

Katarzyna RZOSIŃSKA¹, Dorota FORMANOWICZ², Piotr FORMANOWICZ^{1,3}

¹Instytut Informatyki, Politechnika Poznańska

²Zakład Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

³Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk

ILOŚCIOWY MODEL PROCESU RÓŻNICOWANIA MAKROFAGÓW OPARTY NA SIECIACH PETRIEGO*

Streszczenie. Rozwój nowych technik i ich wykorzystanie w naukach biomedycznych spowodowały ogromny postęp w rozumieniu podstawowych zjawisk leżących u podłoża wielu chorób, jednocześnie odkrywając liczne nieścisłości. Do takich zjawisk z pewnością można zaliczyć proces różnicowania się makrofagów. Na razie nasza wiedza w tym zakresie opiera się na hipotezach, z których każda wydaje się być dość prawdopodobna. W naszym projekcie stworzyliśmy autorski model różnicowania makrofagów, w którym podkreśliśmy rolę mikrośrodowiska. W tym celu wykorzystaliśmy sieci Petriego, które umożliwiły uwzględnienie licznych jakościowych i ilościowych zależności. Pozwoliło to na pełniejsze zrozumienie analizowanego procesu.

QUANTITATIVE PETRI NET BASED MODEL OF MACROPHAGES DIFFERENTIATION

Summary. The development of new techniques and their use in bio-medical sciences have caused enormous progress in understanding basic phenomena underlying many diseases, also discovering the numerous inaccuracies. These phenomena certainly include the differentiation of macrophages. For now, our knowledge in this field is based on hypotheses, each of which seems to be quite plausible. In our project we have created an original model of macrophages differentiation, which underlined the role of the micro-environment. For this purpose we used Petri nets, which allowed us to take into account a number of qualitative and quantitative relationships. This allowed for a more complete understanding of the analyzed process.

1. Wstęp

Wyniki badań ostatnich kilkunastu lat rzuciły nowe światło na procesy immunologiczne leżące u podłoża wielu chorób cywilizacyjnych, w tym tak powszechnych jak

*Badania przeprowadzone w ramach realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/07/B/ST6/01537.

miażdżycy [15]. Miażdżycy już dawno przestała być postrzegana jedynie jako choroba wynikająca z nagromadzenia lipidów w warstwie podśródbłonkowej naczyń tętniczych, a została uznana za bardzo złożone zjawisko, w którym współuczestniczy kilka kluczowych procesów, tj. zapalenie, stres oksydacyjny, zaburzenia układu odpornościowego i hiperlipidemia.

W naszym projekcie skupiliśmy się na badaniach związanych z różnicowaniem makrofagów. Odkrycie dużej niezależności różnicowania się makrofagów od limfocytów pomocniczych (Th) oraz istnienie subpopulacji makrofagów o różnych profilach fenotypowych M1 i M2, otwiera nowe drogi do zrozumienia patomechanizmów licznych chorób, a co się z tym wiąże pozwala mieć nadzieję na ich skuteczniejsze leczenie w przyszłości [14, 7]. Aby oddać złożoną naturę analizowanego procesu i uwzględnić wpływy licznych czynników, wykorzystaliśmy sieci Petriego i za ich pomocą stworzyliśmy ilościowy model różnicowania makrofagów.

Sieci Petriego zostały zaproponowane w pierwszej połowie lat 60. XX w. przez Carla A. Petriego jako formalizm przeznaczony do modelowania i analizy współbieżnych procesów zachodzących w systemach komputerowych [12]. Od połowy lat 90. są one też coraz szerzej stosowane do opisu i analizy systemów biologicznych (por. [6]). Sieć tego rodzaju posiada strukturę ważonego, skierowanego grafu dwudzielnego, w którym wierzchołki z jednego podzbioru nazywane są miejscami i odpowiadają biernym składnikom modelowanego systemu, natomiast wierzchołki należące do drugiego z podzbiorów to tranzycje, które odpowiadają aktywnym składnikom systemu. Łuki łączą tylko miejsca z tranzycjami i tranzycje z miejscami. Sieć Petriego to jednak nie tylko wspomniany graf, bowiem jej istotną cechą jest dynamika, która jest związana z tokenami przepływającymi pomiędzy miejscami poprzez tranzycje. Ich przepływem rządzi reguła uruchamiania tranzycji, zgodnie z którą tranzycja staje się aktywna, jeżeli w każdym z miejsc bezpośrednio ją poprzedzających, znajduje się liczba tokenów co najmniej równa wadze łuku łączącego takie miejsce z daną tranzycją. Aktywna tranzycja może zostać uruchomiona, co oznacza, że z każdego z miejsc bezpośrednio ją poprzedzających wpływa do niej liczba tokenów, równa wadze łuku łączącego te dwa wierzchołki i tokeny te przepływają do miejsc bezpośrednio następujących po danej tranzycji, przy czym i w tym przypadku liczba przepływających tokenów równa jest wadze łuku, przez który następuje przepływ [10].

Sieć Petriego może być reprezentowana za pomocą macierzy incydencji $A = (a_{ij})_{n \times m}$, w której wiersze odpowiadają miejscom, kolumny odpowiadają tranzycjom, a komórka a_{ij} zawiera liczbę będącą różnicą liczb tokenów znajdujących się w miejscu p_i przed i po uruchomieniu tranzycji t_j . Jeżeli sieć Petriego jest modelem systemu biologicznego, szczególne znaczenie ma analiza występujących w niej niezmienników tranzycji (t-niezmienników). Niezmiennik taki jest wektorem x będącym rozwiązaniem równania $a \cdot x = 0$. Z t-niezmiennikiem x związany jest zbiór $s(x) = \{t_j : x_j > 0\}$ nazywany jego wsparciem, który zawiera tranzycje odpowiadające jego dodatnim współrzędnym. Zbiory takie są związane z podprocesami zachodzącymi w modelowanym systemie, które nie zmieniają jego stanu. Stąd są one szczególnie istotne i analiza zależności zachodzących między nimi może prowadzić do odkrywania nieznanych wcześniej własności systemu [2]. W celu odnajdywania takich zależności t-niezmienniki na ogół grupuje się w t-klastry. Każdy z takich klastrów zawiera niezmienniki podobne do siebie ze względu na pewną miarę podobieństwa, a ponadto każdy z nich odpowiada pewnemu

podprocesowi wyższego rzędu występującemu w badanym systemie [3, 2]. Ponadto, w przypadku, gdy sieć zawiera dużą liczbę tranzycji, często rozważa się też zbiory MCT, z których każdy zawiera tranzycje będące elementami wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników. Każdy z takich zbiorów odpowiada pewnemu funkcjonalnemu modułowi analizowanego systemu [3, 2].

Model zaproponowany w niniejszej pracy został przeanalizowany w oparciu o występujące w nim t-niezmienniki, a zatem wyznaczone zostały zbiory MCT oraz t-klastry i określono ich znaczenie biologiczne.

2. Różnicowanie makrofagów

Makrofagi to najstarsza filogenetycznie grupa komórek żernych zaliczana do białych krwinek, odgrywająca zasadniczą rolę w czynnej obronie organizmu. Komórki te charakteryzują się dużą heterogennością i uniwersalnością odpowiedzi immunologicznej. Chociaż ich główną funkcją jest fagocytoza, produkują jednocześnie wiele cząsteczek wykazujących funkcje cytotoksyczne lub efektorowe, takich jak cytokiny, reaktywne formy tlenu (ROS), tlenek azotu (NO), itp. Dodatkowo makrofagi zaliczane są do grupy komórek prezentujących antygen (APC), umożliwiając uruchomienie swoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację limfocytów T. Zróżnicowanie funkcji makrofagów sprawia, że możemy podzielić je między innymi na makrofagi osiadłe (rezydujące), tkankowe i wędrujące.

Makrofagi rezydujące różnicują się na wczesnym etapie rozwoju zarodka i posiadają zdolność regeneracji swojej populacji. Pozostałe makrofagi, zarówno wędrujące jak i tkankowe powstają głównie w efekcie dojrzewania monocytów. Monocyty, również są heterogeniczną grupą komórek, w której wyróżniamy dwie subpopulacje, tj. monocyty klasyczne (u myszy nazwane Ly6C+) i nieklasyczne (Ly6C-). Obie populacje powstają w szpiku kostnym, skąd trafiają do krwiobiegu. Tam, pod wpływem między innymi cytokin, dojrzewają lub zostają rekrutowane do tkanek, gdzie różnicują się w różne typy makrofagów.

Makrofagi typu M1, nazywane również makrofagami prozapalnymi, aktywują się w obecności patogenów i czynników prozapalnych. Charakteryzują się produkcją związków cytotoksycznych takich jak m.in. ROS, NO, cytrulina oraz liczne cytokiny prozapalne. Ten profil fenotypowy makrofagów ma zdolność do prezentacji antygeny, przez co zaliczany jest do grupy komórek APC i uczestniczy w reakcjach obronnych organizmu. Jednak metabolizm przystosowany do produkcji toksycznych substancji nie jest obojętny dla komórek. Zasadniczo, makrofagi aktywowane do tego profilu fenotypowego, są w stanie dezaktywować się gdy ich funkcje cytotoksyczne nie są już dla organizmu potrzebne. Jednak, jeśli funkcjonowanie w trybie M1 trwa zbyt długo, komórka nie jest w stanie dezaktywować się i taki długotrwały, wyniszczający metabolizm w efekcie doprowadza do apoptozy. Drugą klasą fenotypową są makrofagi M2, nazywane makrofagami przeciwzapalnymi. To podstawowy program aktywacji tych komórek. Typ ten, odpowiada za utrzymanie homeostazy tkanek, remodeling oraz wzrost i regenerację komórek zniszczonych w urazach lub przez stany zapalne. Wśród tej klasy wyróżnia się trzy podtypy: M2a, M2b oraz M2c, które różnią się ekspresją oraz funkcjami jakie pełnią w organizmie. Typ M2a indukuje do odpowiedzi limfocyty Th2, pobudza reakcję zapalną typu II (cytotoksyczną) i zwalcza pasożyty. Z kolei program M2b wykazuje ak-

tywność regulatorową dla odpowiedzi immunologicznej. Komórki tego typu również zaangażowane są w aktywację limfocytów Th oraz hamowanie rozwoju guza. M2c, trzeci z programów określany jako immunosupresyjny, ma za zadanie hamować reakcje zapalne i bierze udział w odbudowie i rekompozycji tkanek. Makrofagi nie są jednak jedynie dwupostaciowe. Mnogość czynników wpływających na fenotyp tych wszechstronnych komórek sprawia, że makrofagi mogą przyjmować mieszaną aktywność. Ich populacja jest niejednorodna, a typy M1 i M2 to fenotypy skrajne.

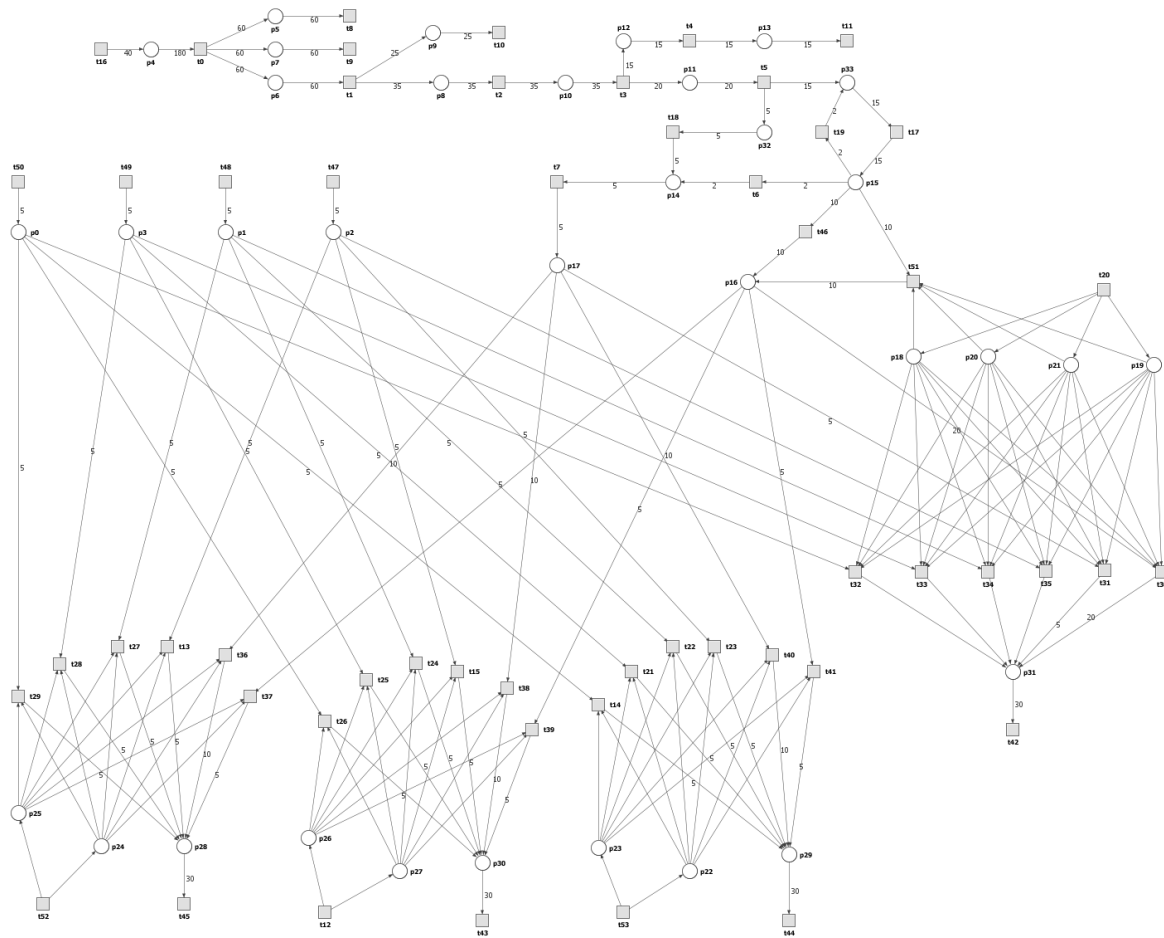
Istnieją trzy główne hipotezy różnicowania się makrofagów. Pierwsza z nich zakłada, że dana subpopulacja monocytów może różnicować się w makrofagi o konkretnym fenotypie. Zgodnie z tą hipotezą, monocyty Ly6C+ oraz makrofagi tkankowe pochodzące od monocytów różnicują się do makrofagów typu M1. Makrofagi typu M2 mają natomiast powstawać z monocytów Ly6C- oraz makrofagów osiadłych [4]. Z kolei, według drugiej hipotezy, fenotyp makrofagów zależy od czynników wpływających na różnicujące się monocyty w danej tkance. Sygnały mikrośrodowiskowe i cytokiny obecne w tkance, są różne dla różnych stanów zapalnych. Wypadkowa tych czynników wpływa na fenotyp makrofagów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. Zazwyczaj wśród makrofagów znajdują się obie grupy fenotypowe, jednak w zależności od stanu tkanki, udział procentowy frakcji jest różny. Makrofagów M1 jest więcej na początku procesu zapalnego, natomiast frakcja M2 zwiększa się z czasem i osiąga największy udział w fazie post-zapalnej [4, 1]. Możliwe też, zgodnie z trzecią hipotezą, że dojrzałe makrofagi są w stanie zmieniać swój fenotyp z prozapalnych makrofagów M1 do frakcji przeciwzapalnej (regulatorowej) M2 i odwrotnie, w zależności od zmieniania się warunków [5, 11, 13].

Badania *in vitro* wykazały że aktywacja makrofagów do fenotypu M1 odbywa się pod wpływem czynników infekcyjnych, takich jak lipopolisacharyd (LPS), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) oraz cytokiny prozapalne: czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α) i interferon gamma (IFN- γ). Uaktywnienie programu M2 zależy od obecności niektórych cytokin (interleukiny 4 (IL-4) i interleukiny 13 (IL-13)), czynników przeciwzapalnych (interleukina 10 (IL-10) i transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β)), jak również aktywności receptorów FC γ i TLR. Wpływ IL-4 i IL-13 skutkuje powstaniem makrofagów z subpopulacji M2a, aktywacja fenotypu M2b zależy od jednoczesnego uruchomienia receptorów kompleksu immunologicznego Fc γ i TLR. M2c, trzeci z programów, jest stymulowany przez IL-10 i TGF- β .

3. Model

Przy tworzeniu modelu oparliśmy się na drugiej hipotezie, w której fenotyp makrofagów zależy od sygnałów mikrośrodowiskowych. W ten sposób ograniczyliśmy się do różnicowania i dojrzewania monocytów w makrofagi, nie biorąc pod uwagę możliwości zmiany fenotypów już powstałych makrofagów. Ponadto, nie uwzględniliśmy zdolności makrofagów do dezaktywacji i obecności tak zwanych makrofagów pamięci.

Struktura sieci została przedstawiona na rysunku 1. Sieć składa się z 34 miejsc i 54 tranzycji opisanych w tabelach 1 i 2.



Rys. 1. Model różnicowania się makrofagów

Tabela 1

Lista miejsc

Miejsca	Znaczenie biologiczne	Miejsca	Znaczenie biologiczne
p_0	komórki Langerhansa (LC) - skóra	p_{17}	Makrofagi z Ly6C-
p_1	komórki mikrogleju - ośrodkowy układ nerwowy	p_{18}	TNF- α
p_2	komórki Kupffera - wątroba	p_{19}	INF- γ
p_3	pęcherzyki płucne	p_{20}	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF)
p_4	hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC)	p_{21}	lipopolisacharyd (LPS)
p_5	wspólna progenitorowa komórka limfopoezy (CLP)	p_{22}	toll-like receptor (TLR)
p_6	wspólna komórka progenitorowa linii mieloidalnej i granulocytarnej (CMP)	p_{23}	receptor fragmentu Fc immunoglobulin IgG (Fc γ R)
p_7	wczesne komórki progenitorowe limfocytów T (ETP)	p_{24}	IL-4
p_8	komórka progenitorowa granulocytów i monocytów (GMP)	p_{25}	IL-13
p_9	komórka progenitorowa megakariocytów i erytrocytów (MEP)	p_{26}	IL-10
p_{10}	wspólny prekursor dla makrofagów i komórek dendrytycznych (MDP)	p_{27}	TGF- β

Miejsca	Znaczenie biologiczne	Miejsca	Znaczenie biologiczne
p_{11}	wspólny prekursor dla linii monocytowo - makrofagowej (cMoP)	p_{28}	makrofag M2a
p_{12}	wspólne progenitory komórek dendrytycznych (CDP)	p_{29}	makrofag M2b
p_{13}	komórki dendrytyczne (DC)	p_{30}	makrofag M2c
p_{14}	monocyt Ly6C- we krwi	p_{31}	makrofag M1
p_{15}	monocyt Ly6C+ - we krwi	p_{32}	monocyt Ly6C-
p_{16}	makrofagi pochodzące z monocytów	p_{33}	monocyt Ly6C+

Tabela 2

Lista tanzycji

Tranzycje	Znaczenie biologiczne	Tranzycje	Znaczenie biologiczne
t_0	różnicowanie hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC)	t_{27}	mikroglej - aktywacja M2a
t_1	wspólne komórki progenitorowe linii mieloidalnej i granulocytarnej - aktywacja	t_{28}	pęcherzyki płucne - aktywacja M2a
t_2	różnicowanie komórek progenitorowych linii mieloidalnej i granulocytarnej (GMP)	t_{29}	komórki Langerhansa - aktywacja M2a
t_3	różnicowanie wspólnego prekursora dla makrofagów i komórek dendrytycznych (MDP)	t_{30}	makrofagi pochodzące z monocytów M1 aktywacja
t_4	dojrzewanie komórek dendrytycznych (DC)	t_{31}	Ly6C- M1 aktywacja
t_5	wyjście ze szpiku	t_{32}	komórki Langerhansa - aktywacja M1
t_6	utrata ekspresji Ly6C	t_{33}	pęcherzyki płucne - aktywacja M1
t_7	dojrzewanie monocytów Ly6C-	t_{34}	komórki mikrogleju - aktywacja M1
t_8	linia limfoidalna	t_{35}	komórki Kupffera - aktywacja M1
t_9	powstawanie limfocytów T	t_{36}	Ly6C- M2a aktywacja
t_{10}	erytogeneza	t_{37}	makrofagi pochodzące z monocytów - aktywacja M2a
t_{11}	prezentowanie antygenów	t_{38}	Ly6C- M2c aktywacja
t_{12}	stymulacja przeciwzapalna, stymulacja odbudowy tkanek	t_{39}	makrofagi pochodzące z monocytów - aktywacja M2c
t_{13}	komórki Kupffera - aktywacja M2a	t_{40}	Ly6C- M2b aktywacja
t_{14}	komórki Langerhansa - aktywacja M2b	t_{41}	makrofagi pochodzące z monocytów - aktywacja M2b
t_{15}	komórki Kupffera - aktywacja M2c	t_{42}	aktywność M1
t_{16}	namnażanie hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC)	t_{43}	aktywność M2c
t_{17}	transport Ly6C+ do krwi	t_{44}	aktywność M2b
t_{18}	transport Ly6C- do krwi	t_{45}	aktywność M2a
t_{19}	powrót do szpiku	t_{46}	rekrutacja Ly6C+ do tkanek
t_{20}	stymulacja prozapalna	t_{47}	komórki Kupffera - samoodnowienie
t_{21}	pęcherzyki płucne - aktywacja M2b	t_{48}	komórki mikrogleju - samoodnowienie
t_{22}	komórki mikrogleju - aktywacja M2b	t_{49}	pęcherzyki płucne - samoodnowienie
t_{23}	komórki Kupffera - aktywacja M2b	t_{50}	komórki Langerhansa - samoodnowienie
t_{24}	komórki mikrogleju - aktywacja M2c	t_{51}	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek
t_{25}	pęcherzyki płucne - aktywacja M2c	t_{52}	symulacja przeciwzapalna - synteza IL-13 i IL-4
t_{26}	komórki Langerhansa - aktywacja M2c	t_{53}	stymulacja przeciwzapalna - progresja nowotworu

4. Analiza modelu

Sieć jest pokryta 53 t-niezmiennikami. Ponadto w sieci można wyróżnić 4 wieloelementowe zbiory MCT i 35 jednoelementowych zbiorów MCT.

Znaczenie biologiczne t-niezmienników zostało przedstawiona w tabeli 3. T-niezmiennik x_1 przedstawia migrację monocytów tzw. zapalnych (Ly6C+) ze szpiku do krwi i ich możliwy powrót do szpiku. T-niezmienniki od x_2 do x_{17} , odzwierciedlają różnicowanie się makrofagów rezydualnych (osiadłych) do wszystkich rodzajów fenotypów. T-niezmienniki od x_{18} do x_{53} opisują różnicowanie się makrofagów pochodzących ze szpiku kostnego do poszczególnych fenotypów.

W przedstawionym modelu wyróżnić można 4 wieloelementowe zbiory MCT opisane w tabeli 4. Zbiór m_1 przedstawia powstawanie monocytów w szpiku i dojrzewanie monocytów nieklasycznych, pozostałe zbiory MCT to dwuelementowe zbiory tranzycji wejściowych i wyjściowych każdej z klas fenotypowych.

Znaczenie biologiczne t-klastrów zostało przedstawiona w tabeli 5. Przeprowadzone analizy umożliwiły zgrupowanie t-inwariantów w 6 t-klastrach. Jednoelementowy klaster c_1 zawiera inwariant x_1 odpowiadający cyrkulacji monocytów klasycznych między krwią a szpikiem. Z kolei klaster c_2 grupuje makrofagi rezydualne (osiadłe) do M2a, klaster c_3 makrofagi rezydualne (osiadłe) do M2b, klaster c_4 makrofagi rezydualne (osiadłe) do M2c, klaster c_5 makrofagi rezydualne (osiadłe) do M1, a klaster c_6 obejmuje makrofagi pochodzące od monocytów do wszystkich klas fenotypowych.

Tabela 3

Lista t-niezmienników

t-niezmienniki	Zbiory MCT	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
x_1		t_{17}, t_{19}	przepływ Ly6C+ z i do szpiku
x_2	m_4	t_{29}, t_{50}	różnicowanie się w komórkach Langerhansa do M2a
x_3	m_4	t_{27}, t_{48}	różnicowanie się w komórkach mikrogleju do M2a
x_4	m_4	t_{13}, t_{47}	różnicowanie się w komórkach Kupffera do M2a
x_5	m_4	t_{28}, t_{49}	różnicowanie się w pęcherzykach płucnych do M2a
x_6	m_3	t_{14}, t_{50}	różnicowanie się w komórkach Langerhansa do M2b
x_7	m_3	t_{22}, t_{48}	różnicowanie się w komórkach mikrogleju do M2b
x_8	m_3	t_{23}, t_{47}	różnicowanie się w komórkach Kupffera do M2b
x_9	m_3	t_{21}, t_{49}	różnicowanie się w pęcherzykach płucnych do M2b
x_{10}	m_2	t_{26}, t_{50}	różnicowanie się w komórkach Langerhansa do M2c
x_{11}	m_2	t_{24}, t_{48}	różnicowanie się w komórkach mikrogleju do M2c
x_{12}	m_2	t_{15}, t_{47}	różnicowanie się w komórkach Kupffera do M2c
x_{13}	m_2	t_{25}, t_{49}	różnicowanie się w pęcherzykach płucnych do M2c
x_{14}		$t_{20}, t_{32}, t_{42}, t_{50}$	różnicowanie się w komórkach Langerhansa do M1
x_{15}		$t_{20}, t_{34}, t_{42}, t_{48}$	różnicowanie się w komórkach mikrogleju do M1
x_{16}		$t_{20}, t_{35}, t_{42}, t_{47}$	różnicowanie się w komórkach Kupffera do M1

t-niezmienniki	Zbiory MCT	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
x_{17}		$t_{20}, t_{33}, t_{42}, t_{49}$	różnicowanie się w pęcherzykach płucnych do M1
x_{18}	m_1, m_4	t_6, t_{17}, t_{36}	zwiększenie puli monocytów nieklasycznych przez utratę ekspresji Ly6C monocytów klasycznych, różnicowanie się makrofagów nieklasycznych do M2a
x_{19}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{36}, t_{37}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M2a
x_{20}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{36}, t_{37}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M2a
x_{21}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{36}, t_{41}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2b i nieklasycznych do M2a
x_{22}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{36}, t_{41}, t_{51}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2b i nieklasycznych do M2a
x_{23}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{36}, t_{39}, t_{46}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2b i nieklasycznych do M2a
x_{24}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{36}, t_{39}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2c i nieklasycznych do M2a
x_{25}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{36}, t_{42}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych M1 i nieklasycznych do M2a
x_{26}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{36}, t_{42}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych M1 i nieklasycznych do M2a
x_{27}	m_1, m_3	t_6, t_{17}, t_{40}	zwiększenie puli monocytów nieklasycznych przez utratę ekspresji Ly6C monocytów klasycznych, różnicowanie się makrofagów nieklasycznych do M2b
x_{28}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{37}, t_{40}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych M2a i nieklasycznych do M2b
x_{29}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{37}, t_{40}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych M2a i nieklasycznych do M2b
x_{30}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{40}, t_{41}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M2b
x_{31}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{40}, t_{41}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M2b
x_{32}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{39}, t_{40}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2c i nieklasycznych do M2b
x_{33}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{39}, t_{40}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2c i nieklasycznych do M2b
x_{34}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{42}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M1 i nieklasycznych do M2b
x_{35}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{42}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M1 i nieklasycznych do M2b
x_{36}	m_1, m_2	t_6, t_{17}, t_{38}	zwiększenie puli monocytów nieklasycznych przez utratę ekspresji Ly6C monocytów klasycznych, różnicowanie się makrofagów nieklasycznych do M2c
x_{37}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{37}, t_{38}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2a i nieklasycznych M2c

t-niezmienniki	Zbiory MCT	Zawarte tranzycje	Znaczenie biologiczne
x_{38}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{37}, t_{38}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2a i nieklasycznych do M2c
x_{39}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{38}, t_{41}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2b i nieklasycznych do M2c
x_{40}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{38}, t_{41}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2b i nieklasycznych do M2c
x_{41}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{38}, t_{39}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M2c
x_{42}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{38}, t_{39}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M2c
x_{43}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{38}, t_{42}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M1 i nieklasycznych do M2c
x_{44}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{38}, t_{42}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M1 i nieklasycznych do M2c
x_{45}	m_1	$t_6, t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{42}$	zwiększenie puli monocytów nieklasycznych przez utratę ekspresji Ly6C monocytów klasycznych, różnicowanie się makrofagów nieklasycznych do M1
x_{46}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{37}, t_{42}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2a i nieklasycznych do M1
x_{47}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{37}, t_{42}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2a i nieklasycznych do M1
x_{48}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{41}, t_{42}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2b i nieklasycznych do M1
x_{49}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{41}, t_{42}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2b i nieklasycznych do M1
x_{50}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{39}, t_{42}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2c i nieklasycznych do M1
x_{51}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{39}, t_{42}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych do M2c i nieklasycznych do M1
x_{52}	m_1	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{31}, t_{42}, t_{46}$	różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M1
x_{53}	m_1	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{31}, t_{42}, t_{51}$	zwiększenie rekrutacji monocytów do tkanek oraz różnicowanie się makrofagów klasycznych i nieklasycznych do M1

Tabela 4

Lista wieloelementowych zbiorów MCT

Zbiory MCT	Zawarte tranzycje
m_1	$t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t_5, t_7, t_8, t_9, t_{10}, t_{11}, t_{16}, t_{18}$
m_2	t_{12}, t_{43}
m_3	t_{44}, t_{53}
m_4	t_{45}, t_{52}

Tabela 5

Lista t-klastrów

t-klastry	t-niezmienniki	Zbiory MCT	Pojedyncze tranzycje
c_1	x_1		t_{17}, t_{19}
c_2	x_2	m_4	t_{29}, t_{50}
	x_3	m_4	t_{27}, t_{48}
	x_4	m_4	t_{13}, t_{47}
	x_5	m_4	t_{28}, t_{49}
c_3	x_6	m_3	t_{14}, t_{50}
	x_7	m_3	t_{22}, t_{48}
	x_8	m_3	t_{23}, t_{47}
	x_9	m_3	t_{21}, t_{49}
c_4	x_{10}	m_2	t_{26}, t_{50}
	x_{11}	m_2	t_{24}, t_{48}
	x_{12}	m_2	t_{15}, t_{47}
	x_{13}	m_2	t_{25}, t_{49}
c_5	x_{14}		$t_{20}, t_{32}, t_{42}, t_{50}$
	x_{15}		$t_{20}, t_{34}, t_{42}, t_{48}$
	x_{16}		$t_{20}, t_{35}, t_{42}, t_{47}$
	x_{17}		$t_{20}, t_{33}, t_{42}, t_{49}$
c_6	x_{18}	m_1, m_4	t_6, t_{17}, t_{36}
	x_{19}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{36}, t_{37}, t_{46}$
	x_{20}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{36}, t_{37}, t_{51}$
	x_{21}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{36}, t_{41}, t_{46}$
	x_{22}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{36}, t_{41}, t_{51}$
	x_{23}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{36}, t_{39}, t_{46}$
	x_{24}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{36}, t_{39}, t_{51}$
	x_{25}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{36}, t_{42}, t_{46}$
	x_{26}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{36}, t_{42}, t_{51}$
	x_{27}	m_1, m_3	t_6, t_{17}, t_{40}
	x_{28}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{37}, t_{40}, t_{46}$
	x_{29}	m_1, m_3, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{37}, t_{40}, t_{51}$
	x_{30}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{40}, t_{41}, t_{46}$
	x_{31}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{40}, t_{41}, t_{51}$
	x_{32}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{39}, t_{40}, t_{46}$
	x_{33}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{39}, t_{40}, t_{51}$
	x_{34}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{42}, t_{46}$
	x_{35}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{42}, t_{51}$
	x_{36}	m_1, m_2	t_6, t_{17}, t_{38}
	x_{37}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{37}, t_{38}, t_{46}$
	x_{38}	m_1, m_2, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{37}, t_{38}, t_{51}$
	x_{39}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{38}, t_{41}, t_{46}$
	x_{40}	m_1, m_2, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{38}, t_{41}, t_{51}$
	x_{41}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{38}, t_{39}, t_{46}$
	x_{42}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{38}, t_{39}, t_{51}$
	x_{43}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{38}, t_{42}, t_{46}$
	x_{44}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{38}, t_{42}, t_{51}$
	x_{45}	m_1	$t_6, t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{42}$
	x_{46}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{37}, t_{42}, t_{46}$
	x_{47}	m_1, m_4	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{37}, t_{42}, t_{51}$
	x_{48}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{41}, t_{42}, t_{46}$
	x_{49}	m_1, m_3	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{41}, t_{42}, t_{51}$
	x_{50}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{39}, t_{42}, t_{46}$
x_{51}	m_1, m_2	$t_{17}, t_{20}, t_{31}, t_{39}, t_{42}, t_{51}$	
x_{52}	m_1	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{31}, t_{42}, t_{46}$	
x_{53}	m_1	$t_{17}, t_{20}, t_{30}, t_{31}, t_{42}, t_{51}$	

5. Wnioski

Zaproponowany w pracy model różnicowania się makrofagów uwzględnia przede wszystkim udział mikrośrodowiska w tym skomplikowanym procesie. Jest to istotne założenie, zważywszy na fakt, że obecny stan wiedzy nie pozwala w pełni odrzucić żadnej z trzech przedstawionych w pracy hipotez. Głównym problemem, który pojawił się w trakcie tworzenia modelu w oparciu o sieci Petriego był dysonans pomiędzy wiedzą i dostępnością danych jakościowych oraz ilościowych, a bardzo precyzyjnymi wymaganiami jakie niosą ze sobą wykorzystywane przez nas metody. Na uwagę zasługuje fakt złożoności procesu i jednocześnie jego duża odrębność, w zależności od miejsca w którym toczy się proces. Stworzony model jest stosunkowo mało skomplikowany i uwzględniający tylko wybrane aspekty złożonego procesu różnicowania się makrofagów. Jednak jego analiza pozwoliła na zaobserwowanie ciekawych zależności i wyciągnięcia następujących wniosków.

Założeniem modelu była między innymi możliwość różnicowanie się wszystkich typów makrofagów do obu klas fenotypowych. Prawdopodobieństwo nabycia konkretnej aktywności fenotypowej przez makrofag jest jednak różne w zależności od czynników mikrośrodowiskowych i pochodzenia makrofagów. Czynniki prozapalne przyczyniające się do aktywowania fenotypu M1 pobudzają również rekrutację monocytów nieklasycznych z krwiobiegu do wybranej tkanki celem zwiększenia populacji makrofagów biorących udział w lokalnym stanie zapalnym. Jednak z analiz opisywanego modelu wynika, że część makrofagów nieklasycznych w ten sposób rekrutowana do tkanki może różnicować się do wszystkich typów fenotypowych, nie tylko do prozapalnego typu M1. Oznacza to, że czynniki prozapalne zwiększając pulę makrofagów w tkance, mogą inicjować przeciwzapalną odpowiedź makrofagów M2. W modelu istnieją również niezmienniki sugerujące, że stymulacja migracji monocytów czynnikami prozapalnymi prowadzi do wzmożonego dojrzewania makrofagów do fenotypów przeciwzapalnych z grupy M2, nie powodując aktywacji programu prozapalnego M1. Co więcej, dzięki dużemu napływowi monocytów do tkanek możliwe jest powstanie mieszanej populacji makrofagów podczas odpowiedzi immunologicznej dzięki jednoczesnej aktywacji części makrofagów do różnych klas fenotypowych. Natomiast, gdy w analizowanym modelu tranzycja odpowiadająca pobudzeniu rekrutacji monocytów jest nieaktywna, populacje monocytów aktywują się wyłącznie do jednej z klas fenotypowych.

Opisany model jest podstawą do dalszych prac nad modelowaniem procesu różnicowania się makrofagów, który może przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat złożoności tego procesu. Rozszerzenie modelu o inne czynniki może wykazać dalsze zależności między aktywowaniem się makrofagów do poszczególnych klas fenotypowych i rodzajem odpowiedzi immunologicznej.

LITERATURA

1. Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-Amer Y., van Rooijen N., Plonquet A., Gherardi R.K., Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 2007,204, p. 1057-1069.

2. Formanowicz D., Kozak A., Głowacki T., Radom M., Formanowicz P. Hemojuvelin-hepcidin axis modeled and analyzed using Petri nets. *Journal of Biomedical Informatics*. 2013, 46, p. 1030-1043.
3. Formanowicz D., Sackmann A., Kozak A., Błażewicz J., Formanowicz P. Some aspects of the anemia of chronic disorders modeled and analyzed by petri net based approach. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34, 2011, p. 581-595.
4. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5, 2014, p. 514.
5. Italiani P., Mazza E.M., Lucchesi D., Cifola I., Gemelli C., Grande A., Battaglia C., Biciato S., Boraschi D. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PLoS One*, 2014, 9, e87680.
6. Koch I., Reisig W., Schreiber F., editors. *Modeling in Systems Biology. The Petri Net Approach*. Springer, London, 2011.
7. Leitinger N., Schulman I.G. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2013, 33, p. 1120-1126.
8. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Reports*, 2014, 6, p. 13.
9. Mills C.D., Ley K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *Journal of Innate Immunology*, 2014, 6(6).
10. Murata T. Petri Nets: Properties, Analysis and Applications. *Proceedings of the IEEE*, 77, 1989, p. 541-580.
11. Mylonas K.J., Nair M.G., Prieto-Lafuente L., Paape D., Allen J.E. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *Journal of Immunology*, 2009, 182, p. 3084-3094.
12. Petri C.A. *Communication with Automata (in German)*. Schriften des Instituts für Instrumentelle Mathematik, Bonn, 1962.
13. Stout R.D., Jiang C., Matta B., Tietzel I., Watkins S.K., Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotypes in response to changes in micro-environmental influences. *Journal of Immunology*, 2005, 175, p. 342-349.
14. Varol C., Mildner A., Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology* 2015, 33, p. 643-675.
15. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X-F., Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory disease. *Biomarkers Research* 2014, 2, p. 1.