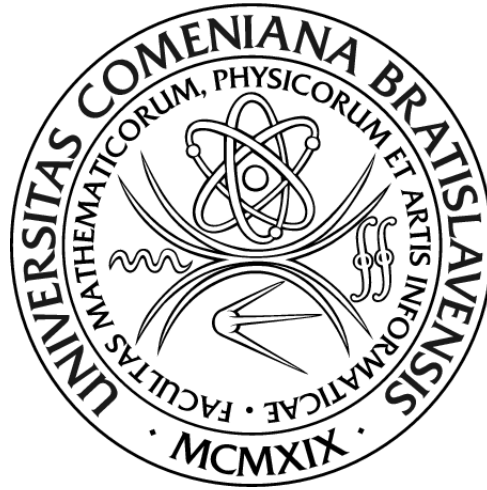


UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
FAKULTA MATEMATIKY, FYZIKY A INFORMATIKY



MODELOVANIE POHYBU MAKROFÁGU (NEUTROFILU)
PRI HOJENÍ INFEKCIÍ

Bratislava 2012

Bc. Peter Dižo

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
FAKULTA MATEMATIKY, FYZIKY A INFORMATIKY

MODELOVANIE POHYBU MAKROFÁGU (NEUTROFILU)
PRI HOJENÍ INFEKCIÍ

Diplomová práca

Štúdijný program: Ekonomická a finančná matematika
Štúdijný odbor: Aplikovaná matematika 1114
Školiace pracovisko: Katedra aplikovanej matematiky
Školiteľ: Mgr Richard Kollár, PhD.

Bratislava 2012

Bc. Peter Dižo



Univerzita Komenského v Bratislave
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Bc. Peter Dižo
Študijný program: ekonomická a finančná matematika (Jednoodborové štúdium, magisterský II. st., denná forma)
Študijný odbor: 9.1.9. aplikovaná matematika
Typ záverečnej práce: diplomová
Jazyk záverečnej práce: slovenský

Názov: Modelovanie pohybu makrofágu (neutrofilu) pri hojení infekcií

Cieľ: Cieľom práce je numericky simulovať chemotaktický pohyb makrofágu (neutrofilu) bielych krviniek v heterogénnom prostredí generovanom pohybom bakterií. V práci sa bude študovať efektívnosť práce makrofágu vzhľadom na jeho stratégiu pohybu. Súčasťou práce je odvodenie príslušného modelu pomocou parciálnych diferenciálnych rovníc.

Vedúci: Mgr. Richard Kollár, PhD.
Katedra: FMFI.KAMŠ - Katedra aplikovanej matematiky a štatistiky
Dátum zadania: 13.01.2011

Dátum schválenia: 14.01.2011

prof. RNDr. Daniel Ševčovič, CSc.
garant študijného programu

.....
študent

.....
vedúci práce

Čestné vyhlásenie

Čestne vyhlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracoval samostatne s použitím citovaných zdrojov a za odborného vedenia môjho vedúceho diplomovej práce.

.....

Bc. Peter Dižo

Podakovanie

Týmto by som sa chcel podakovať vedúcemu mojej diplomovej práce Mgr. Richardovi Kollárovi, PhD. za jeho trpezlivosť, cenné rady a pripomienky, ktoré mi počas odborného vedenia poskytol.

Abstrakt

DIŽO , Peter, Bc.: Modelovanie pohybu makrofágu (neutrofilu) pri hojení infekcií [Diplomová práca]. Univerzita Komenského v Bratislave. Fakulta matematiky, fyziky a informatiky; Katedra aplikovanej matematiky. Vedúci diplomovej práce: Mgr Richard Kollár, PhD. Bratislava: FMFI UK, 2012. 43 s.

Táto práca sa zaoberá modelovaním chemotaktického pohybu makrofágov. V prvej časti popisujeme základné charakteristiky chemotaktického pohybu, stavbu eukaryotickej bunky, jej pohybový aparát a signálne väzby, vďaka ktorým dokáže aktívne reagovať na okolie. Ďalej sú predstavené základné druhy modelov používaných na riešenie tejto problematiky. Nakoniec popíšeme a implementujeme jeden z modelov, ukážeme prečo nie je efektívny a navrhujeme jeho možné zlepšenia.

Kľúčové slová: Matematický model biológie, Makrofág, Neutrofil, CPM, Chemotaxia

Abstract

DIŽO , Peter, Bc.: Modelling of the neutrophil movement during infection healing. Comenius University in Bratislava. Faculty of Mathematics, Physics and Informatics; Department of Applied Mathematics. Bachelor thesis supervisor: Mgr Richard Kolár, PhD. Bratislava: FMFI UK, 2012. 43 p.

This thesis deals with modeling of the chemotactic movement of neutrophils. In the first part of our work, we describe the basic characteristics of this movement, most significant parts of eukaryotic cell, its movement mechanisms and signaling pathways responsible for the ability to actively interact with the surroundings. Later, we describe four basic approaches standardly used to model these types of problems. In the end, we implement one of the models, show its inefficiency and present some possible improvements.

Keywords: Mathematical model of biology, Neutrophil, CPM, Chemotaxis, Gradient sensing

Obsah

1	Úvod	1
2	Základné mikrobiologické poznatky	3
2.1	Baktérie	3
2.1.1	Velkosť a tvar	3
2.1.2	Pohyb	4
2.2	Makrofág (neutrofil)	4
2.2.1	Velkosť a tvar	5
2.2.2	Pohyb	5
2.2.3	Eliminácia baktérií	6
2.3	Prostredie	7
3	Biochémia eukaryotických buniek	8
3.1	Základné časti bunky	8
3.1.1	Jadro a jadierko	8
3.1.2	Golgiho aparát	9
3.1.3	Mitochondrie	9
3.1.4	Ribozómy	9
3.1.5	Cytoplazma a cytoskelet	10
3.2	Bunkové motory	11
3.2.1	Cytoskeletové motory	12
3.2.2	Polymerizačné motory	12
3.3	Signálne väzby	12
4	Prehľad používaných modelov	14
4.1	FEM Finite element method	15
4.2	LSM Level set method	16
4.3	IBM Immersed boundary method	17
4.4	CPM Cellular Potts model	18
5	Pôvodný model	19
5.1	Návrh modelu	19

5.1.1	Kinetika	20
5.1.2	Difúzia	20
5.1.3	Zachovanie tvaru	20
5.1.4	Rozširovanie bunkovej domény	21
5.1.5	Monitorovanie	21
5.2	Implementácia	21
5.2.1	Dátové štruktúry	21
5.2.2	Algoritmus	22
5.2.3	Použité konštanty	22
5.2.4	Výsledky simulácie	23
6	Modifikovaný model	26
6.1	Návrh modelu	26
6.1.1	Kinetika	26
6.1.2	Zachovávanie objemu	27
6.1.3	Rozširovanie bunkovej domény	27
6.2	Výsledky simulácie	28
7	Záver	30
	Literatúra	32

Zoznam obrázkov

1.1	Makrofág a baktéria	1
2.1	Baktérie	3
2.2	Makrofág	4
3.1	Jadro	9
3.2	Mitochondrie	10
3.3	Cytoskelet	10
4.1	Fagocytóza a cytokinéza	14
4.2	Finite element method	15
4.3	Level set method	16
4.4	Immersed boundary method	17
4.5	Cellular Potts model	18
5.1	Roztrhnutie	23
5.2	1D Graf	24
5.3	Nevhodná polarizácia	24
5.4	Šum v koncentráciách	25
6.1	Nový Inhibítor	28
6.2	Polarizácia	28

Kapitola 1

Úvod

Základom pre modelovanie akéhokoľvek procesu, je nájdenie všetkých signifikantných objektov vystupujúcich v modeli, pochopenie ich reálneho fungovania a vzájomných interakcií[11]. Ako základ pre túto prácu poslúžilo reálne video zobrazujúce makrofág prenasledujúci baktériu v prirodzenom prostredí, natočené v 50–tych rokoch Davidom Rogersom na Vanderbilt University, pričom išlo o krv jedného z jeho študentov.



Obr. 1.1: Snímka z videa, zachytávajúceho chemotaktický pohyb makrofágu pri prenasledovaní baktérie stafylokoka (modrá) v prostredí s červenými krvinkami (červená)[12]

Modrou farbou je v tomto prípade označená prenasledovaná baktéria, červenou červená krvinka a makrofág je najväčší útvar v strede obrázku.

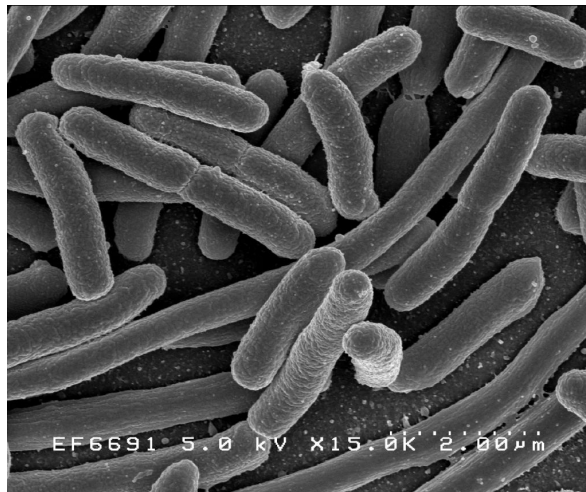
Cielom práce bolo pochopiť základné princípy chemotaktického pohybu, mikrobiologické procesy, ktoré ho zabezpečujú, a na ich základe navrhnúť vhodný model, ktorý by v čo najvyššej možnej miere odzrkadľoval reálne pozorovateľné javy. Pri modelovaní budeme vychádzať zo základných mikrobiologických poznatkov, na základe ktorých na-

vrhneme a následne implementujeme matematický model, ktorý by mal v čo najvyššej
možnej miere zodpovedať našim požiadavkam.

Kapitola 2

Základné mikrobiologické poznatky

2.1 Baktérie



Obr. 2.1: Kolónia baktérii *Escherichia coli*[18]

Pojem baktéria zahŕňa obrovskú čelaď prokaryotických (neobsahujú bunkové jadro) mikroorganizmov. Bežne sa vyskytujú všade okolo nás a sú najrozšírenejšou formou organizmov na Zemi. Len v samotnom ľudskom tele a na povrchu pokožky sa ich nachádza rádovo 10–násobne viac ako je buniek v celom tele. Väčšina týchto baktérií je však neškodná, niektoré dokonca organizmu prospešné. Existujú však druhy spôsobujúce rôzne druhy ochorení, ako napríklad cholera, tuberkulóza, alebo syfilis, ktoré každoročne zabíjajú na svete státisíce ľudí.

2.1.1 Veľkosť a tvar

Veľkosť baktérií je rôzna, pohybuje sa rádovo v rozmedzí od 0,5 do 5 mikrometrov, v závislosti od druhu. Tvary baktérií sú taktiež veľmi rôznorodé. Najjednoduchšie majú

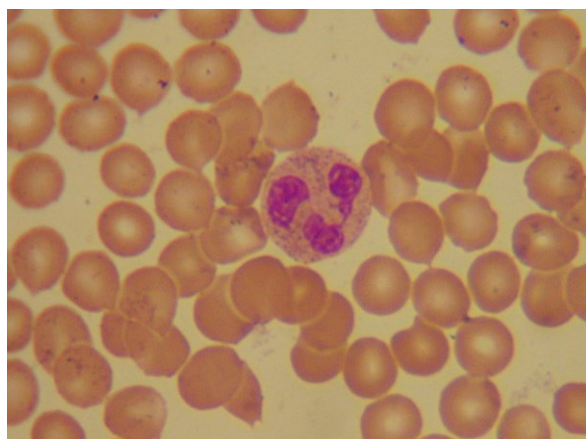
gulovitý alebo podlhovastý tvar, zložitejšie môžu byť napríklad špirálovité. Veľa druhov vytvára špecifické štruktúry spájaním dvoch a viac buniek. K takýmto patria napríklad diplokoky (dve spojené bunky), streptokoky (jednoduché reťazce buniek) alebo stafylokoky (štruktúry pripomínajúce strapce hrozna). Práve posledne spomenuté sú častou príčinou rôznych dýchacích ochorení.

2.1.2 Pohyb

Baktérie poznáme pohyblivé a nepohyblivé. Základný pohybový aparát väčšiny baktérií je bičík (flagellum). Počet a umiestnenie bičikov môže byť rôzne – existujú druhy s jedným, dvoma umiestnenými oproti sebe, alebo viacerými rovnomerne rozmiestnenými po celom obvode.

U baktérií rozlišujeme dva druhy pohybu. Priamy pohyb a rotačný. Tieto dva baktéria strieda, čím sa dokáže pohybovať v prostredí. U pohyblivých druhov baktérií bola pozorovaná schopnosť chemotaxie, t.j. schopnosť pohybovať sa smerom do tých častí prostredia, kde je vyššia koncentrácia chemoatraktantu¹. Toto je dosiahnuté zmenou frekvencie striedania rotačného a priameho pohybu. Baktéria teda dokáže obmedziť rotačný pohyb ak sa pohybuje do miest s vyššou koncentráciou pre ňu zaujímavej látky a naopak zväčšiť frekvenciu zmien smeru ak koncentrácia chemoatraktantu klesá. Takýmto spôsobom má tendenciu zotrvať v miestach, ktoré sú pre ňu výhodnejšie a naopak nezdržovať sa príliš tam, kde je prostredie nevhodné.

2.2 Makrofág (neutrofil)



Obr. 2.2: Makrofág (neutrofil) obklopený červenými krvinkami[22]

¹Chemoatraktant je látka, ktorej zmenu koncentrácie dokáže organizmus vycítiť.

Makrofágy sú najbežnejším druhom bielych krviniek v ľudskom tele. Tvoria približne 70% všetkých bielych krviniek a sú teda jednou z najvýznamnejších súčastí imunitného systému pri boji s bakteriálnymi infekciami.

Ich prirodzeným prostredím je krvné riečište, ktorým sa v prípade infekcie dokážu veľmi rýchlo dostať k zasiahnutému miestu. Sú spravidla jedny z prvých organizmov, ktoré sa na miesto infekcie dostanú a teda pri hojení hrajú kľúčovú úlohu. V ľudskom tele sa ich nachádza približne 2,5 – 7,5 miliárd na liter krvi. Priemerná dĺžka života jedného makrofágu v krvnom obehú je približne 12 hodín. V prípade infekcie sa dostáva do tkaniva kde môže prežiť až 2 dni.

2.2.1 Veľkosť a tvar

Na rozdiel od baktérií, makrofágy patria k eukaryotickým organizmom, čiže obsahujú jadro. Sú meňavkovitého tvaru, ich tvar je premenlivý, a teda sú veľmi flexibilné. Tento fakt im umožňuje dostať sa k miestam infekcie aj cez tkanivo. Veľkosť makrofágu závisí od počtu lalokov, na ktorý je segmentované jeho jadro. V závislosti od tohto počtu môže jeho priemer nadobúdať hodnoty 10 – 12 mikrometrov.

2.2.2 Pohyb

U makrofágov, podobne ako u baktérií, bola pozorovaná schopnosť chemotaxie. Avšak zatiaľ čo baktérie sú schopné reagovať na zmenu koncentrácie chemoatraktívnych látok len veľmi jednoducho kvôli ich eukaryotickej stavbe bunky, chemotaktický pohyb makrofágov je oveľa komplexnejší. Baktérie pri pohybe používajú len časový údaj, teda vnímajú časovú zmenu gradientu na základe ktorej dokážu prispôbiť pohyb. Na druhej strane makrofág má väčší povrch a dokáže teda vyhodnocovať priestorovú informáciu o gradiente na celom svojom povrchu použitím citlivých receptorov. Jeho pohyb sa dá rozdeliť na tri úzko súvisiace základné časti, ktorými sú vytváranie panôžok, polarizácia a vnímanie smeru[2].

Tvorba panôžok

Vytváranie malých výbežkov po obvode bunky je základnou črtou meňavkovitého pohybu. Aj v prípade, keď je v okolí makrofágu rovnomerná hladina chemoatraktantu a teda nie je nijak polarizovaný, tieto panôžky sa tvoria periodicky po celom jeho obvode, čo zabezpečuje jeho pohyblivosť. Najskôr sa sformujú aktínové filamenty, po ktorých sa vysunie panôžka. Táto fáza trvá približne minútu a následuje buď jej stiahnutie späť, alebo prichytenie o substrát, po ktorom sa makrofág pohybuje. Potom sa celá

bunka posunie v danom smere, čo vytvára pohyb. Následne sa vytvorí ďalšia panôžka v náhodnej časti makrofágu a proces sa opakuje.

Polarizácia

V prípadoch, keď je rozdiel koncentrácií chemoatraktantu medzi dvoma protilahlými časťami bunky rôzny aspoň o 2 – 10%, chemotaktická bunka sa dokáže polarizovať. Tento jav sa vyznačuje vytváraním panôžok hlavne na okajoch bunky s vyššou koncentráciou, kde je taktiež väčší obsah aktínových filamentov a potlačeniu ich vytvárania v časti s nižšou koncentráciou kde je naopak väčší obsah myozínu. Polarizácia umožňuje makrofágom účinnejšie zachovávať smer a tým efektívnejšie prenasledovať zdroj chemoatraktívnych látok. Má však aj svoje nevýhody. Pri silnej polarizácii nie je bunka schopná hneď reagovať na náhlu zmenu pozície zdroja chemoatraktantu. V takomto prípade sú panôžky stále tvorene aj na pôvodnej strane s väčším obsahom aktínových filamentov, čo núti bunku zachovávať si z časti pôvodný smer a polaritu mení pomaly. Z tohto faktu vyplýva, že makrofágy skôr vykonajú pomalú zatáčku, ako by náhle zmenili polaritu.

Vnímanie smeru

V tomto prípade ide hlavne o pozorovanie, že viac panôžok je tvorených v oblastiach s vyššou koncentráciou chemoatraktantu. To znamená, že aj v prípade keď bunka nie je polarizovaná a momentálne sa nehýbe, panôžky majú väčšiu tendenciu tvoriť sa na okrajoch vystavených väčším koncentráciám. Bolo pozorované, že aj v prípadoch keď boli makrofágy zbavené možnosti tvorby aktínových a myozínových filamentov a tým zbavené možnosti pohybu, stále boli schopné tvoriť panôžky práve v smere s vyššími koncentráciami chemoatraktívnej látky.

2.2.3 Eliminácia baktérií

Spôsob, akým makrofágy dokážu zneškodňovať baktérie sa nazýva fagocytóza. V prípade, keď sa nejaká baktéria dostane do jeho blízkosti, makrofág začne okolo nej vytvárať útvary podobné panôžkam, avšak tieto sa nezachytávajú o substrát, ale o pohlcovanú baktériu. Tieto výbežky sa predlžujú až kým nie je baktéria úplne pohltená a následne rozložená vo vnútri makrofágu, čím dochádza k jej eliminácii. Makrofágy takýmto spôsobom odstraňujú taktiež odumreté tkanivo alebo malé čiastočky minerálov.

2.3 Prostredie

Prirodzeným prostredím makrofágov je ľudská krv. Avšak v prípade infekcie sú schopné preniknúť do tkanív, kde následne dochádza k prenasledovaniu a zneškodňovaniu baktérií. Základnou charakteristikou tohto prostredia je difuzivita, teda rýchlosť akou sa v ňom rozširujú rôzne látky. Toto je kľúčovým prvkom práve v prípade chemotaxie. Ovplyvňuje totiž signifikantne schopnosť makrofágu sledovať chemickú stopu zanechanú pôsobením baktérií. V prípade, že by chemoatraktant prílišne difundoval, vzniklo by prostredie s relatívne uniformnou koncentráciou a teda makrofág by nebol schopný polarizácie a následného účinného prenasledovania baktérií spôsobujúcich závažné ochorenia. Taktiež v prípade malej difúzie by makrofág nebol schopný zachytiť chemickú stopu, aktivovať sa a prejsť do tkaniva, keďže chemoatraktívne látky by sa hromadili len v bezprostrednej blízkosti infekcie.

Kapitola 3

Biochémia eukaryotických buniek

3.1 Základné časti bunky

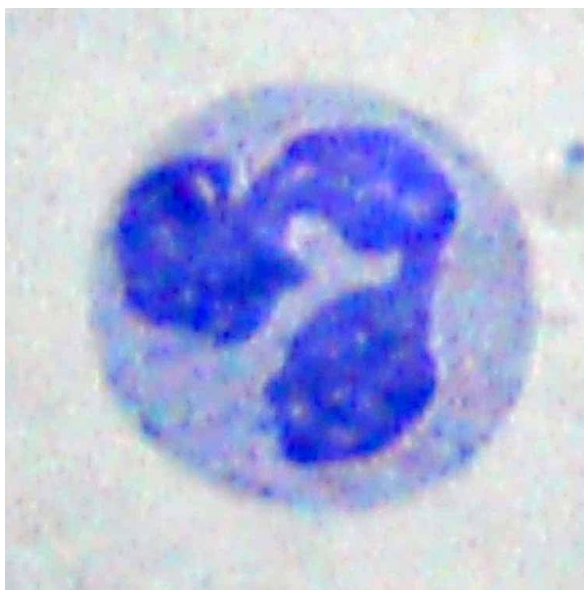
Eukaryotické bunky sú základnou stavebnou funkčnou jednotkou u eukaryotických organizmov. Na rozdiel od jednoduchých prokaryotických buniek, obsahujú komplexné štruktúry(organely) uzavreté pomocou membrán. Charakteristické pre eukaryotické bunky je jadro a jadierko, obsahujúce DNA, uzavreté dvojitou membránou. Hlavné časti bunky makrofágu teda sú:

- Jadro a jadierko
- Golgiho aparát
- Mitochondrie
- Ribozómy
- Cytoplazma

Drsné endoplazmatické retikulum u makrofágov chýba[15].

3.1.1 Jadro a jadierko

Bunkové jadro obsahuje väčšinu genetickej informácie bunky, uloženej vo forme dlhých lineárnych DNA molekúl. Makrofágy (neutrofilny), spolu s eozinofilmi a bazofilmi, patria k tzv. polymorfonukleárnym bunkám, vďaka ich jadru, ktoré je tvorené viacerými lalokmi pospájanými pomocou chromatínu. Zaujímavosťou je, že pri dospievaní makrofágu jadierko mizne, čo je pozorované len u malého počtu druhov buniek. Existuje malý rozdiel medzi jadrom ženského a mužského makrofágu, kde u žien je možné pozorovať malú dodatočnú X-chromozómovú štruktúru, familiárne nazývanú aj "neutrophil drumstick"(bubenícka palička).



Obr. 3.1: Makrofág s jadrom jasne segmentovaným do troch lalokov[17]

3.1.2 Golgiho aparát

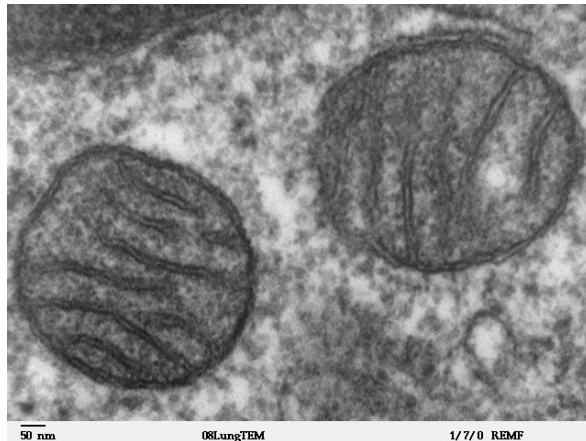
Bol objavený v roku 1898 talianskym fyzikom Camillom Golgim, po ktorom je pomenovaný. Hlavnou funkciou tohto telieska je modifikácia, triedenie a balenie rôznych makromolekúl, produkovaných bunkou. Tieto sú následne buď vylučované, alebo použité vo vnútri bunky. Ide napríklad o modifikáciu proteínov, alebo transport lipidov v rámci bunky. U makrofágov je tento aparát pomerne malý.

3.1.3 Mitochondrie

Niekedy sa im hovorí tiež bunkové elektrárne, keďže poskytujú väčšinu ATP (adenozín trifosfát), používaného bunkami ako zdroj chemickej energie. Okrem toho sa mitochondrie podieľajú na rade ďalších procesov, akými sú prenos signálov, bunkové delenie, bunkový cyklus, smrť, alebo rast. Počet mitochondrií je veľmi rôznorodý a mení sa od bunky k bunke. Môže ich byť od jednej, po niekoľko tisíc. V prípade makrofágu je ich počet malý.

3.1.4 Ribozómy

Sú tvorené veľkou komplexnou molekulou, ktorá je základom pri zostavovaní proteínov. Využitím dvadsiatich špecifických druhov aminokyselín dokážu vytvoriť molekulu proteínu danú nukleotickou sekvenciou v molekule mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina).

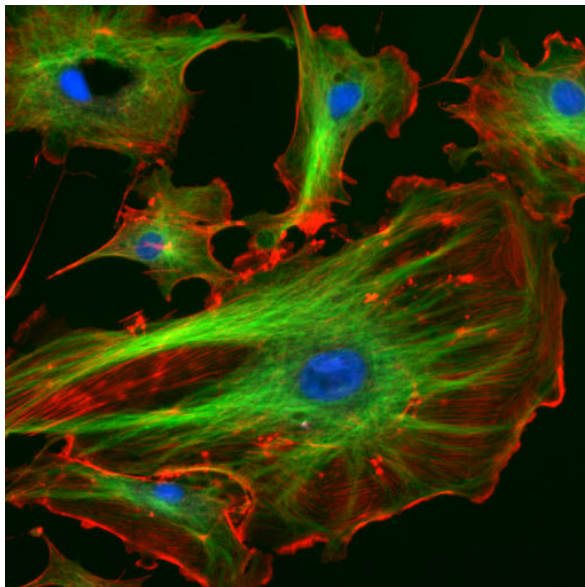


Obr. 3.2: Dve mitochondrie v pľúcnom tkanive cicavca [20]

3.1.5 Cytoplazma a cytoskelet

Cytoplazma je gélovitá hmota, nachádzajúca sa vo vnútri bunky, vyplňajúca priestor medzi bunkovou stenou a organelami, ktorým tiež poskytuje oporu. Jedinou výnimkou je bunkové jadro, ktoré je od nej separované a jeho obsah sa nazýva nukleoplazma. Cytoplazmu tvorí prevažne voda a je zvyčajne priehľadná.

Práve v nej prebieha väčšina bunkových procesov, ako napríklad metabolické procesy, alebo delenie. časť cytoplazmy, ktorá sa nenachádza vo vnútri organel, sa nazýva cytosól. Tento je tvorený zmesou cytoskeletových filamentov, rozpustených molekúl a vody a tvorí väčšinu objemu eukaryotickej bunky.



Obr. 3.3: Eukaryotický cytoskelet. Aktínové filanty sú červené, mikrotubuly zelené a jadrá modré [19]

V cytosóle sa nachádza cytoskeleton, tvorený proteínmi, ktorý slúži ako bunková kostra a poskytuje bunke štruktúru a tvar. Je tvorený tromi základnými druhmi filamentov,

ktoré vo veľkej miere interagujú s bunkovou stenou. Týmito druhmi sú:

- Mikrofilamenty (Aktínové filamenty)
- Intermediárne filamenty
- Mikrotubuly

Mikrofilamenty (Aktínové filamenty)

Patria k najtenším filamentom cytoskeletu. Tvoria ich lineárne polyméry aktínu a sú schopné produkovať silu predlžovaním na jednom konci a skracovaním na druhom. Tvoria taktiež dráhu myozínu, ktorý sa na ne dokáže viazať a pohybovať sa pozdĺž ich vlákien. Aktínové filamenty sú ovládané vďaka špecifickým G–proteínom (guanine nucleotide-binding proteins), ktoré sa podieľajú na prenose chemických signálov z prostredia do vnútra bunky.

Intermediárne filamenty

Tieto filamenty majú priemer približne 10nm a sú viazané silnejšie ako aktínové filamenty. Ich hlavnou funkciou je udržiavanie tvaru bunky, keďže dokážu odolávať pnutiu. Tvoria teda štruktúry podobné kotviacim lanám pre organely, čím sa podieľajú na tvorbe vnútornej štruktúry bunky.

Mikrotubuly

Tieto filamenty majú tvar dutých valcov s priemerom približne 23nm. Na rozdiel od intermediárnych filamentov, dobre odolávajú tlaku. Dá sa teda na ne pozeráť ako na bunkové nosníky. U niektorých druhov buniek vytvárajú napríklad bičičky alebo brvy slúžiace na pohyb.

3.2 Bunkové motory

Molekulárne motory sú v podstate biologickými molekulárnymi strojmi, produkujúcimi v živých organizmoch pohyb. Vo všeobecnosti využívajú voľnú energiu a premieňajú ju na pohyb alebo mechanickú prácu. Príkladom môžu byť bunkové motory na báze proteínu, ktoré dokážu využívať energiu vytvorenú hydrolýzou ATP[23]. K základným druhom bunkových motorov patria cytoskeletové motory a polymerizačné motory.

3.2.1 Cytoskeletové motory

Tento druh motorov je schopný pohybovať sa po povrchu vhodného substrátu, pričom energiu čerpá z ATP. Najvýznamnejším predstaviteľom je myozín, vďaka ktorému dochádza ku kontrakcii svalov. Cytoskeletové motory je možné rozdeliť na dva druhy, v závislosti od substrátov po ktorých sa pohybujú.

Aktínové motory

Hlavným predstaviteľom je už spomínaný myozín, ktorého názov pochádza z gréckeho názvu pre sval. Pohybom pozdĺž aktínových filamentov sú schopné generovať dostatočne veľkú silu na kontrakciu svalov. Hrajú taktiež kľúčovú úlohu v prípade bunkového delenia a sú základom eukaryotického bunkového pohybu, ktorý pozorujeme práve v prípade makrofágov, keďže umožňujú pohyb organel a cytoplazmy v konkrétnom smere.

Mikrotubulové motory

Kinezín V tomto prípade ide o skupinu motorových proteínov, používajúcich ako substrát mikrotubuly. Umožňujú napríklad pohyb chromozómov počas mitózy.

Dyneín Dyneíny sú mikrotubulové motory, schopné klzavého pohybu. Sú oveľa väčšie a komplexnejšie ako myozínové motory a umožňujú najmä pohyb bičíkov a bŕv.

3.2.2 Polymerizačné motory

Pod pojmom polymerizačné motory rozumieme schopnosť bunky vytvárať nové aktínové filamenty a mikrotubuly. Polymerizáciou aktínu, pomocou energie z ATP, je makrofág schopný vytvárať panôžky, po ktorých sa neskôr môžu pohybovať myozínové motory, čím dochádza k pohybu celej bunky.

Tvorba mikrotubúl, na druhú stranu, umožňuje pohyb kinezínu, ktorý sa po nich dokáže pohybovať v kladnom smere, a dyneínu, ktorý sa zas pohybuje v smere negatívnom.

3.3 Signálne väzby

Ako bolo spomínané vyššie, reorganizácia aktínového cytoskeletu bunky je základom pohybu makrofágu. Látkami, ktoré riadia tieto procesy, sú najmä ró – GTPázy (menovite *Cdc42*, *Rac* a *Ró*), a membránové lipidy (*PIP₂* a *PIP₃*)[9]. V prípade, keď je bunka stimulovaná prítomnosťou externého signálu, tieto látky sa dokážu špecificky

rozmiestniť v rámci bunky, čím dochádza k polarizácii. V miestach s veľkou koncentráciou *Cdc24* alebo *Rac*, dochádza k polymerizácii aktínových filamentov, čím sa bunka rozširuje a vytvára tým panôžky. Na druhú stranu, pri vyššej koncentrácii *Ró* dochádza k myozínovej kontrakcii, čím sa na druhom konci bunka skracuje. Kombinácia týchto dvoch procesov umožňuje bunke efektívne sa hýbať v smere s vyššími koncentraciami látok, ktoré ju zaujímajú.

Ró – GTPázy sú proteíny, ktoré cyklicky striedajú dva stavy. Aktívny – membránový (Guanozín trifosfát) a neaktívny – cytosólový (Guanozín difosfát), pričom aktiváciu sprostredkujú guanínové výmenné faktory (GEF – guanine exchange factors) a extrakciu z membrány disociačné inhibítory (GDI).

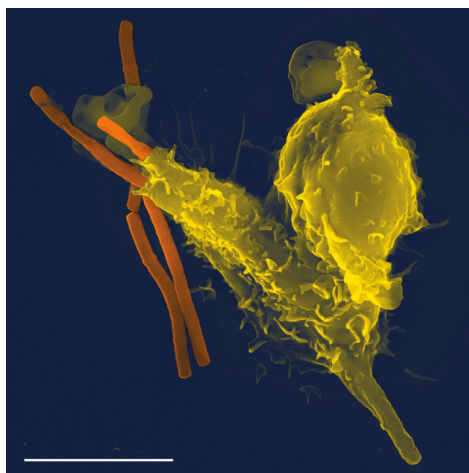
Pri membránových lipidoch dochádza taktiež k zmenám. Napríklad premenu *PIP₂* na *PIP₃* zabezpečuje kináza(enzým) *PI3K*, ktorého vyššie hodnoty sa dajú pozorovať hlavne v častiach bunky stimulovaných externým signálom. Opačnú premenu *PIP₃* na *PIP₂* sprostredkúva fosfatáza *PTEN*, čím sa lipid *PIP₃* tvorí hlavne v rozširujúcich sa častiach bunky, teda v smere pohybu.

V bunke samozrejme dochádza k množstvu ďalších procesov súvisiacich s prenosom signálu, pričom väčšina z nich je vzájomne prepojená a tieto väzby sú stále predmetom skúmania.

Kapitola 4

Prehľad používaných modelov

Charakteristickým problémom pri modelovaní rôznych bunkových procesov sú neustále zmeny tvaru bunky. Či už ide o vyššie spomínanú fagocytózu, kde sa bunková stena zdeformuje tak, aby pohltila nežiadúcu časticu, alebo cytokinézu, pri ktorej dochádza k extrémnej deformácii bunkovej steny, vedúcej až k rozdeleniu na dve nové. Taktiež pri chemotaktickom pohybe makrofág nadobúda podlhovastý tvar s členitými panôžkami, vytvárajúcimi sa hlavne v smere zvyšujúcej sa koncentrácie chemoatraktantu.



(a) Fagocytóza



(b) Cytokinéza

Obr. 4.1: Ilustrácia deformácii bunkovej steny pri fagocytóze a cytokinéze[21, 25]

Všetky tieto procesy, generujúce pohyb, prebiehajú na molekulárnej úrovni a k správ-
nemu pochopeniu ich podstaty potrebujeme poznať mechanické vlastnosti bunky, a
taktiež chemické procesy zabezpečujúce interakciu bunky s prostredím.

Existuje niekoľko základných druhov modelov, snažiacich sa popísať tieto zmeny tvaru, z ktorých každý má svoje výhody a nevýhody:

FEM Finite-element model

LSM Level set method

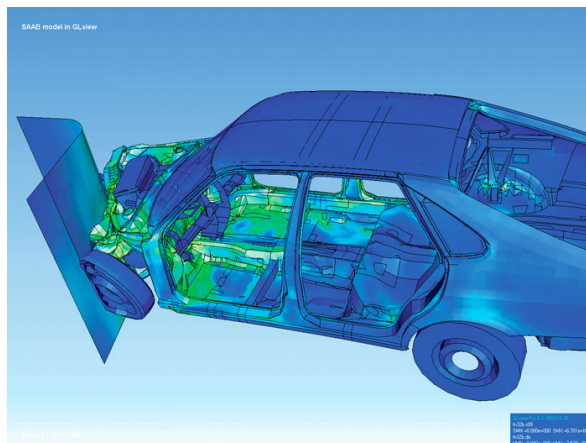
IBM Immerse boundary method

CPM Cellular Potts model

4.1 FEM Finite element method

Metóda konečných prvkov. Patrí k tradičným metódam simulácie zmeny bunkových tvarov[4]. V prípade tohto prístupu je bunka modelovaná explicitne, pomocou parciálnych diferenciálnych rovníc popisujúcich pôsobiace sily. Princípom FEM metódy je následná aproximácia týchto rovníc systémom obyčajných diferenciálnych rovníc, ktoré sa už dajú riešiť štandardnými numerickými metódami (Runge–Kutta, Eulerova metóda).

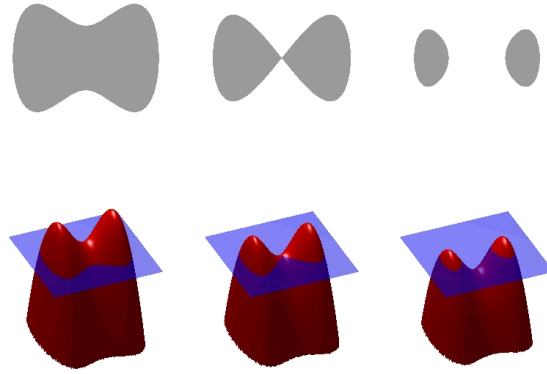
Hlavnou výhodou metódy konečných prvkov oproti iným metódam na riešenie parciálnych diferenciálnych rovníc je fakt, že dokáže efektívne zvládať aj modelovanie komplikovanejších tvarov a hraníc, kdežto napríklad tradičná metóda konečných diferencií v jej základnom tvare je určená len pre obdĺžnikové mriežky a ich jednoduché modifikácie. Pri chemotaktickom pohybe však dochádza k častým, niekedy extrémnym, zmenám tvaru bunky, čo vedie k problému riešenia parciálnych diferenciálnych rovníc na pohyblivej hranici. Takéto výpočty sú ale spravidla veľmi náročné, preto táto metóda nie je najvhodnejšou pre náš problém. Úspešne sa však používa napríklad pri modelovaní deformácii áut pri zrážkach, kde nie sú potrebné stochastické simulácie.



Obr. 4.2: Ilustrácia využitia metódy konečných prvkov pri simulácii autohavárie[24]

4.2 LSM Level set method

Metóda úrovnových množín. Pri modelovaní pohyblivej hranice tradičnými metódami, je táto hranica najskôr diskretizovaná a následne vypočítaná nová poloha jej bodov, určujúcich novú polohu hranice. Takýto prístup ale môže často stroskotať na prípadoch, keď dôjde k prílišnému zakriveniu alebo k zmene topológie (napr. spomínaná cytokinéza). Metóda úrovnových množín však tieto prípady dokáže eliminovať vďaka faktu, že nenarába s tvarom priamo, ale s využitím potenciálovej funkcie[8]. Simulovaný tvar



Obr. 4.3: Ilustrácia fungovania metódy úrovnových množín. Vo vrchnom riadku môžeme pozorovať zmenu topológie s korešpondujúcimi potenciálovými funkciami v spodnom riadku[16]

v čase t je v prípade tejto metódy reprezentovaný uzavretou krivkou $\Gamma(t)$ s príslušnou potenciálovou funkciou $\phi(\mathbf{x}, t)$, pričom platí:

$$\Gamma(t) = \{\mathbf{x} | \phi(\mathbf{x}, t) = 0\}.$$

$\Gamma(t)$ je teda nulovou úrovnovou množinou funkcie $\phi(\mathbf{x}, t)$. Simulovaná hranica je vyjadrená implicitne pomocou jej potencialovej funkcie, ktorú je možné reprezentovať na fixnej mriežke, čím odpadá potreba parametrizácie. Práve tento fakt umožňuje LSM zvládať aj komplexné tvary a zmeny topológie. Hranica sa teda mení implicitne vďaka zmene $\phi(\mathbf{x}, t)$:

$$\frac{\partial \phi(\mathbf{x}, t)}{\partial t} + \mathbf{v}(\mathbf{x}, t) \cdot \nabla \phi(\mathbf{x}, t) = 0,$$

pričom vektor $\mathbf{v}(\mathbf{x}, t)$ vyjadruje normálovú rýchlosť pohybu hranice $\Gamma(t)$. Potenciálová funkcia pri týchto zmenách však môže nadobudnúť príliš strmý, resp. plytký tvar, používa sa preto ešte re-inicializácia

$$\frac{\partial \phi(\mathbf{x}, t)}{\partial t} = S(\phi(\mathbf{x}, 0))(|\nabla \phi(\mathbf{x}, t)| - 1),$$

kde $S(\phi(\mathbf{x}, 0))$ je +1 vo vnútri krivky, -1 okolo a 0 na hranici.

4.3 IBM Immersed boundary method

Metóda vnorenej hranice. Táto metóda, predstavená Peskinom[1] je zameraná na modelovanie interakcie medzi elastickými štruktúrami, ako napríklad bunková stena, a nestlačiteľnými tekutinami vyplňajúcimi okolie. V prípade niektorých tekutín je možné vyjadriť ich tok pomocou Navier-stokesovej rovnice

$$\rho \left(\frac{\partial u(x, t)}{\partial t} + u \cdot \nabla + \right) = \mu \Delta u(x, t) - \nabla p + f(x, t),$$

s podmienkou nestlačiteľnosti

$$\nabla \cdot u = 0,$$

kde ρ a μ vyjadrujú hustotu a viskozitu tekutiny a $u(x)$ a $p(x)$ sú rýchlosť a tlak tekutiny v bode $\mathbf{x}(x, y)$. Riešenie tejto rovnice je zvyčajne zjednodušené využitím fixnej mriežky, čím je možné zrýchliť tento výpočtovo náročný úkon.

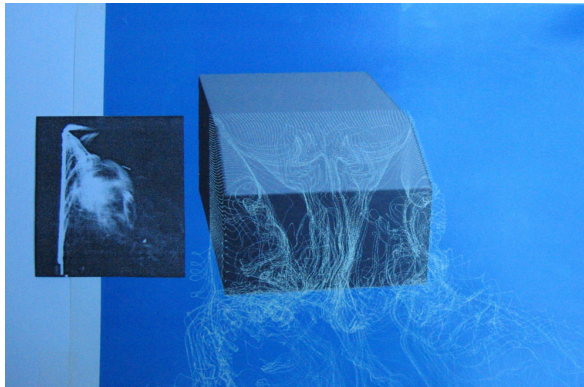
Bunková stena je modelovaná systémom navzájom na seba pôsobiacich častíc Z_j , pričom na j -ty bod pôsobia sily F_j . V prípade rovnice prúdenia tekutín sú tieto sily zahrnuté v člene

$$f(x, t) = \sum_{j=1}^N \delta_a(x - Z_j) F_j,$$

kde δ_a je aproximáciou Diracovej funkcie. Modelovaná hranica je následne aktualizovaná ako

$$\frac{dZ_j}{dt} = \int \delta_a(x - Z_j) u(x, t) dx.$$

V prípade väčších deformácií je potrebné niektoré body hranice spolu s ich väzbami pridávať alebo odoberať, čo však môže byť výpočtovo veľmi náročné, preto je táto metóda vhodnejšia na modelovanie procesov, kde nedochádza k takým zmenám hranice ako pri chemotaktickom pohybe.



Obr. 4.4: Ilustrácia využitia metódy vnorenej hranice pri simulácii obtekania pevného telesa kvapalinou[24]

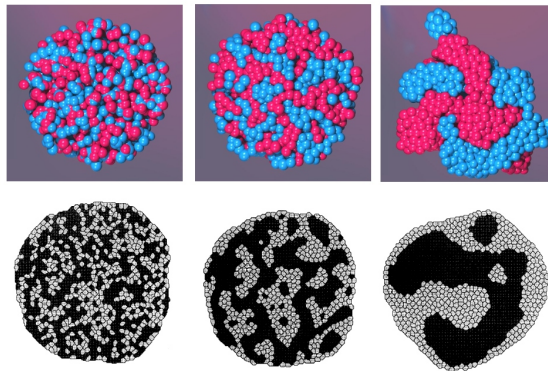
4.4 CPM Cellular Potts model

Bunkový Pottsov model. Vo všeobecnosti, Pottsov model je simuláciou interagujúcich spinov na štvorcovej sieti. Tento model je rozšírením Isingovho modelu[7], s možnosťou uvažovať viac ako 2 stavy. Je teda vhodný aj na modelovanie napríklad fázových zmien (topenie, tuhnutie látok) alebo rôznych dynamických systémov. V prípade CPM, je bunka modelovaná ako spojená množina bodov na štvorcovej sieti, pričom zmeny tvaru sa dosahujú postupným aktualizovaním jednotlivých bodov mriežky na základe zvolených pravidiel. Takýto prístup síce nezachytáva explicitne viskózne-elastické vlastnosti bunky, jej tvar je ale regulovaný použitím minimalizácie funkcie vyjadrujúcej jej energiu, ktorá penalizuje zmeny v objeme a prílišné krivenie membrány. Väčšina Pottsových modelov využíva Metropolis algoritmus, ktorý na popísanie vývoja modelu využíva zmenu energie za daný časový úsek, pričom pre pravdepodobnosť zmeny stavu s energiou E_{old} na stav E_{new} platí:

$$P(\Delta E) = \begin{cases} 1 & \text{pre } \Delta E < 0 \\ e^{-\frac{\Delta E}{kT}} & \text{inak} \end{cases},$$

kde $\Delta E = E_{new} - E_{old}$.

Najväčšou výhodou tohto prístupu je fakt, že aj v prípade veľkých deformácií je algoritmus stále rovnako výpočtovo náročný. Na druhú stranu, mechanika bunky modelovaná týmto spôsobom nezodpovedá do takej miery reálnym pozorovaným fyzikálnym vlastnostiam, ako v prípade iných prístupov.



Obr. 4.5: Ilustrácia triedenia buniek s rôznou prílnavosťou modelovaná pomocou CPM [3]

Kapitola 5

Pôvodný model

Návrh pôvodného modelu pochádza z článku od Nishimuru a Sasaia[14]. Tento model sa dá zaradiť do kategórie CPM - bunkových Pottsových modelov. Ide teda o Eulerov prístup, kde je všetko reprezentované pomocou jednotlivých bodov mriežky. Problematické modelovanie pohybu bunky a vnútorných síl pritom vyriešime využitím fenomenologických pravidiel namiesto používania rovníc. Hlavnou výhodou tohto prístupu je jednoduchosť modelovania, ktoré v kombinácii s efektívnou implementáciou poskytuje možnosť prevádzať rôzne stochastické simulácie a vizualizácie v reálnom čase. V našom prípade budeme využívať štvorcovú sieť, reprezentujúcu doménu, kde sa budú odohrávať všetky modelované procesy. Samotná bunka teda bude reprezentovaná množinou susediacich bodov (bunkové body). Zvyšné body domény budeme nazývať externými bodmi. V prípade, že nejaký bunkový bod susedí s externým, nazývame ho tiež membránovým bodom. Ostatné (vnútorné) bunkové body budú cytoplazmatické body. Každý bunkový bod má 3 charakteristiky, ktorými sú koncentrácia aktivátoru A, inhibítora I a aktívnych filamentov F. Navyše, v každom bode domény je definovaná koncentrácia externého chemoatraktantu S, ktorú vie makrofág prostredníctvom receptorov sledovať. Aktivátor a inhibítora sú regulujúce proteíny. Aj napriek faktu, že vnútrobunkové biochemické reakcie sú stále predmetom skúmania, ukazuje sa, že vyššie spomínané enzýmy *PI3K* a *PTEN* by mohli byť vhodnými kandidátmi na post nášho aktivátoru a inhibítora[9].

5.1 Návrh modelu

Tento model využíva sadu piatich pravidiel, ktoré sa vykonávajú náhodne – každé s vlastnou pravdepodobnosťou a zabezpečujú tak jeho fungovanie.

5.1.1 Kinetika

Produkcia oboch, aktivátoru aj inhibítora, je stimulovaná prítomnosťou externého signálu (chemoatraktívnej látky). Aktivátor urýchľuje polymerizáciu aktínu, kdežto inhibítor ju naopak spomaľuje. Toto pravidlo vyberie náhodný bunkový bod a zmení koncentrácie aktivátoru A_j , inhibítora I_j a filamentov F_j na základe nasledujúcich rovníc:

$$A'_j = A_j + \alpha S_j - k_\alpha A_j \quad (5.1)$$

$$I'_j = I_j + \beta S_j - k_\beta I_j \quad (5.2)$$

$$F'_j = F_j + \begin{cases} \gamma - k_f F_j & \text{pre } \left(\frac{A_j}{I_j} > h\right) \\ -k_f F_j & \text{inak} \end{cases} \quad (5.3)$$

kde α , β , γ , k_α , k_β , k_f , a h sú konštanty. V prípade, že ide o cytoplazmatický bod, S_j uvažujeme nulové.

5.1.2 Difúzia

V našom modeli predpokladáme, že vnútri bunky difunduje jedine inhibítor[9]. Tento fakt by mal zabezpečiť schopnosť bunky polarizovať sa a zachovávať si smer. Pravidlo vyberie náhodný bunkový bod, v ktorom sa koncentrácia inhibítora I_j a koncentrácia susediacich bunkových bodov I_l zmení na základe nasledujúcich rovníc:

$$I'_j = I_j - DI_j \quad (5.4)$$

$$I'_l = I_l + \frac{DI_j}{n}, \quad (5.5)$$

kde D je konštanta difúzie a n je počet susediacich bunkových bodov.

5.1.3 Zachovanie tvaru

Je nevyhnutné navrhnúť pravidlo, ktoré bude predchádzať roztrhnutiu bunky, respektíve nadobudnutiu príliš neprirodzeného tvaru. Bunka si prirodzene zachováva objem a minimalizuje povrch v prípade, že na ňu nepôsobia externé sily. Toto pravidlo vyberie náhodný membránový bod. Následne sa rozhodne buď tento bod odstáť, alebo pridať nový. Uvažujeme povrchové napätie vyjadrené pomocou hodnotiacej funkcie

$$E = (V - V_0)^2 + cL^2,$$

kde V je celkový počet bunkových bodov, L je počet membránových bodov a V_0 a c sú konštanty. V_0 pritom vyjadruje rovnovážny počet bunkových bodov a c je faktor popisujúci ohybnosť membrány. Ak označíme E' hodnotu funkcie po odobraní, respektíve pridaní membránového bodu, môžeme štandardne zdefinovať pravdepodobnosť P ako:

$$P = e^{\left(-\frac{E'-E}{kT}\right)},$$

kde kT je konštanta kontrolujúca fluktuácie membrány. Následne vygenerujeme náhodné číslo medzi 0 a 1 a porovnáme ho s P . V prípade, že je toto číslo menšie ako P , membránový bod nepridáme, respektíve neodoberieme. V prípade, že predsaden odoberieme membránový bod, hodnoty A , I a F odobratého bodu sa pripočítajú k najbližšiemu membránovému bodu. V prípade, že sme bod pridali, tieto tri hodnoty sa presunú z najbližšieho bodu, kde sa následne vynulujú.

Môžeme pozorovať, že hodnota P nezodpovedá celkom pravdepodobnosti, keďže pravdepodobnosť nemôže byť väčšia ako 1. Takýto model nám však v prípade, keď by bola nová energia menšia, zabezpečí zmenu s pravdepodobnosťou 1, keďže hodnota P bude v tomto prípade väčšia ako 1.

5.1.4 Rozširovanie bunkovej domény

V tomto prípade sa náhodne zvolí membránový bod. Ak je hodnota F_j v tomto bode väčšia ako F_{th} , jeden zo susedných externých bodov sa transformuje na bunkový bod, pričom pôvodné množstvo filamentov F_j si tieto dva body rozdelia napoly. Hodnota F_{th} teda určuje minimálne množstvo filamentov potrebných k rozšíreniu o jeden bod.

5.1.5 Monitorovanie

Toto pravidlo nijak nemení systém, koncentrácie ani tvar bunky. Zodpovedá jednému časovému kroku molekulárnej dynamiky a zaznamenávame vtedy stav systému.

5.2 Implementácia

Model bol implementovaný v jazyku Java, použitím integrovaného vývojového prostredia NetBeans 7.0.1.

5.2.1 Dátové štruktúry

Doménu sme použili veľkosti 500 krát 500 bodov, reprezentovanú tromi jednorozmernými poliami. Každé pole malo 250000 prvkov a reprezentovalo množstvo inhibítora,

respektíve aktivátoru a filamentov v jednotlivých bodoch domény.

Pozícia makrofágu bola uchovávaná pomocou spájaného zoznamu (`java.util.ArrayList`), obsahujúceho tie indexy poľa, kde sa aktuálne makrofág nachádzal. Toto nám umožnilo jednoduchšie generovanie náhodného bodu vo vnútri bunky. Podobný zoznam bol vytvorený pre pozíciu membrány.

5.2.2 Algoritmus

Hlavný algoritmus pracoval presne podľa navrhnutého modelu. V každom jeho kroku bolo rovnomerne vygenerované číslo z intervalu $(0, 1)$ a na základe jeho veľkosti sa následne vykonalo jedno z popísaných pravidiel tak, aby boli zachované ich dané pravdepodobnosti. Tieto boli prevzaté z vyššie spomínaného článku.

Kinetika

$$P_1 = 0,040686$$

Difúzia

$$P_2 = 0,8718$$

Zachovanie tvaru

$$P_1 = 0,05812$$

Rozširovanie bunkovej domény

$$P_1 = 0,02906$$

Monitorovanie

$$P_1 = 0,00029$$

Nastavenie týchto základných pravdepodobností implicitne určuje časovú škálu modelovaných procesov, nie je preto nutné explicitne zadávať časový krok, ako tomu je vo väčšine prípadov diskretizácií parciálnych diferenciálnych rovníc.

Makrofág je na začiatku inicializovaný ako kruh s polomerom 17 bodov a koncentrácia chemoatraktantu stúpa lineárne zľava doprava naprieč doménou od hodnoty 1 až po 11.

5.2.3 Použité konštanty

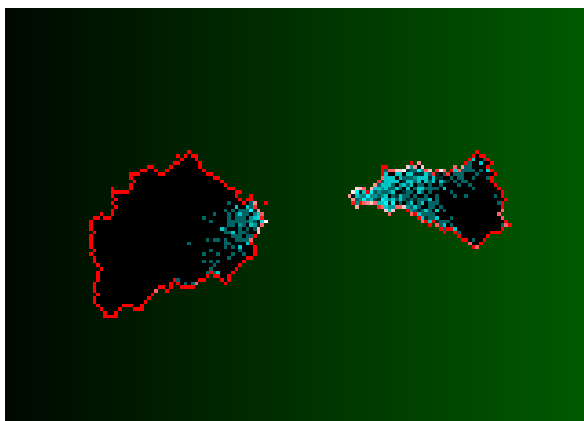
Konštanty zodpovedajú konštantám publikovaným v článku z ktorého vychádzame.

α	0,4
k_α	0,9
β	0,1
k_β	0,02
γ	100,0
k_f	0,99
F_{th}	1,0
h	10,0
D	0,4
V_0	900
c	1,2
kT	20

Tabuľka 5.1: Zoznam použitých konštánt

5.2.4 Výsledky simulácie

Makrofág pri spustení simulácie rýchlo nadobúda veľmi členitý, rýchlo premenlivý tvar, pričom je možné pozorovať náznaky polarizácie. Nanešťastie táto polarizácia očividne nijak nesúvisí s koncentráciou chemoatraktantu, keďže pri každom spustení simulácie má tendenciu polarizovať sa iným smerom. Pri niektorých simuláciách sa dokonca stáva, že sa makrofág roztrhne. Tento nechcený jav nastáva v prípade, keď sa makrofág snaží polarizovať naraz dvoma protilahlými smermi.

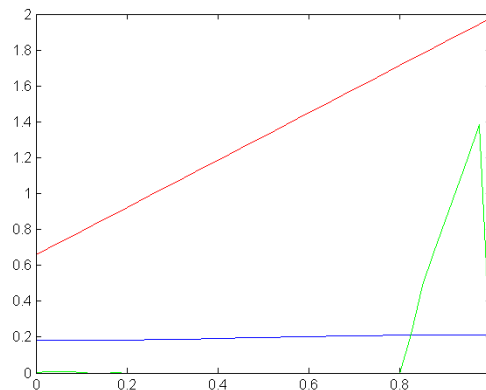


Obr. 5.1: Makrofág roztrhnutý na dve rôzne polarizované časti. Polarizáciu pekne ilustruje inhibítor (svetlá farba) ktorý je nahromadený v zadnej časti (vzhľadom na smer pohybu).

Takto postavený model teda nedokáže vierohodne opísať chemotaktický pohyb makrofágu.

Autori sa v článku často odvolávajú na prácu Levchenka a Iglesiasa[9], kde je odvodený model s podobnými rovnicami ako v našom prípade. Hlavným rozdielom však je, že v našom prípade je makrofág schopný vnímať koncentrácie chemoatraktantu len na

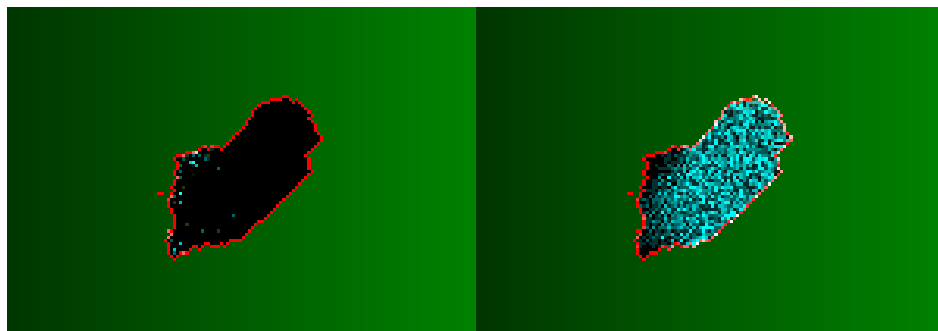
membráne, kdežto v článku je prezentovaný jednorozmerný model v ktorom je signál vnímaný po celej dĺžke.



Obr. 5.2: Ilustrácia fungovania našej kinetiky s vnímaním chemického signálu celým povrchom v 1D. Červená farba predstavuje úroveň aktivátoru, modrá inhibítora a zelená filamentov. Hodnota chemoatraktantu bola 1 na ľavom konci a 2 na pravom.

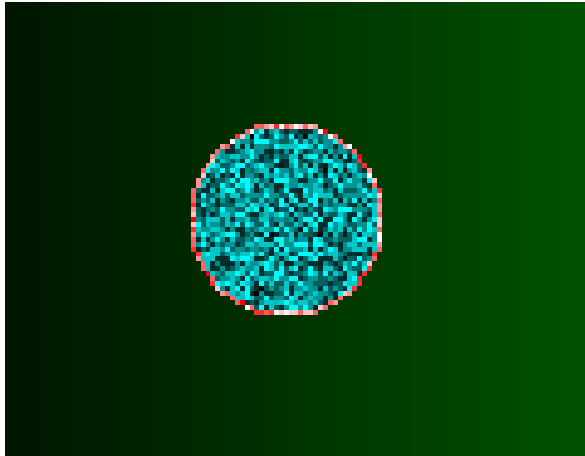
Jednorozmernému modelu, ktorý dokáže vnímať chemoatraktant pozdĺž celej svojej dĺžky teda viac pre dva rozmery zodpovedá predstava dvojrozmerného makrofágu, ktorý taktiež vníma chemoatraktant celým svojím povrchom. Túto modifikáciu sme následne implementovali.

Po tejto zmene už makrofág nenadobúdal tak neprirozené tvary ako pred tým. Schopnosť polarizácie sa nestratila, no naďalej ostala jej orientácia čisto náhodná.



Obr. 5.3: Ilustrácia fungovania modifikovaného modelu. Na ľavom obrázku je možné vidieť koncentrácie filamentov – očividne sa ich viac nachádza v čele bunky (relatívne k smeru pohybu). Na druhú stranu, inhibítora je viac koncentrovaný v zadnej časti bunky.

Na simuláciách sme videli, že ani takáto modifikácia nepriniesla radikálne zlepšenie vo fungovaní modelu. Ako sme spomínali vyššie, tento model modifikuje v každom kroku len jeden náhodný bod vo vnútri makrofágu. Tým dochádza vo vnútri makrofágu k veľkým nepomerom koncentrácií jednotlivých látok, čo je možné vidieť aj z obrázkov, kde je koncentrácia inhibítora v rámci bunky veľmi premenlivá (podobá sa na šum).



Obr. 5.4: Aj v prípade, keď je bunka zbavená možnosti pohybu a prebieha len kinetika a dufúzia inhibítora, z jeho koncentrácie sa nedá o gradiente vyčítať nič.

Kapitola 6

Modifikovaný model

Nevhodnosť predstaveného modelu nás núti vymyslieť jeho modifikácie, ktoré by odstránili problémy s jeho veľkou stochastikou a neschopnosťou reagovať efektívne na smer stúpajúceho gradientu chemoatraktantu. Základnou zmenou bude teda zmena hlavného algoritmu.

6.1 Návrh modelu

Hlavným kameňom úrazu pôvodného modelu bolo modifikovanie jednotlivých bodov makrofágu po jednom a náhodne. V novej verzii sa vrátíme k tradičným parciálnym diferenciálnym rovniciam popisujúcich kinetiku naraz v celej bunke. Tým sa vyhneme vzniku náhodného šumu, ako to bolo v pôvodnom modeli.

6.1.1 Kinetika

Vnútorne procesy bunky budú popisovať tri rovnice.

$$\frac{\partial A}{\partial t} = -k_\alpha A + \alpha S \quad (6.1)$$

$$\frac{\partial I}{\partial t} = D\Delta I - k_\beta I + \beta S \quad (6.2)$$

$$\frac{\partial F}{\partial t} = \begin{cases} \gamma - k_f F & \text{pre } \left(\frac{A}{I} > h\right) \\ -k_f F & \text{inak} \end{cases} \quad (6.3)$$

Teda v jednom kroku nám prebehne kinetika pre celú bunku makrofágu.

Môžeme modifikovať taktiež funkciu ktorá nám hovorí o raste filamentov. V pôvodnom modeli je predpoklad, že ak je pomer aktivátoru a inhibítora väčší ako nejaká hranica h , filamentov pribúda v každom kroku presne γ . Toto však nemusí celkom zodpovedať

pravde, rast filamentov by mal byť nejakým spôsobom proporcionálny pomeru aktivátoru a inhibítora a taktiež by mohol zohľadňovať množstvo filamentov, ktoré sa už na mieste nachádza. Zaujímavou funkciou je napríklad

$$\frac{\partial F}{\partial t} = \left(\gamma + c \frac{F + G_1}{F + G_2} \right) \left(1 + \frac{A}{I} \right) - k_f F$$

. V prípade, že $G_2 \ll G_1$ bude ľavá zátvorka pre $F \ll G_2$ veľká a naopak pre $F \gg G_1$ malá. Takto by sme mohli pri správnej kombinácii veľkostí parametrov dosiahnuť účinnejšiu polarizáciu.

6.1.2 Zachovávanie objemu

V tomto prípade musíme vziať do úvahy fakt, že už nemáme časový krok daný implicitne. Od dĺžky časového kroku musí nejak závisieť pravdepodobnosť pridania, resp. odobrania bodu makrofágu. Intuitívne sa dá na tento problem pozeráť ako na pravdepodobnosť, že za čas Δt sa zmení energia zo stavu E na E' .

Túto pravdepodobnosť budeme modelovať pomocou exponenciálneho rozdelenia. Pravdepodobnosť, že nastane nejaký jav za čas t dostaneme integrovaním jeho hustoty:

$$P = \int_0^{\Delta t} \lambda e^{-\lambda t} dt = 1 - e^{-\lambda \Delta t}$$

Pričom

$$\frac{1}{\lambda} = se \left(-\frac{E' - E}{kT} \right),$$

a teda po dosadení dostávame náš výsledok

$$P = 1 - \exp \left(-\frac{\Delta t}{s} \exp \left(-\frac{E' - E}{kT} \right) \right),$$

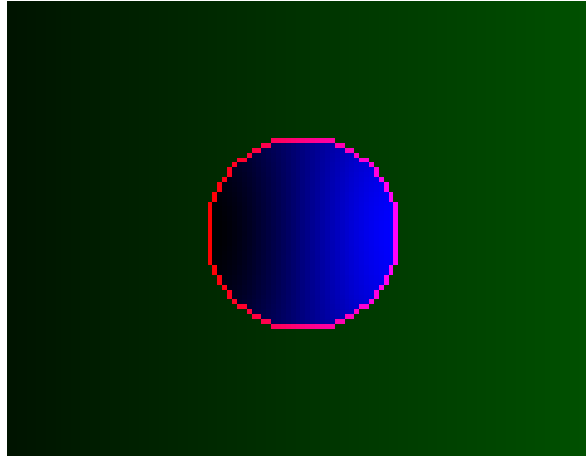
kde konštanta s je zodpovedná za časovú škálu membránových fluktuácií. Za jeden krok model vyhodnotí všetky membránové body naraz.

6.1.3 Rozširovanie bunkovej domény

Funguje podobne ako v predchádzajúcom modeli, s tým rozdielom, že teraz za jeden krok prejdeme všetky membránové body. Naďalej budeme sledovať, či je v danom bode viac filamentov ako je nastavená hraničná hodnota a ak je, pridáme k tomuto bodu ďalší.

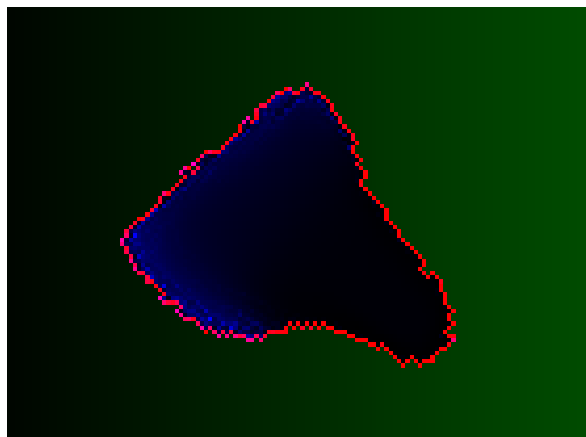
6.2 Výsledky simulácie

Ako je vidno z nasledujúceho obrázku, podarilo sa nám eliminovať šum v koncentráciách chemických látok, najmä difundujúceho inhibítora.



Obr. 6.1: Môžeme vidieť, že v prípade keď zakážeme bunke akýkoľvek pohyb, inhibítora sa rozloží v rámci bunky rovnomerne v závislosti od koncentrácií chemoatraktantu v okolí.

Pri pozorovaní simulácií sme mali možnosť vidieť, že najväčším problémom tohto modelu naďalej ostala neschopnosť efektívne sa polarizovať. Náhodnými fluktuáciami membrány dochádza aj naďalej k vytváraniu veľkých lokálnych nepomerov v koncentráciách látok a tieto výkyvy majú následne na svedomí spontánnu polarizáciu v náhodnom smere.



Obr. 6.2: Na tomto obrázku môžeme vidieť polarizovaný makrofág. Modrou farbou je vykreslená koncentrácia aktivátoru. Môžeme vidieť, že je sústredený v smere polarizácie a vyzerá oveľa homogénnejšie

Snažili sme sa nájsť optimálnu kombináciu nových parametrov, ktorá by tieto spontánne polarizácie zastavila, žiaľ zatiaľ neúspešne, keďže parametrov je už teraz veľké

množstvo. Je dokonca možné, že taká kombinácia ani neexistuje a budeme musieť pristúpiť k ďalším zmenám v štruktúre modelu.

Kapitola 7

Záver

Táto práca sa zaoberala modelovaním chemotaktického pohybu u makrofágov – bielych krviniek. Hlavným cieľom bolo navrhnúť model, ktorý by zodpovedal reálnym poznatkom získaným pozorovaním živých buniek.

V prvých dvoch kapitolách bola vysvetlená motivácia k tvorbe modelov chemotaktického pohybu, spolu so základnými informáciami o makrofágoch, baktériách a ich vzájomných interakciách.

V tretej kapitole sme sa venovali hlbšie stavbe eukaryotickej bunky, keďže takéto informácie sú esenciálne pre úspešné modelovanie mikrobiologických procesov. Boli vysvetlené jej základné časti a ich funkcie. Taktiež sme podrobne rozobrali pohybový aparát, spolu s chemickými procesmi, vďaka ktorým bunka dokáže vnímať okolie a aktívne naň reagovať.

Následne boli v skratke predstavené štyri základné druhy modelov, štandardne používaných na modelovanie problémov ako chemotaktický pohyb, alebo deformácie bunkovej steny. Vysvetlili sme základné princípy každého z týchto modelov a uviedli niektoré jeho pozitíva a negatíva.

Piata kapitola bola venovaná vysvetleniu kompletného fungovania a implementácii CPM modelu založeného na vnútrobunkových chemických signalizačných procesoch, prezentovaného v práci Nishimuru a Sasaia[14]. Následne sme prakticky ukázali nedostatky tohto modelu, spočívajúce v schopnosti reagovať na koncentráciu chemoatrantu iba v membránových bodoch, a navrhli jednoduché vylepšenie, inšpirované prácou Iglesiasa a Levchenka[9]. Toto však pomohlo iba čiastočne.

V záverečnej kapitole navrhujeme niekoľko komplexných riešení problémov sprevádzajúcich tento model. Úspech sme zaznamenali však len čiastočný, podarilo sa nám odstrániť problém s nehomogenitou inhibítora vo vnútri bunky, no pri fluktuácii membrány vzniká stále príliš veľký šum, polarizujúci bunku v náhodnom smere a znemožňujúci efektívne sledovať gradient.

Aj napriek čiastočnému neúspechu má tento model vďaka svojej variabilite veľký potenciál, a veríme že sa nám eventuelne podarí navrhnuť takú formu, ktorá dokáže efektívne sledovať gradient.

Literatúra

- [1] Peskin C.S. and McQueen D.M. A general method for the computer simulation of biological systems interacting with fluids. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 49:265–276, 1995.
- [2] P. N. Devreotes and P. J. Van Haastert. Chemotaxis: Signalling the way forward. *Nature reviews*, 5, 2004.
- [3] Graner F. and Glazier J.A. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Physical Review Letters*, 69:2013–2016, 1992.
- [4] Baaijens F.P.T., Trickey W.R., Laursen T.A., and Guilak F. Large deformation finite element analysis of micropipette aspiration to determine the mechanical properties of the chondrocyte. *Annals of Biomedical Engineering*, 33:494–501, 2005.
- [5] D. J. Higham. Modeling and simulating chemical reactions. *SIAM review*, 50, 2008.
- [6] D. Horstmann. From 1970 until present: the keller-segel model in chemotaxis and its consequences i. *Jahresberichte*, pages 103–165, 2003.
- [7] E. Ising. Beitrag zur Theorie des Ferromagnetismus. *Zeitschrift fur Physik*, 31:253–258, February 1925.
- [8] Yang L., Effler J.C., Kutscher B.L., Sullivan S.E., Robinson D.N., and et al. Modeling cellular deformations using the level set formalism. *BMC Systems Biology*, 2, 2008.
- [9] A. Levchenko and P. A. Iglesias. Models of eukaryotic gradient sensing: Application to chemotaxis of amoebae and neutrophils. *Biophysical Journal*, 82:50 – 63, 2002.
- [10] H. Othmer and P. Schaap. Oscillatory camp signaling in the development of dictyostelium discoideum. *Comments on Theoretical Biology*, 5:175–282, 1998.

- [11] Dižo P. Matematické modelovanie pohybu makrofágu (neutrofilu) pri hojení infekcií. *Študentská vedecká konferencia FMFI UK*, pages 1–9, 2011.
- [12] D. Rogers. Crawling neutrophil chasing a bacterium, 1950. [Online; 17-Apríl-2012].
- [13] J. A. Sethian. *Level Set Methods*. Cambridge University Press, 1996.
- [14] Nishimura S.I. and Sasai M. Modulation of the reaction rate of regulating protein induces large morphological and motional change of amoebic cell. *Journal of Theoretical Biology*, 245:230–237, 2007.
- [15] Wikipedia. Eukaryotic cell, 2001. [Online; 17-Apríl-2012].
- [16] Wikipedia. File:level set method.jpg, 2004. [Online; 17-Apríl-2012].
- [17] Wikipedia. File:20100825 023736 neutrophil.jpg, 2005. [Online; 17-Apríl-2012].
- [18] Wikipedia. File:escherichiacoli niaid.jpg, 2005. [Online; 17-Apríl-2012].
- [19] Wikipedia. File:fluorescentcells.jpg, 2005. [Online; 17-Apríl-2012].
- [20] Wikipedia. File:mitochondria mammalian lung - tem.jpg, 2005. [Online; 17-Apríl-2012].
- [21] Wikipedia. File:neutrophil with anthrax copy.jpg, 2005. [Online; 17-Apríl-2012].
- [22] Wikipedia. File:neutrophil.jpg, 2005. [Online; 17-Apríl-2012].
- [23] Wikipedia. Molecular motor, 2005. [Online; 17-Apríl-2012].
- [24] Wikipedia. File:fae visualization.jpg, 2006. [Online; 17-Apríl-2012].
- [25] Wikipedia. File:unk.cilliate.jpg, 2012. [Online; 17-Apríl-2012].