



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
Δ.Π.Μ.Σ. ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Διακλαδώσεις και ευστάθεια λύσεων μοντέλου  
διαφοροποίησης μεσεγγυματικών  
στρωματικών/βλαστικών κυττάρων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΚΑΤΙΑΝΑΣ ΚΟΝΤΟΛΑΤΗ

**Επιβλέποντες:** Ιωάννης Κομίνης, Επίχ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.  
Κωνσταντίνος Σιέττος, Αναπλ. Καθηγητής Univ. of Naples "Federico II"

Αθήνα, Ιούνιος 2019





ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙ-  
ΣΤΗΜΩΝ  
Δ.Π.Μ.Σ. ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Διακλαδώσεις και ευστάθεια λύσεων μοντέλου  
διαφοροποίησης μεσεγγυματικών  
στρωματικών/βλαστικών κυττάρων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΚΑΤΙΑΝΑΣ ΚΟΝΤΟΛΑΤΗ

Επιβλέποντες: Ιωάννης Κομίνης  
Κωνσταντίνος Σιέττος

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 28η Ιουνίου 2019.

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

.....  
Ιωάννης Κομίνης  
Επίχ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....  
Κωνσταντίνος Σιέττος  
Αναπλ. Καθηγητής  
Univ. of Naples Federico II

.....  
Ευστάθιος Θεοτόκογλου  
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούνιος 2019





ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙ-  
ΣΤΗΜΩΝ  
Δ.Π.Μ.Σ. ΈΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Copyright ©–All rights reserved Κατιάνα Κοντολάτη, 2019.

Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.

Το περιεχόμενο αυτής της εργασίας δεν απηχεί απαραίτητα τις απόψεις του Τμήματος, του Επιβλέποντα, ή της επιτροπής που την ενέκρινε.

### Υπεύθυνη Δήλωση

Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας, και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης έχω αναφέρει τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η μεταπτυχιακή εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά ειδικά για τις απαιτήσεις του Δ.Π.Μ.Σ. Έφαρμοσμένη Μηχανική της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

(Υπογραφή)

.....  
Κατιάνα Κοντολάτη



# Περίληψη

Η δυναμική συμπεριφορά των πολυδύναμων στελεχειαίων κυττάρων (βλαστικών κυττάρων) αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας λόγω της πληθώρας εφαρμογών αυτών στην αναγεννητική ιατρική και την καταπολέμηση ασθενειών. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) ειδικότερα, αποτελούν μη-εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης -μεταξύ άλλων- σε νευρώνες, λιποκύτταρα, μύοκύτταρα και οστεοβλάστες οδηγούμενα από τα μηχανικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος (εξωκυττάρια μήτρα) στα οποία καλλιεργούνται. Η κατανόηση του φαινομένου της κυτταρικής διαφοροποίησης αποτελεί πρόκληση για την βελτίωση θεραπειών βασισμένες σε βλαστικά κύτταρα.

Στόχος της εργασίας, είναι η δυναμική ανάλυση ενός μαθηματικού μοντέλου - γενετικού ρυθμιστικού δικτύου διαφοροποίησης μεμονωμένου κυττάρου, μέσω διατάραξης των μηχανικών και βιολογικών του παραμέτρων. Η εργασία επικεντρώνεται στην αριθμητική ανάλυση διακλάδωσης ενός συστήματος μη-γραμμικών συνήθων διαφορικών εξισώσεων (ODEs), ικανό να προβλέψει τα επίπεδα εκφράσεως γονιδίων, μεταγραφικών παραγόντων (TFs) και προσκόλλησης κυττάρου - εξωκυττάρια μήτρας, η δυσκαμψία του οποίου λαμβάνει τιμές από ένα συνεχές φάσμα. Με μεθόδους από τη θεωρία της αριθμητικής ανάλυσης διακλάδωσης προβλέπεται η εμφάνιση πολλαπλών κλάδων ισορροπίας, υστέρησης και περιοχών μηχανικής 'μνήμης' αλλά και σημείων διακλάδωσης τύπου Andronov-Hopf τα οποία γεννούν ευσταθείς περιοδικές λύσεις, ενώ διερευνάται πως αυτές επηρεάζονται από αλλαγές στην δυσκαμψία του υποστρώματος. Η ανάλυση προβλέπει την εμφάνιση οριακών κύκλων για κύτταρα καλλιεργούμενα σε υποστρώματα μικρής δυσκαμψίας ( $< 1kPa$ ), στα οποία ευνοείται η διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων σε νευρώνες και λιποκύτταρα ενώ παρουσιάζεται ένας νέος μηχανισμός διαφοροποίησης βασισμένος σε ομοκλινική διακλάδωση (homoclinic bifurcation).

## Λέξεις Κλειδιά

Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), θεωρία διακλάδωσης, μη-γραμμική δυναμική, ανάλυση ευστάθειας, ομοκλινικές διακλάδώσεις





# Abstract

The dynamic behavior of pluripotent stem cells is an important field of research due to the wide variety of possible applications in regenerative medicine. Mesenchymal stem cells, in particular, are cells which have the ability to differentiate - among others - into neurons, adipocytes, myocytes and osteoblasts driven by the mechanical features of the substrate (extracellular matrix) on which they are cultured. Understanding the phenomenon of stem cell differentiation is a major challenge for the improvement of stem cell based treatments.

This work aims to the analysis of a mathematical model/gene regulatory network, describing the differentiation fate of a single MSC, by perturbing the models' mechanical and biological parameters. The work focuses on the numerical bifurcation analysis of a system of nonlinear ordinary differential equations (ODEs), which approximates the levels of gene expression, transcription factors (TFs) and adhesion of cell-extracellular matrix, in a continuous range of ECMs stiffness values. With methods from the numerical bifurcation theory we predict the appearance of multiple branches of equilibrium and hysteresis as well as Andronov-Hopf bifurcation points which give rise to stable periodic oscillations. We explore how these solutions affect cell's fate and are affected by changes in the mechanical properties of the matrix. The analysis predicts the existence of limit cycles for cells cultured on low stiffness substrates, in which case differentiation of stem cells into neurons and adipocytes is favored. A new mechanism based on homoclinic bifurcations is also presented.

## Keywords

Mesenchymal stem cells (MSCs), cell-substrate adhesion, bifurcation theory, non-linear dynamics, stability analysis, homoclinic bifurcation



# Ευχαριστίες

Θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ιωάννη Κομίνη για την επίβλεψη αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον συνεπιβλέπων της εργασίας και δάσκαλό μου καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σιέττο για την πολύτιμη και ουσιαστική καθοδήγησή του όλον αυτόν τον καιρό. Τον ευχαριστώ διότι με εμφύσησε στον μαγικό κλάδο της μη-γραμμικής δυναμικής, με καθοδήγησε κατά την συγγραφή της πρώτης μου ερευνητικής δημοσίευσης και μου δίδαξε πολύτιμα μαθήματα τα οποία θα με συνοδεύουν στην μετέπειτα πορεία μου.

Ευχαριστώ επίσης και τον καθηγητή κ. Ευστάθιο Θεοτόκογλου για την συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου. Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές στο ΕΜΠ, θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τον καθηγητή του τομέα Μηχανικής της ΣΕΜΦΕ κ. Αντώνιο Γιαννακόπουλο, για την προσοχή που έδειξε στο πρόσωπό μου και τις συμβουλές που μου έδωσε καθόλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον θα ήθελα να αναφερθώ στους αγαπητούς συμφοιτητές με τους οποίους συμπορευτήκαμε αυτά τα δύο χρόνια στο ΕΜΠ, τους Γιώργο Αναγνώστου, Γιάννη Ηλιάδη, Στέφανο Νικολόπουλο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Γάλλο τους οποίους εκτιμώ ιδιαίτερα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Θεοδώρα και Σπύρο, τον αδερφό μου Στάθη καθώς και όλους τους φίλους μου για την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Αθήνα, Ιούνιος 2019  
Κατιάνα Κοντολάτη



# Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract	iii
Ευχαριστίες	v
Περιεχόμενα	viii
Κατάλογος Σχημάτων	xiii
Κατάλογος Πινάκων	xv
<b>1 Εισαγωγή</b>	<b>1</b>
1.1 Στόχοι της Εργασίας και Σημασία του Προβλήματος . . . . .	3
1.2 Διάρθρωση της Μεταπτυχιακής Εργασίας . . . . .	4
<b>2 Βλαστικά κύτταρα: Χαρακτηριστικά και Εφαρμογές</b>	<b>5</b>
2.1 Τι είναι τα βλαστικά κύτταρα . . . . .	5
2.1.1 Σημασία και εφαρμογές στην αναγεννητική ιατρική . . . . .	7
2.2 Κατηγορίες βλαστικών κυττάρων . . . . .	8
2.2.1 Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) . . . . .	8
2.2.2 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs) . . . . .	9
2.2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα εμβρυϊκών και ενήλικων βλαστικών κυττάρων . . . . .	10
2.2.4 Επαγωγικά πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) . . . . .	11
2.3 Μεσεγχυματικά στρωματικά/βλαστικά κύτταρα . . . . .	12
2.4 Κυτταρική καλλιέργεια και μηχανισμοί διαφοροποίησης . . . . .	16
2.4.1 Εξωκυττάρια μήτρα (ECM): Δομή και λειτουργία . . . . .	16
2.4.2 Δυσχαμψία, εστιακή προσκόλληση και μηχανική μεταγωγή . . . . .	18
2.4.3 Γονιδιακή έκφραση και μεταγραφικοί παράγοντες . . . . .	19
<b>3 Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα</b>	<b>23</b>
3.1 Μοντελοποίηση και ανάλυση . . . . .	23

3.1.1	Λογικά δίκτυα . . . . .	24
3.1.2	Συνεχή δίκτυα . . . . .	26
3.1.3	Στοχαστικά δίκτυα . . . . .	31
3.1.4	Σύγκριση μεθόδων μοντελοποίησης . . . . .	32
<b>4</b>	<b>Μη-Γραμμική Δυναμική</b>	<b>35</b>
4.1	Δυναμικά συστήματα και βασικές έννοιες . . . . .	35
4.2	Μη-Γραμμικές Διαφορικές Εξισώσεις . . . . .	36
4.2.1	Τοπολογική ισοδυναμία δυναμικών συστημάτων . . . . .	37
4.2.2	Υπερβολικά σημεία ισορροπίας . . . . .	38
4.2.3	Γραμμικοποίηση και ευστάθεια . . . . .	40
4.2.4	Τοπικές διακλαδώσεις (Local bifurcations) . . . . .	44
4.2.5	Διακλαδώσεις οριακών κύκλων και καθολικές διακλαδώσεις (Global bifurcations) . . . . .	49
4.2.6	Διαφορικές εξισώσεις χρονοκαθυστέρησης (Time-delay) . . . . .	53
4.3	Εφαρμογές . . . . .	55
<b>5</b>	<b>Αριθμητικές μέθοδοι</b>	<b>59</b>
5.1	Εισαγωγή . . . . .	59
5.2	Μέθοδος Newton-Raphson . . . . .	60
5.3	Φυσικός βηματισμός σε παράμετρο (Natural continuation) . . . . .	61
5.4	Βηματισμός σε παράμετρο με μήκος τόξου (Arc-length continuation) . . . . .	62
5.5	Βηματισμός σε παράμετρο για την ανίχνευση κλάδων οριακών κύκλων (Limit cycle continuation) . . . . .	63
<b>6</b>	<b>Μοντελοποίηση και ανάλυση της διαφοροποίησης των MSCs</b>	<b>67</b>
6.1	Ανασκόπηση . . . . .	67
6.2	Περιγραφή μοντέλου . . . . .	69
6.3	Αριθμητική ανάλυση ευστάθειας και διακλάδωσης . . . . .	70
6.3.1	Κατασκευή μονοδιάστατου μοντέλου . . . . .	70
6.3.2	Μονοπαραμετρική ανάλυση - περιοχές μηχανικής μνήμης . . . . .	73
6.3.3	Μη-γραμμικές ταλαντώσεις . . . . .	76
6.3.4	Ομοκλινικές διακλαδώσεις . . . . .	81
6.3.5	Διπαραμετρική ανάλυση . . . . .	84
<b>7</b>	<b>Επίλογος</b>	<b>87</b>
7.1	Συμπεράσματα . . . . .	87
7.2	Μελλοντικές επεκτάσεις . . . . .	89

# Κατάλογος Σχημάτων

2.1	Σχηματική απεικόνιση της ικανότητας αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων [84]. . . . .	6
2.2	Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών της α) ασύμμετρης και της β) συμμετρικής διαίρεσης των βλαστικών κυττάρων [84]. . . . .	6
2.3	Παραγωγή της κυτταρικής σειράς H9 (in vitro). (A) Βλαστικά κύτταρα παραγόμενα από την εσωτερική μάζα βλαστοκύστης, καλλιεργούμενα σε υπόστρωμα εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού για 8 ημέρες (κλίμακα 100μm). (B) H9 αποικία (κλίμακα 100μm) (C) Κύτταρα σειράς H9 (κλίμακα 50μm) (D) Διαφοροποιημένα κύτταρα H9, καλλιεργημένα για 5 ημέρες απουσία εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού αλλά παρουσιά ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor, LIF) (20 ng/ml; Sigma) (κλίμακα 100μm) (Thomson et al. 1998 [109]). . . . .	9
2.4	Σχηματική απεικόνιση των βασικών ειδών βλαστικών κυττάρων με βάση την πηγή προέλευσης αυτών. Η καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε αυτο-ανανέωση (self-renewal) και διαφοροποίηση (differentiation) σε κάθε είδος κυττάρου (στο ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα). Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και από τα σωματικά βλαστικά κύτταρα, η δυνατότητα διαφοροποίησης εναλλακτικών γενεαλογιών (lineages) των οποίων, είναι πιο περιορισμένη (O'Connor et al. 2006 [71]). . . . .	11
2.5	Σχηματική απεικόνιση της ικανότητας των μεσεγχυματικών στρωματικών/βλαστικών κυττάρων MSCs να αυτο-ανανεώνονται (καμπύλο τόξο) και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδέρματος (συνεχή τόξα). Η ικανότητα δια-διαφοροποίησης (transdifferentiation) σε κύτταρα εξω-δέρματος και ενδο-δέρματος απεικονίζεται με τα διακεκομμένα τόξα (Uccelli et al. 2008 [111]). . . . .	13
2.6	Ενήλικες και εμβρυϊκές / νεογνικές πηγές ιστών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων στο σώμα. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν από διάφορες πηγές ιστού του ενήλικα, αλλά οι εμβρυϊκοί και νεογνικοί ιστοί που σχετίζονται με τη γέννηση περιέχουν MSCs σε διαφορετικές ποσοότητες [55]. . . . .	14

- 2.7 Απεικόνιση της μακρομοριακής οργάνωσης της εξωκυττάριας μήτρας. Οι εικονιζόμενες πρωτεΐνες (φιμπρονεκτίνες, κολλαγόνα, λαμινίνες), αποτελούνται από σημεία πρόσδεσης για την μεταξύ τους ένωση και επικοινωνία, αλλά και για την ένωση με τις ιντεγκρίνες. Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούν μεγάλα συμπλέγματα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών τα οποία καταλαμβάνουν σημαντικό μέρος του όγκου της εξωκυττάριας μήτρας [49]. . . . . 17
- 2.8 Η δυσκαμψία της εξωκυττάριας μήτρας και η γεωμετρία του κύτταρου ως παράγοντες της διαφοροποίησης των MSCs σε νευρώνες, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα και οστεοκύτταρα. **α)** Αύξηση της δυσκαμψίας του υποστρώματος οδηγεί σε διαφοροποίηση ως προς κυτταρικούς τύπους που εμφανίζονται σε πιο δύσκαμπτους ιστούς. **β)** Εύκαμπτοι ιστοί ή ιστοί που εμποδίζουν την εξάπλωση του κυττάρου, αναγκάζουν την παραμονή των μεταγραφικών παραγόντων YAP/TAZ στο κυτταρόπλασμα και οδηγούν σε λιπογενή διαφοροποίηση. Αντίθετα, σε δύσκαμπτα υποστρώματα ή εκείνα που οδηγούν στην εξάπλωση του κυττάρου πάνω σε αυτό, οι παράγοντες YAP/TAZ οδηγούνται στον πυρήνα και έτσι επιτυγχάνεται οστεογενής διαφοροποίηση [18]. . . . . 19
- 2.9 Η μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων σε έναν οργανισμό μπορεί να εξαρτάται από την δραστηριότητα των ρυθμιστικών παραγόντων σε κάθε κύτταρο. Διαφορετικοί TFs μπορούν να ενεργοποιηθούν σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια διαδοχικών γενεών κυττάρων. Καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν και περνούν από διαφορετικά στάδια (βέλη), οι TFs (χρωματιστές μπάλες) μπορούν να επιδρούν στην έκφραση γονιδίων και να αλλάξουν το κύτταρο με διαφορετικούς τρόπους. Αυτή η αλλαγή επηρεάζει την επόμενη γενιά κυττάρων που προέρχονται από αυτό το κύτταρο. Στις επόμενες γενιές, είναι ο συνδυασμός διαφορετικών παραγόντων μεταγραφής που καθορίζουν τελικά τον κυτταρικό τύπο (2010 Nature Education). . . . . 21
- 3.1 Σέ ένα δίκτυο Boolean κάθε μία από τις ποσότητες  $a$ ,  $b$  και  $c$  μπορεί να βρίσκονται σε κατάσταση 0 ή 1. Οι μεταβολές (transitions) βασίζονται στις ρυθμιστικές συναρτήσεις στα δεξιά, οι οποίες περιγράφουν τους κανόνες λειτουργίας του μοντέλου. Για παράδειγμα, αν το  $a$  είναι στην κατάσταση 1 και το  $c$  στην 0, στο επόμενο χρονικό βήμα η κατάσταση του  $b$  θα είναι 0. Τα λεπτά βέλη υποδεικνύουν τους ρυθμιστές κάθε κόμβου. Τα χρονικά βήματα αναπαριστώνται από τα έντονα βέλη. Η καθολική κατάσταση του μοντέλου (global state) καθορίζεται από τον συνδυασμό των τριών επιμέρους καταστάσεων. Το σύστημα ανακυκλώνεται μέσω των έξι συνολικά διαφορετικών global states. Μία συγκεκριμένη ακολουθία global states κατά την οποία η μία διαδέχεται την άλλη ονομάζεται τροχιά (trajectory) Karlebach et al., 2008 [48]. . . . . 25
- 3.2 Γραφική παράσταση των συναρτήσεων  $a) h^{(1)}(x)$  και  $b) h^{(2)}(x)$  για διάφορες τιμές του  $n$ . Η απόλυτη της τιμή της κλίσης των καμπυλών στο  $x = 1$  αυξάνει ανάλογα με την τιμή του  $n$ . . . . . 29



3.3	Σχηματική αναπαράσταση των ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων γενετικού ρυθμιστικού δικτύου τριών αυθαίρετων γονιδίων (Karlebach et al., 2008 [48]). . . . .	29
3.4	Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της έκφρασης των τριών γονιδίων και σταθεροποίηση αυτών ( $t > 4.5$ ). Τιμές των σταθερών ρυθμού αντίδρασης: $k_{1,s} = k_{2,s} = 2$ , $k_{3,s} = 15$ , $k_{1,d} = k_{2,d} = k_{3,d} = 1$ , $k_{2,1} = k_{3,1} = k_{3,2} = 1$ και $k_{1,3} = 100$ . Η έκφραση των γονιδίων ξεκινάει από μηδενικές τιμές. [48]. . . . .	30
3.5	Σχηματική σύγκριση των διαφόρων μεθόδων μοντελοποίησης γενετικών ρυθμιστικών δικτύων (Karlebach et al. 2008). . . . .	32
4.1	Χαρακτηριστικές τροχιές ενός συνεχούς στο χρόνο (continuous-time) συστήματος. . . . .	37
4.2	(a) Σάγμα και (b) σάγμα-εστία σε ένα δυναμικό σύστημα στο χώρο $\mathbb{R}^3$ . Τα διανύσματα $\nu_i$ αποτελούν τα ιδιοδιανύσματα των ιδιοτιμών $\lambda_i$ (Kuznetsov 2013). . . . .	39
4.3	Τοπολογική κατηγοριοποίηση υπερβολικών σημείων ισορροπίας γραμμικοποιημένων δυναμικών συστημάτων στο επίπεδο (Kuznetsov 2013). . . . .	43
4.4	Διακλάδωση τύπου σάγματος-κόμβου (saddle-node). . . . .	45
4.5	Διακλάδωση τύπου σάγματος-κόμβου (saddle-node) στο επίπεδο $(\alpha, x)$ . . . . .	46
4.6	Υπερκρίσιμη διακλάδωση Andronov-Hopf. Για $\alpha > 0$ (Εξ. 4.21) εμφανίζεται στο διάγραμμα φάσης ευσταθής οριακός κύκλος ακτίνας $\sqrt{\alpha}$ . . . . .	47
4.7	Υπερκρίσιμη διακλάδωση Andronov-Hopf στο χώρο φάσεων και στον μονο-παραμετρικό χώρο [59]. . . . .	48
4.8	Διακλάδωση οριακών κύκλων τύπου σάγματος-κόμβου (saddle-node bifurcation of cycles) (Strogatz, 1994). . . . .	50
4.9	Διακλάδωση άπειρης περιόδου (Infinite-period bifurcation) (Strogatz, 1994). . . . .	51
4.10	Ομοκλινική διακλάδωση (homoclinic bifurcation). Ο οριακός κύκλος στο διάγραμμα φάσης πλησιάζει ένα σαγματικό σημείο ισορροπίας με το οποίο ενώνεται όταν η παράμετρος πάρει την κρίσιμη τιμή της και μία ομοκλινική τροχιά δημιουργείται. Για τιμές της παραμέτρου μικρότερες της κρίσιμης η σύνδεση αυτή σπάει και η κλειστή τροχιά καταστρέφεται. . . . .	52
4.11	Ταλάντωση και οριακός κύκλος της Εξ. 4.28 για τιμές των παραμέτρου $\beta = 2$ , $\theta = 1$ , $\gamma = 1$ , $m = 10$ και $\tau = 2$ (Beuter et al., 2003). . . . .	54
4.12	Χαοτική χρονοσειρά και ελκυστής της Εξ. 4.29 για τιμές των παραμέτρου $\beta = 2$ , $\theta = 1$ , $\gamma = 1$ , $m = 10$ και $\tau = 2$ (Beuter et al., 2003). . . . .	55
5.1	Περίπτωση συνάρτησης κατά την οποία η μέθοδος Newton-Raphson αποτυγχάνει να συγκλίνει [58]. . . . .	61
5.2	Αδυναμία σύγκλισης της μεθόδου φυσικού βηματισμού σε παράμετρο κοντά σε οριακά σημεία. . . . .	62
5.3	Βηματισμός σε παράμετρο με μήκος τόξου (Arc-length continuation) [13]. . . . .	64

- 6.1 Μονοπαραμετρικά διαγράμματα διακλάδωσης του μοντελου διαφοροποίησης. **(a)** Επίπεδα συγκέντρωσης των ρυθμιστών YAP/TAZ. **(b)** Επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. **(c-f)** Επίπεδα συγκεντρώσεως των γονιδίων TUBB3, PPARG, MYOD1 και RUNX2 αντίστοιχα. Η παράμετρος διακλάδωσης (οριζόντιος άξονας) αντιστοιχεί στην δυσκαμψία του υποστρώματος. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στους κλάδους ευσταθούς ισορροπίας ενώ οι διακεκομμένες στους κλάδους ασταθούς ισορροπίας. Οι κλάδοι οι οποίοι δεν απεικονίζονται στα **(c-f)** αντιστοιχούν σε τιμές των ρυθμιστικών παραγόντων YAP/TAZ από  $10^{-7}$  έως  $10^{-3}$  (π.χ. υπο-διάγραμμα στο Σχ. 6.1**(e)**). . . . . 75
- 6.2 Μονοπαραμετρικά διαγράμματα διακλάδωσης ως προς την παράμετρο  $k_2$ . **(a)** Επίπεδα συγκέντρωσης των ρυθμιστών YAP/TAZ. **(b)** Επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. **(c-f)** Επίπεδα συγκεντρώσεως των γονιδίων TUBB3, PPARG, MYOD1 και RUNX2 αντίστοιχα. Η παράμετρος διακλάδωσης (οριζόντιος άξονας) αντιστοιχεί στην παράμετρο  $k_2$  που σχετίζεται με τον μηχανισμό θετικής ανα-τροφοδότησης που με βάση τα επίπεδα του γονιδίου PPARG, ενεργοποιεί την επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στους κλάδους ευσταθούς ισορροπίας, οι διακεκομμένες στους κλάδους ασταθούς ισορροπίας και οι χρωματιστοί κύκλοι στο μέγιστο και ελάχιστο πλάτος ταλάντωσης (ευσταθείς οριακοί κύκλοι). . . . . 77
- 6.3 Εξάρτηση των μη-μηδενικών μεταβλητών στους ασταθείς κλάδους ισορροπίας (5) και (7) του Σχήματος 6.2 ( $S = 0.5kPa, k_2 = 2.2$ ). Στον κλάδο (5) μόνο τα SAA, YAP/TAZ και MYOD1 είναι διάφορα του μηδενός, ενώ στους κλάδους (7) μόνο το SAA, YAP/TAZ και RUNX2 είναι διάφορα του μηδενός. **(a)** Κλάδος (5): SAA συναρτήσει του MYOD1, **(b)** Κλάδος (5): MYOD1 συναρτήσει των SAA και YAP/TAZ, **(c)** Κλάδος (7): SAA συναρτήσει του RUNX2, **(d)** Κλάδος (7): RUNX2 συναρτήσει των SAA και YAP/TAZ. Παρουσιάζονται επίσης και οι τιμές των σημείων ισορροπίας. Οι σιγμοειδείς συναρτήσεις δείχνουν γιατί ο αλγόριθμος Newton-Raphson αποτυγχάνει να συγκλίνει σε αυτά όταν οι αρχικές εκτιμήσεις δεν είναι αρκετά κοντά στην ακριβή λύση. . . 80
- 6.4 Γραφική παράσταση του αριστερού μέλους της Εξ. 6.12 συναρτήσει του SAA στο εύρος  $[0 - 8]$  για  $k_2 = 2.2$  και  $S = 500Pa$ . Τα σημεία που απεικονίζονται αντιπροσωπεύουν τις προσεγγιστικές λύσεις της εξίσωσης και έτσι τις τιμές του SAA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικές εκτιμήσεις για την σύγκλιση της μεθόδου Newton-Raphson και για τον αλγόριθμο βηματισμού σε παράμετρο των κλάδων ισορροπίας του Σχήματος 6.2. . . . . 81
- 6.5 Περιοδικά προφίλ της επιφάνειας επαφής κυττάρου-μήτρας, των ρυθμιστών YAP/TAZ και της έκφρασης του γονιδίου PPARG. Τα προφίλ αυτά υπολογίσθηκαν μέσω του αλγορίθμου πεπερασμένων διαφορών για  $k_2 = 3.5$ . . . . . 81

- 6.6 Μονοπαραμετρικά διαγράμματα διακλάδωσης ως προς την παράμετρο  $k_5$ . **(a)** Επίπεδα συγκέντρωσης των ρυθμιστών YAP/TAZ. **(b)** Επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. **(c-f)** Επίπεδα συγκεντρώσεως των γονιδίων TUBB3, PPARG, MYOD1 και RUNX2 αντίστοιχα. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στους κλάδους ευσταθούς ισορροπίας, οι διακεκομμένες στους κλάδους ασταθούς ισορροπίας και οι χρωματιστοί κύκλοι στο μέγιστο και ελάχιστο πλάτος ταλάντωσης (ευσταθείς οριακοί κύκλοι). . . . . 83
- 6.7 Διπαραμετρική ανάλυση των Andronov-Hopf (συνεχείς γραμμές) και ομοκλινικών σημείων διακλάδωσης (διακεκομμένες γραμμές) συναρτήσεως του **(a)**  $k_2$  και  $S$  (βλ. Σχήμα 6.2 ) και **(b)**  $k_5$  και  $S$  (βλ. Σχήμα 6.6 ). Οι περιοχές I, IV αντιστοιχούν σε ευσταθείς οριακούς κύκλους με ασταθής σημεία ισορροπίας εσωτερικά αυτών. Χαρακτηριστικά διαγράμματα φάσης για ( $S = 500Pa$ ,  $k_2 = 6$ ) και ( $S = 500Pa$ ,  $k_5 = 6$ ), αντίστοιχα δίνονται επίσης. Οι περιοχές II,III αντιστοιχούν σε σημεία ευσταθούς ισορροπίας και τα αντίστοιχα διαγράμματα φάσεως δείχνουν ευσταθείς σπείρες για ( $S = 500Pa$ ,  $k_2 = 1.8$ ) και ( $S = 500Pa$ ,  $k_5 = 3$ ), αντίστοιχα. Η περιοχή V η οποία περικυκλώνεται από την διακεκομμένη γραμμή των ομοκλινικών διακλαδώσεων αντιστοιχεί σε μία περιοχή ασταθών σημείων ισορροπίας. Ένα αντίστοιχο διάγραμμα φάσης παρουσιάζεται για ( $S = 300Pa$ ,  $k_5 = 8$ ) (ασταθής σπείρα). . . . . 84



# Κατάλογος Πινάκων

6.1	Ονομαστικές τιμές των παραμέτρων του μοντέλου . . . . .	71
6.2	Σημεία διακλάδωσης του Σχ. 6.1 . . . . .	74
6.3	Σημεία διακλάδωσης του Σχ. 6.2 . . . . .	78
6.4	Σημεία διακλάδωσης του Σχήματος 6.6 . . . . .	82



# Κεφάλαιο 1

## Εισαγωγή

Η κυτταρική διαφοροποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο μετασχηματίζεται μέσω γονιδιακής ρύθμισης σε εξειδικευμένο κυτταρικό τύπο προκειμένου να εκτελέσει μια συγκεκριμένη λειτουργία. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό και την επούλωση ιστών στους ζωντανούς οργανισμούς. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά/στρωματικά κύτταρα (Mesenchymal stem cells ή MSCs) ειδικότερα έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως νευρώνες, λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, μύοκύτταρα και άλλα, ανάλογα με τις μηχανικές ιδιότητες των υποστρωμάτων στα οποία καλλιεργούνται [10, 82].

Η σημασία των MSCs στην αναγεννητική ιατρική είναι αδιαμφισβήτητη καθώς η δυνατότητα διαφοροποίησής τους έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την καταπολέμηση τραυματισμών αλλά και ασθενειών (π.χ. νόσος του Πάρκινσον και καρκίνος). Η δυναμική τους έχει γίνει ιδιαίτερα πολύτιμη στην αναγεννητική ιατρική, κυρίως λόγω του περιορισμένου αριθμού δωρεών για μεταμόσχευση οστού [5]. Απο την άλλη, ανεπιθύμητες αλλαγές στον κυτταρικό τύπο οδηγούν σε ένα πλήθος ασθενειών καθώς και σε μη-ομαλή εμβρυϊκή ανάπτυξη. Έτσι, γίνεται επιτακτική μία πλήρης κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν τα κύτταρα και κατά συνέπεια τους ιστούς να μεταβάλλουν τη δομή και τις ιδιότητές τους (παρουσία μηχανικών ερεθισμάτων) [85].

Τα κύτταρα που καλλιεργούνται με σχετικά εύκαμπτες μήτρες ( $< 1kPa$ ) που εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες με τον εγκεφαλικό ιστό, παρουσιάζουν νευρογενή διαφοροποίηση, σκληρότερες μήτρες που μοιάζουν με μυϊκό ιστό προκαλούν μύογενή διαφοροποίηση και συγκριτικά δύσκαμπτες μήτρες ( $> 10kPa$ ) που προσομοιώνουν κολλαγόνο οστό οδηγούν σε δύσκαμπτους οστεοβλάστες [23]. Ουσιαστικά, τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τις μηχανικές ιδιότητες του υποστρώματος και προσαρμόζονται στο περιβάλλον αυτό με το να αναδιαμορφώνονται και να διαφοροποιούνται [40, 110].

Η προσκόλληση των κυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη μηχανική αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριας μήτρας [24]. Ο αριθμός των χημικών δεσμών και των αλληλεπιδράσεων στην επιφάνεια ενός κυττάρου είναι ανάλογος με τον βαθμό στον οποίο το κύτταρο έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα. Η κυτταρική προσκόλληση είναι πρωταρχικής σημασίας στην παραγωγή ιστών και σε *in vitro* μελέτες η διαδικασία προσομοιώνεται μέσω

υλικών που δρουν ως υποστρώματα και έτσι βοηθούν στη διαδικασία της βιοσύνθεσης. Η στατική *in vitro* κυτταρική προσκόλληση αποτελείται από τρία στάδια: προσάρτηση του κυττάρου στο υπόστρωμα, αύξηση της επιφάνειας επαφής του σώματος του κυττάρου με το υπόστρωμα και σχηματισμός εστιακής προσκόλλησης (Focal adhesion ή FA) [52].

Το υπόστρωμα πάνω στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα είναι ένα δυναμικό δομικό και πολυδύναμο δίκτυο που υφίσταται συνεχώς αναδιαμόρφωση. Γενικά, μπορεί να χαρακτηριστεί από την δυσκαμψία του, δηλαδή την ικανότητά του να αντιστέκεται σε παραμορφώσεις λόγω εφαρμοζόμενων δυνάμεων. Το μέτρο ελαστικότητας ή μέτρο Young (E) σε Pascals (Pa) μπορεί να θεωρηθεί ως μέτρο της δυσκαμψίας και θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για να περιγράψει τις μηχανικές ιδιότητες της ECM. Οι επιδράσεις των φυσικών ιδιοτήτων της εξωκυττάριας μήτρας όπως η δυσκαμψία στον καθορισμό του τελικού κυτταρικού τύπου των MSCs έχουν εξεταστεί πειραματικά από πολλές μελέτες που δείχνουν για παράδειγμα ότι τα κύτταρα που καλλιεργούνται για ένα χρονικό διάστημα σε δύσκαμπτα υποστρώματα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες ακόμη και μετά τη μεταφορά τους σε πιο εύκαμπτα υποστρώματα [117]. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι υπάρχει μια περιοχή μηχανικής μνήμης η οποία σχετίζεται με την οστεογενή διαφοροποίηση.

Τα μαθηματικά μοντέλα μηχανικής μεταγωγής έχουν αναπτυχθεί για να περιγράφουν τους τελικούς κυτταρικούς τύπους των MSCs που οδηγούνται από εξωτερικά μηχανικά ερεθίσματα. Τέτοια μοντέλα ωστόσο δεν επικεντρώνονται στα μηχανικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος στα οποία τα κύτταρα καλλιεργούνται αλλά αντιθέτως σε μία συγκεκριμένη πειραματική παρατήρηση που εμφανίζουν τα MSCs σε υποστρώματα σταθερών μηχανικών παραμέτρων. Πρόσφατα, προτάθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο από τους Peng *et al.* [76] με τη μορφή έξι ODEs για την προσέγγιση της δυναμικής διαφοροποίησης των MSCs σε νευρώνες, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα και οστεοβλάστες και τη σχετική συμπεριφορά αυτών σε ένα συνεχές φάσμα τιμών δυσκαμψίας της εξωκυττάριας μήτρας.

Το μοντέλο έχει τη δυνατότητα να αναπαράγει τη συμπεριφορά των κυττάρων όταν αυτά μεταφέρονται από ένα υπόστρωμα σε ένα άλλο. Επιπλέον, προβλέπει την ύπαρξη περιοχών μηχανικής μνήμης για κάθε έναν από τους τέσσερις πιθανούς τύπους διαφοροποίησης των MSCs και προβλέπει νέους τρόπους με τους οποίους μπορεί να ελεγχθεί η μοίρα των κυττάρων. Γενικά, η γραμμή διαφοροποίησης μπορεί να ελεγχθεί με την αλλαγή τριών παραγόντων: την δυσκαμψία του πρώτου υποστρώματος τη διάρκεια της πρώτης καλλιέργειας και της δυσκαμψία του δεύτερου υποστρώματος. Το μοντέλο προβλέπει πως μια χαμηλότερη δεύτερη τιμή δυσκαμψίας σε σχέση με τη πρώτη οδηγεί σε μεγαλύτερο αριθμό πιθανών γραμμών διαφοροποίησης μέσω των σχετικών γονιδιακών ερεθισμάτων. Επιπλέον, προβλέπει έναν αριθμό αντι-δαισθητικών (counter-intuitive) δυναμικών αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα, υψηλή πρώτη δυσκαμψία σε συνδυασμό με μικρή διάρκεια καλλιέργειας και μικρή δεύτερη δυσκαμψία οδηγεί σε ταχύτερη νευρογενή διέγερση και αντίστοιχα διαφοροποίηση από ότι θα είχαμε με ένα δεύτερο υπόστρωμα μικρής δυσκαμψίας. Ωστόσο, όταν οι τιμές της πρώτης και της δεύτερης δυσκαμψίας είναι σχετικά κοντά, η συμπεριφορά είναι η ίδια ακόμα και αν η διάρκεια της πρώτης καλλιέργειας είναι μεγάλη. Τέλος, μπορεί κανείς να κρατήσει τόσο η τιμή της πρώτης όσο και της δεύτερης δυσκαμψίας του υποστρώματος σταθερή και να μεταβάλλει τη



διάρκεια της πρώτης καλλιέργειας για να δει πως μπορούν να εμφανισθούν διαφορετικές γραμμές διαφοροποίησης. Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν αποκαλύψει κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά που εμφανίζουν τα μεσεγγυματικά βλαστικά κύττατα κατά την διαφοροποίησή τους σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων, ωστόσο περιορίζονται στην εμφάνιση και κατανόηση των λύσεων μόνιμης κατάστασης-ισορροπίας του μοντέλου.

## 1.1 Στόχοι της Εργασίας και Σημασία του Προβλήματος

Η παρουσία βιοχημικών ταλαντωτών στη φύση είναι γνωστή και έχει μελετηθεί εκτεταμένα (καρδιακοί ρυθμοί, ταλαντώσεις νευρώνων, πληθυσμιακοί κύκλοι κ.α.) τόσο σε μακροσκοπική όσο και σε μικροσκοπική κλίμακα (κυτταρικό επίπεδο) μέσω μαθηματικής μοντελοποίησης και ανάλυσης [101]. Ωστόσο η ύπαρξη τέτοιων ταλαντώσεων σε μοντέλα διαφοροποίησης μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων και η πιθανή συσχέτιση τους στον προσδιορισμό του τελικού κυτταρικού τύπου δεν έχει διερευνηθεί έως τώρα. Εκτός λοιπόν από τις καταστάσεις ισορροπίας που προβλέπει το μοντέλο, όπως συζητήσαμε ήδη παραπάνω, ενδιαφέρον θα αποτελούσε η αναζήτηση τέτοιων λύσεων συσχετιζόμενων με τη συγκέντρωση των γονιδίων καθώς και την επιφάνεια και δύναμη προσκόλλησης των κυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα, όπως αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει [92, 94, 120, 44, 112]. Μία τέτοια διερεύνηση θα συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση των μεταβατικών φάσεων στις οποίες υπόκεινται τα κύτταρα κατά τη διαφοροποίησή τους και στις γενικότερες μορφές απόκρισής τους απέναντι στα μηχανικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος καλλιέργειας (δυσκαμψία). Η εμφάνιση τέτοιων λύσεων μέσω της δυναμικής ανάλυσης μαθηματικού μοντέλου δείχνει την αποτελεσματικότητα της προσέγγισης αυτής στην αναπαράσταση πειραματικών παρατηρήσεων. Τέτοια πειράματα θεωρούνται συχνά αδύνατον να διεξαχθούν λόγω του μεγάλου κόστους ή/και τεχνογνωσίας.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιούμε τα εργαλεία της αριθμητικής ανάλυσης διακλάδωσης και διερευνούμε συστηματικά τη δυναμική του μοντέλου που προτείνεται στην εργασία των Peng *et al.* [76] στον μονο-διάστατο και δι-διάστατο παραμετρικό χώρο. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην απόκριση και συμπεριφορά των κυττάρων κάτω από διαφορετικές μηχανικές συνθήκες του εξωκυτταρικού υποστρώματος και στόχος είναι ο καθορισμός ενός εύρους τιμών δυσκαμψίας για τις οποίες εμφανίζονται περιοδικές λύσεις στο μοντέλο. Επίσης διερευνάται η απόκριση του συστήματος κάτω από μεταβολές και σε άλλες παραμέτρους-κλειδιά του μοντέλου. Με τον τρόπο αυτό, προβλέπουμε την εμφάνιση ταλαντώσεων λόγω της ύπαρξης διακλαδώσεων τύπου Andronov-Hopf και της απότομης διατάραξής τους με την εμφάνιση ομοκλινικών διακλαδώσεων στην επιφάνεια προσκόλλησης κυττάρου-υποστρώματος και στα επίπεδα συγκέντρωσης γονιδίων κατά τη διαφοροποίησή. Οι ταλαντώσεις και οι ομοκλινικές διακλαδώσεις που βρέθηκαν εμφανίζονται σε σχετικά μαλακά υποστρώματα ( $< 1$  kPa), και κατ' επέκταση σχετίζονται με την διαφοροποίηση των MSCs σε νευρώνες και λιποκύτταρα.

## 1.2 Διάρθρωση της Μεταπτυχιακής Εργασίας

Η εργασία αυτή είναι οργανωμένη σε επτά κεφάλαια: Στο Κεφάλαιο 2 δίνεται το θεωρητικό υπόβαθρο και οι βασικές έννοιες που σχετίζονται με την εργασία. Αρχικά περιγράφονται τα γενικά χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων και οι εφαρμογές αυτών στην αναγεννητική ιατρική ενώ στη συνέχεια γίνεται μία παρουσίαση των ιδιοτήτων, των λειτουργιών και των δυνατοτήτων των μεσεγχυματικών στρωματικών/βλαστικών κυττάρων. Στο Κεφάλαιο 3 παρουσιάζονται οι τρεις βασικές μέθοδοι μοντελοποίησης γενετικών ρυθμιστικών δικτύων, τα λογικά, συνεχή και στοχαστικά δίκτυα. Στο Κεφάλαιο 4 παρουσιάζονται οι βασικές έννοιες της μη-γραμμικής δυναμικής και της θεωρίας διακλάδωσης ενώ στο Κεφάλαιο 5 οι αριθμητικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την ανάλυση του μοντέλου. Στο Κεφάλαιο 6 αρχικά περιγράφονται οι σχετικές με το θέμα εργασίες και στη συνέχεια δίνεται ο στόχος της συγκεκριμένης εργασίας. Έπειτα παρουσιάζεται το μαθηματικό μοντέλο για τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών στρωματικών/κυττάρων και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αριθμητικής ανάλυσης διακλάδωσης. Τέλος, στο Κεφάλαιο 7 παρουσιάζεται η συνεισφορά της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, καθώς και δίνονται προτάσεις για μελλοντικές επεκτάσεις.

## Κεφάλαιο 2

# Βλαστικά κύτταρα: Χαρακτηριστικά και Εφαρμογές

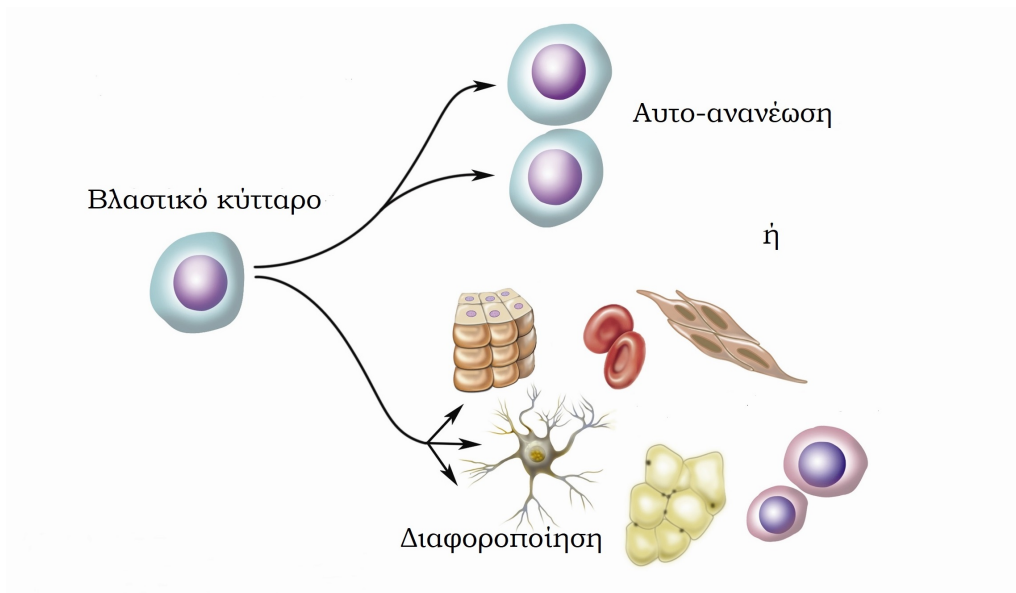
Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι βασικές αρχές και λειτουργίες των βλαστικών κυττάρων καθώς και η περιγραφή των μηχανισμών διαφοροποίησης οι οποίες χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ενός πλήθους ασθενειών.

### 2.1 Τι είναι τα βλαστικά κύτταρα

Κάθε ζωντανός οργανισμός αποτελείται από ένα σύνολο εξειδικευμένων κυττάρων, τα οποία συγκροτούν τους ιστούς και κατ' επέκταση τα όργανα. Από που όμως προέρχονται τα κύτταρα αυτά και πως αποχτούν την εκάστοτε εξειδίκευσή τους; Η απάντηση βρίσκεται στα βλαστικά κύτταρα, τα οποία ανακαλύφθηκαν από τους Καναδούς ερευνητές Ernest McCulloch και James Till το 1963 [4]. Με τον όρο **στελεχιαία** ή **βλαστικά κύτταρα** χαρακτηρίζονται τα αρχέγονα κύτταρα του οργανισμού τα οποία ως δομικοί λίθοι συνθέτουν όλους τους ιστούς του σώματος. Αποτελούν μη-εξειδικευμένα κύτταρα, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης (self-renewal capacity /proliferation) παράγοντας πληθυσμό πανομοιότυπων βλαστικών κυττάρων, ακόμα και μετά από μεγάλες περιόδους αδράνειας. Επιπλέον, διαθέτουν την ικανότητα διαφοροποίησης (differentiation), παράγοντας εξειδικευμένα κύτταρα (νευρώνες, μυοκύτταρα, λιποκύτταρα κ.α.<sup>1</sup>) κάτω από συγκεκριμένες φυσιολογικές (in vivo) ή πειραματικές συνθήκες (ex vivo) [116, 72] (βλ. Σχήμα 2.1). Η φυσική τους αυτή ιδιότητα τα ξεχωρίζει από όλα τα άλλα είδη κυττάρων έμβιων οργανισμών τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν αποκλειστικά ομοειδή κύτταρα (πολλαπλασιασμός). Ουσιαστικά, τα βλαστικά κύτταρα είναι απαραίτητα αφενός για την φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των οργανισμών και αφετέρου για την ικανότητα τους να δρουν ως μία εφεδρική πηγή για τη θεραπευτική ανανέωση κατεστραμμένων ιστών και οργάνων [74].

---

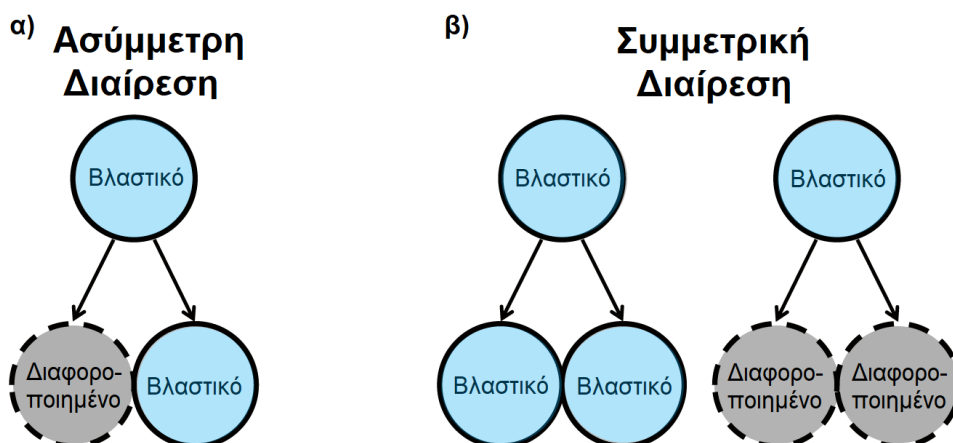
<sup>1</sup>Ορισμένα βλαστικά κύτταρα μπορούν να αναπαράγουν εξειδικευμένα κύτταρα κάθε είδους. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 220 είδη κυττάρων, το καθένα με διαφορετική μορφή και λειτουργία.



Σχήμα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της ικανότητας αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων [84].

Οι δύο μηχανισμοί με τους οποίους τα βλαστικά κύτταρα αυτο-ανανεώνονται και διαφοροποιούνται είναι:

- η **ασύμμετρη διαίρεση** (asymmetric stem cell division), κατά την οποία ένα βλαστικό κύτταρο διαιρείται σε ένα πανομοιότυπο με το αρχικό και σε ένα το οποίο διαφοροποιείται και
- η **συμμετρική διαίρεση** (symmetric stem cell division), κατά την οποία ένα βλαστικό κύτταρο παράγει είτε δύο διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα είτε υφίσταται μίτωση και παράγει δύο πανομοιότυπα με το αρχικό βλαστικά κύτταρο (Morrison et al. 2006 [69])



Σχήμα 2.2: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών της α) ασύμμετρης και της β) συμμετρικής διαίρεσης των βλαστικών κυττάρων [84].

### 2.1.1 Σημασία και εφαρμογές στην αναγεννητική ιατρική

Η σημασία των βλαστικών κυττάρων στη δημιουργία και λειτουργία ζωντανών οργανισμών είναι αδιαμφισβήτητη. Κατά την τρίτη με πέμπτη μέρα ζωής ενός εμβρύου, η λεγόμενη **βλαστοκύστη**, αποτελείται από ένα σύνολο βλαστικών κυττάρων τα οποία θα δώσουν τη μορφή και λειτουργία στους μεταγενέστερους και εξειδικευμένους τύπους κυττάρων και κατ'επέκταση οργάνων όπως την καρδιά, τους πνευμόνες, το δέρμα και τους υπόλοιπους ιστούς. Επιπλέον, σε ορισμένους ιστούς ενηλίκων, όπως τον μυελό των οστών, τους μύες και τον εγκέφαλο, διακριτοί πληθυσμοί ενηλίκων βλαστικών κυττάρων αντικαθιστούν εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία χάνονται μέσω φυσιολογικής απώλειας ή και ασθένειας /τραυματισμού.

Δεδομένων των αναγεννητικών τους ιδιοτήτων, τα βλαστικά κύτταρα προσφέρουν νέες δυνατότητες για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο διαβήτης, ορισμένοι τύποι καρκίνων αλλά και καρδιοπάθειες. Πολλές ασθένειες, όπως για παράδειγμα η νόσος του Πάρκινσον, είναι αποτέλεσμα του θανάτου ή της δυσλειτουργίας ορισμένων τύπων κυττάρων στον οργανισμό. Η αντικατάσταση επομένως αυτών των κυττάρων από παραγόμενα υγιή μπορεί να προσφέρει δυνητικά άμεση θεραπεία. Για τον σκοπό αυτό απαραίτητη καθίσταται η ανάπτυξη στρατηγικών για την καταπολέμηση της ανοσολογικής απόρριψης των μεταμοσχευμένων κυττάρων από τον οργανισμό (φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στην περίπτωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων). Δύο πιθανές τέτοιες μέθοδοι αποτελούν η δημιουργία τραπεζών βλαστικών κυττάρων με καλά καθορισμένο ιστορικό συμβατότητας και η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων κυττάρων για ελαχιστοποίηση του φαινομένου της απόρριψης.

Εργαστηριακές έρευνες των τελευταίων δεκαετιών, έχουν φέρει στο φως πληροφορίες για τις εξαιρετικής σημασίας ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων οι οποίες τα διαφοροποιεί από τα υπόλοιπα είδη. Μερικές από τις χρήσεις αυτών στο εργαστήριο αφορούν στη παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας νέων φαρμάκων και στην δημιουργία μοντέλων-συστημάτων για την μελέτη της φυσιολογικής ανάπτυξης οργανισμών αλλά και των αιτιών που προκαλούν γενετικές ανωμαλίες. Μερικούς από τους τομείς στους οποίους η θεραπεία με βλαστικά κύτταρα έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία είναι η Ορθοπαιδική, η Γυναικολογία, η Ρευματολογία, η Πλαστική Χειρουργική, η Γαστρεντερολογία και η Οφθαλμολογία [12, 77, 64, 90, 79, 62].

Οι έρευνες που αφορούν στη μελέτη βλαστικών κυττάρων, συνεισφέρουν στην κατανόηση της διαδικασίας δημιουργίας και εξέλιξης οργανισμών ξεκινώντας από μεμονωμένα κύτταρα αλλά και στην σταδιακή διαδικασία αντικατάστασης ιστών από υγιή κύτταρα σε οργανισμούς ενηλίκων. Η μελέτη βλαστοκυττάρων αποτελεί μία από τις πιο ενδιαφέρουσες περιοχές έρευνας της σύγχρονης βιολογίας, και έχει εγείρει πολλές ανακαλύψεις αλλά και αναπάντητα ακόμα ερωτήματα. Εκτός από σημαντικό τομέας της επιστήμης της βιολογίας, η μελέτη βλαστοκυττάρων αποτελεί πλέον και σημαντικό πεδίο έρευνας των εφαρμοσμένων μαθηματικών και της (εμβιο-) μηχανικής, μέσω (μεταξύ άλλων) της ανάλυσης της δυναμικής αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης (γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα) αλλά και της μηχανικής συμπεριφοράς της προσκόλλησης των βλαστοκυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα (βλ. Κεφάλαιο 3).

## 2.2 Κατηγορίες βλαστικών κυττάρων

Η κατηγοριοποίηση των βλαστοκυττάρων γίνεται κατά κύριο λόγο με κριτήριο την πηγή προέλευσης τους. Έτσι λοιπόν αυτά μπορούν να διαχωρισθούν στα εμβρυϊκά (embryonic stem cells), τα ενήλικα (adult stem cells) και τα επαγωγικά πολυδύναμα (induced pluripotent stem cells). Ένας δεύτερος τρόπος κατηγοριοποίησης αυτών γίνεται με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης τους σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων. Σύμφωνα με αυτή, τα βλαστοκύτταρα χωρίζονται σε α) **παντοδύναμα** (totipotent), β) **ολοδύναμα** (pluripotent), γ) **πολυδύναμα** (multipotent) , δ) **ολιγοδύναμα** (oligopotent) και ε) **μονοδύναμα** (unipotent) με την κάθε κατηγορία να αντιστοιχεί σε ένα αντίστοιχο εύρος πιθανών 'δρόμων-διακλαδώσεων' κυτταρικής διαφοροποίησης. Στη συνέχεια γίνεται μία σύντομη αναφορά στις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των βασικών κατηγοριών βλαστοκυττάρων με βάση την πηγή προέλευσης τους.

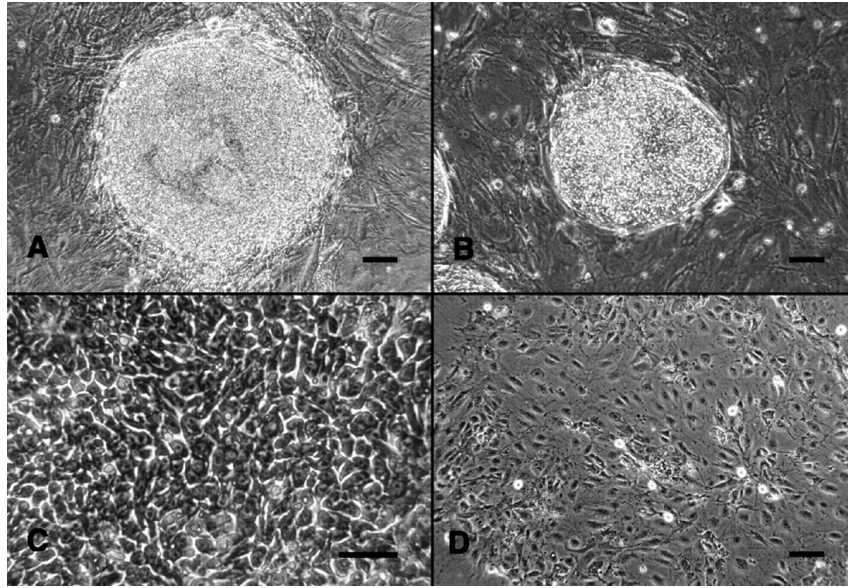
### 2.2.1 Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs)

Τα **εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα** (ESCs) βρίσκονται εσωτερικά του εμβρύου κατά την ανάπτυξη αυτού. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διεργασία κατά την οποία ένα κύτταρο (το ωάριο), γονιμοποιείται και διαιρείται σταδιακά σε δισεκατομμύρια κύτταρα. Όταν το έμβρυο αποτελείται από μονάχα οχτώ κύτταρα, τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε είδος ενώ μετά από τρεις έως πέντε ημέρες το έμβρυο μεταμορφώνεται σε **βλαστοκύστη** η οποία περιλαμβάνει τα 150 περίπου κύτταρα. Η μελέτη των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων καθίσταται εφικτή κυρίως μέσω δωρεών γονιμοποιημένων εμβρύων που έχουν προκύψει από τη διαδικασία της τεχνητής γονιμοποίησης. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι ερευνητές αφαιρούν τα κύτταρα από την βλαστοκύστη και τα καλλιεργούν σε τρυβλίο καλλιέργειας Πέτρι<sup>2</sup>. Καθώς τα κύτταρα διαιρούνται πολλαπλές φορές, οι πληθυσμοί που προκύπτουν τοποθετούνται σε διαφορετικά τρυβλία, μέχρι να προκύψουν εκατομμύρια κύτταρα σε διάστημα μερικών μηνών. Εφόσον τα κύτταρα αυτά συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό τους χωρίς περαιτέρω διαφοροποίηση τότε έχει παραχθεί η λεγόμενη **κυτταρική σειρά** (stem cell line).

Η κυτταρική σειρά μπορεί να αποτελείται από εξειδικευμένα ή μη-εξειδικευμένα (βλαστικά) κύτταρα. Οι κυτταρικές σειρές μπορούν να καταψυχθούν και να μοιραστούν μεταξύ εργαστηρίων για την μελέτη και ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων. Η πρώτη εργαστηριακή απομόνωση ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με την παραγωγή 5 διαφορετικών κυτταρικών σειρών (H1,H7,H9,H13,H14), έγινε απο τους Thomson et al. [109] το 1998 και ουσιαστικά άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων βασισμένες στα βλαστικά κύτταρα. Στο Σχήμα 2.3 παρουσιάζεται η παραγόμενη σειρά H9 από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα καλλιεργούμενα σε υπόστρωμα εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού.

Πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (pluripotent hematopoietic stem cells) μπο-

<sup>2</sup>Το τρυβλίο καλλιέργειας Πέτρι (από τον Γερμανό βακτηριολόγο Julius Richard Petri, 1877) αποτελεί ειδικό γυάλινο ή πλαστικό κυλινδρικό και ρηχό πιάτο επικαλυμμένο με θρεπτικές ουσίες όπως άλατα, υδατάνθρακες και αμινοξέα, που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια μικροοργανισμών στο εργαστήριο.



Σχήμα 2.3: Παραγωγή της κυτταρικής σειράς H9 (in vitro). (A) Βλαστικά κύτταρα παραγόμενα από την εσωτερική μάζα βλαστοκύστης, καλλιεργούμενα σε υπόστρωμα εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού για 8 ημέρες (κλίμακα 100 $\mu$ m). (B) H9 αποικία (κλίμακα 100 $\mu$ m) (C) Κύτταρα σειράς H9 (κλίμακα 50 $\mu$ m) (D) Διαφοροποιημένα κύτταρα H9, καλλιεργημένα για 5 ημέρες απουσία εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού αλλά παρουσιά ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor, LIF) (20 ng/ml; Sigma) (κλίμακα 100 $\mu$ m) (Thomson et al. 1998 [109]).

ρούν επίσης να περισυλλεχθούν από το αίμα του ομφάλιου λώρου και του πλακούντα μετά τον τοκετό με το μειονέκτημα ότι τα κύτταρα αυτά -σε αντίθεση με κύτταρα νωρίτερα κατά την ανάπτυξη του εμβρύου- μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ένα περιορισμένο αριθμό εξειδικευμένων κυττάρων. Σήμερα, η διαδικασία της δωρεάς, αποθήκευσης, συντήρησης και διανομής εμβρυϊκών -και όχι μόνο- βλαστοκυττάρων τηρεί υψηλά και αυστηρά πρότυπα ποιότητας και ασφάλειας.

### 2.2.2 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs)

Τα **ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs)** αποτελούν μη-εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία βρίσκονται μεταξύ άλλων εξειδικευμένων κυττάρων στους ιστούς/όργανα [74]. Η βασική λειτουργία αυτών αφορά στην διατήρηση και στην ανακατασκευή (επούλωση) ιστών. Επιπρόσθετα χρησιμοποιούν επιπλέον και τον όρο **σωματικά βλαστικά κύτταρα**, καθώς αναφέρονται σε κύτταρα του σώματος (και όχι σε γεννητικά κύτταρα). Η έρευνα πάνω στα ενήλικα βλαστοκύτταρα έχει γεννήσει μεγάλο ενθουσιασμό μεταξύ των ερευνητών λόγω της πιθανής τους χρήσης σε μεγάλο αριθμό νοσημάτων, τραυματισμών αλλά και στη καταπολέμηση της γήρανσης των οργανισμών. Μία ιδιαίτερως σημαντική και πολλά υποσχόμενη εφαρμογή των ενήλικων βλαστοκυττάρων αφορά στις μεταμοσχεύσεις οργάνων [86]. Ενήλικα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, από τον μυελό των οστών, χρησιμοποιούνται σε μεταμοσχεύσεις για περισσότερο από 40 χρόνια. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι έρευνες έχουν επιβεβαιώσει

την ύπαρξη αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων σε περιοχές της καρδιάς και του εγκεφάλου <sup>3</sup>. Εφόσον λοιπόν αναπτυχθούν μέθοδοι για την ελεγχόμενη διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων στο εργαστήριο, τα κύτταρα αυτά μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για θεραπείες ασθενειών μέσω μεταμόσχευσης.

Τα ενήλικα βλαστικοκύτταρα βρίσκονται σε ένα πλήθος οργάνων και ιστών, μεταξύ άλλων, στον εγκέφαλο, στο μυελό των οστών, στο περιφερειακό αίμα, στα αιμοφόρα αγγεία, στους σκελετικούς μύες, στο δέρμα, στα δόντια, στη καρδιά, στο έντερο, στο ήπαρ και τις ωοθήκες. Θεωρείται πως υπάρχουν σε μία ειδική περιοχή κάθε ιστού του σώματος (stem cell niche). Σε πολλούς μάλιστα ιστούς, τελευταίες μελέτες υποστηρίζουν, πως κάποια από αυτά τα κύτταρα είναι περικύτταρα τα οποία συνθέτουν το εξωτερικό στρώμα μικρών αιμοφόρων αγγείων. Τα βλαστικά κύτταρα παραμένουν αδρανή (μη-διαφοροποιημένα) για μεγάλο χρονικό διάστημα, έως να ενεργοποιηθούν λόγω της ανάγκης των ιστών να διατηρηθούν ή να απακατασταθούν από τυχόν τραυματισμό ή ασθένεια.

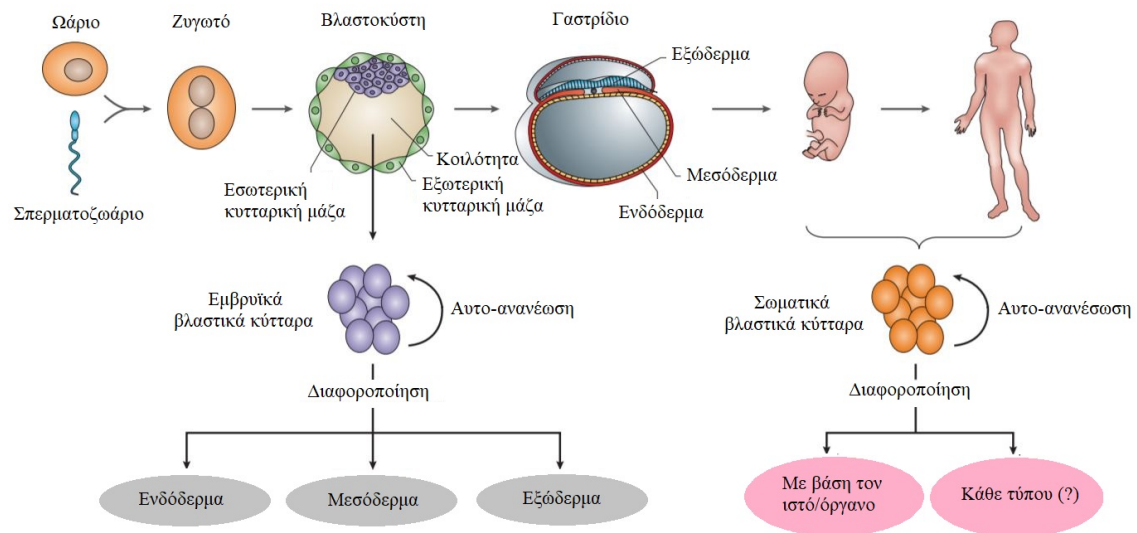
Η έρευνα πάνω σε ενήλικα βλαστοκύτταρα ξεκινάει περίπου πριν από περίπου 60 χρόνια, με την ανακάλυψη δύο ειδών βλαστικών κυττάρων στον μυελό των οστών. Τα πρώτα εκ των δύο, τα λεγόμενα **αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα** είναι ικανά να παράγουν όλους τους τύπους κυττάρων αίματος στο ανθρώπινο σώμα. Ο δεύτερος πληθυσμός, των λεγόμενων **μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων**, ανακαλύφθηκε μερικά χρόνια αργότερα. Τα κύτταρα αυτά περισυλλέγονται κυρίως από το μυελό των οστών ενηλίκων και από λιπώδη ιστό (αν και μπορούν να υπάρξουν αντίστοιχα εμβρυικά (Κεφάλαιο 2.3) ). Χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά για πρώτη φορά ως παράγοντας θεραπείας σε ανθρώπους το 1995 [60] και έκτοτε η χρήση τους έχει εξελιχθεί ως την πιο ευρέως μελετημένη μέθοδο κυτταρικής θεραπείας [31]. Τυπικά, ο αριθμός των κυττάρων αυτών σε κάθε ιστό είναι μικρός και η ικανότητα τους να διαιρούνται μετά την απομάκρυνση τους από το σώμα είναι περιορισμένη, καθιστώντας έτσι την αναπαραγωγή μεγάλων πληθυσμών μία δύσκολη διαδικασία [74]. Μερικά από τα υπόλοιπα είδη ενηλίκων βλαστικών κυττάρων είναι -μεταξύ άλλων- τα ενδοθηλιακά, τα εντερικά, τα νευρικά, τα οσφρητικά, τα μαστικά και τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος.

### 2.2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα εμβρυϊκών και ενηλίκων βλαστικών κυττάρων

Οι δύο προαναφερθείσες κατηγορίες βλαστικών κυττάρων (εμβρυϊκά και ενήλικα), παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης τους σε θεραπείες αναγεννητικής ιατρικής. Η ειδοποιός διαφορά των δύο αυτών κατηγοριών αφορά στην ικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Από τη μία, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα όντας παντοδύναμα, έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε κάθε είδους κύτταρο και από την άλλη, τα ενήλικα μπορούν να μεταβάλλονται σε έναν περιορισμένο αριθμό κυττάρων ανάλογα με το είδος ιστού/οργάνου στο οποίο βρίσκονται (Σχήμα 2.4). Ω-

<sup>3</sup>Η νευρογένεση (neurogenesis) κατά την ενήλικη ζωή του ανθρώπου -δηλαδή η δυνατότητα των νευρικών βλαστικών και προγονικών κυττάρων να παράγουν νέους νευρώνες- αμφισβητούνταν από την επιστημονική κοινότητα, μέχρι την δεκαετία του 1990, όπου αποδείχθηκε πειραματικά η ύπαρξη τους και η δυνατότητα αυτών να ανανεώνονται και να παράγουν αστροκύτταρα και ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα [88, 30].





Σχήμα 2.4: Σχηματική απεικόνιση των βασικών ειδών βλαστικών κυττάρων με βάση την πηγή προέλευσης αυτών. Η καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε αυτο-ανανέωση (self-renewal) και διαφοροποίηση (differentiation) σε κάθε είδος κυττάρου (στο ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα). Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και από τα σωματικά βλαστικά κύτταρα, η δυνατότητα διαφοροποίησης εναλλακτικών γενεαλογιών (lineages) των οποίων, είναι πιο περιορισμένη (O'Connor et al. 2006 [71]).

στόσο, τα βλαστικά κύτταρα ενηλίκων δεν βρίσκονται σε αφθονία στους ώριμους ιστούς και επομένως η απομόνωση αυτών αποτελεί μία απαιτητική διαδικασία. Οι σχετικές θεραπείες με μεταμοσχευση παρόλα αυτά, απαιτούν μεγάλους πληθυσμούς ενηλίκων βλαστοκυττάρων. Από την άλλη, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καλοήθων ή κακοήθων τερατωμάτων και καρκίνου.

Ακόμη μία διαφορά των δύο τύπων κυττάρων, αφορά στην ικανότητα επιβίωσης και απόρριψης αυτών από το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι έως τώρα κλινικές μελέτες πάνω σε μεταμοσχευμένα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ως παράγοντες θεραπείας, δεν έχουν αποφανθεί πλήρως ως προς την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια αυτών, καθώς η απόρριψη τους από το ανοσοποιητικό είναι συχνή [105]. Από την άλλη, ιστοί οι οποίοι έχουν παραχθεί από τα ίδια ενήλικα βλαστικά κύτταρα του ασθενή, είναι περισσότερο αποτελεσματικοί ως μοσχεύματα. Το πλεονέκτημα αυτό, είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς η απόρριψη μοσχεύματος μπορεί να παρακαμφθεί μόνο με συνεχή χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων τα οποία ενίοτε προκαλούν επιβλαβείς παρενέργειες.

#### 2.2.4 Επαγωγικά πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs)

Τα **επαγωγικά πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα** ή **iPSCs** είναι ένας τύπος ο-λοδύναμων (pluripotent) βλαστικών κυττάρων τα οποία παράγονται απευθείας από ενήλικα κύτταρα. Η τεχνολογία αυτή αναπτύχθηκε από τους Takahashi και Yamanaka (βραβείο

Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής 2012) [106]. Ουσιαστικά, η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει την επαναπρογραμματισμό των εκειδικευμένων κυττάρων σε βλαστικά και έτσι την αντιστροφή της διαδικασίας της διαφοροποίησης. Ενώ τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται επίσης από πολυδυναμία, η παραγωγή αυτών συνεπάγεται με χειραγώγηση (ή και καταστροφή) του εμβρύου (προ εμφύτευσης) και επομένως εγείρει ηθικά ζητήματα. Εν αντιθέσει, η παραγωγή επαγωγικών πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων από ιστούς, παρακάμπτει την ανάγκη για έμβρυα και επιπλέον δίνει τη δυνατότητα παραγωγής σειρών βλαστοκυττάρων προσαρμοσμένες στο εκάστοτε άτομο ελαχιστοποιώντας έτσι την πιθανότητα ανοσοποιητικής απόρριψης αλλά και τα προβλήματα σχετικά με την ιστοσυμβατότητα δότη-παράληπτη σε μεταμοσχεύσεις.

Στις μέρες μας η τεχνολογία των iPSCs σε συνδυασμό με την CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated adaptive immune systems) δηλαδή την τεχνική ακριβούς κατάτμησης και τροποποίησης του DNA, θεωρούνται το μέλλον της γενετικής ιατρικής και γενετικής μηχανικής [43]. Μάλιστα οι δύο αυτές τεχνολογίες, χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με σκοπό τη διερεύνηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από κληρονομικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των ανοσολογικών, μεταβολικών, αιματολογικών, νευροεκφυλιστικών και καρδιακών ασθενειών [46, 89].

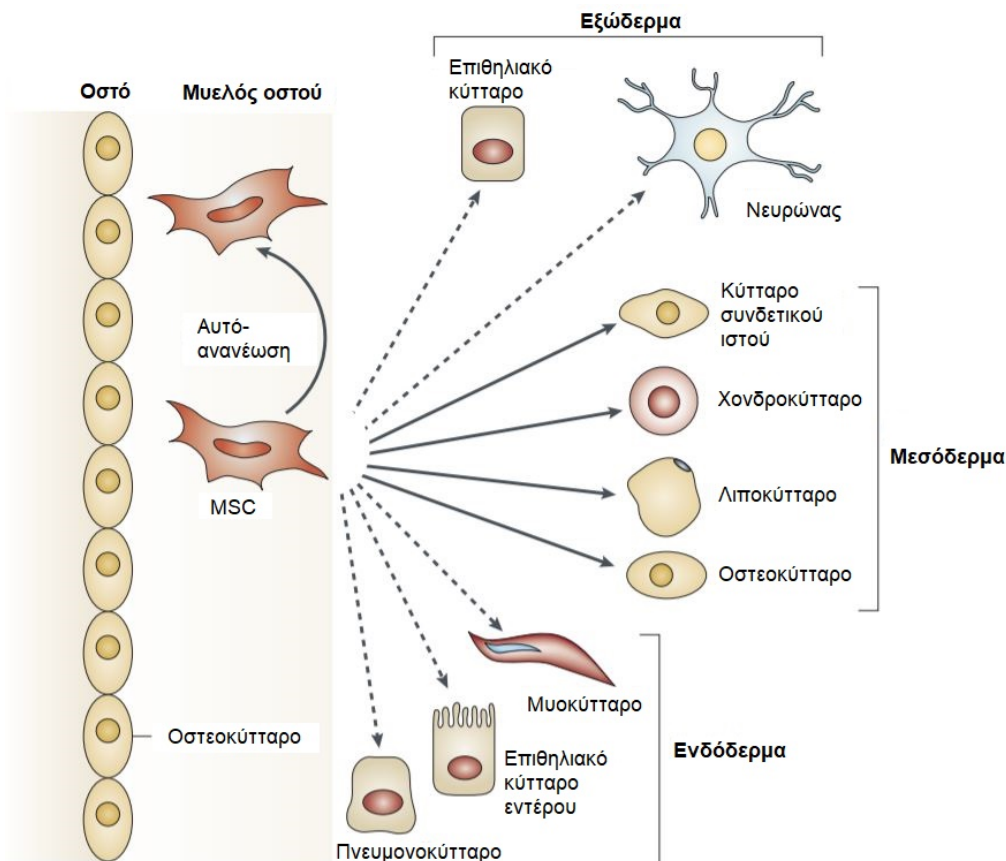
## 2.3 Μεσεγχυματικά στρωματικά/βλαστικά κύτταρα

### Χαρακτηριστικά και ιδιότητες

Η ανακάλυψη και περιγραφή των **μεσεγχυματικών στρωματικών/βλαστικών κυττάρων** έγινε από την ερευνητική ομάδα του Alexander Friedenstein το 1974 [28]. Ο Friedenstein ουσιαστικά κατάφερε να απομονώσει μονοστρωματικά καλλιεργούμενα κύτταρα, από τον μυελό των οστών ινδικών χοιριδίων και ποντικών [27, 29], τα οποία και όρισε ως μονάδα ινοβλαστών για σχηματισμό αποικιών (colony-forming unit fibroblasts ή CFU-Fs). Τα στρωματικά κύτταρα που προέρχονται από CFU-Fs μπορούν να χρησιμεύσουν ως στρώματα τροφοδοσίας για την καλλιέργεια αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSCs) και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα τόσο in vitro όσο και in vivo. Η παρατήρηση αυτή του Friedenstein ήταν η βάση για περαιτέρω μελέτες που έδειξαν ότι τα στρωματικά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών είναι ουσιαστικά πρόγονοι των μεσεγχυματικών ιστών. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά διαθέτουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα μη-συγγενή γενετικά (δια-διαφοροποίηση ή transdifferentiation<sup>4</sup>). Ως αποτέλεσμα της ικανότητάς τους για αυτο-ανανέωση και διαφοροποίηση, χαρακτηρίστηκαν ως βλαστικά και ονομάστηκαν μεσεγχυματικά από τους Caplan et al. 1991 [11]. Εκτός από την δυνατότητα τους για αποκατάσταση ιστών, έχει πλέον αποδειχθεί ότι τα MSCs διαθέτουν και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση [111]. Τα MSCs χαρακτηρίζονται από την έκφραση μορίων όπως CD105 (SH2), CD73, CD44, CD105 και απουσίας αιμοποιητικών δεικτών όπως CD34

<sup>4</sup>Transdifferentiation - το φαινόμενο κατά το οποίο ένα εξειδικευμένο κύτταρο αλλάζει κυτταρικό τύπο. Οι Davis et al. 1987 [16], απέδειξαν το φαινόμενο αυτό με τη μετατροπή ινοβλαστών ποντικού σε μυοκύτταρα (μέσω έκφρασης του γονιδίου MyoD).

και CD45.



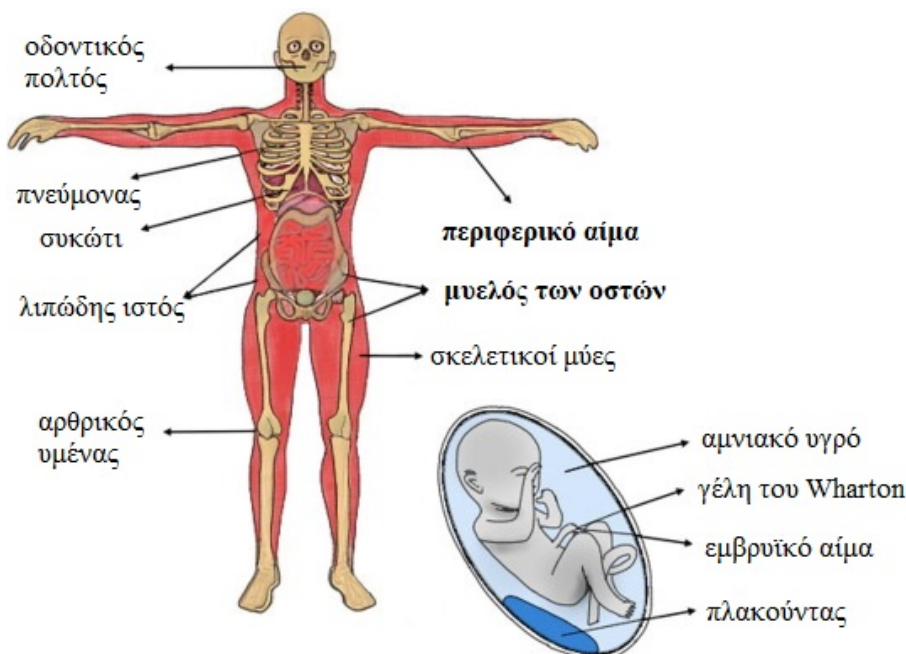
Σχήμα 2.5: Σχηματική απεικόνιση της ικανότητας των μεσεγχυματικών στρωματικών/βλαστικών κυττάρων MSCs να αυτο-ανανεώνονται (καμπύλο τόξο) και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσοδέρματος (συνεχή τόξα). Η ικανότητα δια-διαφοροποίησης (transdifferentiation) σε κύτταρα εξω-δέρματος και ενδο-δέρματος απεικονίζεται με τα διακεκομμένα τόξα (Uccelli et al. 2008 [111]).

Στις μέρες μας ο όρος *στρωματικά* αντί για *βλαστικά* μεσεγχυματικά κύτταρα θεωρείται πιο δόκιμος, καθώς τα κύτταρα αυτά ενώ ικανοποιούν το κριτήριο της διαφοροποίησης, η ικανότητα αυτο-ανανέωσης τους περιορίζεται για αναγέννηση σκελετικών ιστών και όχι για αναγέννηση χόνδρου, λίπους και άλλων ιστών [57, 7].

### Πηγές προέλευσης

Τα MSCs βρίσκονται σε διάφορους ιστούς ενηλίκων συμπεριλαμβανομένου του μυελού των οστών, του λιπώδους ιστού, των εσωτερικών οργάνων και των αιμοφόρων αγγείων αλλά και από άλλες πηγές όπως το αμνιοτικό υγρό, την αμνιοτική μεμβράνη, τον ομφάλιο λώρο ή τον πλακούντα [15] (βλέπε Σχήμα 2.6). Με σκοπό την διάκριση των MSCs από ινοβλάστες και άλλα προσκολλημένα κύτταρα, μια ερευνητική ομάδα πρότεινε τον καθορισμό των MSCs **μυελού οστών** (bone marrow MSCs ή BM-MSCs) με τρία κριτήρια: την έκφραση ενός συνόλου σημάτων στην κυτταρική επιφάνεια, ένα δυναμικό τριπλής διαφοροποίησης (οστεο-

γενής, χονδρογενής και αδιπογενής) και παρόμοια εμφάνιση με ινοβλάστη σε καλλιέργεια in vitro [20]. Υπάρχουν πολλές πειραματικές ενδείξεις ότι MSCs που απομονώνονται από άλλους ιστούς εκτός από τον μυελό των οστών μοιράζονται αυτά τα χαρακτηριστικά και παράγουν μετά από διέγερση οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και άλλα κύτταρα in vitro επίσης [2].



Σχήμα 2.6: Ενήλικες και εμβρυϊκές / νεογνικές πηγές ιστών μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων στο σώμα. Τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν από διάφορες πηγές ιστού του ενήλικα, αλλά οι εμβρυϊκοί και νεογνικοί ιστοί που σχετίζονται με τη γέννηση περιέχουν MSCs σε διαφορετικές ποσότητες [55].

Η διαδικασία της αναρρόφησης μυελού των οστών είναι ιδιαίτερα επεμβατική για τους ασθενείς και συνοδεύεται από κίνδυνο μόλυνσης. Επιπλέον, η περιορισμένη αυτή προσβασιμότητα συνοδεύεται με σχετικά χαμηλή απόδοση της συγκέντρωσης κυττάρων (0,001-0,01%) αλλά και με σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού αυτών σε ηλικιωμένους ανθρώπους [63]. Επομένως, εναλλακτικές πηγές MSCs έχουν μελετηθεί ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες, και τις ικανότητες διαφοροποίησης τους. Η δεύτερη σημαντική πηγή είναι τα βλαστοκύτταρα που προέρχονται από **λιπώδη ιστό** (adipose tissue-derived stem cells ή AT-MSCs). Τα AT-MSCs απομονώνονται από βιολογικά υλικά που παράγονται κατά τη διάρκεια της λιποαναρρόφησης, της λιποπλαστικής ή διαδικασιών λιπομετρίας. Αυτά τα κύτταρα έχουν πολλά κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά με τα BM-MSCs. Αν και η συχνότητα των αποικιών των κυττάρων που λαμβάνονται από τους λιπώδεις ιστούς είναι υψηλότερη από εκείνη του μυελού των οστών, υπάρχει αμφιβολία σχετικά με το αν τα AT-MSCs είναι πραγματικά MSCs, και συχνά ονομάζονται «βλαστικά κύτταρα λιπώδους ιστού» [51]. Οι **εμβρυϊκοί ιστοί** είναι επίσης σημαντικές πηγές για την απομόνωση MSCs. Τα MSCs από εμβρυϊκούς ιστούς έχουν ανώτερες βιολογικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα BM-MSCs [42]. Έχουν επίσης βελτιω-

μένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διάρκεια ζωής και δυναμικό διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα MSCs που προέρχονται από ενήλικους ιστούς. Άλλες πηγές από τις οποίες τα MSCs έχουν απομονωθεί είναι οι αρθρικές μεμβράνες, οι περιοδοντικοί σύνδεσμοι, το αμνιακό υγρό, ο πνευμονικός ιστός, ο ιστός του ήπατος και ο δερματικός ιστός.

### Κυτταρική διασπορά και μετανάστευση

Σε οργανισμούς ενηλίκων και σε έντονη αντίθεση με τα αιμοποιητικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα ή τα σπερματογλοιακά βλαστοκύτταρα, για τα MSCs δεν υπάρχουν αυστηρά κριτήρια σχετικά με τις περιοχές στις οποίες αυτά φαίνεται να διασπείρονται και να μεταναστεύουν (stem cell niche). Ωστόσο φαίνεται να προσκολλώνται καλά στην ινωδονεκτίνη, στα κολλαγόνα και σε άλλες πρωτεΐνες εξωκυτταρικής μήτρας [22]. Απεδείχθη πως μοσχευμένα MSCs εμφανίστηκαν σε διάφορες περιοχές στο σώμα υγιούς παραλήπτη και μόνο μερικά από αυτά στον μυελό των οστών [50]<sup>5</sup>. Μέχρι σήμερα, οι διαφορές μεταξύ της συγκέντρωσης των MSCs στον μυελό των οστών και της ανίχνευσης αυτών σε άλλες περιοχές όπως οι φλέβες του πνεύμονα μετά από ενδοφλέβια ένεση με MSCs δεν είναι πλήρως κατανοητές. Ακόμα, η συνολική αποτελεσματικότητα της επώασης ή της μεταμόσχευσης των MSCs είναι σχετικά χαμηλή, ωστόσο σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός πως μερικά MSCs που εφαρμόζονται με ενδοφλέβια ένεση παρατηρούνται σε σημεία τραυματισμού. Την ίδια στιγμή, η κινητικότητα των MSCs μετά από υποξία ή μετά από τραυματισμό, υποδεικνύει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μεταναστευτικής ικανότητας της MSCs και της τοπικής επιδιόρθωσης του τραύματος. Άλλωστε, μια ισχυρή έλξη των MSCs σε προκαθορισμένα σημεία του σώματος, πιθανώς θα εμπόδιζε την βασική λειτουργία αυτών των πολυδύναμων επιδιορθωτικών κυττάρων και την μετανάστευση τους σε περιοχές του σώματος που ασθενούν ή είναι τραυματισμένες [26].

### Μέθοδοι απομόνωσης και πολλαπλασιασμού

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των MSCs από διαφορετικούς ιστούς. Οι κοινώς εφαρμοζόμενες μέθοδοι για την απομόνωση BM-MSCs ή MSCs που προέρχονται από το αίμα του ομφάλιου λώρου (umbilical cord blood ή UBC-MSCs) χρησιμοποιούν τη μέθοδο της απομόνωσης βαθμιδωτής πυκνότητας (density gradient isolation) ή τη μέθοδο της άμεσης επίστρωσης για διαχωρισμό των μεσεγγυματικών από τα αιματοποιητικά κύτταρα ανάλογα με την πρόσφυσή τους στην πλαστική επιφάνεια. Η πυκνότητα των κυττάρων κατά την καλλιέργεια είναι πολύ σημαντική για την επιτυχή επέκταση του πληθυσμού των MSCs. Πυκνότητες επίστρωσης των  $4 - 22 \times 10^3$  μονοπύρηνων κυττάρων μυελού των οστών  $/cm^2$  μπορούν να παράξουν μέχρι και  $9,8 \times 10^8$  MSCs όταν συλλέγονται μόλις μετά από την πρώτη φάση καλλιέργειας [93]. Τα UBC-MSCs προτείνεται να καλλιεργούνται με μεγαλύτερες πυκνότητες της τάξης του  $1 \times 10^6 /cm^2$ , λόγω της μικρής τους συχνότητας πολλαπλασιασμού. Για την απομόνωση MSCs από λιπώδη ιστό (AT-MSCs), συνήθως χρησιμοποιείται ενζυμική

<sup>5</sup>Για την παρακολούθηση της διασποράς των MSCs in vivo, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της ραδιενεργής επισήμανσης των κυττάρων, των χρωστικών φθορισμού, της μεταγωγής με συγκεκριμένα γονίδια και της χρήσης κυτταρο-ειδικών δεικτών DNA όπως μικροδορυφόρων [63].

θεραπεία. Διεξάγεται φυγοκέντρηση και μετά από καλλιέργεια 10 ημερών, περίπου 1 : 1.000 κύτταρα εντός του στρωματικού αγγειακού τμήματος θα έχουν παράξει μονάδες/αποικίες [51].

### Κλινικές μελέτες και εφαρμογές στην αναγεννητική ιατρική

Τα MSCs παρουσιάζουν τεράστιες δυνατότητες για τη θεραπεία πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ανοσολογικών όσο και των μη ανοσολογικών. Το θεραπευτικό δυναμικό αυτών των κυττάρων οφείλεται σε αρκετές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητάς τους να i) διαφοροποιούνται σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ii) εκκρίνουν διαλυτούς παράγοντες κρίσιμους για την κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό, iii) ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση και iv) μεταναστεύουν στην ακριβή θέση της βλάβης [99].

Σύμφωνα με την επίσημη βάση δεδομένων του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ, έχουν αναφερθεί 493 κλινικές δοκιμές με βάση τα MSCs. Οι περισσότερες πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του δυναμικού των MSCs στη θεραπεία αιματολογικών παθήσεων, GvHD (Graft-versus-host disease ή νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή), διαβήτη, φλεγμονωδών ασθενειών και ασθενειών στο ήπαρ, τα νεφρά και τους πνεύμονες, καθώς επίσης καρδιαγγειακές, οστικές, χόνδρου, νευρολογικές και αυτοάνοσες ασθένειες. Ωστόσο, οι περισσότερες κλινικές δοκιμές βρίσκονται σε πρώιμη φάση (φάση I, I / II ή II), αποδεικνύοντας ότι η θεραπευτική αποτελεσματικότητά τους πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω σε συνδυασμό φυσικά με τη μακροπρόθεσμη ασφάλεια τους. Πέραν αυτών των ανοιχτών προβλημάτων, οι σχετικές θεραπείες είναι πολλά υποσχόμενες και κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος στην αναγεννητική ιατρική.

## 2.4 Κυτταρική καλλιέργεια και μηχανισμοί διαφοροποίησης

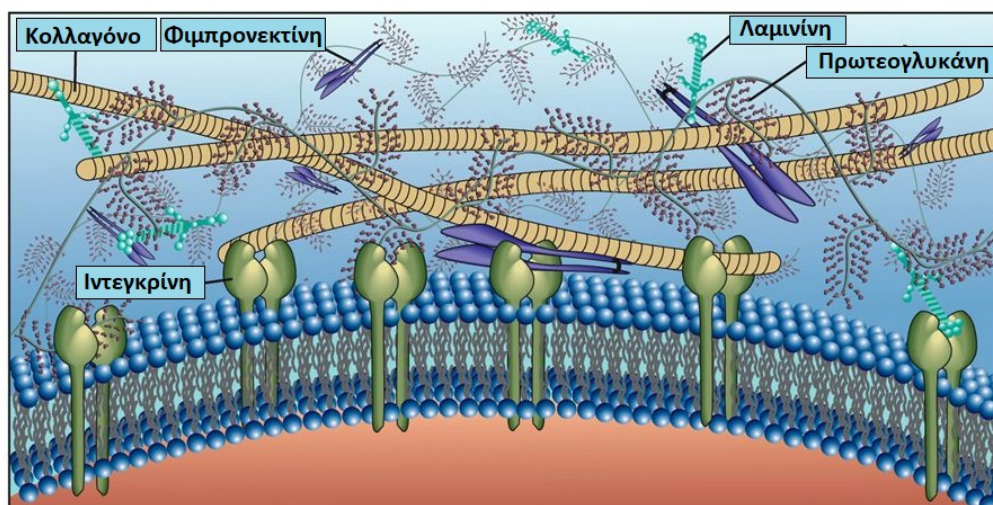
Η μοίρα των βλαστικών κυττάρων εξαρτάται από τα σήματα του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο αυτά καλλιεργούνται. Ένας από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστικούς παράγοντες είναι η εξωκυττάρια μήτρα (ECM) και τα μηχανικά χαρακτηριστικά αυτής, πάνω στην οποία τα βλαστοκύτταρα προσκολλώνται, αναπαράγονται και διαφοροποιούνται όταν αυτά βρίσκονται εσωτερικά ενός οργανισμού [110]. Η καλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί και εκτός αυτού (in vitro), σε ειδικά δισκία τα οποία μιμούνται το ECM, οι ιδιότητες των οποίων θα καθορίσουν και πάλι τον δρόμο πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων. Στη συνέχεια, γίνεται μια σύντομη αναφορά στις ιδιότητες και χαρακτηριστικά της εξωκυττάριας μήτρας καθώς και στην αλληλεπίδραση της με τα βλαστικά κύτταρα.

### 2.4.1 Εξωκυττάρια μήτρα (ECM): Δομή και λειτουργία

Η εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix ή ECM), αποτελεί ένα πολυ-λειτουργικό δίκτυο ινώδους υλικού, το οποίο κατανέμεται σε όλα τα μέρη του σώματος, παρέχοντας δομική και βιοχημική υποστήριξη σε όλους τους ιστούς (βλ. Σχήμα 2.7) [107, 1]. Οι πρωτεΐνες της μήτρας εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, από την δυναμική συμπεριφο-



ρά κυττάρων όπως μετανάστευση και μορφογένεση έως και τις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης.



Σχήμα 2.7: Απεικόνιση της μακρομοριακής οργάνωσης της εξωκυττάριας μήτρας. Οι εικονιζόμενες πρωτεΐνες (φιμπρονεκτίνες, κολλαγόνα, λαμνίνες), αποτελούνται από σημεία πρόσδεσης για την μεταξύ τους ένωση και επικοινωνία, αλλά και για την ένωση με τις ιντεγκρίνες. Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούν μεγάλα συμπλέγματα πρωτεϊνών-πολυσακχαριτών τα οποία καταλαμβάνουν σημαντικό μέρος του όγκου της εξωκυττάριας μήτρας [49].

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πρωτεΐνες του ECM μπορούν να επηρεάσουν τέτοιου είδους λειτουργίες, στηρίζονται σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών υποδοχέων, όπως οι ιντεγκρίνες, οι οποίες μπορούν να προσδεθούν σε μερικά από τα στοιχεία της μήτρας. Εκτός από την άμεση παραγωγή σημάτων μέσω αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης, η μήτρα μπορεί να σηματοδοτήσει και με πιο έμμεσες μεθόδους όπως με τον διαχωρισμό αυξητικών παραγόντων και μορφογόνων που δρουν ως μια δυνατή πηγή που δύναται να απελευθερωθεί με την ύπαρξη μεταβολών από τις φυσιολογικές συνθήκες.

Έχει αποδειχθεί πως τα βλαστοκύτταρα μπορούν να αισθάνονται και να ανταποκρίνονται στις μηχανικές ιδιότητες της μήτρας. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της μήτρας είναι ο ιδιαίτερα **δυναμικός χαρακτήρας** της. Τα κύτταρα μπορούν να ανταποκριθούν στις μικροπεριβαλλοντικές παραμέτρους και να μεταβάλλουν την έκφραση της μήτρας με αποτέλεσμα την ταχεία αναδιαμόρφωση της τόσο στη φύση όσο και στην ποσότητα των συστατικών μορίων. Εναλλακτικά, το κύτταρο μπορεί να αλλάξει το οπλοστάσιο των υποδοχέων μήτρας που εκφράζει παρέχοντας έτσι ένα μέσο για την ουσιαστική ρύθμιση της αλληλεπίδρασης των υποδοχέων με το τοπικό μικροπεριβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα αμφίδρομο κέντρο σηματοδότησης το οποίο είναι ικανό να εξελίσσεται και να παράγει διαφορετικά αποτελέσματα με την πάροδο του χρόνου και σε ανταπόκριση διαφόρων σημάτων [1].

### 2.4.2 Δυσκαμψία, εστιακή προσκόλληση και μηχανική μεταγωγή

Η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί το υπόστρωμα πάνω στο οποίο τα βλαστικά κύτταρα προσκολλώνται και κατ' επέκταση αυτο-ανανεώνονται ή/και διαφοροποιούνται. Η μήτρα αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί από την δυσκαμψία της, δηλαδή την ικανότητά της να αντιστέκεται σε παραμορφώσεις που αναπτύσσονται λόγω των εφαρμοσμένων δυνάμεων. Το **μέτρο ελαστικότητας** (Young modulus (Pa)), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μετρική της δυσκαμψίας της εξωκυττάριας μήτρας.

Τα βλαστικά κύτταρα ουσιαστικά 'αισθάνονται' την δυσκαμψία του μικροπεριβάλλοντος με το να ασκούν δυνάμεις στην εξωκυττάρια μήτρα και με το να 'μετρούν' τις αντίστοιχες αντιδράσεις [83]. Έτσι, επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση ή η αδρανοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και συγκεντρώσεων γονιδίων, τα οποία καθορίζουν τον τελικό δρόμο διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, MSCs τα οποία προσκολλώνται σε μαλακές και εύκαμπτες εξωκυττάριας μήτρες (όπως ο εγκεφαλικός ιστός), με μέτρο ελαστικότητας μικρότερο του 1kPa, υπόκεινται σε νευρογενή διαφοροποίηση. Πιο δύσκαμπτες εξωκυττάριας μήτρες, όπως ο μυϊκός ιστός, ευνοούν τη μυογενή ή λιπογενή διαφοροποίηση, ενώ αρκετά σκληρές και δύσκαμπτες μήτρες, μεγαλύτερες των 10kPa, όπως τα οστά, προωθούν την οστεογενή διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων [23] (βλ. Σχήμα 2.8).

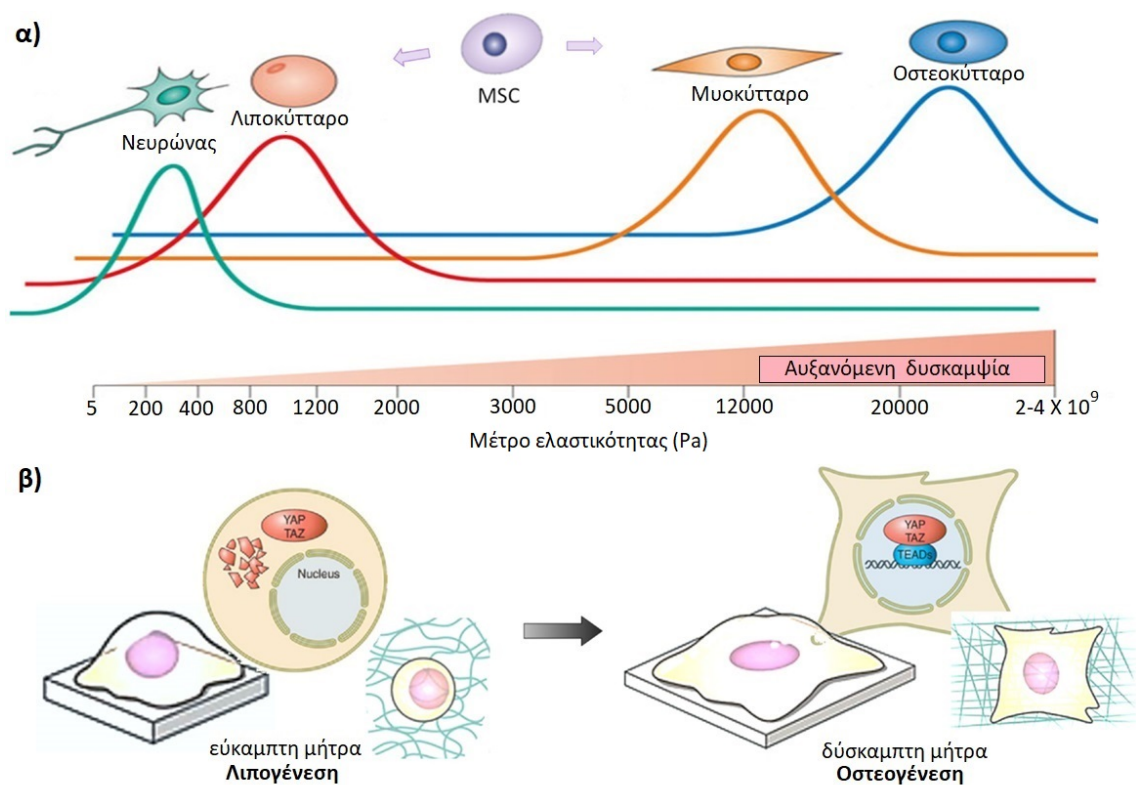
Ποια είναι η διαδικασία όμως με την οποία τα MSCs αισθάνονται τις μηχανικές ιδιότητες της μήτρας; Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, απαραίτητη είναι η περιγραφή της διαδικασίας της προσκόλλησης του κυττάρου με την εξωκυττάρια μήτρα. Η μηχανική αλληλεπίδραση κυττάρου-μήτρας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την μεταξύ τους επαφή. Ο βαθμός στον οποίο τα κύτταρα είναι σε επαφή με το υπόστρωμα, είναι ανάλογος με τον αριθμό των βιοχημικών δεσμών και αλληλεπιδράσεων στην επιφάνεια του κυττάρου.

Η στατική *in vitro* προσκόλληση αποτελείται από τρία βασικά βήματα:

1. Το κύτταρο έρχεται σε πρώτη επαφή με το υπόστρωμα και προσκολλάται σε αυτό
2. Εξαπλώνεται στο υπόστρωμα αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής
3. Αναπτύσσει την λεγόμενη **εστιακή προσκόλληση** (Focal adhesion ή FA)

Η εστιακή προσκόλληση (FA), είναι η διαδικασία κατά την οποία η εξωτερική εφελκυστική δύναμη, που δημιουργείται όταν οι άκρες των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του κυττάρου προσκολλούνται στο ECM, προκαλεί τη σύνδεση των πρωτεϊνών με ενδοκυτταρικά μέλη που ονομάζονται νημάτια ακτίνης (actin filaments), τα οποία προηγουμένως ήταν ανενεργά [52]. Έχει βρεθεί πως πάνω από ένα όριο της τιμής της επιφάνειας επαφής, η δύναμη επαφής και η εστιακή προσκόλληση δεν μεταβάλλονται και επομένως δεν υπάρχει αλλαγή στις μηχανικές και βιοχημικές αλληλεπιδράσεις [32]. Ένας επιπρόσθετος παράγοντας που επηρεάζει την διαφοροποίηση είναι η αλληλεπίδραση κυττάρου-με-κύτταρο, καθώς οι παραγόμενες δυνάμεις επαφής αλλάζουν την ενδοκυτταρική οργάνωση και επομένως του σχήμα του κυττάρου, αναστέλλοντας έτσι ή προωθώντας την κυτταροσκελετική ένταση και την ακτομυοσίνη [118].





Σχήμα 2.8: Η δυσκαμψία της εξωκυττάριας μήτρας και η γεωμετρία του κυττάρου ως παράγοντες της διαφοροποίησης των MSCs σε νευρώνες, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα και οστεοκύτταρα. **α)** Αύξηση της δυσκαμψίας του υποστρώματος οδηγεί σε διαφοροποίηση ως προς κυτταρικούς τύπους που εμφανίζονται σε πιο δύσκαμπτους ιστούς. **β)** Εύκαμπτοι ιστοί ή ιστοί που εμποδίζουν την εξάπλωση του κυττάρου, αναγκάζουν την παραμονή των μεταγραφικών παραγόντων YAP/TAZ στο κυτταρόπλασμα και οδηγούν σε λιπογενή διαφοροποίηση. Αντίθετα, σε δύσκαμπτα υποστρώματα ή εκείνα που οδηγούν στην εξάπλωση του κυττάρου πάνω σε αυτό, οι παράγοντες YAP/TAZ οδηγούνται στον πυρήνα και έτσι επιτυγχάνεται οστεογενής διαφοροποίηση [18].

Τα μηχανικά λοιπόν σήματα του εξωκυτταρικού μικρο-περιβάλλοντος, όπως η δυσκαμψία της μήτρας, καθορίζουν την κατάσταση του κυττάρου. Η **μηχανική μεταγωγή** (mechanotransduction), είναι ο μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα μετατρέπουν τα μηχανικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος σε ηλεκτροχημική δραστηριότητα. Μέσω λοιπόν μηχανικής μεταγωγής, οι γονιδιακές εκφράσεις και τα επίπεδα μεταγραφικών παραγόντων μεταβάλλονται και οδηγούν σε συγκεκριμένους δρόμους διαφοροποίησης [23].

### 2.4.3 Γονιδιακή έκφραση και μεταγραφικοί παράγοντες

Τα γονίδια είναι συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων του DNA, τα οποία περιέχουν αποθηκευμένη μία συγκεκριμένη γενετική πληροφορία. Ο όρος **γονιδιακή έκφραση** ή έκφραση γονιδίων (gene expression) αναφέρεται στη διαδικασία εκείνη που προκαλεί τη μεταφορά κω-

δικοποιημένων πληροφοριών του γονιδίου στο λειτουργικό προϊόν του γονιδίου (πρωτεΐνη ή RNA). Έτσι, όταν ένα γονίδιο 'εκφράζεται' σημαίνει πως είναι γονιδιακά ενεργό. Η έκφραση γονιδίων πολλές φορές εξισώνεται με τη διαδικασία της μεταγραφής. Η **μεταγραφή** αναφέρεται στο **πρώτο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης** και περιγράφει τη διαδικασία κατά την οποία δημιουργείται ένα μόριο RNA (εσωτερικά του πυρήνα του κύτταρου), με χρήση μιας αλυσίδας του DNA ως προτύπου, της οποίας είναι συμπληρωματικό<sup>6</sup>.

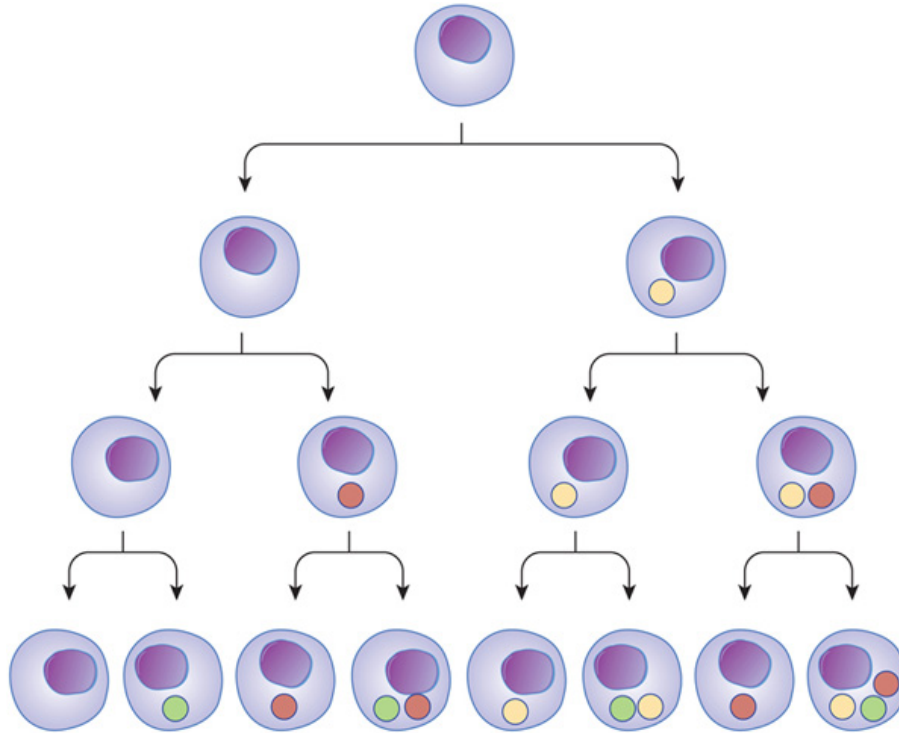
Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αναφέρεται στον έλεγχο της ποσότητας και του χρόνου εμφάνισης του λειτουργικού προϊόντος ενός γονιδίου. Ο έλεγχος της έκφρασης είναι ζωτικής σημασίας για να επιτρέψει σε ένα κύτταρο να παράγει τα γονιδιακά προϊόντα που χρειάζεται όταν τα χρειάζεται. Με τη σειρά του, δίνει στα κύτταρα την ευελιξία να προσαρμόζονται σε ένα μεταβλητό περιβάλλον, σε εξωτερικά σήματα, σε βλάβες στο κύτταρο και σε άλλα ερεθίσματα. Γενικότερα, η γονιδιακή ρύθμιση δίνει τον έλεγχο των κυττάρων σε όλη τη δομή και τη λειτουργία και είναι η βάση της κυτταρικής διαφοροποίησης, μορφογένεσης, ευελιξίας και προσαρμοστικότητας οποιουδήποτε οργανισμού.

Η μεταγραφική ρύθμιση είναι το μέσο με το οποίο ένα κύτταρο ρυθμίζει τη μετατροπή του DNA σε RNA (μεταγραφή), οπότε τελικά ρυθμίζει τη γονιδιακή δραστηριότητα. Ένα μόνο γονίδιο μπορεί να ρυθμιστεί με διάφορους τρόπους, από τη μεταβολή του αριθμού των αντιγράφων του RNA που μεταγράφονται, στον χρονικό έλεγχο της μεταγραφής του γονιδίου. Αυτός ο έλεγχος επιτρέπει στο κύτταρο ή τον οργανισμό να ανταποκριθεί σε μια ποικιλία από ενδο- και εξωκυττάρων σήματα. Η ρύθμιση της μεταγραφής είναι μια ζωτικής σημασίας διαδικασία σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς.

Οι **μεταγραφικοί παράγοντες** (transcriptional factors ή TFs) είναι πρωτεΐνες που προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες DNA προκειμένου να ρυθμιστεί η έκφραση ενός δεδομένου γονιδίου. Η ισχύς των μεταγραφικών παραγόντων έγκειται στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν και / ή να καταστέλλουν ένα ευρύ φάσμα των κατάντη γονιδίων. Το γεγονός ότι αυτοί οι παράγοντες μεταγραφής λειτουργούν με συνδυαστικό τρόπο σημαίνει ότι μόνο ένα μικρό υποσύνολο του γονιδιώματος ενός οργανισμού κωδικοποιεί παράγοντες μεταγραφής. Οι παράγοντες μεταγραφής λειτουργούν μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας μηχανισμών. Διαφορετικοί τύποι κυττάρων εκφράζουν χαρακτηριστικά σύνολα μεταγραφικών ρυθμιστών. Στην πραγματικότητα, καθώς αναπτύσσονται πολυκύτταροι οργανισμοί, διαφορετικά σύνολα κυττάρων μέσα σε αυτούς τους οργανισμούς ενεργοποιούν και απενεργοποιούν συγκεκριμένους συνδυασμούς TFs). Τέτοια αναπτυξιακά πρότυπα είναι υπεύθυνα για την ποικιλία κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στον ώριμο οργανισμό (βλ. Σχήμα 2.9). Υπάρχουν έως και 2600 TFs στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

Μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: ενεργοποιητές και καταστολείς. Ενώ οι ενεργοποιητές μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον βασικό μηχανισμό της μεταγραφής μέσω δέσμευσης, οι καταστολείς προσλαμβάνουν κυρίως συν-κατασταλτικά σύμπλοκα που οδηγούν σε μεταγραφική καταστολή με συμπύκνωση χρωματίνης των ενισχυτικών περιο-

<sup>6</sup>Η διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης περιλαμβάνει επίσης και το στάδιο της μετάφρασης, δηλαδή της διαδικασίας κατά την οποία τα ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο συνθέτουν πρωτεΐνες μετά τη διαδικασία της μεταγραφής του DNA σε RNA.



Σχήμα 2.9: Η μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων σε έναν οργανισμό μπορεί να εξαρτάται από την δραστηριότητα των ρυθμιστικών παραγόντων σε κάθε κύτταρο. Διαφορετικοί TFs μπορούν να ενεργοποιηθούν σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια διαδοχικών γενεών κυττάρων. Καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν και περνούν από διαφορετικά στάδια (βέλη), οι TFs (χρωματιστές μπάλες) μπορούν να επιδρούν στην έκφραση γονιδίων και να αλλάξουν το κύτταρο με διαφορετικούς τρόπους. Αυτή η αλλαγή επηρεάζει την επόμενη γενιά κυττάρων που προέρχονται από αυτό το κύτταρο. Στις επόμενες γενιές, είναι ο συνδυασμός διαφορετικών παραγόντων μεταγραφής που καθορίζουν τελικά τον κυτταρικό τύπο (2010 Nature Education).

χών. Οι TFs παίζουν κεντρικό ρόλο κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού, αφού επηρεάζουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Οι ορμόνες, οι αυξητικοί και άλλοι χημικοί παράγοντες επιδρούν στην αύξηση, τη διαφοροποίηση και τις κυτταρικές λειτουργίες, ενεργοποιώντας τη γονιδιακή έκφραση μέσω της δραστηριοποίησης συγκεκριμένων βιολογικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων. [75].

Η ανάλυση των μεταβολών της γονιδιακής έκφραση και των μεταγραφικών παραγόντων των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω των λεγόμενων Γενετικών Ρυθμιστικών Δικτύων (Gene Regulatory Networks), τα οποία θα παρουσιασθούν αναλυτικά στο επόμενο Κεφάλαιο.



## Κεφάλαιο 3

# Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα

Το γονιδίωμα κωδικοποιεί χιλιάδες γονίδια, τα προϊόντα των οποίων επιτρέπουν την κυτταρική επιβίωση και διάφορες άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Τα γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα ορίζουν τα επίπεδα αυτών των γονιδιακών προϊόντων. Αποτελούνται από μία συλλογή μοριακών ειδών και των αλληλεπιδράσεών τους, τα οποία μαζί ελέγχουν την αφθονία του γονιδιακού προϊόντος. Ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών διεργασιών επηρεάζεται από ρυθμιστικά δίκτυα όπως η διαδικασία της **κυτταρικής διαφοροποίησης** (Κεφάλαιο 2.4). Η κατανόηση της δυναμικής συμπεριφοράς των δικτύων αυτών μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη αντίληψή μας, για τις ασθένειες που δημιουργούνται όταν συγκεκριμένες κυτταρικές διαδικασίες απορρυθμίζονται.

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται μια περιγραφή των βασικών μεθόδων μαθηματικής μοντελοποίησης και ανάλυσης των γενετικών ρυθμιστικών δικτύων, καθώς και μια παρουσίαση του τρόπου λειτουργίας τους σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου.

### 3.1 Μοντελοποίηση και ανάλυση

Ένα γενετικό ρυθμιστικό δίκτυο (Gene Regulatory Network ή GRN) αποτελεί ένα σύνολο τμημάτων DNA εσωτερικά ενός κυττάρου, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μέσω των προϊόντων έκφρασής τους (RNA ή πρωτεΐνες) καθώς και με άλλα στοιχεία του κυττάρου, επηρεάζοντας έτσι τον ρυθμό με τον οποίο τα γονίδια στο δίκτυο αυτό μεταγράφονται σε mRNA. Οι κόμβοι ενός GRN είναι γονίδια και οι ενώσεις μεταξύ τους, αντιπροσωπεύουν γονιδιακές αλληλεπιδράσεις μέσω των οποίων τα προϊόντα ενός γονιδίου επηρεάζουν αυτά ενός άλλου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές διακρίνονται σε:

- **επαγωγικές** (inductive), με την αύξηση του ενός να οδηγεί σε αύξηση του άλλου ή
- **ανασταλτικές** (inhibitory), με αύξηση του ενός να οδηγεί σε μείωση του άλλου [69]

Μια σειρά ενώσεων υποδεικνύει μια αλυσίδα τέτοιων αλληλεπιδράσεων, με την δυνατή ύπαρξη κύκλων να αντιστοιχούν σε βρόχους θετικής ή αρνητικής ανάδρασης (positive or negative feedback loops) [113]. Διάφορα υπολογιστικά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για την

ανάλυση των GRNs, τα οποία μπορούν γενικά να χωρισθούν σε τρεις κατηγορίες: τα λογικά, τα συνεχή και τα στοχαστικά [48].

### 3.1.1 Λογικά δίκτυα

Η πιο βασική και απλοϊκή μέθοδος μοντελοποίησης είναι βασισμένη στα διακριτά μαθηματικά και τη λογική (logic-based) και αναπτύχθηκε από τους Kauffman και Thomas το 1973 [36, 108]. Τα μοντέλα αυτά περιγράφουν **ποιοτικά** τα ρυθμιστικά δίκτυα και όχι ποσοτικά. Οι τύποι δικτύων που σχεδιάστηκαν και περιγράφουν τα λογικά μοντέλα είναι οι ακόλουθοι.

#### ▷ Δίκτυα Boolean

Σε ένα δίκτυο Boolean, μία μεταβλητή  $x_i$ , η οποία συνήθως αντιπροσωπεύει την έκφραση γονιδίων ή ρυθμιστικών παραγόντων, μπορεί να λάβει αποκλειστικά δύο τιμές  $x_i \in \{0, 1\}$ , (0) για όταν το γονίδιο είναι ανενεργό και (1) όταν είναι ενεργό. Κάθε γονίδιο, εισερχόμενη και εξερχόμενη ποσότητα, αναπαρίστανται από κόμβους σε ένα γράφημα στο οποίο τα βέλη μεταξύ αυτών συμβολίζουν σχέσεις αλληλεπίδρασης. Ο χρόνος δεν είναι συνεχής και αποτελείται από διακριτά βήματα. Σε κάθε βήμα, η νέα κατάσταση ενός κόμβου στο δίκτυο είναι μία Boolean συνάρτηση της κατάστασης των κόμβων στο προηγούμενο βήμα (Σχήμα 3.1).

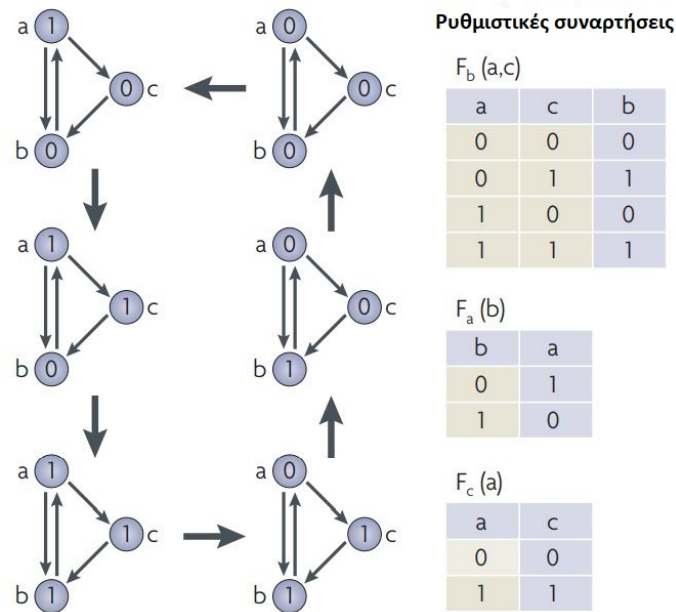
Η εγκυρότητα της μεθόδου μπορεί να εξετασθεί συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της προσομοίωσης με παρατηρήσιμες χρονοσειρές ή επιπλέον με την εξέταση της προβλεπόμενης ύπαρξης μιας ρυθμιστικής σύνδεσης μεταξύ δύο συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι αποτελούν κόμβους του μοντέλου [65]. Το βασικό μειονέκτημα των δικτύων αυτών είναι πως δεν μπορούν να περιγράψουν πλήρως τη λειτουργία των γονιδίων εσωτερικά ενός κυττάρου καθώς αυτό βρίσκεται αποκλειστικά σε δύο καταστάσεις.

#### ▷ Πιθανοτικά δίκτυα Boolean

Συχνά λόγω έλλειψης πειραματικών δεδομένων ή μη επαρκούς κατανόησης του υπό εξέταση συστήματος, πολλές διαφορετικές ρυθμιστικές συναρτήσεις μπορεί να είναι πιθανές για μία ποσότητα. Το γεγονός αυτό δημιουργεί την ανάγκη ποσοτικοποίησης της αβεβαιότητας στο δίκτυο (Uncertainty Quantification ή UQ). Οι Shmulevich et al. [96], τροποποίησαν το δίκτυο Boolean έτσι ώστε κάθε ποσότητα να μπορεί να λάβει διαφορετικές συναρτήσεις και τιμές, με διαφορετική πιθανότητα εμφάνισης η κάθε μία η οποία βασίζεται στη συμβατότητα της με τα προηγούμενα δεδομένα. Σε κάθε χρονικό βήμα, η κάθε ποσότητα αντιστοιχίζεται με μία ρυθμιστική συνάρτηση η οποία επιλέγεται τυχαία σύμφωνα με τις καθορισμένες πιθανότητες [96].

Έτσι το μοντέλο θεωρείται στοχαστικό (stochastic) και μία αρχική κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε πολλές διαφορετικές διαδρομές/αποτελέσματα αντίστοιχης πιθανότητας. Το νέο μοντέλο, το πιθανοτικό δίκτυο Boolean (probabilistic Boolean network ή PBN), γεννά μία ακολουθία καταστάσεων οι οποίες αποτελούν μία αλυσίδα Μάρκοφ ή Μαρκοβιανή αλυσίδα (Markov chain<sup>1</sup>). Για παράδειγμα, ένα PBN χρησιμοποιήθηκε για την μοντελοποίηση ενός

<sup>1</sup>Markov chain - Μία στοχαστική διαδικασία κατά την οποία η επόμενη κατάσταση του συστήματος ε-



Σχήμα 3.1: Σε ένα δίκτυο Boolean κάθε μία από τις ποσότητες  $a$ ,  $b$  και  $c$  μπορεί να βρίσκονται σε κατάσταση 0 ή 1. Οι μεταβολές (transitions) βασίζονται στις ρυθμιστικές συναρτήσεις στα δεξιά, οι οποίες περιγράφουν τους κανόνες λειτουργίας του μοντέλου. Για παράδειγμα, αν το  $a$  είναι στην κατάσταση 1 και το  $c$  στην 0, στο επόμενο χρονικό βήμα η κατάσταση του  $b$  θα είναι 0. Τα λεπτά βέλη υποδεικνύουν τους ρυθμιστές κάθε κόμβου. Τα χρονικά βήματα αναπαριστώνται από τα έντονα βέλη. Η καθολική κατάσταση του μοντέλου (global state) καθορίζεται από τον συνδυασμό των τριών επιμέρους καταστάσεων. Το σύστημα ανακυκλώνεται μέσω των έξι συνολικά διαφορετικών global states. Μία συγκεκριμένη ακολουθία global states κατά την οποία η μία διαδέχεται την άλλη ονομάζεται τροχιά (trajectory) Karlebach et al., 2008 [48].

δικτύου 15 γονιδίων το οποίο προέκυψε από πειραματικά δεδομένα έκφρασης γλοιώματος σε άνθρωπο [97].

### ▷ Μοντέλα MetaReg

Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών πιθανών καταστάσεων, δυσκολεύει ιδιαίτερα την δυναμική ανάλυση των μοντέλων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ανάλυση κάτω από συνθήκες μόνιμης κατάστασης (steady-state) φαίνεται να είναι ένας πρακτικός στόχος. Οι Gat-Viks et al. [33], ανέπτυξαν το μοντέλο MetaReg, στο οποίο οι ποσότητες μπορούν να βρίσκονται σε διάφορα επίπεδα (συνήθως 3-5) και οι ρυθμιστικές συναρτήσεις είναι διακριτές. Δύο αποτελεσματικά heuristics<sup>2</sup> αναπτύχθηκαν: το πρώτο ανιχνεύει τα steady-states του δικτύου ενώ το δεύτερο επιλέγει ρυθμιστικές συναρτήσεις οι οποίες είναι πιο συμβατές με τα εν λόγω

ξαρτάται αποκλειστικά από την τωρινή, ανεξαρτήτως της ακολουθίας (trajectory) που οδήγησε στην τωρινή κατάσταση (memoryless process). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο τυχαίος περίπατος ή random walk.

<sup>2</sup>heuristic - Ένας αλγόριθμος επίλυσης ενός προβλήματος ο οποίος δεν επιφέρει πάντα τη βέλτιστη λύση. Τα heuristics συχνά χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις όπου η εύρεση της ακριβούς λύσης είναι μη-πρακτική και σε πολλές περιπτώσεις παρέχουν ικανοποιητικές λύσεις.

steady-states. Το πρώτο heuristic μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δυναμική ανάλυση του δικτύου, ενώ το δεύτερο μπορεί να συμπληρώσει ή να διορθώσει δίκτυα βασισμένα στη βιβλιογραφία. Το MetaReg δίκτυο έχει εφαρμοσθεί για την ανάλυση της ρύθμισης βιοσύνθεσης λυσίνης σε ζυμομύκητες και προέβλεψε την ύπαρξη αγνώστων προηγούμενως μεταγραφικών ελέγχων διαφόρων μεταβολικών ενζύμων.

### ▷ Petri nets

Η δυναμική ανάλυση ενός ρυθμιστικού δικτύου μπορεί επίσης να επιτευχθεί μέσω των Petri nets τα οποία αποτελούν μη-ντετερμινιστικά μοντέλα [78]. Μία ερώτηση στην οποία μπορεί να απαντήσει ένα Petri net είναι η εξής: πόσες δυνατές ακολουθίες μετάβασης μπορούν να οδηγήσουν από μία κατάσταση A σε μία κατάσταση B; Η ποιοτική περιγραφή των βιοχημικών αντιδράσεων χρησιμοποιώντας ένα Petri net είναι απλή και τα μοντέλα αυτά αποτελούν χρήσιμα εργαλεία ανάλυσης για μεγάλα μεταβολικά δίκτυα (metabolic networks) [56].

### 3.1.2 Συνεχή δίκτυα

Τα συνεχή γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα είναι μία επέκταση των δικτύων Boolean, τα οποία παρουσιάστηκαν παραπάνω. Οι κόμβοι εξακολουθούν να αναπαριστούν γονίδια και οι συνδέσεις μεταξύ τους επηρεάζουν την έκφραση αυτών. Ωστόσο, είναι γνωστό πως τα βιολογικά συστήματα και τα πειράματα πάνω σε αυτά εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα δραστηριότητας σε ένα συνεχές χρονικό πλαίσιο (και όχι σε διακριτό) και έτσι μία συνεχής αναπαράσταση αυτών μπορεί να προβλέψει τις διάφορες ιδιότητες των γενετικών ρυθμιστικών δικτύων, κάτι το οποίο είναι αδύνατο να επιτευχθεί με ένα δίκτυο Boolean. Οι περισσότερες από αυτές τις προσεγγίσεις είναι παρόμοιες με τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (artificial neural networks) [98], καθώς οι εισροές (inputs) σε έναν κόμβο συνοψίζονται και το αποτέλεσμα χρησιμεύει ως είσοδος σε μια μη-γραμμική (σιγμοειδή συνήθως) συνάρτηση [34]. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν τα:

- *Συνεχή Γραμμικά Μοντέλα (Continuous Linear Models)* - η αλλαγή μίας ποσότητας στο δίκτυο εξαρτάται από το σταθμισμένο γραμμικό άθροισμα της δραστηριότητας των υπολοίπων ρυθμιστών και χρησιμοποιούνται κυρίως για την ποιοτική ερμηνεία των δικτύων
- *Μοντέλα Δραστηριότητας Μεταγραφικών Παραγόντων (Models of Transcription Factor Activity)* - οι ρυθμιστές αποτελούνται αποκλειστικά από μεταγραφικούς παράγοντες και τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων καθορίζονται από μη-γραμμικές ρυθμιστικές συναρτήσεις οι οποίες παίρνουν τη μορφή Michaelis-Menten<sup>3</sup> [54], ενώ οι παράγοντες μεταγραφής υπολογίζονται από δεδομένα μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιούν δυναμικά Bayesian δίκτυα [53]

<sup>3</sup>Michaelis-Menten - Εξισώσεις που περιγράφουν την κινηματική ενζυματικών αντιδράσεων. Μπορούν να προκύψουν από συνήθεις διαφορικές εξισώσεις οι οποίες περιγράφουν μεταβολές συγκέντρωσης των εμπλεκόμενων μοριακών οντοτήτων, κάτω από κάποιες απλοποιημένες παραδοχές.



- *Regulated Flux Balance Analysis* - στοχεύει στην μοντελοποίηση με ενσωμάτωση των διαδικασιών της ρύθμισης αλλά επιπλέον και του μεταβολισμού καθώς η τελευταία επιφέρει αλλαγές στη μάζα του κυττάρου. Έτσι θεωρείται πως λαμβάνεται υπόψιν η συνολική εικόνα των κυτταρικών διεργασιών
- *Συνήθεις Διαφορικές Εξισώσεις* - αφορά στην πιο σημαντική κατηγορία μοντέλων για την δυναμική ανάλυση γενετικών ρυθμιστικών δικτύων. Οι εξισώσεις αυτές περιγράφουν λεπτομερώς και σε ένα συνεχές χρονικό φάσμα τις αλλαγές των ποσοτήτων σαν συνάρτηση των επιπέδων άλλων ποσοτήτων στο δίκτυο.

### Συστήματα Συνήθων Διαφορικών Εξισώσεων

Τα συστήματα Συνήθων Διαφορικών Εξισώσεων αποτελούν μία πιο γενική και λεπτομερή προσέγγιση για την περιγραφή του φαινομένου της ρύθμισης. Για απλά τέτοια συστήματα η εξαγωγή αναλυτικών λύσεων είναι πιθανή για την περιγραφή της εξέλιξης των εξεταζομένων μεγεθών στο χρόνο. Ωστόσο, μεγαλύτερα δίκτυα απαιτούν τη χρήση αριθμητικών μεθόδων για την επίλυση τους. Η προσέγγιση αυτή, προσφέρει λεπτομερείς πληροφορίες για τη δυναμική δικτύων, ωστόσο απαιτεί υψηλής ποιότητας δεδομένα για τις παραμέτρους του μοντέλου και έτσι η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη σε κάθε είδους σύστημα. Η μέθοδος των ODEs για την μελέτη γενετικών ρυθμιστικών δικτύων αναπτύχθηκε από τον Brian C. Goodwin το 1963 [37]. Η πολυπλοκότητα των εξισώσεων αυξάνει εκθετικά με την αύξηση του αριθμού των γονιδίων και έτσι τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιούνται για δίκτυα με σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων.

#### ▷ Μοντελοποίηση και ανάλυση

Έστω πως ένα ρυθμιστικό δίκτυο αποτελείται από  $N$  κόμβους και  $G_1(t), G_2(t), \dots, G_N(t)$  αναπαρισθούν τις συγκεντρώσεις των  $N$  αντιστοίχων μεγεθών (γονιδίων, μεταγραφικών παραγόντων) στο χρόνο  $t$ . Τότε, η χρονική εξέλιξη του συστήματος μπορεί να προσεγγισθεί από το παρακάτω σύστημα ODEs

$$\frac{dG_j}{dt} = f_j(G_1, G_2, \dots, G_N) \quad (3.1)$$

όπου οι συναρτήσεις  $f_j$  εκφράζουν την εξάρτηση των  $G_j$  από τις συγκεντρώσεις των άλλων μεγεθών εσωτερικά του κυττάρου.

Οι συναρτήσεις  $f_j$  προκύπτουν από βασικές αρχές την χημικής κινητικής (κινητική των χημικών αντιδράσεων) π.χ. Michaelis-Menten ενζυματική κινητική. Συνήθως, προκύπτουν χαμηλής τάξης πολυώνυμα ή πιο συχνά συναρτήσεις τύπου Hill [91].

Τα μοντέλα αυτά μελετώνται μέσω των μαθηματικών εργαλείων της μη-γραμμικής δυναμικής. Μέσω της επίλυσης της παρακάτω εξίσωσης

$$\frac{dG_j}{dt} = 0 \quad (3.2)$$

για κάθε  $j$ , προκύπτουν τα σημεία ισορροπίας του συστήματος. Συγκεκριμένα, λαμβάνονται οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και mRNAs, σε μορφή λύσεων μόνιμης κατάστασης, αλλά όχι υποχρεωτικά ευσταθούς. Πέραν των λύσεων μόνιμης κατάστασης, τα μοντέλα αυτά παρουσιάζουν και περιοδικές λύσεις. Μέσω ανάλυσης ευστάθειας προκύπτει η φύση των ελκυστών αυτών, ενώ κρίσιμα σημεία και σημεία διακλάδωσης αποκαλύπτουν καταστάσεις του κυττάρου κατά τις οποίες μικρές μεταβολές στις παραμέτρους του συστήματος μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορους δρόμους κυτταρικής διαφοροποίησης. Για τη μελέτη των μοντέλων αυτών χρησιμοποιούνται μαθηματικά εργαλεία της μη-γραμμικής δυναμικής, της θεωρίας διακλαδώσεων, και της θεωρίας χάους.

### ▷ Συναρτήσεις Hill

Η κατάσταση ισορροπίας της αντίδρασης κατά την οποία  $n$  μόρια πρόσδεσης  $B$ , συνδέονται με έναν υποδοχέα  $A$ , οδηγεί στα παρακάτω κλάσματα (ποσοστά) των κατειλημμένων και ελεύθερων μορίων  $A$  αντιστοίχως:

$$H^{(1)}([B]) = \frac{[B]^n}{K^n + [B]^n}, \quad H^{(2)}([B]) = \frac{K^n}{K^n + [B]^n} \quad (3.3)$$

όπου  $H^{(1)}([B])$  και  $H^{(2)}([B])$  ονομάζονται συναρτήσεις Hill. Η πρώτη αποτελεί μία αύξουσα μονότονη συνάρτηση του  $[B]$  (συγκέντρωση) και ικανοποιεί τις σχέσεις  $H^{(1)}(0) = 0$ ,  $H^{(1)}(K) = 1/2$  και  $\lim_{[B] \rightarrow \infty} H^{(1)}([B]) = 1$ . Αντίστοιχα, η δεύτερη αποτελεί μία φθίνουσα μονότονη συνάρτηση του  $[B]$  η οποία ικανοποιεί τις σχέσεις  $H^{(2)}(0) = 1$ ,  $H^{(2)}(K) = 1/2$  και  $\lim_{[B] \rightarrow \infty} H^{(2)}([B]) = 0$ . Επιπλέον ισχύει  $H^{(1)}([B]) + H^{(2)}([B]) = 1$ .

Μέσω της κανονικοποίησης  $x = [B]/K$ , οι συναρτήσεις Hill ορίζονται ως:

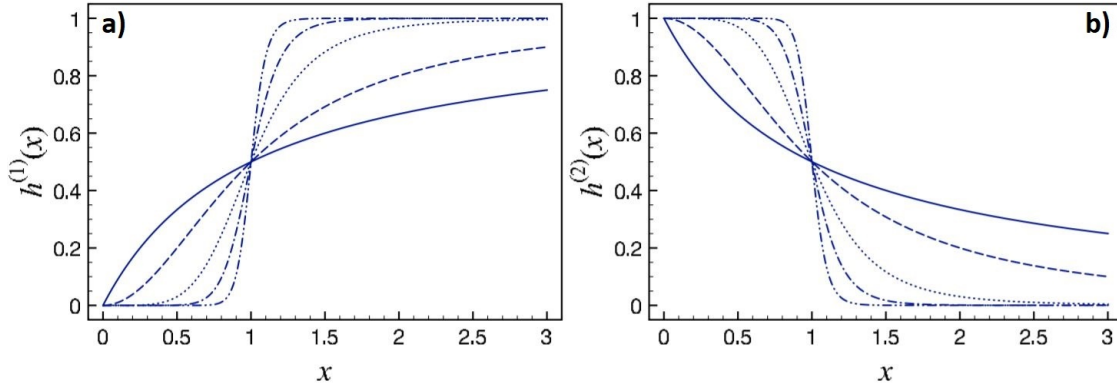
$$h^{(1)}(x) = H^{(1)}(Kx) = \frac{x^n}{1 + x^n}, \quad h^{(2)}(x) = H^{(2)}(Kx) = \frac{1}{1 + x^n} \quad (3.4)$$

όπου προφανώς  $h^{(1)}(1) = h^{(2)}(1) = 1/2$  και  $h^{(1)}(x) = h^{(2)}(x) = 1$

Οι συναρτήσεις  $h^{(1)}(x)$  και  $h^{(2)}(x)$  παρουσιάζονται στο Σχ. 3.2 για διάφορες τιμές του  $n$ . Η κυρτότητα και η κλίση των σιγμοειδών καμπυλών Hill (steepness) αυξάνεται ανάλογα με το  $n$ . Τα μοντέλα συνήθων διαφορικών εξισώσεων μπορούν να προσεγγίσουν τη συμπεριφορά των Boolean (switch-like behavior), μέσω αύξησης της κλίσης των καμπυλών.

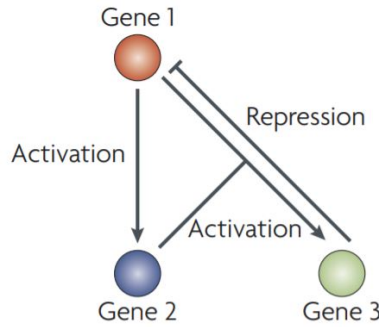
Η απόλυτη τιμή της κλίσης των καμπυλών στο  $x = 1$ ,  $S = \text{abs}(\frac{dh^{(i)}}{dx}|_{x=1})$  μπορεί να θεωρηθεί ως μετρική της κυρτότητας ενώ εύκολα αποδεικνύεται η σχέση  $S = n/4$ . Επιπλέον για τις συναρτήσεις Hill ισχύουν τα παρακάτω:

$$\lim_{x \rightarrow \infty} h^{(1)}(x) = \begin{cases} 0 & \text{if } x < 1, \\ 1/2 & \text{if } x = 1, \\ 1 & \text{if } x > 1 \end{cases} \quad (3.5) \quad \lim_{x \rightarrow \infty} h^{(2)}(x) = \begin{cases} 1 & \text{if } x < 1, \\ 1/2 & \text{if } x = 1, \\ 0 & \text{if } x > 1 \end{cases} \quad (3.6)$$



Σχήμα 3.2: Γραφική παράσταση των συναρτήσεων a)  $h^{(1)}(x)$  και b)  $h^{(2)}(x)$  για διάφορες τιμές του  $n$ . Η απόλυτη της τιμή της κλίσης των καμπυλών στο  $x = 1$  αυξάνει ανάλογα με την τιμή του  $n$ .

**Παράδειγμα 3.1.** Έστω ένα γενετικό ρυθμιστικό δίκτυο (GRN) τριών γονιδίων. Οι σχέσεις αλληλεπίδρασης των γονιδίων αυτών παρουσιάζονται στο Σχ. 3.3. Όπως φαίνεται, οι σχέσεις που συνδέουν τα γονίδια είναι επαγωγικές (activation) ή ανασταλτικές (repression).



Σχήμα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση των ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων γενετικού ρυθμιστικού δικτύου τριών αυθαίρετων γονιδίων (Karlebach et al., 2008 [48]).

Η μοντελοποίηση του δικτύου μέσω ODEs στοχεύει στην παρακολούθηση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης των γονιδίων σε σχέση με την σύνθεση (synthesis) και αποσύνθεσης (degradation) αυτών. Έτσι σε κάθε ένα γονίδιο αντιστοιχεί μία διαφορική εξίσωση και τελικά προκύπτει ένα σύστημα τριών συζευγμένων διαφορικών εξισώσεων για τους τρεις αγνώστους ( $gene_1$ ,  $gene_2$  και  $gene_3$ ) της παρακάτω μορφής [48]:

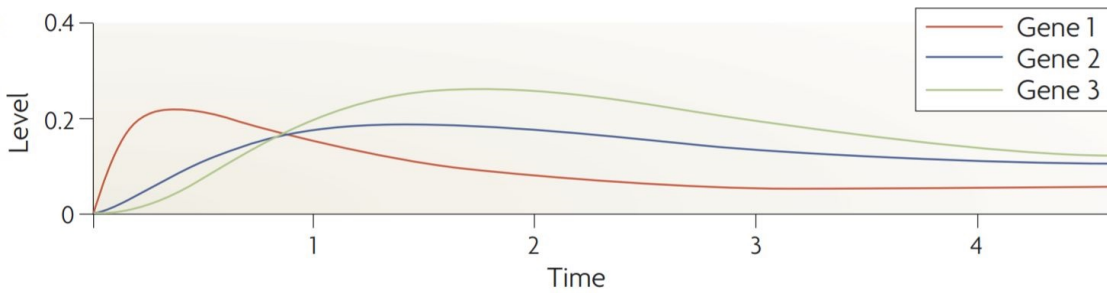
$$\frac{d([gene_1])}{dt} = k_{1,s} \cdot \frac{1}{1 + k_{1,3} \cdot [gene_3]} - k_{1,d} \cdot [gene_1] \quad (3.7)$$

$$\frac{d([gene_2])}{dt} = k_{2,s} \cdot \frac{k_{2,1} \cdot [gene_1]}{1 + k_{2,1} \cdot [gene_1]} - k_{2,d} \cdot [gene_2] \quad (3.8)$$

$$\frac{d([gene_3])}{dt} = k_{3,s} \cdot \frac{k_{3,1} \cdot [gene_1] \cdot k_{3,2} \cdot [gene_2]}{(1 + k_{3,1} \cdot [gene_1]) \cdot (1 + k_{3,2} \cdot [gene_2])} - k_{3,d} \cdot [gene_3] \quad (3.9)$$

Οι πρώτοι όροι των δεξιών μελών των παραπάνω εξισώσεων αφορούν στην σύνθεση (synthesis). Όπως φαίνεται από τη σχηματική αναπαράσταση του δικτύου (Σχ. 3.3) το gene 1, εκφράζεται γενικώς ενώ καταστέλλεται από το gene 3. Έτσι λοιπόν, μπορεί να λάβει μέγιστο ρυθμό αύξησης ( $k_{1,s}$ : 's' εκ του synthesis), όταν το επίπεδο έκφρασης του gene 3 είναι μηδέν, όπου σε αυτή την περίπτωση το  $k_{1,s}$  στην Εξ. (3.7) πολλαπλασιάζεται με τη μονάδα. Εναλλακτικά, όταν το επίπεδο έκφρασης του gene 3 είναι μη-μηδενικό, το gene 1 αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό. Το gene 2 ενεργοποιείται από το gene 1. Συγκεκριμένα αυξάνεται ως μία συνάρτηση Michaelis-Menten της έκφρασης του gene 1 (Εξ. (3.8)). Με παρόμοιο τρόπο, το gene 3, ενεργοποιείται όταν τα genes 1,2 είναι μη-μηδενικά όπως φαίνεται στην Εξ. (3.9). Οι σταθερές σύνθεσης αναφέρονται στην διαδικασία της μεταγραφής αλλά και της μετάφρασης (τα δύο στάδια της γονιδιακής έκφρασης). Η αποσύνθεση, μοντελοποιείται ως μία πρώτη τάξης αντίδραση με σταθερές ρυθμού  $k_{i,d}$  ('d' εκ του degradation) όπου  $i = 1, 2, 3$ .

Μέσω χρονικής ολοκλήρωσης (time integration) στο παραπάνω σύστημα μπορούν να ληφθούν οι καμπύλες της γονιδιακής έκφρασης και να υπολογισθεί η χρονική στιγμή της σταθεροποίησης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων (Σχ. 3.4). □



Σχήμα 3.4: Διάγραμματα χρονικής εξέλιξης της έκφρασης των τριών γονιδίων και σταθεροποίηση αυτών ( $t > 4.5$ ). Τιμές των σταθερών ρυθμού αντίδρασης:  $k_{1,s} = k_{2,s} = 2$ ,  $k_{3,s} = 15$ ,  $k_{1,d} = k_{2,d} = k_{3,d} = 1$ ,  $k_{2,1} = k_{3,1} = k_{3,2} = 1$  και  $k_{1,3} = 100$ . Η έκφραση των γονιδίων ξεκινάει από μηδενικές τιμές. [48].

Οι σταθερές ρυθμού αντίδρασης αποτελούν τον πιο σημαντικό παράγοντα για την δημιουργία αξιόπιστων συνεχών μοντέλων. Η περιορισμένη διαθεσιμότητα αυτών στη βιβλιογραφία δημιουργεί ένα μεγάλο εμπόδιο για την καλύτερη κατανόηση γονιδιακών διεργασιών μέσω μαθηματικής μοντελοποίησης. Έτσι, μικρότερα μοντέλα που διαθέτουν μικρό αριθμό τέτοιων σταθερών θεωρούνται πιο αξιόπιστα. Είναι φανερό λοιπόν, πως η ώσμωση μεταξύ πειραματικών και υπολογιστικών προσεγγίσεων πρέπει να ενισχυθεί με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας της γονιδιακής ρύθμισης.

Τα συνεχή μοντέλα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για την περιγραφή του φαινομένου της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η επικράτηση της έκφρασης συγκεκριμένου γονιδίου ουσιαστικά προσδιορίζει τον εκάστοτε δρόμο διαφοροποίησης. Πέραν των σταθερών ρυθμού αντίδρασης το μοντέλο μπορεί να περιέχει και άλλες σταθερές που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού περιβάλλοντος.

### 3.1.3 Στοχαστικά δίκτυα

Η τρίτη κατηγορία μοντέλων εισήχθη μετά την παρατήρηση πως η λειτουργία των ρυθμιστικών δικτύων επηρεάζεται συχνά από θόρυβο (noise). Καθώς η πλειονότητα των μοντέλων αυτών περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεμονωμένων μορίων, συναντώνται στη βιβλιογραφία ως μονο-μοριακού επιπέδου μοντέλα (single-molecule level models). Ουσιαστικά περιγράφουν τη σχέση μεταξύ στοχαστικότητας και γονιδιακής ρύθμισης.

Κάθε βιολογικό δίκτυο, λόγω της στοχαστικότητας που το χαρακτηρίζει, μπορεί να εμφανίσει διαφορετική συμπεριφορά, ακόμα και όταν αυτό ξεκινήσει από τις ίδιες αρχικές συνθήκες [67]. Όταν ο αριθμός των εμπλεκόμενων μορίων κάθε είδους είναι μεγάλος, ο νόμος της μαζικής δράσης (mass action) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ακριβή υπολογισμό της μεταβολής των συγκεντρώσεων και ελάχιστη ή καθόλου στοχαστική επίδραση είναι παρατηρήσιμη. Ωστόσο, όταν ο αριθμός των μορίων είναι μικρός, σημαντικά στοχαστικά φαινόμενα ενδέχεται να εμφανισθούν. Σε ένα μεγάλο πλήθος πειραμάτων σε μεμονωμένα κύτταρα έχει αποδειχθεί την στοχαστική συμπεριφορά των διαδικασιών της μεταγραφής και μετάφρασης [73, 9, 119, 87]. Τα δύο πιο βασικά από αυτά αποτελούν τα παρακάτω:

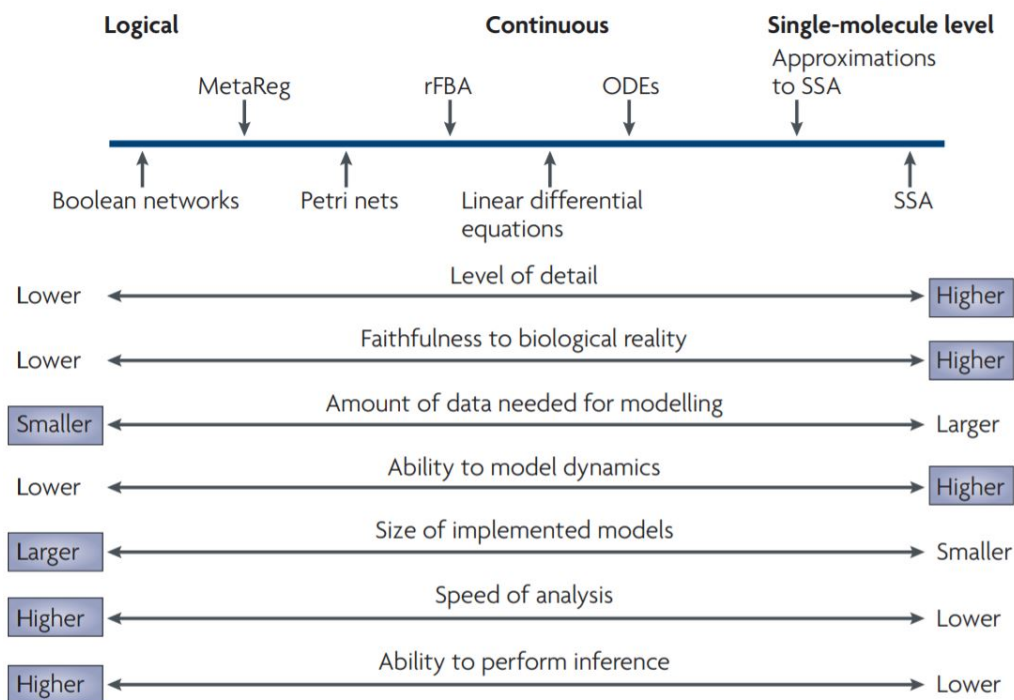
- **Αλγόριθμοι στοχαστικής προσομοίωσης (SSA)** - Οι McAdams και Arkin έδειξαν πως οι διακυμάνσεις στα χρονικά διαστήματα μεταξύ των βιοχημικών αντιδράσεων και συνεπώς στους χρόνους εμφάνισης ρυθμιστικών συμβάντων, μπορεί να εκφραστεί με ένα μοντέλο που περιγράφει τις βιοχημικές αντιδράσεις σε επίπεδο μεμονωμένου μορίου. Το μοντέλο είναι βασισμένο στον αλγόριθμο στοχαστικής προσομοίωσης (stochastic simulation algorithm ή SSA) του Gillespie [35]. Ο αλγόριθμος αυτός δέχεται ως είσοδο τον αρχικό αριθμό των μορίων (όπως πρωτεΐνες και mRNAs) και σταθερές πιθανότητας-αντίδρασης, και προσομοιώνει τη δυναμική του συστήματος. Η πιθανότητα αντίδρασης αναφέρεται στην πιθανότητα ένας συγκεκριμένος συνδυασμός μορίων να συμμετέχει σε μία αντίδραση στη διάρκεια ενός απειροελάχιστου χρονικού διαστήματος. Οι αλγόριθμοι SSA έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμοι για την περιγραφή της χρονικής εξέλιξης μικρών GRNs.
- **Προσεγγίσεις των αλγορίθμων SSA (τ-leaping)** - Οι αλγόριθμοι SSA απαιτούν τεράστια υπολογιστική ισχύ, καθώς προσομοιώνουν κάθε μεμονωμένη αντίδραση. Κατά συνέπεια, δεν είναι ιδανικοί για τη μοντελοποίηση μεγάλων δικτύων. Ως εκ τούτου, οι ερευνητές τροποποίησαν περαιτέρω τα SSA, θυσιάζοντας τη λεπτομέρεια για χάρη της ταχύτερης προσομοίωσης. Μέσω του τ-leaping δεν προσομοιώνεται κάθε αντίδραση αλλά αντιθέτως το μοντέλο κάνει άλματα χρονικού διαστήματος μεγέθους  $\tau$  και τυχαία επιλέγει τον αριθμό αντιδράσεων κάθε τύπου που συνέβησαν σε αυτό το διάστημα. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η ταχύτητα της αριθμητικής ανάλυσης.

Η στοχαστική φύση της γονιδιακής έκφρασης επηρεάζει την δυναμική του ρυθμιστικών δικτύων και αυτή η πτυχή του προβλήματος συνήθως δεν ενσωματώνεται στα συνεχή δίκτυα. Τα single-molecule level μοντέλα, είναι τα πιο λεπτομερή και μπορούν να περιγράψουν την στοχαστική συμπεριφορά για διάφορα σενάρια. Ταυτόχρονα ωστόσο, αποτελούν και τα πιο

απαιτητικά στην ανάλυσή τους. Επιπλέον η περιορισμένη ύπαρξη δεδομένων από στοχαστικά πειράματα στη βιβλιογραφία, καθιστά δύσκολη την δημιουργία ποιοτικών στοχαστικών μοντέλων.

### 3.1.4 Σύγκριση μεθόδων μοντελοποίησης

Η εισαγωγή νέων και ισχυρών πειραματικών μεθόδων για τη μελέτη του φαινομένου της ρύθμισης γονιδίων δημιούργησε ένα τεράστιο ενδιαφέρον για τη μοντελοποίηση ρυθμιστικών δικτύων. Η ποιότητα ενός μοντέλου μπορεί να εκτιμηθεί από την ομοιότητα της πρόβλεψής του με τα πειραματικά δεδομένα. Στο Κεφάλαιο αυτό παρουσιάστηκαν τρεις βασικές προσεγγίσεις μοντελοποίησης δικτύων. Μία σύγκριση των μεθόδων αυτών παρουσιάζεται στο Σχ. 3.5, στην κλίμακα του οποίου, το επίπεδο λεπτομέρειας αυξάνει από τα αριστερά προς τα δεξιά. Τα δίκτυα Boolean απαιτούν τη μικρότερη ποσότητα δεδομένων, ωστόσο μπορούν να περιγράψουν μόνο ποιοτικά τη δυναμική συμπεριφορά. Το MetaReg είναι πιο κοντά στη βιολογική πραγματικότητα επειδή μπορεί να εκφράσει ενδιαμέσου επιπέδου συγκεντρώσεις ρυθμιστών, αλλά απαιτεί περισσότερες γνώσεις για το δίκτυο και περιορίζεται στην ανάλυση λύσεων μόνιμης κατάστασης.



Σχήμα 3.5: Σχηματική σύγκριση των διαφόρων μεθόδων μοντελοποίησης γενετικών ρυθμιστικών δικτύων (Karlebach et al. 2008).

Τα Petri nets μπορούν να περιγράψουν πιο λεπτομερώς δίκτυα μεταβολισμού και σηματοδότησης και σε ένα βαθμό την δυναμική τους, η ανάλυση που προσφέρουν παρόλα αυτά παραμένει ποιοτική. Η Regulated Flux Balance ανάλυση είναι ικανή για μεταβολικές προβλέψεις που μπορούν να συγκριθούν με πειραματικές μετρήσεις, αλλά απαιτεί αρκετές βιο-

χημικές γνώσεις. Οι γραμμικές διαφορικές εξισώσεις μπορούν να μοντελοποιήσουν και να προβλέψουν πειραματικά παρατηρούμενες συγκεντρώσεις ρυθμιστικών οντοτήτων και ξεχωρίζουν από τα προηγούμενα μοντέλα ως προς την δυνατότητα τους για πιο λεπτομερή δυναμική ανάλυση. Γενικά, οι μη-γραμμικές συνήθεις διαφορικές εξισώσεις (ODEs) είναι πιο συνεπείς με τους βιοχημικούς μηχανισμούς από τις γραμμικές ODEs, αλλά είναι πιο δύσκολες στην ανάλυση τους. Τέλος, τα single-molecule level models, τα πιο λεπτομερή όλων, μπορούν να συμπεριλάβουν τη στοχαστικότητα, αλλά είναι υπολογιστικά δαπανηρά. Για την αντιμετώπιση αυτού του υπολογιστικού κόστους, αναπτύχθηκαν οι προσεγγίσεις αλγόριθμων στοχαστικής προσομοίωσης (SSA), οι οποίες θυσιάζουν ορισμένο βαθμό λεπτομέρειας με σκοπό την καλύτερη απόδοση.





## Κεφάλαιο 4

# Μη-Γραμμική Δυναμική

Η μη-γραμμική δυναμική <sup>1</sup> αποτελεί κλάδο των μαθηματικών και ουσιαστικά ασχολείται με την μελέτη συστημάτων συνήθων ή μερικών διαφορικών εξισώσεων. Περισσότερη έμφαση δίνεται στις ποιοτικές πτυχές της δυναμικής όπως για παράδειγμα το αν ένα σύστημα εξισώσεων εμφανίζει λύσεις μόνιμης κατάστασης με πολλαπλή ευστάθεια, περιοδικές ή πιο περίπλοκες λύσεις όπως χαοτικές. Επιπλέον έμφαση δίνεται στην εύρεση κρίσιμων σημείων τα οποία οριοθετούν απότομες αλλαγές στην συμπεριφορά των συστημάτων. Η ανάλυση τέτοιων φαινομένων πραγματοποιείται μέσω της θεωρίας διακλαδώσεων.

### 4.1 Δυναμικά συστήματα και βασικές έννοιες

Τα δυναμικά συστήματα αποτελούν τον μαθηματικό φορμαλισμό της γενικής επιστημονικής ιδέας του ντετερμινισμού (Kuznetsov 2013 [59]). Οι μελλοντικές και παρελθοντικές καταστάσεις πολλών φυσικών, χημικών, βιολογικών, οικολογικών, οικονομικών ακόμα και κοινωνικών συστημάτων μπορούν να προβλεφθούν σε ένα βαθμό έχοντας ως δεδομένη την παρούσα κατάσταση και τους νόμους που διέπουν την εξέλιξή του. Έτσι, ένα δυναμικό σύστημα περιλαμβάνει ένα σύνολο πιθανών καταστάσεων-λύσεων (state space) και ένα νόμο για την εξέλιξη του (evolution) στο χρόνο.

Μία σύντομη περιγραφή των πιο σημαντικών εννοιών που εμφανίζονται κατά τη μελέτη δυναμικών συστημάτων γίνεται παρακάτω.

- **Τροχιά** (orbit) - σε ένα σύστημα συνεχές στο χρόνο (continuous-time) οι τροχιές αποτελούν καμπύλες στον χώρο καταστάσεων/φάσεων παραμετροποιημένες από τον χρόνο και με αύξουσα κατεύθυνση (βλ. Σχ. 4.1).
- **Διάγραμμα φάσης** (phase portrait) - παρουσιάζει γραφικά την δυναμική συμπεριφορά του συστήματος σε μια περιοχή του παραμετρικού χώρου με άξονες του διαγράμματος τις 'φάσεις' του συστήματος, δηλαδή τις μεταβλητές του. Ουσιαστικά απεικονίζει τον

---

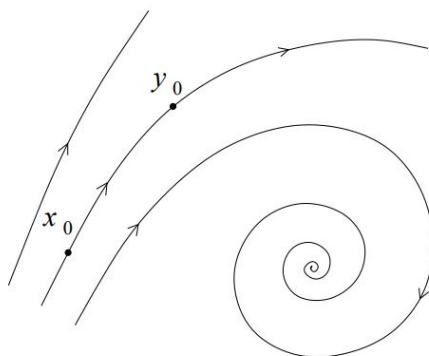
<sup>1</sup>Η θεωρία και οι εφαρμογές του Κεφαλαίου αυτού βασίζονται στα βιβλία *Elements of Applied Bifurcation Theory* του Yuri A. Kuznetsov [59], *Nonlinear Dynamics in Physiology and Medicine* των Anne Beuter *et al.* [6] και *Nonlinear Dynamics and Chaos* του Steven H. Strogatz [102].

αριθμό και τύπο των καταστάσεων τις οποίες το σύστημα προσεγγίζει ασυμπτωτικά καθώς  $t \rightarrow \pm\infty$ . Καθώς είναι αδύνατο να σχεδιασθούν όλες οι πιθανές τροχιές σε ένα διάγραμμα, επιλέγονται ορισμένες για την σχηματική αναπαράσταση (δες Σχ. 4.1). Το διάγραμμα φάσης ενός συνεχούς συστήματος μπορεί να παρομοιασθεί με την εικόνα ροής ενός ρευστού, όπου οι καμπύλες δείχνουν τις τροχιές που ακολουθούν τα σωματίδια.

- **Σημείο ισορροπίας** (fixed points) - αφορά σε μία κατάσταση η οποία παραμένει σταθερή στο χρόνο. Πολλές φορές χρησιμοποιούνται και οι όροι λύσεις *μόνιμης κατάστασης* ή και *ισορροπίας*.
- **Ταλάντωση** (oscillation) - αφορά σε λύσεις οι οποίες επαναλαμβάνονται περιοδικά στο χρόνο. Στο διάγραμμα φάσεων, μία ταλάντωση αναπαρίσταται από μία απομονωμένη κλειστή τροχιά που ονομάζεται *οριακός κύκλος*.
- **Ευστάθεια** (stability) - είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται σε διαφορετικές περιπτώσεις. Η *τοπική* ευστάθεια υποδηλώνει επιστροφή του συστήματος σε οριακό κύκλο ή σημείο ισορροπίας μετά από μικρές διαταραχές στις μεταβλητές κατάστασης. Η *ολική* ευστάθεια υποδηλώνει επιστροφή του συστήματος σε οριακό κύκλο ή σημείο ισορροπίας μετά από (όχι απαραίτητα μικρές) διαταράξεις. Η *δομική* ευστάθεια αναφέρεται στην ευστάθεια των δυναμικών χαρακτηριστικών του συστήματος, μετά από αλλαγές στο ίδιο το σύστημα.
- **Διακλάδωση** (bifurcation) - αναφέρεται στην ποιοτική αλλαγή των τοπολογικών χαρακτηριστικών του συστήματος καθώς οι παράμετροί του μεταβάλλονται. Έτσι για παράδειγμα, ένα σημείο ισορροπίας μπορεί να χάσει την ευστάθειά του ή ένας οριακός κύκλος ενδέχεται να εμφανισθεί.
- **Χάος** (chaos) - αναφέρεται σε σύστημα του οποίου η συμπεριφορά μεταβάλλεται ακανόνιστα στο χρόνο. Παρόλα αυτά η ακανόνιστη συμπεριφορά δεν συνεπάγεται αυτομάτως και χαοτική συμπεριφορά. Στη μη-γραμμική δυναμική το χάος εμφανίζεται ως ντετερμινιστικό και ουσιαστικά αναφέρεται σε συστήματα με μεγάλη ευαισθησία στις αρχικές συνθήκες. Κάθε μικρή αβεβαιότητα στις αρχικές συνθήκες, αυξάνεται σε βάνθος χρόνου και έτσι καθιστά αδύνατη την μακροπρόθεσμη προβλεψη.

## 4.2 Μη-Γραμμικές Διαφορικές Εξισώσεις

Στην ενότητα αυτή γίνεται μία παρουσίαση των βασικών μεθοδολογιών για την ποιοτική ανάλυση δυναμικών συστημάτων μη-γραμμικών συνήθων διαφορικών εξισώσεων. Δίνεται έμφαση στον υπολογισμό των ελκυστών (σημεία ισορροπίας και ταλαντώσεις), της ευστάθειας αυτών καθώς και παρουσιάζονται κάποιες εφαρμογές πραγματικών βιολογικών συστημάτων με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της θεωρίας.



Σχήμα 4.1: Χαρακτηριστικές τροχιές ενός συνεχούς στο χρόνο (continuous-time) συστήματος.

### 4.2.1 Τοπολογική ισοδυναμία δυναμικών συστημάτων

Ο στόχος της μη-γραμμικής δυναμικής είναι η μελέτη των ποιοτικών αλλά και ποσοτικών χαρακτηριστικών δυναμικών συστημάτων. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων απόκρισης καθώς και σύγκριση της συμπεριφοράς διαφορετικών δυναμικών συστημάτων. Έτσι, θεωρείται απαραίτητη η διατύπωση ενός ορισμού για την ισοδυναμία δύο δυναμικών συστημάτων η οποία υποδηλώνει την ποιοτική ομοιοτητα μεταξύ αυτών. Ένας τέτοιος ορισμός θα πρέπει να υπακούει και σε κάποια ενστικτώδη κριτήρια. Για παράδειγμα, θεωρείται φυσικό πως δύο ισοδύναμα συστήματα παρουσιάζουν το ίδιο πλήθος σημείων ισορροπίας και οριακών κύκλων και του ίδιου τύπου ευστάθειας. Η σχετική θέση των αναλλοιώτων συνόλων καθώς και του σχήματος των ελκυστών πρέπει να είναι παρόμοια σε ισοδύναμα συστήματα. Με άλλα λόγια, θεωρούμε δύο συστήματα ισοδύναμα, αν τα διαγράμματα φάσης τους είναι ποιοτικά παρόμοια δηλαδή εάν το ένα διάγραμμα φάσης μπορεί να ληφθεί από έναν συνεχή μετασχηματισμό του άλλου.

**Ορισμός 4.1.** Ένα δυναμικό σύστημα  $\{T, \mathbb{R}^n, \phi^t\}$  ονομάζεται τοπολογικά ισοδύναμο με ένα δυναμικό σύστημα  $\{T, \mathbb{R}^n, \psi^t\}$  εάν υπάρχει ομοιομορφισμός <sup>2</sup>  $h : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$  ο οποίος απεικονίζει τις τροχιές του πρώτου συστήματος σε τροχιές του δεύτερου, διατηρώντας την κατεύθυνση του χρόνου [59].

Πολύ συχνά στην δυναμική μελετάμε συστήματα τοπικά, δηλαδή όχι σε όλο τον χώρο  $\mathbb{R}^n$  αλλά σε μία περιοχή  $U \subset \mathbb{R}^n$ . Μία τέτοια μπορεί να είναι για παράδειγμα, η περιοχή γειτονικά ενός σημείου ισορροπίας ή ενός οριακού κύκλου. Ο ορισμός της τοπολογικής ισοδυναμίας (4.1) μετασχηματίζεται για τις αντίστοιχες τοπικές περιοχές των διαγραμμάτων φάσης όπως φαίνεται παρακάτω.

**Ορισμός 4.2.** Ένα δυναμικό σύστημα  $\{T, \mathbb{R}^n, \phi^t\}$  ονομάζεται τοπολογικά και τοπικά ισοδύναμο κοντά σε ένα σημείο ισορροπίας  $x_0$  με ένα δυναμικό σύστημα  $\{T, \mathbb{R}^n, \psi^t\}$  κοντά σε ένα σημείο ισορροπίας  $y_0$  εάν υπάρχει ομοιομορφισμός  $h : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$  ο οποίος:

<sup>2</sup>Ο ομοιομορφισμός είναι μία αντιστρέψιμη απεικόνιση, όπου η ίδια αλλά και η αντίστροφη της είναι συνεχής.

- (i) ορίζεται σε μία μικρή γειτονική περιοχή  $U \subset \mathbb{R}^n$  του  $x_0$ .
- (ii) ικανοποιεί τη σχέση  $y_0 = h(x_0)$ .
- (iii) απεικονίζει τροχιές του πρώτου συστήματος στο  $U$ , σε τροχιές του δεύτερου συστήματος στο  $V = f(U) \subset \mathbb{R}^n$ , διατηρώντας την κατεύθυνση του χρόνου.

Εάν  $U$  είναι μια ανοιχτή περιοχή γειτονικά του  $x_0$ , τότε  $V$  είναι αντίστοιχα μία περιοχή του  $y_0$ . Σημειώνεται πως οι θέσεις των σημείων ισορροπίας  $x_0$  και  $y_0$ , καθώς και οι περιοχές  $U$  και  $V$ , ενδέχεται να συμπίπτουν.

#### 4.2.2 Υπερβολικά σημεία ισορροπίας

Ο πιο σύνηθες τρόπος περιγραφής ενός συνεχούς δυναμικού συστήματος είναι μέσω διαφορικών εξισώσεων. Έστω πως ο χώρος καταστάσεων ενός συστήματος είναι  $X = \mathbb{R}^n$  με συντεταγμένες  $(x_1, x_2, \dots, x_n)$ . Αν το σύστημα ορίζεται πάνω σε μία πολλαπλότητα, τότε αυτές μπορούν να θεωρηθούν τοπικές συντεταγμένες αυτής. Ο νόμος της εξέλιξης του συστήματος δίνεται έμμεσα, ως προς τις ταχύτητες  $\dot{x}_i$  σαν συνάρτηση των συντεταγμένων  $(x_1, x_2, \dots, x_n)$ :

$$\dot{x}_i = f_i(x_1, x_2, \dots, x_n), \quad i = 1, 2, \dots, n, \quad (4.1)$$

ή στη διανυσματική μορφή

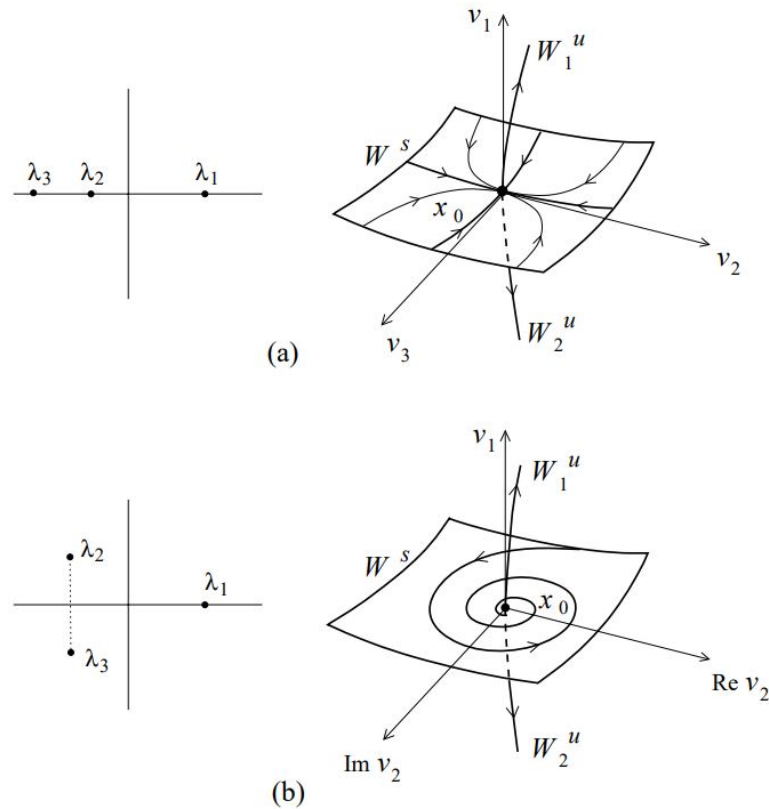
$$\dot{x} = f(x), \quad (4.2)$$

όπου η διανυσματική συνάρτηση  $f : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$  θεωρείται επαρκώς διαφορίσιμη. Η συνάρτηση του δεξιού μέλους της Εξ. 4.2 ονομάζεται *διανυσματικό πεδίο* καθώς αντιστοιχεί σε κάθε σημείο  $x$  ένα διάνυσμα  $f(x)$ . Η Εξ. 4.2 αναπαριστά ένα σύστημα *αυτόνομων συνήθων διαφορικών εξισώσεων* (ODEs).

Έστω  $x^* = 0$  ένα σημείο ισορροπίας του συστήματος ( $f(x^*) = 0$ ) και  $A$  η Ιακωβιανή  $\frac{df}{dx}$  υπολογισμένη στο  $x^*$ . Έστω  $n_-, n_0$  και  $n_+$  το πλήθος των ιδιοτιμών του  $A$  με αρνητικό, μηδέν και θετικό πραγματικό μέρος αντίστοιχα.

**Ορισμός 4.3.** Ένα σημείο ισορροπίας λέγεται *υπερβολικό* εάν  $n_0 = 0$ , δηλαδή εάν δεν υπάρχουν ιδιοτιμές πάνω στον άξονα των φανταστικών αριθμών. Ένα υπερβολικό σημείο ισορροπίας ονομάζεται *υπερβολικό σάγμα* εάν  $n_- n_+ \neq 0$ .

Ως παράδειγμα παρουσιάζονται δύο περιπτώσεις υπερβολικών σημείων ισορροπίας στον χώρο  $\mathbb{R}^3$ . Έστω  $x^*$  ένα υπερβολικό σημείο ισορροπίας (δηλαδή  $n_0 = 0$ ) με  $n_- = 2$  και  $n_+ = 1$  ( $n_- + n_+ = n = 3$ ). Στο Σχ. 4.2 παρατηρούμε δύο αναλλοίωτες πολλαπλότητες να περνάνε μέσα από τα σημεία ισορροπίας, η δισδιάστατη πολλαπλότητα  $W^s(x^*)$  και η μονοδιάστατη  $W^u(x^*)$  η οποία αποτελείται από τις  $W_1^u(x^*)$ ,  $W_2^u(x^*)$ . Όλες οι τροχιές που δεν ανήκουν σε αυτές τις πολλαπλότητες περνάνε κοντά από το σημείο ισορροπίας και τελικά απομακρύνονται στις δύο κατευθύνσεις του χρόνου.



Σχήμα 4.2: (a) Σάγμα και (b) σάγμα-εστία σε ένα δυναμικό σύστημα στο χώρο  $\mathbb{R}^3$ . Τα διανύσματα  $v_i$  αποτελούν τα ιδιοδιανύσματα των ιδιοτιμών  $\lambda_i$  (Kuznetsov 2013).

**Σημείωση:** Τα αναλλοίωτα σύνολα  $W^s$  και  $W^u$  είναι πολλαπλότητες διαστάσεων  $n_-$  και  $n_+$  αντίστοιχα και έχουν τις ίδιες ιδιότητες με την ομαλή συνάρτηση  $f$ . Έτσι τα σύνολα  $W^s$  και  $W^u$  ονομάζονται *ευσταθείς* και *ασταθείς αναλλοίωτες πολλαπλότητες του  $x^*$* , αντίστοιχα.

Στο Σχ. 4.2 (a) στο οποίο παρατηρούμε τρεις πραγματικές ιδιοτιμές ( $\lambda_3 < \lambda_2 < 0 < \lambda_1$ ), οι τροχιές πάνω στην πολλαπλότητα  $W^s(x_0)$  δημιουργούν έναν κόμβο, ενώ στο (b) εμφανίζονται μιγαδικές ιδιοτιμές ( $\text{Re } \lambda_{2,3} < 0 < \lambda_1, \text{Re } \lambda_3 = \text{Re } \lambda_2$ ), και στην πολλαπλότητα  $W^s(x_0)$  εμφανίζεται μία εστία. Στην πρώτη περίπτωση λοιπόν, το σημείο ισορροπίας ονομάζεται και *σάγμα* (saddle), ενώ στην δεύτερη ονομάζεται *σάγμα-εστία* (saddle-focus). Σημειώνεται πως τα σημεία αυτά είναι τοπολογικά ισοδύναμα.

Το επόμενο θεώρημα δίνει την τοπολογική κατηγοριοποίηση των υπερβολικών σημείων ισορροπίας.

**Θεώρημα 4.1.** Τα διαγράμματα φάσης ενός συστήματος (4.1) γειτονικά δύο υποεργολικών σημείων ισορροπίας,  $x^*$  και  $y^*$ , είναι τοπολογικά ισοδύναμα αν και μόνο αν αυτά τα σημεία έχουν τον ίδιο αριθμό  $n_-$  και  $n_+$  ιδιοτιμών με  $\text{Re } \lambda < 0$  και  $\text{Re } \lambda > 0$  αντίστοιχα.  $\diamond$ .

Συχνά, τα σημεία ισορροπίας  $x^*$  και  $y^*$  ονομάζονται και τοπολογικά ισοδύναμα. Η απόδειξη του θεωρήματος αυτού είναι βασισμένο σε δύο ιδέες. Η πρώτη βασίζεται στο παρακάτω θεώρημα γνωστό και ως θεώρημα Hartman-Grobman (Kuznetsov, 2013):

**Θεώρημα 4.2. (Hartman-Grobman)** Το τοπικό διάγραμμα φάσεων ενός μη-γραμμικού συστήματος (4.1) κοντά σε ένα υπερβολικό σημείο ισορροπίας, είναι τοπολογικά ισοδύναμο με το διάγραμμα φάσης του γραμμικοποιημένου συστήματος.

Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να εφαρμοσθεί γειτονικά και των δύο σημείων ισορροπίας  $x^*$  και  $y^*$ . Δεύτερον, επίσης αποδεικνύεται πως υπάρχει τοπολογική ισοδυναμία μεταξύ δύο γραμμικών συστημάτων με τον ίδιο αριθμό ιδιοτιμών με αρνητικό και θετικό πραγματικό μέρος και καμία ιδιοτιμή στον φανταστικό άξονα.

### 4.2.3 Γραμμικοποίηση και ευστάθεια

Με βάση όλα τα προηγούμενα, στη συνέχεια παρουσιάζεται η μεθοδολογία για την γραμμικοποίηση συστημάτων γύρω από υπερβολικά σημεία ισορροπίας, η οποία επιτρέπεται με βάση το Θεώρημα 4.2 (Hartman-Grobman), με σκοπό τη μελέτη ευστάθειας αυτών για βαθμωτά και επίπεδα δυναμικά συστήματα.

#### ▷ Βαθμωτά συστήματα

Έστω η μονοδιάστατη μη-γραμμική διαφορική εξίσωση της μορφής

$$\frac{dx}{dt} = f(x) \quad (4.3)$$

Για τη μελέτη της Εξ. 4.3 ακολουθούμε μία διαδικασία ιδιαίτερα χρήσιμη για μεγαλύτερα συστήματα, αυτή της γραμμικοποίησης της συνάρτησης  $f(x)$  του δεξιού μέλους της Εξ. 4.3.

Έστω τιμές του  $x$  κοντά στο σημείο ισορροπίας  $x^*$ . Αν θεωρήσουμε  $X(t) = x(t) - x^*$ , η κλίση στο σημείο ισορροπίας δίνεται από την παράγωγο  $f'(x^*)$  και η γραμμικοποίηση δίνει

$$\frac{dX}{dt} = [f'(x^*)]X = \alpha X \quad (4.4)$$

όπου  $\alpha = f'(x^*)$ . Η Εξ. 4.4 αποτελεί μία γραμμική διαφορική εξίσωση. Τις περισσότερες φορές, τέτοιες εξισώσεις έχουν σαν λύσεις τους εκθετικές συναρτήσεις. Έτσι, η γενική μορφή της λύσης είναι  $Ke^{\alpha t}$ . Μία τέτοια συνάρτηση, τείνει στο 0 κατά απόλυτη τιμή, όταν  $\alpha < 0$ , ενώ απειρίζεται όταν  $\alpha > 0$ . Το σημείο ισορροπίας  $x^*$  είναι επομένως τοπικά ευσταθές όταν  $f'(x^*) < 0$ , και ασταθές όταν  $f'(x^*) > 0$ . Οι εξισώσεις αυτές δεν παρουσιάζουν ταλαντώσεις ή χάος καθώς τέτοιες δυναμικές συμπεριφορές απαιτούν περισσότερες μεταβλητές/διαστάσεις ( $\geq 2$ ).

#### ▷ Συστήματα στο επίπεδο

Η δυναμική μεγαλύτερων σε διαστάσεις συστημάτων παρουσιάζει περισσότερο ενδιαφέρον. Στη συνέχεια παρουσιάζεται σε ένα σύστημα δύο συνήθων διαφορικών εξισώσεων, η διαδικασία για την εύρεση του τύπου αλλά και της ευστάθειας των υπερβολικών σημείων ισορροπίας. Η ίδια διαδικασία εφαρμόζεται και σε μεγαλύτερα δυναμικά συστήματα, για τα οποία η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι πιο περίπλοκη.

Έστω ένα σύστημα συνήθων διαφορικών εξισώσεων της μορφής

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= f(x, y) \\ \frac{dy}{dt} &= g(x, y)\end{aligned}\quad (4.5)$$

όπου  $f(x, y)$  και  $g(x, y)$  είναι μη-γραμμικές συναρτήσεις.

Παρόμοια με την ανάλυση ευστάθειας για τις μονοδιάστατες συνήθεις διαφορικές εξισώσεις, εξετάζουμε τη δυναμική της Εξ. 4.5 σε μία περιοχή γύρω από το σημείο ισορροπίας  $(x^*, y^*)$ . Εξ ορισμού, ένα σημείο ισορροπίας  $(x^*, y^*)$  ικανοποιεί τις σχέσεις  $f(x^*, y^*) = g(x^*, y^*) = 0$ . Προσεγγίζουμε τις μη-γραμμικές εξισώσεις  $f(x, y)$  και  $g(x, y)$  σε μία περιοχή γύρω του σημείου  $(x^*, y^*)$  μέσω ανάλυσης σε σειρές Taylor. Για την συνάρτηση  $f(x, y)$  θα έχουμε

$$f(x, y) = f(x^*, y^*) + \left. \frac{\partial f}{\partial x} \right|_{x^*, y^*} (x - x^*) + \left. \frac{\partial f}{\partial y} \right|_{x^*, y^*} (y - y^*) + \dots \quad (4.6)$$

όπου οι τελείες αναπαριστούν όρους ανώτερης τάξης. Αν τώρα μετασχηματίσουμε τους αγνώστους ως

$$X = x - x^*, \quad Y = y - y^* \quad (4.7)$$

όπου  $X$  και  $Y$  τις διαφορές των λύσεων από τις λύσεις μόνιμης κατάστασης. Έτσι οι Εξ. 4.6 γράφονται ως

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= AX + BY + \dots \\ \frac{dY}{dt} &= CX + DY + \dots\end{aligned}\quad (4.8)$$

όπου

$$\begin{aligned}A &= \left. \frac{\partial f}{\partial x} \right|_{x^*, y^*}, & B &= \left. \frac{\partial f}{\partial y} \right|_{x^*, y^*} \\ C &= \left. \frac{\partial g}{\partial x} \right|_{x^*, y^*}, & D &= \left. \frac{\partial g}{\partial y} \right|_{x^*, y^*}\end{aligned}\quad (4.9)$$

Η Εξ. 4.8 μπορεί να γραφτεί σε μητρική μορφή ως

$$\begin{pmatrix} \frac{dX}{dt} \\ \frac{dY}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix} \quad (4.10)$$

Ορίζουμε τώρα δύο μεταβλητές  $\xi$  και  $\eta$ , έτσι ώστε για κάποιες σταθερές  $\alpha, \beta, \gamma$  και  $\delta$  θα ισχύουν οι παρακάτω σχέσεις

$$\begin{aligned}X &= \alpha\xi + \beta\eta \\ Y &= \gamma\xi + \delta\eta\end{aligned}\quad (4.11)$$

και επιπλέον

$$\begin{pmatrix} \frac{d\xi}{dt} \\ \frac{d\eta}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \xi \\ \eta \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

Το παραπάνω σύστημα είναι πολύ πιο απλό στην επίλυσή του καθώς αποτελείται από τις δύο αποσυζευγμένες εξισώσεις

$$\frac{d\xi}{dt} = \lambda_1 \xi, \quad \frac{d\eta}{dt} = \lambda_2 \eta \quad (4.13)$$

καθεμία από τις οποίες είναι μονοδιάστατη. Γνωρίζουμε λοιπόν πως οι δύο αυτές εξισώσεις έχουν τη λύση  $\xi(t) = K_\xi e^{\lambda_1 t}$  και  $\eta(t) = K_\eta e^{\lambda_2 t}$ . Για την εύρεση των  $\lambda_1$  και  $\lambda_2$  λύνεται το πρόβλημα ιδιοτιμών όπως φαίνεται παρακάτω.

$$\det \begin{vmatrix} A - \lambda & B \\ C & D - \lambda \end{vmatrix} = 0, \quad (4.14)$$

από την οποία προκύπτει η παρακάτω χαρακτηριστική εξίσωση

$$\lambda^2 - (A + D)\lambda + (AD - BC) = 0 \quad (4.15)$$

Οι δύο λύσεις που προκύπτουν, γνωστές και ως χαρακτηριστικές ρίζες ή ιδιοτιμές, είναι

$$\lambda_1 = \frac{A + D}{2} + \frac{\sqrt{(A - D)^2 + 4BC}}{2}$$

$$\lambda_2 = \frac{A + D}{2} - \frac{\sqrt{(A - D)^2 + 4BC}}{2}$$

Οι λύσεις της Εξ. 4.10 τελικά δίνονται από τις σχέσεις

$$\begin{aligned} X(t) &= K_1 e^{\lambda_1 t} + K_2 e^{\lambda_2 t} \\ Y(t) &= K_3 e^{\lambda_1 t} + K_4 e^{\lambda_2 t} \end{aligned} \quad (4.16)$$

όπου  $K_1, K_2, K_3$  και  $K_4$  είναι σταθερές οι οποίες τυπικά υπολογίζονται από τις αρχικές συνθήκες.

Ένας τρόπος παρουσίασης των λύσεων  $x$  και  $y$ , είναι ως συναρτήσεις του χρόνου. Εναλλακτικά, ο χρόνος μπορεί να θεωρηθεί μία έμμεση μεταβλητή και οι να σχεδιασθεί η εξέλιξη των  $x$  και  $y$  στο  $(x, y)$  επίπεδο, δηλαδή στο χώρο φάσεων. Ξεκινώντας από μία αρχική συνθήκη  $x(0), y(0)$  καθορίζονται οι τροχιές μέσω των εξισώσεων. Οι τροχιές αυτές έχουν συγκεκριμένη γεωμετρία γειτονικά των σημείων ισορροπίας και κατηγοριοποιούνται μέσω των γραμμικοποιημένων εξισώσεων.

Υπάρχουν τρία βασικά είδη ροών γειτονικά των σημείων ισορροπίας στο επίπεδο:

- **Εστία ή σπείρα (focus or spiral).**  $\Delta < 0$ . Οι ιδιοτιμές  $\lambda_1, \lambda_2$  είναι μιγαδικοί αριθμοί. Οι τροχιές γύρω από το σημείο ισορροπίας έχουν σπειροειδή μορφή. Το φανταστικό μέρος των ιδιοτιμών καθορίζει την ένταση της σπείρας. Εάν το πραγματικό μέρος των ιδιοτιμών είναι αρνητικό δηλαδή  $\frac{A+D}{2} < 0$ , η εστία είναι ευσταθής ενώ εάν



$\frac{A+D}{2} > 0$  η εστία είναι ασταθής. Στην ειδική περίπτωση όπου  $\frac{A+D}{2} = 0$  και επομένως οι ιδιοτιμές είναι καθαρά φανταστικές, το σημείο ισορροπίας είναι **κέντρο** (center).

- **Κόμβος (node)**.  $\Delta > 0$ . Οι ιδιοτιμές  $\lambda_1, \lambda_2$  είναι πραγματικές και ομόσημες. Εάν είναι και οι δύο αρνητικές ( $\lambda_1, \lambda_2 < 0$ ) τότε ο κόμβος είναι ευσταθής ενώ εάν είναι θετικές ( $\lambda_1, \lambda_2 > 0$ ) ο κόμβος είναι ασταθής.
- **Σάγμα (saddle)**.  $\Delta > 0$ . Οι ιδιοτιμές  $\lambda_1, \lambda_2$  είναι πραγματικές και ετερόσημες. Το σάγμα θεωρείται ασταθές.

Υπάρχουν και δύο ακόμα χαρακτηριστικές περιπτώσεις ροών (λιγότερο εμφανιζόμενες) αυτή του *νόθου* ή *εκφυλισμένου κόμβου* (degenerate node) και της *γραμμής σημείων ισορροπίας* με την αντίστοιχη ευσταθή και ασταθή εκδοχή αυτών όπου οι τροχιές προσεγγίζουν ή απομακρύνονται αντίστοιχα από το/τα σημείο/α ισορροπίας.

$(n_+, n_-)$	Ιδιοτιμές	Διάγραμμα φάσης	Ευστάθεια	
(0, 2)			κόμβος	ευσταθής
			εστία	
(1, 1)			σάγμα	ασταθής
(2, 0)			κόμβος	ασταθής
			εστία	

Σχήμα 4.3: Τοπολογική κατηγοριοποίηση υπερβολικών σημείων ισορροπίας γραμμικοποιημένων δυναμικών συστημάτων στο επίπεδο (Kuznetsov 2013).

Η τοπολογική κατηγοριοποίηση απεικονίζεται στο Σχ. 4.3. Ανάλογα με τις ιδιοτιμές της Ιακωβιανής στο σημείο ισορροπίας, στο διάγραμμα φάσης μπορεί να υπάρξει κόμβος, σπείρα ή σάγμα. Ενώ το σάγμα είναι ασταθές, ο κόμβος και η σπείρα μπορεί να είναι ευσταθείς ή και ασταθείς.

**Ορισμός 4.4.** Οι κόμβοι και οι εστίες ονομάζονται και αντί-σάγματα (antisaddles). Στο επίπεδο, τα ευσταθή σημεία ισορροπίας έχουν διδιάστατες ευσταθείς πολλαπλότητες ενώ δεν έχουν ασταθείς πολλαπλότητες. Το αντίστροφο ισχύει για τα ασταθή σημεία ισορροπίας. Τέλος, τα σάγματα έχουν μονοδιάστατες ευσταθείς και ασταθείς πολλαπλότητες, που ενίοτε ονομάζονται και *separatrices*.

#### 4.2.4 Τοπικές διακλαδώσεις (Local bifurcations)

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα δυναμικά συστήματα τα οποία μελετάμε εμπεριέχουν σε μικρές η μεγάλες μεταβολές των ποιοτικών χαρακτηριστικών του. Στη μη-γραμμική δυναμική η διαδικασία ανάλυσης συστημάτων ως προς τις παραμέτρους αυτών ονομάζεται *ανάλυση Διακλάδωσης*.

Ας υποθέσουμε ένα σύστημα το οποίο εξαρτάται από ένα πλήθος παραμέτρων της μορφής

$$\dot{x} = f(x, \alpha), \quad (4.17)$$

όπου  $x \in \mathbb{R}^n$  και  $\alpha \in \mathbb{R}^m$  αντιπροσωπεύουν μεταβλητές και παραμέτρους αντίστοιχα. Μεταβολές των παραμέτρων οδηγούν και σε μεταβολές του διαγράμματος φάσης. Το σύστημα είτε παραμένει τοπολογικά ισοδύναμο με το αρχικό, είτε η τοπολογία του αλλάζει.

**Ορισμός 4.5.** Η εμφάνιση ενός τοπολογικά μη-ισοδύναμου διαγράμματος φάσης μετά από μεταβολές στις παραμέτρους του συστήματος ονομάζεται διακλάδωση (bifurcation).

Έστω  $x = x_0$  ένα υπερβολικό σημείο ισορροπίας του συστήματος 4.17 για  $\alpha = \alpha_0$ . Κάτω από μικρές μεταβολές στις παραμέτρους το σημείο ισορροπίας μετακινείται αλλά παραμένει υπερβολικό. Έτσι μπορούμε να μεταβάλλουμε τις τιμές των παραμέτρων και να παρακολουθούμε τα σημεία ισορροπίας. Είναι προφανές, πως υπάρχουν δύο τρόποι για την παραβίαση της συνθήκης της υπερβολικότητας. Είτε μία πραγματική ιδιοτιμή να πλησιάσει το μηδέν και να έχουμε  $\lambda_1 = 0$ , είτε για ένα ζεύγος ιδιοτιμών να έχουμε  $\lambda_{1,2} = \pm i\omega_0$ ,  $\omega_0 > 0$  για κάποια τιμή των παραμέτρων.

Επομένως, διακλάδωση είναι η αλλαγή στα τοπολογικά χαρακτηριστικά του συστήματος καθώς οι παράμετροι διαπερνούν ένα (κρίσιμο) σημείο διακλάδωσης. Στη συνέχεια, θα παρουσιασθούν οι δύο βασικοί τύποι διακλάδωσης (fold για βαθμωτά συστήματα και Andronov-Hopf για επίπεδα) που συναντώνται σε πολλά γνωστά δυναμικά συστήματα και θα εισαχθεί και η έννοια του οριακού κύκλου.

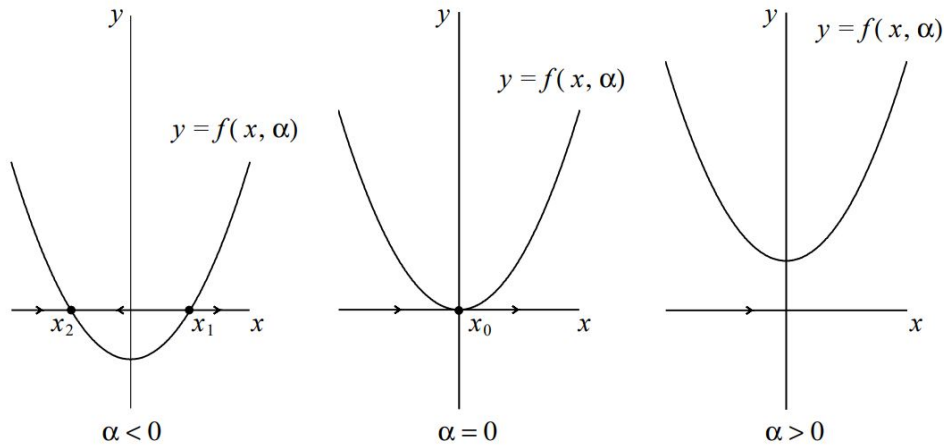
#### ▷ Κανονικές μορφές διακλάδωσης στη μία διάσταση

Ας θεωρήσουμε το παρακάτω βαθμωτό σύστημα το οποίο εξαρτάται από μία παράμετρο:

$$\dot{x} = \alpha + x^2 \equiv f(x, \alpha) \quad (4.18)$$

Για  $\alpha = 0$  το σύστημα παρουσιάζει μη-υπερβολικό σημείο ισορροπίας  $x_0 = 0$  με  $\lambda = f_x(0, 0) = 0$ . Η συμπεριφορά του συστήματος για όλες τις υπόλοιπες τιμές του  $\alpha$  παρουσιάζεται στο Σχ. 4.4.

Για  $\alpha < 0$  υπάρχουν δύο σημεία ισορροπίας στο σύστημα:  $x_{1,2} = \pm\sqrt{-\alpha}$ , με το αριστερά να είναι ευσταθές ενώ το δεξιά ασταθές. Για  $\alpha > 0$  δεν υπάρχουν σημεία ισορροπίας στο σύστημα. Καθώς το  $\alpha$  περνάει το μηδέν τα δύο σημεία ισορροπίας ενώνονται και εν συνεχεία



Σχήμα 4.4: Διακλάδωση τύπου σάγματος-κόμβου (saddle-node).

εξαφανίζονται. Ένας εναλλακτικός τρόπος οπτικοποίησης της διακλάδωσης είναι μέσω του διαγράμματος διακλάδωσης το οποίο ουσιαστικά είναι το επίπεδο  $(x, \alpha)$ . Η εξίσωση

$$f(x, \alpha) = 0$$

καθορίζει μία πολλαπλότητα ισορροπίας όπου ουσιαστικά είναι μία παραβολή  $\alpha = -x^2$ . Κρατώντας σταθερή την τιμή της παραμέτρου, μπορούμε εύκολα να διακρίνουμε τα σημεία ισορροπίας. Στο Σχ. 4.5 διακρίνουμε στο σημείο  $(x, \alpha) = (0, 0)$  μία μοναδικότητα (singularity) η οποία ονομάζεται **διακλάδωση σάγματος-κόμβου (saddle-node)**.

Αν στο σύστημα 4.18 προσθέσουμε όρους ανώτερης τάξης, προκύπτει πως οι όροι αυτοί δεν αλλάζουν ποιοτικά τη συμπεριφορά του συστήματος κοντά στο σημείο  $x = 0$  για τιμές παραμέτρων κοντά στο  $\alpha = 0$ . Έτσι προκύπτει το παρακάτω λήμμα:

**Λήμμα 4.6.** Το σύστημα

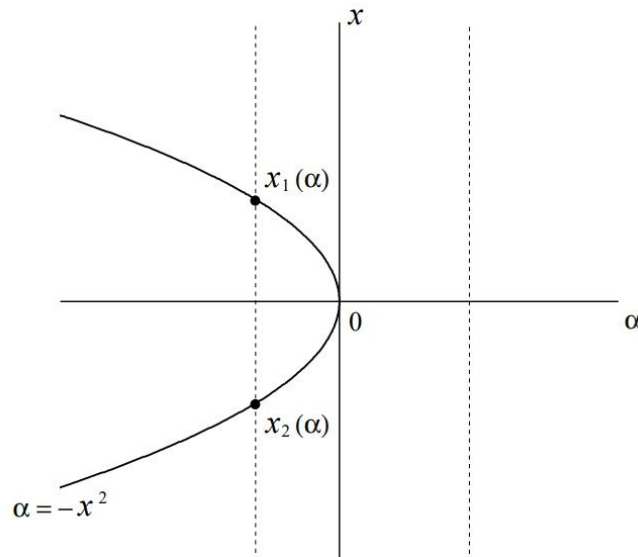
$$\dot{x} = \alpha + x^2 + O(x^3)$$

είναι τοπολογικά και τοπικά ισοδύναμο κοντά στο  $x = 0$  με το σύστημα

$$\dot{x} = \alpha + x^2.$$

Το σύστημα 4.18 αποτελεί την **κανονική μορφή (normal form)** της διακλάδωσης σάγματος-κόμβου. Έτσι, κάθε γενικό σύστημα το οποίο ικανοποιεί τις ίδιες συνθήκες διακλάδωσης με το σύστημα της κανονικής μορφής στο σημείο ισορροπίας, θεωρείται τοπολογικά και τοπικό ισοδύναμο.

Άλλες κανονικές μορφές στη μία διάσταση αποτελούν αυτές της **αμφίπλευρης διακλάδωσης (transcritical bifurcation)** με εξίσωση δεξιού μέλους  $f(x, \alpha) = \alpha x - x^2$  και αυτή της **μονόπλευρης διακλάδωσης (pitchfork bifurcation)** που χωρίζεται σε τρεις περιπτώσεις συναρτήσεων δεξιού μέλους:  $f_1(x, \alpha) = \alpha x - x^3$ ,  $f_2(x, \alpha) = \alpha x + x^3 - x^5$  και  $f_3(x, \alpha) = \alpha x + x^3$ . Όλοι οι παραπάνω τύποι διακλάδωσης παρουσιάστηκαν στην απλούστερη μορφή τους, παρόλα αυτά εμφανίζονται και σε συστήματα ανώτερης τάξης.



Σχήμα 4.5: Διακλάδωση τύπου σάγγατος-κόμβου (saddle-node) στο επίπεδο  $(\alpha, x)$ .

### ▷ Κανονικές μορφές διακλάδωσης στις δύο διαστάσεις

Ας υποθέσουμε το ακόλουθο σύστημα στο επίπεδο το οποίο εξαρτάται από μία παράμετρο:

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = \alpha x_1 - x_2 - x_1(x_1^2 + x_2^2) \\ \dot{x}_2 = x_1 + \alpha x_2 - x_2(x_1^2 + x_2^2) \end{cases} \quad (4.19)$$

Το σύστημα αυτό έχει σημείο ισορροπίας στο  $x_1 = x_2 = 0$ ,  $\forall \alpha$  και με Ιακωβιανή

$$A = \begin{pmatrix} \alpha & -1 \\ 1 & \alpha \end{pmatrix} \quad (4.20)$$

με ιδιοτιμές  $\lambda_{1,2} = \alpha \pm i$ . Αν εισάγουμε τις μιγαδικές μεταβλητές  $z = x_1 + ix_2$ ,  $\bar{z} = x_1 - ix_2$ ,  $|z|^2 = z\bar{z} = x_1^2 + x_2^2$ . Αυτές οι μεταβλητές ικανοποιούν τη διαφορική εξίσωση

$$\dot{z} = \dot{x}_1 + i\dot{x}_2 = \alpha(x_1 + ix_2) + i(x_1 + ix_2) - (x_1 + ix_2)(x_1^2 + x_2^2),$$

και μπορούμε επομένως να ξαναγράψουμε το σύστημα 4.19 στην παρακάτω μιγαδική μορφή

$$\dot{z} = (\alpha + i)z - z|z|^2,$$

Τέλος, εισάγοντας τη σχέση  $z = \rho e^{i\phi}$ , θα έχουμε

$$\dot{z} = \dot{\rho}e^{i\phi} + \rho i\dot{\phi}e^{i\phi},$$

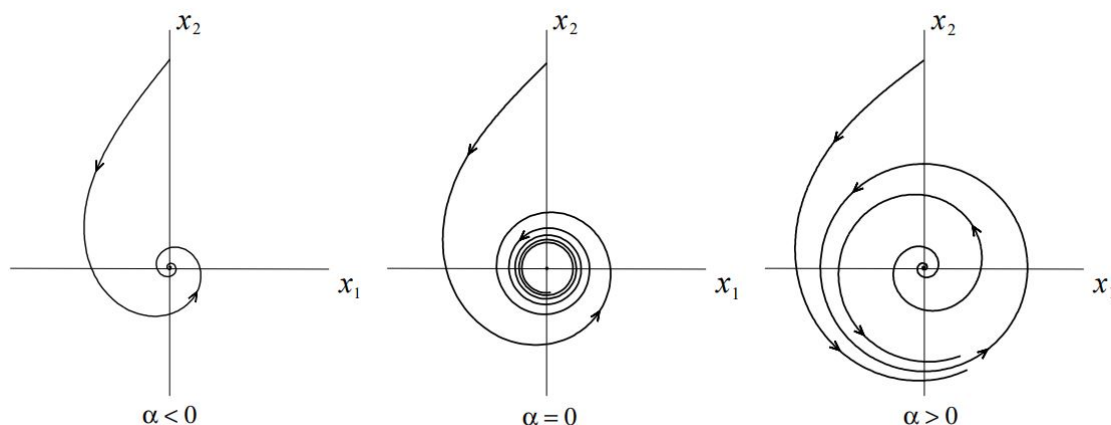
ή

$$\dot{\rho}e^{i\phi} + \rho i\dot{\phi}e^{i\phi} = \rho e^{i\phi}(\alpha + i - \rho^2),$$

το οποίο δίνει σε πολική μορφή το σύστημα 4.19:

$$\begin{cases} \dot{\rho} = \rho(\alpha - \rho^2) \\ \dot{\phi} = 1 \end{cases} \quad (4.21)$$

Καθώς οι εξισώσεις των  $\rho$  και  $\phi$  είναι ανεξάρτητες, μπορούν εύκολα να σχεδιασθούν τα διαγράμματα φάσης του συστήματος γειτονικά του σημείου ισορροπίας που είναι και μοναδικό (βλ. Σχ. 4.6). Για  $\alpha \leq 0$  το σημείο είναι ευσταθής σπείρα, καθώς  $\dot{\rho} < 0$  και  $\rho(t) \rightarrow 0$ , αν εισάγουμε οποιαδήποτε αρχική συνθήκη. Από την άλλη, εάν  $\alpha > 0$  θα έχουμε  $\dot{\rho} > 0$  για μικρό  $\rho > 0$  (το σημείο ισορροπίας γίνεται ασταθής σπείρα), και  $\dot{\rho} < 0$  για επαρκές μεγάλο  $\rho$ . Από την Εξ. 4.21 φαίνεται εύκολα πως το σύστημα εμφανίζει περιοδική τροχιά (οριακό κύκλο) για κάθε  $\alpha > 0$  ακτίνας  $\rho_0 = \sqrt{\alpha}$  (όπου  $\dot{\rho} = 0$ ). Επιπλέον, η περιοδική αυτή τροχιά είναι ευσταθής καθώς εσωτερικά του κύκλου  $\dot{\rho} > 0$  ενώ εξωτερικά  $\dot{\rho} < 0$ .

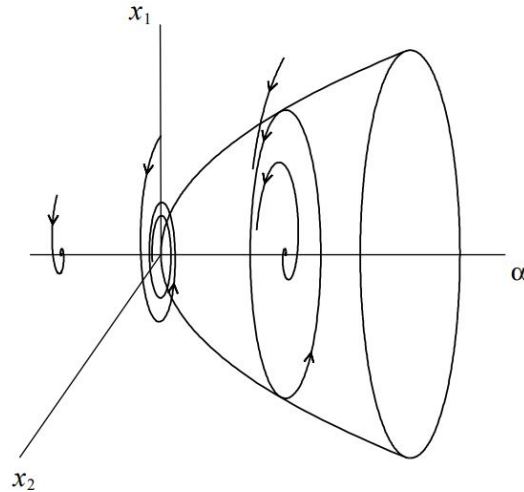


Σχήμα 4.6: Υπερκρίσιμη διακλάδωση Andronov-Hopf. Για  $\alpha > 0$  (Εξ. 4.21) εμφανίζεται στο διάγραμμα φάσης ευσταθής οριακός κύκλος ακτίνας  $\sqrt{\alpha}$ .

Επομένως, το  $\alpha = 0$  είναι ένα σημείο διακλάδωσης. Η παρουσία ενός οριακού κύκλου θεωρείται μία *τοπολογική αναλλοίωτη*. Καθώς το  $\alpha$  αυξάνεται και περάσει το μηδέν, δημιουργείται μία διακλάδωση στο σύστημα της Εξ. 4.19 η οποία ονομάζεται **διακλάδωση Andronov-Hopf**. Οδηγεί στην εμφάνιση μικρού πλάτους περιοδικής ταλάντωσης. Καθώς ο ελκυστής αυτός είναι ευσταθής η διακλάδωση ονομάζεται **υπερκρίσιμη (supercritical)** και το σύστημα 4.19 αποτελεί την κανονική μορφή αυτού. Η διακλάδωση μπορεί επίσης να αναπαρασταθεί στον  $(x, y, \alpha)$  χώρο (βλ. Σχ. 4.7). Η οικογένεια των οριακών κύκλων για  $(\alpha > 0)$  δημιουργεί μία παραβολοειδή επιφάνεια.

Αν τώρα υποθέσουμε πως οι μη-γραμμικοί όροι των δεξιών όρων του συστήματος 4.19 έχουν το αντίθετο πρόσημο, δηλαδή

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = \alpha x_1 - x_2 + x_1(x_1^2 + x_2^2) \\ \dot{x}_2 = x_1 + \alpha x_2 + x_2(x_1^2 + x_2^2) \end{cases} \quad (4.22)$$



Σχήμα 4.7: Υπερκρίσιμη διακλάδωση Andronov-Hopf στο χώρο φάσεων και στον μονο-παραμετρικό χώρο [59].

με την παρακάτω μιγαδική μορφή

$$\dot{z} = (\alpha + i)z + z|z|^2,$$

μπορούμε να αναλύσουμε το σύστημα αυτό με τον ίδιο τρόπο. Το σύστημα εξακολουθεί να υφίσταται μία διακλάδωση Andronov-Hopf για  $\alpha = 0$ . Ωστόσο, αυτή τη φορά εμφανίζεται *ασταθής οριακός κύκλος* ο οποίος εξαφανίζεται όταν το  $\alpha$  περάσει το μηδέν από τον αρνητικό προς τον θετικό ημιάξονα. Η διακλάδωση επομένως ονομάζεται **υποκρίσιμη (subcritical) Andronov-Hopf** και το σύστημα 4.22 αποτελεί την κανονική μορφή αυτού.

Σύμφωνα με όλα τα προηγούμενα, παρουσιάζεται το Θεώρημα Andronov-Hopf για την εμφάνιση κλάδου οριακών κύκλων σε ένα σύστημα  $n$ -διαστάσεων.

**Θεώρημα 4.3. (Andronov-Hopf)** Έστω  $f \in C^2$ . Αν ισχύει ότι

(i)  $f(x^*, \alpha^*) = 0$

(ii) η Ιακωβιανή  $\nabla f(x, \alpha)|_{(x^*, \alpha^*)}$  έχει έναν ζεύγος φανταστικών ιδιοτιμών  $\lambda_{1,2} = \pm i\beta$  και καμία άλλη ιδιοτιμή με πραγματικό μέρος και

(iii)  $\frac{d\text{Re}(\lambda(\alpha^*))}{d\alpha} \neq 0$ .

τότε στο σημείο ισορροπίας  $(x^*, \alpha^*)$  γεννιέται ένας κλάδος οριακών κύκλων με αρχική περίοδο  $T_0 = \frac{2\pi}{\beta}$ .

**Σημειώσεις:**

(1) Στην περίπτωση της υπερκρίσιμης αλλά και υποκρίσιμης διακλάδωσης *Andronov-Hopf* παρατηρήσαμε απώλεια της ευστάθειας του σημείου ισορροπίας στο  $\alpha = 0$  καθώς αυξάναμε την τιμή της παραμέτρου. Στην πρώτη περίπτωση (με το αρνητικό πρόσημο μπροστά από

τους όρους τρίτης τάξης), το ευσταθές σημείο ισορροπίας αντικαθίσταται από έναν ευσταθή οριακό κύκλο μικρού πλάτους ταλάντωσης. Επομένως, το σύστημα ‘παραμένει’ στην ‘γειτονιά ισορροπίας’ και έχουμε μία μη-καταστροφική απώλεια ευστάθειας. Στην δεύτερη περίπτωση, (με το θετικό πρόσημο μπροστά από τους όρους τρίτης τάξης), η περιοχή έλξης του σημείου ισορροπίας περιορίζεται από τον ασταθή οριακό κύκλο, ο οποίος συρρικνώνεται καθώς η παράμετρος πλησιάζει την κρίσιμη τιμή της. Επομένως, το σύστημα απομακρύνεται από την γειτονιά ισορροπίας, δίνοντας μία καταστροφική απώλεια ευστάθειας. Όταν ένα σύστημα χάνει την ευστάθεια του με μη-καταστροφικό τρόπο είναι πιο ελεγχόμενο, δηλαδή μπορούμε να μειώσουμε την τιμή της παραμέτρου και αυτό να επανέλθει στην ισορροπία. Αντιθέτως, η μείωση της τιμής της παραμέτρου, όταν το σύστημα έχει χάσει την ευστάθεια του απότομα, δεν συνεπάγεται επιστροφή στην ευσταθή ισορροπία καθώς το σύστημα ενδέχεται να έχει απομακρυνθεί από τον εκάστοτε ελκυστή. Σημειώνεται πως ο τύπος της διακλάδωσης Andronov-Hopf καθορίζεται από την ευστάθεια του σημείου ισορροπίας στην κρίσιμη τιμή της παραμέτρου.

(2) Ας υποθέσουμε το παρακάτω σύστημα χωρίς μη-γραμμικούς όρους

$$\dot{z} = (\alpha + i)z$$

Το σύστημα αυτό παρουσιάζει επίσης μία οικογένεια περιοδικών τροχιών αυξανόμενου πλάτους ταλάντωσης, αλλά όλες αυτές εμφανίζονται για  $\alpha = 0$ , όταν το σύστημα παρουσιάζει ένα κέντρο (*center*) σαν σημείο ισορροπίας (κατά το οποίο το σύστημα θα ταλαντώνεται με διαφορετικό πλάτος ανάλογα με την δοθείσα αρχική συνθήκη). Ουσιαστικά, η παραβολοειδής επιφάνεια των οριακών κύκλων εκφυλίζεται στο επίπεδο  $\alpha = 0$  στον  $(x, y, \alpha)$  χώρο.

Ας προσθέσουμε τώρα στο σύστημα 4.19 όρους ανώτερης τάξης όπως φαίνεται παρακάτω

$$\begin{pmatrix} \dot{x}_1 \\ \dot{x}_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha & -1 \\ 1 & \alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix} - (x_1^2 + x_2^2) \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix} + O(\|x\|^4) \quad (4.23)$$

όπου  $x = (x_1, x_2)^T$ ,  $\|x\|^2 = x_1^2 + x_2^2$  και  $O(\|x\|^4)$  όροι εξαρτώνται από το  $\alpha$ . Το παραπάνω σύστημα, αποδεικνύεται πως είναι τοπολογικά ισοδύναμο με το 4.19 (κανονική μορφή) κοντά στο σημείο ισορροπίας.

Σημειώνεται πως μία διακλάδωση Andronov-Hopf μπορεί να εντοπιστεί εξετάζοντας την περιοχή κοντά και γύρω από τον οριακό κύκλο. Τέτοιες διακλαδώσεις ονομάζονται *τοπικές (local)*. Υπάρχουν επίσης και διακλαδώσεις οι οποίες δεν είναι εντοπίσιμες γειτονικά των σημείων ισορροπίας ή οριακών κύκλων. Αυτές ονομάζονται *καθολικές (global)* και θα παρουσιασθούν στην επόμενη Ενότητα.

#### 4.2.5 Διακλαδώσεις οριακών κύκλων και καθολικές διακλαδώσεις (Global bifurcations)

Σε συστήματα δύο διαστάσεων υπάρχουν τέσσερις βασικοί τρόποι με τους οποίους οι οριακοί κύκλοι δημιουργούνται και καταστρέφονται. Η διακλάδωση Andronov-Hopf είναι ο

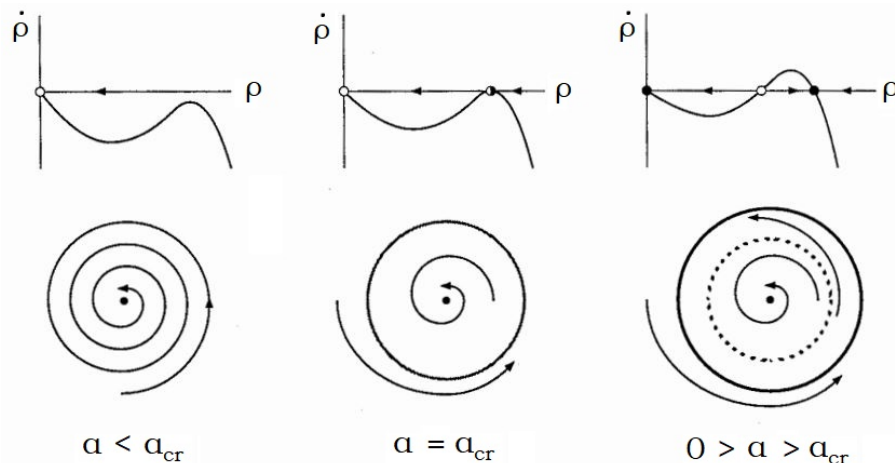
πιο γνωστός εξ αυτών. Οι υπόλοιπες μορφές είναι πιο δύσκολες στην ανίχνευση τους καθώς περιλαμβάνουν μεγάλες περιοχές του διαγράμματος φάσης και όχι όπως προηγουμένως μικρές περιοχές γύρω από σημεία ισορροπίας. Αυτές ονομάζονται *καθολικές διακλαδώσεις (global bifurcations)* και στην συνέχεια παρουσιάζονται κάποιες βασικές κατηγορίες αυτών (Strogatz, 1994).

### ▷ Διακλάδωση σάγματος-κόμβου (Saddle-node bifurcation of cycles)

Η διακλάδωση κατά την οποία δύο οριακοί κύκλοι ενώνονται και εν συνεχεία καταστρέφονται ονομάζεται *διακλάδωση κύκλων σάγματος-κόμβου (saddle-node bifurcation of cycles)* κατά αναλογία με την αντίστοιχη διακλάδωση σημείου ισορροπίας. Μία τέτοια διακλάδωση εμφανίζεται στο παρακάτω σύστημα [102]:

$$\begin{cases} \dot{\rho} = \alpha\rho + \rho^3 - \rho^5 \\ \dot{\theta} = \omega + \beta\rho^2 \end{cases} \quad (4.24)$$

Για λόγους απλούστευσης, ας θεωρήσουμε την ακτινική εξίσωση  $\dot{\rho} = \alpha\rho + \rho^3 - \rho^5$  ως μονοδιάστατη. Εύκολα αποδεικνύεται πως το σύστημα εμφανίζει μία διακλάδωση σάγματος-κόμβου στην κρίσιμη τιμή  $\alpha_{cr} = -1/4$ . Επιστρέφοντας τώρα στο διδιάστατο σύστημα, αυτά τα σημεία ισορροπίας αντιστοιχούν σε οριακούς κύκλους. Στο Σχ. 4.8 παρουσιάζονται τα ‘ακτινικά διαγράμματα φάσης’ και η αντίστοιχη συμπεριφορά στα πραγματικά διαγράμματα φάσης.



Σχήμα 4.8: Διακλάδωση οριακών κύκλων τύπου σάγματος-κόμβου (saddle-node bifurcation of cycles) (Strogatz, 1994).

Όταν η παράμετρος παίρνει την κρίσιμη τιμή της ( $\alpha_{cr}$ ), ένας ευσταθής κατά το ήμισυ οριακός κύκλος (half-stable limit cycle) γεννιέται. Καθώς η παράμετρος  $\alpha$  αυξάνεται, ο κύκλος αυτός διχοτομείται σε ένα ζεύγος οριακών κύκλων, έναν ευσταθή και έναν ασταθή. Ξεκινώντας από την άλλη κατεύθυνση, δύο οριακοί κύκλοι ενώνονται και καταστρέφονται



καθώς το  $\alpha$  μειώνεται. Παρατηρούμε, πως το κέντρο ισορροπίας παραμένει ευσταθές σε όλες τις περιπτώσεις και έτσι δεν συμμετέχει στην διακλάδωση.

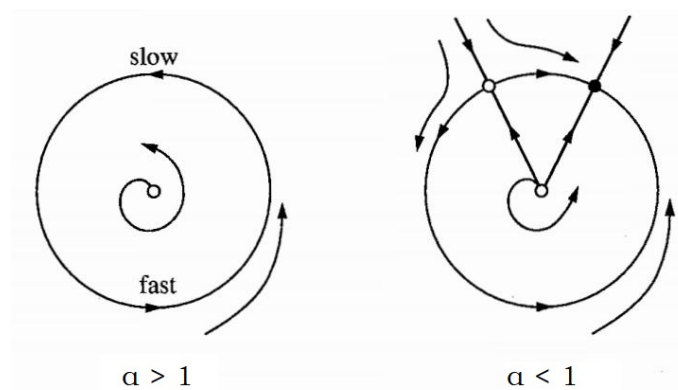
Σημειώνεται πως ο παραπάνω οριακός κύκλος, κατά την δημιουργία του, έχει εύρος ταλάντωσης πρώτης τάξης ( $O(1)$ ) σε αντίθεση με την διακλάδωση Andronov-Hopf (τοπική διακλάδωση) κατά την οποία ο οριακός κύκλος έχει μικρό πλάτος ταλάντωσης ανάλογο της ποσότητας  $(\alpha - \alpha_{cr})^{1/2}$ .

### ▷ Διακλάδωση άπειρης περιόδου (Infinite-period bifurcation)

Ας υποθέσουμε το παρακάτω σύστημα:

$$\begin{cases} \dot{\rho} = \rho(1 - \rho^2) \\ \dot{\theta} = \alpha - \sin \theta \end{cases} \quad (4.25)$$

όπου  $\alpha \geq 0$ . Στην ακτινική κατεύθυνση, όλες οι τροχιές (εκτός της  $\rho^* = 0$ ) προσεγγίζουν τον μοναδιαίο κύκλο μονοτονικά καθώς  $t \rightarrow \infty$ . Στην γωνιακή κατεύθυνση, η κίνηση είναι παντού αντιρολογιακή αν  $\alpha > 1$ , ενώ εμφανίζονται δύο αναλλοίωτες 'ακτίνες' από το  $\sin \theta = \alpha$  όταν  $\alpha < 1$ . Επομένως καθώς το  $\alpha$  μειώνεται πέραν του  $\alpha_{cr} = 1$ , το διάγραμμα φάσης αλλάζει όπως φαίνεται από το Σχ. 4.9.



Σχήμα 4.9: Διακλάδωση άπειρης περιόδου (Infinite-period bifurcation) (Strogatz, 1994).

Καθώς το  $\alpha$  μειώνεται, ο οριακός κύκλος  $\rho = 1$  δημιουργεί έναν 'λαιμό μπουκαλιού' (bottleneck) για  $\theta = \pi/2$  το σχήμα του οποίου γίνεται αυξανόμενα πιο έντονο καθώς  $\alpha \rightarrow 1^+$ . Η περίοδος της ταλάντωσης αυξάνεται και τελικά απειρίζεται για  $\alpha_{cr} = 1$ , όταν ένα σημείο ισορροπίας εμφανίζεται πάνω στον οριακό κύκλο· γι'αυτό και ο όρος διακλάδωση άπειρης περιόδου. Για  $\alpha < 1$  το σημείο ισορροπίας χωρίζεται σε ένα σάγμα και έναν κόμβο.

Σημειώνεται πως καθώς το σύστημα προσεγγίζει της διακλάδωση, το πλάτος της ταλάντωσης παραμένει  $O(1)$  αλλά η περίοδος αυξάνεται ανάλογα με τον όρο  $(\alpha - \alpha_{cr})^{1/2}$ .

### ▷ Ομοκλινική διακλάδωση (Homoclinic bifurcation)

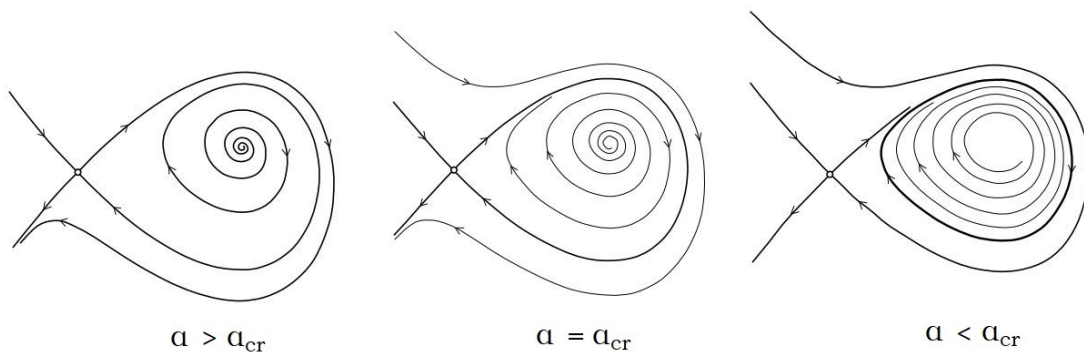
Σε αυτόν τον τύπο διακλάδωσης, ένας κομμάτι του οριακού κύκλου κινείται όλο και πιο κοντά σε ένα σαγματικό σημείο. Κατά την ομοκλιτική διακλάδωση ο κύκλος ακουμπάει το σάγμα και δημιουργεί μία ομοκλιτική τροχιά. Αυτή είναι μία μορφή διακλάδωσης άπειρης περιόδου. Εκτός από ομοκλιτική διακλάδωση ονομάζεται και διακλάδωση σάγματος-βρόγχου (*saddle-loop*).

Καθώς είναι δύσκολο να βρεθεί ένα ξεκάθαρο παράδειγμα για την ομοκλιτική διακλάδωση, θα χρησιμοποιηθεί υπολογιστική προσομοίωση. Ας υποθέσουμε το σύστημα:

$$\begin{cases} \dot{x} = y \\ \dot{y} = \alpha y + x - x^2 + xy \end{cases} \quad (4.26)$$

Στο Σχ. 4.10 παρουσιάζονται τα διαγράμματα φάσης πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την ομοκλιτική διακλάδωση. Μέσω αριθμητικής ανάλυσης (δες Ενότητα 4.3), η διακλάδωση φαίνεται να συμβαίνει για  $\alpha_{cr} \approx -0.8645$ . Για  $\alpha < \alpha_{cr}$ , ένας ευσταθής οριακός κύκλος πλησιάζει ένα σαγματικό ισορροπίας. Για  $\alpha = \alpha_{cr}$  ο οριακός κύκλος ενώνεται με το σημείο αυτό και δημιουργεί μια ομοκλιτική τροχιά. Όταν το  $\alpha > \alpha_{cr}$  η σύνδεση αυτή σπάει και ο βρόγχος καταστρέφεται.

Το κλειδί σε αυτή την διακλάδωση είναι η συμπεριφορά της ασταθούς πολλαπλότητας του σάγματος. Ο κλάδος της ασταθούς πολλαπλότητας που φεύγει από το σημείο ισορροπίας, αφού εκτελέσει κάποιους βρόγχους ταλάντωσης, είτε χτυπά το σημείο ισορροπίας (και έτσι δημιουργείται η ομοκλιτική τροχιά, (Σχ. 4.10 κέντρο» είτε πέφτει στον οριακό κύκλο (Σχ. 4.10 δεξιά), ή φεύγει εξωτερικά μέσω του άλλου κλάδου της ασταθούς πολλαπλότητας (Σχ. 4.10 αριστερά).



Σχήμα 4.10: Ομοκλιτική διακλάδωση (homoclinic bifurcation). Ο οριακός κύκλος στο διάγραμμα φάσης πλησιάζει ένα σαγματικό σημείο ισορροπίας με το οποίο ενώνεται όταν η παράμετρος πάρει την κρίσιμη τιμή της και μία ομοκλιτική τροχιά δημιουργείται. Για τιμές της παραμέτρου μικρότερες της κρίσιμης η σύνδεση αυτή σπάει και η κλειστή τροχιά καταστρέφεται.

**Σημείωση:**

Η **συνδιάσταση** ή **codimension** μία διακλάδωσης αναφέρεται στον αριθμό των παραμέτρων που πρέπει να μεταβληθούν έτσι ώστε να συμβεί η διακλάδωση. Οι διακλαδώσεις σάγματος-κόμβου και Andronov-Hopf είναι οι μόνες μορφές τοπικών διακλαδώσεων που είναι πραγματικά συνδιάστασης-1 (codimension-1). Παρόλα αυτά, και οι διακλαδώσεις transcritical και pitchfork θεωρούνται συνδιάστασης-1, καθώς οι κανονικές μορφές αυτών μπορούν να γραφούν με μία μόνο παράμετρο. Παραδείγματα διακλαδώσεων συνδιάστασης-2 (codimension-2) αποτελούν οι διακλαδώσεις Bogdanov-Takens, cusp και Bautin ή GH (generalized Hopf).

#### 4.2.6 Διαφορικές εξισώσεις χρονοκαθυστέρησης (Time-delay)

Σε πολλά βιολογικά και συνεχή στο χρόνο συστήματα οι ρυθμιστικές διαδικασίες περιλαμβάνουν έναν αριθμό προκαθορισμένων σταδίων και η μεταβλητή ποσότητα του μοντέλου αποτελεί το τέλος αυτών των σταδίων [6]. Το σύστημα σε αυτή την περίπτωση βασίζεται στην ιστορία του και τέτοιοι όροι ονομάζονται ενίοτε ‘κληρονομικοί’ (hereditary). Τέτοιες εξισώσεις συνηθίζεται να λέγονται, *διαφορικές εξισώσεις χρονοκαθυστέρησης (time-delay differential equations)*. Χρησιμοποιούνται για παράδειγμα σε μοντέλα για τον έλεγχο της παραγωγής των κυττάρων του αίματος αλλά και της δυναμικής της κόρης του οφθαλμού (pupil light reflex). Στη συνέχεια θα ασχοληθούμε με κάποιες από τις βασικές ιδιότητες των εξισώσεων αυτών.

Ας υποθέσουμε την παρακάτω εξίσωση, όπου  $t$  ο χρόνος:

$$\frac{dx}{dt} = f(x(t - \tau)) - \gamma x(t) \quad (4.27)$$

στην οποία ο ρυθμός εξέλιξης της ποσότητας  $x$  εξαρτάται όχι μόνο από την εκάστοτε τιμή  $x(t)$ , αλλά επίσης από την τιμή της σε κάποια χρονική στιγμή (η λεγόμενη *χρονοκαθυστέρηση* ή *time delay*)  $\tau$  στο παρελθόν,  $x(t - \tau)$ . Στην Εξ. 4.27 το  $\gamma$  είναι η σταθερά ρυθμού αποσύνθεσης (βλ. Παράδειγμα 3.1) και  $f$  είναι μια μη-γραμμική συνάρτηση. Σε αντίθεση με τις συνηθισμένες διαφορικές εξισώσεις, για τις οποίες χρειάζεται να δώσουμε μία αρχική συνθήκη στο χώρο φάσεων, για τις διαφορικές εξισώσεις χρονοκαθυστέρησης, χρειαζόμαστε μία αρχική συνθήκη σε μορφή συνάρτησης ορισμένη για μία χρονική περίοδο ίση με την διάρκεια της χρονοκαθυστέρησης, συνήθως για το διαστημα  $-\tau \leq t' \leq 0$ .

Η διαφορική εξίσωση χρονοκαθυστέρησης 4.27 αποτελεί ένα σύστημα άπειρων διαστάσεων, καθώς η συνάρτηση που ορίζει την αρχική συνθήκη απαιτεί έναν άπειρο αριθμό σημείων για να ορισθεί. Συνεπώς, τέτοιες εξισώσεις μπορούν να παρουσιάσουν ταλαντωτική και χαοτική δυναμική συμπεριφορά.

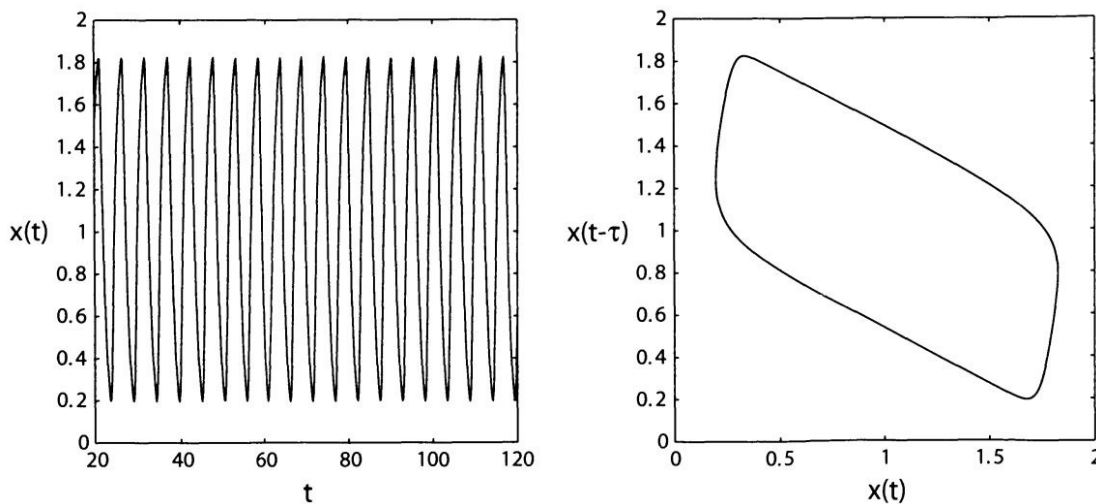
Η απλούστερη τεχνική για την διερεύνηση διαφορικών εξισώσεων χρονοκαθυστέρησης περιλαμβάνει τοπική ανάλυση ευστάθειας του σημείου ισορροπίας. Παρατηρούμε πως η Εξ. 4.27 παρουσιάζει σημείο ισορροπίας  $x^*$  για τιμές όπου  $f(x^*) = \gamma x^*$ , ανεξαρτήτως της τιμής του  $\tau$ . Δεδομένου ότι το σύστημα είναι άπειρων διαστάσεων, συμπεραίνουμε πως θα υπάρχει και άπειρο πλήθος ιδιοτιμών στις γραμμικοποιημένες εξισώσεις. Μπορούν επίσης να εξετασθούν ορισμένες συνθήκες για την εμφάνιση περιοδικής λύσης καθώς μία στατική λύση

γίνεται ασταθής, έτσι ώστε να μπορεί να ορισθεί η διακλάδωση Andronov-Hopf στο πλαίσιο των διαφορικών εξισώσεων χρονοκαθυστέρησης. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις το δεξί μέλος της εξίσωσης μπορεί να δωθεί ως μία τμηματικά γραμμική (piecewise linear) συνάρτηση και έτσι είναι δυνατόν να υπάρξει αναλυτική λύση.

Ας θεωρήσουμε την παρακάτω διαφορική εξίσωση χρονοκαθυστέρησης με μία μη-γραμμική συνάρτηση ελέγχου στο δεξί μέλος (Mackey and Glass, 1977 [66]) η οποία μειώνεται μονοτονικά:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\beta\theta^m}{x(t-\tau)^m + \theta^m} - \gamma x \quad (4.28)$$

όπου  $m$  και  $\theta$  είναι σταθερές. Η δυναμική του συστήματος προβλέπει την έλξη αυτού σε σημείο ισορροπίας ή σε έναν ευσταθή οριακό κύκλο. Για παράδειγμα, στο Σχ. 4.11 παρατηρούμε έναν τέτοιο κύκλο για τιμές της παραμέτρου  $\beta = 2$ ,  $\theta = 1$ ,  $\gamma = 1$ ,  $m = 10$ ,  $\tau = 2$ .



Σχήμα 4.11: Ταλάντωση και οριακός κύκλος της Εξ. 4.28 για τιμές των παραμέτρου  $\beta = 2$ ,  $\theta = 1$ ,  $\gamma = 1$ ,  $m = 10$  και  $\tau = 2$  (Beuter *et al.*, 2003).

Αντιθέτως, αν η μη-γραμμική συνάρτηση ελέγχου στην διαφορική εξίσωση είναι της μορφής<sup>3</sup>:

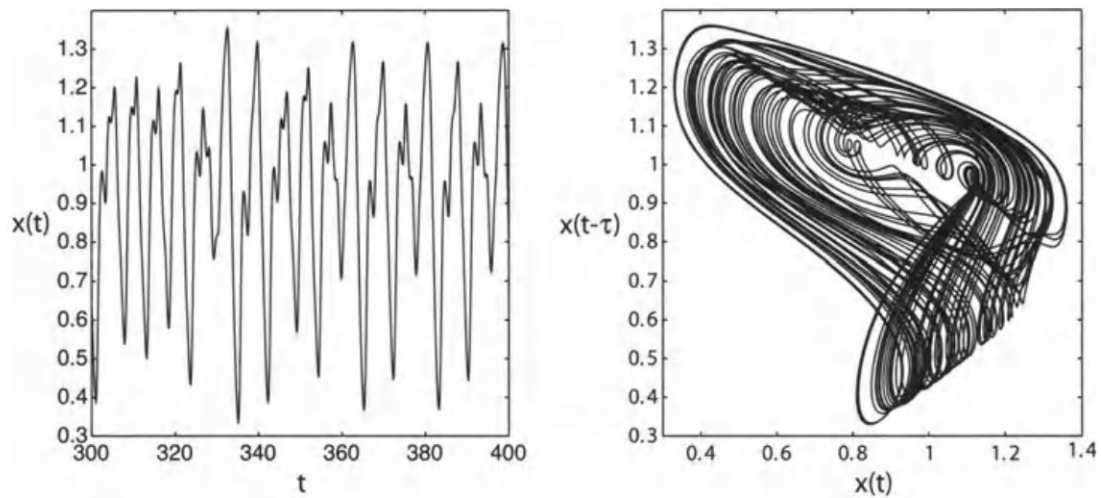
$$\frac{dx}{dt} = \frac{\beta\theta^m(t-\tau)}{x(t-\tau)^m + \theta^m} - \gamma x \quad (4.29)$$

τότε για τις ίδιες τιμές των παραμέτρων η δυναμική είναι χαοτική όπως φαίνεται στο Σχ. 4.12.

Για την ανάλυση των παραπάνω διαφορικών εξισώσεων χρονοκαθυστέρησης παρουσιάζουμε τα διαγράμματα των χρονοσειρών και του όρου  $x(t-\tau)$  συναρτήσεως του  $x(t)$ . Στο Σχ. 4.11b παρατηρούμε ταλάντωση σταθερού πλάτους με τον αντίστοιχο οριακό κύκλος και στο 4.12b

<sup>3</sup>Τέτοιες συναρτήσεις αναφέρονται συχνά και ως single-humped functions ή συναρτήσεις μεμονωμένης κυρτότητας.

χαοτική χρονοσειρά. Οι τιμές των παραμέτρων παραμένουν ίδιες και στις δύο περιπτώσεις. Φαίνεται λοιπόν πως η μοντελοποίηση με την κατάλληλη συνάρτηση ελέγχου είναι απαραίτητη για τη σωστή αναπαράσταση της δυναμικής του εκάστοτε βιολογικού (και όχι μόνο) συστήματος.



Σχήμα 4.12: Χαοτική χρονοσειρά και ελκυστής της Εξ. 4.29 για τιμές των παραμέτρων  $\beta = 2$ ,  $\theta = 1$ ,  $\gamma = 1$ ,  $m = 10$  και  $\tau = 2$  (Beuter *et al.*, 2003).

### 4.3 Εφαρμογές

Στην συνέχεια θα παρουσιασθούν δύο εφαρμογές απλών μοντέλων για την περιγραφή βιολογικών συστημάτων τα οποία παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα δυναμική συμπεριφορά. Τα παρακάτω παραδείγματα αφορούν στις κυτταρικές διεργασίες του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Η ανάλυση των μοντέλων μπορεί να γίνει με αναλυτικές και αριθμητικές μεθόδους.

#### Παράδειγμα 4.7. Ρυθμός παραγωγής αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Ας θεωρήσουμε το πρόβλημα της παραγωγής και ελέγχου αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων [66]. Έστω ( $P$ ) τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στη φάση του πολλαπλασιασμού, ( $N$ ) τα κύτταρα που βρίσκονται σε αδράνεια,  $\delta$  ο κανονικός (normal) ρυθμός διαφοροποίησης ενώ η σταθερά  $\gamma$  αντιπροσωπεύει την απώλεια των κυττάρων στη φάση διαφοροποίησης λόγω απόπτωσης<sup>4</sup>.

Η δυναμική του πληθυσμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων περιγράφεται από ένα σύστημα διαφορικών εξισώσεων χρονοκαθυστέρησης:

$$\frac{dP}{dt} = -\gamma P + \beta(N)N - e^{-\gamma\tau}\beta(N_\tau)N_\tau \quad (4.30)$$

<sup>4</sup> Απόπτωση - αυτοεπισχυόμενη και μη αντιστρεπτή διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

$$\frac{dN}{dt} = -[\beta(N) + \delta]N + 2e^{-\gamma\tau}\beta(N_\tau)N_\tau \quad (4.31)$$

όπου  $\tau$  είναι ο χρόνος που χρειάζεται ένα κύτταρο να περάσει το στάδιο του πολλαπλασιασμού, ενώ ρυθμός αντίδρασης από την αδράνεια στην διαφοροποίηση  $\beta$  ορίζεται ως

$$\beta(N) = \frac{\beta_0\theta^n}{\theta^n + N^n} \quad (4.32)$$

Παρατηρούμε πως η Εξ. 4.31 μπορεί να θεωρηθεί ως μία εξίσωση για τον έλεγχο ενός πληθυσμού με έναν όρο παραγωγής και ανατροφοδότησης [ $2e^{-\gamma\tau}\beta(N_\tau)N_\tau$ ] και έναν όρο αποσύνθεσης [ $\beta(N) + \delta$ ] ο οποίος είναι μία μειούμενη συνάρτηση του  $N$ .

Το μοντέλο αυτό παρουσιάζει δύο πιθανές λύσεις μόνιμης κατάστασης. Υπάρχει μία λύση που αντιστοιχεί στην κατάσταση  $(P_1^*, N_1^*) = (0, 0)$ , η οποία είναι ευσταθής εάν είναι η μοναδική λύση ισορροπίας, ενώ γίνεται ασταθής όταν υπάρχει και η δεύτερη λύση ισορροπίας  $(P_2^*, N_2^*)$ .

Η ισορροπία της μη μηδενικής λύσης εξαρτάται από την τιμή του  $\gamma$ . Όταν  $\gamma = 0$ , αυτή η λύση ισορροπίας δεν μπορεί να αποσταθεροποιηθεί έτσι ώστε να παράξει τα δυναμικά χαρακτηριστικά της κυκλικής ουδετεροπενίας (CN). Όταν  $\gamma > 0$ , αυξήσεις του  $\gamma$  οδηγούν σε μείωση της παραγωγής αιμοποιητικών κυττάρων και σε μείωση της κυτταρικής εκροής (όρος  $\delta N$ ) σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Η μειούμενη εκροή γίνεται ασταθής όταν το  $\gamma$  φτάσει την κρίσιμη τιμή του,  $\gamma = \gamma_{cr,1}$ , κατά το οποίο γεννιάται μία υπερκρίσιμη διακλάδωση Andronov-Hopf. Για όλες τις τιμές που ικανοποιούν την διπλή ανισότητα  $\gamma_{cr,1} < \gamma < \gamma_{cr,2}$ , υπάρχει περιοδική λύση των Εξ. 4.30-4.31, της οποίας η περίοδος είναι βρίσκεται σε συμφωνία με πειραματικά αποτελέσματα κυκλικής ουδετεροπενίας. Στην τιμή  $\gamma = \gamma_{cr,2}$ , παρατηρείται μία αντίστροφη διακλάδωση και ο εξαιρετικά μειωμένος αριθμός αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και η κυτταρική εκροή σταθεροποιούνται ξανά.

Η ρυθμική των παραμέτρων σε τιμές κατάλληλες για την περίπτωση ανθρωπίνων αιμοποιητικών κυττάρων δίνει προβλέψεις για την περίοδο ταλάντωσης κατά την διακλάδωση Andronov-Hopf, σύμφωνες με αυτές που παρατηρούνται σε κλινικές και εργαστηριακές μελέτες.

Σημειώνεται πως οι παραπάνω εξισώσεις παρουσιάζουν πιο περίπλοκη και χαοτική συμπεριφορά αλλά για τιμές εκτός του φυσιολογικού εύρους. Έτσι, οι διακυμάνσεις στον αριθμό των ερυθροκυττάρων που παρατηρούνται στην κυκλική ουδετεροπενία δεν συσχετίζεται με τις χαοτικές λύσεις των εξισώσεων αυτών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η κυκλική ουδετεροπενία πιθανώς συσχετίζεται με γενετικές ανωμαλίες του πληθυσμού αιμοποιητικών κυττάρων που οδηγούν σε μία μη-ομαλή ( $\gamma > 0$ ) απώλεια αυτών μέσω απόπτωσης από το στάδιο διαφοροποίησης του κυτταρικού κύκλου.

#### Παράδειγμα 4.8. Γενετικό ρυθμιστικό δίκτυο για τον μεταγραφικό παράγοντα *Hes1*

Θα εξετάσουμε τη δυναμική συμπεριφορά του μεταγραφικού παράγοντα *Hes1* μέσω μαθηματικής μοντελοποίησης του αντίστοιχου γενετικού ρυθμιστικού δικτύου το οποία αποτελείται

από βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback loop) μεταξύ της πρωτεΐνης Hes1 και του mRNA αυτής [14].

Το βασικό μοντέλο ενός αυτοκατασταλτικού γονιδίου [68] που περιγράφει τη δυναμική συμπεριφορά της συγκέντρωσης του hes1 mRNA,  $m(t)$  και της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Hes1,  $p(t)$ , παίρνει την ακόλουθη γενική μορφή:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \alpha_m f(p - \tau) - \mu_m m \quad (4.33)$$

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \alpha_p m - \mu_p p \quad (4.34)$$

Οι παραπάνω διαφορικές εξισώσεις χρονοκαθυστέρησης έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση άλλων συστημάτων ανατροφοδότησης με μεταγραφικούς παράγοντες όπως p53 και NF-κB.

Επιπλέον το παραπάνω μοντέλο μπορεί να μελετηθεί και στην χωρική του εκδοχή και έτσι να εξετασθεί ο ρόλος της χωρικής κίνησης των μορίων στην δημιουργία ταλαντώσεων στα επίπεδα συγκέντρωσης. Το μοντέλο αυτό αποτελείται από ένα σύστημα συζευγμένων μη-γραμμικών μερικών διαφορικών εξισώσεων (PDEs) που περιγράφουν την χωρική (1D) και χρονική δυναμική των συγκεντρώσεων της hes1 mRNA,  $m(x, t)$  και της Hes1 πρωτεΐνης,  $p(x, t)$  και αφορούν στις διαδικασίες της μεταγραφής (παραγωγή mRNA) και της μετάφρασης (παραγωγή πρωτεΐνης). Τόσο η mRNA όσο και η πρωτεΐνη διαχέονται και υποβάλλονται σε γραμμική αποσύνθεση. Το μοντέλο παρουσιάζεται παρακάτω:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = D \frac{\partial^2 m}{\partial x^2} + \alpha_m f(p) \delta^{\epsilon}_{x_M}(x) - \mu m \quad (4.35)$$

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} + \alpha_p g(x) m - \mu p \quad (4.36)$$

$$\frac{\partial m(t, 0)}{\partial x} = \frac{\partial m(t, 1)}{\partial x} = 0, \quad \frac{\partial p(t, 0)}{\partial x} = \frac{\partial p(t, 1)}{\partial x} = 0 \quad \text{in } (0, T)$$

$$m(0, x) = m_0(x), \quad p(0, x) = p_0(x) \quad \text{in } (0, 1)$$

όπου  $D$ ,  $\alpha_m$ ,  $\alpha_p$  και  $\mu$  είναι θετικές σταθερές (η σταθερά διάχυσης, ρυθμού μεταγραφής, ρυθμού μετάφρασης και ρυθμός αποσύνθεσης αντίστοιχα). Εδώ, το  $l$  δηλώνει την θέση της πυρηνικής μεμβράνης και επομένως το χωρίο χωρίζεται σε δύο μέρη,  $(0, l)$  τον κυτταρικό πυρήνα και  $(l, 1)$  το κυτταρόπλασμα για κάποια  $l \in (0, 1)$ . Το σημείο  $x_M \in (0, l)$  είναι η θέση του κέντρου του γονιδιακού χώρου και  $\delta^{\epsilon}_{x_M}$  είναι η Dirac προσέγγιση της δ-κατανομής στη θέση  $x_M$ , με  $\epsilon > 0$  μία μικρή παράμετρος.

Ο μη-γραμμικός όρος αντίδρασης  $f : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$  είναι μία συνάρτηση Hill,  $f(p) = 1/(1 + p^h)$ , με  $h \geq 1$ , μοντελοποιεί την καταστολή της παραγωγής του mRNA από την πρωτεΐνη (αρνητικής ανατροφοδότησης). Η συνάρτηση  $g$  είναι μία συνάρτηση βήματος της μορφής

$$g(x) = \begin{cases} 0, & \text{if } x < l \\ 1, & \text{if } x \geq l \end{cases}$$

καθώς η διαδικασία της μετάφρασης συμβαίνει μόνο στο κυτταρόπλασμα.

Μέσω αριθμητικής ανάλυσης αποδεικνύεται η ύπαρξη σημείων διακλάδωσης, τα οποία έχουν αποδειχθεί και πειραματικά [14]. Ως παράμετρος διακλάδωσης εξετάζεται η σταθερά διάχυσης της πρωτεΐνης και mRNA,  $D$ , και προκύπτουν δύο τιμές  $D_{1,cr}$  και  $D_{2,cr}$  κατά τις οποίες εμφανίζονται υπερκρίσιμες διακλαδώσεις τύπου Andronov-Hopf οι οποίες γεννούν ταλαντώσεις. Οι ταλαντώσεις αυτές δείχνουν πως η κίνηση των μορίων (διάχυση) είναι ικανή για να προκαλέσει ταλαντώσεις στο σύστημα. Επιπλέον αποδεικνύεται και η σημασία της μοντελοποίησης συστημάτων μεταγραφικών παραγόντων με βρόγχους αρνητικής ανατροφοδότησης μέσω χωρικών μοντέλων.



## Κεφάλαιο 5

# Αριθμητικές μέθοδοι

Στο Κεφάλαιο αυτό θα περιγράψουμε κάποιες από τις βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αριθμητική ανάλυση δυναμικών συστημάτων. Επικεντρωνόμαστε σε αλγόριθμους της ανάλυσης διακλάδωσης, όπως αλγορίθμους για την εύρεση σημείων ισορροπίας, σημείων διακλάδωσης και τον βηματισμό σε παράμετρο αυτών. Παρουσιάζεται επίσης αλγόριθμος για την ανίχνευση κλάδων οριακών κύκλων αλλά και για τον υπολογισμό του προφίλ και της περιόδου των περιοδικών λύσεων.

Δεδομένου ενός συστήματος αυτόνομων συνήθων διαφορικών εξισώσεων εξαρτώμενο από παραμέτρους, στόχος είναι η κατασκευή των *διαγραμμάτων διακλάδωσης* (δηλαδή η συστηματική διερεύνηση του χώρου λύσεων στον παραμετρικό χώρο). Ακόμα και στις πιο απλές περιπτώσεις, η αριθμητική ανάλυση καθίσταται αναγκαία. Ακόμα περισσότερο βέβαια στην περίπτωση διακλάδωσης οριακών κύκλων και ομοκλινικών τροχιών, για τις οποίες υπάρχουν μόνο λίγα παραδείγματα μη-γραμμικών συστημάτων με αναλυτικές λύσεις σε κλειστή μορφή. Επίσης, η ανάλυση σημείων ισορροπίας σε πολυ-διάστατα συστήματα είναι πρακτικά αδύνατη χωρίς αριθμητικούς υπολογισμούς.

### 5.1 Εισαγωγή

Πολλά προβλήματα υπολογιστικού ενδιαφέροντος βασίζονται στην επίλυση της παρακάτω εξίσωσης

$$\frac{dx}{dt} = f(x, p) = 0, \quad f : \mathbb{R}^m \times \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^m \quad (5.1)$$

όπου  $x \in \mathbb{R}^m$  αντιπροσωπεύει τη λύση-διάνυσμα και  $p \in \mathbb{R}$  είναι μία φυσική παράμετρος [13].

Οι λύσεις μόνιμης κατάστασης<sup>1</sup> του παραπάνω συστήματος μη-γραμμικών εξισώσεων μπορούν να βρεθούν με διάφορες μεθόδους, με την πιο γνωστή εξ αυτών να αποτελεί η μέθοδος *Newton* ή *Newton-Raphson*. Επιπλέον, πολλές φορές απαιτείται η εύρεση λύσεων σε ένα εύρος της παραμέτρου  $p$ , δηλαδή ένα σύνολο λύσεων  $[x(p), p]$  (διάγραμμα διακλάδωσης). Ενώ η μέθοδος *Newton-Raphson* είναι βολική για τον υπολογισμό τέτοιων συνόλων λύσεων με μορφή ομαλών συναρτήσεων χωρίς κομβικά σημεία (turning points), αποτυγχάνει όταν

<sup>1</sup>σημεία ισορροπίας αλλά και οριακοί κύκλοι (με βάση την Poincare απεικόνιση).

συναντήσει τέτοια ανώμαλα σημεία. Συνήθης μέθοδος επίλυσης για το πρόβλημα αυτό αποτελεί ο βηματισμός της λύσης μέσω παραμετροποίησης των κλάδων αυτής με ένα μήκος τόξου (*arc-length*),  $[x(s), p(s)]$ . Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι πως σε ανώμαλα σημεία δεν παρουσιάζει κάποιο πρόβλημα σύγκλισης. Επίσης, ενδέχεται για κάποιες τιμές της παραμέτρου να εμφανίζονται περιοδικές λύσεις. Για την περίπτωση αυτή, έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι για τον αριθμητικό υπολογισμό αυτών καθώς και για την παρακολούθηση της εξέλιξής τους για ένα εύρος της/των παραμέτρου/ων. Στη συνέχεια παρουσιάζουμε αναλυτικά τις μεθόδους αυτές.

## 5.2 Μέθοδος Newton-Raphson

Δεδομένης μίας τιμής  $p$  και μίας αρχικής εκτίμησης  $x^{(0)}$ , για τη λύση  $x(p)$ , εφαρμόζουμε τα επόμενα βήματα (που έχουν προκύψει μέσω ανάλυσης της λύσης σε σειρά Taylor) επαναληπτικά έως ότου να ικανοποιείται η σχέση  $\|\delta x^i\| < \epsilon$ :

$$\nabla f^i \delta x^i = -f(x^i, p) \quad (5.2)$$

$$x^{i+1} = x^i + \delta x^i \quad (5.3)$$

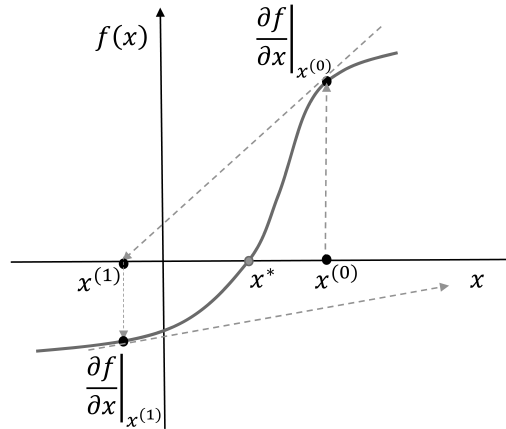
Ο όρος  $\nabla f$  αναπαριστά την Ιακωβιανή του  $f$ . Αυτός ο αλγόριθμος γενικά, συγκλίνει τετραγωνικά (όταν συγκλίνει). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις αποτυγχάνει να συγκλίνει όταν η αρχική εκτίμηση δεν είναι 'κοντά' στην πραγματική λύση. Ένα τέτοιο παράδειγμα παρουσιάζεται στο Σχ. 5.1.

Επιλέγοντας  $x^{(0)}$  σαν αρχική εκτίμηση για το σημείο ισορροπίας  $x^*$ , η πρώτη επανάληψη της Newton-Raphson χρησιμοποιεί την παράγωγο  $\frac{\partial f}{\partial x}|_{x^{(0)}}$  για να βρει την επόμενη προσέγγιση ( $x^{(1)}$ ). Ύστερα η παράγωγος  $\frac{\partial f}{\partial x}|_{x^{(1)}}$  οδηγεί τη νέα προσέγγιση μακριά του σημείου ισορροπίας  $x^*$ , δηλαδή η Newton-Raphson αποτυγχάνει να το εντοπίσει. Το παραπάνω μονο-διάστατο πρόβλημα μπορεί να επεκταθεί και στην πιο γενική περίπτωση όπου  $f: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$  δέχεται ως είσοδο το διάνυσμα  $x \in \mathbb{R}^n$  και όπου η Hessian

$$H_{i,j} = \frac{\partial^2 f}{\partial x_i \partial x_j} \quad (5.4)$$

γύρω από το σημείο ισορροπίας γίνεται singular.

Στην περίπτωση που αναζητούσαμε το διάγραμμα διακλάδωσης, δηλαδή τη λύση που προκύπτει από την Εξ. 5.1 για συνεχώς αυξανόμενες (ή συνεχώς μειούμενες) τιμές της παραμέτρου  $p$ , θα επιλύαμε μία φορά με την μέθοδο Newton-Raphson για  $p_0$ , και στη συνέχεια θα αυξάναμε την τιμή αυτής ( $p = p_0 + \delta p$ ), και θα χρησιμοποιούσαμε την λύση του πρώτου βήματος ως αρχική εκτίμηση του επόμενου. Στη συνέχεια θα επαναλαμβάναμε τη διαδικασία μέχρι να καταλήξουμε στο επιθυμητό διάγραμμα. Η παραπάνω μέθοδος ονομάζεται βηματισμός μηδενικής τάξης ή zero-th order continuation. Ο αλγόριθμος αυτός μπορεί να βελτιωθεί όπως φαίνεται παρακάτω.



Σχήμα 5.1: Περίπτωση συνάρτησης κατά την οποία η μέθοδος Newton-Raphson αποτυγχάνει να συγκλίνει [58].

### 5.3 Φυσικός βηματισμός σε παράμετρο (Natural continuation)

Ένας τρόπος για να ξεπερασθεί το πρόβλημα που αντιμετωπίζει η μέθοδος Newton-Raphson να συγκλίνει και επιπλέον να καθοριστεί πιο γρήγορα και αποτελεσματικά η εξάρτηση της λύσης  $x$  από την παράμετρο  $p$  είναι μέσω της μεθόδου του φυσικού βηματισμού (ή *natural continuation*). Μέσω αυτής, υπολογίζεται η παράγωγος  $x_p$  σε μία γνωστή λύση και μετά χρησιμοποιείται σαν μία καλύτερη αρχική εκτίμηση για την επόμενη τιμή του  $p$ . Η μέθοδος ονομάζεται φυσικός βηματισμός σε παράμετρο καθώς παραμετροποιεί την καμπύλη λύσεων με το  $p$ , δηλαδή την φυσικά εμφανιζόμενη παράμετρο.

Μία μορφή αυτής της μεθόδου είναι ο βηματισμός Euler-Newton. Δεδομένης μίας γνωστής λύσης  $(x_0, p_0)$ , υπολογίζουμε τις λύσεις σε γειτονικά σημεία του  $p$  όπως φαίνεται παρακάτω:

1. Υπολογίζω την παράγωγο  $x_p$  στο  $(x_0, p_0)$  από τη σχέση

$$\nabla f x_p = -f_p$$

2. Υπολογίζω την τιμή της λύσης μέσω Euler (από ανάλυση Taylor)

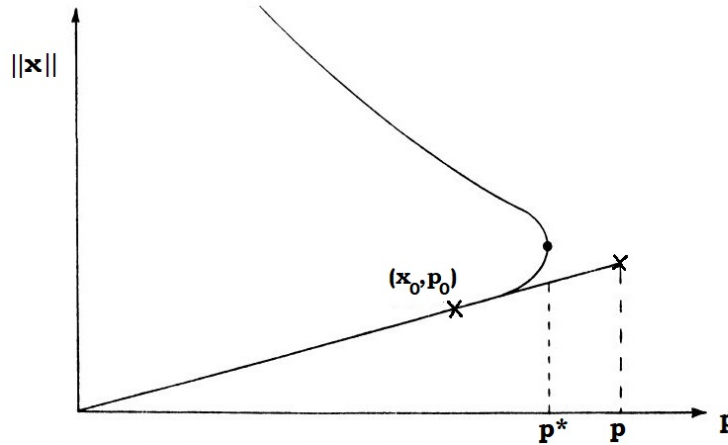
$$x^0 = x_0 + x_p (p - p_0)$$

3. Χρησιμοποιώ το  $x_0$  ως αρχική εκτίμηση για την μέθοδο Newton-Raphson μέχρι σύγκλισης

$$\nabla f^i (x^{i+1} - x^i) = -f(x^i, p)$$

4. Χρησιμοποιώ το  $(x(p), p)$  ως το νέο  $(x_0, p_0)$  και επαναλαμβάνω από το Βήμα 1.

Σημειώνεται πως για τον υπολογισμό της παραγώγου  $x_p$ , η Ιακωβιανή  $\nabla f$  έχει ήδη υπολογισθεί από το βήμα της Newton. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει ουσιαστικά, μεγάλα βήματα για την παράμετρο  $p$  καθώς υπολογίζεται το διάγραμμα διακλάδωσης και έτσι μειώνεται δραματικά το υπολογιστικό κόστος.



Σχήμα 5.2: Αδυναμία σύγκλισης της μεθόδου φυσικού βηματισμού σε παράμετρο κοντά σε οριακά σημεία.

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή χρειάζεται κάποιες τροποποιήσεις έτσι ώστε να μπορεί να αντιμετωπίζει γενικώς μη-γραμμικά συστήματα τα οποία ενδεχομένως εμφανίζουν στο διάγραμμα διακλάδωσής τους ιδιαίτερα σημεία (όπου η Ιακωβιανή  $\nabla f$  γίνεται singular), όπως οριακά σημεία και σημεία διακλάδωσης. Η μέθοδος Newton κοντά σε τέτοια σημεία θα συγκλίνει (αν συγκλίνει) γραμμικά, δημιουργώντας μεγάλο υπολογιστικό κόστος. Επιπλέον, κοντά σε ένα οριακό σημείο ενδέχεται να μην υπάρχει λύση για δεδομένη τιμή της παραμέτρου και έτσι η μέθοδος δεν θα συγκλίνει (βλ. Σχ. 5.2). Τέλος, απαραίτητη θεωρείται και η διατύπωση ενός μηχανισμού για την αλλαγή κλάδων σε σημεία διακλάδωσης.

#### 5.4 Βηματισμός σε παράμετρο με μήκος τόξου (Arc-length continuation)

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που αντιμετωπίζει η μέθοδος φυσικού βηματισμού αναπτύχθηκε η μέθοδος βηματισμού με μήκος τόξου. Σύμφωνα με αυτή, η λύση  $x$  παραμετροποιείται όχι με την φυσική παράμετρο  $p$ , αλλά με την παράμετρο μήκους τόξου  $s$ .

Έστω  $s$  η παράμετρος μήκους τόξου και  $x(s), p(s)$  συναρτήσεις αυτής. Ξεκινώντας από δύο γνωστές λύσεις  $(x(s_0), p(s_0))$  και  $(x(s), p(s))$  επιλύουμε την εξίσωση μόνιμης κατάστασης μαζί με την παρακάτω συνθήκη:

$$\|dx\|^2 + |dp|^2 = ds^2 \quad (5.5)$$

ή

$$\left\| \frac{x(s) - x(s_0)}{ds} \right\|^2 + \left| \frac{p(s) - p(s_0)}{ds} \right|^2 = 1$$

Η παραπάνω μη-γραμμική εξίσωση αποτελεί την *συνθήκη μήκους τόξου*.

Σύμφωνα με τον αλγόριθμο, μεταβαίνουμε από το προηγούμενο βήμα ( $s_0$ ) στο επόμενο ( $s$ ) μέσω της εφαπτομένης στον κλάδο της λύσης και απαιτούμε η νέα λύση  $x(s)$ ,  $p(s)$  να ικανοποιεί τη σχέση

$$g(x(s), p(s)) = \alpha (x(s) - x(s_0)) + \beta (p(s) - p(s_0)) - \Delta s = 0 \quad (5.6)$$

όπου

$$\alpha = \frac{(x(s) - x(s_0))^T}{\Delta s}, \quad \beta = \frac{(p(s) - p(s_0))}{\Delta s}$$

Επιπλέον απαιτούμε φυσικά την παρακάτω συνθήκη (steady-state)

$$f(x(s), p(s)) = 0 \quad (5.7)$$

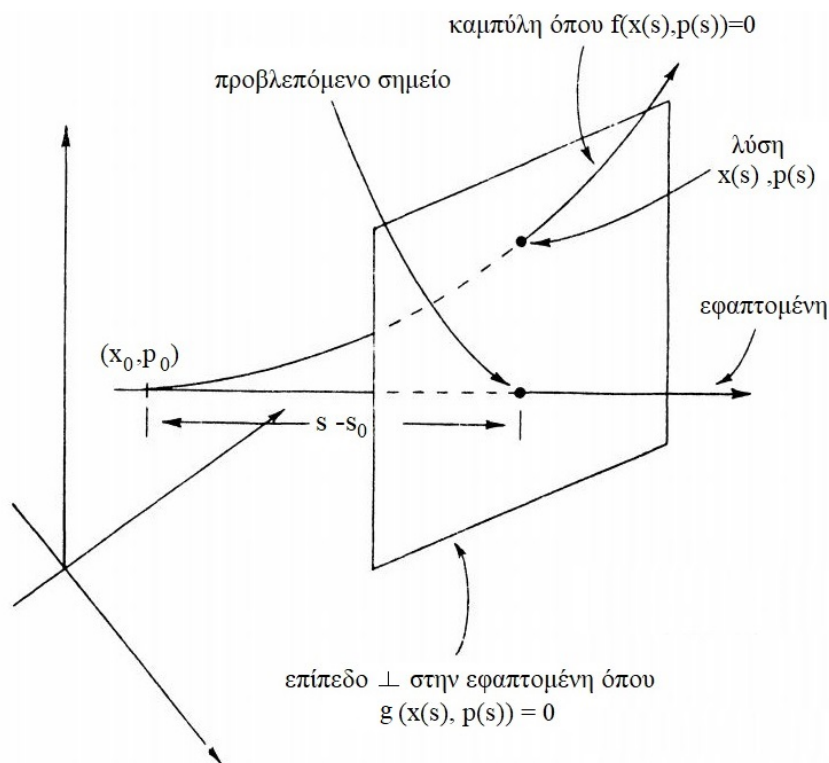
Η Εξ. 5.6 αποτελεί την γραμμικοποίηση της συνθήκης 5.5 και απαιτεί τη νέα λύση να βρίσκεται σε ένα υπερ-επίπεδο κάθετο στο εφαπτόμενο διάνυσμα της καμπύλης-λύσης στο  $s_0$  και σε μία απόσταση  $\Delta s = s - s_0$  από αυτό. Η Εξ. 5.7 απαιτεί τα  $x(s)$ ,  $p(s)$  να βρίσκονται πάνω στη καμπύλη πραγματικών λύσεων (βλ. Σχ. 5.3). Στη συνέχεια, επιλύουμε το σύστημα των παραπάνω εξισώσεων ως προς  $x(s)$ ,  $p(s)$  δεδομένου του βήματος  $\Delta s$ . Χρησιμοποιούμε τη μέθοδο Newton κατά την οποία πρέπει να λύσουμε σε κάθε επανάληψη το παρακάτω αλγεβρικό γραμμικό σύστημα:

$$\begin{bmatrix} \nabla f & \frac{df}{dp} \\ \alpha & \beta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} dx \\ dp \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} f(x, p) \\ g(x, p) \end{bmatrix} \quad (5.8)$$

Αποδεικνύεται πως σε οριακά σημεία το παραπάνω γραμμικό σύστημα είναι non-singular και επομένως η μέθοδος Newton για το σύστημα των εξισώσεων 5.6 και 5.7 είναι καλώς ορισμένη. Έτσι, τα οριακά σημεία δεν αποτελούν πλέον πρόβλημα και η τετραγωνική σύγκλιση είναι επίσης εφικτή. Ωστόσο, σε σημεία διακλάδωσης απαιτούνται συνθήκες ανώτερης τάξης για την επίλυση του προβλήματος [13].

## 5.5 Βηματισμός σε παράμετρο για την ανίχνευση κλάδων οριακών κύκλων (Limit cycle continuation)

Έστω τώρα πως το σύστημα εμφανίζει ταλαντωτική συμπεριφορά. Σε αυτή την περίπτωση θα ισχύει η παρακάτω συνθήκη



Σχήμα 5.3: Βηματισμός σε παράμετρο με μήκος τόξου (Arc-length continuation) [13].

$$x(t) = x(t + T) \quad (5.9)$$

όπου  $T$  η περίοδος της ταλάντωσης

Επομένως οι περιοδικές λύσεις μπορούν να υπολογισθούν λύνοντας το παρακάτω πρόβλημα συνοριακών συνθηκών (boundary value problem)

$$\begin{pmatrix} \dot{x} \\ \dot{T} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} f(x, p) \\ 0 \end{pmatrix}, \quad \begin{pmatrix} x(0) - x(T) \\ h(x(0), p) \end{pmatrix} = 0 \quad (5.10)$$

όπου  $h(x(0), p) = 0$  είναι η λεγόμενη 'phase' συνθήκη ή 'pinning' συνθήκη, η οποία αποκλείει τον άπειρο αριθμό οικογενειών ταλαντωτικών λύσεων. Η συνθήκη αυτή επιτρέπει επίσης τον αριθμητικό υπολογισμό της άγνωστης περιόδου με το να αποκλείει την μεταφορική χρονική αναλλοίωτη του προβλήματος. Για παράδειγμα, η συνθήκη θα μπορούσε να ήταν η σχέση  $h(x(0), p) \equiv x_i(0) - c = 0$  η οποία επιβάλλει το  $i$  στοιχείο του διανύσματος  $x$  για  $t = 0$  να λάβει μία συγκεκριμένη τιμή  $c$  ή θα μπορούσε να ήταν η σχέση  $h(x(0), p) \equiv \frac{dx_i(0)}{dt} = 0$  η οποία επιβάλλει το  $x_i$  για  $t = 0$  να είναι ένα κρίσιμο (μέγιστο ή ελάχιστο) σημείο του περιοδικού  $x_i$ .

Σημειώνεται πως το πακέτο αριθμητικής ανάλυσης διακλάδωσης MATCONT [19] (το οποίο χρησιμοποιήθηκε εν μέρει για τις αναλύσεις της παρούσας εργασίας) εφαρμόζει σαν pinning συνθήκη την παρακάτω ολοκληρωτική σχέση

$$\int_0^1 \langle x(t), \dot{x}(t) \rangle dt = 0 \quad (5.11)$$

όπου  $\dot{x}(t)$  είναι η παράγωγος του προηγούμενως υπολογισμένου οριακού κύκλου.

Το παραπάνω πρόβλημα συνοριακών συνθηκών μπορεί να επιλυθεί μέσω των μεθόδων shooting ή μεθόδων διακριτοποίησης όπως orthogonal collocation ή πεπερασμένες διαφορές. Το πρόγραμμα MATCONT εφαρμόζει orthogonal collocation [19] ενώ στους αλγορίθμους που αναπτύχθηκαν για την συγκεκριμένη εργασία εφαρμόστηκαν κεντρικές πεπερασμένες διαφορές (central finite differences).

Για πρακτικούς λόγους, μπορεί να εφαρμοσθεί ο μετασχηματισμός  $t' = \frac{t}{T}$  έτσι ώστε το πρόβλημα συνοριακών συνθηκών να ξαναγραφτεί ως:

$$\begin{pmatrix} \dot{x} \\ \dot{T} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} Tf(x, p) \\ 0 \end{pmatrix}, \quad \begin{pmatrix} x(0) - x(1) \\ h(x(0), p) \end{pmatrix} = 0 \quad (5.12)$$

Η επίλυση του παραπάνω συστήματος δίνει το προφίλ της ταλάντωσης, ξεκινώντας απο συγκεκριμένο σημείο που ορίζει η συνθήκη καθώς και την τιμή της περιόδου ταλάντωσης.

Σε αντιστοιχία με τις λύσεις μόνιμης κατάστασης, αναζητούμε τώρα την εξέλιξη των ταλαντωτικών λύσεων (μεταβολή περιόδου και πλάτους ταλάντωσης) καθώς μεταβάλλονται η/οι παράμετρος/οι του συστήματος. Η παρακολούθηση των λύσεων αυτών επιτυγχάνεται και εδώ μέσω της μεθόδου βηματισμού σε μήκος τόξου. Ας υποθέσουμε πως  $(x(s_0), p(s_0), T(s_0))$  και  $(x(s), p(s), T(s))$  είναι δύο γνωστές περιοδικές λύσεις. Σύμφωνα με τα προηγούμενα η συνθήκη μήκους τόξου γράφεται ως εξής

$$N(x, p, T) = \alpha(x(s) - x(s_0)) + \beta(p(s) - p(s_0)) + \gamma(T(s) - T(s_0)) - \delta S = 0 \quad (5.13)$$

όπου

$$\alpha \equiv \frac{(x(s_0) - x(s))^T}{\delta S}, \quad \beta \equiv \frac{p(s) - p(s_0)}{\delta S}, \quad \gamma \equiv \frac{T(s) - T(s_0)}{\delta S} \quad (5.14)$$

Ο βηματισμός σε παράμετρο των περιοδικών λύσεων επιτυγχάνεται ξανά με μία επαναληπτική διαδικασία όπως η Newton-Raphson σε συνδυασμό με την παραπάνω συνθήκη μήκους τόξου.





## Κεφάλαιο 6

# Μοντελοποίηση και ανάλυση της διαφοροποίησης των MSCs

Η μαθηματική μοντελοποίηση της δυναμικής βλαστικών κυττάρων δίνει τη δυνατότητα πρόβλεψης της συμπεριφοράς τέτοιων βιολογικών συστημάτων δίχως την ανάγκη διεξαγωγής πειραμάτων μεγάλου κόστους ή μεγάλης τεχνικής δυσκολίας. Η μοντελοποίηση του φαινομένου της διαφοροποίησης βλαστικών κυττάρων ειδικότερα, πρέπει να ενσωματώνει όλες τις παραμέτρους που υπεισέρχονται στο πρόβλημα όπως τη λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων, την εσωκυτταρική οργάνωση, την εφαρμογή μηχανικών δυνάμεων και την συνύπαρξη κυττάρων διαφορετικών ειδών [70, 103, 8].

### 6.1 Ανασκόπηση

Αρκετά μοντέλα έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία για την ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς των μεσεγχυματικών στρωματικών/βλαστικών κυττάρων. Το καθένα εξ αυτών λαμβάνει υπόψιν διαφορετικές παραμέτρους και περιγράφει μία συγκεκριμένη συμπεριφορά που εμφανίζουν τα MSCs. Οι Bailon-Plaza και van der Meulen [3] έχουν προτείνει ένα ντετερμινιστικό δισδιάστατο μοντέλο μερικών διαφορικών εξισώσεων για τη διαφοροποίηση των MSCs σε χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα κατά τη διάρκεια επούλωσης καταγμάτων. Το μοντέλο αυτό με επιτυχία προβλέπει τον ρυθμό της οστεογονικής ανάπτυξης λαμβάνοντας υπόψη τη σύνθεση της εξωκυτταρικής μήτρας καθώς και αποσύνθεσή της στο χρόνο. Οι Lemon *et al.* [61], ανέπτυξαν ένα μοντέλο συνήθων διαφορικών εξισώσεων βασισμένο σε πειραματικά δεδομένα το οποίο προβλέπει την αυτο-ανανέωση και διαφοροποίηση των MSCs που αναπτύσσονται μέσα σε τεχνητά πορώδη ικρίωματα artificial porous scaffolds. Το μοντέλο είναι κανό να προβλέψει την διαφοροποίηση των κυττάρων κάτω από διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης οξυγόνου το οποίο συσχετίζεται με μεγαλύτερο ή μικρότερο ρυθμό δημιουργίας MSCs και έτσι μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της κυτταρικής συμπεριφοράς εσωτερικά τέτοιων τεχνητών ικρίωμάτων φτιαγμένων από διαφορετικά υλικά. Ένα μοντέλο σε μορφή PDEs για την ισορροπία του πληθυσμού και ένα σε μορφή ODEs για τη μείωση του αυξητικού παράγοντα των MSCs το οποίο προσομοιώνει τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε

συνδεδειγμένους και μη συνδεδειγμένους ιστούς έχει προταθεί από τους Pisu *et al.* [80, 81].

Οι Stops *et al.* [100] ανέπτυξαν ένα μοντέλο υπολογιστικής υδροδυναμικής CFD για την περιγραφή της κυτταρικής διαφοροποίησης σε ικρίωματα το οποίο λαμβάνει υπόψη τις διατμητικές παραμορφώσεις και τις τάσεις που αναπτύσσονται λόγω της ροής ρευστού. Προσομοιώσεις έδειξαν πως συγκεκριμένοι συνδυασμοί τάσης και ταχύτητας ρευστού συνδέονται με συγκεκριμένες γραμμές διαφοροποίησης (differentiation lineages). Ένα μινιμαλιστικό μοντέλο σε μορφή ODEs έχει προταθεί από τους Schittler *et al.* [95]. Η ανάλυση διακλάδωσης σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου έδειξε πως η μοίρα των κυττάρων ρυθμίζεται από διάφορα ερεθίσματα καθώς και με τον συνδυασμό αυτών σε συγκεκριμένους χρόνους.

Οι ιδιότητες και η δυναμική των επιγενετικών τοπίων (Waddington 1957), σε ένα γενικότερο πλαίσιο, έχουν μελετηθεί εκτενώς μέσω απλών γενετικών ρυθμιστικών δικτύων (φαινομενολογικά μοντέλα) ενός ή δύο γονιδίων (GRNs) με αυτοενεργοποιητικούς και αμοιβαία ανασταλτικούς μεταγραφικούς παράγοντες (TFs) [114, 45, 25, 47, 115] (βλ. Κεφάλαιο 3). Οι Kaity *et al.* [47] μελέτησαν ένα δίκτυο δύο γονιδίων και απέδειξαν πως ξεκινώντας από την διαφοροποιημένη κατάσταση, το αντίθετο μονοπάτι μπορεί να ακολουθηθεί και να προσεγγιστεί η μη-διαφοροποιημένη κατάσταση (βλαστικά κύτταρα) μέσω της εμφάνισης ταλαντώσεων στις συγκεντρώσεις των μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, το μοντέλο προσφέρει και μία θεωρητική εξήγηση για το φαινόμενο της δια-διαφοροποίησης (transdifferentiation), κατά το οποίο ένα διαφοροποιημένο κύτταρο μπορεί να αλλάξει τύπο χωρίς να χρειαστεί να περάσει από τη μη-διαφοροποιημένη κατάσταση.

Οι Suzuki *et al.* [104] πρότειναν ένα μοντέλο δικτύου κυττάρων (το οποίο λαμβάνει υπόψη την αλληλεπίδραση κυττάρου προς κύτταρο), του οποίου η έκφραση πρωτεϊνών ρυθμίζεται από ένα GRN τεσσάρων γονιδίων. Οι συγγραφείς απέδειξαν πως βλαστικά κύτταρα τα οποία υφίστανται διαφοροποίηση εμφανίζουν συνεχώς ταλαντωτικές λύσεις. Ωστόσο, μελέτες σχετικές με τη δυναμική της συσταλτικής δραστηριότητας ακτιμοσίονης κατά τη διάρκεια επιθηλιακής μορφογένεσης, έχουν εντοπίσει πως η εμφάνιση ταλαντώσεων στο κυτταρικό σχήμα είναι ένας κατά βάση αυτόνομος μηχανισμός ο οποίος δεν χρειάζεται να στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο [38, 39].

Όπως περιγράφεται παραπάνω, τα μαθηματικά μοντέλα μηχανικής μεταγωγής έχουν αναπτυχθεί για να περιγράψουν τη μοίρα των MSCs που οδηγούνται από εξωτερικά μηχανικά ερεθίσματα, ωστόσο κάθε μοντέλο περιγράφει ένα διαφορετικό φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί πειραματικά. Πρόσφατα, προτάθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο από τους Peng *et al.* [76] με τη μορφή έξι ODEs για την προσέγγιση της δυναμικής διαφοροποίησης των MSCs σε νευρώνες, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα και οστεοβλάστες και τη σχετική συμπεριφορά αυτών σε ένα συνεχές φάσμα τιμών δυσκαμψίας της εξωκυττάριας μήτρας. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση του μοντέλου αυτού μέσω των εργαλείων της αριθμητικής ανάλυσης διακλάδωσης για την διερεύνηση ύπαρξης περιοδικών λύσεων αλλά και άλλων συμπεριφορών των επιπέδων συγκέντρωσης γονιδίων αλλά και της επιφάνειας επαφής κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας. Εστιάζουμε κυρίως στην εξαγωγή αποτελεσμάτων τα οποία συνδέονται με αλλαγές φάσης (phase transitions) στις γραμμές διαφοροποίησης και άρα τους τελικούς κυτταρικούς τύπους των MSCs. Στη συνέχεια θα παρουσιασθεί το μοντέλο διαφοροποίησης και θα

ακολουθήσει η ανάλυση αυτού.

## 6.2 Περιγραφή μοντέλου

Το μαθηματικό μοντέλο των Peng *et al.* χρησιμοποιεί τις παρακάτω παραδοχές. Τα κύτταρα 'αισθάνονται' τη δυσκαμψία των MSCs μέσω της προσκόλλησής τους στην εξωκυττάρια μήτρα. Οι YAP/TAZ (yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding domain (TAZ)) είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές οι οποίοι μεσολαβούν στην αντίληψη του κυττάρου για το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται καθώς και για τις μηχανικές ιδιότητες αυτού. Έχει βρεθεί πως η σηματοδότηση των YAP/TAZ είναι ο πιο βασικός παράγοντας για τη μορφογένεση των ιστών. Μελέτες δείχνουν πως εξωκυττάρια μήτρες μεγάλης δυσκαμψίας αντιστοιχούν στην ενεργοποίηση των YAP/TAZ, ενώ μήτρες μικρής δυσκαμψίας στην έλλειψη αυτών [21, 41]. Τα κύτταρα ουσιαστικά αναγνωρίζουν την δυσκαμψία της ECM ( $S$ ) καθώς και τη κυτταροσκελετική ένταση ως επίπεδα της δραστηριότητας των YAP/TAZ. Επιπροσθέτως, τα YAP/TAZ συνδέονται με τα επίπεδα έκφρασης ενός αριθμού γονιδίων-μεταγραφικών παραγόντων (εδώ TUBB3, PPARG, MYOD1 and RUNX2), τα οποία ρυθμίζουν γενετικά και προσδιορίζουν-αποφασίζουν για τη μοίρα των κυττάρων. Η διαφοροποίηση των MSCs περιγράφεται βιολογικά μέσω των παρακάτω γονιδίων αλλά και της αντίστοιχης συγκέντρωσής τους:

- TUBB3 – το γονίδιο που κωδικοποιεί την αλυσίδα Tubulin beta-3 , που σχετίζεται με τη νευρογένεση. Εκφράζεται όταν το κύτταρο δέχεται πληροφορία από εύκαμπτο υπόστρωμα ( $< 1kPa$ ).
- PPARG – ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπερο-ξεισωματίων  $\gamma$ , που σχετίζονται με την αδιπογενή μοίρα σε μαλακά υποστρώματα.
- MYOD1 – μύογενής διαφοροποίηση 1, η οποία εκφράζεται σε περιβάλλοντα μεσαίας δυσκαμψίας ( $\sim 10kPa$ ).
- RUNX2 – runt-συγγενής παράγοντας μεταγραφής 2, οδηγεί σε οστεογενή διαφοροποίηση και ενεργοποιείται σε δύσκαμπτα υποστρώματα ( $\sim 40kPa$ ).

Το ακόλουθο σύστημα των έξι συζευγμένων συνήθων διαφορικών εξισώσεων προσεγγίζει τη δυναμική συμπεριφορά του φαινομένου της διαφοροποίησης των MSCs σε νευρώνες, λιποκύτταρα, μυοκύτταρα και οστεοβλάστες.

$$\begin{aligned} \frac{d[SAA]}{dt} = & k_1 \frac{\left(\frac{S}{K_1}\right)^{n_1} + \left(\frac{[TUBB3]}{K_2}\right)^{n_2}}{1 + \left(\frac{S}{K_1}\right)^{n_1} + \left(\frac{[TUBB3]}{K_2}\right)^{n_2}} + k_2 \frac{\left(\frac{S}{K_3}\right)^{n_3} + \left(\frac{[PPARG]}{K_4}\right)^{n_4}}{1 + \left(\frac{S}{K_3}\right)^{n_3} + \left(\frac{[PPARG]}{K_4}\right)^{n_4}} + \\ & k_3 \frac{\left(\frac{S}{K_5}\right)^{n_5} + \left(\frac{[MYOD1]}{K_6}\right)^{n_6}}{1 + \left(\frac{S}{K_5}\right)^{n_5} + \left(\frac{[MYOD1]}{K_6}\right)^{n_6}} + k_4 \frac{\left(\frac{S}{K_7}\right)^{n_7} + \left(\frac{[RUNX2]}{K_8}\right)^{n_8}}{1 + \left(\frac{S}{K_7}\right)^{n_7} + \left(\frac{[RUNX2]}{K_8}\right)^{n_8}} - d_1[SAA] \end{aligned} \quad (6.1)$$

$$\frac{d[YAPT AZ]}{dt} = k_5[SAA] - d_2[YAPT AZ] \quad (6.2)$$

$$\frac{d[TUBB3]}{dt} = k_6 \frac{\left(\frac{[SAA]}{K_9}\right)^{n_9}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_9}\right)^{n_9} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{10}}\right)^{n_{10}}} - d_3[TUBB3] \quad (6.3)$$

$$\frac{d[PPARG]}{dt} = k_7 \frac{\left(\frac{[SAA]}{K_{11}}\right)^{n_{11}}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_{11}}\right)^{n_{11}} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{12}}\right)^{n_{12}}} - d_4[PPARG] \quad (6.4)$$

$$\frac{d[MYOD1]}{dt} = k_8 \frac{\left(\frac{[SAA]}{K_{13}}\right)^{n_{13}}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_{14}}\right)^{n_{14}} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{13}}\right)^{n_{13}}} - d_5[MYOD1] \quad (6.5)$$

$$\frac{d[RUNX2]}{dt} = k_9 \frac{\left(\frac{[SAA]}{K_{15}}\right)^{n_{15}}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_{16}}\right)^{n_{16}} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{15}}\right)^{n_{15}}} - d_6[RUNX2] \quad (6.6)$$

Οι τιμές των σταθερών αλλά και μεταβλητών παραμέτρων του παραπάνω μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.

### 6.3 Αριθμητική ανάλυση ευστάθειας και διακλάδωσης

#### 6.3.1 Κατασκευή μονοδιάστατου μοντέλου

Για την ανάλυση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το MATCONT για τον βηματισμό σε παράμετρο των οριακών κύκλων αλλά και για την διπαραμετρική ανάλυση διακλάδωσης των διακλαδώσεων τύπου Andronov-Hopf. Ο βηματισμός σε παράμετρο των οριακών κύκλων με το MATCONT εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας 20 mesh points και 4 collocation points, με αποτέλεσμα να έχουμε συνολικά 81 κόμβους. Ο υπολογισμός των οριακών κύκλων πραγματοποιήθηκε επίσης με τη χρήση πεπερασμένων διαφορών χρησιμοποιώντας διακριτοποίηση 320 κόμβων. Η διακριτοποίηση που χρησιμοποιήσαμε τόσο στο MATCONT όσο και στους αλγορίθμους που αναπτύξαμε πεπερασμένων διαφορών εγγυάται την αξιοπιστία της αριθμητικής προσέγγισης: ο διπλασιασμός του αριθμού των κόμβων από 20 σε 40 είχε ως αποτέλεσμα λιγότερο από  $10^{-3}$  διαφορά στην περίοδο εντός του εύρους των παραμέτρων διακλάδωσης. Για τους αλγορίθμους πεπερασμένων διαφορών, διπλασιάζοντας τον αριθμό των κόμβων από 320 σε 640, η μέγιστη διαφορά στην περίοδο ήταν της τάξεως του  $10^{-2}$ . Έτσι φαίνεται πως το MATCONT είναι πολύ πιο αποτελεσματικό στον υπολογισμό των οριακών κύκλων από άποψη αριθμητικής ακρίβειας σε σύγκριση με τους αλγορίθμους πεπερασμένων διαφορών (με τη

Πίνακας 6.1: Ονομαστικές τιμές των παραμέτρων του μοντέλου

Δείκτης	Παράμετρος	Τιμή nominal	Δείκτης	Παράμετρος	Τιμή nominal
1	$k_1$	0.2	22	$n_{13}$	20
2	$k_2^*$	2.2	23	$n_{14}$	60
3	$k_3$	5	24	$n_{15}$	45
4	$k_4$	9	25	$n_{16}$	55
5	$k_5^*$	4	26	$K_1$	600
6	$k_6$	2.9	27	$K_2$	1.1
7	$k_7$	3	28	$K_3$	1300
8	$k_8$	5	29	$K_4$	0.8
9	$k_9$	2	30	$K_5$	20000
10	$n_1$	4	31	$K_6$	1
11	$n_2$	2	32	$K_7$	60000
12	$n_3$	6	33	$K_8$	1.1
13	$n_4$	2	34	$K_9$	0.1
14	$n_5$	4	35	$K_{10}$	0.5
15	$n_6$	20	36	$K_{11}$	0.89
16	$n_7$	6	37	$K_{12}$	4
17	$n_8$	20	38	$K_{13}$	12
18	$n_9$	2	39	$K_{14}$	3
19	$n_{10}$	8	40	$K_{15}$	16
20	$n_{11}$	2	41	$K_{16}$	4.5
21	$n_{12}$	8		$d_i (i = 1, 2, \dots, 6)$	1

\* παράμετροι διακλάδωσης

συγκεκριμένη συνθήκη φάσης pinning condition). Για τους υπολογισμούς μας, το απόλυτο σχετικό σφάλμα για την επαναληπτική μέθοδο Newton-Raphson έχει τεθεί ίσο με  $10^{-6}$ .

Όσον αφορά τον υπολογισμό των κλάδων ισορροπίας, θα πρέπει να σημειώσουμε ότι για να συγκλίνει η Newton-Raphson στο αρχικό (ασταθές) σημείο ισορροπίας που απαιτείται για την ανίχνευση ασταθών κλάδων, είναι απαραίτητη μία καλή αρχική εκτίμηση, ακόμη και όταν η Jacobian δεν είναι singular δηλαδή όταν βρισκόμαστε μακριά από κρίσιμα σημεία.

Έτσι, για τους απομονωμένους κλάδους ασταθών λύσεων, δηλαδή τους κλάδους των λύσεων που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με χρονική ολοκλήρωση ή βηματισμό σε παράμετρο, η επιλογή της αρχικής εκτίμησης είναι κρίσιμη. Σε τέτοιες περιπτώσεις, μπορεί κανείς να διακριτοποιήσει για παράδειγμα το χώρο των αρχικών εκτιμήσεων, επιλέγοντας ένα μικρό βήμα (όπως  $10^{-4}$ ) και να εκτελέσει τον αλγόριθμο Newton-Raphson για κάθε μία από τις αρχικές εκτιμήσεις για να συγκλίνει σε όλους τους κλάδους των λύσεων στο επιθυμητό (με φυσική σημασία) εύρος τιμών τιμών. Ενώ αυτό μπορεί να γίνει για μονοδιάστατα ή διδιάστατα συστήματα, το λεγόμενο ‘curse of dimensionality’ καθιστά αυτό τον τρόπο απαγορευτικό υπολογιστικά ακόμα και όταν έχουμε πέντε ή έξι εξισώσεις. Για παράδειγμα, αν κάποιος έχει

έξι εξισώσεις όπως στην περίπτωση μας και επιδιώκει να εκτελέσει μια εκτενή αναζήτηση του αρχικού χώρου εκτιμήσεων, η διακριτοποίηση του χώρου σε τιμές  $10^4$  για κάθε μία από τις μεταβλητές, θα απαιτήσει την εκτέλεση της Newton-Raphson  $10^{24}$  φορές. Μια άλλη μέθοδος που διευκολύνει την επιλογή των 'καλών' αρχικών εκτιμήσεων (ειδικά για συστήματα χαμηλών διαστάσεων) είναι ο σχεδιασμός της/των συνάρτησης/σεων της δεξιά πλευράς (ή πλευρών) των διαφορικών εξισώσεων χρησιμοποιώντας ένα πλέγμα διακριτοποίησης των αντίστοιχων μεταβλητών και η αναζήτηση των σημείων όπου αυτές μηδενίζονται.

Εδώ, για να αντιμετωπίσουμε το πρόβλημα της εύρεσης 'καλών' αρχικών εκτιμήσεων για τους ασταθείς κλάδους, κατασκευάσαμε ένα μειωμένο μονοδιάστατο μοντέλο για να αναζητήσουμε όλες τις λύσεις μόνιμης κατάστασης στον παραμετρικό χώρο. Ρυθμίζοντας τα αριστερά μέλη των Εξ. (6.2) - (6.6) ίσα με το μηδέν προκύπτουν οι ακόλουθες αλγεβρικές σχέσεις:

$$[YAPT AZ] = \frac{k_5}{d_2} [SAA] \quad (6.7)$$

$$[TUBB3] = \frac{k_6}{d_3} \frac{\left(\frac{[SAA]}{K_9}\right)^{n_9}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_9}\right)^{n_9} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{10}}\right)^{n_{10}}} \quad (6.8)$$

$$[PPARG] = \frac{k_7}{d_4} \frac{\left(\frac{[SAA]}{K_{11}}\right)^{n_{11}}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_{11}}\right)^{n_{11}} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{12}}\right)^{n_{12}}} \quad (6.9)$$

$$[MYOD1] = \frac{k_8}{d_5} \frac{\left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{13}}\right)^{n_{13}}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_{14}}\right)^{n_{14}} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{13}}\right)^{n_{13}}} \quad (6.10)$$

$$[RUNX2] = \frac{k_9}{d_6} \frac{\left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{15}}\right)^{n_{15}}}{1 + \left(\frac{[SAA]}{K_{16}}\right)^{n_{16}} + \left(\frac{[YAPT AZ]}{K_{15}}\right)^{n_{15}}} \quad (6.11)$$

Τέλος, εισάγοντας τις Εξ. (6.7)-(6.11) στην Εξ. (6.1) θέτοντας  $\frac{d[SAA]}{dt} = 0$  λαμβάνουμε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\begin{aligned}
& -[SAA]d_1 + k_1 + k_2 + k_3 + k_4 - \\
& \frac{k_1}{1 + \left( \frac{([SAA]/K_9)^{n_9} k_6}{d_3 K_2 (1 + ([SAA]/K_9)^{n_9} + ([SAA]k_5/d_2 K_{10})^{n_{10}})} \right)^{n_2} + (S/K_1)^{n_1}} \\
& - \frac{k_2}{1 + \left( \frac{([SAA]/K_{11})^{n_{11}} k_7}{d_4 K_4 (1 + ([SAA]/K_{11})^{n_{11}} + ([SAA]k_5/d_2 K_{12})^{n_{12}})} \right)^{n_4} + (S/K_3)^{n_3}} \\
& - \frac{k_3}{1 + \left( \frac{([SAA]k_5/d_2 K_{13})^{n_{13}} k_8}{d_5 K_6 (1 + ([SAA]/K_{14})^{n_{14}} + ([SAA]k_5/d_2 K_{13})^{n_{13}})} \right)^{n_6} + (S/K_5)^{n_5}} \\
& - \frac{k_4}{1 + \left( \frac{([SAA]k_5/d_2 K_{15})^{n_{15}} k_9}{d_6 K_8 (1 + ([SAA]/K_{16})^{n_{16}} + ([SAA]k_5/d_2 K_{15})^{n_{15}})} \right)^{n_8} + (S/K_7)^{n_7}} = 0
\end{aligned} \tag{6.12}$$

Η παραπάνω είναι συνάρτηση μόνο της επιφάνειας προσκόλλησης SAA, η οποία μπορεί γενικά να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση κλάδων ισορροπίας με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Ωστόσο, πρέπει να σημειώσουμε ότι το παραπάνω μονοδιάστατο μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για σύγκλιση σε κλάδους ισορροπίας αλλά όχι σε κλάδους που αναπαριστούν ταλαντωτικές λύσεις. Για αυτούς, απαιτείται η ανάλυση του πλήρους μοντέλου ή τουλάχιστον δύο εξισώσεων από αυτό.

### 6.3.2 Μονοπαραμετρική ανάλυση - περιοχές μηχανικής μνήμης

Αρχικά, κατασκευάσαμε τα μονοδιάστατα διαγράμματα διακλάδωσης ως προς την παράμετρο που αντιστοιχεί στην δυσκαμψία του υποστρώματος (παράμετρος  $S$ ) θέτοντας στις υπόλοιπες παραμέτρους τις τιμές που αναφέρονται στο [76]. Τα σχήματα 6.1(a-f) απεικονίζουν τα υπολογισμένα διαγράμματα διακλάδωσης που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το μονοδιάστατο μοντέλο. Η συγκέντρωση του ρυθμιστή YAP/TAZ συναρτήσει της δυσκαμψίας του υποστρώματος δίνεται στο Σχήμα 6.1(a) ενώ η επαφάνεια επαφής κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας στο Σχήμα 6.1(b). Ουσιαστικά στο σημείο αυτό αναπαράγουμε τα διαγράμματα διακλάδωσης που παρουσιάζονται στο [76] μέσω του παραγόμενου μονοδιάστατου μοντέλου. Σε αυτόν τον παραμετρικό χώρο παρατηρούμε πέντε ξεχωριστούς κλάδους ισορροπίας και όχι κλάδους που αντιστοιχούν σε ταλαντωτικές λύσεις.

Ο πρώτος κλάδος (1) στο Σχήμα 6.1 αντιστοιχεί σε σχετικά μικρές τιμές της έκφρασης των ρυθμιστών YAP/TAZ και ένα κρίσιμο σημείο ( $TP_1$ ) εμφανίζεται. Ένας δεύτερος κλάδος σάγματος-κόμβου (2) (Σχήμα 6.1) εμφανίζεται λόγω ενός σημείου καμπής ( $TP_2$ ). Ο τρίτος κλάδος που αντιστοιχεί σε υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας YAP/TAZ και ευσταθούς ισορροπίας, φτάνει στο κρίσιμο σημείο ( $TP_3$ ), όπου εμφανίζεται ένας κλάδος σαγματικών σημείων ισορροπίας με σχεδόν σταθερές τιμές των ρυθμιστών YAP/TAZ. Υπάρχει επίσης ένας κλάδος υψηλότερων τιμών συγκέντρωσης, ο κλάδος (4), ο οποίος επίσης εμγανίζει κρίσιμο σημείο καμπής ( $TP_4$ ). Ένας πέμπτος κλάδος ευσταθούς ισορροπίας εμφανίζεται (κλάδος (5) στο Σχήμα

6.1) που αντιστοιχεί σε ακόμη υψηλότερα επίπεδα έκφρασης YAP/TAZ. Η συμπεριφορά της επιφάνειας επαφής κυττάρου-μήτρας (SAA) είναι ανάλογη με αυτή των YAP/TAZ, καθώς από τις εξισώσεις βλέπουμε πως για την περίπτωση των λύσεων μόνιμης κατάστασης θα έχουμε:  $[SAA] = d_2[YAP/TAZ]/k_5$  (βλ. Σχήμα 6.1(b)). Οι συγκεκριμένες τιμές που εμφανίζονται τα σημεία διακλάδωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2: Σημεία διακλάδωσης του Σχ. 6.1

	$S^*(kPa)$	YAP/TAZ*	SAA*	TUBB3*	PPARG*	MYOD1*	RUNX2*
( $TP_1$ )	0.36	0.13	0.03	0.27	0	0	0
( $TP_2$ )	0.62	0.77	0.19	0.28	0.14	0	0
( $TP_3$ )	10.39	10.99	2.75	0	0.01	0.73	0
( $TP_4$ )	16.37	15.83	3.96	0	0	$10^{-4}$	0.77

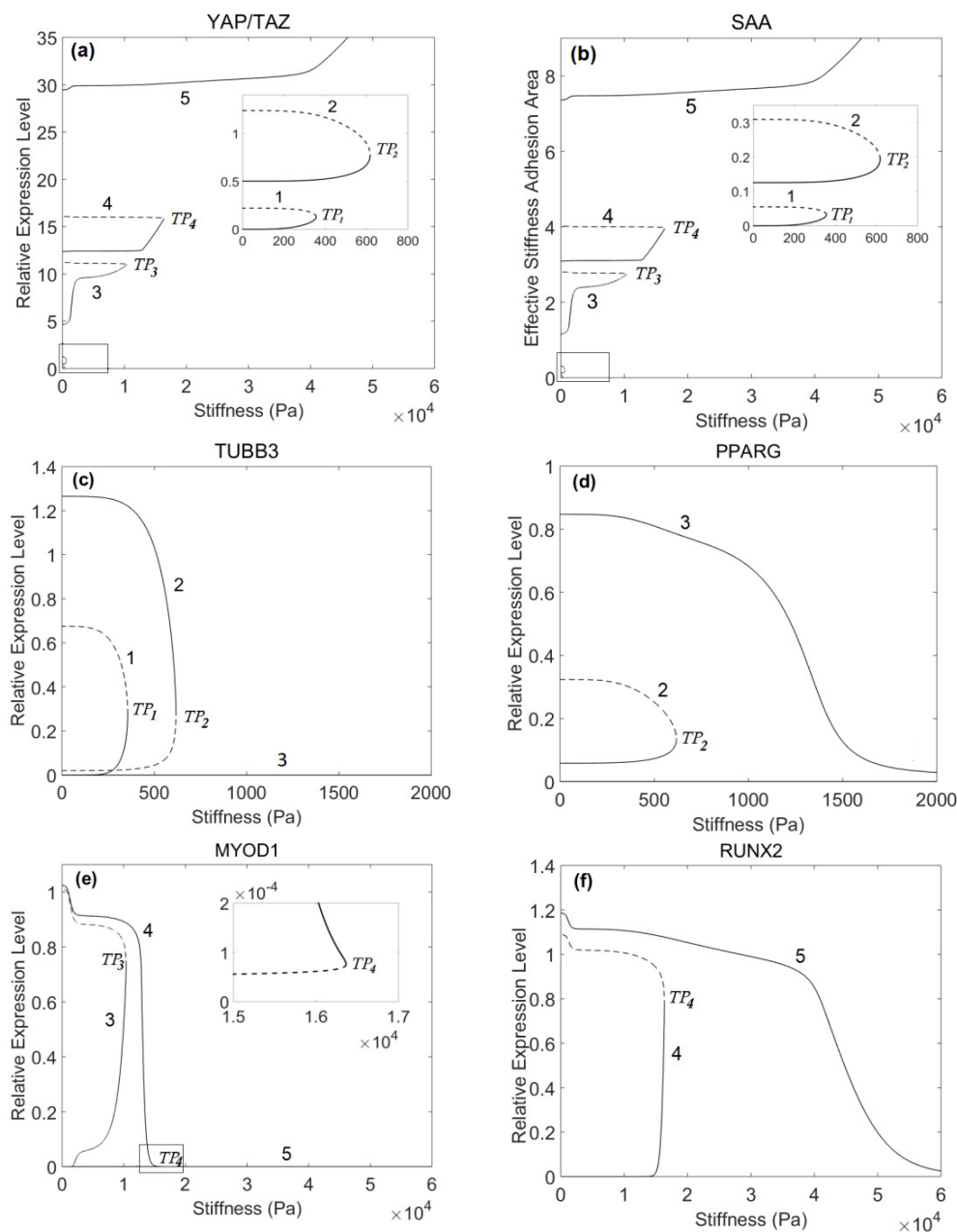
Το Σχήμα 6.1(c) απεικονίζει το διάγραμμα διακλάδωσης της συγκέντρωσης του γονιδίου TUBB3. Ξεκινώντας από χαμηλές (κοντά στο μηδέν) συγκεντρώσεις όταν η δυσκαμψία του υποστρώματος είναι κάτω από  $0.36kPa$ , το γονίδιο παραμένει στον κλάδο (1). Καθώς η δυσκαμψία αυξάνεται πέραν του πρώτου σημείου διακλάδωσης ( $S_{TP_1}^*$ ,  $[TUBB3]_{TP_1}^* = 0.27$ ) η λύση δίνεται πλέον από τον κλάδο (2). Με περαιτέρω αύξηση της δυσκαμψίας πέραν του δεύτερου σημείου διακλάδωσης ( $S_{TP_2}^*$ ,  $[TUBB3]_{TP_2}^* = 0.28$ ) το σύστημα βρίσκεται στον τρίτο κλάδο ευσταθούς ισορροπίας (3) ο οποίος οδηγεί το γονίδιο σε συγκεντρώσεις κοντά στο μηδέν (ο κλάδος (3) συμπιέζεται σε κοντά στο μηδέν τιμές μέσα στο εύρος  $10^{-7}$  έως  $10^{-4}$ ). Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται για υψηλότερες τιμές της δυσκαμψίας όπου πάλι οι κλάδοι (4) και (5) συμπιέζονται σε μηδενικές τιμές.

Το Σχήμα 6.1(d) αντιστοιχεί στο διάγραμμα διακλάδωσης για τα επίπεδα συγκέντρωσης του γονιδίου PPARG. Οι κλάδοι (1),(4) και (5) δεν απεικονίζονται καθώς αντιστοιχούν σε τιμές πολύ κοντά στο μηδέν. Πέραν του σημείου διακλάδωσης του κλάδου (2) ( $S_{TP_2}^*$ ,  $[PPARG]_{TP_2}^* = 0.14$ ), η έκφραση του γονιδίου αυτού 'πηδάει' απότομα στον κλάδο (3) μέχρι να προσεγγίσει το κρίσιμο σημείο ( $S_{TP_3}^*$ ,  $[PPARG]_{TP_3}^* = 0.01$ ) (το οποίο δεν παρουσιάζεται καθώς αντιστοιχεί σε τιμές δυσκαμψίας πάνω του  $10^4$  Pa), όπου το σημείο καμπής δημιουργεί έναν ασταθή κλάδο ισορροπίας με τιμές της συγκέντρωσης του γονιδίου κοντά στο μηδέν.

Το διάγραμμα διακλάδωσης της συγκέντρωσης του γονιδίου MYOD1 παρουσιάζεται στην εικόνα 6.1(e). Οι κλάδοι (1) και (2) αντιστοιχούν σε αμελητέες τιμές της σχετικής έκφρασης MYOD1 και έτσι δεν απεικονίζονται. Καθώς αυξάνουμε την τιμή της δυσκαμψίας του υποστρώματος  $S$ , η συγκέντρωση MYOD1 αυξάνεται μέσω του κλάδου (3) μέχρι το σημείο καμπής ( $TP_3$ ) και στη συνέχεια μια περαιτέρω αύξηση της δυσκαμψίας οδηγεί σε μείωση του MYOD1, και μέσω του κλάδου (4) σε μηδενικές τιμές. υπάρχει επίσης ένα σημείο καμπής στο ( $S_{TP_4}^*$ ,  $[MYOD1]_{TP_4}^* \approx 10^{-4}$ ) (το οποίο παρουσιάζεται σαν υπο-διάγραμμα στο Σχήμα 6.1(e)).

Στη συνέχεια, για ακόμα υψηλότερες τιμές της δυσκαμψίας της εξωκυττάριας μήτρας ECM, ο κλάδος (5) βλέπουμε πως αντιστοιχεί σε περίπου μηδενικές τιμές της συγκέντρωσης του





Σχήμα 6.1: Μονοπαραμετρικά διαγράμματα διακλάδωσης του μοντελου διαφοροποίησης. **(a)** Επίπεδα συγκέντρωσης των ρυθμιστών YAP/TAZ. **(b)** Επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. **(c-f)** Επίπεδα συγκεντρώσεως των γονιδίων TUBB3, PPARG, MYOD1 και RUNX2 αντίστοιχα. Η παράμετρος διακλάδωσης (οριζόντιος άξονας) αντιστοιχεί στην δυσκαμψία του υποστρώματος. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στους κλάδους ευσταθούς ισορροπίας ενώ οι διακεκομμένες στους κλάδους ασταθούς ισορροπίας. Οι κλάδοι οι οποίοι δεν απεικονίζονται στα **(c-f)** αντιστοιχούν σε τιμές των ρυθμιστικών παραγόντων YAP/TAZ από  $10^{-7}$  έως  $10^{-3}$  (π.χ. υπο-διάγραμμα στο Σχ. 6.1(e)).

γονιδίου MYOD1. Τέλος, στο Σχήμα 6.1(f) απεικονίζονται τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου RUNX2 που σχετίζεται με την διαφοροποίηση των MSCs σε οστεοβλάστες. Οι κλάδοι (1) και (2) αντιστοιχούν σε αμελητέες τιμές της γονιδιακής έκφρασης. Ωστόσο, για υψηλότερες τιμές της δυσκαμψίας ( $\sim 15kPa$ ), και ακολουθώντας την διαδρομή του κλάδου (4), εμφανίζεται ένα σημείο καμπής στο ( $S_{TP_4}^*$ ,  $[RUNX2]_{TP_4}^* = 0.77$ ). Στη συνέχεια, πέραν από αυτό το σημείο η λύση μεταβαίνει στον ευσταθή κλάδο (5) που χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου RUNX2 όπου η οστεογενής διαφοροποίηση γίνεται κυρίαρχη. Μία περαιτέρω αύξηση της δυσκαμψίας της μήτρας οδηγεί σε χαμηλές εκφράσεις του γονιδίου RUNX2 και τιμές κοντά στο μηδέν για ακόμη μεγαλύτερες τιμές ( $> 60kPa$ ).

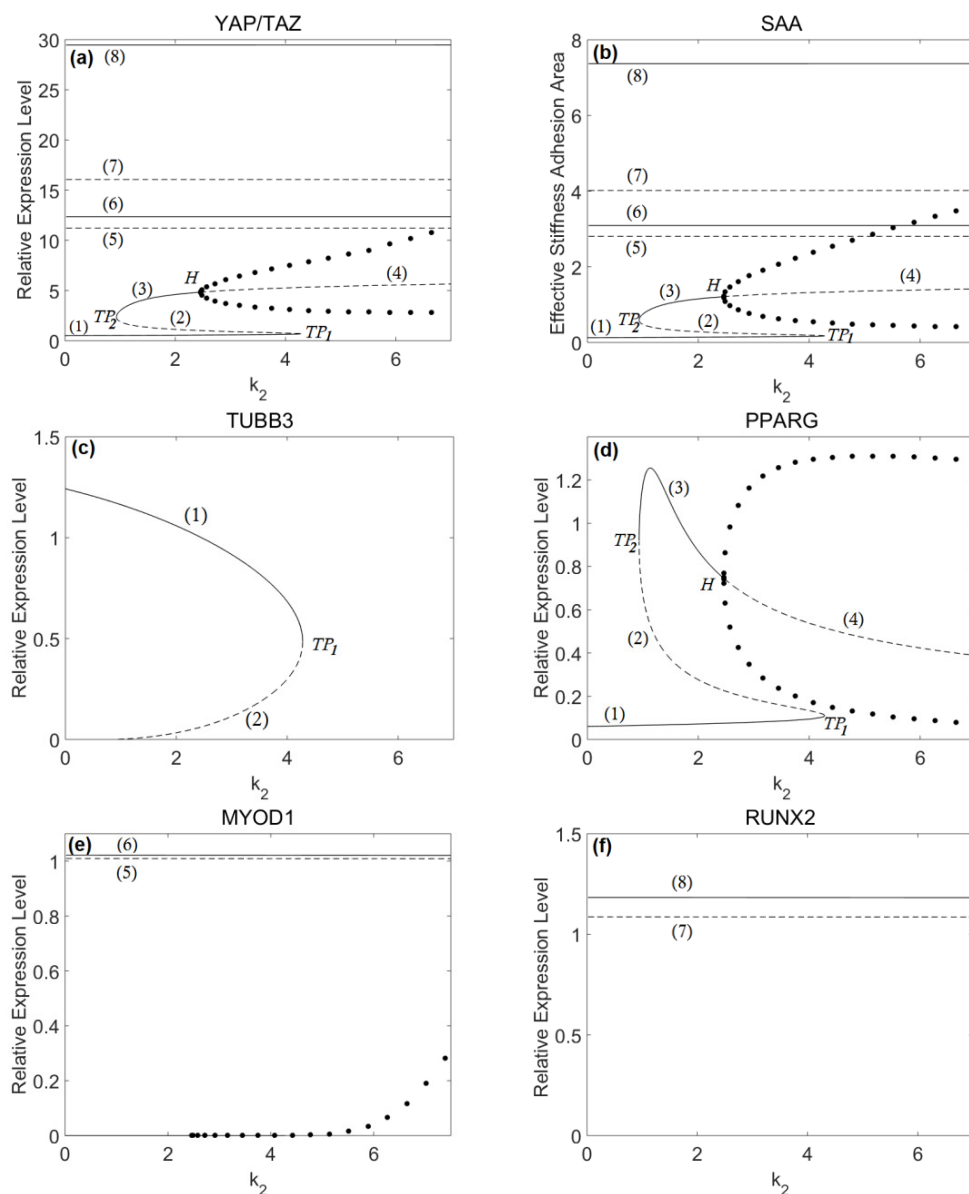
### Μηχανική μνήμη

Από τα διαγράμματα διακλάδωσης των σχετικών επιπέδων έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων (TUBB3, PPAR $\gamma$ , MYOD1 και RUNX2) μπορούμε επίσης να παρατηρήσουμε τις αντίστοιχες περιοχές μηχανικής μνήμης (mechanical memory). Σημειώνεται πως μόνο για το γονίδιο που αντιστοιχεί σε οστεογενή διαφοροποίηση (RUNX2) έχει παρατηρηθεί τέτοια περιοχή στο παρελθόν. Ξεκινώντας από το μηδέν και αυξάνοντας την τιμή της δυσκαμψίας του υποστρώματος η συγκέντρωση κάθε γονιδίου μεταπηδά από χαμηλότερες σε υψηλότερες εκφράσεις λόγω της εμφάνισης διαδοχικών σημείων διακλάδωσης (καμπής) και μετά μειώνεται απότομα (κοντά σε μηδενικές τιμές) για τα γονίδια TUBB3, MYOD1 και PPAR $\gamma$ . Τα επίπεδα έκφρασης του RUNX2 προσεγγίζουν πιο ομαλά το μηδέν για πολύ υψηλές τιμές της δυσκαμψίας ( $> 60kPa$ ) Έτσι, λόγω του φαινομένου της υστερήσης που προκύπτει από τις διακλαδώσεις τύπου σάγματος-κόμβου, τα βλαστικά κύτταρα ουσιαστικά «θυμούνται» τις προηγούμενες συγκεντρώσεις γονιδίων μόνο μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών δυσκαμψίας. Αυτή η περιοχή είναι σχετικά μικρή για τους νευρώνες (Σχήμα 6.1(c)) και λιποκύτταρα (Σχήμα 6.1(d)) και μεγαλύτερη για τα μυοκύτταρα (Σχήμα 6.1(e)) και τους οστεοβλάστες (Σχήμα 6.1(f)). Παραδείγματος χάριν, παρατηρούμε ότι η οστεογονική διαφοροποίηση (που αντιστοιχεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου RUNX2) παραμένει ακόμη και αν μειώσουμε σημαντικά την δυσκαμψία του υποστρώματος (π.χ. από  $40kPa$  σε  $20kPa$ ).

### 6.3.3 Μη-γραμμικές ταλαντώσεις

Στο σημείο αυτό θα μελετήσουμε τη συμπεριφορά του συστήματος, μεταβάλλοντας δύο διαφορετικές παραμέτρους του μοντέλου, συγκεκριμένα τις παραμέτρους  $k_2$  και  $k_5$ . Η παράμετρος  $k_2$ , η οποία εμφανίζεται στην Εξ. 6.1 σχετίζεται με τον όρο που ρυθμίζει αυξητικά την επιφάνεια προσκόλλησης του κυττάρου στο υπόστρωμα και ελέγχεται από το γονίδιο PPAR $\gamma$ . Ενώ στην προηγούμενη ανάλυση, η τιμή αυτής της παραμέτρου είχε τεθεί ως  $k_2 = 2.2$ , εδώ μελετάμε τη δυναμική συμπεριφορά του συστήματος στο εύρος τιμών  $[0-7.5]$ . Για την μονοπαραμετρική ανάλυση διακλάδωσης, επιλέξαμε να ρυθμίσουμε την δυσκαμψία του υποστρώματος σε μια ενδιάμεση τιμή δηλαδή  $S = 500Pa$ . Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το πλήρες μοντέλο έξι διαστάσεων. Αυτή τη φορά, το μοντέλο παρουσιάζει μια πολύ πιο περίπλοκη συμπεριφορά, συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης σημείων διακλάδωσης τύπου Andronov-Hopf (βλ. Σχήμα

6.2).



Σχήμα 6.2: Μονοπαραμετρικά διαγράμματα διακλάδωσης ως προς την παράμετρο  $k_2$ . **(a)** Επίπεδα συγκέντρωσης των ρυθμιστών YAP/TAZ. **(b)** Επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. **(c-f)** Επίπεδα συγκεντρώσεως των γονιδίων TUBB3, PPARG, MYOD1 και RUNX2 αντίστοιχα. Η παράμετρος διακλάδωσης (οριζόντιος άξονας) αντιστοιχεί στην παράμετρο  $k_2$  που σχετίζεται με τον μηχανισμό θετικής ανα-τροφοδότησης που με βάση τα επίπεδα του γονιδίου PPARG, ενεργοποιεί την επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στους κλάδους ευσταθούς ισορροπίας, οι διακεκομμένες στους κλάδους ασταθούς ισορροπίας και οι χρωματιστοί κύκλοι στο μέγιστο και ελάχιστο πλάτος ταλάντωσης (ευσταθείς οριακοί κύκλοι).

Θέτοντας την παράμετρο διακλάδωσης ως  $k_2 = 2.2$  και ξεκινώντας από μία αρχική εκτίμηση ( $[SAA] = 0.14$ ,  $[YAP/TAZ] = 0.6$ ,  $[TUBB3] = 1$ ,  $[PPARG] = 0.1$  ανδ  $[MYOD1] = [RUNX2] \approx 0$ ), ο αλγόριθμος συγκλίνει στον πρώτο κλάδο ευσταθούς ισορροπίας (1) (Σχήμα 6.2(a-f)). Έπειτα χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο βηματισμού σε παράμετρο, εντοπίστηκαν οι κλάδοι ασταθούς ισορροπίας (2),(4) και ευσταθούς ισορροπίας (3). Ξεκινώντας από τον κλάδο ισορροπίας (1) με μικρές τιμές των ρυθμιστών YAP/TAZ και αυξάνοντας σταδιακά την τιμή της παραμέτρου, ανιχνεύουμε το πρώτο σημείο διακλάδωσης ( $TP_1$ ) και ακολουθώντας τον ασταθές κλάδο (2) στο Σχήμα 6.2, ανιχνεύσαμε ένα δεύτερο σημείο διακλάδωσης ( $TP_2$ ). Με περαιτέρω αύξηση της τιμής της παραμέτρου, ο κλάδος ισορροπίας μετατρέπεται σε ασταθής καθώς μία υπερκρίσιμη διακλάδωση τύπου Andronov-Hopf (πρώτος συντελεστής Lyapunov  $-1.52 \cdot 10^{-1}$ ) εμφανίζεται και έτσι προκύπτουν ευσταθείς ταλαντώσεις στο σύστημα. Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζονται οι τιμές των μεταβλητών του συστήματος στα σημεία διακλάδωσης.

Πίνακας 6.3: Σημεία διακλάδωσης του Σχ. 6.2

	$k_2^*$	$YAP/TAZ^*$	$SAA^*$	$TUBB3^*$	$PPARG^*$	$MYOD1^*$	$RUNX2^*$
( $TP_1$ )	4.28	0.70	0.17	0.49	0.11	0	0
( $TP_2$ )	0.93	2.38	0.59	0	0.92	0	0
( $H$ )	2.46	4.84	1.21	0	0.75	0	0

Η τιμή της παραμέτρου στο σημείο διακλάδωσης Andronov-Hopf είναι πολύ κοντά στην αρχική ονομαστική της τιμή ( $\sim 12\%$  διαφορά). Για ακόμη μεγαλύτερες τιμές της παραμέτρου, εμφανίζονται ταλαντώσεις μεγαλύτερου πλάτους που συνεχίζουν μέχρι το σημείο διακλάδωσης των οριακών κύκλων (που δεν απεικονίζεται στα διαγράμματα καθώς αντιστοιχεί σε μεγάλες τιμές  $k_2$ ). Χρησιμοποιώντας το πλήρες μοντέλο, προσπαθήσαμε να βρούμε και άλλους απομονωμένους κλάδους ισορροπίας μέσω χρονικής ολοκλήρωσης εφαρμόζοντας διαφορετικές αρχικές εκτιμήσεις. Με αυτόν τον τρόπο καταφέραμε να συγκλίνουμε στους κλάδους ευσταθούς ισορροπίας (6) και (8) του Σχήματος 6.2. Εντούτοις, η θεωρία διακλαδώσεων απαιτεί την ύπαρξη τουλάχιστον δύο ασταθών κλάδων ισορροπίας μεταξύ των κλάδων (3)-(6) και (6)-(8) (βλέπε Σχήμα 6.2). Λόγω του λόγου που εξηγείται στην προηγούμενη ενότητα, προκειμένου να ανιχνευθούν αυτοί οι ασταθείς κλάδοι χρειάζονται καλές αρχικές εκτιμήσεις για τους αλγορίθμους. Όταν οι αρχικές εκτιμήσεις δεν ήταν αρκετά κοντά στις λύσεις, η εφαρμογή του αλγορίθμου Newton-Raphson αποτυγχάνει να συγκλίνει λόγω των σιγμοειδών συναρτήσεων του συστήματος (βλ. Σχήμα 6.3). Για παράδειγμα, όσον αφορά την περίπτωση του κλάδου (5) που φαίνεται στο Σχήμα 6.2 (όπου μόνο τρεις SAA, YAP/TAZ και MYOD1 από τις έξι μεταβλητές είναι διάφορες του μηδενός), η εξάρτηση του SAA σαν συνάρτηση του MYOD1 (θέτοντας τα TUBB3, PPARG και RUNX2 ίσα με το μηδέν στην Εξ. 6.1 ) θα δίνεται από την παρακάτω:

$$\begin{aligned}
 SAA = f_1([MYOD1]) &= \frac{k_1}{d_1} \frac{(S/K_1)^{n_1}}{1 + (S/K_1)^{n_1}} + \frac{k_2}{d_1} \frac{(S/K_3)^{n_3}}{1 + (S/K_3)^{n_3}} \\
 &+ \frac{k_3}{d_1} \frac{(S/K_5)^{n_5} + ([MYOD1]/K_6)^{n_6}}{1 + (S/K_5)^{n_5} + ([MYOD1]/K_6)^{n_6}} + \frac{k_4}{d_1} \frac{(S/K_7)^{n_7}}{1 + (S/K_7)^{n_7}}
 \end{aligned} \tag{6.13}$$

και η εξάρτηση του MYOD1 σαν συνάρτηση του SAA και YAP/TAZ (από Εξ. 6.5) θα δίνεται από την σχέση:

$$MYOD1 = g_1([SAA], [YAPTAZ]) = \frac{k_8}{d_5} \frac{([YAPTAZ]/K_{13})^{n_{13}}}{1 + ([SAA]/K_{14})^{n_{14}} + ([YAPTAZ]/K_{13})^{n_{13}}} \quad (6.14)$$

Οι γραφικές παραστάσεις των  $f_1$  και  $g_1$  παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.3(a) και 6.3(b) αντίστοιχα.

Για τον ασταθή κλάδο (7) που παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.2, κατά τον οποίο μόνο τρεις από τις έξι συνολικά μεταβλητές είναι διάφορες του μηδενός (SAA, YAP/TAZ και RUNX2), η εξάρτηση του SAA σαν συνάρτηση του RUNX2 (θέτοντας τα TUBB3, PPARG και MYOD1 ίσα με το μηδέν στην Εξ. 6.1) δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$SAA = f_2([RUNX2]) = \frac{k_1}{d_1} \frac{(S/K_1)^{n_1}}{1 + (S/K_1)^{n_1}} + \frac{k_2}{d_1} \frac{(S/K_3)^{n_3}}{1 + (S/K_3)^{n_3}} + \frac{k_3}{d_1} \frac{(S/K_5)^{n_5}}{1 + (S/K_5)^{n_5}} + \frac{k_4}{d_1} \frac{(S/K_7)^{n_7} + ([RUNX2]/K_8)^{n_8}}{1 + (S/K_7)^{n_7} + ([RUNX2]/K_8)^{n_8}} \quad (6.15)$$

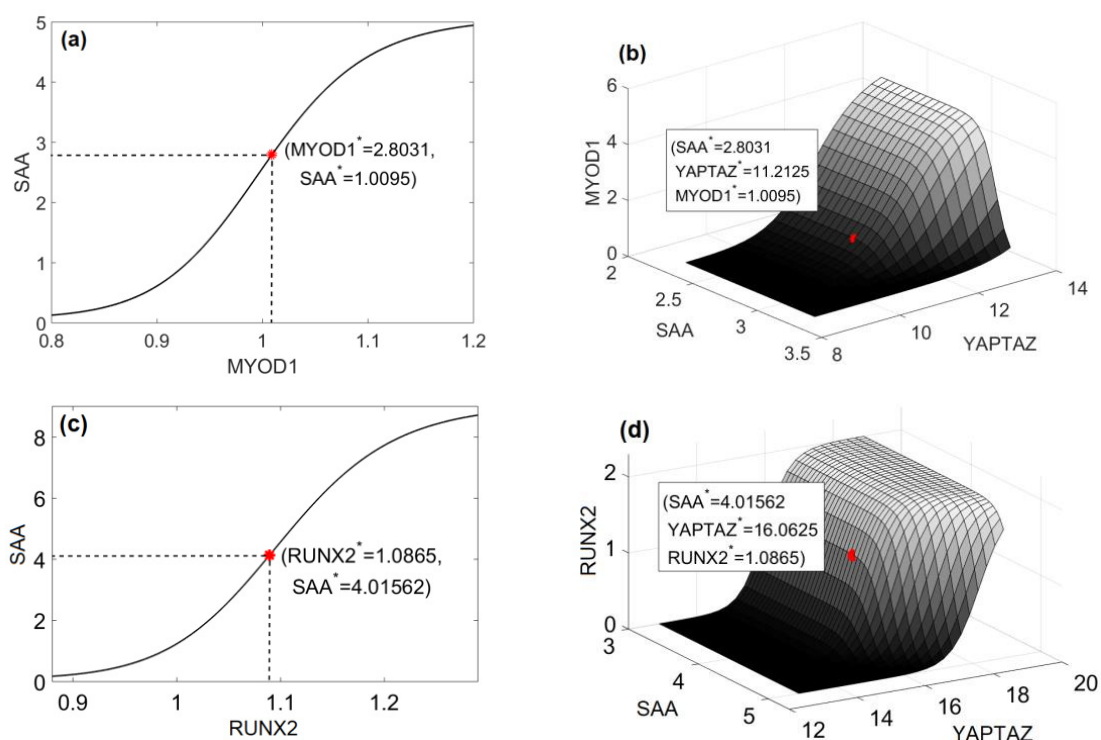
και η εξάρτηση του RUNX2 σαν συνάρτηση του SAA και του YAP/TAZ (από την Εξ. 6.6) δίνεται από τη σχέση:

$$RUNX2 = g_2([SAA], [YAPTAZ]) = \frac{k_9}{d_5} \frac{([YAPTAZ]/K_{15})^{n_{15}}}{1 + ([SAA]/K_{16})^{n_{16}} + ([YAPTAZ]/K_{15})^{n_{15}}} \quad (6.16)$$

Οι γραφικές παραστάσεις των  $f_2$  και  $g_2$  δίνονται στο Σχήμα 6.3(c) και 6.3(d).

Με σκοπό να υπολογίσουμε ‘καλές’ αρχικές εκτιμήσεις για τον αλγόριθμο Newton-Raphson στο εύρος τιμών [0–15] του SAA, δημιουργήσαμε το διάγραμμα του αριστερού μέλους της Εξ. 6.12 συναρτήσει των τιμών SAA (Σχήμα 6.4). Έτσι, μέσω των κατάλληλων αυτών αρχικών εκτιμήσεων, ο αλγόριθμος συνέκλινε στους κλάδους (5) και (7) του Σχήματος 6.2. Χρησιμοποιώντας τις τιμές αυτές του SAA σαν αρχικές εκτιμήσεις μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και το πλήρες σύστημα των έξι εξισώσεων μέσω των αλγεβρικών σχέσεων που τα συνδέουν, δηλαδή Εξ. 6.7 - 6.11 .

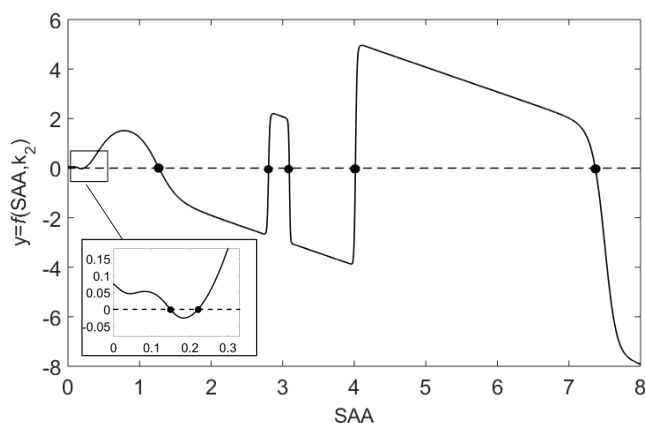
Έτσι, θέτοντας  $S = 500Pa$  για μία σταθερή τιμή του  $k_2$ , μπορούμε να έχουμε (ενδιάμεσα του  $(TP_2)$  και του  $(H)$  σημείου) συνολικά 8 διαφορετικές λύσεις ισορροπίας, 4 από τις οποίες είναι ευσταθείς και 4 ασταθείς. Καθεμία από αυτές μπορεί να επέλθει μέσω των κατάλληλων αρχικών συνθηκών των  $\Sigma\Delta E$ , όπως την αρχική επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας, όπου θα οδηγήσουν το σύστημα σε αυτές. Συγκεκριμένα οι τιμές των ρυθμιστών YAP/TAZ για τους κλάδους (5),(6),(7) και (8) είναι  $[YAPTAZ]_{(5)} = 11.21$ ,  $[YAPTAZ]_{(6)} = 12.37$ ,  $[YAPTAZ]_{(7)} = 16.06$  και  $[YAPTAZ]_{(8)} = 29.47$  αντίστοιχα.



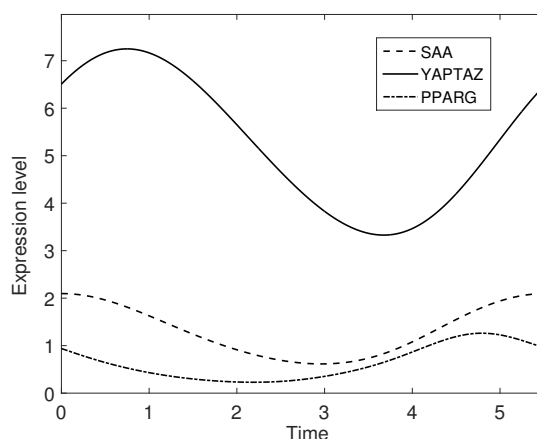
Σχήμα 6.3: Εξάρτηση των μη-μηδενικών μεταβλητών στους ασταθείς κλάδους ισορροπίας (5) και (7) του Σχήματος 6.2 ( $S = 0.5kPa, k_2 = 2.2$ ). Στον κλάδο (5) μόνο τα SAA, YAP/TAZ και MYOD1 είναι διάφορα του μηδενός, ενώ στους κλάδους (7) μόνο το SAA, YAP/TAZ και RUNX2 είναι διάφορα του μηδενός. (a) Κλάδος (5): SAA συναρτήσει του MYOD1, (b) Κλάδος (5): MYOD1 συναρτήσει των SAA και YAP/TAZ, (c) Κλάδος (7): SAA συναρτήσει του RUNX2, (d) Κλάδος (7): RUNX2 συναρτήσει των SAA και YAP/TAZ. Παρουσιάζονται επίσης και οι τιμές των σημείων ισορροπίας. Οι σιγμοειδείς συναρτήσεις δείχνουν γιατί ο αλγόριθμος Newton-Raphson αποτυγχάνει να συγκλίνει σε αυτά όταν οι αρχικές εκτιμήσεις δεν είναι αρκετά κοντά στην ακριβή λύση.

Μέσω της ανάλυσης προέκυψαν ταλαντώσεις στο γονίδιο PPARG (Σχήμα 6.2(d)). Αυτό αποδεικνύει την κυριαρχία αυτού του συγκεκριμένου γονιδίου και επομένως της αδιπογενο-ύς διαφοροποίησης όταν το κύτταρο καλλιεργείται σε υποστρώματα τιμών δυσκαμψίας κοντά στα  $500Pa$ . Οι περιοδικές λύσεις των τριών μεταβλητών (SAA, YAP/TAZ και PPARG), υπολογισμένες με τον αλγόριθμο πεπερασμένων διαφορών στο μειωμένο σύστημα τριών ΣΔΕ (παραλείποντας τις Εξ. 6.3, 6.5, 6.6 και θέτοντας τις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις γονιδίων ίσες με το μηδέν) για  $k_2 = 3.5$  παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.5.

Όσον αφορά τη συμπεριφορά των άλλων γονιδίων (Σχήμα 6.2 (c,e,f)), το μοντέλο προβλέπει ότι για το ίδιο εύρος της παραμέτρου διακλάδωσης, η έκφρασή τους δεν είναι περιοδικής μορφής αλλά αντίθετα παραμένει σε ευσταθείς ή ασταθείς κλάδους ισορροπίας.



Σχήμα 6.4: Γραφική παράσταση του αριστερού μέλους της Εξ. 6.12 συναρτήσεως του SAA στο εύρος  $[0 - 8]$  για  $k_2 = 2.2$  και  $S = 500 Pa$ . Τα σημεία που απεικονίζονται αντιπροσωπεύουν τις προσεγγιστικές λύσεις της εξίσωσης και έτσι τις τιμές του SAA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικές εκτιμήσεις για την σύγκλιση της μεθόδου Newton-Raphson και για τον αλγόριθμο βηματισμού σε παράμετρο των κλάδων ισορροπίας του Σχήματος 6.2.



Σχήμα 6.5: Περιοδικά προφίλ της επιφάνειας επαφής κυττάρου-μήτρας, των ρυθμιστών YAP/TAZ και της έκφρασης του γονιδίου PPARG. Τα προφίλ αυτά υπολογίστηκαν μέσω του αλγορίθμου πεπερασμένων διαφορών για  $k_2 = 3.5$ .

#### 6.3.4 Ομοκλινικές διακλαδώσεις

Οι ταλαντώσεις στην περιοχή έκφρασης και προσκόλλησης των γονιδίων παρουσιάστηκαν επίσης και μέσω μικρής μεταβολής της παραμέτρου  $k_5$ , που βρίσκεται στον όρο υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της συγκέντρωσης των μεταγραφικών παραγόντων YAP/TAZ καθώς η επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας αυξάνεται. Τα διαγράμματα διακλάδωσης ως προς την παράμετρο  $k_5$  παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.6.

Ξεκινώντας από το μηδέν και αυξάνοντας την τιμή της παραμέτρου διακλάδωσης, ο κλάδος ισορροπίας (1) χάνει τη ευστάθειά του μέσω ενός υπερκρίσιμου σημείου διακλάδωσης τύπου Andronov-Hopf ( $H_1$ ) (πρώτος συντελεστής Lyapunov  $-1.64 \cdot 10^{-1}$ ), κάτι το οποίο σηματοδοτεί την εμφάνιση ενός κλάδου ευσταθών οριακών κύκλων. Ο κλάδος ευσταθών οριακών κύκλων εξαφανίζεται ξαφνικά μέσω μίας ομοκλινικής διακλάδωσης ( $HB_1$ ), κατά την οποία ο ευσταθής οριακός κύκλος ‘χτυπά’ το σημείο ισορροπίας - σάγμα (στον κλάδο (4) στο Σχήμα 6.6). Με την περαιτέρω αύξηση της παραμέτρου διακλάδωσης  $k_5$  εμφανίζεται μια δεύτερη ομοκλινική διακλάδωση ( $HB_2$ ) ακολουθούμενη από ένα δεύτερο υπερκρίσιμο σημείο διακλάδωσης τύπου Andronov-Hopf ( $H_2$ ) (πρώτος συντελεστής Lyapunov  $-3.50 \cdot 10^{-1}$ ). Ακολουθώντας αυτή τη διαδρομή, το σύστημα φτάνει σε κρίσιμο σημείο ( $TP_1$ ) όπου εμφανίζεται ένας ασταθής κλάδος λύσεων ισορροπίας - κλάδος (4), στον οποίο εμφανίζονται οι ομοκλινικές διακλαδώσεις.

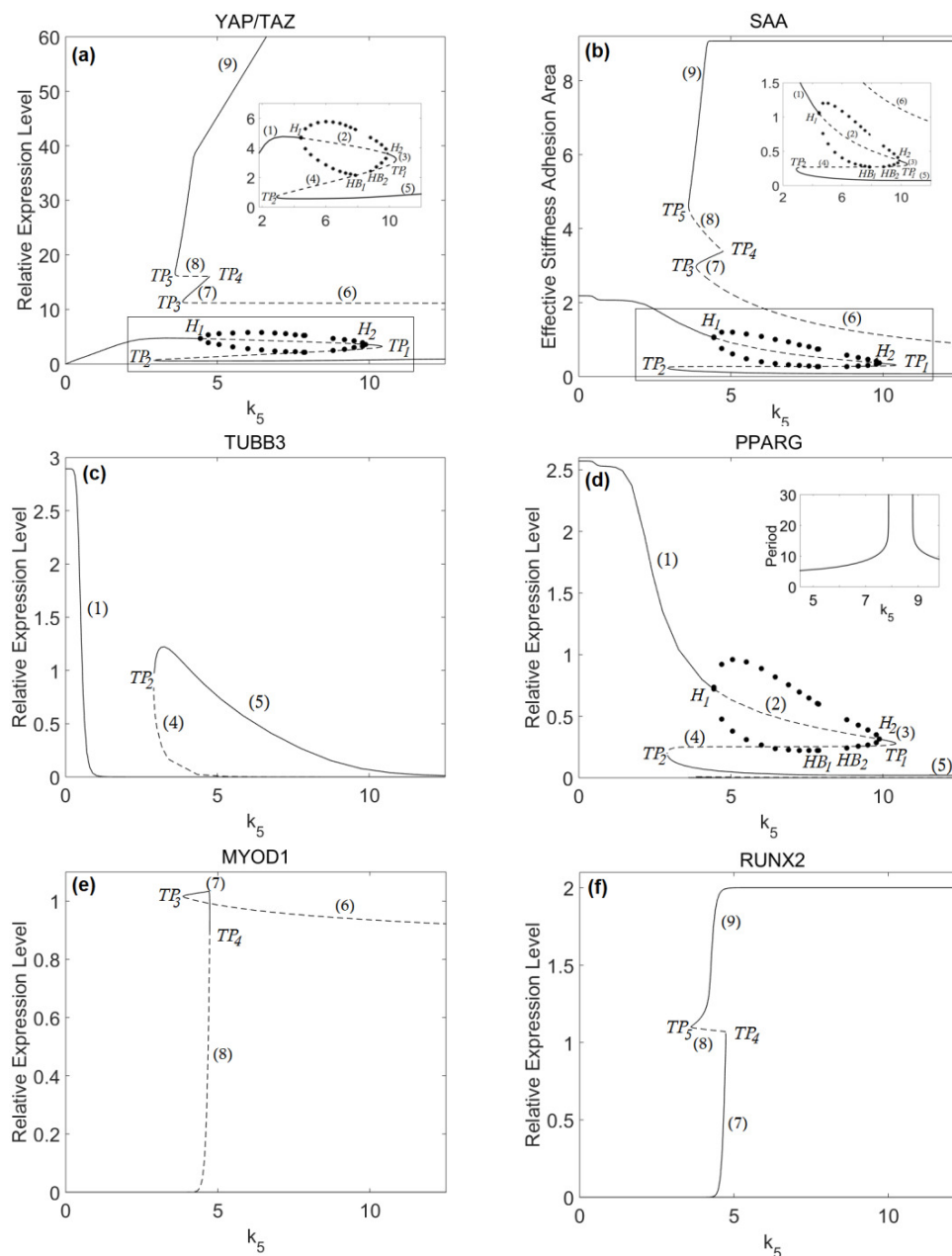
Πίνακας 6.4: Σημεία διακλάδωσης του Σχήματος 6.6

	$k_5^*$	YAPTAZ*	SAA*	TUBB3*	PPARG*	MYOD1*	RUNX2*
( $H_1$ )	4.44	4.66	1.05	0	0.72	0	0
( $HB_1$ )	7.88	2.13	0.27	0	0.25	0	0
( $H_2$ )	9.88	3.61	0.36	0	0.31	0	0
( $HB_2$ )	8.80	2.40	0.27	0	0.25	0	0
( $TP_1$ )	10.42	3.22	0.31	0	0.28	0	0
( $TP_2$ )	2.90	0.69	0.24	0.84	0.20	0	0
( $TP_3$ )	3.86	11.43	2.96	0	0.01	1.02	0
( $TP_4$ )	4.73	16.02	3.38	0	0	0.95	1.03
( $TP_5$ )	3.61	16.69	4.62	0	0	0	1.10

Ένα δεύτερο σημείο διακλάδωσης (fold point) ( $TP_2$ ) παρατηρείται, μετά του οποίου ακολουθεί ένας κλάδος ευσταθούς ισορροπίας για ακόμη μικρότερες τιμές του YAP/TAZ (κλάδος (5) στο Σχήμα 6.6) και μη-μηδενικές τιμές αποκλειστικά για την συγκέντρωση του γονιδίου TUBB3. Αναφορικά με το άνω μέρος του διαγράμματος, ξεκινώντας με τις κατάλληλες αρχικές συνθήκες από τον ευσταθή κλάδο (9) και μεταβάλλοντας την τιμή της παραμέτρου διακλάδωσης, το σύστημα φθάνει ένα κρίσιμο σημείο (fold) ( $TP_5$ ) και δύο ακόμη ( $TP_4$ ), ( $TP_3$ ) αντίστοιχα. Στον Πίνακα 6.4 παρουσιάζονται οι τιμές των μεταβλητών στα σημεία διακλάδωσης.

Αν και το διάγραμμα διακλάδωσης της επιφάνειας επαφής κυττάρου-υποστρώματος SAA συναρτήσει της παραμέτρου  $k_5$  (Σχήμα 6.6(b)) είναι παρόμοιο με αυτό των ρυθμιστών YAP/TAZ (Σχήμα 6.6(a)), παρατηρούμε ότι ο ανώτερος σταθερός κλάδος (9) φτάνει σε μια σταθερή τιμή ( $[SAA] \approx 9.07$ ) για  $k_5 > 4.31$  ενώ στο Σχήμα 6.6 αυτόν ο κλάδος αυξάνεται απότομα. Τα επίπεδα έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων που εξετάζονται παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.6(c-f). Το μοντέλο προβλέπει ότι οι ταλαντώσεις της επιφάνειας επαφής και των ρυθμιστών YAP/TAZ, προκαλούν την εμφάνιση περιοδικών λύσεων για το γονίδιο PPARG που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των MSCs σε λιποκύτταρα. Μέσα σε αυτό το εύρος της παραμέτρου διακλάδωσης, τα άλλα τρία επίπεδα γονιδιακής έκφρασης δεν παρουσιάζουν παρόμοιες





Σχήμα 6.6: Μονοπαραμετρικά διαγράμματα διακλάδωσης ως προς την παράμετρο  $k_5$ . **(a)** Επίπεδα συγκέντρωσης των ρυθμιστών YAP/TAZ. **(b)** Επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας. **(c-f)** Επίπεδα συγκεντρώσεως των γονιδίων TUBB3, PPARG, MYOD1 και RUNX2 αντίστοιχα. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στους κλάδους ευσταθούς ισορροπίας, οι διακεκομμένες στους κλάδους ασταθούς ισορροπίας και οι χρωματιστοί κύκλοι στο μέγιστο και ελάχιστο πλάτος ταλάντωσης (ευσταθείς οριακοί κύκλοι).

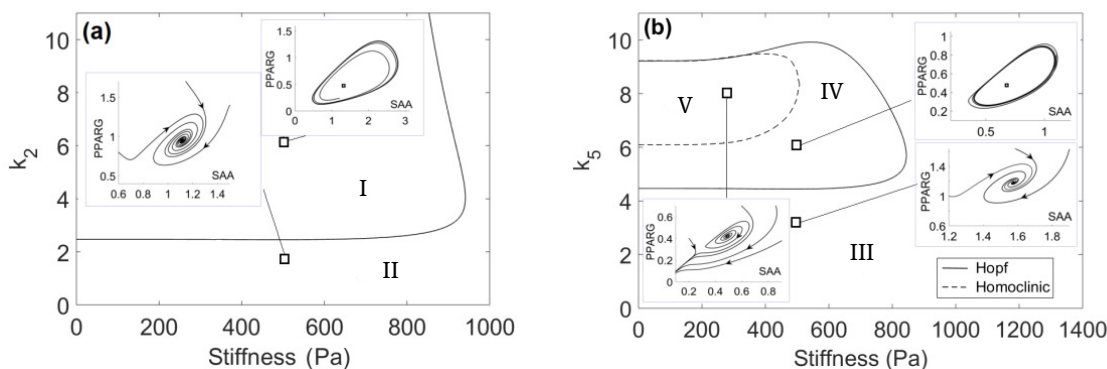
λύσεις, αλλά αντίθετα παραμένουν σε κατάσταση ευσταθούς ή ασταθούς ισορροπίας (Σχήμα 6.6 (c,e,f)).

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το σύστημα εμφανίζει πολλαπλές λύσεις ισορροπίας

(έως και επτά) καθώς και ταλαντώσεις σε ένα διάστημα των τιμών της παραμέτρου  $k_5$  πολύ κοντά στην ονομαστική του τιμή ( $k_5 = 4$ ). Φυσικά, απαιτούνται οι κατάλληλες αρχικές συνθήκες ώστε το σύστημα να φτάσει σε μία από αυτές τις πιθανές καταστάσεις. Η εμφάνιση των ομοκλινικών διακλαδώσεων που σταματούν ξαφνικά τις περιοδικές λύσεις των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου PPARG στο Σχήμα 6.6(d) οδηγεί το σύστημα στον ευσταθή κλάδο ισορροπίας (5) του Σχήματος 6.6. Αυτή η μετάβαση προκαλεί την αυξανόμενη ρύθμιση της έκφρασης νευρογενών γονιδίων (γονίδιο που κωδικοποιεί την αλυσίδα βήτα-3 Tubulin) η οποία ενεργοποιείται σε περιβάλλοντα μικρής δυσκαμψίας και προκαλεί νευρογενή διαφοροποίηση.

Σημειώνεται ότι οι περιοδικές λύσεις που εμφανίζονται για ένα συγκεκριμένο εύρος της παραμέτρου  $k_5$  μπορούν επίσης να υπολογιστούν και με το μειωμένο σύστημα των ΣΔΕ. Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι οι ταλαντώσεις για τρία από τα τέσσερα γονίδια (TUBB3, MYOD1 και RUNX2) καταστέλλονται στο μηδέν. Σε μια τέτοια περίπτωση, οι αντίστοιχοι κλάδοι (2) και (3) πάνω στους οποίους εμφανίζονται οι ταλαντώσεις μπορούν να υπολογιστούν αριθμητικά παραλείποντας τις Εξ. 6.3, 6.5 και 6.6.

### 6.3.5 Διπαραμετρική ανάλυση



Σχήμα 6.7: Διπαραμετρική ανάλυση των Andronov-Hopf (συνεχείς γραμμές) και ομοκλινικών σημείων διακλάδωσης (διακεκομμένες γραμμές) συναρτήσε του (a)  $k_2$  και  $S$  (βλ. Σχήμα 6.2) και (b)  $k_5$  και  $S$  (βλ. Σχήμα 6.6). Οι περιοχές I, IV αντιστοιχούν σε ευσταθείς οριακούς κύκλους με ασταθής σημεία ισορροπίας εσωτερικά αυτών. Χαρακτηριστικά διαγράμματα φάσης για ( $S = 500Pa$ ,  $k_2 = 6$ ) και ( $S = 500Pa$ ,  $k_5 = 6$ ), αντίστοιχα δίνονται επίσης. Οι περιοχές II,III αντιστοιχούν σε σημεία ευσταθούς ισορροπίας και τα αντίστοιχα διαγράμματα φάσεως δείχνουν ευσταθείς σπείρες για ( $S = 500Pa$ ,  $k_2 = 1.8$ ) και ( $S = 500Pa$ ,  $k_5 = 3$ ), αντίστοιχα. Η περιοχή V η οποία περικυκλώνεται από την διακεκομμένη γραμμή των ομοκλινικών διακλαδώσεων αντιστοιχεί σε μία περιοχή ασταθών σημείων ισορροπίας. Ένα αντίστοιχο διάγραμμα φάσης παρουσιάζεται για ( $S = 300Pa$ ,  $k_5 = 8$ ) (ασταθής σπείρα).

Για την ανίχνευση των διακλαδώσεων τύπου Andronov-Hopf και των ομοκλινικών διακλαδώσεων που σηματοδοτούν την έναρξη των μη-γραμμικών ταλαντώσεων καθώς και την απότομη εξαφάνισή τους, εφαρμόσαμε διπαραμετρική ανάλυση διακλάδωσης χρησιμοποιώντας

το MATCONT [19, 17] συναρτήσσει την δυσκαμψία του υποστρώματος  $S$  και των παραμέτρων του μοντέλου  $k_2$  και  $k_5$ .

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.7. Το Σχήμα 6.7 (a) δείχνει το διδιάστατο διάγραμμα διακλάδωσης συναρτήσσει των  $k_2$  και  $S$  (βλ. επίσης Σχήμα 6.2). Το Σχήμα 6.7 (b) δείχνει το αντίστοιχο διάγραμμα συναρτήσσει των  $k_5$  και  $S$  του  $(H_1)$  Andronov-Hopf (βλ. επίσης σχήμα 6.6). Οι συνεχείς γραμμές και στα δύο Σχήματα 6.7 (a),(b) απεικονίζουν τα σημεία διακλάδωσης τύπου Andronov-Hopf. Στο Σχήμα 6.7 (b) οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τα σημεία των ομοκλίνικων διακλαδώσεων. Οι περιοχές I και IV αντιπροσωπεύουν περιοχές όπου παρατηρούνται ευσταθείς ταλαντώσεις, ενώ οι περιοχές II, III σημεία ευσταθούς ισορροπίας. Παρουσιάζονται επίσης χαρακτηριστικά πορτραίτα φάσης των διαφόρων περιοχών. Έτσι, παρατηρούνται μη-γραμμικές ταλαντώσεις για τιμές δυσκαμψίας του ECM μέχρι  $S \approx 900 Pa$ . Αυτές οι σχετικά χαμηλές τιμές της δυσκαμψίας αντιστοιχούν σε ταλάντωση της συγκέντρωσης του γονιδίου PPARG που ευνοεί την αδιπογενή διαφοροποίηση των MSCs.



# Κεφάλαιο 7

## Επίλογος

### 7.1 Συμπεράσματα

Μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις στην κλάδο της αναπτυξιακής βιολογίας είναι η κατανόηση και η μοντελοποίηση των μηχανισμών που σχετίζονται με τη δυναμική συμπεριφορά του φαινομένου της ρύθμισης γενετικών γονιδίων, μιας διαδικασίας που επηρεάζεται από κυτταρικά αυτόνομους μηχανισμούς ή/και από εξωγενείς παράγοντες όπως η αλληλεπίδραση με τα γειτονικά κύτταρα ή/και την εξωκυττάρια μήτρα (ECM) [38]. Από την εισαγωγή του ‘επιδημιολογικού τοπίου’ (Waddington 1957) των κοιλάδων διακλάδωσης, μία μέθοδος που περιγράφει με φαινομενολογικό τρόπο πως η γονιδιακή ρύθμιση και η αμοιβαία αλληλεπίδραση των γονιδίων σχετίζονται με την κυτταρική διαφοροποίηση και τον καθορισμό κυτταρικού τύπου, υπήρξε όλο και περισσότερο ενδιαφέρον και προσπάθεια για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων που σκοπό έχουν να εξηγήσουν τους βασικούς μηχανισμούς που διέπουν το φαινόμενο αυτό [47].

Οι περισσότερες από τις υπάρχουσες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μοντελοποίηση των γενετικών ρυθμιστικών δικτύων (GRNs) - συνήθως με μικρό αριθμό γονιδίων - που διέπουν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων, δηλαδή μελετώντας κατά κύριο λόγο το ρόλο των αυτόνομων κυτταρικών μηχανισμών στον καθορισμό κυτταρικού τύπου [47, 115, 39]. Έτσι, η ανάλυση αυτών των μοντέλων επιτυγχάνεται μέσω ανάλυσης διακλάδωσης [45, 25, 47, 115]. Ωστόσο, πειραματικές μελέτες έχουν τονίσει τη σημασία των εξωτερικών μηχανικών ερεθισμάτων και ειδικότερα τη σημασία της εξωκυττάριας μήτρας στον προσδιορισμό των τελικού κυτταρικού τύπου ενός MSC [40, 110].

Τα μαθηματικά μοντέλα που ενσωματώνουν την επιρροή των εξωτερικών ερεθισμάτων - χωρίς ωστόσο να λαμβάνουν υπόψη τις επιδράσεις ρυθμιστικών παραγόντων - περιλαμβάνουν ένα 3D μοντέλο που έχει προταθεί από τους Mousavi et al. [70] και ένα μοντέλο που περιγράφει κυτταρική διαφοροποίηση για την επούλωση ιστών που αναπτύχθηκε από τους Burke et al. [8]. Το γενετικό ρυθμιστικό δίκτυο που προτάθηκε πρόσφατα από τους Peng et al. [76] εξετάζει τους μηχανισμούς διαφοροποίησης κυττάρων που δέχονται ερεθίσματα από τα μηχανικά χαρακτηριστικά της εξωκυττάριας μήτρας στην οποία καλλιεργούνται (η δυσκαμψία της οποίας λαμβάνει τιμές από ένα συνεχές φάσμα) και τους μεταγραφικούς παράγοντες YAP και

TAZ (υπεύθυνοι για την αντίληψη των κυττάρων σχετικά με το μηχανικό μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται) που είτε ενεργοποιούν είτε αναστέλλουν τα τέσσερα γονίδια του μοντέλου. Οι συγγραφείς προτείνουν ένα φαινομενολογικό μοντέλο που αποτελείται από έξι ODEs, των οποίων οι παράμετροι έχουν προσαρμοστεί από πειραματικά δεδομένα και ουσιαστικά παρουσιάζουν τα μονοδιάστατα διαγράμματα διακλάδωσης των μεταβλητών του μοντέλου έχοντας ως παράμετρο διακλάδωσης την δυσκαμψία της μήτρας. Με αυτόν τον τρόπο, ποσοτικοποίησαν νέες περιοχές μηχανικής μνήμης που προκύπτουν λόγω διακλαδώσεων τύπου fold τα οποία έχουν άμεση επίδραση στις αλλαγές φάσης των κυττάρων. Η εκ νέου καλλιέργεια των MSCs σε υποστρώματα διαφορετικής δυσκαμψίας και η αλλαγή της διάρκειας της καλλιέργειας μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά πιθανών τύπων διαφοροποίησης, ένα αποτέλεσμα το οποίο μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση και την ενίσχυση των θεραπευτικών μεθόδων της αναγεννητικής ιατρικής.

Στην παρούσα εργασία επεκτείνουμε την αριθμητική ανάλυση διακλάδωσης του μοντέλου που προτείνεται από τους Peng et al. [76]. Αρχικά, από το ήδη υπάρχον μοντέλο αναπτύσσουμε ένα ισοδύναμο μονοδιάστατο που διευκολύνει την ανίχνευση ασταθών κλάδων ισορροπίας. Στη συνέχεια, υπολογίζουμε αριθμητικά τα μονοδιάστατα και δισδιάστατα διαγράμματα διακλάδωσης ως προς τις παραμέτρους που σχετίζονται με τους μηχανισμούς θετικής ανατροφοδότησης που ενεργοποιούν την έκφραση των YAP/TAZ TRs και την περιοχής επαφής κυττάρου-υποστρώματος. Η μονοδιάστατη ανάλυση διακλάδωσης οδήγησε στην εμφάνιση μη-γραμμικών ταλαντώσεων που προκύπτουν από την ύπαρξη σημείων διακλάδωσης τύπου Andronov-Hopf, στην περιοχή προσκόλλησης, στους ρυθμιστικούς παράγοντες YAP/TAZ και στο γονίδιο PPAR $\gamma$ , το πλάτος ταλάντωσης των οποίων μπορεί να επηρεαστεί από την εκάστοτε τιμή της παραμέτρου. Η δισδιάστατη ανάλυση διακλάδωσης οδήγησε στο ότι τα σημεία διακλάδωσης και οι ταλαντωτικές λύσεις στην επιφάνεια επαφής κυττάρου-μήτρας και στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης εμφανίζονται σε εξωκυτταρικά περιβάλλοντα μικρής δυσκαμψίας ( $< 1kPa$ ).

Ένα ακόμη κομμάτι της συνεισφοράς της εργασίας αυτής συνδέεται με τον νέο μηχανισμό αλλαγής φάσης των κυττάρων λόγω της εμφάνισης ομοκλινικών διακλαδώσεων. Αυτές σταματούν απότομα τις μη-γραμμικές ταλαντώσεις και οδηγούν το σύστημα σε υψηλή συγκέντρωση του γονιδίου το οποίο ευνοεί την νευρογενή διαφοροποίηση. Μικρές διαταραχές στις παραμέτρους που μελετώνται στην εργασία, μπορούν να οδηγήσουν το σύστημα από λύσεις μόνιμης κατάστασης σε περιοδικές λύσεις και να επιτρέψουν αλλαγές στον τελικό κυτταρικό τύπο. Τα αποτελέσματά μας συμβάλλουν στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι ταλαντώσεις στα TFs/γονίδια και στην επιφάνεια επαφής κυττάρων-μήτρας μπορούν να εμφανιστούν και να τερματιστούν απότομα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειώσουμε ότι αντίστοιχες περιοδικές λύσεις έχουν παρατηρηθεί σε πλήθος πειραματικών μελετών, συμπεριλαμβανομένων μελετών σχετικά με τη συμπεριφορά των αγγειακών κυττάρων και εγκεφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων [38, 39, 92, 94, 120, 44, 112]. Έτσι, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να κατευθύνουν το σχεδιασμό νέων πειραματικών μελετών προκειμένου να αναπαραχθούν αντίστοιχα αποτελέσματα για MSCs καλλιεργούμενα σε υποστρώματα μικρής δυσκαμψίας, με σκοπό να επιβεβαιωθούν οι αλλαγές φάσεων που παρουσιάστηκαν οι οποίες συνδέονται με

διαφοροποίηση των κυττάρων σε δύο τύπους, νευρώνες και λιποκύτταρα.

## 7.2 Μελλοντικές επεκτάσεις

Η ανάλυση της παρούσας εργασίας και τα αποτελέσματά της δίνουν μελλοντικές επεκτάσεις σε τουλάχιστον τέσσερις κατευθύνσεις. Η πρώτη αφορά στην υπολογιστική ανάλυση του υπάρχοντος μοντέλου διαφοροποίησης. Ενδιαφέρον θα αποτελούσε η διερεύνηση της συμπεριφοράς του συστήματος μέσω υπολογισμού των διαγραμμάτων διακλάδωσης μεταβάλλοντας και άλλες παραμέτρους του μοντέλου πέραν αυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία για την εύρεση διαφορετικών δυναμικών φαινομένων που έχουν παρατηρηθεί σε άλλα μοντέλα (π.χ. χάος). Σημαντική θα αποτελούσε και μία ανάλυση για την ποσοτικοποίηση της αβεβαιότητας λόγω του μεγάλου πλήθους παραμέτρων του μοντέλου και της φαινομενολογικής φύσης αυτού.

Η δεύτερη κατεύθυνση αφορά στην ενσωμάτωση επιπρόσθετων γονιδίων στο γενετικό ρυθμιστικό δίκτυο για τον υπολογισμό νέων πιθανών περιοχών μηχανικής μνήμης αλλά και περίπλοκων δυναμικών συμπεριφορών που συνδέονται με την διαφοροποίηση των κυττάρων και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Κάτι τέτοιο παρόλα αυτά απαιτεί την εκτέλεση περίπλοκων εργαστηριακών πειραμάτων, αλλά και την ανάλυση ενός μοντέλου αυξημένων διαστάσεων αλλά και αυξημένου πλήθους παραμέτρων.

Μία τρίτη κατεύθυνση αφορά στην δημιουργία ενός δικτύου κυττάρων με ενσωμάτωση της αλληλεπίδρασης κυττάρου-προς-κύτταρο. Ένα τέτοιο μοντέλο, σε συνδυασμό με την ήδη υπάρχουσα αλληλεπίδραση κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας θα μπορούσε να προσεγγίσει ακόμα καλύτερα το φαινόμενο της κυτταρικής διαφοροποίησης σε πραγματικές συνθήκες. Σε επόμενο στάδιο θα μπορούσε να ενσωματωθεί και η αλληλεπίδραση των κυττάρων με ερεθίσματα δεχόμενα από τον περιβάλλοντα χώρο (π.χ. ροή ρευστών γύρω από τα κύτταρα).

Τέλος, ενδιαφέρον θα είχε και η ανάπτυξη ενός μοντέλου 'first principle' με πλήρη περιγραφή της μηχανικής επαφής κυττάρου-μήτρας και των αντίστοιχων μηχανισμών ενεργοποίησης των συγκεντρώσεων γονιδίων και των μεταγραφικών παραγόντων, το οποίο δεν απαιτεί προσαρμογή παραμέτρων, διαδικασία που επιφέρει συνήθως αρκετή αβεβαιότητα στην ακριβή αναπαράσταση του φυσικού φαινομένου αλλά και στα αποτελέσματα της ανάλυσης.





# Βιβλιογραφία

- [1] Maqsood Ahmed και others. Extracellular matrix regulation of stem cell behavior. *Current stem cell reports*, 2(3):197–206, 2016.
- [2] Wilhelm K Aicher, Hans Jörg Bühring, Melanie Hart, Bernd Rolauffs, Andreas Badke και Gerd Klein. Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells—potential and pitfalls. *Advanced drug delivery reviews*, 63(4-5):342–351, 2011.
- [3] Alicia Bailon-Plaza και Marjolein CH Van Der Meulen. A mathematical framework to study the effects of growth factor influences on fracture healing. *Journal of Theoretical Biology*, 212(2):191–209, 2001.
- [4] Andrew J Becker, Ernest A McCulloch και James E Till. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197:452–454, 1963.
- [5] D Ben-David, T Kizhner, E Livne και S Srouji. A tissue-like construct of human bone marrow mscs composite scaffold support in vivo ectopic bone formation. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4(1):30–37, 2010.
- [6] Anne Beuter, Leon Glass, Michael C Mackey και Michele S Titcombe. *Nonlinear dynamics in physiology and medicine*. 2003.
- [7] Paolo Bianco, Xu Cao, Paul S Frenette, Jeremy J Mao, Pamela G Robey, Paul J Simmons και Cun Yu Wang. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine*, 19(1):35, 2013.
- [8] Darren Paul Burke και Daniel John Kelly. Substrate stiffness and oxygen as regulators of stem cell differentiation during skeletal tissue regeneration: a mechanobiological model. *PloS one*, 7(7):ε40737, 2012.
- [9] Long Cai, Nir Friedman και X Sunney Xie. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*, 440(7082):358, 2006.
- [10] AI Caplan. Why are mscs therapeutic? new data: new insight. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 217(2):318–324, 2009.

- [11] Arnold I Caplan. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5):641–650, 1991.
- [12] Arnold I Caplan. New era of cell-based orthopedic therapies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(2):195–200, 2009.
- [13] Tony FC Chan και HB Keller. Arc-length continuation and multigrid techniques for nonlinear elliptic eigenvalue problems. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*, 3(2):173–194, 1982.
- [14] Mark Chaplain, Mariya Ptashnyk και Marc Sturrock. Hopf bifurcation in a gene regulatory network model: Molecular movement causes oscillations. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, 25(06):1179–1215, 2015.
- [15] Lindolfoda Silva Meirelles, Pedro Cesar Chagastelles και Nance Beyer Nardi. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, 119(11):2204–2213, 2006.
- [16] Robert L Davis, Harold Weintraub και Andrew B Lassar. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51(6):987–1000, 1987.
- [17] Virginie De Witte, Willy Govaerts, Yuri A Kuznetsov και Mark Friedman. Interactive initialization and continuation of homoclinic and heteroclinic orbits in matlab. *ACM Transactions on Mathematical Software (TOMS)*, 38(3):18, 2012.
- [18] Michael D Deel, Jenny J Li, Lisa ES Crose και Corinne M Lincardic. A review: molecular aberrations within hippo signaling in bone and soft-tissue sarcomas. *Frontiers in oncology*, 5:190, 2015.
- [19] Annick Dhooge, Willy Govaerts, Yu A Kuznetsov, Hil Gaétan Ellart Meijer και Bart Sautois. New features of the software matcont for bifurcation analysis of dynamical systems. *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems*, 14(2):147–175, 2008.
- [20] MLBK Dominici, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop και EM Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317, 2006.
- [21] Sirio Dupont, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giulitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, Jimmy Le Digabel, Mattia Forcato, Silvio Bicciato και others. Role of yap/taz in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350):179, 2011.
- [22] Kourosch C Elahi, Gerd Klein, Meltem Avci-Adali, Karl D Sievert, Sheila MacNeil και Wilhelm K Aicher. Human mesenchymal stromal cells from different sources

- diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem cells international*, 2016, 2016.
- [23] Adam J Engler, Shamik Sen, H Lee Sweeney και Dennis E Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689, 2006.
- [24] Jeroen Eyckmans, Thomas Boudou, Xiang Yu και Christopher S Chen. A hitchhiker’s guide to mechanobiology. *Developmental cell*, 21(1):35–47, 2011.
- [25] James E Ferrell Jr. Bistability, bifurcations, and waddington’s epigenetic landscape. *Current biology*, 22(11):P458–P466, 2012.
- [26] James M Fox, Giselle Chamberlain, Brian A Ashton και Jim Middleton. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British journal of haematology*, 137(6):491–502, 2007.
- [27] AJ Friedenstein, RK Chailakhjan και KS Lalykina. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4):393–403, 1970.
- [28] AJ Friedenstein, UF Deriglasova, NN Kulagina, AF Panasuk, SF Rudakowa, EA Luria και IA Ruadkow. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*, 2(2):83–92, 1974.
- [29] Alexander J Friedenstein, JF Gorskaja και NN Kulagina. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, 4(5):267–274, 1976.
- [30] Fred H Gage, Penelope W Coates, Theo D Palmer, H Georg Kuhn, Lisa J Fisher, Jaana O Suhonen, Daniel A Peterson, Steve T Suhr και Jasodhara Ray. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(25):11879–11883, 1995.
- [31] Jacques Galipeau και Luc Sensébé. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, 22(6):824–833, 2018.
- [32] Nathan D Gallant, Kristin E Michael και Andrés J García. Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Molecular biology of the cell*, 16(9):4329–4340, 2005.
- [33] Irit Gat-Viks, Amos Tanay και Ron Shamir. Modeling and analysis of heterogeneous regulation in biological networks. *Journal of Computational Biology*, 11(6):1034–1049, 2004.
- [34] Nicholas Geard και Janet Wiles. A gene network model for developing cell lineages. *Artificial Life*, 11(3):249–267, 2005.

- [35] Daniel T Gillespie. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of computational physics*, 22(4):403–434, 1976.
- [36] Leon Glass και Stuart A Kauffman. The logical analysis of continuous, non-linear biochemical control networks. *Journal of theoretical Biology*, 39(1):103–129, 1973.
- [37] Brian C Goodwin και others. Temporal organization in cells. a dynamic theory of cellular control processes. *Temporal organization in cells. A dynamic theory of cellular control processes.*, 1963.
- [38] Nicole Gorfinkiel. From actomyosin oscillations to tissue-level deformations. *Developmental Dynamics*, 245(3):268–275, 2016.
- [39] Nicole Gorfinkiel και Guy B Blanchard. Dynamics of actomyosin contractile activity during epithelial morphogenesis. *Current opinion in cell biology*, 23(5):531–539, 2011.
- [40] Farshid Guilak, Daniel M Cohen, Bradley T Estes, Jeffrey M Gimble, Wolfgang Liedtke και Christopher S Chen. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell stem cell*, 5(1):17–26, 2009.
- [41] Georg Halder, Sirio Dupont και Stefano Piccolo. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by yap and taz. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(9):591, 2012.
- [42] Ralf Hass, Cornelia Kasper, Stefanie Böhm και Roland Jacobs. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (msc): a comparison of adult and neonatal tissue-derived msc. *Cell Communication and Signaling*, 9(1):12, 2011.
- [43] Dirk Hockemeyer και Rudolf Jaenisch. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell stem cell*, 18(5):573–586, 2016.
- [44] Zhongkui Hong, Zhe Sun, Min Li, Zhaohui Li, Filiz Bunyak, Ilker Ersoy, Jerome P Trzeciakowski, Marius Catalin Staiculescu, Minshan Jin, Luis Martinez-Lemus και others. Vasoactive agonists exert dynamic and coordinated effects on vascular smooth muscle cell elasticity, cytoskeletal remodelling and adhesion. *The Journal of physiology*, 592(6):1249–1266, 2014.
- [45] Sui Huang, Yan Ping Guo, Gillian May και Tariq Enver. Bifurcation dynamics in lineage-commitment in bipotent progenitor cells. *Developmental biology*, 305(2):695–713, 2007.
- [46] Ronen Ben Jehuda, Yuval Shemer και Ofer Binah. Genome editing in induced pluripotent stem cells using crispr/cas9. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(3):323–336, 2018.

- [47] Bivash Kaity, Ratan Sarkar, Buddhapriya Chakrabarti και Mithun K Mitra. Reprogramming, oscillations and transdifferentiation in epigenetic landscapes. *Scientific reports*, 8(1):7358, 2018.
- [48] Guy Karlebach και Ron Shamir. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10):770, 2008.
- [49] Gerald Karp. *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. John Wiley & Sons, 2009.
- [50] Jeffrey M Karp και Grace Sock Leng Teo. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell stem cell*, 4(3):206–216, 2009.
- [51] Susanne Kern, Hermann Eichler, Johannes Stoeve, Harald Klüter και Karen Bieback. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, 24(5):1294–1301, 2006.
- [52] Amelia Khalili και Mohd Ahmad. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *International journal of molecular sciences*, 16(8):18149–18184, 2015.
- [53] Sun Yong Kim, Seiya Imoto και Satoru Miyano. Inferring gene networks from time series microarray data using dynamic bayesian networks. *Briefings in bioinformatics*, 4(3):228–235, 2003.
- [54] Edda Klipp, Ralf Herwig, Axel Kowald, Christoph Wierling και Hans Lehrach. *Systems biology in practice: concepts, implementation and application*. John Wiley & Sons, 2008.
- [55] Julianna Kobolak, Andras Dinnyes, Adnan Memic, Ali Khademhosseini και Ali Mombasheri. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, 99:62–68, 2016.
- [56] Ina Koch, Wolfgang Reisig και Falk Schreiber. *Modeling in systems biology: the Petri net approach*, τόμος 16. Springer Science & Business Media, 2010.
- [57] Catherine M Kolf, Elizabeth Cho και Rocky S Tuan. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy*, 9(1):204, 2007.
- [58] Katiana Kontolati και Constantinos Siettos. Numerical analysis of mesenchymal stem cell mechanotransduction dynamics reveals homoclinic bifurcations. *International Journal of Non-Linear Mechanics*, 113:146–157, 2019.
- [59] Yuri A Kuznetsov. *Elements of applied bifurcation theory*, τόμος 112. Springer Science & Business Media, 2013.

- [60] Hillard M Lazarus, SE Haynesworth, SL Gerson, NS Rosenthal και AI Caplan. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*, 16(4):557–564, 1995.
- [61] Greg Lemon, Sarah L Waters, Felicity RAJ Rose και John R King. Mathematical modelling of human mesenchymal stem cell proliferation and differentiation inside artificial porous scaffolds. *Journal of theoretical biology*, 249(3):543–553, 2007.
- [62] Leonard A Levin, Robert Ritch, Julia E Richards και Teresa Borrás. Stem cell therapy for ocular disorders. *Archives of Ophthalmology*, 122(4):621–627, 2004.
- [63] Feifei Li, Xia Guo και Shi You Chen. Function and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4:32, 2017.
- [64] R Liu, P Zhao, W Tan και M Zhang. Cell therapies for refractory rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*, 2018.
- [65] Anna Lovrics, Yu Gao, Bianka Juhász, István Bock, Helen M Byrne, András Dinnyés και Krisztián A Kovács. Boolean modelling reveals new regulatory connections between transcription factors orchestrating the development of the ventral spinal cord. *PloS one*, 9(11):ε111430, 2014.
- [66] Michael C Mackey και Leon Glass. Oscillation and chaos in physiological control systems. *Science*, 197(4300):287–289, 1977.
- [67] Harley H McAdams και Adam Arkin. It’s a noisy business! genetic regulation at the nanomolar scale. *Trends in genetics*, 15(2):65–69, 1999.
- [68] Nicholas AM Monk. Oscillatory expression of *hes1*, *p53*, and *nf-κb* driven by transcriptional time delays. *Current Biology*, 13(16):1409–1413, 2003.
- [69] Sean J Morrison και Judith Kimble. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097):1068, 2006.
- [70] Seyed Jamaledin Mousavi και Mohamed Hamdy Doweidar. Role of mechanical cues in cell differentiation and proliferation: a 3d numerical model. *PloS one*, 10(5):ε0124529, 2015.
- [71] Timothy P O’Connor και Ronald G Crystal. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics*, 7(4):261, 2006.
- [72] Min Oh και Jacques E Nör. The perivascular niche and self-renewal of stem cells. *Frontiers in physiology*, 6:367, 2015.

- [73] Ertugrul M Ozbudak, Mukund Thattai, Iren Kurtser, Alan D Grossman και Alexander Van Oudenaarden. Regulation of noise in the expression of a single gene. *Nature genetics*, 31(1):69, 2002.
- [74] NIH Stem Cell Information Home Page. Bethesda, md: National institutes of health, u.s. department of health and human services. *In Stem Cell Information* [<https://stemcells.nih.gov/info/basics/4.htm>], 2016.
- [75] Athanasios G Papavassiliou. Transcription factors. *New England Journal of Medicine*, 332(1):45–47, 1995.
- [76] Tao Peng, Linan Liu, Adam L MacLean, Chi Wut Wong, Weian Zhao και Qing Nie. A mathematical model of mechanotransduction reveals how mechanical memory regulates mesenchymal stem cell fate decisions. *BMC systems biology*, 11(1):55, 2017.
- [77] A Perillo, G Bonanno, L Pierelli, S Rutella, G Scambia και S Mancuso. Stem cells in gynecology and obstetrics. *Panminerva medica*, 46(1):49–59, 2004.
- [78] CA Petri. Kommunikation mit automaten/schriften des institutes für instrumentelle mathematik (bonn). 1962. *Forschungsbericht* {5, 9}, χ.χ.
- [79] Anna Chiara Piscaglia, Marialuisa Novi, Mariachiara Campanale και Antonio Gasbarrini. Stem cell-based therapy in gastroenterology and hepatology. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 17(2):100–118, 2008.
- [80] Massimo Pisu, Alessandro Concas και Giacomo Cao. A novel simulation model for stem cells differentiation. *Journal of biotechnology*, 130(2):171–182, 2007.
- [81] Massimo Pisu, Alessandro Concas, Sarah Fadda, Alberto Cincotti και Giacomo Cao. A simulation model for stem cells differentiation into specialized cells of non-connective tissues. *Computational biology and chemistry*, 32(5):338–344, 2008.
- [82] Mark F Pittenger, Alastair M Mackay, Stephen C Beck, Rama K Jaiswal, Robin Douglas, Joseph D Mosca, Mark A Moorman, Donald W Simonetti, Stewart Craig και Daniel R Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411):143–147, 1999.
- [83] Sergey V Plotnikov, Ana M Pasapera, Benedikt Sabass και Clare M Waterman. Force fluctuations within focal adhesions mediate ecm-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell*, 151(7):1513–1527, 2012.
- [84] Washington DC: National Academies Press. Understanding stem cells: An overview of the science and issues from the national academies. [<http://hdl.handle.net/10822/509615>], 2006.

- [85] Beth L Pruitt, Alexander R Dunn, William I Weis και W James Nelson. Mechano-transduction: from molecules to tissues. *PLoS biology*, 12(11):ε1001996, 2014.
- [86] Shahin Rafii και David Lyden. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine*, 9(6):702, 2003.
- [87] Arjun Raj, Charles S Peskin, Daniel Tranchina, Diana Y Vargas και Sanjay Tyagi. Stochastic mrna synthesis in mammalian cells. *PLoS biology*, 4(10):ε309, 2006.
- [88] Brent A Reynolds και Samuel Weiss. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052):1707–1710, 1992.
- [89] Renli Ru, Yongchao Yao, Songlin Yu, Benpeng Yin, Wanwan Xu, Siting Zhao, Li Qin και Xiaoping Chen. Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells by penetrating talens. *Cell regeneration*, 2(1):5, 2013.
- [90] Ara A Salibian, Alan D Widgerow, Michael Abrouk και Gregory RD Evans. Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. *Archives of plastic surgery*, 40(6):666, 2013.
- [91] Moises Santillán. On the use of the hill functions in mathematical models of gene regulatory networks. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 3(2):85–97, 2008.
- [92] Hanna Sanyour, Josh Childs, Gerald A Meininger και Zhongkui Hong. Spontaneous oscillation in cell adhesion and stiffness measured using atomic force microscopy. *Scientific reports*, 8(1):2899, 2018.
- [93] Katharina Schallmoser, Eva Rohde, Andreas Reinisch, Christina Bartmann, Daniela Thaler, Camilla Drexler, Anna C Obenauf, Gerhard Lanzer, Werner Linkesch και Dirk Strunk. Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 14(3):185–196, 2008.
- [94] Hermann Schillers, Mike Wälte, Katarina Urbanova και Hans Oberleithner. Real-time monitoring of cell elasticity reveals oscillating myosin activity. *Biophysical journal*, 99(11):3639–3646, 2010.
- [95] D Schittler, J Hasenauer, F Allgöwer και Steffen Waldherr. Cell differentiation modeled via a coupled two-switch regulatory network. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 20(4):045121, 2010.
- [96] Ilya Shmulevich, Edward R Dougherty, Seungchan Kim και Wei Zhang. Probabilistic boolean networks: a rule-based uncertainty model for gene regulatory networks. *Bioinformatics*, 18(2):261–274, 2002.



- [97] Ilya Shmulevich, Ilya Gluhovsky, Ronaldo F Hashimoto, Edward R Dougherty και Wei Zhang. Steady-state analysis of genetic regulatory networks modelled by probabilistic boolean networks. *Comparative and functional genomics*, 4(6):601–608, 2003.
- [98] Michael R Smith, Mark Clement, Tony Martinez και Quinn Snell. Time series gene expression prediction using neural networks with hidden layers. Στο *Proceedings of the 7th Annual Biotechnology and Bioinformatics Symposium (BIOT 2010)*, σελίδες 67–69, 2010.
- [99] Tiziana Squillaro, Gianfranco Peluso και Umberto Galderisi. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell transplantation*, 25(5):829–848, 2016.
- [100] Adam JF Stops, KB Heraty, M Browne, Fergal J O’Brien και PE McHugh. A prediction of cell differentiation and proliferation within a collagen–glycosaminoglycan scaffold subjected to mechanical strain and perfusive fluid flow. *Journal of biomechanics*, 43(4):618–626, 2010.
- [101] Steven H Strogatz. From kuramoto to crawford: exploring the onset of synchronization in populations of coupled oscillators. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 143(1-4):1–20, 2000.
- [102] Steven H Strogatz. *Nonlinear Dynamics and Chaos with Student Solutions Manual: With Applications to Physics, Biology, Chemistry, and Engineering*. CRC Press, 2018.
- [103] Meng Sun, Fabian Spill και Muhammad H Zaman. A computational model of yap/taz mechanosensing. *Biophysical journal*, 110(11):2540–2550, 2016.
- [104] Narito Suzuki, Chikara Furusawa και Kunihiko Kaneko. Oscillatory protein expression dynamics endows stem cells with robust differentiation potential. *PloS one*, 6(11):e27232, 2011.
- [105] Rutger Jan Swijnenburg, Sonja Schrepfer, Feng Cao, Jeremy I Pearl, Xiaoyan Xie, Andrew J Connolly, Robert C Robbins και Joseph C Wu. In vivo imaging of embryonic stem cells reveals patterns of survival and immune rejection following transplantation. *Stem cells and development*, 17(6):1023–1029, 2008.
- [106] Kazutoshi Takahashi και Shinya Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663–676, 2006.
- [107] Achilleas D Theocharis, Spyros S Skandalis, Chrysostomi Gialeli και Nikos K Karamanos. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 97:4–27, 2016.

- [108] René Thomas. Boolean formalization of genetic control circuits. *Journal of theoretical biology*, 42(3):563–585, 1973.
- [109] James A Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, Vivienne S Marshall και Jeffrey M Jones. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391):1145–1147, 1998.
- [110] Britta Trappmann, Julien E Gautrot, John T Connelly, Daniel GT Strange, Yuan Li, Michelle L Oyen, Martien A Cohen Stuart, Heike Boehm, Bojun Li, Viola Vogel και others. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature materials*, 11(7):642, 2012.
- [111] Antonio Uccelli, Lorenzo Moretta και Vito Pistoia. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 8(9):726, 2008.
- [112] Attila G Végh, Csilla Fazakas, Krisztina Nagy, Imola Wilhelm, István A Krizbai, Péter Nagyószzi, Zsolt Szegletes και György Váró. Spatial and temporal dependence of the cerebral endothelial cells elasticity. *Journal of Molecular Recognition*, 24(3):422–428, 2011.
- [113] Nedumparambathmarath Vijesh, Swarup Kumar Chakrabarti και Janardanan Sreekumar. Modeling of gene regulatory networks: a review. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 6(02):223, 2013.
- [114] CH. Waddington. *The Strategy of the Genes*. London, George Allen and Unwin Ltd, 1957.
- [115] Jin Wang, Kun Zhang, Li Xu και Erkang Wang. Quantifying the waddington landscape and biological paths for development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011.
- [116] Xin Wei, Xue Yang, Zhi peng Han, Fang fang Qu, Li Shao και Yu fang Shi. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6):747, 2013.
- [117] Chun Yang, Mark W Tibbitt, Lena Basta και Kristi S Anseth. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nature materials*, 13(6):645, 2014.
- [118] Gregory Yourek, Mohammad A Hussain και Jeremy J Mao. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, 53(2):219, 2007.
- [119] Ji Yu, Jie Xiao, Xiaojia Ren, Kaiqin Lao και X Sunney Xie. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science*, 311(5767):1600–1603, 2006.
- [120] Yi Zhu, Hongyu Qiu, Jerome P Trzeciakowski, Zhe Sun, Zhaohui Li, Zhongkui Hong, Michael A Hill, William C Hunter, Dorothy E Vatner, Stephen F Vatner και others.

---

Temporal analysis of vascular smooth muscle cell elasticity and adhesion reveals oscillation waveforms that differ with aging. *Aging cell*, 11(5):741–750, 2012.



# Συντομογραφίες - Αρκτικόλεξα - - Ακρωνύμια

βλπ	βλέπε
κ.λπ.	και λοιπά
κ.ο.κ	και ούτω καθεξής
MSCs	Mesenchymal stromal/stem cells
ESCs	Embryonic stem cells
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
BM-MSCs	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells
UCB-MSCs	Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells
ECM	Extracellular matrix
FA	Focal adhesion
TFs	Transcriptional factors
GRN	Gene Regulatory Network
UQ	Uncertainty Quantification
SSA	Stochastic Simulation Algorithm
AH	Andronov-Hopf bifurcation
HB	Homoclinic bifurcation



