

Kaja CHMIELEWSKA¹, 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

MODELOWANIE I ANALIZA USZKODZEŃ ŚRÓDBŁONKA ZA POMOCĄ SIECI PETRIEGO*

Streszczenie. Uszkodzenie śródbłonka naczyniowego, będące jedną z głównych przyczyn powstawania blaszki miażdżycowej, jest bardzo złożonym i dynamicznym procesem zależnym od wielu czynników. Wpływ tych czynników jest różnorodny i uzależniony od zmian ilościowych i jakościowych pozostałych czynników. Stąd aby w pełni zrozumieć procesy leżące u podłoża tego zjawiska, należy je analizować w sposób całościowy, biorąc pod uwagę jak najwięcej zmiennych. Takie podejście zastosowano w przypadku obecnego projektu. Zaproponowano model uszkodzenia śródbłonka wykorzystując teorię sieci Petriego. Model ten składa się z 63 miejsc i 94 tranzycji, 8481 t-niezmienników i 19 zbiorów MCT. Analiza klastrów t-niezmienników, umożliwiła określenie sensu biologicznego dla modelowanego procesu i ujawniła, że w procesie tym kluczową rolę odgrywa proces zapalny i stres oksydacyjny.

MODELING AND ANALYSIS OF ENDOTHELIAL DAMAGE USING PETRI NETS

Summary. Damage to the vascular endothelium, which is one of the major causes of atherosclerotic plaque formation is a complex and dynamic process depending on many factors. The impact of these factors is diverse and addicted to quantitative and qualitative changes of other factors. Therefore, to fully understand the processes underlying this phenomenon, they must be analyzed in a holistic manner, taking into account as many as possible variables. This approach was applied to the current project. model of endothelial damage by using the theory of Petri nets has been proposed . This model consists of 63 places and 94 transitions, 8481 t-invariants and 19 MCT sets. Analysis of the clusters of the t-invariants, determined the biological sense of the modeled process and at revealed that inflammation and oxidative stress plays a key role in this process.

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

1. Wstęp

Pomimo postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie poznania mechanizmów leżących u podłoża złożonego zjawiska, jakim jest miażdżyca, ciągle nasza wiedza jest niekompletna, co utrudnia w pełni skuteczne leczenie przyczynowe tego bardzo powszechnego schorzenia. Miażdżyca jest dziś postrzegana jako złożony dynamiczny proces zapalno-fibroproliferacyjny toczący się w błonie wewnętrznej dużych i średnich naczyń tętniczych, który podlega licznym modyfikacjom pod wpływem oddziaływania różnorodnych czynników. Jednym z kluczowych zjawisk tego procesu jest dysfunkcja śródbłonna, do której dochodzi przede wszystkim na tle toczącego się lokalnego lub ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Zgodnie z jedną z koncepcji, tzw. hipotezą oksydacyjną odpowiedzi na zapalenie, zakłada się, że powszechnie występujące czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego przyczyniają się do procesów zapalnych, które z kolei wywołują stres oksydacyjny równoległe do miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych. Pojęcie stresu oksydacyjnego stosowane jest w odniesieniu do wszelkich procesów zachodzących w ludzkim organizmie, w których dochodzi do nasilonego wytwarzania reaktywnych form tlenu, przekraczającego wydolność fizjologicznych układów anty-oksydacyjnych. Z drugiej strony podkreśla się, że wolne rodniki mogą także w sposób korzystny oddziaływać na organizm człowieka, np. poprzez przekazywanie sygnałów pobudzających mechanizmy naprawcze. Należy zatem zauważyć, że proces, uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, który stał się tematem badawczym pracy, jest bardzo dynamiczny i podlega licznym międzycząsteczkowym zależnościom jakościowym i ilościowym, stąd nie jesteśmy w stanie biorąc pod uwagę tylko jeden wybrany kontekst/pojedyńcze zaobserwowane zdarzenie w pełni poznać i zrozumieć jego natury. Z kolei jeśli chcielibyśmy wziąć pod uwagę wszystkie wpływy i precyzyjnie je przeanalizować, to bez zastosowania narzędzi matematycznych i informatycznych będzie to praktycznie niewykonywalne. Wspomniane wyzwania przed którymi staje współczesna nauka, powodują dynamiczny rozwój biologii obliczeniowej, a co się z tym w sposób ścisły wiąże biologii i medycyny systemowej, w której organizm ludzki w stanie zdrowia jest traktowany jako system, będący w stanie dynamicznej równowagi. Wszelkie zaburzenia tego stanu mogą skutkować jego niewłaściwym działaniem, np. akumulacją pewnych cząsteczek, hamowaniem innych - co jest jednoznaczne z przejściem układu ze stanu zdrowia w stan choroby. Aby ukazać złożoność prezentowanego zjawiska i stworzyć jego model matematyczny, w pracy wykorzystano sieci Petriego, coraz częściej stosowane do opisu układów biologicznych.

Sieć Petriego jest obiektem matematycznym mającym strukturę ważonego grafu dwudzielnego skierowanego, a zatem zbiór wierzchołków takiej sieci dzieli się na dwa rozłączne podzbiory, przy czym łuki łączą tylko wierzchołki należące do różnych podzbiorów [8, 3]. Wierzchołki będące elementami jednego z nich nazywane są tranzycjami, a wierzchołki, które należą do drugiego podzbioru to miejsca. Jeżeli sieć Petriego jest modelem pewnego systemu biologicznego, tranzycje (oznaczane za pomocą prostokątów) odpowiadają elementarnym podprocesom w nim zachodzącym, natomiast miejsca (oznaczane za pomocą okręgów) na ogół modelują składniki systemu, które są potrzebne do zajścia elementarnych procesów, lub takie, które są ich wynikiem (na ogół składniki będące wynikiem zajścia pewnego elementarnego podprocesu są potrzebne do zajścia innego podprocesu). Istotnymi elementami sieci Petriego są tokeny, które znajdując się

w miejscach reprezentują ilości poszczególnych składników znajdujących się w modelowanym systemie. Rozkład tokenów w poszczególnych miejscach sieci, nazywany znakowaniem, reprezentuje stan modelowanego systemu. Tokeny poruszają się w sieci przepływając pomiędzy miejscami poprzez tranzycje. Przepływem tym rządzi reguła aktywacji i uruchomienia tranzycji. Zgodnie z nią tranzycja jest aktywna, jeżeli w każdym z miejsc bezpośrednio ją poprzedzających w sieci znajduje się liczba tokenów równa co najmniej wadze łuku łączącego takie miejsce z daną tranzycją. Aktywna tranzycja może zostać uruchomiona, co oznacza, że z miejsc bezpośrednio ją poprzedzających przepływają tokeny do miejsc bezpośrednio po niej następujących, przy czym liczba przepływających tokenów równa jest wagom odpowiednich łuków. Przepływ tokenów reprezentuje przepływ informacji, substancji itp. przez modelowany system.

Oprócz reprezentacji graficznej sieci Petriego, jej struktura może być opisana za pomocą macierzy incydencji $A = [a_{ij}]_{n \times m}$, gdzie n jest liczbą miejsc, a m jest liczbą tranzycji [8, 13, 3]. Element a_{ij} tej macierzy równy jest różnicy liczb tokenów znajdujących się w miejscu p_i przed i po uruchomieniu tranzycji t_j . Na podstawie macierzy A można wyznaczyć niezmienniki tranzycji (t-niezmienniki), mające istotne znaczenie w analizie modeli systemów biologicznych. Niezmiennik taki jest wektorem x będącym rozwiązaniem równania $A \cdot x = 0$. Z t-niezmiennikiem x związany jest zbiór tranzycji $supp(x) = \{t_j : x_j > 0\}$, nazywany jego wsparciem, zawierający tranzycje, którym odpowiadają nieujemne współrzędne wektora x . najważniejsza cecha t-niezmiennika polega na tym, że uruchomienie każdej tranzycji $t_j \in supp(x)$ x_j razy nie zmienia rozkładu tokenów w sieci. A zatem t-niezmienniki odpowiadają pewnym podprocesom, które nie zmieniają stanu modelowanego systemu. Istotna jest analiza zależności między tego rodzaju podprocesami, gdyż może ona prowadzić do odkrywania nieznanych wcześniej własności badanego systemu biologicznego. Analizę taką można prowadzić przez poszukiwanie podobieństw między t-niezmiennikami. W przypadku dużej ich liczby korzysta się na ogół z algorytmów analizy skupień, za pomocą których podobne do siebie nawzajem t-niezmienniki grupowane są w t-klastry i dalszą analizę prowadzi się wewnątrz klastrów. Dla każdego z nich określa się też jego znaczenie biologiczne, gdyż na ogół odpowiadają one pewnym podprocesom wyższego rzędu. Ponadto, przydatne jest też określenie zbiorów MCT (Maximal Common Transition sets), z których każdy zawiera tranzycje będące elementami wsparć dokładnie tych samych t-niezmienników. Zbiory te stanowią zatem podział zbioru tranzycji na rozłączne podzbiory, z których każdy odpowiada pewnemu funkcjonalnemu modułowi badanego systemu.

2. Nieformalny opis modelowanego procesu

2.1. Zainicjowanie uszkodzeń śródbłonna

Zainicjowanie uszkodzeń śródbłonna naczyniowego (tzw. aktywacja prozapalnego fenotypu śródbłonna) wiąże się z pojawieniem różnych czynników mogących oddziaływać w sposób bezpośredni i pośredni na śródbłonek. Wyróżniamy wśród nich m.in. wysokie ciśnienie tętnicze krwi, podwyższone stężenie glukozy w surowicy, nadmierną ilość lipoprotein o małej gęstości (*LDL*), toksyny, wzrost lub spadek stężenia różnych cząsteczek/cytokin powodowany m.in. paleniem papierosów [9, 7, 6]. Przez bezpośrednie uszkodzenie rozumie się m.in. dysplazję włóknisto-mięśniową (*FMD*), pojawiającą się często u palaczy [7]. Natomiast pośrednie uszkodzenie spowodowane paleniem

przyczynia się m.in.: do zmniejszenia ilości tetrahydrobiopteryny (BH_4) - która jest ko-faktorem syntezy tlenku azotu (NO), zwiększenia ilości LDL , reaktywnych form tlenu (ROS), wolnych rodników i metali. Reaktywne formy tlenu i wolne rodniki biorą udział w wybuchu tlenowym [2] i utlenianiu LDL (powstawaniu szkodliwych, utlenionych lipoprotein o małej gęstości ($oxLDL$)) [9, 7, 6]. Większość z tych procesów wpływa na biodostępność NO , który odgrywa kluczową rolę w wielu procesach komórkowych. Należy podkreślić, że NO , w zależności od lokalnego stężenia, może wywierać wpływ zarówno korzystny, jak i niekorzystny [9]. Odpowiedzią uszkodzonego śródbłonna na działanie czynników uszkodzających jest ekspresja białek dokujących $VECAM - 1$ na powierzchni śródbłonna. Pozwala to na adhezję monocytów krwi stymulowanych przez chemokiny (również uwolnione z uszkodzonego śródbłonna). Diapedeza, czyli przejście monocytów przez ścianę naczynia oraz ich transformacja do makrofaga wchodzi w skład typowej odpowiedzi zapalnej [9]. Głównym celem makrofaga jest pozbycie się uszkodzonych komórek i zapobiegnięcie infekcji [14]. Zwykle po wykonaniu tej czynności makrofagi wracają do obiegu krwi, jednakże ze względu na obecność wysokiego stężenia LDL pozostają w ognisku zapalnym. Dodatkowo u palaczy, dym papierosowy stymuluje rozwój zapalenia, będąc dodatkowym źródłem cytokin i monocytów [7].

2.2. Dalszy rozwój uszkodzeń śródbłonna

Makrofagi wydzielają cytokiny, które prowadzą do syntezy białek $VECAM - 1$ na powierzchni śródbłonna oraz proliferacji komórek mięśni gładkich [9]. Przy obecności cytokin dochodzi do wybuchu tlenowego, w wyniku którego powstają wolne rodniki [9]. Precyzując, dochodzi do syntezy anionorodnika nadadtlenkowego $O_2^{\bullet-}$ [2], który bierze udział w utlenianiu LDL prowadząc do powstania $oxLDL$ [10]. Można zatem powiedzieć, że $O_2^{\bullet-}$ jest ważnym elementem złożonego procesu powodującego zwężanie światła naczynia. Utlenione lipoproteiny o małej gęstości ulegają fagocytozie przez makrofagi - jest to działanie chroniące komórkę przed nadmiernym gromadzeniem się szkodliwego utlenionego LDL [2]. Proces ten prowadzi do powstania wypełnionych lipidami komórek piankowatych, a gdy ilość $oxLDL$ jest wysoka może dojść do lizy. Gdy komórki piankowate umierają, pozostawiają rdzeń nekrotyczny zbudowany z utlenionych lipidów, których depozyty doprowadzają do zwężenia światła naczynia [9]. W procesie zapalnym cytokiny przyczyniają się do proliferacji komórek mięśni gładkich [16, 1]. Z kolei namnożone komórki wydzielają kolagen oraz macierz glikoproteinową, prowadząc do powstania czapeczki włóknistej, która przykrywa tkankę tłuszczową. Podczas rozwoju procesu chorobowego dochodzi do wielokrotnego powtarzania się fazy odkładania lipidów i formowania czapeczki włóknistej, co w następstwie prowadzi do rozwoju blaszki miażdżycowej [9].

2.3. Rola tlenu azotu

Tlenek azotu (NO) odgrywa istotną rolę w licznych procesach, takich jak m.in. rozszerzanie naczyń krwionośnych (regulacja ciśnienia tętniczego krwi), angiogeneza [16] oraz apoptoza [9]. Stężenie NO będące wypadkową współdziałania licznych mechanizmów zmienia się, co pozwala mu pełnić przeciwstawne funkcje [9]. Należy zaznaczyć, że zaburzenia biodostępności NO sprzyjają powstawaniu chorób sercowo-naczyniowych [9, 7].

- Działanie korzystne związane z wysokim stężeniem NO : gdy mechanizmy wpływające na biodostępność NO działają prawidłowo, wytwarzana jest wystarczająca

ilość tlenu azotu do regulacji funkcji płytek krwi, adhezji leukocytów, zapobiegania proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń oraz hamowania oksydacji *LDL* [9]. Kluczowym procesem jest właśnie hamowanie oksydacji *LDL*, podczas której anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ łączy się z tlenkiem azotu *NO*, syntetyzując nadtlenoazotyn $ONOO^-$. Gdy stężenie *NO* jest wysokie to anionorodniki są zredukowane do postaci nadtlenoazotynu, co uniemożliwia utlenianie *oxLDL* [9, 7].

- Działanie niekorzystne związane z niskim stężeniem *NO*: mechanizmy zmniejszające biodostępność *NO*, powodują utratę wystarczającej ilości tego związku do prawidłowego działania [9, 7, 6]. Oznacza to, że jeśli jest za mało *NO*, to będzie dochodzić do nadmiernej syntezy utlenionego *LDL*, którego nadmiar powoduje rozwój choroby [9, 7]. Precyzując, gdy stężenie *NO* jest niskie to niektóre z anionorodników ponadtlenkowych mogą być w dalszym ciągu zredukowane do postaci nadtlenoazotynu. Nie ma to jednak większego znaczenia, gdyż w sytuacji z przewagą ilościową $O_2^{\bullet-}$ dochodzi do oksydacji *LDL* w dużo większym stopniu [9].

Obok procesu zapalnego dochodzi do stresu oksydacyjnego (wybuchu tlenowego) [2] w wyniku którego powstaje wspomniany wcześniej anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ [9, 7, 6]. Ponadto, palenie papierosów dodatkowo stymuluje wybuch tlenowy czym przyczynia się w znacznym stopniu do zmniejszenia biodostępności *NO* [7, 6].

2.4. Synteza tlenu azotu

Tlenek azotu jest syntetyzowany przez grupę enzymów zwaną syntazami tlenu azotu *NOS* [9, 12]. W wyniku konwersji L-argininy do cytruliny powstaje *NO*. Reakcja to wymaga niezbędnych kofaktorów, takich jak tlen i *NADPH* oraz kofaktor BH_4 zwiększający powinowactwo syntazy *eNOS* do L-argininy [9]. Produktem tej reakcji jest *NO* i *NADP+*. Ważne jest, że synteza może być hamowana w przypadku, gdy zahamowana zostanie syntaza *eNOS*. Inhibitorem syntaz jest asymetryczna dimetylo-arginina *ADMA*, jej obecność jest jednym z mechanizmów zmniejszających produkcję *NO* [9]. Innym mechanizmem wpływającym na zmniejszenie biodostępności *NO* jest po prostu uszkodzenie śródbłonna, który w normalnych warunkach wytwarza *eNOS* konieczny do zajścia syntezy *NO*. Jednakże, wyróżnia się trzy główne izoformy *NOS* w zależności od umiejscowienia w tkance: neuronalna (*nNOS*), endotelialna (*eNOS*), indukowalna (*iNOS*) [9, 12].

3. Model

W niniejszym rozdziale zaproponowano model matematyczny oparty na teorii sieci Petriego [8, 11] procesu biologicznego, którego szczegółowy opis został przedstawiony w poprzednim rozdziale. Model ten został stworzony za pomocą programu Snoopy [5], a do jego analizy wykorzystano m. in. skrypty napisane w języku R.

Model jest zapisem przetworzonej informacji biologicznej i należy go traktować jako przybliżenie rzeczywistości, gdyż zawiera pewne uproszczenia. Zaproponowany model został przedstawiony na rysunku 1. Z uwagi na czytelność, jest on podzielony na dwie podsieci, które połączone są miejscami logicznymi. Pierwsza z nich, zamieszczona w górnej ramce na rysunku 1, przedstawia obecne w organizmie mechanizmy, które

obejmują odpowiedź uszkodzonego śródbłonka i szereg innych. Druga część, znajdująca się w dolnej ramce, przedstawia elementy związane z paleniem papierosów, ale skupiono się tylko na wybranych, mających wpływ na uszkodzenie śródbłonka. W tabeli 1 zamieszczone są nazwy miejsc, natomiast w tabeli 2 znajdują się nazwy tranzycji.

Uproszczenia modelu wynikają z reakcji hamujących, czyli reakcji zmniejszających ilość danego czynnika. Narzędzia do tworzenia modeli z zastosowaniem sieci Petriego umożliwiają zastosowanie łuków hamujących. Jednak nie są one uwzględniane w macierzy incydencji, zatem nie podlegają analizie t-niezmienników oraz analizie klastrów. Jako, że problem ten pozostaje otwarty to w zaprezentowanym modelu reakcje hamujące zostały uwzględnione przez tranzycje o nazwie *hamowanie* - podczas symulacji nie jest to jasno uwidocznione. Oto kilka przykładów zahamowania reakcji:

- Hamowanie kofaktora BH_4 : W normalnych warunkach kofaktor BH_4 zwiększa powinowactwo syntazy $eNOS$ do L-argininy co ma duży udział w syntezie tlenu azotu. W przypadku, gdy dochodzi do hamowania BH_4 , dochodzi też do zahamowania syntezy NO w wyniku której powstaje mniej produktu (stąd miejsce *mniej NO*). Te dwa przeciwstawne procesy w modelu nie są do końca wyodrębnione (Rysunek 2).
- Hamowanie L-argininy: L-arginina bierze udział w syntezie tlenu azotu, więc gdy pojawia się jej inhibitor L- NMMA, dochodzi do tej samej sytuacji co w przypadku kofaktora BH_4 , czyli zahamowania syntezy tlenu azotu. I również te dwa procesy w modelu umiejscowione są blisko siebie, choć ich efekt końcowy jest różny (Rysunek 3).
- Hamowanie syntazy $eNOS$: O pośrednim hamowaniu syntazy $eNOS$ wspomniano w przypadku kofaktora BH_4 . Natomiast można wyróżnić także bezpośrednie hamowanie w wyniku pojawienia się asymetrycznej dimetyloargininy ($ADMA$) (Rysunek4).

Inne uproszczenia pojawiające się w modelu wynikają z braku dokładnych danych. W związku z tym w modelu pojawiają się tranzycje o nazwach: *wzrost*, *spadek* oraz miejsca o nazwie *mniej NO* i po prostu NO . W przypadku miejsca NO oznaczono prawidłową ilość tego związku. Podczas tworzenia modelu uwzględniono występowanie reakcji odwracalnych, stąd występują dodatkowe łuki. Przykładem reakcji odwracalnych jest tworzenie się aktywnego monocytu z chemokiny i nieaktywnego monocytu, aby na dalszym etapie aktywny monocyt mógł stworzyć kompleks z białkiem $VECAM - 1$ i przejść transformację do makrofaga. W tym procesie zarówno chemokiny jak i białko $VECAM - 1$ może zostać powtórnie wykorzystane.

Tabela 1

Lista miejsc

Miejsce	Biologiczne znaczenie	Miejsce	Biologiczne znaczenie
p_0	zdrowy śródbłonek	p_{33}	rdzeń nekrotyczny
p_1	uszkodzony śródbłonek	p_{34}	blaszka miażdżycowa
p_2	LDL	p_{35}	czynnik tkankowy
p_3	wysokie ciśnienie krwi	p_{36}	miażdżycyca
p_4	toksyny	p_{37}	czynnik wzrostu
p_5	inne czynniki	p_{38}	cytokiny
p_6	eNOS	p_{39}	macierz glikoproteinowa
p_7	ADMA	p_{40}	kolagen

Miejsce	Biologiczne znaczenie	Miejsce	Biologiczne znaczenie
p_8	iNOS	p_{41}	czapeczka włóknista
p_9	nNOS	p_{42}	białe krwinki krwi
p_{10}	NADPH	p_{43}	dym papierosowy
p_{11}	L-arginina	p_{44}	policykliczne węglowodory aromatyczne
p_{12}	O ₂	p_{45}	chemokiny
p_{13}	L-NMMA	p_{46}	FMD (dysplazja włóknisto-mięśniowa)
p_{14}	cytrulina	p_{47}	oxLDL
p_{15}	NADP	p_{48}	ROS (reaktywne formy tlenu)
p_{16}	NO jeśli jest uszkodzenie śródbłonna	p_{49}	wolne rodniki
p_{17}	NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	p_{50}	kadm
p_{18}	czynnik stymulujący kolonie makrofagów	p_{51}	aldehydy
p_{19}	białko chemotaktyczne 1 monocytów	p_{52}	metale
p_{20}	NO	p_{53}	skrzep
p_{21}	ciśnienie krwi	p_{54}	profil lipidowy
p_{22}	agregacja płytek krwi	p_{55}	triglicerydy
p_{23}	namnożone komórki mięśni gładkich VSMC	p_{56}	mniejsza ilość BH_4
p_{24}	nadtlenoazotyn	p_{57}	miejsce pomocnicze dla tranzycji t_{80} stymulującej makrofagi
p_{25}	anionrodnik ponadtlenkowy	p_{58}	makrofag
p_{26}	ICAM-1	p_{59}	markery stresu oksydacyjnego
p_{27}	cząsteczki adhezyjne	p_{60}	endotelina-1
p_{28}	nieaktywny monocyt	p_{61}	mniej NO
p_{29}	aktywny monocyt	p_{62}	inne zahamowane cząsteczki
p_{30}	VECAM-1	p_{63}	BH_4 (kofaktor eNOS)
p_{31}	kompleks VECAM-1 i monocytu		
p_{32}	komórka piankowata		

Tabela 2

Lista tranzycji

Tranzycja	Biologiczne znaczenie	Tranzycja	Biologiczne znaczenie
t_0	uszkodzenie powodowane przez LDL	t_{48}	prolifерacja
t_1	sekrecja chemokin przez uszkodzony śródbłonek	t_{49}	tranzycja pomocnicza dla cytokin
t_2	tranzycja pomocnicza dla uszkodzonego śródbłonna	t_{50}	sekrecja kolagenu i macierzy glikoproteinowej przez namnożone VSMC
t_3	tranzycja pomocnicza dla LDL	t_{51}	tworzenie czapeczki włóknistej przez kolagen i macierz glikoproteinową
t_4	tranzycja pomocnicza dla wysokiego ciśnienia krwi	t_{52}	tranzycja pomocnicza dla namnożenia komórek mięśni gładkich VSMC
t_5	tranzycja pomocnicza dla toksyn	t_{53}	tranzycja pomocnicza dla VECAM-1
t_6	tranzycja pomocnicza dla innych czynników	t_{54}	wybuch tlenowy
t_7	ekspresja białek VECAM-1 przez uszkodzony śródbłonek	t_{55}	stymulowanie czynnika wzrostu
t_8	hamowanie eNOS przez uszkodzony śródbłonek	t_{56}	tranzycja pomocnicza dla dymu papierosowego
t_9	sekrecja eNOS przez zdrowy śródbłonek	t_{57}	wydzielanie kadmu, metali, wolnych rodników, aldehydów, policykliczne węglowodory aromatyczne przez dym papierosowy
t_{10}	zahamowanie eNOS przez ADMA	t_{58}	bezpośrednie uszkodzenie powodowane dymem, prowadzące do dysplazji włóknisto-mięśniowej
t_{11}	tranzycja pomocnicza dla ADMA	t_{59}	remodelowanie tkanki

Tranzycja	Biologiczne znaczenie	Tranzycja	Biologiczne znaczenie
t_{12}	tranzycja pomocnicza iNOS	t_{60}	uszkodzenie wywołane przez FMD powodujące uszkodzenie śródbłonna
t_{13}	tranzycja pomocnicza nNOS	t_{61}	tranzycja pomocnicza dla ROS
t_{14}	synteza NO	t_{62}	ekspresja cząsteczek adhezyjnych przez oxLDL (utleniony LDL)
t_{15}	tranzycja pomocnicza dla NADPH	t_{63}	ekspresja ICAM-1 przez oxLDL
t_{16}	tranzycja pomocnicza dla O_2	t_{64}	tranzycja pomocnicza dla czynnika stymulującego kolonie makrofagów
t_{17}	tranzycja pomocnicza dla L-argininy	t_{65}	tranzycja pomocnicza dla białka chemotaktycznego 1 monocytów
t_{18}	zahamowanie L-argininy przez L-NMMA	t_{66}	stymulowanie czynnika stymulującego kolonie makrofagów i białka chemotaktycznego 1 monocytów przez oxLDL
t_{19}	tranzycja pomocnicza dla L-NMMA	t_{67}	ekspresja cząsteczek adhezyjnych przez kadm
t_{20}	tranzycja pomocnicza	t_{68}	wzrost ilości ROS przez aldehydy
t_{21}	tranzycja pomocnicza dla cytruliny	t_{69}	stymulowanie oksydacji przez wolne rodniki
t_{22}	tranzycja pomocnicza dla NADP	t_{70}	stymulowanie oksydacji przez metale
t_{23}	wysoka ilość NO	t_{71}	stymulowanie namnażania VSMC przez ICAM-1
t_{24}	regulacja ciśnienia krwi przez NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	t_{72}	stymulowanie namnażania VSMC przez cząsteczki adhezyjne
t_{25}	hamowanie agregacji płytek krwi, namnożonych VSMC, innych zahamowanych cząsteczek przez NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	t_{73}	stymulowanie wybuchu tlenowego
t_{26}	zahamowanie cząsteczek adhezyjnych przez NO jeśli jest zdrowy śródbłonek	t_{74}	modyfikacja profilu lipidowego powodowana dymem papierosowym
t_{27}	tranzycja pomocnicza dla ciśnienia krwi	t_{75}	wzrost LDL i triglicerydów powodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_{28}	tranzycja pomocnicza	t_{76}	tranzycja pomocnicza dla triglicerydów
t_{29}	niska ilość NO	t_{77}	spadek ilości BH_4 powodowany modyfikacją profilu lipidowego
t_{30}	wysoka ilość anionrodnika ponadtlenkowego	t_{78}	rozwój środowiska zapalnego
t_{31}	redukcja z NO i anionrodnika ponadtlenkowego do nadtlenoazotynu	t_{79}	wzrost ilości markerów stresu oksydacyjnego, białych krwinek krwi, namnażania VSMC, endoteliny-1 spowodowany dymem papierosowym
t_{32}	zahamowanie oksydacji oxLDL przez redukcję do nadtlenoazotynu	t_{80}	stymulowanie makrofagów przez rozwój środowiska zapalnego
t_{33}	oksydacja LDL	t_{81}	tranzycja pomocnicza dla markerów stresu oksydacyjnego
t_{34}	tranzycja pomocnicza dla anionrodnika ponadtlenkowego	t_{82}	tworzenie blaszki miażdżycowej przez białe krwinki krwi
t_{35}	tranzycja pomocnicza dla aktywnego monocytu	t_{83}	tworzenie blaszki miażdżycowej przez LDL
t_{36}	tranzycja pomocnicza	t_{84}	uszkodzenie śródbłonna powodowane endoteliną-1
t_{37}	adhezja monocytu	t_{85}	stymulowanie chemokin przez białko chemotaktyczne 1 monocytów
t_{38}	transformacja do makrofaga	t_{86}	tranzycja pomocnicza dla innych zahamowanych cząsteczek
t_{39}	wychwyt oxLDL przez makrofagi	t_{87}	wzrost powinowactwa eNOS do L-argininy

Tranzycja	Biologiczne znaczenie	Tranzycja	Biologiczne znaczenie
t_{40}	sekrecja cytokin i czynnika wzrostu przez makrofagi	t_{88}	zahamowanie kofaktora BH_4
t_{41}	tranzycja pomocnicza dla nieaktywnego monocytu	t_{89}	tranzycja pomocnicza dla kofaktora BH_4
t_{42}	rozpad komórek piankowatych	t_{90}	spadek NO powodowany małą ilością BH_4
t_{43}	tworzenie się blaszki miażdżycowej	t_{91}	uszkodzenie śródbłonka powodowane wysokim ciśnieniem krwi
t_{44}	pęknięcie blaszki miażdżycowej	t_{92}	uszkodzenie śródbłonka powodowane toksynami
t_{45}	aktywacja płytek krwi	t_{93}	uszkodzenie śródbłonka powodowane innymi czynnikami
t_{46}	zablokowanie wieńcowych naczyń krwionośnych	t_{94}	indukowanie chemokin przez policykliczne węglowodory aromatyczne
t_{47}	tranzycja pomocnicza		

4. Analiza

4.1. Zbiory MCT

Zaproponowany model uszkodzeń śródbłonka składa się z 63 miejsc i 94 tranzycji, 8481 t-niezmienników i 19 zbiorów MCT (tabela 3).

Tabela 3

Lista nietrywialnych zbiorów MCT

Zbiory MCT	Zawarte tranzycje	Biologiczne znaczenie
m_1	$t_{12}, t_{13}, t_{14}, t_{21}, t_{29}$	Synteza tlenu azotu
m_2	$t_{39}, t_{42}, t_{43}, t_{50}, t_{51}$	Niepożądane działanie makrofagów: wychwyt dużej ilości utlenionych LDL w efekcie rozpad komórek i tworzenie się blaszki miażdżycowej.
m_3	$t_{57}, t_{67}, t_{68}, t_{70}, t_{94}$	Wydzielanie z dymu papierosowego substancji takich jak kadm, wolne rodniki, aldehydy oraz policykliczne węglowodory aromatyczne. Kadm indukuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych, aldehydy zwiększają liczbę reaktywnych form tlenu co ma swoje następstwa w wybuchu tlenowym, z kolei metale stymulują oksydację, a węglowodory uwalnianie chemokin. Zatem dym papierosowy ma bardzo duży udział w utlenianiu LDL i rozwoju mikrośrodowiska zapalnego.
m_4	$t_{44}, t_{45}, t_{46}, t_{47}$	Proces miażdżycowy: tworzenie się blaszki miażdżycowej, aktywacja płytek krwi - co wpływa na zwężenie wieńcowych naczyń krwionośnych,
m_5	$t_{79}, t_{81}, t_{82}, t_{84}$	Dym papierosowy ma wpływ na wzrost ilości markerów stresu oksydacyjnego, leukocytów, namnażania VSMC, enoteliny-1, co z kolei stymuluje tworzenie blaszki miażdżycowej i uszkodzenie śródbłonka
m_6	t_{15}, t_{16}, t_{22}	Substraty $NADPH$ i O_2 oraz produkt $NADP$ zaangażowane w proces syntezy tlenu azotu i wybuch tlenowy.
m_7	t_{25}, t_{28}, t_{86}	Hamowanie wielu szkodliwych procesów w sytuacji, gdy śródbłonek jest zdrowy i dochodzi do syntezy wystarczającej ilości NO .

Zbiory MCT	Zawarte tranzycje	Biologiczne znaczenie
m_8	t_{30}, t_{31}, t_{32}	Hamowanie oksydacji LDL w wyniku redukcji anionrodnika ponadtlenowego i <i>NO</i> do nadteloazotynu. Taka redukcja zmniejsza ilość anionrodnika wymaganego do ultenienia LDL.
m_9	t_4, t_{91}	Uszkodzenie śródbłónka spowodowane wysokim ciśnieniem krwi.
m_{10}	t_5, t_{92}	Uszkodzenie śródbłónka spowodowane toksynami.
m_{11}	t_6, t_{93}	Uszkodzenia śródbłónka spowodowane innymi czynnikami - (zaznaczenie, że istnieją inne czynniki, ale nie zostały one dokładnie ujęte w tym modelu).
m_{12}	t_{10}, t_{11}	Hamowanie syntazy tlenu azotu <i>eNOS</i> przez inhibitor <i>ADMA</i> co wpływa na ograniczenie produkowanej ilości <i>NO</i> .
m_{13}	t_{18}, t_{19}	Wpływ L-argininy na syntezę <i>NO</i> oraz zahamowanie L-argininy przez inhibitor <i>L - NMMA</i>
m_{14}	t_{24}, t_{27}	Regulacja ciśnienia krwi w sytuacji, gdy śródbłonek nie jest uszkodzony i produkowana ilość <i>NO</i> jest wystarczająca.
m_{15}	t_{37}, t_{38}	Adhezja monocytu do białka <i>VECAM - 1</i> , stymuluje utworzenie kompleksu, który może przejść transformację do makrofaga.
m_{16}	t_{63}, t_{71}	Utlenione LDL (<i>oxLDL</i>) mają wpływ na ekspresję białek <i>ICAM - 1</i> , które stymulują proliferację komórek mięśni gładkich <i>VSMC</i>
m_{17}	t_{75}, t_{76}	Wzrost ilości LDL i trójglicerydów powodowany modyfikacją profilu lipidowego
m_{18}	t_{77}, t_{90}	Spadek stężenia <i>BH₄</i> (powodowany modyfikacją profilu lipidowego) wpływa na ilość produkowanego <i>NO</i> ze względu na to, że jest kofaktorem syntazy tlenu azotu <i>eNOS</i> .
m_{19}	t_{78}, t_{80}	Stymulowanie makrofagów przez rozwój środowiska zapalnego będącego wynikiem palenia papierosów.

4.2. Analiza klastrów

Obecnie stosowana analiza klastrów t-niezmienników, umożliwia określenie sensu biologicznego dla zamodelowanego procesu. Podprocesy zgromadzone w jednym klastrze prawdopodobnie są od siebie zależne. Natomiast docelowa liczba grup t-niezmienników zależy od natury analizowanego systemu, dlatego ważne jest zeterminowanie liczby klastrów. W tabeli 4 przedstawiono analizę dla 20 klastrów t-niezmienników. Klastry te uzyskano stosując algorytm klastrowania oparty na metodzie średniego wiązania (*ang. average linkage*), przy czym zastosowano miarę dystansu *Pearsona*. Uzyskane wyniki potwierdzają, że stres oksydacyjny i proces zapalny stanowią kluczowe zjawiska leżące u podłoża uszkodzenia (dysfunkcji) śródbłónka. Oba te procesy prowadzą do nadmiernego wydzielania się reaktywnych form tlenu, co powoduje zwiększenie w organizmie ilości utlenionych lipoprotein o małej gęstości, a w konsekwencji uruchomienie niekorzystnego działania tlenu azotu związanego ze zmniejszeniem jego biodostępności, w efekcie promując miażdżycę. Analiza klastrów uwidoczniła jak szeroka i zawiła jest sieć wpływów, zarówno stresu oksydacyjnego, jak i procesów zapalnych – są one zaangażowane w niemal wszystkie procesy opisane w tabeli 4. Wyniki tej analizy potwierdziły, że wspomniane procesy są kluczowe dla zamodelowanego

systemu, co znajduje także odzwierciedlenie w literaturze [4, 15].

Tabela 4

Lista 20 t-klastrów

t-klastry	Biologiczna interpretacja	t-klastry	Biologiczna interpretacja
c_1	Odpowiedź uszkodzonego śródbłonka - chemokiny indukują monocyty, które w następstwie przejdą transformację do makrofaga.	c_{11}	Palenie powoduje wzrost ilości wielu szkodliwych czynników wywołujących odpowiedź zapalną uszkodzonego śródbłonka oraz dodatkowo stymulujących zapalenie przez indukowanie makrofagów i proliferacji, a w konsekwencji wpływając na rozwój miażdżycy.
c_2	Bezpośrednie uszkodzenie śródbłonka powodowane przez dysplazję włóknisto-mięśniową (FMD), co prowadzi do remodelowania tkanki.	c_{12}	Uszkodzenia śródbłonka powodowane paleniem oraz innymi czynnikami, stymulujące wszystkie opisane w modelu mechanizmy. Bez uwzględnienia szkodliwego działania makrofagów stymulującego rozwój miażdżycy i kilku mechanizmów hamowania w przypadku wystarczającej ilości NO.
c_3	Spadek kofaktora BH_4 (spowodowany dymem papierosowym) hamuje syntezę NO. W efekcie jest mniejsza ilość NO i wyższa ilość anionrodnika ponadtlenkowego co wpływa na ograniczenie hamowania oksydacji LDL.	c_{13}	Uszkodzenia śródbłonka powodowane paleniem oraz innymi czynnikami, stymulują wszystkie opisane w modelu mechanizmy.
c_4	Uszkodzenie śródbłonka powodowane zwiększeniem ilości LDL oraz modyfikowanie profilu lipidowego ma wpływ na proces tworzenia się blaszki miażdżycowej i w następstwie prowadzi do rozwoju miażdżycy.	c_{14}	Uszkodzenia śródbłonka oraz inne czynniki (ADMA, L-NMMA) wpływające na zahamowanie syntezy NO. W klastrze umieszczone są dwa przeciwstawne procesy: pierwszy prowadzący do zmniejszenia ilości NO, a drugi do zahamowania wielu szkodliwych mechanizmów. Można zatem powiedzieć, że niezależnie od pojawienia się inhibitorów, funkcje NO zostają zachowane jednak mogą mieć znacznie mniejszy efekt.
c_5	Uszkodzenie śródbłonka powodowane wysokim ciśnieniem tętniczym krwi stymuluje odpowiedź uszkodzonego śródbłonka.	c_{15}	Uszkodzenia śródbłonka powodowane paleniem oraz innymi czynnikami, stymulują wszystkie opisane w modelu mechanizmy.
c_6	Uszkodzenie śródbłonka powodowane toksynami stymuluje odpowiedź uszkodzonego śródbłonka.	c_{16}	Odpowiedź zapalna śródbłonka powodowana uszkodzeniem przez wysoki poziom LDL oraz oksydacja LDL stymulująca białko chemotaktyczne 1 monocytów i czynnik stymulujący kolonie makrofagów (stymulowanie zapalenia).
c_7	Uszkodzenie śródbłonka powodowane innymi czynnikami stymuluje odpowiedź uszkodzonego śródbłonka.	c_{17}	Uszkodzenia śródbłonka oraz rozwój zapalenia powodowany paleniem stymulują odpowiedź zapalną uszkodzonego śródbłonka i wpływają na znaczny rozwój miażdżycy z uwzględnieniem procesu utlenienia LDL.
c_8	Bezpośrednie uszkodzenie śródbłonka powodowane przez dysplazję włóknisto-mięśniową (FMD), co prowadzi do remodelowania tkanki i odpowiedzi zapalnej uszkodzonego śródbłonka.	c_{18}	Rozwój miażdżycy stymulowany uszkodzeniami śródbłonka, ale przede wszystkim rozwojem zapalenia na skutek palenia. W dużej mierze zaangażowane jest utlenianie LDL oraz stres oksydacyjny.

t-klastry	Biologiczna interpretacja	t-klastry	Biologiczna interpretacja
c ₉	Wzrost ilości LDL i triglicerydów powodowany modyfikacją profilu lipidowego, prowadzi do uszkodzenia śródbłónka i wywołania odpowiedzi zapalnej uszkodzonego śródbłónka.	c ₁₉	Oksydacja LDL, wpływa na ekspresję molekuł adhezyjnych oraz białek ICAM-1 i VECAM, które stymulują proliferację komórek mięśni gładkich.
c ₁₀	Stymulowanie proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń, przez tworzenie się kompleksu VECAM-1 i aktywnego monocytu, który ulega transformacji do makrofaga i wydziela cytokiny oraz czynniki wzrostu. Dodatkowo uwzględnione zostało hamowanie tego mechanizmu w sytuacji, gdy śródbłónka jest zdrowy, a ilość syntezowanego NO jest prawidłowa.	c ₂₀	Rozwój miażdżycy stymulowany uszkodzeniami śródbłónka, ale przede wszystkim rozwojem zapalenia na skutek palenia. W dużej mierze zaangażowane jest utlenianie LDL oraz stres oksydacyjny.

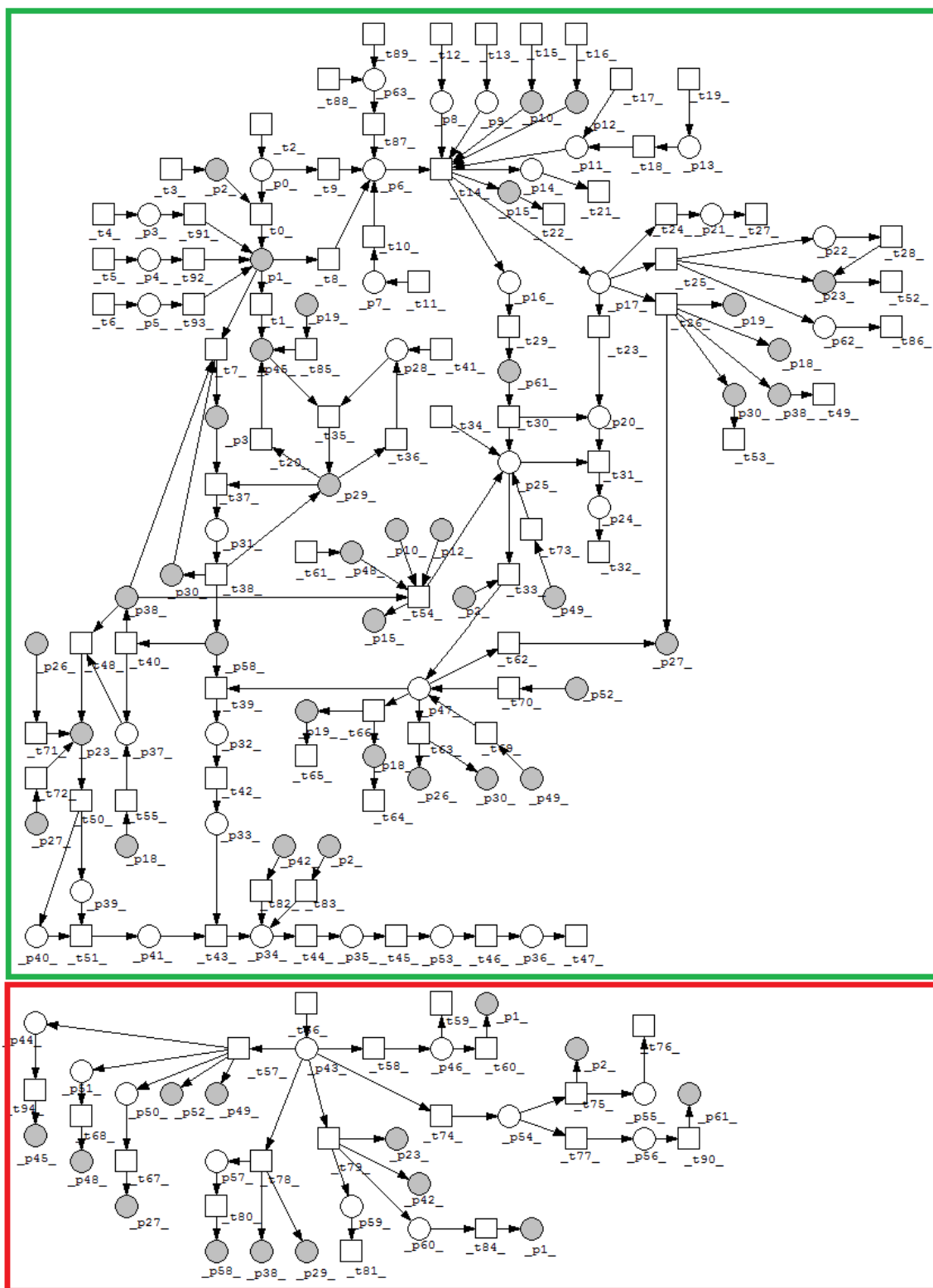
5. Podsumowanie

Analizowanie układów biologicznych jako złożonych systemów powiązanych ze sobą skomplikowaną siecią oddziaływań stało się możliwe dzięki zastosowaniu podejścia systemowego. Takie podejście narzuca konieczność wnikliwego poznania prezentowanego procesu, co bywa bardzo trudne ze względu na braki danych, albo wykluczające się wzajemnie informacje. Z drugiej strony należy pamiętać, że tylko w ten sposób jesteśmy w stanie poznać naturę tych procesów i uporządkować wiedzę na ich temat.

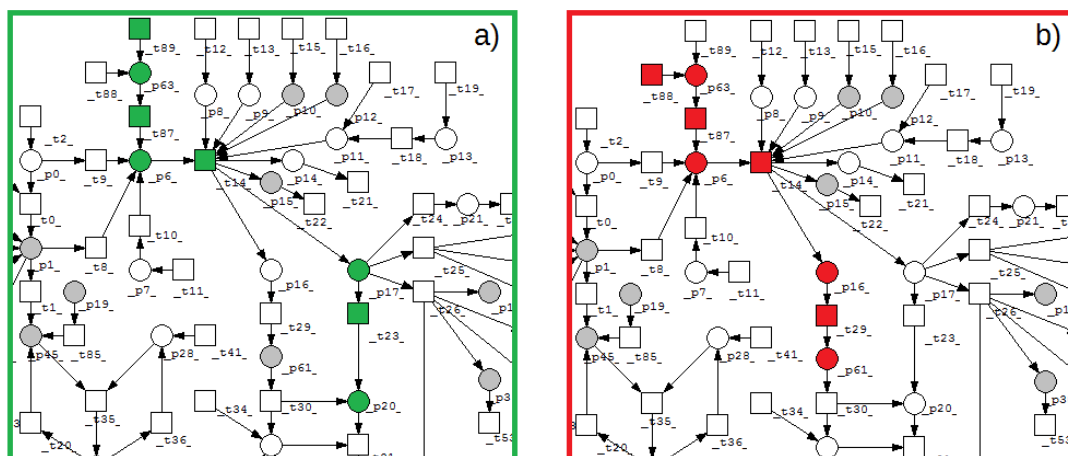
LITERATURA

1. Assender JW., Southgate KM., Hallett MB., Newby AC. Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. *Biochem. J.*, 288, 1992, p.527–532.
2. Birben E., Sahiner UM., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.*, 5, 2012, p. 9–19.
3. Formanowicz D, Kozak A, Głowacki T, Radom M, Formanowicz P. Hemojuvelin-hepcidin axis modeled and analyzed using Petri nets. *J Biomed Inform.*, 46, 2013, p. 1030–1043.
4. Grassi D, Desideri G, Ferri L, Aggio A, Tiberti S, Ferri C. Oxidative stress and endothelial dysfunction: say NO to cigarette smoking. *Curr Pharm Des.*, 16, 2010, p. 2539–2550.
5. Heiner M, Herajy M, Liu F, Rohr C, Schwarick M. Snoopy - a unifying Petri net tool. *LNCS*, 7347, 2012, p. 398–407.
6. Kitami M., Ali MK. Tobacco, Metabolic and Inflammatory Pathways, and CVD Risk. *Glob Heart.*, 7, 2012, p. 121–128.
7. Messner B., Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 34, 2014, p. 509–515.

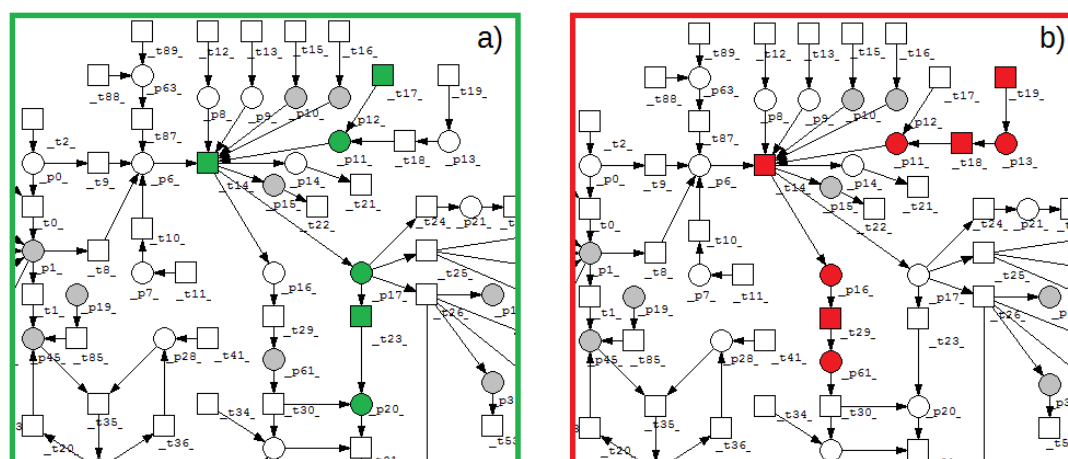
8. Murata T. Petri Nets: Properties, Analysis and Applications. Proceedings of the IEEE, 77, 1989, p. 541–580.
9. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Mol Aspects Med., 26, 2005, p. 33-65.
10. Parthasarathy S., Raghavamenon A., Garelnab MO., Santanam N. Oxidized Low-Density Lipoprotein. Methods Mol Biol., 610, 2010, p. 403—417.
11. Petri C.A. Communication with Automata (in German). Schriften des Institut fur Instrumentelle Mathematik, Bonn, 1962.
12. Rosselli M., Keller PJ., Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Hum Reprod Update., 4, 1998, p. 3–24.
13. Sackmann A, Heiner M., Koch I. Application of Petri net based analysis techniques to signal transduction pathway. BMC Bioinformatics, 7, 2006, p. 482.
14. Sun B., Boyanovsky BB., Connelly MA., Shridas P., van der Westhuyzen DR., Webb NR. Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. J Lipid Res., 48, 2007, p. 2560–2570.
15. Victor VM, Rocha M, Sola E, Banus C, Garcia-Malpartida K, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. Curr Pharm Des., 15, 2009, p. 2988–3002.
16. Ziche M., Morbidelli L., Masini E., Amerini S., Granger HJ., Maggi CA., Gepetti P., Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance. Clin. Invest., 94, 1994, p. 2036–2044.



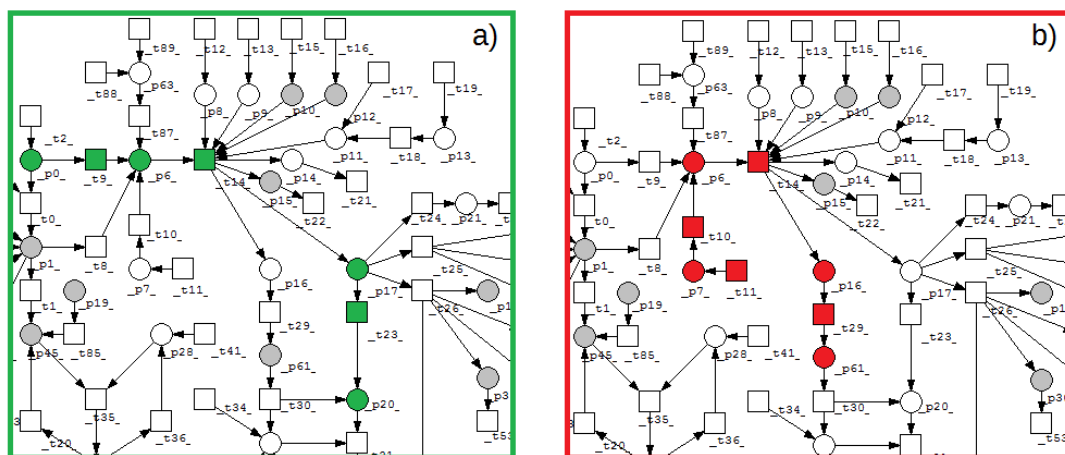
Rys. 1. Model podzielony na dwie składowe. Część modelu znajdująca się w górnej ramce, przedstawia mechanizmy związane z uszkodzeniem śródbłonna, funkcjonujące w organizmie oraz inne mechanizmy zaangażowane w odpowiedź zapalną. Druga część modelu, znajdująca się w dolnej ramce przedstawia substancje związane z paleniem papierosów oraz ich wpływ (wzrost, spadek) na inne elementy modelu.



Rys. 2. a) kofaktor BH_4 umożliwia zajście syntezy tlenku azotu i otrzymanie wystarczającej ilości NO do poprawnego działania, b) zahamowanie kofaktora BH_4 ograniczy ilość produkowanego NO .



Rys. 3. a) L-arginina jest ważnym elementem syntezy NO , jej obecność jest niezbędna do prawidłowej syntezy NO , b) pojawienie się inhibitora $L - NMMA$, co spowoduje zahamowanie L-argininy i efekcie syntezy NO .



Rys. 4. a) *eNOS* jest ważnym enzymem w syntezie *NO*, b) pojawienie się inhibitora *ADMA* wywoła zahamowanie syntezy, czyli zmniejszoną produkcję *NO*.