

TDK-dolgozat

Paless Ágoston
Kiss Gergely



**Pázmány Péter
Katolikus Egyetem**

Információs Technológiai és
Bionikai Kar

**Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem**

Gépészmérnöki Kar

Immunsejt-tumor interakciók térbeli, sztochasztikus, ágens alapú modellje

Kölcsönható Rácsok Módszere

Szerzők:

Ágoston Paless (5. Szemeszter)
PPKE ITK Molekuláris Bionikai Mérnök

Gergely Kiss (5. Szemeszter)
BME GPK Mechatronikai Mérnök

Témavezetők:

Dr. Boldog Péter Tamás
HUN-REN Wigner Fizikai Kutatóközpont,
tudományos munkatárs
Vághy Mihály András
Pázmány Péter Katolikus Egyetem, PhD hallgató

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Matematikai háttér	5
2.1. A Sztochasztikus Szimulációs Algoritmus	5
2.2. Sejtkultúrák egzakt sztochasztikus szimulációja	7
3. A Kölcsönható Rácsok Módszere	12
3.1. Heterogén sejtpopulációk	12
3.2. Kiterjesztett rácsszerkezet	12
3.3. Modell hipotézisek	13
3.4. A rácsok feltöltése	15
3.5. Reakciók	15
3.6. Szimulációs lépések	19
4. Implementáció	22
4.1. A matematikai modell megvalósítása	22
4.2. Futásidejű adatstruktúrák	23
4.3. Szimulációs komponens	24
5. Paraméterbecslés kísérleti adatok felhasználásával	25
5.1. A kísérleti elrendezés	25
5.2. Adatgyűjtés	26
5.3. Szimulált és kísérleti adatok összehasonlítása	27
5.4. Minimalizáló algoritmusok	28
6. Eredmények	31
6.1. A paraméterek konzisztenciája	31
6.2. Illesztett paraméterek összehasonlítása	31
6.3. Az események időbeli lefolyása	32
6.4. Kvalitatív morfológiai elemzés	34
7. Összefoglalás	36

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozunk témavezetőinknek: Vághy Mihály Andrásnak és Dr. Boldog Péternek a rengeteg a támogatásért és útmutatásért, amit az elmúlt másfél évben kaptunk tőlük. Igazán hálásak vagyunk nekik.

Köszönetet mondunk továbbá az Információs Technológiai és Bionikai Karnak, hogy biztosították a szükséges hardvert számításaink elvégzéséhez.

Paless Ágoston részéről a projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium EKÖP-24-1 kódszámú Egyetemi Kutatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



A helyi TDK fordulóra készült angol nyelvű dolgozatunk lefordításához és nyelvhelyesség ellenőrzéséhez részben mesterséges intelligencia eszközöket alkalmaztunk.

1. Bevezetés

A rák világszerte az egyik vezető halálok [1], [2]. Számos kutatócsoport dolgozik folyamatosan a mögöttes mechanizmusok feltárásán és a terápiás beavatkozások fejlesztésén; ez azonban számos okból különösen nagy kihívás.

Az *in vivo* kísérletek, például betegből átültetett tumorokon végzett xenograft vizsgálatok gyakran költségesek, hosszadalmasak, és a tumor evolúciójának csak bizonyos aspektusait képesek vizsgálni. Az *in vitro* kísérletek ráksejtvonalakon költséghatékonyabbak, és növelik a vizsgálati lehetőségek tárházát, azonban a tumor mikrokörnyezet, az extracelluláris mátrix és más, betegspecifikus tényezők hiánya miatt a sejt kultúrák korlátozottak az *in situ* tumorok megfelelő modellezésében.

Az elmúlt években köztes megoldásként a *betegből izolált tumor organoid* modellek ígéretes módszerként jelentek meg az *in vitro* onkológiában. Ezek háromdimenziós, többsejtű struktúrák, amelyek önszerveződési képességeket mutatnak, és biopsziás mintákból származó sejtekből tenyésztik őket extracelluláris mátrix gélekben (pl. Matrigel vagy alapmembrán kivonat) [3].

Számos tekintetben jobbnak bizonyulnak a sejtkultúráknál, mivel megőrzik a betegspecifikus genetikai, fenotípusos, strukturális és élettani jellemzőket [3]–[6] és utánozzák az eredeti szövet mikrokörnyezetét és időbeli fejlődését [6], [7]. A rákkutatásban az izolált organoidokat gyakran használják hatóanyagok hatékonyságának és működési mechanizmusának tanulmányozására, mivel az ezeken végzett kezelés jó in vitro modellje a betegen alkalmazott kezelésnek és ezek a struktúrák részletesebben megfigyelhetők mikroszkópos technikákkal, mint egy tumor xenograft.

Az immunterápiák és molekuláris biológiai módszerek jelentős fejlődése új lehetőségeket nyit arra, hogy megértsük az immunrendszer működését és új terápiás módszereket dolgozzunk ki. Az egyik ilyen új irány a genetikailag módosított T-sejtek terápiás használata, amely hatékonynak ígérkezik a tumorok célzott megsemmisítésében. [8]–[10].

Dekkers és mtsai. [11] organoid és háromdimenziós képképzési technológiákat kombinálva térképezték fel bizonyos módosított T-sejtek viselkedési jellemzőit (pl. sejtmozgás, citotoxikus aktivitás) betegekből izolált tumor organoidokkal való társtenyésztés esetén. Tekintettel a T-sejtek és az organoidok közötti interakciók komplexitására, értékes lehetőségnek tartjuk a matematikai modellezés eszköztárának alkalmazását a mögöttes mechanizmusok mélyebb megértésének érdekében. A kísérletileg validált *in silico* modellek és szimulációk betekintést nyújthatnak a rendszer viselkedésébe olyan körülmények között, amelyeket egy laboratóriumban nehéz vagy lehetetlen megvalósítani. A modell struktúrájának és paraméterérzékenységének elemzése potenciális terápiás célpontokat világíthat meg, így megkönnyítve új lehetőségek felderítését a terápiás gyakorlatban.

Gyakran alkalmaznak differenciálegyenlet-alapú modelleket immunterápiák vizsgálatára [12]–[14]. Ezek a modellek azonban nem képesek a tumorképződés korai szakaszaiban jellemző alacsony sejtszám miatt fellépő sztochasztikus hatások figyelembe vételére, és ilyen helyzetekben gyakran pontatlannak bizonyulnak. Sztochasztikus modellekkel ezek a hatások figyelembe vehetők, pontosabb eredményt nyújtva [15]. Mindazonáltal egyik megközelítés sem kezeli a tumor- és környezetének térbeli szerveződéséből adódó hatásokat, mint például a limfoid infiltráció, amely fontos prognosztikai tényező szilárd tumorokban [16].

Ebben a dolgozatban bemutatunk egy új, térbeli, ágens alapú, egzakt sztochasztikus modellt a T-sejtek és tumorsejtek közötti interakciók vizsgálatára. Modellünk jól reprodukálja a tumor organoidok megsemmisítésének Dekkers és mtsai. kísérleteiben megfigyeltek szerinti időbeli dinamikáját [11]. Ezt az új megközelítést a Kölcsönható Rácsok Módszerének nevezzük.

A bevezetés hátralévő részében röviden ismertetjük a dolgozat felépítését.

Elméleti háttér

Először bemutatjuk megközelítésünk matematikai alapjait: Gillespie sztochasztikus szimulációs algoritmusát [17] és ennek térben strukturált sejtpopulációkra értelmezett kiterjesztését, az ún. Redukált Ráta Módszert (Boldog [18]).

A Kölcsönható Rácsok Módszere

A harmadik fejezetben bemutatjuk a dolgozatunk matematikai alapjául szolgáló Kölcsönható Rácsok Módszerét, amely az előzőekben leírt alapokra épül, és több jelentős kiterjesztést tartalmaz, pontosabb leírást adva az immun-tumor kölcsönhatásokról. Részletesen ismertetjük a sejtek közötti interakciók kiválasztásához vezető gondolatmenetet, és tárgyaljuk a modell feltételezéseit és egyszerűsítéseit. Ez a módszer a dolgozat egyik új eredménye.

Implementáció

Ebben a fejezetben röviden áttekintjük az *in silico* szimulációkat megvalósító C++ kód felépítését. Bemutatjuk az optimalizálási megoldásainkat, amelyek szükségesek a nagy méretű szimulációk futtatásához, és említést teszünk az adatok illesztéséhez és elemzéséhez használt további szoftverekről.

Paraméterbecslés

Annak igazolására, hogy a létrehozott modell képes reprodukálni a kísérletes megfigyeléseket, modellünket valós adatokra illesztettük és megbecsültük a szükséges biológiai paraméterértékeket. A hatodik fejezetben bemutatjuk a Dekkers és mtsai. [11] által végzett kísérletek eredményeit, amelyeket validációra használtunk. Leírjuk továbbá az adatok feldolgozásának és illesztésének eljárásait.

Eredmények

A hetedik fejezetben bemutatjuk az illesztett paramétereket, majd összehasonlítjuk az ezek alapján szimulált eredményeket a kísérleti adatokkal, és kiemeljük a megfigyelhető trendeket.

Összegzés

Végül röviden összefoglaljuk eredményeinket, és felvázoljuk jövőbeli terveinket.

2. Matematikai háttér

2.1. A Sztochasztikus Szimulációs Algoritmus

Ebben a szakaszban bemutatjuk a Gillespie-algoritmust [17], [19], [20], amely később matematikai modellünk és szimulációs algoritmusunk alapjául szolgál. A sztochasztikus szimulációs algoritmust (SSA) Daniel T. Gillespie [17] dolgozta ki és publikálta 1976-ban. Tőle függetlenül ugyanabban az évben Tóth János és Érdi Péter is publikálta a sztochasztikus szimulációs algoritmust, melyet Hárs Vera implementált [21] a szakdolgozatában.

2.1.1. Állapotváltozók és mennyiségek

A sztochasztikus szimulációs algoritmust eredetileg kémiai folyamatok időbeli modellezésére vezették be. Tekintsük az $S_1, \dots, S_N$ kémiai anyagokat, amelyek mennyisége a $t \in [0, \infty)$ időben $(X_1(t), \dots, X_N(t)) \in \mathbb{N}_0^N$, valamint közöttük zajló reakciókat $R_1, \dots, R_M$. A kényelem érdekében $\mu = 1, 2, \dots, M$ jelöli a reakcióindexet, így M a lehetséges reakciók száma, $i = 1, 2, \dots, N$ jelöli a kémiai anyagok indexét, így tehát N a folyamatban szereplő különböző típusú kémiai anyagok száma. Az R_μ reakció a kémiai anyagok populációjában $(\Delta X_1, \dots, \Delta X_N)_\mu$ változást határoz meg.

Az R_μ reakciót jellemző ún. a_μ hajlandósági függvény az $a_\mu = c_\mu \cdot h_\mu$ formulával adható meg, ahol $c_\mu \in \mathbb{R}^+$ a sebességi állandó, h_μ pedig a rendelkezésre álló, különböző molekuláris reagens kombinációk száma az adott pillanatban. Például az $S_1 + S_2 \rightarrow S_3$ és $2S_1 + S_2 \rightarrow S_3$ típusú reakciók különböző molekuláris reagens kombinációinak száma rendre $\binom{X_1}{1} \cdot \binom{X_2}{1} = X_1 \cdot X_2$ és $\binom{X_1}{2} \cdot \binom{X_2}{1} = \frac{1}{2} X_1 \cdot (X_1 - 1) \cdot X_2$.

A hajlandósági függvények összegének jelölésére bevezetjük az $a = \sum_{\mu=1}^M a_\mu$ mennyiséget. Bebizonyítható [17], hogy a két egymást követő reakció közötti várakozási idő τ exponenciális eloszlású a paraméterrel, és a következő reakció valószínűsége $P(R_\mu)$:

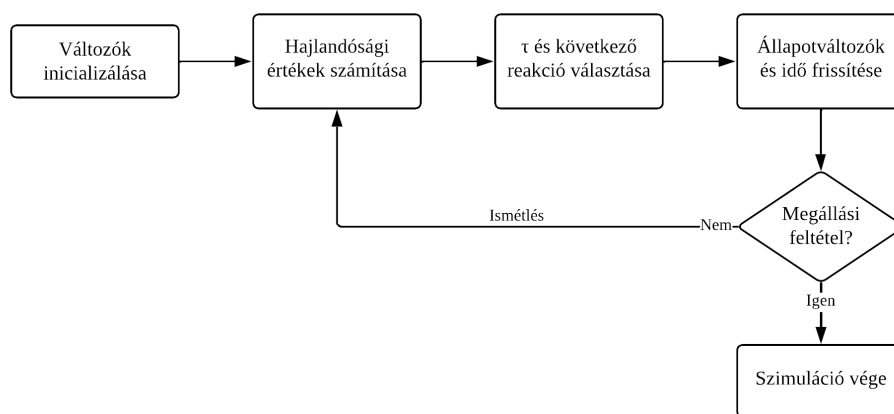
$$\tau \sim \text{Exp}(a), \quad P(R_\mu) = \frac{a_\mu}{a}. \quad (1)$$

2.1.2. Az SSA lépései

Az algoritmus a változók inicializálásával és egy leállási feltétel előírásával kezdődik. A leállási feltétel lehet például egy maximális szimulált idő előírása vagy bonyolultabb feltétel a rendszer állapotára vonatkozóan. Például leállíthatjuk a szimulációt, ha bizonyos kémiai anyagok aránya

elér egy meghatározott, vagy ha egy bizonyos kémiai anyag teljesen eltűnik a rendszerből, ezzel elkerülve a fölösleges számításokat.

Az inicializálás után egy ciklusba lépünk, amely addig ismétlődik, amíg a leállási feltétel nem teljesül. Minden ciklus az aktuális állapothoz tartozó hajlandóságok kiszámításával kezdődik. A hajlandóságok kiszámítása után az (1)-es egyenlet alapján kiválasztjuk az R_μ reakciót és a τ várakozási időt. Ezután frissítjük az állapotváltozókat a kiválasztott reakció szerint, és frissítjük az időt az eltelt idővel: az rendszer idejéhez hozzáadjuk τ -t. Végül ellenőrizzük a leállási feltételt, és szükség esetén megismételjük a folyamatot. Az 1. ábrán az algoritmus folyamatábrája látható.



1. ábra. A Sztochasztikus Szimulációs Algoritmus folyamatábrája

2.1.3. Az SSA előnyei és hátrányai

Az SSA nagyszerű alternatívát nyújt az közönséges differenciálegyenleteken alapuló determinisztikus modellekhez képest. Ellentétben a közönséges differenciálegyenletekkel, az SSA értelmezhető eredményeket ad még akkor is, ha az ágensek száma nagyon alacsony. A módszer inherens sztochasztikus természete és a kis populációk szimulálásának lehetősége lehetővé teszi a sztochasztikus hatások figyelembevételét, amelyek alacsony ágens szám esetén jelentősen eltérő kimeneteket eredményezhetnek. Továbbá az SSA segítségével megbecsülhetjük a folyamat bizonyos kimeneteinek empirikus valószínűségét. Például szimulációinkban ilyen szituáció akkor fordul elő, amikor a tumor organoid kicsi, csupán néhány sejtből áll, és így pár véletlen esemény határozza meg a klaszter sorsát, azaz hogy az organoid növekszik vagy eliminálódik teljesen.

Ugyanakkor az egzakt sztochasztikus szimulációk számítási szempontból költségesek. Az

ilyen algoritmusok valószínűségi természete miatt gyakran szükséges számos realizációt vagy trajektóriát szimulálni ahhoz, hogy megbízható információt nyerjünk egy adott kimenet valószínűségéről, vagy hogy megkapjuk az állapotváltozók várható értékeit az idő függvényében.

2.2. Sejtkultúrák egzakt sztochasztikus szimulációja

A Gillespie-algoritmus egyik feltételezése, hogy a rendszer *jól kevert*; azaz a molekulák térbeli elhelyezkedése nem befolyásolja a lehetséges reakciók valószínűségét. Ez különösen megnehezíti a sejtkultúrák modellezését, mivel az élő szervezetekben a sejtek populációi általában jól meghatározott térbeli szerkezettel rendelkeznek a szövetek és szervek működésének fenntartása érdekében. Egy sejt elhelyezkedése és közvetlen szomszédjainak mibenléte meghatározó egy rákos sejt ártalmasként való felismerésekor és elpusztításakor. Egy másik probléma az, hogy a sejtek több nagyságrenddel nagyobbak, mint az SSA segítségével vizsgált molekulák. Ebből adódóan mozgásuk során jelentős akadályt jelentenek egymásnak. Ezt a térfogati kizárás jelenségének nevezzük és azt jelenti, hogy egy adott sejt által elfoglalt térfogatban más sejt nem lehet jelen. A sejtkultúrák viselkedésének megfelelő modellezéséhez – ahol a térfogati kizárás kulcsszerepet játszik – a térbeli struktúrát egy rács formájában vezetjük be a rendszerbe. Ennek a matematikai alapjai Boldog [18]-ben találhatók meg. Ez a cikk több, matematikailag ekvivalens módszert tárgyal a sejtkultúrák egzakt térbeli sztochasztikus szimulációjának megvalósításához. A fejezet hátralévő részében az ún. *marginális Redukált Ráta Módszert* (mRRM) fogjuk bemutatni [18] alapján és kiterjeszteni a dolgozat későbbi fejezeteiben.

Ebben a keretrendszerben a sejtek és a kémiai anyagok egy $(n_1 \times n_2)$ méretű téglalap alakú rácson léteznek. A sejtek makroszkópikus entitások a kémiai részecskékhez képest. Valóságghű modellekben feltételezzük, hogy térfogati kizárás alá esnek, azaz két sejt nem foglalhatja el ugyanazt a rács cellát. Következésképpen a sejtek fizikai akadályokat képeznek egymás számára. Ezzel szemben a kémiai anyagok nagyságrendekkel kisebbek, így feltételezhetjük, hogy szabadon diffundálnak az intercelluláris térben, diffúziós együtthatóik jelentősen nagyobbak, mint a sejteké. Ennek eredményeként a kémiai anyagokat jól kevertnek tekintjük. A rács egy adott pozícióját *cellának* vagy *koordinátának* nevezzük. A térfogati kizárás miatt minden cella legfeljebb egy sejtet tartalmazhat, lehetővé téve egy sejt egyértelmű azonosítását a rácson elfoglalt pozíciója alapján.

Az élő sejtek tipikus viselkedései közé tartoznak az olyan reakciók, mint a sejtosztódás, a mozgás és az apoptózis. Az egyszerűség kedvéért csak a sejtciklus mitózist és interfázist

modellezzük, a köztes fázisokat elhanyagoljuk. Azaz az osztódás egy pillanatszerű esemény az egyébként interfázisban lévő sejt életében.

A rács-alapú sejtpopulációs modellek legegyszerűbb esete egy kétdimenziós rács von Neumann szomszédsággal, ami azt jelenti, hogy minden cellának négy szomszédja van: felül, alul, balra és jobbra. Egy sejtről akkor mondjuk, hogy j szabad szomszédal rendelkezik, ha j darab szomszédos cella üres, azaz nem tartalmaz sejtet. Ezeket a sejteket j -osztályú sejteknek nevezzük. Kétdimenziós von Neumann szomszédságot tekintve ez azt is jelenti, hogy a sejtnek $4 - j$ foglalt szomszédja van. Az egyszerűség kedvéért a j -osztályú sejtek számát N_j jelöli, a populáció összes sejtjének száma pedig $N = \sum_{j=0}^4 N_j$.

2.2.1. Reakciótípusok

A reakciókat megkülönböztetjük annak függvényében, hogy függenek-e a szabad vagy foglalt szomszédos celláktól. Egy reakciót *kontaktus serkerntett*-nek nevezzük, ha nagyobb valószínűséggel (gyakrabban) fordul elő olyan sejteknél, amelyeknek sok szomszédos sejtje van, mint olyanoknál, amelyeknek kevés. Hasonlóképpen, egy reakció *kontaktus gátolt*, ha előfordulásának valószínűsége csökken a szomszédok számának növekedésével. Egy reakció lehet *kontaktus független* is, ha előfordulása független az adott sejt szomszédainak számától, vagy teljesen független a sejtektől (pl. kémiai reakció).

2.2.2. Hajlandóság függvények

Az mRRM leírásához külön jelölésrendszert használunk: a mennyiségeket (pl. $\hat{a}_\mu$) kalapos szimbólummal jelöljük, így a szokásos, kalap nélküli jelölést használhatjuk a Kölcsönható Rácsok Módszerének leírásához a 3. szakaszban.

$$h_\mu = \begin{cases} 1 & \text{ha kémiai anyagok nem vesznek részt } R_\mu\text{-ben,} \\ \text{Különböző reagenskombinációk száma} & \text{ha kémiai anyagok részt vesznek } R_\mu\text{-ben.} \end{cases} \quad (2)$$

Az egyszerűség kedvéért bevezetünk egy új jelölést:

$$\hat{r}_\mu = \begin{cases} c_\mu \cdot h_\mu & \text{sejteket (vagy esetleg kémiai anyagokat) érintő reakcióknál,} \\ \frac{c_\mu \cdot h_\mu}{N} & \text{csak kémiai anyagokat érintő reakcióknál.} \end{cases} \quad (3)$$

Egy R_μ reakció hajlandósága az alábbiak szerint definiálható:

$$\hat{a}_\mu = \begin{cases} \frac{\hat{r}_\mu}{4} \sum_{j=0}^4 jN_j(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus gátolt,} \\ \hat{r}_\mu N(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus független,} \\ \frac{\hat{r}_\mu}{4} \sum_{j=0}^4 (4-j)N_j(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus serkentett.} \end{cases} \quad (4)$$

Definíció szerint a tisztán kémiai reakciók csak a kémiai anyagok számától függenek, és függetlenek bármely sejtsztaály sejtjeinek számától. Így egy egyszerű algebrai átalakítással a R_μ kémiai reakció hajlandósága, $\hat{a}_\mu$, ugyanazt a formát ölti, mint a kontaktus független reakciók esetében:

$$\hat{a}_\mu = c_\mu h_\mu = \frac{c_\mu h_\mu}{N} N = \hat{r}_\mu N.$$

Könnyen belátható, hogy ha minden sejtnak pontosan 4 szabad szomszédja van, a kontaktus serkentett reakció hajlandósága 0, és a kontaktus gátolt reakció hajlandósága maximális. Hasonlóképpen, ha a rács teljesen tele van (minden sejtnak 0 szabad szomszédja van), akkor a kontaktus serkentett reakciók hajlandósága maximális, míg a kontaktus gátolt reakciók lehetetlenek.

Bebizonyítható [18], hogy annak a valószínűségnek a meghatározásához, hogy τ várakozási idő múlva egy R_μ reakció következik be τ el kell osztanunk az adott hajlandóságot a hajlandóságok összegével, $\hat{a} = \sum_\mu \hat{a}_\mu$ -vel:

$$P(R_\mu) := P(R_\mu|\tau) = \frac{\hat{a}_\mu}{\hat{a}}. \quad (5)$$

Az mRRM-ben nemcsak a reakciót választjuk ki, hanem azt is, hogy melyik sejten hajtjuk végre a reakciót. Legyen A_j az az esemény, hogy a reakció egy j -osztályú sejten megy végbe. Annak a valószínűségét, hogy az R_μ következő reakció egy j -osztályú sejten megy végbe a következőképpen számíthatjuk ki:

$$P(A_j|R_\mu) = \begin{cases} \frac{jN_j}{\sum_{j=0}^4 jN_j} & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus gátolt,} \\ \frac{N_j}{N} & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus független,} \\ \frac{(4-j)N_j}{\sum_{j=0}^4 (4-j)N_j} & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus serkentett.} \end{cases} \quad (6)$$

Ezen egyenletek alapján az algoritmus lépéseit az alábbiak szerint hajthatjuk végre:

2.2.3. Az mRRM lépései

1. Inicializálás:

- (a) Állítsuk az időváltozót t -t 0-ra, és írjuk elő a leállási feltételt.
- (b) Inicializáljuk a $n_1 \times n_2$ méretű rácsot, helyezzünk el $N(0) \leq n_1 \cdot n_2$ sejtet a rácson, és tároljuk el azok pozícióit.
- (c) Tároljuk el a kémiai anyagok kezdeti mennyiségeit.

2. Hajlandóságok kiszámítása:

Számítsuk ki $\hat{a}_\mu$, $\mu = 1, 2, \dots, M$ értékeket a (4)-es egyenlet alapján. Ha a hajlandóságok összege nulla, állítsuk le az algoritmust.

3. Eltelt idő generálása:

Határozzuk meg τ értékét az $\hat{a}$ -al paraméterezett exponenciális eloszlásból történő mintavételezéssel.

4. Reakció kiválasztása:

Válasszuk ki az R_μ reakciót az (5)-ös egyenlet alapján.

5. Sejt kiválasztása:

- (a) Válasszuk ki j -t a sejtosztályt a (6)-os egyenlet alapján.
- (b) Válasszuk ki a célsejtet egyenletes eloszlás szerint a kiválasztott sejtosztályból.
- (c) Ha a reakció szomszédos (szabad vagy foglalt) cellát érint, válasszuk ki a cél szomszédot diszkrét egyenletes eloszlásból való mintavételezéssel.

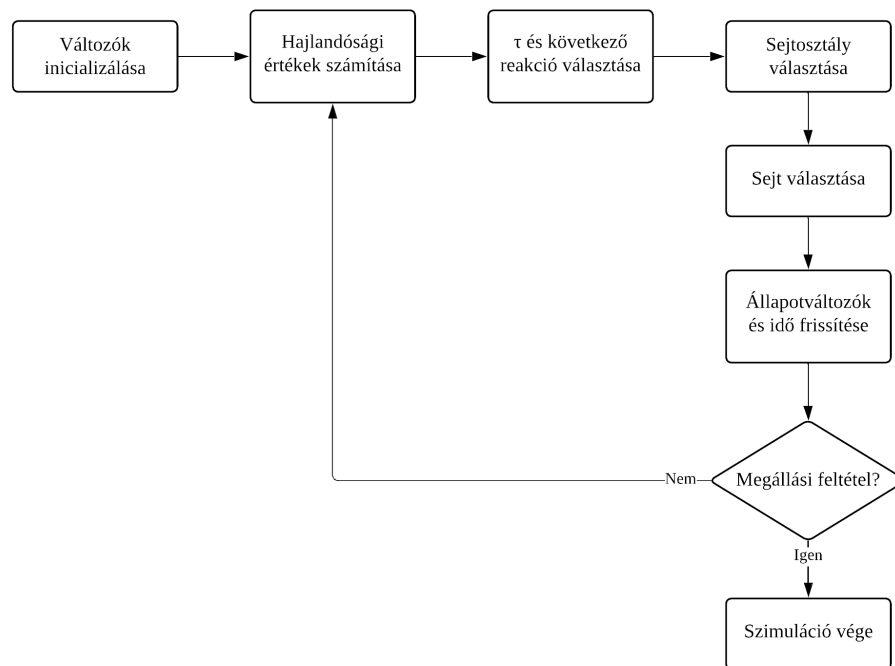
6. Reakció végrehajtása:

- (a) Frissítsük az időt: $t = t + \tau$.
- (b) Hajtsuk végre az R_μ reakciót a kiválasztott j -osztályú sejten.
- (c) Frissítsük az állapotváltozókat.

7. Leállási feltétel ellenőrzése:

Ha a leállási feltétel teljesül, fejezzük be az algoritmust; ha nem, ismételjük meg a 2. lépéstől.

A 2. ábra bemutatja az algoritmus folyamatábráját.



2. ábra. Az mRRM folyamatábrája

3. A Kölcsönható Rácsok Módszere

A marginális Redukált Ráta Módszer hatékony megközelítést kínál homogén (egy sejttypusból álló) sejtenyészetek szimulálására, azonban nem képes kezelni biológiaiilag releváns tumor- és immunsejtek közötti interakciókat, ahol az immunsejtek egy zsúfolt tumoros régióban is képesek mozogni.

Ebben az új keretrendszerben ugyanabban a fizikai térben két különálló rácsot veszünk figyelembe: egyet a tumorsejtek, és egyet az immunsejtek számára. Ez a kialakítás lehetővé teszi, hogy modellezzük azt a biológiai tény, hogy az immunsejtek behatolhatnak a tumorszövetbe, és elmozognak a tumorsejtek között. Ezt az új megközelítést a *Kölcsönható Rácsok Módszerének* nevezzük.

3.1. Heterogén sejtpopulációk

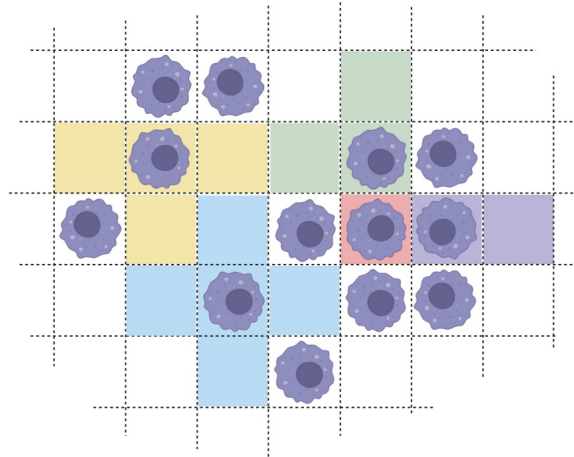
Az mRRM-et kiterjesztettük különböző sejttypusokra, lehetővé téve heterogén sejtpopulációk, például daganatok szimulálását. Ennek eredményeként egy sejtet a rácson elfoglalt koordinátája, szabad szomszédainak száma és típusa jellemez.

Jelölje $\delta = 1, 2, \dots, \alpha, \alpha + 1, \dots, D$ a sejttypust, ahol D a sejttypusok száma, továbbá feltezzük, hogy δ sejttypus a szöveti rácson létezik, ha $\delta \in [1, \alpha]$ és az immunrácson létezik, ha $\delta \in [\alpha + 1, D]$. Annak érdekében, hogy figyelembe tudjuk venni, hogy az egyes reakciókban a különböző sejttypusok eltérő valószínűséggel vesznek részt, bevezetünk $c_{\mu, \delta}$ konstansokat, amelyek egy adott reakcióhoz és sejttypushoz tartoznak. Ezeket *sejttypus konstansoknak* nevezzük. Ezek a konstansok olyan súlyozási együtthatókként értelmezhetők, amelyek meghatározzák, hogy a reakciónak megfelelő események hogyan oszlanak el a különböző sejttypusok között.

3.2. Kiterjesztett rácsszerkezet

3.2.1. A szimulált terület dimenziói

Annak érdekében, hogy a modell biológiaiilag életszerűbb legyen, egy kétdimenziós felület helyett egy háromdimenziós rácsot veszünk figyelembe. Megjegyzendő, hogy az ún. Neumann-féle szomszédság esetén 3D-ben a sejteknek 6 szomszédos cellája lehet, így ha egy sejtnek j szabad szomszédja van, akkor a foglalt szomszédok száma $6 - j$.



3. ábra. **Neumann szomszédság két dimenzióban:** egy cellának szomszédja egy másik cella, ha van közös élük. A színezett cellák a szabad szomszédokat jelölik.

3.2.2. Immunrács

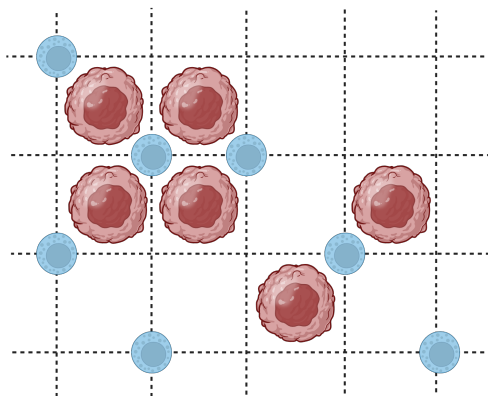
Az immunsejtek mérete jelentősen eltérhet a tumorsejtektől, gyakran egy nagyságrenddel kisebbek [22], [23]. Ez és más molekuláris mechanizmusok (pl. extracelluláris mátrix bontó enzimek) lehetővé teszik, hogy olyan helyeken is közlekedjenek, ahol más sejtek nem tudnak. Ezt a jelenséget modellünkbe egy kizárólag immunsejteknek dedikált második rács bevezetésével integráljuk, amelyet immunrácsnak nevezünk. Az immunsejtek kizárólag ezen a rácson léteznek, míg más sejtek a szöveti rácson helyezkednek el. A két rács egymáshoz viszonyított térbeli elhelyezkedése úgy képzelhető el, mintha az immunsejtek az eddig is használt szöveti rács celláinak sarkain helyezkednének el. Ebben a konfigurációban az immunsejtek mozgását a szöveti rácson lévő sejtek nem akadályozzák; akár közöttük is mozoghatnak.

Ez a jelenség és a rácscok térbeli szerveződése a 4. ábrán látható. A pirossal jelölt sejtek a szöveti rácson elhelyezkedőket (pl. tumorsejteket), míg a kézzel jelöltek az immunrácsra elhelyezkedő immunsejteket jelölik.

3.3. Modell hipotézisek

A szimulált tér jellemzői

- A sejtek egyenlő távolságra helyezkednek el egymástól, csak rácspozíciókon létezhetnek, és egy adott rácson egy időpontban csak egy sejt tartózkodhat egy rácspozíción, ezzel megvalósítva a térfogati kizárás elvét.
- A sejtek térfogata és felülete egy rácson belül egyenlő, és csak a legközelebbi 6 + 8 (azonos rács beli + keresztrácsos) szomszédjukkal léphetnek kölcsönhatásba.



4. ábra. **A kölcsönható rácsok egymáshoz viszonyított elrendezése.** A tumorsejtek (piros, nagyobb) a szöveti rács celláiban helyezkednek el, míg az immunsejtek (kék, kisebb) az immunrácson, a szöveti rácsot kijelölő rácsvonalak kereszteződésein, a szöveti sejtek között helyezkednek el. Mindkét sejtípus a saját rácsán belül mozog vagy osztódik, betartva a térfogati kizárás elvét. Ez a megközelítés modellezi azt a biológiai tényt, hogy az immunsejtek képesek mozogni a tumorklaszteren belül, az egyes tumorsejtek között. Azonban mind a tumorsejtek, mind az immunsejtek akadályozzák saját populációik mozgását és osztódását.

- Egy rács sejtjei csak a saját rácsukon belüli térfogati kizárásban vesznek részt. Egy rács sejtjei nem akadályozzák a másik rács sejtjeinek mozgását.
- A szimulációs tér határain nincs sejt be- vagy kiáramlás. A szimuláción kívüli cellákat fal tölti fel, amely megakadályozza a kifelé irányuló mozgást.

A sejtpopulációra vonatkozó feltételezések

- A sejtes viselkedések diszkrét eseményként vannak modellezve, és az események közötti idő exponenciális eloszlást követ.
- Csak életképes sejtek foglalják el a rácsokat; apoptotikus törmelék nem befolyásolja az élő sejteket.
- Dekkers és mtsai. kísérletében [11] szereplő összes sejt vagy tumorsejtnak, vagy T-sejtnak tekinthető. Megjegyzendő, hogy bár a kísérletben $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejteket 1:1 arányban keverték közvetlenül a felvételek elkészítése előtt [11], az egyszerűség kedvéért csak egyetlen T-sejt populációt veszünk figyelembe. Ezeket úgy tekinthetjük, mint amelyek e két alcsoport átlagos tulajdonságait képviselik.

Tumorsejtekre vonatkozó feltételezések

- A tumororganoidok kezdetben nagyjából azonos méretűek, szerkezetük jól közelíthető $4 \times 4 \times 4$ kockákkal. Ezen túlmenően egyes tumorsejtek nem részei az organoidoknak,

és a kezdeti állapotban, a szimulációs térben egyenletesen oszlanak el. Ezt a modellezett [11] kísérlet során is megfigyelhetjük.

- A tumorsejtek a szöveti rácson véletlen bolyongást végeznek, ami egy kontaktus gátolt folyamat.
- Feltételezzük, hogy a kísérlet időtartama annyira rövid, hogy a tumorsejtek nem pusztulnak el spontán módon, vagyis a tumorsejtek pusztulása csak az immunsejteken keresztül valósul meg.

T-sejtekre vonatkozó feltételezések

- A T-sejtek elég kicsik és migrációs képességeik lehetővé teszik számukra, hogy szabadon mozogjanak a tumorsejtek között. Ezért az immunrácsra helyezkednek el.
- A kísérlet [11] kezdetén a T-sejtek még nem hatoltak be az organoidokba. Ezért modellünkben olyan kezdeti feltételt alkalmazunk, amikor a T-sejtek mind a 0. immunsejt osztályba tartoznak, azaz nincsenek tumor szomszédai.
- Feltesszük, hogy a T-sejtek proliferációjának mértéke a felvétel időintervalluma alatt elhanyagolható.
- A T-sejtek súlyozott véletlen bolyongást végeznek az immunrácsra, ami egy kontaktus gátolt folyamat. A T-sejtek mozgását tumor szomszédai száma alapján súlyozzuk, úgy, hogy a több tumor szomszéddal rendelkező T-sejtek kisebb valószínűséggel mozognak.

3.4. A rácson feltöltése

Ahogy a 3.3-as alfejezetben említettük, a tumororganoidokat $4 \times 4 \times 4$ tumorsejt-kockákkal közelítettük. A kezdeti állapotot úgy hozzuk létre, hogy a teljes tumorsejtszámból a lehető legtöbb organoidot elhelyezzük a rácson, majd a fennmaradó tumorsejteket egyedileg, egyenletesen elosztva helyezzük el a fennmaradó térfogatban. Ezután a T-sejteket az immunrácsra helyezzük el úgy, hogy minden T-sejt a 0. immunsejt osztályhoz tartozik.

3.5. Reakciók

Az immunrács beépítésével olyan reakciókat is megvalósíthatunk, amelyek hajlandósági függvényei nem írhatók le a 2.2-es szakaszban bemutatott módon. Ebben a részben azt tárgyaljuk,

hogy hogyan lehet az mRRM hajlandósági függvényeit kiterjeszteni több sejtípusra és két kölcsönható rácra.

Azokra a reakciókra, amelyek két különböző rác sejtjei között zajlanak le rácsközötti reakciókként hivatkozhatunk. Természetesen lehetnek rácsközötti kontaktus serkentett, rácsközötti kontaktus gátolt és rácsközötti kontaktustól független reakciók is. Ha egy reakcióról nem mondjuk explicit módon, hogy rácsközötti, akkor mindig egy nem rácsközötti reakciót értünk alatta.

Bevezetjük az $N_{\delta,j}$ jelölést, amely a j szabad szomszédal rendelkező, δ típusú sejtek számát jelöli, továbbá az $N'_{\delta,j}$ jelölést, amely a j rácsközötti szabad szomszédal rendelkező, δ típusú sejtek számát adja meg. Logikusan N_δ a δ típusú sejtek teljes számát jelöli.

Ezekkel a mennyiségekkel definiálhatjuk a hajlandósági függvényeket:

$$a_\mu = \begin{cases} \frac{r_\mu}{6} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^6 j N_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus gátolt,} \\ \frac{r_\mu}{8} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^8 j N'_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ rácsközötti kontaktus gátolt,} \\ r_\mu \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} N_\delta(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus független,} \\ \frac{r_\mu}{6} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^6 (6-j) N_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus serkentett,} \\ \frac{r_\mu}{8} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^8 (8-j) N'_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ rácsközötti kontaktus serkentett.} \end{cases} \quad (7)$$

Az mRRM-hez hasonlóan a következő τ időintervallumban bekövetkező reakció valószínűsége a következőképpen adható meg:

$$P(R_\mu) := P(R_\mu|\tau) = \frac{a_\mu}{a}. \quad (8)$$

Ugyanezt a stratégiát alkalmazzuk a $P(R_{\mu,\delta}|R_\mu)$ valószínűség meghatározására, amely annak valószínűsége, hogy egy adott típusú sejtre esik a választás, ha a reakció indexe (μ) már ismert. Jelölje $a_{\mu,\delta}$ annak a valószínűségi függvénynek az értékét, hogy egy μ indexű reakció δ típusú sejten következik be. Ez alapján a valószínűség a következőképpen számolható:

$$P(R_{\mu,\delta}|R_\mu) = \frac{a_{\mu,\delta}}{a_\mu}. \quad (9)$$

Hasonlóan, annak a valószínűsége, hogy egy j -osztályú sejt esetében történik a reakció, ha a

reakció indexe μ és a sejt típusa δ adott, a következőképpen adható meg:

$$P(R_{\mu,\delta,j}|R_{\mu,\delta}) = \frac{a_{\mu,\delta,j}}{a_{\mu,\delta}}. \quad (10)$$

Így bármely A esemény τ idő múlva való bekövetkezésének valószínűsége a következőképpen írható fel:

$$P(A|\tau) = \begin{cases} \frac{1}{j \cdot N_{\delta,j}} P(R_{\mu,\delta,j}|R_{\mu,\delta}) P(R_{\mu,\delta}|R_{\mu}) P(R_{\mu}) & \text{ha } R_{\mu} \text{ kontaktus gátolt,} \\ \frac{1}{j \cdot N'_{\delta,j}} P(R_{\mu,\delta,j}|R_{\mu,\delta}) P(R_{\mu,\delta}|R_{\mu}) P(R_{\mu}) & \text{ha } R_{\mu} \text{ rácsközötti kontaktus gátolt,} \\ \frac{1}{N_{\delta,j}} P(R_{\mu,\delta,j}|R_{\mu,\delta}) P(R_{\mu,\delta}|R_{\mu}) P(R_{\mu}) & \text{ha } R_{\mu} \text{ kontaktus független,} \\ \frac{1}{(6-j) \cdot N_{\delta,j}} P(R_{\mu,\delta,j}|R_{\mu,\delta}) P(R_{\mu,\delta}|R_{\mu}) P(R_{\mu}) & \text{ha } R_{\mu} \text{ kontaktus serkentett,} \\ \frac{1}{(8-j) \cdot N'_{\delta,j}} P(R_{\mu,\delta,j}|R_{\mu,\delta}) P(R_{\mu,\delta}|R_{\mu}) P(R_{\mu}) & \text{ha } R_{\mu} \text{ rácsközötti kontaktus serkentett.} \end{cases} \quad (11)$$

Itt μ , δ és j az A esemény által meghatározott értékek. Ezek alapján minden esemény valószínűsége kiszámítható. Ehhez elegendő lenne egyszer mintát venni ebből az eloszlásból, de ez rendkívül erőforrásigényes feladat lenne a lehetséges események nagy száma miatt. Ezért marginalizáljuk a valószínűségeket és inkább több kisebb eseményterű eloszlásból mintavételezünk.

Az egyes marginalizált valószínűségek kiszámításához szükség van $a_{\mu,\delta}$ értékére, amely annak az eseménynek a hajlandóságát jelzi, hogy az R_{μ} reakció egy δ típusú sejten következik be:

$$a_{\mu,\delta} = \begin{cases} r_{\mu} c_{\mu,\delta} N_{\delta}(t) & \text{ha } R_{\mu} \text{ kontaktus független,} \\ \sum_{j=0}^6 a_{\mu,\delta,j} & \text{ha } R_{\mu} \text{ nem rácsközötti,} \\ \sum_{j=0}^8 a_{\mu,\delta,j} & \text{ha } R_{\mu} \text{ rácsközötti.} \end{cases} \quad (12)$$

és szükség van $a_{\mu,\delta,j}$ -re, amely a μ indexű reakció egy δ típusú és j osztályba tartozó sejten

történő bekövetkezésének hajlandósága:

$$a_{\mu,\delta,j} = \begin{cases} \frac{r_\mu}{6} c_{\mu,\delta} j N_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus gátolt,} \\ \frac{r_\mu}{8} c_{\mu,\delta} j N'_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ rácsközötti kontaktus gátolt,} \\ \frac{r_\mu}{6} c_{\mu,\delta} (6-j) N_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ kontaktus serkentett,} \\ \frac{r_\mu}{8} c_{\mu,\delta} (8-j) N'_{\delta,j}(t) & \text{ha } R_\mu \text{ rácsközötti kontaktus serkentett.} \end{cases} \quad (13)$$

A kontaktus független reakciók hajlandóságait a (12) képletben külön definiáljuk, mivel ezek esetében a szabad szomszédok száma definíció szerint nem releváns. A rácsközötti reakciók képletei csak abban különböznek a nem rácsközötti reakcióktól, hogy maximálisan 8 szabad szomszédot feltételeznek, és $N'_{\delta,j}$ -ot használnak $N_{\delta,j}$ helyett.

Öt reakciót definiáltunk, amelyek hajlandóságai megfelelnek az (7)-es képlet valamely esetének. Fontos megemlíteni, hogy a Kölcsönható Rácsok Módszere egy általános megközelítés, ami a fent leírtak szerint képes a mindkét rácson tetszőleges számú immun- vagy szöveti sejtípust figyelembe venni. Jelen alkalmazásunk azonban rácsonként csak egy-egy sejtípus veszünk figyelembe, valamint minden reakció kizárólag csak az egyik sejtípusra lesz jellemző. Mindezek alapján a sejtípus konstansok használata fölöslegessé válik.

1. *Osztódás*: kontaktus gátolt reakció, hiszen a szabad szomszéd nélküli sejtek nem osztódhatnak. Továbbá, a 3.3-as alfejezet feltételezései alapján a T-sejtek proliferációját elhanyagoljuk, ezért ez kizárólag tumorsejtekre jellemző reakció.
2. *Véletlen Bolyongás*: ugyanazon megfontolás alapján, mint az Osztódás, ez is kontaktus gátolt reakció, mely szintén kizárólag tumorsejtekre jellemző.
3. *Apoptózis*: programozott sejthalál, sejten belüli- vagy kívüli tényezők hatására. A korábban már említett (3.3) feltételezéseinknek megfelelően a tumorsejtek ellenállóak ezekkel a tényezőkkel szemben, ezért ez kizárólag T-sejtekre jellemző reakció. Bár *in vivo* tumorok esetében a sejthalál oka (akár tumorsejtek akár szöveti sejtek esetében) gyakran az erőforrások szűkössége, ahol a szomszédok száma jelentősen befolyásolná a sejthalál valószínűségét (és kontaktus serkentett reakcióként lenne helyénvaló modellezni), itt kontaktus független folyamatnak tekintjük, mivel feltesszük, hogy ezek a hatások a vizsgált laboratóriumi környezetben elhanyagolhatóak.

4. *Súlyozott Véletlen Bolyongás*: a T-sejtek mozgását reprezentálja, és modellezi, hogy képesek a tumor organoidokon lehorgonyozni és akár több tumorsejtet is megölni mielőtt újra eltávolodnak [11]. A T-sejteket a szomszédos tumorsejtek száma alapján differenciálva választjuk ki a mozgásra. A súlyozás a sejtválasztás lépésében történik: azok az immunsejtek, amelyeknek 8 tumorszomszédjuk van, $\frac{1}{9}$ eséllyel kerülnek kiválasztásra azokhoz képest, akiknek 0 tumorszomszédjuk van. A köztes értékek természetes módon súlyozódnak, például 5 tumorszomszédossal rendelkező T-sejtek súlyozási tényezője $\frac{4}{9}$.
5. *Citolízis*: kizárólag a T-sejtek citotoxikus képességét reprezentálja a tumorsejtekkel szemben, ezért értelemszerűen kizárólag T-sejtekre jellemző reakció. Mivel a T-sejtek citotoxikus aktivitása immunsejt-tumorsejt kontaktust igényel, ezt a reakciót rácsközötti kontaktus serkentett reakciónak tekinthetjük. Megjegyezzük, hogy egy T-sejt, amelynek j szabad rácsközötti szomszédja van, pontosan $8 - j$ rácsközötti tumorszomszédossal rendelkezik. Ha több sejttípus lenne a szöveti rácson, tovább kellene bővíteni ezt a keretet olyan reakciókra, amelyek nem csak a rácsközötti szabad szomszédok számát veszik figyelembe, hanem sejttípus-specifikusan a rácsközötti szomszédokat is.

Reakció	Kontaktusfüggőség	Hajlandósági függvény	Jellemző sejttípus
Osztódás	Kontaktus gátolt	$\frac{r_\mu}{6} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^6 j N_{\delta,j}(t)$	Tumor
Véletlen Bolyongás	Kontaktus gátolt	$\frac{r_\mu}{6} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^6 j N_{\delta,j}(t)$	Tumor
Apoptózis	Kontaktus független	$r_\mu \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} N_\delta(t)$	T-sejt
Súlyozott Véletlen Bolyongás	Kontaktus gátolt	$\frac{r_\mu}{6} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^6 j N_{\delta,j}(t)$	T-sejt
Citolízis	Rácsközötti kontaktus serkentett	$\frac{r_\mu}{8} \sum_{\delta=1}^D c_{\mu,\delta} \sum_{j=0}^8 (8-j) N'_{\delta,j}$	T-sejt

1. táblázat. A reakciók összefoglalása, kontaktusfüggőségük, megfelelő hajlandósági függvényeik és sejttípus konstansaik.

3.6. Szimulációs lépések

1. Inicializálás:

- (a) Állítsuk az időváltozót $t = 0$ -ra, és írjuk elő a leállási feltételt.

(b) Inicializáljuk a szöveti rácsot $n_1 \times n_2 \times n_3$ mérettel. Helyezzünk el a δ szöveti sejtípusból $N_\delta(0) \leq n_1 \cdot n_2 \cdot n_3$, $\delta = 1, 2, \dots, \alpha$, $\sum_{\delta=1}^{\alpha} N_\delta(0) \leq n_1 \cdot n_2 \cdot n_3$ sejtet a szöveti rácsra, és tároljuk a pozícióikat.

(c) Inicializáljuk az immunrácsot $(n_1 + 1) \times (n_2 + 1) \times (n_3 + 1)$ mérettel. Helyezzünk el a δ immunsejt típusból $N_\delta(0) \leq (n_1 + 1) \cdot (n_2 + 1) \cdot (n_3 + 1)$, $\delta = \alpha + 1, \alpha + 2, \dots, D$, $\sum_{\delta=\alpha+1}^D N_\delta(0) \leq (n_1 + 1) \cdot (n_2 + 1) \cdot (n_3 + 1)$ sejtet az immunrácsra, és tároljuk a pozícióikat.

(d) Tároljuk a kémiai anyagok kezdeti mennyiségeit.

2. Hajlandóságok kiszámítása:

Számítsuk ki az a_μ értékeket a (7)-es egyenlet alapján. Ha a hajlandóságok összege nulla, állítsuk le az algoritmust.

3. Eltelt idő generálása:

Számítsuk ki τ -t egy $a = \sum_{\mu=1}^M a_\mu$ paraméterű exponenciális eloszlásból mintavételezve.

4. Reakció kiválasztása:

Válasszuk ki az R_μ reakciót a (8)-as egyenlet alapján.

5. Célsejt kiválasztása:

(a) Válasszuk ki a sejtípust, δ -t, a (9)-es egyenlet alapján.

(b) Válasszuk ki a sejtosztályt, j -t, a (10)-es egyenlet alapján.

(c) Válasszuk ki a célsejtet egyenletes eloszlás szerint az adott sejtosztályból és sejtípusból. Kivéve a Súlyozott Véletlen Bolyongás esetében, ahol az eloszlás a 4-es alfejezetben leírtak szerint történik.

(d) Ha a reakció egy szomszédos cellát érint, válasszuk ki a célszomszédot diszkrét egyenletes eloszlás szerint.

6. Végrehajtás:

(a) Idő frissítése: $t = t + \tau$.

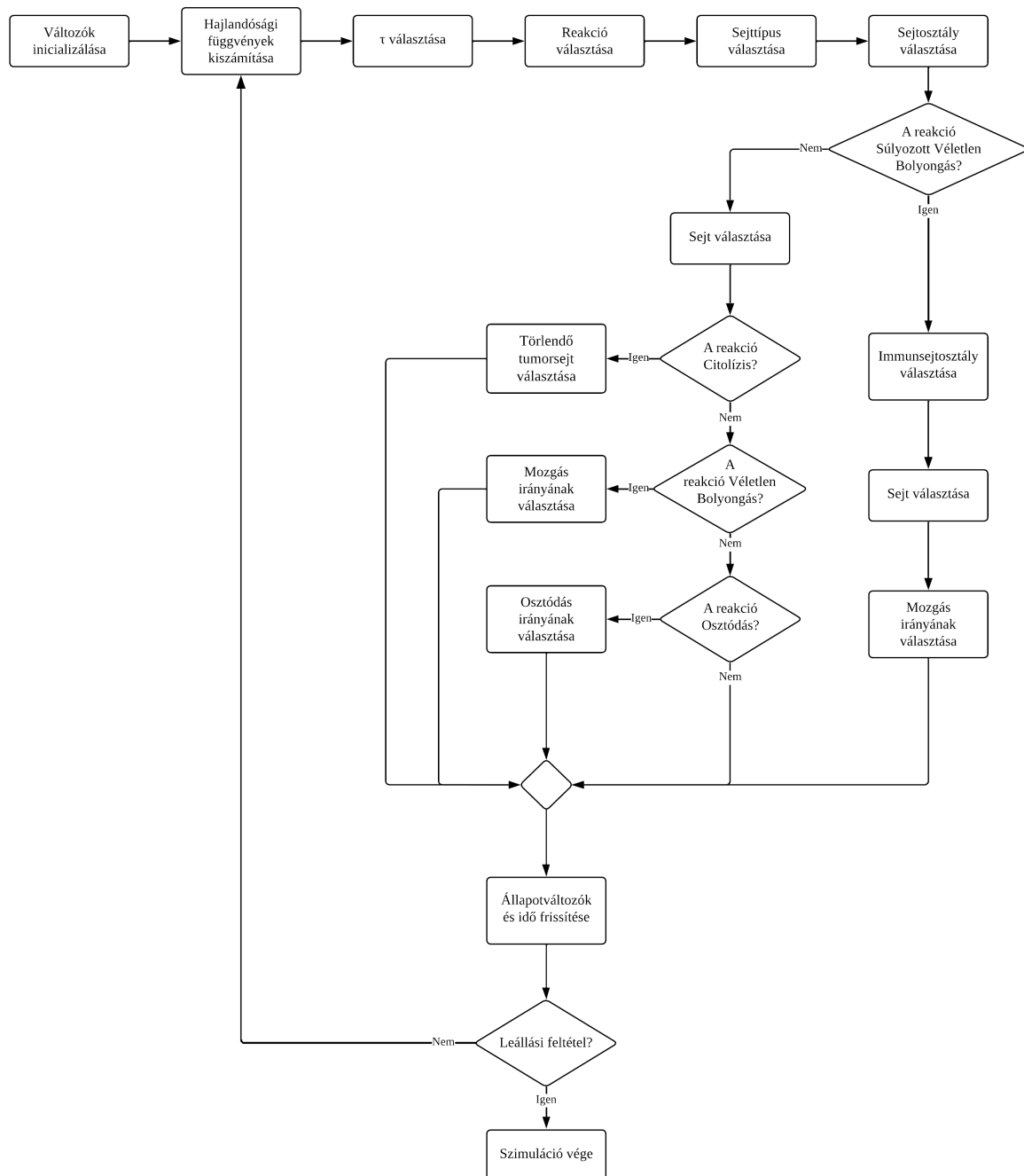
(b) Hajtsuk végre az R_μ reakciót a kiválasztott cellán.

(c) Frissítsük az állapotváltozókat.

7. Leállási feltétel ellenőrzése:

Ha a leállási feltétel teljesül, állítsuk le az algoritmust; különben ismételjük a 2. lépéstől.

A fent leírt algoritmus folyamatábrája az 5. ábrán látható.



5. ábra. A Kölcsönható Rácsok Módszerének folyamatábrája

4. Implementáció

A szimulációs programot C++ nyelven fejlesztettük objektumorientált megközelítéssel. A szimulációs szoftver mellett számos eszközt implementáltunk az adatok feldolgozására és vizualizálására. A szimulációs eredmények megfelelő értelmezhetőségének és kommunikációjának érdekében egy Python programot hoztunk létre az események időbeli lefolyásának nyomon követésére és hőterképek generálására. Ehhez létrehoztunk egy kezdetleges Python könyvtárat, amely az összeköttetést megvalósítja. Azért választottuk ezt a megoldást az adatok vizualizálására, mert a jövőben célunk a keretrendszert publikusan is elérhetővé tenni Python könyvtár formájában. Ezenkívül egy 3D-s vizualizáló alkalmazást is fejlesztettünk Unity-ben, amely intuitívabbá teszi az eredmények értelmezését.

A kód lényegében három fő részből áll: a matematikai modell implementációja, a futásidejű adatstruktúrák, az SSA-alapú szimulációs komponens, valamint egyéb segédeszközök, mint például az adatok fájlokba mentését végző modul.

4.1. A matematikai modell megvalósítása

4.1.1. Sejtek

A sejteket a `Cell` osztály példányaival reprezentáljuk. Minden sejt tárolja a típusát, amelyet egy `enum` határoz meg, valamint a rácson elfoglalt koordinátáit. Ahogyan a 3.2-es alfejezetben említettük, ezek a koordináták nemcsak az x, y és z pozíciókat tartalmazzák, hanem egy negyedik dimenziót is, amely lehetővé teszi annak meghatározását, hogy a sejt a szövet- vagy az immunrácon helyezkedik el. Ezenkívül minden sejt tárolja az indexét az adott `PreAllocVector`-ban, ami egy adott szabad szomszéd számhoz tartozik.

A `PreAllocVector` egy sajátkészítésű osztály, amely előre allokkált memóriában tárolja a sejteket, és automatikusan defragmentálja az adatokat, lehetővé téve a konstans idejű hozzáférést/törlést és elérést indexelés alapján. Az `ImmuneCell` osztály a `Cell` osztályból származik, és az előbbieken túl tárolja a szomszédos tumorsejtek számát, valamint az ennek megfelelő `PreAllocVector`-ban elfoglalt indexét.

4.1.2. Reakciók

Minden reakciót egy osztály reprezentál, amely tartalmazza a `GetPropensity` és az `Effect` tagfüggvényeket. Ezeket az osztályokat a szimuláció kezdetén példányosítjuk a megfelelő re-

akciós állandók megadásával.

A `GetPropensity` függvények a 3.5-ös szakaszban ismertetett állapot alapján kiszámítják az adott reakció hajlandóságát. Az algoritmus minden iterációjában a szimulációs komponens meghívja ezeket a függvényeket az összes reakcióhoz, és eltárolja az eredményeket, hogy ennek megfelelően válassza ki a következő eseményt.

Miután a kiválasztás megtörtént, a szimulációs komponens meghívja a megfelelő reakció `Effect` függvényét, amelynek paraméterként átadja a szükséges adatokat, például azt, hogy melyik sejtet kell végrehajtani a reakciót, vagy Súlyozott Véletlen Bolyongás esetén melyik szomszédos helyre kell mozgatni a sejtet. Ezek a függvények lényegében két dolgot tesznek: sejtet törölnek vagy létrehoznak. Az összes reakció ezek kombinációja. Az `Apoptosis` (Apoptózis), `Division` (Oszródás) és `Cytolysis` (Citolízis) reakciók mindegyike ezek közül az egyik műveletet valósítja meg. A `Random Walk` (Véletlen Bolyongás) és a `Biased Random Walk` (Súlyozott Véletlen Bolyongás) reakciók esetén a kiválasztott sejtet töröljük, és egy újat helyezünk a kijelölt szomszédos helyre, így ez megvalósítását tekintve egy `Division` és egy `Apoptosis` kombinációjának tekinthető.

4.2. Futásidejű adatstruktúrák

A futásidő alatt két fő adatstruktúrát használunk: a `Lattice`-t és a `Cells`-t, amelyeket ebben a szakaszban részletezünk. Ezek az adatstruktúrák, a szimuláció során eltelt idő, valamint az ezek frissítéséhez szükséges függvények a `State` osztályban vannak elhelyezve.

4.2.1. A `Lattice`

A `Lattice` osztály egy háromdimenziós rácsot definiál, ahol a tér cellaméretű egységekre van osztva egymásba ágyazott `std::vector`-ok segítségével. A legbelső `std::vector`-ok elemei az általunk létrehozott `Slot` (Cella) osztály példányai, amelyek tárolják a szabad szomszédok számát, valamint egy mutatót az adott koordinátán található sejthez. Mivel a cellákat és így a sejteket is koordináták alapján kérdezzük le, az adatok elérési ideje ebben a struktúrában konstans.

A `Lattice` osztály az adatokat tároló komponensek mellett tartalmazza az adatok módosításához és az jelenlegi állapot lekérdezéséhez szükséges függvényeket és túlterhelt operátorokat, például a `DeleteCell()`, `AddCell()` és `GetTumorNeighbors()` függvényeket. Ezek a metódusok biztosítják, hogy az egységbe zárás elve érvényesüljön a tagváltozók esetében.

4.2.2. Cells

A második adatstruktúra a sejtek tárolására szolgál. A hajlandóságok kiszámításához az egyes sejtípusokba tartozó sejtek számára, valamint az adott sejt szabad és tumor szomszédjainak számára van szükség, így érdemes olyan adatstruktúrát választani, amelyben ezek gyorsan lekérdezhetők. Fontos továbbá, hogy a sejtek törlése és hozzáadása hatékony legyen, mivel ezek a műveletek szinte minden reakció részét képezik.

A szimuláció során a program nem igényel nagy memória-területet; azonban a futási idő kritikus, ezért a sejtek redundáns tárolása egy kézenfekvő opció. Az egyes sejtípusokat a szabad szomszédjaik száma szerint rendeztük, az immunsejteket pedig a tumor szomszédjaik száma szerint. Mindkét esetben először a sejtípust tároljuk egy `std::unordered_map`-ben, majd a szabad/tumor szomszédok száma szerint egy `std::vector`-ban, és a legbelső szinten `PreAllocVector`-okat használunk.

4.3. Szimulációs komponens

Létrehoztunk egy `Simulation` osztályt, amely az eddig bemutatott komponensek mellett tartalmazza a kommunikációjukhoz és a szimuláció futtatásához szükséges függvényeket és változókat.

Fontos megjegyezni, hogy amikor a `Simulation` osztály egy példányát inicializáljuk, a megadott `State` példány másolásra kerül, hogy biztosítsuk, hogy a szimuláció minden realizációja ugyanabból a kezdeti állapotból induljon.

A megvalósítás során nagy hangsúlyt fektettünk a futási idő optimalizálására azzal, hogy minden adatstruktúránál biztosítottuk az elemek konstans idejű elérését, hozzáadását és törlését. Bár a futási idő nagyban függ a megadott paraméterektől, a kísérletes adatokkal meghatározott értékekhez közeli paraméterek mellett egyetlen szimuláció kevesebb mint 5 másodpercig tart.

Egy másik fontos fejlesztés a párhuzamosítás volt. Mivel az adatok elemzése szinte mindig több szimulációs futtatás eredményeinek átlagolását igényelte, logikus lépés volt a párhuzamosítás implementálása a szimulációs szinten. Ez a megközelítés csökkentette az összesített futási időt, és lehetővé tette az eredmények hatékonyabb elemzését.

5. Paraméterbecslés kísérleti adatok felhasználásával

Modellünket kísérleti adatokhoz illesztettük, hogy meghatározzuk az *in silico* szimulációk futtatásához szükséges paramétereket, és igazoljuk, hogy megközelítésünk képes rekonstruálni a tumor–immun interakció időbeli dinamikáját.

5.1. A kísérleti elrendezés

A validációs adatsor létrehozásához Dekkers és mtsai. [11] által publikált, betegből izolált tumor organoid – T-sejt társtenyészetekeket vizsgáló fluoreszcens mikroszkópiás adatokat használtunk fel. A kísérlet részleteit ebben az alfejezetben mutatjuk be röviden. Ebben a tanulmányban több kísérletet is végeztek különböző módosított T-sejtekkel és tumor organoidokkal. Mi az eredeti cikkben T-sejt viselkedési térképek létrehozásához használt adatokból négy különböző T-sejt – izolált organoid kombináció felvételeit dolgoztuk fel.

5.1.1. T-sejtek

Az emberi perifériás vérből származó vad típusú $\alpha\beta$ TSR pozitív T-sejteket virális transzdukciónal módosították, hogy kifejezzenek $V\gamma9V\delta2$ TSR-eket, de $\alpha\beta$ TSR-eket ne [8]. A $V\gamma9V\delta2$ TSR-ek, amelyek egyfajta kiméra antigén receptorok, segítik a $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejteket a daganatokra jellemző metabolikus eltérések felismerésében, ezáltal növelve hatékonyságukat [9]. Ezeket a $V\gamma9V\delta2$ TSR⁺ T-sejteket az angol szakirodalom alapján [8] mi is TEG-eknek nevezzük.

Egy másik vad típusú T-sejt csoportot úgy módosítottak, hogy kifejezzenek egy funkció vesztett, defektív $V\gamma9V\delta2$ TSR-t. Ezeket a T-sejteket LM1-nek nevezzük. Mindkét típust a virális transzdukciónal után legalább 90%-os tisztaságig tisztították mágneses szeparációval.

5.1.2. Tumor organoidok

Bazális membrán kivonatban növesztettek organoidokat 14 beteg emlőrák biopsziájából, 12 lyukú lemezen. Az organoidokat, melyekkel később a T-sejt társtenyészetekeket létrehozták a 5-30. passzálások valamelyikéből nyerték vissza.

A 14 mintából létrehozott organoid – TEG társtenyészetekekben mérték a TEG-ek organoidokkal szembeni citotoxikus hatását. A legmagasabb relatív organoid pusztulás a 13T kódú mintában volt, a 100T kódú minta pedig ebben a tekintetben a harmadik legalacsonyabb volt a

vizsgált minták közül. Ebből a két mintából létrehozott organoidokat használták később a 2-es táblázatban felsorolt felvételek létrehozásához, amiket jelen kutatásunkhoz felhasználtunk.

5.1.3. Képalkotási paraméterek

Az izolált organoid – T-sejt társtenyészeteiket egy üvegfenekű 96 lyukú lemezen helyezték el, és három különböző hullámhosszon (T-sejtek, organoidok, apoptotikus sejtek) készítettek felvételeket 620 képkockán keresztül, képkockánként 2 perc különbséggel. Minden képkocka 48 darab 208×208 pixeles síkból áll, amelyek megfelelnek egy fizikai térbeli téglatest alakú képalkotási térfogatnak, amelynek oldalméretei rendre $708,49\mu m$, $708,49\mu m$ és $50,40\mu m$ az X, Y és Z irányokban. Az összesített képalkotási térfogat tehát 2076672 háromdimenziós pixel egység, azaz $25298687,24\mu m^3$ fizikai térben.

5.2. Adatgyűjtés

A vizsgálatban[11] használt viselkedési térképek létrehozásához nyers mikroszkópiás adatok nyilvánosan elérhetők [24]. Összesen 22 fájl érhető el, ezek közül 4-et használtunk, amelyek fájlneveit a 2-es táblázat tartalmazza. A CZI adatokat a `pylibCZIr` Python könyvtár segítségével dolgoztuk fel.

Fájlnev	Tumor organoid	T-sejt
20190711_13T100TLM1TEG100%(0).czi	13T	LM1
20190711_13T100TLM1TEG100%(1).czi	100T	LM1
20190711_13T100TLM1TEG100%(2).czi	13T	TEG
20190711_13T100TLM1TEG_100%(3).czi	100T	TEG

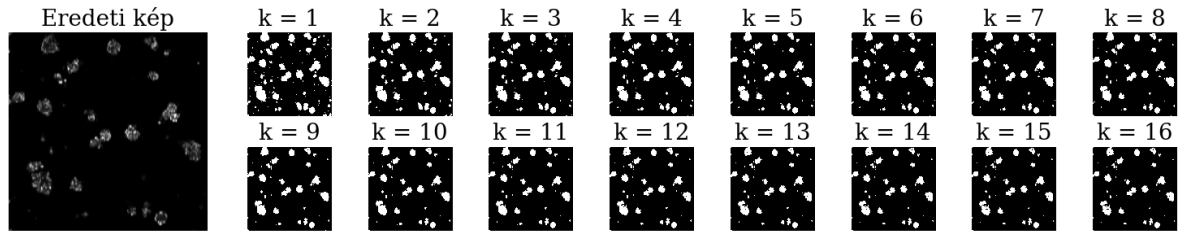
2. táblázat. **Nyers adatok forrásai.** Fájlnev és sejtvonalak a Dekkers és mtsai. [11] kiegészítő anyagából.

5.2.1. Konverzió bináris tömbbé

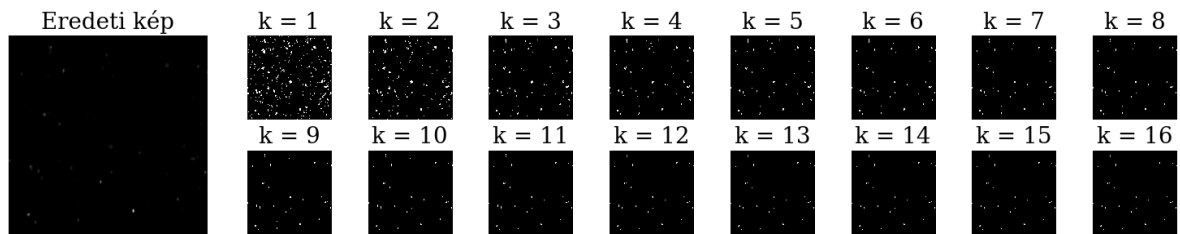
A pixelek értékei fluoreszcencia intenzitást jelölnek, amely 0 és 255 közötti értékeket vehet fel. Bár egy egyszerű szegmentálással meghatározható, hogy mely pixelek tartoznak sejtekhez, a pontos sejtszám becslése egy komplex képszegmentációs feladat, amely túlmutat-e tanulmány keretein. Ezért a kísérlet és a szimuláció összehasonlításakor a sejtek által elfoglalt térfogat és a teljes térfogat arányát vettük alapul.

Annak meghatározására, hogy egy adott pixel foglalt-e vagy sem, egy fluoreszcencia intenzitás küszöb értéket alkalmaztunk, amit k -val jelölünk. Ha az adott pixel értéke meghaladja a

küszöböt vagy azonos vele, foglaltnak tekintjük; ha alatta van, üresnek. A küszöbértéket heurisztikusan 7-nek határoztuk meg. Különböző küszöbértékekkel végzett kísérletezés alapján (6. és 7. ábra) azt választottuk, amely a legjobban megtartja a sejtek által elfoglalt részeket, miközben elveti a nyilvánvalóan nem életképes sejtekhez tartozó jeleket.



6. ábra. A küszöbérték, k hatása a binarizálásra és az eredeti fluoreszcencia intenzitású kép összehasonlítása tumor organoidok (13T) esetén. Az ábrák a térfogat középső szeletét (Z-sorozat 25. elemét) mutatják a $t = 0$ időpillanatban.



7. ábra. A küszöbérték, k hatása a binarizálásra és az eredeti fluoreszcencia intenzitású kép összehasonlítása T-sejtek (TEG) esetén. Az ábrák a térfogat középső szeletét (Z-sorozat 25. elemét) mutatják a $t = 0$ időpillanatban.

Ezután idősorokká alakítottuk az adatokat a sejteket tartalmazó pixelek arányának kiszámításával. Ezeket az idősorokat használtuk referenciaadatként a modellparaméterek becsléséhez a 6. fejezetben.

5.3. Szimulált és kísérleti adatok összehasonlítása

5.3.1. Időbeli diszkretizáció és lineáris interpoláció

A szimuláció időben folytonos, mivel két reakció között eltelt időt exponenciális eloszlásból választjuk. Ahhoz, hogy összehasonlítható legyen a kísérleti adatokkal, minden percben mintát vettünk a sejtpopuláció jelenlegi számáról 20 óra és 40 percen keresztül, így összesen 1240 adatpontot kaptunk sejtípusonként.

Mivel a kísérletekben a felvételek szintén 20 óra és 40 perc alatt készültek, de csak 2 percenként, az így kapott adatokat lineáris interpolációval bővítettük, hogy szintén 1240 adatpontot kapjunk sejtípusonként.

5.3.2. A rendszer kezdeti állapotának meghatározása

A szimuláció kezdeti állapotának meghatározásához szükség van a szimulálandó térfogatra, a rács oldalhosszaira és a $t = 0$ időpontban elhelyezendő sejtek számára sejtípusonként.

A tumorsejteket és T-sejteket tartalmazó pixelek számát az adatokból ki lehet nyerni, így hozzávetőleges térfogatuk is kiszámítható. Mivel szimulációnk az egész teret azonos (sejtméretű) részekre osztja, nem veszi figyelembe az azonos típusú sejtek közötti térfogat- és alakbeli különbségeket. Ezen egyszerűsítések miatt a tumorsejtek [22] és T-sejtek [23] irodalmi átlagos térfogatát használtuk, amelyek rendre $3262\mu m^3$ és $131\mu m^3$. A sejtek kezdeti számát úgy becsültük, hogy a sejtek által elfoglalt térfogatot elosztottuk egyetlen sejt átlagos térfogatával.

Végül meg kell határozni a teljes szimulált terület oldalhosszait. Mivel szimulációnkban a tumorsejtek a szövetrács egyes celláiban helyezkednek el, a tumorsejtek méreteit vettük figyelembe. A teljes fizikai térfogatot elosztottuk egy tumorsejt átlagos méretével, hogy megbecsüljük a rácson elhelyezhető sejtek maximális számát. A képek oldalhosszainak és Z-sorozatának arányait megőrizve azt találtuk, hogy a rácsnak $44 \times 44 \times 4$ -esnek kell lennie.

5.3.3. Sejtsűrűségek összehasonlítása

Amint azt az 5.2-es szakaszban említettük, a sejtek által elfoglalt térfogat arányát hasonlítottuk össze a kísérletbeli vagy szimulált teljes térfogathoz. Ezt a szimulációban jelen lévő tumor- és T-sejtek számának megszámlálásával kaptuk meg minden időpontban, majd megszoroztuk az átlagos sejtmérettel. Végül az így kapott térfogatosokat elosztottuk a teljes szimulált térfogattal.

5.4. Minimalizáló algoritmusok

A `scipy.optimize` könyvtárat használtuk függvényillesztéshez, mivel könnyen kezelhető és széles körű minimalizáló algoritmus tárházat biztosít.

5.4.1. A minimalizálandó függvény meghatározása

A kísérleti T-sejt és tumorsejt idősorokat a szimulációból származó megfelelő idősorokhoz egyidejűleg illesztettük. A minimalizálandó függvény a megfelelő idősorok relatív négyzetes hibája:

$$\text{RSE}(\theta) = \sum_{i=0}^k \left(\frac{y_{\text{exp}}[i] - y_{\text{sim}}[\theta, i]}{y_{\text{exp}}[i]} \right)^2 + \sum_{i=0}^k \left(\frac{x_{\text{exp}}[i] - x_{\text{sim}}[\theta, i]}{x_{\text{exp}}[i]} \right)^2,$$

ahol θ a módosítandó paraméterek vektora, $RSE(\theta)$ a relatív négyzetes hiba, k az adatpontok száma, $y[i]$ és $x[i]$ a tumor- és T-sejtek száma az i -edik időpontban, rendre. Az *exp* alsóindex a kísérleti, míg a *sim* a szimulált értékeket jelöli.

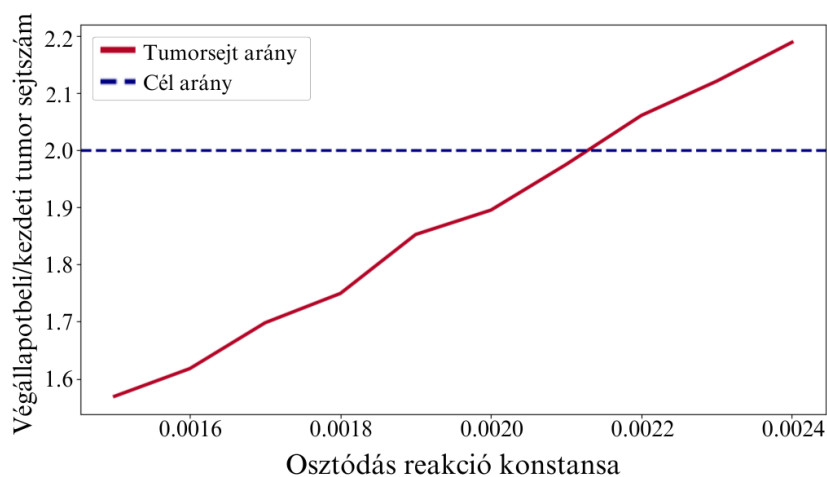
5.4.2. Rögzített paraméterek

A minimalizálás felgyorsítása és a kísérleti megfigyelések rekonstruálására alkalmas paraméterek meghatározása érdekében bizonyos állandókat rögzítettünk.

Lodish klasszikus könyve [25] szerint a proliferáló tumorsejtek hozzávetőlegesen naponta egyszer osztódnak. Bár ilyen konstans nem szerepel közvetlenül a matematikai modellben, megkereshetjük azt az állandót az osztódási reakcióhoz, amely a sejtpopuláció 24 órán belüli megduplázódásához vezet. Meg kell jegyezni, hogy a hosszútávon a sejtek osztódási hajlandóságát nagymértékben befolyásolja a mozgási rátájuk. Ennek oka, hogy az osztódás egy kontaktus gátolt reakció; azaz minél több szomszédja van egy sejtnak, annál kisebb az osztódás valószínűsége. A Véletlen Bolyongás rátájának növelésével a sejtek idővel egyenletesebben oszlanak el a rácson, ellentétben a kezdeti klaszterezett elrendezéssel. Ezért nemcsak az osztódási reakcióhoz tartozó paramétert keressük, hanem egy Véletlen Bolyongás-Osztódás paraméterpárt. Megfigyeltük, hogy több ilyen paraméterpár is eredményezheti azt, hogy a sejtek naponta egyszer osztódjanak. Ezért azt választottuk, amelyik kvalitatívan reprodukálja a kísérleti adatsorban megfigyelhető tendenciákat a sejtek elrendeződési mintázatait (értsd. fragmentáltság, klasztereződés) tekintve.

A 8. ábra az Osztódás paraméterének 0,0015 és 0,0024 közötti változtatásának hatását szemlélteti a Véletlen Bolyongás valószínűségét szabályozó paraméter 0,001-en való rögzítése mellett. Mind a 10 paraméterértéknél 100 szimulációt futtattunk, az eredményeket átlagoltuk, és kiszámítottuk a tumorsejtek számának arányát $t = 1440min = 24h$ időpontban $t = 0$ -hoz képest (azaz t_{1440}/t_0). Az Osztódás konstans értékeit az x -tengelyen, a számított arányokat a y -tengelyen tüntettük fel. A szimulációk eredményéből arra következtethetünk, hogy a Véletlen Bolyongás-Osztódás paraméterpár 0,001 és 0,0021 értéknél a tumorsejtek átlagos osztódási rátája eléri a napi egy osztódást ($1/1440$).

Végül a 3. táblázat mutatja be a szimulációk során használt reakció- és sejttípus konstansokat, valamint azt, hogy a minimalizáló algoritmus módosíthatta-e ezeket. Az Apoptózis paraméterét rögzítettük, bár volt egy kísérlet, ahol szükség volt a módosítására, amint azt részletesen tárgyaljuk a 6.3.2. szakaszban.



8. ábra. **Az Osztódás reakció konstansának meghatározása.** Annak érdekében, hogy elérjük a Loidish könyvében [25] leírt tumorsejt osztódási rátát, miszerint egy tumorsejt átlagosan naponta egyszer osztódik, meghatározzuk az Osztódás reakció konstansát, amelynél a tumorsejtek 24 órán belül megduplázódnak. Mivel az Osztódás kontaktus gátolt reakció, a teljes populációra vett valószínűsége nagymértékben függ a tumorsejtek rendelkezésére álló szabad szomszédos helyeinek számától, így közvetve a Véletlen Bolyongás paraméterétől is. Ezen megfontolások alapján a Véletlen Bolyongás konstansát 0,001 értéken rögzítjük.

Reakció	Rögzített vagy szabad	Reakció konstans	Jellemző sejttípus
Osztódás	Rögzített	0,0021	Tumor
Véletlen Bolyongás	Rögzített	0,001	Tumor
Apoptózis	Kézzel illesztett	0,0001 vagy 0,001	T-sejt
Súlyozott Véletlen Bolyongás	Szabad	-	T-sejt
Citolízis	Szabad	-	T-sejt

3. táblázat. **A használt paraméterek értékei.** A táblázat összefoglalja a szimulációk során lehetséges reakciókat, valamint a reakció- és sejttípus konstansok értékeit. A második oszlop kiemeli, hogy mely reakció konstansokat módosíthatta az optimalizációs algoritmus az adatillesztési folyamat során, és melyeket rögzítettük más módszerekkel. Ebben a kontextusban a *kézzel illesztett* azt jelenti, hogy az adott konstans kezdetben rögzítve volt, de manuálisan kellett módosítani, hogy igazodjon egy T-sejt mortalitásában jelentősen eltérő trendet mutató adatsorhoz.

5.4.3. Az alkalmazott minimalizáló módszerek

Minimalizáló algoritmusok kiválasztásakor figyelembe kellett venni, hogy a minimalizálandó függvény sztochasztikus természetű. Aszimptotikus megoldás csak akkor érhető el, ha az átlagolt trajektóriák száma (n) a végtelenhez tart. Véges n esetén azonban nem garantált, hogy a paramétertér két egymáshoz közeli pontjának kimenete is közel esik egymáshoz. Továbbá szükségünk volt olyan módszerekre, amelyek lehetővé teszik a határok közötti keresést, mivel például negatív konstansok negatív hajlamértékeket és ennek következtében értelmetlen negatív valószínűségeket eredményeznének. Ezen megfontolások alapján a következő minimalizáló algoritmusokat használtuk: Globális minimum keresésére a **Differenciális Evolúció**, **Direct** és **Dual Annealing** módszereket alkalmaztuk, lokális minimum keresésére pedig a **Powell** és **Nelder-Mead** módszereket.

6. Eredmények

Ebben a szakaszban bemutatjuk a 5. szakaszban ismertetett módon illesztett modellparamétereket, az ezekkel a paraméterekkel végzett szimulációkat és kiemelünk néhány érdekes jelenséget az eredményekben.

6.1. A paraméterek konzisztenciája

A paramétereket több különböző módszerrel illesztettük. Minden esetben először manuális kereséssel becsültük meg a paraméterek értékeit, majd optimalizáló algoritmusok pontosították azokat a nagyságrenden belül a pontos értékek megtalálása érdekében.

A 100T tumorsejt és TEG T-sejt kombinációval végzett kísérlethez illesztett paraméterek, három különböző minimalizáló algoritmus alkalmazásával, a 4. táblázatban láthatók. Ahogy az bemutatásra kerül, a különböző módszerek szinte azonos paramétereket találtak. Az apró eltérések a szimuláció sztochasztikus hatásainak és az optimalizációs folyamat kisebb pontatlanságának tudhatók be.

Minimalizáló módszer	Súlyozott Véletlen Bolyongás	Citolízis
Powell	0.050266	0.000935
Nelder-Mead	0.052772	0.000935
Direct	0.032201	0.001132

4. táblázat. **Illesztett paraméterek különböző módszerekkel.** A táblázat a 100T tumorsejt és TEG T-sejt kombinációval végzett kísérlethez illesztett paramétereket mutatja, három különböző minimalizáló algoritmus használatával. Az paraméterek összehasonlításából látható, hogy ugyan eltérő megközelítést használó algoritmusok, hasonló eredményekre jutottak.

6.2. Illesztett paraméterek összehasonlítása

A négy különböző kísérleti adathalmazhoz illesztett paraméterek (azaz a Citolízis és a Súlyozott Véletlen Bolyongás reakció konstansai) a 5. táblázatban láthatók. Az összes értéket a Powell-módszerrel határoztuk meg.

A 5.1-es szakasz alapján várható módon a Citolízis állandók magasabbak a TEG sejtek esetében, mint az LM1 sejtek esetében ugyanazon tumortípusoknál. Ennek oka, hogy a TEG sejtek mesterségesen módosítottak, ami növeli hatékonyságukat a rákos sejtek eliminálásában. Továbbá megfigyelhető, hogy a 100T sejtvonalhoz tartozó mindkét T-sejt típus esetében alacsonyabb értékeket kaptunk a Citolízis reakció konstansára, mint a 13T esetében ugyanannál

a T-sejt típusnál, ami szintén összhangban van a Dekkers és mtsai.[11] által már megfigyelt különbségekkel a két tumor sejtvonal között.

Azt is megfigyelhetjük, hogy a Súlyozott Véletlen Bolyongás reakció konstansa nem változik jelentősen a második, harmadik és negyedik sejt kombinációk között; azonban az első esetben jelentős eltérés figyelhető meg. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy ebben az adathalmazban a tumorsejt-szám trendje markánsan eltérő, amit részletesen tárgyalunk a 6.3-as szakaszban.

Sejtvonal kombináció	Súlyozott Véletlen Bolyongás	Citolízis
13T - LM1	0.0264	0.00080
13T - TEG	0.0564	0.00101
100T - LM1	0.0551	0.00063
100T - TEG	0.0502	0.00093

5. táblázat. **Illesztett reakciós állandók összehasonlítása különböző sejtvonal kombinációkban.** A táblázat a négy különböző sejtkombinációval végzett kísérletekhez illesztett paramétereket mutatja. Az értékek azt jelzik, hogy bár a Súlyozott Véletlen Bolyongás reakció konstansában nincs jelentős különbség (kivéve a 13T - LM1 kísérletet, amit később részletezünk), a Citolízis paraméter következetesen magasabb a TEG (módosított T) sejtek esetében, azonos tumorsejt típusokra, illetve következetesen alacsonyabb 100T organoidok esetében azonos T-sejt típusokra. Ezek egyezésben vannak a sejtvonalakról korábban leírtakkal [11].

6.3. Az események időbeli lefolyása

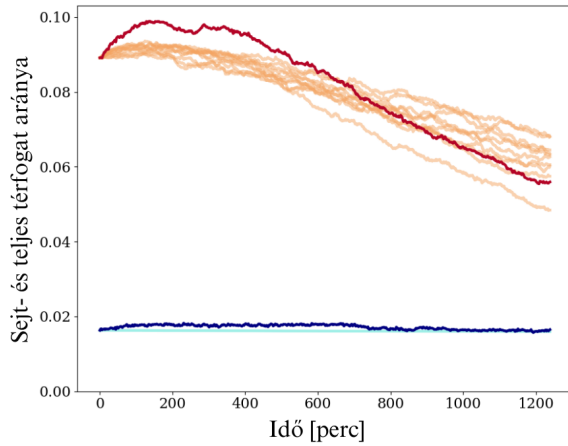
A 9. ábrán az illesztett paraméterekkel szimulált adatok láthatók. Az y-tengely a sejtek arányát mutatja a teljes (szimulált vagy fizikai) térfogathoz viszonyítva, míg az x-tengely az eltelt időt percben.

Az ábrákon a sötétebb vonalak a kísérleti adatokat jelképezik, míg a világosabb, átlátszó vonalak a szimulált eredmények egyedi trajektóriáit ábrázolják. Minden ábra 10 trajektóriát mutat, amelyek azonos paraméterekkel lettek szimulálva, de különböző kezdeti állapotokból indultak. Az ábrák alatt olvasható, hogy mely T-sejt tumorsejt kombinációt használták az adott kísérlet során.

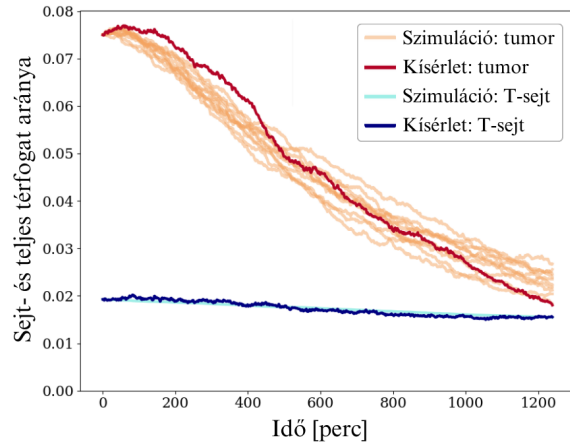
6.3.1. A megfigyelt jelenségek

Az adathalmazokban több visszatérő jelenség is megfigyelhető:

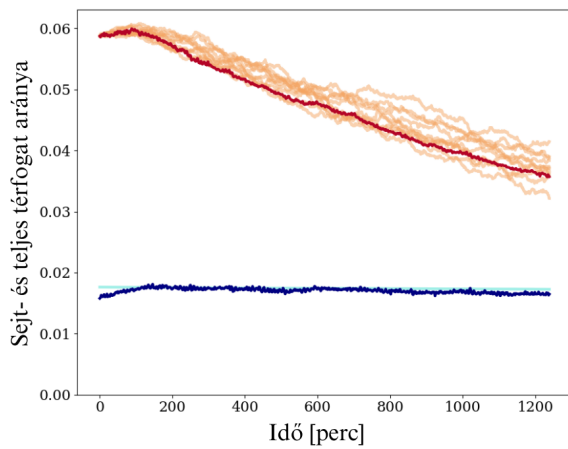
1. A T-sejtek száma nem csökken jelentősen (kivéve a 13T TEG sejtkombinációval végzett kísérletet, lásd 9b).
2. A kísérlet kezdetén a tumorsejtek számában stagnálási időszak figyelhető meg.



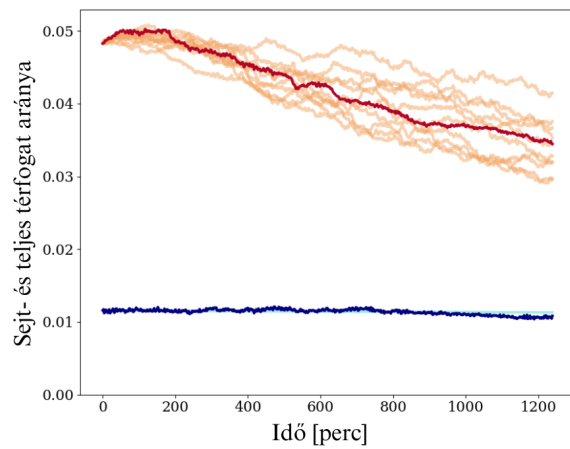
(a) Sejttípus kombináció: 13T, LM1



(b) Sejttípus kombináció: 13T, TEG



(c) Sejttípus kombináció: 100T, LM1



(d) Sejttípus kombináció: 100T, TEG

9. ábra. A négy különböző sejttípus kombináció szimulációs eredményei az illesztett paraméterekkel generált adatok alapján. Mindegyik ábrán 10 trajektória látható, amelyek azonos paraméterekkel lettek szimulálva, de különböző kezdeti állapotokból indultak. Az ábrák feliratait jelzik, mely sejtkombinációhoz tartozik az adott kísérlet. Az ábrákon a sötétebb vonalak a kísérleti adatokat jelképezik, míg a világosabb, átlátszó vonalak az egyes szimulált eredményeket ábrázolják. A 9b ábrán látható jelmagyarázat az összes ábrára érvényes.

3. A stagnálási fázis után a tumorsejtek száma viszonylag monoton módon csökken minden esetben.

4. Enyhe lassuló trend figyelhető meg a sejtszám csökkenésében.

Bár az egyes trajektóriák jelentősen eltérhetnek egymástól, több trajektória (szimulációinkban 96db) átlagának vizsgálatakor a kísérleti adatokhoz viszonyított relatív hiba nem lépi túl az 5%-t.

6.3.2. Az adatokban megfigyelt anomáliák

Bár a szimulációk általában jól visszaadják a kísérleti eredményeket, vannak olyan jelenségek, amelyekre még nem találtunk magyarázatot.

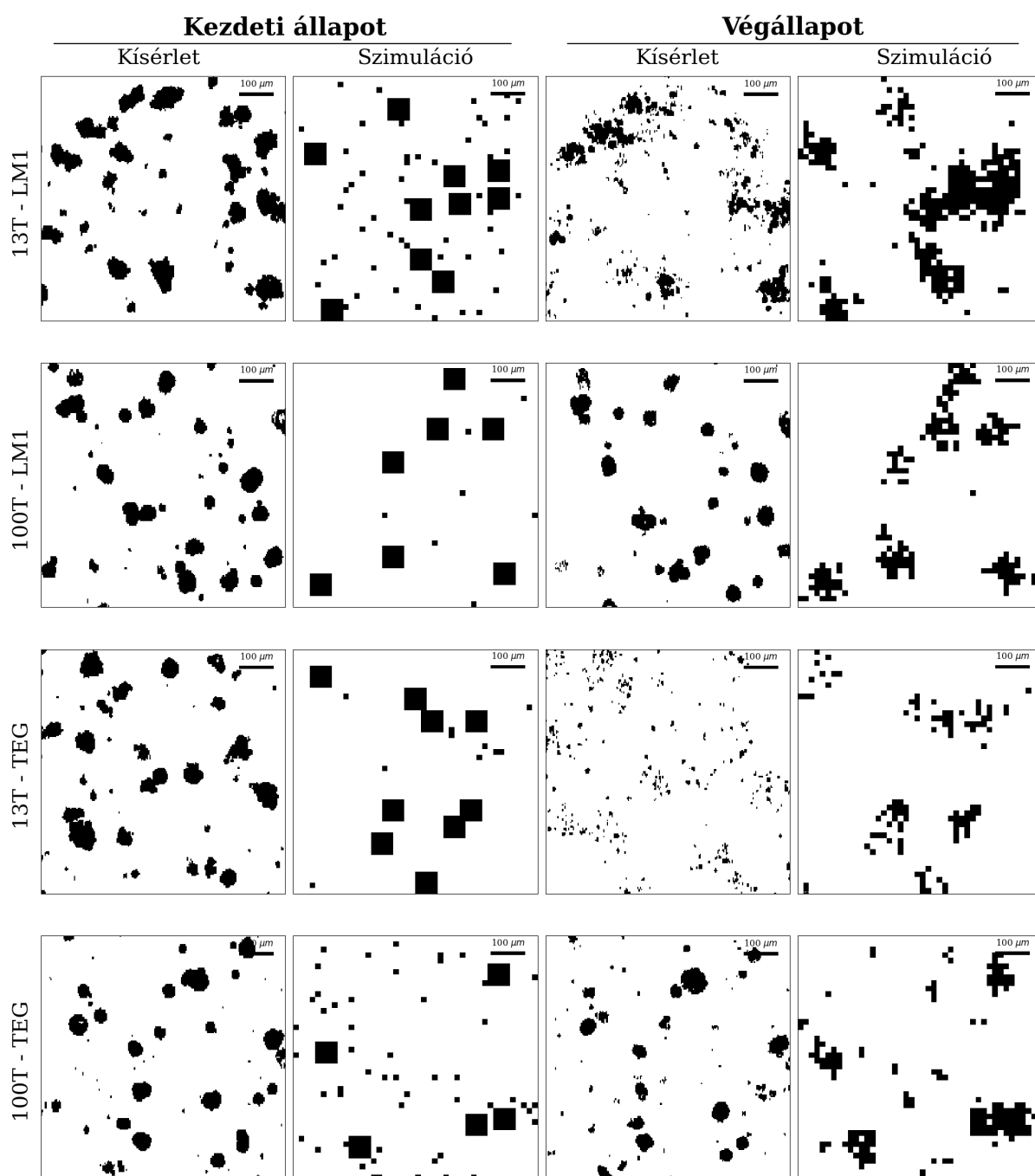
Amint azt korábban említettük, a 9b ábrán jelentős, körülbelül 20%-os T-sejtszám csökkenés figyelhető meg a kísérlet során. Ez a jelenség a többi adathalmazban nem fordul elő, és az eredeti cikkben [11] sem található rá magyarázat. Ezt figyelembe véve, a modell korrigálható az Apoptózis reakció konstansának magasabbra állításával.

Egy másik ilyen jelenség a 9a ábrán látható, ahol a tumorsejtek száma meredeken növekszik a kísérlet kezdetén, majd stagnál, mielőtt végül csökkenni kezd. Ez a jelenség a többi kísérletben nem figyelhető meg, és a cikk [11] nem ad rá magyarázatot. Feltételezhető, hogy a T-sejtek tumorsejtektől való véletlenszerű távolabb pozicionálása (vagy két szuszpenzió nem megfelelő elkeveredése) a kísérlet kezdetén ebben a lyukban lehetőséget adott a rákos sejteknek az osztódásra, mielőtt a T-sejtek elkezdtek pusztítani őket.

6.4. Kvalitatív morfológiai elemzés

Bár jelen dolgozatunk fókuszában nem a kvantitatív morfológiai vizsgálatok állnak, bemutattunk néhány illusztratív ábrát annak szemléltetésére, hogy szimulációk ebben a tekintetben is tükrözik a kísérleteket.

A 10. ábra a négy sejttípus kombináció kísérleti adatait mutatja be, valamint az ezekhez illesztett szimulációk eredményeit $t = 0$ perc és $t = 1240$ perc időpontban, amelyek a kísérlet kezdeti és végső állapotának felelnek meg. Ezek a képek a háromdimenziós tér egy síkját ábrázolják a Z-sorozat közepéről, lehetővé téve az organoidok különböző mértékű fragmentáltságának megfigyelését az egyes kísérletekben. Kezdetben lokalizált csoportokban klaszteres elrendezést mutatnak a tumorsejtek, majd az egyes kísérletek körülményeitől függően eltérő végállapotokat mutatnak. Az első sorban látható 13T-LM1 sejtkombinációnál mind a kísérlet, mind a szimuláció végén sűrű sejtcsoportosulások figyelhetők meg, melyek mellett számos magányos tumorsejt látható. A 100T-LM1 kísérlet és szimuláció vég állapotában azonban kompakt gócok maradnak meg kevesebb magányos sejttel. A 13T-TEG kombináció esetén a kezdeti tumor klaszterek jobban szétesnek, míg az alsó sorban látható 100T-TEG esetben kompakt gócokat látunk sok magányos sejttel. A képek jól szemléltetik, hogy a szimulációk visszaadják az organoidok kísérletekben megfigyelt fragmentálódását. Ez különösen figyelemre méltó, hiszen a morfológiai információkat nem használtuk fel a modell illesztése során.



10. ábra. **Kvalitatív morfológiai elemzés** Az ábra első és harmadik oszlopai a kísérletek kezdeti ($t = 0perc$) és végső ($t = 1240perc$) időpontjainak felelnek meg. A második és negyedik oszlopok a szimulációk eredményeit mutatják ugyanebben az időpontban. Minden esetben a képek középső keresztmetszetek (Z-sorozat 24. eleme). A képek demonstrálják, hogy a szimuláció visszaadja a kísérleti adatokban megfigyelt jelenségeket, különösen azt, hogy az organoidok fragmentálódása sejtípus kombinációtól függően eltérően alakul a kezdeti klaszteres elrendezéshez képest.

7. Összefoglalás

Dolgozatunkban bemutattuk az általunk kifejlesztett Kölcsönható Rácsok Módszerét, amely a marginal Reduced Rate Method-on [18] alapul és a Gillespie-algoritmust használja sejtpopulációkban zajló folyamatok modellezésére. Ez a továbbfejlesztett modell képes heterogén sejtpopulációk szimulálására és az általános viselkedésüket leíró reakciók, például Oszródás, Apoptózis és Véletlen Bolyongás, modellezésére. Továbbá az immunrácson és a szöveti rácson keresztül figyelembe veszi a tumor- és immunsejtek közötti jelentős méretkülönbséget és az immunsejtek különleges, mobilitást elősegítő képességeit, ezzel helyet adva a tumor limfoid infiltráció ismert jelenségének.

Elkészítettük a szimulációs keretrendszer C++ nyelvű implementációját, amely gyorsan és hatékonyan képes végrehajtani az Kölcsönható Rácsok Módszerét, lehetővé téve az adatok átfogó statisztikai és minőségi elemzését. A szimulációs programon kívül több Python és Unity eszközt fejlesztettünk ki, amelyek lehetővé teszik az adatok széles körű vizualizációját, mind kvalitatív, mind kvantitatív elemzés céljából.

A kész szoftverrendszer és a Dekkers és mtsai. [11] által publikált mikroszkópiás adatok felhasználásával megbecsültük a matematikai modell paramétereit, ami lehetővé tette számunkra annak bemutatását, hogy megfelelő paraméterezés mellett a módszerünk képes reprodukálni a kísérletekben megfigyelt jelenségeket mind dinamikai mind morfológiai szempontból.

Végezetül bemutattuk és elemeztük az eredményeket. Összehasonlítottuk az adott kísérlethez illesztett paramétereket különböző matematikai módszerekkel, hogy bizonyítsuk azok konzisztenciáját. Megvizsgáltuk az illesztett paraméterek összhangját, a sejtvonalak már ismert tulajdonságaival. Analizáltuk a szimulációs trajektóriák dinamikáját, hogy valóban megjelennek-e a kísérleti úton megfigyelt kulcsjelenségek.

Végezetül kvalitatív módon elemeztük a tumorsejtek morfológiáját a kísérlet kezdeti és végső állapotában, hogy kiemeljük a szimulált adatok és a kísérletek közötti egyezést ezen a téren. Ez az eredmény kiváltképp fontos, hiszen ezt az egyezést úgy tapasztaljuk, hogy a paraméterek illesztésekor morfológiai információt nem használtunk fel.

Reméljük, hogy a közeljövőben tovább tudjuk fejleszteni ezt a módszert. Elsősorban szeretnénk feltárni a potenciális alternatív és kiterjesztett modelleket, például megkülönböztetve a $CD4^+$ segítő T-sejteket és a $CD8^+$ citotoxikus T-sejteket. Másodsorban pedig javítani szeretnénk az adat-feldolgozási folyamatot korszerű szegmentációs módszerekkel, illetve validálni szeretnénk a tumorsejtek eloszlását a kezdeti állapotban. Ezenkívül szeretnénk megvizsgálni a

sejtciklus modellezésének különböző megközelítései és a kialakuló populációdinamika közötti kapcsolatot.

Összegzőképpen, megközelítésünk ígéretes módszer a rács-alapú ágens-alapú modellezési területen, amely kevés paraméterrel is megragadja a tumor–immun interakció lényegét. A betegből származó organoid adatokkal való sikeres kalibráció azt jelzi, hogy ez a módszer és származékai nagy potenciállal rendelkeznek a személyre szabott orvoslás és a digitális ikrek területeinek előrelendítésében.

Hivatkozások

- [1] F. Bray, M. Laversanne, E. Weiderpass és I. Soerjomataram, “The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide”, *Cancer*, 2021. cím: <https://doi.org/10.1002/cnccr.33587>.
- [2] G. 2. Mortality és C. of Death Collaborators, “Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015”, *The Lancet*, 388. évf., 10053. sz., 1459–1544. old., 2016. cím: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1).
- [3] C. Yang, W. Xiao, R. Wang és tsai., “Tumor organoid model of colorectal cancer (Review)”, *Oncology Letters*, 26. évf., 328. old., 2023. cím: <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13914>.
- [4] E. B. Gunnarsson, S. Kim, B. Choi és tsai., “Understanding patient-derived tumor organoid growth through an integrated imaging and mathematical modeling framework”, *PLOS Computational Biology*, 20. évf., 1–26. old., 2024. aug. cím: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1012256>.
- [5] Z. Fang, P. Li, F. Du és tsai., “The role of organoids in cancer research”, *Experimental Hematology & Oncology*, 12. évf., 69. sz., 2023. cím: <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00433-y>.
- [6] H. Xu, D. Jiao, A. Liu és tsai., “Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine”, *Journal of Hematology & Oncology*, 15. évf., 58. sz., 2022. cím: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01278-4>.
- [7] X. Jiang, “Organoids: opportunities and challenges of cancer therapy”, *Frontiers in cell and developmental biology*, 2023. aug. cím: <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1232528>.
- [8] T. Straetemans és tsai., “GMP-Grade Manufacturing of T Cells Engineered to Express a Defined $\gamma\delta$ TCR”, *Frontiers in Immunology*, 9. évf., 1062. old., 2018. cím: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01062>.
- [9] V. Marcu-Malina, S. Heijhuurs, M. van Buuren és tsai., “Redirecting $\alpha\beta$ T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive $\gamma\delta$ T-cell receptor”, *Blood*, 118. évf., 1. sz., 50–59. old., 2011. cím: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-325993>.
- [10] L. Wallstabe, C. Göttlich, L. Nelke és tsai., “ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models”, *JCI Insight*, 4. évf., 18. sz., e126345., 2019. cím: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126345>.
- [11] J. Dekkers, M. Alieva, A. Cleven és tsai., “Uncovering the mode of action of engineered T cells in patient cancer organoids”, *Nature Biotechnology*, 41. évf., 60–69. old., 2023. cím: <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01397-w>.

- [12] L. de Pillis, W. Gu és A. Radunskaya, “Mixed immunotherapy and chemotherapy of tumors: modeling, applications and biological interpretations”, *Journal of Theoretical Biology*, 238. évf., 4. sz., 841–862. old., 2006. cím: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519305002936>.
- [13] L. Depillis, K. Fister, W. Gu és tsai., “Mathematical Model Creation for Cancer Chemo-Immunotherapy”, *Comput. Math. Methods Med.*, 10. évf., 2009. jan. DOI: 10.1080/17486700802216301.
- [14] M. Qomlaqi, F. Bahrami, M. Ajami és J. Hajati, “An extended mathematical model of tumor growth and its interaction with the immune system, to be used for developing an optimized immunotherapy treatment protocol”, *Mathematical Biosciences*, 292. évf., 1–9. old., 2017. cím: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025556416302711>.
- [15] M. Baar, L. Coquille, H. Mayer és tsai., “A stochastic model for immunotherapy of cancer”, *Scientific Reports*, 6. évf., 1. sz., 24169. old., 2016. cím: <https://doi.org/10.1038/srep24169>.
- [16] M.-A. Allard, J. B. Bachet, A. Beauchet és tsai., “Linear quantification of lymphoid infiltration of the tumor margin: a reproducible method, developed with colorectal cancer tissues, for assessing a highly variable prognostic factor”, *Diagnostic Pathology*, 7. évf., 1. sz., 156. old., 2012. cím: <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-156>.
- [17] D. T. Gillespie, “A General Method for Numerically Simulating the Stochastic Time Evolution of Coupled Chemical Reactions”, *Journal of Computational Physics* 22, 403–434. old., 1976.
- [18] P. Boldog, “Exact lattice-based stochastic cell culture simulation algorithms incorporating spontaneous and contact-dependent reactions”, *arXiv:2208.04774*, 2022.
- [19] D. T. Gillespie, “Approximate accelerated stochastic simulation of chemically reacting systems”, *The Journal of Chemical Physics*, 115. évf., 4. sz., 1716–1733. old., 2001. júl., ISSN: 1089-7690. cím: <http://dx.doi.org/10.1063/1.1378322>.
- [20] D. T. Gillespie, “Stochastic Simulation of Chemical Kinetics”, *Annual Review of Physical Chemistry*, 58. évf., 1. sz., 35–55. old., 2007. máj.
- [21] V. Hárs, “A sztochasztikus reakciókinetika néhány kérdéséről”, dipl., ELTE TTK, 1976.
- [22] P. A. J. Mendelaar, J. Kraan, M. Van és tsai., “Defining the dimensions of circulating tumor cells in a large series of breast, prostate, colon, and bladder cancer patients”, *Molecular Oncology*, 2020.
- [23] J. C. Rathmell, “IL-7 Enhances the Survival and Maintains the Size of Naive T Cells”, *The Journal of Immunology*, 2001.
- [24] A. C. R. Maria Alieva és J. F. Dekkers, *Uncovering the mode of action of engineered T cells in patient cancer organoids*, <https://www.ebi.ac.uk/biostudies/bioimages/studies/S-BIAD448>, 2022.
- [25] U. H. Lodish, *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman, 2016.