

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

TEZA DE DOCTORAT

**DINAMICA PROCESELOR DE ADEZIUNE CELULARĂ
IMPLICATE ÎN MORFOGENEZA TISULARĂ**

REZUMAT

**Îndrumător științific
Prof. Univ. dr. Eugenia Kovács**

**Doctorand
Ion-Octavian Doagă**

**CATEDRA DE BIOFIZICĂ ȘI BIOTEHNOLOGIE CELULARĂ
U.M.F. “CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**

- 2008 -

CUPRINS

CUPRINS.....	2
Lista lucrărilor	3
INTRODUCERE.....	4
PARTEA GENERALĂ.....	5
Mecanisme moleculare ale adeziunii celulare	5
Rolul citoscheletului	6
Metode experimentale în studiul morfogenezei tisulare	6
Asamblarea agregatelor celulare	7
Proprietățile vâscoelastice ale agregatelor celulare embrionare	8
Adeziunea celulară pe matrici solide	9
PARTEA SPECIALĂ	11
Studii de dinamică celulară pe agregate multicelulare sferice	11
<i>Rezultate și discuții</i>	12
Studiul cineticii de aderare pe biomatrici tridimensionale solide	14
<i>Rezultate și discuții</i>	16
CONCLUZII FINALE.....	20
Dinamica celulară în agregate multicelulare sferice	20
Dinamica proceselor de aderare pe matrici solide	20
BIBLIOGRAFIE	22

Lista lucrărilor

Această teză se bazează pe conținutul următoarelor lucrări publicate sau aflate în curs de publicare:

- I. DOAGA, O., K. JAKAB, G. FORGACS, Cell migration in non-differentiated tissues mimics movement in liquids (rezumat), ***European Biophys. J.***, 32 (3), p306 (2003)
- II. A. NEAGU, I.O. DOAGA, M. NEAGU, T. SAVOPOL, E. KOVÁCS, Cell seeding of tissue engineering scaffolds: experimental, kinetic and computer simulation study (rezumat), ***European Biophys. J.***, 36 (Supp.1), S109 (2007)
- III. DOAGA, I.O, T. SAVOPOL, A. NEAGU, E. KOVÁCS, Cell seeding process monitored by the turbidimetric method: the kinetics of cell adhesion on solid scaffolds (rezumat), ***Tissue Engineering***, 13(7), p1649 (2007)
- IV. DOAGA, I.O. T. SAVOPOL, A. NEAGU, E. KOVÁCS, Study about cell adhesion kinetics on solid biomatrices, ***Rom. J. Biophys.***, 17(3), 177-183 (2007)
- V. K. JAKAB, B. DAMON, F. MARGA, O. DOAGA, V. MIRONOV, I. KOSZTIN, R. MARKWALD, G. FORGACS, Relating cell and tissue mechanics: implications and applications, ***Dev. Biol.***, submis spre publicare (septembrie 2007)
- VI. DOAGA, I.O., T. SAVOPOL, A. NEAGU, M. NEAGU, E. KOVÁCS, The kinetics of cell adhesion to solid scaffolds: an experimental and theoretical approach, ***Journal of Biological Physics***, submis spre publicare (februarie 2008)

INTRODUCERE

La ora actuală, eforturi susținute se realizează în vederea înțelegerii mecanismelor implicate în fazele inițiale ale morfogenezei embrionare. Studiile experimentale în această direcție trebuie să utilizeze modele experimentale specifice, care să reducă inconvenientele de natură bioetică, dar să păstreze cadrul fiziologic de interacțiune al celulelor. Astfel de modele sunt agregatele multicelulare sferice, ale căror proprietăți biofizice sunt revizuite în lucrarea de față și pe baza cărora sunt prezentate studii originale care evidențiază importanța proceselor de adeziune celulară în definirea caracterului vâscoelastic al acestor agregate, similar lichidelor. Un avantaj deosebit ce decurge de aici este tocmai deslușirea căilor prin care se pot sintetiza în laborator țesuturi viabile, pornind de la structuri de tipul agregatelor multicelulare, care să poată fi utilizate pentru înlocuirea celor patologice sau distruse accidental. În plus, studiarea mecanismelor care guvernează dinamica celulară în interiorul unor astfel de structuri multicelulare se poate dovedi extrem de importantă și în încercarea de a înțelege natura proceselor invazive tumorale.

Ingineria tisulară este un domeniu aflat în plină dezvoltare și promite rezolvarea problemelor existente în transplantul de organe. Problemele majore, cu care se confruntă această ramură nouă a științelor medicale, sunt legate de incompleta cunoaștere a mecanismelor fundamentale implicate în morfogeneza tisulară. Sunt raportate numeroase realizări în domeniul ingineriei tisulare dar și limitările acestora, care, la ora actuală sunt încă departe de a fi rezolvate. De exemplu, multiplicarea celulelor stem, recoltate de la pacienți în culturi celulare de tip monostrat alterează semnificativ expresia genetică a celulelor ce pierd astfel caracterul *self* și declanșează reacții de respingere din partea organismului. Un alt exemplu este legat de timpul necesar sintezei de suprafețe epiteliale suficient de mari pentru rezolvarea cazurilor de arsuri extinse. Cea mai puternică limitare este resimțită însă în cazul sintezei *in vitro* de structuri tridimensionale, care să respecte arhitectura, consistența și funcția țesutului natural și care să se integreze perfect în locul de implant *in vivo*. În ortopedie, sinteza de os sau cartilaj artificial din celulele stem ale pacientului trebuie să confere, în plus, și rezistență mecanică corespunzătoare. Astfel, prin implantarea constructului artificial trebuie să se obțină un os/cartilaj complet funcțional, care să permită pacientului reluarea rapidă a activității mecanice, evitându-se astfel perioada de spitalizare și faza de refacere și recuperare funcțională.

În lucrarea de față, se vor prezenta rezultatele unor studii experimentale asupra dinamicii celulare din agregatele multicelulare tridimensionale și a dinamicii procesului de aderare pe matrici solide tridimensionale de collagen. Toate aceste studii contribuie la înțelegerea mecanismelor implicate în fazele inițiale ale morfogenezei tisulare, în care sunt implicate celule încă nediferențiate. Primul set de experimente evidențiază caracterul vâscoelastic al agregatelor celulare tridimensionale, prin determinarea deplasării radiale medii ale celulelor, în urma unui stres de compresie mecanică, precum și efectul destabilizării citoscheletului în această dinamică.

În al doilea set de determinări, se prezintă un model experimental original, bazat pe o tehnică de turbidimetrie, dedicat evaluării procesului de aderare celulară pe matrici solide de collagen. Acest proces este implicat în etapele inițiale ale sintezei artificiale de țesuturi care necesită consistență mecanică (de ex. țesut osos sau cartilaginos), în faza de însămânțare cu celule stem, nediferențiate. Sunt evidențiate modificările de dinamică induse de existența sau lipsa inițială a proteinelor membranare de aderare pe suprafața celulelor, precum și rolul ionilor de calciu.

PARTEA GENERALĂ

Partea generală este structurată pentru a marca noutățile din literatura de specialitate cu privire la adeziunea celulară și rolul acesteia în procesele de sinteză tisulară, artificială sau naturală.

Mecanisme moleculare ale adeziunii celulare

La acest capitol sunt trecute în revistă date recente cu privire la structurile moleculare implicate în procesul de adeziune celulară precum și rolul specific al acestora.

Macromoleculele implicate în procesele de organizare tisulară sunt majoritar proteine, clasificate în trei categorii principale: molecule de adezivitate intercelulară (*cell adhesion molecules* sau CAM, ex. *caderine*), molecule de adezivitate la substrat (*substratum adhesion molecules* sau SAM, ex. *integrine*) și molecule din superfamilia imunoglobulinelor (ex. *neural cell adhesion molecule* sau N-CAM) (Fig.1).

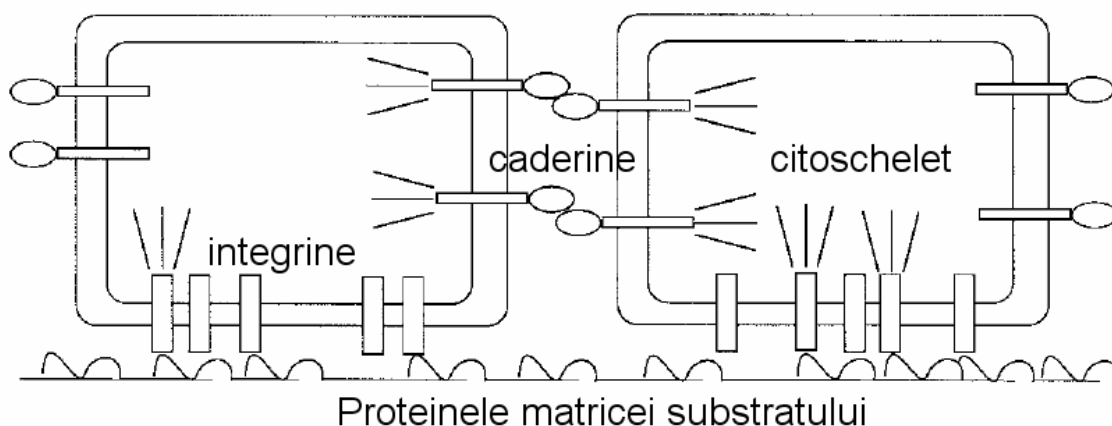


Fig. 1 - Ilustrare schematică a tipurilor de receptori membranari care sunt conectați cu citoscheletul pentru transmiterea forțelor. Integrinele, proteine membranare $\alpha\beta$ -heterodimerice se leagă de substrat sau de matricea extracelulară. Caderinele, proteine Ca^{2+} -dependente transmembranare se leagă homotipic de receptori omologi din celula alăturată

Integrinele sunt receptorii majori ai aderării celulare la matricea extracelulară. Ele sunt implicate și în unele forme de adeziune celulă-celulă, prin intermediul citoscheletului și prin activarea căilor de semnalizare intercelulară.

Rolul citoscheletului

Studiile de biologie moleculară dezvăluie rolul activ al citoscheletului în procesele de aderare asociate cu migrarea celulară (Galbraith, 2002). Astfel, pentru ca o celulă să poată adera sau migra, trebuie să fie capabilă să realizeze o corelare dinamică a structurilor citoscheletului cu matricea extracelulară. Se consideră că, în aparatul molecular implicat, participă proteine precum *vinculina* ce favorizează formarea complexelor focale de aderare. Stimularea mecanică a receptorilor de fibronectină de la suprafața celulei pare să fie responsabilă de activarea sau inactivarea acestor complexe focale. O serie de proteine, precum *talina* și *actinina*, stabilizează și mediază atașarea filamentelor terminale ale citoscheletului la complexe focale de aderare în funcție de regimul forțelor externe (Ginsberg, 2005).

Multe celule în cultură, de exemplu fibroblastele, nu vor putea crește sau prolifera ca răspuns la factorii de creștere extracelulari, decât dacă celulele sunt atașate prin integritate de substrat. La majoritatea celulelor (precum cele epiteliale, endoteliale sau musculare) supraviețuirea și viabilitatea acestora depinde de semnalizarea mediată de integritate (Evans, 2007).

Metode experimentale în studiul morfogenezei tisulare

Explicarea modului de organizare a celulelor pentru a forma țesuturi este o veche problemă încă nerezolvată a biologiei. În ultima decadă au fost realizate o serie de progrese, totuși, multe dintre principiile fundamentale ce guvernează procesele moleculare reglatoare ale interacțiunilor intercelulare din țesuturi sunt încă departe de a fi definite.

Modelele experimentale, utilizate în astfel de studii, pot fi grupate în funcție de tipul de interacțiune studiat și de substratul molecular avut în atenție:

- a. adezivitate celulă-celulă mediată de caderine:
 - i. studii la nivelul unei singure celule: microscopia atomică de forță (Vedula, 2005), penseta optică (Thoumine, 2006)
 - ii. studii pe agregate celulare: microscopie confocală (Du, 2007), microscopie RMN (Bernas, 2007)
- b. adezivitate celulă-substrat mediată de integritate:
 - i. metode dinamice pe suprafețe plane (Bigerelle, 2005; Hong, 2006)
 - ii. metode dinamice pe matrici tridimensionale (Vunjak-Novakovic, 1998)

În lucrarea de față, se iau în discuție modelul experimental al agregatelor celulare pentru evaluarea adezivității mediată de caderine și modelul de cinetică pe matrici tridimensionale pentru adezivitatea mediată de integritate. Pentru ambele tipuri de modele sunt prezentate detaliile de tehnică precum și rezultatele experimentelor realizate.

Modelele experimentale abordate pentru studiul adezivității celulare, au fost preferate deoarece reprezintă punctul de plecare pentru dezvoltarea cercetării

aplicative în două dintre domeniile esențiale ale cercetării medicale moderne (Ingber, 2006), și anume:

1. elucidarea mecanismelor biofizice ale morfogenezei tisulare cu aplicații în ingineria tisulară și medicina regenerativă
2. studiul dinamicii celulare cu aplicații în terapia formațiunilor maligne.

Un domeniu extrem de atractiv al tehnologiei medicale și care a căpătat o mare amploare în ultimul deceniu, este sinteza artificială de organe sau ingineria tisulară (“tissue engineering”). Acest domeniu al biotehnologiei, aflat în prezent în plină dezvoltare, presupune “proiectarea” *in vitro* de țesuturi sau organe, prin formarea de populații (agregate) de celule “controlate” genetic care să fie capabile să se organizeze în structuri tisulare funcționale. Clinicienii vor putea avea astfel, o nouă metodă de înlocuire a țesutului viu patologic cu țesut viu sănătos, proiectat și construit special din “materialul clientului”, pentru a răspunde nevoilor particulare ale fiecărui pacient (Langer, 1993; Vacanti, 1999; Hunziker, 2006; Mikos, 2006; Ingber, 2006, 2007).

Succesul acestor tehnologii va depinde însă de elucidarea modului în care celulele interacționează între ele dar și cu substratul, sau matricea înconjurătoare, care are rolul inițial de a asigura atât suport mecanic cât și mediu de vehicul pentru substanțele nutritive sau pentru evacuarea produșilor de metabolism. În acest sens, agregatul multicelular reprezintă cel mai simplu model de “țesut artificial”, iar cunoașterea fiziologiei acestuia, precum și a fenomenelor legate de interacția cu mediul înconjurător va permite consolidarea principiilor de bază ce vor permite dezvoltarea “ingineriei tisulare” (Lauffenburger, 2001; Zhang, 2004; Mikos, 2006, Hunziker, 2006).

Asamblarea agregatelor celulare

Prin agregate celulare se înțeleg acele structuri tridimensionale multicelulare lipsite de matrice extracelulară caracterizate prin următoarele aspecte majore:

1. număr suficient de mare de celule (între 500 și 10.000 de celule)
2. mobilitate celulară
3. adezivitate intercelulară

Agregatele celulare se pot obține relativ ușor prin proceduri uzuale de laborator. În literatura sunt menționate diverse metode, precum metoda supraconfluenței (Freyer, 1986/a/b, Deisboeck, 2001), metoda tubului, metoda peletului sau metoda “în picătură” (Foty, 1996).

Pentru asigurarea adezivității, o condiție esențială este ca celulele să exprime la suprafața membranei un număr suficient de proteine cu rol în adeziunea celulară. Motilitatea celulară este necesară pentru ca celulele să poată “explora” vecinătatea imediată și astfel să interacționeze preponderent cu acele celule cu care pot stabili numărul maxim de punți aderente homotipice. Modelele de agregate celulare vor putea fi construite din acele linii celulare care prezintă mobilitate, precum fibroblastele, celulele embrionare, liniile derivate din celule canceroase (ex. CHO, U87MG).

Mobilitatea celulară în interiorul unui agregat poate fi pasivă, ca rezultat al acțiunilor externe și activă, cu implicarea proceselor metabolice celulare (Steinberg, 1996). Studiile au arătat că la agregatele aflate în afara influențelor externe, mișcarea celulelor este aleatorie, de tip brownian (Mombach, 1996). Alte studii au demonstrat rolul activ al citoscheletului în locomoția celulelor din agregat (Mombach, 1995). Pentru acest tip de studii s-au utilizat substanțe care destabilizează citoscheletul, precum *cytochalazina B*. În lucrarea de față este realizat un studiu experimental care evidențiază efectul global pe care îl are dezasamblarea citoscheletului cu ajutorul *latrunculinei A* asupra dinamicii celulare în interiorul unui agregat multicelular.

Proprietățile vâscoelastice ale agregatelor celulare embrionare

Încă de începutul secolului trecut s-au făcut primele observații referitoare la rearanjarea celulelor unui organism după disociere. La unele organisme inferioare, precum bureții sau hidra de apă dulce, s-a observat că prin reamestecarea celulelor componente disociate anterior prin metode litice blânde, se poate regenera structura funcțională inițială. Ulterior, alte studii au arătat că prin disocierea în celule a organelor embrionare și apoi remixarea acestora, se constată un proces de segregare celulară care conduce, în final, la reformarea structurii inițiale a embrionului (Steinberg, 1963, 1996).

Încercările cercetătorilor de a înțelege mecanismele biofizice ale proceselor morfogenetice s-au concretizat în 1963 când Steinberg a propus și argumentat teoria adezivității diferențiate (TAD) pentru a explica sortarea celulară. Conform acestei teorii, fiecărui tip de interacțiune (celulă-celulă și celulă-substrat) i se poate asocia un anumit nivel de energie, evoluția întregului sistem făcându-se în sensul minimizării globale a energiei interfețelor. TAD precizează un principiu fundamental în fiziologia agregatelor celulare, dar nu precizează nimic despre dinamica sau mecanismul acestei evoluții (Steinberg, 1963).

În virtutea acestei teorii, agregatele celulare manifestă proprietăți asemănătoare cu lichidele vâscoase. O serie de experimente recente au confirmat această teorie și au permis chiar măsurarea proprietăților de lichid ale agregatelor celulare embrionare (Foty, 1996; Forgacs, 1998).

Rolul adezivității celulă-celulă sau celulă-substrat asupra segregării celulare intra-agregat a fost demonstrat prin experimente realizate cu agregate alcătuite din celule modificate genetic să exprime diferite nivele de caderine la nivelul suprafeței membranare (Steinberg, 1996; Lauffenburger, 2001; Ryan, 2001). S-a putut demonstra astfel că segregarea celulară nu depinde de fenomene chemotactice sau de altă natură, ci numai de adezivitatea intercelulară, dacă motilitatea celulară este păstrată (Foty, 2005).

Motilitatea celulară în interiorul agregatului este un factor hotărâtor în evoluția ulterioară a acestuia cu consecințe majore atât în determinarea potențialului invaziv al proceselor neoplazice, dar și în cazul morfogenezei pe substrat artificial. Procesele de

motilitate depind de modul de transmitere a forțelor intracelulare generate de citoschelet asupra mediului înconjurător: fie celule adiacente, fie matrice extracelulară sau material sintetic. Transmiterea, dar și generarea de forțe, este reglată prin căi de semnalizare declanșate de stimuli externi, dar sunt mediate, întotdeauna, de receptori membranari conectați la citoschelet. Implicarea citoscheletului în fenomene de sortare sau expansiune celulară, în agregate sau culturi celulare, a fost demonstrată prin studii efectuate cu agregate tratate cu substanțe de tipul *citochalazinei B*, destabilizator reversibil al citoscheletului. În aceste experimente, sortarea celulară a fost inhibată într-o manieră dependentă de concentrație, iar transferarea în mediu fără reactiv a agregatelor tratate a determinat recuperarea activității citoscheletului cu revigorarea procesului de sortare celulară (Mombach, 1995). Substanțe cu efect asemănător, ca de exemplu *latrunculina A*, au fost experimentate recent în studii pe culturi de celule și au demonstrat capacitatea de blocare reversibilă a polimerizării monomerului de actină cu inhibarea totală a mobilității active celulare (Morton, 2000). În studiile personale, derulate în Laboratorul de Fizică Biologică a Universității Missouri din Columbia, am urmărit efectul tratării cu *latrunculina A*, în diverse concentrații, a agregatelor de celule CHO supuse unui stres mecanic deformativ. Rezultatele acestor experimente sunt prezentate și discutate în partea specială a tezei.

Adeziunea celulară pe matrici solide

Ingineria tisulară, își propune rezolvarea unor probleme medicale majore precum transplantul de organe, vizând înlocuirea metodelor convenționale cu tehnologii noi, care să permită extinderea limitei de funcționare a grefelor de organ și să elimine complicațiile inerente ale operațiilor de transplant, precum cele vasculare, imunologice etc (Vacanti, 1999; Atala, 2004; Williams, 2006; Pryor II, 2008). Ca alternativă, sunt propuse tehnici autologe pentru sinteza *in vitro* de substituenți tisulari funcționali. Dacă pentru unele organe/țesuturi cu structură mai simplă (i.e., vezică urinară, vase de sânge, tegumente, cartilagii etc.) progresele sunt mai avansate, mult mai puține realizări există pentru organele cu structură internă, parenchimatoase (Atala, 2007; Huttmacher, 2007).

O serie de studii remarcă rolul esențial al procesului de însămânțare pe biomatrici, ca prim pas în stabilirea arhitecturii țesutului tridimensional primordial, dar și în determinarea progresiei ulterioare a procesului de diferențiere celulară spre starea de funcționalitate a organului/țesutului artificial (Ryan, 2001; Martin, 2004; Miot, 2005; Williams, 2006).

Matricile tridimensionale solide sunt folosite mai ales în sinteza de țesut osos sau cartilagos. Pentru a rezolva cu succes problemele transplantului de os sau cartilaj, în ortopedie se consideră că implantul artificial ideal este acela care se va putea biointegra rapid la locul de implant (fără reacții inflamatorii de respingere), astfel încât, durata refacerii clinice a segmentului osos sau articular să fie redusă la maxim. Pe lângă problema biocompatibilității acestor produse, se pune, însă, și problema proprietăților biomecanice, precum rezistența la compresie și întindere, care să asigure și integrarea funcțională a implantului pe lângă integrarea biologică (Kneser, 2006; Huttmacher, 2007).

Pentru sinteza de țesuturi dure, sunt necesare matricile solide naturale, precum cele de colagen tip I, pentru cartilaj, sau matrici artificiale, precum cele de oxid de siliciu (*bioglass®*) pentru os. Acestea conferă rezistență mecanică superioară față de constructele tisulare pe bază de gel, ce poate asigura o mai bună integrare funcțională la locul de implant (Kneser, 2006, Hutmacher, 2007).

Procesul de însămânțare a unor astfel de matrici solide tridimensionale joacă un rol hotărâtor, deoarece implică toți factorii cheie ai formării țesutului:

1. factori celulari: tip, activitate metabolică, rată de diviziune, viabilitate ș.a.
2. matrice: structură chimică, porozitate, arhitectură, ș.a.
3. interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice: procesele de adeziune

Studii recente au demonstrat importanța stabilirii acelor condiții optime necesare pentru însămânțarea matricilor solide, în vederea sintezei artificiale de țesuturi (Kneser, 2006). Tehnicile de însămânțare a matricilor tridimensionale pot fi clasificate astfel:

- I. metode statice:
 - a. prin îmbibarea directă a matricei cu o suspensie celulară concentrată
 - b. prin sedimentarea celulelor dintr-o suspensie aflată în repaus
- II. metode dinamice:
 - a. metoda fluxului circular
 - b. metoda perfuziei directe

Toate aceste metode prezintă diverse particularități, cu avantaje și dezavantaje.

Cel mai important aspect îl reprezintă însă calitatea biologică a produsului final (constructul tisular) și timpul necesar obținerii acestuia. Pentru a evalua eficiența procesului de însămânțare prin diversele tehnici, au fost propuși mai ales parametri statici, morfologici, precum densitatea celulară finală (gradul de celularitate), distribuția celulară sau viabilitatea celulară. Astfel, datele experimentale sugerează că cel mai eficient mod de însămânțare din punct de vedere al viabilității celulare și al dezvoltării ulterioare a constructului este însămânțarea prin flux circular. Prin acest mod de însămânțare, celulele au posibilitatea de a-și ajusta parametrii funcționali astfel încât să poată atinge un maxim de viabilitate și dezvoltare ulterioară în cadrul matricii (Wendt, 2003; Wang, 2003; Ochi, 2004)

În a doua parte experimentală a acestei lucrări, se propune o metodă dinamică de apreciere a eficienței procesului de însămânțare pe matrici solide, prin determinarea vitezei procesului de însămânțare. În plus, se propune un model matematic de analiză a datelor experimentale prin intermediul căruia se pot evalua diferite ipoteze de lucru, permițând astfel o mai bună înțelegere a mecanismelor implicate.

PARTEA SPECIALĂ

Studii de dinamică celulară pe agregate multicelulare sferice

Studiile realizate și prezentate în această parte au ca scop evidențierea rolului pe care procesele de adezivitate intercelulară îl joacă în generarea proprietăților vâscoelastice ale agregatelor multicelulare sferice. Se urmărește totodată și evaluarea influenței pe care integritatea citoscheletului celular o are în asigurarea motilității celulare la nivelul agregatului.

Așa cum este arătat în partea generală, țesuturile embrionare, formate din celule încă nediferențiate, precum și cele din agregatele multicelulare, mimează proprietățile și comportamentul lichidelor, conform ipotezei adeziunii diferențiate, propusă de Steinberg (Steinberg; 1963). Nu au fost însă furnizate până la ora actuală dovezi directe ale unei asemenea aserțiuni. Experimentele anterioare, care sugerează și susțin indirect această teorie, au fost descrise în partea generală.

Prin inducerea unui stres deformativ, de exemplu o compresie de $\sim 30\%$, se mărește suprafața unei picături de lichid considerată inițial sferică. Această mărire de suprafață presupune creșterea numărului de molecule de lichid din stratul superficial, prin atingerea unui nou echilibru de suprafață. În cazul unui agregat celular, mărirea de suprafață, la echilibru, trebuie să fie realizată prin deplasarea unui număr de celule din interior către periferie. Deși într-o primă fază, se produce o întindere elastică a celulelor din straturile profunde, la echilibru are loc o reșezare prin deplasare a celulelor din agregat.

Experimentele efectuate caută să determine deplasarea celulelor dintr-un agregat multicelular, supus unui stres deformativ cu mărirea suprafeței externe, în perioada de relaxare lentă, în care are loc deformarea vâscoasă. Dorim să demonstrăm caracterul difuziv și orientat spre suprafață al mișcării celulelor prin măsurarea comparativă a deplasărilor radiale medii (DRM) spre exterior (centrifugă) și spre interior (centripetă), ceea ce ar constitui o dovadă directă a proprietății de lichid a agregatului multicelular, proprietate care are la bază adezivitatea intercelulară. Într-un agregat multicelular omogen necomprimat, mișcarea celulelor este de tip brownian (mișcare difuzivă nedirecționată) în care cele două tipuri de deplasări propuse, DRM centrifugă și centripetă sunt egale (Mombach, 1996).

Agregatele celulare au fost realizate dintr-un amestec de celule CHO (*chinese hamster ovary*) transfectate stabil cu N-caderina, având o proporție de 10% celule marcate YFP (yellow fluorescence protein) și restul celule nemarcate. Stresul deformativ a fost realizat cu ajutorul unui dispozitiv original conceput și perfecționat în laborator, astfel încât să permită examinarea la microscopul confocal a agregatului, pe toată perioada experimentului. La 10-15 minute de la inițierea compresiei, se declanșează secvența de achiziție a imaginilor de microscopie confocală

Pentru achiziția imaginilor de fluorescență s-a utilizat un microscop inversat, Olympus, dotat cu sistem de scanare confocală tip BIORAD MRC600. Procesarea

imaginilor a fost realizată cu ajutorul programului Image Pro Plus (Media Cybernetics, USA), iar datele numerice furnizate au fost prelucrate în programul Microsoft Office Excel.

Calculul DRM (deplasării radiale medii) a fost realizat, pornind de la deplasarea radială individuală a fiecărei celule, iar coordonatele X,Y ale celulelor au fost furnizate prin procesarea imaginilor din secvența de scanare de la începutul (cca. 15 minute de la inițierea compresiei) și sfârșitul perioadei de monitorizare (după cca. 60 de minute de la inițierea compresiei).

În final, exprimarea deplasării radiale medii a fost făcută prin expresia:

$$DRM^{ex} = \frac{N_{ex} \cdot \sum_{i=1} d_i^{ex}}{N}$$

$$DRM^{in} = \frac{N_{in} \cdot \sum_{i=1} d_i^{in}}{N}$$

unde $d_i = AD$ este deplasarea individuală calculată pentru fiecare celulă marcată din secțiunile reprezentative. Din numărul total, N , de celule, N_{ex} sunt celulele care au avut $d_i > 0$, iar N_{in} sunt celulele pentru care $d_i < 0$.

Rezultate și discuții

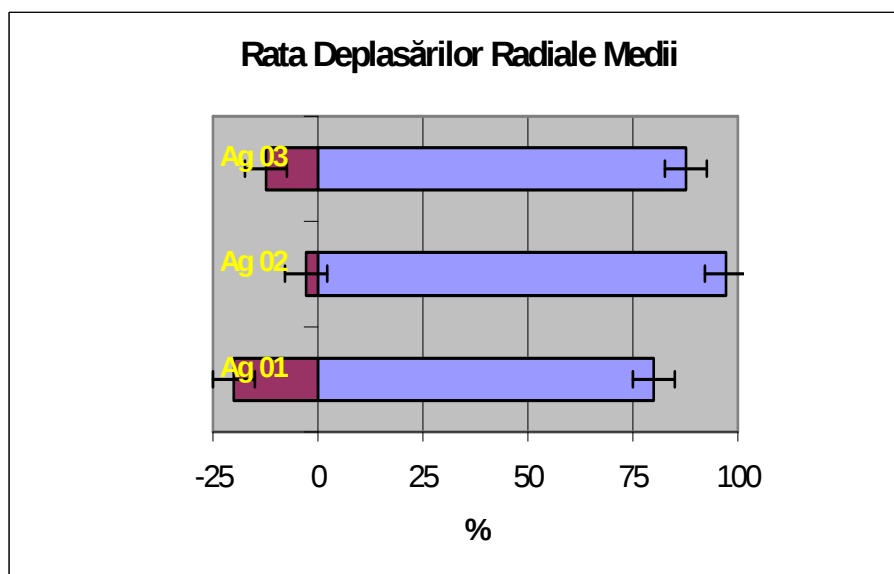


Fig. 2 - Rata Deplasărilor Radiale Medii la nivelul întregului agregat calculată ca raportul procentual dintre numărul de celule cu deplasare spre exterior (■) sau interior (■), față de numărul total de celule (semnul minus pe axa deplasărilor procentuale semnifică deplasarea spre axa de simetrie a agregatului).

Au fost monitorizate peste 30 de agregate multicelulare, dintre care am ales 3 dintre cele mai reprezentative. Din grosimea de agregat de 50 μm , scanată cu pas de 2 μm , au fost procesate 4 secțiuni, la distanță de 14 μm una de cealaltă, distanță ce corespunde

diametrului mediu al celulelor. Celelalte secțiuni au fost utilizate pentru aprecierea deplasării XY și a celulelor care aveau componentă majoră de deplasare pe direcția Z și părăseau de-a lungul perioadei de monitorizare nivelul secțiunii inițiale. Numărul acestor celule a fost însă nesemnificativ, comparativ cu totalul celulelor evaluate.

Din analiza datelor se poate observa cu ușurință că peste 80 % dintre celulele marcate au avut o deplasare net orientată spre suprafața agregatului, cu o viteză medie de aprox. 3 $\mu\text{m/oră}$, ceea ce sugerează că relaxarea către noua stare de echilibru caracterizată de o suprafață mai mare, se realizează printr-un mecanism asemănător cu cel al lichidelor.

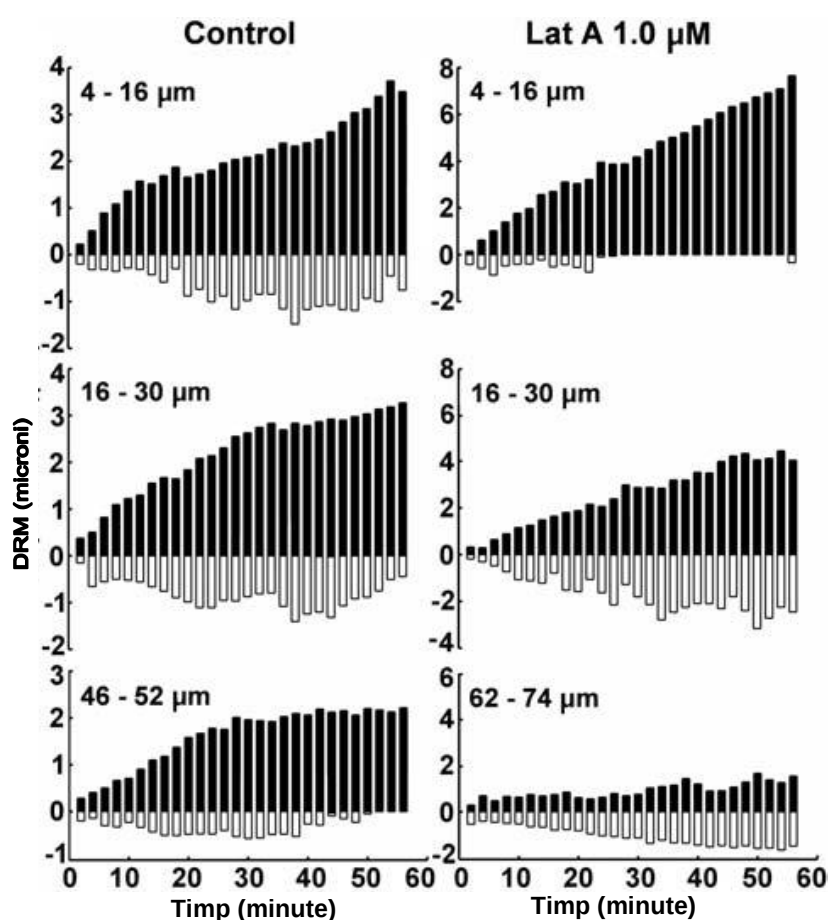


Fig. 3 - Diagrama prezintă diferențiat DRM^{ex} și DRMⁱⁿ la un agregat de control comparativ cu un agregat incubat cu 1.0 mm Latrunculina A, la diferite nivele în interiorul agregatului.

Pentru observarea modificărilor de dinamică, induse de latrunculina A, inhibitor al polimerizării actinei citoplasmatică, s-au efectuat experimente de compresie pe agregate preincubate în mediu de cultură cu latrunculina A în diferite concentrații. Prin acțiunea latrunculinei A, citoscheletul celulelor este destabilizat, astfel că nu mai poate fi implicat în procesele dinamice active ale celulelor. În acest tip de experimente au fost determinate deplasările radiale medii, față de poziția inițială, pentru toate celulele marcate fluorescent aflate la diferite adâncimi în agregat. Măsurătorile au fost

efectuate, la fiecare moment de timp, de-a lungul perioadei de monitorizare pe două seturi de agregate. Au fost evaluate deplasările individuale pentru 100 de celule/agregat în medie, pentru 30 de secvențe la interval de 2 minute. Astfel, pentru cele 6 agregate au fost efectuate aproximativ 18.000 de determinări. Acest volum considerabil a fost posibil prin crearea unor microseturi de comenzi automate, dezvoltate în cadrul programului de procesare de imagini Image Pro Plus și a procesorului de date Microsoft Office Excel.

Din rezultatele obținute se observă blocarea deplasării radiale la celulele din straturile profunde, la ambele concentrații de latrunculină utilizate în cele două seturi de analiză, comparativ cu controlul. Datorită efectului de difuziune a latrunculinei în mediul de cultură pe perioada derulării experimentelor, în straturile superficiale, se constată o creștere de două ori a DRME față de control. Acest lucru probează caracterul reversibil al acțiunii latrunculinei și, în plus, sugerează că blocarea celulelor din interior determină o mobilizare mai amplă a celulelor de la exterior pentru obținerea relaxării după compresie.

În straturile interioare, la agregatele tratate cu latrunculina A, mobilitatea celulelor este aproape complet abolită, lucru demonstrat de diminuarea sub un micron a deplasărilor înregistrate, și de distribuția egală între deplasările spre exterior sau interior (Fig. 3).

Studiul cineticii de aderare pe biomatrici tridimensionale solide

Dat fiind caracterul complex, multidisciplinar al problemelor cu care se confruntă ingineria țesuturilor artificiale și, luând în considerare limitările majore existente la ora actuală, lumea științifică din domeniu a trecut la reconsiderarea strategiei de abordare. Eforturile anterioare, ce aveau mai degrabă un caracter entuziast decât unul elaborat pe baze fundamentale, au fost direcționate într-o manieră de tip *încearcă și vezi dacă merge* și nu au condus la rezultate clinice reproductibile, viabile pe termen lung (Mikos, 2006). Astfel, pe buna dreptate s-a formulat întrebarea: “dacă mecanismele fizice și genetice prin care operează celulele utilizate ca sursă pentru procedeele de inginerie tisulară nu sunt suficient stăpânite, cum să sperăm că se vor putea găsi condițiile optime pentru a crea țesutul artificial ideal?” (Williams, 2006)

În consecință, a devenit foarte clară ideea că dinamica interacțiunilor moleculare și celulare este factorul esențial în proliferarea sau diferențierea celulară. Fără considerarea aspectelor fizice, dinamice, active, ce caracterizează astfel de fenomene, simpla determinare a componentelor biologice, de la codificare genetică până la proteine, organite și celule, și mai departe la țesuturi, organe și organism, nu poate conduce direct la înțelegerea proceselor implicate în morfogenează.

Studiile realizate în această parte au ca obiectiv studiul dinamicii proceselor de adeziune pe matrice solide, implicate în etapele inițiale ale sintezei artificiale de țesuturi (i.e. os și/sau cartilaj).

În cadrul laboratorului nostru, a fost realizat un dispozitiv ce permite evaluarea în dinamică a procesului de însămânțare a matricilor solide, cu posibilitatea studierii factorilor favorizanți sau inhibitori. Aparatul este special construit pentru a putea măsura viteza de însămânțare, definită ca:

$$V_{seed} = -\frac{dc_{sc}}{dt} = -\frac{dN_{sc}}{V \cdot dt} = \frac{dN_{seed}}{V \cdot dt}$$

unde c_{sc} este concentrația de celule din suspensie (N_{sc}), N_{seed} – este numărul de celule care se atașează de matrice, iar V – volumul de suspensie celulară.

Aparatul înregistrează variația densității optice (extincția) a suspensiei celulare puse în contact cu biomatricea poroasă. Datorită sechestrării celulelor circulante în interiorul matricei, se înregistrează scăderea în timp a densității optice a suspensiei, odată cu scăderea concentrației de celule. Viteza de însămânțare se determină prin calibrarea curbelor de extincție în funcție de concentrația de celule și se exprimă în număr de celule sechestrate la nivelul matricei, în unitatea de timp (N_{seed}/t).

Dispozitivul experimental a fost conceput ca un sistem modular, flexibil, alcătuit din următoarele **părți componente principale**: sursa de lumină, incintă reactor de agregare, reactorul propriu-zis, dispozitivul de fotodetecție, sistemul de achiziție analog-digital conectat la computer. Elementul de originalitate îl constituie **reactorul de însămânțare** care a fost conceput astfel încât să îndeplinească toate condițiile specifice experimentului (Fig. 4). Această geometrie s-a dovedit a fi mai eficientă în monitorizarea densității optice a suspensiei celulare. Agitarea continuă asigură un flux circular de celule și un contact permanent al celulelor cu biomatricea.

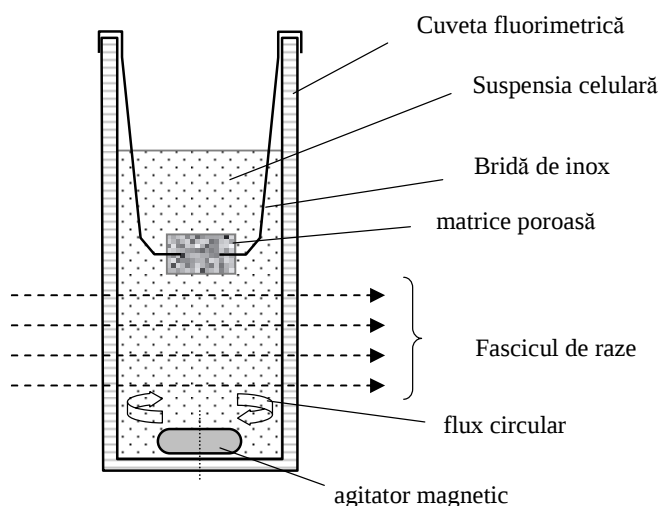


Fig. 4 - Bioreactor cu flux circular

Pentru monitorizarea procesului de însămânțare, rata de eșantionare a fost de 0.5 Hz, astfel rezoluția temporară a înregistrărilor este de ordinul secundelor. Fiecare punct al curbelor de cinetică prezentate în secțiunile următoare este obținut prin

medierea a 300 de valori succesive, înregistrate într-un interval de 10 minute, și prin ajustarea mediei obținute cu nivelul de amplificare al aparatului.

Rezultate și discuții

Pentru a se putea evalua parametrii optimi de funcționare ai dispozitivului experimental s-au efectuat o serie de teste preliminare. Prezintă, în continuare, rezultatele a două tipuri de experimente, realizate în condiții diferite:

- 1) concentrație mare de celule în suspensia inițială ($3 \times 10^6/\text{ml}$) și matrice cu dimensiuni reduse ($2 \times 2 \times 5 \text{ mm}^3$) – **proba A**
- 2) concentrație mică de celule în suspensia inițială ($1 \times 10^6/\text{ml}$) și matrice cu dimensiuni mărite ($3 \times 3 \times 5 \text{ mm}^3$) – **proba B**

Pentru toate tipurile de experimente s-au efectuat teste-control preliminare care au constatat în monitorizarea densității optice a unei suspensii celulare în condiții identice cu cele experimentale, dar în lipsa matricei poroase solide. Au fost realizate teste de viabilitate celulară la începutul și la sfârșitul experimentelor folosind metoda de exclusiune cu Trypan blue.

În figura 5 se pot observa curbele de transmitanță optică obținute la monitorizarea celor două procese diferite de însămânțare, comparativ cu controlul.

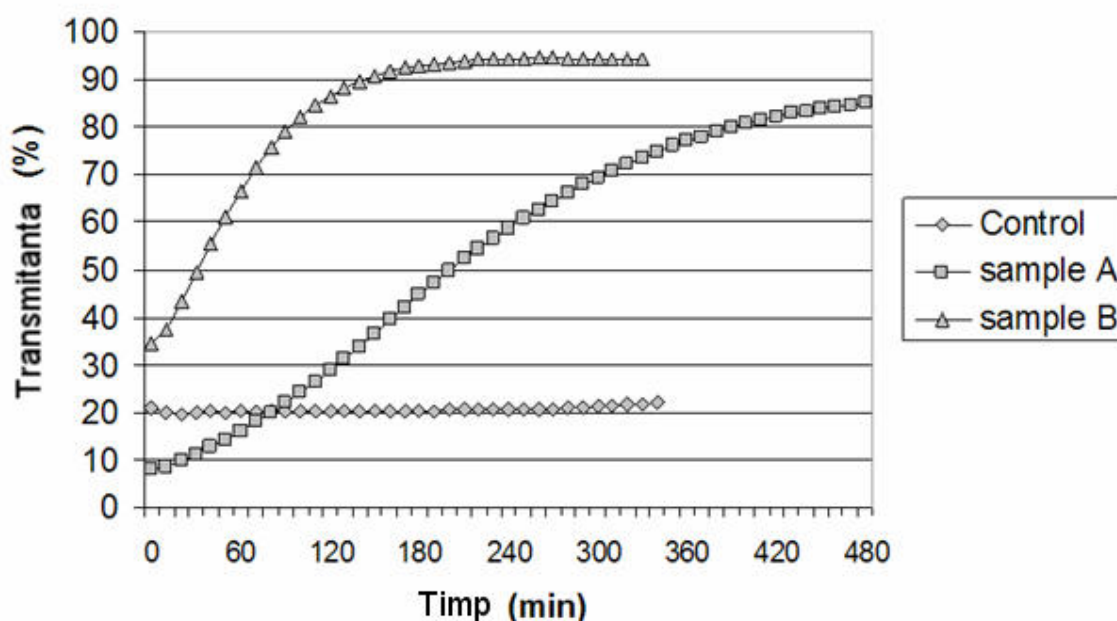


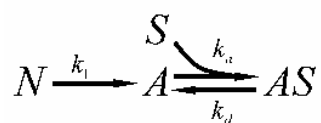
Fig. 5 - Curbe de transmisie. Proba A – proces de însămânțare inițiat cu celule multe și matrice mică; Proba B – proces de însămânțare inițiat cu celule puține și cu matrice mare; Controlul – variația transmitanței unei suspensii celulare în lipsa matricei poroase solide.

Testele preliminare au demonstrat că dispozitivul experimental construit permite verificarea, într-o manieră extrem de precisă și eficientă, a efectelor pe care le au asupra procesului de atașare pe biomatrice poroase, parametrii predictibili precum

numărul inițial de celule sau volumul matricial. Prin experimente similare se vor putea deci testa cu succes și alți parametri, mai puțin predictibili, care să poată permite elucidarea mecanismelor implicate în etapele inițiale ale proceselor de adeziune celulară.

Un model teoretic al procesului de însămânțare trebuie să țină însă cont de cinetica de activare a integrinelor, de aderarea celulelor la locurile disponibile oferite de matrice și, funcție de fluxul circulant indus de agitare, de detașarea unor celule.

Schema cinetică cea mai simplă care încorporează aceste evenimente este:



unde N reprezintă celulele din suspensie care nu sunt capabile să adere deoarece funcția integrinelor nu este încă refăcută după tratamentul cu tripsina/EDTA, A reprezintă numărul care au capacitatea să adere, S - locurile disponibile de legare, iar AS - număr de celule atașate. Constanta k_1 este o măsură globală a cineticii de activare a integrinelor, k_a este constanta de aderare a celulelor la matrice, iar k_d este constanta procesului de detașare. În acest proces bifazic, în care etapa a doua este reversibilă, este similar teoriei adsorbției atomilor sau moleculelor pe substrat solid, descrisă de Langmuir (Atkins, 1994).

Pentru a realiza corelarea modelului cu datele experimentale obținute, se ține cont de rezultatele experimentelor de calibrare care au demonstrat relația de proporționalitate dintre densitatea optică a suspensiei celulare și concentrația acesteia. Parametrii matematici care asigură corespondența optimă dintre modelul teoretic și cel experimental au fost determinați prin metoda regresiei neliniare a celor mai mici pătrate (nonlinear least square regression) utilizând algoritmul simplex implementat de funcția *fminsearch* din cadrul programului Matlab (Nelder, 1965).

Pentru a testa modelul matematic propus pentru interpretarea datelor obținute cu ajutorul disozitivului experimental descris, s-au efectuat două tipuri de experimente, în care am folosit celule procesate diferit. În primul tip, se folosește procedura clasică de digerare enzimatică a proteinelor membranare, iar în cel de-al doilea, se realizează desprinderea celulelor de pe suprafața vasului de cultură cu păstrarea intactă a configurației proteice membranare. Se prezintă analiza comparativă a curbelor de cinetică realizate pentru cele două tipuri de populații celulare, cu monitorizarea dinamicii procesului de reconfigurare proteică externă a membranei (expresia de integrine) și cu discutarea rolului avut asupra procesului de aderare. Se prezintă, de asemenea, date morfologice ale celulelor din suspensie, la începutul și la sfârșitul experimentelor de cinetică, în încercarea de a pune în evidență eventuale procese concomitente de agregare sau reagregare intercelulară la nivelul suspensiei, pe perioada proceselor de însămânțare.

S-au efectuat mai multe serii de experimente, din care am selectat trei serii realizate cu celule tripsinizate și trei serii cu suspensii de celule netripsinizate, conform

protocolului menționat mai sus. Concentrația celulelor din suspensie a fost aceeași, de aprox. $10^6/\text{ml}$.

În figura 6 sunt prezentate curbele de cinetică obținute în urma fitării datelor experimentale (punctele marcate distinct) cu cele teoretice utilizând modelul secvențial extins prezentat anterior (curbe trasate cu linii).

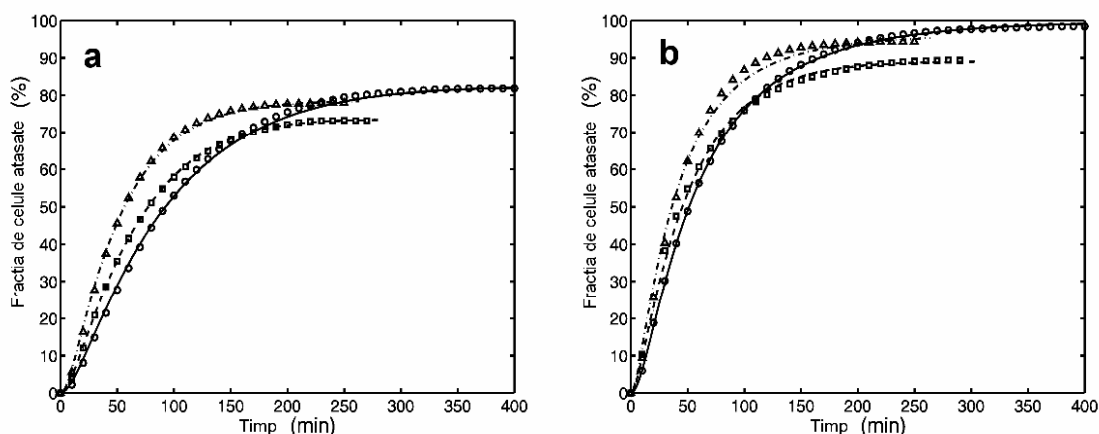


Fig. 6 - Dependența de timp a fracției de celule atașate la matrice. Datele experimentale sunt reprezentate prin marcaje cu forme geometrice distincte, iar soluțiile modelului teoretic sunt trasate cu linii diferite. Datele obținute cu celule tratate cu tripsină-EDTA (a) corespund setului 1 (cercuri, linie continuă), setului 2 (pătrate, linie întreruptă) și setului 3 (triunghiuri, linie-punct), iar cele obținute cu celule tratate fără tripsină (numai cu EDTA) (b) corespund setului 4 (triunghiuri, linie-punct), setului 5 (pătrate, linie întreruptă) și setului 6 (cercuri, linie continuă).

Prin analiza rezultatelor celor două tipuri de experimente, se pot distinge următoarele aspecte:

- 3) Atingerea platoului de saturare, după aproximativ 6 ore, în ambele tipuri de experimente; în condițiile în care raportul dintre numărul inițial de celule din suspensie și suprafața totală a matricei a fost aproximativ egal, în ambele experimente, se poate deduce că acest raport are o pondere globală mai mare asupra vitezei procesului de însămânțare, comparativ cu integritatea inițială a aparatului proteic de aderare.
- 4) Cinetica procesului prin care celulele devin aderente, exprimată prin k_1 , este net superioară în cazul populației de celule la care aparatul molecular de aderență era prezent de la început, ceea ce este perfect rezonabil. Se poate aprecia totodată și că simpla prezență a integrinelor la suprafața celulei nu este suficientă pentru a determina direct aderarea celulei pe substrat, astfel că se păstrează tot o cinetică de tip secvențial, dar în care transformarea inițială $A \rightarrow B$ este mult mai rapidă.
- 5) viteza de însămânțare a fost mai mare, în prima fază, ca apoi să scadă din ce în ce mai mult, până la atingerea platoului. Acest tip de evoluție a fost similar în cele două experimente.

Pentru a testa capacitatea modelului experimental de a evidenția influența unor factori chimici importanți precum ionii de calciu liberi asupra proceselor de

Însămânțare a matricilor solide de collagen, am efectuat o nouă serie de determinări. Pentru acest tip de experimente, celulele au fost suspendate în mediu CO_2 independent cu SFB 10 %, după ce, în prealabil, au fost desprinse de pe suprafața de cultură, cu soluție Tripsină-EDTA sau soluție EDTA. Imediat după atingerea echilibrului de adeziune pe suprafața matricei, în cele trei cazuri prezentate, A, B și C (Fig. 7), s-a agitat cuveta bioreactor cu un șoc mecanic controlat, prin intermediul unui vortex de laborator, aplicând câte 3 pulsuri vibratorii succesive de câte 1 secundă la intensitate maximă.

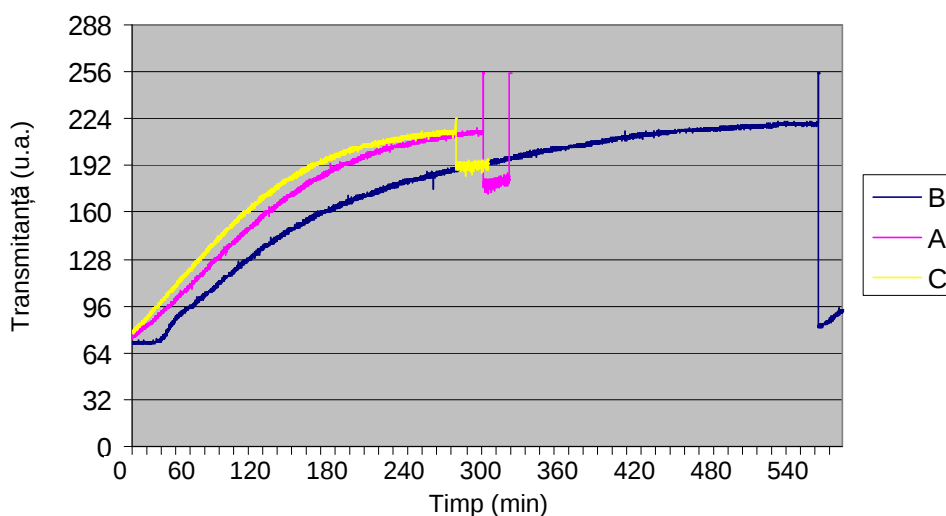


Fig. 7 - Dinamica de aderare pe matrici de collagen în prezența (A și C) sau în absența ionilor de Ca (B) la celule desprinse din cultură cu soluție de Tripsină (A și B), și la celule desprinse cu soluție EDTA (C).

În experimentele A și B s-au folosit celule al cărui aparat de adeziune a fost digerat în momentul desprinderii de pe suprafața de cultură cu soluție de Tripsină. Spre deosebire de experimentul A, în experimentul B s-a adăugat în mediul de reacție, de la începutul înregistrării soluție EDTA, pentru fixarea ionilor bivalenți, la o concentrație finală de 5 mM. În experimentul C, s-au utilizat celule desprinse fără distrugerea aparatului molecular de adeziune, conform metodei descrise în etapa anterioară. În toate cele trei cazuri, matricile au fost preincubate în mediu CO_2 independent cu SFB 10%. Rezultatele înregistrărilor sunt prezentate în figura 7.

Prin analiza calitativă a rezultatelor descrise se poate afirma că fixarea calciului cu chelatori de tipul EDTA duce la scăderea semnificativă a vitezei procesului de aderare, fără însă să blocheze procesul de atașare a celulelor pe matrice. Această observație susține ipoteza existenței a două mecanisme implicate în procesele de aderare pe matrici, unul activ mediat de calciu și proteinele de adezivitate de tipul integrinei, și unul pasiv, fizic, de adsorbție la interfața lichid-solid. Desprinderea de pe matrice a celulelor aproape în totalitate la sfârșitul procesului de aderare derulat în lipsa ionilor de Ca, sugerează procesul pasiv, fizic, de aderare, fără o participare activă din partea celulelor.

CONCLUZII FINALE

Dinamica celulară în agregate multicelulare sferice

Prin mărirea suprafeței agregatelor multicelulare realizată în urma unei compresii de 30 % din diametrul inițial, elementele celulare marcate fluorescent adoptă, în proporție de peste 80 %, o mișcare orientată spre suprafață, cu o viteză medie de 3 $\mu\text{m/oră}$, ceea ce confirmă ipoteza lichidității agregatelor multicelulare de tip embrionar.

Deplasarea radială medie a elementelor celulare marcate nu depinde semnificativ de adâncimea la care se află celula în agregat, ceea ce sugerează că pentru atingerea echilibrului de suprafață sunt angrenate toate celulele din agregat în aceeași măsură.

Prin destabilizarea citoscheletului celular, sub efectul latrunculinei A, dinamica elementelor celulare marcate fluorescent din agregatele multicelulare este diminuată semnificativ comparativ cu controlul. Efectul este reversibil, astfel că în straturile superficiale ale agregatelor tratate și apoi transferate în mediul fără latrunculină, dinamica celulară este redobândită, cauza fiind tocmai difuzia latrunculinei din celulele aflate la suprafață.

Datorită blocării celulelor din straturile interne prin efectul latrunculinei, se constată o amplificare de două ori față de control a deplasării celulelor din straturile superficiale (spălate de latrunculină). Astfel, atingerea echilibrului de suprafață se face numai pe seama celulelor din straturile de la suprafață ceea ce determină dublarea deplasărilor radiale medii comparativ cu controlul.

Dinamica proceselor de aderare pe matrici solide

Modelul experimental propus pentru monitorizarea procesului de însămânțare a matricilor solide este o metodă neinvazivă de turbidimetrie ce permite testarea diferitelor procedee de însămânțare și studiul factorilor ce influențează acest proces.

Pentru acreditarea datelor furnizate de modelul experimental propus, sunt necesare teste riguroase de calibrare, de monitorizare a viabilității celulare precum și asigurarea de condiții optime de temperatură și sterilitate pentru celule în timpul experimentelor.

Modelul secvențial combinat cu teoria adsorbției Langmuir propus pentru descrierea mecanismului procesului de aderare asigură o corespondență foarte bună cu datele experimentale, cu excepția unui singur set de măsurători. Valorile coeficientului de disponibilitate, r , al matricii arată că gradul de populare al matricii nu depinde numai de microstructura matricii ci și de starea fiziologică a celulelor utilizate pentru însămânțarea biomatricii. În cazul tratamentului mai puțin agresiv al celulelor, numai cu EDTA, matricea înglobează mai multe celule. O întrebare interesantă ar fi dacă acest fenomen este cauzat de o atașare mai eficientă a celulelor sau de mobilitatea mai bună a acestora.

Modelul secvențial este susținut de faptul că celulele aflate în suspensie nu exprimă integrine. La fel se întâmplă și în cazul celulelor desprinse de pe suprafața de cultură fără distrugerea proteinelor membranare, deoarece, în lipsa stimulării expresia de integrine dispare. Exprimarea integrinelor se poate produce și/sau menține numai în prezența stimulării specifice determinată de contactul fizic cu fibrele de colagen ale matricei (Hynes, 2002; Iber, 2006). Datorită agitării permanente induse de agitatorul magnetic, celula nu poate rămâne atașată de la primul contact cu matricea. Ea preia însă stimulul și declanșează secvența de expresie a integrinelor. La următorul contact, celula preia un nou stimul și așa mai de parte, până se ajunge la exprimarea unui număr suficient de integrine, care, la contactul imediat următor, să poată fixa definitiv celula, în ciuda curenților de agitare.

Modelul experimental descris completat de modelul teoretic propus constituie un instrument de studiu al mecanismelor implicate în etapele inițiale ale morfogenezei tisulare, precum însămânțarea matricilor poroase solide. Pe baza acestui model se pot testa diferite protocoale de însămânțare utilizând diferite tipuri de celule sau matrici solide, precum și influența factorilor fizico-chimici implicați, cum ar fi ioni de calciu sau integritatea aparatului molecular de adeziune.

Sunt necesare studii suplimentare imuno-histologice și genetice pentru cuantificarea nivelului de exprimare a integrinelor pe suprafața celulară pe toată perioada procesului de însămânțare. Aceste studii vor fi avute în vedere în elaborarea de proiecte de cercetare ample, multidisciplinare.

BIBLIOGRAFIE

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition, Garland Science, New York, pp1080-1117 (2002)
2. Atala, A., Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system, *Am. J. Transplant.*, 4(Suppl 6), 58-73 (2004)
3. Atala, A., Engineering tissues, organs and cells, *J. Tissue. Eng. Regen. Med.*, 1(2):83-96 (2007)
4. Atkins, P.W.: Physical Chemistry. Fifth Edition. Chapter 28. Oxford University Press, Oxford (1994)
5. Bernas, L.M., Foster P.J., Rutt B.K., Magnetic resonance imaging of in vitro glioma cell invasion, *J. Neurosurg.*, 106(2), 306-13 (2007)
6. Beysens, D.A., G. Forgacs, J. A. Glazier, Cell sorting is analogous to phase ordering in fluids, *PNAS*, 97(17), 9467–71 (2000)
7. Bigerelle, M., K. Anselme, Bootstrap analysis of the relation between initial adhesive events and long-term cellular functions of human osteoblasts cultured on biocompatible metallic substrates, *Acta Biomaterialia*, 1, 499–510 (2005)
8. Carrier, R.L., Papadaki, M., Rupnick, M., Schoen, F.J., Bursac, N., Langer, R., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization, *Biotechnol Bioeng*, 64, 580–589 (1999)
9. Catledge, S.A., Vohra, Y.K., Bellis, S.L., Sawyer, A.A., Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on nanostructured biomaterials, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 4, 986–989 (2004)
10. Chaplain, M.A.J., M. Ganesh, I.G. Graham, Spatio-temporal pattern formation on spherical surfaces: numerical simulation and application to solid tumour growth, *J. Math. Biol.*, 42, 387–423 (2001)
11. Deisboeck, T.S., M.E. Berens, A.R. Kansal, S. Torquato, A.O. Stemmer-Rachamimov, E.A. Chiocca, Pattern of self-organization in tumour systems: complex growth dynamics in a novel brain tumour spheroid model, *Cell Prolif.*, 34, 115–134 (2001)
12. Dormand, J.R., Prince, P.J., A family of embedded Runge-Kutta formulae, *J. Comp. Appl. Math.*, 6, 19-26 (1980)
13. Du, Y., Han R., Ng S., Ni J., Sun W., Wohland T., Ong S.H., Kuleshova L., Yu H., Identification and characterization of a novel prespheroid 3-dimensional hepatocyte monolayer on galactosylated substratum, *Tissue Eng.*, 13(7), 1455-68 (2007)
14. Enmon, R.M., K.C. O'Connor, D.J. Lacks, D.K. Schwartz, R.S. Dotson, Dynamics of Spheroid Self-Assembly in Liquid-Overlay Culture of DU 145 Human Prostate Cancer Cells, *Biotech. Bioeng.*, 72(6), 579-591 (2001)
15. Evans, E.A., Calderwood D.A., Forces and bond dynamics in cell adhesion, *Science*, 316(5828), 1148-53 (2007)
16. Filippovich, I.V., N.I. Sorokina, N. Robillard and J.F. Chatal, Radiation-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids, *Int. J. Cancer*, 1997, 72, 851–859
17. Forgacs, G., et al., Viscoelastic properties of living embryonic tissues: a quantitative study, *Biophys J*, 74(5), 2227-34 (1998)
18. Foty, R.A., Pflieger, C.M., Forgacs, G., and Steinberg, M.S., Surface Tensions of Embryonic Tissues Predict Their Mutual Envelopment Behavior, *Development*, 122, 1611–1620 (1996)
19. Foty R.A., Steinberg M.S., The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation, *Dev.Biol.*, 278(1), 255-63 (2005)
20. Freshney, R.I.: Culture of animal cells – A manual of basic technique, Fourth Edition. pp 185-186. Wiley-Liss, New York (2001)
21. Freyer, J.P., R.M. Sutherland, Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply, *CancerResearch*, 46, 3513-3520 (1986)/a
22. Freyer, J.P., R.M. Sutherland, Regulation of growth saturation and development of necrosis in EMT6/Ro multicellular spheroids by the glucose and oxygen supply, *CancerResearch*, 46, 3504-3512 (1986)/b
23. Friedlander, D. R., Mege, R. M., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M., Cell sorting-out is modulated by both the specificity and amount of different cell adhesion molecules (CAMs) expressed on cell surfaces. *PNAS*, 86, 7043–7047 (1989)
24. Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP, The relationship between force and focal complex development, *J. Cell Biol.*, 159(4), 695–705 (2002)
25. Gaus, K., L.S. Le, N. Balasubramanian, M.A. Schwartz, Integrin-mediated adhesion regulates membrane order, *J. Cell Biol.*, 174(5), 725–734 (2006)

26. Ginsberg, M.H., Partridge A., Shattil S.J., Integrin regulation, *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 509–516 (2005)
27. Goldbrunner, R.H., J.J. Bernstein, K.H. Plate, G.H. Vince, K. Roosen, J.C. Tonn, Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms, *Journal of Neuroscience Research*, 55, 486–495 (1999)
28. Griffith, L.G., Naughton, G.: Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities, *Science*, 295, 1009–14 (2002)
29. Gurdon, J.B.: A community effect in animal development, *Nature*, 366, 772–774 (1988)
30. Hayman, D.M., T.J. Blumberg, C.C. Scott, K.A. Athanasiou, The Effects of Isolation on Chondrocyte Gene Expression, *Tissue Engineering*, 12(9), 2573–81 (2006)
31. Hong, S. et al., Real-time analysis of cell–surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator, *Biomaterials*, 27, 5813–5820 (2006)
32. Hunziker E., Spector, M., Libera, J., Gertzman, A., Woo, S.L.-Y., Ratcliffe, A., Lysaght, M., Coury, A., Kaplan, D., Vunjak-Novakovic, G.: Translation from research to applications, *Tissue Engineering*, 12(12), 3341–64 (2006)
33. Hutmacher, D.W., S. Cool, Concepts of scaffold-based tissue engineering-the rationale to use solid free-form fabrication techniques, *J. Cell. Mol. Med.*, 11(4), 654–669 (2007)
34. Hynes, R.O., Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines, *Cell.*, 110, 673 – 687 (2002)
35. Iber, D., I.D. Campbell, Integrin activation – the importance of a positive feed-back, *Bul. Math. Biol.*, 68, 945–956 (2006)
36. Imoto, E., Kakuta, S., Hori, M., Yagami, K., Nagumo, M.: Adhesion of a chondrocytic cell line (USAC) to fibronectin and its regulation by proteoglycan, *J. Oral. Pathol. Med.*, 31, 35–44 (2002)
37. Ingber, D.E. et al., Tissue Engineering and Developmental Biology: Going Biomimetic, *Tissue Engineering*, 12(12), 3265–3283 (2006)
38. Ingber, D.E., Levin, M.: What lies at the interface of regenerative medicine and developmental biology? *Development*, 134, 2541–2547 (2007)
39. Iwasa, J., et al., Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel, *Artificial Organs*, 27(3), 249–255 (2003)
40. Jakab, K., et al., Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems, *Proc Natl Acad Sci*, 101(9), 2864–9 (2004)
41. Kneser, U., D.J. Schaefer, E. Polykandriotis, R.E. Horch, Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view, *J. Cell. Mol. Med.*, 10(1), 7–19 (2006)
42. Langer, R., Vacanti, J.P., Tissue Engineering. *Science*, 260, 920–926 (1993)
43. Lauffenburger, D. A. and L. G. Griffith, Who's got pull around here? Cell organization in development and tissue engineering, *PNAS*, 98(8), 4282–4284 (2001)
44. Li, G.N., L.L. Livi, C.M. Gourd, E.S. Deweerdt, D. Hoffman-Kim, Genomic and Morphological Changes of Neuroblastoma Cells in Response to Three-Dimensional Matrices, *Tissue Engineering*, 13(5), 1035–47 (2007)
45. Martin, I., Wendt D., Heberer M., The role of bioreactors in tissue engineering, *Trends in Biotechnology*, 22(2), 80–86 (2004)
46. Mikos, AG et al., Engineering Complex Tissues, *Tissue Engineering*, 12(12), 3307–3339 (2006)
47. Miot, S. et al., Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition, *Biomaterials*, 26, 2479–2489 (2005)
48. Mombach, J.C.M., J.A. Glazier, R.C. Raphael, M. Zajac, Quantitative comparison between differential adhesion models and cell sorting in the presence and absence of fluctuations, *Phys. Rev. Lett.*, 75(11), 2244–49 (1995)
49. Mombach, J.C.M., J.A. Glazier, Single cell motion in aggregates of embryonic cells, *Phys. Rev. Lett.*, 76(16), 3032–35 (1996)
50. Morton, W.M., K.R. Ayscough, P.J. McLaughlin, Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization, *Nature Cell Biology*, 2, 376–378 (2000)
51. Naughton, G.K.: From lab bench to market – Critical issues in tissue engineering. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 961, 372–385 (2002)
52. Nelder, J.A., Mead, R., A Simplex Method for Function Minimization, *Computer J.*, 7, 308–313 (1965)
53. Ochi, M. et al., Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect, *Artificial Organs*, 25(3), 172–179 (2001)
54. Ochi, M., Adachi N., Nobuto H., Yanada S., Ito Y., Agung M., Articular cartilage repair using tissue engineering technique - novel approach with minimally invasive procedure, *Artificial Organs*, 28(1), 28–32 (2004)

55. Pollok, J.M., D. Kluth, R.A. Cusick, H. Lee, H. Utsunomiya, P.X. Ma, R. Langer, C.E. Broelsch, J.P. Vacanti, Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions, *Eur. J. Pediatr. Surg.*, 8, 195-199 (1998)
56. Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T, Flannery, B.P., Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing. Third Edition. pp. 773-836. Cambridge University Press, New York (2007)
57. Pryor II, H.I., J.P. Vacanti, The promise of artificial liver replacement, *Frontiers in Bioscience*, 13, 2140-59, (2008)
58. Ryan, P.L., R.A. Foty, J. Kohn, M.S. Steinberg, Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity, *PNAS*, 98(8), 4323-4327 (2001)
59. Solchaga, L.A. et al., A rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs, *Tissue Engineering*, 12(7), 1851-63 (2006)
60. Spector, I., Shochet, N.R., Kashman, Y., Groweiss, A., Latrunculin: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells, *Science*, 219(4584), 493-5 (1983)
61. Steinberg, M.S., Reconstruction of tissue by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells have a common explanation, *Science*, 141, 401-8 (1963)
62. Steinberg, M.S., Adhesion in Development: An Historical Overview, *Developmental Biology*, 180, 377-388 (1996)
63. Sutherland, R.M., Cell and environment interact in tumor microregions: the multicell spheroid model, *Science*, 240, 177-18 (1988)
64. Tadokoro, S., Eto K., Pereda J.M., Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation, *Science*, 302, 103-106 (2003)
65. Thoumine, O., Lambert M., Mège R.M., Choquet D., Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling, *Mol Biol Cell.*, 17(2), 862-75 (2006)
66. Torado, G.J., Habel, K., Green, H., Antigenic and cultural properties of cells doubly transformed by polyoma virus and SV40, *Virology*, 27, 179-185 (1965)
67. Vacanti, J.P., R. Langer, Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation, *Lancet*, 354(suppl 1), 32-34 (1999)
68. Vedula, S.R., Lim T.S., Kausalya P.J., Hunziker W., Rajagopal G., Lim C.T., Biophysical approaches for studying the integrity and function of tight junctions, *Mol Cell Biomech.*, 2(3), 105-23 (2005)
69. Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B., Martin, I., Bursac, P.M., Langer, R., Freed, L., Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biotechnol. Prog.*, 14, 193-202 (1998)
70. Wang, H.-J., M. Bertrand-de Haas, C.A. Van Blitterswijk, E.N. Lammé, Engineering of a dermal equivalent: seeding and culturing fibroblasts in pegt/pbt copolymer scaffolds, *Tissue Engineering*, 9(5), 909-917 (2003)
71. Wendt, D., Marsano, A., Jakob, M., Heberer, M., Martin, I., Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity, *Biotechnology and Bioengineering*, 84, 205-214 (2003)
72. Wiesner, S., K.R. Legate, R. Fässler, Integrin-actin interactions, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 1081-1099 (2005)
73. Williams, D.F., To engineer is to create: the link between engineering and regeneration, *Trends Biotech.*, 24, 4-8 (2006)
74. Wu, Y., F.F. Sun, D.M. Tong, B.M. Taylor, Changes in membrane properties during energy depletion-induced cell injury studied with fluorescence microscopy, *Biophys. J.*, 71(1), 91-100 (1996)
75. Yarmola, E.G., Somasundaram, T., Boring, T.A., Spector, I. & Bubb, M.R., Actin-latrunculin A structure and function, *J.Biol.Chem*, 275(36), 28120-7 (2000)
76. Zhdanov, V.P., B. Kasemo, Synchronization of metabolic oscillations: two cells and ensembles of adsorbed cells, *J. Biol. Phys.*, 27, 295-311 (2001)
77. Zhang, Z., J.M. McCaffery, R.G.S. Spencer, C.A. Francomano, Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants, *J. Anat.*, 205, 229-237 (2004)