vanhoutte, and S. W. Leung. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2):83–94, 2015.
- [321] J. Zheng. SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10):1678–1685, 2020.
- [322] F. Zhou, T. Yu, R. Du, G. Fan, Y. Liu, Z. Liu, J. Xiang, Y. Wang, B. Song, X. Gu, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229):1054–1062, 2020.
- [323] Z. D. Zhou and E.-K. Tan. Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1):1–12, 2017.
- [324] M. Ziche, L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H. Granger, C. Maggi, P. Geppetti, and F. Ledda. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(5):2036–2044, 1994.
- [325] A. Zoufaly, M. Poglitsch, J. H. Aberle, W. Hoepler, T. Seitz, M. Traugott, A. Grieb, E. Pawelka, H. Laferl, C. Wenisch, et al. Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(11):1154–1158, 2020.



© 2023 [Kaja Gutowska](#)

Instytut Informatyki, Wydział Informatyki i Telekomunikacji

Politechnika Poznańska

Skład przy użyciu systemu $\text{L}^{\text{A}}\text{T}_{\text{E}}\text{X}$ na platformie Overleaf.