

# TUMORSEJTEK IN VITRO SZELEKCIÓS KÍSÉRLETEINEK SZIMULÁCIÓJA RÁCSFÜGGETLEN SEJTAUTOMATA MODELL SEGÍTSÉGÉVEL

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Szerző: Kiss Dániel

alkalmazott matematika MSc. szak, II. évf.

Konzulensek:

Dr. Lovrics Anna

tudományos munkatárs

MTA TTK EI

Dr. Sergyán Szabolcs

egyetemi docens

OE NIK

# Tartalomjegyzék

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Bevezetés</b>                                                             | <b>3</b>  |
| <b>1. Irodalomkutatás, létező megközelítések</b>                             | <b>5</b>  |
| 1.1. Folytonos modellek . . . . .                                            | 5         |
| 1.2. Diszkrét modellek, sejtautomaták . . . . .                              | 6         |
| 1.3. Hibrid modellek . . . . .                                               | 10        |
| <b>2. A modell felépítése és implementálása</b>                              | <b>12</b> |
| 2.1. A sejt és a fizikai környezet modellezése . . . . .                     | 12        |
| 2.2. A sejt proliferációjának modellezése . . . . .                          | 17        |
| 2.3. A Metropolis Monte-Carlo módszer . . . . .                              | 19        |
| 2.4. A modell paramétereinek becslése . . . . .                              | 21        |
| 2.5. Implementáció . . . . .                                                 | 23        |
| <b>3. Szimulációs és kísérleti eredmények összevetése</b>                    | <b>28</b> |
| 3.1. Sejtpopulációk növekedésének szimulációi . . . . .                      | 28        |
| 3.2. Hatóanyag-koncentrációtól függő szaporodási sebesség . . . . .          | 30        |
| 3.3. A sejtek Pgp-expressziójára vonatkozó hipotézisek ellenőrzése . . . . . | 32        |
| <b>Továbbfejlesztési lehetőségek</b>                                         | <b>38</b> |
| <b>Összegzés</b>                                                             | <b>40</b> |
| <b>Köszönetnyilvánítás</b>                                                   | <b>41</b> |
| <b>Függelék</b>                                                              | <b>42</b> |
| <b>Irodalomjegyzék</b>                                                       | <b>45</b> |

# Bevezetés

## A multidrog rezisztencia és kialakulása

Daganatos betegségek kezelésének egyik lehetséges módja a gyógyszeres terápia, más néven kemoterápia. Célja a tumor növekedésének gátlása, illetve a daganatos sejtek minél nagyobb mértékű pusztítása, mely sokszor csak az egészséges sejtek károsítása mellett lehetséges. A terápia során alkalmazott drogokat hatásmechanizmusuk szerint csoportosítva megkülönböztethetünk citosztatikus (a sejtet osztódásában gátló) illetve citotoxikus (a sejt pusztulását okozó) hatóanyagokat [11]. Közös jellemzőjük, hogy főként a gyorsan osztódó sejtekre hatnak, ezáltal néhány egészséges sejtípust is károsítanak, ami súlyos mellékhatásokat okoz a szervezetben.

Klinikai megfigyelések szerint az alkalmazott gyógyszerek hatására a tumorsejtek gyakran olyan változáson esnek át, amely ellenállóvá teszi azokat a hatóanyaggal szemben, sőt gyakran más, hasonló típusú készítményekkel szemben is. A *multidrog rezisztenciának* (MDR) nevezett folyamat, mely többféle módon is megvalósulhat, gyakran felelős a gyógyszeres terápia sikertelenségéért. A rezisztens sejtváltozat (fenotípus) megjelenése lehetséges már a terápia kezdetén, illetve annak folyamán is, eszerint megkülönböztetünk elsődleges-, illetve szerzett rezisztenciát.

A multidrog rezisztencia mindkét változatánál a sejtek különböző transzport fehérjék közreműködésével eltávolítják magukból a hatóanyag molekuláit, ezáltal csökkentve annak terápiás koncentrációját a sejten belül, így gátolva hatását. A folyamatban fontos szerepet játszó transzportfehérje a P-glikoprotein (Pgp, *permeability glycoprotein*), melynek sejten belüli mennyisége meghatározza az alkalmazott drog hatékonyságát.

## Lehetséges magyarázatok: darwini- és lamarcki evolúció

A multidrog rezisztens fenotípusokból álló sejtpopuláció kialakulására jelenleg két elmélet létezik. A klasszikus vagy darwini elmélet szerint a rezisztens fenotípus (mely mutáns változatnak tekinthető) nagyon kis arányban már a kezdetektől jelen van a populációban. A mutáció szelekciós előnyt jelent számára az adott környezet-

ben, így nagyobb valószínűséggel él túl és szaporodik, ami miatt gyorsan megnő a populáción belüli részaránya. Az elmélet ugyanakkor nem magyarázza azt, hogy a rezisztens fenotípus megjelenése jóval gyorsabban történik, mint ahogy arra a sejtek szaporodási sebességéből számítani lehetne [8]. Ennek lehetséges magyarázata (a lamarcki evalúció), hogy a rezisztens fenotípus nem kizárólag darwini szelekció útján, hanem egy új tulajdonság (a drog rezisztencia) megszerzése útján jut szelekciós előnyhöz, amely tulajdonság később az utódaiba is átöröklődik.

A két elmélet nem zárja ki egymást. Míg a lamarcki magyarázat a rezisztens fenotípus gyors kialakulását írja le, addig a darwini magyarázatot ad a fenotípus tartós fennmaradására.

## A munka célkitűzései

A szelekciós elméleteket jelenleg nem sikerült minden kétséget kizáróan igazolni. Bár számítógépes szimulációk eredményei semmiképp sem fogják eldönteni ezt a problémát, mégis inspirálhatnak olyan kutatásokat, melyek által választ kapunk a fenti kérdésekre.

A dolgozat célja egy olyan sejtautomata modell létrehozása, amely alkalmas *in vitro* sejttenyészetek szimulációira, az ott megfigyelhető jelenségek reprodukálására, és a populációt alkotó egyedek minél több tulajdonságának nyomon követésére, ezáltal összevethetővé téve azokat valódi kísérleti eredményekkel. A szimulációk rávilágíthatnak a sejtek olyan egyedi jellemzőire, melyek esetleg hatással vannak az egész populációra, azonban valódi *in vitro* kísérletek során körülményes (esetleg lehetetlen) azok ellenőrzése.

Az irodalomban jelenleg elérhető megközelítések megismerése és megértése után egy saját modell létrehozására törekszem, mely a lehető legjobban illeszkedik a későbbiekben bemutatásra kerülő sejtípusokhoz. A modell alkalmas kell legyen nagyjából néhány tízezer sejtből álló egyrétegű és térbeli populációk különböző időtartamú szimulációjára, a folyamat során keletkező adatok szabványos formátumban történő tárolására, a tárolt adatok kiértékelésére és vizualizációjára. Az implementáció a későbbi számítási párhuzamosítás lehetőségét is szem előtt tartva kell történjen. A modell megbízhatóságának ellenőrzésére különböző szimulációkat tervezek, melyek eredményeit valódi *in vitro* kísérletekből származó adatokkal hasonlítom össze.

# 1. fejezet

## Irodalomkutatás, létező megközelítések

### 1.1. Folytonos modellek

*In vitro* sejtkísérletek esetén a tenyésztőedényben lévő sejtek száma általában  $10^6$  nagyságrendű. Ilyen nagy számú egyed esetén helytálló lehet azokat pontszerű sokaságnak tekinteni, mivel ebben az esetben mellőzhetők egyedi tulajdonságaik. A populáció vizsgálata ekkor statisztikai értelemben történik, így beszélhetünk például átlagos migrációs értékről, vagy egy bizonyos fehérje átlagos expressziós szintjéről. Az ilyen típusú megközelítések gyakran parciális differenciálegyenletekkel (vagy egyenletrendszerekkel) modellezik a sejtpopuláció viselkedését, melyek gyakran analitikusan is jól kezelhetők, azonban általában csak komoly egyszerűsítő feltevések mellett képesek a valós eredmények reprodukálására.

#### 1.1.1. Khain és Sander reakció-diffúzó modellje

A modell egy igen agresszívan terjedő tumorfajta, a Glioblastoma multiforme (GBM) *in vitro* növekedési dinamikáját tárgyalja [6]. Az előbbiek szerint a sejtek itt sem egyedi objektumként vannak jelen a modellben, azokat elhanyagolható méretűnek tekintik, melyek térbeli sűrűségét azok koncentrációja írja le, s egy adott térbeli pont sejtkoncentrációjából következtethetünk az ott lévő sejtek számára. A modellezett tér egy adott  $\mathbf{x}$  pontjában a  $t$  időpillanatban a sejtsűrűséget az  $u(\mathbf{x}, t)$  függvény, míg a növekedési faktorok sűrűségét (ami lehet például a tápanyag koncentrációja) a  $c(\mathbf{x}, t)$  függvény adja meg. A sejtek migrációjának nagysága a diffúziós konstanstól, a proliferáció sebessége pedig a szaporodási rátától függ.

A modell a következő feltevésekkel él:

- a sejtek migrációra és proliferációra képesek
- proliferáció sebessége függ a diffúziós együttható értékétől:  $\partial u / \partial x = u^2 c$
- a növekedési faktorok diffúziója jóval gyorsabb a sejtek diffúziójánál
- mindig van elegendő hely a sejtek osztódásához

A szimulációk során két sejt vonalon (vad típusú, illetve mutáns GBM-en) tesztelték a modellt. A két típus eltérő viselkedését a diffúziós konstans, illetve a szaporodási ráta megválasztásával érték el. Csupán e két érték megfelelő beállításával az *in vitro* eredményekkel jól egyező dinamikát kaptak, s a modell képes magyarázatot adni a két típus eltérő növekedési mintázatára is.

## Megállapítások

A megközelítés nagy előnyeként említhető, hogy maga a szimuláció igen gyorsan lefuttatható különböző matematikai programcsomagok használatával. Jelen dolgozat célkitűzései között ugyanakkor olyan kérdések megválaszolása is szerepel, amely a fenti keretek között nem válaszolható meg, így a modell ebben a formában inkább csak inspirálta a munkát.

## 1.2. Diszkrét modellek, sejtautomaták

Sejtbiológiai szimulációk során hasznos megközelítésnek bizonyultak az ágens-alapú vagy sejtautomata szimulációk, legyen szó akár epithel sejtek kalciumfüggő növekedési mintázatának szimulációjáról [14], akár az előző szakaszban említetthez hasonló sejt típusok mozgásának reprodukálásáról [9]. A sejtautomata-megközelítések közös jellemzője, hogy a sejtet egy rögzített – determinisztikus vagy sztochasztikus jellegű – szabályrendszer alapján cselekvő, autonóm egyedként modellezi, mely kapcsolatban áll a környezetével, s gyakran a többi egyeddel is, melyek így hatással vannak egymásra.

Sejtautomata modellek esetén különbséget tehetünk két alapvetően eltérő megközelítés közt: léteznek rácsalapú és rácsfüggetlen modellek. Előbbi esetén a rendelkezésre álló tér rögzített koordináták véges halmaza (például egy kétdimenziós négyzet esetleg hexagonális rács, vagy egy háromdimenziós kockarács), míg utóbbi esetén az egyedek – elvben legalábbis – tetszőleges helykoordinátákat felvehetnek. Miközben a rács definiálásával egyben általában az egyedek méretéről is döntünk (ugyanis a rács egy adott helye vagy betöltött vagy nem), addig egy rácsfüggetlen modell egyedeihez tetszőleges méret rendelhető. A rácsalapú megközelítés egyik erőssége, hogy egy

adott egyed szomszédait triviálisan meg tudjuk határozni a szomszédos rácspontok vizsgálatával, míg rácsfüggetlen modell esetén a „szomszédosság” már nehezebben megfogható fogalommá válik, mivel minden egyedre meg kell határozni egy megfelelő méretű térrészt, s az abban megtalálható egyedeket definiálhatjuk szomszédos egyedeknek.

### 1.2.1. Aubert és mtsai. sejtautomata modellje hexagonális rács

Az 1.1.1 alszakaszban említett sejttípushoz hasonló GL15 humán glioma sejtvonal egyedinek mozgásának szimulációjára bemutatott rácsalapú modell [1]. A hexagonális rács izotrópikus tulajdonsága miatt ideális választás akkor, ha a sejtmigráció lényeges a modell szempontjából. A sejtek között attraktív erőt feltételeztek, mely a közöttük kialakuló fizikai kapcsolatokat modellezi. Az elmozdulás – mely az attraktív erő nagyságával áll kapcsolatban – egy véletlen  $p \in (0,1)$  értéktől és egy előre megválasztott  $r \in (0,1)$  küszöbértéktől függően vagy egy szomszédos sejt irányába vagy azzal ellentétes irányba történik, egy szomszédos rácspontba (ha az még nem foglalt). Osztódási folyamatot a modell nem tartalmaz.

A sejtek elmozdulását többféle küszöbérték megválasztása mellett szimulálva arra a következtetésre jutottak, hogy a köztük lévő attraktív erő alapvető fontosságú a migráció mintázatának kialakulásához. A kapott eredmények jól illeszkednek a valódi kísérleti adatokra, továbbá a modell a sejtek sebesség-eloszlására is választ ad.

### Megállapítások

A sejtautomata-típusú szimulációk egyik lényeges jellemzője, hogy a kölcsönható egyedek viselkedését leíró szabályrendszer alkalmazása igen költséges a számítási kapacitás tekintetében. Ez a költség azonban rácsalapú modellek esetében jóval kedvezőbb, mint rácsfüggetlen esetben, tehát megfelelőnek tűnik az előbbi választani kiindulási alapnak. Ezt megerősít az is, hogy a két megközelítés gyakran nagyon hasonló eredményt produkál (lásd [9]). Ugyanakkor nem hagyható figyelmen kívül az sem, hogy rácsalapú modellek esetén körülményes a jelentősen különböző mérettel rendelkező sejtek, illetve a térbeli populációk modellezése. Mivel a később bemutatásra kerülő sejttípusok épp az előbbiek közé sorolhatók, így esetünkben célszerűbb egy rácsfüggetlen modell megvalósítása.

### 1.2.2. Macklin és mtsai. rácsfüggetlen sejtautomata modellje

Egy nem invazív emlődaganat-típus (ductalis carcinoma in situ, DCIS) kialakulásának modellje kétdimenziós környezetben [7]. A sejtek alakját nem veszik számításba, így azokat egy  $\mathbf{x}$  hely-, illetve egy  $\mathbf{v}$  sebességvektor, továbbá egy  $R$  ekvivalens sejtsugár és egy  $R_N$  sejtmag sugár írja le. A sejtek rendelkeznek egy  $R_A > R$  adhéziónál nagyobb rádiusszal, melyen belül képesek fizikai kapcsolatot létrehozni más sejtekkel, illetve a bazális membránnal<sup>1</sup>. A kapcsolatok lehetnek attraktív és repulzív jellegűek, ezzel modellezve többek között a sejtek limitált összenyomhatóságát. A kapcsolatok erősségét interakciós potenciálfüggvények segítségével definiálják (lásd részletesen a következő fejezetben). A sejtek az erőhatások függvényében tetszőleges rendelkezésre álló térrészre elmozdulhatnak. A fizikai környezetet kiegészíti még a tér adott pontjában lévő oxigén-koncentráció, mely felfogható egyféle tápanyagnak.

A sejtek életét különböző állapotok írják le, így megkülönböztetünk például nyugvó, proliferatív vagy hipoxiás állapotban lévő sejtet. Az egyes állapotok közötti átmenetet valószínűségi változók definiálják, melyek értéke függ a sejt aktuális állapotától és a fizikai környezet paramétereitől is (például az oxigén-koncentrációtól), ezek adják a sejtautomata modell szabályrendszerét. A proliferáló sejtek térfogata megfelelő körülmények között növekszik, majd a kétszeres térfogat elérésekor szétválik két kisebb sejt-re. A sejtek elpusztulhatnak külső hatás (oxigénhiányos állapot) vagy belső hatás (apoptózis) eredményeképp, ekkor nekrotikus sejtekké válnak, és kis idő múltán eltűnnek a modellből.

A modell számos paraméterértéket figyelembe vesz, így például a sejtek átmérőit, az egyes kötések (sejt-sejt, illetve sejt-bazális membrán) erősségét, a sejtciklus egyes fázisainak hosszát, vagy az elpusztult egyedek felszívódásának időtartamát. A szimulációs eredmények jó egyezést mutatnak a irodalomban közölt adatokkal, valamint a modell képes előrejelezni a tejcsatornában fejlődő tumor keresztmetszeti struktúráját, és a folyamat menetét is.

### Megállapítások

Az ismertett modell kisebb módosításokkal alkalmas térbeli sejtpopulációk szimulációjára is. A fizikai környezet és a sejt-interakciók modellezésére használt potenciálfüggvények gradienséből közvetlenül származtathatók a sejtre ható erők eredői, így azok elmozdulása könnyen meghatározható minden szimulációs lépésben. A szükséges módosítások figyelembevételével a modell számos ötlete jól használható a célkitűzésben leírtak megvalósításához.

<sup>1</sup> Hámszövetekben lévő alaphártya, erre képesek letapadni a sejtek.

### 1.2.3. Drasdo és mtsai. rácsfüggetlen sejtautomata modellje

A modell általános megközelítést kívánt adni epithel sejtek életfolyamatainak szimulációjára [4]. Alapötletük szerint bizonyos típusú sejtek (lásd a következő fejezetben részletesen) felfoghatók egy  $\mathbf{x}$  tömegközépponttal leírható  $R_N$  sugarú gömb alakú, összenyomhatatlan, deformálhatatlan térrész (a sejtmag) és egy vele koncentrikus  $R_A$  sugarú gömb (adhéziós térrész) közötti átlagos térrészként. Az osztódás alatt ez a gömb alak átalakul egy adott  $\phi$  tengelyirányú, súlyzószerű (dumb-bell) alakra, melyet két, részben átfedő gömb alakú sejttel modelleznek. Ebben a megközelítésben a sejt pontos alakja nem adható meg, csak statisztikai értelemben írható le, hogy várhatóan a sejt épp a tér mely részét tölti ki. A sejtek közötti vonzó- és taszító erőket itt is interakciós potenciálfüggvényekkel definiálják, azonban Macklin és mtsai. [7] modelljétől eltérően nem származtatnak közvetlenül erőhatásokat a potenciálfüggvényekből, helyette a statisztikus fizikában sikerrel alkalmazott Metropolis Monte-Carlo szimulációt használják a sejtek fizikai interakcióinak kezelésére (erről részletesen lásd a következő fejezetet).

A modell tartalmaz egy egyszerűsített sejtciklust, mely egy növekedési szakaszra (interfázis) és egy osztódási szakaszra (mitózis) tagolható. Az interfázis alatt a sejt egy kezdeti  $V_0$  térfogatról  $2 \cdot V_0$  térfogatra növekszik – miközben gömb alakról súlyzó alakra deformálódik –, majd az osztódási szakaszban szétválik két  $V_0$  térfogatú sejtre. A sejt rendelkezik továbbá egy belső órával – ennek ideje  $\tau$  –, mely akkor növekszik, ha a sejt aktív, azaz képes proliferációra. Ellenkező esetben (például helyhiány miatt) a sejt képtelen növekedni, belső órája lelassul vagy megáll, majd nyugalmi állapotba kerül.

A szimuláció során a sejtek elmozdulása és fejlődése az alábbi próbákhoz kötött:

- $T_R$  elfordulási (*rotation*) próba: a súlyzó alakú sejt  $\phi$  tengelyiránya egy véletlen értékkel megváltozik
- $T_M$  elmozdulási (*migration*) próba: a sejt tömegközéppontja egy véletlen irányú és nagyságú  $\mathbf{r}$  vektorral eltolódik
- $T_G$  növekedési (*growth*) próba: a sejt térfogatához egy véletlen értékű növekmény adódik
- $T_D$  átalakulási (*deform*) próba: a súlyzó alakú sejtek középpontjai távolodnak egymástól, majd kellő távolság esetén szétválnak

Egy próba megengedett lépésnek számít, ha általa a sejt interakciós energiája csökken (vagy nem növekszik jelentősen, lásd alaposan a következő fejezetet), és elutasítása kerül ellenkező esetben.

A szimuláció egy általános lépése a következő:

---

1. egy  $C_i \in \{C_1, C_2, \dots, C_n\}$  sejt kiválasztása véletlenszerűen az  $n$  darab létező sejt közül
  2. egy  $T_j \in \{T_R, T_M, T_G, T_D\}$  próba választása véletlenszerűen
  3. a  $\Delta E$  interakciós-energia változásának kiszámítása
  4. ha  $\Delta E$  csökken (vagy nem növekszik nagyon), akkor a próba elfogadva, ellenkező esetben elutasítva
  5. sikeres  $T_G$  esetén a  $\tau$  belső idő növekszik egy adott értékkel
- 

## Megállapítások

A modellben alkalmazott megközelítés a sejtek fizikai interakcióinak leírására közel azonos Macklin és mtsai. ötletével. A megvalósított sejtciklus bár igen egyszerű, de könnyen bővíthető. A sejtek belső idejének és a szimuláció valós idejének konverziója bonyolultnak tűnhet, azonban kisebb változtatásokkal könnyen értelmezhetővé tehető. Ugyanakkor a Metropolis Monte-Carlo szimulációs módszer széles irodalommal, jól kidolgozott implementációs technikákkal rendelkezik, továbbá lépései könnyen párhuzamosíthatók, melyre akár részben kidolgozott módszerek is elérhetők.

Mindezeket figyelembe véve Drasdo és mtsai. rendszere kifejezetten jó alapot ad a modell elkészítéséhez, számos ötlet található benne, mely a szükséges átalakításokkal megfelelő rendszert adhat a dolgozat célkitűzéseinek megvalósításához.

## 1.3. Hibrid modellek

A korábban bemutatott folytonos modellek egyszerű és gyors kezelhetőségének, valamint a sejtautomata modellek komplex viselkedésének ötvözésére több kísérlet is született. A következő, példaként bemutatott modell csak vázlatosan kerül ismertetésre.

### 1.3.1. Ramis-Conde és mtsai. rácsfüggetlen hibrid modellje

A modell célja az egészséges szövetek tumorsejtek hatására történő átalakulásának leírása [10]. A diszkrét modell itt is egy kétdimenziós sejtautomata, melyben

az interakciókat potenciálfüggvények irányítják. Az elmozdulásvektorokat a potenciálfüggvényekből származtatják, míg az osztódás valószínűségi alapon történik. A folytonos részt az ágensek és a környezetet alkotó anyagok kölcsönhatásának leírására szolgáló parciális differenciálegyenletek adják. A kémiai anyagok térbeli eloszlása hatással van sejteket irányító potenciálfüggvények értékére, befolyásolva ezzel például a migrációs lépések irányát.

## **Megállapítások**

A célkitűzésekben vázolt problémák között jelenleg nem szerepel olyan, amely kifejezetten szükségessé tenné egy hibrid modell építését, mindazonáltal a későbbiekben számos olyan pontosítás tehető az alapmodellen, mely megkívánhatja azt.

## 2. fejezet

# A modell felépítése és implementálása

### 2.1. A sejt és a fizikai környezet modellezése

#### 2.1.1. A sejt alakja és helyzete

Különböző típusú sejteket megfigyelve jelentős eltérést tapasztalunk azok alakjában és az alakjuk változásának dinamikájában. Míg egyes sejtek többé-kevésbé tömör, jól körülírható, a klasszikus geometria fogalmai szerint egyszerű alakzatnak feleltethetők meg, mely alak a sejt élete során sem módosul alapvetően, addig más sejtek igen változatos formát vehetnek fel, erősen polarizáltak lehetnek, és nehéz egyszerű geometriai alakzatokként reprezentálni őket. Utóbbiakra jó példa lehet egy idegsejt, melynek alakja, s ezáltal funkciója is jelentős térbeli különbségeket mutat, míg egy fibroblaszt<sup>1</sup> sejt az előbbi típusúak közé sorolható, lásd a 2.1. ábrát.

#### A sejt alak paraméterei

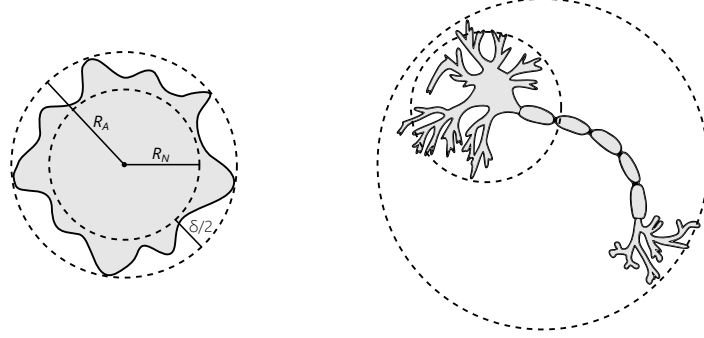
Biológiai megfigyelések alapján a sejtek képesek az alakjukat korlátozott mértékben megváltoztatni (nyúlványokat létrehozni), hogy kapcsolatot alakítsanak ki a közelben lévő más sejtekkel. Így olyan sejttípus esetén, amely csak kissé polarizált, lehetőség nyílik a sejt valószínűségi értelmezésére a következő módon [4]. Feleltessünk meg egy  $R_N$  sugarú gömböt a sejt egy olyan belső régiójának, mely alakját és méretét lényegében nem változtatja, valamint egy vele koncentrikus  $R_A$  sugarú másik gömböt egy olyan térrésznek, amibe a sejttest minden alakváltozás esetén nagy valószínűséggel beleesik. A sejt általunk megfigyelhető alakja így egy olyan gömbbel

<sup>1</sup> A kötőszövetet alkotó sejtek egy típusa.

írható le, melynek  $R$  sugarára teljesül az

$$R_N < R < R_A$$

összefüggés. Ebben az esetben nincs lehetőségünk a sejtfelszín alakjának pontos vizsgálatára, csak annyit mondhatunk, hogy a sejt átlagosan egy  $R$  sugarú gömbbel írható körül, amely képes kapcsolatok kialakítására egy  $R_A = R_N + \delta/2$  sugarú gömb alakú térrészen belül (lásd a 2.1. ábrát a jelölésekért).



**2.1. ábra.** Kevésbé polarizált (balra) és erősen polarizált (jobbra) sejtípusok. A bal oldali ábrán látható sejt jól közelíthető egy gömbbel, míg a jobb oldalon lévő kevésbé. A modellsejt deformálatlan régiójának (sejtmagjának) sugara  $R_N$ , adhéziós sugara  $R_A$ , a fluktuáló régió mérete  $\delta$ . A sejt megfigyelhető átlagos sugara az  $R_N$  és  $R_A$  közötti  $R_N + \delta/4$  méretű térrészbe esik.

A fenti megközelítés jól működhet olyan sejt esetén, mely épp nem osztódó fázisban van. Az osztódás folyamata azonban szükségessé teszi némi korrekció bevezetését, mivel ekkor a sejt alakja lényeges változásokon megy keresztül (ennek folyamatát lásd részletesebben a 2.2. szakaszban).

## A sejt helyzetét definiáló paraméterek

A sejt térbeli helyzetét annak tömegközéppontjával azonosítjuk, vagyis egy

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix}$$

háromdimenziós vektorral. Amennyiben a sejt már megkezdte a súlyzó alakra deformálódást, úgy a deformáció tengelyének irányát egy

$$\boldsymbol{\theta} = \begin{bmatrix} \theta_x \\ \theta_y \\ \theta_z \end{bmatrix}$$

irányú egységvektor reprezentálja. Ebben az esetben a két gömb alakú leánysejt  $\mathbf{x}_1$  és  $\mathbf{x}_2$  középpontjainak koordinátáit az

$$\begin{aligned}\mathbf{x}_1 &= \mathbf{x} - \frac{d}{2}\boldsymbol{\theta} \\ \mathbf{x}_2 &= \mathbf{x} + \frac{d}{2}\boldsymbol{\theta}\end{aligned}$$

összefüggések adják, ha azok középpontjainak távolsága  $d$ .

### 2.1.2. Potenciálfüggvények

Egy sejtpopuláció modellezési szempontból sok hasonlóságot mutat a kolloid rendszerekkel. Erre építve lehetőség nyílik a számítógépes fizikában sikerrel alkalmazott interakciós potenciálfüggvények bevezetésére úgy, hogy azok figyelembe vegyék a sejtek kolloidoktól eltérő tulajdonságait is, mint például a korlátozott összenyomhatóságot vagy összetapadási képességet.

#### Interakciós potenciálfüggvények

Drasdo és mtsai. [5] cikkében különböző lehetőségeket mutat be interakciós potenciálfüggvények felírására. Az alkalmas függvény felírásakor a cél két ellentétes igénynek megfelelni: egyrészt a függvény minél jobban ragadja meg a valódi sejt-sejt kapcsolatok viselkedését, másrészt kiszámítása legyen a lehető legegyszerűbb, mivel sok egyed esetén az interakciós energiák kiszámítása jelentős teljesítményigényű lehet.

A következőkben nagyon röviden áttekintjük a Függelékben részletesen ismertetett interakciós potenciálfüggvényeket, majd alaposabban tárgyalunk közülük egyet, melyet a modellbeli sejt-sejt kapcsolatok leírására fogunk felhasználni.

A sejtek közötti interakciós potenciális energia nagyságát általában két hatás – egy attraktív és egy repulzív energia – eredőjeként értelmezik. Ekkor az  $i$  és  $j$  egyedek között kialakuló interakciós potenciál értéke

$$V_{ij} = \begin{cases} V_{ij}^{\text{attr}} + V_{ij}^{\text{rep}} & \text{ha } \tilde{d}_{ij} < 0 \\ 0 & \text{egyébként} \end{cases},$$

ahol  $\tilde{d}_{ij} = d_{ij} - (R_A^i + R_A^j)$  az egymástól  $d$  távolságban lévő,  $R_A$  adhézión sugárral rendelkező sejtek közötti „hézag” értéke. Az attraktív és repulzív potenciálok pontos alakjának definiálására különböző megközelítések léteznek.

A *Hertz-típusú* potenciálfüggvény a sejtek kismértékű összenyomódását feltételezi. Értéke függ az egyedeket reprezentáló gömbök távolságától és nagyságától,

az érintkező felületek nagyságától, a felszínükön lévő adhézións molekulák számától, a molekula-molekula kötések energiájától, továbbá a sejtek Young- és Poisson-együtthatóitól. Ezek mind jól mérhető (vagy legalábbis közelíthető) fizikai paraméterek, így a Hertz-típusú potenciálfüggvények használatával a valóság bizonyos értelemben igen jó közelítése adható, ám ugyanakkor kiszámítása is igen költséges.

Az előbbi probléma megszüntetésére bevezethető a Hertz-potenciálfüggvény egy közelítése, a *harmonikus potenciálfüggvény*. A feltevései az előzővel azonosak, de lényegesen kevesebb fizikai paraméter felhasználásával épül fel a függvény. Egyúttal azonos paraméterek használata esetén nem mutat lényeges eltérést a Hertz-potenciálfüggvényhez képest (lásd a 2.2. ábrát).

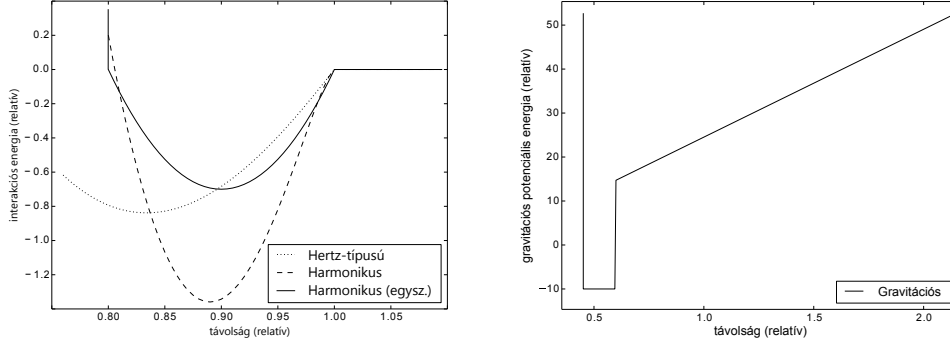
### Egyszerűsített harmonikus potenciálfüggvény

Az előzőleg bemutatott potenciálfüggvények viszonylagos bonyolultságából eredő többletszámítások nem feltétlenül teszik pontosabbá a modellt, a sejtek fizikai viselkedését tekintve. Drasdo és munkatársai egy igazán egyszerű, ugyanakkor a fentieket jól közelítő potenciálfüggvényt vezetnek be cikkükben [5]. Abban az esetben, amikor az előzőekben vázolt harmonikus potenciálfüggvényben az  $\epsilon = V_{ij}^{\text{attr}} \propto E^{\text{ref}}$  egyszerűsítéssel élünk (lásd a Függelékét a jelölésekért), a

$$V_{ij} = \begin{cases} \epsilon \left( \frac{2\tilde{d}_{ij}}{\delta} + 1 \right)^2 - \epsilon & \text{ha } -\delta \leq \tilde{d}_{ij} < 0 \\ \infty & \text{ha } \tilde{d}_{ij} < -\delta \\ 0 & \text{egyébként} \end{cases}$$

összefüggést kapjuk. Itt  $\epsilon$  értéke arányos a sejt típusra jellemző  $E^{\text{ref}}$  referencia-energiával [2], mely leegyszerűsíti az interakciós energiák kiszámítását. Fontos megjegyezni, hogy az így definiált interakciós potenciálfüggvények mindegyike kompakt tartójú, vagyis nullától különböző értéket csak az értelmezési tartományának csak egy részén vesz fel, melyet később kihasználhatunk.

A 2.2. ábrán az eddig tárgyalt interakciós potenciálfüggvények láthatók. Megállapítható, hogy a három függvény jellege hasonló (ez ráadásul a paraméterek széles tartományában igaz). Az egyes függvények minimumhelyei (vagyis az összetapadó sejtek energia szempontjából várhatóan optimális helyei) némileg eltérnek egymástól, azonban ennek szimulációs szempontból nincs jelentősége, mivel a szimulációs algoritmus futása során az interakciós energiák konkrét értékének nincsen kiemelt szerepe, csak az egyes energiaszintek egymáshoz viszonyított nagyságának.



**2.2. ábra.** Potenciálfüggvények. A bal oldali ábrán a két sejt között kialakuló interakciós energia nagysága látható az  $E^{\text{ref}}$  referencia energiához viszonyítva a sejtek közötti adhéziós sejtátmérőben mért relatív távolság függvényében. A jobb oldali ábra a gravitációs potenciálfüggvény értékét mutatja az edény aljától mért relatív távolság függvényében. Az alkalmazott paraméterek:  $l = 10 \mu\text{m}$ ,  $\varrho_m = 1 \cdot 10^{15} \frac{1}{\text{m}^2}$ ,  $W_s = 20k_B T$ ,  $E = 500 \text{ Pa}$ ,  $\sigma = 0.4$ ,  $\delta = 0.2l$ ,  $E^{\text{ref}} = 8 \cdot 10^{-16} \text{ J}$ ,  $\gamma_G = 10$ . (A jelölésekért lásd a Függelék.)

## Gravitációs potenciálfüggvény

A sejtek térbeli mozgásának leírásához szükséges egy gravitációs potenciális energia bevezetése. Ezzel egyrészt definiálhatjuk a gravitációs erő hatását a sejtekre, másrészt az interakciós potenciálhoz hasonlóan modellezhetjük a sejtek letapadásának folyamatát. Letapadás alatt azt a folyamatot értjük, amikor a frissen tenyésztő-edénybe került sejt rövid idő (tipikusan néhány óra) múltán lesüllyed az edény aljára, majd kötőmolekulák segítségével fizikai kapcsolatot hoz létre az edény anyagával.

Megfigyelések alapján a letapadást követően a sejtek csak korlátozott mértékben képesek elmozdulni, továbbá a kötéseket csak külső hatásra szakítják fel. Defináljuk az  $i$  sejtre ható  $V_i^{\text{grav}}$  gravitációs potenciálfüggvényt a következőképp:

$$V_i^{\text{grav}} = \begin{cases} -\epsilon & \text{ha } R_N < h_i < R_A \\ \gamma_G m_i g h_i & \text{ha } R_A \leq h_i \end{cases},$$

ahol  $h_i$  jelöli az  $i$  sejt magasságát az edény aljától mérve,  $m_i$  a sejt tömegét,  $g$  pedig a nehézségi gyorsulási állandót.  $\epsilon$  értékenek megválasztása a sejt és az edény falának kötési erősségétől függ, de – az interakciós potenciálhoz hasonlóan – konkrét értékének nincs kiemelt jelentősége. A  $\gamma_G$  együtthatóval befolyásolható a sejtrétegek egymásra növése mértéke. A fenti alakú gravitációs potenciálfüggvény megválasztásával elérhető, hogy a szimuláció során a sejtek lefelé mutató irányba igyekezzenek elmozdulni mindaddig, amíg ezt egy másik sejt vagy az edény fala nem akadályozza. Amennyiben az edény fala belekerül a sejt adhéziós régiójába, úgy a szimuláció során már valószínűtlen, hogy spontán felszakadjon ez a kötés. A modellben alkalmazott tipikus gravitációs potenciálfüggvény látható a 2.2. ábrán.

## 2.2. A sejt proliferációjának modellezése

### 2.2.1. A sejtciklus

#### Biológiai háttér

A sejt élete időben egymástól jól elkülöníthető szakaszokra osztható, melyen belül más-más sejtfolymatok történnek. Ezen folymatok összességét nevezzük sejtciklusnak. A sejtciklus első közelítésben két fő részre osztható: az interfázisra és a mitózisra. Az interfázis további szakaszokra osztható, ezek elnevezése  $G_0$ ,  $G_1$ ,  $S$  és  $G_2$ .

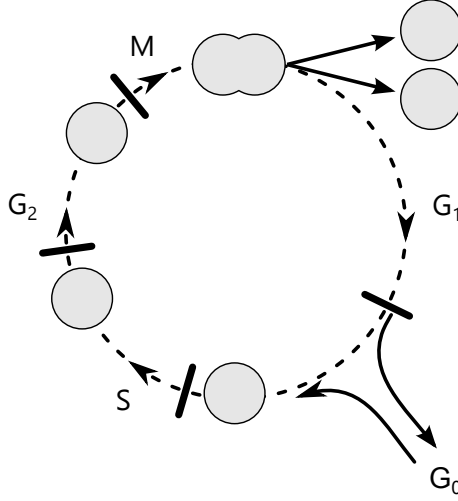
Egy  $G_1$  fázisban lévő sejt a környezetéből tápanyagokat vesz fel, miközben különböző anyagokat (aminosavakat, fehérjéket) szintetizál. A szintézis során keletkező anyagok miatt a sejt térfogata növekszik, tapasztalatok szerint egészen a kiinduló térfogat kétszeresének eléréséig [12]. A felhízott sejt ekkor átlép az  $S$  fázisba, melyen belül DNS-t szintetizál. Ezt a  $G_2$  szakasz követi, melyben a sejt felkészül az osztódásra. A folymat utolsó és egyben leggyorsabb része az  $M$  fázis, mely során a sejt súlyzó alakúra deformálódik, a sejtmembrán befűződik, és két kisebb, általában egyforma méretű leánysejt jön létre, melyek végül elválnak egymástól. A sejtciklus ezután újraindul a létrejött sejtekben.

A ciklus fázisainak határán ellenőrzőpont (checkpoint) működik, mely csak akkor engedi továbblépni a sejtet a következő fázisba, ha minden rendben zajlott, azaz megfelelő mennyiségű tápanyag áll rendelkezésre, vagy nem keletkezett hibás DNS-másolat (ez utóbbi például a tumorsejtekből hiányzik). Amennyiben egy checkpointnál hibát észlel a sejt, úgy elindul az előre programozott sejthalál (apoptózis) folymata – ez hivatott megakadályozni a hibás sejtmásolatok létrejöttét egészséges sejtekben. A  $G_1$  növekedési fázis során előfordulhat, hogy nem áll rendelkezésre megfelelő mennyiségű hely vagy tápanyag, így a sejt növekedése gátolva van (a jelenség neve kontakt gátlás). Ebben az esetben a sejtciklus leáll, a sejt egy  $G_0$  nevű nyugalmi állapotba kerül, és abban marad mindaddig, amíg a feltételek alkalmassá nem válnak a növekedés folytatásához.

A sejtciklus folymatát és jellemző időtartamait lásd a 2.3. ábrán.

#### A sejtciklus modellezése

Tapasztalatok szerint az egyes sejtípusok ciklushossza igen eltérő lehet, ugyanakkor az  $S$ ,  $G_2$  és  $M$  szakaszok hossza megfigyelések alapján közel azonos minden sejtípus esetén, tehát eltérés főként a  $G_1$  hosszában van.



**2.3. ábra.** A sejtciklus folyamatának sematikus ábrája. A szaggatott vonalú görbén elhelyezett keresztirányú szakaszok jelzik az egyes ellenőrzőpontokat. Az egyes fázisok jellemző időtartamai:  $G_1$ : 7-11 óra,  $S$ : 8 óra,  $G_2$ : 4 óra,  $M$ : 1 óra ([12] alapján).

Modellünkben létezik egy külső, objektíven megfigyelhető idő<sup>2</sup>, melyet a szimuláció időtartamának mérésére használunk. Ugyanakkor létezik a sejtnak is egy belső órája, melyen a fejlődéssel töltött időt mérjük. Ez a sejt megszületésének pillanatában nullát vesz fel, értéke pedig csak akkor növekszik, amikor a sejt képes a növekedésre. Előfordulhat ugyanis, hogy bizonyos körülmények miatt (például kontakt gátlás miatt) a sejt nem tudja növelni a méretét. Ebben az esetben belső óráján nem telik az idő, azaz a külső szemlélő számára a sejt megáll a fejlődésben, mellyel a  $G_0$  fázisba kerülést modelleztük.

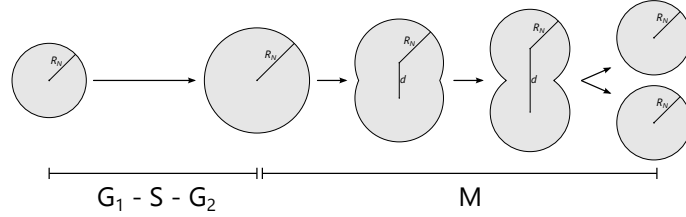
A sejt fejlődésének folyamatát és a sejtciklus modellben megvalósított egyes fázisait mutatja a 2.4. ábra. A  $G_1$  fázis hosszát normális eloszlásból választjuk, melynek várható értéke a sejt típusra jellemző  $G_1$  időtartam. Ebben a fázisban a sejt átmérője egy adott mennyiséggel növekszik minden szimulációs lépésben. A  $G_1$  és  $S$  határán lévő ellenőrzőponton akkor léphet át a sejt, ha térfogata elérte az induló térfogat kétszeresét, azaz amikor  $R \geq \sqrt[3]{2}R_0$  (ahol  $R_0$  az újonnan létrejött sejt sugara).

Az  $S$  és  $G_2$  fázisban lévő sejtekben végbemenő változásokat a modell nem tartalmazza, így ezekben az fázisokban csak a sejt belső órájának ideje növekszik. Amennyiben a belső idő átlép egy, a szakaszra jellemző értéket (a fázishosszt), a sejt átkerül a következő fázisba.

Az  $M$  fázis a sejt életének legrövidebb szakasza, morfológiailag egyben a legérdekesebb is. A sejten belül végbemenő membrán-befűződést és kettéválást a következő folyamat modellezi (lásd a 2.4. ábrát). A sejtet egyetlen  $R$  sugarú, gömb alakú test helyett kettő darab gömb reprezentálja, melyeknek  $M$  kezdetén középpontjuk

<sup>2</sup> Léteznek ettől eltérő megközelítések is, lásd például [5]

megegyezik. A folyamat során ezek a gömbök úgy távolodnak el egymástól a 2.1.1 szakaszban leírt  $\theta$  irányvektorú tengely mentén, hogy összesített térfogatuk kiadja a felhízott sejt térfogatát, valamint a folyamat ideális körülmények között épp  $M$  időtartama alattt menjen végbe. A mitózis folyamata akkor ér véget, amikor a két leánysejtet reprezentáló gömb középpontjának  $d$  távolságára  $d > 2R_N$  teljesül, mivel ekkorra a leánysejtek kikerültek egymás deformálhatatlan térrészéből.  $M$  végén a két leánysejt már önállóan létezik.



**2.4. ábra.** A sejt fejlődésének folyamata a szimuláció során. (A  $G_1$ - $S$ - $G_2$  szakasz és az  $M$  szakasz hossza az ábrán nem arányos.)

## 2.3. A Metropolis Monte-Carlo módszer

A szimuláció során a sejtek elhelyezkedését, mozgását, növekedését és osztódását fizikai korlátok szabályozzák. Ezeket a fizikai korlátokat a Metropolis Monte-Carlo algoritmuson keresztül építem be a modellbe. A módszer alapötletét az a statisztikus fizikai megfigyelés adja, hogy részecskék lehetséges elrendeződései közül azokat figyelhetjük meg a valóságban, melyek bekövetkezésének valószínűsége nagy. Valószínűtlen elrendeződések csak nagyon ritkán, vagy soha nem figyelhetők meg.

A sejtet mint kölcsönható részecskét kezelem a szimuláció során. A sejt egyes lehetséges elrendeződéseinek megfeleltetek egy bizonyos energiaszintet, melyet az interakciós- és gravitációs potenciálfüggvények definiálnak. Egy adott elrendeződésből a szimuláció során egy sejt csak olyan elrendeződésbe kerülhet, mely során annak energiája csökken, vagy csak kis valószínűséggel növekszik, melyet precízen az alábbi algoritmus definiál.

- 
1. adott a sejtek egy elrendeződése
  2. az  $i$ -edik sejt adott elrendeződéshez tartozó energiaszintje  $E_i^0$
  3. a sejt egy paraméterét véletlenszerűen megváltoztatjuk, majd kiszámítjuk az így előálló  $E_i^1$  energiaszintet
  4. ha  $\Delta E_i = E_i^1 - E_i^0 < 0$  vagy
  5. ha  $r < \exp(-\Delta E_i)$  akkor a változást elfogadjuk, egyébként pedig elutasítjuk, ahol  $r$  egy  $[0,1)$  egyenletes eloszlásból kapott véletlen szám
- 

### 2.3.1. Próbák

A szimuláció során a sejtek tengelyirányának megváltozását (forgását), elmozdulását, növekedését, osztódását és pusztulását részben az előbbi algoritmuson alapuló, részben attól független próbák irányítják. Minden esemény egy rá jellemző próbához kötött, mely próba dönt az esemény bekövetkezéséről.

#### Rotációs Monte-Carlo próba

A próba során az  $M$  állapotban lévő, súlyzó alakúra deformálódott sejt véletlenszerűen megváltoztathatja  $\theta$  tengelyirányát. Az új tengelyirány egyenletes eloszlású az egységgömb felszínén, vagyis minden térbeli irány egyforma valószínűséggel fordulhat elő. A forgás a rendelkezésre álló hely minél jobb kitöltése miatt lényeges, így hatással van többek között a kialakuló sejttelep alakjára és sűrűségére.

#### Migrációs Monte-Carlo próba

Sejtciklus fázistól függetlenül bármely sejt képes migrációra, mely során közép-pontja eltolódik egy véletlen térbeli vektorral. A próba során a maximális elmozdulás mértékének két, egymással ellentétes követelménynek kell eleget tennie: egyrészt legyen elegendően nagy, hogy a sejtek képesek legyen energetikailag optimális elrendeződésbe kerülni a lehető legkevesebb migrációs lépés megtételével; másrészt kellően kicsinek kell lennie ahhoz, hogy a szabadon álló sejtek ne kerülhessenek irreálisan messzire eredeti helyüktől. A maximális elmozdulás mértékének meghatározását és a Monte-Carlo próbák számával való összefüggését a következő szakaszban tárgyalom.

## Növekedési próba

A próba során egy  $G_1$  fázisban lévő sejt átmérője egy véletlen mennyiséggel megnő. A próba elfogadja a növekedési lépést, ha általa a sejt nem metsz bele más sejtek deformálhatatlan térrészeibe, és nem nő túl a tenyésztőedény határain. A növekmények értékét úgy választom meg, hogy ideális körülmények között – ha a sejt nincsen fizikailag gátolva a növekedésben, vagyis kellő hely áll rendelkezésére – a sejt éppen  $G_1$  hosszúságú idő alatt kétszerezze meg térfogatát.

## Deformációs próba

Az  $M$  fázisba került sejtet alkotó egyetlen gömböt két, kezdetben egyező méretű, azonos középponttal rendelkező gömbre cserélem. Az osztódási folyamat során a gömbök középpontjai a korábban már említett módon addig távolodnak egymástól, amíg a leánysejtek el nem hagyják egymás deformálhatatlan térrészét. A távolsággal párhuzamosan a gömbök átmérője is csökken, konstans értéken tartva ezáltal a sejt térfogatát. Egy ilyen deformációs lépés akkor megengedett, ha általa a sejtet alkotó gömbök egyike sem metsz bele más sejtek deformálhatatlan régióiba, és nem lép túl a tenyésztőedény határain. A deformáció végén a sejtek elválnak egymástól, s a korábban leírtak szerint két önálló sejt jön létre. A távolodási lépések nagyságát úgy határozom meg, hogy ideális körülmények között (fizikai gátlás hiányában) épp  $M$  hosszúságú idő alatt történjen meg a szétválás.

## Pusztulási próba

Bármely sejtnak minden szimulációs lépésben van valamekkora esélye arra, hogy elpusztuljon. Ez a pusztulási valószínűség a populációra jellemző növekedési rátából származtatható, melyet a következő szakaszban ismertetek. Ha a sejten végrehajtott pusztulási próba sikeres, akkor a sejt eltávolításra kerül a szimulációs környezetből.

## 2.4. A modell paramétereinek becslése

### 2.4.1. A sejt méretbeli jellemzőinek becslése

A modellezett sejtek átlagos átmérőit egy Bio Rad TC10 automata optikai sejtszámláló készülékből származó adatokból becsültem. Az egyes sejtszámlálások alkalomával nyert sejtméret adatokból – melyekről feltételezhető, hogy normális eloszlást követnek – illesztéssel becsültem a eloszlás paramétereit. Ezután a tenyészetekről készült mikroszkópos felvételeken véletlenszerűen kiválasztva néhány sejtet, mindegyikhez felvettem egy *beírható* és egy *köré írható* kört a következő módon.

A beírható kör olyan maximális méretű kör, mely teljes egészében a sejten belül helyezkedik el, a köré írható kör pedig olyan minimális méretű kör, mely a teljes sejtet magába foglalja. A beírható és köröket a sejtek modellbeli összenyomhatatlan térrészeivel, míg a köré írható köröket az adhézis térrészekkel azonosítottam, így a megfelelő átmérőket átlagolva, majd a sejtek átlagos átmérőjéhez viszonyítva meghatároztam az összenyomhatatlan és az adhézis térrészek arányát az adott sejt típusra.

## 2.4.2. A migrációs Monte-Carlo próbák paramétereinek meghatározása

A szimuláció során egy szabadon álló (más sejtekhez nem kötött) sejt véletlen bolyongó mozgást végez, mely fizikailag diffúzióként értelmezhető. Amennyiben rendelkezésre áll a sejt típusra jellemző  $D$  diffúziós konstans, akkor  $D$  értékéből elvben következtetni lehet az egyes migrációs lépésekben maximálisan megengedhető elmozdulás nagyságára [5].

Az egyes szimulációs időlépések alatt végrehajtott migrációs próbák számának alapvető hatása van a populáció egyedszámának alakulására. Megfigyelések szerint megfelelő mennyiségben rendelkezésre álló hely és tápanyag esetén valódi *in vitro* sejtpopulációk exponenciális ütemben növekednek, és a sejttelep belsejét alkotó sejtek közel azonos sebességgel osztódnak, mint a peremen lévők (Füredi András eredményei alapján). A szimuláció során azonban a növekvő sejttelep egy bizonyos időpontban („crossover time”, [4]) elér egy olyan méretet, amikor a sejtek által diffúzióval bejárható tartomány mérete már alatta marad a sejttelep méretének, így a telep belseje egyre tömörebbé válik, az ott lévő sejtek osztódási sebessége lecsökken, és a populáció nem képes tartani az addigi exponenciális növekedési ütemet. A diffúzióval bejárható térrész nagysága a sejtre jellemző  $D$  diffúziós konstans nagyságának, illetve a végrehajtott migrációs próbák számának függvényében növekszik.

A fentiek miatt az egyes szimulációs időlépések során szükséges migrációs Monte-Carlo próbák számát a szimuláció megkezdésekor rögzítettem, figyelembe véve a szimuláció tervezett időtartamát. Amennyiben az előzőekben vázolt „crossover time” értéke nagyobb a tervezett hosszánál, akkor a növekedés várhatóan végig közel exponenciális marad. A szükséges migrációs próbák számának hozzávetőleges meghatározását irodalmi adatok alapján végeztem [4]. Általánosságban elmondható, hogy az általam futtatott tipikusan néhány hét hosszúságú szimulációk során a migrációs próbák száma  $10^0 - 10^2$  nagyságrendű volt minden szimulációs időlépés során.

### 2.4.3. A sejtciklus hosszának becslése

Tételezzük fel, hogy egy olyan sejtpopuláció növekedését vizsgáljuk, melynek elegendő hely és tápanyag áll rendelkezésre az osztódáshoz. Jelölje a populációt alkotó sejtek számát  $n(t)$  a  $t$  időpontban. Ebben az esetben  $n(t)$  kielégíti a

$$\frac{d}{dt}n(t) = (\kappa - \lambda)n(t)$$

differentiálegyenletet valamely  $n(0) = n_0$  kezdeti feltétellel, ahol  $\kappa > 0$  a populációra jellemző növekedési sebesség, vagyis a szaporodási ráta,  $\lambda > 0$  a populációra jellemző pusztulási ráta,  $n_0$  pedig egy tetszőleges pozitív konstans (a kiindulási populáció mérete). A fenti egyenletből kiszámítható a populációt alkotó sejtek számának megduplázódásához szükséges  $\tau$  idő hossza, ami

$$\tau = \frac{\ln 2}{\kappa - \lambda},$$

ez pedig éppen a populációt alkotó sejtek átlagos sejtciklusának időtartama. A képlet alapján megbecsülhető egy, a populációra jellemző  $\tau$  érték (lásd részletesebben [3]). Valódi mérési eredmények birtokában lehetséges külön  $\kappa$  és  $\lambda$  értékének meghatározása, ezt részletesebben a következő fejezetben tárgyalom.

## 2.5. Implementáció

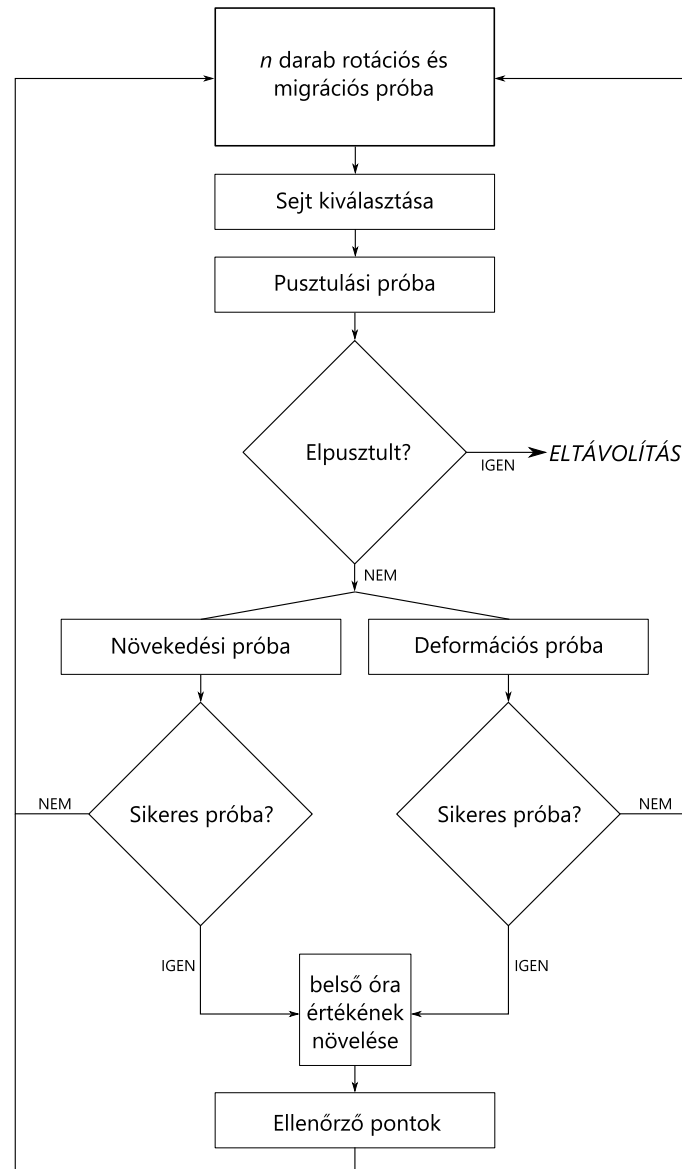
### A választott környezet és használatának indoklása

A bemutatott modellt *Python* programnyelven implementáltam. A döntés mellett szóló legerősebb érvek az egyszerűség, platformfüggetlenség, ingyenesség és a széleskörű támogatottság, melyre építve rengeteg már létező modult felhasználhattam. Nem elhanyagolható az sem, hogy a *Numpy* és *SciPy* modulok professzionális matematikai programcsomagokban is alkalmazott algoritmusok használatát teszik lehetővé, lényegesen megkönnyítve ezáltal a fejlesztés menetét. Igaz ugyanakkor, hogy a fenti szempontok egy része igaz más programnyelvekre is (például C++), ugyanakkor a munka során a modell prototípusának kifejlesztése és tesztelése volt elsődleges cél a teljesítménnyel szemben.

#### 2.5.1. A szimulációs folyamat

A szimulációt egy előre megválasztott  $T$  időtartam, egy kezdeti  $n_0$  sejtszám, a szimulációs környezet (tenyésztőedény), illetve a sejtek mérhető jellemzőinek megadása után lehetséges futtatni. A folyamat  $k = T/\Delta t$  iterációs lépésből áll, egy előre rögzített  $\Delta t$  időtartamot jelentő szimulációs lépéshossz esetén.

A szimuláció paramétereit tartalmazó input fájl feldolgozását követően létrehozom a szimulációs teret (tenyésztőedényt), melyet kisebb részekre (*interakciós domainekre*, lásd 2.5.2) osztok. A szimulációs folyamat egy általános lépésben a domaineken végigjárva elvégzem a megfelelő számú rotációs és migrációs próbát, majd a sejteket tartalmazó lista elemein (a sejteken) véletlenszerű sorrendben végigfutva elvégzem a különböző próbákat. Az előre definiált időpontokban elmentem a szimuláció aktuális állapotát, mely így később különböző szempontok szerint kiértékelhető.



**2.5. ábra.** A szimuláció folyamatábrája.

## 2.5.2. Gyorsítási módszerek

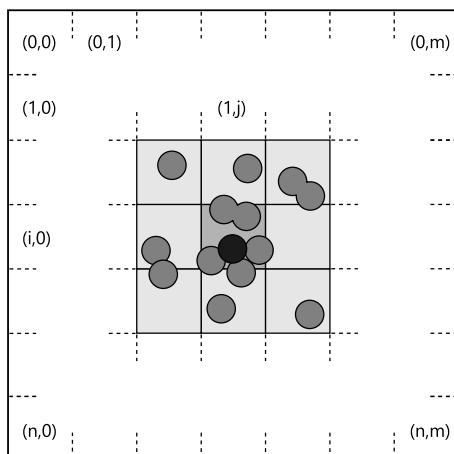
A szimuláció egy iterációs lépése alatt minden egyes Monte-Carlo próba (rotáció és migráció) során a sejt energiaszintjének meghatározásához  $n \cdot (n - 1) = O(n^2)$  interakciós energia kiszámítása szükséges. Ez nagy számú sejt esetén jelentős számítási teljesítményt igényelne, melyet a következő módon szokás kivédeni.

### Verlet-listák használata

A Verlet-féle szomszédsági listák alapötlete, hogy kompakt tartójú potenciálfüggvények esetén egy adott sejtre elegendő annak csak egy bizonyos (az interakciós távolságtól függő) környezetében lévő más sejtekkel vett interakciós energiáját kiszámítani, mivel a többivel vett értéke úgyszólván nulla [13]. A 2.1.2. szakaszban definiált potenciálfüggvények rendelkeznek ezzel a tulajdonsággal, így a sejtek adott idő alatt megtett elmozdulásából megbecsülhető egy olyan távolság (a szomszédsági rádiusz), melyen belül a  $k$  lépést megtevő sejt nem érhet el olyan sejteket, melyekkel az interakciós energiája nullától különböző lenne. A sejt szomszédsági rádiuszán belül lévő sejteket egy listába gyűjtve elegendő lenne csak  $c \cdot n$  interakciós energia kiszámítása a szomszédsági rádiusztól függő  $c$  darab szomszéd esetén. A listákat azonban bizonyos időközönként frissíteni kell, ami mindenképp  $O(n^2)$  távolság kiszámítását jelenti. A Verlet-listák használata tapasztalatok szerint képes ugyan a szimuláció felgyorsítására, a következő módszer azonban még ennél is nagyobb megtakarítást eredményez.

### Interakciós domaineik bevezetése

Verlet ötletét továbbfejlesztve szokás a szimulációs teret az előbb már említett módon kisebb – a tér dimenziójától függően téglalap vagy téglalest alakú – részegységekre (domainekre) bontani (lásd a 2.6. ábrát). Tegyük fel, hogy egy domain kellően nagy méretű a sejtek lehetséges megváltozásához (elhelyezkedés, méret) képest, azaz  $t$  szimulációs idő alatt a sejt biztosan nem képes kikerülni annak szomszédságából. Ebben az esetben minden sejtet elláthatunk egy címkével, hogy az épp melyik domainben tartózkodik, s interakciós energiákat elegendő csak az aktuális domainnel szomszédos domaineikben lévő sejtekkel kiszámítani, mivel – a domain méretének megválasztása miatt – a többi sejttel úgyszólván nulla lenne az interakciós energia értéke. Amennyiben ezen felül minden domainhez hozzárendelünk egy listát, mely az abban a tartományban lévő sejtekből áll, akkor az interakciós energiák kiszámítása lineáris-sá válik a sejtszám függvényében, mely jelentős számítási megtakarítást eredményez. A listákat elegendő  $t$  időközönként frissíteni az korábban leírt idokok miatt.



**2.6. ábra.** Interakciós domainek két dimenzióban. A teljes szimulációs teret ebben az esetben  $n \times m$  tartományra particionáltam. Az  $(i, j)$  címkéjű domainben lévő sejtekre elegendő csak az  $(i - 1, j - 1), (i - 1, j), \dots (i + 1, j + 1)$  szomszédos (világos szürke színnel jelölt) domainekben lévő sejtekkel kiszámítani az interakciós energiát.

### Interakciós domainek optimális méretezése

Az interakciós domainek előzőekben leírt kedvező tulajdonságai miatt a modellt ezekre alapozva implementáltam. A domainek használatával megtakarított számítások mennyisége akkor maximális, ha a domaineket a lehető legkisebbre választjuk, így csökkentve a lehetséges interakciós párok számát. Ennek a minimális méretnek viszont két dolog szab határt: a sejtek elméleti maximális mérete, illetve a program futása alatt felhasználható memória mennyisége.

Ha egy sejt nagyobb, mint az őt tartalmazó domain, akkor előfordulhat, hogy valójában szükséges volna interakciós energiát számítani valamely más sejttel, ez azonban a szimuláció során nem történik meg, mivel a sejt középpontjának koordinátái alapján nem lehetne szomszédos az említett másik sejttel. Hogy ezt elkerüljem, a domainek legkisebb dimenziójának (oldalhosszának)  $l_D$  méretét a

$$l_D = 2(\sqrt[3]{2}d_A)$$

képlettel határoztam meg, mely felülről becsüli a kezdetben  $d_A$  adhézión átmérővel rendelkező, kétszeres térfogatúra felhízott, és méretcsökkenés nélkül egymástól eltávolodó leánysejtek által meghatározott térrész legnagyobb kiterjedését. Természetesen ennél sokkal élesebb becslés is adható, amennyiben a leánysejtek méretcsökkenését is figyelembe vesszük, azonban tapasztalataim szerint a némileg kisebb domainek (melyek darabszáma ekkor viszont megnő) nem eredményezik a szimuláció jelentős gyorsulását, ezen felül a szimuláció memóriaigényét is megnövelik.

Az előbb említett memóriaigény túlzott növekedése azért sem elhanyagolható tényező, mivel asztali számítógépes környezetben a hardver memóriakorlátainak túl-

lépése esetén a program futása drasztikus mértékben lelassul a virtuális memória használata miatt. Ennél is erősebb érv az, hogy az általam elérhető szuperszámítógépeken (lásd a következő fejezetben) futtatott szimulációk indításakor előre szükséges a memóriafoglalás, melynek túllépése esetén a folyamatot leállítja a feladatkezelő.

### 2.5.3. Az adatok tárolását végző modul és a MultiCellXML formátum

A szimuláció során előálló adatok tárolása nélkülözhetetlen, hogy azok később különböző módon kiértékelhetők legyenek. A tárolásra több lehetséges mód kínálkozik, ezek egyike a kifejezetten ágens alapú szimulációs adatok tárolására Macklin és mtsai. (2012) által létrehozott XML-alapú MultiCellXML formátum [7]. A formátum megalkotásakor a cél az volt, hogy a kiértékelésre kerülő adatok olyan formában legyenek eltárolva, melyek akár egy általános XML-feldolgozóval is megjeleníthetők, szabad szemmel egyaránt jól olvashatók, segítve ezáltal az információ értelmezését. Bár nagy számú sejt tárolásakor – amennyiben a szükséges tárhely minimalizálása a szempont – ez a megközelítés nem tekinthető optimálisnak, előnyei mégis ellensúlyozzák ezt a tulajdonságát.

A szimuláció során az előre megadott időpontokban (példuál minden 24. órában) a program elmenti a folyamat aktuális állapotát, eltárolva a mentés kísérletbeli időpontját, valamint tenyésztőedény és a sejtek jellemzőit (úgy mint aktuális pozíció, átmérő, sejtciklus fázisa vagy Pgp expressziós szint).

### 2.5.4. A vizualizációt végző modul

A szimuláció során eltárolt adatok vizualizálását egy külön szkript végzi, melyet a *MayaVi Data Visualizer* nevű *Python* modulra építve hoztam létre. A modult nagyfokú testreszabhatóság és igényes megjelenítés jellemzi. Az szkript az eltárolt XML fájlokat dolgozza fel, majd az aktuálisan definiált beállításoknak (sejtek színezése, kamera jellemzői) megfelelően előhívja a kompozíciót. Ezek után lehetőségünk van három dimenzióban forgatva és tetszőlegesen közelítve megvizsgálni az előhívott képkockát, illetve elmenthetjük azokat.

Lehetséges úgy is beállítani az előhívást végző szkriptet, hogy az automatikusan elvégezze a szimuláció során létrejött adatok vizualizációját, melyet utána timelapse-felvétellé fűz össze.

## 3. fejezet

# Szimulációs és kísérleti eredmények összevetése

### 3.1. Sejtpopulációk növekedésének szimulációi

#### Biológiai háttér

A modellből származó eredményeket valós, *in vitro* növekedési adatokkal vetetem össze. Az ehhez tervezett kísérletek során lehetőségem nyílt a sejtenyésztés alapttechnikáinak megismerésére és elsajátítására. A létrehozott tenyészetek felhasználásának elsődleges célja a növekedési mintázat és az sejtszámok megfigyelése volt két, morfológiailag jelentősen eltérő sejtvonalon. A tenyészeteket készítésekor a kiinduló sejtszuszpenzót megfelelően hígítva úgy adagoltam a sejt típusonként  $3 \times 60$  darab tenyésztőedénybe, hogy azokba várhatóan egyetlen sejt kerüljön. A kiültetés után – szemben a szimulációval – a sejtek nem kezdenek azonnal növekedni és osztódni, előtte egy úgynevezett *lag* fázis figyelhető meg, melynek hossza igen változó. A szimulációs és kísérleti eredmények összevetését az alacsony induló sejtszámon felül tovább nehezítette, hogy a tárolásra használt sejtenyésztő kamra (inkubátor) a gyakori használat miatt nem képes mindig a sejtek számára ideális körülményeket ( $37.5^{\circ}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$ ) biztosítani, ami tapasztalatok szerint kihat a sejtek növekedési és osztódási folyamataira is. A kisméretű (nagyjából  $200\mu\text{l}$  űrmértékű) tenyészőedény továbbá korlátozza a sejtek számára elérhető tápanyag mennyiségét is, mely a modellben korlátlanul rendelkezésre áll. Az alábbiakban közölt eredmények értékelésénél ezeket mindenképp szükséges szem előtt tartani.

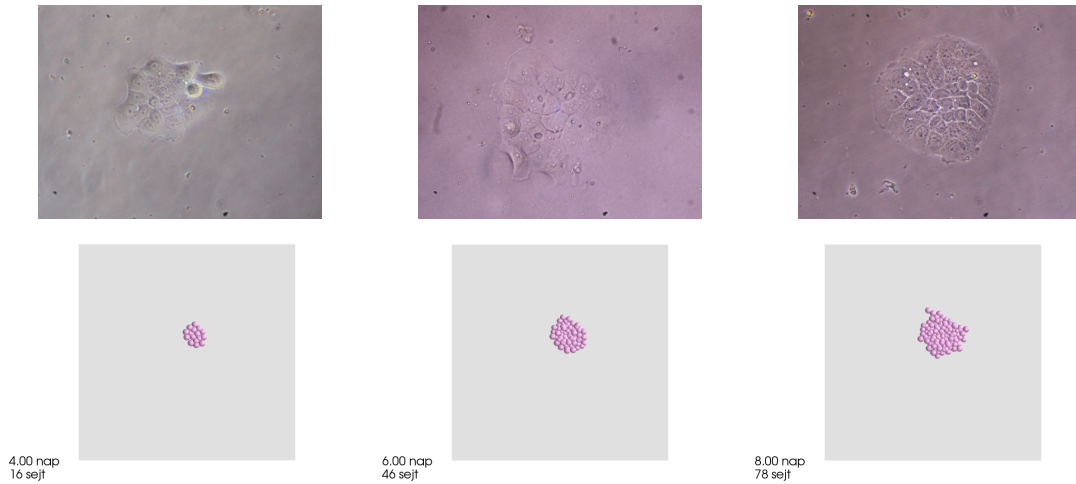
### 3.1.1. A431 sejtvonal növekedési jellemzőinek szimulációja

#### Az A431 sejttípus

Epidermoid karcinóma (laphámrák eredetű) sejtvonal. Nagyon erős adhézió jellemzi a sejteket, a rendelkezésre álló teret hézagmentesen töltik ki. Kizárólag monolayerben képesek fejlődni. Nem multidrog rezisztens (lásd a Bevezetésben) sejttípus.

#### Szimulációs paraméterek és eredmények

A sejtvonal előbbiekben leírt tulajdonságait egyrészt a sejteket jellemző összenyomhatósági és adhéziós tartomány, másrészt az interakciós- és gravitációs potenciálfüggvény értékének megválasztásával értem el. A szoros térkitöltést a kisebb összenyomhatósági tartomány, illetve az erősebb interakciós potenciálérték rögzítésével, míg a monolayerben történő növekedést a gravitációs potenciálérték kellően nagyinak választásával modelleztem. A választott paraméterek pontos értékét lásd a 3.1 ábra feliratán.

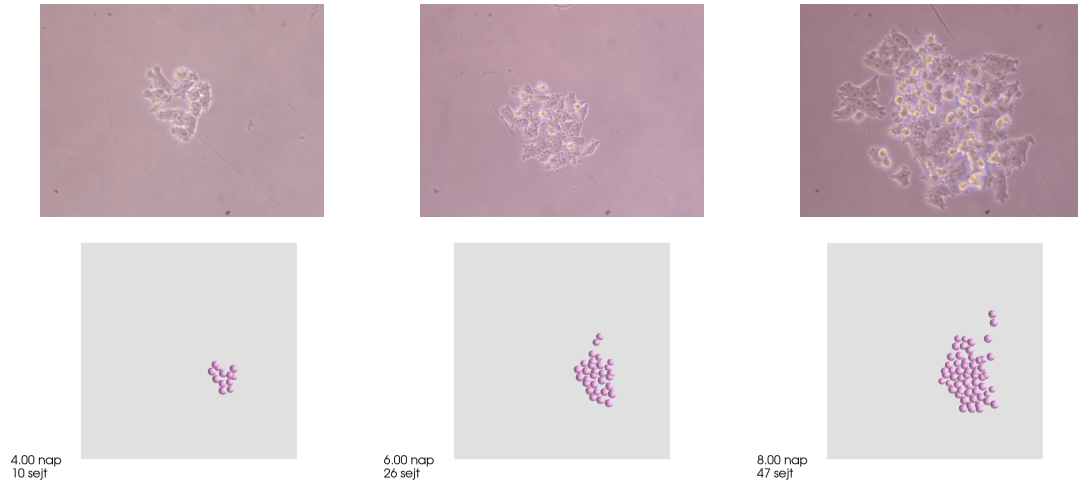


**3.1. ábra.** A431 sejtenyészet fáziskontraszt-mikroszkópos fotói (felső sor) és szimulációs képei (alsó sor). A mikroszkópos képek a szimulációs eredményekhez képest egy nappal későbbi állapotot mutatják, figyelembe véve a sejtek kiültetésnél tapasztalható *lag* fázist. A szimuláció során alkalmazott paraméterek:  $d = 14.5 \mu\text{m}$ ,  $R_N = 0.9d$ ,  $R_A = 1.5d$ ,  $V_{\min}^I = -5.0E^{\text{ref}}$ ,  $\gamma_G = 10^{2.5}$ .

### 3.1.2. MES-SA/Dx5 sejtvonal növekedési jellemzőinek szimulációja

#### A MES-SA/Dx5 sejttípus

A humán uterin szarkóma sejtekből alapított MES-SA sejtvonal többször ismételt doxorubicin kezelés hatására Pgp-t nagy mennyiségben termelő rezisztens



**3.2. ábra.** MES-SA/Dx5 sejtenyészet fáziskontraszt-mikroszkópos fotói (felső sor) és szimulációs képei (alsó sor). A mikroszkópos képek a szimulációs eredményekhez képest egy nappal későbbi állapotot mutatják, figyelembe véve a sejtek kiültetésénél tapasztalható *lag* fázist. A szimuláció során alkalmazott paraméterek:  $d = 14.5 \mu\text{m}$ ,  $R_N = 0.95d$ ,  $R_A = 1.5d$ ,  $V_{\min}^I = -2.5E^{\text{ref}}$ ,  $\gamma_G = 10^{2.5}$ .

variánsa. Az A431-hez képest gyengébben kötődve növekednek. Amennyiben a rendelkezésre álló hely nem teszi lehetővé a monolayerben növekedést, akkor hajlamos újabb rétegeket növesztetni a már meglévő tetején.

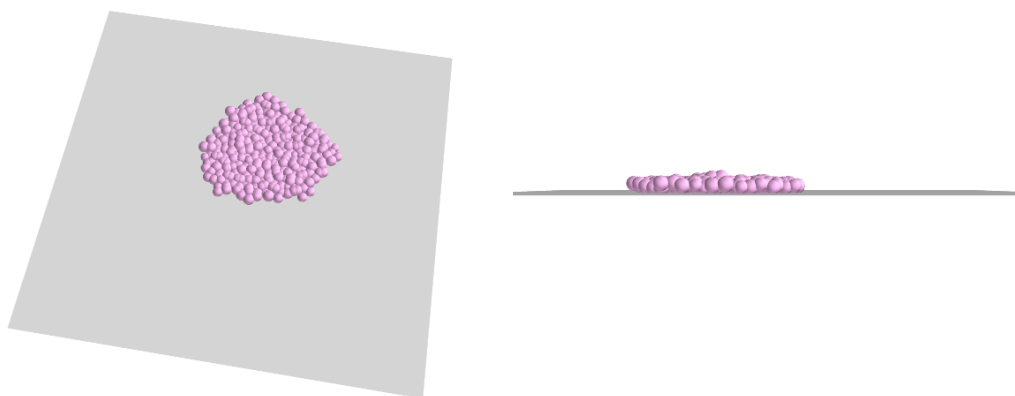
### Szimulációs paraméterek és eredmények

A fenti tulajdonságok modellezéséhez az előbbiekhöz hasonlóan az összenyomhatósági és adhéziós tartomány, valamint az interakciós- és gravitációs potenciál-függvény értékét állítottuk be. Mivel ezek sejtek lazábban kötődnek egymáshoz, így kisebb összenyomhatósági tartományt, és interakciós potenciálértéket választottunk. A gravitációs potenciálérték mérésével a sejtek nagyobb eséllyel kezdenek egymásra nőni. A választott paraméterértékeket lásd a 3.2 ábrán.

## 3.2. Hatóanyag-koncentrációtól függő szaporodási sebesség

### Biológiai háttér

A 2.4.3. alszakaszban vázolt módon a sejtek növekedését populációs szinten két paraméter, a növekedési ráta ( $\kappa$ ) és a halálozási ráta ( $\lambda$ ) szabályozzák. Míg előző közvetlen kapcsolatot mutat a sejt típusra jellemző sejtciklus hosszával, addig utóbbi főként a sejtre pusztító hatással lévő hatóanyag koncentrációjától függ. *In vitro* sejt-populációk növekedésének mérését lehetséges többek között fluoreszcencia-intenzitás



**3.3. ábra.** A431 sejtvonal tipikus szimulációs eredménye. Az ábrákon egyetlen sejtől indított futás eredményei láthatók 14 nap múlva. Ahogyan bal oldali ábrán jól látható, a sejtek egymáshoz szorosan tapadva egy összefüggő, jól körülhatárolható telepet hoznak létre. A jobb oldali ábrán ugyanez a sejttelep látható oldalnézetben. A sejtek csak egy rétegben növekednek, egymás tetejére növeő sejtek nem fordulnak elő a populációban. A szimuláció során használt paraméterek értékei megegyeznek a 3.1. ábra feliratában megadottakkal.

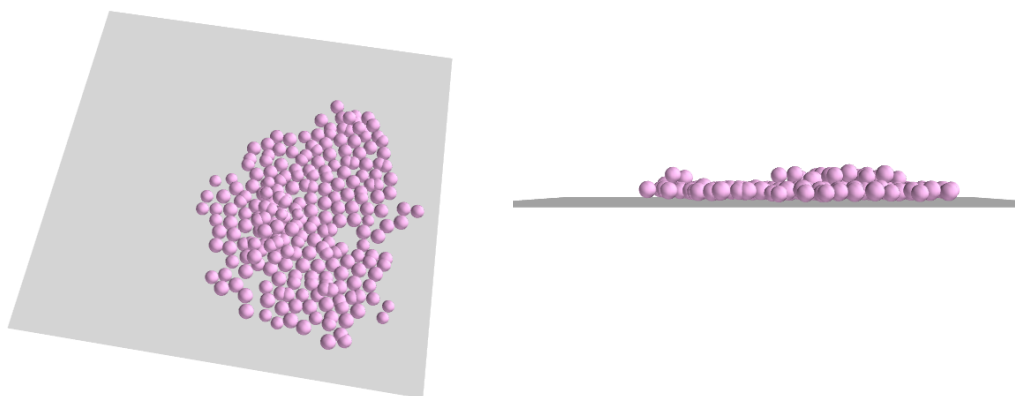
mérésével végezni. Pontos, darabszámmra történő átváltás ezzel a módszerrel nem lehetséges, mivel például a sejttel termeltetett fluoreszcens anyag mennyisége a sejt pusztulása után sem csökken azonnal nullára, így kissé torzítva a kapott eredményeket.

### 3.2.1. Szimulációs paraméterek és eredmények

#### Biológiai háttér

A különböző típusú hatóanyagokhoz és az alkalmazott koncentrációhoz eltérő  $\lambda$  halálozási ráták tartoznak, melyek a rendelkezésemre álló sejtszám mérésekből a következő módon határozhatók meg. Egy kiválasztott hatóanyag esetén különböző dózissal kezelve a sejtmintákat, majd adott időszakonként mérve a minta fluoreszcencia-intenzitását, lehetséges az egyes dózissokra ábrázolni az intenzitás megváltozását. Az intenzitásgörbe azon szakaszán, ahol a növekedés exponenciális, kiszámítható a populációra jellemző  $(\kappa - \lambda)$  növekedési ráta (lásd a 2.4.3. résznél). A nulla koncentrációértéket kontrollként véve meghatározható  $\kappa$  értéke (ilyenkor feltehető, hogy a sejtek egyáltalán nem pusztulnak). Ehhez viszonyítva lehetséges az adott drogonkoncentrációra számított  $(\kappa - \lambda)$  értékből  $\lambda$ -ra következtetni.

A 3.5. ábra a fluoreszcencia-intenzitás mérések eredményeit (pontokkal jelezve a 0., 24., 48., 72., 96., 120. és 144. órában), a kezdeti exponenciális növekedési szakasz adataira illesztett növekedési görbéket, valamint az azokból származtatott



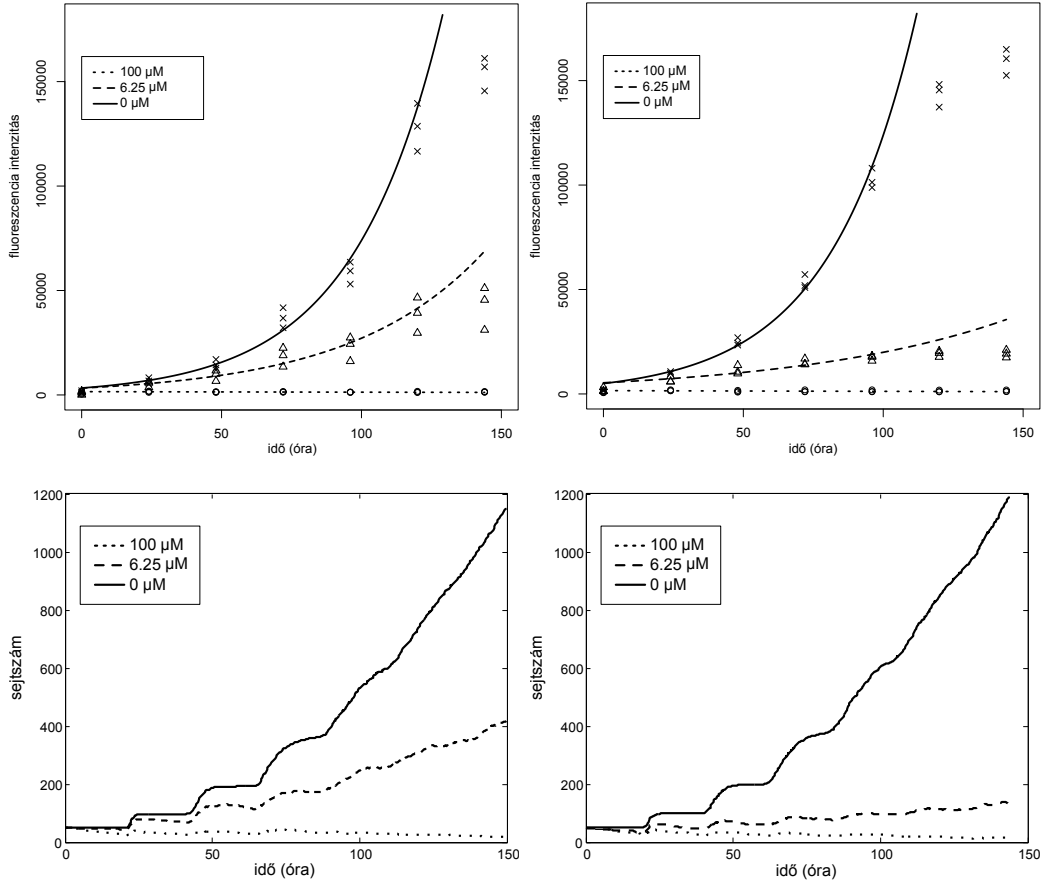
**3.4. ábra.** MES-SA/Dx5 sejtvonal tipikus szimulációs eredménye. Az ábrákon egyetlen sejtől indított futás eredményei láthatók 14 nap múlva. A sejtek kevésbé összenyomhatók és lazábban kapcsolódnak egymáshoz, így a sejttelep alakja kevésbé szabályos, határa nem olyan élés (bal oldali ábra). A sejtek hajlamosabbak egymás tetejére is osztódni, ha a rendelkezésre álló hely nem elegendő a monolayerben növeshez (lásd a jobb oldali ábrán). A szimuláció során használt paraméterek értékei megegyeznek a 3.2. ábra feliratában megadottakkal.

paraméterek felhasználásával futatott szimulációk eredményeit mutatja. Az előző szakaszban leírtak szerint ugyan a valódi és a szimuláció során keletkezett sejtszámok közvetlenül nem vethetők össze, a szimulációs görbék alakja a megfelelő valós intenzitásérték-változással azonban jó hasonlóságot mutat. Az *in vitro* kísérleteknél telítődéshez hasonló növekedési mintázat látható nagyjából a 120. óra után, ami a tenyésztőedény méretével és a rendelkezésre álló tápanyag véges mennyiségével lehet összefüggésben. A szimulációs adatoknál ez a viselkedés csak a  $0 \mu\text{M}$  hatóanyag koncentrációnál figyelhető meg, mivel a modell a tápanyag fogyásával nem számol.

### 3.3. A sejtek Pgp-expressziójára vonatkozó hipotézisek ellenőrzése

#### Biológiai háttér

A multidrog rezisztencia mértéke a Bevezetésben vázolt módon összefüggést mutat a sejtek Pgp-expressziójának szintjével. A sejtek Pgp-szintjének mérése egy FACS (Fluorescence-activated cell sorting) elnevezésű technikával oldható meg, mely során egy hajszálcsövön átáramoltatott sejtszuszpenzió egyedeit a mérőberendezés az egyed fluoreszcencia-mértékétől függően leválogatja, így lehetőség van a sejtek fluoreszcenciával összefüggő jellemzőinek eloszlását meghatározni. Egy tipikus Pgp-szint



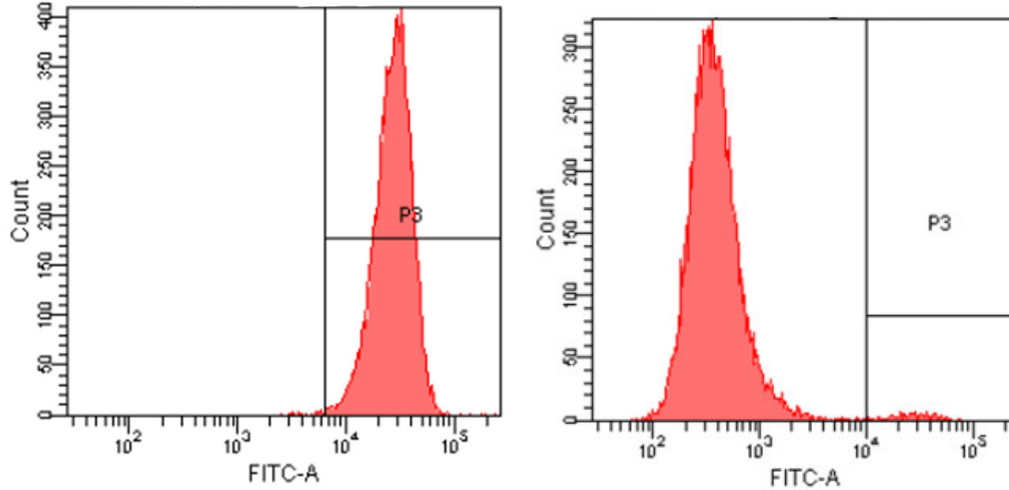
**3.5. ábra.** MES-SA (bal) és MES-SA/Dx5 (jobb) sejtek növekedése különböző hatóanyag koncentrációk mellett. A felső ábrákon a sejtek fluoreszcens festését követő mérések relatív fluoreszcencia értékei és az azokra illesztett növekedési görbék láthatók az idő függvényében, különböző drog-koncentrációk esetén. (Az ábrákat Lovrics Anna engedélyével használtam fel.) Az alsó ábrákon a fluoreszcens mérésekből származó paraméterekkel lefutott szimulációk átlagos sejtszáma látható az idő függvényében, különböző hatóanyag koncentrációk esetén. A szimulációkat  $n_0 = 50$  sejtről indítottam.

eloszlást mutat a 3.6. ábra. A fluoreszcencia-intenzitás értéke fordított összefüggést mutat a sejt Pgp-expressziójának mértékével.

### 3.3.1. Pgp expressziós szintek modellezése

A modellben egy adott sejt adott időpontbeli Pgp expressziójának mértékét egyetlen változó jellemzi, mely 0.0 és 1.0 között vehet fel értéket. A 0.0-hoz közeli értékek alacsony expressziós szintet jelölnek (ilyen típusú sejtek például a MES-SA sejtek), az 1.0-hez közeli értékek pedig magas expressziós szintet (ilyen típusúak például a MES-SA/Dx5 sejtek). Az egyedek konkrét expressziós szintje szorosan összefügg a sejtvonallal jellemző expressziós szinttel, mely egy normális eloszlású valószínűségi változóként jelenik meg a modellben.

Biológiai megfigyelések szerint az egyes sejtvonalak különböző Pgp expresszió-



**3.6. ábra.** MES-SA populáció (balra) és MES-SA/Dx5 populáció (jobbra) Calcein-AM festéses FACS mérési eredményei. Az alacsony Pgp expressziójú sejtek (MES-SA) felveszik a festékanyagot, ezért magas fluoreszcenciát mutatnak ( $> 10^4$ ), míg a magas Pgp expressziójú sejtek (MES-SA/Dx5) eltávolítják magukból a festéket (ahogyan bizonyos terápiás hatóanyagokat is), ezért esetükben alacsony fluoreszcenciát láthatunk (tipikusan  $10^2 - 10^3$ ).

ős eloszlási mintázatot mutatnak, amely egyrészt jellemző az adott sejtvonalra. A rendelkezésemre bocsátott FACS mérési eredmények alapján hozzávetőlegesen megbecsültem a különböző sejtvonalakra jellemző eloszlások paramétereit, s ezeket használtam az alábbiakban ismertetett szimulációk során.

### 3.3.2. Szelekciós hipotézisek ellenőrzése

A szelekciós kísérletek során arra kerestem választ, hogyan lehetséges magyarázni a Bevezetésben ismertetett multidrog rezisztenciát, vagyis milyen folyamatokat szükséges mindenképp modellezni ahhoz, hogy egy sejtpopuláció jellemző Pgp expressziós szintje valamely hatóanyag jelenlétében megváltozzon. Az expressziós szintek konkrét értékeknek ebben a megközelítésben nincsen szerepe, ugyanis csak azok stabilizálódásának, illetve eltolódásának *trendjét* vizsgáltam. A kialakuló értékek pontos meghatározásához jelenleg nem áll rendelkezésre információ az irodalomban, mivel a folyamatokat irányító mechanizmusok sem ismertek részleteikben.

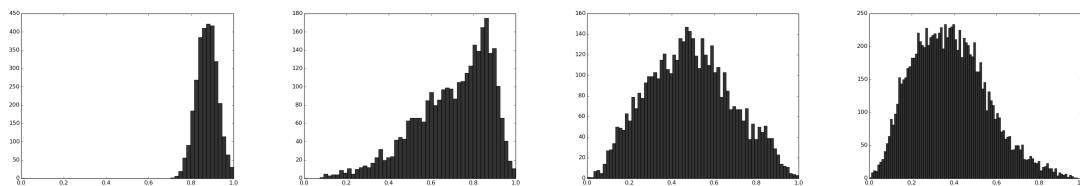
Témavezetőmmel három különböző hipotézist állítottunk fel az expressziós szint alakulására. A hipotézisek mindegyikénél feltételeztük, hogy a stabil expressziós szint eltolódását a hatóanyag jelenléte indukálja. Ennek modellezésére a különböző expressziós szinttel rendelkező, osztódó sejteket a modellezett hatóanyag jelenléte miatti, egyedi expressziós szintjüktől függő pusztulás gyéríti. A bemutatásra kerülő eredmények esetén a modellezett hatóanyag olyan tulajdonságú, hogy a magasabb expressziós szinttel rendelkező sejteket nagyobb mértékben pusztítja. A hatóanyag

expressziós szinttől függő hatása egy olyan szigmoid függvénnyel írható le, melynek középpontja épp a FACS ábrák alapján becsült alacsony és magas expressziót mutató populációkat elválasztó határra esik.

### 1. hipotézis: a darwini szelekció önmagában is képes magyarázni az expressziós szint eltolódását

A darwini szelekció alapgondolatát modellezve az osztódó sejt átörökíti a sejvonálára jellemző expressziós szint eloszlásának paramétereit, ám az kis mértékben megváltozhat. Ezt a hatást úgy modelleztem, hogy az utódsejtek Pgp expressziós szintjét a szülősejt expressziós szintje és nulla várható értékű, normális eloszlásból származó érték összegeként kapom meg.

A szimulációs eredmények a 3.7. ábrán láthatók, melyek alapján megállapíthatjuk, hogy az eltérő expressziójú sejteket különböző mértékben pusztító hatóanyag jelenlétében a valóságban tapasztalható expressziós szint változás valóban bekövetkezik. A folyamat azonban egy több generáción át tartó kiválasztódás eredménye, mely nem okozhatja a Bevezetésben tárgyalt gyors átmenetet az eltérő expressziós szintek közt.



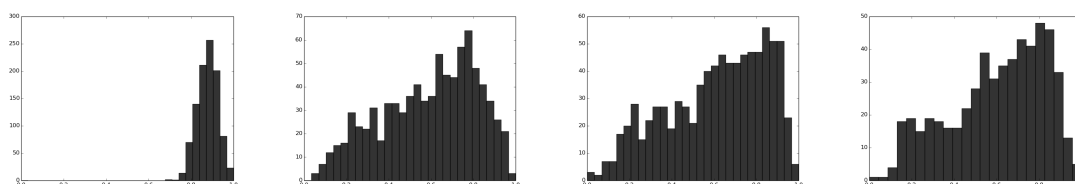
**3.7. ábra.** A darwini szelekcióra vonatkozó hipotézist tesztelő szimuláció eredményei. Az ábrák a populáció Pgp expresszió eloszlás eltolódásának tipikus trendjét mutatják. Balról jobbra haladva látható, hogy a kezdetben magas expressziót mutató sejtek gyorsabb pusztulása és az osztódó sejtek expressziós szintjeiben bekövetkező kisebb változások összegződése miatt a populáció átlagos expressziós szintje alacsonyabb értékek irányába tolódik el.

## 2. hipotézis: a fenotípusváltás képes magyarázatot adni az expressziós szint eltolódására

A fenotípusváltást (a sejt valamely tulajdonságának megváltozását) a modellbe a következő módon építettem be: a sejtek jellemző expressziós szintje a szimulációs folyamat alatt bármikor megváltozhat, és ez a változás nagyságrendileg nagyobb az előző hipotézisnél bekövetkező változásoknál. Az expressziós szint öröklődése az ott ismertetett módon történik, vagyis a leánysejtek a szülősejtre jellemző expressziós értékeket öröklik, mely kis mértékben minden átörökítésnél változhat.

A 3.7. ábra a hipotézis tesztelése során keletkezett eloszlások tipikus időbeli alakulását mutatja. Látható, hogy a tetszőleges időpillanatban bekövetkező jelentős mértékű, de irány nélküli expressziós szint változás azt eredményezi, hogy a kezdetben relatív alacsony szórással jellemezhető eloszlás „szétkenődik”, és rövid időn belül nem alakul ki egy, a valóságban megfigyelhető alacsonyabb expressziójú populáció. Hosszabb idő után természetesen az előző hipotézisnél ismertetett módon eltűnne a magas expressziójú populáció, de ez nem a fenotípusváltás közvetlen következménye.

A fentiekből arra következtethetünk, hogy az irány nélküli, véletlen expressziós szint változás nem ad megfelelő magyarázatot a valóságban megfigyelhető Pgp-szint eltolódásra. Bizonyos, hogy egyéb olyan paramétereket is szükséges volna a modellbe építeni, amelyek a fenotípusváltás mechanizmusát – mely a fentiek alapján feltételezhetően nem egy teljesen véletlenszerűen zajló folyamat – képesek pontosabban leírni.



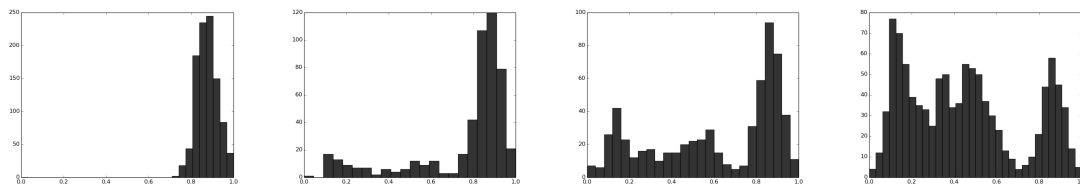
**3.8. ábra.** A fenotípusváltásra vonatkozó hipotézist tesztelő szimuláció eredményei. Az ábrák a populáció Pgp expressziós szint eloszlásának jellemző alakulását mutatják. A nagymértékű, véletlen változások az expressziós szintekben nem adják vissza a multidrog rezisztencia kialakulása során megfigyelhető eloszlás-eltolódást.

## 3. hipotézis: a sejtek mutációja képes magyarázatot adni az expressziós szint eltolódására

A mutáció hatását a szimuláció során egy osztódásnál bekövetkező, jelentős mértékű expressziós szint változással modelleztem, mely hatás a szülősejtet nem érinti, azonban a leánysejt később átörökíti saját tulajdonságát az utódaiba, azaz ideális

körülmények közt bizonyos idő után felnő egy olyan populáció, melyet a mutációt elszenvedett egyed leszármazottai alkotnak.

A 3.9. ábrán láthatók a szimuláció egy tipikus futásából nyert expressziós szintek hisztogramjai és azok változása. Megfigyelhető, ahogy a mutáció hatásaként eltérő expressziós szinttel rendelkező utódok jönnek létre, majd elszaporodnak. Ebből viszont az következik, hogy a folyamat a darwini szelekcióhoz hasonlóan csak hosszabb idő alatt tud lezajlani, így nem adhat magyarázatot az expressziós szint gyors megváltozására, ugyanakkor nem zárható ki teljesen, hogy szerepe lehet a rezisztencia kialakulásában.



**3.9. ábra.** A mutáció hatására vonatkozó hipotézist tesztelő szimuláció eredményei. Az ábrák a populáció Pgp expressziós szint eloszlásának jellemző alakulását mutatják. Az osztódások átlagosan 1%-ában bekövetkezett mutáció hatására néhány generáció alatt létrejönnek olyan csoportok, melyek expressziós szintje jelentősen eltér az induló populáció átlagis szintjétől.

# Továbbfejlesztési lehetőségek

## Biológiai megfigyelések pontosítása

Bár a modell jelen állapotában is képes sejtpopulációk néhány jellemző tulajdonságának leírására, a sejteknél megfigyelhető összes életjelenséget nyilván közel sem képes reprodukálni. Ennek legfőbb oka a modellben lévő viszonylag erős egyszerűsítésekben keresendő. Lehetőség volna számos további olyan sejtfolyamat beépítésére a modellbe, amely precízebben képes megragadni a sejtek életjelenségeit és az azok közötti összefüggéseket.

A jelenlegi paraméterek pontosítása is egy lehetséges, kézenfekvőnek látszó továbbfejlesztési irány. Érdemes lenne például skálával ellátott mikroszkópos képek alapján elvégezni a sejt alaki jellemzőinek (átmérő, illetve összenyomhatatlan- és adhéziós térrész méretének) becslését, mivel így pontosabban mérhető az egyes tartományok mérete. Bár a sejtek konkrét dimenzióinak nincs kitüntetett szerepe a modellben, ezzel a módszerrel jóval precízebben becsülhetőbbek az előbbi arányok, melyek viszont már hatással lehetnek a kialakuló tenyészetek jellemzőire.

A jelenlegi sejtautomata modell tovább bővíthető lenne egy, az irodalomkutatásban ismertett hibrid modellé, mely például képes lenne a sejtek rendelkezésre álló tápanyag mennyiségének, vagy a sejtek által kiválasztott különböző vegyületek térbeli koncentrációjának hatását is figyelembe venni.

A lehetőségek száma természetesen szinte végtelen, azonban az említett problémák jelenleg is aktív részét adják a modell továbbfejlesztési irányának.

## Implementációs fejlesztési lehetőségek

Egy érdekes továbbfejlesztési lehetőségként említem a rotációhoz és a migrációhoz szükséges Monte-Carlo lépések számának vizsgálatát, mivel ennek módosításával tapasztalataim szerint jelentősen befolyásolható a szimuláció lefutásának ideje, de hatással van a kialakuló sejtpopuláció növekedési mintázatára és dinamikájára is. A jelenleg fix számú Monte-Carlo lépések dinamikusan változóvá tételére született

néhány elképzelés, azonban eddig egyik sem váltotta be a hozzá fűzött reményeket.

Érdemes lenne továbbá a 2.5.2. résznél bemutatott interakciós domainek méretének vizsgálata. Ez azért lehet fontos, mert a domain mérete befolyásolja az egyes lépésekben kiértékelésre kerülő interakciós potenciálfüggvények számát. A domain méretének csökkenésével a szükséges számítások mennyisége is lecsökken, azonban cserébe a korábban ismertetett módon a memóriaigény megnövekszik. Feltételezésem szerint meghatározható egy sejtmérettől és a szimulációs tér méretétől függő optimális domain méret, melynek használata a rendelkezésre álló erőforrásokat jobban kihasználná, és ismerete tovább javíthatja a szimuláció teljesítményét.

## Párhuzamosítási lehetőségek

A modell párhuzamosítására két megközelítést vázolok. A klasszikus, informatikai értelemben vett párhuzamosíthatóság kérdéseire egy korábbi fejezet röviden már kitért. Távolsági célom a modellt úgy átalakítani, hogy az grafikus processzorokon is futtathatóvá váljon, ezzel vélhetően jelentősen megnövelve a szimulációban vizsgálható sejtek számát, mely jelenleg reális időkeretek között tapasztalataim szerint a  $10^3 - 10^5$  tartományba esik.

A párhuzamosíthatóság másik, lényegében triviális megközelítése az, hogy egyszerre több szimulációt indítunk. Mivel a modell eleve statisztikai jellegű, így egyetlen futtatás eredményének nem tulajdoníthatunk komoly jelentést, azokat csak sokszor megismételve, majd kiátlagolva állíthatunk bármit. A továbbfejlesztések célja egy automatizált indítást és kiátlagolást végző rendszer létrehozása is.

# Összegzés

A dolgozat bemutatta sejtpopulációk modellezésének és szimulációjának lehetséges megközelítéseit. Az irodalomban megismert modellek ötleteinek felhasználásával létrehoztam egy saját modellt, mely alkalmas a célkitűzésekben leírt tumorsejtek bizonyos *in vitro* kísérleti eredményeinek reprodukálására, valamint a valós kísérletekben közvetlenül nem megfigyelhető jellemzők meghatározására. A modell alkalmas két- és háromdimenziós sejtpopulációk szimulációjára, az adatok szabványos formátumban történő eltárolására, illetve azok különböző módon történő vizualizációjára, a sejtek szimuláció során előálló mérhető jellemzőinek ábrázolására. Az implementáció során szem előtt tartottam azt, hogy a nagyszámú egyedből álló sejtpopulációk minél gyorsabb szimulációjához kihasználható a lépések párhuzamos feldolgozása, mely egyúttal egy lehetséges továbbfejlesztési irányt is kijelöl.

A modell teszteléseként először összehasonlítottam két eltérő tulajdonságú sejtvonal növekedési mintázatát. Ezt követően különböző mértékű rezisztenciát mutató sejttípusok adott dózisú hatóanyag jelenlétében történő szaporodásának dinamikáját vizsgáltam, mely jó egyezést mutatott a valódi *in vitro* mérések adataival. A multidrog rezisztenciával szoros összefüggésben lévő Pgp expressziós szint modellbe történő beépítésének ismertetése után a rezisztencia kialakulására vonatkozó szelekciós hipotéziseket mutattam be, melyekhez kísérleti szimulációkat terveztem. A szimulációk futtatásával nyert eredmények megerősítik azt a vélekedést, hogy a darwini szelekció és az osztódáskor bekövetkező mutációk önmagukban nem magyarázhatják a rezisztencia kialakulásakor megfigyelhető gyors átmenetet a magas és alacsony expressziós szintek között. A fenotípusváltásra vonatkozó szimulációs eredmények alapján nem vethetjük el azt a gondolatot, hogy a multidrog rezisztencia kialakulásában fontos szerepe van a tumort alkotó sejtekben bekövetkező gyors expressziós szint megváltozásnak, ám a dolgozatban bemutatott eredmények ezt nem tudják megerősíteni. Ennek okaként a modellbe épített paraméterek jellegét lehet megjelelni, mivel azok önmagukban nem képesek az átmenet irányítására, mely mögött valószínűleg más jellegű szabályok húzódnak meg. Ezek megismerése és modellbe építése segíthet újabb, pontosabb eredmények előállításában.

# Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témevezetőimnek, Lovrics Annának és Sergyán Szabolcsnak a munkám elkészüléséhez nélkülözhetetlen útmutatást és segítséget. Köszönöm Füredi Andrásnak a hasznos és érdekes beszélgetéseket, valamint a sejttenyésztési alapok elsajátításában nyújtott munkáját és türelmét. Köszönöm Szakács Gergelynek a dolgozat stílusára tett hasznos javaslatait, valamint a lehetőséget, hogy csatlakozhattam kutatócsoportjához. Köszönet Tóth Szilárdnak, amiért a fluoreszcens sejtszámlálási eredményeit a rendelkezésemre bocsátotta. Köszönet illeti továbbá Tóth Krisztinát, aki mindig készséggel állt rendelkezésemre, amikor sejtbiológiai ismereteim hiányosnak bizonyultak. Köszönettel tartozom végül az NIIF szegedi szuperszámítógépeinek használatáért, melyeken a szimulációkat futtathattam.

# Függelék

## Interakciós potenciálfüggvények

### Hertz-típusú potenciálfüggvény

Ebben a közelítésben a sejtek homogén, rugalmas gömbökként foghatók fel [5], melyek között a  $V_{ij}$  interakciós energia egy vonzó (attraktív), illetve egy taszító (repulzív) jellegű hatás eredőjeként áll elő. Az  $i$  és  $j$  sejtek sugarai  $R_i$  és  $R_j$ , középpontjaik távolsága  $d_{ij}$ , a sejtek közötti „hézag” nagysága pedig

$$\tilde{d}_{ij} = d_{ij} - (R_i + R_j).$$

A sejtek közötti interakciós energia a

$$V_{ij} = \begin{cases} V_{ij}^{\text{attr}} + V_{ij}^{\text{rep}} & \text{ha } \tilde{d}_{ij} < 0 \\ 0 & \text{egyébként} \end{cases}$$

összefüggéssel adható meg. A modell feltételezései szerint a sejtek összenyomódása kismértékű, és azok rugalmassági tartományán belül esik, továbbá a felületek súrlódás nélkül érintkeznek. A sejtek közötti vonzó hatás energiáját a

$$V_{ij}^{\text{attr}} = \varrho_m W_s A_{ij}$$

képlet adja, melyben  $\varrho_m$  a sejtek felszínén lévő adhéziós molekulák felületi sűrűségét jelöli,  $W_s$  egyetlen darab molekula kötési energiája,  $A_{ij}$  pedig a kötődő sejtek között lévő felület nagysága. A modellben a taszító hatás a sejtek rugalmas energiájából származik, melynek nagysága

$$V_{ij}^{\text{rep}} = (-\tilde{d}_{ij})^{\frac{5}{2}} \frac{1}{5} \tilde{E}_{ij}^{-1} \sqrt{\frac{R_i R_j}{R_i + R_j}},$$

ahol

$$\tilde{E}_{ij}^{-1} = \frac{3}{4} \left( \frac{1 - \sigma_i^2}{E_i} + \frac{1 - \sigma_j^2}{E_j} \right)$$

az elaszticitási hatás, melyben  $E_i$  és  $E_j$  a két sejt Young-modulusa,  $\sigma_i$  és  $\sigma_j$  pedig azok Poisson-tényezői.

## Harmonikus potenciálfüggvény

A modell a sejteket egy összenyomhatatlan belső térrésszel rendelkező, gömbszerű testként kezeli [5]. Az adhéziós sáv mérete  $\delta$ . Amikor a sejtek egymásba fednek ( $\tilde{d}_{ij} < 0$ ), az átfedés miatt kialakuló közös felület nagyságától függően vonzó hatás alakul ki közöttük, ám egyúttal a középpontjaik miatt taszító hatást is gyakorolnak a másokra, továbbá az összenyomhatatlan térrészek nem fedhetnek egymásba. Az interakciós energia így

$$V_{ij} = \begin{cases} \epsilon \left( \frac{2\tilde{d}_{ij}}{\delta} + \sqrt{\frac{V_{ij}^{\text{attr}}}{\epsilon}} \right)^2 - V_{ij}^{\text{attr}} & \text{ha } -\delta \leq \tilde{d}_{ij} < 0 \\ \infty & \text{ha } \tilde{d}_{ij} < -\delta \\ 0 & \text{egyébként.} \end{cases}$$

Az összefüggésben  $\epsilon$  jelöli az elasztikus hatást:

$$\epsilon = \frac{El\delta^2}{8},$$

ahol  $E$  most is az  $l$  átmérőjű sejtek Young-modulusa.

# Irodalomjegyzék

- [1] M. AUBERT – M. BADOUAL – S. FÉREOL – C. CHRISTOV – Grammaticos B.: A cellular automaton model for the migration of glioma cells. In *Physical Biology*, 3. évf. (2006) 2. sz., 93. p. URL <http://stacks.iop.org/1478-3975/3/i=2/a=001>.
- [2] D. A. BEYSENS – G. FORGACS – J. A. GLAZIER: Cell sorting is analogous to phase ordering in fluids. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97. évf. (2000) 17. sz., 9467–9471. p.  
URL <http://www.pnas.org/content/97/17/9467.abstract>.
- [3] Thomas C. G. BOSCH – Charles N. DAVID: Growth regulation in hydra: Relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. In *Developmental Biology*, 1984.
- [4] D. DRASDO – Kree R. – McCaskill J.S.: Monte carlo approach to tissue-cell populations. In *Physical Review*, 52. évf. (1995) 6. sz., 6635–6657. p.
- [5] Dirk DRASDO – Stefan HOEHME – Michael BLOCK: On the role of physics in the growth and pattern formation of multi-cellular systems: What can we learn from individual-cell based models? In *Journal of Statistical Physics*, 128. évf. (2007. július) 1-2. sz., 287–345. p. ISSN 0022-4715.  
URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10955-007-9289-x>.
- [6] Evgeniy KHAİN – Leonard M. SANDER: Dynamics and pattern formation in invasive tumor growth. In *Phys. Rev. Lett.*, 96. évf. (2006. May), 188103. p.  
URL <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.96.188103>. 4 p.
- [7] Paul MACKLIN – Mary E. EDGERTON – Alastair M. THOMPSON – Vittorio CRISTINI: Patient-calibrated agent-based modelling of ductal carcinoma in situ (dcis): From microscopic measurements to macroscopic predictions of clinical progression. In *Journal of Theoretical Biology*, 2012. 301. sz., 122–140. p.

- [8] Angela Oliveira PISCO–Amy BROCK–Joseph ZHOU–Andreas MOOR–Mitra MOJTAHEDI–Dean JACKSON–Sui HUANG: Non-darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. In *Nat Commun*, 4. évf. (2013), 2467. p. ISSN 2041-1723.  
URL <http://www.biomedsearch.com/nih/Non-Darwinian-dynamics-in-therapy/24045430.html>.
- [9] Michael J. PLANK–Matthew J. SIMPSON: Models of collective cell behaviour with crowding effects: comparing lattice-based and lattice-free approaches. In *Journal of the Royal Society*, 9. évf. (2012. June), 2983–2996. p.
- [10] Ignacio RAMISCONDE–Mark A.J. CHAPLAIN–Alexander R.A. ANDERSON: Mathematical modelling of cancer cell invasion of tissue. In *Mathematical and Computer Modelling*, 2008. 47. sz., 533–545. p.
- [11] Ádám SIKE: *ABCB1 transzporterek vizsgálata multidrog rezisztens patkány hepatoma sejtekben*. PhD értekezés (Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar). 2014.
- [12] Gábor SZABÓ: *Sejtbiológia*. Medicina Könyvkiadó Zrt., 2009.
- [13] Loup VERLET: Computer "experiments" on classical fluids. i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. In *Physical Review*, 159. évf. (1967) 1. sz.
- [14] D.C. WALKER–J. SOUTHGATE–G. HILL–M. HOLCOMBE–D.R. HOSE–S.M. WOOD–S. MACNEIL–R.H. SMALLWOOD: The epitheliome: agent-based modelling of the social behaviour of cells. In *Elsevier BioSystems*, 2004. 76. sz., 89–100. p.