

CONTRIBUȚII PRIVIND ALGORITMI ȘI PROGRAMELE DE MODELARE ȘI SIMULARE A EVOLUȚIEI SISTEMELOR MULTICELULARE ÎN INGINERIA TISULARĂ

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul CALCULATOARE ȘI TEHNOLOGIA
INFORMAȚIEI
de către

Ing. Andreea - Paula ROBU

Conducători științifici: prof.univ.dr.ing Lăcrămioara STOICU-TIVADAR
prof.univ.dr.fiz. Adrian NEAGU
Referenți științifici: prof.univ.dr.ing. Mircea PETRESCU
prof.univ.dr. Viorel NEGRU
prof.univ.dr.ing. Vladimir CREȚU

Ziua susținerii tezei: 7.06.2013

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2012

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Am elaborat prezenta teză de doctorat în timpul activității desfășurate în cadrul Departamentului de Automatică și Informatică Aplicată al Universității "Politehnica" din Timișoara.

Mulțumesc frumos conducătorilor mei de doctorat -prof.dr.ing. Lăcrămioara Stoicu-Tivadar de la Universitatea "Politehnica" din Timișoara și prof.dr.fiz. Adrian Neagu de la Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" din Timișoara pentru că mi-au stat la dispoziție ori de câte ori le-am cerut întrevederi, împărtășindu-mi cu generozitate din cunoașterea și competența excepționale ale domniilor lor și direcționându-mi munca înspre acest punct terminus pentru o etapă din devenirea mea și, inevitabil, punct de început pentru o nouă etapă.

Mulțumesc, de asemenea, șefului meu direct pe linie de serviciu, d-lui prof.dr. ing. Ioan Filip, pentru că m-a înțeles atunci când a trebuit să mă concentrez mai mult asupra doctoratului și, inevitabil, să acord timp mai puțin altor lucruri și m-a încurajat mereu și ajutat cu sfaturile sale.

Mulțumesc, în egală măsură, membrilor comisiilor de susținere a examenelor și referatelor din programul de doctoratură și membrilor Comisiei de Îndrumare, respectiv membrilor Comisiei de Analiză și Susținere Publică a Tezei.

Nu în ultimul rând, mulțumesc familiei mele pentru tot sprijinul și toate încurajările acordate și Universității "Politehnica" din Timișoara care m-a format ca specialist și apoi mi-a oferit cadrul de a mă perfecționa prin doctorat.

Robu, Andreea-Paula

Contribuții privind algoritmi și programe de modelare și simulare a evoluției sistemelor multicelulare în ingineria tisulară

Teze de doctorat ale UPT, Seria 14, Nr. 6, Editura Politehnica, 2012, 269 pagini, 172 figuri, 17 tabele.

ISSN: xxxx-xxxx

ISSN-L:xxxx-xxxx

ISBN:xxx-xxx-xxx-xxx-x

Cuvinte cheie:

inginerie tisulară, sisteme biologice, algoritmi, modelare, simulare, Metropolis Monte Carlo, aplicație informatică

Rezumat:

Teza este organizată pe 8 capitole, astfel: În Capitolul 1, se prezintă actualitatea temei abordate și structura tezei. În Capitolul 2, se prezintă conceptele specifice domeniului ingineriei tisulare și se realizează o analiză complexă a modelelor computaționale ale morfogenezei in vitro. Capitolul 3 are ca obiect modelarea computațională a unor sisteme biologice utilizate în experimentele de laborator, respectiv conceperea și dezvoltarea unor algoritmi de simulare a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale, având la bază metoda Metropolis Monte Carlo. În Capitolul 4, se prezintă aplicația informatică originală SIMMMC, dezvoltată de autoare pentru modelarea și studiul evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale. În Capitolul 5 se studiază cu ajutorul SIMMMC evoluția unor agregate celulare pe suprafața unor plăci de biomaterial și se validează aplicația și algoritmi propuși, prin compararea rezultatelor obținute cu rezultatele experimentale. În Capitolul 6, se studiază cu ajutorul SIMMMC însămânțarea celulelor în biomatrici cu pori sferici, respectiv cu pori cubici, determinându-se condițiile energetice și geometrice care conduc la o însămânțare uniformă. În Capitolul 7, se simulează cu ajutorul SIMMMC însămânțarea celulară în biomatrici, luând în calcul, pe lângă adeziunea celulelor la substrat, și fenomenul de chemotaxie. Capitolul 8 prezintă contribuțiile originale aduse în această teză.

CUPRINS

LISTA FIGURILOR	7
LISTA TABELELOR.....	14
1. INTRODUCERE.....	15
2. ASPECTE GENERALE PRIVIND INGINERIA TISULARĂ ȘI STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR COMPUTAȚIONALE ÎN DOMENIU	19
2.1. Aspecte generale în ingineria tisulară.....	19
2.2. Istoria ingineriei tisulare	21
2.3. Elementele fundamentale din ingineria tisulară	22
2.4. Tehnologii utilizate în dezvoltarea de noi țesuturi in vitro	27
2.5. Modele computaționale ale auto-organizării celulelor în țesuturi	28
2.5.1. Mecanismele auto-organizării celulare	28
2.5.2. Modele computaționale de rezoluție celulară.....	31
2.5.3. Modele computaționale de rezoluție subcelulară	38
2.5.4. Experimente utilizate pentru validarea modelelor computaționale	44
2.6. Concluzii	48
3. MODELE COMPUTAȚIONALE ȘI ALGORITMI ÎN STUDIUL EVOLUȚIEI SISTEMELOR MULTICELULARE ÎN VECINĂTATEA UNOR BIOMATERIALE.....	51
3.1. Modelarea computațională a elementelor sistemelor biologice.....	51
3.1.1. Modelarea computațională a unei suspensii celulare.....	51
3.1.2. Modelarea computațională a unui agregat celular aflat în mediu de cultură	54
3.1.3. Modelarea computațională a unei plăci de biomaterial.....	56
3.1.4. Modelarea computațională a unei biomatrici de structură poroasă cu pori cubici.....	57
3.1.5. Modelarea computațională a unei biomatrici de structură poroasă cu pori sferici interconectați.....	59
3.1.6. Modelarea computațională a unor structuri tisulare artificiale	62
3.2. Algoritmi pentru studiul evoluției sistemelor multicelulare	65
3.2.1. Algoritmi bazați pe adeziune	67
3.2.2. Algoritmi bazați pe adeziune și chemotaxie	78
3.2.3. Algoritmi dedicați MATLAB pentru analiza rezultatelor simulărilor.....	84
3.3. Concluzii	98
4. APLICAȚIA INFORMATICĂ SIMMMC DE MODELARE ȘI SIMULARE A EVOLUȚIEI SISTEMELOR MULTICELULARE ÎN VECINĂTATEA UNOR BIOMATERIALE.....	101
4.1. Funcționalitățile aplicației informatice	101
4.2. Arhitectura aplicației informatice	102
4.3. Diagrame de activitate UML asociate modulelor principale ale aplicației informatice.....	108
4.4. Considerații privind implementarea aplicației informatice	112
4.5. Interfața cu utilizatorul	119
4.6. Concluzii	126
5. STUDIUL COMPUTAȚIONAL AL EVOLUȚIEI SISTEMELOR MULTICELULARE PE SUPRAFAȚA UNOR BIOMATERIALE.....	129
5.1. Studiul împrăștierei unui agregat celular pe suprafața plană a unui biomaterial.....	129

5.1.1. Introducere	129
5.1.2. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat	130
5.1.3. Simularea împrăștierei unui agregat celular pe suprafața plană a unui biomaterial	130
5.2. Studiul organizării a două populații diferite de celule în cadrul structurilor tisulare	168
5.2.1. Introducere	168
5.2.2. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat	170
5.2.3. Simularea organizării a două populații diferite de celule în cadrul structurilor tisulare	171
5.3. Concluzii	189
6. STUDIUL COMPUTAȚIONAL AL ÎNSĂMÂNȚĂRII CELULARE A BIOMATRICILOR DE STRUCTURĂ POROASĂ	194
6.1. Introducere.....	194
6.2. Studiul însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori sferici interconectați	195
6.2.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat	195
6.2.2. Simularea însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori sferici interconectați.....	196
6.3. Studiul însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori cubici	205
6.3.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat	205
6.3.2. Simularea însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori cubici.....	205
6.4. Studiul însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice cu pori sferici interconectați	215
6.4.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat	215
6.4.2. Simularea însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice cu pori sferici interconectați.....	216
6.5. Concluzii	224
7. STUDIUL COMPUTAȚIONAL AL INTERACȚIUNII DINTRE ADEZIUNE ȘI CHEMOTAXIE ÎN PROCESUL DE ÎNSĂMÂNȚARE A BIOMATRICILOR POROASE DIN INGINERIA TISULARĂ CARE AU ÎNCORPORATĂ O SUBSTANȚĂ CHEMOATTRACTANTĂ	230
7.1. Introducere.....	230
7.2. Studiul însămânțării unor biomatrice poroase care au încorporată o substanță chemoatractantă dispusă sub forma unui gradient	231
7.2.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat	231
7.2.2. Simularea însămânțării unor biomatrice poroase care au încorporată o substanță chemoatractantă dispusă sub forma unui gradient	232
7.3. Concluzii	243
8. CONCLUZII	246
BIBLIOGRAFIE.....	259
A1. LISTA DE LUCRĂRI PUBLIFICATE ÎN DOMENIUL TEZEI.....	266
A2. LISTA DE LUCRĂRI PUBLIFICATE (EXCEPTÂND CELE DIN DOMENIUL TEZEI)....	268
A3. LISTA GRANTURILOR / CONTRACTELOR DE CERCETARE - DEZVOLTARE - INOVARE	269

LISTA FIGURILOR

Fig. 2.1.	Ingineria tisulară.....	19
Fig. 2.2.	Ilustrare schematică a tipurilor de receptori membranari implicați în procesul de organizare tisulară.....	29
Fig. 2.3.	Reprezentarea pe rețea a țesutului regenerat în biomatrice.....	32
Fig. 2.4.	Reprezentari grafice ale modelului Metropolis Monte Carlo (MMC).....	33
Fig. 2.5.	Experimente și simulări ale fuziunii sferoidelor vasculare.....	35
Fig. 2.6.	(a) O schemă bidimensională care arată două modele celulare de formă elipsoidală adiacente și modul în care este calculată distanța d dintre suprafețele lor. (b) Forța netă de interacțiune dintre o pereche de celule, reprezentată în funcție de distanță d	37
Fig. 2.7.	(a) Un exemplu bidimensional al unui sistem multicelular reprezentat de modelul GGH. (b) Un nod S , se consideră că interacționează cu vecini de până la ordinul 4.....	40
Fig. 2.8.	O pereche de celule care interacționează, așa cum sunt descrise de ScEM.....	43
Fig. 2.9.	Împrăștierea unui agregat pe un substrat solid.....	46
Fig. 2.10.	O imagine a fuziunii a două agregate identice formate fiecare din 10^4 celule umane musculare netede.....	48
Fig. 3.1.	Schema bloc a procesului de modelare a unei suspensii de celule.....	51
Fig. 3.2.	Modelul computațional 3D asociat unei suspensii celulare formate dintr-un singur tip de celule.....	52
Fig. 3.3.	Schema bloc a procesului de modelare a unui agregat celular.....	54
Fig. 3.4.	Modelul computațional 3D asociat unui agregat celular de rază $r_{agregat}=15$ unități, format (A) dintr-un singur tip de celule, (B) din două tipuri de celule... 54	54
Fig. 3.5.	Schema bloc a procesului de modelare a unei plăci paralelipipedice de biomaterial.....	56
Fig. 3.6.	Modelul computațional 3D asociat unei plăci paralelipipedice de biomaterial	56
Fig. 3.7.	Schema bloc a procesului de modelare a unei biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi.....	58
Fig. 3.8.	Modele computaționale 3D asociate unor biomatrici poroase cu porii cuburi de arhitectură controlată: (A) $L=5$; (B) $L=10$; (C) $L=15$	58
Fig. 3.9.	Schema bloc a procesului de modelare a unei biomatrici de structură poroasă cu porii sfere.....	60
Fig. 3.10.	Modele computaționale 3D asociate unor biomatrici poroase cu porii sfere de arhitectură controlată: (A) $R_{por}=3, R_{orif}=1$; (B) $R_{por}=4, R_{orif}=1$; (C) $R_{por}=4, R_{orif}=2$; (D) $R_{por}=5, R_{orif}=1$; (E) $R_{por}=5, R_{orif}=2$; (F) $R_{por}=8, R_{orif}=2$	60
Fig. 3.11.	Structura de bază a sistemului biologic modelat în spațiu tridimensional: un sistem multicelular aflat în vecinătatea unei biomatrici / plăci de biomaterial....	63
Fig. 3.12.	Exemplu de fișier de tipul xyz în care e salvată configurația inițială a sistemului.....	64
Fig. 3.13.	A. Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă; B. Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-un agregat celular situat pe suprafața plană a unui biomaterial de formă paralelipedică.....	65
Fig. 3.14.	Structura de bază a sistemului biologic modelat în spațiul tridimensional: un sistem multicelular aflat în vecinătatea unei biomatrici care are încorporată o substanță chemoattractantă.....	79
Fig. 3.15.	Exemplu de fișier de tipul xyz în care e salvată configurația sistemului după rularea a 10 000 de MCS.....	85
Fig. 3.16.	Exemplu de fișier în care este memorat numărul de celule atașate la substrat la rularea a diferiți MCS	86
Fig. 3.17.	Exemplu de fișier în care sunt memorate valorile energiilor de interacțiune celulă - celulă, respectiv celulă - substrat, valorile tensiunilor interfaciale celulă - mediu, respectiv celulă - substrat și parametrii aferenți vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat.....	88
Fig. 3.18.	Exemplu de fișier în care se memorează valoarea medie a numărului de celule	

	atașate pe substrat pentru un set de 10 simulări și deviația standard a valorii medii.....	90
Fig. 3.19.	Exemplu de fișier în care se memorează numărul de MCS rulați, numărul de legături dintre celulele de tip <i>C1</i> și <i>C2</i> , numărul de legături dintre celulele de tip <i>C1</i> și substratul <i>S</i> și numărul de legături dintre celulele de tip <i>C2</i> și substratul <i>S</i>	91
Fig. 3.20.	Exemplu de fișier în care este memorată fracțiunea de celule din suspensie la rularea a diferiți MCS.....	93
Fig. 3.21.	Exemplu de fișier în care se memorează coordonatele <i>x,y,z</i> ale centrului de masă al celulelor pătrunse în biomatrice la rularea a diferiți MCS.....	95
Fig. 3.22.	Exemplu de fișier în care se memorează valorile constantelor <i>K1</i> și <i>K2</i> aferente simulării curente și energia de adeziune a sistemului la fiecare rulare a unui pas Monte Carlo.....	97
Fig. 3.23.	Exemplu de fișier în care fiecare linie conține valoarea comună a constantelor <i>K1</i> și <i>K2</i> și energia de adeziune medie a sistemului obținută pentru ultimii 1000 MCS rulați ai fiecărei simulări.....	98
Fig. 4.1.	Arhitectura aplicației informatice SIMMMC.....	104
Fig. 4.2.	Diagrama de activitate UML aferentă modulului de generare a modelelor computaționale asociate sistemelor biologice.....	109
Fig. 4.3.	Diagrama de activitate UML aferentă modulului de simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare.....	110
Fig. 4.4.	Diagrama de activitate UML aferentă modulului de implementare a algoritmului Metropolis Monte Carlo.....	111
Fig. 4.5.	Fereastra principală a aplicației SIMMMC.....	120
Fig. 4.6.	Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice cu porii sfere.....	121
Fig. 4.7.	Fereastra pentru introducerea parametrilor de chemoattractant.....	122
Fig. 4.8.	Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice cu porii cuburi.....	122
Fig. 4.9.	Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-un agregat celular aflat în vecinătatea unei biomatrice cu porii sfere.....	123
Fig. 4.10.	Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-un agregat celular situat pe suprafața plană a unei plăci de biomaterial.....	124
Fig. 4.11.	Fereastra pentru introducerea parametrilor de simulare a evoluției sistemului multicelular.....	125
Fig. 4.12.	Fereastra de afișare a duratei simulării Metropolis Monte Carlo.....	125
Fig. 5.1.	Modelul computațional asociat sistemului biologic studiat: un agregat celular situat pe suprafața unei plăci de biomaterial.....	130
Fig. 5.2.	A, B – Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 1).....	132
Fig. 5.3.	A, B – Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 2).....	133
Fig. 5.4.	A, B – Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 3).....	133
Fig. 5.5.	A, B – Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 4).....	133
Fig. 5.6.	A, B – Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 5).....	134
Fig. 5.7.	Evoluția treptată a agregatului celular pe suprafața biomaterialului: A – Configurația inițială a sistemului; B – Configurația obținută după rularea a 10 000 MCS; C – Configurația obținută după rularea a 30 000 MCS; D – Configurația obținută după rularea a 50 000 MCS; E – Configurația obținută după rularea a 70 000 MCS; F – Configurația obținută după rularea a 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 5).....	134
Fig. 5.8.	Evoluția coordonatei <i>z</i> a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați	135
Fig. 5.9.	Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat	

	sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați	136
Fig. 5.10.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat	137
Fig. 5.11.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celulă.....	138
Fig. 5.12.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 1).....	139
Fig. 5.13.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 2)	139
Fig. 5.14.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 3)	139
Fig. 5.15.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 4).....	140
Fig. 5.16.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 5).....	140
Fig. 5.17.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.....	141
Fig. 5.18.	Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.....	142
Fig. 5.19.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.....	142
Fig. 5.20.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celulă.....	143
Fig. 5.21.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 1).....	144
Fig. 5.22.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 2).....	144
Fig. 5.23.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 3).....	145
Fig. 5.24.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 4).....	145
Fig. 5.25.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 5).....	145
Fig. 5.26.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.....	146
Fig. 5.27.	Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.....	146
Fig. 5.28.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.....	147
Fig. 5.29.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celulă.....	147
Fig. 5.30.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 1).....	148
Fig. 5.31.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 2).....	148
Fig. 5.32.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 3).....	149
Fig. 5.33.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 4).....	149
Fig. 5.34.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 5).....	149
Fig. 5.35.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.....	150
Fig. 5.36.	Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.....	150
Fig. 5.37.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.....	151
Fig. 5.38.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de	

	raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celulă.....	151
Fig. 5.39.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 1).....	152
Fig. 5.40.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 2).....	152
Fig. 5.41.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 3).....	153
Fig. 5.42.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 4).....	153
Fig. 5.43.	A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 5).....	153
Fig. 5.44.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați. Parametrii de intrare ai simulărilor sunt: $\gamma_{cs} = -0.4$; $\gamma_{cm} = 0.5; 0.55; 0.6; 0.65; 0.7; 0.75; 0.8; 0.85; 0.9; 0.95; 1$	154
Fig. 5.45.	Analiza cantitativă a atașării a 4 linii celulare de diferite coezivități (LN29 – coezivitate aproape nulă, LN2 - coezivitate mică, LN5 - coezivitate medie, LR1 - coezivitate mare), pe substraturi polimerice de diferite adezivități (conținând de la 0% la 5% PEG).....	156
Fig. 5.46.	Împrăștierea a două suspensii de celule, formate din două linii celulare de coezivități diferite: LN5 (a-d), respectiv LR1 (e-h), pe un substrat polimeric având încorporate concentrații diferite de PEG(0-5%).....	157
Fig. 5.47.	Matricea rezultatelor arătând influența adeziunii celulă - substrat, respectiv a coeziunii celulă - celulă asupra împrăstierii unor agregate celulare de diferite coezivități pe un substrat cu diferite concentrații de PEG.....	159
Fig. 5.48.	Matricea rezultatelor simulărilor care arată influența coeziunii celulă - celulă și a adeziunii celulă – substrat asupra împrăstierii (A,B,C –Tabelul 5.6, rândul 1; D,E,F – Tabelul 5.6, rândul 2; G,H,I – Tabelul 5.6, rândul 3).....	160
Fig. 5.49.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de energia de adeziune celulă – substrat.....	161
Fig. 5.50.	Viteza de împrăștiere a unor agregate celulare de diferite coezivități (LR1, LN5, LN2, cu LR1>LN5>LN2) pe suprafața a 5 substraturi de diferite adezivități ca și funcție de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă – celulă.....	162
Fig. 5.51.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului ca funcție de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă – celulă.....	163
Fig. 5.52.	Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8 rândul 1.....	164
Fig. 5.53.	Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8 rândul 4.....	165
Fig. 5.54.	Valoarea medie și deviația standard a numărului de celule atașate la substrat pentru parametrii prezentați în Tabelul 5.8, rândul 4.....	165
Fig. 5.55.	Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8, rândul 6.....	166
Fig. 5.56.	Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8, rândul 8.....	166
Fig. 5.57.	Viteza de împrăștiere a celulelor în funcție de raportul dintre adeziune și coeziune pentru valorile parametrilor de intrare prezentate în Tabelul 5.8.....	167
Fig. 5.58.	Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului ca funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.....	168
Fig. 5.59.	Diferite moduri de organizare a două populații de celule (epiteliale și hepatice) pe o suprafață plană de biomaterial acoperită de diferite niveluri de collagen de tipul 1.....	170
Fig. 5.60.	A. Modelul computațional asociat sistemului biologic studiat: un agregat multicelular, format din două tipuri de celule, aflat pe suprafața unui biomaterial de structură paralelipipedică B. Secțiune verticală în agregatul celular din Fig. 5.60A.....	171
Fig. 5.61.	A. Configurația sistemului după rularea a 100 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 1; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.61A.....	174

Fig. 5.62.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set I de simulări.....	175
Fig. 5.63.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set I de simulări....	176
Fig. 5.64.	A. Configurația sistemului după rularea a 100 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 2; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.64A.....	177
Fig. 5.65.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set II de simulări.....	177
Fig. 5.66.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set II de simulări.....	178
Fig. 5.67.	A. Configurația sistemului după rularea a 30 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 3; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.67A.....	178
Fig. 5.68.	Sortarea celulelor care exprimă același tip de caderine.....	180
Fig. 5.69.	Relaxarea de formă a agregatelor hydra 2D , formate din proporții egale de celule endodermale (cele de culoare închisă, având o coezivitate mai mare) și celule ectodermale (cele de culoare deschisă, având o coezivitate mai mică) după (a) 0h (b) 1h și (c) 6h.....	180
Fig. 5.70.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați– set III de simulări.....	181
Fig. 5.71.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set III de simulări.....	181
Fig. 5.72.	A. Configurația sistemului după rularea a 200 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 4; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.72A.....	182
Fig. 5.73.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set IV de simulări.....	183
Fig. 5.74.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set IV de simulări.....	183
Fig. 5.75.	A. Configurația sistemului după rularea a 100 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 5; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.75A.....	184
Fig. 5.76.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set V de simulări.....	184
Fig. 5.77.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set V de simulări....	185
Fig. 5.78.	Ilustrarea modului în care intensitatea coeziunii dintre moleculele de același tip ale unui lichid (Wa-a and Wb-b) și intensitatea adeziunii dintre molecule de diferite tipuri (Wa-b) determină configurația cea mai stabilă a unui lichid.....	186
Fig. 5.79.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS – $\mathcal{E}_{c_1c_1} = 1.2$, $\mathcal{E}_{c_2c_2} = 0.8$, $\mathcal{E}_{c_1c_2} = 1.2$, $\mathcal{E}_{c_1s} = 1.8$, $\mathcal{E}_{c_2s} = 1.4$	187
Fig. 5.80.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS – $\mathcal{E}_{c_1c_1} = 1.2$, $\mathcal{E}_{c_2c_2} = 0.8$, $\mathcal{E}_{c_1c_2} = 1$, $\mathcal{E}_{c_1s} = 1.8$, $\mathcal{E}_{c_2s} = 1.4$	188
Fig. 5.81.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS – $\mathcal{E}_{c_1c_1} = 1.2$, $\mathcal{E}_{c_2c_2} = 0.8$, $\mathcal{E}_{c_1c_2} = 0.6$, $\mathcal{E}_{c_1s} = 1.8$, $\mathcal{E}_{c_2s} = 1.4$	188
Fig. 5.82.	Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS – $\mathcal{E}_{c_1c_1} = 1.2$, $\mathcal{E}_{c_2c_2} = 0.8$, $\mathcal{E}_{c_1c_2} = 0$, $\mathcal{E}_{c_1s} = 1.8$, $\mathcal{E}_{c_2s} = 1.4$	189
Fig. 6.1.	Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice cu porii sferici ($R=8$; $r=2$).....	195
Fig. 6.2.	A. Configurația inițială a sistemului; B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 1); C. Configurația din Fig. 6.2B, cu biomatricea ștersă pentru a se evidenția mai bine însămânțarea celulelor.....	197
Fig. 6.3.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 1.....	198

Fig. 6.4.	Evoluția fracțiunii de celule din suspensie, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 1.....	198
Fig. 6.5.	A. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 2 - $\mathcal{E}_{cc} = 0.8$; $\mathcal{E}_{cs} = 0.6$) B. Configurația din Fig. 6.5A, cu biomatricea ștersă pentru a se evidenția mai bine însămânțarea celulelor	199
Fig. 6.6.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 2.....	200
Fig. 6.7.	Evoluția fracțiunii de celule din suspensie, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 2.....	200
Fig. 6.8.	Configurațiile obținute după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 3) A. $R=8, r=2$; B. $R=8, r=3$; C. $R=8, r=4$; D. $R=8, r=5$	201
Fig. 6.9.	Evoluția coordonatei z a centrului de masa al celulelor, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 3.....	202
Fig. 6.10.	Evoluția fracțiunii de celule din suspensie, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 3.....	203
Fig. 6.11.	A. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 4); B. Configurația din Fig. 6.11A, cu biomatricea ștersă pentru a se evidenția mai bine însămânțarea celulelor.....	203
Fig. 6.12.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 4.....	204
Fig. 6.13.	Evoluția fracțiunii de celule din suspensie, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 4.....	204
Fig. 6.14.	A. Configurația inițială a sistemului ($L=5$); B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 1); C. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 3); D. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 4).....	207
Fig. 6.15.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=5$).....	208
Fig. 6.16.	Evoluția fracțiunii de celule în suspensie în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=5$).....	209
Fig. 6.17.	A. Configurația inițială a sistemului ($L=10$); B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 1); C. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 3); D. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 4).....	210
Fig. 6.18.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=10$).....	211
Fig. 6.19.	Evoluția fracțiunii de celule în suspensie în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=10$).....	212
Fig. 6.20.	A. Configurația inițială a sistemului ($L=15$); B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 1); C. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 3); D. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 4).....	213
Fig. 6.21.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=15$).....	214
Fig. 6.22.	Evoluția fracțiunii de celule în suspensie în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=15$).....	215
Fig. 6.23.	Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-un agregat celular ($R_{agregat}=10$) aflat în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă (porii sferici: $R=5$; $r=2$).....	216
Fig. 6.25.	Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1 - $\mathcal{E}_{cc} = 1$; $\mathcal{E}_{cs} = 1$).....	218
Fig. 6.26.	Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1 - $\mathcal{E}_{cc} = 1$;	

	$\mathcal{E}_{cs} = 1.2$).....	218
Fig. 6.27.	Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C.200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1 - $\mathcal{E}_{cc} = 1$; $\mathcal{E}_{cs} = 1.4$).....	218
Fig. 6.28.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1.....	219
Fig. 6.29.	Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricii în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1.....	220
Fig. 6.30.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 2.....	220
Fig. 6.31.	Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricii în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 2.....	221
Fig. 6.32.	Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 3 - $R=8$; $r=2$).....	222
Fig. 6.33.	Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 3 - $R=8$; $r=3$).....	222
Fig. 6.34.	Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 3 - $R=8$; $r=4$).....	222
Fig. 6.35.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândurile 3,4.....	223
Fig. 6.36.	Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricii în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândurile 3,4.....	224
Fig. 7.1.	A. Model sistem biologic: un agregat celular ($D = 20$) situat pe suprafața unei biomatricii cu pori sferici ($R=5$, $r=2$); B. Model sistem biologic: o suspensie celulară aflată în vecinătatea unei biomatricii cu porii sfere ($R=5$, $r=2$).....	232
Fig. 7.2.	Rezultatele însămânțării celulare obținute după rularea a 400 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 7.1).....	236
Fig. 7.3.	Configurațiile obținute după rularea a 100 000 MCS (A, E, I, M): A. $K1=K2=0$; E. $K1=K2=400$; I. $K1=K2=700$; M. $K1=K2=1000$. Configurațiile obținute după rularea a 300 000 MCS (B, F, J, N): B. $K1=K2=0$; F. $K1=K2=400$; J. $K1=K2=700$; N. $K1=K2=1000$. Configurațiile obținute după rularea a 400 000 MCS (C, G, K, O): C. $K1=K2=0$; G. $K1=K2=400$; K. $K1=K2=700$; O. $K1=K2=1000$. Configurațiile obținute după rularea a 500 000 MCS (D, H, L, P): D. $K1=K2=0$; H. $K1=K2=400$; L. $K1=K2=700$; P. $K1=K2=1000$	237
Fig. 7.4.	Evoluția coordonatei z a centrului de masa al celulelor din biomatrice pentru diferite valori ale lui $K1, K2$	238
Fig. 7.5.	Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricii pentru diferite valori ale lui $K1, K2$	239
Fig. 7.6.	Energia medie obținută pentru ultimii 1000 de MCS rulați, la diverse valori ale lui $K1, K2$	239
Fig. 7.7.	Rezultatele însămânțării celulare obținute după rularea a 10 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 7.2).....	241
Fig. 7.8.	Configurațiile obținute după rularea a 10 000 MCS (A, D, G, J): A. $K1=K2=0$; D. $K1=K2=500$; G. $K1=K2=1000$; J. $K1=K2=1500$. Configurațiile obținute după rularea a 30 000 MCS (B, E, H, K): B. $K1=K2=0$; E. $K1=K2=500$; H. $K1=K2=1000$; K. $K1=K2=1500$. Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS (C, F, I, L): C. $K1=K2=0$; F. $K1=K2=500$; I. $K1=K2=1000$; L. $K1=K2=1500$	242
Fig. 7.9.	Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din biomatrice pentru diferite valori ale lui $K1, K2$	243

LISTA TABELELOR

Tabel 2.1. Câteva aplicații ale ingineriei tisulare și medicinei regenerative.....	22
Tabel 2.2. Caracteristici ale celulelor care provin de la organisme diferite.....	24
Tabel 2.3. Caracteristici ale celulelor rezultate din diferite stadii ale dezvoltării.....	25
Tabel 5.1. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului I de simulări ale împrăștierei celulare.....	132
Tabel 5.2. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului II de simulări ale împrăștierei celulare.....	138
Tabel 5.3. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului III de simulări ale împrăștierei celulare.....	144
Tabel 5.4. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului IV de simulări ale împrăștierei celulare.....	148
Tabel 5.5. Valorile parametrilor de intrare ai setului V de simulări ale împrăștierei celulare.....	152
Tabel 5.6. Valorile parametrilor de intrare ai simulărilor ce reproduc matricea lui Ryan.....	159
Tabel 5.7. Valorile parametrilor de intrare ai simulărilor împrăștierei unui agregat celular de diferite coezivități.....	162
Tabel 5.8. Valorile parametrilor de intrare ai simulărilor împrăștierei unui agregat celular de coezivitate egală cu 1.....	164
Tabel 5.9. Valorile parametrilor de intrare în simulările organizării a două populații de celule pe suprafața unui biomaterial.....	173
Tabel 6.1. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire în simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice cu pori sferici.....	197
Tabel 6.2. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice cu pori cubici.....	206
Tabel 6.3. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice cu pori sferici.....	217
Tabel 7.1. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice poroasă care are încorporată o substanță chemoattractantă.....	235
Tabel 7.2. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice poroasă care are încorporată o substanță chemoattractantă.....	240

1. INTRODUCERE

Prezenta teză de doctorat se înscrie într-un domeniu nou, prin excelență interdisciplinar –domeniul ingineriei tisulare-, în care interferă ingineria informatică, ingineria materialelor, ingineria chimică, matematica aplicată, biofizica, biologia și medicina.

Ingineria tisulară își propune realizarea unor structuri multicelulare implantabile care să substituie sau să regenereze țesuturile lezate din organismul uman. Aceasta reprezintă un domeniu promițător pentru reconstrucția organelor sau țesuturilor nefuncționale, substitutelor tisulare nou create având capacitatea de a evita complicațiile care apar în cazul transplantelor tradiționale.

Succesul metodelor teoretice curente folosite pentru a descrie rearanjările populațiilor de celule atât *in vivo* cât și *in vitro* au motivat tentativele recente de modelare a fenomenelor de interes în ingineria tisulară. Metodele computaționale sunt apreciate ca instrumente de dezvoltare ale ingineriei tisulare care permit testarea unor ipoteze de lucru și optimizarea unor proceduri experimentale de laborator, reducând astfel costurile elaborării unor noi tehnologii de realizare a substitutelor tisulare.

Complexitatea morfogenezei face din abordările computaționale instrumente indispensabile în stabilirea unei ierarhii a mecanismelor implicate într-un comportament specific al țesutului. Simulările bazate pe programe cu un singur mecanism implementat pun în evidență mecanismul dominant. Ulterior, mecanisme suplimentare pot fi incluse unul câte unul până se atinge cea mai bună potrivire dintre rezultatele *in silico* și rezultatele experimentale. Pentru a valida un model computațional, este nevoie de estimarea parametrilor modelului, astfel încât să se obțină o bună armonizare cu rezultatele experimentale. Odată validate, modelele computaționale devin predictive.

Modelele computaționale existente și-au dovedit eficiența în caracterizarea proceselor observate în embriologie, concentrându-se asupra unui număr mic de celule supuse unei mari varietăți de factori cum ar fi ciclul celular, modificările formei celulelor și influența unor substanțe chimice prezente în mediul acestora. În contextul aplicațiilor de inginerie tisulară însă, este necesară simularea evoluției unui număr mare de celule (de ordinul $10^5 - 10^7$) pentru a studia auto-organizarea lor în structuri tisulare artificiale. Programele existente sunt limitate în ceea ce privește dimensiunea sistemului multicelular pe care îl pot caracteriza.

Scopul acestei teze a fost crearea unor posibilități de modelare computațională a unor structuri tisulare artificiale utilizate în experimentele de laborator și simulare a evoluției acestora, în vederea optimizării unor proceduri de inginerie tisulară. În acest sens, a fost necesară conceperea unor algoritmi adaptați necesităților ingineriei tisulare, luând în considerare un număr mare de celule care se auto-organizează sub acțiunea unui număr mic de factori dominanți, cum ar fi interacțiunile dintre celule, respectiv dintre celule și materialele biocompatibile utilizate drept suport pentru cultura celulară. Algoritmii dezvoltați, având la bază metoda Metropolis Monte Carlo, se concentrează pe interacțiunile dintre diferite tipuri celulare și nu pe urmărirea schimbărilor de formă ale celulelor sau pe monitorizarea poziției celulelor individuale.

În vastul areal al ingineriei tisulare, această teză se focalizează pe aspecte încadrabile în domeniul de doctorantură -Calculatoare și Tehnologia Informației-, și anume: (i) pe modelarea elementelor ce intervin în dezvoltarea controlată a substitutilor tisulare, a sistemelor formate din respectivele elemente și a procesului de dezvoltare tisulară controlată însuși, (ii) pe algoritimizarea acestei modelări, (iii) pe dezvoltarea unei aplicații informatice de realizare a modelării și de simulare a procesului de dezvoltare tisulară controlată și (iv) pe validarea acestei aplicații informatice și implicit a modelelor și algoritmilor pe care le / îi înglobează.

Lucrarea se întinde pe 272 de pagini, structurate pe 8 capitole, care cuprind un total de 172 figuri, 17 tabele și 29 relații matematice. Bibliografia consultată pe parcursul cercetării conexe doctoranturii referită în cadrul tezei cuprinde 116 titluri, dintre care 12 o au ca autor sau coautor pe autoarea tezei de doctorat.

Capitolul 1 al tezei este reprezentat de prezenta **Introducere**.

Capitolul 2 al tezei este intitulat "**Aspecte generale privind ingineria tisulară și stadiul actual al cercetărilor computaționale în domeniu**". În cadrul său, s-a realizat o sinteză amplă, **originală**, folosind 96 de surse bibliografice, a celor mai importante aspecte legate de domeniul ingineriei tisulare, evidențiindu-se stadiul actual al cercetărilor computaționale și aplicabilitatea acestora în optimizarea procedurilor de laborator din ingineria tisulară. Au fost prezentate conceptele specifice domeniului ingineriei tisulare, tehnologiile utilizate în dezvoltarea de noi țesuturi *in vitro*, mecanismele auto-organizării celulare și, cel mai important, a fost realizată o analiză complexă a modelelor computaționale ale morfogenezei *in vitro*. Au fost expuse mai multe modele de rezoluție celulară și subcelulară, a căror potențial a fost ilustrat prin aplicații specifice. De asemenea, au fost prezentate experimentele de bază utilizate pentru validarea modelelor computaționale.

Capitolul 3 al tezei este intitulat "**Modele computaționale și algoritmi în studiul evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale**". El are ca obiect modelarea computațională a elementelor componente ale unor sisteme biologice: suspensii, agregate celulare, plăci de biomaterial și biomatrice poroase. De asemenea, sunt modelate sistemele biologice în ansamblul lor și sunt concepuți și dezvoltați o serie de algoritmi dedicați simulării evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale. Pe parcursul capitolului, se prezintă în manieră originală bazele biofizice ale algoritmilor dedicați simulării evoluției sistemelor multicelulare având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo, cum se construiesc o serie de modele computaționale de interes în domeniu: modelul unei suspensii celulare, modelul unui agregat celular aflat în mediu de cultură, modelul unei plăci de biomaterial, modelul unei biomatrice de structură poroasă cu pori cubici, respectiv sferici și modelele unor sisteme biologice formate din diverse combinații ale acestora: (i) agregat celular – placă de biomaterial, (ii) suspensie celulară – biomatrice cu pori sferici, (iii) suspensie celulară – biomatrice cu pori cubici, (iv) agregat celular – biomatrice cu pori sferici, respectiv cum se simulează diverse evoluții. Pentru fiecare model, se prezintă: o descriere a modelului, schema bloc a procesului de modelare, cu evidențierea parametrilor de intrare și ieșire, algoritmul de generare a modelului și o vizualizare 3D realizată cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD [1]. Multitudinea de algoritmi dezvoltați în acest capitol -**în majoritatea lor originali**- au fost

prezența detaliat, în limbaj pseudocod, reliefând astfel fluxul logic al operațiilor și oferind un material implementabil în orice limbaj de programare.

Capitolul 4 al tezei este intitulat "**Aplicație informatică SIMMMC de modelare și simulare a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale**". În cadrul său, este prezentată aplicația informatică originală SIMMMC, concepută și realizată de autoare pentru studiul evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor structuri formate din materiale biocompatibile. Scopul aplicației este furnizarea de informații de interes pentru optimizarea tehnicilor de creare a structurilor tisulare *in vitro*. Aplicația are la bază algoritmi originali prezenți în capitolul 3 și este implementată în mediul de dezvoltare Visual Studio.Net 2008, utilizând limbajul de programare Visual Basic.Net. Pe parcursul capitolului, se prezintă: funcționalitățile aplicației, arhitectura aplicației, modulele aplicației, interfața cu utilizatorul a aplicației și considerații privind implementarea aplicației, evidențiindu-se **caracterul original** la fiecare dintre acestea în parte.

Capitolul 5 al tezei este intitulat "**Studiul computațional al evoluției sistemelor multicelulare pe suprafața unor biomateriale**". În cadrul său, se studiază cu ajutorul aplicației informatice originale SIMMMC, împrăștierea unui agregat celular format dintr-un singur tip de celule pe suprafața plană a unui substrat sintetic și organizarea a două populații diferite de celule în cadrul structurilor tisulare, având la bază ipoteza adeziunii diferențiate (DAH) [2].

Procesul de împrăștiere a celulelor pe un substrat sintetic este deosebit de important pentru domeniul ingineriei tisulare, din înțelegerea lui rezultând informații utile pentru crearea de structuri tisulare *in vitro*. De asemenea, organizarea multiplelor populații de celule în structuri tisulare, pornind de la agregate multicelulare, reprezintă una dintre cele mai studiate probleme, la ora actuală, în domeniul ingineriei tisulare și medicinei regenerative. Abilitatea de a înțelege și controla distribuția spațială a mai multor populații de celule de diferite tipuri furnizează abordări raționale aplicațiilor din ingineria tisulară, unde organizarea multicelulară în structuri tridimensionale este dorită.

Studiul acestor procese *in vitro* este pe de o parte costisitor, iar pe de altă parte mare consumator de timp. Pentru a veni în ajutorul studiilor *in vitro* și pentru a minimiza numărul acestora, în acest capitol s-au realizat mai multe studii *in silico* și, printr-o serie de simulări efectuate și analize comparate ale rezultatelor simulărilor cu rezultatele obținute prin studii *in vitro*, **s-au validat părțile implicate din aplicația informatică originală SIMMMC**.

Capitolul 6 al tezei este intitulat "**Studiul computațional al însămânțării celulare a biomatricilor de structură poroasă**". În cadrul său, se studiază cu ajutorul aplicației informatice originale SIMMMC, evoluția unor sisteme multicelulare în vecinătatea unor biomatrice de structură poroasă cu pori sferici, respectiv cu pori cubici. Este urmărită determinarea condițiilor energetice și geometrice optime care conduc la o distribuție uniformă și rapidă a celulelor în biomatrice. Se analizează influența geometriei biomatricii, a energiei de coeziune dintre celule, respectiv a energiei de adeziune dintre celule și biomatrice asupra procesului de însămânțare. Mișcarea celulelor în sistem se simulează considerând că sistemul celular tinde să atingă starea de energie minimă (DAH) [2].

Pe baza configurațiilor obținute, se face o analiză a evoluției coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem, respectiv din biomatrice și a procentajului de celule rămase în suspensie, în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

Centrul de masă al tuturor celulelor din sistem, respectiv al celulelor pătrunse în biomatrice sunt indicatori importanți care ne furnizează informații cu privire la distribuția celulelor în sistem, respectiv în volumul biomatricii. Dependența centrului de masă de numărul de pași Monte Carlo rulați reprezintă, totodată, o măsură a vitezei de însămânțare celulară. Monitorizarea procentajului de celule ce se află în vecinătatea biomatricii în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, reprezintă de asemenea, un indicator al vitezei cu care celulele pătrund în biomatrice.

Analiza însămânțării celulare se face atât cantitativ, oferindu-se tabele de valori și grafice de evoluție, cât și calitativ, prin vizualizări sugestive, realizate cu programul de grafică moleculară VMD [1].

Capitolul 7 al tezei este intitulat "**Studiul computațional al interacțiunii dintre adeziune și chemotaxie în procesul de însămânțare a biomatricilor poroase din ingineria tisulară care au încorporată o substanță chemoattractantă**". În cadrul său, se construiesc cu ajutorul aplicației informatice originale SIMMMC modelele computaționale ale unui agregat celular, respectiv ale unei suspensii de celule, aflate -agregatul și suspensia- în vecinătatea unei biomatrici poroase cu pori sferici care are încorporată o substanță chemoattractantă, reprezentată printr-un gradient de concentrație constant. Pornind de la aceste modele, se simulează, de asemenea cu ajutorul aplicației informatice originale SIMMMC, adaptată fenomenului de chemotaxie, însămânțarea celulară în biomatrici, luând în calcul, pe lângă adeziunea celulelor la substrat, și fenomenul de chemotaxie, care influențează, de asemenea mișcarea celulelor în sistem.

Se consideră că sistemul celular poate fi format din două tipuri de celule diferite. În simulările realizate, se variază tăriile chemotactice, care descriu măsura în care celulele de un anumit tip tind să se deplaseze de-a lungul gradientului substanței chemoattractante, urmărindu-se identificarea influenței chemoattractantului din biomatrice asupra vitezei de însămânțare.

Pe baza configurațiilor obținute, se face o analiză a evoluției coordonatei z a centrului de masă al celulelor din biomatrice și a procentajului de celule rămase în suspensie.

Analiza însămânțării celulare se face atât cantitativ, oferindu-se tabele de valori și grafice de evoluție, cât și calitativ, prin vizualizări sugestive, realizate cu programul de grafică moleculară VMD [1].

Capitolul 8 al tezei este intitulat "**Concluzii**". În cadrul său, se prezintă contribuțiile originale ale autoarei aferente tezei de doctorat, mai întâi într-o sinteză ce le reunește pe cele mai importante, iar apoi într-o trecere în revistă exhaustivă, ce le enumeră pe toate, ordonat pe capitole.

2. ASPECTE GENERALE PRIVIND INGINERIA TISULARĂ ȘI STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRIILOR COMPUTAȚIONALE ÎN DOMENIU

2.1. Aspecte generale în ingineria tisulară

Generarea artificială de țesuturi și organe a fost de-a lungul istoriei omenirii doar un concept tratat la nivel de vis sau de mit. În decursul ultimelor decenii această viziune a devenit fezabilă și a fost recent introdusă în medicina clinică [3].

Comunitatea de cercetare biomedicală a pus accentul pe dezvoltarea unei game complete de strategii care pot fi folosite pentru tratarea țesuturilor și organelor bolnave sau distruse. Aceste strategii au la bază trei termeni fundamentali: înlocuirea, repararea și/sau regenerarea țesuturilor sau organelor (Fig. 2.1) [4].

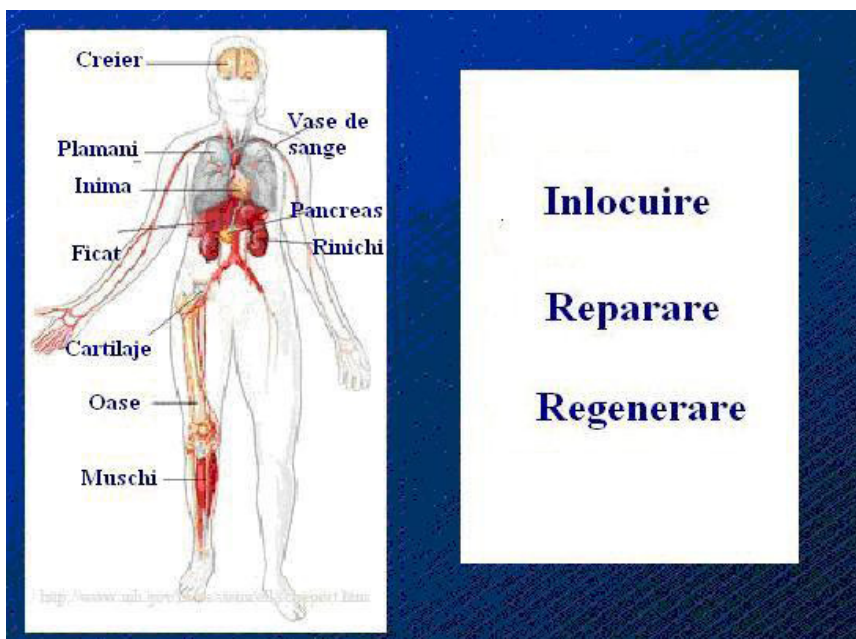


Fig. 2.1. Ingineria tisulară

În unele cazuri, înlocuirea este cea mai potrivită abordare clinică, prin crearea unor substitute biologice tisulare în laborator, care vor fi implantate pentru a înlocui țesutul alterat. În alte situații, cea mai potrivită abordare este repararea unui țesut rănit sau bolnav. Acest proces se referă la o reparare biologică la nivel celular/molecular. În viitor, se urmărește diagnosticarea pacientului la debutul bolii, înainte de apariția simptomelor clinice, astfel încât repararea țesuturilor alterate să se facă la un stadiu incipient al bolii. Regenerarea se referă la refacerea țesuturilor sau organelor. De exemplu, dacă o parte a unui rinichi a fost extirpată, există posibilitatea, cel puțin dacă sunt îndeplinite anumite condiții, ca acesta să se regenereze și să redevină un organ complet funcțional [4].

Ingineria tisulară reprezintă un domeniu științific nou, interdisciplinar (biologie, chimie, fizică și inginerie), bazat pe capacitatea sistemelor vii de a se autoorganiza într-o largă varietate de structuri. Ea se ocupă cu crearea *in vitro* de structuri biologice tisulare implantabile și funcționale, menite să substituie regiuni ale corpului defectuoase, lezate sau afectate de diverse boli [4,5].

Metoda de obținere a structurilor tisulare implică adăugarea unor tipuri de celule specifice (celule stem sau diferențiate) pe un material biocompatibil de forma țesutului ce urmează a fi restaurat și crearea condițiilor propice de dezvoltare tisulară, dacă este necesar inclusiv prin intervenții stimulativă sau inhibitorii. Scheletul acesta dispare treptat, în vreme ce celulele continuă să se dezvolte pentru a contura forma țesutului ce se dorește a fi restaurat. Materialele biocompatibile utilizate drept suport pentru cultura celulară au o structură poroasă și poartă denumirea de scaffold-uri (în limba engleză) sau biomatrici, termen utilizat în comunitatea românească de biomateriale [5,6].

Succesul metodelor teoretice curente folosite pentru a descrie rearanjările populațiilor de celule atât *in vivo* cât și *in vitro* au motivat tentativele recente de modelare a fenomenelor de interes în ingineria tisulară [7].

Pentru a fi eficientă în oferirea de indicii pentru studiile de laborator, ingineria tisulară computațională trebuie să țină cont într-un mod corespunzător de dinamica populațiilor de celule în prezența biomaterialelor și a matricilor extracelulare care, pe de o parte ghidează comportamentul celulelor, iar pe de altă parte sunt subiectul degradării și restructurării celulelor [5].

La ora actuală, s-au raportat numeroase realizări în domeniul ingineriei tisulare, însă, datorită cunoașterii incomplete a mecanismelor fundamentale implicate în morfogeneza tisulară, există și o serie de limitări ale acestora. Un exemplu de limitare constă în aceea că procesul de înmulțire a celulelor stem recoltate de la pacienți în culturi celulare de tip monostrat modifică expresia genetică a celulelor, declanșând, astfel, reacții de respingere din partea organismului. Un alt exemplu de limitare în domeniul ingineriei tisulare constă în sinteza *in vitro* de structuri tridimensionale, care să asigure arhitectura și funcționalitatea țesutului natural și care să se integreze perfect în locul necesar implantării. În ortopedie, osul sau cartilajul artificial creat din celulele stem ale pacientului trebuie să asigure, în plus, și rezistența mecanică similară cu cea a țesutului nativ. Prin implantarea substitutului artificial nou format, se urmărește obținerea unui os/cartilaj funcțional, care să permită refacerea rapidă a pacientului [8].

Ingineria tisulară osoasă are ca scop refacerea osului care a fost pierdut datorită unor cauze cum ar fi: traumatismele, defectele congenitale (defecte înnașcute) sau prin extirparea tumorilor. Ea se bazează pe utilizarea celulelor stem mezenchimale (CSM) din măduva osoasă, reprezentând o tehnică de tratament promițătoare pentru ortopedie [9].

În contextul morfogenezei oaselor și cartilajelor *in vitro*, tehnicile computaționale se angajează să proiecteze biomatrici anatomice 3D și să controleze porozitatea și compoziția chimică a acestora, de-a lungul procesului de fabricație [10,11].

Ca și concluzie, ingineria tisulară reprezintă un domeniu promițător pentru reconstrucția organelor sau țesuturilor alterate sau distruse în totalitate, substituitele tisulare create reducând complicațiile care apar în cazul transplantelor tradiționale [5].

Succesul clinic al ingineriei tisulare depinde de găsirea unei surse de celule corespunzătoare, de optimizarea biomaterialelor sau hidrogelurilor (matrici

extracelulare) care sprijină creșterea, diferențierea și auto-organizarea celulelor, de construirea bioreactorilor capabili să furnizeze condiții fiziologice pentru țesut, dar cel mai important, de dezvoltarea de tehnici capabile să asigure o durată lungă de viață pentru țesutul construit, așa încât să poată fi implantat pacientului [5].

2.2. Istoria ingineriei tisulare

Termenul "inginerie tisulară" cu sensul în care este utilizat în zilele noastre, a fost introdus în medicină în anul 1987. Definiția convenită pentru acest termen a fost: "Ingineria tisulară reprezintă aplicarea principiilor și metodelor științelor ingineresti și științelor vieții, în scopul înțelegerii fundamentale a relațiilor structurale și funcționale din cadrul țesuturilor normale și patologice și dezvoltarea de substitute biologice, care să restaureze, să mențină și să îmbunătățească funcțiile țesuturilor" [4]. Succinta sinteză a istoriei ingineriei tisulare expusă în continuare a fost realizată în mare măsură pe baza informațiilor oferite de două monografii de referință în domeniu: [3,4].

Prima întâlnire sub denumirea de inginerie tisulară a avut loc la începutul anului 1988, în California. Aceasta a condus la un simpozion al UCLA/ Keystone pe tema Ingineria Tisulară, reiterat din 2 în 2 ani, până în 1994. În paralel, acest domeniu a început să se dezvolte în zona Boston-ului de către Charles și Joseph Vacantti. Una dintre primele lucrări clasice în acest domeniu a fost publicată de Langer și Vacantti. Societatea de Inginerie Tisulară a fost înființată în anul 1995, avându-l ca președinte fondator pe Charles Vacantti. Această societate și-a susținut prima întâlnire în anul 1996 în Orlando, Florida. Jurnalul Ingineria Tisulară a fost fondat în 1996, atât jurnalul cât și societatea dezvoltându-se pe parcursul ultimei decade [3,4].

Ulterior, societatea și-a modificat denumirea în Societatea Internațională de Inginerie Tisulară și Medicină Regenerativă (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - TERMIS), aceasta susținând un congres mondial o dată la fiecare 3 ani [4].

La mijlocul anilor '90, a fost acordată destul de multă atenție celulelor stem și altor celule progenitoare și a intrat în vogă termenul de medicină regenerativă.

Principalele abordări ale tehnologiei bazate pe celule, care au marcat începutul dezvoltării domeniului ingineriei tisulare sunt: (i) prelevarea celulelor de la pacient și înmulțirea lor, (ii) dezvoltarea de biomatrice acelulare (fără structură celulară) și (iii) dezvoltarea de biomatrice în care se însămânțează celule [3,4].

Încă din a doua jumătate a anilor 80, au fost dezvoltate tratamente în care propriile celule ale pacientului erau recoltate și înmulțite înainte de a fi utilizate în tratarea pacientului. Primul tratament de acest tip se numea *Epicell* și presupunea înmulțirea celulelor pielii pentru a trata pacienții cu arsuri. Acesta a fost urmat de *Carticell*, unde condrocitele erau recoltate de la pacient, înmulțite și apoi reintroduse în țesutul afectat al pacientului. Aceste abordări autologe ale lui Genzyme, reprezintă o parte importantă a începutului acestui domeniu [4].

Anii '90 au fost marcați de câteva realizări importante și anume, elaborarea primelor produse aprobate de administrația alimentației și medicamentelor (*Food and Drug Administration - FDA*). Unul dintre acestea a fost *TransCyte*, un substituent al pielii, care deși a fost realizat prin însămânțarea celulară a unei biomatrice, a fost livrat ca o biomatrice acelulară, cu o matrice extracelulară bogată. Un alt produs acelular a fost obținut prin utilizarea submucoasei intestinului subțire (*Small Intestin Submucosa - SIS*) care a furnizat de asemenea o matrice

extracelulară bogată și care implantat ca înlocuitor a indus o remodelare care a condus la repararea grupului de mușchi și tendoane care stabilizează umărul [4].

Primul produs al ingineriei tisulare care implică celule vii încorporate într-o biomatrice a fost *Apligraf*, substituent de piele dezvoltat de *Organogenesis*, care includea atât o dermă, cât și o epidermă. Științele tisulare avansate au trecut de la *TransCyte* la dezvoltarea unui echivalent dermatologic, denumit *Dermagraft*, bazat pe încorporarea fibroblastelor dermice într-o biomatrice polimerică. Aceste produse au făcut parte din începutul ingineriei tisulare, *TransCyte* și *SIS* fiind aceluare, iar *Apligraf* și *Dermagraft* fiind alogenice. Cu excepția lui *SIS*, succesul comercial al celorlalte produse timpurii a venit destul de lent [3,4].

Astfel, se pot observa o largă varietate de abordări care pot fi angrenate în dezvoltarea terapiilor clinice bazate pe ingineria tisulară și medicina regenerativă. Adevărata oportunitate pe care o oferă acest domeniu o reprezintă aplicațiile ce includ repararea neuronală și repararea unor organe vitale (rinichi, ficat, pancreas, inimă și componentele sale), utilizate în cazurile în care fie nu există opțiuni de tratament, fie cele existente sunt mai puțin dezirabile (Tabel 2.1). În cazul organelor vitale menționate mai sus, există o criză veritabilă a transplantelor datorată cererii mult mai mari de organe față de oferta donatorilor. Ingeria tisulară și medicina regenerativă au potențialul de a soluționa această criză, oferind o alternativă organelor donate [4].

Țesuturile și organele avute în vedere sunt extrem de dificil de realizat datorită complexității lor biologice. Acestea sunt structuri multicelulare, au o arhitectură tridimensională, sunt vascularizate și dispun de o rețea de nervi perfect funcțională. Indiferent de abordarea urmată - reparare, înlocuire sau regenerare -, problemele care trebuie luate în calcul atunci când se urmărește crearea de substituite tisulare *in vitro* sau refacerea unui țesut sunt următoarele: (i) sursa celulelor, (ii) biomatricile utilizate, (iii) problema vascularizării și a înervării (asigurarea legăturilor dintre nervi), pentru ca noul substituit tisular să fie integrat în mod corespunzător și acceptat de pacientul gazdă [3,4].

Tabel 2.1. Câteva aplicații ale ingineriei tisulare și medicinei regenerative.

Structurale/Ortopedice	Organe vitale/ Neuronale
Arsuri severe	Rinichi
Ulcere de piele	Ficat
Reconstrucție facială	Pancreas
Cartilagii	Inimă și componentele ei
Țesuturi ortopedice moi	Reparare neuronală
Oase	

2.3. Elementele fundamentale din ingineria tisulară

Ingeria tisulară este un domeniu complex, în care se lucrează cu noțiuni specifice atât domeniului biomedical, cât și domeniului informaticii și ingineriei. Ea este bazată pe principiile dezvoltării biologice celulare și moleculare. Cele trei ingrediente cheie care stau la baza ingineriei tisulare sunt: biomatricile (scaffold-urile), celulele și biomoleculele. Biomecanica și informatica sunt de asemenea domenii de activitate care au un rol foarte important în realizarea structurilor tisulare [3]. În continuare, sunt prezentate elementele de bază ale ingineriei tisulare.

a) Biomatrici (Scaffold-uri)

Țesuturile nu sunt alcătuite exclusiv din celule. Un volum substanțial din spațiul lor este extracelular, constând într-o rețea complexă de macromolecule numită matrice extracelulară (MEC). Matricea extracelulară constă, în esență, dintr-o rețea de proteine fibroase, dispuse într-un gel hidratat de polizaharide. Rolurile matricii extracelulare sunt: (i) de stabilizare a structurii fizice tisulare (reprezintă suportul structural al celulelor), (ii) de reglare a comportamentului celulelor cu care se află în contact, prin influențarea dezvoltării, migrării și proliferării celulare [12].

Având ca obiectiv principal crearea de substitute tisulare *in vitro*, de mare interes în cadrul domeniului ingineriei tisulare este realizarea unor structuri poroase formate din materiale biocompatibile, care să permită proliferarea, motilitatea și diferențierea celulelor către linia celulară dorită. Aceste structuri poartă denumirea de biomatrici sau scaffold-uri [13].

Astfel, biomatricile reprezintă suportul fizic pentru cultura celulară, orientând celulele să formeze țesutul dorit. Materialele biocompatibile utilizate pentru realizarea acestor structuri pot fi: naturale, cum sunt colagenul, mătasea, chitosanul, alginatul sau sintetice, ca de exemplu polimerii PLLA, PGA etc.

Formarea țesutului ce urmează a fi implantat este influențată într-o mare măsură de compoziția, de arhitectura și de biocompatibilitatea biomatricii. Puterea mecanică a materialului biomatricii trebuie să asigure proprietățile mecanice ale țesutului care se dorește a fi reparat sau înlocuit. Porozitatea materialului, distribuția și mărimea porilor influențează într-o mare măsură atașarea unor tipuri specifice de celule la biomaterial și interacțiunea biomaterialelor cu gazda. Unul dintre aspectele de asemenea importante se referă la reacția inflamatoare la biomateriale. Multe dintre biomaterialele utilizate în mod curent obțin reacții inflamatorii după implantare. De asemenea degradabilitatea biomaterialului este o problemă care prezintă interes în cadrul acestui domeniu, deoarece biomatricile trebuie să fie de preferință absorbite de țesutul înconjurător, nou creat, fără îndepărtarea chirurgicală [6]. Este preferabilă degradarea biomaterialului *in vivo* pentru a minimiza probleme de biocompatibilitate pe termen lung, rata de degradare a biomaterialului potrivitându-se cu rata de regenerare a țesutului, astfel încât produsele degradate rezultate să nu fie toxice pentru gazdă. Degradarea prematură a biomaterialelor, combinată cu lipsa dezvoltării *in vivo* a țesutului înlocuitor pot determina reducerea în timp a puterii mecanice a unui țesut construit, ceea ce ar putea conduce la defectarea acestuia [6,14].

Astfel, proprietățile principale pe care trebuie să le posede o biomatrice sunt:

- biocompatibilitate, pentru a spori atașarea, dezvoltarea și proliferarea celulelor;
- porozitate, pentru a permite accesul celulelor și a mediului de cultură;
- degradabilitate, pentru a-și ceda locul, într-un interval de timp controlat, țesutului viu generat de celulele cultivate pe ea.

b) Materiale biocompatibile utilizate în realizarea biomatricilor

O parte din materialele naturale și sintetice biodegradabile și permanente au fost studiate în domeniul medical înainte de apariția ingineriei tisulare, ca un subiect de cercetare, fiind deja cunoscut că poliesterul și colagenul sunt materiale care se resorb, potrivite pentru crearea unor structuri suport în vederea formării de noi țesuturi [6].

Un material sintetic utilizat în mod obișnuit în ingineria tisulară este PLA - acid polilactic. Acesta este un poliester care se degradează în corpul uman pentru a forma acidul lactic, un produs chimic natural, care este ușor de eliminat din organism. Alte materiale sintetice utilizate pentru formarea biomatricilor sunt acidul poliglicolic (PGA) și policaprolactona (PCL), mecanismul lor de degradare fiind similar cu cel al PLA, dar având un ritm mai lent de degradare [6].

Materialele naturale care se utilizează pentru construirea biomatricilor sunt colagenul, mătasea, chitosanul, alginatul și altele. De asemenea, s-au studiat diferite derivate ale matricii extracelulare, pentru a evalua capacitatea lor de a oferi suport pentru cultura celulară [6,13].

c) Celule

Deși la începutul dezvoltării domeniului ingineriei tisulare, au existat și abordări bazate pe biomatrice acelulară, în principal, cele mai multe strategii care au urmat au implicat prezența celulelor. Aceste din urmă abordări, indiferent de scop (înlocuire, regenerare, reparare), implică fie celule însămânțate în biomatrici, fie doar celule [4].

Celulele sunt cheia regenerării și reparării țesuturilor, prin proliferarea, motilitatea și diferențierea lor, prin producerea de biomolecule și formarea matricii extracelulare. În funcție de sursa din care provin, celulele pot fi împărțite în trei categorii: autologe, alogenice și xenogenice. Caracteristicile acestora sunt prezentate pe scurt în Tabelul 2.2 [4].

Tabel 2.2. Caracteristici ale celulelor care provin de la organisme diferite.

Tipul celulelor	Organismul	Caracteristici
Autologe	Organismul gazdă	Număr de celule limitat; Compatibilitate din punct de vedere imunologic;
Alogenice	Alt organism uman	Disponibilitate „pe raft”; Incompatibilitate din punct de vedere imunologic; Transfer de boli;
Xenogenice	Organism animal	Număr mare de celule; Incompatibilitate din punct de vedere imunologic; Transfer de boli;

Celulele autologe – sunt celulele care se preiau de la un pacient în scopul de a fi utilizate pentru același pacient. În cazul utilizării acestui tip de celule pentru regenerarea sau înlocuirea unui țesut lezat sau distrus în totalitate, apar cele mai puține probleme legate de rejecția de către organism sau de transmiterea agenților patogeni. Există însă situații în care aceste celule nu pot fi folosite. De exemplu, persoanele vârstnice sau foarte bolnave, persoanele care au arsuri grave nu pot avea cantități suficiente de celule autologe pentru a stabili linii celulare utile. Recent, a existat o tendință uriașă de utilizare a celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă. Celulele autologe reprezintă sursa ideală de celule pentru generarea de noi țesuturi implantabile și funcționale, atât din punct de vedere al răspunsurilor imunologice, cât și din motive etice [3,6].

Celulele alogenice – sunt celule preluate din corpul unui alt donator decât pacientul la care se face implantul. Celulele alogenice sunt folosite și pentru efectuarea de diverse studii *in vitro*. Cu toate că acest lucru este contestat din punct de vedere etic, s-au obținut realizări foarte importante pe baza acestor experimente în domeniul ingineriei tisulare [3,6].

Celulele xenogenice – sunt celule izolate de la indivizi din alte specii. Acest tip de celule s-au folosit cu precădere în experimente ce vizau construcția de implanturi cardiovasculare [3,6].

O altă clasificare a celulelor în funcție de stadiul de dezvoltare din care rezultă și de tipul lor, presupune următoarele trei categorii: celule stem embrionare, celule stem adulte sau progenitoare și celule diferențiate (Tabel 2.3)[4].

Tabel 2.3. Caracteristici ale celulelor rezultate din diferite stadii ale dezvoltării.

Tipul celulelor	Stadiu	Caracteristici
Celule stem embrionare	Blastocist	Preocupări de natură etică; Capacitate de proliferare ridicată; Pluripotente;
Celule stem adulte/progenitoare	Postnatal	Număr limitat; Multipotente;
Celule diferențiate	Postnatal	Capacitate de proliferare limitată; Posibil în număr limitat; Un singur fenotip;

Celulele stem sunt celule nediferențiate care posedă capacitatea de a se transforma în celule înalt specializate, putând forma orice tip de țesut și organ din corp. Importanța lor rezidă tocmai în această posibilitate de a se dezvolta în orice tip de celulă din organismul uman [6].

Celulele stem, după cum se poate vedea și în tabelul de mai sus, se pot împărți în două mari categorii:

- celule stem embrionare
- celule stem adulte

Celulele stem embrionare pot da naștere oricărui tip de celulă/țesut și se pot obține din țesutul embrionar. În contrast, celulele stem din țesuturile adulte se găsesc în creier, oase, inimă, plămâni și alte organe, având o capacitate de diferențiere mai limitată. Celulele stem mezenchimale sunt celule stem adulte care se găsesc în măduva oaselor lungi, ele putându-se diferenția în celule musculare, cartilajinoase, osoase și nervoase [15].

Diferențierea celulelor stem este indusă de:

- stimuli interni
- bagajul genetic al celulei respective
- stimuli externi
- factori de contact
- semnale intercelulare (molecule secretate de celule învecinate)
- factori prezenți în mediul extracelular [15].

Indiferent de tipul de celule și de sursa din care fac parte, un aspect important îl reprezintă disponibilitatea imediată a acestora. Există în mod clar situații în care este necesar tratamentul imediat al bolnavului, iar dacă tratamentul are la bază celulele, atunci va fi necesar ca acestea să fie disponibile de îndată la momentul și locul respectiv. Precizăm, de asemenea, faptul că și în cazul tratamentului care poate fi planificat pentru viitor (chiar dacă implică operații), disponibilitatea imediată „de pe raft” a produselor sau a strategiei de tratament este foarte avantajoasă. Aceasta, datorită faptului că majoritatea populației de pacienți care are nevoie de tratament îl poate procura doar dacă este disponibil în cadrul sistemului de asigurări de sănătate, în spitalele comunității și nu doar în principalele centre medicale academice [4].

În continuare, sunt prezentate sursele celulelor utilizate în tratamentele clinice de până în prezent. Abordările Carticel și Epicel se bazează pe înmulțirea celulelor obținute de la pacient și utilizarea ulterioară a populației rezultate în tratarea pacientului. Aceste abordări celulare au fost autologe și în mod evident nu implicau disponibilitatea „de pe raft”. Acesta este unul dintre motivele pentru care compania Genzyme, care se ocupă în principal cu procesarea celulară, nu este o companie ce furnizează produse, ci una care prestează servicii [3,4].

Deși au existat abordări aceluare pentru substituenții pielii, produsele dezvoltate de Organogenesis și Advance Tissue Sciences utilizează celule alogenice. Aceste celule, fibroblaste dermice și cheratinocite, au fost selecționate cu atenție pentru a fi acceptate de către țesutul gazdă din punct de vedere imunologic. În general, utilizarea celulelor alogenice presupune o strategie a ingineriei tisulare pentru acceptarea acestora din punct de vedere imunologic [3,4].

Un tip diferit de tratament este cel numit protocolul Edmonton pentru tratarea pacienților cu diabet. În cadrul acestei proceduri, grupuri de celule obținute de la cadavre sunt implantate pacientului. Aceasta este una dintre abordările alogenice. Deși primele rezultate clinice au fost încurajatoare, rezultatele obținute în următorii 5 ani subsecvenți implantării nu au avut același impact. Limitarea majoră din punct de vedere al sursei celulelor constă în faptul că, pentru un singur pacient, erau necesare grupuri de celule de la mai multe cadavre, iar numărul cadavrelor disponibile este limitat [3,4].

În consecință, cercetătorii concentrați asupra dezvoltării pancreasului artificial s-au îndreptat către alte surse posibile. Acestea includ linii celulare alogenice precum și grupuri celulare xenogenice. În ceea ce privește ultimele menționate, din studiile efectuate pe animale reiese că acceptarea din punct de vedere imunologic a celulelor implantate este mai mare în cazul celulelor xenogenice decât în cazul celulelor alogenice [4].

Toate sursele de celule prezentate mai sus au fost utilizate în cazul celulelor diferențiate. După cum se poate vedea în Tabelul 2.3, pe lângă acestea mai pot fi utilizate în cadrul acestor tehnologii de tratament celule stem embrionare sau celule stem adulte/progenitoare [4].

Din punct de vedere imunologic, în cazul celulelor stem/progenitoare, deși acest aspect nu este cunoscut, odată ce devin total diferențiate, ele ar trebui să prezinte toate caracteristicile celulelor diferențiate în care s-au transformat, inclusiv markerii moleculari asociați respingerii imune.

Celulele pot fi utilizate atât ca înlocuitor al populației endogene de celule cât și ca o „fabrică” biologică. În acest ultimul caz, scopul lor este de a secreta matricea extracelulară, factorii de creștere sau factorii chemotactici. Un aspect critic este cel privind abilitatea de a înmulți o populație de celule până la numărul cerut de o anumită abordare fără a se modifica fenotipul celulelor. Avem de a face cu o

adevărată provocare dacă sursa o reprezintă celulele diferențiate, dar și în cazul în care aceasta este formată din celule stem/progenitoare [3,4].

d) Biomolecule

Biomoleculele (factori de creștere, hormoni locali, semnale intercelulare) sunt macromolecule care orientează diferențierea celulară. Ele au un rol important în procesul de agregare celulară, de adeziune a celulelor la biomatrice și de angiogeneză (dezvoltarea de vase sanguine).

Biomoleculele sunt produse de multe tipuri de celule, fiind orientate spre o celulă particulară, având scopul să realizeze o reacție specifică. Termenul factor de creștere este utilizat pentru a descrie factorii asociați cu celulele implicate în sistemul imunitar. Când un factor de creștere se leagă la receptorul unei celule țintă, un sistem de semnale intracelulare este activat, producându-se un răspuns biologic [3,4].

e) Biomecanica

Biomecanica exprimă condițiile minime fizico-chimice pentru ca țesutul regenerat să devină funcțional. Ea are la bază studiul proprietăților native ale țesuturilor și semnalelor mecanice locale necesare pentru diferențiere și expresie genetică, reprezentând o modalitate de control a eficienței și siguranței în utilizare a țesuturilor nou formate [3,4].

f) Informatica

Informatica joacă un rol foarte important în ingineria tisulară, ea oferind instrumentele de modelare, simulare, analiză, proiectare, monitorizare a dezvoltării tisulare și analiză comparată a rezultatelor, asistate de calculator [3].

2.4. Tehnologii utilizate în dezvoltarea de noi țesuturi *in vitro*

Această secțiune se concentrează asupra a trei tehnologii: biomaterialele, bioreactorii și imagistica. Biomaterialele sunt dezvoltate sub forma unor biomatrice pentru a fi utilizate în dezvoltarea substituenților tridimensionale de organe sau țesuturi sau ca și mijloace pentru livrarea locală de celule. Biomaterialele trebuie să fie formate din materiale „inteligente”, care furnizează semnale necesare pentru a direcționa caracteristicile funcționale ale celulelor. Acest aspect este important indiferent dacă celulele sunt endogene sau dacă sunt obținute din surse exogene. Semnalele care sunt încorporate în material pot influența acțiuni cum ar fi adeziunea celulară, proliferarea și/sau migrarea. Înțelegerea acestor semnale și a modului în care se succed nu este nicidecum completă [4].

A doua tehnologie cheie este tehnologia bioreactoare. Bioreactorii pot fi utilizați pentru a înmulți o populație de celule, pentru a crește un substituent de țesut *in vitro* sau pentru studiul biologiei primare, prin furnizarea în mod controlat a unor semnale diferite care influențează funcționarea celulelor [4].

În cele din urmă, o a treia tehnologie importantă este cea a imagisticii, care are ca scop detectarea patologiilor clinice și monitorizarea proceselor regenerative. După utilizarea terapierii bazate pe celule, este necesară o scanare a corpului uman

pentru a determina viabilitatea substituentului tisular care a fost implantat, a populației de celule care a fost furnizată sau chiar monitorizarea unei biomatrice acelulare, în vederea stabilirii abilității sale de recrutare a celulelor. Toate acestea sunt asigurate de procesul de imagistică, care poate identifica proprietățile moleculare și celulare. Tehnologia imagistică avansată poate conduce la o detectare timpurie a bolilor, pentru a fi vindecate prin procesul de reparare biologică, în detrimentul înlocuirii unui țesut sau organ [4].

2.5. Modele computaționale ale auto-organizării celulelor în țesuturi

2.5.1. Mecanismele auto-organizării celulare

Obiectivul ingineriei tisulare este de a crea țesuturi vii pentru înlocuirea celor lezate sau de a determina regenerarea țesuturilor. Privind lucrurile în perspectivă, ingineria tisulară va rezolva criza transplantelor de organe prin crearea de organe funcționale în laborator [16]. În cadrul abordării tradiționale a ingineriei tisulare, celulele sunt însămânțate în biomatrice biocompatibile, degradabile, fiind cultivate în laborator câteva săptămâni, iar ulterior implantate în organismul pacientului [17]. Abordările recente ale ingineriei tisulare presupun dezvoltarea de substitute tisulare rezultate din auto-organizarea unor subsambluri de mici dimensiuni cum ar fi structurile celulare cultivate în hidrogel obținute prin tehnologii ale microingineriei [18]. În ambele contexte, înțelegerea morfogenezei *in vitro* este importantă întrucât funcționalitatea substitutelor tisulare depinde de distribuția spațială a celulelor.

Modul de organizare a celulelor în țesuturi funcționale reprezintă o problemă fundamentală, încă deschisă, a embriologiei și a medicinei regenerative. Deși unele mecanisme de reglare sunt cunoscute, incluzând aici receptorii celulari de suprafață, factorii solubili și insolubili, respectiv factorii de legătură la matricea extracelulară (MEC), impactul lor asupra comportamentului celular nu este pe deplin înțeles. Complexitatea morfogenezei *in vivo* descurajează specialiștii din domeniul ingineriei tisulare în reproducerea sa, însă, cu toate acestea, identificarea factorilor esențiali a condus la rezultate promițătoare [19].

Această secțiune descrie mecanismele celulare implicate în formarea, creșterea și funcționarea substitutelor tisulare. Este cunoscut faptul că mecanismele reglatoare ale morfogenezei embrionice sunt implicate și în dezvoltarea structurilor tisulare artificiale. În consecință, embriologia reprezintă un punct de reper important pentru specialiștii din domeniul ingineriei tisulare, dar complexitatea sistemului face dificilă identificarea mecanismelor dominante. Modelarea computațională tinde să dețină un rol tot mai important în acest demers [20].

Modelele computaționale ale morfogenezei iau în calcul abilitatea celulelor de a interacționa unele cu altele și cu materialele biocompatibile. În continuare, sunt prezentate informații cu privire la structurile moleculare care intervin în procesul de adeziune celulară.

Celulele interacționează cu mediul lor prin intermediul unor receptori din membrana celulară care sunt conectați la citoschelet. Acești receptori, numiți integrine, sunt proteine transmembranare, responsabile în principal de interacțiunea celulelor cu matricea extracelulară [21], dar care pot să medieze și interacțiunile de tipul celulă - celulă, fie direct, prin legături heterotipice cu receptorii altor celule, fie

indirect, prin legături cu filamentele matricii extracelulare care se întind de la o celulă la alta [22]. O altă familie importantă de receptori de adeziune sunt caderinele, proteine Ca^{2+} - dependente transmembranare, care se leagă homotopic de receptorii omologi ai celulei alăturate, asigurând astfel interacțiunile de tipul celulă - celulă (Fig. 2.2). Forțele de coeziune, care acționează la interacțiunea dintre celule, respectiv forțele de adeziune, care acționează la interacțiunea dintre celule și substrat sunt transmise prin intermediul acestor receptori [8].

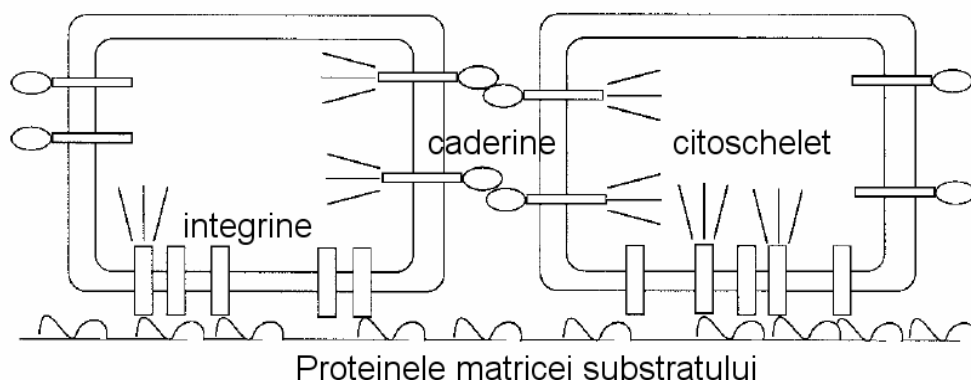


Fig. 2.2. - Ilustrare schematică a tipurilor de receptori membranari implicați în procesul de organizare tisulară [8].

Cu toate că au la bază proteine diferite, atât forțele de coeziune, cât și cele de adeziune sunt interacțiuni de contact, atractive. Astfel, ele pot fi caracterizate prin valorile lucrului mecanic necesar ruperii acestor legături. Mobilitatea celulelor atât în țesuturi cât și în suspensie este dezordonată, similară cu mișcarea Browniană. Astfel, ea poate fi asimilată cu mișcarea de agitație termică a moleculelor unui lichid, intensitatea sa fiind caracterizată printr-un parametru energetic, E_T , analogul energiei de agitație termică, $k_B T$, unde k_B este constanta lui Boltzmann și T este temperatura absolută. Această aproximație poate fi nejustificată în cazul unor bioreactoare de însămânțare care antrenează suspensia celulară într-o mișcare ordonată [5].

Contactele de adeziune dintre celule sunt, în general, stabile, dar ele nu trebuie considerate statice. Menținerea legăturilor stabile între celule impune procese celulare active [23].

Celulele percep indiciile mediului și se mișcă în consecință. Prin urmare, este dificil să anticipezi structura unui sistem multicelular. Deși studiată aprofundat în culturi celulare bidimensionale [24], motilitatea celulară într-un mediu tridimensional, cum ar fi biomatricile din ingineria tisulară, face subiectul unor cercetări majore. În prezent, sunt dezvoltate metode noi pentru a produce biomatrici cu microarhitecturi controlate, pentru a vizualiza porțiuni considerabile ale unui sistem celular cu ajutorul imagisticii confocale a celulelor vii, dar și pentru a analiza diferitele imagini [25]. Pentru a se ajunge la o înțelegere cantitativă a motilității celulare într-un mediu tridimensional, sunt necesare studii viitoare în acest sens.

Un mecanism morfogenetic foarte cunoscut este chemotaxia, care presupune că celulele se deplasează urmărind un gradient de concentrație a unei

substanțe chimice care se află în mediul lor. Chemotaxia, conform dicționarului enciclopedic, reprezintă o reacție locomotorie, orientată și obligatorie, a organismelor mobile, declanșată și întreținută de o substanță chimică răspândită în mediul lor de viață și care se efectuează fie spre acea substanță (c. *pozitivă*), fie în sens opus (c. *negativă*) [26]. Chemotaxia intervine în dezvoltarea și funcționarea normală a organismului. De exemplu, pe baza unui studiu de modelare [27], s-a constatat că vasele de sânge s-ar putea forma datorită chemotaxiei provocată de izoformele factorului de creștere al endoteliului vascular (vascular endothelial growth factor - VEGF).

Rigiditatea substratului poate de asemenea orienta migrarea celulelor. Durotaxia reprezintă tendința celulelor de a se deplasa spre zonele mai rigide ale substratului, fiind responsabilă și de interacțiunile celulă - celulă pe distanțe mari, atunci când celulele se află într-o matrice alcătuită din filamente lungi [28]. Datorită forțelor centripete exercitate pe substrat, două celule îndepărtate care trag de același filament percep rigiditatea crescută a substratului și au tendința de a migra de-a lungul său, apropiindu-se una de alta chiar și în absența semnalizării chimice [28,29,30].

Celulele dependente de ancorare pot fi cultivate doar dacă se asigură un suport cum ar fi o biomatrice de natură solidă [17] sau un hidrogel [18]. O alternativă ar fi ca celulele coezive să fie cultivate în agregate compacte (sferoide multicelulare) [31].

Agregatele celulare sunt structuri multicelulare sferice lipsite de matrice extracelulară, care conțin zeci de mii de celule mobile și coezive (care adera unele de altele) [8].

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 legături 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) [8]. Agregatele celulare pot fi obținute relativ ușor în laborator, prin diverse metode, cum ar fi: metoda supraconfluenței [32,33,34], metoda tubului, metoda peletului sau metoda "în picătură" [35].

Într-o biomatrice de structură poroasă, celulele se deplasează de-a lungul suprafeței sale, fenomen cunoscut sub denumirea de orientare de contact. Când două celule migratoare intră în contact fără să se lipească unele de altele, ele își modifică direcția de deplasare, proces denumit inhibiție de contact a mișcării [36].

Încercările cercetătorilor de a înțelege mecanismele biofizice ale proceselor morfogenetice s-au concretizat în 1963 când Steinberg a propus și argumentat teoria adezivității diferențiate (Differential Adhesion Hypothesis – DAH). Conform DAH, diferite tipuri de celule aderă unele la altele în grade diferite de intensitate, evoluția întregului sistem făcându-se în sensul minimizării energiei totale de adeziune [37]. Altfel spus, celulele profită de mobilitatea lor pentru a da naștere configurației cu cel mai mare număr de conexiuni puternice cu vecinii lor. Se poate concluziona că, atât în biomatrici, cât și în agregate, proprietățile adezive ale celulelor influențează migrarea lor. Există numeroase dovezi care sugerează că ipoteza DAH poate fi considerată principiul fundamental al embriologiei [2,31].

Diviziunea celulară și apoptoza (moartea celulelor) contribuie de asemenea la formarea structurilor multicelulare [38]. Prin urmare, modelele computaționale ale dezvoltării tisulare pot beneficia de rezultatele cercetării ciclului celular. O

resursă valoroasă în acest sens o constituie baza de date Cell Cycle, care conține modele matematice ale ciclului celular, precum și informații despre genele și proteinele acestuia [39].

Disponibilitatea nutrienților și a oxigenului, precum și eliminarea eficientă a reziduurilor metabolice sunt esențiale pentru dezvoltarea tisulară. Rezistența unui substitut tisular este dependentă de producerea de matrice extracelulară (MEC) de către celule. Atât creșterea țesuturilor, cât și producerea de MEC sunt îmbunătățite de cultivarea substitutelor în bioreactoare specifice țesuturilor [40,41].

2.5.2. Modele computaționale de rezoluție celulară

a) Modele Random Walk

Rearanjările celulare în cadrul substitutelor tisulare sunt adesea simulate cu algoritmi de tip *random walk* (explorare aleatoare) care iau în considerare orientarea de contact și inhibiția de contact a mișcării.

Pentru a simula modul în care fibroblastele invadează o biomatrice realizată din clustere de fibre, similar colagenului din dermă, s-a folosit un algoritm de tip *random walk* care simulează mișcarea celulelor pe suprafața fibrei, precum și un algoritm Monte Carlo care descrie salturile celulelor printre fibrele adiacente [7]. Scopul realizării acestui model l-a reprezentat investigarea populării biomatricei ca funcție a densității de fibre. Dezvoltări ulterioare, cum ar fi semnalizarea celulară, proliferarea celulară și remodelarea biomatricei sunt compatibile cu platforma de simulare utilizată și pot fi folositoare în modelarea etapelor inițiale ale evoluției substitutelor din ingineria tisulară [7].

Mișcarea celulelor a fost simulată ca o deplasare aleatoare (*random walk*) pe o rețea cubică, reprezentând un remarcabil model computațional al creșterii și diferențierii tisulare într-o biomatrice din ingineria tisulară (Fig. 2.3) [42,43].

Modelarea începe odată ce țesutul de granulație (un amestec compus din celule și matricea extracelulară care se dezvoltă timpuriu în etapa de vindecare a rănilor) a infiltrat biomatricea implantată. Simulările computaționale descriu proliferarea celulară, diferențierea celulară și producția de matrice extracelulară (MEC). Fiecare nod din rețea reprezintă o regiune a spațiului ocupată de o celulă și de propria MEC (Fig. 2.3a). Pe lângă acest model reprezentat pe rețea, s-a utilizat și un model cu elemente finite, necesar pentru a calcula stimulii biomecanici care acționează asupra celulelor. Odată ce stimulii sunt determinați, simularea diferențierii tisulare se face cu un algoritm mecanic (*mechano-regulation algorithm*) [44], care ia în calcul deformația relativă de forfecare γ și viteza relativă v a fluidului (solidului) învecinat, calculate din analiza elementelor finite [42]. Tipul celular în care se transformă o celulă mezenchimală este determinat de valoarea stimulului mecanic:

$$S = \frac{\gamma}{a} = \frac{v}{b}, \quad (2.1)$$

unde $a = 0.0375$ și $b = 3 \mu\text{m}/\text{s}$ sunt constante empirice determinate de armonizarea simulărilor cu experimentele. Celula se diferențiază într-un fibroblast când S este ridicat, în condrocit când S este de nivel intermediar și în osteoblast când S este scăzut. Nivelul foarte scăzut al lui S susține resorbția [42].

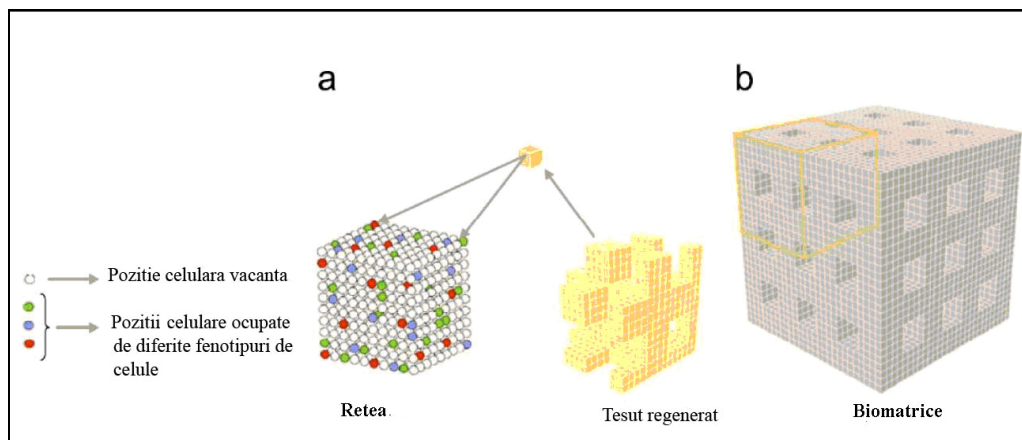


Fig. 2.3. Reprezentarea pe rețea a țesutului regenerat în biomatrice. (a) În interiorul fiecărui element finit conținând $10 \times 10 \times 10$ noduri de rețea, pozițiile celulare vacante sunt ocupate de matricea extracelulară (MEC) a țesutului de granulație; alte noduri de rețea sunt ocupate de diferite tipuri de celule împreună cu MEC lor caracteristică. (b) Modelul elementului finit al unei biomatrice de structură poroasă cu porii cuburi de dimensiune 7 mm și țesutul regenerat în interiorul acestuia. Datorită simetriei, doar 1/8 din sistem trebuie modelat (preluat din Journal of Biomechanics [43], cu permisiunea Elsevier).

Utilizând modelul computațional al diferențierii tisulare prezentat mai sus, Byrne et al. [42] au studiat efectele proprietăților biomatricei (porozitate, elasticitate și rata de disoluție) asupra formării osului după implantare, fiind identificată o combinație optimă a acestor proprietăți. Checa și Prendergast [43] au utilizat modelul diferențierii tisulare pentru a evalua impactul densității și a uniformității însămânțării celulare asupra vascularizării substitutelor tisulare după implantare, în condițiile unor încărcări mecanice diferite. De asemenea, a fost anticipată distribuția cartilagiului și a osului nou formate, în acord optim cu datele experimentale [43]. Rezultatele modelării computaționale au fost sintetizate în principii de design pentru biomatrice specializate din ingineria tisulară osoasă [45].

Până în momentul de față, o singură geometrie a biomatricei (Fig. 2.3b) a fost studiată cu ajutorul modelului diferențierii tisulare. Cu toate acestea, astfel de biomatrice deschid perspective favorabile pentru aplicații personalizate ale ingineriei tisulare, întrucât pot fi produse prin tehnici rapide de realizare de prototipuri care permit un control precis al formei și porozității [46]. Modelul poate fi ușor extins pentru diferite microstructuri de biomatrice.

b) Modele Monte Carlo

Motivați de nevoile practice ale tipăririi țesuturilor [10,47,48], Jakab și alții [10] au propus un model de rețea bazat pe algoritmul Metropolis Monte Carlo (MMC), pentru a descrie rearanjările celulelor. Acest model nu ține seama de schimbările de formă ale celulelor. Pentru a asigura eficiența computațională, sistemul este reprezentat pe o rețea. Fiecare nod al rețelei este ocupat fie de o celulă, fie de un element de volum al mediului de cultură, de aceeași dimensiune cu cea a celulei. Într-o rețea cubică, este considerat că o celulă poate interacționa cu vecini de până la ordinul 3, reprezentați în Fig. 2.4a de I, II, respectiv III. Într-o rețea hexagonală, o celulă se consideră că poate interacționa cu vecini doar de ordinul 1 (Fig. 2.4b).

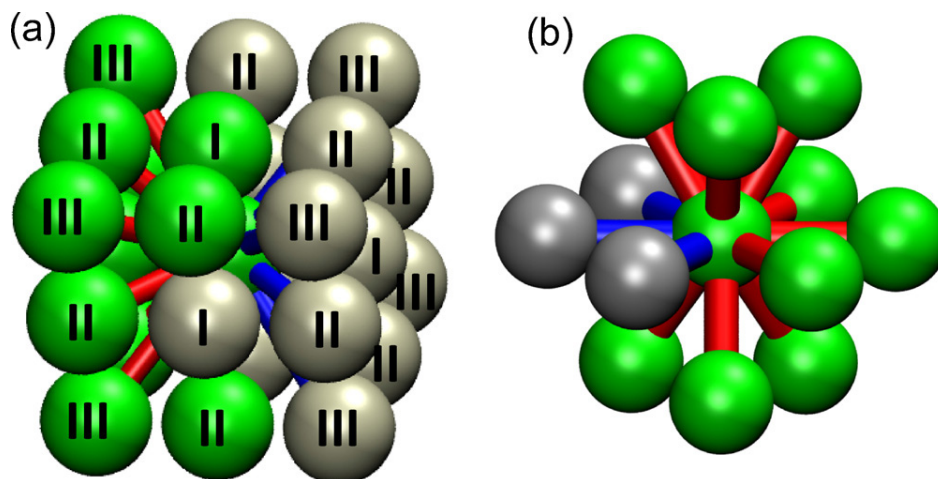


Fig. 2.4. Reprezentari grafice ale modelului Metropolis Monte Carlo (MMC): celulele (sferele verzi) sau elementele de volum de mediu (sferele gri) ocupă nodurile unei rețele cubice (a) sau unei rețele hexagonale (rețea hexagonală compactă) (b). În ambele cadrane, sfera centrală (verde) reprezintă o celulă particulară, în timp ce celelalte sfere simbolizează vecinii care interacționează cu aceasta. În cadranul (a) numerele romane indică ordinul vecinilor. Cilindrii care conectează sfera centrală cu vecinii săi reprezintă energia potențială de interacțiune: cilindrii roșii asigură interacțiunile de tip celulă - celulă, iar cilindrii albaștrii asigură interacțiunile de tip celulă - mediu [5].

Modelul MMC este similar modelului Cellular Potts [49,50,51] în ceea ce privește evoluția sistemului, dar diferă din punct de vedere al reprezentării sistemului. În modelul Cellular Potts, parametrul spin etichetează o celulă care ocupă mai multe poziții ale rețelei, în timp ce în modelul MMC spinul etichetează un tip celular.

În modelul MMC, tăria interacțiunilor dintre elementele sistemului este descrisă sub forma lucrului mecanic $\varepsilon_{\sigma\sigma'}$, necesar pentru a separa două particule adiacente de tip σ și σ' (denumit lucrul mecanic de coeziune, dacă cele două particule sunt celule, respectiv lucrul mecanic de adeziune, dacă una dintre particule este celulă, iar cealaltă este un element de volum de mediu de cultură). Dacă numărul de celule de fiecare tip este conservat, energia de adeziune poate fi exprimată în termeni de tensiuni interfaciale [5]:

$$\gamma_{\sigma\sigma'} = 0.5(\varepsilon_{\sigma\sigma} + \varepsilon_{\sigma'\sigma'}) - \varepsilon_{\sigma\sigma'}, \quad (2.2)$$

Dacă proliferarea celulară, moartea celulară și diferențierea celulară sunt incluse în model, energia de interacțiune depinde de asemenea de lucrul mecanic de coeziune homotipic [52].

Tensiunea interfacială este definită drept energia de interacțiune corespunzătoare unității de arie a interfeței dintre două elemente. Tensiunea de suprafață a țesutului (TST) este definită drept energia corespunzătoare unității de arie a interfeței dintre țesutul biologic și mediul de cultură. TST poate fi calculată experimental cu ajutorul unui aparat de compresie între plăci paralele, furnizând o măsură a coezivității țesutului și o predicție pentru sortarea celulară. Compararea

cu rezultatele experimentale permite determinarea valorilor corespunzătoare pentru parametrii de tensiune interfacială [5].

Detaliind, energia totală de adeziune a unui sistem alcătuit din t tipuri de celule are forma:

$$E = \sum_{\substack{\sigma, \sigma'=0 \\ \sigma < \sigma'}}^{t-1} \gamma_{\sigma\sigma'} B_{\sigma\sigma'} - \frac{1}{2} n_n \sum_{\sigma=0}^{t-1} N_{\sigma} \varepsilon_{\sigma\sigma} \quad (2.3)$$

unde $\gamma_{\sigma\sigma'}$ reprezintă tensiunea interfacială dintre celule de tipuri diferite, respectiv dintre celulă și mediu (ecuația (2.2)), $B_{\sigma\sigma'}$ reprezintă numărul total de legături dintre particulele de tip σ și σ' , n_n este numărul vecinilor cu care interacționează o celulă oarecare ($n_n = 26$ pe o rețea cubică cu interacțiuni între vecinii de până la ordinul 3), N_{σ} numărul celulelor de tip i , ($i \in \{0, 1, \dots, t-1\}$) [5].

Evoluția țesutului este descrisă utilizând o versiune a algoritmului Metropolis adaptată problemelor biologice, urmărindu-se minimizarea energiei sistemului (DAH) [2]. În modelul MMC, rearanjările în sistem apar doar pe interfețe, unde celulele intră în contact cu mediul sau cu celule de alt tip. Mai întâi, se identifică celulele de pe interfețe, apoi o celulă este aleasă aleator, iar o mișcare elementară în sistem se face prin schimbarea poziției celei cu cea a unui vecin adiacent, de asemenea aleator selectat. Acesta poate fi fie celulă, fie particulă de mediu de cultură. Schimbarea corespunzătoare în energie de adeziune a sistemului (ΔE) este calculată. Mișcarea este acceptată dacă conduce la o scădere a energiei de adeziune a sistemului ($\Delta E \leq 0$); în caz contrar (dacă $\Delta E > 0$), mișcarea poate fi acceptată, cu o probabilitate [5]:

$$P = \exp\left(-\frac{\Delta E}{E_T}\right), \quad (2.4)$$

care este mai mică decât 1 (dată de factorul Boltzmann). E_T reprezintă o măsură a motilității celulare, analogul biologic al fluctuațiilor de energie termică din fizica statistică [53]. În practică, această decizie este luată prin generarea unui număr aleator r , cuprins între 0 și 1, noua configurație fiind acceptată doar dacă $r < \exp(-\Delta E/E_T)$. Pe durata unui pas Monte Carlo (Monte Carlo Step - MCS), toate celulele din sistem au șansa de a efectua o mișcare [5].

Din punct de vedere biologic, regulile stohastice prezentate mai sus presupun că celulele dintr-un sistem multicelular își explorează vecinătatea, fiind capabile să își schimbe poziția cu celule adiacente sau să reorganizeze matricea extracelulară din vecinătatea lor [5].

În abordarea de tip „bottom up” a ingineriei tisulare, modelul MMC a fost utilizat pentru a elabora experimente de tipărire a țesuturilor și pentru a prezice rezultatele acestora. În aceste experimente [10,48,54,55,56], celulele sau agregatele celulare sunt livrate cu ajutorul unui dispozitiv controlat de calculator, împreună cu straturi de hidrogel cu rol de susținere. Celulele sunt mobile, tipărirea

doar direcționând auto-organizarea acestora. Pentru a descrie rearanjările celulelor în structura tipărită, sunt necesare simulări computaționale [10,57].

Metoda Metropolis Monte Carlo (MMC) s-a dovedit utilă și în analiza rearanjărilor celulare în aplicațiile emergente bazate pe hidrogeluri obținute prin microtehnologii [18,58]. Fuziunea picăturilor submilimetrice de hidrogel, îmbrăcate într-un strat celular, a fost mai întâi sugerată *in silico* [57], apoi testată experimental ca posibilă cale spre realizarea arteriolelor *in vitro* [59]. O idee similară a fost propusă pentru realizarea unor structuri tisulare hepatice perfuzabile [60].

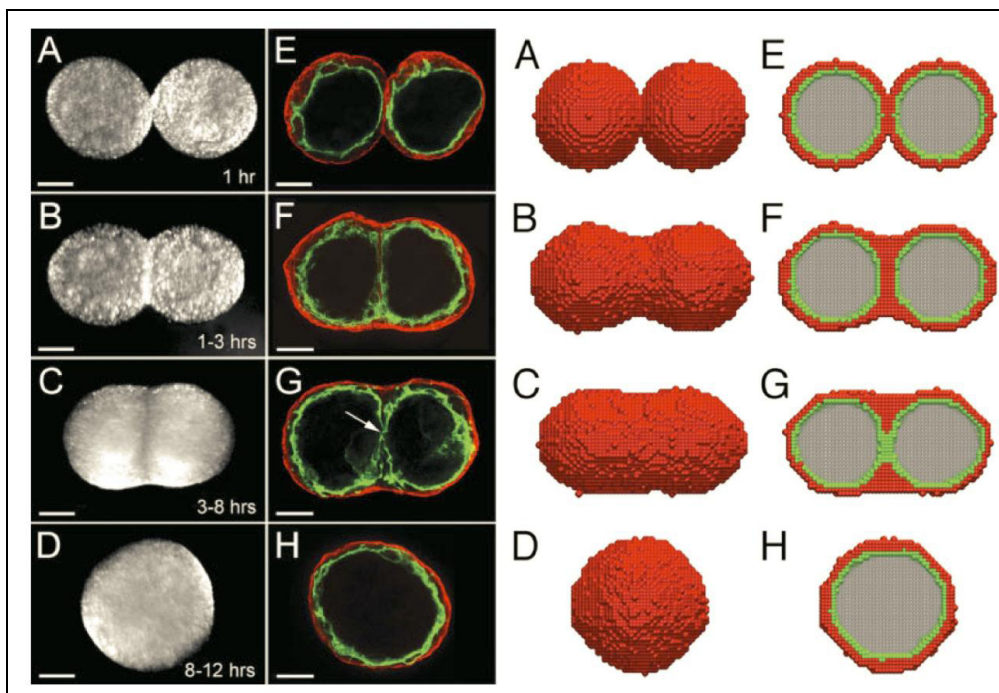


Fig. 2.5. Experimente și simulări ale fuziunii sferoidelor vasculare. Experimente (panoul stâng, fundal negru): (A,E) două sferoide în prima oră în cultură; (B,F) două sferoide în orele 1-3 în cultură; (C,G) două sferoide în orele 3-8 în cultură; (D, H) sferoidul rezultat în orele 8-12 în cultură; Scala = 150 μm . Simulări (panoul drept, fundal alb): (A,E) vedere din exterior și secțiune transversală a două modele de sferoide contigue în stare inițială; (B,F) rezultatul după rularea a 5×10^4 MCS; (C,G) rezultatul după rularea a 45×10^4 MCS; (D,H) rezultatul după rularea a 2×10^6 MCS. Fiecare model de sferoid este compus din aproximativ 5000 celule musculare netede și 2000 celule endoteliale. Celulele musculare netede sunt roșii, celulele endoteliale sunt verzi, iar mediul interior este gri deschis. Vizualizarea a fost efectuată în programul de grafica moleculara Visual Molecular Dynamics (VMD) [1] (preluat din Developmental Dynamics [59], cu permisiunea John Wiley and Sons).

Pentru a dovedi fezabilitatea fabricării arteriolelor, în articolul [59] s-a studiat fuziunea sferoidelor vasculare. Alcătuite dintr-un strat exterior de celule musculare netede și un strat interior de celule endoteliale căptușind lumenul central, sferoidele vasculare fuzionează, transformându-se într-o sferă mai mare (Fig.2.5, panou stânga).

Simulările MMC au reprodus detaliat ordinea evenimentelor (Fig. 2.5, panou dreapta) și au caracterizat intensitatea energiilor de interacțiune care facilitează procesul respectiv [59]. De exemplu, simulările au indicat în mod clar că, pentru a se produce fuziunea, mediul care înconjoară sferoidele trebuie să fie diferit de cel care umple lumenul lor. Astfel, energiile de interacțiune dintre celule și mediul intern sunt diferite față de energiile de interacțiune dintre celule și mediul extern. Când sferoidele contigue au fost înglobate în gelul de collagen, ele au format o structură alungită, sugerând că, prin fuziunea unui număr mare de sferoide, se poate obține o structură cilindrică cu diametre de câteva sute de microni, similară cu o arteriolă [57,59].

Simplicitatea modelului MMC permite simularea evoluției a milioane de celule pe un singur procesor, cu un timp de simulare de ordinul zilelor [5].

În ciuda simplității sale, metoda MMC reproduce corect ipoteza DAH [2] întrucât algoritmul Metropolis conduce la o configurație de energie de adeziune minimă a sistemului. De asemenea, diviziunea celulară și producerea matricei extracelulare au fost implementate utilizând metoda MMC și aplicate pentru a descrie transformarea epitelialo-mezenchimală în stadiile timpurii ale dezvoltării inimii [52].

Conform informațiilor deținute, moartea celulară și chemotaxia nu au fost încă implementate în simulările MMC. Cu toate acestea, dată fiind strânsa legătură dintre modelele MMC și Cellular Potts [51], astfel de extensii par fezabile.

O limitare inerentă a metodei MMC este incapacitatea acesteia de a descrie evoluția în timp a sistemului multicelular. Timpul nu este implicat în algoritmul Metropolis [61], astfel că secvența de configurații generate de metoda MMC prezintă căi eficiente de minimizare a energiei, dar nu există justificare pentru a le privi ca pe niște configurații succesive ale sistemului multicelular. Deși simulările arată un acord calitativ bun între evoluția în timp real observată și evoluția simulată, nu se poate demonstra că timpul este direct proporțional cu numărul pașilor Monte Carlo parcurși. Pentru depășirea acestei limitări a fost propusă o nouă metodă de simulare dependentă de timp [62] care justifică ipoteza DAH și se bazează pe algoritmul Monte Carlo Kinetik [61,63].

c) Modele bazate pe celule individuale deformabile

Secțiunea de față discută modelele de tip *off-lattice* ale celulelor deformabile. Chiar dacă entitățile lor fundamentale sunt celulele individuale, acestea permit schimbări în forma și/sau în volumul celulei. Astfel de modele preced modelele de rezoluție subcelulară în care forma celulelor este determinată dinamic.

Celulele organismului *Dictyostelium discoideum*, în absența hranei, agregă într-un melc multicelular care migrează. În efortul de a înțelege această mișcare colectivă, Palsson și Othmer [64] au modelat celulele sub forma unor elipsoide vâscoelastice tridimensionale înzestrate cu abilități de semnalizare celulară.

Axele principale ale elipsoidelor sunt văzute ca și corzi vâscoelastice [65]. Celulele modelate au capacitatea de a sesiza gradientii concentrației, de a se reorienta, de a interacționa unele cu altele și de a exercita forțe active asupra vecinilor lor sau asupra substratului (Fig. 2.6). Forțele provoacă deformarea celulei prin modificarea formei elipsoidului, dar nu și a volumului său [64].

Modelul elipsoidului deformabil a fost testat [66] în experimentele care studiază sortarea celulară [37], precum și în experimentele care determină tensiunea de suprafață a țesuturilor prin comprimarea agregatelor celulare între două plăci plan-paralele [35,67]. Cu ajutorul parametrilor estimați din datele

experimentale, modelul a reprodus cu succes motilitatea celulară observată în stadiile timpurii ale agregării, precum și migrarea melcului [64,65].

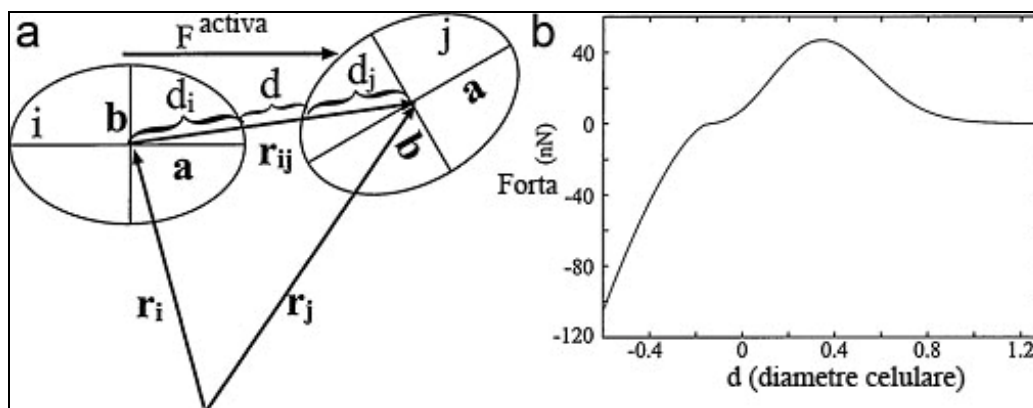


Fig. 2.6. (a) O schemă bidimensională care arată două modele celulare de formă elipsoidală adiacente și modul în care este calculată distanța d dintre suprafețele lor. Aici, F^{activa} reprezintă forța pe care celula o exercită datorită chemotaxiei. (b) Forța netă de interacțiune dintre o pereche de celule, reprezentată în funcție de distanța d . Valorile negative descriu repulsia datorată rezistenței la deformare, în timp ce valorile pozitive descriu atracția datorată forțelor de adeziune. Reprintată cu permisiunea Proceedings of the National Academy of Sciences [64]. Copyright 2000 National Academy of Sciences, USA.

Într-un model bazat pe agent dedicat creșterii culturii celulare monostrat [68], celulele au fost modelate ca și obiecte deformabile, sferice, în suspensie și ca elipsoide turtite după atașarea la substrat. În acest model, comportamentul colectiv al celulelor a fost modelat tratând celulele ca pe niște agenți care execută reguli în funcție de starea diferențierii, de semnalele mediului și de poziționarea în ciclul celular. Modelul bazat pe reguli este cuplat cu un model fizic conceput să ajusteze poziția celulelor în funcție de forțele care acționează între ele.

Modelul a fost validat printr-un acord calitativ optim cu experimentele dedicate comportamentului celulelor uroteliale umane în culturi bidimensionale [68]. În plus, modelul a simulat cu succes impactul concentrației de calciu din mediu asupra vindecării rănilor prin formarea monostraturilor confluențe de celule uroteliale. Atât rezultatele din *vitro*, cât și din *silico*, indică faptul că, la concentrații scăzute de calciu, celulele migrează individual în rană, iar la concentrații fiziologice de calciu, celulele migrează cu o viteză de aproximativ 50% mai mică, fiind organizate într-un monostrat confluent [69].

Abordarea bazată pe reguli, caracteristică modelelor agent este importantă pentru a reprezenta șabloane observate experimental ale comportamentului celular [70,71,72]. Modelele fizice, pe de altă parte, se concentrează mai mult pe forțe sau pe energii potențiale de interacțiune. Cu toate acestea, așa cum modelul lui Walker și alții [68] combină algoritmi bazați pe reguli și algoritmi bazați pe fizică, majoritatea modelelor fizice includ și elemente bazate pe reguli [52,73].

Măsurarea interacțiunilor celulă - celulă, efectuată prin aspirația parțială a acestora în micropipete, a indicat faptul că, atâta timp cât citoscheletul celulelor rămâne intact, celulele se comportă ca niște obiecte ușor deformabile și adezive; interacțiunile dintre celule sunt descrise detaliat în teoria lui Johnson-Kendall-Roberts [74]. În modelele inspirate de această descoperire, celulele au fost

reprezentate sub forma unor sfere elastice, omogene și lipicioase, capabile să migreze, să se dezvolte, să se dividă și să moară [38,75].

În cazul modelului sferei elastice, celulele sunt supuse (i) forțelor deterministe, cum ar fi aversiunea datorată deformării și forța de contact atractivă datorată moleculelor de adeziune celulară de pe suprafața celulelor, și (ii) forțelor stohastice, care transmit mișcarea activă, aleatoare a celulelor izolate, după cum s-a observat în experimente [53]. Mișcarea celulelor este descrisă de ecuațiile Langevin. Galle et al. [38] au inclus de asemenea în model, inhibiția de contact a migrării și inhibiția creșterii.

Simulările bazate pe modelul sferei elastice au arătat impactul proprietăților de la nivel celular asupra dinamicii invaziei tumorale [76]. Studii ulterioare *in silico* au condus la concluzia că polarizarea celulelor datorată contactului celulă - celulă poate contribui la stabilitatea monostraturilor epiteliale [77]. Parametrizarea atentă precum și includerea polarității celulei, cuplate cu ecuațiile de reacție - difuzie, au făcut din modelul sferei elastice un model adecvat pentru studierea aprofundată *in silico* a regenerării ficatului după distrugerea provocată de tetraclorura de carbon [78].

Recent, Hoffman și alții [79] au extins acest model în scopul de a simula auto-organizarea celulelor stem mezenchimale în culturi de tip 2D. Celulelor li s-au furnizat un număr variabil de platforme capabile să exercite forțe de protuberanță și tracțiune responsabile de mișcarea și împrăștierea celulară. Pe lângă descrierea evoluției populației de celule, simulările au sugerat ideea de a îmbunătăți tehnica de cultivare a celulelor stem mezenchimale prin creșterea acestora pe substraturi cu microșabloane în formă de stea, dispuse în rețele hexagonale [79].

Modelul sferei elastice a fost încorporat într-un software modular gratuit, numit CellSys, disponibil la adresa <http://msysbio.com/software/cellsys> (data accesării 5.03.2012). Caracteristicile și aplicațiile de succes ale lui CellSys sunt descrise în articolul [73].

Succesul simulărilor proceselor *in vitro* și *in vivo* pledează în favoarea aplicabilității modelului sferei elastice în studii computaționale relevante pentru ingineria tisulară. Modelul înglobează mecanisme morfogenetice cunoscute, iar modularitatea sa facilitează dezvoltări ulterioare.

2.5.3. Modele computaționale de rezoluție subcelulară

Sub influența stimulilor din mediu, celulele își modifică frecvent forma. De-a lungul ciclului celular, celulele își dublează volumul. Pentru a simula forma adaptivă a celulelor, au fost dezvoltate așa numitele modele ale rezoluției subcelulare. Preponderent utilizate pentru a simula fenomene observate în embriologie și în progresia cancerului, modelele computaționale ale rezoluției subcelulare ar putea deveni instrumente vitale de predicție în ingineria tisulară.

a) Modelul Glazier – Graner – Hogeweg

Auto-organizarea celulară a fost descrisă pe baza ipotezei DAH, utilizând o versiune modificată a modelului Potts (large-N Potts model) specific mecanicii statistice [50,51]. Modelul a devenit cunoscut sub numele de modelul Cellular Potts și, recent, i-a fost atribuită denumirea de modelul Glazier-Graner-Hogeweg (GGH), în onoarea oamenilor de știință care l-au creat și extins [49]. Modelul GGH a câștigat respectul specialiștilor din domeniul embriologiei, prin capacitatea sa de a

descrie auto-organizarea celulelor din cadrul experimentelor atât *in vivo* cât și *in vitro*.

Modelul GGH reprezintă un sistem multicelular pe o rețea. O celulă este definită pe o regiune compusă din mai multe noduri de rețea și este etichetată de o valoare dată a unui index celular (Fig. 2.7a). O celulă este caracterizată de asemenea, de un index al tipului celular.

Dinamica celulară este reprodusă pornind de la principiul minimizării energiei sistemului (DAH), prin simulări bazate pe metoda Monte Carlo și algoritmul Metropolis. Potrivit DAH, energiile de interacțiune depind de tipul celulelor. Pe lângă suma energiilor de interacțiune de contact, energia totală a sistemului include de asemenea energia elastică care menține volumul total și/sau aria unei celule la o valoare apropiată de o anumită valoare țintă [50,80].

Componenta principală a modelului CPM este funcția care definește energia totală a sistemului (*Hamiltonian*) [51]:

$$H = \sum_{ij} \sum_{i'j'} J_{\tau(\sigma_{ij}), \tau(\sigma_{i'j'})} (1 - \delta_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}}) + \sum_{\sigma} \lambda (a_{\sigma} - A_{\tau(\sigma)})^2, \quad (2.5)$$

unde $J_{\tau(\sigma_{ij}), \tau(\sigma_{i'j'})}$ este energia de interacțiune dintre un element celular (care aparține celulei σ_{ij} și tipului celular $\tau(\sigma_{ij})$) și un element învecinat (care aparține celulei $\sigma_{i'j'}$ și tipului celular $\tau(\sigma_{i'j'})$); termenul $(1 - \delta_{\sigma_{ij}, \sigma_{i'j'}})$ asigură că elementele învecinate din rețea care aparțin aceleiași celule să nu contribuie la energia totală a sistemului; a_{σ} reprezintă aria actuală a celulei, $A_{\tau(\sigma)}$ este aria țintă și λ este o constantă de „inelasticitate”, care asigură o constrângere a deformării ariei unei celule la o anumită valoare [51].

Acestei funcții Hamiltoniene, îi pot fi adăugați parametri adiționali, fie care referă proprietățile mezoscopice ale unei celule (cum ar fi perimetrul total), fie care referă un factor extern la care celula răspunde (cum ar fi o concentrație de chemoattractant, produsă chiar de celule).

La fiecare pas Monte Carlo, se verifică dacă fiecare element celular al rețelei, selectat aleator, și-a schimbat tipul în tipul unui vecin de ordinul 1 ce aparține altei celule, de asemenea selectat aleator. Pentru aceasta, se calculează pe baza ecuației (2.5) energia totală a sistemului înainte ca schimbarea de tip a celor două elemente să aibă loc, precum și energia totală a sistemului după încercarea de schimbare. Se determină modificarea în energie a sistemului, astfel [51]:

$$\Delta H = H_{after} - H_{before} \quad (2.6)$$

Mișcarea este acceptată cu o probabilitate:

$$p(\sigma_{ij} \rightarrow \sigma_{i'j'}) = \begin{cases} 1, & \Delta H < 0 \\ \exp\left(-\frac{\Delta H}{T}\right), & \Delta H \geq 0 \end{cases} \quad (2.7)$$

unde T reprezintă temperatura de simulare (care determină fluctuațiile membranelor celulare). Astfel, dacă noua energie a sistemului este mai mică decât vechea energie a sistemului, acceptarea mișcării are loc întotdeauna; în caz contrar, mișcarea este acceptată pe baza probabilității Boltzman. Aceste mișcări ale elementelor celulare corespund unor mici deformări ale membranei [50,51].

Unitatea de „timp” în CPM este reprezentată de pasul Monte Carlo, care este definit ca o secvență de operații prin care fiecărui element celular din sistem i se oferă șansa de a-și schimba tipul cu cel al unui vecin, selectat aleator [50,51].

În exemplul 2D prezentat în Fig. 2.7a, volumul țintă al celulelor este de 6 noduri de rețea, dar de-a lungul evoluției lor, celulele pot acoperi un număr diferit de noduri de rețea. O poziție anume (S în Fig. 2.7b) interacționează cu vecini de ordinul 1, 2, 3 și 4 (notați în Fig. 2.7b cu I, II, III, respectiv IV) [81].

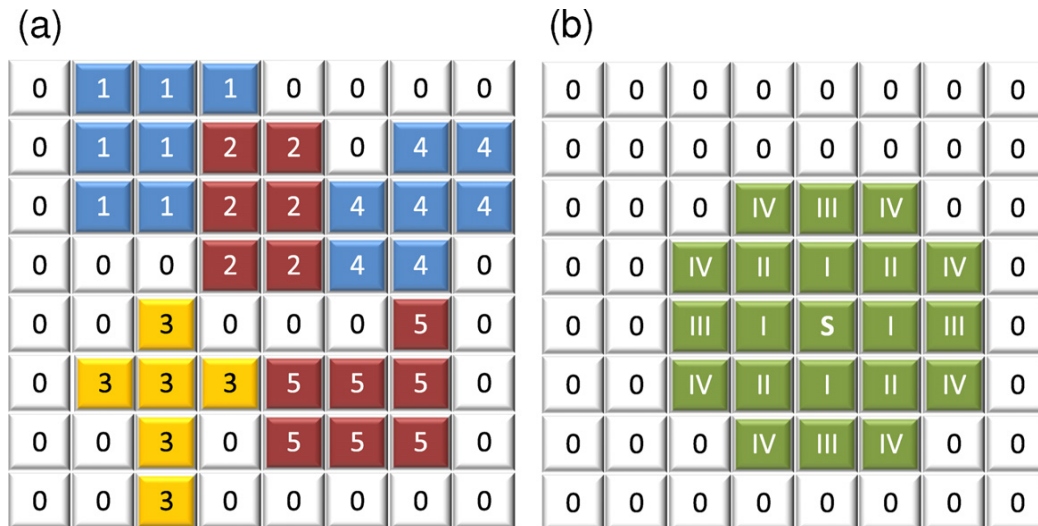


Fig. 2.7. (a) Un exemplu bidimensional al unui sistem multicelular reprezentat de modelul GGH [81]. Nodurile de rețea care aparțin unei anumite celule sunt etichetate de același spin (index celular) [51]. În acest exemplu, indecșii 1-5 se referă la celule, în timp ce indexul 0 se referă la elementele de volum ale matricei extracelulare (MEC). Nodurile ocupate de celule sunt etichetate de un index asociat tipului de celulă. Un anumit tip de celulă este reprezentat printr-o anumită culoare (în reprezentarea de mai sus, celulele 1 și 4 sunt de un anumit tip, celulele 3 sunt de alt tip, iar celulele 2 și 5, de asemenea de alt tip). (b) Un nod S, se consideră că interacționează cu vecini de până la ordinul 4 (I, II, III și IV) [81].

Secvența aplicațiilor modelului GGH începe cu simulări precise ale sortării celulelor în agregate celulare heterotipice. În experimente, când două populații celulare, cu grade diferite de coeziune, sunt aleatoriu intermixate, acestea se separă astfel încât celulele mai coezive se grupează în centrul agregatului, iar celulele mai puțin coezive formează un strat exterior [37]. Modelul Cellular Potts a simulat cu acuratețe sortarea celulelor [50].

Modelul GGH a fost extins pentru a simula fenomenul de chemotaxie și, extrem de important, a fost cuplat cu un set de ecuații diferențiale parțiale (EDP) pentru a caracteriza producerea și difuzia substanțelor bioactive. Pentru a simula agregarea și migrarea celulelor *Dictyostelium discoideum* cu ajutorul modelului GGH, este necesar să se pornească de la supoziția că celulele aderă unele la altele,

produc o substanță chemoatractantă (cAMP) și caută zonele cu concentrație ridicată de chemoatractant (cAMP) [82].

Modelul GGH este utilizat și pentru a descrie dezvoltarea organismelor multicelulare, prin simulări ale procesului de somitogeneza, care reprezintă cea mai timpurie segmentare în embrionii vertebratelor, dând naștere precursorilor vertebrelor, coastelor, precum și a mușchilor scheletali [83].

Platforma de simulare CompuCell3D (CC3D) este disponibilă gratuit (open source) și se bazează pe modelul GGH [80,81,84]. Pachetele de instalare sunt furnizate atât pentru implementarea în serie, cât și pentru implementarea paralelă a software-ului (<http://www.compuCell3d.org/>; accesat în 5 martie 2012).

Din perspectiva ingineriei tisulare, CC3D are o limitare referitoare la dimensiunea sistemului. Rezoluția subcelulară a modelului GGH nu permite gestionarea sistemelor care conțin milioane de celule. Cu toate acestea, paralelizarea, precum și creșterea rapidă a puterii de calcul pot depăși această limitare. Astfel, CC3D este un instrument de perspectivă pentru ingineria tisulară *in silico*.

b) Modelul elementelor subcelulare

Multe modele computaționale au dezavantajul de a fi dezvoltate pe o rețea. Din motive de eficiență computațională, elementele sistemului (cum ar fi celulele sau părți ale acestora) sunt constrânse să migreze pe o rețea, ceea ce poate produce artefacte. Modelul elementului subcelular (ScEM), spre deosebire de majoritatea modelelor computaționale, tratează celula ca pe o colecție de particule care interacționează (elemente subcelulare) și care pot adopta orice poziție în spațiu.

Elementele subcelulare care aparțin unei anumite celule interacționează mai puternic între ele decât cu elemente subcelulare aparținând altor celule [85]. Interacțiunile între elementele subcelulare sunt descrise de energia potențială de tip Morse, cunoscută din teoria forțelor moleculare [86]:

$$V(r) = U_0 \exp(-r/\xi_1) - V_0 \exp(-r/\xi_2), \quad (2.8)$$

unde r este distanța dintre două elemente subcelulare, iar U_0 , V_0 , ξ_1 , ξ_2 sunt parametri de model care descriu poziția minimumului energiei potențiale și valoarea acesteia.

Parametrii energiei potențiale specifică tăria și raza de acțiune a forțelor dintre elementele subcelulare. Forța care acționează asupra unui element subcelular include, de asemenea, și o componentă stohastică, care imită fluctuațiile citoscheletului [85,86].

Evoluția sistemului este descrisă de mișcarea Browniană puternic amortizată (în cazul căreia frecarea domină în asemenea măsură încât viteza unui element este proporțională cu forța rezultantă care acționează asupra sa). În continuare, vom asocia indici romani celulelor individuale și indici greci elementelor subcelulare. Ecuația mișcării elementelor subcelulare α_i , ce fac parte din celula i , este dată de ecuația Langevin [86]:

$$\mu \dot{\mathbf{y}}_{\alpha_i} = \xi_{\alpha_i} - \sigma_{\alpha_i} \sum_{\beta_i \neq \alpha_i} V_{intra}(|\mathbf{y}_{\alpha_i} - \mathbf{y}_{\beta_i}|) - \sigma_{\alpha_i} \sum_{j \neq i} \sum_{\beta_j} V_{inter}(|\mathbf{y}_{\alpha_i} - \mathbf{y}_{\beta_j}|), \quad (2.9)$$

unde \mathbf{y}_{α_i} este vectorul de poziție al elementului α_i , μ este coeficientul de amortizare, care descrie forța vâscoasă ce acționează asupra elementului subcelular din partea citoplasmei din jurul său și V_{intra} (V_{inter}), energia potențială de interacțiune a unei perechi de elemente subcelulare aparținând aceleiași celule (celulelor diferite). Forța aleatoare, ξ_{α_i} , reprezintă zgomotul alb Gaussian cu valoarea medie nulă și coeficientul de corelație:

$$\langle \xi_{\alpha_i}^m(t) \xi_{\beta_j}^n(t') \rangle = 2D\mu^2 \delta_{ij} \delta_{\alpha_i \beta_j} \delta^{mn} \delta(t-t'), \quad (2.10)$$

unde m și n etichetează componentele vectoriale, iar D este coeficientul de difuzie. Forța aleatoare descrie fluctuațiile unei regiuni mezoscopice a citoplasmei, datorate atât agitației termice, cât și evenimentelor necorelate de polimerizare și depolimerizare ale filamentelor citoscheletului. Alegerea mișcării Browniene este susținută de argumente din domeniul fizicii [85] și de date experimentale ale migrării fibroblastelor [87]. Parametrii modelului elementului subcelular au fost optimizați pentru a descrie corect proprietățile vâscoelastice ale celulelor individuale [86].

Fig. 2.8 descrie două celule, notate i și j , reprezentate ca și un set de elemente subcelulare care interacționează. Nodurile arată locațiile elementelor subcelulare, în timp ce filamentele reprezintă energia potențială de interacțiune dintre elementele aceleiași celule (V_{intra}), respectiv dintre elementele diferitelor celule (V_{inter}).

O variantă a modelului ScEM este modelul dinamicii particulelor celulare (Cellular Particle Dynamics - CPD) [62,88], care presupune că interacțiunea dintre elementele subcelulare (particulele celulare) este descrisă de potențialul Lennard-Jones și integritatea unei celule este menținută de un potențial armonic care împiedică îndepărtarea excesivă a unui element subcelular față de celelalte elemente constituente ale celulei. Acest potențial intră în acțiune atunci când distanța dintre două elemente subcelulare depășește o valoare limită, care este un parametru al modelului.

Astfel, energia potențială de interacțiune a unei perechi de elemente subcelulare, aflate la distanța r este dată de:

$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] + \frac{k}{2} (r - \xi)^2 \theta(r - \xi), \quad (2.11)$$

unde ε este valoarea absolută a energiei de interacțiune de tip Lennard-Jones, atunci când particulele se află la distanța de echilibru (poziția minimului energiei potențiale, în care forța de interacțiune este nulă), σ este distanța dintre cele două particule la care energia de interacțiune Lennard-Jones este nulă, k este constanta

elasică din expresia potențialului armonic (al doilea termen al ecuației (2.11)), ξ este distanța dintre cele două elemente subcelulare începând de la care intră în acțiune potențialul armonic, $\theta(x)$ este funcția treaptă a lui Heaviside ($\theta(x) = 0$, $x < 0$ și $\theta(x) = 1$, $x \geq 0$).

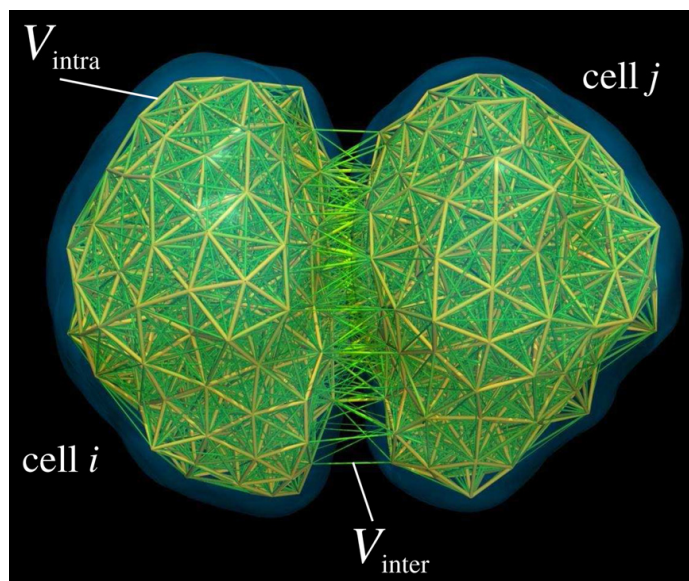


Fig. 2.8. O pereche de celule care interacționează, așa cum sunt descrise de ScEM. Fiecare celulă este compusă din aproximativ 500 de elemente subcelulare. Filamentele simbolizează interacțiunile dintre elementele localizate în noduri; grosimea filamentelor este aproximativ proporțională cu tăria interacțiunii corespunzătoare. Celulele, interacțiunile intra-celulare, respectiv inter-celulare sunt notate ca și în ecuația (2.9). Retipărit din Physical Biology [86], <http://dx.doi.org/10.1088/1478-3975/5/1/015002>, cu permisiunea de la IOP Publishing Ltd.

Parametrii modelului CPD sunt determinați comparând rezultatele simulărilor cu rezultatele experimentale privitoare la evoluția sistemelor multicelulare, în timp ce parametrii ScEM au fost optimizați pentru a descrie proprietățile vascoelastice ale unei singure celule [86].

Modelul elementului subcelular a fost extins pentru a descrie procesele subcelulare care duc la generarea unor forțe active de către celule [89]. Astfel, modelul extins descrie modificările de formă ale celulelor ca și răspuns la întinderea lentă, la fluxul vâcos al țesuturilor, respectiv la migrarea unor grupuri celulare datorată chemotaxiei.

Dezvoltarea și proliferarea celulară au fost de asemenea incluse în ScEM. În cadrul utilizării modelului pentru a descrie creșterea straturilor monocelulare, s-a constatat că distribuția statistică a vecinilor de ordinul 1 este în acord cu datele experimentale înregistrate pentru epiteliu, în care activitatea principală este proliferarea celulelor [90].

Principalele avantaje ale ScEM includ implementarea în afara rețelei, rezoluția subcelulară, extensibilitatea și capacitatea de a descrie evoluția în timp a dinamicii celulare.

Timpul necesar unității centrale de procesare (CPU) pentru rularea simulărilor ScEM depinde de implementare. Cu algoritmul lui Sandersius et al.

[89,90], aproximativ 2 milioane de iterații a 20 000 de elemente subcelulare (400 de celule, a câte 50 de elemente fiecare) durează aproximativ o săptămână pe un singur CPU; simularea descrie 8 ore de timp real și ține cont de procesele biomecanice pasive și active, responsabile de rearanjările celulare.

Pe un cluster de calculatoare cu 32 CPU, rularea algoritmului CPD pentru a simula fuziunea a 2 agregate celulare, având fiecare 2000 de celule și 10 particule celulare per celulă, durează aproximativ o săptămână [62]. Depinzând de tipul de celulă, în experimentele de laborator, fuziunea a două agregate celulare durează câteva zile. De exemplu, pentru celulele de tip Chinese hamster ovary (CHO) [91], fuziunea a două agregate contigue durează aproximativ 8 zile.

Chiar dacă ScEM este mare consumator de resurse din punct de vedere computațional, grupurile de cercetători din domeniu au acces la programe puternice de simulare a dinamicii particulelor, bazate pe algoritmi paraleli și la cluster care înglobează mii de unități centrale de procesare, făcând din ScEM un instrument atrăgător pentru ingineria tisulară *in silico*.

2.5.4. Experimente utilizate pentru validarea modelelor computaționale

Un model computațional este considerat valid dacă conduce la rezultate ce corespund datelor experimentale, cel puțin sub aspect calitativ. În cazul mult mai satisfăcător al unei potriviri cantitative, modelul computațional poate fi calibrat prin identificarea valorilor obținute în simulări cu valorile corespunzătoare măsurate în experimente. Validarea, chiar și parțială, redă un model computațional predictibil.

Validarea completă a unui model computațional presupune determinarea parametrilor de model asociați sistemului biologic. Datorită complexității morfogenezei, modelele tipice depind de zeci de parametri, astfel validarea completă presupune studiul computațional a mai multor experimente. În această secțiune, vom discuta despre experimentele care pot fi folosite pentru a calibra modelele computaționale de interes din ingineria tisulară.

a) Sortarea celulară

Când celulele de diferite coezivități sunt intermixate aleator într-un agregat celular, populațiile celulare segregă (se sortează) în așa fel încât celulele puternic coezive se adună în centrul agregatului, în timp ce celulele slab coezive formează un strat în exteriorul acestuia sub forma unui înveliș [37]. O mulțime de date experimentale sunt disponibile în ceea ce privește sortarea celulară, pentru că studiul acestui fenomen a clarificat mecanismele esențiale implicate în dezvoltarea celulară [2].

Secvența de aplicații de succes ale modelului GGH a început cu simulări ale sortării celulare [50]. De atunci, sortarea celulară a servit ca un experiment de referință pentru validarea calitativă a modelelor computaționale ale auto-organizării celulare.

În ciuda popularității sale, sortarea celulară nu este satisfăcătoare ca și experiment de validare cantitativă, datorită lipsei unui parametru măsurabil care să descrie evoluția în timp a sortării celulare în agregatele 3D. Pentru a cuantifica simulările sortării celulare, Palsson [66] a definit un parametru de sortare, s , egal cu valoarea medie a procentajelor vecinilor de ordinul 1 de același tip. Mai precis,

$$s = 1/N \sum_{i=1}^N N_{t_i} / N_i, \quad (2.12)$$

unde N este numărul total de celule din agregat, N_i este numărul celor mai apropiați vecini ai celulei i , în timp ce N_{t_i} este numărul celor mai apropiați vecini care sunt de același tip cu celula i . Pe măsură ce are loc sortarea celulară, s crește către o valoare maximă care este mai mică decât 1 [62]. Studii recente în microscopia confocală și în analiza de imagini 3D [25] indică faptul că parametrul de sortare poate deveni accesibil experimental în viitorul apropiat.

b) Împrăștierea celulelor pe suprafața unor materiale biocompatibile

Împrăștierea celulară pe un substrat este omniprezentă în dezvoltarea țesuturilor, vindecarea rănilor și în malignitate. În ingineria tisulară clasică, împrăștierea rapidă a celulelor în urma însămânțării unei biomatrice este importantă pentru o distribuție uniformă a acestora. Împrăștierea presupune ruperea contactelor de tip celulă - celulă și, simultan, stabilirea contactelor de tip celulă - substrat.

Pentru a înțelege împrăștierea celulară sub aspectul caracteristicilor măsurabile ale interacțiunilor celulă - celulă, respectiv celulă - substrat, Ryan et al. [92] au studiat împrăștierea agregatelor celulare pe suprafața unui material biocompatibil. Ei au preparat agregate din celule de coezivități diferite, având diferite expresii de caderine și au monitorizat împrăștierea agregatelor pe diferite substraturi prin intermediul microscopiei confocale. S-a ajuns la concluzia că viteza medie de împrăștiere crește proporțional cu raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă - celulă [92,93].

În experimente recente, care au urmărit împrăștierea în timp real a agregatelor celulare pe suprafața unor biomateriale, Douezan et al. [94] au utilizat microscopia optică cu vedere laterală și interferometria optică. Pentru prepararea agregatelor, au fost utilizate celule cu diferite expresii de caderine, în timp ce adeziunea celulă - substrat a fost controlată prin ajustarea densității de suprafață a moleculelor la care celulele sunt capabile să adere (fibronectina). S-au observat două etape diferite. În stadiul inițial al împrăștierii agregatului, de durată aproximativ o oră, agregatul se apropie de suprafață sub forma unei calote sferice cu rază crescătoare (Fig. 2.9b și c). Mai târziu, în al doilea stadiu al împrăștierii, un monostrat precursor se desprinde din agregat și se împrăștie pe substrat (Fig. 2.9d-f) [94].

Dependența de timp a împrăștierii celulare a fost analizată pe baza unei analogii dintre țesuturile compacte și lichidele de vâscozitate ridicată [67,94]. În stadiu inițial al împrăștierii, raza r a discului de contact dintre agregat și planul substratului a crescut în timp (t) conform formulei:

$$r^2 = R_0^{4/3} (W^*)^{2/3} t^{2/3}, \quad (2.13)$$

unde R_0 este raza inițială a agregatului și W^* este viteza specifică proporțională cu adeziunea celulă - substrat pe unitatea de arie și invers proporțională cu vâscozitatea țesutului. Pentru linia celulară de soarece de tip S-180 transfectată pentru a exprima diferite niveluri de E-caderine, analiza rezultatelor obținute cu ajutorul ecuației (2.13) arată că o scădere de 52% (79%) în expresia de caderine reduce vâscozitatea țesutului cu 43% (58%) [94].

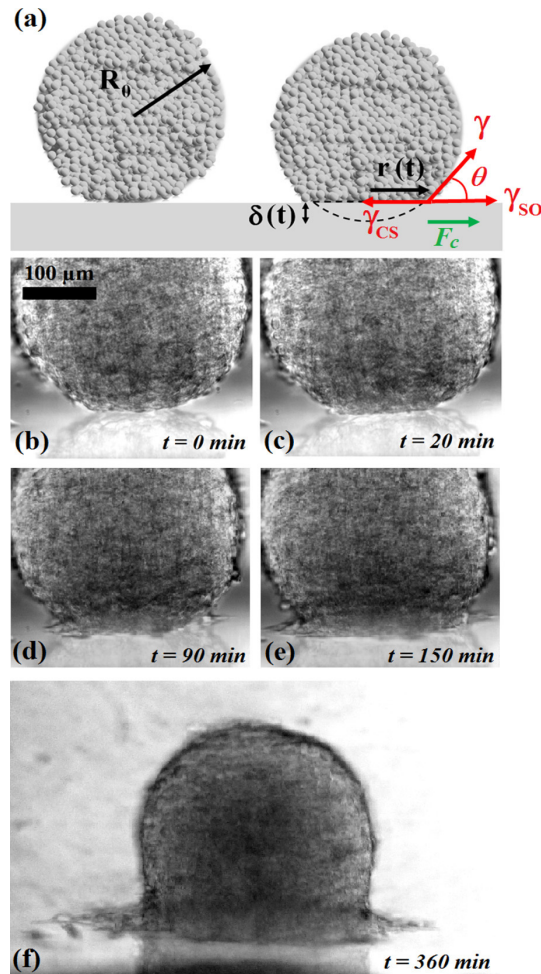


Fig. 2.9. Împrăștierea unui agregat pe un substrat solid. (a) Schema profilului agregatului în stare inițială (stânga) și de-a lungul primului stadiu de împrăștiere (dreapta). Aici, θ reprezintă unghiul de contact dinamic, în timp ce γ_{SO} , γ_{CS} și γ reprezintă energiile interfaciale substrat - mediu, celulă - substrat și celulă - mediu. (b-f) Diferite stadii de împrăștiere ale unui agregat coeziv pe un substrat acoperit de fibronectină: (b) formarea contactului inițial; (c) netezirea agregatului; (d) formarea monostratului precursor; (e,f) dezvoltarea și răspândirea monostratului precursor.

Retipărit cu permisiunea Proceedings of the National Academy of Sciences [94].
Copyright 2001 National Academy of Sciences, USA.

În a doua etapă a împrăștierii, raza R a monostratului precursor evoluează conform ecuației:

$$R^2 = [2\ln(R/R_1) - 1] + R_1^2 = D(t - t_1), \quad (2.14)$$

unde D reprezintă coeficientul de difuzie al monostratului precursor, iar R_1 reprezintă raza discului de contact la momentul $t = t_1$, când monostratul precursor începe să se formeze (Fig. 2.9d). Spre deosebire de ecuația (5) din articolul [94], în care t denotă timpul măsurat de la inițierea monostratului precursor, în ecuația (2.14) variabila t reprezintă timpul măsurat de la primul contact dintre agregat și substrat.

Pentru celulele de tip S-180, analiza cu ajutorul ecuației (2.14) furnizează un coeficient de difuzie $D = (2.5 \pm 0.1) \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ pentru celulele puternic coezive și $D = (4.0 \pm 0.1) \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ pentru celulele care exprimă cu 52% mai puține E-caderine. Coezivitatea scăzută favorizează împrăștierea celulară, pentru că D este proporțional cu diferența dintre energia de adeziune celulă - substrat pe unitatea de arie și energia de coeziune celulă - celulă pe unitatea de arie [94].

c) Fuziunea tisulară

Fuziunea tisulară este observată în dezvoltarea embrionară unde contribuie la evenimente morfogenetice esențiale, cum ar fi faza de compartimentare a inimii; întreruperea acesteia poate duce la malformații congenitale [95]. De asemenea, fuziunea tisulară este esențială în abordările ingineriei tisulare unde auto-organizarea blocurilor celulare submilimetrice generează structurile tisulare dorite [18,96].

Datorită relevanței sale pentru tipărirea țesuturilor [97], fuziunea agregatelor celulare a fost studiată pe larg [62,88,91]. În experimentele dedicate fuziunii agregatelor, două agregate identice cu celule coezive, având raza R_0 , sunt puse în contact. Pe măsură ce fuziunea evoluează, forma lor este bine aproximată de învelișurile sferice de rază crescătoare R (Fig. 2.10).

Mărimea de interes este r , raza discului de contact dintre agregatele care fuzionează sau unghiul θ , obținut din cea mai bună potrivire a unei perechi de arcuri de cerc congruente pe conturul agregatelor (Fig. 2.10). Dependența de timp a unghiului θ , este bine aproximată printr-o expresie analitică simplă [62]:

$$\sin^2 \theta = 1 - \exp(-t/\tau), \quad (2.15)$$

unde τ este constanta de timp a fuziunii, $\tau = R_0\eta/\gamma$, unde R_0 este raza inițială a agregatelor, η este vâscozitatea țesutului și γ este tensiunea de suprafață a țesutului.

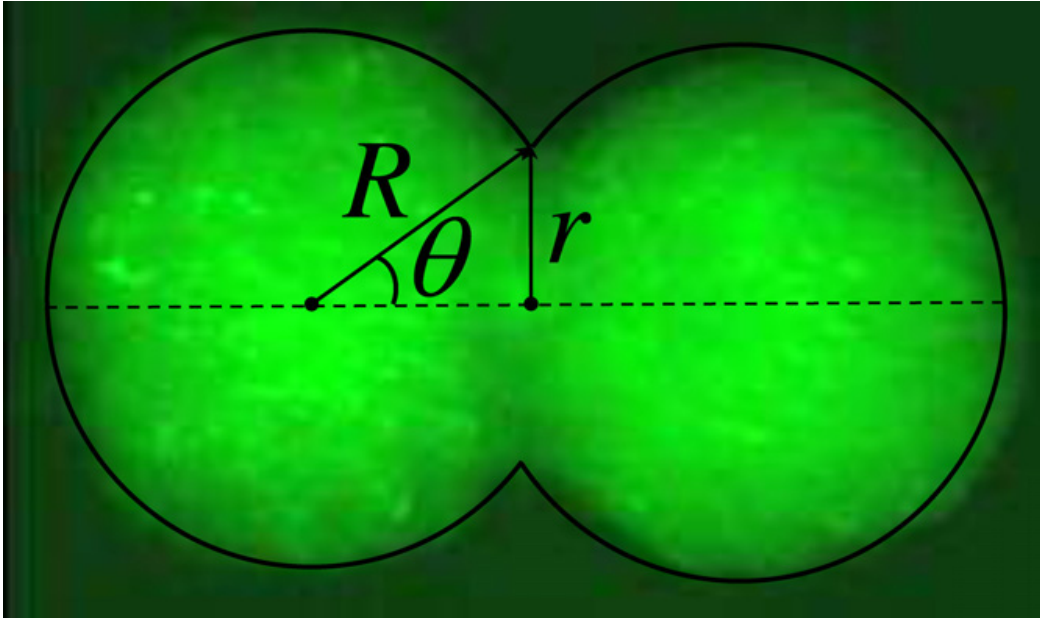


Fig. 2.10. O imagine a fuziunii a două agregate identice formate fiecare din 10^4 celule umane musculare netede. Suprafața agregatelor a fost aproximată de două învelișuri sferice de rază R , rază care crește pe măsură ce fuziunea evoluează; suprafața de contact dintre agregate a fost aproximată de un disc de rază r . Experimentele realizate prin stereo-microscopie cu fluorescență arată fuziunea agregatelor în cadrul unei culturi de 28 de h (cu acordul Françoise Marga, University of Missouri, Columbia, MO, USA).

Deși monitorizarea lui r și θ este echivalentă în cazul unor picături de lichid foarte vâscoase, a fost argumentat că în experimentele fuziunii agregatelor celulare este preferabil să se măsoare θ , deoarece ecuația (2.15) este independentă de conservarea volumului. Astfel, diviziunea și/sau moartea celulară, care pot afecta conservarea volumului, nu afectează precizia analizei.

Experimentele discutate în această secțiune reprezintă teste de referință pentru modelele computaționale particularizate pentru a descrie rearanjările celulelor coezive. Pentru a construi o bază de date coerentă, care să fie utilă pentru validarea modelelor, ar trebui realizate câteva tipuri de experimente pentru un anumit tip de celule. Din cunoștințele întâlnite în literatură, nici unul dintre modelele prezentate în acest capitol nu au fost comparate cu toate experimentele de mai sus. Astfel de comparații ar fi fezabile și folositoare pentru a îmbunătăți puterea de predicție a modelelor computaționale.

2.6. Concluzii

Ingineria tisulară își propune realizarea unor structuri multicelulare implantabile care să substituie sau să regenereze țesuturile lezate din organismul uman. Aceasta reprezintă un domeniu promițător pentru reconstrucția organelor sau țesuturilor nefuncționale, substituitele tisulare nou create având capacitatea de a evita complicațiile care apar în cazul transplantelor tradiționale.

Succesul metodelor teoretice curente folosite pentru a descrie rearanjările populațiilor de celule atât *in vivo* cât și *in vitro* au motivat tentativele recente de modelare a fenomenelor de interes în ingineria tisulară. Complexitatea morfogenezei face din abordările computaționale instrumente indispensabile în stabilirea unei ierarhii a mecanismelor implicate într-un comportament specific al țesutului. Simulările bazate pe programe cu un singur mecanism implementat (cum ar fi DAH) pun în evidență mecanismul dominant. Ulterior, mecanisme suplimentare pot fi incluse unul câte unul până se atinge cea mai bună potrivire dintre rezultatele *in silico* și rezultatele experimentale. Pentru a valida modelul computațional, este nevoie de estimarea parametrilor modelului, astfel încât să se obțină o foarte bună armonizare cu rezultatele experimentale. Odată validate, modelele computaționale prezic rezultatele noilor experimente, fiind utile în optimizarea condițiilor de cultură celulară și în conceperea experimentelor.

În cadrul acestui capitol a fost realizată o sinteză amplă, folosind 96 de surse bibliografice, a celor mai importante aspecte legate de domeniul ingineriei tisulare, evidențiindu-se stadiul actual al cercetărilor computaționale și aplicabilitatea acestora în optimizarea procedurilor de laborator din ingineria tisulară. Au fost prezentate conceptele specifice domeniului ingineriei tisulare, tehnologiile utilizate în dezvoltarea de noi țesuturi *in vitro*, mecanismele auto-organizării celulare și, cel mai important, a fost realizată o analiză complexă a modelelor computaționale ale morfogenezei *in vitro*. Au fost expuse mai multe modele de rezoluție celulară și subcelulară, a căror potențial a fost ilustrat prin aplicații specifice. De asemenea, au fost prezentate experimentele de bază utilizate pentru validarea modelelor computaționale.

Contribuțiile aduse de către autor la cunoașterea în domeniu prin intermediul acestui capitol sunt prezentate în cele ce urmează:

1. Realizarea unui amplu studiu privind abordările și direcțiile fundamentale din cadrul domeniului ingineriei tisulare -înlocuirea, repararea și regenerarea țesuturilor sau organelor-, cu evidențierea obiectivelor și importanței ingineriei tisulare, precum și a motivației modelării computaționale a fenomenelor de interes din ingineria tisulară.
2. Realizarea unei analize privind tratamentele în care propriile celule ale pacientului sunt recoltate și înmulțite înainte de a fi implantate, cu reliefaarea faptului că această abordare evită problemele imunologice întâlnite în transplantele tradiționale.
3. Realizarea unui studiu critic asupra plajei de produse aceluare, respectiv celulare utilizate pentru regenerarea sau înlocuirea unor țesuturi lezate, cu evidențierea problemelor nerezolvate ale domeniului.
4. Elaborarea unei prezentări rezumative a elementelor care stau la baza ingineriei tisulare: biomatricile, materialele biocompatibile utilizate în realizarea biomatricilor, celulele și biomoleculele, cu argumentarea oportunității utilizării metodelor biomecanicii și informaticii pentru îmbunătățirea calității substitutelor tisulare.
5. Elaborarea unei sinteze sistematice trecând în revistă pe de o parte mecanismele auto-organizării celulare, cu evidențierea rolului structurilor moleculare care intervin în procesul de adeziune celulară (integrine, caderine), iar pe de altă parte, fenomenele morfogenetice care intervin în dezvoltarea țesuturilor (chemotaxie, durotaxie, diviziune celulară, apoptoză).

6. Realizarea unei analize critice reliefând rolul ipotezei adeziunii diferențiate (DAH) ca principiu fundamental al embriologiei.
7. Elaborarea unui studiu sintetic, în abordare proprie, asupra principalelor modele computaționale de rezoluție celulară și subcelulară existente în literatură și realizarea unei analize originale a modelelor de rezoluție celulară (modele Random Walk, modele Monte Carlo și modele bazate pe celule individuale deformabile) și subcelulară (modelul Glazier – Graner – Hogeweg, modelul elementelor subcelulare), cu evidențierea avantajelor și dezavantajelor acestora, precum și a aplicabilității lor.
8. Realizarea unei analize asupra experimentelor de validare a modelelor computaționale ale auto-organizării sistemelor multicelulare: sortarea celulară, împrăștierea celulelor pe suprafața unor materiale biocompatibile și fuziunea tisulară (un model computațional este considerat valid dacă conduce la rezultate ce corespund datelor experimentale, cel puțin sub aspect calitativ; în cazul unei potriviri și cantitative, modelul computațional poate fi validat prin identificarea valorilor obținute în simulări cu valorile corespunzătoare măsurate în experimente).

Analiza complexă a mecanismelor auto-organizării celulare, a modelelor computaționale ale morfogenezei *in vitro*, precum și a experimentelor utilizate pentru validarea acestor modele a fost publicată de autoare în articolul "Computer simulations of in vitro morphogenesis" în revista **Biosystems** [98], **cotată ISI, cu factor de impact 1.783**.

3. MODELE COMPUTAȚIONALE ȘI ALGORITMI ÎN STUDIUL EVOLUȚIEI SISTEMELOR MULTICELULARE ÎN VECINĂTATEA UNOR BIOMATERIALE

3.1. Modelarea computațională a elementelor sistemelor biologice

3.1.1. Modelarea computațională a unei suspensii celulare

Modelul computațional dezvoltat, asociat unei suspensii celulare, constă într-o rețea paralelipipedică formată din $i_{\max} \times j_{\max} \times k_{\max}$ noduri de rețea. Sistemul de coordonate asociat are originea într-un colț al paralelipipedului, axa OZ reprezentând axa longitudinală a sistemului. Unitatea de lungime este distanța dintre două noduri de rețea, egală cu diametrul celular.

Un nod de rețea din acest domeniu găzduiește fie o celulă, fie o particulă de mediu de cultură. Celulele sunt reprezentate prin sfere de diametru unitate, având asociate un index în funcție de tipul de celulă. Particulele de mediu de cultură au asociată în model valoarea 0.

În Fig. 3.1 se prezintă schema bloc a procesului de modelare a suspensiei celulare, evidențiindu-se parametrii de intrare, precum și parametrii de ieșire ai modelului.

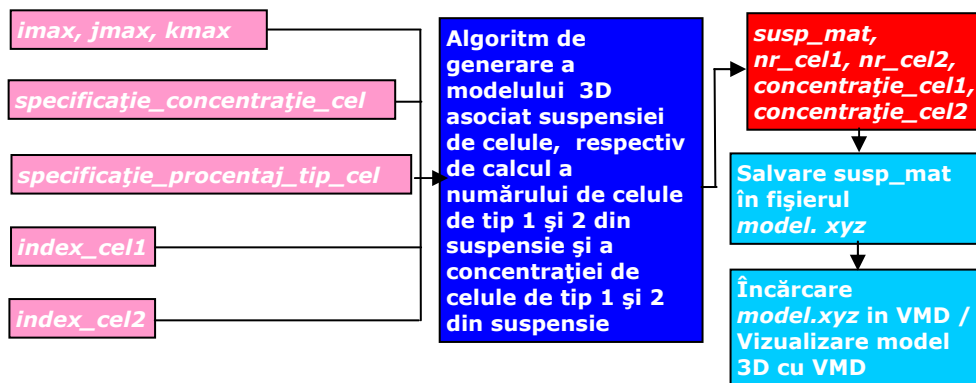


Fig. 3.1. Schema bloc a procesului de modelare a unei suspensii de celule.

Pentru generarea modelului suspensiei celulare, facem apel la un generator de numere pseudo-aleatoare pentru a plasa celule pe unele noduri de rețea alese la întâmplare astfel încât în medie concentrația volumică a celulelor să fie egală cu valoarea parametrului de intrare primit – *specificație_concentrație_cel* [99].

Modelul realizat permite ca suspensia celulară să fie formată fie dintr-un singur tip de celule, fie din două tipuri de celule, procentajul de celule de tip 1

respectiv de tip 2 fiind asigurat tot pe baza unui generator de numere pseudo-aleatoare, astfel încât să se respecte o specificație a procentajului tipului de celulă oferită ca și parametru de intrare – *specificație_procentaj_tip_cel* [99].

Odată ce matricea tridimensională asociată suspensiei celulare este creată, elementele ei reprezentate de celule sunt salvate într-un fișier de tipul *xyz*, în timp ce elementele care conțin particule de mediu sunt neglijate, deoarece acestea nu urmează a fi vizualizate. Datele aferente sistemului multicelular sunt memorate în fișierul *model.xyz* sub forma:

- primele două linii ale fișierului conțin date generale despre model
- începând de la linia a treia se memorează: tipul elementului (*C1* – dacă este celulă de tipul 1, *C2* – dacă este celulă de tipul 2), precum și coordonatele *x,y,z* din sistem ale acestuia.

Această formă de reprezentare (în format *xyz*) va fi utilizată în cadrul tuturor modelelor computaționale studiate în această lucrare.

Prin încărcarea fișierului de tipul *xyz* în programul de grafică moleculară Visual Molecular Dynamics (VMD) [1], se poate vizualiza grafic modelul dezvoltat (Fig. 3.2). VMD este un program de vizualizare moleculară utilizat pentru afișarea și analiza sistemelor biomoleculare complexe, cu ajutorul graficelor 3D. VMD este accesibil gratuit la adresa <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>.

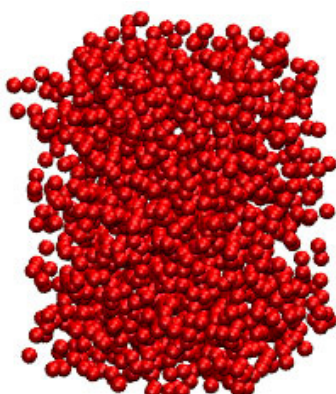


Fig. 3.2. Modelul computațional 3D asociat unei suspensii celulare formate dintr-un singur tip de celule.

În cele ce urmează, este prezentat în limbajul pseudocod algoritmul de generare a modelului 3D asociat suspensiei de celule, respectiv de calcul al numărului de celule de tip 1 și 2 și a concentrației de celule de tip 1 și 2 din suspensie.

Algoritm Generare Model 3D Suspensie Celulară

algoritm Generare_Model_3D_Suspensie_Celulară **este**:

{algoritm care (i) generează o matrice tridimensională cu elemente celule sau particule de mediu, asociată suspensiei de celule, (ii) calculează numărul de celule de tip 1, respectiv de tip 2 din suspensie, (iii) calculează concentrația de celule de tip 1 și de tip 2 din suspensie}

citeste *imax, jmax, kmax, specificație_concentrație_cel, specificație_procentaj_tip_cel, index_cel1, index_cel2*

```

{imax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OZ,
 jmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OY,
 kmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OX,
 specificație_concentrație_cel - specificația concentrației de celule din suspensie,
 specificație_procentaj_tip_cel - specificația procentajului unui tip de celule din
 suspensie,
 index_cel1, index_cel2 - indecșii asociați în model celulelor de tip 1, respectiv de
 tip 2}
atribuie nr_cel1 <- 0
atribuie nr_cel2 <- 0
atribuie nr_elem <- imax*jmax*kmax
{nr_cel1 - numărul de celule de tip 1 din suspensie,
 nr_cel2 - numărul de celule de tip 2 din suspensie,
 nr_elem - numărul total de elemente ale matricii tridimensionale}
pentru i in [0, imax-1] execută
  pentru j in [0, jmax-1] execută
    pentru k in [0, kmax-1] execută
      atribuie susp_mat(i,j,k) <- 0;
      {susp_mat(i,j,k) - matricea tridimensională asociată suspensiei de celule,
      inițializată cu particule de mediu (indexul 0 corespunde particulelor de mediu
      de cultură în model)}
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
pentru i in [0, imax-1] execută
  pentru j in [0, jmax-1] execută
    pentru k in [0, kmax-1] execută
      dacă Rnd() < specificație_concentrație_cel atunci
        {Rnd() - funcție care returnează un număr aleator cuprins între 0 și 1}
        dacă Rnd() < specificație_procentaj_tip_cel atunci
          atribuie nr_cel2 <- nr_cel2+1
          atribuie susp_mat(i,j,k) <- index_cel2
        altfel
          atribuie nr_cel1 <- nr_cel1+1
          atribuie susp_mat(i,j,k) <- index_cel1
        sfârșit dacă
      sfârșit dacă
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
atribuie concentrația_cel1 <- nr_cel1/nr_elem
atribuie concentrația_cel2 <- nr_cel2/nr_elem
{concentrația_cel1 - concentrația de celule de tip 1 din suspensie,
 concentrația_cel2 - concentrația de celule de tip 2 din suspensie}
scrie susp_mat, nr_cel1, nr_cel2, concentrația_cel1, concentrația_cel2
sfârșit algoritm

```

3.1.2. Modelarea computațională a unui agregat celular aflat în mediu de cultură

Modelul computațional asociat unui agregat celular aflat în mediu de cultură constă într-o rețea paralelipedică ce conține $i_{\max} \times j_{\max} \times k_{\max}$ noduri de rețea. Mediul de cultură este reprezentat în model prin noduri de rețea ce conțin particule de mediu (valoarea 0), iar agregatul celular este reprezentat printr-o sferă de rază r_{agregat} , nodurile de rețea din cadrul sferei fiind indecși asociați celulelor de tipul 1, respectiv de tipul 2. Procentajul de celule de tip 1 respectiv de tip 2 din cadrul agregatului celular este asigurat pe baza unui generator de numere pseudo-aleatoare, astfel încât să se respecte o specificație a procentajului tipului de celulă oferită ca și parametru de intrare [100].

În Fig. 3.3 se prezintă schema bloc a procesului de modelare a agregatului celular scaldat în mediu de cultură, evidențiindu-se parametrii de intrare, precum și parametrii de ieșire ai modelului.

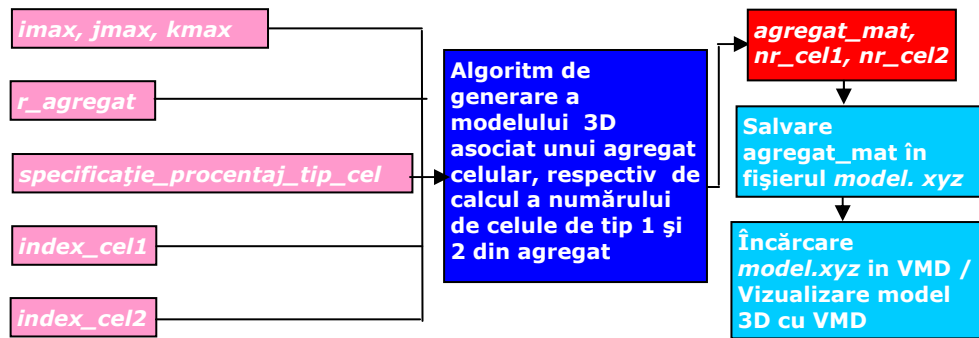


Fig. 3.3. Schema bloc a procesului de modelare a unui agregat celular.

În Fig. 3.4 este prezentată vizualizarea în VMD [1] a modelelor asociate unor agregate celulare de rază egală cu 15 unități, formate dintr-un singur tip de celule (reprezentate prin sfere de diametru unitate de culoare roșie), respectiv din două tipuri de celule (reprezentate prin sfere de diametru unitate de culoare roșie, respectiv albastră).

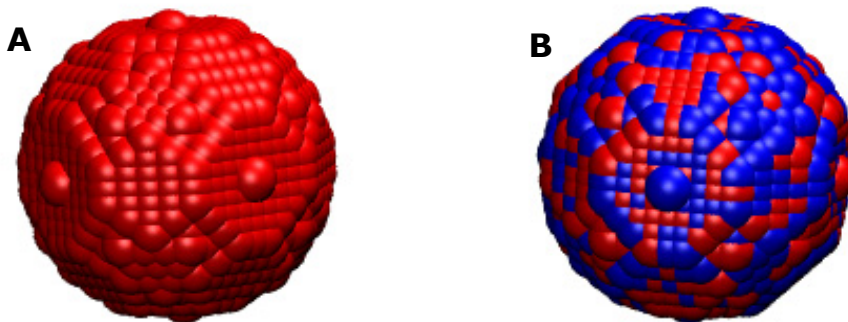


Fig. 3.4. Modelul computațional 3D asociat unui agregat celular de rază $r_{\text{agregat}}=15$ unități, format (A) dintr-un singur tip de celule, (B) din două tipuri de celule.

În cele ce urmează, este prezentat în limbajul pseudocod algoritmul de generare a modelului 3D asociat agregatului celular scaldat în mediu de cultură, respectiv de calcul al numărului de celule de tip 1 și 2 din agregatul celular.

Algoritm Generare Model 3D Agregat Celular

algoritm Generare_Model_3D_Agregat_Celular **este**:
 {algoritm care (i) generează o matrice tridimensională cu elemente celule sau particule de mediu, asociată unui agregat celular scaldat în mediul de cultură, (ii) calculează numărul de celule de tip 1, respectiv de tip 2 din agregat}
citește *imax, jmax, kmax, r_agregat, specificație_procentaj_tip_cel, index_cel1, index_cel2*
 {*imax* - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OZ,
jmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OY,
kmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OX,
r_agregat - raza agregatului celular,
specificație_procentaj_tip_cel - specificația procentajului unui tip de celule din agregat,
index_cel1, index_cel2 - indecșii asociați în model celulelor de tip 1, respectiv de tip 2}
atribuie *nr_cel1* <- 0
atribuie *nr_cel2* <- 0
atribuie *nr_elem* <- *imax*jmax*kmax*
atribuie *xc* <- *kmax/2*
atribuie *yc* <- *jmax/2*
atribuie *zc* <- *r_agregat*
 {*nr_cel1* - numărul de celule de tip 1 din agregat,
nr_cel2 - numărul de celule de tip 2 din agregat,
nr_elem - numărul de elemente ale matricii tridimensionale,
xc,yc,zc - coordonatele centrului sferei asociate agregatului celular}
pentru *i* **in** [0, *imax-1*] **execută**
pentru *j* **in** [0, *jmax-1*] **execută**
pentru *k* **in** [0, *kmax-1*] **execută**
atribuie *agregat_mat(i,j,k)* <- 0;
 {*agregat_mat(i,j,k)* - matricea tridimensională asociată agregatului celular scaldat în mediu de cultură, inițializată cu particule de mediu (indexul 0 corespunde particulelor de mediu de cultură în model)}
sfârșit pentru
sfârșit pentru
sfârșit pentru
pentru *i* **in** [0, *imax-1*] **execută**
pentru *j* **in** [0, *jmax-1*] **execută**
pentru *k* **in** [0, *kmax-1*] **execută**
dacă (*i - zc*) ^ 2 + (*j - yc*) ^ 2 + (*k - xc*) ^ 2 <= *r_agregat* ^ 2 **atunci**
dacă *Rnd()* < *specificație_procentaj_tip_cel* **atunci**
 {*Rnd()* - funcție care returnează un număr aleator cuprins între 0 și 1}
atribuie *nr_cel2* <- *nr_cel2+1*
atribuie *agregat_mat(i,j,k)* <- *index_cel2*
altfel
atribuie *nr_cel1* <- *nr_cel1+1*
atribuie *agregat_mat(i,j,k)* <- *index_cel1*
sfârșit dacă
sfârșit dacă

sfârșit pentru
sfârșit pentru
sfârșit pentru
scrie agregat_mat, nr_cel1, nr_cel2
sfârșit algoritm

3.1.3. Modelarea computațională a unei plăci de biomaterial

Modelul computațional asociat plăcii de biomaterial constă într-o rețea paralelipipedică ce conține $i_{\max} \times j_{\max} \times k_{\max}$ noduri de rețea. Fiecare nod de rețea este reprezentat de o particulă de biomaterial care are asociat în model un index [100].

În Fig. 3.5 se prezintă schema bloc a procesului de modelare a plăcii paralelipipedice de biomaterial, evidențiindu-se parametrii de intrare, precum și parametrii de ieșire ai modelului.

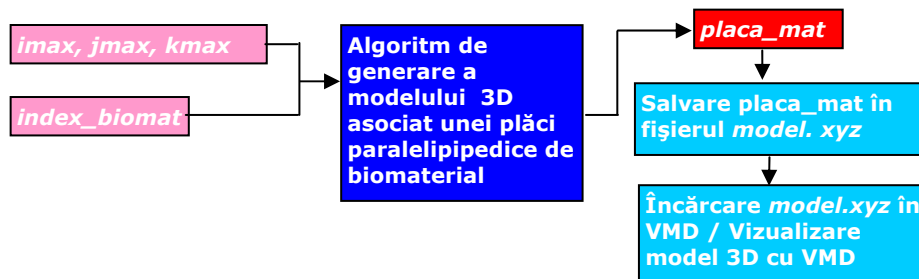


Fig. 3.5. Schema bloc a procesului de modelare a unei plăci paralelipipedice de biomaterial.

Odată ce modelul computațional al plăcii de biomaterial este construit, elementele de matrice corespunzătoare biomaterialului sunt salvate într-un fișier de tipul xyz sub forma unor particule de tip C3. Fig. 3.6, creată cu ajutorul VMD [1], reprezintă această configurație.

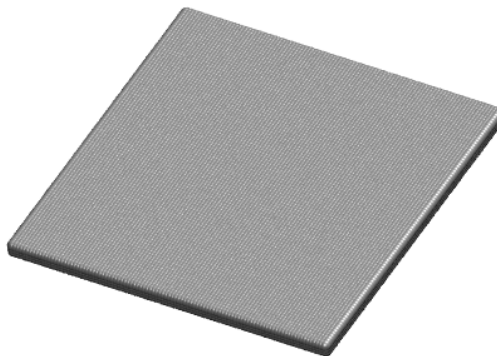


Fig. 3.6. Modelul computațional 3D asociat unei plăci paralelipipedice de biomaterial.

În cele ce urmează este prezentat în limbajul pseudocod algoritmul de generare a modelului 3D asociat plăcii paralelipipedice de biomaterial.

Algoritm Generare Model 3D Placă Biomaterial

```

algoritm Generare_Model_3D_Placă_Biomaterial este:
{algoritm care generează o matrice tridimensională cu elemente particule de
biomaterial asociată unei plăci paralelipipedice de biomaterial}
citește imax, jmax, kmax, index_biomat
{imax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OZ,
jmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OY,
kmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OX,
index_biomat - index asociat în model particulelor de biomaterial}
pentru i in [0, imax-1] execută
  pentru j in [0, jmax-1] execută
    pentru k in [0, kmax-1] execută
      atribuie placa_mat(i,j,k) <- index_biomat;
      {placa_mat(i,j,k) - matricea tridimensională asociată plăcii paralelipipedice
      de biomaterial}
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
scrie placa_mat
sfârșit algoritm

```

3.1.4. Modelarea computațională a unei biomatrici de structură poroasă cu pori cubici

Pentru modelarea computațională a unei biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi, s-a creat o rețea paralelipipedică formată din $i_{\max} \times j_{\max} \times k_{\max}$ noduri de rețea. Porii biomatrici, umpluți cu mediu de cultură, sunt reprezentați sub forma unor cuburi, situate unele de altele la distanță egală cu latura unui cub. Nodurile de rețea din afara porilor sunt reprezentate de un index asociat particulelor de biomaterial, în timp ce nodurile de rețea din interiorul porilor sunt reprezentate de valoarea 0, care reprezintă particulele de mediu de cultură [101].

În Fig. 3.7 se prezintă schema bloc a procesului de modelare a biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi, evidențiindu-se parametrii de intrare, precum și parametrii de ieșire ai modelului.

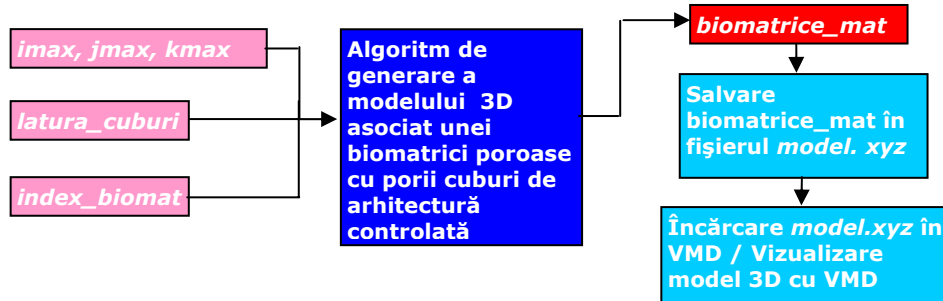


Fig. 3.7. Schema bloc a procesului de modelare a unei biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi.

În Fig. 3.8 este prezentată vizualizarea în VMD [1] a modelelor asociate unor biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi de arhitectură controlată [101].

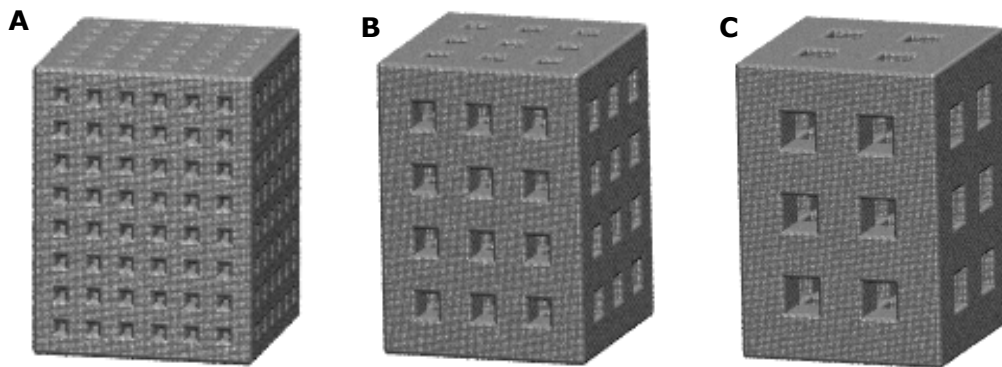


Fig. 3.8. Modele computaționale 3D asociate unor biomatrici poroase cu porii cuburi de arhitectură controlată: (A) $L=5$; (B) $L=10$; (C) $L=15$.

În continuare, este prezentat în limbajul pseudocod, algoritmul de generare a modelelor 3D asociate biomatricilor de structură poroasă cu porii cuburi pentru Fig. 3.8 A, B și C.

Biomatricea este inițializată cu indexul asociat particulelor de biomaterial, iar în nodurile de rețea determinate ca făcând parte din cuburile de latură *latura_cuburi* se pune valoarea 0, reprezentând particulele de mediu. Astfel, din punct de vedere biologic, se consideră că porii biomatricii sunt umpluți cu mediu de cultură [101].

Algoritm Generare Model 3D Biomatrice Cu Pori Cuburi

algoritm *Generare_Model_3D_Biomatrice_Pori_Cuburi* **este:**
 {algoritm care generează o matrice tridimensională asociată unei biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi}

citeste *imax, jmax, kmax, latura_cuburi, index_biomat*
 {*imax* - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OZ,
jmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OY,
kmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OX,
latura_cuburi - latura porilor reprezentați de cuburi,

```

index_biomat – index asociat în model particulelor de biomaterial}
pentru i in [0, imax-1] execută
  pentru j in [0, jmax-1] execută
    pentru k in [0, kmax-1] execută
      atribuie biomatrice_mat(i,j,k) <- index_biomat
      {biomatrice_mat(i,j,k) – matricea tridimensională asociată biomatricii de
      structură poroasă cu porii cuburi, inițializată cu particule de biomaterial}
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
pentru i in [0, imax-1] execută
  pentru j in [0, jmax-1] execută
    pentru k in [0, kmax-1] execută
      dacă trunc(k / l) mod 2 = 1 și trunc(j / l) mod 2 = 1 atunci
        biomatrice_mat(i, j, k) = 0
        {elementul 0 reprezintă în model indexul asociat particulelor de mediu}
      sfârșit dacă
      dacă trunc(k / l) mod 2 = 1 și trunc(i / l) mod 2 = 1 atunci
        biomatrice_mat(i, j, k) = 0
      sfârșit dacă
      dacă trunc(j / l) mod 2 = 1 și trunc(i / l) mod 2 = 1 atunci
        biomatrice_mat(i, j, k) = 0
      sfârșit dacă
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
scrie biomatrice_mat
sfârșit algoritm

```

3.1.5. Modelarea computațională a unei biomatrici de structură poroasă cu porii sferici interconectați

Pentru modelarea biomatricii de structură poroasă cu porii sferice, am optat pentru un aranjament tridimensional hexagonal al unor porii sferici de rază R_{por} și am calculat distanța dintre centrele acestora în așa fel încât ferestrele de comunicare dintre porii adiacenți să fie cercuri de rază R_{orif} [98,99,102].

Porii biomatricii, precum și orificiile care îi conectează sunt umpluți cu mediul de cultură, elementele asociate acestora fiind reprezentate în model de valoarea 0. Celelalte elemente din rețeaua hexagonală sunt reprezentate de un index asociat particulelor de biomaterial [99].

În Fig. 3.9, se prezintă schema bloc a procesului de modelare a biomatricii de structură poroasă cu porii sferice, evidențiindu-se parametrii de intrare, precum și parametrii de ieșire ai modelului.

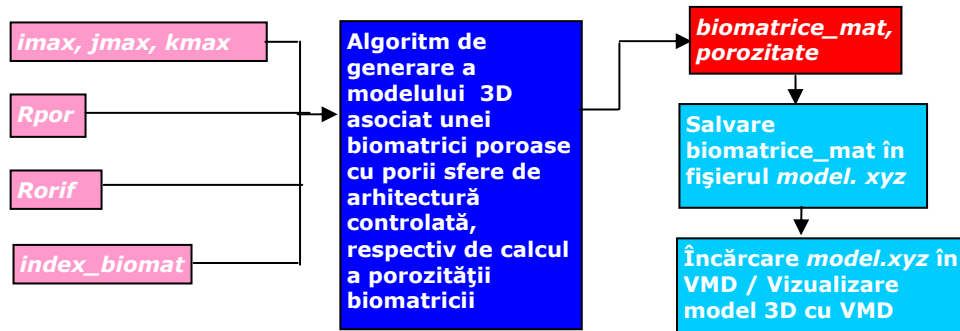


Fig. 3.9. Schema bloc a procesului de modelare a unei biomatrici de structură poroasă cu porii sfere.

În Fig. 3.10, este prezentată vizualizarea în VMD a modelelor asociate unor biomatrici de structură poroasă cu porii sfere de arhitectură controlată [98,99].

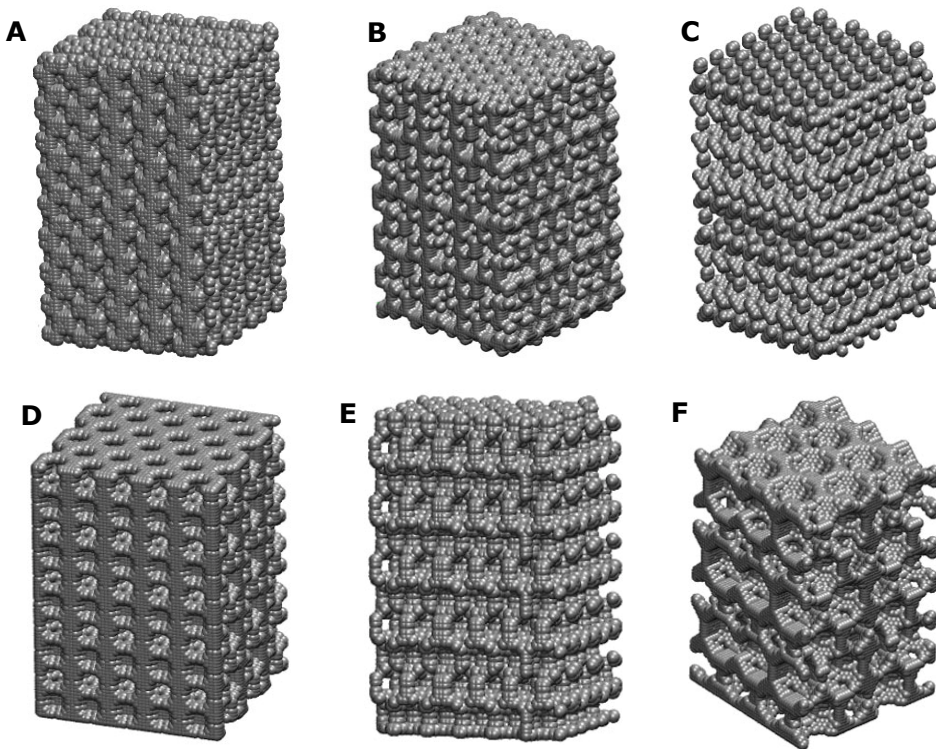


Fig. 3.10. Modele computaționale 3D asociate unor biomatrici poroase cu porii sfere de arhitectură controlată: (A) $R_{por}=3$, $R_{orif}=1$; (B) $R_{por}=4$, $R_{orif}=1$; (C) $R_{por}=4$, $R_{orif}=2$; (D) $R_{por}=5$, $R_{orif}=1$; (E) $R_{por}=5$, $R_{orif}=2$; (F) $R_{por}=8$, $R_{orif}=2$.

Algoritmul de generare a modelului 3D asociat biomatricii de structură poroasă cu porii sfere este prezentat în cele ce urmează, în limbajul pseudocod.

Algoritm Generare Model 3D Biomatrice Cu Pori Sfere

algoritm Generare_Model_3D_Biomatrice_Pori_Sfere **este**:
 {algoritm care generează o matrice tridimensională asociată unei biomatrice de structură poroasă cu porii sfere}

citeste *imax, jmax, kmax, Rpor, Rorif, index_biomat*
 {*imax* - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OZ,
jmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OY,
kmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axei OX,
Rpor - raza porilor reprezentați de sfere,
Rorif - raza orificiilor circulare care conectează porii,
index_biomat - index asociat în model particulelor de biomaterial}

atribuie *margin* >- 10 * *Rpor*
atribuie *im* >- *imax* + *margin*
atribuie *jm* >- *jmax* + *margin*
atribuie *km* >- *kmax* + *margin*
 {extinderea matricii tridimensionale asociate biomatricei poroase,
im, jm, km - numărul maxim de elemente ale matricii extinse, de-a lungul celor 3 axe}

pentru *i* **in** [0, *im-1*] **execută**
pentru *j* **in** [0, *jm-1*] **execută**
pentru *k* **in** [0, *km-1*] **execută**
atribuie *biomat_mat(i,j,k)* <- *index_biomat*
 {*biomat_mat(i,j,k)* - matricea tridimensională extinsă asociată biomatricei de structură poroasă cu porii sfere, inițializată cu particule de biomaterial}

sfârșit pentru
sfârșit pentru
sfârșit pentru
atribuie *R* <- *sqrt(Rpor² - Rorif²)*
 {*R* - raza sferelor plasate concentric cu porii de raza *Rpor*, conectați prin orificiile circulare de raza *Rorif*}

atribuie *Nx* <- *round(im / (2 * R))*
atribuie *Ny* <- *round(jm / (sqrt(3) * R))*
atribuie *Nz* <- *round(km / (2 * sqrt(2/3) * R))*
 {*Nx, Ny, Nz* - numărul de sfere de raza *R* de pe axele OX, OY, OZ}

atribuie *centru* >- *Hexa (<Nx, Ny, Nz, R>)*
 {*Hexa* - funcție care: (i) primește ca și parametrii de intrare numărul de sfere de raza *R* concentrice porilor de pe axele OX, OY, OZ (*Nx, Ny, Nz*), precum și raza sferelor (*R*),
 (ii) calculează coordonatele centrelor sferelor de raza *R*, și
 (iii) returnează o instanță a unei clase (*centru*) ce are ca și variabile membre 3 vectori *X, Y, Z*, în care se memorează coordonatele de pe axele OX, OY, OZ ale centrelor sferelor concentrice porilor din rețeaua hexagonală creată}

atribuie *biomatrice_mat_extinsa* >- *Scrie_Pori (<biomat_mat, im, jm, km, X, Y, Z, R>)*
 {*Scrie_Pori* - funcție care (i) primește ca și parametrii de intrare matricea tridimensională extinsă asociată biomatricei poroase inițializată cu particule de biomaterial (*biomat_mat*), numărul maxim de elemente de pe axele OX, OY, OZ (*im, jm, km*), vectorii ce memorează coordonatele centrelor sferelor concentrice porilor din rețeaua hexagonală creată (*X, Y, Z*) și raza sferelor concentrice porilor (*R*),
 (ii) construiește porii în matricea tridimensională extinsă asociată biomatricei poroase, prin plasarea în elementele acesteia, pe pozițiile determinate de raza sferelor concentrice porilor și de centrele acestora, a particulelor de mediu de

```

    cultură (indecși egali cu valoarea 0), și
    (iii) returnează matricea tridimensională extinsă asociată biomatricii de structură
    poroasă cu porii sfere (biomatrice_mat_extinsa)}
atribuie suma >- 0
    {suma - suma elementelor din matricea asociată biomatricii poroase}
atribuie x0 >- 5 * Rpor + 1
atribuie y0 >- 3 * Rpor + 1
atribuie z0 >- 1 * Rpor + 1
    {x0, y0, z0 - coordonatele elementului din colțul din stânga sus}
pentru i in [z0, z0-1+ imax] execută
    pentru j in [y0, y0-1+ jmax] execută
        pentru k in [x0, x0-1+ kmax] execută
            biomatrice_mat(i - z0, j - y0, k - x0) = biomatrice_mat_extinsa(i, j, k)
            suma += biomatrice_mat(i, j, k)
        sfârșit pentru
    sfârșit pentru
sfârșit pentru
    {biomatrice_mat - matricea tridimensională asociată biomatricii poroase obținută
    prin decuparea matricii extinse la dimensiunea dorită}
atribuie porozitate >- 1 - suma / (index_biomat * imax * jmax * kmax)
    {porozitate - porozitatea biomatricii}
scrie biomatrice_mat, porozitate
sfârșit algoritm

```

3.1.6. Modelarea computațională a unor structuri tisulare artificiale

În cele ce urmează, se prezintă în pseudocod algoritmul dezvoltat pentru generarea modelelor computaționale ale unor structuri tisulare artificiale formate dintr-un sistem multicelular (suspensie sau agregat celular) aflat în vecinătatea unei biomatrici de diferite structuri sau pe suprafața plană a unei plăci de biomaterial de formă paralelipipedică. Având în vedere că atât modelul unei suspensii celulare / agregat celular, cât și modelul unei biomatrici / plăci de biomaterial sunt reprezentate de o matrice tridimensională, modelul computațional asociat sistemelor biologice studiate este reprezentat de asemenea de o matrice tridimensională, obținută prin alipirea celor două matrici de-a lungul axei *OZ*, care reprezintă axa longitudinală a sistemului [99,100,101].

Algoritm Generare Model 3D Sistem Biologic

```

algoritm Modelare_Sistem_Biologic este:
    {algoritm care realizează modelarea unui sistem biologic format dintr-un sistem
    multicelular (agregat celular sau suspensie celulară) aflat în vecinătatea unei
    biomatrici de diferite structuri sau pe suprafața plană a unei plăci de biomaterial }
citeste parametrii geometrici aferenți sistemului biologic
crează modelul computațional 3D asociat sistemului multicelular
    (A_sistem_celular(i,j,k))
crează modelul computațional 3D asociat biomatricii de diferite structuri sau
    biomaterialului de formă paralelipipedică (A_biomatrice/biomaterial(i,j,k))
crează modelul computațional 3D al sistemului biologic prin concatenarea pe

```

```

verticală a celor două matrici ( $A(i,j,k)$ )
pentru  $i$  in  $[0, dz\_scaff - 1]$  execută
  pentru  $j$  in  $[0, dy\_scaff - 1]$  execută
    pentru  $k$  in  $[0, dx\_scaff - 1]$  execută
      { $dx\_scaff, dy\_scaff, dz\_scaff$  - dimensiunile biomatricei / plăcii de
      biomaterial de-a lungul celor 3 axe}
       $A(i, j, k) = A\_biomatrice/biomaterial(i,j,k)$ 
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
 $isusp = 0$ 
pentru  $i$  in  $[dz\_scaff, (dz\_scaff + dz\_susp) - 1]$  execută
   $isusp <- isusp + 1$ 
  pentru  $j$  in  $[0, dy\_susp - 1]$  execută
    pentru  $k$  in  $[0, dx\_susp - 1]$  execută
      { $dx\_susp, dy\_susp, dz\_susp$  - dimensiunile sistemului multicelular de-a
      lungul celor 3 axe}
       $A(i, j, k) = A\_sistem\_celular(isusp-1,j,k)$ 
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
salveaza într-un fișier xyz modelul computațional 3D al sistemului biologic
salveaza într-un fișier txt parametrii de model
sfârșit algoritm

```

Structura de bază a sistemului biologic modelat în spațiu tridimensional este prezentată în Fig. 3.11:

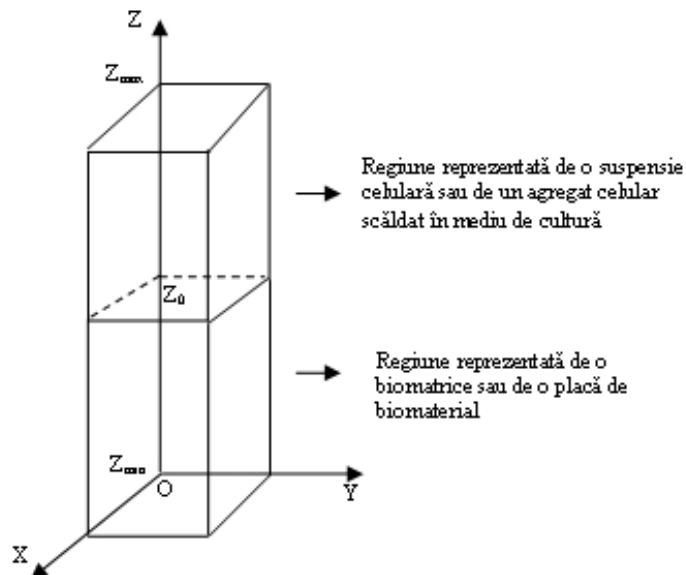
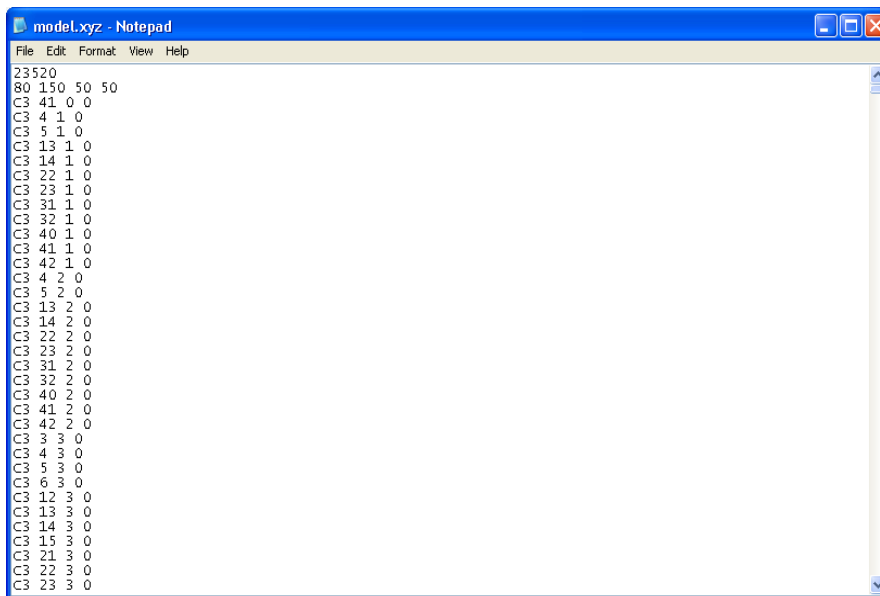


Fig. 3.11. Structura de bază a sistemului biologic modelat în spațiu tridimensional: un sistem multicelular aflat în vecinătatea unei biomatrice / plăci de biomaterial.

În regiunea cuprinsă între Z_{min} și Z_0 se află biomatricea de structură poroasă sau placă de biomaterial de formă paralelipipedică, iar în regiunea cuprinsă între Z_0 și Z_{max} se află suspensia de celule sau agregatul celular scăldat în mediu de cultură.

Elementele matricii tridimensionale asociate sistemului biologic sunt salvate într-un fișier de tipul *xyz*, sub forma: începând de la linia a treia (primele două linii sunt excluse, ele conținând date generale despre model), pe fiecare linie a fișierului se memorează tipul elementului (*C1* – dacă este celulă de tipul 1, *C2* – dacă este celulă de tipul 2, *C3* – dacă este particulă de biomaterial), precum și coordonatele acestuia de-a lungul axelor *OX*, *OY*, *OZ*.

Salvarea configurației sistemului biologic studiat a fost făcută într-un fișier de tipul *xyz*, pentru a fi posibilă vizualizarea sub forma grafică a modelelor computaționale realizate, cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD (Visual Molecular Dynamics). Acest program necesită ca și parametru de intrare un fișier de tip *xyz*, de forma celui prezentat în Fig. 3.12:



```

23520
80 150 50 50
C3 41 0 0
C3 4 1 0
C3 5 1 0
C3 13 1 0
C3 14 1 0
C3 22 1 0
C3 23 1 0
C3 31 1 0
C3 32 1 0
C3 40 1 0
C3 41 1 0
C3 42 1 0
C3 4 2 0
C3 5 2 0
C3 13 2 0
C3 14 2 0
C3 22 2 0
C3 23 2 0
C3 31 2 0
C3 32 2 0
C3 40 2 0
C3 41 2 0
C3 42 2 0
C3 3 3 0
C3 4 3 0
C3 5 3 0
C3 6 3 0
C3 12 3 0
C3 13 3 0
C3 14 3 0
C3 15 3 0
C3 21 3 0
C3 22 3 0
C3 23 3 0

```

Fig. 3.12. Exemplu de fișier de tipul *xyz*, în care e salvată configurația inițială a sistemului

În Fig. 3.13, se pot vizualiza câteva exemple de reprezentări grafice ale modelelor realizate [99,100].

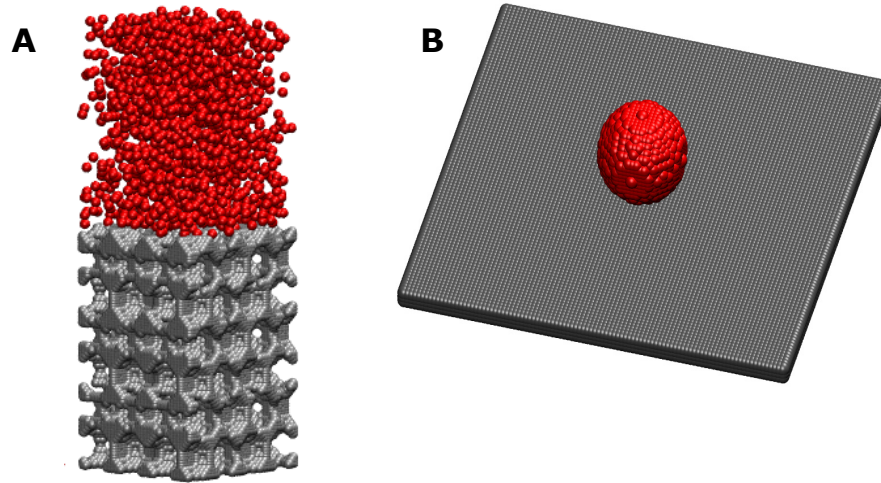


Fig. 3.13. A. Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă; B. Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-un agregat celular situat pe suprafața plană a unui biomaterial de formă paralelipipedică (reprezentat în VMD [1]).

3.2. Algoritmi pentru studiul evoluției sistemelor multicelulare

Simularea evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrici de diferite structuri sau pe suprafața plană a unor plăci de biomaterial s-a făcut pornind de la ipoteza adeziunii diferențiate (DAH) [2], având ca scop minimizarea energiei de adeziune a sistemului multicelular. Pe baza acestui principiu, celulele se vor organiza în structuri care implică formarea unui număr cât mai mare de legături cu vecinii lor (alte tipuri de celule sau particule de biomaterial).

În acest sens, s-au dezvoltat algoritmi bazați pe metoda Metropolis Monte Carlo, care descriu mișcarea celulelor în sistem, astfel încât sistemul să atingă starea de energie minimă.

Energia totală de adeziune a unui sistem alcătuit din t tipuri de celule se poate aduce la forma [5]:

$$E = \sum_{\substack{i,j=0 \\ i < j}}^{t-1} \gamma_{ij} \cdot B_{ij} - \frac{1}{2} n_n \sum_{i=0}^{t-1} N_i \varepsilon_{ii}, \quad (3.1)$$

unde:

- B_{ij} reprezintă numărul total de legături dintre particule de tip i și j
- γ_{ij} este parametrul de tensiune interfacială dintre tipurile de particule i și j , dat de formula:

$$\gamma_{ij} = \frac{1}{2} (\varepsilon_{ii} + \varepsilon_{jj}) - \varepsilon_{ij}, \quad (3.2)$$

- ε_{ii} (ε_{jj}) este o măsură a interacțiunii dintre celulele de tip i (j) (lucrul mecanic necesar pentru a rupe legăturile dintre două celule de același tip)
- ε_{ij} este o măsură a interacțiunii dintre o celulă de tip i și o celulă de tip j (lucrul mecanic necesar pentru a le separa)
- n_n este numărul vecinilor cu care interacționează o celulă oarecare ($n_n = 26$ pe o rețea paralelipedică, cu interacțiuni între vecinii de până la ordinul 3).

Dacă numărul N_i al particulelor de tip, ($i \in \{0, 1, \dots, t-1\}$), rămâne constant, cel de-al doilea termen al ecuației (3.1) nu se modifică în timpul evoluției sistemului, motiv pentru care se poate neglija.

Dacă se ține cont și de interacțiunea celulelor cu particulele biomatrici, energia de adeziune devine [99,100]:

$$E = \sum_{\substack{i,j=0 \\ i < j}}^{t-1} \gamma_{ij} \cdot B_{ij} + \sum_{i=0}^{t-1} \gamma_{is} \cdot B_{is}, \quad (3.3)$$

unde:

- B_{ij} reprezintă numărul total de legături dintre particule de tip i și j
- γ_{ij} este parametrul de tensiune interfacială dintre tipurile de particule i și j (ecuația (3.2))
- B_{is} reprezintă numărul de legături stabilite între celule de tip $i \in \{0, 1, \dots, t-1\}$ și substrat
- γ_{is} este parametrul de tensiune interfacială celulă - substrat, dat de formula:

$$\gamma_{is} = \frac{1}{2} \varepsilon_{ii} - \varepsilon_{is}, \quad (3.4)$$

- ε_{ii} este o măsură a interacțiunii dintre celulele de tip i
- ε_{is} este o măsură a interacțiunii dintre o celulă de tip i și substrat.

În cazul unui sistem format dintr-un singur tip de celule, primul termen al ecuației (3.3) devine 0, evoluția sistemului celular fiind guvernată doar de parametrul de tensiune interfacială celulă - substrat, γ_{is} .

O mișcare elementară în sistem este reprezentată de interschimbarea dintre o celulă aleasă aleator, cu o particulă de volum din mediul de cultură sau cu o celulă de alt tip, din vecinătatea ei, de asemenea aleasă aleator. Mișcarea este acceptată cu o probabilitate [5,100]:

$$P = \min(1, \exp(-\Delta E / E_T)), \quad (3.5)$$

unde:

- ΔE este diferența dintre energia de adeziune a sistemului după efectuarea mișcării și energia de adeziune a sistemului înaintea efectuării mișcării

- E_T este echivalentul biologic al energiei de agitație termică, o măsură a motilității celulare.

Simularea evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrici de diferite structuri sau pe suprafața plană a unor plăci de biomaterial constă în rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo (MCS – Monte Carlo Step), iar un pas Monte Carlo reprezintă secvența de operații care oferă fiecărei celule șansa de a efectua o mișcare [99,100,101,103].

3.2.1. Algoritmi bazați pe adeziune

Având în vedere că celulele sunt atrase între ele prin intermediul unor forțe de coeziune, iar pe de altă parte sunt atrase de substrat prin intermediul unor forțe de adeziune, primul pas constă în preluarea de la tastatură a parametrilor energetici care descriu măsura interacțiunii dintre aceste elemente, a numărului de pași Monte Carlo ce se doresc a fi rulați în simulare, respectiv a numărului de pași Monte Carlo după care se dorește să se salveze periodic configurația sistemului. S-a considerat că suspensia celulară sau agregatul celular din cadrul sistemului pot fi formate din maxim două tipuri de celule și că interacțiunea dintre celule și mediul de cultură este nulă.

Pe baza parametrilor energetici preluați, se calculează tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului (substrat și mediu, substrat și celulă de tipul 1, substrat și celulă de tipul 2, mediu și celulă de tipul 1, mediu și celulă de tipul 2, respectiv celulă de tipul 1 și celulă de tipul 2).

Algoritmul simulării evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrici de diferite structuri sau pe suprafața plană a unor biomateriale este prezentat în limbajul pseudocod, în cele ce urmează.

Algoritm Simulare Evoluție Sistem Multicelular

algoritm Simulare_Evoluție_Sistem_Multicelular **este:**
 {algoritm care realizează simularea Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale, constând în rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo}
citeste nr_MCS , pas_es , ϵ_{s0} , ϵ_{s1} , ϵ_{s2} , ϵ_{01} , ϵ_{02} , ϵ_{12} , ϵ_{00} , ϵ_{11} , ϵ_{22}
 { nr_MCS – numărul de pași Monte Carlo care se doresc rulați în simulare,
 pas_es – numărul de pași Monte Carlo după care se dorește salvarea noii configurații a sistemului,
 ϵ_{s0} , ϵ_{s1} , ϵ_{s2} , ϵ_{01} , ϵ_{02} , ϵ_{12} , ϵ_{00} , ϵ_{11} , ϵ_{22} – parametrii energetici care descriu interacțiunea dintre diferitele elemente ale sistemului}
 $\gamma_{s0} <- \epsilon_{00} / 2 - \epsilon_{s0}$
 $\gamma_{s1} <- \epsilon_{11} / 2 - \epsilon_{s1}$
 $\gamma_{s2} <- \epsilon_{22} / 2 - \epsilon_{s2}$
 $\gamma_{01} <- (\epsilon_{00} + \epsilon_{11}) / 2 - \epsilon_{01}$
 $\gamma_{02} <- (\epsilon_{00} + \epsilon_{12}) / 2 - \epsilon_{02}$
 $\gamma_{12} <- (\epsilon_{11} + \epsilon_{22}) / 2 - \epsilon_{12}$
 { γ_{s0} – tensiunea interfacială dintre substrat și mediu,
 γ_{s1} – tensiunea interfacială dintre substrat și celulă de tipul 1,
 γ_{s2} – tensiunea interfacială dintre substrat și celulă de tipul 2,
 γ_{01} – tensiunea interfacială dintre mediu și celulă de tipul 1,

γ_{02} – tensiunea interfacială dintre mediu și celulă de tipul 2,
 γ_{12} – tensiunea interfacială dintre celulă de tipul 1 și celulă de tipul 2}
 {în cazul în care s-au rulat un număr de pași Monte Carlo, dar configurația finală nu este satisfăcătoare, algoritmul permite rularea unui număr mai mare de pași Monte Carlo, pornind de la ultima configurație obținută}

calculează în *nr_fisiere_xyz* numărul de fișiere *xyz* în care sunt salvate configurațiile sistemului după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo

dacă *nr_fisiere_xyz* > 0 **atunci**

citeste din ultimul fișier *xyz* în matricea tridimensională $A(i,k,j)$ configurația sistemului obținută după rularea unui număr de pași Monte Carlo specificați în simularea anterioară

MCS_contor <- *nr_MCS_ant* + 1

{*MCS_contor* – contorul pașilor Monte Carlo rulați,
nr_MCS_ant – numărul de pași Monte Carlo rulați în simularea anterioară}

apelează funcția *Calcul_Energie_Totala_Adeziune*
 {funcția *Calcul_Energie_Totala_Adeziune* – calculează energia inițială (*En*) a sistemului reprezentat de configurația primită ca și parametru}

Evec(nr_MCS_ant) <- *En*

{*Evec* – vectorul în care se salvează energiile sistemului după rularea fiecărui pas Monte Carlo}

altfel

citeste din fișierul *xyz* în care este salvat modelul sistemului biologic în stare inițială, în matricea tridimensională $A(i,k,j)$, configurația sistemului în stare inițială, înainte de rularea pașilor Monte Carlo

MCS_contor <- 1

apelează funcția *Calcul_Energie_Totala_Adeziune*
 {funcția *Calcul_Energie_Totala_Adeziune* – calculează energia inițială (*En*) a sistemului reprezentat de configurația primită ca și parametru}

Evec(0) <- *En*

sfârșit dacă

câtă vreme *MCS_contor* < *nr_MCS* **execută**

apelează funcția *Detectare_Celule_Migrare*
 {funcția *Detectare_Celule_Migrare* determină numărul de celule care pot migra și coordonatele acestora, pe configurația sistemului primită ca și parametru}

apelează funcția *Metropolis_Monte_Carlo*
 {funcția *Metropolis_Monte_Carlo* constă într-o secvență de operații specifice rulării unui pas Monte Carlo}

salvează în $A(i,j,k)$ noua configurație a sistemului biologic obținută după rularea unui pas Monte Carlo

salvează în *En* energia de adeziune a noii configurații

Evec(MCS_contor) <- *En*

dacă *MCS_contor* Modulo *pas_es* == 0 **atunci**

salvează într-un fișier *xyz* configurația curentă a sistemului

afisează pe ecran numărul de pași Monte Carlo rulați până în prezent și incrementează valoarea ProgressBar-ului

dacă sistemul biologic e format dintr-un agregat celular situat pe suprafața plană a unui biomaterial de formă paralelipipedică **atunci**

calculează *nr_leg12*, *nr_leg1s*, *nr_leg2s*
 {*nr_leg12* - numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 din configurația curentă,

```

nr_leg1s - numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat din
configurația curentă
nr_leg2s - numărul de legături dintre celulele de tip 2 și substrat din
configurația curentă}
salvează într-un fișier text numărul de legături calculate mai sus, pentru
configurația obținută după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo
sfârșit dacă
sfârșit dacă
MCS_contor <- MCS_contor + 1
sfârșit câtă vreme
salvează într-un fișier text vectorul Evec
salvează într-un fișier text parametrii simulării
afișează pe ecran durata simulării (zile, ore, minute, secunde)
sfârșit algoritm

```

În cadrul unei simulări, configurațiile sistemului se salvează periodic în fișiere de tipul xyz, după fiecare rulare a unui număr de pași Monte Carlo prefixat, putându-se astfel monitoriza evoluția sistemului biologic.

Pe configurația inițială a sistemului, înainte de efectuarea oricărei mișcări celulare, se va calcula energia totală de adeziune a sistemului. Algoritmul dezvoltat pentru calculul energiei de adeziune a sistemului permite determinarea cu ușurință a numărului de vecini de până în ordinul 3, de tip particulă de biomaterial, particulă de mediu, celulă de tipul 1, respectiv celulă de tipul 2 ai elementului curent.

Acest calcul are la bază o alegere strategică a valorilor pentru indecșii care reprezintă elementele sistemului: particulă de biomaterial – 10 000, particulă de mediu – 0, celulă de tipul 1 – 1, celulă de tipul 2 – 100. Algoritmul de calcul a energiei de adeziune a sistemului este prezentat în limbajul pseudocod în continuare.

Algoritm Calcul Energie Totală de Adeziune

```

algoritm Calcul_Energie_Totala_Adeziune este:
{algoritm care calculează energia totală de adeziune a sistemului multicelular}
citește  $A(,,)$ ,  $imax$ ,  $jmax$ ,  $kmax$ ,  $\gamma_{s0}$ ,  $\gamma_{s1}$ ,  $\gamma_{s2}$ ,  $\gamma_{01}$ ,  $\gamma_{02}$ ,  $\gamma_{12}$ ,  $indexp$ ,  $index1$ ,  $index2$ ,
 $indexm$ 
{ $A(,,)$  – matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
 $imax$ ,  $jmax$ ,  $kmax$  - numărul maxim de elemente de-a lungul axelor  $OZ$ ,  $OY$ ,  $OX$ ,
 $\gamma_{s0}$ ,  $\gamma_{s1}$ ,  $\gamma_{s2}$ ,  $\gamma_{01}$ ,  $\gamma_{02}$ ,  $\gamma_{12}$  - tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale
sistemului,
 $indexp$  – indexul asociat particulelor de biomaterial = 10 000,
 $index1$  – indexul asociat celulelor de tipul 1 = 1,
 $index2$  – indexul asociat celulelor de tipul 2 = 100,
 $indexm$  – indexul asociat particulelor de mediu = 0}
atribuie  $B_{s0}$  <- 0
atribuie  $B_{s1}$  <- 0
atribuie  $B_{s2}$  <- 0
atribuie  $B_{01}$  <- 0
atribuie  $B_{02}$  <- 0
atribuie  $B_{12}$  <- 0
{ $B_{s0}$ ,  $B_{s1}$ ,  $B_{s2}$ ,  $B_{01}$ ,  $B_{02}$ ,  $B_{12}$  – numărul de legături dintre diferite elemente ale
sistemului}

```

```

pentru i in [1, imax - 2] execută
  pentru j in [1, jmax - 2] execută
    pentru k in [1, kmax-2] execută
      {am neglijat straturile periferice}
        calculează in sum suma indecșilor celor 26 de vecini ai elementului de
        coordonate (i,j,k)
        atribuie nr_sub <- sum / indexp
        {nr_sub – numărul particulelor de biomaterial din jurul elementului de
        coordonate (i,j,k)}
        atribuie nr_cel2 <- (sum - nr_sub * indexp)/index2
        {nr_cel2 – numărul celulelor de tipul 2 din jurul elementului de coordonate
        (i,j,k)}
        atribuie nr_cel1 <- sum - nr_sub * indexp - nr_cel2 * index2
        {nr_cel1 – numărul celulelor de tipul 1 din jurul elementului de coordonate
        (i,j,k); această formulă este valabilă, având în vedere că particulele de mediu
        au asociată valoarea 0}
        atribuie nr_mediu <- 26 - nr_sub - nr_cel2 - nr_cel1
        {nr_mediu – numărul particulelor de mediu din jurul elementului de
        coordonate (i,j,k)}

      dacă A(i,j,k) == indexm atunci
        {dacă elementul curent este particula de mediu, atunci actualizează numărul
        de legături cu particulele de biomaterial, celulele de tipul 1 și celulele de
        tipul 2}
          Bs0 <- Bs0 + nr_sub
          B01 <- B01 + nr_cel1
          B02 <- B02 + nr_cel2
        sfârșit dacă
      dacă A(i,j,k) == index1 atunci
        {dacă elementul curent este celula de tipul 1, atunci actualizează numărul de
        legături cu particulele de biomaterial, particulele de mediu și celulele de
        tipul 2}
          Bs1 <- Bs1 + nr_sub
          B01 <- B01 + nr_mediu
          B12 <- B12 + nr_cel2
        sfârșit dacă
      dacă A(i,j,k) == index2 atunci
        {dacă elementul curent este celula de tipul 2, atunci actualizează numărul
        de legături cu particulele de biomaterial, particulele de mediu și celulele
        de tipul 1}
          Bs2 <- Bs2 + nr_sub
          B02 <- B02 + nr_mediu
          B12 <- B12 + nr_cel1
        sfârșit dacă

    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
  {elimină duplicatele; legăturile cu substratul nu au fost numărate de două ori}
  B01 = B01 / 2
  B02 = B02 / 2
  B12 = B12 / 2
  {calculează energia totală de adeziune a sistemului, En}

```

$$En = B_{s0} * \gamma_{s0} + B_{s1} * \gamma_{s1} + B_{s2} * \gamma_{s2} + B_{01} * \gamma_{01} + B_{02} * \gamma_{02} + B_{12} * \gamma_{12}$$

scrie En
sfârșit algoritm

Secvența de operații aferentă rulării unui pas Monte Carlo presupune, într-o primă fază, detectarea tuturor celulelor din sistem care au posibilitatea să migreze. O mișcare presupune interschimbarea poziției unei celule cu cea a unui vecin de maxim ordinul 3, de alt tip. Se consideră că celulele de tipul 2 au posibilitatea să migreze în locul oricăruia dintre cei 26 de vecini reprezentați de celule de tipul 1 sau particule de mediu de cultură, în timp ce celulele de tipul 1 au posibilitatea să migreze doar în locul vecinilor reprezentați de particule de mediu (pentru a se evita ca o celulă de un anumit tip să își schimbe poziția cu o celulă de alt tip de două ori). Algoritmul aferent determinării numărului de celule care au posibilitatea să realizeze o mișcare și a coordonatelor acestora este prezentat în pseudocod în cele ce urmează.

Algoritm Detectare Celule Capabile de Migrare

algoritm Detectare_Celule_Migrare **este**:
{algoritm care determină celulele din sistem care au posibilitatea să migreze}
citește A(,,), imax, jmax, kmax, nr_celule, indexp, index1, index2, indexm
{A(,,) – matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
imax, jmax, kmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axelor OZ, OY, OX,
nr_celule - numărul total de celule din sistem
indexp - indexul asociat particulelor de biomaterial = 10 000,
index1 - indexul asociat celulelor de tipul 1 = 1,
index2 - indexul asociat celulelor de tipul 2 = 100,
indexm - indexul asociat particulelor de mediu = 0}
atribuie nr_cel_migrare <- 0
pentru i **in** [0, nr_celule - 1] **execută**
 atribuie I(i) <- 0
 atribuie J(i) <- 0
 atribuie K(i) <- 0
 {I, J, K - vectori în care se memorează coordonatele fiecărei celule care poate migra,
 nr_cel_migrare - numărul celulelor care pot migra}
sfârșit pentru
{Pentru a evita complicațiile în calculul schimbărilor energetice, am setat marginile efective la al treilea rând și coloana matricii. În stare inițială, nu am plasat celule în afara acestora, astfel singurul lucru care trebuie făcut este să construim un algoritm care să permită celulelor situate pe aceste margini să poată migra doar în locurile ocupate de mediu din regiunea interioară}
pentru i **in** [2, imax - 3] **execută**
 pentru j **in** [2, jmax - 3] **execută**
 pentru k **in** [2, kmax - 3] **execută**
 calculează in sum suma indecșilor celor 26 de vecini ai elementului de coordonate (i, j, k)
 atribuie nr_sub <- sum / indexp
 {nr_sub - numărul particulelor de biomaterial din jurul elementului de coordonate (i, j, k)}
 atribuie nr_cel2 <- (sum - nr_sub * indexp) / index2

```

{nr_cel2 – numărul celulelor de tipul 2 din jurul elementului de coordonate
(i,j,k)}
atribuie nr_cel1 <- sum – nr_sub * indexp – nr_cel2 * index2
{nr_cel1 – numărul celulelor de tipul 1 din jurul elementului de coordonate
(i,j,k); această formulă este valabilă, având în vedere că particulele de mediu
au asociată valoarea 0}
atribuie nr_mediu <- 26 – nr_sub – nr_cel2 – nr_cel1
{nr_mediu – numărul particulelor de mediu din jurul elementului de
coordonate (i,j,k)}
dacă A(i,j,k) == index2 atunci
{dacă elementul curent este celula de tipul 2}
dacă sum <> 26 * index2 atunci
{dacă există între vecini celule de tipul 1 sau particule de mediu, se
încreează numărul de celule care pot migra și se salvează
coordonatele acestora}
I(nr_cel_migrare) = i
J(nr_cel_migrare) = j
K(nr_cel_migrare) = k
nr_cel_migrare = nr_cel_migrare + 1
sfârșit dacă
altfel
{dacă elementul curent este celula de tipul 1}
dacă nr_mediu <> 0 atunci
{dacă există între vecini particule de mediu, se încreează
numărul de celule care pot migra și se salvează coordonatele acestora}
I(nr_cel_migrare) = i
J(nr_cel_migrare) = j
K(nr_cel_migrare) = k
nr_cel_migrare = nr_cel_migrare + 1
sfârșit dacă
sfârșit dacă
sfârșit pentru
sfârșit pentru
sfârșit pentru
scrie nr_cel_migrare, I,J,K
sfârșit algoritm

```

După ce lista celulelor care pot migra este creată, se parcurg toate aceste celule într-o ordine aleatoare, determinându-se, pentru fiecare, lista vecinilor care permit mișcarea.

Dat fiind că indexul asociat unei particule de mediu este 0, indexul asociat unei celule de tipul 1 este 1, indexul asociat unei celule de tipul 2 este 100 și indexul asociat unei particule de biomaterial este 10 000, pentru a asigura ca celulele de tipul 2 să își poată schimba poziția doar cu vecini celule de tipul 1 sau particule de mediu, iar celulele de tipul 1 să își poată schimba poziția doar cu vecini particule de mediu, am permis celulelor să își schimbe poziția doar cu elemente din vecinătatea lor care au valoarea indecșilor mai mică decât a lor.

Algoritmul care determină numărul vecinilor unei celule care îndeplinesc condițiile necesare pentru efectuarea unei mișcări, precum și coordonatele acestora, este prezentat mai jos.

Algoritm Detectare Vecini Disponibili pentru Migrare

algoritm Detectare_Vecini_Disponibili_Migrare **este**:
 {algoritm care detectează vecinii de maxim ordinul 3, în locul cărora se poate muta celula}

citește $A(,,)$, $imax$, $jmax$, $kmax$, i , j , k
 { $A(,,)$ – matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
 $imax$, $jmax$, $kmax$ – numărul maxim de elemente de-a lungul axelor OZ , OY , OX ,
 i , j , k – coordonatele celulei pentru care se determină lista vecinilor disponibili}

atribuie $nrv \leftarrow 0$
pentru i **in** $[0, 25]$ **execută**
 atribuie $IV(i) \leftarrow 0$
 atribuie $JV(i) \leftarrow 0$
 atribuie $KV(i) \leftarrow 0$
 { IV, JV, KV – vectori în care se memorează coordonatele vecinilor disponibili,
 nrv – numărul vecinilor disponibili}

sfârșit pentru
dacă $(i > 2$ **și** $i < (imax-3))$ **și** $(j > 2$ **și** $j < (jmax-3))$ **și** $(k > 2$ **și** $k < (kmax-3))$
 parcurge toți vecinii de ordinul 3 ai celulei de coordonate (i, j, k) **și verifică**
 dacă $(A(i_vecin, j_vecin, k_vecin) < A(i, j, k))$ **atunci**
 { $i_vecin, j_vecin, k_vecin$ – coordonatele vecinului celulei;
 dacă indexul asociat vecinului celulei are valoare mai mică decât indexul
 celulei, vecinul respectiv se consideră disponibil pentru interschimbare}
 $IV(nrv) = i_vecin$
 $JV(nrv) = j_vecin$
 $KV(nrv) = k_vecin$
 $nrv = nrv + 1$
 sfârșit dacă

altfel
 {dacă celula se află chiar pe margine ($i=2$ sau $i=imax-3$; $j=2$ sau $j=jmax-3$; $k=2$
 sau $k=kmax-3$), se consideră vecini disponibili doar cei din regiunea interioară
 marginii}

parcurge toți vecinii de ordinul 3 ai celulei de coordonate (i, j, k) **și verifică**
dacă $(A(i_vecin, j_vecin, k_vecin) < A(i, j, k))$ **și** $((i_vecin > 1)$ **și** $(i_vecin < imax-$
 $2))$ **și** $((j_vecin > 1)$ **și** $(j_vecin < jmax-2))$ **și** $((k_vecin > 1)$ **și** $(k_vecin < kmax-$
 $2))$ **atunci**
 $IV(nrv) = i_vecin$
 $JV(nrv) = j_vecin$
 $KV(nrv) = k_vecin$
 $nrv = nrv + 1$
sfârșit dacă

sfârșit dacă
scrie nrv, IV, JV, KV
sfârșit algoritm

După ce lista vecinilor disponibili ai celulei curent selectate este creată, se alege în mod aleator unul dintre acești vecini și se realizează interschimbarea poziției celor două elemente. Pentru a se decide dacă această mișcare se acceptă sau nu, se calculează energia de adeziune în zona afectată, atât pe configurația nouă, de după efectuarea mișcării, cât și pe configurația veche, de dinaintea efectuării mișcării. Zona afectată implică regiunile reprezentate de celula selectată

pentru migrare și cei 26 de vecini ai săi, respectiv vecinul selectat cu care se încearcă interschimbarea și cei 26 de vecini ai săi. Calculul energiei în zona afectată se face cu ajutorul următorului algoritm:

Algoritm Calcul Energie de Adeziune în Zona Afectată

algoritm Calcul_Energie_Adeziune_Zona_Afectata **este**:
 {algoritm care calculează energia de adeziune în zona afectată}
citeste $A(,,)$, $imax$, $jmax$, $kmax$, γ_{s0} , γ_{s1} , γ_{s2} , γ_{01} , γ_{02} , γ_{12} , i , j , k , i_0 , j_0 , k_0 , $indexp$,
 $index1$, $index2$, $indexm$
 { $A(,,)$ – matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
 $imax$, $jmax$, $kmax$ - numărul maxim de elemente de-a lungul axelor OZ , OY , OX ,
 γ_{s0} , γ_{s1} , γ_{s2} , γ_{01} , γ_{02} , γ_{12} - tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului,
 i , j , k - coordonatele elementului care încearcă să migreze,
 i_0 , j_0 , k_0 - coordonatele vecinului cu care se încearcă interschimbarea,
 $indexp$ – indexul asociat particulelor de biomaterial = 10 000,
 $index1$ – indexul asociat celulelor de tipul 1 = 1,
 $index2$ – indexul asociat celulelor de tipul 2 = 100,
 $indexm$ – indexul asociat particulelor de mediu = 0}

atribuie $B_{s0i} <- 0$
atribuie $B_{s1i} <- 0$
atribuie $B_{s2i} <- 0$
atribuie $B_{01i} <- 0$
atribuie $B_{02i} <- 0$
atribuie $B_{12i} <- 0$

atribuie $B_{s0i_0} <- 0$
atribuie $B_{s1i_0} <- 0$
atribuie $B_{s2i_0} <- 0$
atribuie $B_{01i_0} <- 0$
atribuie $B_{02i_0} <- 0$
atribuie $B_{12i_0} <- 0$

{ B_{s0i} , B_{s1i} , B_{s2i} , B_{01i} , B_{02i} , B_{12i} – numărul de legături dintre vecinii elementului de pe poziția (i,j,k) din zona afectată și elementul de pe poziția (i,j,k) ,
 B_{s0i_0} , B_{s1i_0} , B_{s2i_0} , B_{01i_0} , B_{02i_0} , B_{12i_0} – numărul de legături dintre vecinii elementului de pe poziția (i_0,j_0,k_0) din zona afectată și elementul de pe poziția (i_0,j_0,k_0) }

calculează în sum_i suma indecșilor celor 26 de vecini ai elementului de coordonate (i,j,k)
atribuie $nr_sub <- sum_i / indexp$
 { nr_sub – numărul particulelor de biomaterial din jurul elementului de coordonate (i,j,k) }

atribuie $nr_cel2 <- (sum_i - nr_sub * indexp) / index2$
 { nr_cel2 – numărul celulelor de tipul 2 din jurul elementului de coordonate (i,j,k) }

atribuie $nr_cel1 <- sum_i - nr_sub * indexp - nr_cel2 * index2$
 { nr_cel1 – numărul celulelor de tipul 1 din jurul elementului de coordonate (i,j,k) ; această formulă este valabilă, având în vedere că particulele de mediu au asociată valoarea 0}

atribuie $nr_mediu <- 26 - nr_sub - nr_cel2 - nr_cel1$
 { nr_mediu – numărul particulelor de mediu din jurul elementului de coordonate (i,j,k) }

calculează în sum_i_0 suma indecșilor celor 26 de vecini ai elementului de

```

coordonate  $(i_0, j_0, k_0)$ 
atribuie  $nr\_sub_0 <- sum\_i_0 / indexp$ 
{ $nr\_sub_0$  – numărul particulelor de biomaterial din jurul elementului de
  coordonate  $(i_0, j_0, k_0)$ }
atribuie  $nr\_cel2_0 <- (sum\_i_0 - nr\_sub_0 * indexp) / index2$ 
{ $nr\_cel2_0$  – numărul celulelor de tipul 2 din jurul elementului de coordonate
   $(i_0, j_0, k_0)$ }
atribuie  $nr\_cel1_0 <- sum\_i_0 - nr\_sub_0 * indexp - nr\_cel2_0 * index2$ 
{ $nr\_cel1_0$  – numărul celulelor de tipul 1 din jurul elementului de coordonate
   $(i_0, j_0, k_0)$ ; această formulă este valabilă, având în vedere că particulele de mediu
  au asociată valoarea 0}
atribuie  $nr\_mediu <- 26 - nr\_sub_0 - nr\_cel2_0 - nr\_cel1_0$ 
{ $nr\_mediu$  – numărul particulelor de mediu din jurul elementului de coordonate
   $(i_0, j_0, k_0)$ }

dacă  $A(i, j, k) == indexm$  atunci
{dacă elementul de pe poziția  $(i, j, k)$  este particula de mediu, atunci actualizează
  numărul de legături cu particulele de biomaterial, celulele de tipul 1 și celulele de
  tipul 2}
   $B_{s0i} <- B_{s0i} + nr\_sub$ 
   $B_{01i} <- B_{01i} + nr\_cel1$ 
   $B_{02i} <- B_{02i} + nr\_cel2$ 
sfârșit dacă

dacă  $A(i, j, k) == index1$  atunci
{dacă elementul de pe poziția  $(i, j, k)$  este célula de tipul 1, atunci actualizează
  numărul de legături cu particulele de biomaterial, particulele de mediu și celulele
  de tipul 2}
   $B_{s1i} <- B_{s1i} + nr\_sub$ 
   $B_{01i} <- B_{01i} + nr\_mediu$ 
   $B_{12i} <- B_{12i} + nr\_cel2$ 
sfârșit dacă

dacă  $A(i, j, k) == index2$  atunci
{dacă elementul de pe poziția  $(i, j, k)$  este célula de tipul 2, atunci actualizează
  numărul de legături cu particulele de biomaterial, particulele de mediu și celulele
  de tipul 1}
   $B_{s2i} <- B_{s2i} + nr\_sub$ 
   $B_{02i} <- B_{02i} + nr\_mediu$ 
   $B_{12i} <- B_{12i} + nr\_cel1$ 
sfârșit dacă

dacă  $A(i_0, j_0, k_0) == indexm$  atunci
{dacă elementul de pe poziția  $(i_0, j_0, k_0)$  este particula de mediu, atunci
  actualizează
  numărul de legături cu particulele de biomaterial, celulele de tipul 1 și celulele de
  tipul 2}
   $B_{s0i_0} <- B_{s0i_0} + nr\_sub_0$ 
   $B_{01i_0} <- B_{01i_0} + nr\_cel1_0$ 
   $B_{02i_0} <- B_{02i_0} + nr\_cel2_0$ 
sfârșit dacă

dacă  $A(i_0, j_0, k_0) == index1$  atunci
{dacă elementul de pe poziția  $(i_0, j_0, k_0)$  este célula de tipul 1, atunci actualizează
  numărul de legături cu particulele de biomaterial, particulele de mediu și celulele
  de tipul 2}

```

```

    Bs1i0 <- Bs1i0 + nr_sub0
    B01i0 <- B01i0 + nr_mediu0
    B12i0 <- B12i0 + nr_cel20
sfârșit dacă
dacă A(i0,j0,k0) == index2 atunci
  {dacă elementul de pe poziția (i0,j0,k0) este celula de tipul 2, atunci actualizează
   numărul de legături cu particulele de biomaterial, particulele de mediu și celulele
   de tipul 1}
    Bs2i0 <- Bs2i0 + nr_sub0
    B02i0 <- B02i0 + nr_mediu0
    B12i0 <- B12i0 + nr_cel10
sfârșit dacă

  {elimină numărarea dublă a legăturilor dintre elementele de pe poziția (i,j,k) și
   (i0,j0,k0)}
  iplusio = A(i, j, k) + A(i0, j0, k0)
dacă iplusio == index1 atunci
    B01i0 <- B01i0 - 1
sfârșit dacă
dacă iplusio == index2 atunci
    B02i0 <- B02i0 - 1
sfârșit dacă
dacă iplusio == index1 + index2 atunci
    B12i0 <- B12i0 - 1
sfârșit dacă

  {calculează energia de adeziune în zona afectată, Enaf}
  Enaf = (Bs0i + Bs0i0) * γs0 + (Bs1i + Bs1i0) * γs1 + (Bs2i + Bs2i0) * γs2 + (B01i + B01i0) *
  γ01 + (B02i + B02i0) * γ02 + (B12i + B12i0) * γ12.
scrie Enaf
sfârșit algoritm

```

Pentru ca programul de simulare a evoluției sistemelor multicelulare care implementează acești algoritmi să fie cât mai rapid, nu s-a calculat energia totală de adeziune a sistemului pentru fiecare încercare de migrare, ci doar energia în zona afectată de schimbarea celor două elemente.

În continuare, se face diferența dintre cele două energii calculate, ΔE . Dacă aceasta este mai mică sau egală cu 0, înseamnă ca noua energie în zona afectată este mai mică sau egală cu vechea energie în zona afectată, ca urmare mișcarea este acceptată. În caz contrar, se generează un număr aleator cuprins

între 0 și 1, iar dacă acesta este mai mic decât $\exp\left(-\frac{\Delta E}{E_T}\right)$ se acceptă mișcarea,

altfel se respinge. Cu alte cuvinte, mișcarea este acceptată cu o probabilitate

$P = \min\left(1, \exp\left(-\frac{\Delta E}{E_T}\right)\right)$. Dacă mișcarea este acceptată, se actualizează matricea

asociată sistemului, precum și energia de adeziune a acestuia. Algoritmul Metropolis Monte Carlo propriuzis este prezentat mai jos [104]:

Algoritm Metropolis Monte Carlo

algoritm Metropolis_Monte_Carlo **este**:
 {algoritm bazat pe metoda Metropolis Monte Carlo; permite fiecărei celule din sistem să facă o mișcare, în așa fel încât sistemul celular să atingă starea de energie de adeziune minimă; algoritmul descrie secvența de operații specifice unui pas Monte Carlo}

citeste $A(,,)$, $imax$, $jmax$, $kmax$, γ_{s0} , γ_{s1} , γ_{s2} , γ_{01} , γ_{02} , γ_{12} , $nr_cel_migrare$, I , J , K , En
 { $A(,,)$ – matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
 $imax$, $jmax$, $kmax$ - numărul maxim de elemente de-a lungul axelor OZ , OY , OX ,
 γ_{s0} , γ_{s1} , γ_{s2} , γ_{01} , γ_{02} , γ_{12} - tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului,
 $nr_cel_migrare$ - numărul de celule din configurația curentă care au posibilitatea să migreze,
 I , J , K - vectorii care conțin coordonatele acestora}

pentru i **în** $[0, imax - 1]$ **execută**
pentru j **în** $[0, jmax - 1]$ **execută**
pentru k **în** $[0, kmax - 1]$ **execută**
 $Anew(i,j,k) <- A(i,j,k)$
 $Aold(i,j,k) <- A(i,j,k)$
 { $Aold(,,)$ – matricea asociată sistemului, înainte de interschimbare
 $Anew(,,)$ – matricea asociată sistemului, după interschimbare}

sfârșit pentru
sfârșit pentru
sfârșit pentru
 $Eold <- En$
 $Enew <- En$
 { $Eold$ – energia de adeziune a sistemului, înainte de interschimbare,
 $Enew$ – energia de adeziune a sistemului, după interschimbare}

$vp <- randperm(nr_cel_migrare)$
 {apelează funcția $randperm$ care returnează un vector (vp), a cărui elemente sunt numere de la 0 la $nr_cel_migrare - 1$ în ordine aleatoare}

pentru q **în** $[0, nr_cel_migrare - 1]$ **execută**
 $i = I(vp(q))$
 $j = J(vp(q))$
 $k = K(vp(q))$
 {se selectează o celulă în mod aleator, i, j, k fiind coordonatele ei}

apelează funcția $Detectare_Vecini_Disponibili_Migrare$
 (funcția $Detectare_Vecini_Disponibili_Migrare$ returnează în variabila nrv numărul de vecini cu care celula își poate schimba poziția și în vectorii IV , JV , KV coordonatele acestora)

selectează aleator unul dintre vecini cu ajutorul funcției $Rnd()$ în variabila $target$
 și salvează coordonatele acestuia în i_0, j_0, k_0
 $i_0 = IV(target)$
 $j_0 = JV(target)$
 $k_0 = KV(target)$
 { i_0, j_0, k_0 - coordonatele noii poziții a celulei ($target$)}

$Anew(i, j, k) = Aold(i_0, j_0, k_0)$
 $Anew(i_0, j_0, k_0) = Aold(i, j, k)$
 {mută celula din poziția (i, j, k) în poziția (i_0, j_0, k_0) }

apelează funcția $Calcul_Energie_Adeziune_Zona_Afectată$ pentru noua

configurație a sistemului *Anew*
 {această funcție calculează energia de adeziune în zona afectată pe noua configurație a sistemului obținută după interschimbarea celor două elemente (*Eafter*)}

apelează funcția *Calcul_Energie_Adeziune_Zona_Afectata* pentru vechea configurație a sistemului *Aold*
 {această funcție calculează energia de adeziune în zona afectată pe vechea configurație a sistemului, înainte de interschimbarea celor două elemente (*Ebefore*)}

$\Delta E = Eafter - Ebefore$
 {calculează diferența dintre cele două energii}

dacă $\Delta E \leq 0$ **atunci**
 {se acceptă schimbarea, se actualizează matricea asociată sistemului și energia de adeziune a sistemului}

$Aold(i, j, k) = Anew(i, j, k)$
 $Aold(i_0, j_0, k_0) = Anew(i_0, j_0, k_0)$
 $Enew = Eold + \Delta E$
 $Eold = Enew$

altfel
 {se generează un număr aleator cuprins între 0 și 1, prin apelul funcției *Rnd()*}
 $decizie \leftarrow Rnd()$; schimbarea este acceptată dacă $decizie < Exp(-\Delta E/E_T)$; în implementarea noastră nu apare E_T deoarece energiile de interacțiune dintre elementele sistemului sunt exprimate ca multiplii de E_T }

dacă $decizie < Exp(-\Delta E)$ **atunci**
 {acceptă schimbarea}

$Aold(i, j, k) = Anew(i, j, k)$
 $Aold(i_0, j_0, k_0) = Anew(i_0, j_0, k_0)$
 $Enew = Eold + \Delta E$
 $Eold = Enew$

altfel
 {respinge schimbarea}

$Anew(i, j, k) = Aold(i, j, k)$
 $Anew(i_0, j_0, k_0) = Aold(i_0, j_0, k_0)$
 $Enew = Eold$

sfârșit dacă
sfârșit dacă
sfârșit pentru
scrie *Anew, Aold, Enew, Eold*
sfârșit algoritm

3.2.2. Algoritmi bazați pe adeziune și chemotaxie

În cazul în care sistemul biologic este format dintr-un sistem multicelular (suspensie / agregat celular) situat în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă care are încorporată o substanță chemoatractantă dispusă sub forma unui gradient de concentrație constant, energia totală a sistemului devine [105]:

$$E = E_{adeziune} + E_{chemotaxie} \quad (3.6)$$

unde:

- $E_{adeziune}$ - reprezintă energia de adeziune a sistemului (ecuația (3.3))
- $E_{chemotaxie}$ - reprezintă energia produsă de fenomenul de chemotaxie.

Energia produsă de fenomenul de chemotaxie se calculează cu formula [105]:

$$E_{chemotaxie} = - \sum_{i=0}^{t-1} \left(K_i \times \sum_{j=1}^{N_{is}} C_{is} \right), \quad (3.7)$$

unde:

- $i \in (0, 1, \dots, t-1)$ - reprezintă tipurile de celule din sistem
- K_i - reprezintă tăriile chemotactice asociate fiecărui tip de celule (indică măsura în care celulele de tip i tind să se deplaseze de-a lungul gradientului substanței chemoattractante
- $j \in (1, \dots, N_{is})$ - reprezintă pozițiile din biomatrice în care se găsesc celule de tipul i
- C_{is} - reprezintă concentrația de chemoattractant aferentă staturilor biomatricei unde se găsesc celule de tipul i .

O reprezentare sugestivă a modelului computațional asociat unui sistem biologic format dintr-o biomatrice care are încorporată o substanță chemoattractantă, în vecinătatea căreia se află o suspensie celulară sau un agregat celular, se poate vedea în Fig. 3.14.

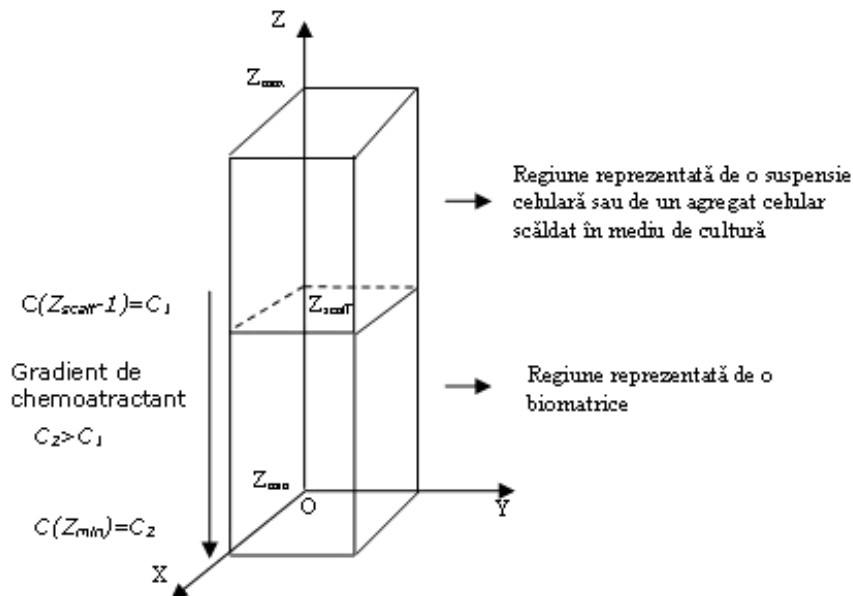


Fig. 3.14. Structura de bază a sistemului biologic modelat în spațiul tridimensional: un sistem multicelular aflat în vecinătatea unei biomatrice care are încorporată o substanță chemoattractantă.

Cu scopul de a studia influența interacțiunii dintre adeziune și chemotaxie asupra procesului de însămânțare a unor biomatrici care au încorporată o substanță chemoatractantă, utilizând metoda Metropolis Monte Carlo, am dezvoltat într-o primă fază un algoritm care calculează concentrația de chemoatractant aferentă fiecărui strat al biomatricii, în condițiile unui gradient constant [105].

Concentrația de chemoatractant se consideră maximă în partea inferioară a biomatricii, urmărindu-se ca pe lângă energia de adeziune dintre celule și substrat, energia asociată procesului de chemotaxie să contribuie la o însămânțare mai rapidă [105].

Algoritm Calcul Concentrație Chemoatractant pe Fiecare Strat al Biomatricii

algoritm Calcul_Concentrație_Chemoatractant_Straturi **este**:
 {algoritm care calculează concentrația de chemoatractant aferentă fiecărui strat al biomatricii}
citeste $C1, C2, dz_scaff, i_{max}$
 { $C1$ - concentrația de chemoatractant din stratul superior al biomatricii,
 $C2$ - concentrația de chemoatractant din stratul inferior al biomatricii ($C2 > C1$),
 dz_scaff - înălțimea biomatricii,
 i_{max} - înălțimea sistemului biologic (în regiunea delimitată de-al lungul axei OZ de la 0 la $dz_scaff-1$ se află biomatricea care are încorporată o concentrație de chemoatractant sub forma unui gradient, iar în regiunea cuprinsă între dz_scaff și $i_{max}-1$ se află suspensia de celule)}
pentru i **în** $[0, dz_scaff-1]$ **execută**
 { $Chemo_strat(i)$ - vector în care se memorează concentrațiile de chemoatractant aferente fiecărui strat al biomatricii}
 $Chemo_strat(i) \leftarrow C1 - (C1 - C2) * (dz_scaff-1-i) / (dz_scaff-1)$
sfârșit pentru
pentru i **în** $[dz_scaff, i_{max}-1]$ **execută**
 {în regiunea aferentă suspensiei, concentrația de chemoatractant este nulă}
 $Chemo_strat(i) \leftarrow 0$
sfârșit pentru
scrie $Chemo_strat$
sfârșit algoritm

În continuare, am dezvoltat un algoritm care calculează valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie pentru o anumită configurație dată a sistemului biologic. Această energie se exprimă în termenii unor parametri de model, $K1$ și $K2$ (tării chemotactice) care indică măsura în care celulele de tip 1, respectiv 2 tind să se deplaseze de-a lungul gradientului substanței chemoatractante.

Algoritm Calcul Energie Asociată Fenomenului de Chemotaxie

algoritm Calcul_Energie_Chemotaxie **este**:
 {algoritm care calculează valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie pentru o anumită configurație data sistemului biologic }
citeste $Chemo_strat(), A(,,), imax, jmax, kmax, dz_susp, K1, K2, index1, index2$
 { $Chemo_strat()$ - vector în care se memorează concentrațiile de chemoatractant aferente fiecărui strat al biomatricii,
 $A(,,)$ - matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,


```

imax, jmax, kmax - numărul maxim de elemente de-a lungul axelor OZ, OY, OX,
dz_scaff - înălțimea biomatricii,
K1, K2 - constantele care descriu intensitatea chemotaxiei celulelor de tip 1 ,
respectiv de tip 2 (tării chemotactice),
index1 - indexul asociat celulelor de tipul 1 = 1,
index2 - indexul asociat celulelor de tipul 2 = 100}
nr_cel1 ← 0
nr_cel2 ← 0
{nr_cel1, nr_cel2 - contor celule de tipul 1, respectiv de tipul 2 din biomatrice}
pentru i în [0, dz_scaff-1] execută
  pentru j în [0, jmax - 1] execută
    pentru k în [0, kmax- 1] execută
      dacă A(i,j,k) == index1 atunci
        {dacă elementul curent din biomatrice este celula de tipul 1, se salveaza în
        vectorul Chemo_cel1, valoarea concentrației de chemoatractant aferentă
        stratului pe care se află celula}
        Chemo_cel1(nr_cel1) ← Chemo_strat(i)
        nr_cel1 ← nr_cel1+1
      sfârșit dacă
      dacă A(i,j,k) == index2 atunci
        {dacă elementul curent din biomatrice este celula de tipul 2, se salvează în
        vectorul Chemo_cel2, valoarea concentrației de chemoatractant aferentă
        stratului pe care se află celula}
        Chemo_cel2(nr_cel2) ← Chemo_strat(i)
        nr_cel2 ← nr_cel2+1
      sfârșit dacă
    sfârșit pentru
  sfârșit pentru
sfârșit pentru
Total_chemo1 ← 0
Total_chemo2 ← 0
{Total_chemo1, Total_chemo2 - variabile în care se salvează concentrația
chemoatractantului din biomatrice pentru celule de tipul 1, respectiv de tipul 2}
pentru i în [0, nr_cel1] execută
  Total_Chemo1 ← Total_Chemo1+ Chemo_cel1(i)
sfârșit pentru
pentru i în [0, nr_cel2] execută
  Total_Chemo2 ← Total_Chemo2 + Chemo_cel2(i)
sfârșit pentru
CH ← K1 * Total_Chemo1 + K2 * Total_Chemo2
{CH - valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie pentru configurația
primită ca și parametru}
scrie CH
sfârșit algoritm

```

În situația în care mișcarea celulelor este influențată atât de adeziune, cât și de chemotaxie, energia totală a sistemului se calculează pe baza formulei prezentate în algoritmul de mai jos.

Algoritm Calcul Energie Totală (Adeziune și Chemotaxie)

algoritm Calcul_Energie_Totala_Adeziune_Chemotaxie **este**:
 {algoritm care calculează energia totală a sistemului, în cazul în care biomatricea are încorporată o substanță chemoattractantă}

citeste $A(,,)$, $imax$, $jmax$, $kmax$, γ_{s0} , γ_{s1} , γ_{s2} , γ_{01} , γ_{02} , γ_{12} , $indexp$, $index1$, $index2$, $indexm$, CH

{ $A(,,)$ – matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
 $imax$, $jmax$, $kmax$ - numărul maxim de elemente de-a lungul axelor OZ , OY , OX ,
 γ_{s0} , γ_{s1} , γ_{s2} , γ_{01} , γ_{02} , γ_{12} - tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului,
 $indexp$ – indexul asociat particulelor de biomaterial = 10 000,
 $index1$ – indexul asociat celulelor de tipul 1 = 1,
 $index2$ – indexul asociat celulelor de tipul 2 = 100,
 $indexm$ – indexul asociat particulelor de mediu = 0,
 CH - valoarea totală a energiei asociate fenomenului de chemotaxie, pentru configurația primită ca și parametru}

{secvența de operații premergătoare calculului energiei de adeziune în acest caz este identică cu cea din algoritmul Calcul_Energie_Sistem prezentat mai sus}

.....

{calculează energia totală de adeziune a sistemului, En , scăzând valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie}

$$En = B_{s0} * \gamma_{s0} + B_{s1} * \gamma_{s1} + B_{s2} * \gamma_{s2} + B_{01} * \gamma_{01} + B_{02} * \gamma_{02} + B_{12} * \gamma_{12} - CH$$

scrie En

sfârșit algoritm

Algoritmul care calculează diferența dintre valorile energiei asociate fenomenului de chemotaxie înainte și după interschimbarea celor două elemente este prezentat mai jos:

Algoritm Calcul Diferență Energii Produse De Chemotaxie În Zona Afectată

algoritm DeltaChemotaxie **este**:
 {algoritm care calculează diferența dintre valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie din zona afectată înainte de interschimbarea celor două elemente și valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie după interschimbare }

citeste $Chemo_strat()$, $A(,,)$, i , j , k , i_0 , j_0 , k_0 , $K1$, $K2$, $index1$, $index2$

{ $Chemo_strat()$ - vector în care se memorează concentrațiile de chemoattractant aferente fiecărui strat al biomatricei,
 $A(,,)$ – matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
 i , j , k - coordonatele celulei care încearcă să migreze,
 i_0 , j_0 , k_0 - coordonatele vecinului cu care se încearcă interschimbarea,
 $K1$, $K2$ - constantele care descriu intensitatea chemotaxiei celulelor de tip 1 , respectiv de tip 2 (tării chemotactice),
 $index1$ – indexul asociat celulelor de tipul 1 = 1,
 $index2$ – indexul asociat celulelor de tipul 2 = 100,
 $indexm$ – indexul asociat particulelor de mediu = 0}

dacă $A(i,j,k) == index1$ **atunci**
 {dacă celula care dorește să migreze e de tipul 1, tăria chemotactică asociată este $K1$ }

$$t < -K1$$

sfârșit dacă**dacă** $A(i,j,k) == index2$ **atunci**

{dacă celula care dorește să migreze e de tipul 2, tăria chemotactică asociată este $K2$ }

 $t < -K2$ **sfârșit dacă****dacă** $A(i_0, j_0, k_0) == index1$ **atunci**

{dacă vecinul cu care se încearcă interschimbarea este celula de tipul 1, tăria chemotactică asociată este $K1$ }

 $t_0 < -K1$ **sfârșit dacă****dacă** $A(i_0, j_0, k_0) == indexm$ **atunci**

{dacă vecinul cu care se încearcă interschimbarea este particula de mediu, tăria chemotactică asociată este 0}

 $t_0 < -0$ **sfârșit dacă** $deltachemo < - (t_0 - t) * (chemo_strat(i) - chemo_strat(i_0))$

{ $deltachemo < -$ diferența dintre valorile energiei asociate fenomenului de chemotaxie, înainte respectiv după efectuarea mișcării}

scrie $deltachemo$ **sfârșit algoritm**

Algoritmul propriu-zis Metropolis Monte Carlo, pentru situația în care biomatricea are încorporată o substanță chemoatractantă, presupune suplimentar calculul diferenței dintre valorile energiei asociate fenomenului de chemotaxie, înainte, respectiv după efectuarea mișcării. Acest calcul se va face doar în regiunea afectată de mișcare. În acest caz, diferența de energii, ΔE , se compune din modificarea energiei de adeziune și modificarea energiei asociate chemotaxiei.

Algoritm Metropolis Monte Carlo Chemotaxie**algoritm** Metropolis_Monte_Carlo_Chemotaxie **este:**

{algoritm bazat pe metoda Metropolis Monte Carlo; permite fiecărei celule din sistem să facă o mișcare, în așa fel încât sistemul celular să atingă starea de energie de adeziune minimă; algoritmul descrie secvența de operații specifice unui pas Monte Carlo; se ia în calcul că biomatricea are încorporată o substanță chemoatractantă}

citește $A(,,), imax, jmax, kmax, dz_susp, \gamma_{s0}, \gamma_{s1}, \gamma_{s2}, \gamma_{01}, \gamma_{02}, \gamma_{12}, nr_cel_migrare, I, J, K, En, Chemo_strat()$

{ $A(,,)$ - matricea tridimensională ce reprezintă modelul sistemului biologic,
 $imax, jmax, kmax$ - numărul maxim de elemente de-a lungul axelor OZ, OY, OX ,
 $\gamma_{s0}, \gamma_{s1}, \gamma_{s2}, \gamma_{01}, \gamma_{02}, \gamma_{12}$ - tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului,

$nr_cel_migrare$ - numărul de celule din configurația curentă care au posibilitatea să

migreze,

 I, J, K - vectorii care conțin coordonatele acestora, $Chemo_strat()$ - vector în care se memorează concentrațiile de chemoatractant aferente fiecărui strat al biomatricii}

{secvența de operații identică cu cea din algoritmul Metropolis_Monte_Carlo prezentat mai sus}

.....
calculează în *deltachemo*, prin apelul funcției *Deltachemotaxie*, diferența dintre valorile energiei asociate fenomenului de chemotaxie înainte și după interschimbarea celor două elemente
 $\Delta E <- E_{after} - E_{before} + \text{deltachemo}$
 { ΔE - diferența dintre energiile de adeziune din zona afectată, dinainte respectiv de după efectuarea mișcării, la care se adună diferența dintre energiile produse de fenomenul de chemotaxie, din zona afectată}
 {secvența de operații identică cu cea din algoritmul *Metropolis_Monte_Carlo* prezentat mai sus}

sfârșit algoritm

Algoritmul de simulare a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrici, în acest caz, arată în felul următor:

Algoritm Simulare Evoluție Sistem Multicelular Chemotaxie

algoritm *Simulare_Evolutie_Sistem_Multicelular_Chemotaxie* **este**:
 {algoritm care realizează simularea *Metropolis Monte Carlo* a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrici, constând în rularea unui anumit număr de pași *Monte Carlo*; se ia în calcul că biomatricea are încorporată o substanță chemoattractantă}
citeste *nr_MCS, pas_es, $\epsilon_{s0}, \epsilon_{s1}, \epsilon_{s2}, \epsilon_{01}, \epsilon_{02}, \epsilon_{12}, \epsilon_{00}, \epsilon_{11}, \epsilon_{22}$*
 {*nr_MCS* - numărul de pași *Monte Carlo* care se doresc rulați în simulare,
pas_es - numărul de pași *Monte Carlo* după care se dorește salvarea noii configurații a sistemului
 $\epsilon_{s0}, \epsilon_{s1}, \epsilon_{s2}, \epsilon_{01}, \epsilon_{02}, \epsilon_{12}, \epsilon_{00}, \epsilon_{11}, \epsilon_{22}$ - parametrii energetici care descriu interacțiunea dintre diferitele elemente ale sistemului}
 {secvența de operații identică cu cea din algoritmul *Simulare_Evoluție_Sistem_Multicelular* prezentat mai sus}

 {în loc de apelul funcției *Calcul_Energie_Totală_Adeziune*, se execută următoarea secvență de operații}
apelează funcția *Calcul_Energie_Chemotaxie*
apelează funcția *Calcul_Energie_Totală_Adeziune_Chemotaxie*
 {secvența de operații identică cu cea din algoritmul *Simulare_Evoluție_Sistem_Multicelular* prezentat mai sus}

sfârșit algoritm

3.2.3. Algoritmi dedicați MATLAB pentru analiza rezultatelor simulărilor

În vederea efectuării unor analize cantitative a rezultatelor simulărilor evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale, am conceput o serie de algoritmi dedicați MATLAB, prezentați în cele ce urmează.

Pentru studiul împrăștierii unui agregat celular pe suprafața unei plăci de biomaterial, am dezvoltat un algoritm dedicat MATLAB care calculează numărul de celule atașate pe suprafața biomaterialului, după fiecare rulare a unui anumit număr de pași Monte Carlo prefixat. Calculul se face pe baza configurațiilor sistemului biologic asociate simulării curente, salvate de către aplicația SIMMMC în fișierele de tipul xyz. Se monitorizează, astfel, evoluția agregatului celular pe parcursul întregii simulări.

Fișierele de tipul xyz conțin: (i) pe prima linie – numărul total de elemente din sistem, (ii) pe a doua linie – numărul de pași Monte Carlo rulați, care au condus la configurația salvată în fișierul respectiv, numărul total de pași Monte Carlo rulați în simulare, numărul de pași Monte Carlo rulați între două configurații salvate și înălțimea regiunii unde se găsește biomatricea / placa de biomaterial, (iii) pe următoarele linii – informații referitoare la configurațiile obținute după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo: tipul elementelor din sistemul biologic studiat (celule sau particule de biomaterial; se neglijează particulele de mediu de cultură) și coordonatele x, y, z ale acestora.

Un exemplu de fișier de tipul xyz care conține configurația sistemului aferentă rulării a 10 000 de MCS este prezentat în Fig. 3.15:

```

outFile10.xyz - Notepad
File Edit Format View Help
23519
10000 150000 1000 80
C3 41 0 0
C3 4 1 0
C3 5 1 0
C3 13 1 0
C3 14 1 0
C3 22 1 0
C3 23 1 0
C3 31 1 0
C3 32 1 0
C3 40 1 0
C3 41 1 0
C3 42 1 0
C3 4 2 0
C3 5 2 0
C3 13 2 0
C3 14 2 0
C3 22 2 0
C3 23 2 0
C3 31 2 0
C3 32 2 0
C3 40 2 0
C3 41 2 0
C3 42 2 0
C3 4 3 0
C3 4 3 0
C3 5 3 0
C3 6 3 0
C3 12 3 0
C3 13 3 0
C3 14 3 0
C3 15 3 0
C3 21 3 0
C3 22 3 0
C3 23 3 0

```

Fig. 3.15. Exemplu de fișier de tipul xyz în care e salvată configurația sistemului după rularea a 10 000 de MCS.

Algoritm Calcul Număr Celule Atașate la Biomaterial

algoritm Calcul_Număr_Celule_Atășate_la_Biomaterial **este:**
 {algoritm care calculează și monitorizează numărul de celule care s-au atașat la biomaterial, după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo}
crează lista de fișiere .xyz
citeste din primul fișier .xyz, de pe a doua linie, h_reg_biomat
 { h_reg_biomat - înălțimea regiunii unde se găsește placa de biomaterial}
calculează numărul de fișiere .xyz, nr_fis_xyz
pentru i **în** $[1, nr_fis_xyz]$ **execută**
citeste $nr_pași_mc_rulați[i]$

```

{nr_pași_mc_rulați[]} – vector în care se memorează numărul de pași Monte
Carlo rulați pentru configurația i}
atribuie nr_cel[i] <- 0;
{nr_cel[i] – vector în care se memorează numărul de celule care s-au atașat pe
suprafața biomaterialului, pentru configurația i}
calculează numărul de linii ale fișierului curent, nr_linii_fisier
pentru j in [3, nr_linii_fisier] execută
  citește din linia curentă tip_element, x, y, z
  {tip_element – tipul elementului curent (celulă, particulă de biomaterial,
  particulă de mediu de cultură),
  x- coordonata x a elementului curent,
  y- coordonata y a elementului curent,
  z- coordonata z a elementului curent}
  dacă tip_element este celulă atunci
    dacă z == h_reg_biomat + 1 atunci
      {dacă coordonata z a celulei corespunde stratului de pe suprafața
      biomaterialului înseamnă că celula s-a atașat pe suprafața biomaterialului}
      atribuie nr_cel[i] <- nr_cel[i]+1
    sfârșit dacă
  sfârșit dacă
sfârșit pentru
sfârșit pentru
trasează nr_cel[] în funcție de nr_pași_mc_rulați[]
scrie într-un fișier de tipul dat al numărului de celule atașate la biomaterial
nr_pași_mc_rulați[], nr_cel[]
sfârșit algoritm

```

Un exemplu de fișier care conține numărul de celule atașate pe suprafața biomaterialului salvat periodic (la fiecare rulare a unui număr de pași Monte Carlo prefixat) este prezentat în Fig. 3.16:

```

nr_cel_atasate_MCS_1.dat - WordPad
File Edit View Insert Format Help
0 1
1000 135
2000 166
3000 192
4000 195
5000 205
6000 234
7000 242
8000 257
9000 263
10000 275
11000 291
12000 295
13000 312
14000 327
15000 336
16000 355
17000 350
18000 375
19000 392
20000 406
21000 411
22000 415
23000 429
24000 424
25000 431
For Help, press F1 NUM

```

Fig. 3.16. Exemplu de fișier în care este memorat numărul de celule atașate la substrat la rularea a diferiți MCS.

Pentru a determina viteza de împrăștiere a celulelor pe substrat în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă - substrat și energia de coeziune celulă - celulă ($\varepsilon_{cs} / \varepsilon_{cc}$) sau de tensiunea interfacială celulă-substrat ($-\gamma_{cs}$), am implementat următorii algoritmi dedicați MATLAB:

Algoritm Fitare Curbe Reprezentând Numărul de Celule Atașate în Funcție de MCS

algoritm Fitare_Curve_Nr_Cel_Atășate_vs_MCS **este:**
 {algoritm care trasează curbele aferente numărului de celule atașate pe substrat în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați din simulările realizate și fitează aceste curbe cu ajutorul unei funcții lineare $f(x)=a*x+b$ }

crează lista de fișiere .dat
 {fișierele .dat conțin pe fiecare linie (i) numărul de pași MCS rulați (ii) numărul de celule atașate pe substrat; fiecărui fișier .dat îi corespund datele aferente unei simulări}

citeste în vectorii $\varepsilon_{cc}()$, $\varepsilon_{cs}()$ energiile de interacțiune celulă-celulă, respectiv celulă-substrat aferente fiecărei simulări

calculează în vectorii $\gamma_{cm}()$ și $\gamma_{cs}()$ tensiunile interfaciale celulă-mediu, respectiv celulă - substrat aferente fiecărei simulări

calculează numărul de fișiere .dat, nr_fis_dat

pentru i **în** $[1, nr_fis_dat]$ **execută**
citeste din fișierul curent, în vectorii nrMCS(), nrCel() numărul de pași Monte Carlo rulați, salvați la o anumită periodicitate și numărul de celule atașate pe substrat în configurația aferentă

trasează nrCel() în funcție de nrMCS()

defineste o funcție liniară de fitare de forma $f(x)=a*x+b$

setează intervalul pe care se face fitarea curbelor (interval cuprins între un număr de pași Monte Carlo minim și un număr de pași Monte Carlo maxim, reprezentat de un vector MCSInterval()); în afara acestui interval nu ne interesează fitarea curbelor)

apelează funcția fit, cu parametrii nrMCS(), nrCel(), funcția liniară, intervalul exclus fitării curbelor

determină coeficienții de potrivire a , respectiv b și limitele de confidență ale acestora amin, amax, bmin, bmax

construiește funcția liniară care realizează fitarea curbelor
 { $y()=a * MCSInterval() + b$ }

trasează $y()$ în funcție de MCSInterval()

scrie în fișierul viteza_împrăștiere.dat: numărul de ordine al simulării curente, energiile ε_{cc} , ε_{cs} ale simulării curente, tensiunile interfaciale γ_{cm} și γ_{cs} ale simulării curente și coeficienții a , amin, amax

sfârșit pentru
sfârșit algoritm

Fișierul viteza_împrăștiere.dat rezultat este prezentat în Fig. 3.17.

Sim.	ep_cc	ep_cs	g_cm	g_cs	a	a_min	a_max
1	1	0.4	0.5	0.1	0.00088742	0.00077341	0.0010014
2	1	0.6	0.5	-0.1	0.004594	0.0044414	0.0047467
3	1	0.8	0.5	-0.3	0.0055759	0.0053271	0.0058247
4	1	1	0.5	-0.5	0.015581	0.015268	0.015894
5	1	1.2	0.5	-0.7	0.048563	0.04813	0.048996

Fig. 3.17. Exemplu de fișier în care sunt memorate valorile energiilor de interacțiune celulă - celulă, respectiv celulă - substrat, valorile tensiunilor interfaciale celulă - mediu, respectiv celulă - substrat și parametrii aferenți vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat.

Algoritm De Monitorizare A Vitezei De Împrăștiere A Celulelor Pe Substrat în Funcție de $\varepsilon_{cs} / \varepsilon_{cc}$

algoritm *Viteza_Împrăștiere_Celule_Substrat_vs_ε_{cs}/ε_{cc}* **este:**

{algoritm care monitorizează evoluția vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat ca funcție de raportul dintre ε_{cs} și ε_{cc} în simulările realizate}

citeste din fișierul *viteza_împrăștiere.dat* valorile energiilor de interacțiune dintre celule (în vectorul $\varepsilon_{cc}()$), respectiv dintre celule și substrat (în vectorul $\varepsilon_{cs}()$) în simulările realizate, precum și valorile coeficientului a , ce reprezintă un indicator al vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat (în vectorul *Viteza()*)

trasează *Viteza()* în funcție de $\varepsilon_{cs}()/\varepsilon_{cc}()$

sfârșit algoritm

Algoritm De Monitorizare A Vitezei De Împrăștiere A Celulelor Pe Substrat în Funcție de $-\gamma_{cs}$

algoritm *Viteza_Împrăștiere_Celule_Substrat_vs_-γ_{cs}* **este:**

{algoritm care monitorizează evoluția vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat ca funcție de valorile lui $-\gamma_{cs}$ în simulările realizate}

citeste din fișierul *viteza_împrăștiere.dat* valorile tensiunilor interfaciale dintre celule și substrat (în vectorul $\gamma_{cs}()$) în simulările realizate, precum și valorile coeficientului a , ce reprezintă un indicator al vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat (în vectorul *Viteza()*)

trasează *Viteza()* în funcție de $-\gamma_{cs}()$

sfârșit algoritm

Având în vedere ca simulările realizate se bazează pe numere aleatoare, am considerat util să rulăm mai multe simulări cu exact aceiași parametri de intrare, pentru a vedea diferențele care apar în rezultatele obținute. Pentru aceasta, am realizat un algoritm care calculează media numărului de celule atașate pe substrat din toate simulările, în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați. De asemenea, am calculat deviația standard a valorii medii.

Algoritm Calcul Valoare Medie a Numărului de Celule Atașate și Deviație Standard a Valorii Medii

algoritm *Medie_Nr_Cel_Atășate* **este**:
 {algoritm care (i) calculează media numărului de celule atașate pe substrat în simulările realizate, în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați (ii) calculează deviația standard a mediei numărului de celule atașate în diferitele simulări}
crează lista de fișiere *.dat*
 {fișierele *.dat* conțin pe fiecare linie (i) numărul de pași MCS rulați (ii) numărul de celule atașate pe substrat; fiecărui fișier *.dat* îi corespund datele aferente unei simulări}
calculează numărul de fișiere *.dat*, *nr_fis_dat*
pentru *i* în [1, *nr_fis_dat*] **execută**
 citeste din fișierul curent, numărul de pași Monte Carlo rulați, salvați la o anumită periodicitate și numărul de celule atașate pe substrat în configurația aferentă
sfârșit pentru
pentru fiecare număr de pași Monte Carlo rulați **execută**
 calculează media numărului de celule atașate pe substrat în simulările realizate
 calculează deviația standard a mediei numărului de celule atașate pe substrat
sfârșit pentru
scrie în fișierul *nr_cel_MCS_medie_deviație.dat*: numărul de pași Monte Carlo rulați, media numărului de celule atașate pe substrat, deviația standard a mediei numărului de celule atașate pe substrat
trasează media numărului de celule atașate în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați și reprezintă în anumite puncte deviația standard a mediei
sfârșit algoritm

Fișierul *nr_cel_MCS_medie_deviație.dat* rezultat are forma reprezentată în Fig. 3.18.

0	1	0
1000	131.1	2.5882
2000	163.9	2.7099
3000	183.6	2.5699
4000	200.5	3.6339
5000	216.2	3.6782
6000	232.7	2.929
7000	245.7	3.0443
8000	257.2	2.8
9000	266.4	3.287
10000	279.5	3.4067
11000	288.9	3.368
12000	305.5	4.4528
13000	306.7	4.2715
14000	319	6.3281
15000	333.5	7.5531
16000	347.9	7.9407
17000	354.5	7.6351
18000	367.5	8.4895
19000	381.8	7.7872
20000	386.9	6.7585
21000	391.8	6.8925
22000	402.4	7.2329
23000	407.3	9.724
24000	415	8.2932
25000	426.4	9.5245

Fig. 3.18. Exemplu de fișier în care se memorează valoarea medie a numărului de celule atașate pe substrat pentru un set de 10 simulări și deviația standard a valorii medii.

Pentru a urmări evoluția unui agregat celular format din două tipuri de celule pe suprafața unui biomaterial de forma paralelipipedică, în diverse condiții energetice, am dezvoltat pe baza fișierului *nr_interfețe.txt* creat în urma rulării programului de simulare (fișier în care sunt salvate la fiecare rulare a unui anumit număr de pași Monte Carlo, numărul de legături dintre celulele interfaciale de tip *C1* și *C2*, numărul de legături dintre celulele de tip *C1* și substratul *S* și numărul de legături dintre celulele de tip *C2* și substratul *S*), următorul algoritm dedicat MATLAB:

Algoritm Monitorizare Număr Legături dintre Elementele Interfaciale de tip *C1C2*, *C1S*, *C2S*

algoritm Monitorizare_Număr_Legături_C1C2_C1S_C2S **este:**

{algoritm care monitorizează evoluția numărului de legături dintre celulele de tip *C1* și *C2*, numărului de legături dintre celulele de tip *C1* și substratul *S* și numărului de legături dintre celulele de tip *C2* și substratul *S* în timpul unei simulări}

citește din fișierul *nr_interfețe.txt* *nr_pași_mc_rulați*, *nr_legC1C2*, *nr_legC1S*, *nr_legC2S*

{*nr_pași_mc_rulați* – numărul de pași Monte Carlo rulați,
nr_legC1C2 – numărul de legături dintre celulele de tip *C1* și *C2*,
 corespunzător configurației curente,
nr_legC1S – numărul de legături dintre celulele de tip *C1* și substrat,
 corespunzător configurației curente,
nr_legC2S – numărul de legături dintre celulele de tip *C2* și substrat,

corespunzător configurației curente}
trasează *nr_legC1C2* în funcție de *nr_pași_mc_rulați*
trasează *nr_legC1S* în funcție de *nr_pași_mc_rulați*
trasează *nr_legC2S* în funcție de *nr_pași_mc_rulați*
sfârșit **algoritm**

Fișierul *nr_interfețe.txt* este prezentat în Fig. 3.19.

MCS	nr_pas1_curent	nr_leg12	nr_leg1s	nr_leg2s
200000	0	17553	0	9
200000	1000	17934	1521	387
200000	2000	17663	1692	765
200000	3000	17515	2034	792
200000	4000	17556	2241	900
200000	5000	17443	2214	1170
200000	6000	17435	2556	1026
200000	7000	16880	2574	1206
200000	8000	17010	2961	1116
200000	9000	16462	3078	1260
200000	10000	16698	2988	1620
200000	11000	16562	3222	1683
200000	12000	16243	3465	1656
200000	13000	16547	3573	1818
200000	14000	16452	3807	1818
200000	15000	16237	4068	1782
200000	16000	15893	4113	1962
200000	17000	16291	4203	2115
200000	18000	16087	4338	2178
200000	19000	15991	4464	2232
200000	20000	15470	4419	2448
200000	21000	15468	4599	2448
200000	22000	15510	4437	2808
200000	23000	15252	4860	2637
200000	24000	15261	5004	2637
200000	25000	15064	4725	3096
200000	26000	14877	5103	2907
200000	27000	14919	5553	2691
200000	28000	14528	5715	2808
200000	29000	14822	5553	3141
200000	30000	14453	5589	3267
200000	31000	14346	5877	3312
200000	32000	14167	6030	3393
200000	33000	14892	6012	3618

Fig. 3.19. Exemplu de fișier în care se memorează numărul de MCS rulați, numărul de legături dintre celulele de tip C1 și C2, numărul de legături dintre celulele de tip C1 și substratul S și numărul de legături dintre celulele de tip C2 și substratul S.

Pentru a realiza o analiză cantitativă a vitezei cu care celulele pătrund în biomatrice, în diferite condiții energetice, am dezvoltat un algoritm dedicat MATLAB care preia din fișierele *xyz* asociate configurațiilor obținute, informațiile despre tipul elementelor și coordonatele acestora și, pe baza acestora, calculează și monitorizează evoluția concentrației de celule rămase în suspensie după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo.

Algoritm Calcul și Monitorizare a Concentrației de Celule din Suspensie

algoritm *Calcul_Concentrație_Celule_Suspensie* **este**:
 {algoritm care calculează și monitorizează concentrația de celule din suspensie, după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo}
crează lista de fișiere *.xyz*
citeste din primul fișier *.xyz*, de pe a doua linie, *nr_pași_mc_rulați*, *h_reg_biomat*
 {*nr_pași_mc_rulați* – numărul de pași Monte Carlo rulați pentru configurația curentă,
h_reg_biomat – înălțimea regiunii unde se găsește biomatricea / biomaterialul}
atribuie *nr_cel_susp_ini* <- 0;

```

{nr_cel_susp_ini - numărul de celule din suspensie în configurația inițială}
calculează numărul de linii ale primului fișier .xyz, nr_linii_fisier
pentru i în [3, nr_linii_fisier] execută
  citește din linia curentă tip_element, x, y, z
  {tip_element - tipul elementului curent (celulă, particulă de biomaterial,
  particulă de mediu de cultură),
  x- coordonata x a elementului curent,
  y- coordonata y a elementului curent,
  z- coordonata z a elementului curent}
  dacă tip_element este celulă atunci
    dacă z > h_reg_biomat atunci
      {dacă coordonata z a celulei este mai mare decât înălțimea biomatricei /
      biomaterialului înseamnă că celula se află în suspensie}
      atribuie nr_cel_susp_ini<- nr_cel_susp_ini+1
    sfârșit dacă
  sfârșit dacă
sfârșit pentru
atribuie frac_cel_susp<- 1
  {frac_cel_susp- fracțiunea de celule din suspensie; are valoarea 1 pentru că în
  configurația inițială a sistemului toate celulele din sistem se află în suspensie}
scrie în fișierul fracțiunilor de celule din suspensie (frac_susp.txt)
nr_pasi_mc_rulati, frac_cel_susp
calculează numărul de fișiere .xyz nr_fis_xyz
pentru i în [2, nr_fis_xyz] execută
  citește de pe a doua linie, nr_pasi_mc_rulati
  atribuie nr_cel_susp >- 0
  {nr_cel_susp - numărul de celule din suspensie, în configurația curentă}
  calculează numărul de linii ale fișierului curent nr_linii_fisier
  pentru j în [3, nr_linii_fisier] execută
    citește din linia curentă tip_element, x, y, z
    dacă tip_element este celulă atunci
      dacă z > h_reg_biomat atunci
        atribuie nr_cel_susp<- nr_cel_susp+1
      sfârșit dacă
    sfârșit dacă
  sfârșit pentru
atribuie frac_cel_susp<- nr_cel_susp/ nr_cel_susp_ini
  {fracțiunea de celule din suspensie se calculează ca fiind numărul de celule
  rămase în suspensie după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo /
  numărul total de celule din sistemul biologic}
scrie în fișierul fracțiunilor de celule din suspensie (frac_susp.txt)
nr_pasi_mc_rulati, frac_cel_susp
sfârșit pentru
citește din fișierul fracțiunilor de celule din suspensie nr_pasi_mc_rulati,
frac_cel_susp
trasează frac_cel_susp în funcție de nr_pasi_mc_rulati
sfârșit algoritm

```

Fișierul *frac_susp.txt* are forma reprezentată în Fig. 3.20.

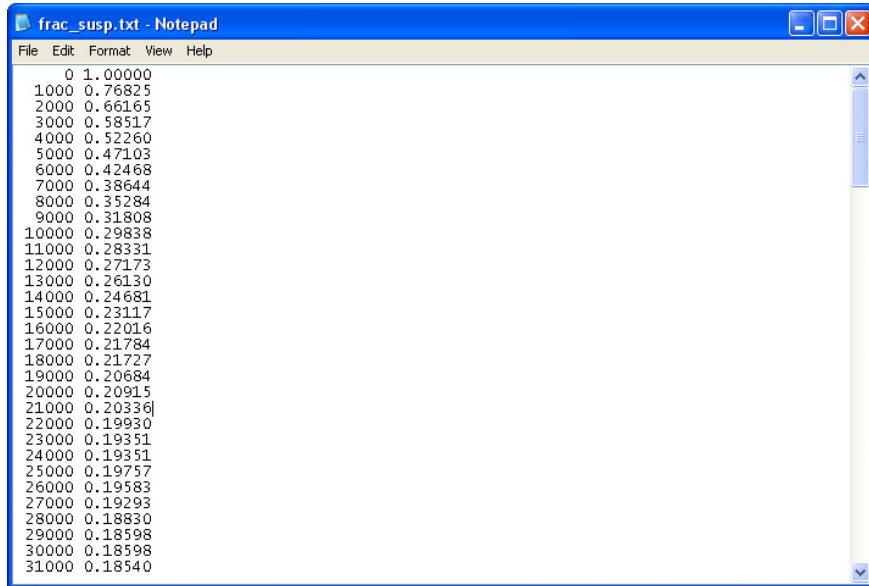


Fig. 3.20. Exemplu de fișier în care este memorată fracțiunea de celule din suspensie la rularea a diferiți MCS.

Pentru a determina condițiile energetice și geometrice care conduc la o distribuție uniformă a celulelor în biomatrice, am dezvoltat doi algoritmi dedicați MATLAB care preiau din fișierele *xyz* informațiile despre tipul elementelor diferitelor configurații și coordonatele acestora și, pe baza lor, calculează și monitorizează evoluția centrului de masă al celulelor din biomatrice, respectiv din întregul sistem după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo:

Algoritm Calcul și Monitorizare a Centrului de Masă al Celulelor care au Pătruns în Biomatrice

algoritm Calcul_Centrul_de_Masa_Celule_Biomatrice **este**:
 {algoritm care calculează și monitorizează centrul de masă al celulelor care au pătruns în biomatrice, după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo}
crează lista de fișiere *.xyz*
citeste din primul fișier *.xyz*, de pe a doua linie, *h_reg_biomat*
 {*h_reg_biomat* - înălțimea biomatricii}
pentru fiecare fișier *.xyz* **execută**
citeste de pe a doua linie, *nr_pasi_mc_rulati*
 {*nr_pasi_mc_rulati* - numărul de pași Monte Carlo rulați pentru fiecare configurație}
atribuie *sumax* <- 0;
 {*suma_x* - suma coordonatelor x ale celulelor care au pătruns în biomatrice}
atribuie *sumay* <- 0;
 {*suma_y* - suma coordonatelor y ale celulelor care au pătruns în biomatrice}
atribuie *sumaz* <- 0;
 {*suma_z* - suma coordonatelor z ale celulelor care au pătruns în biomatrice}
atribuie *nr_cel* <- 0;
 {*nr_cel* - numărul de celule care au pătruns în biomatrice}
calculează numărul de linii ale fișierului curent *nr_linii_fisier*

```

pentru i în [3, nr_linii_fisier] execută
  citeste din linia curentă tip_element, x, y, z
  {tip_element – tipul elementului curent (celula, particula de biomaterial,
  particula de mediu de cultură),
  x- coordonata x a elementului curent,
  y- coordonata y a elementului curent,
  z- coordonata z a elementului curent}
  dacă tip_element este celulă atunci
    dacă z <= h_req_biomat atunci
      {dacă coordonata z a celulei este mai mică sau egală cu înălțimea biomatricei
      înseamnă că celula a pătruns în biomatrice}
      atribuie sumax <- sumax+x
      atribuie sumay <- sumay+ y
      atribuie sumaz <- sumaz+ z
      atribuie nr_cel <- nr_cel+1
    sfârșit dacă
  sfârșit dacă
sfârșit pentru
dacă nr_cel <>0 atunci {dacă au pătruns celule în biomatrice}
  atribuie xCM <- sumax / nr_cel
  atribuie yCM <- sumay / nr_cel
  atribuie zCM <- sumaz / nr_cel
  {se calculează coordonatele centrului de masă al celulelor care au pătruns în
  biomatrice la un anumit număr de pași Monte Carlo rulați –
  nr_pasi_mc_rulati}
  scrie în fișierul centrelor de masă ale celulelor din biomatrice (cm.xyz)
  nr_pasi_mc_rulati, xCM, yCM, zCM
sfârșit dacă
sfârșit pentru
citeste din fișierul centrelor de masă ale celulelor din biomatrice
  nr_pasi_mc_rulati, xCM, yCM, zCM
trasează zCM în funcție de nr_pasi_mc_rulati
sfârșit algoritm

```

Fișierul *cm.xyz* este reprezentat în Fig. 3.21.

Configuration	x	y	z
0	24.5794	25.2428	34.2323
1000	24.6669	25.4594	39.3019
2000	24.1866	25.4108	44.9815
3000	23.9253	25.3401	49.5527
4000	23.6756	25.5753	53.5608
5000	23.5295	25.3181	57.3366
6000	23.2671	25.2816	60.8534
7000	23.4716	25.2323	63.8401
8000	23.2474	24.5985	66.8546
9000	22.6541	24.8204	69.3343
10000	22.8175	24.9936	71.1727
11000	23.0185	25.2063	73.1136
12000	22.8783	25.0730	74.5591
13000	22.9878	25.3922	75.9050
14000	22.9200	25.5098	77.8644
15000	23.0295	25.4154	79.0863
16000	23.1750	25.4867	80.4641
17000	22.8673	25.5800	81.4328
18000	22.8042	25.3992	82.5336
19000	22.6043	25.4368	83.2207
20000	22.7578	25.3922	84.2265
21000	22.9508	25.2659	85.3592
22000	22.8679	25.2306	85.9959
23000	22.8169	25.1228	86.8146
24000	22.6437	25.4287	87.2323
25000	22.6367	25.5504	87.4432
26000	22.7329	25.2671	88.1031
27000	22.7526	25.1987	88.9780
28000	22.8024	25.2341	89.5411
29000	22.7740	25.4061	89.9444
30000	22.6576	25.1280	90.4206
31000	22.6170	25.0666	90.6130
32000	22.2520	24.8384	90.6530
33000	22.5238	24.9351	90.9003
34000	22.4565	25.0678	91.0944

Fig. 3.21. Exemplu de fișier în care se memorează coordonatele x, y, z ale centrului de masă al celulelor pătrunse în biomatrice la rularea a diferiți MCS.

Algoritm Calcul și Monitorizare a Centrului de Masă al Celulelor din Întregul Sistem

algoritm Calcul_Centrul_de_Masa_Celule_Sistem **este**:
 {algoritm care calculează și monitorizează centrul de masă al celulelor din sistemul biologic studiat, după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo}
crează lista de fișiere .xyz
pentru fiecare fișier .xyz **execută**
 citește de pe a doua linie, $nr_pasi_mc_rulati$
 { $nr_pasi_mc_rulati$ – numărul de pași Monte Carlo rulați pentru fiecare configurație}
 atribuie $sumax <- 0$;
 { $sumax$ – suma coordonatelor x ale celulelor din configurația curentă}
 atribuie $sumay <- 0$;
 { $sumay$ – suma coordonatelor y ale celulelor din configurația curentă}
 atribuie $sumaz <- 0$;
 { $sumaz$ – suma coordonatelor z ale celulelor din configurația curentă }
 atribuie $nr_cel <- 0$;
 { nr_cel – numărul de celule din sistemul biologic}
 calculează numărul de linii ale fișierului curent nr_linii_fisier
 pentru i în [$3, nr_linii_fisier$] **execută**
 citește din linia curentă $tip_element, x, y, z$
 { $tip_element$ – tipul *elementului* curent (celula, particula de biomaterial, particula de mediu de cultură),
 x - coordonata x a elementului curent,
 y - coordonata y a elementului curent,
 z - coordonata z a elementului curent}
 dacă $tip_element$ este celulă **atunci**
 atribuie $sumax <- sumax+x$
 atribuie $sumay <- sumay+y$

```

atribuie sumaz <- sumaz+ z
atribuie nr_cel <- nr_cel+1
sfârșit dacă
sfârșit pentru
atribuie xCM <- sumax / nr_cel
atribuie yCM <- sumay / nr_cel
atribuie zCM <- sumaz / nr_cel
{se calculează coordonatele centrului de masă al celulelor din sistemul biologic,
la
un anumit număr de pași Monte Carlo rulați - nr_pasi_mc_rulati}
scrie în fișierul centrelor de masă ale celulelor din sistemul biologic
(cm_sistem.xyz) nr_pasi_mc_rulati, xCM, yCM, zCM
sfârșit pentru
citeste din fișierul centrelor de masă ale celulelor din sistemul biologic
nr_pasi_mc_rulati, xCM, yCM, zCM
trasează zCM în funcție de nr_pasi_mc_rulati
sfârșit algoritm

```

Pentru a urmări evoluția grafică a mediei energiilor de adeziune ale configurațiilor aferente rulării ultimilor 1000 MCS, în raport cu valorile tărilor chemotactice, $K1$ și $K2$, asociate celor două tipuri de celule, am implementat algoritmul dedicat MATLAB ce va fi prezentat în continuare. Simulările au urmărit evoluția unei suspensii de celule în vecinătatea unei biomatrici care are încorporată o substanță chemoattractantă.

Algoritm Calcul și Monitorizare a Energiei Medii de Adeziune

```

algoritm Calcul_Energie_Medie_Ultimii_1000_MCS este:
{algoritm care calculează media energiilor de adeziune aferente configurațiilor
obținute prin rularea ultimilor 1000 de pași Monte Carlo, în cadrul simulărilor
evoluției unei suspensii de celule în vecinătatea unei biomatrici care are
încorporată o substanță chemoattractantă; se monitorizează evoluția energiei medii
ca funcție de valorile tărilor chemotactice ale celor două tipuri de celule ( $K1$ ,  $K2$ )}
crează lista de fișiere .dat
{fișierele .dat conțin pe prima linie valorile lui  $K1$ ,  $K2$  aferente simulării curente, iar
începând de pe a doua linie: (i) numărul de pași MCS rulați curent (ii) energia de
adeziune aferentă configurației respective; fiecare fișier corespunde unei simulări
cu diferite valori ale lui  $K1$ ,  $K2$ }
calculează numărul de fișiere .dat, nr_fis_dat
pentru j în [1, nr_fis_dat] execută
citeste din fișierul curent, în variabila  $K$ , valoarea comună a lui  $K1$  și  $K2$ 
citeste din fișierul curent, în vectorii nrMCS(), En() numărul de pași Monte Carlo
rulați și energiile aferente, în simularea curentă
determină numărul total de pași Monte Carlo rulați în simularea curentă,
nrMCSTotal
EnSum <- 0
{EnSum – suma energiilor de adeziune ale configurațiilor obținute prin rularea
ultimilor 1000 de MCS din simularea curentă}
pentru j în [nrMCSTotal -1000, nrMCSTotal] execută
EnSum <- EnSum + En(j)
sfârșit pentru
EnMed <- EnSum/1000

```


{*EnMed* - media energiilor de adeziune aferente configurațiilor obținute prin rularea ultimilor 1000 de pași Monte Carlo în simularea curentă}

scrie în fișierul *EnK1K2Med.dat* valoarea comună a constantelor $K1$, $K2$ și energia medie calculată pentru ultimii 1000 de pași Monte Carlo rulați în simularea curentă (*EnMed*)

sfârșit pentru

citeste din fișierul *EnK1K2Med.dat* în vectorii $K()$ și $EnMed()$ valoarea comună a constantelor $K1$, $K2$ și energia medie pentru toate simulările

trasează $EnMed()$ în funcție de $K()$

sfârșit algoritm

Un exemplu de fișier care conține valorile constantelor $K1$, $K2$ (listate pe prima linie), numărul de pași Monte Carlo rulați și energiile de adeziune aferente este prezentat în Fig. 3.22:

```

enK1K2.dat - WordPad
File Edit View Insert Format Help
100 100
0 0
1 -1.8
2 -2.4
3 -2.4
4 -3
5 -6
6 -9
7 -7.2
8 -7.8
9 -7.8
10 -6.6
11 -6.6
12 -9.6
13 -9.6
14 -15.6
15 -17.4
16 -25.2
17 -27
18 -30
19 -31.8
20 -29.4
21 -33
22 -34.8
23 -37.8
24 -45.6
For Help, press F1
NUM

```

Fig. 3.22. Exemplu de fișier în care se memorează valorile constantelor $K1$ și $K2$ aferente simulării curente și energia de adeziune a sistemului la fiecare rulare a unui pas Monte Carlo.

Fișierul *EnK1K2Med.dat*, reprezentat în Fig. 3.23, conține pentru fiecare simulare, valoarea comună a constantelor $K1$, $K2$ (listată în prima coloană) precum și energia medie calculată pentru ultimii 1000 de pași Monte Carlo rulați (listată în a doua coloană). Fiecare linie a acestui fișier corespunde unei simulări.

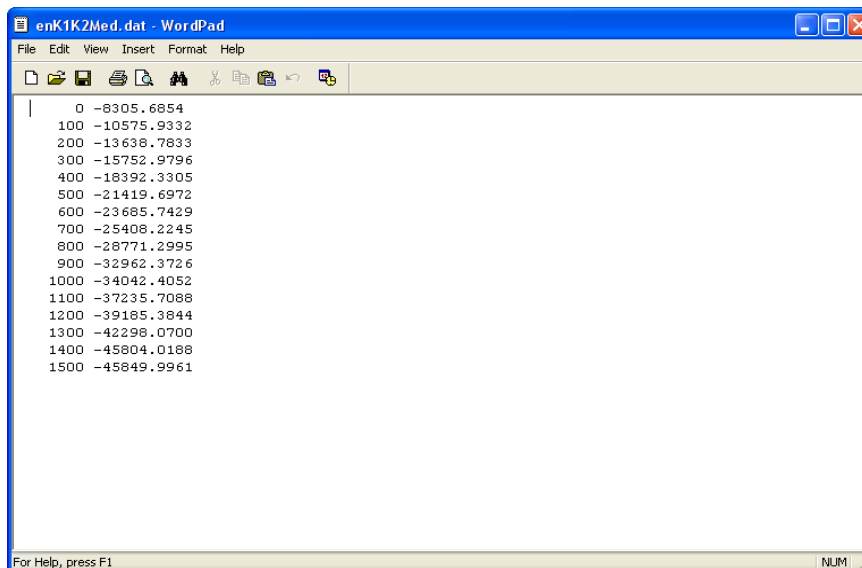


Fig. 3.23. Exemplu de fișier în care fiecare linie conține valoarea comună a constantelor $K1$ și $K2$ și energia de adeziune medie a sistemului obținută pentru ultimii 1000 MCS rulați ai fiecărei simulări.

3.3. Concluzii

Acest capitol are ca obiect modelarea computațională a elementelor componente ale unor structuri tisulare artificiale: suspensii, agregate celulare, plăci de biomaterial și biomatrici poroase. De asemenea, sunt modelate sistemele biologice în ansamblul lor și sunt concepuți și dezvoltați o serie de algoritmi dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale.

Contribuțiile originale aduse în subcapitolul 3.1 sunt următoarele:

1. Construirea modelului computațional al unei suspensii celulare, model care este dezvoltat pe o rețea și prevede mai multe tipuri de celule localizate în poziții aleatoare, în concentrație volumică precizată de utilizator.
2. Construirea modelului computațional al unui agregat celular aflat în mediu de cultură.
3. Construirea modelelor computaționale ale unor structuri alcătuite din materiale biocompatibile: plăci de biomaterial, biomatrici de structură poroasă cu pori cubici, respectiv sferici.

Pentru fiecare model, s-au prezentat: o descriere a modelului, schema bloc a procesului de modelare, cu evidențierea parametrilor de intrare și ieșire, algoritmul de generare a modelului în pseudocod și o vizualizare 3D realizată cu

ajutorul programului de grafică moleculară VMD. Modelele distincte au fost concatenate astfel încât să se obțină modele computaționale ale unor sisteme biologice utilizate în aplicații de inginerie tisulară: (i) agregat celular – placă de biomaterial, (ii) suspensie celulară – biomatrice cu pori sferici, (iii) suspensie celulară – biomatrice cu pori cubici, (iv) agregat celular – biomatrice cu pori sferici și a fost prezentat algoritmul de generare a lor.

Contribuțiile originale aduse în subcapitolul 3.2 sunt următoarele:

1. Elaborarea unei prezentări în manieră originală a bazelor biofizice ale algoritmilor dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo.
2. Dezvoltarea unei serii de algoritmi dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare sub influența adeziunii, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo:
 - (i) algoritmul principal
 - (ii) algoritmul de calcul al energiei totale de adeziune a sistemului biologic
 - (iii) algoritmul de detectare a celulelor capabile de migrare
 - (iv) algoritmul de detectare a vecinilor disponibili pentru migrare
 - (v) algoritmul de calcul al energiei de adeziune în zona afectată
 - (vi) algoritmul propriu-zis Metropolis Monte Carlo.
3. Generarea unei serii de îmbunătățiri ale algoritmului Metropolis Monte Carlo clasic, utilizat în biologie, ținând cont de rezultatele unor cercetări recente privitoare la mobilitatea celulară în sisteme tridimensionale alcătuite din celule și biomateriale, după cum urmează:
 - (i) extinderea modelului cu noduri de rețea asociate unor structuri de biomateriale
 - (ii) definirea proprietăților interfeței celulă – biomaterial
 - (iii) definirea tensiunii interfaciale celulă – biomaterial, în termenii energiilor de interacțiune celulă – celulă, respectiv celulă – substrat
 - (iv) restricționarea modificărilor aleatoare ale sistemului la mișcări posibile din punct de vedere biologic (celulele se mișcă doar de-a lungul interfețelor, putând să-și interschimbe poziția doar cu alte tipuri de celule sau cu elemente de volum de mediu, nefiind permisă interschimbarea cu particule de biomaterial).
4. Dezvoltarea unei serii de algoritmi dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare sub influența adeziunii și chemotaxiei, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo:
 - (i) algoritmul de calcul al concentrației de chemoattractant pe fiecare strat al biomatricii
 - (ii) algoritmul de calcul al energiei asociate fenomenului de chemotaxie
 - (iii) algoritmul de calcul al energiei totale a sistemului biologic ținând cont atât de adeziune cât și de chemotaxie
 - (iv) algoritmul de calcul al diferenței energiilor produse de chemotaxie în zona afectată de mișcare
 - (v) algoritmul propriu-zis Metropolis Monte Carlo adaptat fenomenului de chemotaxie.
5. Conceperea unei serii de algoritmi dedicați MATLAB pentru analiza rezultatelor simulărilor:
 - (i) algoritmul de calcul al numărului de celule atașate la biomaterial

- (ii) algoritm de fitare a datelor referitoare la numărul de celule atașate la biomaterial în funcție de MCS
- (iii) algoritm de monitorizare a vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat în funcție de $\varepsilon_{cs} / \varepsilon_{cc}$
- (iv) algoritm de monitorizare a vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat în funcție de $-\gamma_{cs}$
- (v) algoritm de calcul a valorii medii a numărului de celule atașate și a deviației standard a acestei valori
- (vi) algoritm de monitorizare a numărului de legături dintre elementele interfaciale de tip C1C2, C1S, C2S
- (vii) algoritm de calcul și monitorizare a concentrației de celule din suspensie
- (viii) algoritm de calcul și monitorizare a centrului de masă al celulelor care au pătruns în biomatrice
- (ix) algoritm de calcul și monitorizare a centrului de masă al celulelor din întregul sistem
- (x) algoritm de calcul și monitorizare a energiei medii de adeziune.

Algoritmii dezvoltați în acest capitol au fost prezentați explicit, în limbaj pseudocod, reliefând astfel fluxul logic al operațiilor și oferind un material implementabil în orice limbaj de programare.

4. APLICAȚIA INFORMATICĂ SIMMMC DE MODELARE ȘI SIMULARE A EVOLUȚIEI SISTEMELOR MULTICELULARE ÎN VECINĂTATEA UNOR BIOMATERIALE

4.1. Funcționalitățile aplicației informatice

Aplicația informatică originală SIMMMC de modelare și simulare a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale are ca scop crearea de modele computaționale pentru diferite tipuri de sisteme biologice, iar pe baza acestor modele, simularea evoluției sistemelor multicelulare, având ca suport metoda Metropolis Monte Carlo (MMC).

Modelele computaționale 3D dezvoltate de către această aplicație sunt asociate unor sisteme biologice formate din:

- o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu porii sfere;
- o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi;
- un agregat celular aflat în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu porii sfere;
- un agregat celular situat pe suprafața plană a unei plăci de biomaterial de formă paralelipipedică.

Modelele realizate cu ajutorul acestei aplicații permit controlul arhitecturii elementelor sistemelor biologice, după cum urmează:

- se pot genera biomatrici de diferite dimensiuni, cu pori sferici de diferite raze, conectați prin orificii circulare, de asemenea de diferite raze;
- se pot genera biomatrici de diferite dimensiuni cu pori cubici de diferite laturi;
- se pot genera plăci paralelipipedice de biomaterial de diferite dimensiuni;
- se pot genera agregate celulare de diferite dimensiuni, formate dintr-un singur tip de celule sau din două tipuri de celule, aflate într-un anumit procentaj;
- se pot genera suspensii de celule, de anumite concentrații celulare, formate dintr-un singur tip de celule sau din două tipuri de celule, aflate într-un anumit procentaj.

Aplicația este flexibilă, permițând cu ușurință dezvoltarea unor noi module care să genereze modele computaționale și pentru alte tipuri de sisteme biologice.

Pe baza modelelor 3D realizate, asociate diferitelor sisteme biologice, aplicația permite studiul împrăștierei celulare pe suprafața unei plăci de biomaterial, respectiv studiul însămânțării celulare în biomatrici de structură poroasă, în diferite condiții geometrice, energetice și chimice.

Funcționalitățile de bază ale aplicației SIMMMC sunt:

- (i) simularea împrăștierii unui agregat celular format dintr-un singur tip de celule pe suprafața unei plăci de biomaterial
- (ii) simularea evoluției unui agregat celular format din două populații diferite de celule pe suprafața unei plăci de biomaterial
- (iii) simularea însămânțării unei suspensii celulare care conține una sau două populații diferite de celule într-o biomatrice poroasă
- (iv) simularea însămânțării unei suspensii de celule într-o biomatrice poroasă având încorporată o substanță chemoatractantă
- (v) simularea însămânțării unui agregat celular într-o biomatrice poroasă
- (vi) simularea însămânțării unui agregat celular într-o biomatrice poroasă având încorporată o substanță chemoatractantă.

Simularea evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale constă în rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo (MCS – Monte Carlo Step), precizat de utilizator.

Aplicația are la bază algoritmi originali în care metoda Metropolis Monte Carlo este adaptată în acord cu observațiile experimentale referitoare la motilitatea celulelor. Algoritmii utilizați de SIMMMC sunt prezentați în detaliu în capitolul 3.

4.2. Arhitectura aplicației informatice

Aplicația informatică SIMMMC de modelare și simulare a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale este formată din trei module principale:

- Modulul generare modele computaționale asociate sistemelor biologice
- Modulul racordare modul simulare la modulul generare modele
- Modulul simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare

Arhitectura aplicației, în ansamblu și până la nivelul doi de detaliere este prezentată în Fig. 4.1.

Așa cum se poate observa, *Modulul generare modele computaționale asociate sistemelor biologice* este compus din:

- a. Modulul preluare parametri de intrare
- b. Modulul calcul distribuție chemoatractant pe straturi
- c. Modulul generare matrice suspensie celulară/agregat celular
- d. Modulul generare matrice biomatrice/biomaterial
- e. Modulul formare matrice sistem biologic
- f. Modulul salvare matrice sistem biologic în format .xyz

Modulul preluare parametri de intrare al acestui modul, la rândul lui, constă în următoarele module:

- Modulul preluare parametri utilitari
- Modulul preluare parametri geometrici
- Modulul preluare parametri biologici
- Modulul preluare parametri chemoatractant

Modulul simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare este compus din:

- a. Modulul preluare parametri de intrare
- b. Modulul calcul energie asociată fenomenului de chemotaxie
- c. Modulul calcul energie inițială a sistemului
- d. Modulul determinare legături între elementele sistemului
- e. Modulul implementare algoritm Metropolis Monte Carlo (MMC)

Modulul preluare parametri de intrare al acestui modul, la rândul lui, constă în următoarele module:

- Modulul preluare parametri utilitari
- Modulul preluare parametri energetici
- Modulul preluare parametri MMC

Modulul implementare algoritm Metropolis Monte Carlo (MMC), la rândul lui constă în următoarele module:

- Modulul creare listă celule care au posibilitatea să migreze
- Modulul selecție celulă pentru migrare
- Modulul determinare vecini care permit migrarea
- Modulul selecție vecin cu care are loc interschimbarea poziției celulei
- Modulul interschimbare poziție provizorie
- Modulul calcul energie în zona afectată
- Modulul validare/invalidare interschimbare și actualizare matrice
- Modulul actualizare energie sistem
- Modulul actualizare legături între elementele sistemului
- Modulul salvare rezultate după un număr de pași prefixat

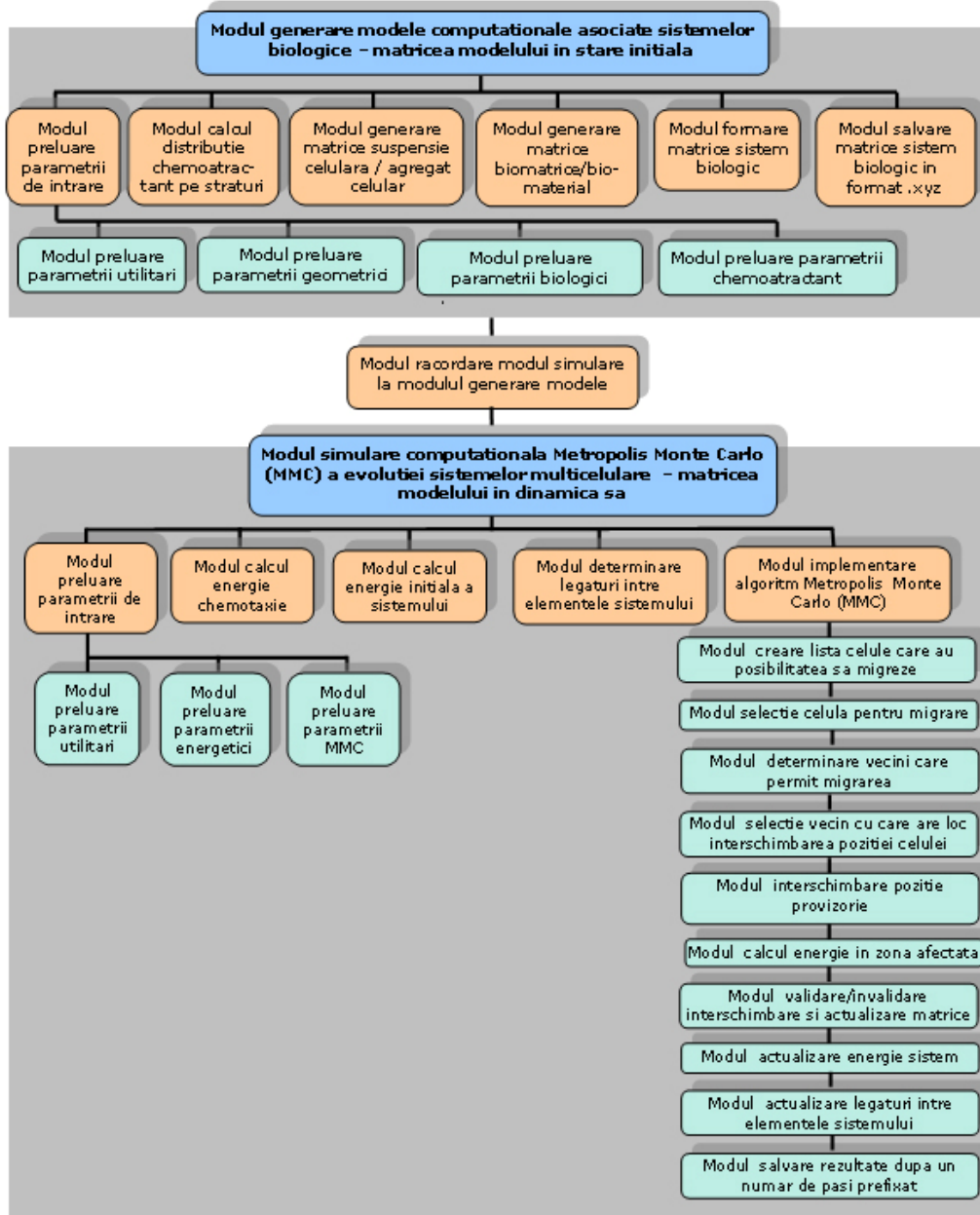


Fig. 4.1. Arhitectura aplicației informatice SIMMMC.

Modulul generare modele computaționale asociate sistemelor biologice are ca scop dezvoltarea de modele computaționale pentru sisteme biologice formate din biomatrice de diferite geometrii / biomateriale, în vecinătatea cărora se află o suspensie celulară sau un agregat celular. Aceste modele reprezintă

punctul de start în studiul evoluției populațiilor de celule în vecinătatea a diferite structuri de biomateriale.

- a. *Modulul preluare parametri de intrare* asigură o interfață care permite utilizatorilor să introducă valori de la tastatură pentru parametrii utilitari, parametrii geometrici, parametrii biologici și parametrii de chemoatractant, necesare în construirea modelului computațional asociat sistemului biologic.
- *Modulul preluare parametri utilitari* – permite utilizatorilor să introducă numele fișierului de ieșire de tipul *xyz*, în care se va salva modelul computațional generat;
 - *Modulul preluare parametri geometrici* – permite utilizatorilor să introducă valori pentru dimensionarea matricii tridimensionale asociate sistemului biologic de-a lungul celor 3 axe *OX*, *OY*, *OZ*, pentru setarea înălțimii biomatricii / biomaterialului (de-a lungul axei *OZ*), iar în funcție de tipul de sistem biologic dorit a se modela, pentru elementele geometrice aferente, astfel:
 - dacă sistemul biologic studiat constă într-o suspensie celulară aflată în vecinătatea unei biomatricii cu porii sfere, utilizatorii vor introduce valori pentru raza porilor biomatricii și raza orificiilor circulare care conectează porii;
 - dacă sistemul biologic studiat constă într-o suspensie celulară aflată în vecinătatea unei biomatricii cu porii cuburi, utilizatorii vor introduce valori pentru latura cuburilor biomatricii;
 - dacă sistemul biologic studiat constă într-un agregat celular situat pe suprafața unei biomatricii cu porii sfere, utilizatorii vor introduce valori pentru raza porilor biomatricii, raza orificiilor circulare care conectează porii și raza agregatului celular;
 - dacă sistemul biologic studiat constă într-un agregat celular situat pe suprafața unui biomaterial de formă paralelipipedică, utilizatorii vor introduce valori pentru raza agregatului celular;
 - *Modulul preluare parametri biologici* – permite utilizatorilor să introducă valori pentru indecșii asociați elementelor din sistemul biologic (celule de tipul 1, celule de tipul 2, particule de biomaterial, respectiv particule de mediu). Dacă populația de celule din cadrul sistemului biologic studiat constă într-o suspensie de celule, utilizatorii vor trebui să introducă valori atât pentru specificația concentrației de celule din suspensie, cât și pentru specificația procentajului de celule de un anumit tip din suspensie. Dacă populația de celule din cadrul sistemului biologic studiat constă într-un agregat celular scăldat în mediu de cultură, utilizatorii vor trebui să introducă valori doar pentru specificația procentajului de celule de un anumit tip din agregat;
 - *Modulul preluare parametri chemoatractant* – permite utilizatorilor să introducă valori pentru parametrii corespunzători unui gradient de chemoatractant din biomatrice. Se setează valoarea concentrației de chemoatractant din stratul superior al biomatricii (punctul minim al gradientului), valoarea concentrației de chemoatractant din stratul inferior al biomatricii (punctul maxim al gradientului), precum și constantele care indică măsura în care o celulă de tip 1, respectiv de tip 2, tinde să se

deplaseze de-a lungul gradientului substanței chemoattractante (tării chemotactice);

- b. *Modulul calcul distribuție chemoattractant pe straturi* – calculează, pe baza concentrației minime și maxime de chemoattractant din stratul superior, respectiv inferior al biomatricii, preluate de la tastatura, distribuția concentrației de chemoattractant pe fiecare strat al biomatricii (în cazul unui gradient constant de concentrație);
- c. *Modulul generare matrice suspensie celulară / agregat celular* – dezvoltă, pe baza valorilor parametrilor geometrici și biologici preluate de la utilizator, modelul computațional asociat unei suspensii de celule sau unui agregat celular scăldat în mediu de cultură. Modelul constă într-o matrice tridimensională a cărei elemente sunt fie indecși asociați particulelor de mediu, fie indecși asociați celor 2 tipuri de celule și este construit pe baza algoritmilor de generare a suspensiei de celule respectiv a agregatului celular, prezentați în pseudocod în capitolul 3;
- d. *Modulul generare matrice biomatrice/biomaterial* - dezvoltă, pe baza valorilor parametrilor geometrici și biologici preluate de la utilizator, modelul computațional asociat unei biomatrice de structură poroasă cu porii sfere/cuburi, sau a unui biomaterial de formă paralelipipedică. Modelul constă într-o matrice tridimensională a cărei elemente sunt fie indecși asociați particulelor de mediu (ce reprezintă porii biomatricii umpluți cu mediu de cultură), fie indecși asociați particulelor de biomaterial și este construit pe baza algoritmilor de generare a biomatricei de structură poroasă cu porii sfere / cuburi sau a biomaterialului de forma paralelipipedică, prezentați în pseudocod în capitolul 3;
- e. *Modulul formare matrice sistem biologic* – construiește modelul computațional asociat sistemului biologic în stare inițială. Modelul constă într-o matrice tridimensională, care s-a obținut prin concatenarea pe verticală a matricii asociate biomatricei/biomaterialului și a matricii suspensiei de celule/agregatului celular;
- f. *Modulul salvare matrice sistem biologic în format .xyz* – realizează salvarea elementelor matricii tridimensionale asociate sistemului biologic într-un fișier cu extensia xyz. Fiecare linie a fișierului conține tipul de particulă, coordonata x , coordonata y și coordonata z a elementului. Elementele de tip particulă de mediu sunt neglijate, pentru a reduce pe cât posibil dimensiunea fișierului. Modelul computațional rezultat poate fi vizualizat ulterior, prin încărcarea fișierului de tip xyz în programul de grafică moleculară, VMD [1].

Modulul racordare modul simulare la modulul generare modele – preia de la Modulul generare modele computaționale asociate sistemului biologic matricea tridimensională asociată sistemului biologic în stare inițială, dimensiunea ei de-a lungul celor 3 axe OX , OY , OZ și înălțimea biomatricei/ plăcii de biomaterial.

Modulul simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multiceulare realizează o simulare Metropolis Monte Carlo a evoluției unor sisteme multiceulare în vecinătatea unor biomateriale. Se urmăresc condițiile energetice și geometrice care conduc la o însămânțare rapidă și uniformă a celulelor în biomatrice de diverse arhitecturi sau la o împrăștiere uniformă și rapidă a celulelor pe suprafața unor biomateriale de formă paralelipipedică.

- a. *Modulul preluare parametri de intrare* – asigură o interfață care permite utilizatorilor să introducă valori de la tastatură pentru parametrii utilitari, parametrii energetici și parametrii MMC, necesare în realizarea simulării Metropolis Monte Carlo a evoluției unor populații de celule.
- *Modulul preluare parametri utilitari* – permite utilizatorilor să introducă numele fișierelor de ieșire de tipul xyz, în care se vor salva configurațiile sistemului biologic obținute la fiecare rulare a unui anumit număr de pași Monte Carlo, precum și numele fișierului de tip txt în care se vor salva valorile energiei sistemului obținute la fiecare rulare a câte unui pas Monte Carlo;
 - *Modulul preluare parametri energetici* – permite utilizatorilor să introducă valori pentru energiile de coeziune dintre celule (energia de coeziune dintre celulele de tipul 1 și de tipul 2, energia de coeziune dintre celulele de tipul 1, energia de coeziune dintre celulele de tipul 2), pentru energiile de adeziune dintre celule și substrat (energia de adeziune dintre celule de tipul 1 și substrat, energia de adeziune dintre celule de tipul 2 și substrat), precum și pentru toate interacțiunile diferitelor elemente din sistem cu mediul de cultură. În studiile efectuate, acestea din urmă se consideră nule;
 - *Modulul preluare parametri MMC* – permite utilizatorilor să introducă numărul de pași Monte Carlo care vor rula în cadrul simulării, precum și un pas de eșantionare care indică la câți pași Monte Carlo rulați se va salva o configurație intermediară a sistemului;
- b. *Modulul calcul energie chemotaxie* – calculează valoarea energiei produsă de fenomenul de chemotaxie, atât în starea inițială a sistemului (dacă în biomatrice nu a pătruns nicio celulă, valoarea acestei energii este 0), cât și în configurațiile obținute după fiecare rulare a unui anumit număr de pași Monte Carlo (în acest caz, celulele încep să pătrundă în adâncimea biomatricei, unde concentrația de chemoattractant este tot mai mare, rezultând o valoare a energiei tot mai mare);
- c. *Modulul calcul energie inițială a sistemului* – calculează energia totală a sistemului biologic în starea inițială (adeziune / adeziune și chemotaxie, în cazul în care biomatricea are încorporată o substanță chemoattractantă);
- d. *Modulul determinare legături între elementele sistemului* – calculează numărul de legături dintre celulele de tipul 1 și celulele de tipul 2, dintre celulele de tipul 1 și substrat, precum și dintre celulele de tipul 2 și substrat pe baza matricii asociate sistemului biologic în stare inițială;
- e. *Modulul implementare algoritm bazat pe Metropolis Monte Carlo (MMC)* – realizează simularea efectivă a dinamicii populației de celule în vecinătatea unei biomatrice de diferite geometrii, sau pe suprafața plană a unui biomaterial de formă paralelipipedică, după cum este prezentat în modulele următoare:
- *Modulul creare listă celule care au posibilitatea să migreze* – detectează celulele care au vecini până în ordinul 3 ce permit migrarea;
 - *Modulul selecție celulă pentru migrare* – selectează aleator o celulă din lista de celule care au posibilitatea să migreze;
 - *Modulul determinare vecini care permit migrarea* – detectează și creează o lista a vecinilor celei selectate care permit migrarea acestora în locul lor;

- *Modulul selecție vecin cu care are loc interschimbarea poziției celulei* – selectează în mod aleator unul dintre vecinii cu care celula își va schimba poziția, stabilindu-se astfel coordonatele noii poziții a celulei;
- *Modulul interschimbare poziție provizorie* – realizează interschimbarea provizorie a poziției celulei cu cea a vecinului selectat;
- *Modulul calcul energie în zona afectată* – calculează energia de adeziune în zona afectată, atât înaintea interschimbării celor două elemente, cât și după interschimbare; dacă biomatricea are încorporată o substanță chemoattractantă, se ține cont și de acest aspect;
- *Modulul validare/invalidare interschimbare și actualizare matrice* – decide dacă interschimbarea celor două elemente este acceptată sau nu, urmărindu-se atingerea unei energii de adeziune minime a sistemului (DAH) și actualizează în funcție de aceasta matricea tridimensională asociată sistemului biologic;
- *Modulul actualizare energie sistem* - actualizează energia de adeziune a sistemului biologic la fiecare pas Monte Carlo rulat;
- *Modulul actualizare legături între elementele sistemului* – actualizează numărul de legături dintre celulele de tipul 1 și celulele de tipul 2, dintre celulele de tipul 1 și substrat, precum și dintre celulele de tipul 2 și substrat, pe baza matricii asociate sistemului biologic obținută după rularea unui număr de pași Monte Carlo prefixat. Acești indicatori ne furnizează informații despre modul de distribuție a celulelor pe suprafața biomaterialului, în cazul în care sistemul biologic studiat este format dintr-un agregat celular situat pe suprafața plană a unui biomaterial de formă paralelipipedică;
- *Modulul salvare rezultate după un număr de pași prefixat* – salvează matricea asociată sistemului biologic, numărul de legături dintre elementele sistemului și energia sistemului biologic obținute după fiecare rulare a unui număr de pași Monte Carlo prefixat.

Aceste 10 module componente ale modulului de implementare a algoritmului bazat pe metoda Metropolis Monte Carlo (MMC) reprezintă în fapt rularea unui pas Monte Carlo, ca urmare se execută de atâtea ori, până numărul de pași Monte Carlo pe care utilizatorul l-a introdus de la tastatură ca și parametru de intrare este atins.

4.3. Diagrame de activitate UML asociate modulelor principale ale aplicației informatice

Pentru a evidenția cât mai clar fluxul de lucru din punctul de pornire până în punctul de final al modulului de generare a modelelor computaționale asociate sistemelor biologice, al modulului de simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare, precum și al modulului de implementare a algoritmului propriu-zis Metropolis Monte Carlo, am utilizat o reprezentare bazată pe diagramele de activitate UML. Astfel, se prezintă clar secvențele de activități ale aplicației informatice dezvoltate, precum și căile de decizie care există în progresia evenimentelor cuprinse în activități.

Fig. 4.2. prezintă diagrama de activitate UML aferentă modulului de generare a modelelor computaționale asociate sistemelor biologice.

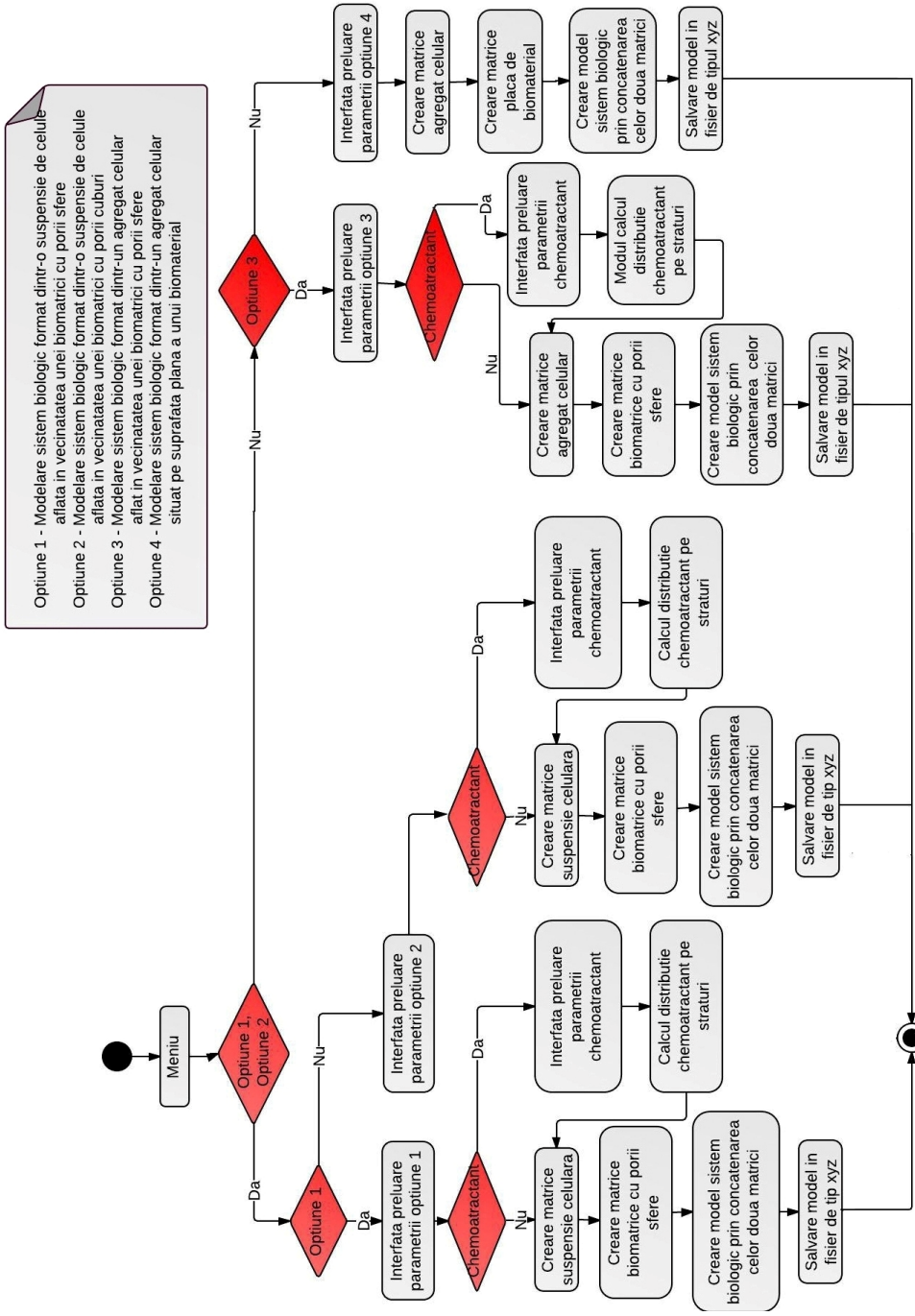


Fig. 4.2. Diagrama de activitate UML aferentă modului de generare a modelelor computaționale asociate sistemelor biologice.

Optiune 1 - Modelare sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflate in vecinatatea unei biomatrici cu porii sfere
 Optiune 2 - Modelare sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflate in vecinatatea unei biomatrici cu porii cuburi
 Optiune 3 - Modelare sistem biologic format dintr-un agregat celular aflat in vecinatatea unei biomatrici cu porii sfere
 Optiune 4 - Modelare sistem biologic format dintr-un agregat celular situat pe suprafata plana a unui biomaterial

Fig. 4.3 prezintă diagrama de activitate UML aferentă modulului de simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare.

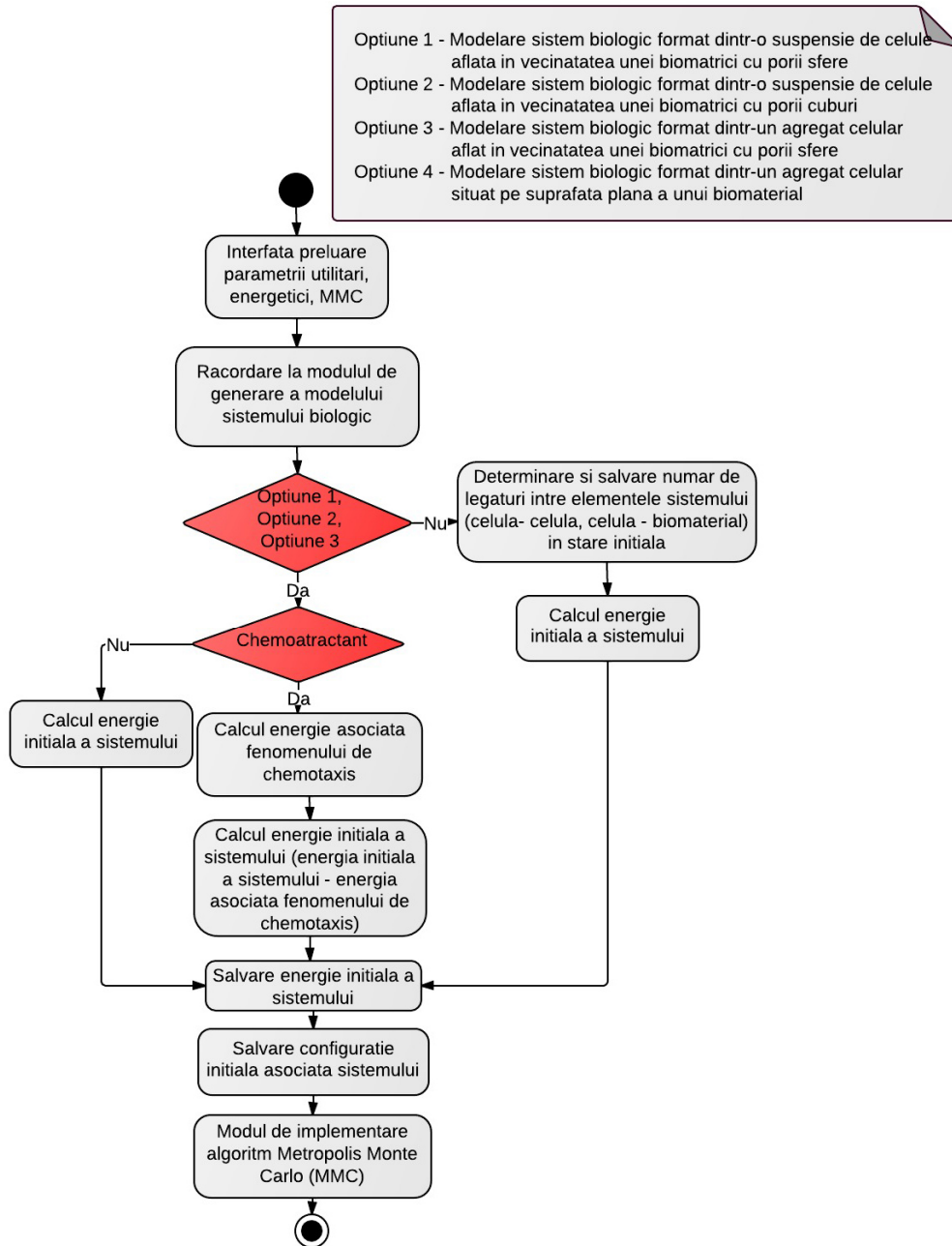


Fig. 4.3. Diagrama de activitate UML aferentă modulului de simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare.

Fig. 4.4 prezintă diagrama de activitate UML aferentă modulului de implementare a algoritmului Metropolis Monte Carlo.

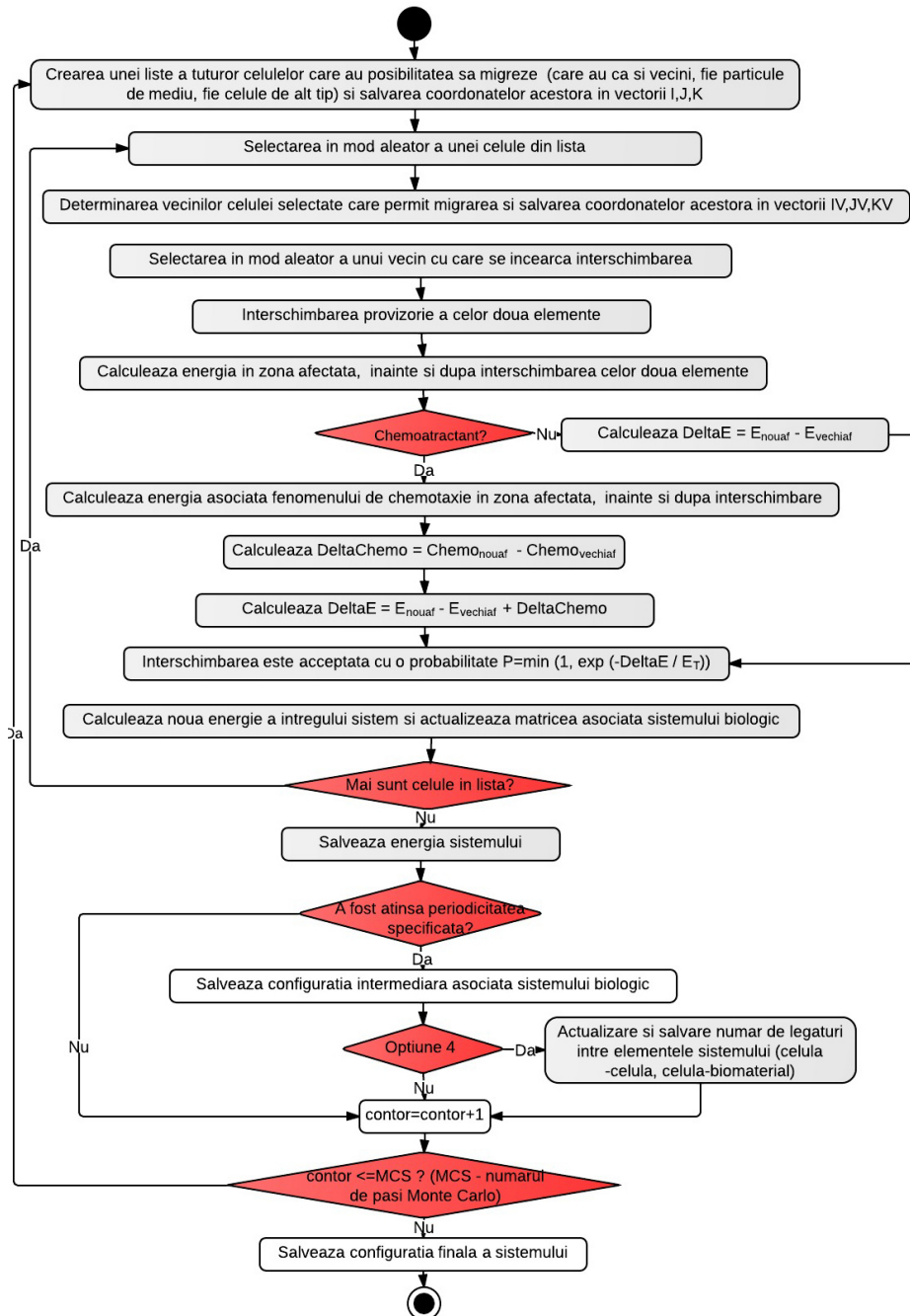


Fig. 4.4. Diagrama de activitate UML aferentă modulului de implementare a algoritmului Metropolis Monte Carlo.

4.4. Considerații privind implementarea aplicației informatice

Aplicația informatică SIMMMC de modelare și simulare a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale a fost implementată în mediul de dezvoltare Visual Studio.Net 2008, utilizând limbajul de programare Visual Basic.Net.

Implementarea modului de generare a modelelor computaționale asociate sistemelor biologice presupune crearea următoarelor metode în clasa *ModelareSistemBiologic*:

Funcția *Generare_Suspensie_Celule*: Această funcție primește ca și parametri de intrare dimensiunile matricii asociate suspensiei de celule, de-a lungul axelor OX, OY, OZ ($dx_susp, dy_susp, dz_susp$), specificația concentrației de celule din suspensie (*specificație_concentrație_cel*), specificația procentajului tipului de celulă din suspensie (*specificație_procentaj_tip_cel*) și indecșii asociați celor două tipuri de celule (*index1, index2*).

Funcția inițializează matricea tridimensională asociată suspensiei de celule cu indexul aferent particulelor de mediu, după care plasează cu ajutorul unui generator de numere pseudo-aleatoare în elementele matricii indecșii celulelor de tipul 1, respectiv de tipul 2, ținând cont de specificația concentrației de celule și de specificația procentajului de celule de tipul 1 și de tipul 2 preluate de la tastatură.

Parametrul de ieșire este matricea tridimensională asociată suspensiei (*Asusp(,,)*).

Funcția *Generare_Agregat_Celular*: Această funcție primește ca și parametri de intrare dimensiunile matricii asociate agregatului celular scăldat în mediul de cultură (dx, dy, dz), raza agregatului celular (R), specificația procentajului tipului de celulă din agregat (*specificație_procentaj_tip_cel*) și indecșii asociați celor două tipuri de celule (*index1, index2*).

Funcția inițializează matricea cu particule de mediu (valoarea 0), iar în pozițiile aferente sferei de rază R ce reprezintă agregatul celular, plasează pe baza unui generator de numere pseudo-aleatoare, indecșii asociați celulelor de tipul 1, respectiv de tipul 2, astfel încât să se respecte specificația procentajului tipului de celulă oferită ca și parametru de intrare.

Parametrul de ieșire este matricea tridimensională asociată agregatului celular (*Aagregat(,,)*).

Funcția *Generare_Biomatrice_Pori_Sfere*: Această funcție primește ca și parametri de intrare dimensiunile matricii asociate biomatricii, de-a lungul axelor OX, OY, OZ ($dx_scaff, dy_scaff, dz_scaff$), raza porilor ($Rpor$), raza orificiilor circulare care conectează porii ($Rorif$) și indexul asociat particulelor de biomaterial (*indexp*).

Funcția realizează următoarele operații:

- extinde matricea asociată biomatricii prin adăugarea unei margini de-a lungul celor 3 axe
- inițializează matricea tridimensională asociată biomatricii cu indexul aferent particulelor de biomaterial

- calculează raza sferelor (R) plasate concentric cu porii de rază R_{por} , conectați prin canale circulare de rază R_{orif} .
- calculează numărul de sfere de rază R de pe axele OX, OY, OZ (N_x, N_y, N_z)
- calculează numărul total de centre ale sferelor din rețea (nr_centre)
- apelează funcția *hexa*
- apelează funcția *scrie_pori*
- decupează porțiunea aferentă marginilor adăugate inițial din matricea returnată de funcția *scrie_pori*, obținând matricea tridimensională asociată biomatricii cu porii sfere, de dimensiune $dx_scaff, dy_scaff, dz_scaff$.

Parametrul de ieșire este matricea tridimensională asociată biomatricii cu porii sfere ($Ascaff(,,)$).

Funcția *Hexa*: Această funcție primește ca și parametri de intrare raza sferelor concentrice porilor (R), numărul de sfere de pe cele 3 axe (N_x, N_y, N_z) și numărul de centre ale sferelor din întreaga rețea (nr_centre).

Funcția calculează și salvează coordonatele tuturor centrelor sferelor de rază R , concentrice porilor. Cu alte cuvinte, funcția *hexa* calculează și salvează coordonatele centrelor tuturor porilor din rețeaua hexagonală creată.

Parametrul de ieșire este un obiect din clasa *centru*, care conține ca și variabile membre 3 vectori $X(), Y(), Z()$ în care se salvează coordonatele centrelor porilor biomatricii.

Funcția *Scrive_Pori*: Această funcție primește ca și parametri de intrare matricea extinsă, inițializată cu particule de mediu (*scaff_mat_margini(,,)*), dimensiunile matricii extinse (im, jm, km), vectorii care conțin coordonatele centrelor porilor ($X(), Y(), Z()$) și raza porilor (R_{por}).

Funcția construiește porii în matricea tridimensională asociată biomatricii de structură poroasă, prin plasarea în pozițiile identificate de rază și de centrele porilor a valorii 0 (0 - index asociat particulelor de mediu de cultură).

Parametrul de ieșire este matricea tridimensională extinsă asociată biomatricii cu porii sfere ($sm_new(,,)$).

Funcția *Generare_Biomatrice_Cuburi*: Această funcție primește ca și parametri de intrare dimensiunile matricii asociate biomatricii, de-a lungul axelor OX, OY, OZ ($dx_scaff, dy_scaff, dz_scaff$), latura porilor reprezentați de cuburi (L), și indexul asociat particulelor de biomaterial (*indexp*).

Funcția inițializează matricea asociată biomatricii cu particule de biomaterial, după care construiește porii biomatricii - cuburi de latură L aflate la o distanță L unele de altele, prin plasarea în pozițiile corespunzătoare a valorii 0 (0 - index asociat particulelor de mediu de cultură).

Parametrul de ieșire este matricea tridimensională asociată biomatricii cu porii cuburi ($Ascaff(,,)$).

Funcția *Generare_Placa_Biomaterial*: Această funcție primește ca și parametri de intrare dimensiunile matricii asociate plăcii paralelipipedice de biomaterial, de-a lungul axelor OX, OY, OZ (dx, dy, dz) și indexul asociat particulelor de biomaterial (*indexp*).

Funcția generează matricea tridimensională asociată plăcii de biomaterial prin plasarea în elementele acesteia a indexului aferent particulelor de biomaterial.

Parametrul de ieșire este matricea tridimensională asociată plăcii paralelipipedice de biomaterial (*Abiomat(,,)*).

Procedura Parametrii_Model: Această procedură salvează într-un fișier text parametri de intrare utilizați în generarea modelului computațional pentru sistemul biologic.

În funcție de tipul de sistem biologic ce se dorește a fi modelat, se instanțiază un obiect din clasa *ModelareSistemBiologic* și se apelează metodele aferente generării modelelor pentru elementele constitutive ale sistemului biologic selectat. Pentru generarea modelului întregului sistem biologic, se concatenează pe verticală matricile rezultate, asociate elementelor constitutive, obținându-se o matrice tridimensională asociată întregului sistem.

Elementele acestei matrici și coordonatele lor sunt salvate într-un fișier de tipul xyz, acesta reprezentând configurația inițială a sistemului biologic. Parametrii de intrare utilizați în model sunt memorați prin apelul metodei *Parametrii_model* a clasei *ModelareSistemBiologic*.

Implementarea modului de simulare computațională Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemelor multicelulare presupune crearea următoarelor metode în clasa *SimulareEvolutieSistemMulticelular*:

Funcția Calcul_Energie_Totală_Adeziune: Această funcție primește ca și parametri de intrare matricea asociată configurației sistemului pentru care se dorește a se calcula energia totală de adeziune (*A(,,)*), dimensiunile acestei matrici de-a lungul axelor *OX, OY, OZ* (*kmax, jmax, imax*) și tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului (substrat și mediu - γ_{s0} , substrat și celula de tipul 1 - γ_{s1} , substrat și celula de tipul 2 - γ_{s2} , mediu și celula de tipul 1 - γ_{01} , mediu și celula de tipul 2 - γ_{02} , respectiv celula de tipul 1 și celula de tipul 2 - γ_{12}).

Funcția calculează energia totală de interacțiune dintre elementele sistemului biologic, astfel: se calculează numărul de legături dintre diferitele elemente ale sistemului (substrat și mediu - B_{s0} , substrat și celula de tipul 1 - B_{s1} , substrat și celula de tipul 2 - B_{s2} , mediu și celula de tipul 1 - B_{01} , mediu și celula de tipul 2 - B_{02} , respectiv celula de tipul 1 și celula de tipul 2 - B_{12}) și se aplică formula:

$$En = B_{s0} \cdot \gamma_{s0} + B_{s1} \cdot \gamma_{s1} + B_{s2} \cdot \gamma_{s2} + B_{01} \cdot \gamma_{01} + B_{02} \cdot \gamma_{02} + B_{12} \cdot \gamma_{12} \quad (4.1)$$

Parametrul de ieșire este energia totală de adeziune a configurației sistemului reprezentată prin matricea *A(,,)* (*En*).

Funcția Detectare_Celule_Migrare: Această funcție primește ca și parametri de intrare matricea asociată configurației sistemului (*A(,,)*), dimensiunile acestei matrici de-a lungul axelor *OX,OY,OZ* (*kmax, jmax, imax*) și numărul total de celule din sistem (*nr_celule*).

Funcția detectează numărul de celule din sistem care au posibilitatea să migreze, având vecini de maxim ordinul 3 care permit acest lucru ($nr_cel_migrare$), precum și memorează coordonatele acestora (în vectorii I, J, K). Algoritmul interschimbării poziției unei celule cu un vecin presupune că celulele de tipul 2 pot migra în locul unui vecin care este fie celula de tipul 1, fie particula de mediu, în timp ce celulele de tipul 1 pot migra doar în locul unui vecin care este particulă de mediu.

Parametrul de ieșire este un obiect din clasa *Lista_celule_migrare* care are ca și variabile membre numărul de celule care pot migra ($nr_cel_migrare$), precum și vectorii care conțin coordonatele acestora (I, J, K).

Funcția *Detectare_Vecini_Disponibili_Migrare*: Această funcție primește ca și parametri de intrare matricea asociată configurației sistemului ($A(,,)$), dimensiunile acestei matrici de-a lungul axelor OX, OY, OZ ($kmax, jmax, imax$) și coordonatele i, j, k ale celulei pentru care se determină lista vecinilor disponibili.

Funcția detectează numărul vecinilor de maxim ordinul 3, în locul cărora se poate muta celula de pe poziția i, j, k (nrv) și memorează coordonatele acestora în vectorii IV, JV, KV .

Dat fiind că indexul asociat unei particule de mediu este 0, indexul asociat unei celule de tipul 1 este 1, indexul asociat unei celule de tipul 2 este 100 și indexul asociat unei particule de biomaterial este 10 000, pentru a asigura că celulele de tipul 2 să își poată schimba poziția doar cu vecini reprezentați fie de celule de tipul 1, fie de particule de mediu, iar celulele de tipul 1 să își poată schimba poziția doar cu vecini reprezentați de particule de mediu, am permis celulelor să își schimbe poziția doar cu elemente din vecinătatea lor care au valoarea indecșilor mai mică decât a lor. Astfel, se compară indexul fiecărui vecin al celulei de pe poziția i, j, k cu indexul celulei și, dacă este mai mic, se incrementează numărul de vecini disponibili, nrv , și se salvează în vectorii IV, JV, KV coordonatele respectivului vecin.

Parametrul de ieșire este un obiect din clasa *Lista_vecini_disponibili* care are ca și variabile membre numărul de vecini disponibili (nrv), precum și vectorii care conțin coordonatele acestora (IV, JV, KV).

Funcția *Calcul_Energie_Adeziune_Zona_Afectată*: Această funcție primește ca și parametri de intrare matricea asociată configurației sistemului ($A(,,)$), coordonatele celulei care încearcă să migreze i, j, k , coordonatele vecinului cu care se încearcă interschimbarea (punctul țintă i_0, j_0, k_0) și tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului ($\gamma_{s0}, \gamma_{s1}, \gamma_{s2}, \gamma_{01}, \gamma_{02}, \gamma_{12}$).

Funcția calculează energia de adeziune din zona afectată astfel:

- se calculează numărul de particule de biomaterial, numărul de celule de tipul 1, numărul de celule de tipul 2 și numărul de particule de mediu din jurul elementului de coordonate i, j, k ($nrs, nr1, nr2, nr0$), precum și din jurul elementului țintă de coordonate i_0, j_0, k_0 ($nrs_0, nr1_0, nr2_0, nr0_0$)
- se verifică de ce tip sunt elementele de pe pozițiile i, j, k , respectiv i_0, j_0, k_0 (particula de mediu, celula de tipul 1, celula de tipul 2)
- în funcție de asta, se calculează numărul de legături dintre diferitele elemente ale sistemului din zona afectată ($B_{s0i}, B_{s1i}, B_{s2i}, B_{01i}, B_{02i}, B_{12i}, B_{s0i_0}, B_{s1i_0}, B_{s2i_0}, B_{01i_0}, B_{02i_0}, B_{12i_0}$)
- se aplică formula:

$$Enaf = (B_{s0}i + B_{s0}i_0) \cdot \gamma_{s0} + (B_{s1}i + B_{s1}i_0) \cdot \gamma_{s1} + (B_{s2}i + B_{s2}i_0) \cdot \gamma_{s2} + (B_{o1}i + B_{o1}i_0) \cdot \gamma_{o1} + (B_{o2}i + B_{o2}i_0) \cdot \gamma_{o2} + (B_{12}i + B_{12}i_0) \cdot \gamma_{12} \quad (4.2)$$

Parametrul de ieșire este energia de adeziune a zonei afectate ($Enaf$).

Funcția Metropolis_Monte_Carlo: Această funcție (vezi diagrama UML din Fig.4.4) primește ca și parametri de intrare matricea asociată configurației sistemului ($A(,,)$), dimensiunile acestei matrici de-a lungul axelor OX , OY , OZ ($kmax$, $jmax$, $imax$), înălțimea biomatricei (dz_scaff), tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului (γ_{s0} , γ_{s1} , γ_{s2} , γ_{o1} , γ_{o2} , γ_{12}), numărul de celule din configurația curentă care au posibilitatea să migreze ($nr_cel_migrare$), vectorii care conțin coordonatele acestora (I , J , K) și energia inițială de adeziune a sistemului (En).

În cadrul acestei funcții, se efectuează următoarele:

- se parcurg toate celulele care au posibilitatea să migreze, selectându-se în mod aleator o celulă dintre acestea și identificându-se coordonatele acesteia (i , j , k)
- se apelează funcția *Detectare_Vecini_Disponibili_Migrare* pentru a determina vecinii în locul cărora celula selectată se poate muta și coordonatele acestora
- se selectează aleator unul dintre vecinii disponibili și se stabilesc coordonatele noii poziții a celulei (poziția target – i_0 , j_0 , k_0)
- se mută celula din poziția i , j , k în poziția i_0 , j_0 , k_0
- se apelează funcția *Calcul_Energie_Adeziune_Zona_Afectata* pentru a calcula energia în zona afectată, atât pentru noua configurație obținută în urma migrării celulei, cât și pentru vechea configurație
- se calculează ΔE , ca fiind diferența dintre energia în zona afectată după migrare și energia înaintea migrării
- migrarea celulei este acceptată cu o probabilitate $P = \min(1, \exp(-\Delta E))$, urmărindu-se minimizarea energiei de adeziune a sistemului
- dacă $\Delta E \leq 0$, mișcarea este acceptată
- dacă $\Delta E > 0$, se generează un număr aleator cuprins între 0 și 1; dacă $\exp(-\Delta E)$ este mai mare decât acest număr atunci se acceptă mișcarea, în caz contrar se respinge
- se actualizează matricea asociată sistemului și se calculează noua energie a sistemului
- se selectează în mod aleator o altă celulă din lista celulelor care au posibilitatea să migreze și se execută din nou toți pașii prezentați.

Acest procedeu se repetă până când toate celulele din listă sunt baleate, oferindu-se, astfel, șansa fiecărei celule de a efectua o mișcare. Parametrul de ieșire este un obiect din clasa *MonteCarloReturn* care are ca și variabile membre noua energie a sistemului $Enew$ și noua configurație a sistemului reprezentată prin matricea $Anew(,,)$. O rulare a funcției *MonteCarlo* reprezintă de fapt rularea unui pas Monte Carlo, adică a unei secvențe de operații care permite fiecărei celule care are vecini disponibili să efectueze o mișcare.

În cazul în care se selectează opțiunea ca biomatricea modelată să aibă încorporată o substanță chemoatractantă, distribuită neuniform (având astfel un gradient de concentrație constant), se implementează procedura eveniment *Calcul_distributie_chemoatractant_pe_straturi*, care este o metodă a clasei *Chemoatractant*.

Procedura eveniment *Calcul_Concentrație_Chemoatractant_Straturi*:

În cadrul acestei proceduri eveniment, se preiau de la tastatură valorile concentrației de chemoatractant din stratul superior și inferior al biomatricei, *C1* și *C2* ($C2 > C1$) și se calculează pentru fiecare strat al biomatricei valoarea concentrației de chemoatractant, astfel încât în stratul superior al biomatricei să avem valoarea minimă (*C1*) și în stratul inferior al biomatricei să avem valoarea maximă (*C2*).

În această situație, pentru implementarea fenomenului de chemotaxie s-au realizat suplimentar următoarele funcții:

Funcția *Calcul_Energie_Chemotaxie*: Această funcție primește ca și parametri de intrare vectorul în care este memorată distribuția concentrației de chemoatractant pe fiecare strat (*chemostrat()*), matricea asociată configurației sistemului (*A(,,)*), dimensiunile acestei matrici de-a lungul axelor *OX*, *OY*, *OZ* (*kmax*, *jmax*, *imax*), înălțimea biomatricei (*dz_scaff*) și țăriile chemotactice ale celor două tipuri de celule (*K1*, *K2*).

Funcția identifică celulele din fiecare strat al biomatricei, și în funcție de tipul lor, calculează valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie, pentru configurația primită ca și parametru. Această valoare reprezintă parametrul de ieșire al funcției (*CH*).

Funcția *DeltaChemotaxie*: Această funcție primește ca și parametri de intrare vectorul în care este memorată distribuția concentrației de chemoatractant pe fiecare strat (*chemostrat()*), matricea asociată configurației sistemului (*A(,,)*), coordonatele celulei care încearcă să migreze *i*, *j*, *k*, coordonatele vecinului cu care se încearcă interschimbarea (punctul țintă *i₀*, *j₀*, *k₀*) și țăriile chemotactice ale celor două tipuri de celule (*K1*, *K2*).

Funcția verifică tipul celulei care încearcă să migreze și tipul vecinului cu care se încearcă interschimbarea, identificând măsurile în care aceste elemente tind să se deplaseze de-a lungul gradientului de chemoatractant. În funcție de aceste măsuri și de concentrațiile de chemoatractant de pe fiecare strat al biomatricei, funcția returnează diferența dintre energiile asociate fenomenului de chemotaxie din zona afectată, de după și dinaintea efectuării mișcării (*deltachemo*).

În această situație, funcția *Calcul_Energie_Totala_Chemotaxie_Adeziune* primește ca parametru suplimentar valoarea energiei produsă de fenomenul de chemotaxie (*CH*), iar energia de adeziune a întregului sistem se calculează cu formula:

$$En = B_{s0} \cdot \gamma_{s0} + B_{s1} \cdot \gamma_{s1} + B_{s2} \cdot \gamma_{s2} + B_{01} \cdot \gamma_{01} + B_{02} \cdot \gamma_{02} + B_{12} \cdot \gamma_{12} - CH \quad (4.3)$$

În cadrul funcției *Metropolis_Monte_Carlo*, de asemenea apare o modificare: se calculează ΔE ca fiind diferența dintre energia în zona afectată după migrare și energia în zona afectată înaintea migrării, la care se adună diferența energiilor

produse de fenomenul de chemotaxie din zona afectată (*deltachemo*) (vezi diagrama UML din Fig.4.4), calculată prin apelul funcției *DeltaChemotaxie*.

Procedura *SalveazaAxyz*: Această procedură primește ca și parametri de intrare matricea asociată configurației sistemului ($A(,,)$), dimensiunile acestei matrici de-a lungul axelor OX, OY, OZ ($kmax, jmax, imax$), înălțimea regiunii în care se află biomatricea sau placa de biomaterial (dz_scaff), numele fișierului de tipul xyz în care se salvează configurația sistemului ($fnume$), numărul de pași Monte Carlo rulați pentru configurația curentă ($nr_pasi_mc_rulati$), numărul total de pași Monte Carlo rulați în simulare (MCS) și pasul de eșantionare care indică din câți în câți pași să se salveze configurațiile sistemului (pas_es).

Procedura salvează într-un fișier de tipul xyz configurația sistemului și parametrii asociați acesteia.

Procedura *SalveazaNr_legături*: Această procedură primește ca și parametri de intrare numărul de pași Monte Carlo specificați (MCS), numărul de pași Monte Carlo rulați în momentul apelului funcției ($nr_MCS_curenti$), numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 (nr_leg12), numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat (nr_leg1s), numărul de legături dintre celulele de tip 2 și substrat (nr_leg2s) și numele fișierului de tipul txt în care se salvează numărul de legături dintre diferitele elemente ale sistemului ($fnume$).

Procedura salvează într-un fișier text numărul de legături dintre diferitele elemente ale sistemului, după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo.

Procedura *SalveazaEn*: Această procedură primește ca și parametri de intrare vectorul în care sunt memorate energiile sistemului după rularea fiecărui pas Monte Carlo ($En()$) și numele fișierului text în care se vor salva aceste energii.

Procedura salvează într-un fișier text, pe câte o line, numărul de pași Monte Carlo rulați și energia de adeziune a sistemului pentru configurația obținută în urma rulării.

Funcția *NumaraCel*: Această funcție primește ca și parametri de intrare matricea asociată configurației sistemului ($A(,,)$) și dimensiunile acestei matrici de-a lungul axelor OX, OY, OZ ($kmax, jmax, imax$).

Funcția parcurge toate elementele acestei matrici și calculează numărul de celule din sistem. Parametrul de ieșire este numărul total de celule din sistem (nr_cel).

Procedura *Parametrii_simulare*: Această procedură salvează într-un fișier text parametrii energetici, numărul de pași Monte Carlo ce se doresc a fi rulați și numărul de pași Monte Carlo dintre două configurații succesive, utilizați în simulare.

Programul principal de simulare *Metropolis Monte Carlo* a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale constă în procedura eveniment *SimulareMetropolisMonteCarlo*. În cadrul acestei proceduri, într-o primă fază:

- se preiau de la tastatură parametrii utilitari și energetici, numărul de pași Monte Carlo ce se doresc a fi rulați în simulare și numărul de pași Monte Carlo după care se dorește să se salveze configurația sistemului

- se calculează tensiunile interfaciale dintre diferitele elemente ale sistemului ($\gamma_{s0}, \gamma_{s1}, \gamma_{s2}, \gamma_{01}, \gamma_{02}, \gamma_{12}$)
- se construiește matricea tridimensională asociată sistemului biologic, fie prin racordare la *Modulul generare modele computaționale asociate sistemelor biologice*, fie prin preluarea ultimei configurații obținute în simularea anterioară.

Simularea propriuzisă presupune execuția următorilor pași:

- se apelează funcția *Calcul_Energie_Totala_Adeziune*, pentru a se calcula energia inițială a sistemului (în cazul în care biomatricea are încorporată o concentrație de chemoatractant, se apelează mai întâi funcția *Calcul_Energie_Chemotaxie*, iar apoi, pentru calculul energiei sistemului, funcția *Calcul_Energie_Totala_Chemotaxie_Adeziune*);
- se inițializează numărul de pași Monte Carlo cu valoarea 1 sau cu o valoare ce reprezintă numărul de pași Monte Carlo rulați în simularea anterioară incrementat cu 1 (acest ultim caz se referă la situația în care se dorește ca noua simulare să continue de la ultima configurație obținută a simulării anterioare, în scopul de a rula un număr mai mare de MCS în aceleași condiții de intrare, dar fără a relua întreaga simulare de la început);
- se creează o buclă *while* care se va executa până când numărul de pași Monte Carlo rulați devine egal cu numărul de pași Monte Carlo specificați de la tastatură; în cadrul buclei, se apelează funcția *Detectare_Celule_Migrare*, apoi se apelează funcția *Metropolis_Monte_Carlo*, actualizându-se matricea asociată sistemului, precum și noua energie a sistemului; dacă numărul de pași Monte Carlo rulați e multiplu de valoarea pasului de eșantionare preluat de la tastatură, atunci se apelează funcția *SalveazaAxyz*; se incrementează numărul de pași Monte Carlo rulați și se repetă execuția operațiilor din cadrul buclei;
- la părăsirea buclei, se apelează funcția *SalveazaEn* și procedura *Parametrii_configurație*.

Durata simulării s-a calculat cu ajutorul unei variabile de tipul *TimeSpan* și s-a afișat la finalul simulării într-un *MessageBox* în zile, ore, minute, secunde. Implementarea *ProgressBar*-ului care arată în ce stadiu e simularea s-a realizat într-un fir de execuție separat.

Vizualizarea configurației inițiale a sistemului biologic, precum și a configurațiilor intermediare obținute în timpul rulării pașilor Monte Carlo se face utilizând programul de grafică moleculară *Visual Molecular Dynamics (VMD)* [1].

Analiza cantitativă a datelor aferente diferitelor configurații ale sistemului - salvate în fișierele de tip *xyz* - care conduce la determinarea condițiilor geometrice și energetice optime pentru o însămânțare/împrăștiere celulară reușită, se face cu ajutorul unor algoritmi originali dezvoltați în *MATLAB*, prezentați în capitolul 3.

4.5. Interfața cu utilizatorul

Aplicația informatică realizată are o interfață prietenoasă, care permite utilizatorilor să introducă simplu și rapid, valori atât pentru parametrii de model, cât și pentru parametrii de simulare.

Fereastra principală a aplicației conține 4 opțiuni aferente celor 4 sisteme biologice care pot fi modelate:

- sistem biologic constând într-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu porii sfere;
- sistem biologic constând într-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu porii cuburi;
- sistem biologic constând într-un agregat celular aflat în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu porii sfere;
- sistem biologic constând într-un agregat celular situat pe suprafața unei plăci de biomaterial (Fig. 4.5).

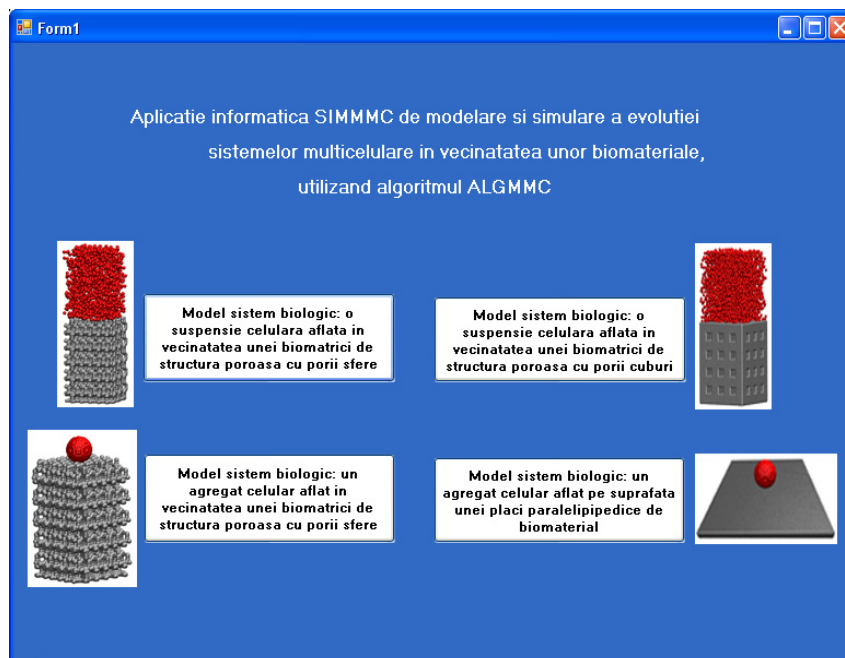


Fig. 4.5. Fereastra principală a aplicației SIMMMC.

În funcție de opțiunea selectată, se va deschide o fereastră care permite utilizatorului să introducă parametrii de model customizați pentru sistemul biologic selectat.

Form2

Generarea modelului computational pentru un sistem biologic
format dintr-o suspensie de celule situata in vecinatatea unei biomatrici
de structura poroasa cu porii sfere

Nume fisier de iesire:

Dimensiunile matricii tridimensionale asociate sistemului biologic:

Raza porilor: (diametre celulare)
Raza orificiilor care conecteaza porii: (< Raza porilor)
Specificatia concentratiei de celule din suspensie: %
Specificatia procentajului de celule de un anumit tip din suspensie: %
Valori asociate fiecarui tip de celula, particulelor de biomaterial si particulelor de mediu:

<input type="text" value="1"/>	(tipul 1 de celule)
<input type="text" value="100"/>	(tipul 2 de celule)
<input type="text" value="10000"/>	(particula de biomaterial)
<input type="text" value="0"/>	(particula de mediu)

Doriti sa introduceti un gradient de chemoattractant in scaffold?

Start generare model sistem biologic Simulare Metropolis Monte Carlo

Fig. 4.6. Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici cu porii sfere.

În cazul în care sistemul biologic ce se dorește a fi modelat este format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici cu porii sfere, parametrii de model sunt următorii: (Fig. 4.6)

- numele fișierului de ieșire în care se va salva configurația inițială a sistemului;
- dimensiunile matricii tridimensionale asociate sistemului biologic: $imax$ – numărul de elemente de pe axa OZ , $jmax$ – numărul de elemente de pe axa OY , $kmax$ – numărul de elemente de pe axa OX ;
- înălțimea biomatrici (pentru a identifica punctul Z_0 de pe axa OZ de unde începe suspensia celulară; făcând diferența dintre $imax$ și înălțimea biomatrici, obținem înălțimea suspensiei celulare);
- raza porilor biomatrici – se măsoară în diametre celulare;
- raza orificiilor circulare care conectează porii – se măsoară în diametre celulare;
- specificația concentrației de celule din suspensie;
- specificația procentajului de celule de un anumit tip din suspensie;
- indecșii asociați elementelor sistemului biologic (particule de mediu, celule de două tipuri, particule de biomaterial).

Dacă se selectează opțiunea de introducere a unui gradient de chemoattractant în biomatrice, se va deschide o fereastră care permite setarea valorii concentrației de chemoattractant din stratul superior al biomatrici (punctul minim al gradientului), a valorii concentrației de chemoattractant din stratul inferior al biomatrici (punctul maxim al gradientului), precum și a tărilor chemotactice asociate tipului 1 și tipului 2 de celule (Fig. 4.7).

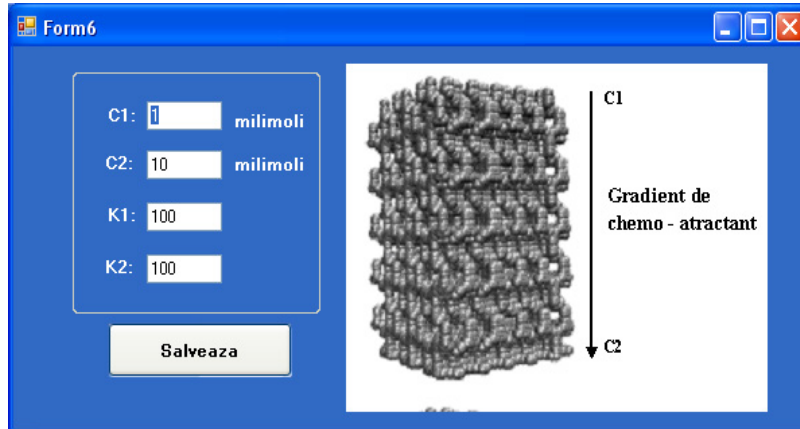


Fig. 4.7. Fereastra pentru introducerea parametrilor de chemoattractant.

În cazul în care sistemul biologic ce se dorește a fi modelat este format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici cu porii cuburi, utilizatorul trebuie să introducă de la tastatură, pe lângă o parte din parametrii de model prezentați în cazul sistemului biologic anterior, valoarea în diametre celulare a laturii cuburilor ce reprezintă porii (Fig. 4.8).

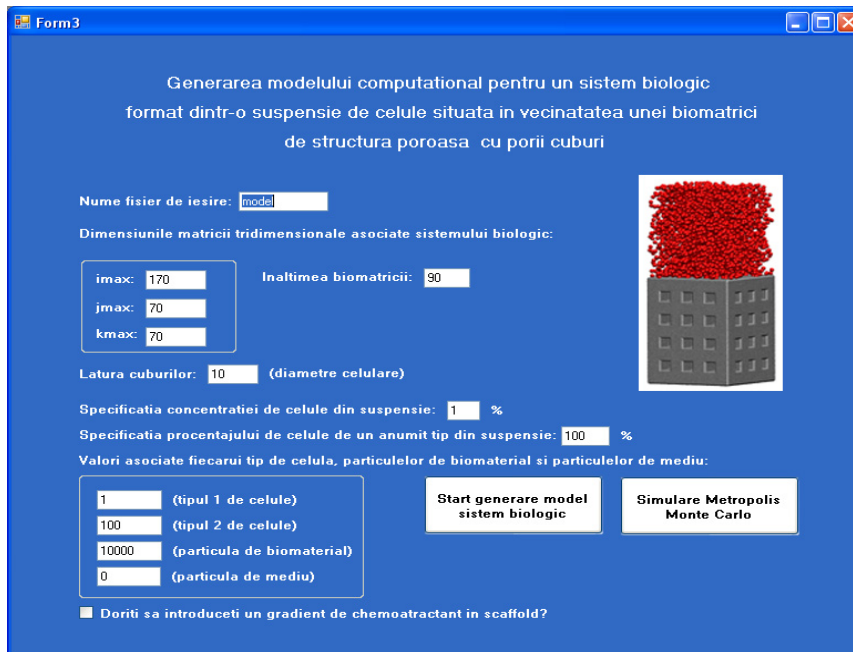


Fig. 4.8. Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici cu porii cuburi.

În cazul în care sistemul biologic ce se dorește a fi modelat este format dintr-un agregat celular aflat în vecinătatea unei biomatrici cu porii sfere, utilizatorul trebuie să introducă de la tastatură, pe lângă o parte din parametrii prezentați

anterior, raza agregatului celular precum și specificația procentajului de celule de un anumit tip din agregat (Fig. 4.9).

Fig. 4.9. Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-un agregat celular aflat în vecinătatea unei biomatrici cu porii sfere.

În cazul în care sistemul biologic ce se dorește a fi modelat este format dintr-un agregat celular situat pe suprafața plană a unei plăci paralelipedice de biomaterial, interfața de preluare a parametrilor de model este prezentată în Fig. 4.10:

Fig. 4.10. Fereastra pentru introducerea parametrilor de model pentru un sistem biologic format dintr-un agregat celular situat pe suprafața plană a unei plăci paralelipedice de biomaterial.

Odată ce modelul asociat sistemului biologic este creat, utilizatorul are posibilitatea de a începe simularea Metropolis Monte Carlo a evoluției sistemului multicelular. Interfața grafică a modului de program care permite simularea evoluției sistemelor multicelulare pe suprafața unor biomateriale este prezentată în Fig. 4.11.

Parametrii necesari realizării simulării evoluției sistemelor multicelulare sunt:

- numele fișierului de ieșire de tip xyz, care prin concatenare cu un contor, furnizează numele fișierelor în care se salvează configurațiile intermediare ale sistemului obținute după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo;
- numele fișierului text în care se salvează valorile energiilor de adeziune ale sistemului la fiecare rulare a unui pas Monte Carlo;
- parametrii energetici care reprezintă o măsură a interacțiunii dintre diferitele componente ale sistemului (0 - particulă de mediu, 1 - celulă de tip 1, 2 - celulă de tip 2, s - particulă de biomaterial);
- numărul de pași Monte Carlo care se doresc a fi rulați în timpul simulării;
- numărul de pași Monte Carlo rulați între două configurații succesive.

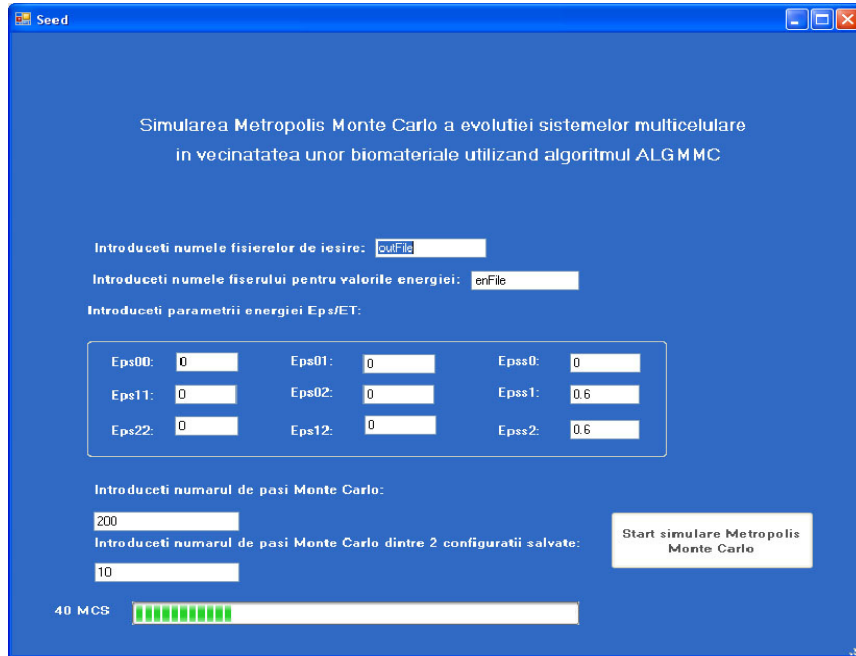


Fig. 4.11. Fereastra pentru introducerea parametrilor de simulare a evoluției sistemului multicelular.

După rularea numărului de pași Monte Carlo specificat, aplicația ne arată durata simulării în zile, ore, minute, secunde (Fig. 4.12).

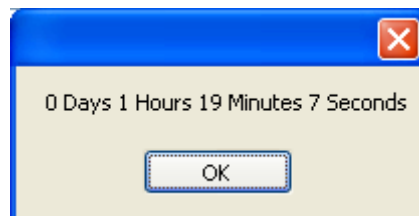


Fig. 4.12. Fereastra de afișare a duratei simulării Metropolis Monte Carlo.

De asemenea, aplicația oferă posibilitatea de a rula un număr mai mare de pași Monte Carlo în cazul în care rezultatele obținute nu sunt satisfăcătoare, pornind de la configurația finală obținută în urma rulării anterioare. Această opțiune este deosebit de folositoare, având în vedere că nu trebuie să rulăm de la început de fiecare dată un anumit număr de pași Monte Carlo, ci putem să continuăm din punctul în care am rămas, economisind ore bune de simulare.

4.6. Concluzii

În cadrul acestui capitol, este prezentată aplicația informatică originală SIMMMC, concepută pentru studiul evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor structuri formate din materiale biocompatibile. Scopul aplicației este furnizarea de informații de interes pentru optimizarea tehnicilor de creare a structurilor tisulare in vitro. Aplicația are la bază algoritmi originali prezentați în capitolul 3 și este implementată în mediul de dezvoltare Visual Studio.Net 2008, utilizând limbajul de programare Visual Basic.Net.

Prezentarea cuprinde:

- funcționalitățile aplicației
- arhitectura aplicației
- modulele aplicației
- diagramele de activitate UML asociate modulelor principale ale aplicației
- considerațiile privind implementarea aplicației
- interfața cu utilizatorul a aplicației

Contribuțiile personale aduse în acest capitol sunt:

1. Concepția funcționalităților aplicației informatice originale SIMMMC, astfel încât aceasta să permită crearea facilă de modele computaționale pentru diferite tipuri de structuri tisulare artificiale și simularea fidelă a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale:
 - (i) funcționalitatea de generare a modelului unui agregat celular situat pe suprafața plană a unei plăci de biomaterial de formă paralelipipedică
 - (ii) funcționalitatea de generare a modelului unei suspensii de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă cu pori sferici
 - (iii) funcționalitatea de generare a modelului unei suspensii de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă cu pori cubici
 - (iv) funcționalitatea de generare a modelului unui agregat celular aflat în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă
 - (v) funcționalitatea de simulare a împrăștierei unui agregat celular format dintr-un singur tip de celule pe suprafața unei plăci de biomaterial
 - (vi) funcționalitatea de simulare a evoluției unui agregat celular format din două populații diferite de celule pe suprafața unei plăci de biomaterial
 - (vii) funcționalitatea de simulare a însămânțării unei suspensii celulare care conține una sau două populații diferite de celule într-o biomatrice poroasă
 - (viii) funcționalitatea de simulare a însămânțării unei suspensii de celule într-o biomatrice poroasă având încorporată o substanță chemoattractantă
 - (ix) funcționalitatea de simulare a însămânțării unui agregat celular într-o biomatrice poroasă
 - (x) funcționalitatea de simulare a însămânțării unui agregat celular într-o biomatrice poroasă având încorporată o substanță chemoattractantă.

2. Concepția arhitecturii aplicației SIMMMC.
3. Concepția și descrierea modulelor aplicației SIMMMC, la nivel de detalii suport pentru implementare (diagrame de activitate UML - vezi Figurile 4.2 – 4.4):
 - (i) modulul generare modele computaționale asociate sistemelor biologice:
 - modulul preluare parametri de intrare
 - modulul calcul distribuție chemoattractant pe straturi
 - modulul generare matrice suspensie celulară/agregat celular
 - modulul generare matrice biomatrice/biomaterial
 - modulul formare matrice sistem biologic
 - modulul salvare matrice sistem biologic în format .xyz
 - (ii) modulul racordare modul simulare la modulul generare modele
 - (iii) modulul simulare computațională Metropolis Monte Carlo (MMC) a evoluției sistemelor multicelulare:
 - modulul preluare parametri de intrare
 - modulul calcul energie asociată fenomenului de chemotaxie
 - modulul calcul energie inițială a sistemului
 - modulul determinare legături între elementele sistemului
 - modulul implementare algoritm MMC.
4. Implementarea modulelor aplicației SIMMMC.
5. Concepția și implementarea interfeței cu utilizatorul a aplicației SIMMMC.

Menționăm că aplicația SIMMMC aduce următoarele elemente de noutate:

- (i) Permite modelarea nu numai a unor agregate celulare, ci și a unor suspensii celulare de diferite concentrații.
- (ii) Permite modelarea nu numai a biomatricilor cu pori cubici, ci și a biomatricilor cu pori sferici interconectați, având ca parametri geometrici independenți raza porilor și raza orificiilor dintre pori.
- (iii) Permite simularea evoluției a diferite sisteme multicelulare (suspensii celulare, respectiv agregate celulare) în vecinătatea unor structuri formate din materiale biocompatibile (biomatrici cu pori cubici, biomatrici cu pori sferici interconectați și plăci de biomaterial) pe baza metodei MMC adaptată original în acord cu observațiile experimentale referitoare la motilitatea celulelor. Celulele se pot mișca doar prin interschimbarea de poziție cu celule de alt tip sau cu elemente de volum de mediu, nu și cu particule de biomaterial.
- (iv) Calculează energia de adeziune a sistemului, ținând cont, pe lângă tensiunea interfacială dintre celulele de diferite tipuri și tensiunea interfacială dintre celule și mediu și de tensiunea interfacială dintre celule și substrat.
- (v) Permite simularea evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrici poroase pe baza metodei MMC cu luarea în considerare a fenomenului de chemotaxie.
- (vi) Permite ca o simulare care nu dă rezultate satisfăcătoare să fie continuată cu noi pași Monte Carlo, pornind de la configurația finală obținută în cadrul ei. Această opțiune este deosebit de utilă, având în vedere că nu trebuie să rulăm de la început de fiecare dată un anumit număr de pași Monte Carlo – de regulă de ordinul sutelor de mii -, ci putem să continuăm din punctul în care am rămas, economisind timp.
- (vii) SIMMMC este singura aplicație integrată de tip Metropolis Monte Carlo (MMC) de rezoluție celulară, care permite modelarea și simularea

evoluției unor structuri tisulare artificiale care includ și biomateriale, ținând cont pe lângă interacțiunile celulă – celulă, celulă – mediu și de interacțiunile celulă – substrat. Așa cum Compu Cell 3D oferă o platformă de implementare a modelului GGH, aplicația SIMMMC oferă o platforma de implementare a modelului MMC.

Aplicația SIMMMC este mai rapidă decât aplicațiile de rezoluție subcelulară (cum ar fi Compu Cell 3D) deoarece ea se bazează pe algoritmul MMC, având ca pas elementar interschimbarea poziției unei celule cu vecinii săi de tip diferit. Astfel, aplicația permite simularea evoluției unor structuri tisulare artificiale care includ milioane de celule.

Aplicația este flexibilă, permițând cu ușurință dezvoltarea unor noi module care să genereze modele computaționale și pentru alte tipuri de sisteme biologice.

5. STUDIUL COMPUTAȚIONAL AL EVOLUȚIEI SISTEMELOR MULTICELULARE PE SUPRAFAȚA UNOR BIOMATERIALE

5.1. Studiul împrăștierii unui agregat celular pe suprafața plană a unui biomaterial

5.1.1. Introducere

Împrăștierea celulară este un fenomen central, care are loc în timpul dezvoltării embrionare, în procesul de vindecare a rănilor, precum și în procesul de invazie și propagare a cancerului. Înțelegerea procesului de împrăștiere a celulelor pe un substrat sintetic este deosebit de importantă pentru domeniul ingineriei tisulare, furnizând informații utile, atât pentru crearea de structuri tisulare in vitro, cât și pentru studiul evoluției țesuturilor canceroase [92].

În încercarea de a înțelege morfogeneza tisulară, o abordare utilizată de Ryan et al. [92] constă în caracterizarea energiei de coeziune celulă - celulă, respectiv a energiei de adeziune celulă - substrat prin parametri cantitativi și manipularea comportamentelor celulare, prin varierea acestor parametri sistematic. Această abordare conduce la prezicerea anumitor aspecte ale comportamentului celular și furnizarea de informații relevante pentru biologia celulară moleculară, știința materialelor și biofizică.

Pentru a varia rezistența adeziunii celulă-substrat, o serie de copolimeri care încorporează diferite concentrații de proteine (PEG) au fost sintetizați. În urma unui test de spălare, cu cât proporția de PEG a fost mai mare, cu atât adeziunea celulă - substrat a fost găsită mai mică. Pentru a varia coeziunea dintre celule, s-au folosit mai multe linii celulare, fiecare exprimând diferite tipuri și niveluri de caderine [92].

Prin modificarea sistematică, în cadrul unor experimente, a interacțiunilor celulă - celulă, respectiv celulă - substrat, Ryan et al. [92] au generalizat DAH [2], incluzând și adeziunea celulă - substrat în cadrul acestui principiu. Rezultatele lor arată ca DAH permite un control rațional al împrăștierii celulare pe suprafața materialelor biocompatibile. Experimentele au arătat că adeziunea celulă - substrat favorizează împrăștierea celulară, în timp ce coeziunea celulă - celulă defavorizează împrăștierea celulară [92].

În cadrul studiului efectuat, am realizat un model computațional al unui sistem biologic utilizat în experimentele de împrăștiere a celulelor pe biomateriale. Pe baza acestui model, am efectuat simulări computaționale ale experimentului lui Ryan et al. [92], identificând condițiile energetice optime care conduc la o împrăștiere rapidă și uniformă a celulelor pe suprafața biomaterialului. O împrăștiere uniformă a celulelor pe un substrat sintetic, format dintr-un material biocompatibil și biodegradabil, determină obținerea de structuri tisulare funcționale, cu proprietăți mecanice și structurale similare țesuturilor native. Simulările efectuate au la bază algoritmi dezvoltați bazați pe metoda Metropolis Monte Carlo și programul informatic original SIMMMC, ambele prezentate în detaliu în capitolele 3 și 4.

Acest studiu are ca scop, pe de o parte, validarea abordării Metropolis Monte Carlo propusă pentru simularea însămânțării celulare a biomatricilor din ingineria

tisulară, iar pe de altă parte, furnizarea de noi informații și principii fundamentale pentru ingineria tisulară.

5.1.2. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat

Sistemul biologic studiat constă într-un agregat celular scădat în mediul de cultură, aflat pe suprafața plană a unui biomaterial. Modelul asociat acestui sistem reprezintă o rețea paralelipipedică, formată din $100 \times 100 \times 63$ noduri de rețea, axa OZ reprezentând axa longitudinală a sistemului. Distanța dintre două noduri de rețea, reprezentând unitatea sistemului de modelare, este egală cu un diametru celular. Agregatul celular constă într-o sferă de rază 10 unități, situată în regiunea $z \geq z_0$ ($z_0=3$) a spațiului de modelare. Fiecare element al sferei are asociat un index, corespunzând celulei aferente. Nodurile de rețea din jurul agregatului celular din această zonă a spațiului de modelare cu $z \geq z_0$ sunt ocupate de indecși asociați particulelor de mediu. Astfel, se obține un model computațional pentru agregatul celular aflat în mediul de cultură. În regiunea $z < z_0$ a spațiului de modelare, fiecare nod al rețelei este ocupat de un index asociat unei particule imobile, această zonă reprezentând placa de biomaterial, pe suprafața căreia se studiază evoluția agregatului celular [100].

Configurația inițială a sistemului a fost vizualizată cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD (Visual Molecular Dynamics)[1]. Ea este redată în Fig. 5.1.

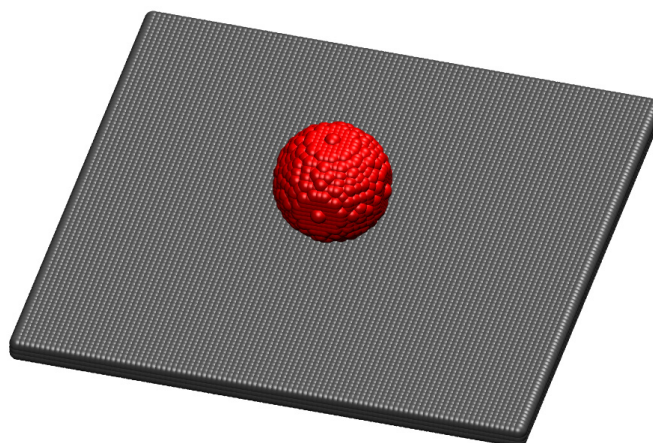


Fig. 5.1. Modelul computațional asociat sistemului biologic studiat: un agregat celular situat pe suprafața unei plăci de biomaterial.

5.1.3. Simularea împrăștierii unui agregat celular pe suprafața plană a unui biomaterial

Studiul *in silico* al împrăștierii celulare pe suprafața plană a unui biomaterial este bazat pe rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale următorilor parametri, considerați de intrare [100,106]:

- energia de coeziune dintre celule, care descrie măsura în care acestea interacționează prin forțe de contact atractive (\mathcal{E}_{cc}) (vezi explicațiile care urmează după ecuația (3.3))
- energia de adeziune dintre celule și substrat, care caracterizează atașarea celulelor la substrat (\mathcal{E}_{cs})
- tensiunea interfacială celulă - mediu ($\gamma_{cm} = \frac{1}{2} \mathcal{E}_{cc}$)
- tensiunea interfacială celulă - substrat ($\gamma_{cs} = \frac{1}{2} \mathcal{E}_{cc} - \mathcal{E}_{cs}$)

Pe baza configurațiilor intermediare obținute, se face o analiză a evoluției următorilor parametri, considerați de ieșire [100,106]:

- coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem (Z_{CM})
- numărul celulelor atașate pe suprafața biomaterialului
- viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului

Calculul acestor parametri pe parcursul evoluției agregatului celular pe suprafața plăcii de biomaterial s-a făcut cu ajutorul unor algoritmi originali, dezvoltăți în MATLAB, prezentați în detaliu în capitolul 3.

Centrul de masă al celulelor este un indicator al mișcării globale a celulelor în vecinătatea substratului. Numărul de celule atașate la substrat descrie rata împrăștierii celulelor pe suprafața plană a substratului, un indicator monitorizat și în experimentele lui Ryan et al. [92]

În scopul de a valida algoritmul original bazat pe metoda Metropolis Monte Carlo, propus pentru simularea împrăștierii celulare pe un substrat, am realizat mai multe seturi de simulări, identificând condițiile energetice optime, care asigură o împrăștiere uniformă a celulelor pe suprafața biomaterialului și o viteză de împrăștiere cât mai mare.

Simulările au fost realizate pe sisteme de calcul dotate cu procesoare Intel Core 2, la 2,4 GHz, memorie 2GB RAM, rulând sub sistemul de operare Windows XP SP3.

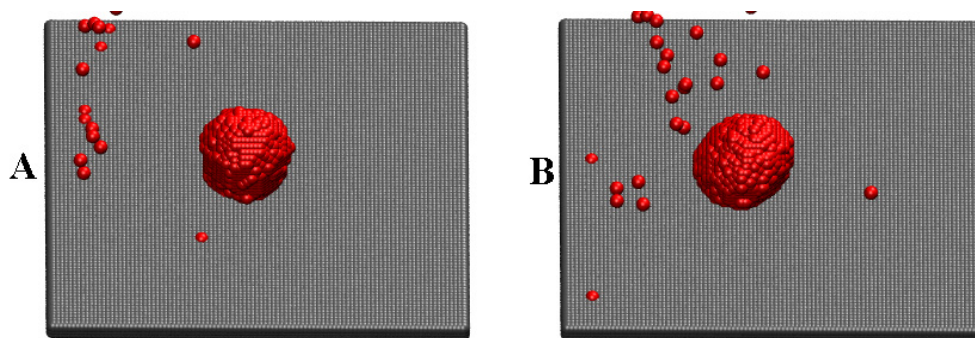
Tabelul 5.1 prezintă valorile parametrilor de intrare aferente primului set de simulări, numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați, precum și valorile rezultate ale parametrilor de ieșire [100].

Tabel 5.1. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului I de simulări ale împrăștierii celulare.

ε_{cc}	ε_{cs}	γ_{cm}	γ_{cs}	MCS	Z_{CM}	Nr. de celule atașate la substrat	Viteza de împrăștiere	Figuri
1	0.4	0.5	0.1	100 000	9.5	250	0.001	Fig.5.2 A,B; 5.8; 5.9; 5.10; 5.11
1	0.6	0.5	- 0.1	100 000	6.8	600	0.005	Fig. 5.3 A,B 5.8; 5.9; 5.10; 5.11
1	0.8	0.5	- 0.3	100 000	5.5	900	0.006	Fig. 5.4 A,B 5.8; 5.9; 5.10; 5.11
1	1	0.5	- 0.5	100 000	4.3	1800	0.018	Fig. 5.5 A,B 5.8; 5.9; 5.10; 5.11
1	1.2	0.5	- 0.7	100 000	3	4200	0.048	Fig. 5.6 A,B 5.7; 5.8; 5.9; 5.10; 5.11

În acest set de simulări, energia de coeziune, ε_{cc} , care asigură interacțiunea dintre celulele constituente ale agregatului celular are valoarea 1, iar energia de adeziune, ε_{cs} , care asigură interacțiunea dintre celule și substrat variază de la o valoare mică (0.4 - care asigură o adeziune la substrat slabă) la o valoare mare (1.2 - care asigură o adeziune la substrat puternică).

În Figurile 5.2 - 5.6, se reprezintă calitativ împrăștierea agregatului celular pe suprafața biomaterialului, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.1. Se observă că împrăștierea celulelor pe suprafața biomaterialului este uniformă, atașarea celulelor la substrat fiind guvernată de valoarea tensiunii interfaciale celulă - substrat [106].

**Fig. 5.2.** A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 1).

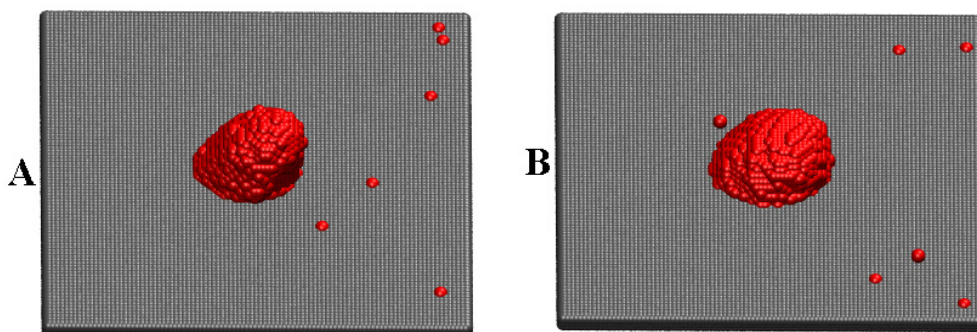


Fig. 5.3. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 2).

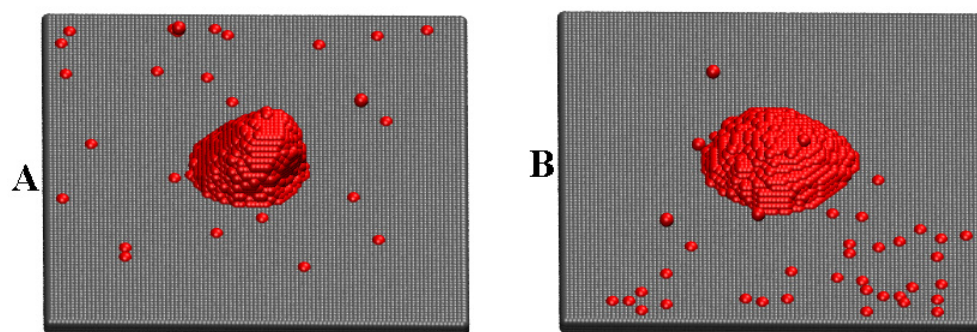


Fig. 5.4. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 3).

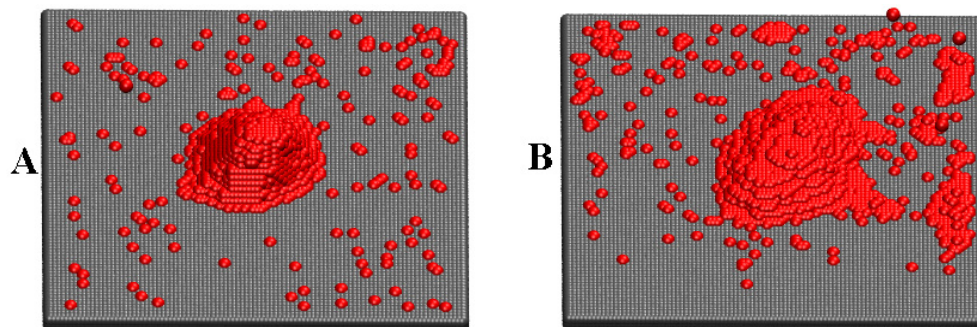


Fig. 5.5. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 4).

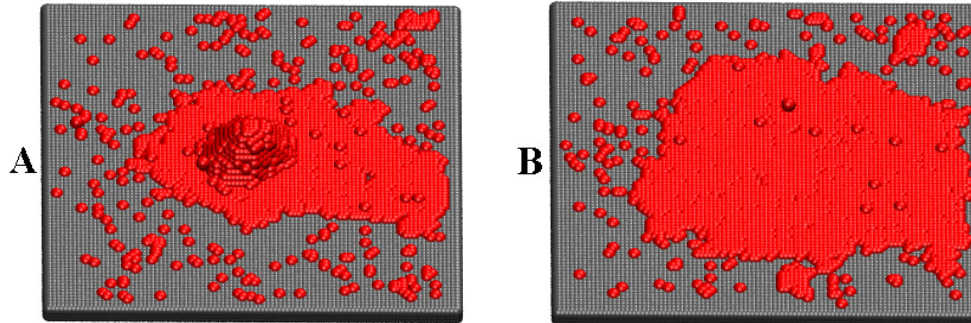


Fig. 5.6. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 5).

Figurile 5.2A, 5.3A, 5.4A, 5.5A, 5.6A prezintă configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, sugerând că, pe măsură ce tensiunea interfacială celulă - substrat este mai mică (pe măsură ce energia de adeziune celulă - substrat este mai mare), atașarea celulelor pe suprafața biomaterialului este mai rapidă. Această concluzie este evidențiată și mai clar în Figurile 5.2B, 5.3B, 5.4B, 5.5B, 5.6B, obținute după rularea a 100 000 MCS [100,106].

În Fig. 5.6B, se poate observa că, după rularea a 100 000 MCS, la o tensiune interfacială celulă - substrat egală cu -0.7 , toate celulele reușesc să se atașeze la biomaterial, formând pe suprafața acestuia un monostrat celular. În acest caz, sistemul celular atinge starea de energie minimă, devenind stabil.

În Fig. 5.7 se pot vizualiza etapele împrăstierii agregatului celular pe suprafața biomaterialului, pentru parametrii prezentați în Tabelul 5.1, rândul 5.

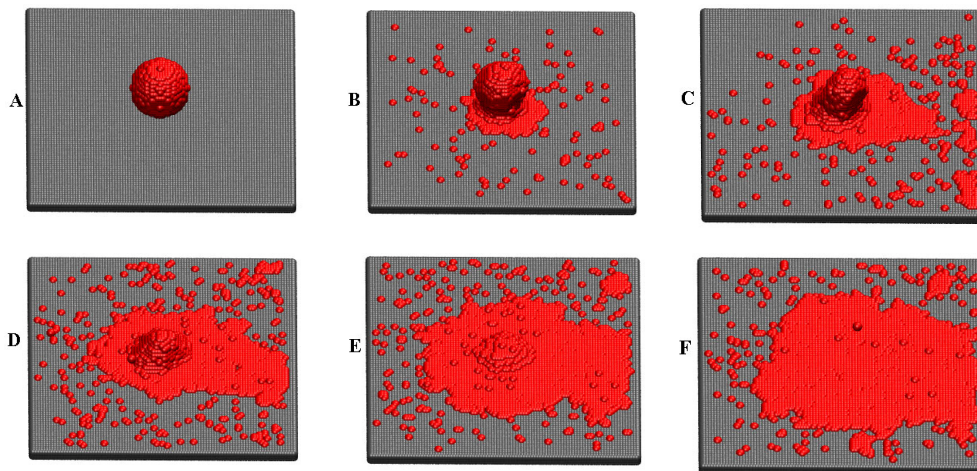


Fig. 5.7. Evoluția treptată a agregatului celular pe suprafața biomaterialului:
 A - Configurația inițială a sistemului; B - Configurația obținută după rularea a 10 000 MCS;
 C - Configurația obținută după rularea a 30 000 MCS; D - Configurația obținută după
 rularea a 50 000 MCS; E - Configurația obținută după rularea a 70 000 MCS;
 F - Configurația obținută după rularea a 100 000 MCS (parametrii prezentați
 în Tabelul 5.1, rândul 5).

În Fig. 5.8, este reprezentată cantitativ evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem, pe durata rulării a 100 000 MCS. Calculul centrului de masă se face la fiecare 1000 MCS rulați, pe baza configurațiilor obținute în simulările cu parametri de intrare prezentați în Tabelul 5.1 [100].

În stare inițială, coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem are valoarea egală cu 13 unități, dat fiind faptul că agregatul celular de rază egală cu 10 unități este plasat pe o fâșie paralelipedică de biomaterial de grosime egală cu 3 unități. După cum se arată în Fig. 5.8, pe măsură ce valoarea tensiunii interfaciale celulă - substrat devine mai mică (caz în care energia de coeziune celulă - celulă rămâne constantă la valoarea 1 și energia de adeziune celulă - substrat ia valori mai mari), coordonata z a centrului de masă al celulelor descrește, apropiindu-se de valoarea 3, care corespunde stratului de pe suprafața biomaterialului [100].

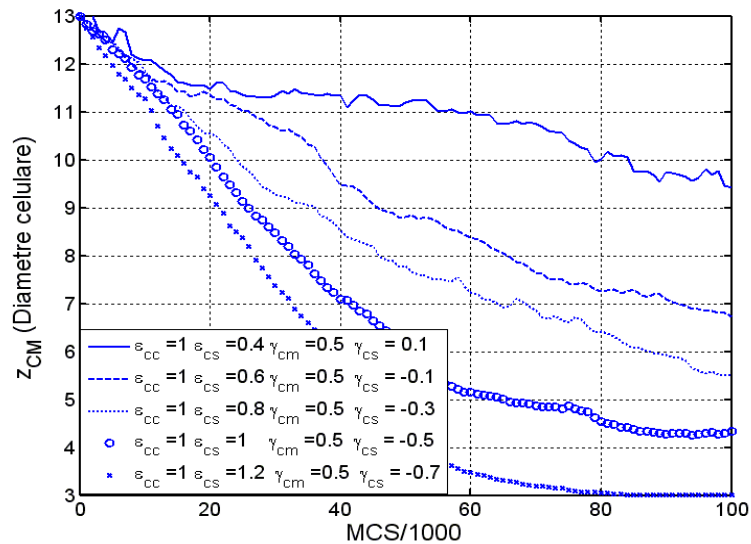


Fig. 5.8. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

Se poate observa că la o energie de adeziune celulă - substrat mică (0.4), ce determină o tensiune interfacială celulă - substrat pozitivă (0.1), coordonata z a centrului de masă al celulelor descrește foarte lent. În acest caz, chiar și după rularea a 100 000 MCS, aceasta abia se apropie de valoarea 9, indicând o împrăștiere foarte lentă a celulelor pe suprafața biomaterialului. La o interacțiune celulă - substrat mai mare (0.8), determinând o tensiune interfacială celulă - substrat negativă (-0.3), se observă că valoarea coordonatei z a centrului de masă al celulelor descrește mai rapid, indicând ca o proporție tot mai mare de celule reușesc să se atașeze de biomaterial [100].

În cazul în care energia de interacțiune celulă - substrat are valoarea 1.2 (tensiunea interfacială celulă - substrat fiind -0.7), încă de după rularea a 80 000 MCS, coordonata z a centrului de masă al celulelor atinge valoarea 3, ceea ce înseamnă că toate celulele au reușit să se atașeze de substrat, sistemul devenind stabil [100].

În Fig. 5.9, este trasată evoluția numărului de celule atașate la substrat în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, pentru valori ale parametrilor de

intrare prezentate în Tabelul 5.1. Analizând aceste grafice, se poate observa că pe măsură ce tensiunea interfacială celulă - substrat are valori mai mici (atînse prin creșterea valorii energiei de adeziune celulă - substrat), numărul de celule care reușesc să se atașeze de suprafața plană a substratului este tot mai mare [106].

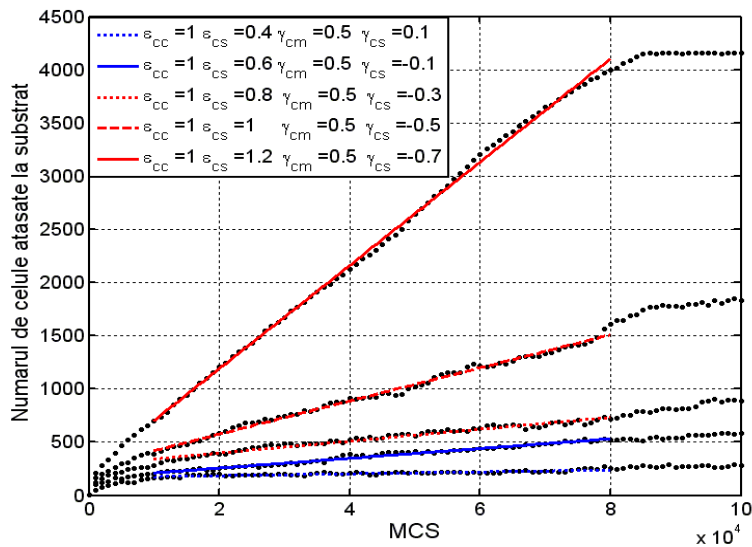


Fig. 5.9. Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

În cazul în care adeziunea celulă - substrat este foarte slabă (0.4), determinând o tensiune interfacială celulă - substrat pozitivă, se poate observa că și după rularea a 100 000 MCS, doar cca 250 de celule reușesc să se atașeze de substrat, rezultând, în acest caz, că procesul de împrăștiere a celulelor pe substratul sintetic este foarte lent. Dacă energia de interacțiune celulă - substrat este mai mare (0.8), determinând o tensiune interfacială celulă - substrat negativă (-0.3), tot mai multe celule reușesc să se atașeze la substrat. În cazul în care adeziunea celulă - substrat este puternică (1.2), determinând o tensiune interfacială celulă - substrat egală cu -0.7, se poate observa că deja după rularea a aproximativ 85 000 MCS, o stare de echilibru este atinsă, toate celulele reușind să se atașeze pe suprafața biomaterialului, formând un monostrat celular [106].

Fig. 5.10 prezintă o reprezentare grafică a vitezei de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului, pentru diferite valori ale tensiunii interfaciale celulă - substrat, prezentate în Tabelul 5.1.

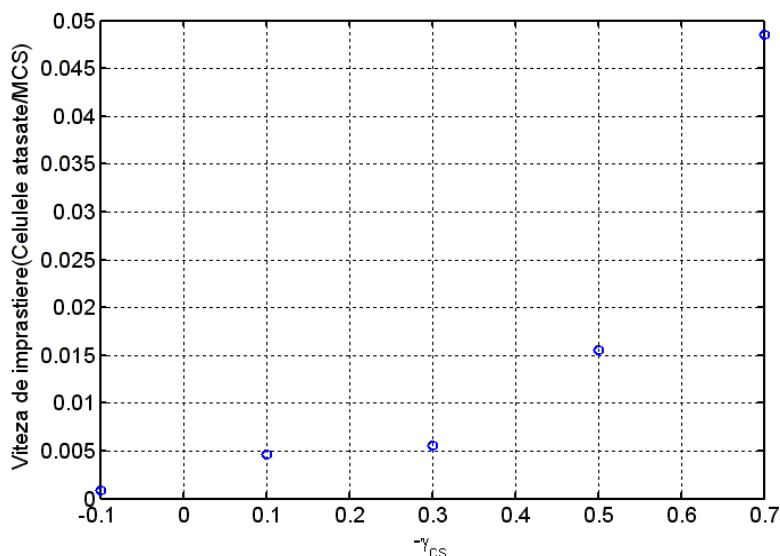


Fig. 5.10. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă - substrat.

Analizând Fig. 5.10, se poate observa că viteza de împrăștiere a celulelor crește pe măsură ce tensiunea interfacială celulă - substrat scade. Dacă tensiunea interfacială celulă - substrat este pozitivă, viteza de împrăștiere a celulelor este foarte mică, aproape nulă, indicând un proces de împrăștiere a celulelor pe substrat foarte lent. Dacă tensiunea interfacială are valoarea -0.7, viteza de împrăștiere a celulelor crește semnificativ, indicând un proces rapid de împrăștiere a celulelor pe substrat [106].

Cu scopul de a valida rezultatele din simulările realizate cu rezultatele din [92], în Fig. 5.11 am reprezentat viteza de împrăștiere a celulelor în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă - substrat și energia de coeziune celulă - celulă. Se observă că viteza de împrăștiere a celulelor crește, pe măsură ce raportul dintre energia de adeziune celulă - substrat și energia de coeziune celulă - celulă crește. Cu alte cuvinte, creșterea energiei de adeziune celulă - substrat favorizează împrăștierea celulelor, în timp ce creșterea energiei de coeziune celulă - celulă defavorizează împrăștierea celulelor. Această concluzie este în acord cu rezultatele experimentale obținute de Ryan [92].

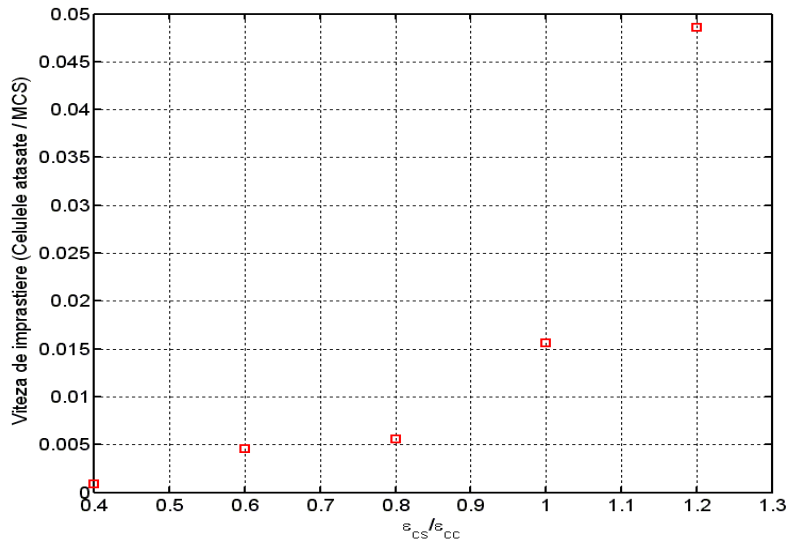


Fig. 5.11. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celulă.

În al doilea set de simulări, am mărit energia de coeziune dintre celule la valoarea 1.2 și am variat energia de adeziune dintre celule și substrat, urmărind să vedem influența coeziunii dintre celule asupra procesului de împrăștiere [106].

Tabelul 5.2 prezintă valorile parametrilor de intrare și de ieșire aferente celui de-al doilea set de simulări, precum și numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați.

Tabel 5.2. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului II de simulări ale împrăștierei celulare.

ϵ_{cc}	ϵ_{cs}	γ_{cm}	γ_{cs}	MCS	Z_{CM}	Nr. de celule atașate la substrat	Viteza de împrăștiere	Figuri
1.2	0.4	0.6	0.2	100 000	11	200	1.2×10^{-3}	Fig. 5.12 A,B; 5.17; 5.18; 5.19; 5.20
1.2	0.6	0.6	0	100 000	9.5	320	2.5×10^{-3}	Fig. 5.13 A,B; 5.17; 5.18; 5.19; 5.20
1.2	0.8	0.6	- 0.2	100 000	8	480	3×10^{-3}	Fig. 5.14 A,B; 5.17; 5.18; 5.19; 5.20
1.2	1	0.6	- 0.4	100 000	6	800	6.3×10^{-3}	Fig. 5.15 A,B; 5.17; 5.18; 5.19; 5.20
1.2	1.2	0.6	- 0.6	100 000	5	1200	8.5×10^{-3}	Fig. 5.16 A,B; 5.17; 5.18; 5.19; 5.20

În Figurile 5.12-5.16 se pot vizualiza configurațiile sistemului celular, obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv a 100 000 MCS, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.2.

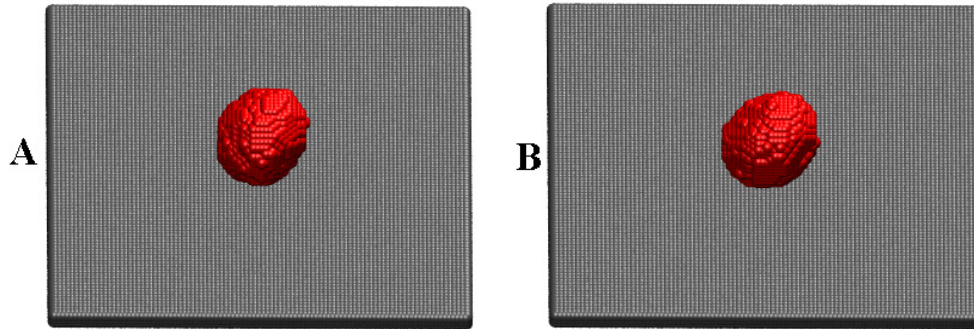


Fig. 5.12. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 1).

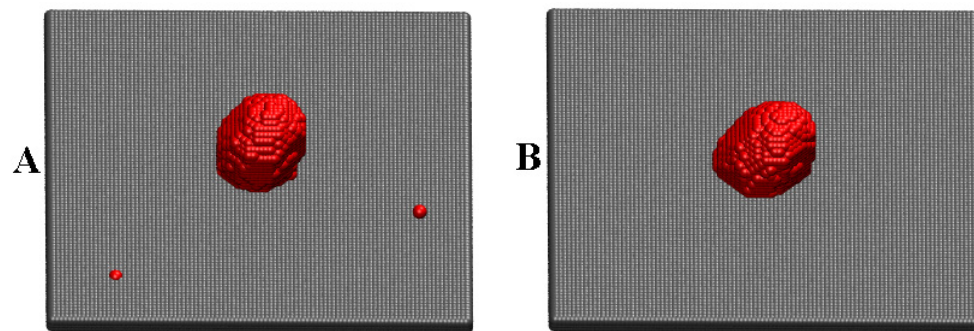


Fig. 5.13. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 2).

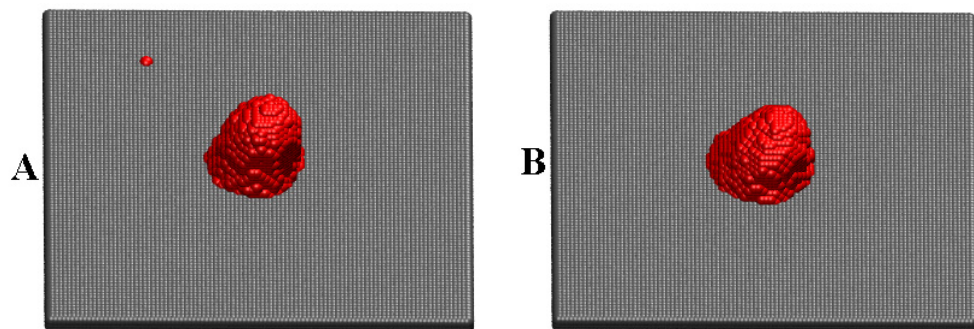


Fig. 5.14. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 3).

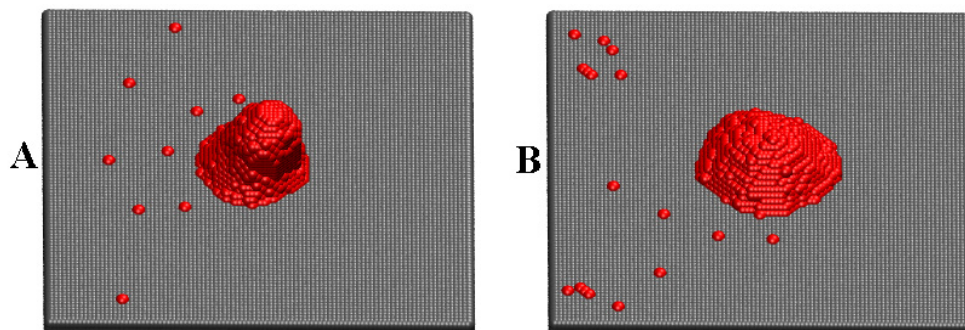


Fig. 5.15. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 4).

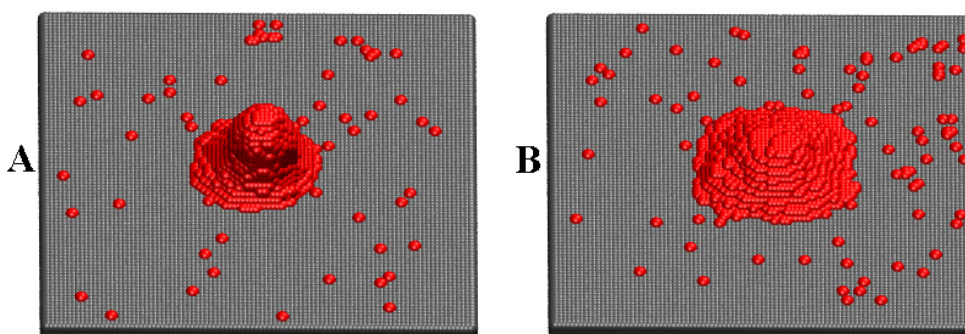


Fig. 5.16. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.2, rândul 5).

Analizând configurațiile obținute în primul set de simulări (Figurile 5.2-5.6) și configurațiile obținute în cel de-al doilea set de simulări (Figurile 5.12-5.16), se poate observa că în ambele cazuri, împrăștierea celulelor este uniformă pe suprafața substratului, însă procesul de împrăștiere este mai lent în cazul în care energia de coeziune dintre celule este mai mare (1.2). Această concluzie se conturează cel mai clar, comparând Figurile 5.6B și 5.16B [106].

În Fig. 5.16B, la o adeziune celulă - substrat puternică (1.2), după rularea a 100 000 MCS, doar o parte dintre celule reușesc să se atașeze de substrat, spre deosebire de cazul prezentat în Fig. 5.6B, când după rularea a 100 000 MCS, la o energie de adeziune puternică (1.2), toate celulele reușesc să se atașeze de substrat.

O tensiune interfacială celulă - substrat mai mică (ecuația (3.4)) asigură o creștere a tendinței de atașare a celulelor la substrat. Pe de altă parte, o tensiune interfacială celulă - mediu, de asemenea mică (ecuația (3.2)) determină ca celulele să se desprindă mai ușor de agregatul celular și să pătrundă în mediul de cultură, conducând la o atașare la biomaterial mult mai ușoară și rapidă. Cu alte cuvinte, dacă adeziunea celulă - substrat este puternică, împrăștierea celulelor pe substrat este favorizată, în timp ce dacă coeziunea dintre celule este puternică, procesul de împrăștiere este încetinit [106].

În Fig. 5.17, este reprezentată grafic evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem, pe durata rulării a 100 000 MCS, în condițiile de

simulare prezentate în Tabelul 5.2. Se poate observa, de asemenea, că pe măsură ce valoarea tensiunii interfaciale celulă - substrat devine mai mică (energia de adeziune celulă-substrat ia valori mai mari), coordonata z a centrului de masă al celulelor descrește, întrucât celulele devin din ce în ce mai atrase de biomaterial. Dacă tensiunea interfacială celulă - substrat este pozitivă (0.2) sau nulă, coordonata z a centrului de masă al celulelor, chiar și după rularea a 100 000 MCS se învârtă în jurul valorii 11, respectiv 9.5, indicând că celulele au tendința să se desprindă de agregatul celular și să migreze spre substrat, dar procesul este foarte lent. Dacă tensiunea interfacială celulă - substrat este foarte mică (-0.6), aceasta presupunând o energie de adeziune celulă - substrat puternică (1.2), coordonata z a centrului de masă al celulelor descrește mai rapid, apropiindu-se după rularea a 100 000 MCS de valoarea 5.

Comparând evoluția centrului de masă din primul set de simulări (Fig. 5.8) cu evoluția centrului de masă din cel de-al doilea set de simulări (Fig. 5.17) se poate observa că, dacă coeziunea dintre celule este mai puternică, la aceleași valori ale adeziunii celulă - substrat, procesul de împrăștiere este încetinit.

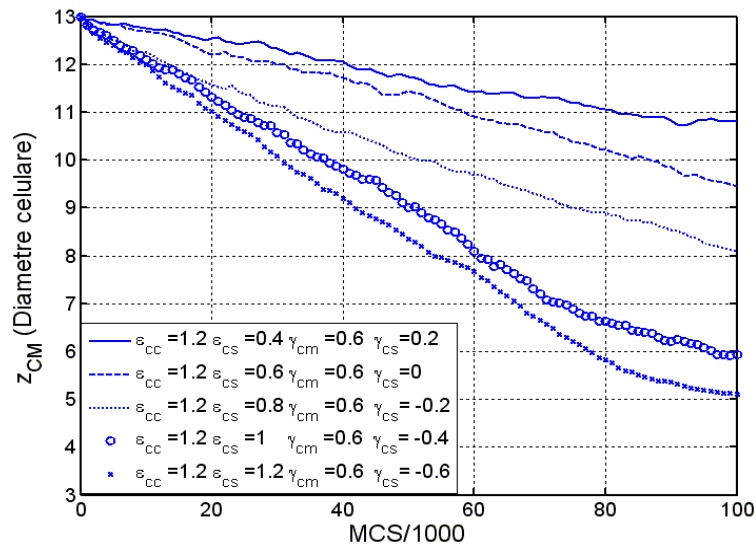


Fig. 5.17. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

În Fig. 5.18, este trasată evoluția numărului de celule atașate la substrat în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, pentru valori ale parametrilor de intrare prezentate în Tabelul 5.2 [106]. În acest caz, chiar și la o adeziune puternică celulă - substrat (1.2), după rularea a 100 000 MCS, doar jumătate din numărul total de celule (aproximativ 1200 de celule) reușesc să se atașeze la substrat.

Comparând Fig. 5.18 cu Fig. 5.9, putem concluziona că, pentru o valoare mai mică a tensiunii interfaciale celulă - mediu (egală cu 0.5 - Fig. 5.9), un număr mai mare de celule reușesc să se atașeze la substrat. Acest lucru se datorează faptului că, dacă coeziunea dintre celule este mai mică, celulele au tendința să se desprindă de agregatul celular și să pătrundă în mediul de cultură, facilitându-se atașarea la substrat [106].

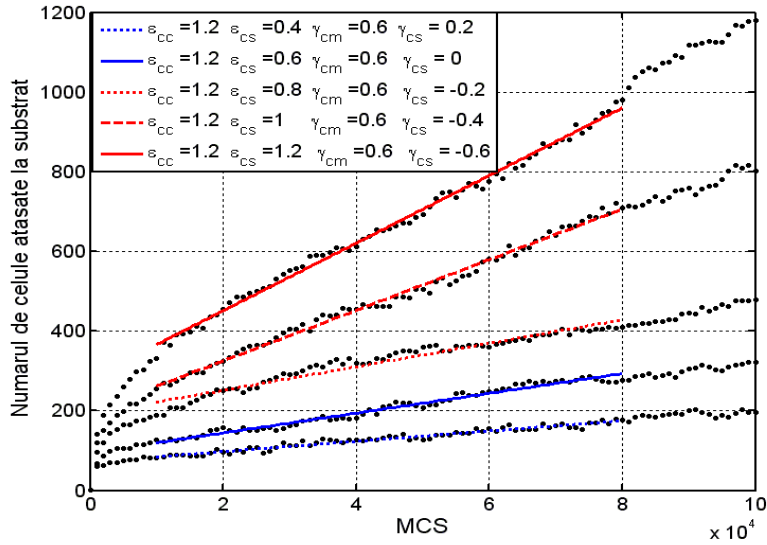


Fig. 5.18. Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

Fig. 5.19 prezintă o reprezentare grafică a vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat, în funcție de valorile tensiunii interfaciale prezentate în Tabelul 5.2.

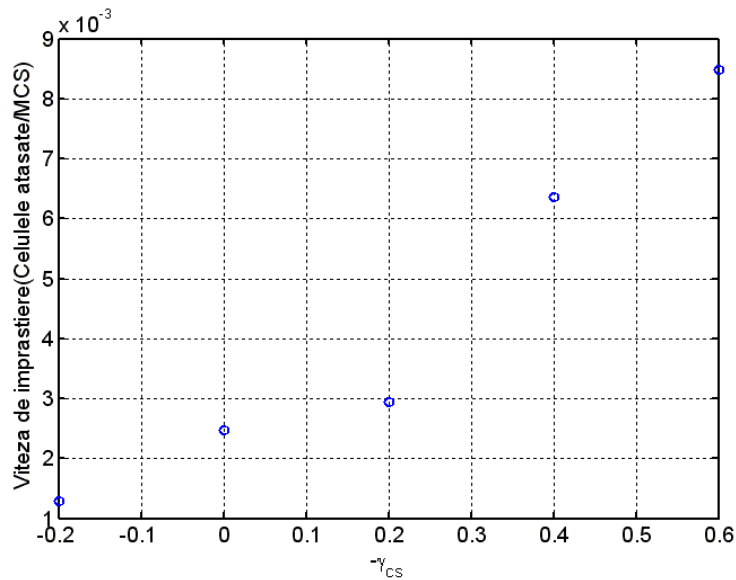


Fig. 5.19. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.

Comparând Fig. 5.19 cu Fig. 5.10, se poate observa că, dacă tensiunea interfacială celulă - mediu este - 0.6 (Fig. 5.19) creșterea vitezei de împrăștiere a

celulelor pe substrat este mai lentă, întrucât celulele sunt atrase puternic între ele și tind să rămână în agregatul celular [106].

În Fig. 5.20, am realizat o reprezentare grafică a vitezei de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre adeziune și coeziune.

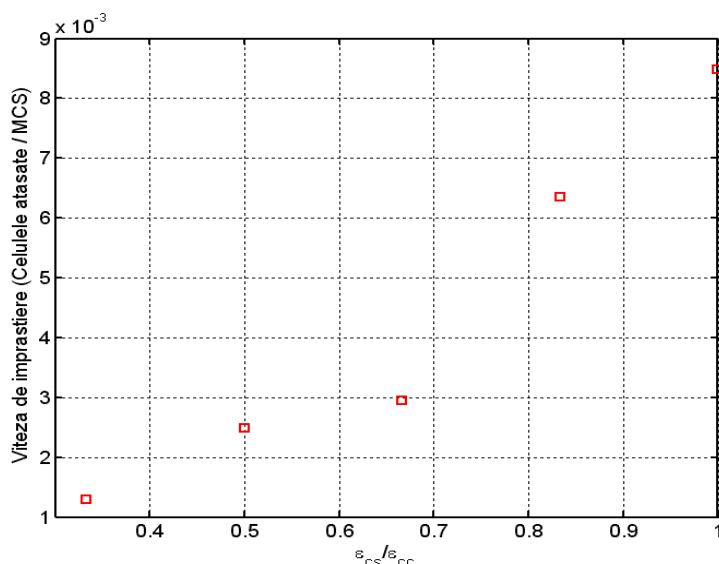


Fig. 5.20. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celula.

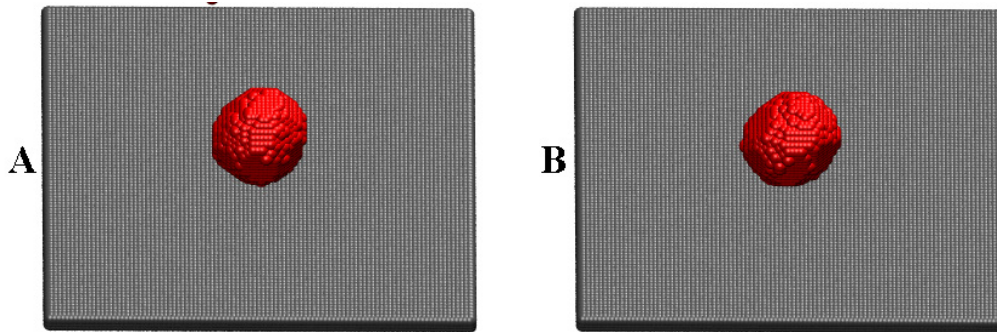
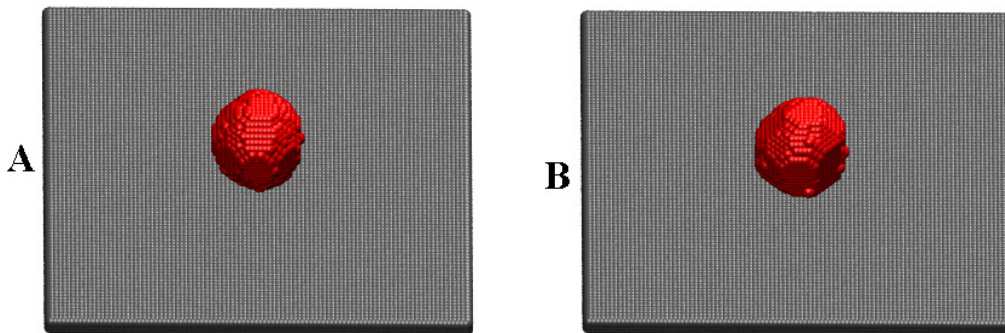
Pentru a sublinia faptul că energia de coeziune defavorizează împrăștierea celulară, iar energia de adeziune celulă – substrat favorizează împrăștierea celulară, s-au mai făcut 2 seturi de simulări, mărindu-se și mai mult coeziunea dintre celule, după cum se poate urmări în Tabelul 5.3, respectiv în Tabelul 5.4.

Analizând figurile obținute în urma acestor simulări, se poate observa că, dacă coeziunea dintre celule este 1.4 (Tabelul 5.3), procesul de împrăștiere celulară este mult încetinit. Această concluzie este fundamentată atât calitativ, de către configurațiile vizualizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD, cât și cantitativ, de către graficele aferente coordonatei z a centrului de masă al celulelor, numărului de celule atașate la substrat, respectiv vitezei de împrăștiere a celulelor. În cazul în care energia de coeziune dintre celule este 1.6 (Tabelul 5.4), se poate observa că procesul de împrăștiere celulară este aproape stopat, celulele fiind foarte atrase între ele, neputând să migreze spre biomaterial.

Tabelul 5.3 prezintă valorile parametrilor de intrare aferente celui de-al treilea set de simulări, numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați, precum și valorile rezultate ale parametrilor de ieșire.

Tabel 5.3. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului III de simulări ale împrăștierii celulare.

ε_{cc}	ε_{cs}	γ_{cm}	γ_{cs}	MCS	Z_{CM}	Nr. de celule atașate la substrat	Viteza de împrăștiere	Figuri
1.4	0.4	0.7	0.3	100 000	11.7	550	0.6×10^{-3}	Fig.5.21 A,B; 5.26; 5.27; 5.28; 5.29
1.4	0.6	0.7	0.1	100 000	10.7	400	1.4×10^{-3}	Fig. 5.22 A,B 5.26; 5.27; 5.28; 5.29
1.4	0.8	0.7	- 0.1	100 000	10.1	310	2.1×10^{-3}	Fig. 5.23 A,B 5.26; 5.27; 5.28; 5.29
1.4	1	0.7	- 0.3	100 000	9.6	215	2.4×10^{-3}	Fig. 5.24 A,B 5.26; 5.27; 5.28; 5.29
1.4	1.2	0.7	- 0.5	100 000	9.3	100	3.5×10^{-3}	Fig. 5.25 A,B 5.26; 5.27; 5.28; 5.29

**Fig. 5.21.** A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 1).**Fig. 5.22.** A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 2).

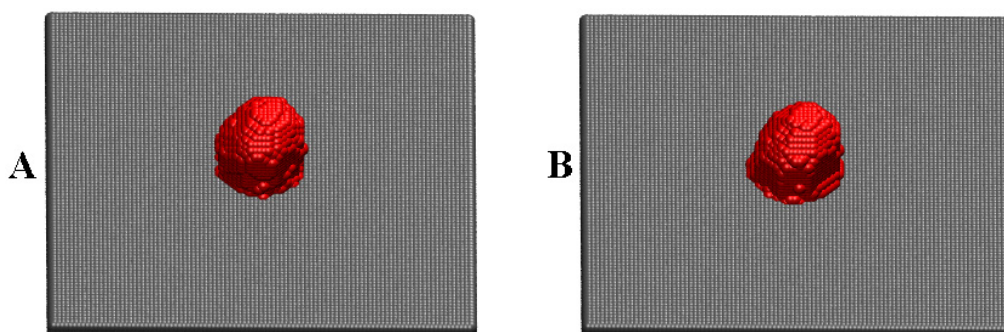


Fig. 5.23. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 3).

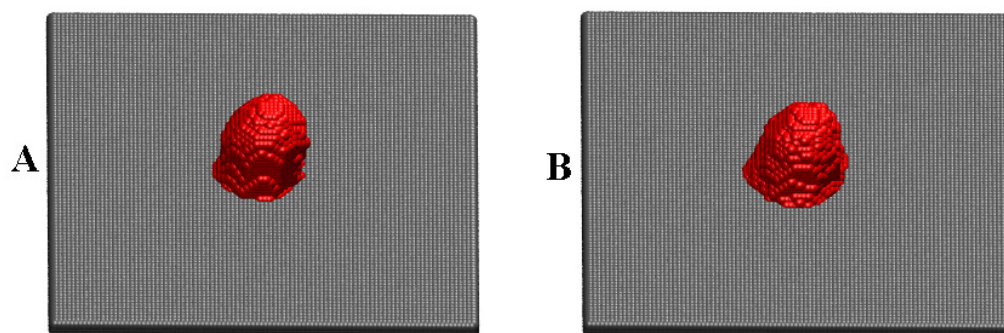


Fig. 5.24. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 4).

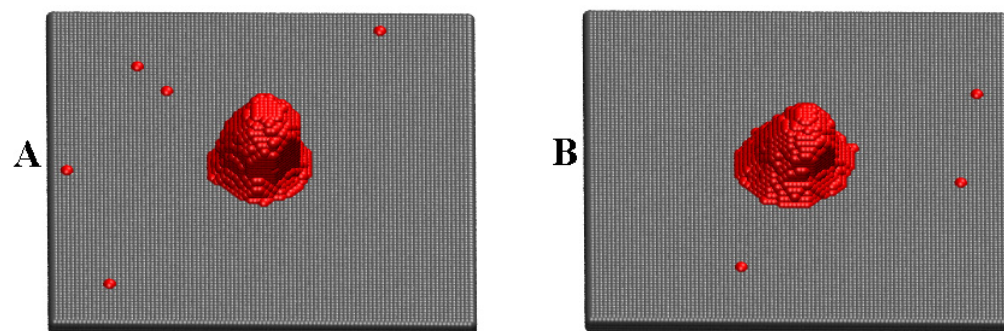


Fig. 5.25. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.3, rândul 5).

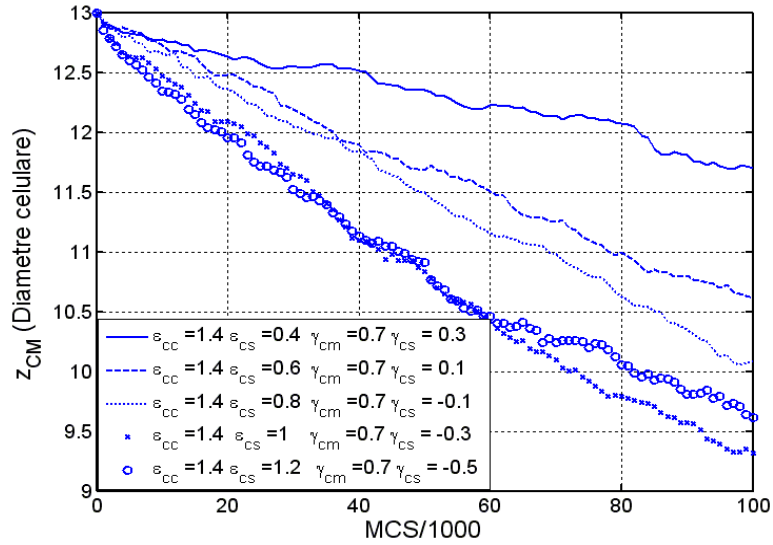


Fig. 5.26. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

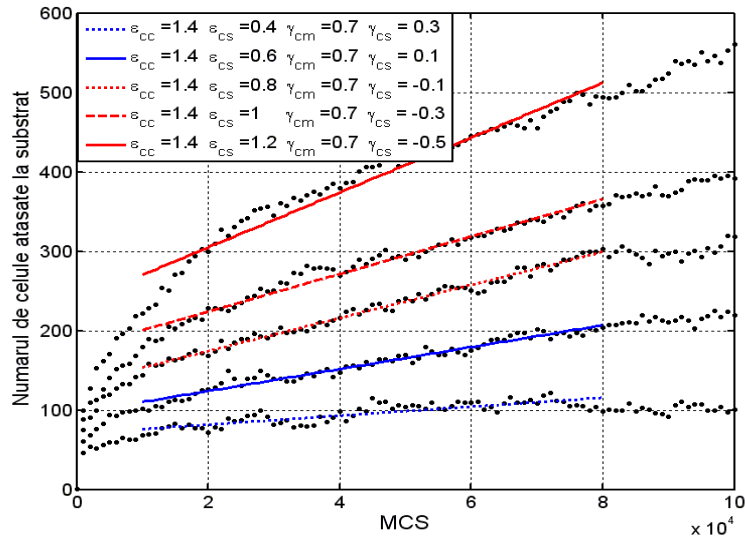


Fig. 5.27. Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

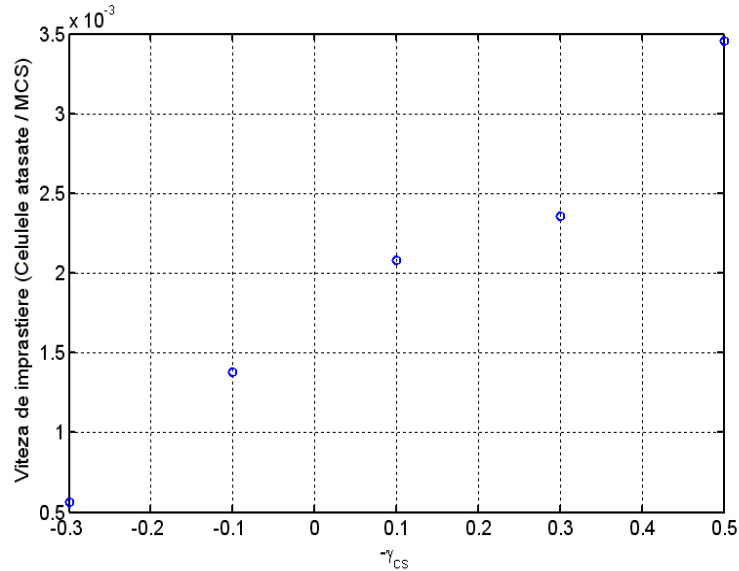


Fig. 5.28. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.

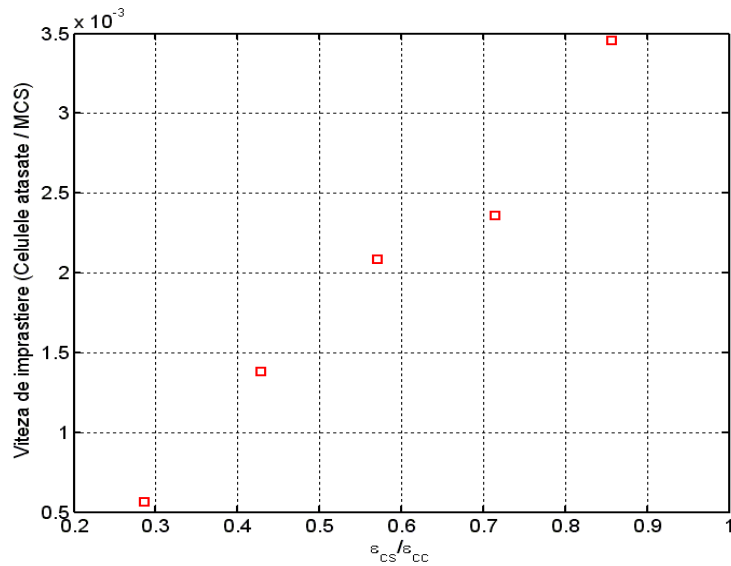
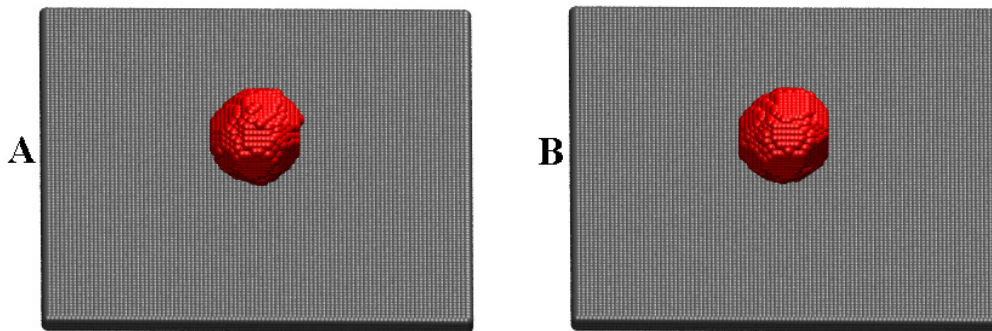
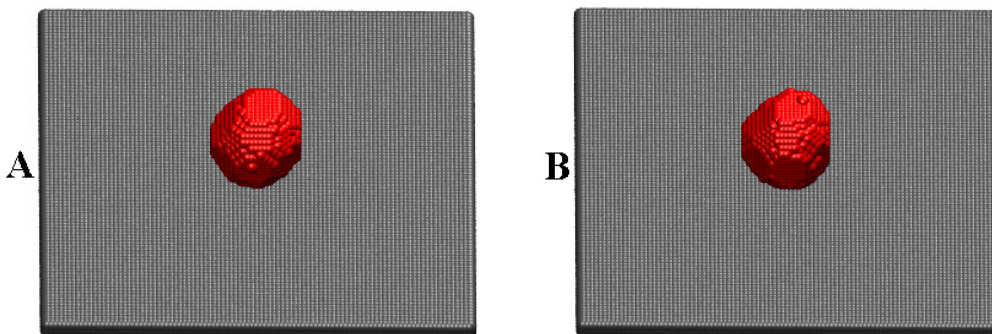


Fig. 5.29. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celulă.

Tabelul 5.4 prezintă valorile parametrilor de intrare și de ieșire aferente celui de-al patrulea set de simulări, precum și numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați:

Tabel 5.4. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire ai setului IV de simulări ale împrăștierii celulare.

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	γ_{cm}	γ_{cs}	MCS	Z_{CM}	Nr. de celule atașate la substrat	Viteza de împrăștiere	Figuri
1.6	0.4	0.8	0.4	100 000	12.25	440	0.4×10^{-3}	Fig.5.30 A,B; 5.35; 5.36; 5.37; 5.38
1.6	0.6	0.8	0.2	100 000	12.1	295	0.45×10^{-3}	Fig. 5.31 A,B 5.35; 5.36; 5.37; 5.38
1.6	0.8	0.8	0	100 000	11.4	215	1.2×10^{-3}	Fig. 5.32 A,B 5.35; 5.36; 5.37; 5.38
1.6	1	0.8	- 0.2	100 000	10.7	135	1.6×10^{-3}	Fig. 5.33 A,B 5.35; 5.36; 5.37; 5.38
1.6	1.2	0.8	- 0.4	100 000	9.5	100	2.8×10^{-3}	Fig. 5.34 A,B 5.35; 5.36; 5.37; 5.38

**Fig. 5.30.** A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 1).**Fig. 5.31.** A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 2).

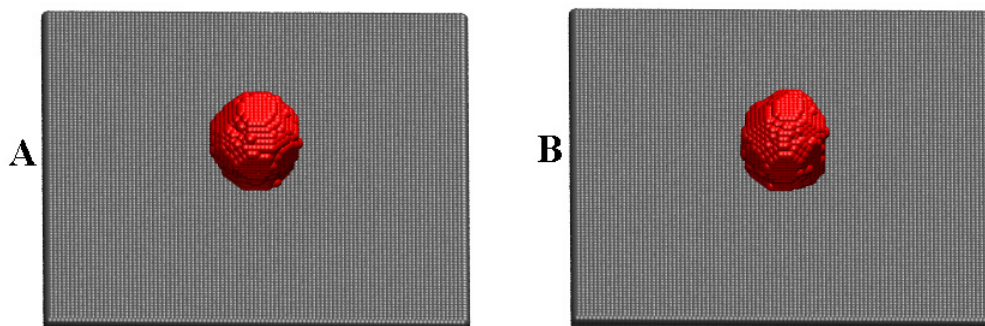


Fig. 5.32. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 3).

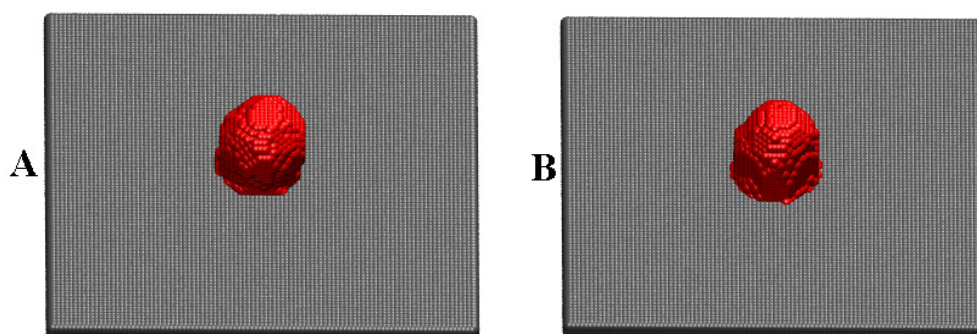


Fig. 5.33. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 4).

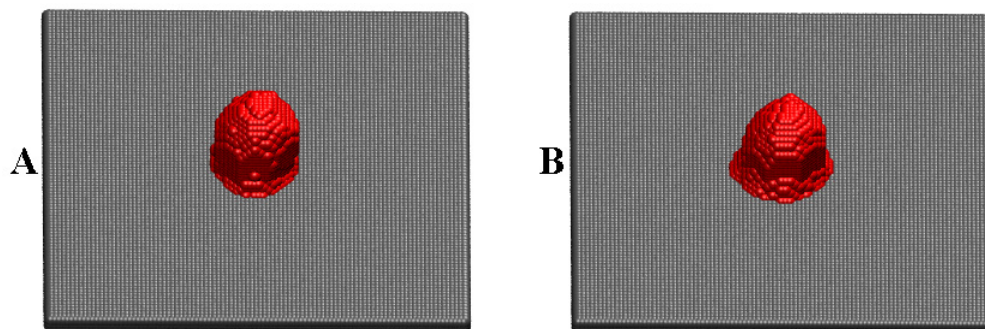


Fig. 5.34. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.4, rândul 5).

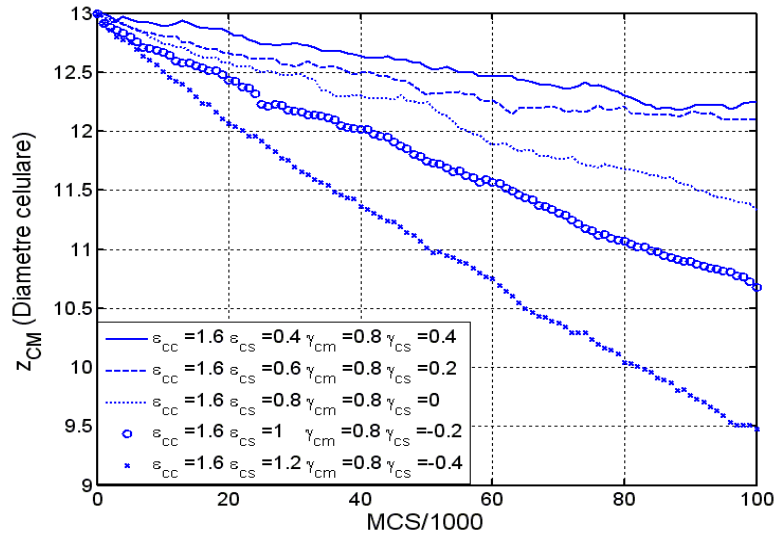


Fig. 5.35. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

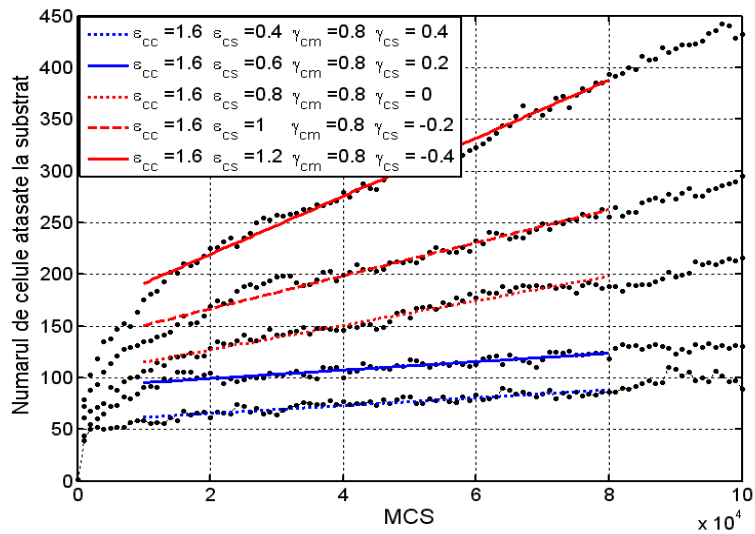


Fig. 5.36. Evoluția numărului de celule atașate pe suprafața plană a unui substrat sintetic în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

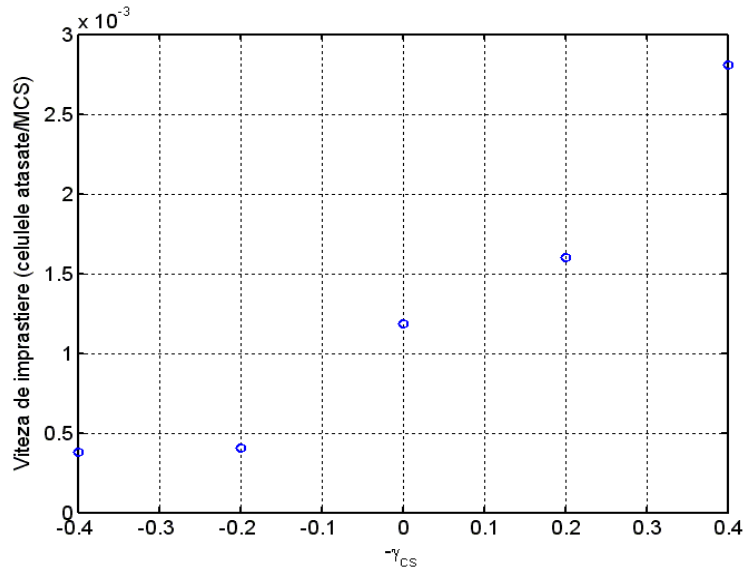


Fig. 5.37. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.

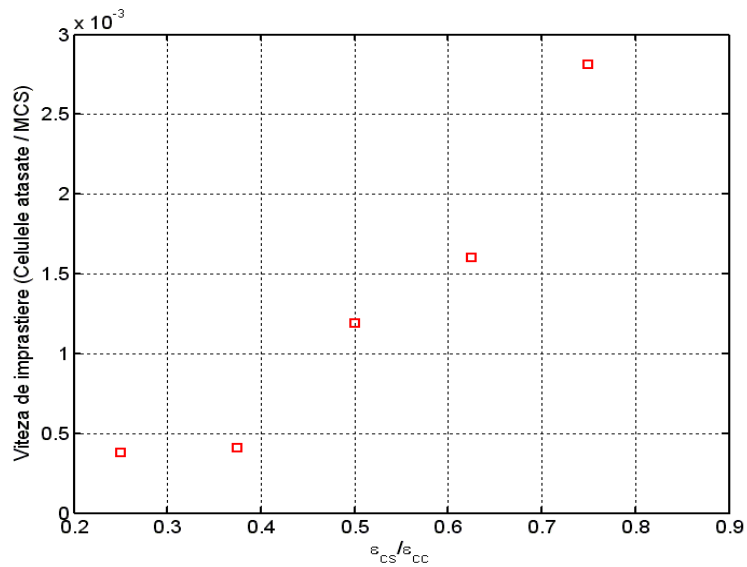


Fig. 5.38. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de adeziune celulă – celulă.

Este foarte important ca domeniul parametrilor de model să fie delimitat în așa fel încât rezultatele simulărilor să fie în acord cel puțin calitativ cu rezultatele experimentale. Astfel, în continuare, s-au făcut un set de simulări, considerând energia de coeziune celulă - celulă egală cu 0.8 și variind energia de adeziune celulă - substrat.

Prin aceste simulări, se urmărește a se vedea dacă micșorând coeziunea dintre celule, procesul de împrăștiere celulară are loc cu succes, fiind și mai rapid, sau eșuează.

Se poate observa că, dacă coeziunea dintre celule este prea mică (0.8), simulările prezic detașarea unei părți a agregatului de substrat și desprinderea unor celule care astfel ajung în suspensie. Asemenea fenomene nu se observă în experimentele efectuate pe celule aderente, dependente de ancoraj.

Tabelul 5.5 prezintă valorile parametrilor de intrare aferente celui de-al cincilea set de simulări, precum și numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați:

Tabel 5.5. Valorile parametrilor de intrare ai setului V de simulări ale împrăștierii celulare.

ϵ_{cc}	ϵ_{cs}	γ_{cm}	γ_{cs}	MCS	Figuri
0.8	0.4	0.4	0	100 000	Fig. 5.39 A,B
0.8	0.6	0.4	- 0.2	100 000	Fig. 5.40 A,B
0.8	0.8	0.4	- 0.4	100 000	Fig. 5.41 A,B
0.8	1	0.4	- 0.6	100 000	Fig. 5.42 A,B
0.8	1.2	0.4	- 0.8	100 000	Fig. 5.43 A,B

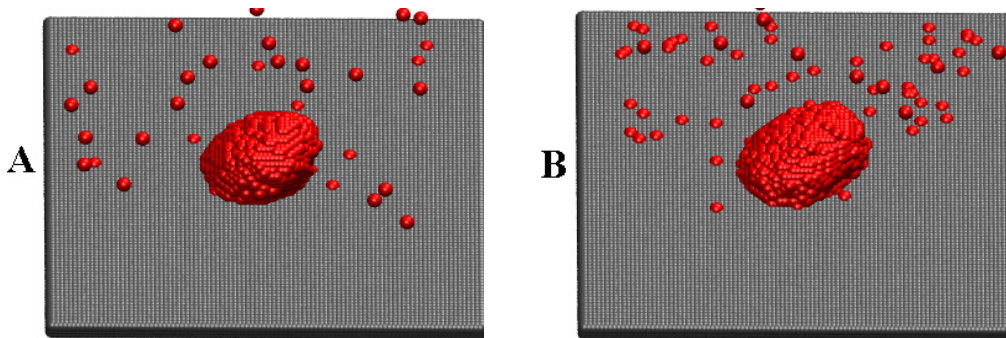


Fig. 5.39. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 1).

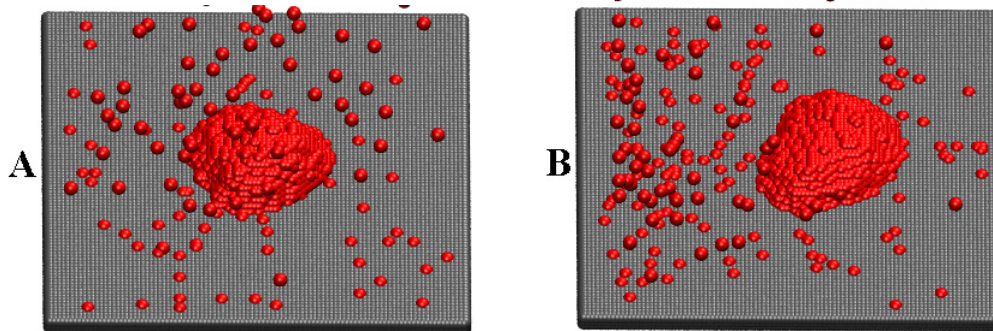


Fig. 5.40. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 2).

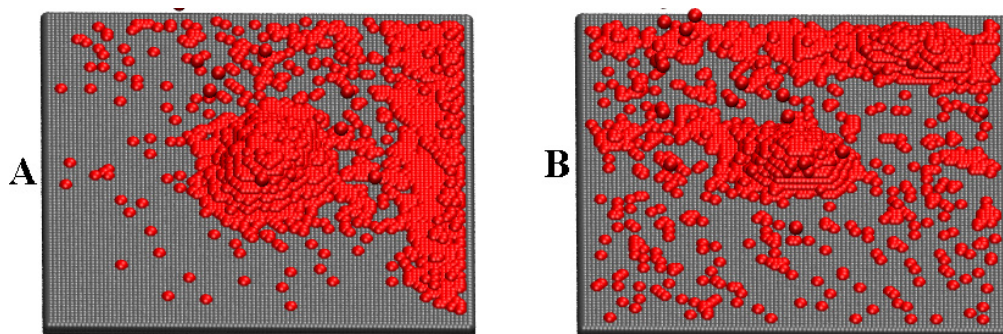


Fig. 5.41. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 3).

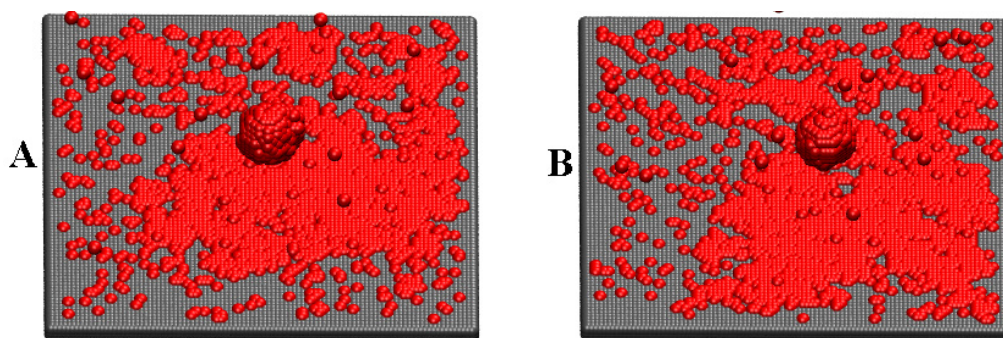


Fig. 5.42. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 4).

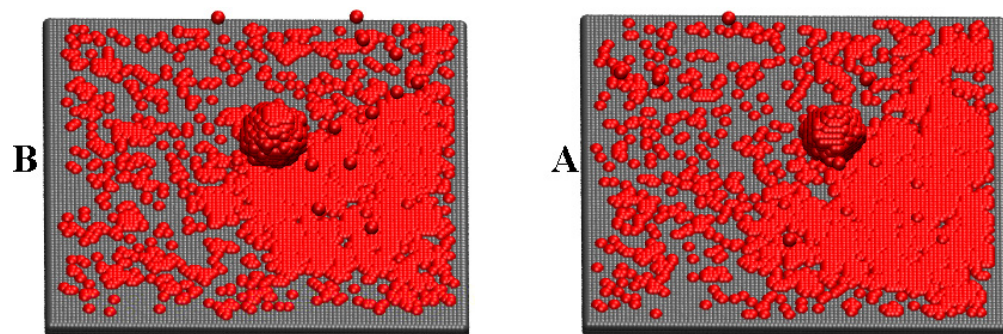


Fig. 5.43. A, B - Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS, respectiv 100 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 5.5, rândul 5).

Analizând Figurile 5.39-5.43, se poate observa că, dacă coeziunea dintre celule este slabă, împrăștieria celulelor pe substrat nu este uniformă. Mai mult, la o energie de adeziune celulă - substrat mare (1 respectiv 1.2), celulele de pe conturul agregatului sunt atrase puternic de substrat, desprinzându-se de acesta. Acest fenomen determină ca agregatul celular să se detașeze de substrat și să plutească în mediul de cultură. O parte dintre celulele care s-au desprins de

agregat se alipesc foarte rapid de substrat, în timp ce o parte rămân în suspensie. În aceste condiții, procesul de împrăștiere celulară eșuează.

În Fig. 5.44, este prezentată evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor, de-a lungul rulării a 100 000 MCS, pentru aceeași valoare a tensiunii interfaciale celulă - substrat și pentru diferite valori ale tensiunii interfaciale celulă - mediu (valori crescătoare).

Prin acest set de simulări, este urmărită influența tensiunii interfaciale celulă - mediu, respectiv a energiei de coeziune dintre celule, asupra împrăștierei celulare. Putem observa că, pe măsură ce tensiunea interfacială celulă - mediu este mai mică, coordonata z a centrului de masă al celulelor de asemenea descrește, apropiindu-se tot mai mult de valoarea 3, care reprezintă stratul de pe suprafața biomaterialului. Explicația este că, pe măsură ce tensiunea interfacială celulă - mediu are valori mai mici (ceea ce presupune o coeziune dintre celule din ce în ce mai slabă), celulele tind să se desprindă din agregatul celular și să pătrundă în mediul de cultură, facilitând atașarea celulelor la substrat. Ținând cont, însă, și de rezultatele obținute în setul al cincilea de simulări, putem concluziona că o coezivitate prea mică între celule nu este recomandată, întrucât aceasta conduce la eșuarea procesului de împrăștiere [106].

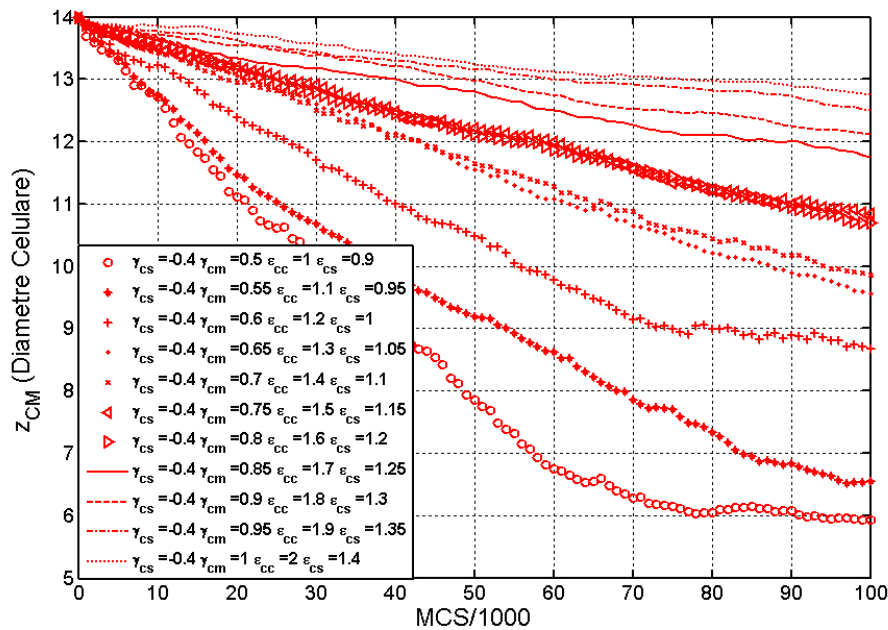


Fig. 5.44. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați. Parametrii de intrare ai simulărilor sunt: $\gamma_{cs} = -0.4$;

$$\gamma_{cm} = 0.5; 0.55; 0.6; 0.65; 0.7; 0.75; 0.8; 0.85; 0.9; 0.95; 1.$$

Rezultatele obținute de autor prin acest studiu *in silico* sunt în conformitate cu rezultatele experimentelor lui Ryan et al. [92], după cum se va vedea în cele ce urmează.

În scopul de a evalua atât efectele adeziunii dintre celule și substrat, cât și efectele coeziunii dintre celule asupra împrăștierii celulare, Ryan realizează o analiză cantitativă a atașării a trei tipuri de agregate celulare, de diferite coezivități, pe substraturi cu diferite concentrații de PEG (diferite adezivități).

Coezivitatea agregatelor a fost măsurată în condiții de cultură tisulară, pe baza forței de echilibru exercitată de agregat pe plăcile de compresie paralelă (forța cu care agregatul acționează asupra plăcilor care nu îi permit rotunjirea). Pe baza acestei forțe și a geometriei agregatului, coezivitatea acestuia a fost calculată ca fiind tensiunea sa de suprafață, cu ajutorul ecuației Young – Laplace [35,67].

Cele trei tipuri de agregate celulare utilizate de Ryan et al. în cadrul experimentelor [92] sunt formate din 3 linii celulare diferite (LR1, LN5 și LN2), care exprimă niveluri diferite de caderine. Nivelurile de coezivitate ale celor 3 agregate diferă semnificativ în funcție de cele 3 linii celulare, astfel: agregatele de tip LR1 sunt cele mai coezive, având o tensiune de suprafață de 8.7 ± 0.4 mN/m; agregatele de tip LN5 sunt de coezivitate intermediară, având o tensiune de suprafață de 3.1 ± 0.2 mN/m, iar agregatele de tip LN2 sunt cele mai slab coezive, având o tensiune de suprafață de 1.9 ± 0.2 mN/m [92].

Pentru a crea substraturi de diferite adezivități, o serie de copolimeri care încorporează diferite concentrații de proteine (PEG) au fost sintetizați. Polimerii care conțin o concentrație mică, sau chiar nulă de PEG (0 mol %) asigură o adezivitate celulară mare. Pe măsură ce concentrația de PEG încorporată în polimeri este mai mare (3 mol %), adezivitatea celulară la substrat scade, devenind minimă în cazul în care concentrația de PEG este 5 mol % [92].

Adezivitatea celulară la acești polimeri a fost monitorizată prin două criterii: viteza de atașare a celulelor și gradul de împrăștiere celulară de-a lungul timpului. În cadrul experimentelor, Ryan et al. au observat ca viteza de atașare a 4 linii celulare considerate (LR1, LN5, LN2, L929 – linie celulară care nu agregă deloc și, de aceea, coezivitatea sa este considerată aproximativ 0) a scăzut semnificativ odată cu creșterea concentrației de PEG a substratului polimeric, ceea ce denotă că o concentrație mai mare de PEG în substrat scade adezivitatea acestuia. Acest fenomen este ilustrat în Fig. 5.45 [92].

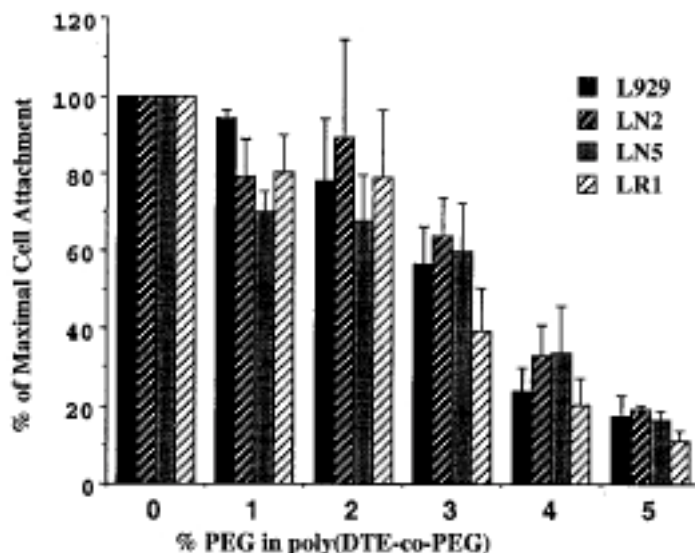


Fig. 5.45. Analiza cantitativă a atașării a 4 linii celulare de diferite coezivități (L929 – coezivitate aproape nulă, LN2 - coezivitate mică, LN5 - coezivitate medie, LR1 - coezivitate mare), pe substraturi polimerice de diferite adezivități (conținând de la 0% la 5% PEG). Se poate observa că pentru toate tipurile de celule, viteza de atașare este semnificativ scăzută, odată cu creșterea concentrației de PEG din substrat. În cadrul experimentului, s-au utilizat suspensii celulare etichetate prin markere fluorescențe, de coezivitate mică, medie, respectiv mare. Acestea sunt lăsate să se atașeze timp de 24 de ore pe niște substraturi polimerice de diferite adezivități. Viteza atașării celulare a fost măsurată ca și intensitate a fluorescenței, la diferite momente de timp. Preluat din Ryan et al. [92].

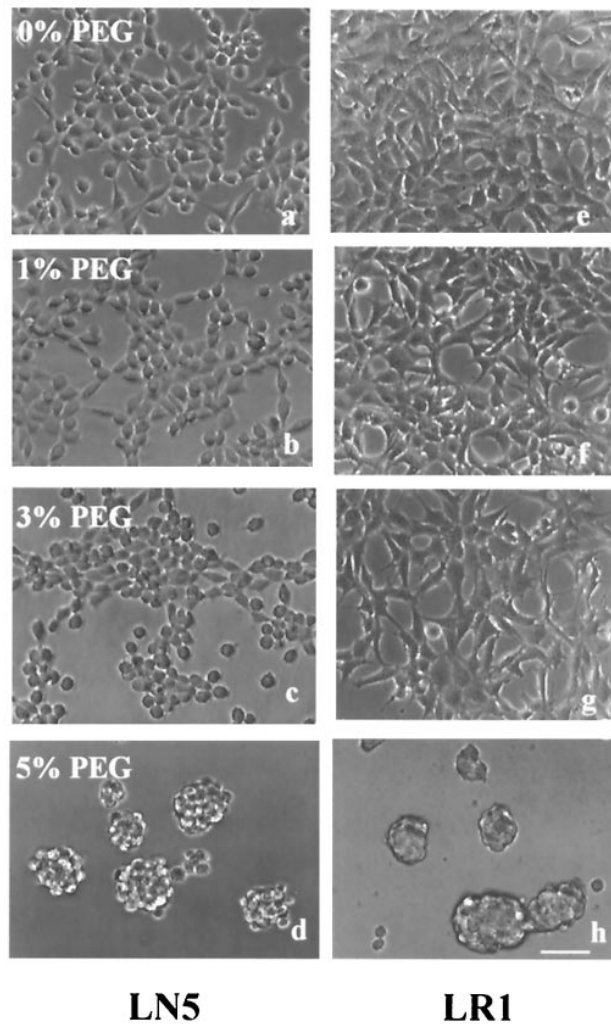
Analizând în detaliu Fig. 5.45, se poate observa că, dacă substratul are o adezivitate ridicată (0% PEG), indiferent dacă celulele sunt slab coezive sau puternic coezive, viteza de atașare la substrat este ridicată. Pe măsură ce adezivitatea substratului scade (1 - 5% PEG), chiar și în cazul unor linii celulare de coezivitate mică, sau chiar nulă, viteza de atașare este redusă semnificativ.

Comparând Figurile 5.10, 5.19, 5.28, 5.37, în care am reprezentat viteza de împrăștiere a agregatelor de diferite coezivități pe substraturi de diferite adezivități cu Fig. 5.45, se observă că am reușit să reproducem cu ajutorul programului SIMMMC fenomenul observat de Ryan în acest experiment. Pe măsură ce valoarea energiei de adeziune celulă - substrat crește (valoarea tensiunii interfaciale celulă - substrat scade), indiferent de valoarea energiei de coeziune celulă - celulă, se observă o creștere a vitezei de atașare a celulelor pe substrat. În simulările realizate, la aceleași valori ale energiei de adeziune celulă - substrat, dacă energia de coeziune celulă - celulă este mai mică (Fig. 5.10) viteza de atașare este mai mare decât în cazul în care energia de coeziune are valori mai mari (Figurile 5.19, 5.28, 5.37). Această ultimă concluzie nu este redată în Fig. 5.45, Ryan reprezentând viteza împrăștierei unor suspensii celulare, caz în care, din acest punct de vedere, lucrurile stau puțin diferit.

În Fig. 5.46 realizată de Ryan et al. [92] în urma experimentului împrăștierei unor suspensii de celule, formate din linii celulare de coezivități diferite pe un substrat polimeric având încorporate concentrații diferite de PEG(0-5%), se observă

cum împrăștierea celulară pe substrat, a fost semnificativ redusă prin creșterea concentrației de PEG în substratul polimeric.

Scăderea în adezivitate a substratului polimeric a fost cel mai bine evidențiată în testele unde concentrația de PEG din substrat depășește 3%. Celulele cultivate pe un substrat care conține 5% PEG, au tendința mai mult să agrege decât să se împrăștie pe substrat. Agregatele nou formate sunt îndepărtate foarte ușor de pe placă printr-o spălare blândă. Aceste fenomene sunt observate la toate liniile celulare considerate în acest studiu, dar sunt ilustrate în Fig. 5.46, doar pentru liniile celulare LN5 și LR1 [92].



Cadherin-expressing L929 Clones

Fig. 5.46. Împrăștierea a două suspensii de celule, formate din două linii celulare de coezivități diferite: LN5 (a-d), respectiv LR1 (e-h), pe un substrat polimeric având încorporate concentrații diferite de PEG(0-5%). Preluat din Ryan et al. [92].

În Fig. 5.46, se observă că, la un nivel constant al coeziunii dintre celule, împrăștierea populației de celule pe un substrat polimeric depinde de adezivitatea substratului. Suspensiile de celule formate din linia celulară LN5 (a-d), respectiv din linia celulară LR1 (e-h) au fost lăsate timp de 24 de ore să se atașeze pe un substrat sintetic care conține 0-5% PEG. În ambele cazuri, se remarcă că împrăștierea populației de celule a fost redusă semnificativ prin creșterea concentrației de PEG din substrat (scăderea adezivității substratului). Celulele cultivate pe un substrat care conține o concentrație mare de PEG, tind să agrege pe suprafața acestuia [92].

Fenomenul prezentat mai sus, prin care la o coeziune celulă - celulă constantă, împrăștierea celulelor are loc cu succes pe măsură ce adeziunea celulă - substrat crește, a fost reprodus cu ajutorul programului original SIMMMC în simulările aferente împrăștierii unui agregat celular de coezivitate egală cu 1, pe suprafața plană a unui biomaterial de adezivități diferite (parametrii de intrare prezentați în Tabel 5.1, rândul 5, Fig. 5.7). În simulările noastre, la o adeziune celulă - substrat mică, agregatul rămâne compact, neîmprăștiindu-se pe suprafața substratului sau împrăștiindu-se foarte lent. La o adeziune celulă - substrat mare, împrăștierea agregatului are loc cu succes, formându-se un monostrat celular pe suprafața biomaterialului.

În Fig. 5.47 sunt prezentate rezultatele unui experiment realizat de Ryan et al. [92] în care s-a studiat împrăștierea a 3 agregate celulare de diferite coezivități (LR1 - 8.7 mN/m, LN5 - 3.1 mN/m, LN2 - 1.9 mN/m) pe suprafața unui substrat polimeric de diferite concentrații de PEG (0%, 3%, 5%). Se poate observa că împrăștierea agregatelor este maximă la o adezivitate ridicată a substratului (0% PEG), scăzând odată cu creșterea concentrației de PEG din substrat și apropiindu-se chiar de 0 la o concentrație de 5% de PEG în substrat (adezivitatea substratului fiind foarte scăzută în acest caz) [92].

De exemplu, făcând media pe 24h, Ryan et al. au observat că viteza de împrăștiere a agregatelor de tip LN2 (de coezivitate mică) a scăzut de la 6.814 $\mu\text{m}^2/\text{h}$ la 4.176 $\mu\text{m}^2/\text{h}$, respectiv la 651 $\mu\text{m}^2/\text{h}$, prin creșterea concentrației de PEG de la 0% la 3%, respectiv la 5% (Fig. 5.47 A-C). Pentru agregatele de tip LN5 (de coezivitate medie), viteza de împrăștiere pe substraturi conținând 0% , respectiv 3% PEG a fost 3.612 $\mu\text{m}^2/\text{h}$ și 1.841 $\mu\text{m}^2/\text{h}$ (Fig. 5.47 D,E). Aceste agregate se împrăștie puțin sau aproape deloc în cazul în care substratul conține 5% PEG (Fig. 5.47 C,F) [92].

Această analiză demonstrează ca la un nivel constant de coeziune celulă - celulă, diminuarea adeziunii celulă - substrat conduce la o scădere a vitezei de împrăștiere a agregatului pe substrat.

De mare interes în cadrul acestui experiment a fost faptul că viteza de împrăștiere a agregatelor pe un substrat de o anumită concentrație a fost puternic influențată de intensitatea coeziunii dintre celule. Agregatele de coezivitate scăzută se împrăștie mai rapid pe fiecare substrat (indiferent de concentrația de PEG) decât agregatele de coezivitate ridicată. De exemplu, pe un substrat conținând 3% PEG, creșterea coezivității agregatului de la 1.9 la 3.1 mN/m reduce viteza de împrăștiere medie de la 4.176 $\mu\text{m}^2/\text{h}$ la 1.841 $\mu\text{m}^2/\text{h}$ (Fig. 5.47 B,E). Acest efect a fost atât de puternic, încât agregatele cele mai coezive (LR1 - 8.7 mN/m) nu se împrăștie aproape deloc, nici măcar pe substratul unde celulele lor individuale au aderat mult mai puternic (Fig. 5.47 G) [92].

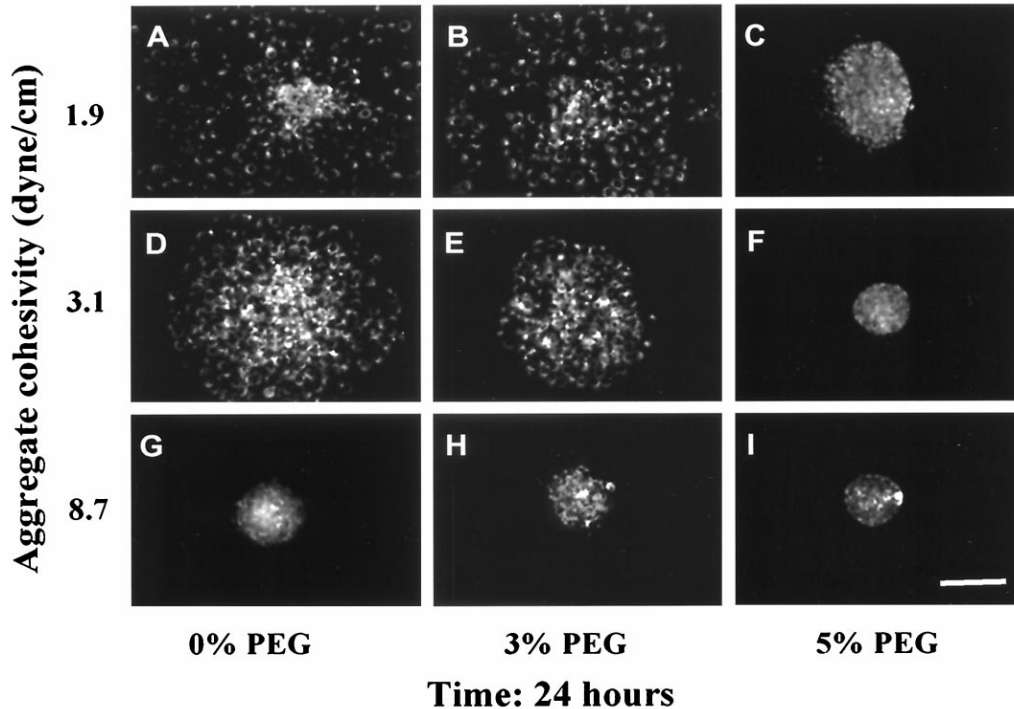


Fig. 5.47. Matricea rezultatelor arătând influența adeziunii celulă-substrat, respectiv a coeziunii celulă-celulă asupra împrăstierii unor agregate celulare de diferite coezivități (LN2, LN5, LR1 – de sus în jos) pe un substrat cu diferite concentrații de PEG (0%,3%,5% - din stânga spre dreapta). Creșterea coeziunii celulă-celulă scade viteza de împrăștiere a agregatelor, în timp ce creșterea adeziunii celulă-substrat crește viteza de împrăștiere a agregatelor. Agregatele celulare de diferite coezivități au fost lăsate să se împrăștie timp de 24 de ore pe substratele de diferite adezivități. Se observă că agregatele cele mai coezive nu se împrăștie aproape deloc, chiar și pe substratul cu cea mai mare adezivitate (G), în timp ce agregatele cele mai puțin coezive, de asemenea nu se împrăștie aproape deloc în cazul în care adezivitatea substratului este foarte scăzută (C). Preluat din Ryan et al. [92].

În continuare, am realizat un nou set de simulări ale împrăstierii celulare, urmărind să reproducem matricea de experimente realizată de Ryan et al. (Fig. 5.47), în condiții de simulare similare condițiilor de intrare folosite în experimentele de laborator [107].

Tabelul 5.6 prezintă valorile parametrilor de coeziune celulă - celulă și de adeziune celulă - substrat folosite în acest set de simulări și numărul de pași Monte Carlo rulați (MCS).

Tabel 5.6. Valorile parametrilor de intrare ai simulărilor ce reproduc matricea lui Ryan.

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	MCS	Figuri
1	1.8; 1; 0.6	100 000	Fig. 5.48 A,B,C
1.4	1.8; 1; 0.6	100 000	Fig. 5.48 D,E,F
2	1.8; 1.2; 0.6	100 000	Fig. 5.48 G,H,I

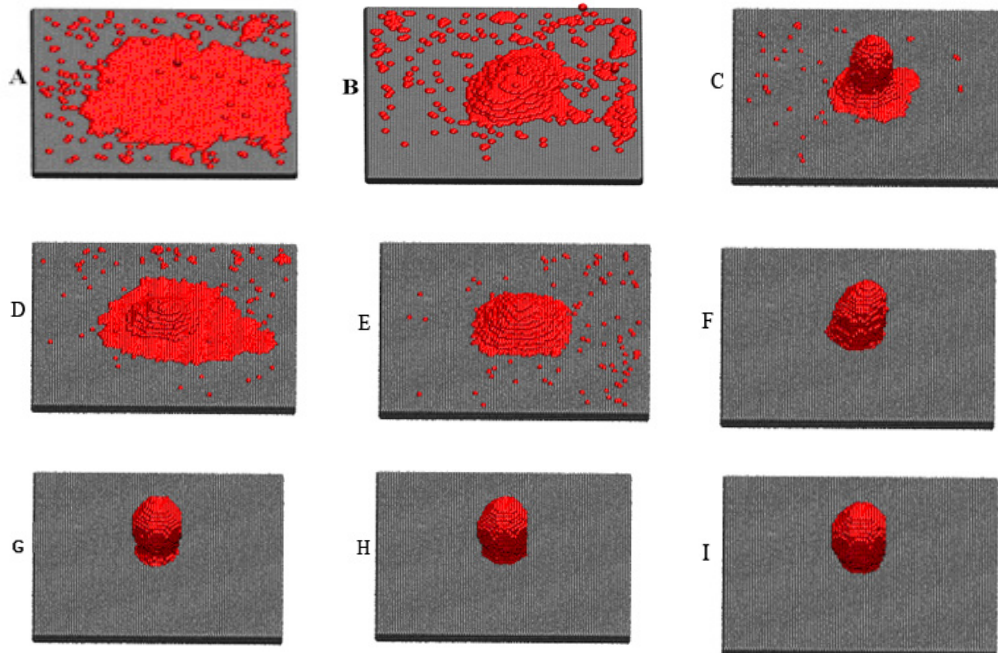


Fig. 5.48. Matricea rezultatelor simulărilor care arată influența coeziunii celulă - celulă și a adeziunii celulă - substrat asupra împrăștierii (A,B,C - Tabelul 5.6, rândul 1; D,E,F - Tabelul 5.6, rândul 2; G,H,I - Tabelul 5.6, rândul 3).

Analizând Fig. 5.48, se observă că la un nivel constant de coeziune celulă - celulă, împrăștierea celulelor pe biomaterial depinde de energia de adeziune celulă - substrat. Creșterea coeziunii celulă - celulă încetinește viteza de împrăștiere a agregatului, în timp ce creșterea adeziunii celulă - substrat crește viteza de împrăștiere a agregatului. Rezultatele obținute sunt în acord calitativ cu rezultatele experimentale din [92]. Astfel, programul SIMMMC propus bazat pe metoda Metropolis Monte Carlo surprinde corect principalele caracteristici ale DAH [2].

Pentru a reproduce cantitativ fenomenul prezentat de Ryan în matricea experimentelor din Fig. 5.47, pe baza setului I, II, III, IV de simulări realizate cu programul original SIMMMC, am reprezentat în Fig. 5.49 evoluția vitezei de împrăștiere a unor agregate de diferite coezivități, în funcție de diferite adezivități ale plăcii de biomaterial.

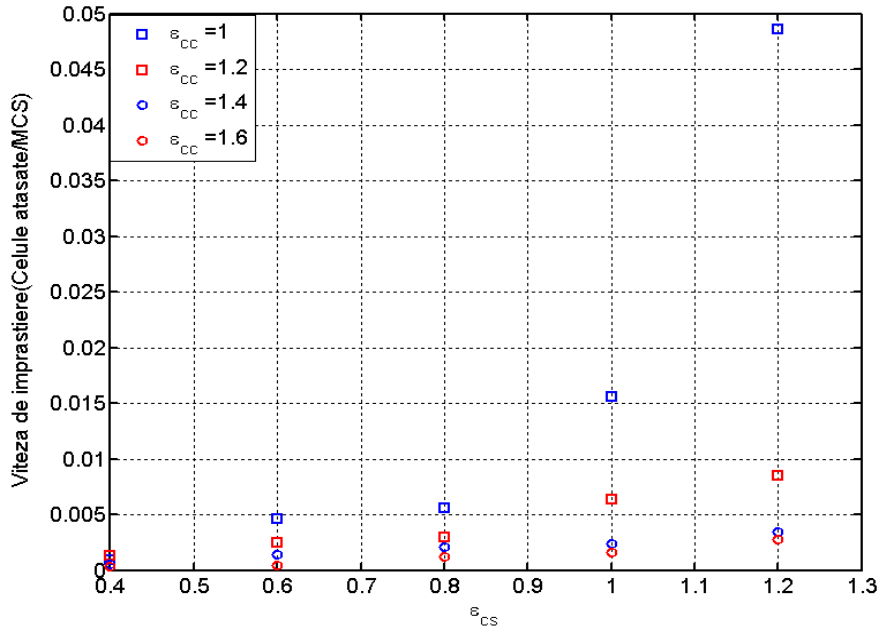


Fig. 5.49. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului în funcție de energia de adeziune celulă - substrat.

În Fig. 5.49, se poate observa foarte clar că la o energie de coeziune constantă celulă - celulă, viteza de împrăștiere a agregatului crește odată cu creșterea energiei de adeziune celulă - substrat. Pe de altă parte, la o energie de adeziune celulă - substrat constantă, creșterea coeziunii dintre celule determină o împrăștiere mai lentă. Se observă că, pe măsură ce energia de coeziune celulă - celulă e mai mare, chiar și la adeziuni celulă - substrat puternice, procesul de împrăștiere este mult încetinit.

În continuare, urmărim să validăm cantitativ aplicația SIMMMC și algoritmi propuși, reproducând graficul vitezei de împrăștiere realizat de Lauffenburger et al. [93] ca funcție de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă - celulă.

Pentru realizarea experimentelor de laborator, s-au considerat 3 linii celulare cu grade diferite de coezivitate (LN2 - coezivitate mică, LN5 - coezivitate medie, LR1 - coezivitate mare) și 5 tipuri de substraturi de diferite adezivități [93]. Analizând Fig. 5.50 (Fig. 2 din [93]) se poate observa că viteza de împrăștiere a celulelor este complet dependentă de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă - celulă, susținând cantitativ astfel concluzia lui Ryan și anume că scăderea energiei de adeziune celulă - substrat, respectiv creșterea energiei de coeziune celulă - celulă încetinește puternic viteza de împrăștiere a agregatelor celulare [93]. Această descoperire este o extensie importantă a conceptului ipotezei adeziunii diferențiate descrisă de Steinberg, în ceea ce privește auto-organizarea tisulară [2,93].

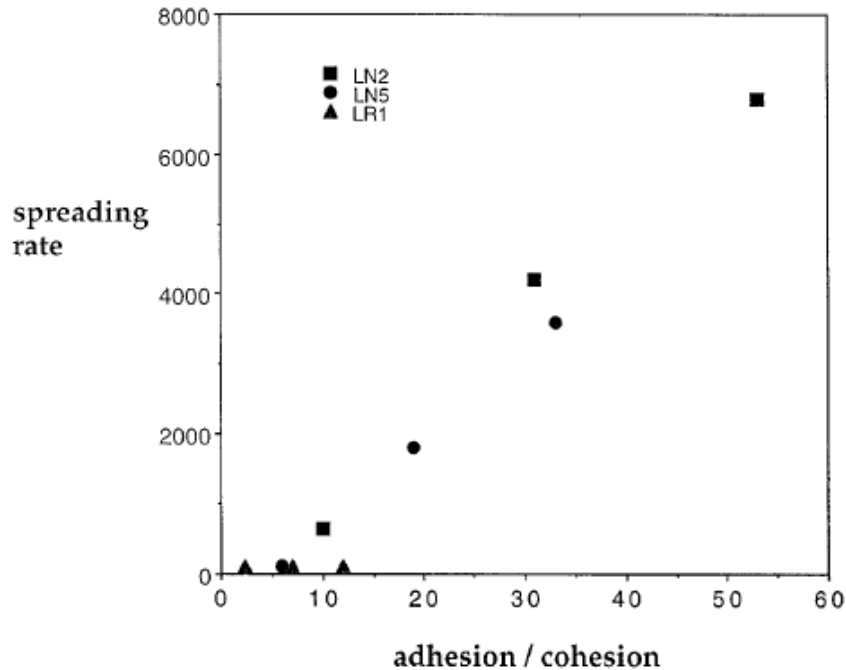


Fig. 5.50. Viteza de împrăștiere a unor agregate celulare de diferite coezivități (LR1, LN5, LN2, cu $LR1 > LN5 > LN2$) pe suprafața a 5 substraturi de diferite adevizivități ca și funcție de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă - celulă (valorile sunt preluate din articolul [92]). Preluat din [93].

Pentru a analiza evoluția vitezei de împrăștiere a celulelor în funcție de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă - celulă, am considerat în simulările realizate 4 tipuri de agregate celulare de diferite coezivități și 10 tipuri de substraturi de diferite adevizivități. Pentru fiecare valoare a energiei de coeziune celulă - celulă, am considerat 10 valori ale energiei de adeziune celulă - substrat. Valorile parametrilor de intrare, precum și numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați sunt prezentate în Tabelul 5.7.

Tabel 5.7. Valorile parametrilor de intrare ai simulărilor împrăștierii unui agregat celular de diferite coezivități.

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	MCS	Figuri
1	0.2;0.4;0.6;0.8;1;1.2;1.4;1.6;1.8;2	150 000	Fig. 5.51
1.2	0.2;0.4;0.6;0.8;1;1.2;1.4;1.6;1.8;2	150 000	Fig. 5.51
1.4	0.2;0.4;0.6;0.8;1;1.2;1.4;1.6;1.8;2	150 000	Fig. 5.51
1.6	0.2;0.4;0.6;0.8;1;1.2;1.4;1.6;1.8;2	150 000	Fig. 5.51

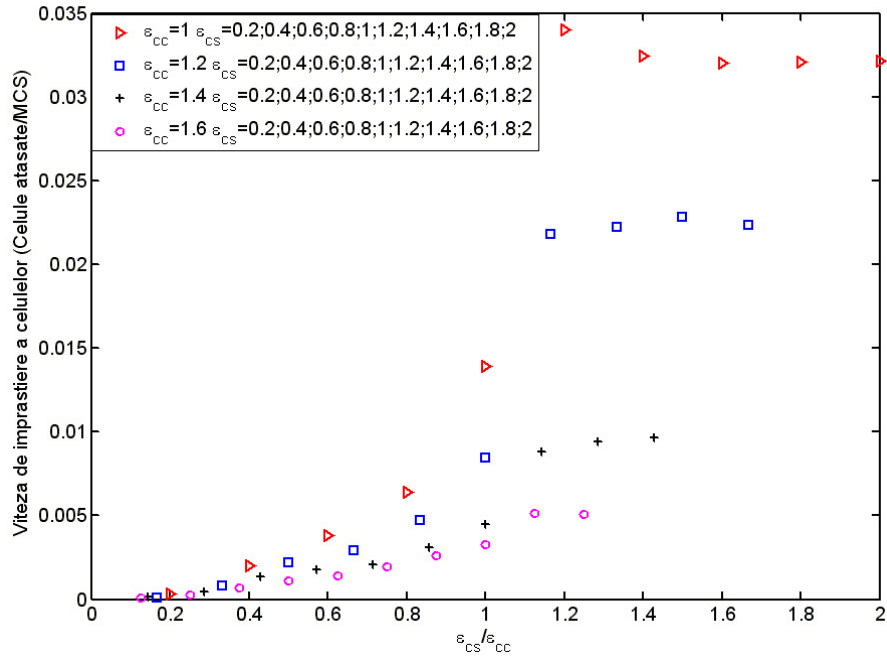


Fig. 5.51. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului ca funcție de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă - celulă.

Analizând Fig. 5.51, putem observa că, dacă coeziunea dintre celule este slabă, viteza de împrăștiere a celulelor crește rapid, pe măsură ce adeziunea dintre celule și substrat e mai puternică. Dacă energia de coeziune dintre celule e mai mare, viteza de împrăștiere a celulelor crește de asemenea, însă într-un ritm mai lent. Rezultatele obținute în acest set de simulări sunt în conformitate cu rezultatele prezentate de Lauffenburger et al. (Fig. 5.50) [93], pe baza experimentelor de laborator realizate.

Dat fiind că algoritmi dezvoltati bazați pe metoda Metropolis Monte Carlo au la bază generarea de numere aleatoare, pentru a obține date cât mai exacte referitoare la evoluția vitezei de împrăștiere a celulelor în funcție de raportul dintre adeziunea celulă - substrat și coeziunea celulă - celulă, am realizat câte 10 simulări pentru fiecare combinație a valorilor energiei de coeziune celulă - celulă și ale energiei de adeziune celulă - substrat.

Tablelul 5.8 prezintă parametrii de intrare utilizați în simulările unde energia de coeziune are valoarea 1, numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați, precum și numărul de rulări efectuate pentru fiecare combinație de parametri.

Tabel 5.8. Valorile parametrilor de intrare ai simulărilor împrăștierii unui agregat celular de coezivitate egală cu 1.

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	MCS	Număr rulări
1	0.2	150 000	10
1	0.4	150 000	10
1	0.6	150 000	10
1	0.8	150 000	10
1	1	150 000	10
1	1.2	150 000	10
1	1.4	150 000	10
1	1.6	150 000	10
1	1.8	150 000	10
1	2	150 000	10

În Figurile 5.52, 5.53, 5.55, 5.56 se prezintă evoluția numărului de celule atașate, de-a lungul rulării a 150 000 MCS, în cele 10 simulări aferente parametrilor de intrare prezentați în Tabelul 5.8, rândurile 1, 4, 6, respectiv 8 (unde energia de coeziune celulă – celulă are valoarea 1). Numărul de celule atașate la substrat luat în discuție pentru determinarea vitezei de împrăștiere pentru acești parametri de intrare se calculează făcându-se media aritmetică între numerele de celule calculate în fiecare din cele 10 simulări.

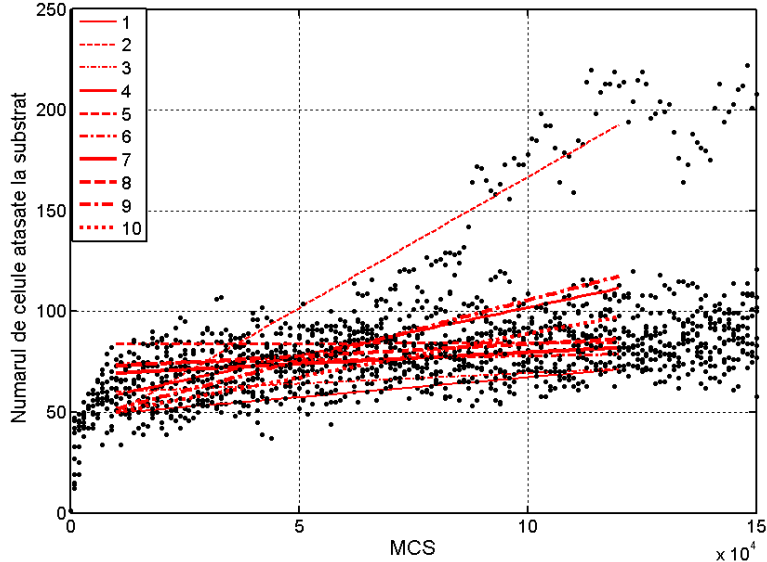


Fig. 5.52. Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8 rândul 1.

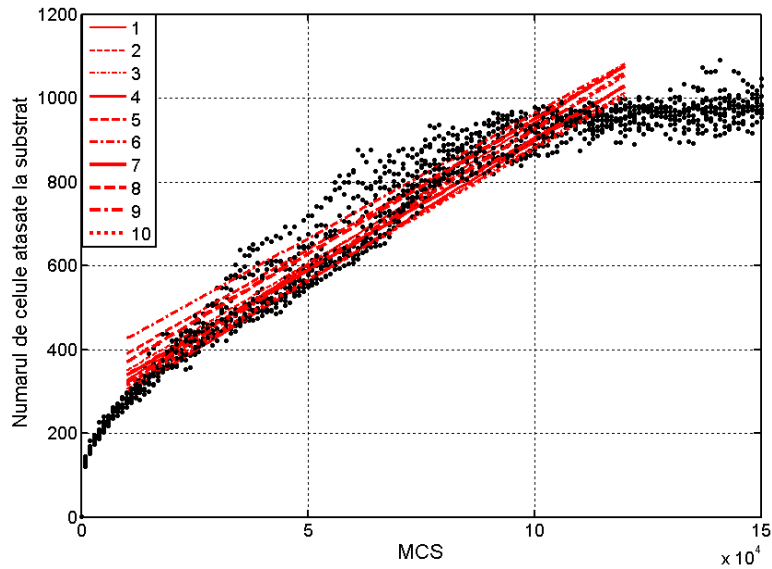


Fig. 5.53. Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8 rândul 4.

În Fig. 5.54, am reprezentat valoarea medie și deviația standard a numărului de celule atașate la substrat, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.8, rândul 4.

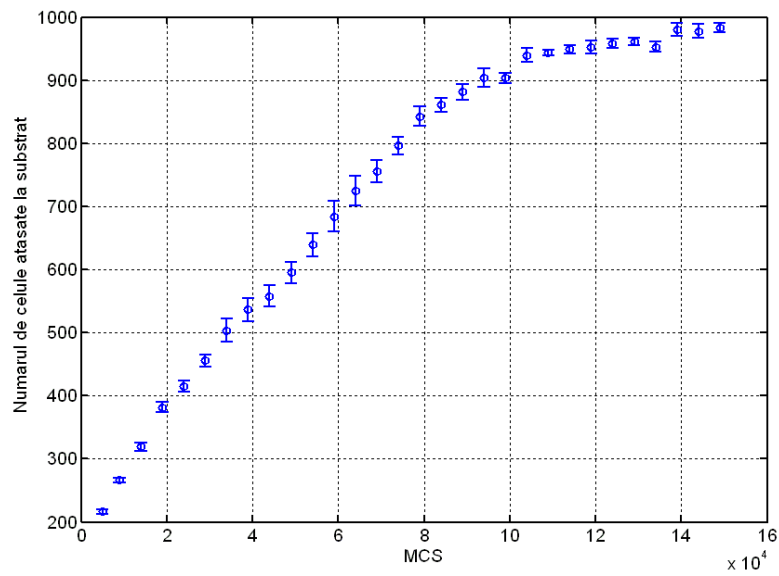


Fig. 5.54. Valoarea medie și deviația standard a numărului de celule atașate la substrat pentru parametrii prezentați în Tabelul 5.8, rândul 4.

Acești parametri au fost calculați la fiecare rulare a unui anumit număr de MCS, cu ajutorul unor algoritmi originali, prezentați în detaliu în capitolul 3. Similar, se calculează valoarea medie a numărului de celule atașate la substrat și deviația standard a acesteia, pentru fiecare set de 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8.

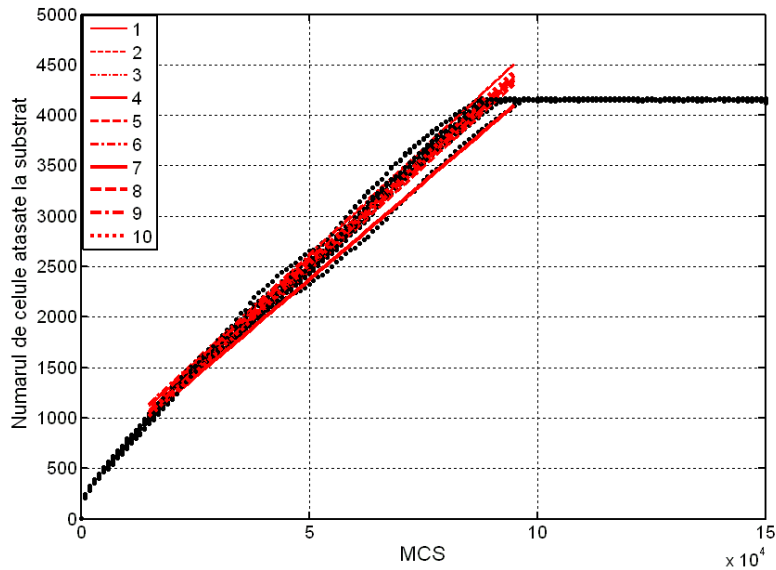


Fig. 5.55. Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8, rândul 6.

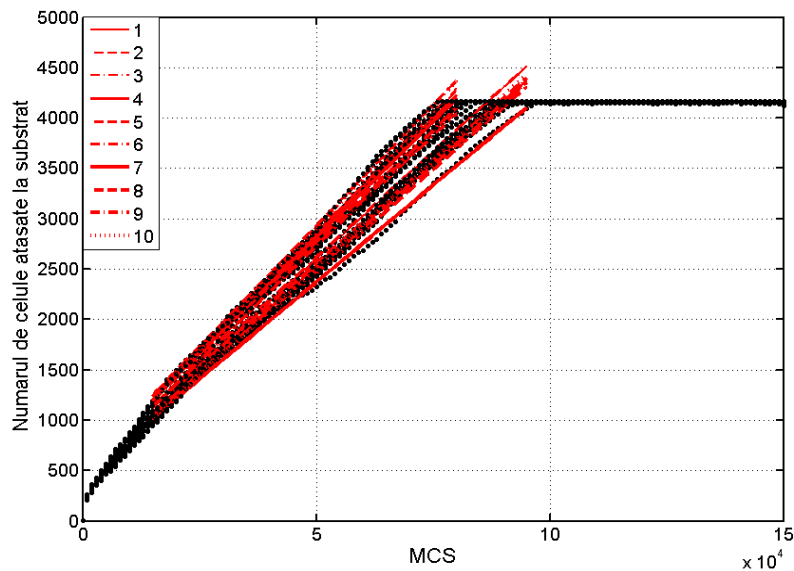


Fig. 5.56. Evoluția numărului de celule atașate la substrat în cele 10 simulări aferente combinației de parametri prezentate în Tabelul 5.8, rândul 8.

În această manieră se procedează pentru toate combinațiile dintre energia de coeziune egală cu 1 și cele 10 energii de adeziune celulă - substrat prezentate în Tabelul 5.8. Pe baza datelor referitoare la numărul de celule atașate la substrat și a parametrilor de intrare, se trasează graficul vitezei de împrăștiere a celulelor în funcție de raportul adeziune - coeziune, pentru parametrii de intrare prezentați în Tabelul 5.8 (Fig. 5.57).

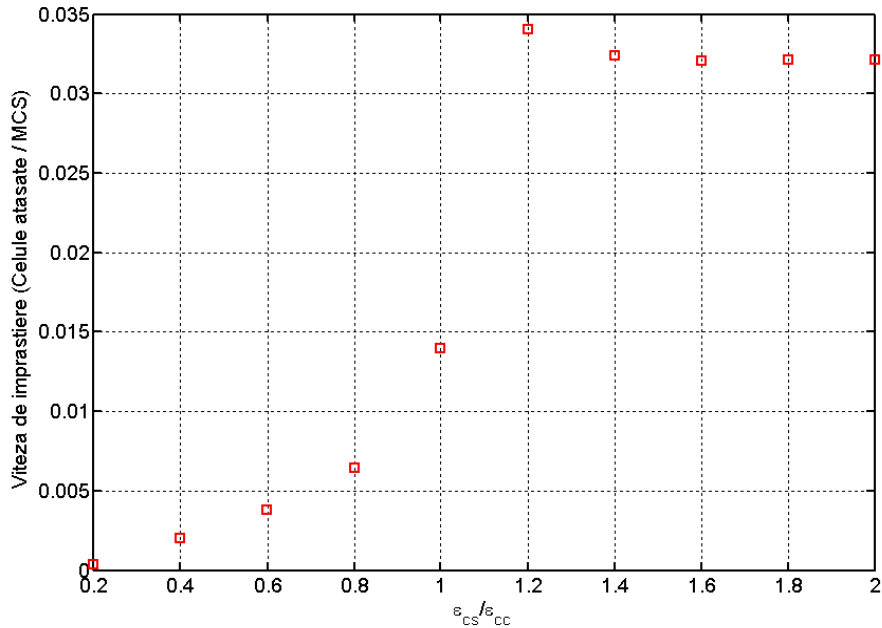


Fig. 5.57. Viteza de împrăștiere a celulelor în funcție de raportul dintre adeziune și coeziune pentru valorile parametrilor de intrare prezentate în Tabelul 5.8.

Același procedeu se execută și pentru energia de coeziune egală cu valorile 1.2; 1.4; 1.6, în final obținându-se graficul din Fig. 5.51.

În Fig. 5.58, am reprezentat viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața unui biomaterial în funcție de tensiunea interfacială celulă - substrat, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.7

Analiza comparativă a graficelor vitezei de împrăștiere în funcție de raportul dintre energii (Fig. 5.51), respectiv în funcție de tensiunea interfacială celulă - substrat (Fig. 5.58), arată că rezultatele obținute sunt similare, neputându-se diferenția care parametru este mai relevant pentru caracterizarea vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat.

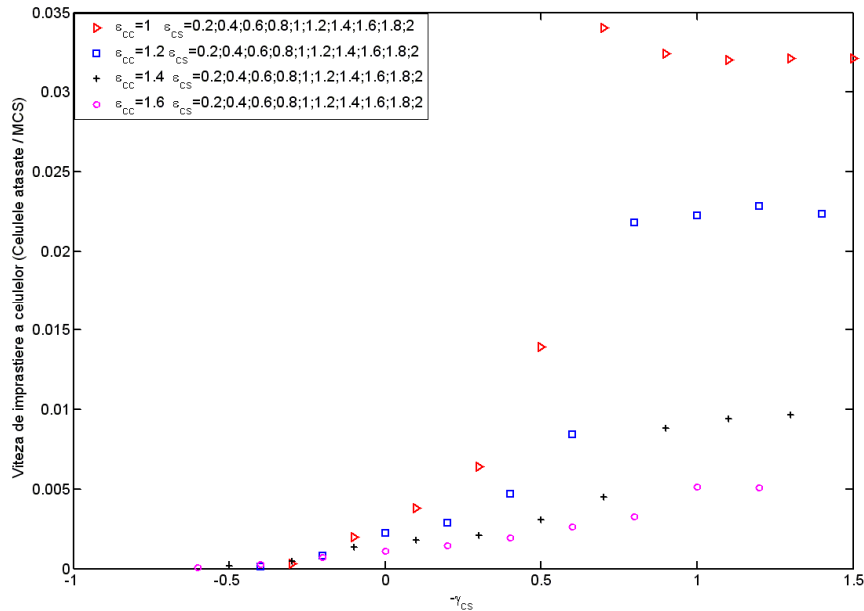


Fig. 5.58. Viteza de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului ca funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat.

Simulările împrăștierii unui agregat celular format dintr-un singur tip de celule pe suprafața unei plăci de biomaterial, au constat în rularea a 100 000 MCS, timp de rulare fiind aproximativ 1 oră și 30 de minute.

Pentru facilitarea analizei rezultatelor obținute în urma numeroaselor seturi de simulări realizate, ar fi utilă memorarea într-o bază de date a parametrilor de intrare ai simularilor, a numărului de pași Monte Carlo rulați, a rezultatelor obținute, precum și a duratei simulărilor [108].

5.2. Studiul organizării a două populații diferite de celule în cadrul structurilor tisulare

5.2.1. Introducere

Organizarea multiplelor populații de celule în structuri tisulare, pornind de la agregate multicelulare, reprezintă una dintre cele mai studiate probleme, la ora actuală, în domeniul ingineriei tisulare și medicinei regenerative. Înțelegerea dinamicii celulare are un rol extrem de important, atât în crearea de noi țesuturi *in vitro*, funcționale și implantabile în organismul uman, cât și în înțelegerea naturii proceselor invazive tumorale [93].

În timpul dezvoltării embrionare, fragmente de țesut se separă, dobândind funcții specializate pentru diferitele organe din corpul uman. O dată ce segregarea tisulară a avut loc, țesuturile reprezintă compartimente separate prin granițe.

Instituirea și întreținerea granițelor și compartimentelor între diferite populații de celule este extrem de importantă pentru morfogeneza tisulară [109].

Caderinele, care sunt responsabile de coeziunea dintre celule, respectiv integrinele care sunt responsabile de adeziunea dintre celule și substrat stau la baza acestui proces. Aceste componente sunt implicate, de asemenea, în tranziția de la tumorile benigne la tumorile invazive, maligne. Tranziția la tumorile maligne are loc în urma unui proces de dezasamblare care determină eliminarea granițelor și compartimentelor dintre diferite populații de celule (celulele tumorale se răspândesc în compartimentele populațiilor de celule sănătoase). Segregarea tisulară poate fi văzută ca și un fenomen cu caracter imiscibil, ce are loc între celule în timpul diferențierii, în timp ce invazia celulară poate fi văzută ca și un fenomen miscibil, ce are loc între celulele tumorale și celulele țesutului pe care acestea îl invadează. Dacă celulele tumorale segregă sau intermixează, depinde în mare parte de balanța dintre interacțiunile dintre celule, asigurate de caderine, și interacțiunile dintre celulele tumorale cu diferite componente ale mediului în care trăiesc, asigurate de integrine [93,109].

Abilitatea de a înțelege și controla distribuția spațială a mai multor populații de celule de diferite tipuri furnizează abordări raționale aplicațiilor din ingineria tisulară, unde organizarea multicelulară în structuri tridimensionale este dorită. În ingineria tisulară, se urmărește construirea de structuri tisulare vascularizate, formate din celulele endoteliale ale vaselor de sânge și celulele țesuturilor conective, utilizând diverse biomatrici ca suport pentru dezvoltarea celulară [93,109,110].

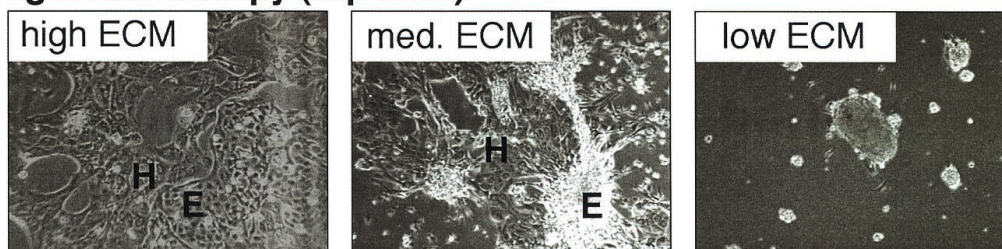
Este foarte bine cunoscut că anumite țesuturi vii au un comportament foarte asemănător cu lichidele vâscoase. Când multiple tipuri de celule din embrion se disociază și se intermixează aleator, ele sunt capabile să se rearanjeze și să formeze compartimente de celule de același tip. Acest fenomen de rearanjare a celulelor este cunoscut și sub denumirea de sortare celulară. Rotunjirea populațiilor de celule este similară cu rotunjirea picăturilor de lichid. Steinberg [2] a sugerat că sortarea celulară este direcționată de minimizarea energiei de suprafață. DAH statuează că țesutul posedă tensiuni interfaciale care provin din interacțiunile adezive dintre celule individuale și prezice că populațiile mixte, formate din celule suficient de mobile se rearanjează astfel încât celulele mai puțin coezive înconjoară celulele mai puternic coezive [93,109,110].

Un studiu pentru controlarea rațională a organizării spațiale a celulelor hepatice și endoteliale a fost raportat în aplicațiile pentru ficat din ingineria tisulară [93]. S-a descoperit că pentru trei niveluri de colagen diferite care acoperă o suprafață de cultură (determinând adezivități diferite), cele două populații de celule se organizează în trei moduri diferite. La niveluri ridicate de colagen, când adeziunea celulă-substrat e mare, atât celulele endoteliale, cât și celulele hepatice se împrăstie pe suprafața substratului. La niveluri intermediare de colagen, când adeziunea celulă-substrat e medie, celulele endoteliale formează un strat pe suprafața biomaterialului, iar hepatocitele formează un strat deasupra stratului de celule endoteliale. La niveluri mici de colagen, când adeziunea celulă-substrat e foarte mică, un agregat de celule hepatice se formează, fiind înconjurat de o coajă de celule endoteliale, care se atașează la substrat [93].

Analizând structurile rezultate în Fig. 5.59, s-a concluzionat că celulele hepatice au o coezivitate mai mare decât celulele endoteliale, organizările lor fiind generate de raportul dintre adeziune și coeziune, pe măsură ce adeziunea celulă-substrat se modifică.

Hepatocyte/Endothelial Cell Sorting

light microscopy (top view)



histology (vertical cut; hematoxylin & eosin stain)

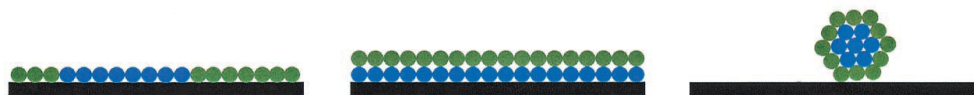
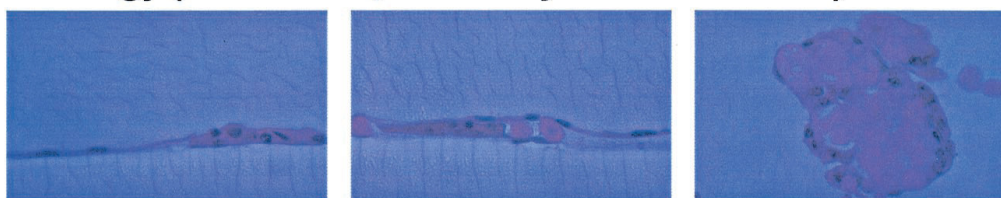


Fig. 5.59. Diferite moduri de organizare a două populații de celule (endoteliale și hepatice) pe o suprafață plană de biomaterial acoperită de diferite niveluri de colagen de tipul 1. Un nivel ridicat de colagen determină ca ambele tipuri de celule să se împrăștie pe substrat (panoul din stânga). La un nivel intermediar de colagen, celulele endoteliale formează un strat pe suprafața biomaterialului, în timp ce hepatocitele formează un strat deasupra stratului de celule endoteliale (panoul din mijloc). Un nivel scăzut de colagen, determină formarea unui agregat de celule hepatice, înconjurat de o coajă de celule endoteliale (panoul din dreapta). Preluat din [93].

Bazându-ne pe cele demonstrate în practică, obiectivul principal al acestui studiu este să modeleze procesul de organizare a două populații de celule de coexistență diferite, cu ajutorul programului original de modelare și simulare celulară - SIMMMC. Se urmăresc rezultatele obținute pentru situațiile în care adesiunea celulei - substrat este mică, medie, respectiv mare.

În urma acestui studiu, avem ca scop validarea aplicației SIMMMC și a algoritmilor propuși, prin obținerea de rezultate similare cu cele obținute în practică, precum și furnizarea de informații și principii importante pentru ingineria tisulară, în vederea înțelegerii și reproducerii în laborator a organizării în structuri tisulare a mai multor populații de celule, formate din diferite tipuri de celule.

5.2.2. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat

În încercarea de a reproduce rezultatele experimentale prezentate în [93], am dezvoltat un model computațional al unui sistem biologic format dintr-un agregat multicelular scăldat în mediu de cultură, localizat pe suprafața plană a unui

biomaterial. Biomaterialul este reprezentat în model de un paralelipiped de dimensiune $100 \times 100 \times 3$ unități de-a lungul celor 3 axe OX , OY , OZ , axa OZ fiind axa longitudinală a sistemului. O unitate în cadrul modelului este reprezentată de un diametru celular. Fiecare element al paralelipipedului constă într-un index asociat particulelor de biomaterial. Agregatul multicelular, format din 2 tipuri de celule, de concentrații egale, aleator amestecate este reprezentat în zona $z \geq z_0$ ($z_0 = 3$ unități) de o sferă cu raza $R = 9$ unități. Fiecare element al sferei, constă fie într-un index asociat tipului 1 de celule, fie într-un index asociat tipului 2 de celule. Celulele de tip 1 sunt mai puternic coezive (reprezentate în model prin culoarea roșie), corespunzând celulelor hepatice din experimentul prezentat în [93], în timp ce celulele de tip 2 sunt mai slab coezive (reprezentate în model prin culoarea albastră), corespunzând celulelor endoteliale din experimentul prezentat în [93].

Pentru vizualizarea modelului sistemului biologic studiat, am folosit programul de vizualizare moleculară VMD (Visual Molecular Dynamics) [1]. Fig. 5.60 prezintă configurația inițială a sistemului.

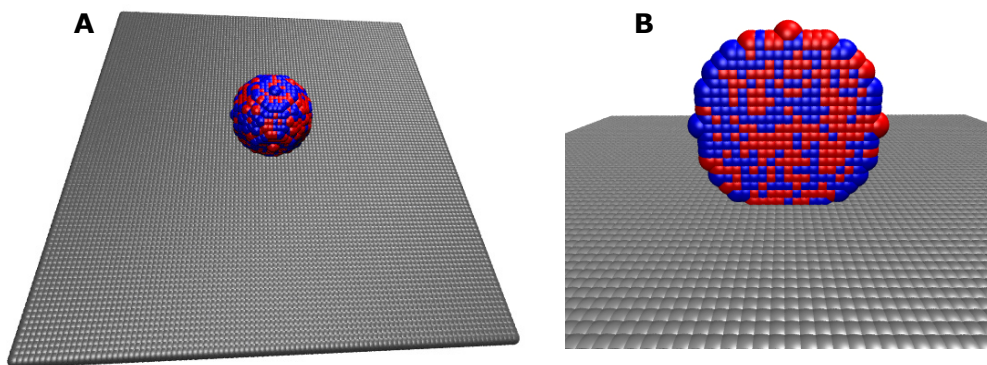


Fig. 5.60. A. Modelul computațional asociat sistemului biologic studiat: un agregat multicelular, format din două tipuri de celule, aflat pe suprafața unui biomaterial de structură paralelipedică (celulele de tip 1 – reprezentate prin culoarea roșie; celulele de tip 2 – reprezentate prin culoarea albastră); B. Secțiune verticală în agregatul celular din Fig. 5.60A.

5.2.3. Simularea organizării a două populații diferite de celule în cadrul structurilor tisulare

Bazându-ne pe modelul computațional dezvoltat, am realizat mai multe seturi de simulări ale procesului de organizare celulară a două populații diferite de celule, identificând condițiile energetice care conduc la rearanjări celulare similare experimentului prezentat în [93]. Prin acest studiu, urmărim să validăm abordarea bazată pe metoda Monte Carlo pentru simularea organizării diferitelor populații de celule în structuri tisulare.

Pentru a caracteriza coeziunea dintre celulele de același tip, coeziunea dintre celulele de tipuri diferite, respectiv adeziunea dintre cele două tipuri de celule și substrat, am folosit, în model, parametrii energetici care dau o măsură cantitativă a interacțiunilor dintre toate aceste componente.

Energia totală de adeziune a unui sistem alcătuit din 2 tipuri de celule se poate aduce la forma:

$$E = \gamma_{oc_1} \cdot B_{0c_1} + \gamma_{oc_2} \cdot B_{0c_2} + \gamma_{c_1c_2} \cdot B_{c_1c_2} + \gamma_{c_1s} \cdot B_{c_1s} + \gamma_{c_2s} \cdot B_{c_2s}, \quad (5.1)$$

unde:

- $\gamma_{oc_1} = \frac{(\varepsilon_{00} + \varepsilon_{c_1c_1})}{2} - \varepsilon_{0c_1}$ este parametrul de tensiune interfacială mediu - celulă de tip 1
- $\gamma_{oc_2} = \frac{(\varepsilon_{00} + \varepsilon_{c_2c_2})}{2} - \varepsilon_{0c_2}$ este parametrul de tensiune interfacială mediu - celulă de tip 2
- $\gamma_{c_1c_2} = \frac{(\varepsilon_{c_1c_1} + \varepsilon_{c_2c_2})}{2} - \varepsilon_{c_1c_2}$ este parametrul de tensiune interfacială celulă de tip 1 - celulă de tip 2
- $\gamma_{0s} = \frac{\varepsilon_{00}}{2} - \varepsilon_{0s}$ este parametrul de tensiune interfacială mediu - substrat
- $\gamma_{c_1s} = \frac{\varepsilon_{c_1c_1}}{2} - \varepsilon_{c_1s}$ este parametrul de tensiune interfacială celulă de tip 1 - substrat
- $\gamma_{c_2s} = \frac{\varepsilon_{c_2c_2}}{2} - \varepsilon_{c_2s}$ este parametrul de tensiune interfacială celulă de tip 2 - substrat.
- $\varepsilon_{c_1c_1}$ este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1
- $\varepsilon_{c_2c_2}$ este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 2
- $\varepsilon_{c_1c_2}$ este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1 și celulele de tip 2
- ε_{0c_1} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1 și mediu
- ε_{0c_2} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 2 și mediu
- ε_{00} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre particulele de mediu
- ε_{0s} este parametru energetic ce măsoară interacțiunea dintre particulele de mediu și substrat
- ε_{c_1s} este parametru energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1 și substrat

- \mathcal{E}_{c_2s} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 2 și substrat
- B_{0c_1} este numărul total de legături dintre mediu și celulele de tip 1
- B_{0c_2} este numărul total de legături dintre mediu și celulele de tip 2
- $B_{c_1c_2}$ este numărul total de legături dintre celulele de tip 1 și celulele de tip 2
- B_{0s} este numărul total de legături dintre mediu și particulele de biomaterial
- B_{c_1s} este numărul total de legături dintre celulele de tip 1 și substrat
- B_{c_2s} este numărul total de legături dintre celulele de tip 2 și substrat

În modelul nostru, toate interacțiunile cu mediul s-au considerat nule.

Studiul prezentat presupune rularea unui număr de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale următorilor parametri de intrare:

- parametrul energetic ce măsoară coeziunea dintre celulele de tip 1, $\mathcal{E}_{c_1c_1}$
- parametrul energetic ce măsoară coeziunea dintre celulele de tip 2, $\mathcal{E}_{c_2c_2}$
- parametrul energetic ce măsoară coeziunea dintre celulele de tip 1 și 2, $\mathcal{E}_{c_1c_2}$
- parametrul energetic ce măsoară adeziunea dintre celulele de tip 1 și substrat, \mathcal{E}_{c_1s}
- parametrul energetic ce măsoară adeziunea dintre celulele de tip 2 și substrat, \mathcal{E}_{c_2s}

Parametrii de ieșire urmăriți sunt:

- numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 (mărime direct proporțională cu aria interfeței dintre aceste două populații de celule)
- numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat (mărime direct proporțională cu aria interfeței dintre populația de celule de tipul 1 și substrat)
- numărul de legături dintre celulele de tip 2 și substrat (mărime direct proporțională cu aria interfeței dintre populația de celule de tipul 2 și substrat)

Evoluția numărului de legături dintre diferitele componente ale sistemului de-a lungul rulării pașilor Monte Carlo furnizează informații cantitative cu privire la modul de organizare a celor două populații de celule pe suprafața biomaterialului. Calculul numărului de legături se face cu ajutorul unor algoritmi originali, prezentați în capitolul 3.

Tabelul 5.9 prezintă valorile parametrilor de intrare utilizați în simulările noastre, precum și numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați.

Tabel 5.9. Valorile parametrilor de intrare în simulările organizării a două populații de celule pe suprafața unui biomaterial.

$\varepsilon_{c_1c_1}$	$\varepsilon_{c_2c_2}$	$\varepsilon_{c_1c_2}$	ε_{c_1s}	ε_{c_2s}	MCS	Setul de simulări, Figura
1.4	0.8	0.9	1.7	1.2	200 000	I, Fig. 2, 3, 4
1.4	0.8	0.9	1	1	200 000	II, Fig. 5,6,7
1.4	0.8	0.9	0	0	50 000	III, Fig. 8,9,10
1.4	0.8	1.4	2	1.7	200 000	IV, Fig. 11,12,13
1.4	0.8	0.7	0.3	0.4	100 000	V, Fig. 14,15,16

În seturile de simulări realizate, am considerat interacțiunea dintre celulele de tipul 1 mai mare, fiind caracterizată de un parametru energetic ce are valoarea 1.4 și interacțiunea dintre celulele de tipul 2 mai mică, fiind caracterizată de un parametru energetic ce are valoarea 0.8. Am urmărit reorganizarea celor două populații de celule pe suprafața unui biomaterial de formă paralelipipedică, în urma modificării interacțiunii celulă – substrat pentru fiecare tip de celulă.

În Fig. 5.61, corespunzătoare setului I de simulări din Tabelul 5.9, se vizualizează, cu ajutorul programului de vizualizare moleculară VMD [1], configurația sistemului obținută după rularea a 100 000 MCS. Se observă că, dacă interacțiunea dintre celulele de tip 1 – substrat și celulele de tip 2 – substrat este mare, cele două populații de celule se reorganizează astfel: atât celulele de tip 1, de o coezivitate mare, cât și celulele de tip 2, de o coezivitate mică se împrăștie pe suprafața biomaterialului.

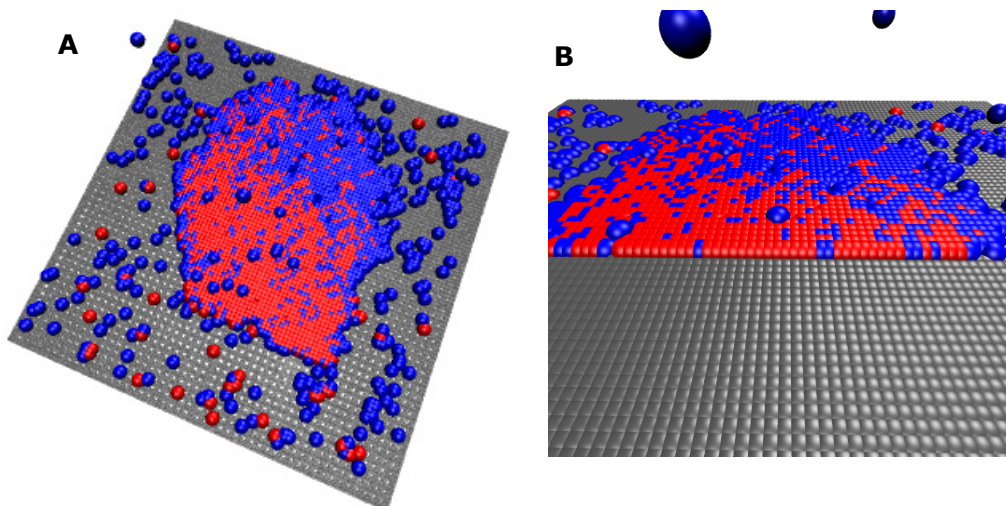


Fig. 5.61. A. Configurația sistemului după rularea a 100 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 1; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.61A.

Ținând cont de parametrii energetici utilizați în simulare, tensiunea interfacială celula de tip 1 - substrat are valoarea -1, iar tensiunea interfacială celula de tip 2 – substrat are valoarea -0.8 (ecuația (5.1)), acestea fiind responsabile de

atașarea rapidă a ambelor tipuri de celule la substrat. Tensiunea interfacială celula de tip 2 - mediu (0.4) este mai mică decât tensiunea interfacială celula de tip 1 - mediu (0.7) (ecuația (5.1)). Aceasta înseamnă că celulele de tipul 2 au tendința să iasă din agregatul celular și să pătrundă în mediul de cultură, ușurând atașarea la biomaterial. Din acest motiv, chiar dacă energia de interacțiune dintre celulele de tip 2 și substrat (1.2) este mai mică decât energia de interacțiune dintre celulele de tip 1 și substrat (1.7), viteza de împrăștiere a celulelor de ambele tipuri pe suprafața biomaterialului este aproximativ aceeași.

Rezultatele sunt similare cu rezultatele obținute în urma experimentului prezentat în [93], unde se urmărește evoluția unui agregat celular format din celule hepatice (puternic coezive) și celule endoteliale (de o coezivitate mai mică) pe suprafața unui biomaterial de adezivitate mare.

În Fig. 5.62, corespunzătoare primului set de simulări, s-a urmărit evoluția numărului de legături dintre celulele de tip 1 și celulele de tip 2, de-a lungul rulării a 200 000 MCS. Se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 în configurația inițială este în jurul valorii 18 000, după care, pe măsură ce celulele ies din agregatul celular și se atașează la biomaterial, acest număr scade.

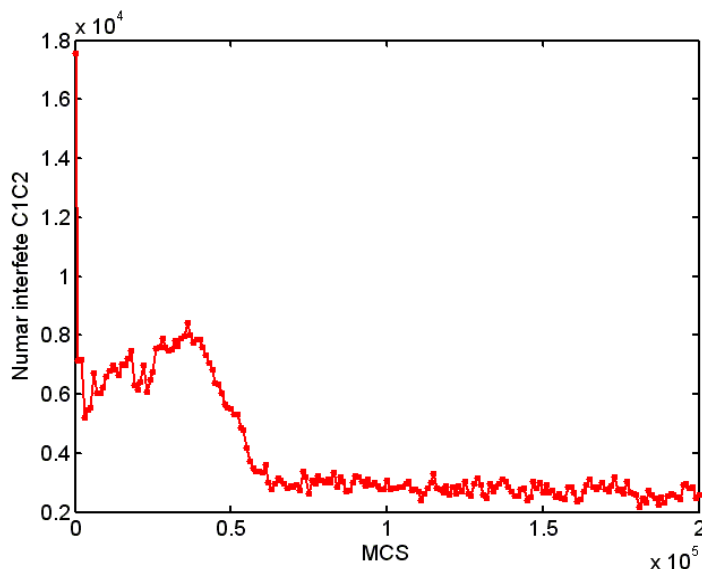


Fig. 5.62. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set I de simulări.

După rularea a 60 000 MCS numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 se stabilizează în jurul valorii 3000, indicând că celulele de tip 1 și 2 s-au separat în mare parte pe suprafața biomaterialului. Acest lucru se datorează faptului că tensiunea interfacială celula de tip 1 – celula de tip 2 este pozitivă (0.2), determinând celulele de un anumit tip să plece de lângă celulele de celălalt tip.

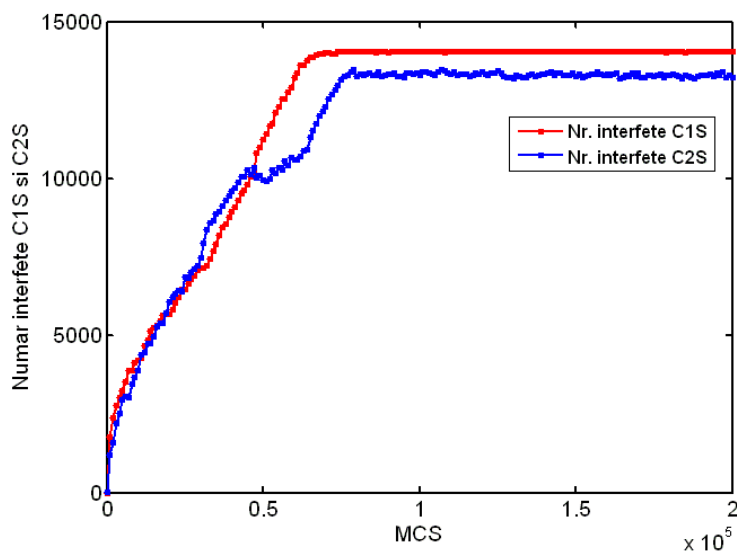


Fig. 5.63. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set I de simulări.

În Fig. 5.63, corespunzătoare primului set de simulări, s-a urmărit evoluția numărului de legături dintre celulele de tip 1 și substrat, respectiv dintre celulele de tip 2 și substrat, de-a lungul rulării a 200 000 MCS. Se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat, respectiv dintre celulele de tip 2 și substrat crește, aproximativ cu aceeași viteză, indicând că celulele se atașează de suprafața biomaterialului și se stabilizează aproximativ după rularea a 60 000 MCS. Începând din acest moment, aproape toate celulele s-au atașat de suprafața biomaterialului.

În Fig. 5.64, corespunzătoare setului II de simulări din Tabelul 5.9, se poate vizualiza configurația sistemului obținută după rularea a 100 000 MCS. Se observă că, dacă interacțiunea dintre celulele de tip 1 – substrat și celulele de tip 2 – substrat este medie, cele două populații de celule se reorganizează astfel: celulele de tip 2, de o coezivitate mai mică, formează un strat pe suprafața biomaterialului, iar deasupra acestora, se formează un strat de celule de tip 1, de coezivitate mai mare.

Ținând cont de parametrii energetici utilizați în simulare, tensiunea interfacială celula de tip 1 – substrat are valoarea -0.3, iar tensiunea interfacială celula de tip 2 – substrat are valoarea -0.6. Tensiunea interfacială celula de tip 2 – substrat, având o valoare mai mică, determină atașarea rapidă a celulelor de tip 2 pe suprafața biomaterialului, în timp ce tensiunea interfacială celula de tip 1 – substrat, având o valoare mai mare, determină formarea unui strat de celule de tip 1 deasupra stratului de celule de tip 2. Chiar dacă energiile de interacțiune celula de tip 1 – substrat și celula de tip 2 – substrat sunt egale (1), diferența de coezivități între aceste două tipuri de celule face ca ele să se organizeze în două straturi, după cum se poate vedea în Fig. 5.64.

Rezultatele sunt similare cu rezultatele obținute în urma experimentului prezentat în [93], unde se urmărește evoluția unui agregat celular format din celule hepatice (puternic coezive) și celule endoteliale (de o coezivitate mai mică) pe suprafața unui biomaterial de adezivitate medie.

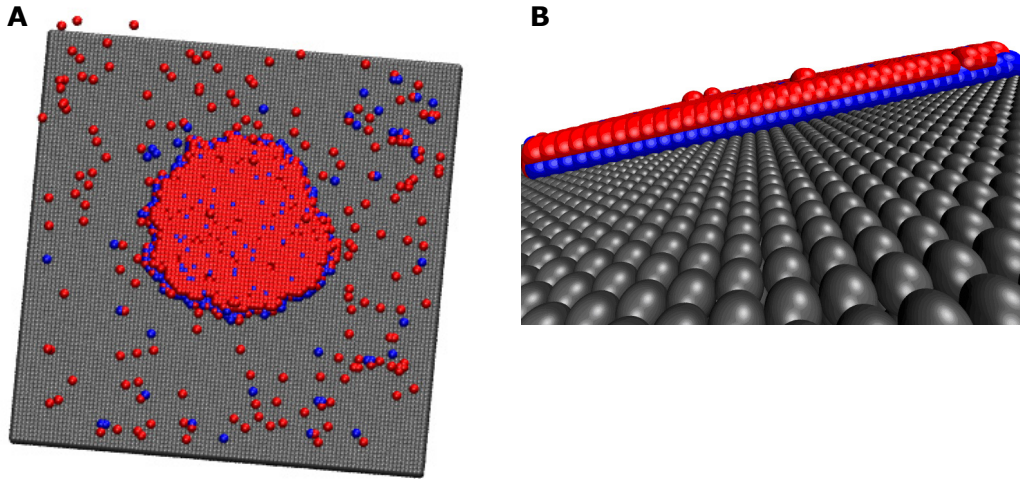


Fig. 5.64 A. Configurația sistemului după rularea a 100 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 2; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.64A.

În Fig. 5.65, corespunzătoare setului II de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 scade, pe măsură ce celulele se reorganizează pe suprafața biomaterialului. După rularea a 60 000 MCS, numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 se stabilizează în jurul valorii 12 000, indicând că celulele de tip 1 și 2 rămân interconectate, în mare parte.

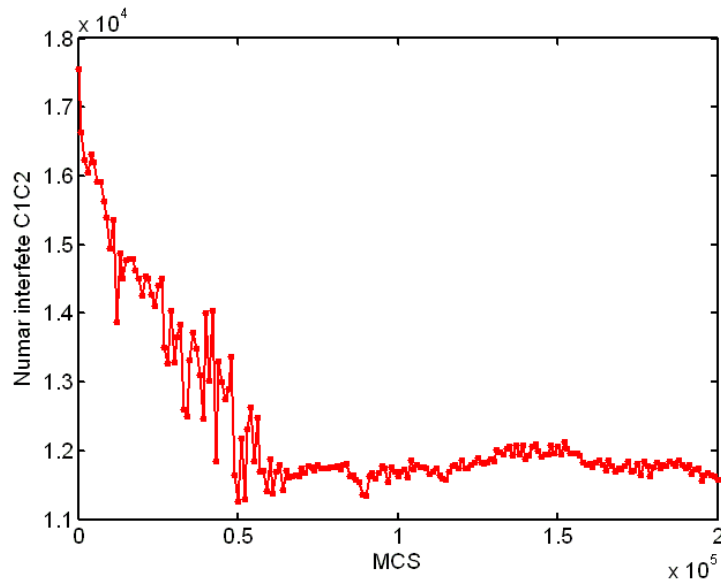


Fig. 5.65. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set II de simulări.

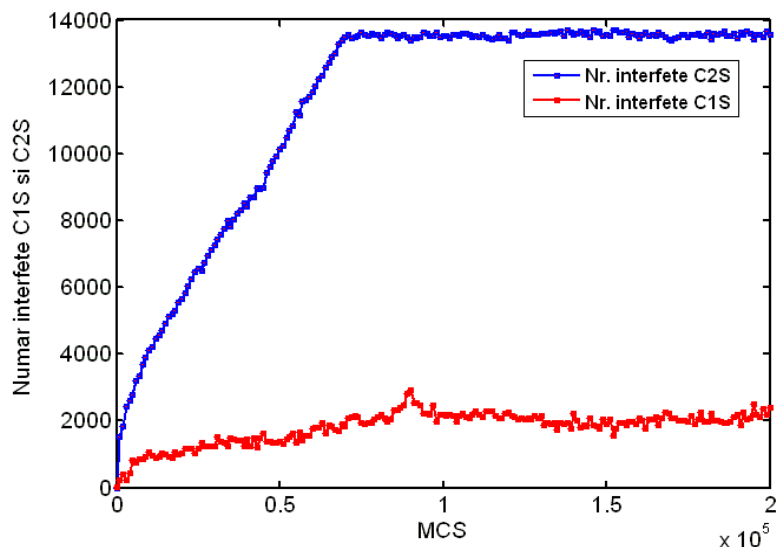


Fig. 5.66. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set II de simulări.

În Fig. 5.66, corespunzătoare setului II de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 2 și substrat crește și se stabilizează în jurul valorii 14 000, după rularea a 60 000 MCS, în timp ce numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat crește doar puțin, stabilizându-se în jurul valorii 2 000. Această reprezentare grafică indică faptul că celulele de tipul 2 se atașează aproape în totalitate pe suprafața biomaterialului, în timp ce celulele de tipul 1 au contact cu substratul în număr foarte mic, majoritatea lor creând un strat deasupra stratului de celule de tipul 2.

În Fig. 5.67, corespunzătoare setului III de simulări din Tabelul 5.9, se poate vizualiza configurația sistemului obținută după rularea a 30 000 MCS. Se poate observa că, dacă interacțiunea dintre celulele de tip 1 și substrat și celulele de tip 2 și substrat este mică (sau chiar nulă), cele două populații de celule se reorganizează astfel: celulele de tip 1, puternic coezive, formează un agregat, care este înconjurat de o coajă formată din celule de tip 2, de coezivitate mai mică.

Ținând cont de parametrii energetici utilizați în simulare, tensiunea interfacială celula de tip 1 - substrat are valoarea 0.7, iar tensiunea interfacială celula de tip 2 - substrat are valoarea 0.4. Tensiunea interfacială celula de tip 2 - mediu fiind mai mică decât tensiunea interfacială celula de tip 1 - mediu, determină ca celulele de tipul 2 să iasă din agregatul celular și să pătrundă în mediul de cultură, ușurând atașarea la biomaterial. Având în vedere și faptul că tensiunea celula de tip 2 - substrat este pozitivă, dar mai mică decât tensiunea interfacială celula de tip 1 - substrat, celulele de tipul 2 formează o coajă care învâluie agregatul celular format din celulele de tipul 1. Această coajă se atașează pe biomaterial, în timp ce agregatul din interiorul ei nu ajunge deloc să aibă contact cu suprafața biomaterialului.

Chiar dacă energiile de interacțiune celula de tip 1 - substrat și celula de tip 2 - substrat sunt egale (0), diferența de coezivități între aceste două tipuri de celule face ca ele să se organizeze, după cum se poate vedea în Fig. 5.67.

Rezultatele sunt similare cu rezultatele obținute în urma experimentului prezentat în [93], unde se urmărește evoluția unui agregat celular format din celule hepatice (puternic coezive) și celule endoteliile (de o coezivitate mai mică) pe suprafața unui biomaterial de adezivitate mică sau chiar nulă.

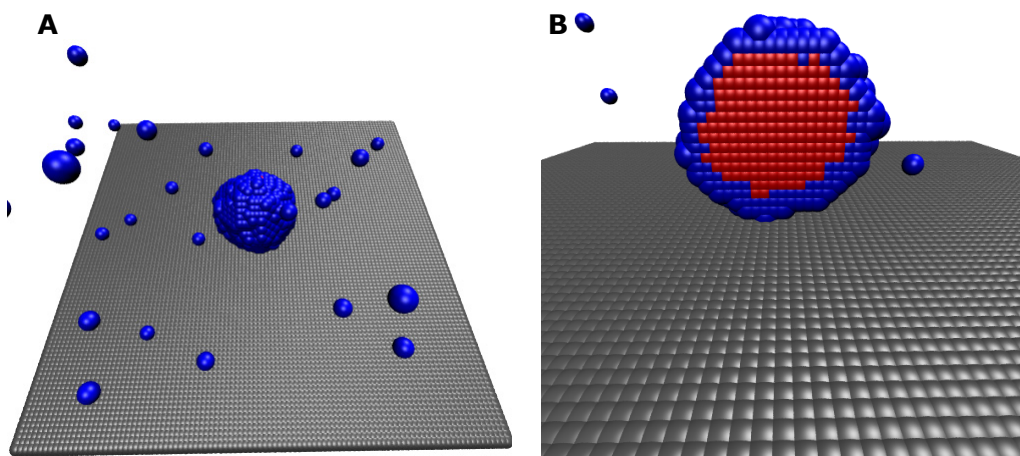


Fig. 5.67. A. Configurația sistemului după rularea a 30 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 3; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.67A.

O astfel de reorganizare celulară a două populații de celule cu niveluri diferite de coezivitate a fost raportată într-un experiment din articolul [109]. În acest experiment, se urmărește evoluția unui agregat celular care conține o mixtură de celule exprimând două niveluri diferite de N-caderine. Celulele care exprimă un nivel de 50% mai mare de N-caderine (având o coezivitate mai mare) segregă în interiorul celulelor care exprimă un nivel mai mic de N-caderine (având coezivitate mai mică). Acest fenomen poate fi observat în Fig. 5.68 preluată din articolul lui Foty et al. [109].

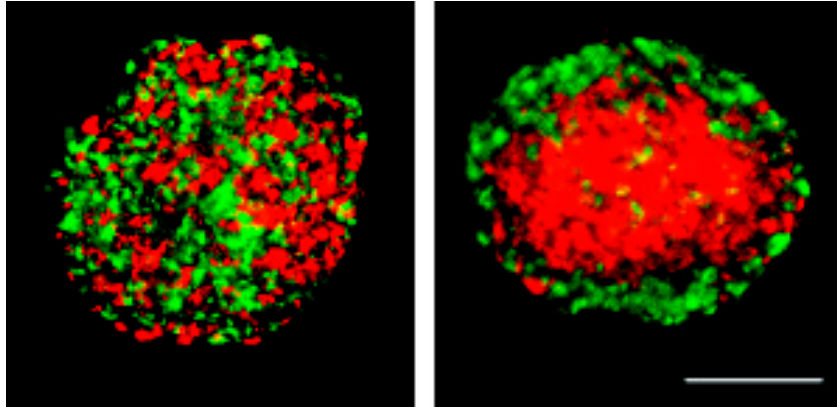


Fig. 5.68. Sortarea celulelor care exprimă același tip de caderine. Un număr egal de celule roșii și verzi au fost intermixate și granulate prin centrifugare, apoi tăiate în fragmente și cultivate în suspensie de-a lungul nopții pentru a permite agregatelor să se reorganizeze. (A) Un agregat care conține un amestec de celule roșii și verzi etichetate ca și celule de tip L, având același nivel de N - caderine se rotunjește, celulele rămânând intermixate; (B) Celulele de tip L (roșii) care exprimă un nivel mai ridicat de N- caderine (cu 50% mai mare) segregă în interiorul celulelor de tipul L (verzi) exprimând același tip de caderine, dar la un nivel mai scăzut. Imagine confocală. Scala de reprezentare: 100 μm . Preluat din [109,111].

De asemenea, în articolul lui Jean Paul Rieu et al. [110] (Fig. 2a-c), se urmărește evoluția unui agregat hydra 2D format din proporții aproximativ egale de celule endodermale și ectodermale. Celulele au fost dissociate, reagregate și aplatizate între două fâșii de sticlă, separate prin delimitatori de 25 μm . Inițial, populația de celule endodermale este formată atât din celule individuale, cât și din clusteri de celule, înconjurați de o masă continuă de celule ectodermale. Agregatul este alungit, urmând ca după o oră, acesta să înceapă să se rotunjească ușor, iar după 6 ore, rotunjirea, precum și sortarea celulelor devine completa. Celulele endodermale, având o coezivitate mai mare se separă în interiorul celulelor ectodermale.

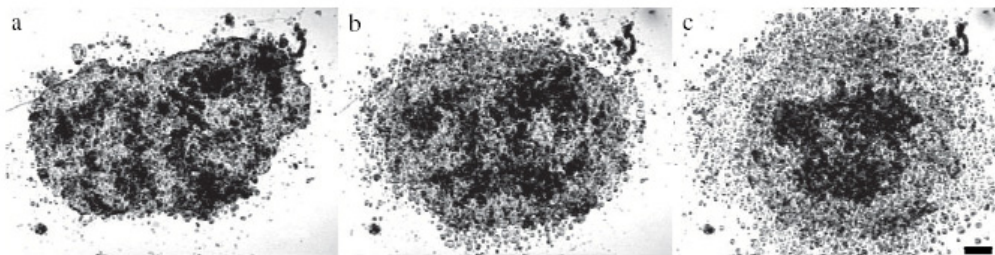


Fig. 5.69. Relaxarea de formă a agregatelor hydra 2D , formate din proporții egale de celule endodermale (cele de culoare închisă, având o coezivitate mai mare) și celule ectodermale (cele de culoare deschisă, având o coezivitate mai mică) după (a) 0h (b) 1h și (c) 6h. Preluat din [110].

În Fig. 5.70, corespunzătoare setului III de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 scade, pe măsură ce celulele se reorganizează pe suprafața biomaterialului. După rularea a numai 1000 de pași

MCS, numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 mai variază puțin în jurul valorii de 8 000, indicând ca o parte din celulele de tip 1 și 2 rămân interconectate.

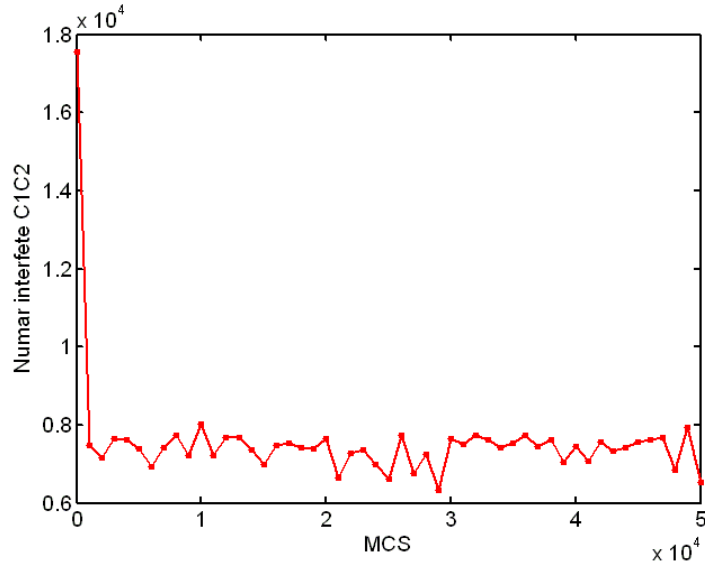


Fig. 5.70. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set III de simulări.

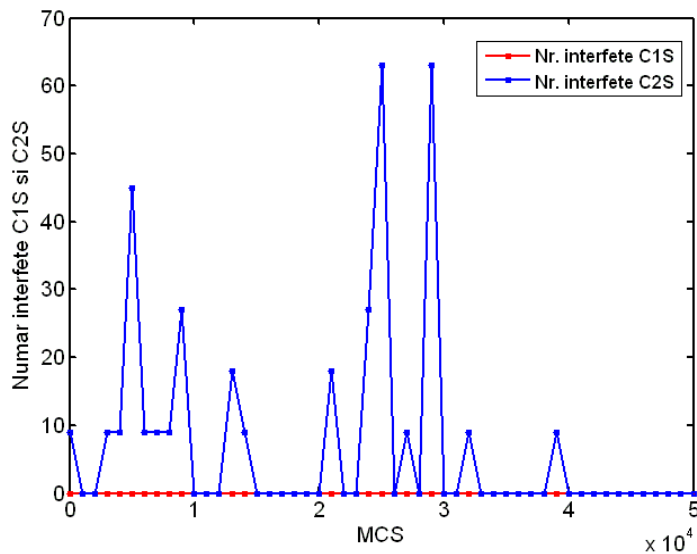


Fig. 5.71. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set III de simulări.

În Fig. 5.71, corespunzătoare setului III de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat este 0, ceea ce înseamnă că celulele de tipul 1 nu ating deloc substratul, ele formând agregatul din interior, acoperit de o coajă de celule de tipul 2. Numărul de legături dintre celulele de tipul

2 și substrat oscilează între limitele 0 și 60, indicând că în anumite momente coaja de celule atinge substratul, iar în alte momente are tendința să se desprindă de pe suprafața biomaterialului, fenomen care se și întâmplă după rularea a 40 000 MCS.

În Fig. 5.72, corespunzătoare setului IV de simulări din Tabelul 5.9, se poate vizualiza configurația sistemului obținută după rularea a 200 000 MCS. Se poate observa că, dacă interacțiunea dintre celulele de tip 1 și substrat și celulele de tip 2 și substrat este mare, cele două populații de celule se reorganizează astfel: atât celulele de tip 1, de o coezivitate mare, cât și celulele de tip 2, de o coezivitate mică se împrăștie pe suprafața biomaterialului.

Ținând cont de parametrii energetici utilizați în simulare, tensiunea interfacială celula de tip 1 - substrat are valoarea -1, iar tensiunea interfacială celula de tip 2 - substrat are tot valoarea -1, acestea fiind responsabile de atașarea rapidă a ambelor tipuri de celule la substrat. În acest set de simulări, am mărit interacțiunea dintre celulele de tip 1 și celulele de tipul 2, astfel încât tensiunea interfacială dintre cele două tipuri de celule să fie negativă (-0.3) (ecuația (5.1)). În aceste condiții, cele două tipuri de celule se atrag, formând pe suprafața biomaterialului o organizare similară unei table de șah.

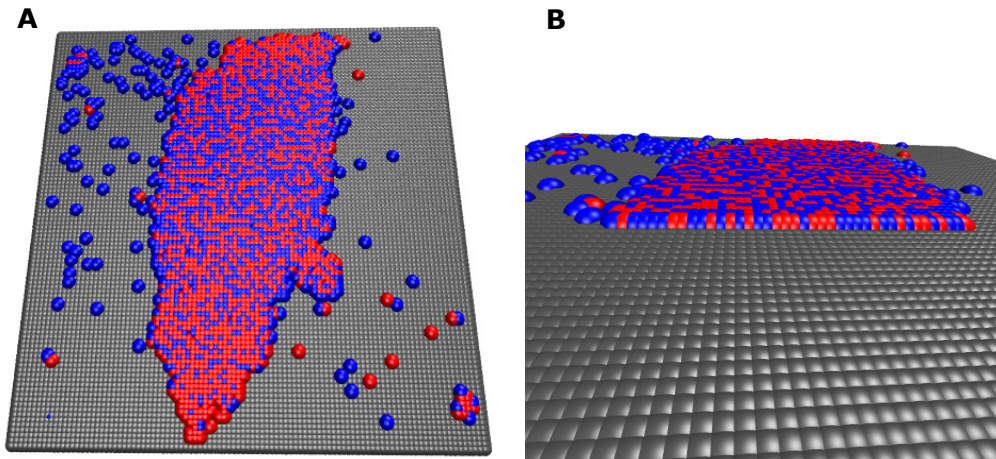


Fig. 5.72. A. Configurația sistemului după rularea a 200 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 4; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.72A.

În Fig. 5.73, corespunzătoare setului IV de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 scade, pe măsură ce celulele ies din agregatul celular și se atașează la biomaterial. După rularea a 180 000 MCS, numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 se stabilizează în jurul valorii 7 000, indicând că o bună parte dintre celulele de tip 1 și 2 formează legături pe suprafața biomaterialului.

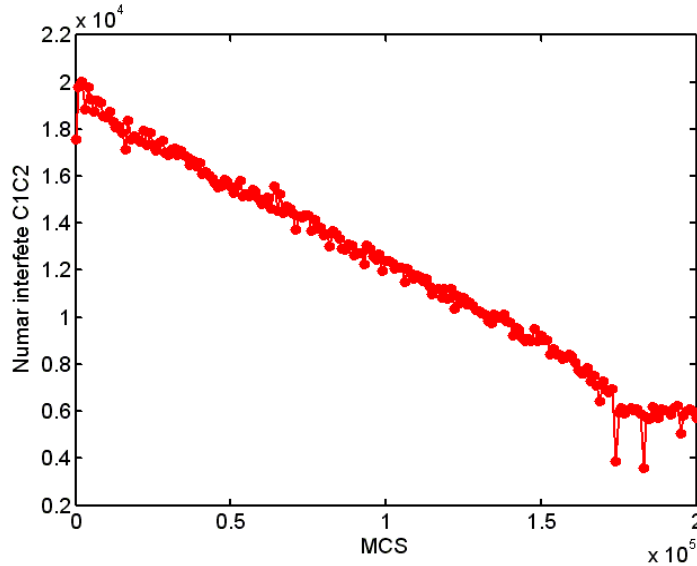


Fig. 5.73. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set IV de simulări.

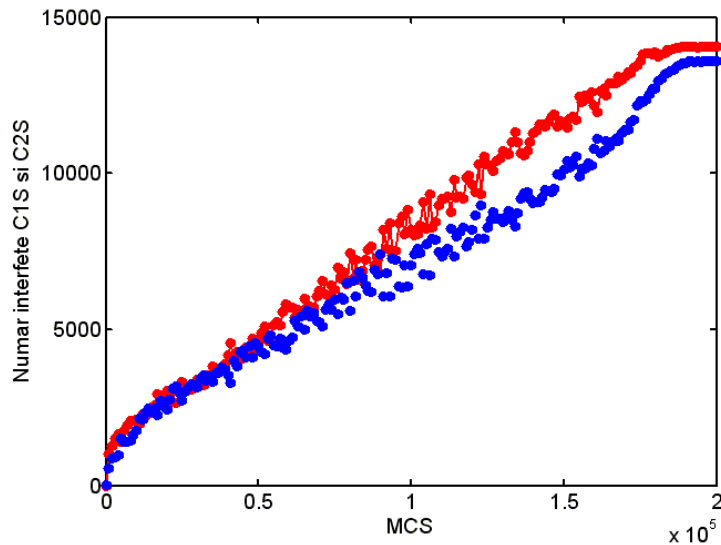


Fig. 5.74. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set IV de simulări.

În Fig. 5.74, corespunzătoare setului IV de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat, respectiv dintre celulele de tip 2 și substrat crește aproximativ cu aceeași viteză, indicând că celulele se atașează de suprafața biomaterialului și se stabilizează aproximativ după rularea a 180 000 MCS. Începând din acest moment, aproximativ toate celulele s-au atașat de suprafața biomaterialului, însă se poate observa că procesul este mai lent decât

în setul I de simulări, când interacțiunea dintre cele două tipuri de celule era mai mică.

În Fig. 5.75, corespunzătoare setului V de simulări din Tabelul 5.9, se poate vizualiza configurația sistemului obținută după rularea a 100 000 MCS. Se poate observa că, dacă interacțiunea dintre celulele de tip 1 și substrat și celulele de tip 2 și substrat este mică, iar interacțiunea dintre celulele de tip 1 și 2 este de asemenea mică, cele două populații de celule se reorganizează astfel: celulele de tip 1, de o coezivitate mare formează ca un fel de plăcintă deasupra unor straturi de celule de tip 2 de o coezivitate mică, care se atașează pe suprafața biomaterialului.

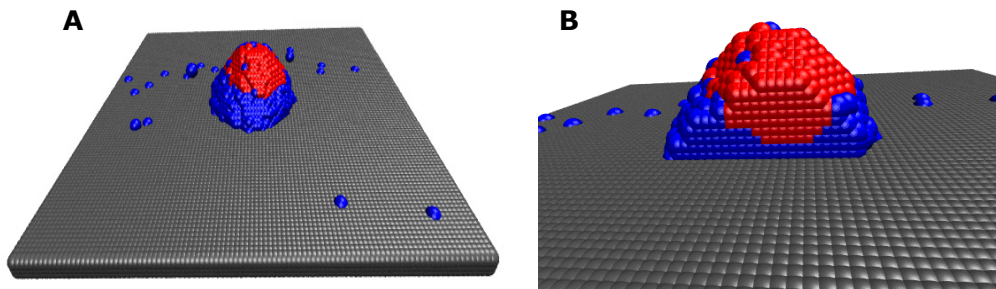


Fig. 5.75. A. Configurația sistemului după rularea a 100 000 MCS în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 5.9, rândul 5; B. Secțiune verticală în sistemul multicelular din Fig. 5.75A.

Interacțiunea dintre cele două tipuri de celule fiind 0.7, determină o tensiune interfacială mare (0.4). Aceasta înseamnă că cele două tipuri de celule se resping, iar adeziunea la substrat fiind foarte mică, se obține configurația de mai sus.

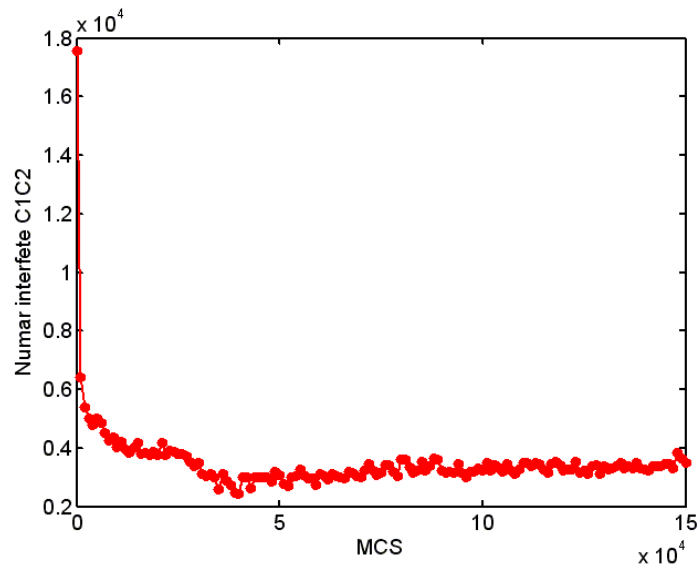


Fig. 5.76. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în funcție de numărul de MCS rulați – set V de simulări.

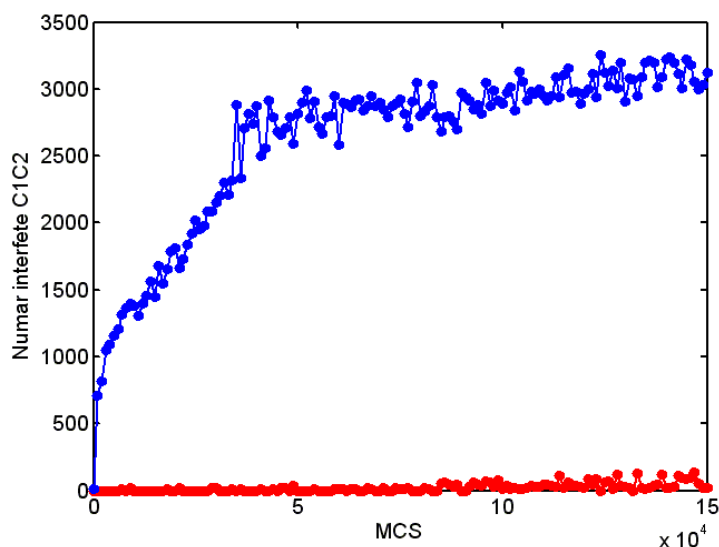


Fig. 5.77. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și substrat și celulele de tip C2 și substrat în funcție de numărul de MCS rulați – set V de simulări.

În Fig. 5.76, corespunzătoare setului V de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și 2 scade brusc, stabilizându-se încă de la rularea a 50 000 MCS, în jurul valorii de 4 000 de legături. Acest grafic indică existența unei interacțiuni medii între cele două populații diferite de celule.

În Fig. 5.77, corespunzătoare setului V de simulări, se poate observa că numărul de legături dintre celulele de tip 1 și substrat rămâne aproximativ 0 pe parcursul rulării celor 150 000 de MCS, indicând că aceste celule nu interacționează cu substratul. Numărul de legături dintre celulele de tip 2 și substrat crește pe parcursul rulării pașilor Monte Carlo, indicând că celulele se atașează de suprafața biomaterialului și se stabilizează aproximativ după rularea a 50 000 MCS. Începând din acest moment, o parte din celulele de tip 2 s-au atașat de suprafața biomaterialului, formând mai multe straturi, deasupra cărora se află o plăcintă de celule de tipul 1.

Având în vedere că reorganizarea celulelor într-un sistem celular are loc pe baza aceluiași principii ca și reorganizarea moleculelor într-un lichid, urmărindu-se minimizarea energiei de adeziune a sistemului (maximizarea energiei de legătură între subunitățile sistemului), relațiile din Fig. 5.78, ilustrate în [109] pot fi aplicate și pentru studiul organizării a două populații diferite de celule, după cum se poate vedea în cele ce urmează.

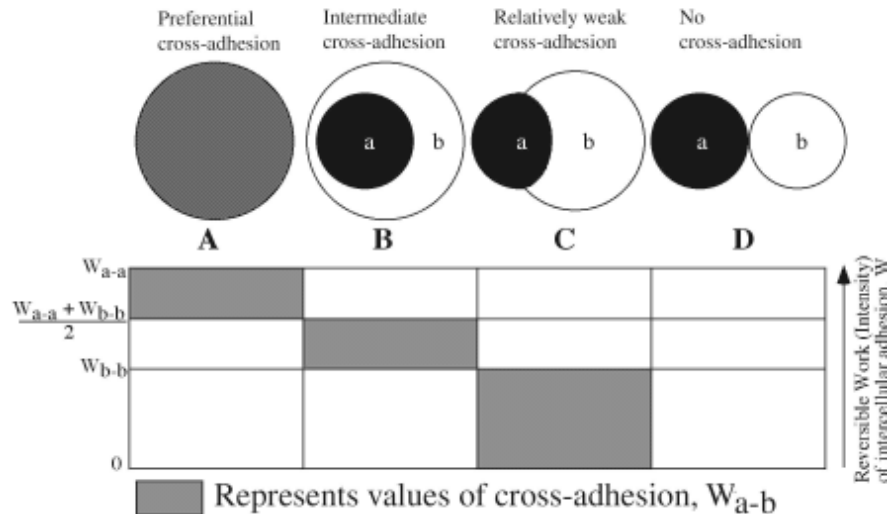


Fig. 5.78. Ilustrarea modului în care intensitatea coeziunii dintre moleculele de același tip ale unui lichid (W_{a-a} and W_{b-b}) și intensitatea adeziunii dintre molecule de diferite tipuri (W_{a-b}) determină configurația cea mai stabilă a unui lichid. Aceste formule ar trebui să se poată aplica oricărui sistem format din mai multe subunități care adoptă forma de echilibru asemănătoare cu cea a lichidelor, indiferent dacă subunitățile sunt molecule sau celule. Figura descrie configurațiile de echilibru determinate de diferite valori ale lui W_{a-b} , pentru două tipuri de molecule dintr-un lichid. Prin convenție, când două molecule diferă în coezivitate, molecula cea mai coezivă este considerate a , și molecula cea mai puțin coezivă este considerate b . În figura, W_{a-a} and W_{b-b} au valori arbitrare ridicate și scăzute, fiind reprezentate prin linii solide orizontale. Figura este împărțită în 4 zone verticale, chenarele gri reprezentând o gama de valori ale lui W_{a-b} de la infinit (coloana A) la 0 (coloana D). O valoare ridicată a lui W_{a-b} (mai mare decât media dintre W_{a-a} și W_{b-b}) determină ca cele două tipuri de molecule să se amestece preferențial (coloana A). Adeziunea 0 între subunitățile a și b (coloana D) determină ca moleculele a și b să se rotunjească în două sfere izolate, separate. O valoare scăzută, dar pozitivă a lui W_{a-b} (cuprinsă între 0 și W_{b-b}) conduce la o acoperire parțială a moleculelor a de moleculele b (coloana C), în timp ce valori ridicate ale lui W_{a-b} (cuprinse între W_{b-b} și media dintre W_{a-a} și W_{b-b}) conduc la o învelire completă a moleculelor a de către moleculele b (coloana B). Preluat din [109]. După [112].

Am considerat adeziunea dintre celule și substrat foarte mare, astfel încât ambele tipuri de celule să se împrăștie pe suprafața biomaterialului. În continuare, am studiat reorganizarea celulelor pe suprafața biomaterialului, în funcție de coeziunea dintre celulele de același tip și coeziunea dintre celulele de tipuri diferite. Se poate observa că relațiile din Fig. 5.78 [109] sunt îndeplinite în totalitate în studiul nostru și conduc la configurații similare cu cele prezentate în respectivul articol.

Fig. 5.79 oferă informații atât calitative, cât și cantitative asupra modului de reorganizare a două populații de celule de coeziuni diferite. Dacă coeziunea dintre celulele de diferite tipuri $\varepsilon_{c_1c_2}$ aparține intervalului $(\frac{(\varepsilon_{c_1c_1} + \varepsilon_{c_2c_2})}{2}, \varepsilon_{c_1c_1}]$, se poate observa că cele două populații de celule se atrag puternic și formează un număr mare de legături pe suprafața biomaterialului.

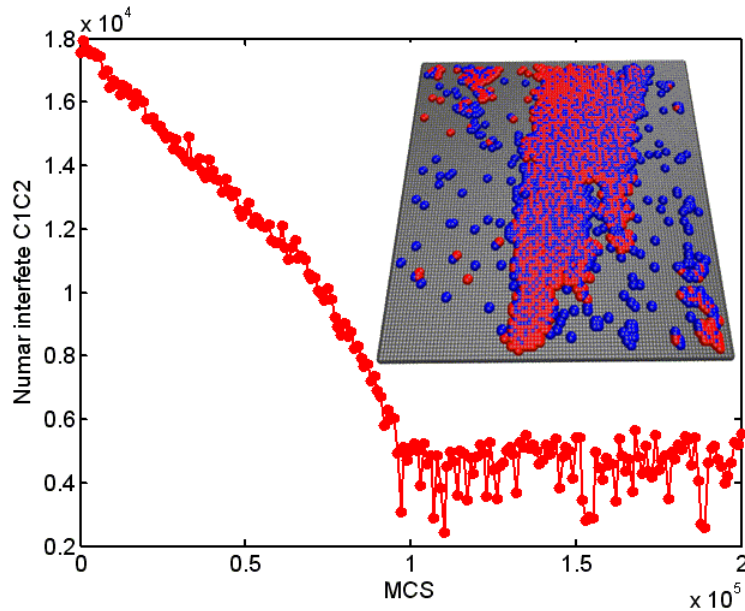


Fig. 5.79. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS - $\varepsilon_{c_1c_1} = 1.2$, $\varepsilon_{c_2c_2} = 0.8$, $\varepsilon_{c_1c_2} = 1.2$, $\varepsilon_{c_1s} = 1.8$, $\varepsilon_{c_2s} = 1.4$.

Graficul din Fig. 5.79 arată că la o coeziune mare între celulele de diferite tipuri, numărul de legături scade pe măsură ce acestea se desprind din agregat și se atașează pe suprafața biomaterialului. După rularea a 100 000 MCS, acest număr se stabilizează în jurul valorii de 6 000 de legături, indicând existența multor interacțiuni între celulele de diferite tipuri pe suprafața biomaterialului.

Dacă $\varepsilon_{c_1c_2}$ aparține intervalului $(\varepsilon_{c_2c_2}, (\varepsilon_{c_1c_1} + \varepsilon_{c_2c_2})/2]$, se observă că interacțiunea dintre cele două populații de celule este de nivel intermediar (Fig. 5.80). În acest caz, coeziunea dintre celulele de diferite tipuri fiind medie, se observă că, încă de la rularea a 50 000 de MCS, numărul de legături dintre celulele de diferite tipuri se stabilizează în jurul unei valori mai mici (la aproximativ 4 000 de legături).

În Fig. 5.81, dacă $\varepsilon_{c_1c_2}$ aparține intervalului $(0, \varepsilon_{c_2c_2}]$, se observă că interacțiunea dintre cele două populații de celule devine slabă, numărul de legături dintre celule scăzând brusc și stabilizându-se în jurul valorii 2 000.

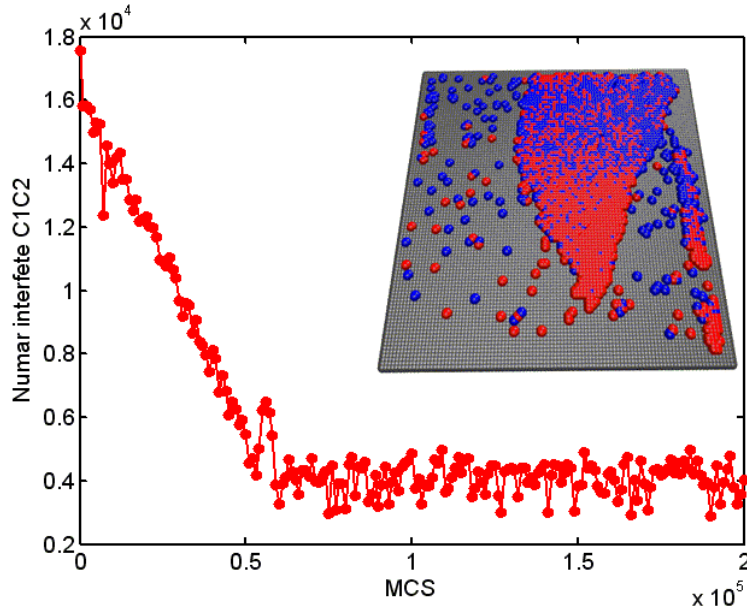


Fig. 5.80. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS – $\varepsilon_{c_1c_1} = 1.2$, $\varepsilon_{c_2c_2} = 0.8$, $\varepsilon_{c_1c_2} = 1$, $\varepsilon_{c_1s} = 1.8$, $\varepsilon_{c_2s} = 1.4$.

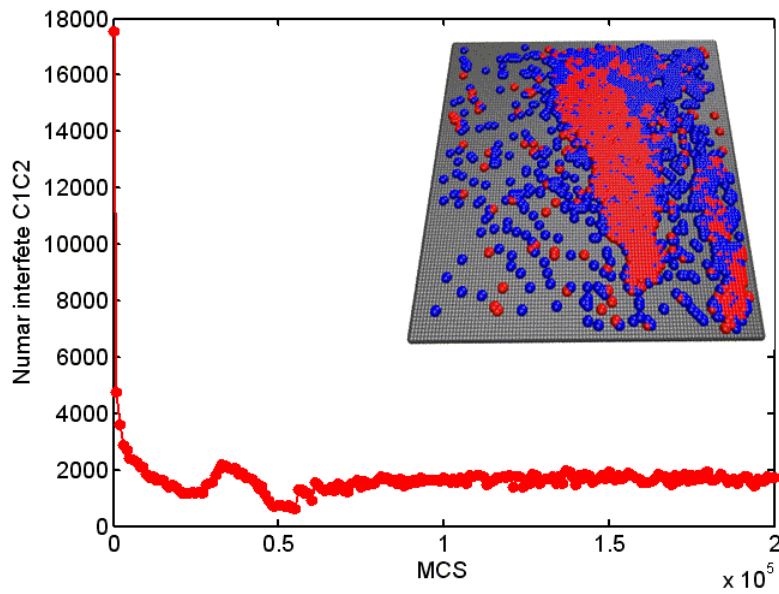


Fig. 5.81. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS – $\varepsilon_{c_1c_1} = 1.2$, $\varepsilon_{c_2c_2} = 0.8$, $\varepsilon_{c_1c_2} = 0.6$, $\varepsilon_{c_1s} = 1.8$, $\varepsilon_{c_2s} = 1.4$.

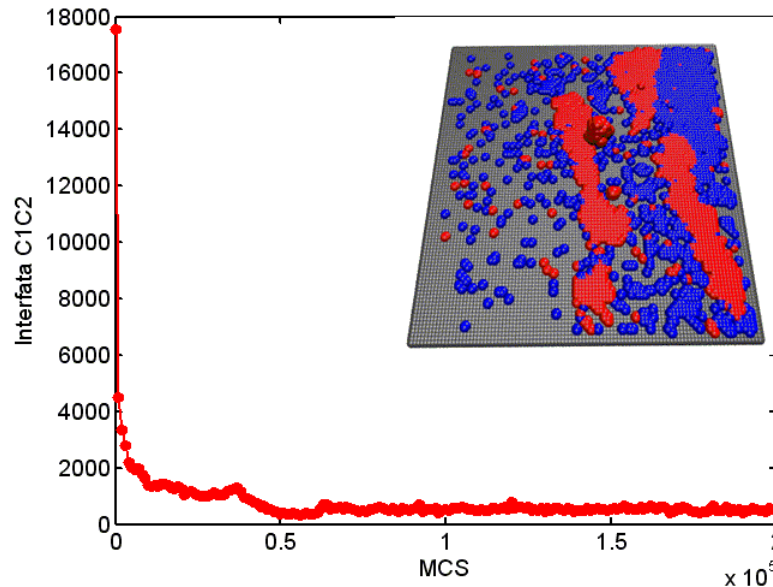


Fig. 5.82. Evoluția numărului de legături dintre celulele de tip C1 și C2 în timpul rulării a 200 000 MCS - $\varepsilon_{c_1c_1}=1.2$, $\varepsilon_{c_2c_2}=0.8$, $\varepsilon_{c_1c_2}=0$, $\varepsilon_{c_1s}=1.8$, $\varepsilon_{c_2s}=1.4$

Dacă $\varepsilon_{c_1c_2}$ este 0 (Fig. 5.82), cele două populații de celule se separă complet, numărul de legături dintre celulele de diferite tipuri scăzând dramatic și apropiindu-se încă de după rularea a 50 000 MCS de valoarea 0.

Simulările evoluției unui agregat celular format din două tipuri celulare pe o placa de biomaterial au constat în rularea a 50 000, 100 000, respectiv 200 000 de MCS, timpii de rulare fiind aproximativ 1 oră, 2 ore, respectiv 3 ore.

5.3. Concluzii

În cadrul acestui capitol, am studiat cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, împrăștierea unui agregat celular format dintr-un singur tip de celule pe suprafața plană a unui substrat sintetic, și organizarea a două populații diferite de celule în cadrul structurilor tisulare, având la bază ipoteza adeziunii diferențiate (DAH) [2].

Procesul de împrăștiere a celulelor pe un substrat sintetic este deosebit de important pentru domeniul ingineriei tisulare, din înțelegerea lui rezultând informații utile pentru crearea de structuri tisulare *in vitro*. De asemenea, organizarea multiplelor populații de celule în structuri tisulare, pornind de la agregate multicelulare, reprezintă una dintre cele mai studiate probleme, la ora actuală, în domeniul ingineriei tisulare și medicinei regenerative. Abilitatea de a înțelege și controla distribuția spațială a mai multor populații de celule de diferite tipuri furnizează abordări raționale aplicațiilor din ingineria tisulară, unde organizarea multicelulară în structuri tridimensionale este dorită.

Studiul acestor procese *in vitro* este pe de o parte costisitor, iar pe de altă parte mare consumator de timp. Pentru a veni în ajutorul studiilor *in vitro* și pentru

a minimiza numărul acestora, în acest capitol am realizat mai multe studii *in silico* și am validat, printr-o serie de simulări efectuate și analize comparate ale rezultatelor simulărilor cu rezultatele obținute prin studii *in vitro*, aplicația informatică originală SIMMMC.

În **subcapitolul 5.1**, s-a modelat un sistem biologic utilizat în experimentele de împrăștiere a celulelor pe biomateriale și s-a simulat fenomenul de împrăștiere celulară, ținând cont de interacțiunile dintre celule, respectiv dintre celule și substrat. Modelarea și simularea s-au făcut cu ajutorul aplicației SIMMMC. Modelarea a avut ca obiect sistemul format dintr-un agregat celular constituit dintr-un singur tip de celule și o placă de biomaterial pe care se situează agregatul. Simulările au constat în rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale energiei de coeziune dintre celule și energiei de adeziune dintre celule și substrat, respectiv ale tensiunii interfaciale celulă - mediu și tensiunii interfaciale celulă - substrat.

Pe baza configurațiilor obținute, s-a făcut o analiză a evoluției coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem, a numărului celulelor atașate pe suprafața biomaterialului și a vitezei de împrăștiere a celulelor pe suprafața biomaterialului.

Analiza împrăștierii celulare s-a făcut atât cantitativ, oferindu-se tabele de valori și grafice de evoluție, cât și calitativ, prin vizualizări sugestive, realizate cu programul de grafică moleculară VMD [1].

Concluziile desprinse din simulări sunt că adeziunea celulă - substrat favorizează împrăștierea celulară și coeziunea celulă - celulă defavorizează împrăștierea celulară, ceea ce înseamnă că pe măsură ce energia de adeziune celulă - substrat este mai mare, atașarea celulelor pe suprafața biomaterialului este mai rapidă. La valori mari ale energiei de coeziune celulă - celulă, împrăștierea este încetinită chiar și în condițiile unei energii de adeziune celulă - substrat mari. Concluzii similare au fost desprinse de către Ryan et al. și Lauffenburger et al. [92,93], în urma experimentelor de laborator, ceea ce validează aplicația SIMMMC.

Contribuțiile originale aduse în subcapitolul 5.1 sunt următoarele:

1. Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o placă de biomaterial și un agregat celular constituit dintr-un singur tip de celule, situat pe suprafața plăcii de biomaterial.
2. Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale evoluției agregatului celular pe placa de biomaterial:
 - (i) considerând coeziunea dintre celule constantă și variind adeziunea dintre celule și substrat, în vederea identificării influenței adeziunii celulă - substrat asupra împrăștierii (s-au considerat 4 valori pentru energia de adeziune celulă - substrat)
 - (ii) măririi coeziunii dintre celule și variind adeziunea dintre celule și substrat, în vederea determinării influenței coeziunii dintre celule asupra împrăștierii (s-au considerat 4 valori pentru energia de coeziune celulă - celulă și 4 valori pentru energia de adeziune celulă - substrat)
 - (iii) considerând coeziunea dintre celule foarte mică și variind adeziunea dintre celule și substrat, în vederea determinării dacă o coeziune mică

- determină ca împrăștierea să fie mai rapidă sau să eşueze (s-au considerat 4 valori pentru energia de adeziune celulă – substrat)
- (iv) considerând adeziunea dintre celule și substrat constantă și variind coeziunea dintre celule, în vederea identificării influenței coeziunii celulă – celulă asupra împrăștierii (s-au considerat 11 valori pentru energia de coeziune celulă – celulă).
3. Delimitarea domeniului parametrilor de model prin simulări repetate, în așa fel încât rezultatele simulărilor să fie în acord cel puțin calitativ cu rezultatele experimentale.
 4. Determinarea numărului de pași Monte Carlo necesari pentru ca sistemul să atingă starea de echilibru, prin rularea unui număr mare de simulări. Acest număr de pași Monte Carlo depinde atât de configurația sistemului, cât și de parametrii energetici ai modelului. Fiecare simulare din acest subcapitol a constat în rularea a 100 000 de pași Monte Carlo.
 5. Efectuarea unei analize calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD [1].
 6. Efectuarea unei analize cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor, a numărului de celule atașate pe biomaterial și a vitezei de împrăștiere a celulelor în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.
 7. Realizarea unui set de simulări ale experimentelor lui Ryan et al. [92], în condiții de intrare similare celor din experimente.
 8. Realizarea unei analize comparative între rezultatele simulărilor și rezultatele experimentale [92], concluzionând că se află în acord calitativ.
 9. Realizarea reprezentării grafice a evoluției vitezei de împrăștiere a patru tipuri de agregate celulare de diferite coezivități, pe 10 substraturi sintetice de diferite adezivități în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă – substrat și energia de coeziune celulă – celulă, în vederea validării rezultatelor obținute și, implicit, a părții din aplicația SIMMMC implicate.

Observatie:

Pentru reprezentarea cât mai exactă a graficului vitezelor, dat fiind că metoda Metropolis Monte Carlo are la bază generarea de numere aleatoare, s-au realizat câte 10 repetări pentru fiecare simulare considerată (în total 400 de simulări, constând în rularea a 100 000 de pași Monte Carlo fiecare). S-a reprezentat evoluția numărului de celule atașate pe substrat în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați în aceste repetări ale fiecărei simulări considerate și s-a calculat valoarea medie a numărului de celule atașate și deviația standard față de această valoare. Pentru calculul vitezei de împrăștiere a celor 4 agregate pe substraturi de diferite adezivități, s-a luat în calcul valoarea medie a numărului de celule atașate, pentru fiecare din cele 40 de simulări. Analiza statistică a rezultatelor oferă o măsură a influenței generatorului de numere pseudo-aleatoare asupra concluziilor desprinse din simulări.

10. Realizarea unei analize comparative între graficul vitezelor realizat în MATLAB pe baza rezultatelor simulărilor și graficul vitezelor determinate experimental de Lauffenburger et al. [93], obținându-se un acord fidel, validând astfel aplicația originală SIMMMC.
11. Realizarea reprezentării grafice a evoluției vitezei de împrăștiere a patru tipuri de agregate celulare de diferite coezivități, pe 10 substraturi sintetice de diferite adezivități în funcție de valoarea tensiunii interfaciale celulă –

substrat. Analiza comparativă a graficelor vitezei de împrăștiere în funcție de raportul dintre energii, respectiv în funcție de tensiunea interfacială celulă – substrat, arată că rezultatele obținute sunt similare, neputându-se diferenția care parametru este mai relevant pentru caracterizarea vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu *in silico* cu ajutorul aplicației SIMMMC propuse, sunt în acord calitativ cu rezultatele experimentale din [92], aplicația bazată pe metoda Metropolis Monte Carlo surprinzând corect principalele caracteristici ale DAH [2].

S-a analizat evoluția unui agregat celular pe suprafața unei plăci de biomaterial, atât în termeni de energii de adeziune și de coeziune cât și în termeni de tensiune interfacială celulă – mediu, respectiv tensiune interfacială celulă – substrat (egală cu diferența dintre jumătate din energia de coeziune și energia de adeziune). Tensiunea interfacială celulă - substrat reprezintă un element de noutate introdus de autoare în cadrul studiilor împrăștierii celulare, punând într-o lumină nouă competiția dintre adeziune și coeziune în timpul împrăștierii celulare.

În subcapitolul 5.2 s-a modelat un sistem biologic constând într-un agregat celular format din două populații diferite de celule, situat pe o placă de biomaterial. Pornind de la acest model, s-a simulat rearanjarea a doua populații de celule de coezivități diferite pe suprafața unor biomateriale de adezivități diferite. S-au luat în calcul biomateriale de adezivitate mică, medie, respectiv mare.

Modelarea și simularea s-au făcut cu ajutorul aplicației originale SIMMMC. Sistemul biologic studiat este utilizat în testele experimentale pentru studiul organizării a două populații de celule de coezivități diferite. Simulările au constatat în rulare a unui anumit număr de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale energiei de coeziune dintre celulele de același tip, ale energiei de coeziune dintre celulele de diferite tipuri și ale energiei de adeziune dintre celule și substrat.

Pe baza configurațiilor obținute la fiecare rulare a unui număr prefixat de pași Monte Carlo, s-a făcut o analiză a evoluției numărului de legături dintre celulele de diferite tipuri, respectiv dintre celulele de diferite tipuri și substrat. Acești indicatori furnizează informații legate de reorganizarea celor două populații de celule.

Analiza reorganizării a două populații de celule de diferite coezivități pe substraturi sintetice de diferite adezivități, s-a făcut atât cantitativ, oferindu-se grafice de evoluție, cât și calitativ, prin vizualizări sugestive, realizate cu programul de grafică moleculară VMD [1].

Bazându-ne pe rezultatele experimentale, obiectivul principal al acestui studiu constă în validarea aplicației SIMMMC, prin obținerea de rezultate similare cu cele obținute în practică, precum și furnizarea de informații și principii importante pentru ingineria tisulară, în vederea înțelegerii și reproducerii în laborator a organizării în structuri tisulare a mai multor populații de celule, formate din diferite tipuri de celule.

Am constatat, în acord cu rezultatele experimentale [93], că în funcție de nivelul de adeziune al celulelor la substrat, se obțin organizări diferite ale celor două populații de celule. O adeziune mare a celulelor la substrat determină atașarea ambelor populații de celule la substrat, indiferent de faptul că sunt de coezivități diferite. O adeziune medie între celule și substrat determină atașarea unui strat de celule slab coezive pe suprafața biomaterialului, iar deasupra acestuia, formarea unui strat de celule puternic coezive. La o adeziune mică între celule și substrat,

celulele slab coezive formează o coajă care se atașează pe suprafața biomaterialului și învăluie celulele puternic coezive, care s-au organizat într-un agregat celular.

Contribuțiile originale aduse în subcapitolul 5.2 sunt următoarele:

1. Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o placă de biomaterial și un agregat celular constituit din două populații de celule diferite, situat pe suprafața plăcii de biomaterial.
2. Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale reorganizării a două populații de celule de coezivități diferite, pe suprafața unui substrat sintetic de diferite adevizivități:
 - (i) considerând celulele de tip 1 de coezivitate mare, celulele de tip 2 de coezivitate mai mică și adevizivitatea substratului mică. Simularea a constat în rularea a 50 000 MCS
 - (ii) considerând celulele de tip 1 de coezivitate mare, celulele de tip 2 de coezivitate mai mică și adevizivitatea substratului medie. Simularea a constat în rularea a 200 000 MCS
 - (iii) considerând celulele de tip 1 de coezivitate mare, celulele de tip 2 de coezivitate mai mică și adevizivitatea substratului mare. Simularea a constat în rularea a 200 000 MCS.
3. Efectuarea unei analize calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.
4. Realizarea unei analize comparative între rezultatele obținute și rezultatele prezentate în experimentele reorganizării a două populații de celule (hepatice și endoteliale) din Lauffenburger et al. [93], care a condus la concluzia că reorganizarea celor două populații de celule în simulările noastre este în acord cu reorganizarea celor două populații de celule considerate în experimentele de laborator [93], în condiții de intrare similare. Această concluzie validează partea din aplicația informatică originală SIMMMC privitoare la modelarea și simularea reorganizării a două populații diferite de celule pe substraturi de diferite adevizivități.
5. Efectuarea unei analize cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a numărului de legături dintre celulele de diferite tipuri, respectiv dintre celulele de diferite tipuri și substrat, în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.
6. Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale reorganizării a două populații de celule de coezivități diferite, pe suprafața unui substrat sintetic de diferite adevizivități, cu constrângerea parametrilor de intrare să respecte relațiile lui Foty et al. [109] referitoare la reorganizarea moleculelor într-un lichid.
7. Realizarea unor analize calitative și cantitative, comparate, ale rezultatelor, cu evidențierea concluziei că reorganizarea celulelor într-un sistem multicelular are loc pe baza aceluiași principii ca și reorganizarea moleculelor într-un lichid, urmărindu-se minimizarea energiei de adeziune a sistemului. Această analiză reprezintă o nouă validare a aplicației SIMMMC.

Modelarea unui astfel de sistem biologic și simularea organizării a diferite populații de celule in vitro este de real interes, furnizând informații cercetătorilor de laborator cu privire la caracteristicile care guvernează dinamica celulară în cadrul structurilor tisulare.

6. STUDIUL COMPUTAȚIONAL AL ÎNSĂMÂNȚĂRII CELULARE A BIOMATRICILOR DE STRUCTURĂ POROASĂ

6.1. Introducere

Ingineria tisulară reprezintă o zonă revoluționară a medicinei regenerative, care stă la baza dezvoltării unor noi terapii pentru pacienții care au țesuturi bolnave sau distruse în totalitate. În vederea formării de structuri tisulare funcționale, implantabile organismului uman, principalul domeniu de activitate al ingineriei tisulare este studiul *in vitro* al comportamentului celular și al funcțiilor țesuturilor [40].

O abordare utilizată pentru dezvoltarea de structuri tisulare în laborator o reprezintă cultivarea bioreactoare a unor celule izolate, încălzite în mediul de cultură, pe o biomatrice cu o structură poroasă, formată dintr-un material biocompatibil și biodegradabil. Biomatricea (scaffold-ul) reprezintă o structură tridimensională care are rol de suport pentru însămânțarea celulelor și pentru dezvoltarea lor ulterioară, în timp ce bioreactorul controlează factorii hidrodinamici și biochimici din mediul de cultură, pentru ca celulele să poată să se dezvolte și să producă matrice extracelulară [40].

Optimizarea procesului de însămânțare celulară este extrem de importantă pentru dezvoltarea de structuri tisulare funcționale *in vitro* [40].

Experimentele de laborator descrise în literatura de specialitate [40] au arătat că dezvoltarea structurilor tisulare este mai rapidă, iar acestea dezvoltă proprietăți mecanice cât mai apropiate de cele ale țesutului uman, în cazul în care însămânțarea celulară este uniformă. Proprietățile mecanice ale structurilor tisulare se datorează în mare măsură sintezei de matrice extracelulară, formată din proteine cu structuri filamentoase produse de către celule. Această producție depinde de calitatea procesului de însămânțare. Cu cât e mai uniform procesul de însămânțare, mediul de cultură pătrunde în mod egal la toate celulele din biomatrice, asigurând transfer de gaze și nutrienți către acestea. Astfel, ulterior, se asigură un proces de dezvoltare și de proliferare adecvat al celulelor în biomatrice.

La ora actuală, rezistența mecanică a structurilor tisulare crescute în laborator rămâne cu aproximativ un ordin de mărime sub valorile aferente țesuturilor native [7,113].

Modelele teoretice existente s-au dovedit folositoare pentru îmbunătățirea proprietăților mecanice ale biomaterialelor și au condus la obținerea de rezultate bune în accelerarea procesului de formare de noi țesuturi [98]. De asemenea, modelarea și simularea computațională a procesului de însămânțare celulară determină reducerea numărului de experimente de laborator empirice, scumpe și mari consumatoare de timp.

Obiectivul studiului prezentat în acest capitol constă în analiza evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrice de structură poroasă, cu pori sferici, respectiv cu pori cubici [99,101,103]. Am ales să studiem efectele ambelor geometrii asupra însămânțării, deoarece diferite proceduri de fabricație a biomatricilor conduc la astfel de arhitecturi. De exemplu, porii sferici se obțin prin metodele de tip salt leaching și gas foaming, iar porii cubici se obțin prin metode de tip rapid prototyping (tiparire a unor structuri tridimensionale) [46].

În studiile de însămânțare realizate, s-a urmărit determinarea condițiilor energetice și geometrice optime care conduc la o distribuție uniformă și rapidă a celulelor în biomatrice. Mișcarea celulelor atât în suspensie, cât și în biomatrice a fost simulată utilizând programul informatic original SIMMMC, considerând că sistemul celular tinde să atingă starea de energie minimă (DAH)[2].

6.2. Studiul însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori sferici interconectați

6.2.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat

Sistemul biologic studiat constă într-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă, cu pori sferici, scăldată în mediu de cultură. Concentrația celulelor din suspensia celulară în starea inițială a sistemului este de 1%. Modelul asociat acestui sistem este format dintr-o rețea paralelipipedică, formată din 50 x 50 x 150 noduri de rețea, axa OZ reprezentând axa longitudinală a sistemului. Unitatea de lungime este distanța dintre două noduri de rețea, egală cu un diametru celular. În regiunea $z < z_0$ ($z_0 = 80$) a spațiului de modelare, nodurile rețelei sunt ocupate fie de indecși asociați particulelor imobile (constituente ale biomatricei), fie de indecși asociați particulelor de mediu, această zonă reprezentând biomatricea cu pori sferici plini de mediu de cultură. În regiunea $z \geq z_0$ a spațiului de modelare, fiecare nod al rețelei este ocupat fie de un index asociat unei celule, fie de un index asociat unei particule de mediu, această zonă reprezentând suspensia celulară. Pori biomatricei sunt reprezentați de sfere de rază R . Ei sunt interconectați prin orificii circulare de rază r [99]. Modelarea geometriei biomatricei, precum și a suspensiei de celule este prezentată în detaliu în capitolul 3.

Vizualizarea modelului computațional dezvoltat se face cu ajutorul programului de grafică moleculară (VMD) [1], după cum se poate vedea în Fig. 6.1.

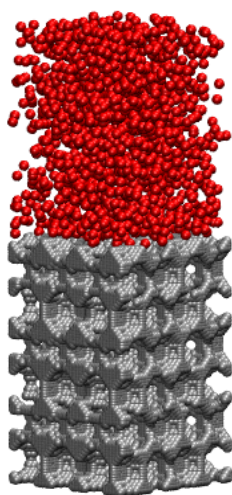


Fig. 6.1. Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice cu pori sferici ($R=8$; $r=2$).

6.2.2. Simularea însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori sferici interconectați

Acest studiu este bazat pe o serie de simulări Metropolis Monte Carlo ale procesului de însămânțare celulară a biomatricilor de structură poroasă cu pori sferici, pentru diferite valori ale următorilor parametri de model [99]:

- energia de coeziune dintre celule, \mathcal{E}_{cc}
- energia de adeziune dintre celule și biomatrice, \mathcal{E}_{cs}
- raza porilor, R
- raza orificiilor circulare care conectează porii, r

Valorile parametrilor de intrare au fost selectate pe baze empirice, după nenumărate teste care au arătat care sunt valorile energetice optime și care este relevanța porozității biomatricii pentru o însămânțare celulară uniformă.

Pe baza configurațiilor obținute în urma rulării unui număr de pași Monte Carlo, la diferite valori ale parametrilor de model, se face o analiză a următorilor parametri, considerați de ieșire [99]:

- coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem (Z_{CM})
- coordonata z a centrului de masă al celulelor care au reușit să pătrundă în biomatrice ($Z_{CMBiomatrice}$)
- concentrația de celule rămase în suspensie

Centrul de masă al tuturor celulelor din sistem, respectiv al celulelor pătrunse în biomatrice este un indicator important care ne furnizează informații cu privire la uniformitatea distribuției celulelor în sistem, respectiv în volumul biomatricii. Dependența centrului de masă de numărul de pași Monte Carlo rulați reprezintă totodată o măsură a vitezei de însămânțare celulară. Dat fiind faptul că experimentele însămânțării celulare a biomatricilor monitorizează concentrația suspensiei de celule ce se află în vecinătatea biomatricii [40], am analizat evoluția acestui parametru, ca funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați. Simularea însămânțării celulare este deosebit de utilă pentru a testa diferite condiții experimentale, care în practică ar costa mult și ar fi foarte greu de realizat.

În scopul de a analiza influența geometriei biomatricii, a energiei de coeziune dintre celule, respectiv a energiei de adeziune dintre celule și biomatrice asupra procesului de însămânțare, s-au realizat mai multe seturi de simulări. Modelul computațional asociat biomatricii de structură poroasă permite controlarea arhitecturii acesteia prin modificarea razei porilor și a orificiilor circulare care conectează porii.

Tabelul 6.1 prezintă valorile parametrilor de intrare utilizate în simulările însămânțării celulare a unei biomatrici cu pori sferici, numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați, precum și valorile parametrilor de ieșire.

6.2 - Studiul însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori sferici...197

Tabel 6.1. Valorile parametrilor de intrare și de ieșire în simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice cu pori sferici.

ε_{cc}	ε_{cs}	R	r	MCS	$Z_{CMBiomatrice}$	Z_{CM}	Concentrația de celule din suspensie	Set simulări
0	0.6	8	2	150 000	110	92	0.2	I
0;0.4;0.8	0.6	8	2	150 000	110;110;110	92;92;70	0.2;0.2; 0.4	II
0	0.6	8	2;3;4;5	150 000	110;110; 110;110	92;92;88;70	0.2;0.23; 0.3;0.53	III
1	0.25	8	2	150 000	110	35	0.95	IV

În primul set de simulări, am considerat o biomatrice poroasă, având porii de rază R egală cu 8 diametre celulare, iar orificiile circulare prin intermediul cărora celulele pătrund în porii biomatricii de rază r egală cu 2 diametre celulare. În Fig. 6.2A, se poate vizualiza configurația inițială a sistemului. Fig. 6.2B prezintă configurația obținută după rularea a 150 000 MCS, cu parametrii energetici prezentați în Tabelul 6.1, rândul 1. Se poate observa că aproape toate celulele se distribuie uniform în adâncimea biomatricii, lucru evidențiat și mai clar în Fig. 6.2C.

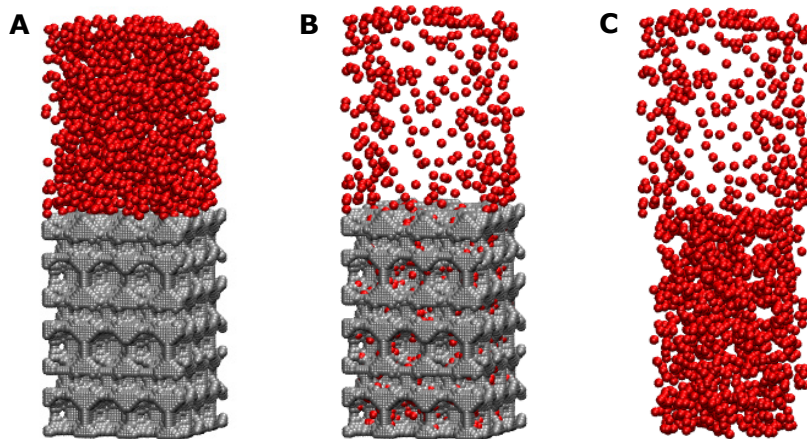


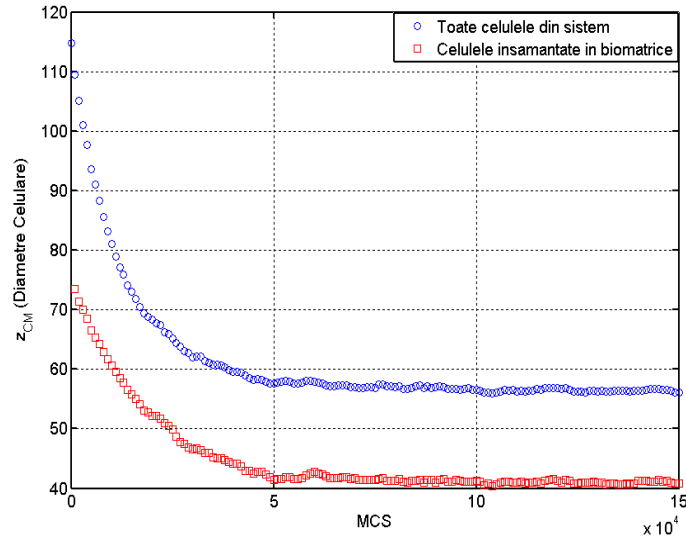
Fig. 6.2. A. Configurația inițială a sistemului; B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 1); C. Configurația din Fig. 6.2B, cu biomatricea ștersă pentru a se evidenția mai bine însămânțarea celulelor.

O analiză cantitativă a însămânțării celulare se poate face urmărind evoluția centrului de masă al celulelor din întreg sistemul, precum și evoluția centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice (Fig. 6.3).

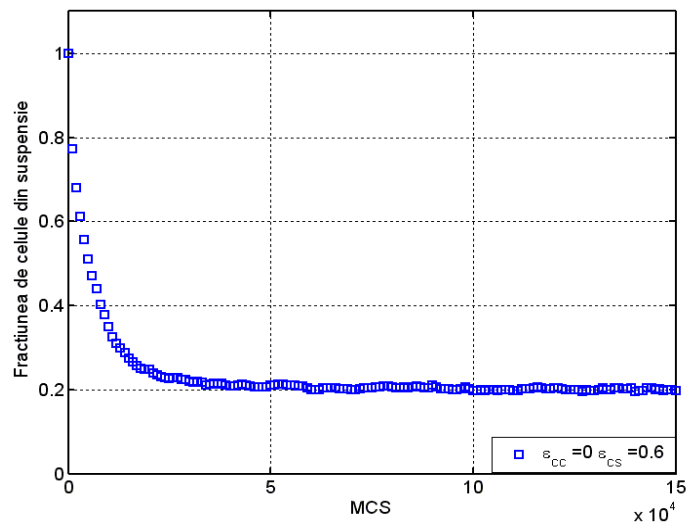
După cum se poate vedea, în aproximativ 7×10^4 MCS, se ajunge la un sistem stabil, în care coordonata z a centrului de masă al celulelor însămânțate are o valoare foarte apropiată de valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricii, $Z_{CMBiomatrice} = 40$ (graficul de culoare roșie). Acest fapt arată că distribuția celulelor în biomatrice este uniformă.

În stare inițială, coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem are valoarea 115 ($Z_{CM} \cong 115$). Pe măsura rulării pașilor Monte Carlo, valoarea acesteia scade, indicând pătrunderea graduală a celulelor în biomatrice (graficul albastru).

Coordonata z a centrului de masă al tuturor celulelor din sistem se stabilizează în jurul valorii 57 ($Z_{CM} \cong 57$), o parte din celule rămânând în suspensie.



În Fig. 6.4, se poate observa că încă de la rularea a 2×10^4 MCS, aproximativ 75% din celule au penetrat biomatricea și în curând un platou este atins, 20% dintre celule rămânând în suspensie. Coordonata z a centrului de masă al celulelor se stabilizează mai târziu, deoarece celulele se rearanjează în cadrul biomatricei.



6.2 - Studiul însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori sferici...199

În experimente, suspensia celulară este omogenizată permanent (antrenată cu ajutorul unui agitator magnetic), ceea ce conduce la pătrunderea majorității celulelor în biomatrice. În simulările din acest studiu, mobilitatea celulelor este descrisă de același algoritm, atât în suspensie, cât și în biomatrice, prin urmare o parte din celule vor rămâne în suspensie (după cum se poate vedea și în Fig. 6.4). Dezvoltări ulterioare ale modelului ar trebui să includă posibilitatea de a asigura o mai mare mobilitate a celulelor (și a agregatelor celulare) în suspensie.

În al doilea set de simulări, cu parametrii prezentați în Tabelul 6.1, rândul 2, am variat coeziunea dintre celule. La o energie de interacțiune celulă - celulă egală cu 0.8 (ce determină o tensiune interfacială încă negativă egală cu -0.2), se formează agregate celulare, iar penetrarea celulelor în biomatrice devine mai încetă (Fig. 6.5).

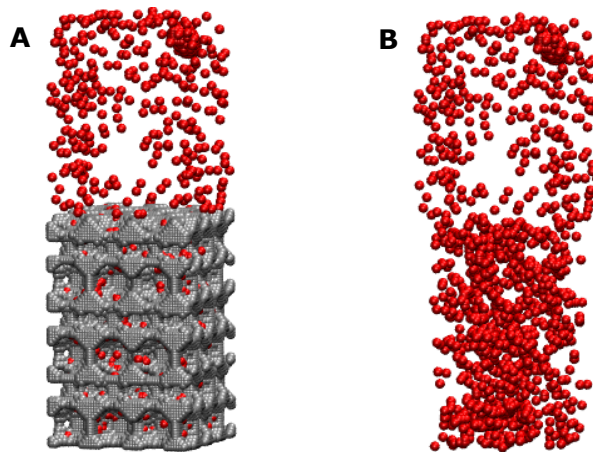


Fig. 6.5. A. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 2 - $\mathcal{E}_{cc} = 0.8$; $\mathcal{E}_{cs} = 0.6$) B. Configurația din Fig. 6.5A, cu biomatricea ștersă pentru a se evidenția mai bine însămânțarea celulelor.

În acest caz, coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice scade mai lent spre valoarea 40, care reprezintă valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricei, indicând că distribuția celulelor este și în acest caz uniformă, însă mai lentă.

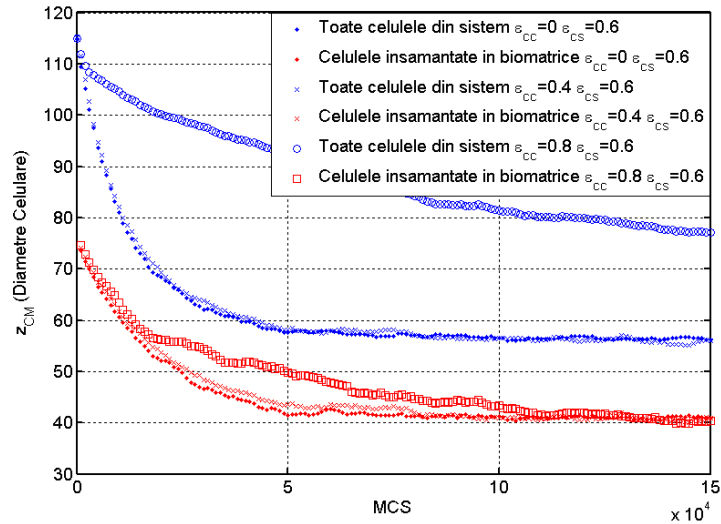


Fig. 6.6. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 2.

De asemenea, în cazul în care $\varepsilon_{cc} = 0.8$ și $\varepsilon_{cs} = 0.6$, coordonata z a centrului de masă al celulelor din întregul sistem atinge, după rularea a 150 000 MCS, doar valoarea 78, ceea ce înseamnă că o cantitate mare de celule nu reușesc să pătrundă în biomatrice (Fig. 6.6). Acest lucru este evidențiat și mai bine în Fig. 6.7, unde se observă că după rularea a 150 000 MCS, 40% din concentrația de celule se află încă în suspensia celulară.

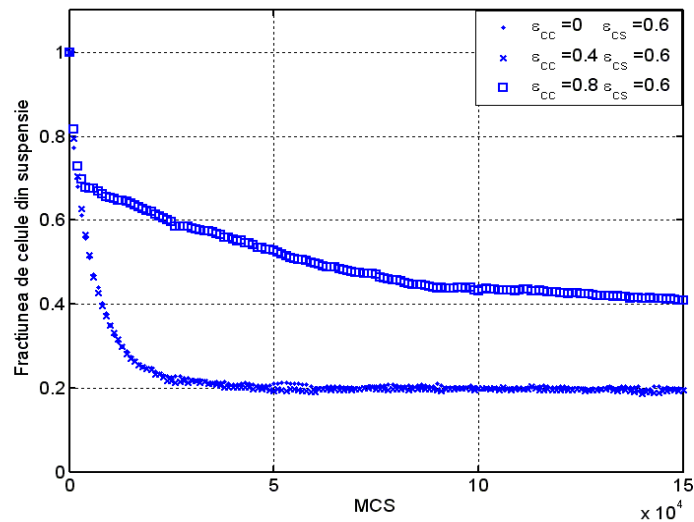


Fig. 6.7. Evoluția fracțiunii de celule din suspensie, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 2.

6.2 - Studiul însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori sferici...201

În setul al treilea de simulări, am variat raza orificiilor care conectează porii, urmărind să determinăm influența geometriei biomatricii asupra însămânțării.

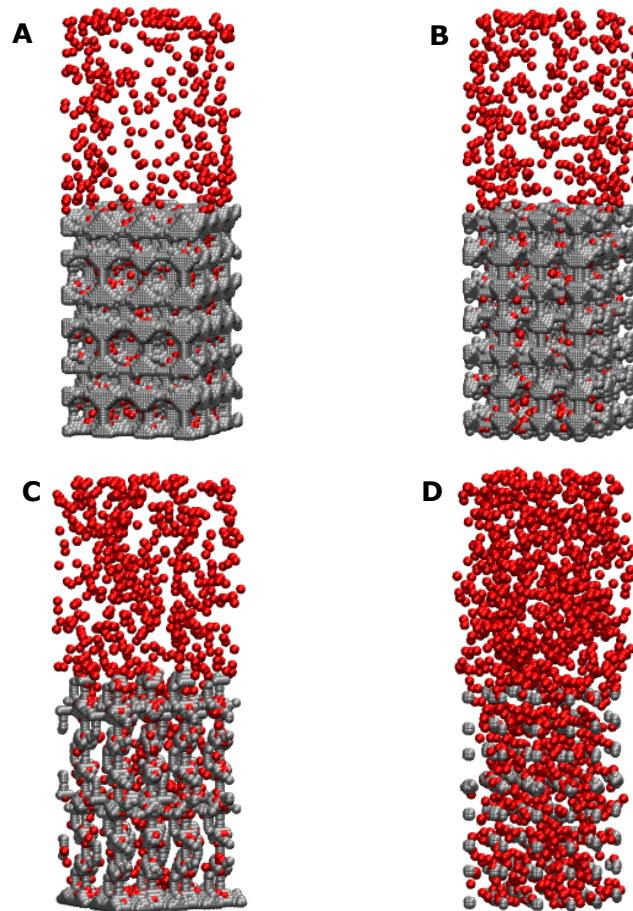


Fig. 6.8. Configurațiile obținute după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 3) A. $R=8, r=2$; B. $R=8, r=3$; C. $R=8, r=4$; D. $R=8, r=5$.

Surprinzător, o creștere a razei orificiilor de la 2 la 3 diametre celulare nu influențează viteza de însămânțare a celulelor (Fig. 6.9) și nici procentajul de celule care pătrund în biomatrice (Fig. 6.10).

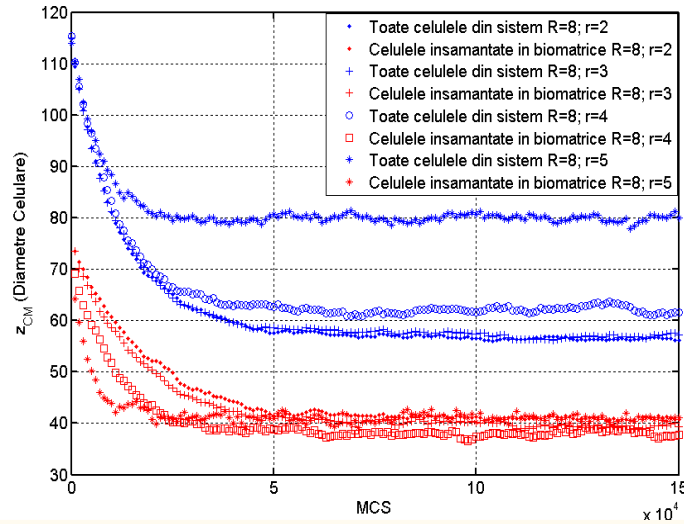


Fig. 6.9. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 3.

Pe măsură ce raza orificiilor are valori mai mari, coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem se stabilizează la o valoare din ce în ce mai mare ($Z_{CM} = 80$, în cazul în care $r=5$ – graficul albastru), indicând că o mare parte din celule nu reușesc să pătrundă în biomatrice. Pe de altă parte, indiferent de concentrația de celule care pătrund în biomatrice, analizând evoluția coordonatei z a acestora, se observă că distribuția lor în biomatrice este uniformă.

În Fig. 6.10, se observă că pe măsură ce raza orificiilor crește (raza egală cu 4, respectiv 5 diametre celulare), procentajul de celule însămânțate în biomatrice descrește. După cum se poate vedea, după rularea a 150 000 MCS, dacă raza orificiilor care conectează porii este egală cu 5 diametre celulare, mai mult de 50% dintre celule rămân în suspensie. Acest fenomen are loc datorită faptului că biomatricea, nemaiavând o structură compactă și existând prea puțin material solid, nu mai oferă celulelor un suport de care să se atașeze, acestea rămânând în suspensie.

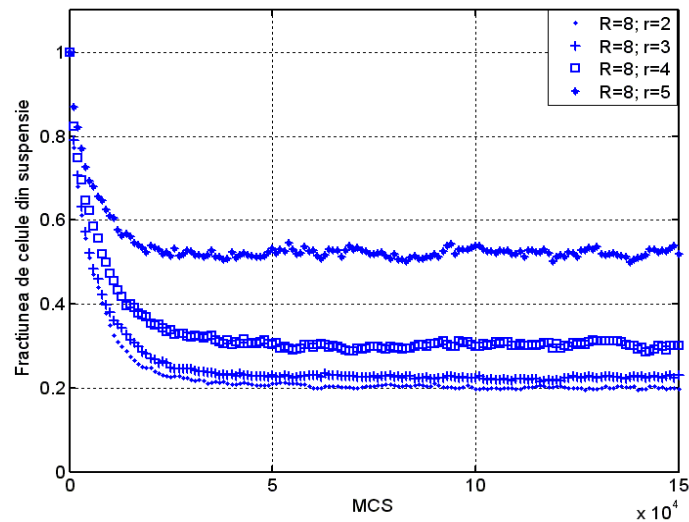


Fig. 6.10. Evoluția fracțiunii de celule din suspensie, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 3.

În cel de-al patrulea set de simulări (Tabelul 6.1, rândul 4), atracția dintre celule este mai mare decât de două ori atracția dintre celule și biomatrice, determinând o tensiune interfacială celulă - substrat pozitivă. În acest caz, majoritatea celulelor rămân în suspensie, formându-se un număr mare de agregate celulare, iar procesul de însămânțare eșuează (Fig. 6.11).

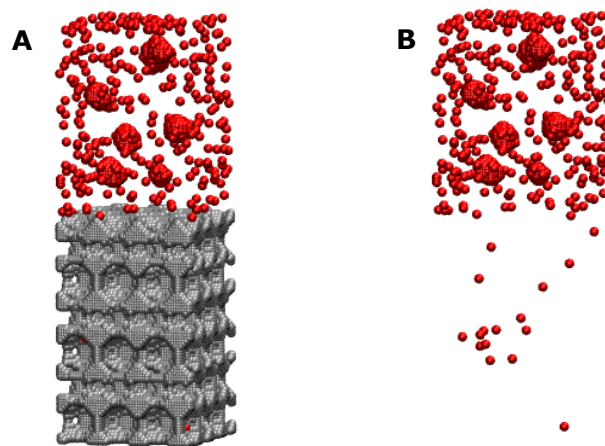


Fig. 6.11. A. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.1, rândul 4); B. Configurația din Fig. 6.11A, cu biomatricea ștersă pentru a se evidenția mai bine însămânțarea celulelor.

Reușita procesului de însămânțare celulară este rezultatul unei competiții între energia de interacțiune celulă - celulă, respectiv energia de interacțiune celulă

– biomatrice, după cum o arată și studiile experimentale prezentate în [92]. Simulările realizate aduc argumente cantitative pentru corectitudinea acestei observații.

Coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem se stabilizează în jurul valorii 115 (Fig. 6.12), indicând că majoritatea celulelor rămân în suspensie. Această remarcă este susținută și mai puternic de Fig. 6.13, unde se observă că mai mult de 95 % dintre celule rămân în suspensie.

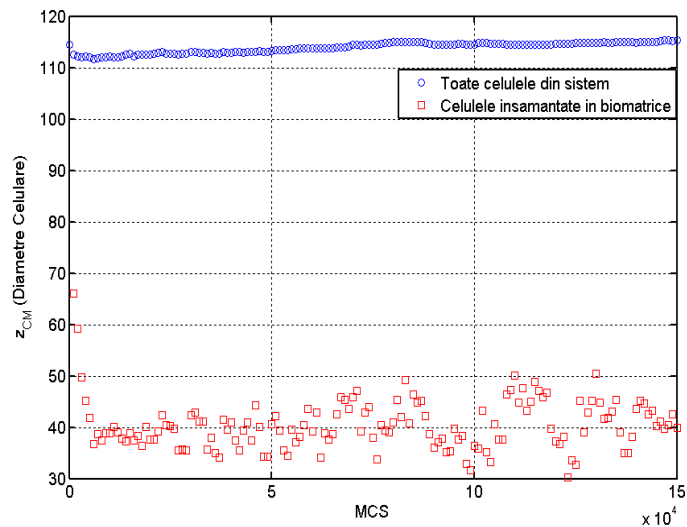


Fig. 6.12. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 4.

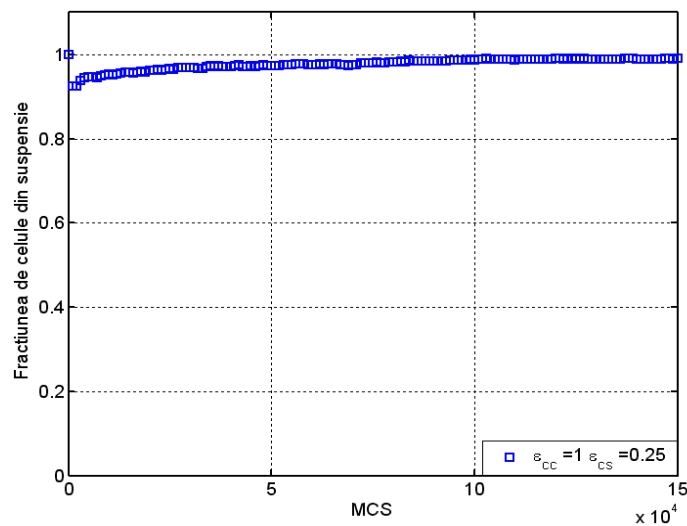


Fig. 6.13. Evoluția fracțiunii de celule din suspensie, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.1, rândul 4.

Simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice poroasă cu pori sferici interconectați au constat în rularea a 150 000 de MCS, timpul de rulare fiind aproximativ 1 ora și 20 de minute.

Noi simulări ale însămânțării celulare a unei biomatrice cu pori sferici de rază $R=5$ diametre celulare au fost realizate și prezentate de autoare în articolul [99], oferind o imagine mai clară a impactului parametrilor geometrici asupra însămânțării.

6.3. Studiul însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori cubici

6.3.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat

Procesul de însămânțare celulară și comportamentul celulelor joacă un rol foarte important în ingineria tisulară, ceea ce face ca modelarea biomatricilor care au rol de suport pentru cultura celulară să fie extrem de folositoare.

Pentru realizarea acestui studiu, am dezvoltat modelele computaționale ale unor sisteme biologice constând în biomatrice de structură poroasă, cu porii cubici de latură egală cu 5, 10, respectiv 15 diametre celulare, în vecinătatea cărora se află o suspensie de celule. Pornind de la aceste modele, am simulat distribuția celulelor în volumul biomatricilor de diferite geometrii, utilizând programul original SIMMMC [101].

Pentru modelarea biomatricilor cu porii cubici de arhitectură controlată, am construit o rețea paralelipipedică de-a lungul axelor OX , OY , OZ . Un nod din această rețea este reprezentat fie de un index asociat particulelor de biomaterial, fie de un index asociat particulelor de mediu. Axa OZ reprezintă axa longitudinală a sistemului. Unitatea de lungime, egală cu un diametru celular, reprezintă distanța dintre două noduri adiacente [101].

Porii biomatricei sunt reprezentați de cuburi de latură L , situate la o distanță de L unități unele de altele. Prin aceste cuburi, celulele pot penetra biomatricea, aceasta determinând fenomenul de însămânțare celulară a biomatricei. Biomatricea poroasă se consideră scăldată în mediul de cultură, aceasta însemnând că porii biomatricei conțin, în stare inițială, particule de mediu. Modelarea geometriei biomatricei este prezentată în detaliu în capitolul 3.

6.3.2. Simularea însămânțării unei suspensii de celule pe o biomatrice cu pori cubici

Simularea însămânțării celulare a unei biomatrice cu porii cubici s-a făcut utilizând algoritmi bazați pe metoda Metropolis Monte Carlo descriși în detaliu în capitolul 3, urmărindu-se distribuția celulelor în biomatrice, în timpul rulării unui anumit număr de pași Monte Carlo (MCS).

Parametrii de model în funcție de care se studiază succesul însămânțării celulare sunt [101]:

- energia de coeziune dintre celule, \mathcal{E}_{cc}

- energia de adeziune dintre celule și biomatrice, \mathcal{E}_{cs}
- latura cuburilor ce reprezintă porii, L

Parametrii de ieșire care ne oferă informații cu privire la stadiul însămânțării celulare pe durata rulării unui număr de pași Monte Carlo sunt [101]:

- coordonata z a centrului de masă al celulelor care au reușit să pătrundă în biomatrice ($Z_{CMBiomatrice}$)
- concentrația de celule rămase în suspensie

Tabelul 6.2 prezintă valorile parametrilor de intrare utilizate în simulările însămânțării celulare a unei biomatrice cu pori cuburi, precum și numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați [101].

Tabel 6.2. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice cu pori cubici.

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	L	MCS	Figuri
0	0.6	5;10;15	150 000	Fig. 6.14, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18, 6.19, 6.20, 6.21, 6.22
0.4	0.6	5;10;15	150 000	Fig. 6.15, 6.16, 6.18, 6.19, 6.21, 6.22
0.8	0.6	5;10;15	150 000	Fig. 6.14, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18, 6.19, 6.20, 6.21, 6.22
1	0.25	5;10;15	150 000	Fig. 6.14, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18, 6.19, 6.20, 6.21, 6.22

Pentru început, am considerat un sistem biologic format dintr-o biomatrice poroasă cu porii cuburi de latură $L=5$ diametre celulare, în vecinătatea căreia se află o suspensie celulară. Concentrația celulelor din suspensia celulară în starea inițială a sistemului este de 1%. Sistemul este reprezentat pe o rețea paralelipipedică de dimensiune $65 \times 65 \times 165$ noduri. În regiunea $z < z_0$ ($z_0=85$), se află biomatricea, iar în regiunea $z \geq z_0$, se află suspensia de celule [101].

În Fig. 6.14A, este vizualizată configurația inițială a sistemului. Fig. 6.14B, prezintă configurația obținută după rularea a 150 000 MCS, pentru parametrii energetici prezentați în Tabelul 6.2, rândul 1. Se poate observa că, în acest caz, aproape toate celulele au pătruns în biomatrice, având o distribuție uniformă. Dacă energia de interacțiune dintre celule are valoarea 0.8 (Tabelul 6.2, rândul 3), se poate observa formarea de agregate celulare în suspensie. Având în vedere că tensiunea interfacială celulă - biomatrice este încă negativă (-0.2), o parte din celule penetrează biomatricea, având o distribuție uniformă, însă procesul de însămânțare este îngreunat (Fig. 6.14C). Dacă energia de interacțiune dintre celule este foarte mare, iar energia de interacțiune dintre celule și biomatrice este aproape nulă (Tabelul 2, rândul 4), determinând o tensiune interfacială celulă - biomatrice pozitivă, celulele nu mai sunt atrase de biomaterial, în schimb sunt atrase puternic unele de altele. Astfel, se formează un număr mare de agregate celulare, iar procesul de însămânțare este blocat complet (Fig. 6.14D) [101].

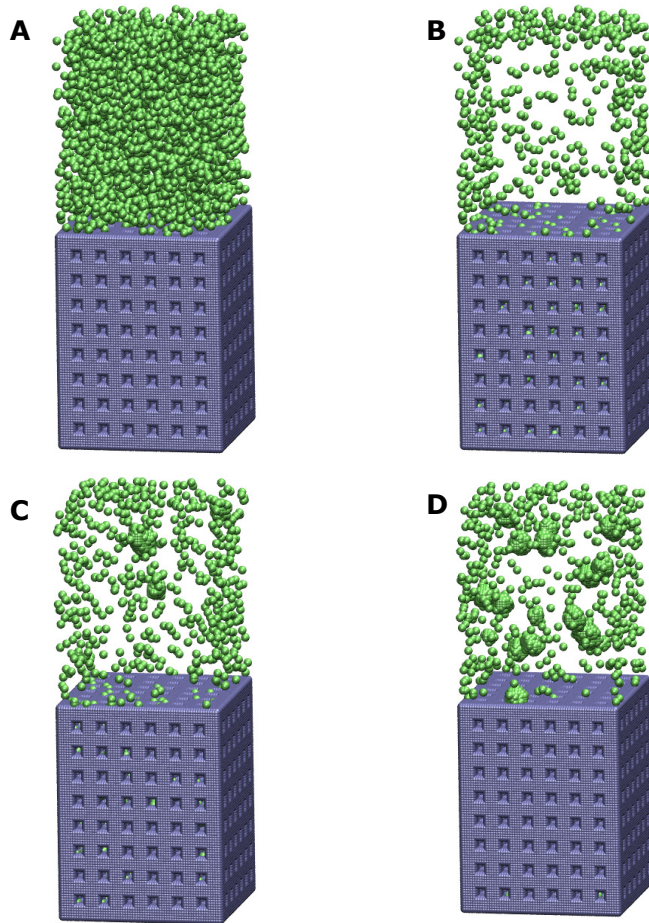


Fig. 6.14. A. Configurația inițială a sistemului ($L=5$); B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 1); C. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 3); D. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 4).

În Fig. 6.15, putem analiza evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor care au penetrat biomatricea, în timpul rulării a 150 000 MCS, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.2, rândurile 1, 2, 3, 4. Dacă energia de interacțiune dintre celule este 0 și energia de interacțiune celulă - substrat este 0.6, în aproximativ 9×10^4 MCS este atinsă o stare stabilă, în care valoarea coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate este foarte apropiată de valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricii ($Z_{CMBiomatice} = 42.5$). Acest fapt arată că celulele pătrund în volumul biomatricii, având o distribuție uniformă. Dacă energia de interacțiune dintre celule este 0.4, se poate observa că însămânțarea este uniformă, rezultatele fiind similare cu cele din cazul în care energia de interacțiune dintre celule este nulă.

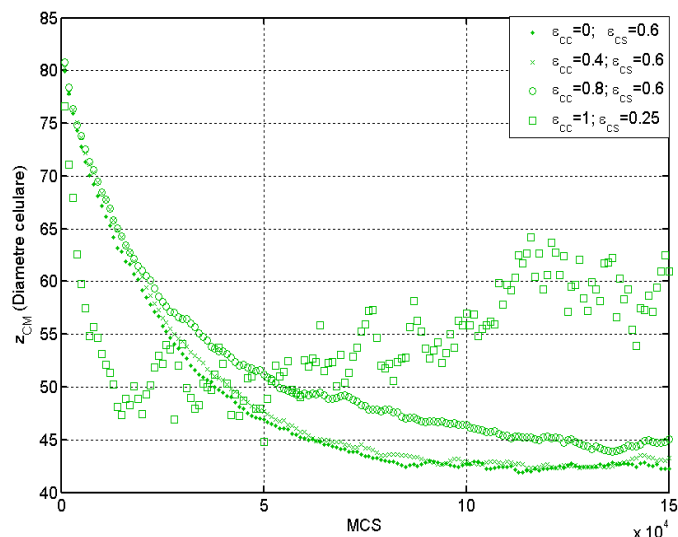


Fig. 6.15. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=5$).

În cazul în care energia de interacțiune celulă - celulă este 0.8 (mai mare decât energia de interacțiune celulă - biomatrice), coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice, după rularea a 13×10^4 MCS, abia atinge valoarea 45 (mai mare decât valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricei), indicând o încetinire a procesului de însămânțare și o pătrundere greoaie a celulelor în adâncimea biomatricei. Dacă atracția dintre celule este mult mai puternică față de atracția dintre celule și biomatrice (Tabelul 6.2, rândul 4), coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice variază în jurul valorilor 55 - 65, însă doar câteva celule pătrund în biomatrice, majoritatea rămânând în suspensia celulară și formând multe agregate celulare [101].

Fig. 6.16 furnizează informații despre concentrația de celule care au reușit să pătrundă în biomatrice. În cazul în care energia de interacțiune dintre celule este 0, respectiv 0.4 (Tabelul 6.2, rândurile 1,2), încă de la rularea a 40 000 MCS, aproximativ 85% dintre celule pătrund în biomatrice, urmând să se rearanjeze în cadrul acesteia, în timp ce diferența de aproximativ 15% dintre celule rămân în suspensie. La o energie de interacțiune celulă - celulă egală cu 0.8 (Tabelul 6.2, rândul 3), după rularea a 150 000 MCS, aproximativ 40% dintre celule se află în suspensie, indicând îngreunarea procesului de însămânțare. Dacă energia de interacțiune celulă - celulă este 1, iar interacțiunea celulă - substrat este aproape nulă (Tabelul 6.2, rândul 4) se poate observa că mai mult de 90% dintre celule rămân în suspensie, însămânțarea celulelor eșuând în acest caz [101].

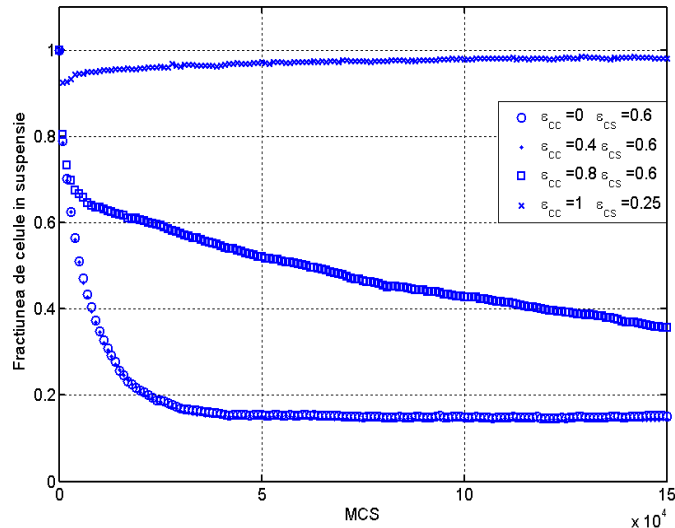


Fig. 6.16. Evoluția fracțiunii de celule în suspensie în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=5$).

Simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice poroasă cu pori cubici interconectați de latură $L = 5$ diametre celulare au constat în rularea a 150 000 de MCS, timpul de rulare fiind aproximativ 2 ore și 30 de minute.

Urmărind să determinăm influența geometriei biomatricei asupra procesului de însămânțare, în continuare, am simulat evoluția unui sistem multicelular în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă, cu porii cuburi de latură $L=10$ diametre celulare. Modelul asociat acestui sistem este creat pe o rețea paralelipipedică ($70 \times 70 \times 170$ noduri). În regiunea $z < z_0$ ($z_0=90$) se află biomatricea de structură poroasă, iar în regiunea $z \geq z_0$ se află suspensia de celule [101].

În Fig. 6.17, se poate vizualiza configurația inițială a sistemului biologic studiat, precum și configurațiile obținute după rularea a 150 000 MCS, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 6.2, rândurile 1, 3, 4 [101].

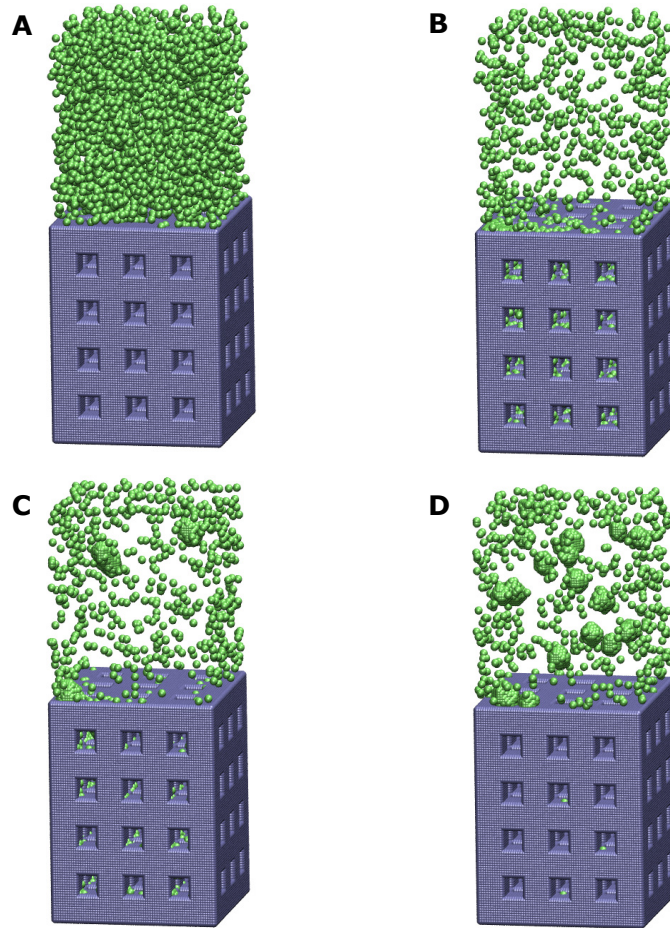


Fig. 6.17. A. Configurația inițială a sistemului ($L=10$); B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 1); C. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 3); D. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 4).

Analizând Fig. 6.18, se poate observa că coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice, atunci când energia de interacțiune dintre celule este 0 (Tabelul 6.2, rândul 1) se stabilizează în jurul valorii 47, valoare care este mai mare decât valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricii (în aceste simulări, $Z_{CMBiomatrice} = 45$). Acest lucru ne spune că celulele nu reușesc să se distribuie în adâncimea biomatricii la fel de bine ca și în cazul în care biomatricea are porii cuburi de latură $L=5$ diametre celulare. Când energia de interacțiune dintre celule are valoarea 0.4 (Tabelul 6.2, rândul 2), coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice tinde mai lent spre valoarea 47, unde se stabilizează. În cazul în care energia de interacțiune celulă - celulă este 0.8 (Tabelul 6.2, rândul 3), coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice, după rularea a 150 000 de pași Monte Carlo, abia ajunge în jurul valorii 52 (mai mare decât valoarea

coordonatei z a centrului de masă al biomatricei). Acest lucru indică, de asemenea, o încetinire puțin mai mare a procesului de însămânțare decât în cazul în care biomatricea are porii cubici de latură $L=5$ diametre celulare. Dacă atracția dintre celule este mult mai puternică față de atracția celulă - biomatrice (Tabelul 6.2, rândul 4), tensiunea interfacială celulă - biomatrice fiind pozitivă, coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice variază în jurul valorilor 75 - 85, însă doar un număr foarte mic de celule reușesc să pătrundă la suprafața biomatricei. În acest caz, procesul de însămânțare eșuează [101].

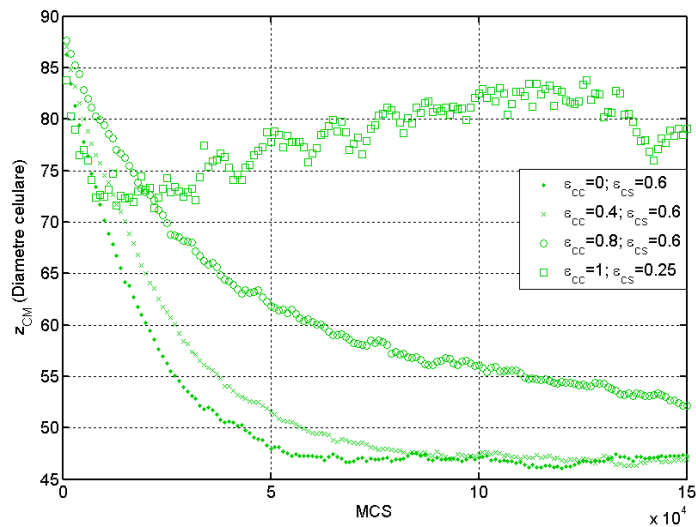


Fig. 6.18. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=10$).

Fig. 6.19, arată că la o energie de interacțiune celulă - celulă egală cu 0, respectiv 0.4 (Tabelul 6.2, rândurile 1,2), aproximativ 80% dintre celule pătrund în biomatrice, încă de după rularea a 40 000 MCS. La o energie de interacțiune celulă - celulă egală cu 0.8 (Tabelul 6.2, rândul 3), după rularea a 150 000 MCS, aproximativ 50% din concentrația de celule se află în suspensie, indicând îngreunarea procesului de însămânțare și mai mult decât în cazul în care biomatricea are porii de latură $L=5$ diametre celulare. Dacă energia de interacțiune celulă - celulă este 1, iar interacțiunea celulă - substrat este aproape nulă (Tabelul 6.2, rândul 4), majoritatea celulelor rămân în suspensie, geometria biomatricei neinfluențând în niciun mod acest lucru [101].

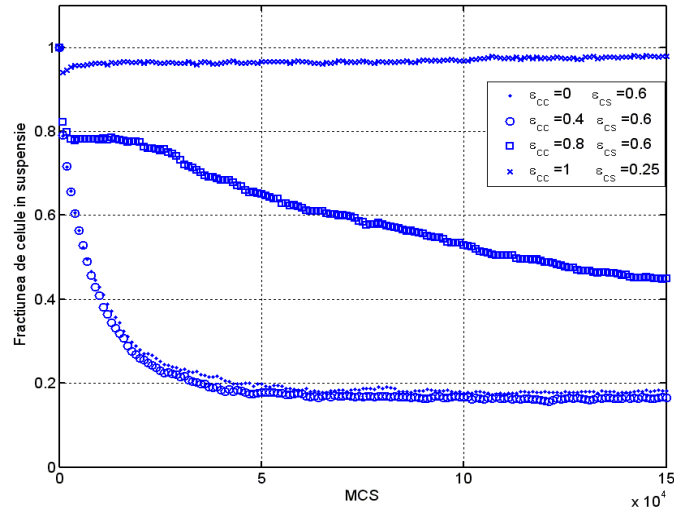


Fig. 6.19. Evoluția fracțiunii de celule în suspensie în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=10$).

Simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice poroasă cu pori cubici interconectați de latură $L = 10$ diametre celulare au constat în rularea a 150 000 de MCS, timpul de rulare fiind aproximativ 3 ore.

În cele ce urmează, am considerat o biomatrice de structură poroasă cu porii cubici de latură $L=15$ diametre celulare. Am simulat evoluția sistemului multicelular aflat în vecinătatea acestei biomatrice, în diferite condiții de simulare prezentate în Tabelul 6.2. Sistemul biologic studiat este reprezentat pe o rețea paralelipipedică de dimensiune $75 \times 75 \times 185$ noduri. În regiunea $z < z_0$ ($z_0=105$), se află biomatricea, iar în regiunea $z \geq z_0$ se află suspensia de celule. Configurațiile obținute pot fi vizualizate în Fig. 6.20 [101].

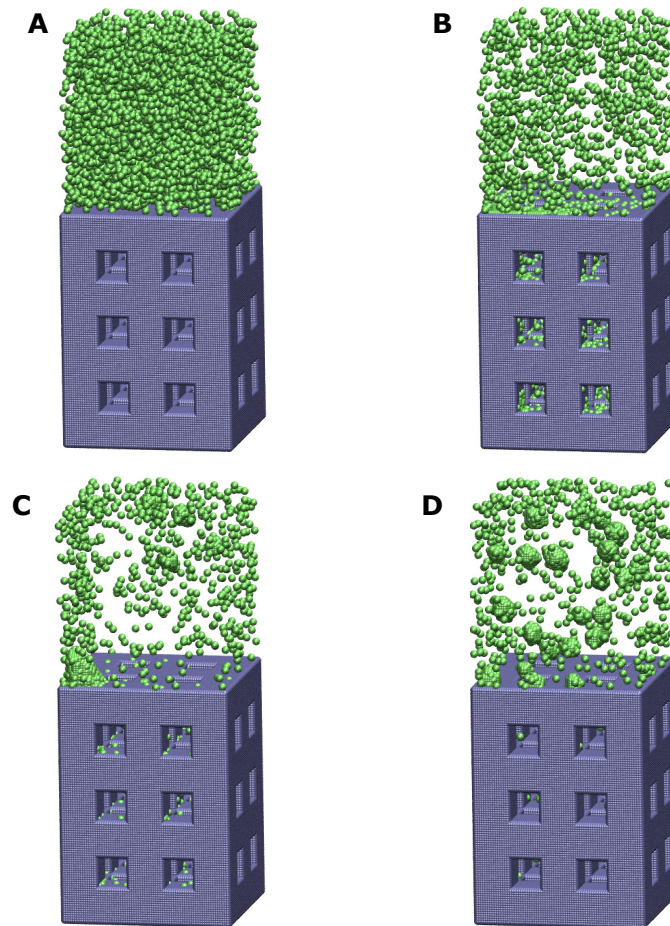


Fig. 6.20. A. Configurația inițială a sistemului ($L=15$);
 B. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 1); C. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 3); D. Configurația obținută după rularea a 150 000 MCS (Tabelul 6.2, rândul 4).

În acest set de simulări, centrul de masă al biomatricii are valoarea $Z_{CMBiomatrice} = 52.5$. Analizând Fig. 6.21, se poate observa că la o energie de interacțiune dintre celule egală cu 0 (Tabelul 6.2, rândul 1), coordonata z a centrului de masă al celulelor pătrunse în biomatrice se stabilizează în jurul valorii 58, care este mai mare decât valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricii. În cazul în care energia de interacțiune celulă - celulă este 0.8 (Tabelul 6.2, rândul 3), coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice, după rularea a 150 000 de pași Monte Carlo, abia ajunge în jurul valorii 70 (mai mare semnificativ decât valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricii). Aceste informații ne spun că, chiar dacă porii biomatricii sunt cuburi de dimensiune mai mare și pot pătrunde mai multe celule prin ei, acestea nu reușesc să se distribuie uniform și în adâncimea

biomatricei, ca și în cazul în care latura porilor este $L=5$ diametre celulare. Dacă atracția dintre celule este mult mai puternică față de atracția celulă - biomatrice (Tabelul 6.2, rândul 4), tensiunea interfacială celulă - substrat fiind pozitivă, doar câteva celule reușesc să pătrundă în biomatrice, însămânțarea neputând avea loc. Se poate observa că, în aceste ultime condiții de simulare, însămânțarea eșuează, indiferent de dimensiunea porilor biomatricei [101].

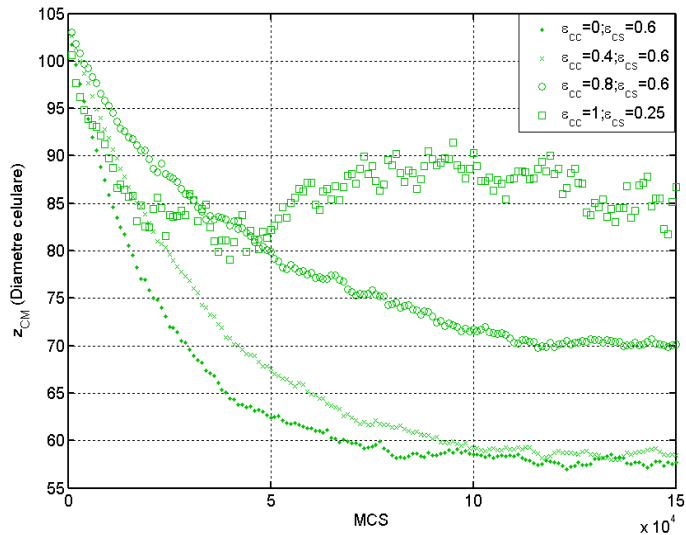


Fig. 6.21. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=15$)

În Fig. 6.22, se poate observa că la o energie de interacțiune celulă - celulă egală cu 0, respectiv 0.4 (Tabelul 6.2, rândurile 1,2), aproximativ 75% dintre celule pătrund în biomatrice, încă de după rularea a 50 000 MCS. La o energie de interacțiune celulă - celulă egală cu 0.8 (Tabelul 6.2, rândul 3), după rularea a 150 000 MCS, aproximativ 70% din concentrația de celule se află în suspensie, indicând îngreunarea procesului de însămânțare și mai mult decât în cazul în care biomatricea are pori de latură $L=5$ sau $L=10$ diametre celulare. Dacă energia de interacțiune celulă-celulă este 1, iar interacțiunea celulă-substrat este aproape nulă (Tabelul 2, rândul 4), aproape toate celulele rămân în suspensie [101].

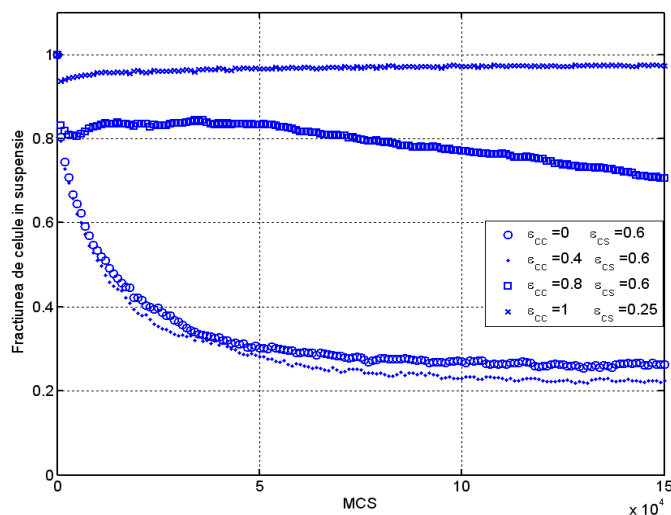


Fig. 6.22. Evoluția fracțiunii de celule în suspensie în timpul rulării a 150 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.2, rândurile 1,2,3,4 ($L=15$).

Simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice poroasă cu pori cubici interconectați de latură $L = 15$ diametre celulare au constat în rularea a 150 000 de MCS, timpul de rulare fiind aproximativ 3 ore și 45 de minute.

Analizând rezultatele simulărilor însămânțării celulare pe cele 3 geometrii de biomatrice, se poate observa că concentrația de celule care pătrund în biomatrice scade pe măsură ce porii sunt mai mari. Deși, intuitiv, ne-am fi așteptat ca pe măsură ce porii sunt mai mari, un număr mai mare de celule să pătrundă în biomatrice, rezultatele obținute arată contrariul. O explicație poate fi că porii biomatricii fiind mai mari, aceasta dispune de mai puțin biomaterial pe care celulele să se atașeze [101].

6.4. Studiul însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice cu pori sferici interconectați

6.4.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat

În cadrul acestui studiu, am realizat un model computațional pentru un sistem biologic format dintr-un agregat celular situat pe suprafața unei biomatricii poroase cu pori sferici. Modelul asociat biomatricii constă într-o rețea paralelipipedică de dimensiune $50 \times 50 \times 80$ noduri de rețea, de-a lungul celor 3 axe OX , OY , OZ . Un nod din această rețea este reprezentat fie de un index asociat unei particule de biomaterial, fie de un index asociat unei particule de mediu. Porozitatea biomatricii este realizată în model ținând cont atât de raza porilor R , cât și de raza orificiilor circulare care conectează porii, r . Agregatul celular, scăldat în mediul de cultură, este reprezentat chiar pe suprafața biomatricii, de o sferă de rază

Ragregat egală cu 10 unități, elementele sferei fiind indecși asociați celulelor [103]. Algoritmii utilizați în dezvoltarea modelului computațional al sistemului biologic prezentat sunt explicați în detaliu în capitolul 3.

Modelul realizat este vizualizat cu ajutorul programului de grafică moleculară Visual Molecular Dynamics (VMD) [1], după cum se poate vedea în Fig. 6.23.

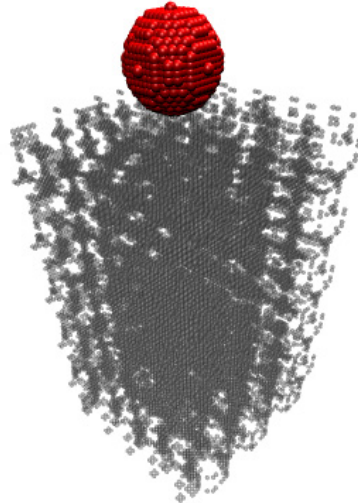


Fig. 6.23. Modelul computațional al unui sistem biologic format dintr-un agregat celular (*Ragregat*=10) aflat în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă (porii sferici: $R=5$; $r=2$).

6.4.2. Simularea însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice cu pori sferici interconectați

Însămânțarea celulară dinamică a biomatricilor din ingineria tisulară cu o suspensie de celule coezive este rapidă datorită formării agregatelor celulare în suspensie și pe cale de consecință datorită atașării acestor agregate la biomatrice. Cu ajutorul programului informatic SIMMMC, am realizat un studiu computațional al ultimei etape a acestui proces - penetrarea unui agregat celular în biomatrice -, urmărind să determinăm factorii energetici și geometrici optimi care conduc la o însămânțare reușită [103].

Parametrii de model în funcție de care se studiază succesul însămânțării celulare sunt:

- energia de coeziune dintre celule, \mathcal{E}_{cc}
- energia de adeziune dintre celule și biomatrice, \mathcal{E}_{cs}
- raza porilor, R
- raza orificiilor circulare care conectează porii, r

Parametrii de ieșire, analizați după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo sunt:

- o coordonata z a centrului de masă al celulelor care au reușit să pătrundă în biomatrice ($Z_{CMBiomatrice}$)
- o concentrația de celule rămasă în suspensie

În Tabelul 6.3, se prezintă valorile parametrilor de intrare, în funcție de care studiem calitatea procesului de însămânțare, precum și numărul de pași Monte Carlo (MCS) rulați [103].

Tabel 6.3. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice cu pori sferici.

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	R	r	MCS	Set simulări, Figuri
1	0.8; 1; 1.2; 1.4	5	2	200 000	I, Fig. 6.24A, 6.24B, 6.24C Fig. 6.25A, 6.25B, 6.25C Fig. 6.26A, 6.26B, 6.26C Fig. 6.27A, 6.27B, 6.27C Fig. 6.28, 6.29
1	1.6; 1.8; 2; 2.2	5	2	200 000	II, Fig. 6.30, 6.31
1	1.4	8	2; 3; 4	200 000	III, Fig. 6.32A, 6.32B, 6.32C Fig. 6.33A, 6.33B, 6.33C Fig. 6.34A, 6.34B, 6.34C Fig. 6.35, 6.36
1	1.2	8	2; 3; 4	200 000	IV, Fig. 6.35, 6.36

Bazându-ne pe diferite configurații obținute după rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale energiei de coeziune, ale energiei de adeziune, a razei porilor și a razei orificiilor circulare care conectează porii, am studiat condițiile care conduc la o însămânțare uniformă și rapidă a biomatricei. Ca o măsură cantitativă a vitezei de însămânțare și a uniformității însămânțării, am calculat centrul de masă al celulelor din biomatrice, precum și fracțiunea de celule care rămân în mediul de cultură.

Figurile 6.24, 6.25, 6.26, 6.27 referitoare la primul set de simulări (I - Tabelul 6.3, rândul 1), prezintă maniera în care agregatul penetrează gradual biomatricea și se împrăștie tot mai mult în volumul său [103].

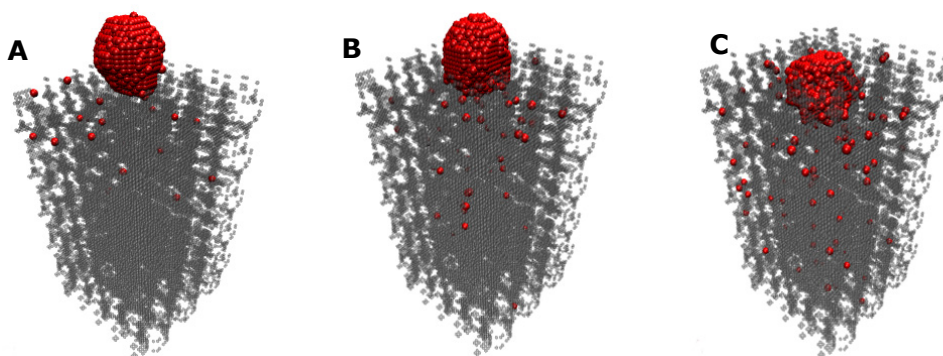


Fig. 6.24. Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1 - $\mathcal{E}_{cc} = 1$; $\mathcal{E}_{cs} = 0.8$).

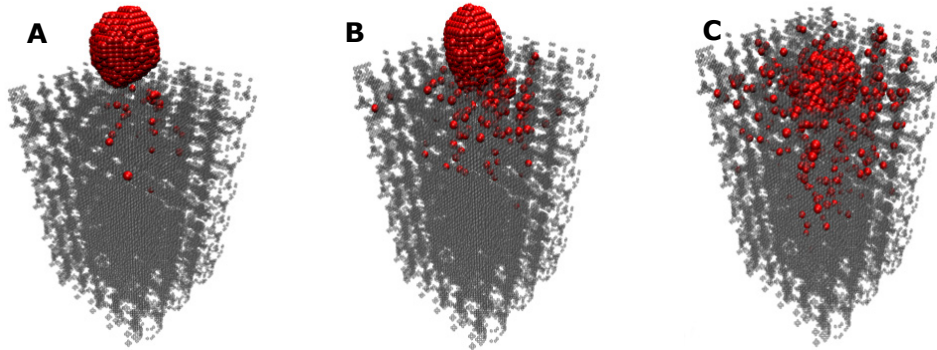


Fig. 6.25. Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1 - $\mathcal{E}_{cc} = 1$; $\mathcal{E}_{cs} = 1$).

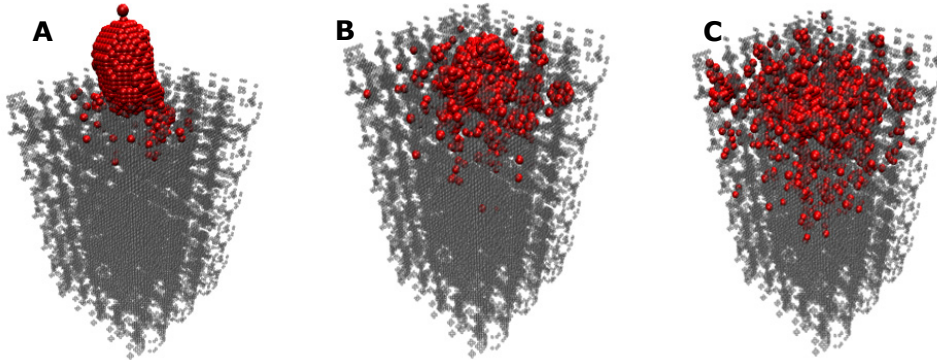


Fig. 6.26. Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1 - $\mathcal{E}_{cc} = 1$; $\mathcal{E}_{cs} = 1.2$).

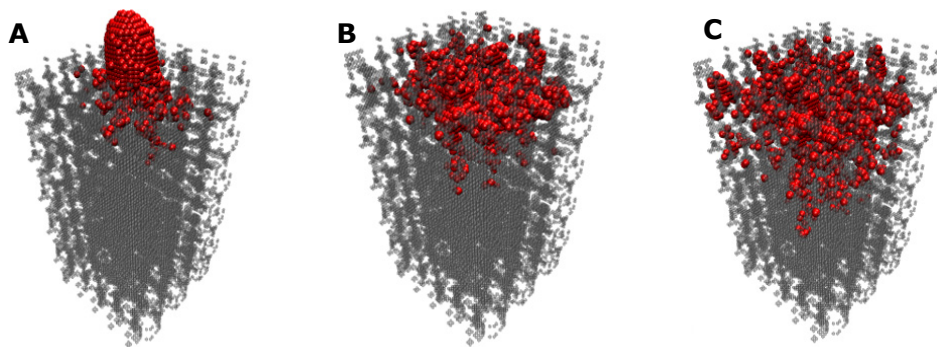


Fig. 6.27. Configurația sistemului obținută după rularea a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1 - $\mathcal{E}_{cc} = 1$; $\mathcal{E}_{cs} = 1.4$).

Analizând configurațiile obținute după rularea a 50 000, 100 000, respectiv 200 000 MCS, se observă că energia de interacțiune celulă - substrat optimă în simulările realizate este 1.4. În acest caz, celulele pătrund mai rapid în volumul biomatricii, la o rulare a unui număr mai mare de pași Monte Carlo asigurând o distribuție uniformă în adâncimea biomatricii (vezi capitolul 7, simularea cu țării chemotactice nule).

În Fig. 6.28, referitoare la primul set de simulări din Tabelul 6.3, este prezentată evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din biomatrice. Se poate observa că, pe măsură ce energia de interacțiune celulă - substrat este mai mare, coordonata z a centrului de masă al celulelor descrește, indicând penetrarea graduală a celulelor în biomatrice. Dacă energia de interacțiune celulă - substrat este 1.4, coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice, după rularea a 200 000 MCS, este aproape de valoarea 62 ($Z_{CMbiomatrice} = 40$) [103].

Fig. 6.29 arată evoluția fracțiunii de celule care rămân în afara biomatricii. Atât Fig. 6.28 cât și Fig. 6.29 indică că, pe măsură ce energia de interacțiune celulă - substrat este mai mare, însămânțarea este mai rapidă. Pentru o energie de interacțiune celulă - substrat egală cu 1.4, deja după rularea a 70 000 MCS, toate celulele reușesc să pătrundă în biomatrice [103].

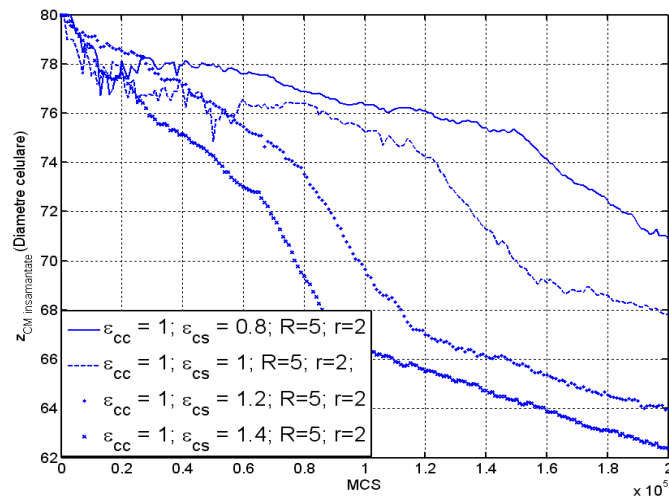


Fig. 6.28. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1.

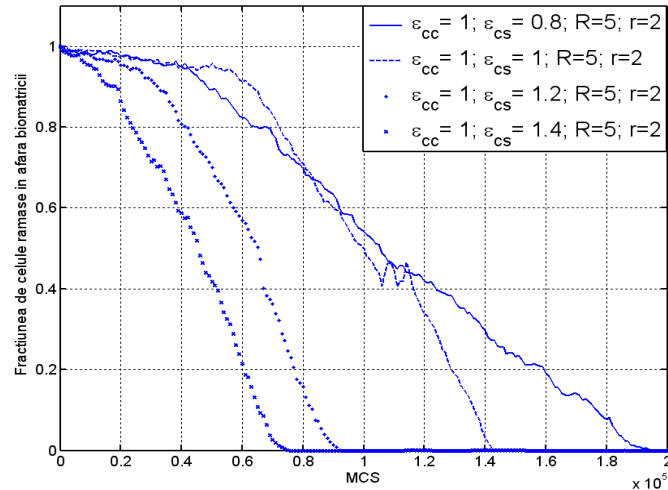


Fig. 6.29. Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricei în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 1.

Fig. 6.30, referitoare la setul II de simulări, arată că pentru o energie de interacțiune celulă - substrat foarte mare (care depășește energia celulă-substrat optimă - 1.4), înșămânțarea biomatricei este redusă. În acest caz, celulele sunt foarte atrase de biomatrice, pătrunzând rapid în aceasta, însă formând încă de la suprafața ei agregate celulare care blochează orificiile dedicate pătrunderii celorlalte celule [103].

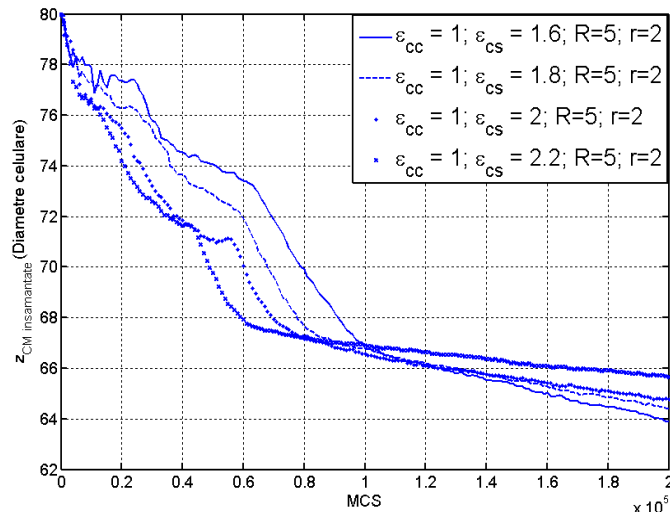


Fig. 6.30. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor înșămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 2.

Poate fi observat că după rularea a 200 000 MCS, coordonata z a centrului de masă al celulelor din biomatrice are o valoare mai mare pe măsură ce energia de interacțiune celulă - substrat este mai mare. Concluzia este că celulele rămân în partea superioară a biomatricei, nereușind să pătrundă în adâncimea sa.

Fig. 6.31 reprezintă un grafic al evoluției fracțiunii de celule care rămân în mediul de cultură, arătând că penetrarea celulelor în biomatrice este mult mai rapidă, pe măsură ce energia de interacțiune celulă - substrat ia valori mai mari. Pentru o energie de interacțiune celulă - substrat egală cu 2.2, după rularea a 50 000 MCS, toate celulele reușesc să pătrundă în biomatrice, în timp ce la o energie celulă - substrat egală cu 1.6, acest fenomen are loc abia după rularea a 80 000 MCS [103].

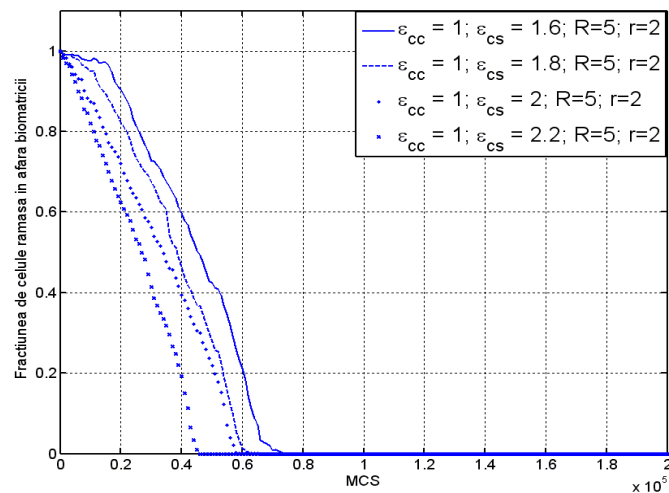


Fig. 6.31. Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricei în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 2.

Figurile 6.32 – 6.34, referitoare la setul III de simulări (Tabelul 6.3, rândul 3), prezintă influența geometriei biomatricei asupra succesului procesului de însămânțare. Însămânțarea lentă, prin orificii mici între pori favorizează migrarea celulelor individuale și împiedică formarea de microagregate în orificiile circulare care conectează porii (Fig. 6.32A, 6.32B, 6.32C). În cazul în care raza orificiilor este egală cu 3 diametre celulare (Fig. 6.33A, 6.33B, 6.33C), biomatricea oferă o suprafață mai redusă pentru atașarea celulelor, dar în același timp nu ridică obstacole în migrarea acestora. Astfel, pătrunderea celulelor în biomatrice are loc mai rapid, însă se formează microagregate celulare care blochează orificiile care conectează porii, împiedicând pătrunderea celulelor în adâncimea biomatricei. În Figurile 6.34A, 6.34B, 6.34C, orificiile circulare au raza egală cu 4 diametre celulare, favorizând și mai mult formarea de microagregate celulare și blocând pătrunderea celulelor în adâncimea biomatricei. În acest caz, pe de altă parte, și suprafața de biomaterial pe care se pot atașa celulele este foarte redusă, procesul de însămânțare celulară fiind un eșec [103].

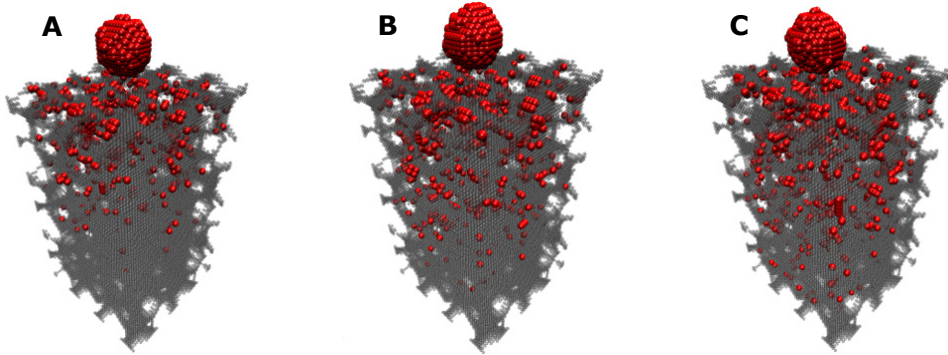


Fig. 6.32. Configurația sistemului obținută după rulare a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 3 – $R=8$; $r=2$).

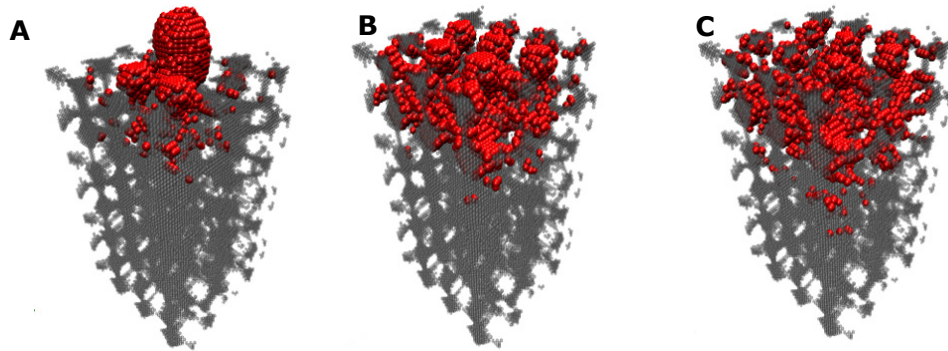


Fig. 6.33. Configurația sistemului obținută după rulare a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 3 – $R=8$; $r=3$).

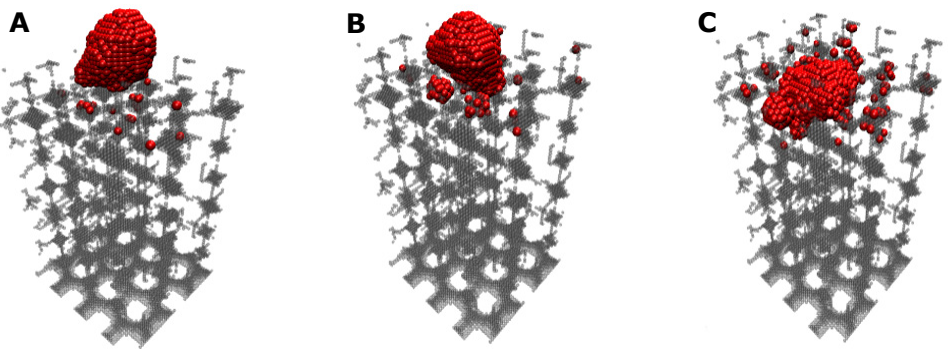


Fig. 6.34. Configurația sistemului obținută după rulare a: A. 50 000 MCS; B. 100 000 MCS; C. 200 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândul 3 – $R=8$; $r=4$).

În Fig. 6.35, aferentă setului de simulări III și IV, se reprezintă evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor pătrunse în biomatrice, pentru diferite porozități ale biomatricei. Se poate observa că dacă raza orificiilor circulare care conectează porii are valoarea egală cu 3 (4) diametre celulare, coordonata z a

centrul de masă al celulelor are o valoare mai mare decât coordonata z a centrului de masă al celulelor în cazul în care raza orificiilor este egală cu 2 diametre celulare. Aceasta arată că, pe măsură ce orificiile care conectează porii sunt mai mari, se permite formarea de microagregate celulare, blocând accesul spre adâncimea biomatricei [103].

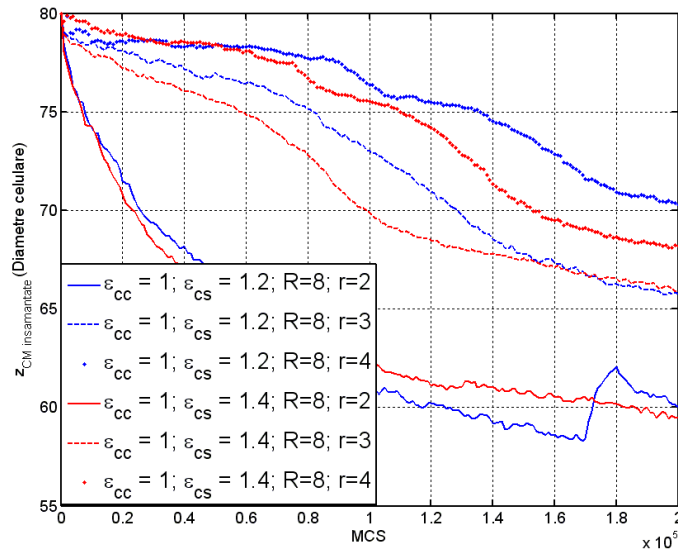


Fig. 6.35. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor însămânțate în biomatrice, în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândurile 3,4.

Fig. 6.36, aferentă setului de simulări III și IV, constă într-o reprezentare cantitativă a evoluției fracțiunii de celule din afara biomatricei, pentru diferite porozități ale acesteia. Se poate observa că, dacă orificiile care conectează porii sunt mari (3, respectiv 4 diametre celulare), celulele pătrund mai rapid în biomatrice. Acest fenomen însă nu conduce la un proces de însămânțare uniform și rapid, ci conduce, dimpotrivă, la o încetinire sau chiar eșuare a procesului de însămânțare. Motivele sunt: (i) favorizarea formării de microagregate celulare, care blochează orificiile ce conectează porii, nepermițând celulelor să înainteze în adâncimea biomatricei, (ii) cu cât orificiile sunt mai mari, biomatricea dispune de mai puțin biomaterial pe care celulele să se atașeze [103].

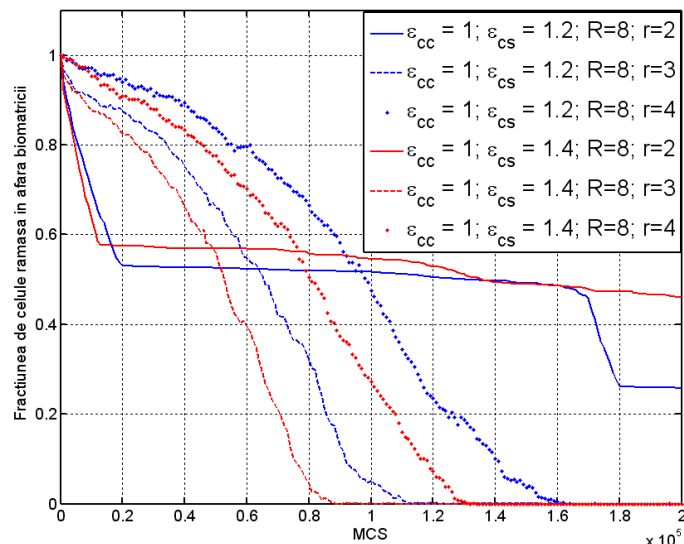


Fig. 6.36. Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricei în timpul rulării a 200 000 MCS, pentru parametrii prezentați în Tabelul 6.3, rândurile 3,4.

Simulările însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice poroasa cu pori sferici inteconectați au constatat în rularea a 200 000 de MCS, timpul de rulare fiind aproximativ 2 ore.

6.5. Concluzii

Principala abordare utilizată pentru dezvoltarea de structuri tisulare artificiale constă în cultivarea unor celule izolate, scăldate în mediul de cultură, pe o biomatrice cu o structură poroasă, formată dintr-un material biocompatibil și biodegradabil. Experimentele de laborator descrise în literatura de specialitate [40] au arătat că dezvoltarea structurilor tisulare este mai rapidă, iar acestea au proprietăți mecanice cât mai apropiate de cele ale țesutului uman, în cazul în care însămânțarea celulară este uniformă.

Studiile *in silico* permit optimizarea procesului de însămânțare celulară, un factor foarte important pentru dezvoltarea rapidă a structurilor tisulare funcționale în laborator și pentru asigurarea de proprietăți mecanice similare cu cele ale țesuturilor native. Simularea însămânțării celulare este deosebit de utilă pentru a testa diferite condiții experimentale, care în practică ar costa mult și ar fi foarte greu de realizat.

În cadrul acestui capitol am studiat cu ajutorul aplicației informatice SIMMMC, evoluția unor sisteme multicelulare în vecinătatea unor biomatrice de structură poroasă cu pori sferici, respectiv cu pori cubici [99,101,103]. În contextul prezentat mai sus, s-a urmărit determinarea condițiilor energetice și geometrice optime care conduc la o distribuție uniformă și rapidă a celulelor în biomatrice. S-a urmărit influența geometriei biomatricei, a energiei de coeziune dintre celule,

respectiv a energiei de adeziune dintre celule și biomatrice asupra procesului de însămânțare. Mișcarea celulelor în sistem a fost simulată considerând ca sistemul celular tinde să atingă starea de energie minimă (DAH)[2].

Pe baza configurațiilor obținute, s-a făcut o analiză a evoluției coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem, respectiv din biomatrice, și a fracțiunii de celule rămase în suspensie.

Centrul de masă al tuturor celulelor din sistem, respectiv al celulelor pătrunse în biomatrice sunt indicatori importanți care ne furnizează informații cu privire la distribuția celulelor în sistem, respectiv în volumul biomatricei. Dependența centrului de masă de numărul de pași Monte Carlo rulați reprezintă totodată o măsură a vitezei de însămânțare celulară. Dat fiind faptul că experimentele însămânțării celulare a biomatricilor monitorizează concentrația suspensiei de celule ce se află în vecinătatea biomatricei [40], am analizat evoluția acestui parametru, ca funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați.

Analiza însămânțării celulare s-a făcut atât cantitativ, oferindu-se tabele de valori și grafice de evoluție, cât și calitativ, prin vizualizări sugestive, realizate cu programul de grafică moleculară VMD [1].

În subcapitolul 6.1, s-a modelat un sistem biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă cu pori sferici și s-a simulat însămânțarea celulelor în biomatrice. Modelarea și simularea s-au făcut cu ajutorul aplicației originale SIMMMC. Simulările au constat în rularea a 150 000 de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale energiei de coeziune dintre celule, ale energiei de adeziune dintre celule și substrat, ale razei porilor biomatricei și ale razei orificiilor care conectează porii.

Concluziile care s-au desprins în urma simulărilor și analizelor realizate sunt următoarele:

- Din punct de vedere geometric, s-a constatat că dimensiunea porilor biomatricei și diametrul orificiilor care conectează porii influențează însămânțarea celulară doar în condiții extreme: dacă orificiile sunt mici (comparabile cu un diametru celular), sau dacă sunt mari (depășind jumătate din diametrul porilor). În acest ultim caz, biomatricea nu este compactă și nu oferă suficient biomaterial pe care celulele să se atașeze. Astfel, procesul de însămânțare celulară eșuează [99].
- Din punct de vedere energetic, s-a observat că, dacă celulele nu aderă unele la altele (daca interacțiunea dintre celule este nulă), dar adera la biomatrice, însămânțarea este rapidă, iar distribuția celulelor în volumul biomatricei este uniformă. Dacă energia de interacțiune celulă - celulă este nenulă, dar suficient de mică încât să asigure o tensiune interfacială celulă - biomatrice negativă, distribuția uniformă este atinsă, dar procesul este mai lent. Însămânțarea este puternic încetinită, chiar blocată, dacă energia de interacțiune celulă - celulă este mai mare decât de două ori energia de interacțiune celulă - biomatrice, conducând la o tensiune interfacială celulă - biomatrice pozitivă. În acest caz, celulele tind să formeze agregate celulare, penetrarea acestora în biomatrice fiind dificilă și puternic încetinită [99].

Contribuțiile originale aduse în subcapitolul 6.1 sunt următoarele:

1. Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați și o suspensie de celule aflată în vecinătatea biomatricii.
2. Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale însămânțării suspensiei de celule pe biomatricea poroasă:
 - considerând coeziunea dintre celule nulă și adeziunea celulă – substrat constantă. S-au identificat condițiile energetice care conduc la o distribuție uniformă a celulelor în biomatrice. S-a pornit de la o biomatrice care are raza porilor egală cu 8 diametre celulare și raza orificiilor care conectează porii egală cu 2 diametre celulare
 - variind coeziunea dintre celule și păstrând adeziunea celulă – substrat constantă. S-a urmărit determinarea influenței coeziunii dintre celule asupra însămânțării (s-au considerat 3 valori pentru energia de coeziune celulă – celulă)
 - considerând o coeziune celulă – celulă foarte mare, și o adeziune celulă – substrat foarte mică
 - considerând valorile energetice optime (care au condus la o însămânțare uniformă) și variind raza orificiilor care conectează porii, în vederea identificării geometriei biomatricii care asigură o însămânțare rapidă și uniformă (s-au considerat 4 valori pentru raza orificiilor care conectează porii, raza porilor fiind egală cu 8 diametre celulare).
3. Efectuarea unei analize calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD [1].
4. Efectuarea unei analize cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule rămase în suspensie în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.

În subcapitolul 6.2 s-au creat modele computaționale pentru sisteme biologice formate din biomatrice cu pori cubici, în vecinătatea cărora se află o suspensie celulară. Pe baza acestor modele, s-a simulat procesul de însămânțare celulară, cu scopul de a determina condițiile energetice și geometrice optime care conduc la o însămânțare rapidă și uniformă. Modelarea și simularea s-au făcut cu ajutorul aplicației originale SIMMMC. Simulările au constat în rularea a 150 000 de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale energiei de coeziune dintre celule, ale energiei de adeziune dintre celule și substrat și ale laturii porilor biomatricii.

Concluziile care s-au desprins în urma simulărilor și analizelor realizate sunt următoarele:

- Din punct de vedere geometric, s-a constatat că, cu cât sunt mai mari porii cubici, cu atât mai mică este concentrația de celule care penetrează biomatricea. Aceasta notificare, este împotriva intuiției, însă explicația ar putea fi faptul că biomatricile cu pori mari oferă mai puțin biomaterial de care celulele să se atașeze [101]. Comparând însă,

rezultatele obținute în cazul în care însămânțarea are loc pe o biomatrice cu pori cuburi, respectiv pe o biomatrice cu pori sfere, am concluzionat ca o biomatrice cu pori cuburi, conduce la un proces de însămânțare reușit, dar mai lent, chiar dacă porii sunt mai mari, pe când dacă orificiile care conectează porii sferici sunt mari, însămânțarea eșuează complet [101].

- Din punct de vedere energetic, lucrurile stau la fel ca și în cazul însămânțării unei biomatrici poroase cu pori sferici (studiu prezentat în subcapitolul 6.1)

Contribuțiile originale aduse în subcapitolul 6.2 sunt următoarele:

1. Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori cubici interconectați și o suspensie de celule aflată în vecinătatea biomatricii.
2. Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale însămânțării suspensiei de celule pe biomatricea poroasă:
 - (i) variind latura porilor cubici (5 diametre celulare - în primul set de simulări, 10 diametre celulare - în al doilea set de simulări, și 15 diametre celulare - în al treilea set de simulări), în vederea determinării celei mai potrivite arhitecturi a biomatricii care să conducă la o însămânțare uniformă și rapidă
 - (ii) variind, pentru fiecare arhitectură de biomatrice, coeziunea dintre celule și considerând adeziunea celulă - substrat constantă (s-au considerat 3 valori pentru energia de coeziune celulă - celulă). Coeziunea nulă între celule conduce la o distribuție uniformă a acestora în volumul biomatricii.
 - (iii) considerând, pentru fiecare arhitectură de biomatrice, o coeziune celulă - celulă foarte mare, și o adeziune celulă - substrat foarte mică.
3. Efectuarea unei analize calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD [1].
4. Efectuarea unei analize cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule ramase în suspensie în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.
5. Realizarea unei analize comparate între rezultatele studiului însămânțării unei biomatrici poroase cu pori sferici, respectiv unei biomatrici poroase cu pori cubici.

Însămânțarea celulară a biomatricilor din ingineria tisulară cu o suspensie de celule coezive este rapidă datorită formării agregatelor celulare în suspensie și pe cale de consecință datorită atașării acestor agregate la biomatrice. **În subcapitolul 6.3**, cu ajutorul aplicației informatice SIMMMC, am realizat un studiu computațional al ultimei etape a acestui proces: penetrarea unui agregat celular în biomatrice, urmărind determinarea factorilor energetici și geometrici optimi care conduc la o însămânțare reușită [103]. Astfel, s-a modelat un sistem biologic format dintr-un agregat celular situat pe suprafața unei biomatrici poroase cu pori sferici

interconectați și s-a simulat însămânțarea celulelor în biomatrice. Modelarea și simularea s-au făcut cu ajutorul aplicației originale SIMMMC. Simulările au constat în rularea a 200 000 de pași Monte Carlo, pentru diferite valori ale energiei de coeziune dintre celule, ale energiei de adeziune dintre celule și substrat, ale razei porilor biomatricii și ale razei orificiilor care conectează porii.

Concluziile care s-au desprins în urma simulărilor și analizelor realizate sunt următoarele:

- Din punct de vedere geometric, s-a constatat că o biomatrice cu orificii mici (de ordinul a 2 diametre celulare) între pori favorizează migrarea celulelor individuale, conducând la o însămânțare uniformă a biomatricii, chiar dacă durează mai mult. Biomatricile care au orificii mai mari între pori permit pătrunderea mai rapidă a celulelor în biomatrice, dar totodată permit și formarea de microagregate celulare, care blochează pătrunderea celulelor în adâncimea biomatricii. Astfel, am concluzionat că uniformitatea însămânțării se atinge pentru biomatrici cu orificii mai mici între porii adiacenți [103].
- Din punct de vedere energetic, s-a observat că o energie de interacțiune celulă - substrat mică determină un proces de însămânțare prea lent. Valoarea optimă a energiei de interacțiune celulă - substrat este în jurul valorii 1.4. În aceste condiții, însămânțarea biomatricii a fost uniformă și s-a putut observa penetrarea graduală a celulelor în biomatrice. Dacă energia de interacțiune celulă - substrat este foarte mare, celulele sunt foarte atrase de biomatrice, blocând orificiile care conectează porii și împiedicând astfel alte celule să pătrundă în biomatrice [103].

Contribuțiile originale aduse în subcapitolul 6.3 sunt următoarele:

1. Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați și un agregat celular situat pe suprafața biomatricii.
2. Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale însămânțării agregatului celular pe biomatricea poroasă:
 - (i) considerând coeziunea constantă și variind adeziunea celulă – substrat, în vederea determinării influenței adeziunii celulă – substrat asupra însămânțării (s-au considerat 8 valori pentru adeziunea celulă – substrat și s-a pornit de la o biomatrice care are raza porilor egală cu 5 diametre celulare și raza orificiilor care conectează porii egală cu 2 diametre celulare)
 - (ii) considerând valorile optime pentru parametrii energetici, determinate în simulările anterioare și variind raza orificiilor care conectează porii (s-au considerat 3 valori pentru raza orificiilor care conectează porii, raza porilor fiind egală cu 8 diametre celulare).
3. Efectuarea unei analize calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD [1].

4. Efectuarea unei analize cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule rămase în suspensie în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.

Studiile originale ale însămânțării sistemelor multicelulare pe biomatrici poroase cu pori sferici, respectiv cubici, furnizează informații utile pentru experimentele de laborator cu privire la arhitectura biomatricilor din cadrul structurilor tisulare și cu privire la condițiile energetice necesare pentru a se atinge o distribuție uniformă a celulelor în volumul biomatricii.

7. STUDIUL COMPUTAȚIONAL AL INTERACȚIUNII DINTRE ADEZIUNE ȘI CHEMOTAXIE ÎN PROCESUL DE ÎNSĂMÂNȚARE A BIOMATRICILOR POROASE DIN INGINERIA TISULARĂ CARE AU ÎNCORPORATĂ O SUBSTANȚĂ CHEMOATTRACTANTĂ

7.1. Introducere

Funcționarea adecvată a substitutelor din ingineria tisulară depinde de succesul însămânțării celulare [40]. Ideal, biomatricea trebuie populată cu un număr mare de celule uniform distribuite. În aceste condiții, condrocitele produc o cantitate de matrice extracelulară comparabilă cu cartilagiile native [40].

Pentru a identifica condițiile necesare atingerii unei însămânțări celulare optime, în studiile precedente am dezvoltat simulări Monte Carlo bazate pe algoritmul Metropolis [99].

Dat fiind ca multe procese din morfogeneza tisulară presupun mișcarea celulară chemotactică [27,90] într-o direcție stabilită de un gradient de substanță chimică, în cadrul acestui studiu, am extins simulările realizate, luând în calcul și fenomenul de chemotaxie [105].

Astfel, am dezvoltat modele computaționale ale unui agregat celular, respectiv ale unei suspensii de celule, aflate în vecinătatea unei biomatrice de structură poroasă care are încorporată o concentrație de chemoatractant, dispusă sub forma unui gradient constant de concentrație [105].

În scopul de a studia interacțiunea dintre adeziune și chemotaxie asupra procesului de însămânțare celulară, am extins algoritmi bazați pe metoda Metropolis Monte Carlo din studiile precedente, adaptându-i fenomenului de chemotaxie (capitolul 3). Cu ajutorul aplicației originale SIMMMC (capitolul 4), am simulat însămânțarea celulelor în biomatrice [105].

Am considerat că sistemul celular este format din două tipuri de celule diferite. În simulările realizate, am variat tăriile chemotactice asociate celor două tipuri de celule, pentru a identifica influența chemoatractantului din biomatrice asupra vitezei de însămânțare. Tăriile chemotactice descriu măsura în care celulele de tip 1, respectiv de tip 2 tind să migreze de-a lungul gradientului de substanță chemoatractantă din biomatrice [105].

Motivația acestui studiu rezultă din apariția unor tehnici solide de fabricare a biomatricilor cu microstructură dorită [113]. Aceste tehnici permit, de asemenea, încorporarea în biomatrice a unor concentrații de substanță chemoatractantă sau a unor factori de creștere, fie sub forma unor gradienti constanți de concentrație, fie sub forma unei concentrații care se eliberează în biomatrice prin difuzie [82,114,115].

7.2. Studiul însămânțării unor biomatrice poroase care au incorporată o substanță chemoattractantă dispusă sub forma unui gradient

7.2.1. Modelarea computațională a sistemului biologic studiat

În cadrul acestui studiu am realizat simularea însămânțării unei populații de celule, reprezentată într-o primă fază de un agregat celular, iar apoi de o suspensie celulară, într-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați, care conține o concentrație de substanță chemoattractantă distribuită pe straturile biomatricei sub forma unui gradient constant. (Fig. 7.1) Concentrația de chemoattractant din biomatrice determină ca celulele să fie atrase mai puternic spre adâncimea sa, ducând la o însămânțare mai rapidă [105].

Modelele computaționale asociate celor două sisteme biologice formate (i) dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrice cu pori sferici, respectiv (ii) dintr-un agregat celular scăldat în mediul de cultură situat pe suprafața unei biomatrice cu pori sferici constau dintr-o rețea paralelipipedică, formată din $50 \times 50 \times 150$ noduri de rețea, axa OZ reprezentând axa longitudinală a sistemului. Unitatea de lungime este distanța dintre două noduri de rețea, egală cu un diametru celular. În regiunea $z < z_0$ ($z_0 = 80$) a spațiului de modelare, nodurile rețelei sunt ocupate fie de un index asociat particulelor de biomaterial, fie de un index asociat particulelor de mediu, această zonă reprezentând biomatricea cu pori sferici plini de mediu de cultură. Porozitatea biomatricei este realizată în model ținând cont atât de raza porilor, R , cât și de raza orificiilor circulare care conectează porii, r . În regiunea $z \geq z_0$ se regăsește fie agregatul celular scăldat în mediul de cultură, fie suspensia de celule. Agregatul celular este reprezentat de o sferă de diametru $D = 20$ unități, elementele sferei fiind indecși asociați tipurilor de celule. Nodurile rețelei asociate suspensiei de celule sunt ocupate fie de un index asociat unei celule, fie de un index asociat unei particule de mediu, procentajul de celule de un anumit tip, precum și concentrația de celule din suspensie fiind asigurate pe baza unui generator de numere pseudo-aleatoare [105].

Modelele computaționale realizate sunt vizualizate cu ajutorul programului de grafică moleculară Visual Molecular Dynamics (VMD) [1], după cum se poate vedea în Fig. 7.1.

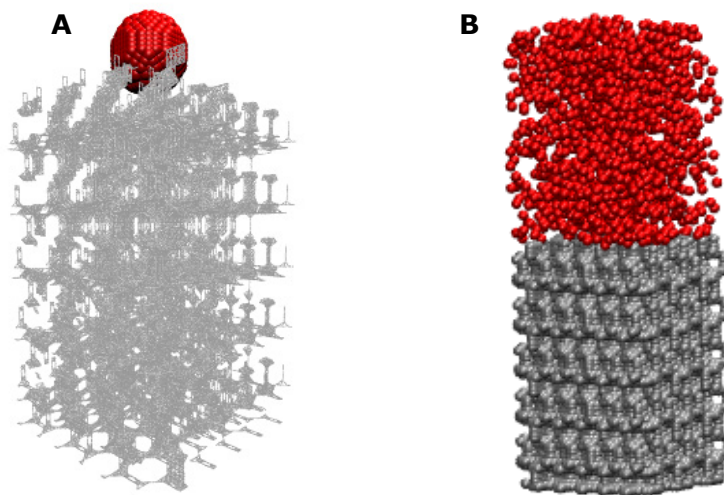


Fig. 7.1. A. Model sistem biologic: un agregat celular ($D = 20$) situat pe suprafața unei biomatrici cu pori sferici ($R=5, r=2$); B. Model sistem biologic: o suspensie celulară aflată în vecinătatea unei biomatrici cu porii sfere ($R=5, r=2$).

Valoarea concentrației de chemoatractant din stratul superior al biomatrici (valoarea minimă a gradientului) – $C1$, valoarea concentrației de chemoatractant din stratul inferior al biomatrici (valoarea maximă a gradientului) – $C2$, tăriile chemotactice ale tipului 1 și tipului 2 de celule – $K1, K2$ ($K1=K2$ în simulările noastre), se vor introduce de către utilizator prin intermediul unei interfețe a aplicației SIMMMC dezvoltate, prezentată în capitolul 4.

7.2.2. Simularea însămânțării unor biomatrici poroase care au încorporată o substanță chemoatractantă dispusă sub forma unui gradient

Simularea însămânțării unei biomatrici poroase care are încorporată o concentrație de chemoatractant dispusă sub forma unui gradient se face cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, utilizând algoritmi bazați pe metoda Metropolis Monte Carlo, adaptați fenomenului de chemotaxie.

În calculul energiei de adeziune a sistemului, intervine un nou termen, CH , care reprezintă energia asociată fenomenului de chemotaxie pentru întreg sistemul și care se calculează cu ajutorul algoritmului numit *Calcul_Energie_Chemotaxie* prezentat în capitolul 3.

Energia de adeziune a unui sistem multicelular compus din 2 tipuri de celule devine, în acest caz [105]:

$$E = \gamma_{oc_1} \cdot B_{0c_1} + \gamma_{oc_2} \cdot B_{0c_2} + \gamma_{c_1c_2} \cdot B_{c_1c_2} + \gamma_{c_1s} \cdot B_{c_1s} + \gamma_{c_2s} \cdot B_{c_2s} - CH, \quad (7.1)$$

unde:

- $\gamma_{oc_1} = \frac{(\varepsilon_{00} + \varepsilon_{c_1c_1})}{2} - \varepsilon_{0c_1}$ este parametrul de tensiune interfacială mediu - celulă de tip 1
- $\gamma_{oc_2} = \frac{(\varepsilon_{00} + \varepsilon_{c_2c_2})}{2} - \varepsilon_{0c_2}$ este parametrul de tensiune interfacială mediu - celulă de tip 2
- $\gamma_{c_1c_2} = \frac{(\varepsilon_{c_1c_1} + \varepsilon_{c_2c_2})}{2} - \varepsilon_{c_1c_2}$ este parametrul de tensiune interfacială celulă de tip 1 - celulă de tip 2
- $\gamma_{0s} = \frac{\varepsilon_{00}}{2} - \varepsilon_{0s}$ este parametrul de tensiune interfacială mediu - substrat
- $\gamma_{c_1s} = \frac{\varepsilon_{c_1c_1}}{2} - \varepsilon_{c_1s}$ este parametrul de tensiune interfacială celulă de tip 1 - substrat
- $\gamma_{c_2s} = \frac{\varepsilon_{c_2c_2}}{2} - \varepsilon_{c_2s}$ este parametrul de tensiune interfacială celulă de tip 2 - substrat.
- $\varepsilon_{c_1c_1}$ este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1
- $\varepsilon_{c_2c_2}$ este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 2
- $\varepsilon_{c_1c_2}$ este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1 și celulele de tip 2
- ε_{0c_1} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1 și mediu
- ε_{0c_2} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 2 și mediu
- ε_{00} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre particulele de mediu
- ε_{0s} este parametru energetic ce măsoară interacțiunea dintre particulele de mediu și substrat
- ε_{c_1s} este parametru energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 1 și substrat
- ε_{c_2s} este parametrul energetic ce măsoară interacțiunea dintre celulele de tip 2 și substrat
- B_{0c_1} este numărul total de legături dintre mediu și celulele de tip 1

- B_{0c_2} este numărul total de legături dintre mediu și celulele de tip 2
- $B_{c_1c_2}$ este numărul total de legături dintre celulele de tip 1 și celulele de tip 2
- B_{0s} este numărul total de legături dintre mediu și particulele de biomaterial
- B_{c_1s} este numărul total de legături dintre celulele de tip 1 și substrat
- B_{c_2s} este numărul total de legături dintre celulele de tip 2 și substrat
- CH este valoarea energiei produsă de fenomenul de chemotaxie din sistem
Acceptarea mișcării se face cu probabilitatea [105]:

$$P = \min(1, \exp(-\Delta E / E_T)) \quad (7.2)$$

unde:

$$\Delta E = E_{nou} - E_{vechi} + \Delta Chemo \quad (7.3)$$

- E_{nou} - energia de adeziune a sistemului după efectuarea interschimbării,
- E_{vechi} - energia de adeziune a sistemului înainte de efectuarea interschimbării,
- $\Delta Chemo$ - diferența dintre valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie din zona afectată de după efectuarea mișcării și valoarea energiei asociate fenomenului de chemotaxie din zona afectată înainte de efectuarea mișcării. Algoritmul de calcul pentru $\Delta Chemo$ este prezentat în capitolul 3.
- E_T - este echivalentul energiei de agitație termică

Studiul *in silico* al însămânțării celulare a unei biomatrici care are încorporată o substanță chemoatractantă este bazat pe rularea unui anumit număr de pași Monte Carlo (MCS), pentru diferite valori ale următorilor parametri, considerați de intrare [105]:

- energia de coeziune dintre celule, \mathcal{E}_{cc}
- energia de adeziune dintre celule și substrat, \mathcal{E}_{cs}
- raza porilor, R
- raza orificiilor circulare care conectează porii, r
- concentrația minimă și maximă asociată gradientului de chemoatractant, $C1$ și $C2$ ($C2 > C1$)
- tăriile chemotactice asociate celor două tipuri de celule, $K1$ și $K2$

Pe baza configurațiilor intermediare obținute, se face o analiză a evoluției următorilor parametri, considerați de ieșire [105]:

- coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem (Z_{CM})
- concentrația de celule rămasă în suspensie

În primul set de simulări, am considerat modelul aferent sistemului biologic format dintr-un agregat celular aflat pe suprafața unei biomatrici cu pori sferici (Fig.

7.1A). Atât modelul, cât și simulările însămânțării celulare s-au realizat cu ajutorul aplicației de modelare și simulare a evoluției sistemelor multicelulare (SIMMMC) dezvoltate. Simulările constau în rularea a 500 000 de pași Monte Carlo (MCS), iar valorile parametrilor de intrare sunt prezentate în Tabelul 7.1 [105].

În scopul de a analiza influența chemoattractantului din biomatrice asupra vitezei și reușitei însămânțării celulare, am variat valorile tărilor chemotactice ($K1$, $K2$) asociate celor două tipuri de celule considerate în sistemul multicelular. Tăriile chemotactice $K1$ și $K2$ descriu măsura în care celulele de tip 1, respectiv de tip 2 tind să migreze de-a lungul gradientului de substanță chemoattractantă [105].

Tabel 7.1. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice poroasă care are încorporată o substanță chemoattractantă.

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	R	r	$C1$ (milimoli)	$C2$ (milimoli)	$K1$	$K2$	Figuri
1	1.4	5	2	1	10	0	0	Fig. 3A
1	1.4	5	2	1	10	400	400	Fig. 3B
1	1.4	5	2	1	10	700	700	Fig. 3C
1	1.4	5	2	1	10	1000	1000	Fig. 3D

În Fig. 7.2, se vizualizează configurațiile obținute după rularea a 400 000 MCS, pentru diverse valori ale lui $K1$ și $K2$. Se poate observa că dacă $K1=K2=0$ (caz în care chemoattractantul nu influențează deloc mișcarea celulelor), celulele înaintază lent spre adâncimea biomatricii. Pe măsură ce $K1$ și $K2$ iau valori mai mari, însămânțarea celulelor este mai rapidă, acestea reușind să se distribuie uniform în volumul biomatricii ($K1=K2=1000$) [105].

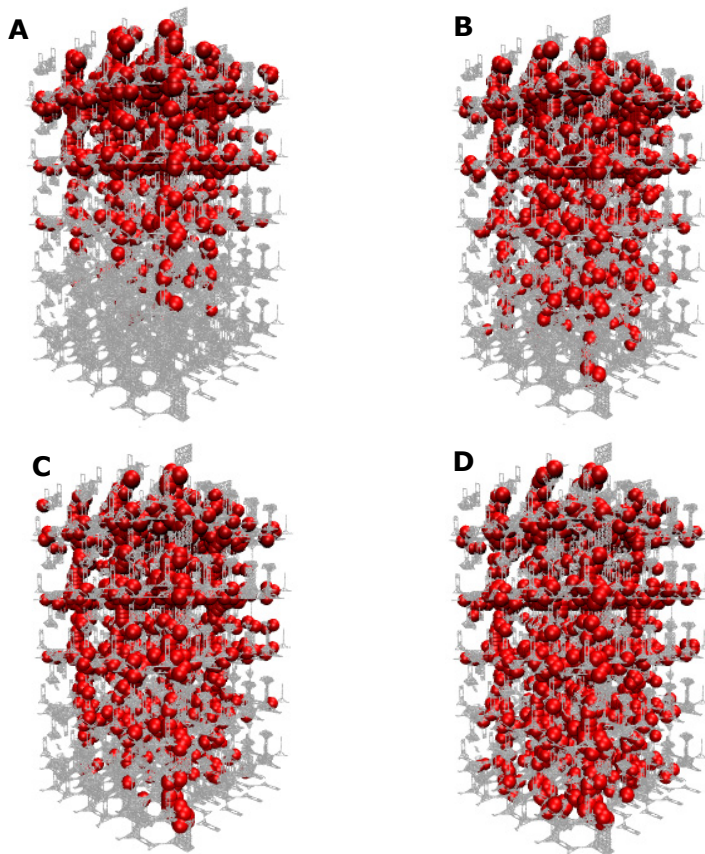


Fig. 7.2. Rezultatele însămânțării celulare obținute după rularea a 400 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 7.1).

Pentru a evidenția și mai clar influența tărilor chemotactice $K1$ și $K2$ asupra procesului de însămânțare, am prezentat în Fig. 7.3 evoluția treptată a agregatului celular în volumul biomatricei, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 7.1.

În liniile din Fig. 7.3, este descrisă evoluția agregatului celular în funcție de numărul de MCS rulați, la valori constante a lui $K1$ și $K2$. În coloanele din Fig. 7.3 sunt reprezentate configurațiile obținute după rularea unui anumit număr de MCS, pentru diferite valori ale lui $K1$ și $K2$. Se poate observa că, pe măsură ce $K1$ și $K2$ iau valori mai mari, după rularea aceluiași număr de MCS, însămânțarea celulelor în biomatrice este mai rapidă.

O analiză cantitativă a însămânțării celulare se face urmărind evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din întreg sistemul, pentru diferite valori ale lui $K1$ și $K2$. Se poate observa că, pe măsură ce $K1$ și $K2$ iau valori mai mari, coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem ia valori mai mici, indicând că tot mai multe celule pătrund spre adâncimea biomatricei. În cazul în care $K1$ și $K2$ au valoarea 1 000, încă de după rularea a 400 000 MCS, coordonata z a centrului de masă al celulelor din sistem este aproximativ egală cu valoarea 40, care reprezintă valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricei, indicând o distribuție uniformă a celulelor în biomatrice (Fig. 7.4).

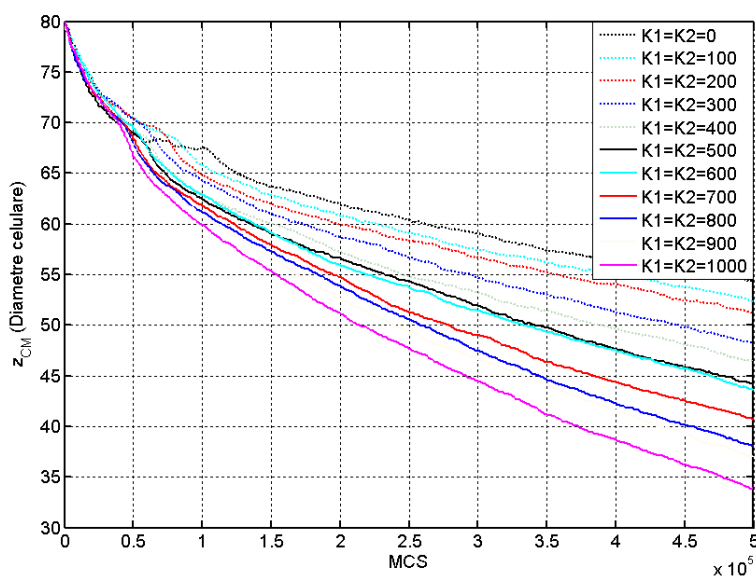


Fig. 7.4. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din biomatrice pentru diferite valori ale lui $K1$, $K2$.

După rularea a 500 000 MCS, în cazul în care $K1=K2=1\ 000$, se observă că valoarea coordonatei z a celulelor din sistem scade sub valoarea coordonatei z a centrului de masă al biomatricei. Acest lucru arată că celulele se atașează în proporție tot mai mare de straturile din adâncimea biomatricei.

Se poate concluziona că celulele tind să se deplaseze de-a lungul gradientului substanței chemoattractante într-o măsură direct proporțională cu valoarea tărilor chemotactice, $K1$ și $K2$.

În Fig. 7.5, este reprezentată evoluția fracțiunii de celule din afara biomatricei, pentru diferite valori ale constantelor $K1$, $K2$. Se poate observa că, pe măsură ce $K1$, $K2$ iau valori mai mari, celulele pătrund mai rapid în biomatrice.

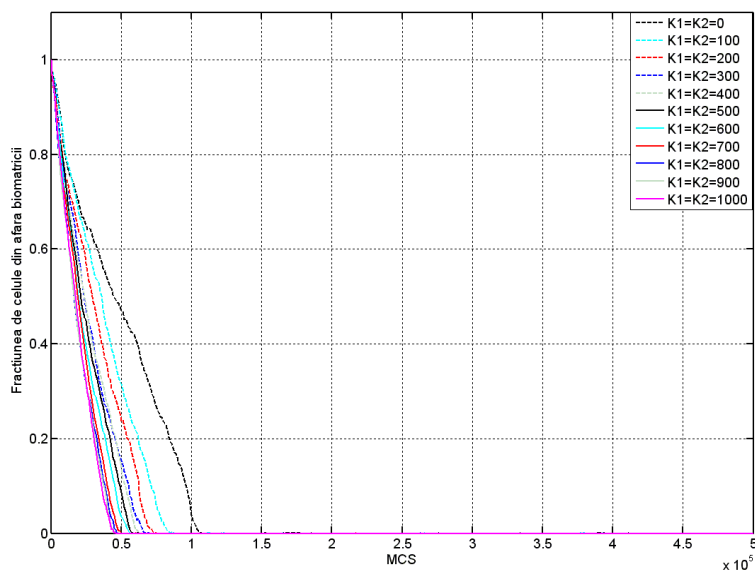


Fig. 7.5. Evoluția fracțiunii de celule din afara biomatrici pentru diferite valori ale lui $K1, K2$.

În Fig. 7.6 este reprezentată evoluția energiei medii de adeziune a sistemului pentru ultimii 1 000 de MCS rulați, la diverse valori ale lui $K1, K2$. Această reprezentare ne indică o descreștere liniară a energiei de adeziune a sistemului, pe măsură ce $K1, K2$ sunt mai mari, evidențiind efectul chemoattractantului și corectitudinea algoritmului realizat.

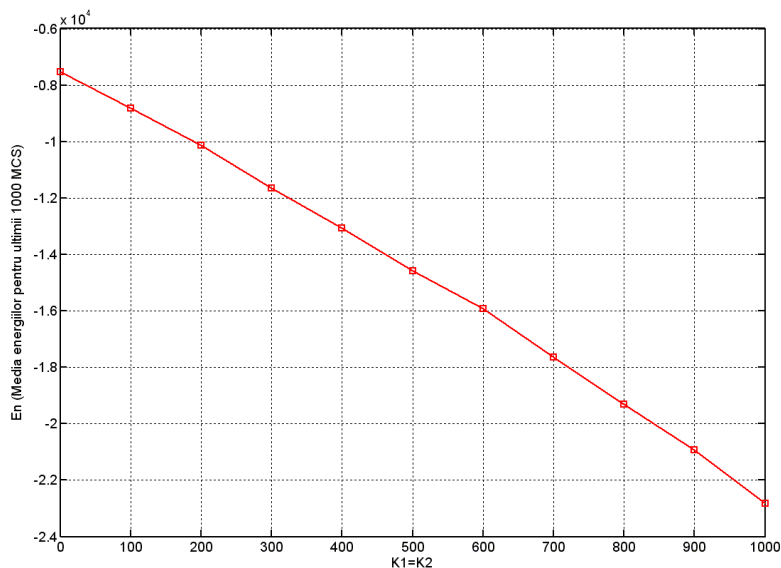


Fig. 7.6. Energia medie obținută pentru ultimii 1000 de MCS rulați, la diverse valori ale lui $K1, K2$.

Simulările însămânțării unui agregat celular pe o biomatrice poroasă cu pori sferici interconectați, având incorporată o substanță chemoatractantă au constat în rularea a 500 000 de MCS, timpul de rulare fiind aproximativ 7 ore.

În al doilea set de simulări, am considerat modelul aferent sistemului biologic format dintr-o suspensie de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici cu pori sferici interconectați (Fig. 7.1B) [105].

Simulările realizate presupun rularea a 500 000 MCS, cu parametrii de intrare prezentați în Tabelul 7.2.

Tabel 7.2. Valorile parametrilor de intrare în simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice poroasă care are încorporată o substanță chemoatractantă

\mathcal{E}_{cc}	\mathcal{E}_{cs}	R	r	$C1$	$C2$	$K1$	$K2$	Figuri
0	0.6	5	2	1	10	0	0	7A
0	0.6	5	2	1	10	200	200	7B
0	0.6	5	2	1	10	500	500	7C
0	0.6	5	2	1	10	1000	1000	7D
0	0.6	5	2	1	10	1300	1300	7E
0	0.6	5	2	1	10	1500	1500	7F

În Fig. 7.7, se vizualizează configurațiile obținute după rularea a 10 000 MCS, pentru diferite valori ale lui $K1$ și $K2$, prezentate în Tabelul 7.2. Se poate observa că, în cazul în care $K1$ și $K2$ au valoarea 1 000, deja de la rularea a 10 000 MCS, distribuția celulelor în volumul biomatricii este uniformă (Fig. 7.7D), iar dacă $K1$ și $K2$ iau valori mai mari decât 1 000, celulele tind tot mai mult să se lipească de straturile inferioare ale biomatricii (Fig. 7.7E, 7.7F). În cazul în care chemoatractantul nu influențează mișcarea celulelor ($K1=K2=0$), după rularea a 10 000 de MCS se observă că celulele nu ating o distribuție uniformă în biomatrice (Fig. 7.7A), procesul de însămânțare fiind mai lent.

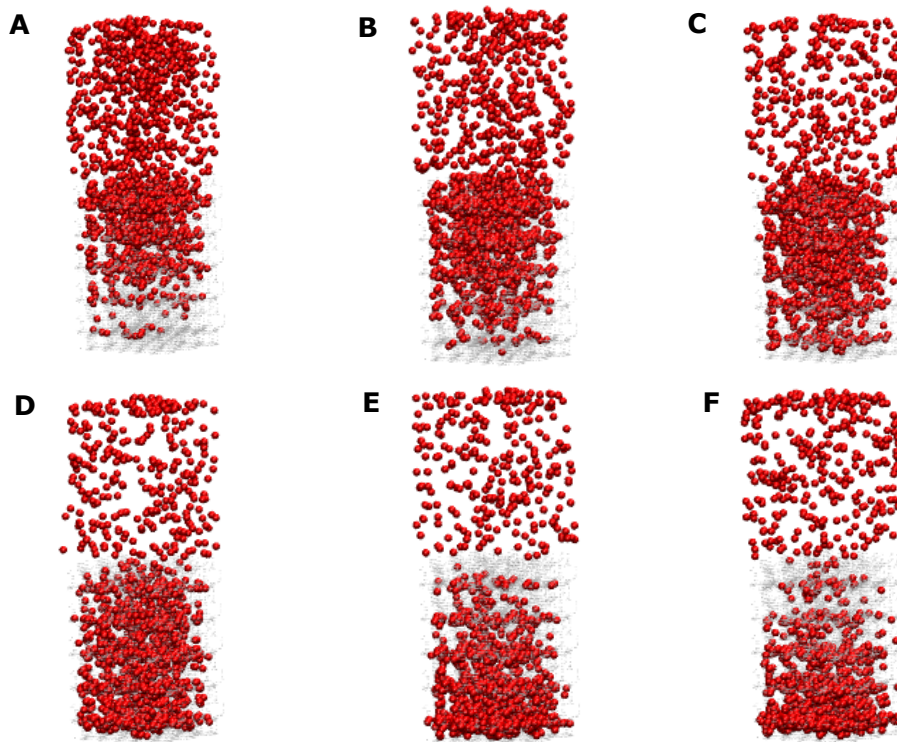


Fig. 7.7. Rezultatele însămânțării celulare obținute după rularea a 10 000 MCS (parametrii prezentați în Tabelul 7.2).

În Fig. 7.8, este reprezentată evoluția treptată a suspensiei de celule în volumul biomatrici, în condițiile de simulare prezentate în Tabelul 7.2, rândurile 1, 3, 4, 6.

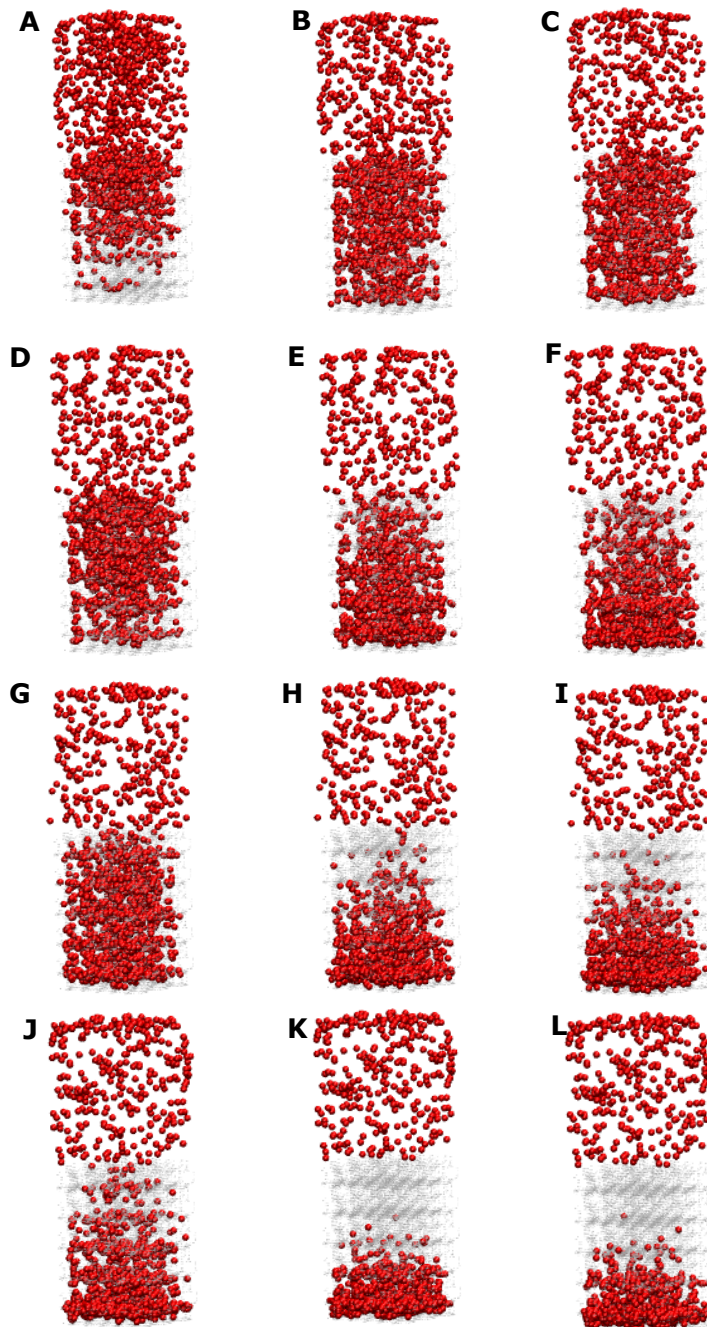


Fig. 7.8. Configurațiile obținute după rularea a 10 000 MCS (A, D, G, J): A. $K1=K2=0$; D. $K1=K2=500$; G. $K1=K2=1000$; J. $K1=K2=1500$. Configurațiile obținute după rularea a 30 000 MCS (B, E, H, K): B. $K1=K2=0$; E. $K1=K2=500$; H. $K1=K2=1000$; K. $K1=K2=1500$. Configurațiile obținute după rularea a 50 000 MCS (C, F, I, L): C. $K1=K2=0$; F. $K1=K2=500$; I. $K1=K2=1000$; L. $K1=K2=1500$.

Analizând coloanele din Fig. 7.8, se poate concluziona că și în cazul însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice, viteza de însămânțare este direct proporțională cu valorile tărilor chemotactice $K1$ și $K2$ ale celor două tipuri de celule considerate în sistem.

În Fig. 7.9 se prezintă evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din întreg sistemul, pentru diferite valori ale lui $K1$ și $K2$. Se observă că, dacă chemoatractantul nu influențează mișcarea celulelor ($K1=K2=0$), celulele ating o distribuție uniformă abia după rularea a aproximativ 40 000 MCS, în acest moment coordonata z a celulelor din sistem devenind egală cu coordonata z a biomatricii (având valoarea 40). Dacă $K1=K2=1\ 000$, se poate observa că, încă de la rularea a aproximativ 10 000 MCS, coordonata z a celulelor atinge valoarea 40, indicând o însămânțare uniformă în biomatrice.

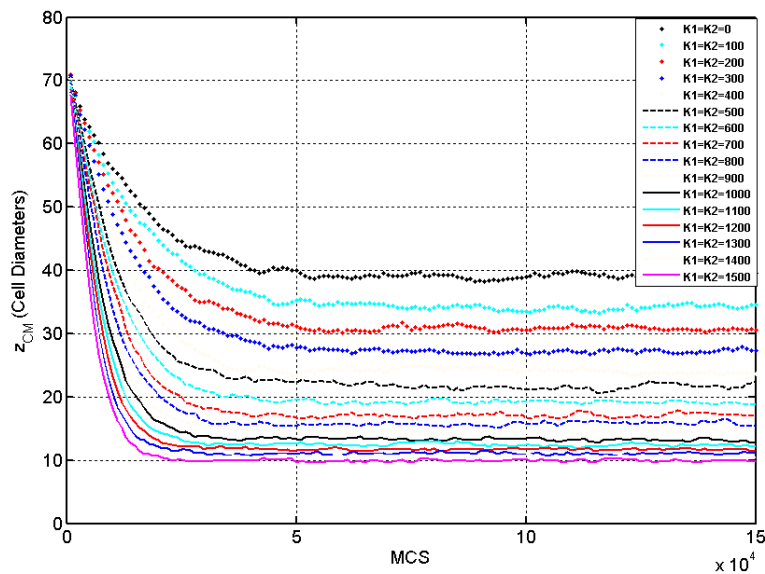


Fig. 7.9. Evoluția coordonatei z a centrului de masă al celulelor din biomatrice pentru diferite valori ale lui $K1$, $K2$.

Simulările însămânțării unei suspensii celulare pe o biomatrice poroasă cu pori sferici interconectați, având incorporată o substanță chemoatractantă au constat în rularea a 500 000 de MCS, timpul de rulare fiind aproximativ 5 ore.

7.3. Concluzii

Un mecanism morfogenetic cunoscut este chemotaxia, care constă în deplasarea celulelor de-a lungul unui gradient de concentrație a unei substanțe chimice care se află în mediul lor. Dat fiind că multe procese din morfogeneza tisulară presupun mișcarea celulară chemotactică [27,90] într-o direcție stabilită de un gradient de substanță chimică, în cadrul acestui capitol, am extins simulările realizate în capitolul precedent, luând în calcul și fenomenul de chemotaxie [105].

Astfel, am dezvoltat modele computaționale ale unui agregat celular, respectiv ale unei suspensii de celule, aflate în vecinătatea unei biomatrice poroase cu pori sferici interconectați care are încorporată o substanță chemoatractantă, reprezentată printr-un gradient de concentrație constant [105]. Pornind de la aceste modele, am simulat însămânțarea celulară a biomatricilor, luând în calcul pe lângă interacțiunile dintre elementele sistemului (adeziunea celulelor la substrat, respectiv coeziunea dintre celule) și fenomenul de chemotaxie, care influențează de asemenea mișcarea celulelor în sistem. Modelarea și simularea s-au făcut cu ajutorul aplicației originale SIMMMC adaptată fenomenului de chemotaxie [105].

Am considerat ca sistemul celular este alcătuit din două tipuri de celule diferite. În simulările realizate, am variat tăriile chemotactice, care descriu măsura în care celulele de un anumit tip tind să se deplaseze de-a lungul gradientului substanței chemoatractante, urmărind să identific influența chemoatractantului din biomatrice asupra vitezei de însămânțare. Am aflat că în aceleași condiții energetice și geometrice, pe măsură ce tăriile chemotactice ale celor două tipuri de celule iau valori mai mari, distribuția celulelor în adâncimea biomatricei are loc mai rapid.

Pe baza configurațiilor obținute, s-a făcut o analiză a evoluției coordonatei z a centrului de masă al celulelor din biomatrice, și a procentajului de celule ramase în suspensie.

Analiza însămânțării celulare s-a făcut atât cantitativ, oferindu-se tabele de valori și grafice de evoluție, cât și calitativ, prin vizualizări sugestive, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD [1].

Motivația acestui studiu rezultă din apariția unor tehnici solide de fabricare a biomatricilor cu microstructura dorită [113]. Aceste tehnici permit de asemenea încorporarea în biomatrice a unor concentrații de substanță chemoatractantă sau a unor factori de creștere, fie sub forma unor gradienti constanți de concentrație, fie sub forma unei concentrații care se eliberează în biomatrice prin difuzie [82,114,115].

Contribuțiile originale aduse în acest capitol sunt următoarele:

1. Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unor modele discretizate pe rețea ale unor sisteme biologice formate dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați care are încorporată o substanță chemoatractantă și (i) un agregat celular aflat pe suprafața biomatricei, respectiv (ii) o suspensie de celule aflată în vecinătatea biomatricei.
2. Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor simulări ale însămânțării celulare în biomatricele poroase, variind valorile tăriilor chemotactice asociate celor două tipuri de celule considerate în sistem și păstrând constante valorile parametrilor geometrici și energetici (s-a urmărit identificarea condițiilor chemotactice optime care conduc la o însămânțare uniformă și rapidă).
3. Efectuarea unei analize calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.
4. Efectuarea unei analize cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule rămase în suspensie în funcție de diferite valori ale tăriilor chemotactice asociate celor două tipuri de celule, realizate în MATLAB (s-a

putut observa că pe măsura ce acestea iau valori mai mari, celulele penetrează biomatricea tot mai rapid, iar distribuția celulelor are loc uniform în tot volumul biomatricii, putându-se concluziona că există o dependență liniară între viteza de însămânțare și valorile tărilor chemotactice $K1$, $K2$) [105].

5. Realizarea unei analize comparative între rezultatele simulărilor însămânțării celulare în care se ține cont doar de adeziune (simulare în care tăriile chemotactice s-au considerat nule) și rezultatele simulărilor însămânțării celulare în care se ține cont atât de adeziune, cât și de chemotaxie (s-a observat că procesul de însămânțare este accelerat atunci când mișcarea celulelor este guvernată atât de adeziune cât și de chemotaxie).

Înglobarea chemotaxiei în algoritmul Metropolis Monte Carlo de rezoluție celulară reprezintă un prim pas important spre dezvoltarea prezentei platforme de simulare pentru a analiza fenomenele care au loc în biomatrici care încorporează substanțe chemoattractante cu o distribuție controlată de fabricant. Asemenea biomatrici s-au realizat prin tehnici de tipărire tridimensională [46]. Simulările pe calculator vor avea ca obiect de studiu eliberarea chemoattractantului din materialul biomatricii și difuzia acestuia în mediul de cultură din biomatricea poroasă. Desigur, aceste fenomene ar conduce la gradienti de concentrație neconstanți și variabili în timp, dar răspunsul celular la acești gradienti va putea fi simulat cu algoritmul dezvoltat în această teză.

8. CONCLUZII

Prezenta teză de doctorat reprezintă chintesența unei munci de cercetare interdisciplinară desfășurată de autoare de-a lungul a 5 ani, într-un domeniu extrem de interesant și important, de mare actualitate și cert viitor, domeniul ingineriei tisulare. În acest vast domeniu, focalizarea autoarei a fost (i) pe modelarea elementelor ce intervin în dezvoltarea controlată a structurilor tisulare, a sistemelor formate din respectivele elemente și a procesului de dezvoltare tisulară controlată însuși, (ii) pe algoritmizarea acestei modelări, (iii) pe dezvoltarea unei aplicații informatice de realizare a modelării și de simulare a procesului de dezvoltare tisulară controlată și (iv) pe validarea acestei aplicații informatice și implicit a modelelor și algoritmilor pe care se bazează, prin simularea cu ajutorul ei a unui mare număr de procese de dezvoltare tisulară aferente unei diversități de sisteme biologice și compararea rezultatelor cu cele obținute *in vitro*.

Pe fiecare dintre aceste direcții de focalizare, autoarea a adus contribuții originale, care au fost valorificate prin generarea în jurul lor a **12 articole** (**11** ca prim autor), dintre care **1** este publicat într-o **revistă** de prestigiu, **ISI**, cu factor de impact **1.783**, iar **11** în volumele unor conferințe internaționale, indexate **ISI** (**1** dintre ele) și **BDI** (**8** dintre ele).

În cele ce urmează, se prezintă, mai întâi, sintetic, principalele contribuții originale, la nivel de ansamblu al tezei, iar apoi, analitic, contribuțiile în totalitatea lor, pe capitole.

Principalele contribuții originale aduse în cadrul tezei sunt:

1. **Realizarea unei analize** complexe a mecanismelor auto-organizării celulare, a modelelor computaționale ale morfogenezei *in vitro*, precum și a experimentelor utilizate pentru validarea acestor modele. Această analiză a făcut obiectul articolului autoarei "*Computer simulations of in vitro morphogenesis*", publicat în revista **Biosystems**, **cotată ISI, cu factor de impact 1.7**.
2. **Realizarea unei prezentări sintetice** originale a bazelor biofizice ale algoritmilor dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo.
3. **Elaborarea de modele** pentru suspensii, agregate celulare, plăci de biomaterial, biomatrici poroase, diferite sisteme biologice formate din acestea, precum și pentru procesul de dezvoltare tisulară aferent lor.
4. **Realizarea unei serii de îmbunătățiri** ale algoritmului Metropolis Monte Carlo, prin luarea în considerare a rezultatelor unor cercetări recente privitoare la mobilitatea celulară în sisteme tridimensionale alcătuite din celule și biomateriale.
5. **Concepția unei serii de algoritmi** dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare sub influența adeziunii, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo.
6. **Concepția unei serii de algoritmi** dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare sub influența adeziunii și chemotaxiei, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo.

7. **Propunerea unui nou parametru** de caracterizare a împrăștierii sistemelor multicelulare pe suprafața unor biomateriale (tensiunea interfacială celulă – substrat).
8. **Concepția funcționalităților** aplicației informatice SIMMMC, astfel încât aceasta să permită crearea facilă de modele computaționale pentru diferite tipuri de structuri tisulare artificiale și simularea fidelă a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale.
9. **Concepția arhitecturii** aplicației informatice SIMMMC.
10. **Concepția și descrierea modulelor** aplicației informatice SIMMMC, la nivel de detalii suport pentru implementare.
11. **Implementarea modulelor** aplicației informatice SIMMMC.
12. **Concepția și implementarea interfeței cu utilizatorul** a aplicației informatice SIMMMC.
13. **Generarea modelului** unui sistem biologic format dintr-un agregat celular alcătuit dintr-o populație de celule de același tip și o placă de biomaterial pe care se situează agregatul, **simularea fenomenului de împrăștiere celulară**, ținând cont de interacțiunile dintre celule, respectiv dintre celule și substrat, cu ajutorul aplicației informatice originale SIMMMC și **analiza comparată** a rezultatelor *in silico* cu cele *in vitro*.
14. **Generarea modelului** unui sistem biologic format dintr-un agregat celular alcătuit din două populații de celule diferite și o placă de biomaterial pe care se situează agregatul, simularea **fenomenului de auto-organizare a celor două populații de celule**, ținând cont de interacțiunile dintre celule, respectiv dintre celule și substrat, cu ajutorul aplicației SIMMMC și **analiza comparată** a rezultatelor *in silico* cu cele *in vitro*.
15. **Generarea modelului** unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați și o suspensie de celule aflată în vecinătatea ei și **simularea fenomenului de însămânțare celulară**, ținând cont de interacțiunile dintre celule, respectiv dintre celule și substrat și de geometria biomatricii, cu ajutorul aplicației SIMMMC.
16. **Generarea modelului** unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori cubici interconectați și o suspensie de celule aflată în vecinătatea ei și **simularea fenomenului de însămânțare celulară**, ținând cont de interacțiunile dintre celule, respectiv dintre celule și substrat și de geometria biomatricii, cu ajutorul aplicației SIMMMC.
17. **Generarea modelului** unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați și un agregat celular situat pe suprafața biomatricii și **simularea fenomenului de însămânțare a celulelor în biomatrice**, urmărind factorii energetici și geometrici care conduc la o însămânțare reușită, cu ajutorul aplicației SIMMMC.
18. **Generarea modelelor** unor sisteme biologice formate dintr-o biomatrice cu pori sferici interconectați care are încorporată o substanță chemoatractantă, reprezentată printr-un gradient de concentrație constant și (i) un agregat celular situat pe suprafața biomatricii, respectiv (ii) o suspensie celulară situată în vecinătatea biomatricii, și **simularea fenomenului de însămânțare celulară** în biomatrice, luând în calcul, pe lângă interacțiunile celulare (adeziunea dintre celule și substrat, respectiv coeziunea dintre celule), și fenomenul de chemotaxie, cu ajutorul aplicației SIMMMC.

În continuare, sunt prezentate contribuțiile aduse de teza de doctorat, în totalitatea lor, grupate pe capitole:

*În **capitolul 2**, dedicat aspectelor legate de ingineria tisulară, contribuțiile sunt:*

1. **Realizarea unui amplu studiu** privind abordările și direcțiile fundamentale din cadrul domeniului ingineriei tisulare -înlocuirea, repararea și regenerarea țesuturilor sau organelor-, cu evidențierea obiectivelor și importanței ingineriei tisulare, precum și a motivației modelării computaționale a fenomenelor de interes din ingineria tisulară.
2. **Realizarea unei analize** privind tratamentele în care propriile celule ale pacientului sunt recoltate și înmulțite înainte de a fi implantate, cu reliefaarea faptului că această abordare evită problemele imunologice întâlnite în transplantele tradiționale.
3. **Realizarea unui studiu critic** asupra plajei de produse acelulare, respectiv celulare utilizate pentru regenerarea sau înlocuirea unor țesuturi lezate, cu evidențierea problemelor nerezolvate ale domeniului.
4. **Elaborarea unei prezentări rezumative** a elementelor care stau la baza ingineriei tisulare: biomatricile, materialele biocompatibile utilizate în realizarea biomatricilor, celulele și biomoleculele, cu argumentarea oportunității utilizării metodelor biomecanicii și informaticii pentru îmbunătățirea calității substitutelor tisulare.
5. **Elaborarea unei sinteze sistematice** trecând în revistă pe de o parte mecanismele auto-organizării celulare, cu evidențierea rolului structurilor moleculare care intervin în procesul de adeziune celulară (integrine, caderine), iar pe de altă parte, fenomenele morfogenetice care intervin în dezvoltarea țesuturilor (chemotaxie, durtaxie, diviziune celulară, apoptoza).
6. **Realizarea unei analize critice** reliefând rolul ipotezei adeziunii diferențiate (DAH) ca principiu fundamental al embriologiei.
7. **Elaborarea unui studiu sintetic**, în abordare proprie, asupra principalelor modele computaționale de rezoluție celulară și subcelulară existente în literatură și **realizarea unei analize originale** a modelelor de rezoluție celulară (modele Random Walk, modele Monte Carlo și modele bazate pe celule individuale deformabile) și subcelulară (modelul Glazier – Graner – Hogeweg, modelul elementelor subcelulare), cu evidențierea avantajelor și dezavantajelor acestora, precum și a aplicabilității lor.
8. **Realizarea unei analize** asupra experimentelor de validare a modelelor computaționale ale auto-organizării sistemelor multicelulare: sortarea celulară, împrăștierea celulelor pe suprafața unor materiale biocompatibile și fuziunea tisulară (un model computațional este considerat valid dacă conduce la rezultate ce corespund datelor experimentale, cel puțin sub aspect calitativ; în cazul unei potriviri și cantitative, modelul computațional poate fi validat prin identificarea valorilor obținute în simulări cu valorile corespunzătoare măsurate în experimente).

*În **capitolul 3**, dedicat prezentării modelelor computaționale și algoritmilor dezvoltați pentru studiul evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale, contribuțiile sunt:*

1. **Construirea modelului** computațional al unei suspensii celulare, model care este dezvoltat pe o rețea și prevede mai multe tipuri de celule localizate în poziții aleatoare, în concentrație volumică precizată de utilizator.

2. **Construirea modelului** computațional al unui agregat celular aflat în mediu de cultură.
3. **Construirea modelelor** computaționale ale unor structuri alcătuite din materiale biocompatibile: plăci de biomaterial, biomatrice de structură poroasă cu pori cubici, respectiv sferici.

Observație:

Pentru fiecare model, s-au prezentat: o descriere a modelului, schema bloc a procesului de modelare, cu evidențierea parametrilor de intrare și ieșire, algoritmul de generare a modelului în pseudocod și o vizualizare 3D realizată cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD. Modelele distincte au fost concatenate astfel încât să se obțină modelele computaționale ale unor sisteme biologice utilizate în aplicații de inginerie tisulară: (i) agregat celular – placă de biomaterial, (ii) suspensie celulară – biomatrice cu pori sferici, (iii) suspensie celulară – biomatrice cu pori cubici, (iv) agregat celular – biomatrice cu pori sferici și a fost prezentat algoritmul de generare a lor.

4. **Elaborarea unei prezentări** în manieră originală a bazelor biofizice ale algoritmilor dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo.
5. **Dezvoltarea unei serii de algoritmi** dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare sub influența adeziunii, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo:
 - (i) algoritmul principal
 - (ii) algoritmul de calcul al energiei totale de adeziune a sistemului biologic
 - (iii) algoritmul de detectare a celulelor capabile de migrare
 - (iv) algoritmul de detectare a vecinilor disponibili pentru migrare
 - (v) algoritmul de calcul al energiei de adeziune în zona afectată
 - (vi) algoritmul propriu-zis Metropolis Monte Carlo.
6. **Generarea unei serii de îmbunătățiri** ale algoritmului Metropolis Monte Carlo clasic, utilizat în biologie, ținând cont de rezultatele unor cercetări recente privitoare la mobilitatea celulară în sisteme tridimensionale alcătuite din celule și biomateriale, după cum urmează:
 - (i) extinderea modelului cu noduri de rețea asociate unor structuri de biomateriale
 - (ii) definirea proprietăților interfeței celulă – biomaterial
 - (iii) definirea tensiunii interfaciale celulă – biomaterial, în termenii energiilor de interacțiune celulă – celulă, respectiv celulă – substrat
 - (iv) restricționarea modificărilor aleatoare ale sistemului la mișcări posibile din punct de vedere biologic (celulele se mișcă doar de-a lungul interfețelor, putând să-și interschimbe poziția doar cu alte tipuri de celule sau cu elemente de volum de mediu, nefiind permisă interschimbarea cu particule de biomaterial).
7. **Dezvoltarea unei serii de algoritmi** dedicați studiului evoluției sistemelor multicelulare sub influența adeziunii și chemotaxiei, având drept suport metoda Metropolis Monte Carlo:
 - (i) algoritmul de calcul al concentrației de chemoattractant pe fiecare strat al biomatricei
 - (ii) algoritmul de calcul al energiei asociate fenomenului de chemotaxie
 - (iii) algoritmul de calcul al energiei totale a sistemului biologic ținând cont atât de adeziune cât și de chemotaxie

- (iv) algoritmul de calcul al diferenței energiilor produse de chemotaxie în zona afectată de mișcare
 - (v) algoritmul propriu-zis Metropolis Monte Carlo adaptat fenomenului de chemotaxie.
8. **Dezvoltarea unei serii de algoritmi** dedicați MATLAB pentru analiza rezultatelor simulărilor:
- (i) algoritm de calcul al numărului de celule atașate la biomaterial
 - (ii) algoritm de fitare a datelor referitoare la numărul de celule atașate la biomaterial în funcție de MCS
 - (iii) algoritm de monitorizare a vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat în funcție de $\varepsilon_{cs} / \varepsilon_{cc}$
 - (iv) algoritm de monitorizare a vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat în funcție de $-\gamma_{cs}$
 - (v) algoritm de calcul a valorii medii a numărului de celule atașate și a deviației standard a acestei valori
 - (vi) algoritm de monitorizare a numărului de legături dintre elementele interfaciale de tip C1C2, C1S, C2S
 - (vii) algoritm de calcul și monitorizare a concentrației de celule din suspensie
 - (viii) algoritm de calcul și monitorizare a centrului de masă al celulelor care au pătruns în biomatrice
 - (ix) algoritm de calcul și monitorizare a centrului de masă al celulelor din întregul sistem
 - (x) algoritm de calcul și monitorizare a energiei medii de adeziune.

Observație:

Algoritmii dezvoltați în acest capitol au fost prezentați explicit, în limbaj pseudocod, reliefând astfel fluxul logic al operațiilor și oferind un material implementabil în orice limbaj de programare.

În **capitolul 4**, dedicat prezentării aplicației informatice originale SIMMMC de modelare și simulare a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale, contribuțiile sunt:

1. **Conceptia funcționalităților** aplicației informatice originale SIMMMC, astfel încât aceasta să permită crearea facilă de modele computaționale pentru diferite tipuri de structuri tisulare artificiale și simularea fidelă a evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomateriale:
 - (i) funcționalitatea de generare a modelului unui agregat celular situat pe suprafața plană a unei plăci de biomaterial de formă paralelipipedică
 - (ii) funcționalitatea de generare a modelului unei suspensii de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu pori sferici
 - (iii) funcționalitatea de generare a modelului unei suspensii de celule aflată în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă cu pori cubici
 - (iv) funcționalitatea de generare a modelului unui agregat celular aflat în vecinătatea unei biomatrici de structură poroasă
 - (v) funcționalitatea de simulare a împrăstierii unui agregat celular format dintr-un singur tip de celule pe suprafața unei plăci de biomaterial
 - (vi) funcționalitatea de simulare a evoluției unui agregat celular format din două populații diferite de celule pe suprafața unei plăci de biomaterial
 - (vii) funcționalitatea de simulare a însămânțării unei suspensii celulare care conține una sau două populații diferite de celule într-o biomatrice poroasă

- (viii) funcționalitatea de simulare a însămânțării unei suspensii de celule într-o biomatrice poroasă având încorporată o substanță chemoattractantă
 - (ix) funcționalitatea de simulare a însămânțării unui agregat celular într-o biomatrice poroasă
 - (x) funcționalitatea de simulare a însămânțării unui agregat celular într-o biomatrice poroasă având încorporată o substanță chemoattractantă.
2. **Concepția arhitecturii** aplicației SIMMMC.
3. **Concepția și descrierea modulelor** aplicației SIMMMC, la nivel de detalii suport pentru implementare (diagrame de activitate UML):
- (i) modulul generare modele computaționale asociate sistemelor biologice:
 - modulul preluare parametri de intrare
 - modulul calcul distribuție chemoattractant pe straturi
 - modulul generare matrice suspensie celulară/agregat celular
 - modulul generare matrice biomatrice/biomaterial
 - modulul formare matrice sistem biologic
 - modulul salvare matrice sistem biologic în format .xyz
 - (ii) modulul racordare modul simulare la modulul generare modele
 - (iii) modulul simulare computațională Metropolis Monte Carlo (MMC) a evoluției sistemelor multicelulare:
 - modulul preluare parametri de intrare
 - modulul calcul energie asociată fenomenului de chemotaxie
 - modulul calcul energie inițială a sistemului
 - modulul determinare legături între elementele sistemului
 - modulul implementare algoritm MMC.
4. **Implementarea modulelor** aplicației SIMMMC.
5. **Concepția și implementarea interfeței** cu utilizatorul a aplicației SIMMMC.

Observatii:

A. Aplicația SIMMMC aduce următoarele elemente de noutate:

- (i) *Permite modelarea nu numai a unor agregate celulare, ci și a unor suspensii celulare de diferite concentrații.*
- (ii) *Permite modelarea nu numai a biomatricilor cu pori cubici, ci și a biomatricilor cu pori sferici interconectați, având ca parametri geometrici independenți raza porilor și raza orificiilor dintre pori.*
- (iii) *Permite simularea evoluției a diferite sisteme multicelulare (suspensii celulare, respectiv agregate celulare) în vecinătatea unor structuri formate din materiale biocompatibile (biomatrici cu pori cubici, biomatrici cu pori sferici interconectați și plăci de biomaterial) pe baza metodei MMC adaptată original în acord cu observațiile experimentale referitoare la motilitatea celulelor. Celulele se pot mișca doar prin interschimbarea de poziție cu celule de alt tip sau cu elemente de volum de mediu, nu și cu particule de biomaterial.*
- (iv) *Calculează energia de adeziune a sistemului, ținând cont, pe lângă tensiunea interfacială dintre celulele de diferite tipuri și tensiunea interfacială dintre celule și mediu și de tensiunea interfacială dintre celule și substrat.*
- (v) *Permite simularea evoluției sistemelor multicelulare în vecinătatea unor biomatrici poroase pe baza metodei MMC cu luarea în considerare a fenomenului de chemotaxie.*
- (vi) *Permite ca o simulare care nu dă rezultate satisfăcătoare să fie continuată cu noi pași Monte Carlo, pornind de la configurația finală obținută în cadrul ei. Această opțiune este deosebit de utilă, având în*

vedere că nu trebuie să rulăm de la început de fiecare dată un anumit număr de pași Monte Carlo – de regulă de ordinul sutelor de mii -, ci putem să continuăm din punctul în care am rămas, economisind timp.

(vii) SIMMMC este singura aplicație integrată de tip Metropolis Monte Carlo (MMC) de rezoluție celulară, care permite modelarea și simularea evoluției unor structuri tisulare artificiale care includ și biomateriale, ținând cont pe lângă interacțiunile celulă – celulă, celulă – mediu și de interacțiunile celulă – substrat. Așa cum Compu Cell 3D oferă o platformă de implementare a modelului GGH, aplicația SIMMMC oferă o platformă de implementare a modelului MMC.

B. Aplicația SIMMMC este mai rapidă decât aplicațiile de rezoluție subcelulară (cum ar fi Compu Cell 3D) deoarece ea se bazează pe algoritmul MMC, având ca pas elementar interschimbarea poziției unei celule cu vecinii săi de tip diferit. Astfel, aplicația permite simularea evoluției unor structuri tisulare artificiale care includ milioane de celule.

C. Aplicația SIMMMC este flexibilă, permițând cu ușurință dezvoltarea unor noi module care să genereze modele computaționale și pentru alte tipuri de sisteme biologice.

În **capitolul 5**, dedicat studiului computațional al evoluției sistemelor multicelulare pe suprafața unor biomateriale, contribuțiile sunt:

1. **Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model** discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o placă de biomaterial și un agregat celular constituit dintr-un singur tip de celule, situat pe suprafața plăcii de biomaterial.
2. **Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări** ale evoluției agregatului celular pe placa de biomaterial:
 - (i) considerând coeziunea dintre celule constantă și variind adeziunea dintre celule și substrat, în vederea identificării influenței adeziunii celulă – substrat asupra împrăstierii (s-au considerat 4 valori pentru energia de adeziune celulă – substrat)
 - (ii) măririi coeziunea dintre celule și variind adeziunea dintre celule și substrat, în vederea determinării influenței coeziunii dintre celule asupra împrăstierii (s-au considerat 4 valori pentru energia de coeziune celulă – celulă și 4 valori pentru energia de adeziune celulă – substrat)
 - (iii) considerând coeziunea dintre celule foarte mică și variind adeziunea dintre celule și substrat, în vederea determinării dacă o coeziune mică determină că împrăștierea să fie mai rapidă sau să eșueze (s-au considerat 4 valori pentru energia de adeziune celulă – substrat)
 - (iv) considerând adeziunea dintre celule și substrat constantă și variind coeziunea dintre celule, în vederea identificării influenței coeziunii celulă – celulă asupra împrăstierii (s-au considerat 11 valori pentru energia de coeziune celulă – celulă).
3. **Delimitarea domeniului parametrilor de model** prin simulări repetate, în așa fel încât rezultatele simulărilor să fie în acord cel puțin calitativ cu rezultatele experimentale.
4. **Determinarea numărului de pași Monte Carlo necesari** pentru ca sistemul să atingă starea de echilibru, prin rularea unui număr mare de simulări. Acest număr de pași Monte Carlo depinde atât de configurația sistemului, cât și de

parametrii energetici ai modelului. Fiecare simulare din acest subcapitol a constat în rularea a 100 000 de pași Monte Carlo.

5. **Efectuarea unei analize** calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.
6. **Efectuarea unei analize** cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masa al celulelor, a numărului de celule atașate pe biomaterial și a vitezei de împrăștiere a celulelor în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.
7. **Realizarea unui set de simulări** ale experimentelor lui Ryan et al. [92], în condiții de intrare similare celor din experimente.
8. **Realizarea unei analize** comparative între rezultatele simulărilor și rezultatele experimentale [92], concluzionând că se afla în acord calitativ.
9. **Realizarea reprezentării grafice** a evoluției vitezei de împrăștiere a patru tipuri de agregate celulare de diferite coezivități, pe 10 substraturi sintetice de diferite adezivități în funcție de raportul dintre energia de adeziune celulă - substrat și energia de coeziune celulă - celulă, în vederea validării rezultatelor obținute și, implicit, a părții din aplicația SIMMMC implicate.

Observatie:

Pentru reprezentarea cât mai exactă a graficului vitezelor, dat fiind că metoda Metropolis Monte Carlo are la bază generarea de numere aleatoare, s-au realizat câte 10 repetări pentru fiecare simulare considerată (în total 400 de simulări, constând în rularea a 100 000 de pași Monte Carlo fiecare). S-a reprezentat evoluția numărului de celule atașate pe substrat în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați în aceste repetări ale fiecărei simulări considerate și s-a calculat valoarea medie a numărului de celule atașate și deviația standard față de această valoare. Pentru calculul vitezei de împrăștiere a celor 4 agregate pe substraturi de diferite adezivități, s-a luat în calcul valoarea medie a numărului de celule atașate, pentru fiecare din cele 40 de simulări. Analiza statistică a rezultatelor oferă o măsură a influenței generatorului de numere pseudo-aleatoare asupra concluziilor desprinse din simulări.

10. **Realizarea unei analize comparative** între graficul vitezelor realizat în MATLAB pe baza rezultatelor simulărilor și graficul vitezelor determinate experimental de Lauffenburger et al. [93], obținându-se un acord fidel, validând astfel aplicația originală SIMMMC.
11. **Realizarea reprezentării grafice** a evoluției vitezei de împrăștiere a patru tipuri de agregate celulare de diferite coezivități, pe 10 substraturi sintetice de diferite adezivități în funcție de valoarea tensiunii interfaciale celulă - substrat. Analiza comparativă a graficelor vitezei de împrăștiere în funcție de raportul dintre energii, respectiv în funcție de tensiunea interfacială celulă - substrat, arată că rezultatele obținute sunt similare, neputându-se diferenția care parametru este mai relevant pentru caracterizarea vitezei de împrăștiere a celulelor pe substrat.

Observatie:

*S-a analizat evoluția unui agregat celular pe suprafața unei plăci de biomaterial atât în termeni de energii de adeziune și de coeziune, cât și în termeni de tensiune interfacială celulă - mediu, respectiv tensiune interfacială celulă - substrat (egală cu diferența dintre jumătate din energia de coeziune și energia de adeziune). **Tensiunea interfacială celulă - substrat reprezintă un element de noutate introdus de autoare în***

cadrul studiilor împrăstierii celulare, punând într-o lumină nouă competiția dintre adeziune și coeziune în timpul împrăstierii celulare.

12. **Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o placă de biomaterial și un agregat celular constituit din două populații de celule diferite, situat pe suprafața plăcii de biomaterial.**
13. **Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări** ale reorganizării a două populații de celule de coezivități diferite, pe suprafața unui substrat sintetic de diferite adezivități:
 - (i) considerând celulele de tip 1 de coezivitate mare, celulele de tip 2 de coezivitate mai mică și adezivitatea substratului mică. Simularea a constat în rularea a 50 000 MCS
 - (ii) considerând celulele de tip 1 de coezivitate mare, celulele de tip 2 de coezivitate mai mică și adezivitatea substratului medie. Simularea a constat în rularea a 200 000 MCS
 - (iii) considerând celulele de tip 1 de coezivitate mare, celulele de tip 2 de coezivitate mai mică și adezivitatea substratului mare. Simularea a constat în rularea a 200 000 MCS.
14. **Efectuarea unei analize calitative** a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.
15. **Realizarea unei analize comparative** între rezultatele obținute și rezultatele prezentate în experimentele reorganizării a două populații de celule (hepatice și endoteliale) din Lauffenburger et al. [93], care a condus la concluzia că reorganizarea celor două populații de celule în simulările noastre este în acord cu reorganizarea celor două populații de celule considerate în experimentele de laborator [93], în condiții de intrare sa respective similare. Această concluzie validează partea din aplicația informatică originală SIMMMC privitoare la modelarea și simularea reorganizării a două populații diferite de celule pe substraturi de diferite adezivități.
16. **Efectuarea unei analize cantitative** a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a numărului de legături dintre celulele de diferite tipuri, respectiv dintre celulele de diferite tipuri și substrat, în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.
17. **Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări** ale reorganizării a două populații de celule de coezivități diferite, pe suprafața unui substrat sintetic de diferite adezivități, cu constrângerea parametrilor de intrare sa respecte relațiile lui Foty et al. [109] referitoare la reorganizarea moleculelor într-un lichid.
18. **Realizarea unor analize calitative și cantitative, comparate,** ale rezultatelor, cu evidențierea concluziei că reorganizarea celulelor într-un sistem celular are loc pe baza aceluiași principii ca și reorganizarea moleculelor într-un lichid, urmărindu-se minimizarea energiei de adeziune a sistemului, ceea ce reprezintă o nouă validare a aplicației SIMMMC.

Observație:

Modelarea unui astfel de sistem biologic și simularea organizării a diferite populații de celule in vitro este de real interes, furnizând informații cercetătorilor de laborator cu privire la caracteristicile care guvernează dinamica celulară în cadrul structurilor tisulare.

În **capitolul 6**, dedicat studiului computațional al însămânțării celulare a biomatricilor de structură poroasă, contribuțiile sunt:

1. **Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați și o suspensie de celule aflată în vecinătatea biomatricii.**
2. **Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale însămânțării suspensiei de celule pe biomatricea poroasă:**
 - (i) considerând coeziunea dintre celule nulă și adeziunea celulă – substrat constantă. S-au identificat condițiile energetice care conduc la o distribuție uniformă a celulelor în biomatrice. S-a pornit de la o biomatrice care are raza porilor egală cu 8 diametre celulare și raza orificiilor care conectează porii egală cu 2 diametre celulare
 - (ii) variind coeziunea dintre celule și păstrând adeziunea celulă – substrat constantă, urmărind determinarea influenței coeziunii dintre celule asupra însămânțării (s-au considerat 3 valori pentru energia de coeziune celulă – celulă)
 - (iii) considerând o coeziune celulă – celulă foarte mare și o adeziune celulă – substrat foarte mică
 - (iv) considerând valorile energetice optime (care au condus la o însămânțare uniformă) și variind raza orificiilor care conectează porii, în vederea identificării geometriei biomatricii care asigură o însămânțare rapidă și uniformă (s-au considerat 4 valori pentru raza orificiilor care conectează porii, raza porilor fiind egală cu 8 diametre celulare).
3. **Efectuarea unei analize calitative a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.**
4. **Efectuarea unei analize cantitative a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule rămase în suspensie în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.**
5. **Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori cubici interconectați și o suspensie de celule aflată în vecinătatea biomatricii.**
6. **Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări ale însămânțării suspensiei de celule pe biomatricea poroasă:**
 - (i) variind latura porilor cubici (5 diametre celulare - în primul set de simulări, 10 diametre celulare - în al doilea set de simulări, și 15 diametre celulare - în al treilea set de simulări), în vederea determinării celei mai potrivite arhitecturi a biomatricii care să conducă la o însămânțare uniformă și rapidă
 - (ii) variind, pentru fiecare arhitectură de biomatrice, coeziunea dintre celule și considerând adeziunea celulă – substrat constantă (s-au considerat 3 valori pentru energia de coeziune celulă – celulă). Coeziunea nulă între celule conduce la o distribuție uniformă a acestora în volumul biomatricii.
 - (iii) considerând, pentru fiecare arhitectură de biomatrice, o coeziune celulă – celulă foarte mare și o adeziune celulă – substrat foarte mică.

7. **Efectuarea unei analize calitative** a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.
8. **Efectuarea unei analize cantitative** a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule rămase în suspensie în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.
9. **Realizarea unei analize comparate** între rezultatele studiului însămânțării unei biomatrice poroase cu pori sferici, respectiv unei biomatrice poroase cu pori cubici.
10. **Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unui model discretizat** pe rețea al unui sistem biologic format dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici interconectați și un agregat celular situat pe suprafața biomatricei.
11. **Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor seturi de simulări** ale însămânțării agregatului celular pe biomatricea poroasă:
 - (i) considerând coeziunea constantă și variind adeziunea celulă – substrat, în vederea determinării influenței adeziunii celulă – substrat asupra însămânțării (s-au considerat 8 valori pentru adeziunea celulă – substrat și s-a pornit de la o biomatrice care are raza porilor egală cu 5 diametre celulare și raza orificiilor care conectează porii egală cu 2 diametre celulare)
 - (ii) considerând valorile optime pentru parametrii energetici, determinate în simulările anterioare și variind raza orificiilor care conectează porii (s-au considerat 3 valori pentru raza orificiilor care conectează porii, raza porilor fiind egală cu 8 diametre celulare).
12. **Efectuarea unei analize calitative** a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.
13. **Efectuarea unei analize cantitative** a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule rămase în suspensie în funcție de numărul de pași Monte Carlo rulați, realizate în MATLAB.

*În **capitolul 7**, dedicat studiului computațional al interacțiunii dintre adeziune și chemotaxie în procesul de însămânțare a biomatricilor poroase din ingineria tisulară care au încorporată o substanță chemoattractantă, contribuțiile sunt:*

1. **Generarea, cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a unor modele discretizate** pe rețea ale unor sisteme biologice formate dintr-o biomatrice de structură poroasă cu pori sferici care are încorporată o substanță chemoattractantă și (i) un agregat celular aflat pe suprafața biomatricei, respectiv (ii) o suspensie de celule aflată în vecinătatea biomatricei.
2. **Conceperea și realizarea cu ajutorul aplicației originale SIMMMC, a mai multor simulări** ale însămânțării celulare în biomatricile poroase, variind valorile tărilor chemotactice asociate celor două tipuri de celule considerate în sistem și păstrând constante valorile parametrilor geometrici și energetici (s-a urmărit identificarea condițiilor chemotactice optime care conduc la o însămânțare uniformă și rapidă).

3. **Efectuarea unei analize calitative** a rezultatelor, pe baza vizualizărilor grafice ale configurațiilor obținute, realizate cu ajutorul programului de grafică moleculară VMD.
4. **Efectuarea unei analize cantitative** a rezultatelor, pe baza graficelor de evoluție a coordonatei z a centrului de masă al celulelor și a procentajului de celule rămase în suspensie în funcție de diferite valori ale tărilor chemotactice asociate celor două tipuri de celule, realizate în MATLAB (s-a putut observa că pe măsura ce acestea iau valori mai mari, celulele penetrează biomatricea tot mai rapid, iar distribuția celulelor are loc uniform în tot volumul biomatricii, putându-se concluziona că există o dependență liniară între viteza de însămânțare și valorile tărilor chemotactice $K1, K2$ [105]).
5. **Realizarea unei analize comparative** între rezultatele simulărilor însămânțării celulare în care se ține cont doar de adeziune (simulare în care tăriile chemotactice s-au considerat nule) și rezultatele simulărilor însămânțării celulare în care se ține cont atât de adeziune, cât și de chemotaxie (s-a observat că procesul de însămânțare este accelerat atunci când mișcarea celulelor este guvernată atât de adeziune cât și de chemotaxie).

Observație:

Înglobarea chemotaxiei în algoritmul Metropolis Monte Carlo de rezoluție celulară reprezintă un prim pas important spre dezvoltarea prezentei platforme de simulare pentru a analiza fenomenele care au loc în biomatrici care încorporează substanțe chemoattractante cu o distribuție controlată de fabricant. Asemenea biomatrici s-au realizat prin tehnici de tipărire tridimensională (Holister 2005). Simulările pe calculator vor avea ca obiect de studiu eliberarea chemoattractantului din materialul biomatricii și difuzia acestuia în mediul de cultură din biomatricea poroasă. Desigur, aceste fenomene ar conduce la gradienti de concentrație neconstanți și variabili în timp, dar răspunsul celular la acești gradienti va putea fi simulat cu algoritmul dezvoltat în această teză.

Reliefăm faptul că, dincolo de utilitatea lor în domeniul medical, multitudinea de modelări și simulări realizate în cadrul doctoraturii și înglobate în teză au rolul de a valida suportul matematic folosit, algoritmi elaborați și aplicația informatică originală dezvoltată de autoare în cadrul doctoraturii.

Simulările MMC din literatură descriu mișcarea celulelor în mediul lor de cultură, dar nu se ocupă de interacțiunea acestora cu biomaterialele utilizate în ingineria tisulară. Un important element de noutate adus de această teză este dezvoltarea unor algoritmi pentru simularea evoluției unor structuri multicelulare în vecinătatea unor materiale biocompatibile. Acești algoritmi au făcut posibilă analiza computațională a procesului de însămânțare celulară a biomatricilor de diferite arhitecturi utilizate în ingineria tisulară. Pentru prima oară, după cunoștințele autoarei, s-a realizat un studiu computațional al însămânțării celulare în diferite condiții energetice, geometrice și chimice.

Deși explică competiția dintre energiile de interacțiune celulă - celulă și celulă - substrat, studiul efectuat privind însămânțarea celulară a biomatricilor utilizate în ingineria tisulară este unul aproximativ, având în vedere că acest algoritm nu poate descrie mișcarea rapidă a agregatelor celulare în suspensia agitată. Dezvoltările ulterioare ale cadrului computațional propus vor trebui să încorporeze un algoritm hibrid capabil să diferențieze motilitatea celulară individuală pe un substrat de mișcarea celulelor și a agregatelor celulare în mediul de cultură. O

astfel de dezvoltare este cu atât mai atrăgătoare cu cât ar permite simularea înșămânțării celulare cu ajutorul unor tehnici de perfuzare forțată [116].

Dezvoltări ulterioare ale platformei computaționale realizate în această teză ar putea include algoritmi pentru a descrie proliferarea celulelor, moartea celulară, degradarea biomaterialului, eliberarea de chemoattractanți din biomaterial și sinteza de matrice extracelulară.

BIBLIOGRAFIE

- [1] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *Journal of Molecular Graphics* 14 (1996) 33-38.
- [2] M.S. Steinberg, Differential adhesion in morphogenesis: a modern view, *Current Opinion in Genetics & Development* 17 (2007) 281-286.
- [3] U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, H.P. Wiesmann, (Eds.), *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, 2009.
- [4] J.J. Mao, G. Vunjak-Novakovic, A.G. Mikos, A. Atala, (Eds.), *Translational Approaches in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Artech House, Boston, 2008.
- [5] A. Neagu, I. Kosztin, K. Jakab, B. Barz, M. Neagu, R. Jamison, G. Forgacs, Computational modeling of tissue self-assembly, *Modern Physics Letters B* 20 (2006) 1217-1231.
- [6] http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_engineering, Tissue Engineering.
- [7] J.L. Semple, N. Woolridge, C.J. Lumsden, In vitro, in vivo, in silico: Computational systems in tissue engineering and regenerative medicine, *Tissue Engineering* 11 (2005) 341-356.
- [8] I.-O. Doaga, *Dinamica proceselor de adeziune celulara implicate in morfogeneza tisulara*, Biofizica Medicala, Universitatea de Medicina si Farmacie "Carol Davila" Bucuresti, Bucuresti, 2008.
- [9] J.O. Hollinger, T.A. Einhorn, B.A. Doll, S. Charles, (Eds.), *Bone Tissue Engineering*, CRC Press, Florida, 2005.
- [10] K. Jakab, A. Neagu, V. Mironov, R.R. Markwald, G. Forgacs, Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004) 2864-2869.
- [11] A. Robu, L. Stoicu-Tivadar, *Tissue Engineering in Fractured Mandible Reconstruction*, *Studies in Health Technology and Informatics*, Volume 150: *Medical Informatics in a United and Healthy Europe*, 2009, pp. 788 - 788.
- [12] http://en.wikipedia.org/wiki/Extracellular_matrix, Extracellular matrix.
- [13] T. Adachi, Y. Osako, M. Tanaka, M. Hojo, S.J. Hollister, Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration, *Biomaterials* 27 (2006) 3964-3972.
- [14] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nature Materials* 4 (2005) 518-524.
- [15] <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>, Stem Cells.
- [16] R.P. Lanza, R. Langer, J.P. Vacanti, (Eds.), *Principles of Tissue Engineering* (Third Edition), Elsevier Academic Press, Burlington, 2007.
- [17] R. Langer, J.P. Vacanti, *Tissue engineering*, *Science* 260 (1993) 920-926.
- [18] A. Khademhosseini, R. Langer, Microengineered hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials* 28 (2007) 5087-5092.
- [19] D.E. Ingber, M. Levin, What lies at the interface of regenerative medicine and developmental biology?, *Development* 134 (2007) 2541-2547.
- [20] B.G. Sengers, M. Taylor, C.P. Please, R.O.C. Oreffo, Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds, *Biomaterials* 28 (2007) 1926-1940.

- [21] R.O. Hynes, Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines, *Cell* 110 (2002) 673-687.
- [22] R.O. Hynes, Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* 69 (1992) 11-25.
- [23] B.M. Gumbiner, Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis, *Cell* 84 (1996) 345-357.
- [24] D.A. Lauffenburger, A.F. Horwitz, Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process, *Cell* 84 (1996) 359-369.
- [25] B.A.C. Harley, H.-D. Kim, M.H. Zaman, I.V. Yannas, D.A. Lauffenburger, L.J. Gibson, Microarchitecture of Three-Dimensional Scaffolds Influences Cell Migration Behavior via Junction Interactions, *Biophysical Journal* 95 (2008) 4013-4024.
- [26] M.D. Popa, A. Stanciulescu, G. Florin-Matei, A. Tudor, C. Zgavardici, R. Chiriacescu, *Chemotaxie, Dictionar Enciclopedic, Enciclopedica*, 2009.
- [27] R.M.H. Merks, E.D. Perryn, A. Shirinifard, J.A. Glazier, Contact-Inhibited Chemotaxis in De Novo and Sprouting Blood-Vessel Growth, *PLoS Computational Biology* 4 (2008) e1000163.
- [28] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo, Y.-I. Wang, Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate, *Biophysical Journal* 79 (2000) 144-152.
- [29] P. Friedl, D. Gilmour, Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2009) 445-457.
- [30] T. Korff, H.G. Augustin, Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 3249-3258.
- [31] M.S. Steinberg, Adhesion in development: An historical overview, *Developmental Biology* 180 (1996) 377-388.
- [32] J.P. Freyer, R.M. Sutherland, Regulation of growth saturation and development of necrosis in EMT6/Ro multicellular spheroids by the glucose and oxygen supply, *Cancer Research* 46 (1986) 3504-3512.
- [33] J.P. Freyer, R.M. Sutherland, Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply, *Cancer Research* 46 (1986) 3513-3520.
- [34] T.S. Deisboeck, 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 (2001) 115-134.
- [35] R.A. Foty, C.M. Pflieger, G. Forgacs, M.S. Steinberg, Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior, *Development* 122 (1996) 1611-1620.
- [36] R. Mayor, C. Carmona-Fontaine, Keeping in touch with contact inhibition of locomotion, *Trends in Cell Biology* 20 (2010) 319-328.
- [37] M.S. Steinberg, Reconstruction of tissues by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation, *Science* 141 (1963) 401-408.
- [38] J. Galle, M. Loeffler, D. Drasdo, Modeling the Effect of Deregulated Proliferation and Apoptosis on the Growth Dynamics of Epithelial Cell Populations In Vitro, *Biophys. J.* 88 (2005) 62-75.
- [39] R. Alfieri, I. Merelli, E. Mosca, L. Milanese, A data integration approach for cell cycle analysis oriented to model simulation in systems biology, *BMC Systems Biology* 1 (2007) 35.

- [40] G. Vunjak-Novakovic, B. Obradovic, I. Martin, P.M. Bursac, R. Langer, L.E. Freed, Dynamic Cell Seeding of Polymer Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering, *Biotechnology Progress* 14 (1998) 193-202.
- [41] D. Wendt, S.A. Riboldi, M. Cioffi, I. Martin, Potential and Bottlenecks of Bioreactors in 3D Cell Culture and Tissue Manufacturing, *Advanced Materials* 21 (2009) 3352-3367.
- [42] D.P. Byrne, D. Lacroix, J.A. Planell, D.J. Kelly, P.J. Prendergast, Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: Application of mechanobiological models in tissue engineering, *Biomaterials* 28 (2007) 5544-5554.
- [43] S. Checa, P.J. Prendergast, Effect of cell seeding and mechanical loading on vascularization and tissue formation inside a scaffold: A mechano-biological model using a lattice approach to simulate cell activity, *Journal of biomechanics* 43 (2010) 961-968.
- [44] P.J. Prendergast, R. Huiskes, K. Soballe, Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces, *Journal of Biomechanics* 30 (1997) 539-548.
- [45] S. Checa, C. Sandino, D.P. Byrne, D.J. Kelly, D. Lacroix, P.J. Prendergast, P.R. Fernandes, P.J. Bártolo, Computational techniques for selection of biomaterial scaffolds for tissue engineering, *Advances on Modeling in Tissue Engineering*, Springer Netherlands, 2011, pp. 55-69.
- [46] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nature Materials* 4 (2005) 518-524.
- [47] N.E. Fedorovich, L. Moroni, J. Malda, J. Alblas, C.A. Blitterswijk, W.J.A. Dhert, 3D-Fiber Deposition for Tissue Engineering and Organ Printing Applications, in: B.R. Ringeisen, B.J. Spargo, P.K. Wu (Eds.), *Cell and Organ Printing*, Springer Netherlands, 2010, pp. 225-239.
- [48] V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, R.R. Markwald, Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering, *Trends in Biotechnology* 21 (2003) 157-161.
- [49] J.A. Glazier, A. Balter, N.J. Popławski, A.R.A. Anderson, M.A.J. Chaplain, K.A. Rejniak, Magnetization to Morphogenesis: A Brief History of the Glazier-Graner-Hogeweg Model, in: A.R.A. Anderson, M.A.J. Chaplain, K.A. Rejniak (Eds.), *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine*, Birkhäuser Basel, 2007, pp. 79-106.
- [50] J.A. Glazier, F. Graner, Simulation of the Differential Adhesion Driven Rearrangement of Biological Cells, *Physical Review E* 47 (1993) 2128-2154.
- [51] F. Graner, J.A. Glazier, Simulation of Biological Cell Sorting Using a 2-Dimensional Extended Potts-Model, *Physical Review Letters* 69 (1992) 2013-2016.
- [52] A. Neagu, V. Mironov, I. Kosztin, B. Barz, M. Neagu, R.A. Moreno-Rodriguez, R.R. Markwald, G. Forgacs, Computational modeling of epithelial-mesenchymal transformations, *Biosystems* 100 (2010) 23-30.
- [53] D.A. Beysens, G. Forgacs, J.A. Glazier, Cell sorting is analogous to phase ordering in fluids, *PNAS* 97 (2000) 9467-9471.
- [54] N.E. Fedorovich, J. Alblas, W.E. Hennink, F.C. Oner, W.J.A. Dhert, Organ printing: the future of bone regeneration?, *Trends in Biotechnology* 29 (2011) 601-606.
- [55] R. Gaetani, P.A. Doevendans, C.H.G. Metz, J. Alblas, E. Messina, A. Giacomello, J.P.G. Sluijter, Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells, *Biomaterials* 33 (2012) 1782-1790.

- [56] K. Jakab, C. Norotte, F. Marga, K. Murphy, G. Vunjak-Novakovic, G. Forgacs, Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells, *Biofabrication* 2 (2010) 022001.
- [57] A. Neagu, K. Jakab, R. Jamison, G. Forgacs, Role of physical mechanisms in biological self-organization, *Physical Review Letters* 95 (2005) 178104.
- [58] A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, J.P. Vacanti, Microscale technologies for tissue engineering and biology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) 2480-2487.
- [59] P.A. Fleming, W.S. Argraves, C. Gentile, A. Neagu, G. Forgacs, C.J. Drake, Fusion of uniluminal vascular spheroids: A model for assembly of blood vessels, *Developmental Dynamics* 239 (2010) 398-406.
- [60] A.P. McGuigan, M.V. Sefton, Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006) 11461-11466.
- [61] J.G. Amar, The Monte Carlo method in science and engineering, *Computing in Science & Engineering* 8 (2006) 9-19.
- [62] E. Flenner, L. Janosi, B. Barz, A. Neagu, G. Forgacs, I. Kosztin, Kinetic Monte Carlo and cellular particle dynamics simulations of multicellular systems, *Physical Review E* 85 (2012) 031907.
- [63] A.B. Bortz, M.H. Kalos, J.L. Lebowitz, A new algorithm for Monte Carlo simulation of Ising spin systems, *J. Comput. Phys* 17 (1975) 10-18.
- [64] E. Palsson, H.G. Othmer, A model for individual and collective cell movement in *Dictyostelium discoideum*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000) 10448-10453.
- [65] J.C. Dallon, H.G. Othmer, How cellular movement determines the collective force generated by the *Dictyostelium discoideum* slug, *Journal of Theoretical Biology* 231 (2004) 203-222.
- [66] E. Palsson, A three-dimensional model of cell movement in multicellular systems, *Future Generation Computer Systems* 17 (2001) 835-852.
- [67] R.A. Foty, G. Forgacs, C.M. Pfleger, M.S. Steinberg, Liquid Properties of Embryonic-Tissues - Measurement of Interfacial-Tensions, *Physical Review Letters* 72 (1994) 2298-2301.
- [68] D.C. Walker, J. Southgate, G. Hill, M. Holcombe, D.R. Hose, S.M. Wood, S. Mac Neil, R.H. Smallwood, The Epitheliome: Agent-Based Modelling of the Social Behaviour of Cells, *BioSystems* 76 (2004) 89-100.
- [69] D.C. Walker, G. Hill, S.M. Wood, R.H. Smallwood, J. Southgate, Agent-based computational modeling of wounded epithelial cell monolayers, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 3 (2004) 153-163.
- [70] M.R. Grant, K.E. Mostov, T.D. Tlsty, C.A. Hunt, Simulating Properties of In Vitro Epithelial Cell Morphogenesis, *PLoS Computational Biology* 2 (2006) e129.
- [71] B.C. Thorne, A.M. Bailey, S.M. Peirce, Combining experiments with multi-cell agent-based modeling to study biological tissue patterning, *Briefings in Bioinformatics* 8 (2007) 245-257.
- [72] D.C. Walker, J. Southgate, The virtual cell - a candidate co-ordinator for middle-out modelling of biological systems, *Briefings in Bioinformatics* 10 (2009) 450-461.
- [73] S. Hoehme, D. Drasdo, A cell-based simulation software for multi-cellular systems, *Bioinformatics* 26 (2010) 2641-2642.
- [74] Y.S. Chu, S. Dufour, J.P. Thiery, E. Perez, F. Pincet, Johnson-Kendall-Roberts theory applied to living cells, *Phys Rev Lett* 94 (2005) 028102.

- [75] D. Drasdo, S. Hoehme, A single-cell-based model of tumor growth in vitro : monolayers and spheroids, *Physical Biology* 2 (2005) 133.
- [76] J. Galle, D. Sittig, I. Hanisch, M. Wobus, E. Wandel, M. Loeffler, G. Aust, Individual Cell-Based Models of Tumor-Environment Interactions: Multiple Effects of CD97 on Tumor Invasion, *American Journal of Pathology* 169 (2006) 1802.
- [77] J. Galle, M. Hoffmann, G. Aust, From single cells to tissue architecture—a bottom-up approach to modelling the spatio-temporal organisation of complex multi-cellular systems, *Journal of Mathematical Biology* 58 (2009) 261-283.
- [78] S. Hoehme, M. Brulport, A. Bauer, E. Bedawy, W. Schormann, M. Hermes, V. Puppe, R. Gebhardt, S. Zellmer, M. Schwarz, E. Bockamp, T. Timmel, J.G. Hengstler, D. Drasdo, Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010) 10371-10376.
- [79] M. Hoffmann, J.-P. Kuska, M. Zscharnack, M. Loeffler, J. Galle, Spatial Organization of Mesenchymal Stem Cells In Vitro - Results from a New Individual Cell-Based Model with Podia, *PLoS ONE* 6 (2011) e21960.
- [80] M.H. Swat, S.D. Hester, A.I. Balter, R.W. Heiland, B.L. Zaitlen, J.A. Glazier, Multicell Simulations of Development and Disease Using the CompuCell3D Simulation Environment, 2009, pp. 361-428.
- [81] T.M. Cickovski, C. Huang, R. Chaturvedi, T. Glimm, H.G.E. Hentschel, M.S. Alber, J.A. Glazier, S.A. Newman, J.A. Izaguirre, A framework for three-dimensional simulation of morphogenesis, *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 2 (2005) 273-288.
- [82] N.J. Savill, P. Hogeweg, Modelling Morphogenesis: From Single Cells to Crawling Slugs, *Journal of Theoretical Biology* 184 (1997) 229-235.
- [83] S.D. Hester, J.M. Belmonte, J.S. Gens, S.G. Clendenon, J.A. Glazier, A Multi-cell, Multi-scale Model of Vertebrate Segmentation and Somite Formation, *PLoS Computational Biology* 7 (2011) e1002155.
- [84] J.A. Izaguirre, R. Chaturvedi, C. Huang, T. Cickovski, J. Coffland, G. Thomas, G. Forgacs, M. Alber, G. Hentschel, S.A. Newman, J.A. Glazier, CompuCell, a multi-model framework for simulation of morphogenesis, *Bioinformatics* 20 (2004) 1129-1137.
- [85] T.J. Newman, Modeling multicellular systems using subcellular elements, *Mathematical Biosciences and Engineering* 2 (2005) 613-624.
- [86] S.A. Sandersius, T.J. Newman, Modeling cell rheology with the Subcellular Element Model, *Physical Biology* 5 (2008) 015002.
- [87] M.J. Kipper, H.K. Kleinman, F.W. Wang, New Method for Modeling Connective-Tissue Cell Migration: Improved Accuracy on Motility Parameters, *Biophysical Journal* 93 (2007) 1797-1808.
- [88] E. Flenner, F. Marga, A. Neagu, I. Kosztin, G. Forgacs, Relating Biophysical Properties Across Scales in: S. Schnell, P.K. Maini, S.A. Newman, T.J. Newman (Eds.), *Current Topics in Developmental Biology, Multiscale Modeling of Developmental Systems*, Academic Press, 2008, pp. 461-483.
- [89] S.A. Sandersius, M. Chuai, C.J. Weijer, T.J. Newman, Correlating Cell Behavior with Tissue Topology in Embryonic Epithelia, *PLoS ONE* 6 (2011) e18081.
- [90] S.A. Sandersius, M. Chuai, C.J. Weijer, T.J. Newman, A 'chemotactic dipole' mechanism for large-scale vortex motion during primitive streak formation in the chick embryo, *Physical Biology* 8 (2011) 045008.

- [91] K. Jakab, B. Damon, F. Marga, O. Doaga, V. Mironov, I. Kosztin, R. Markwald, G. Forgacs, Relating cell and tissue mechanics: Implications and applications, *Developmental Dynamics* 237 (2008) 2438-2449.
- [92] P.L. Ryan, R.A. Foty, J. Kohn, M.S. Steinberg, Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001) 4323-4327.
- [93] D.A. Lauffenburger, L.G. Griffith, Who's got pull around here? Cell organization in development and tissue engineering, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001) 4282-4284.
- [94] S. Douezan, K. Guevorkian, R. Naouar, S. Dufour, D. Cuvelier, F. Brochard-Wyart, Spreading dynamics and wetting transition of cellular aggregates, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (2011) 7315-7320.
- [95] J.M. Pérez-Pomares, R.A. Foty, Tissue fusion and cell sorting in embryonic development and disease: biomedical implications, *BioEssays* 28 (2006) 809-821.
- [96] N. Tejavibulya, J. Youssef, B. Bao, T.-M. Ferruccio, J.R. Morgan, Directed self-assembly of large scaffold-free multi-cellular honeycomb structures, *Biofabrication* 3 (2011) 034110.
- [97] K. Jakab, A. Neagu, V. Mironov, G. Forgacs, Organ printing: Fiction or science, *Biorheology* 41 (2004) 371-375.
- [98] A. Robu, R. Aldea, O. Munteanu, M. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Computer simulations of in vitro morphogenesis, *Biosystems* 109 (2012) 430-443.
- [99] A. Robu, A. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, Cell seeding of Tissue Engineering Scaffolds studied by Monte Carlo simulations, in: A. Moen, S.K. Andersen, J. Aarts, P. Hurlen (Eds.), *Studies in Health Technology and Informatics*, Volume 169, 2011, User Centred Networked Health Care - Proceedings of MIE 2011, IOS Press, 2011, pp. 882-886, DOI: 810.3233/3978-3231-60750-60806-60759-60882.
- [100] A. Robu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Cell spreading on biocompatible materials studied by computer simulations, in: *Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI)*, 2011, 6th IEEE International Symposium, 2011, pp. pp. 641-644, DOI: 610.1109/SACI.2011.5873082
- [101] A. Robu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Computational modeling of multicellular systems evolution in tissue engineering, *Intelligent Engineering Systems (INES)*, 2012 IEEE 16th International Conference on, 2012, pp. 351-356.
- [102] A. Robu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Considerations about a 3D matrix based model for a porous scaffold and a cell suspension, *Annals of DAAAM for 2010 & Proceedings of the 21st International DAAAM Symposium, Zadar, Croatia, 2010*, pp. 325-326.
- [103] A. Robu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Simulation of Cellular Aggregate Seeding of Porous Scaffolds, *Proceedings of the International Conference on Computers and Computing, (ICCC), Lanzarote, 2011*, pp. pp. 100-105.
- [104] A.P. Robu, A. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, A computer simulation study of cell seeding of a porous biomaterial, *Computational Cybernetics and Technical Informatics (ICCC-CONTI)*, 2010 International Joint Conference on, 2010, pp. 225-229.
- [105] A. Robu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Computational Study of the Interplay of Adhesion and Chemotaxis in the Cell Seeding of Tissue Engineering Scaffolds with Incorporated Chemoattractants The 14th World Congress on

- Medical and Health Informatics, MEDINFO 2013, Copenhagen, Danemarca, 2013.
- [106] A. Robu, A. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, The influence of cell-substrate and cell-medium interfacial tension on the cell spreading in: *Intelligent Engineering Systems (INES)*, 2011, 15th IEEE International Conference 2011, pp. pp. 29-32, DOI: 10.1109/INES.2011.5954714
- [107] A. Robu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Optimal Energetic Conditions for Cell Seeding of Scaffolds, *Applied Computational Intelligence in Engineering and Information Technology*, in: R.-E. Precup, S. Kovács, S. Preitl, E.M. Petriu (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 261-272.
- [108] I. Filip, R. Robu, I. Szeidert, A. Robu, Considerations Regarding an Unusual Cause of Database Concurrency Exception, *Annals of DAAAM for 2008 & Proceedings of the 19th International DAAAM Symposium*, Trnava, Slovakia, 2008, pp. 493-494.
- [109] R.A. Foty, M.S. Steinberg, Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy, *Developmental Biology* 48 (2004) 397-409.
- [110] J.P. Rieu, Y. Sawada, Hydrodynamics and cell motion during the rounding of two dimensional hydra cell aggregates, *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems* 27 (2002) 167-172.
- [111] D. Duguay, R. Foty, M. Steinberg, Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants., *Developmental Biology* 253 (2003) 309-323.
- [112] M.S. Steinberg, Cell-cell recognition in multicellular assembly: levels of specificity., *Symp Soc Exp Biol* 32 (1978) 25-49.
- [113] L.G. Griffith, G. Naughton, Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities, *Science* 295 (2002) 1009-1014.
- [114] P. Tayalia, D.J. Mooney, Controlled Growth Factor Delivery for Tissue Engineering, *Advanced Materials* 21 (2009) 3269-3285.
- [115] M. Biondi, F. Ungaro, F. Quaglia, P.A. Netti, Controlled drug delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 229-242.
- [116] S.E. Francioli, C. Candrian, K. Martin, M. Heberer, I. Martin, A. Barbero, Effect of three-dimensional expansion and cell seeding density on the cartilage-forming capacity of human articular chondrocytes in type II collagen sponges, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* 95(3) 2010 (2010) 924-931.

A1. LISTA DE LUCRĂRI PUBLICATE ÎN DOMENIUL TEZEI

A. Reviste de specialitate din străinătate, cotate ISI:

- 1. A. Robu**, R. Aldea, O. Munteanu, M. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Computer simulations of in vitro morphogenesis, **Biosystems** Vol. 109 (2012), **Factor de Impact 1.784**, pp. 430-443

B. Volumele unor manifestări științifice internaționale, indexate ISI:

- 1. I. Filip**, R. Robu , I. Szeidert, **A. ROBU**, Considerations Regarding an Unusual Cause of Database Concurrency Exception, Annals of DAAAM for 2008 & Proceedings of the 19th International DAAAM Symposium, pp. 493-494, 22-25 Octombrie, 2008, Trnava, Slovakia, ISBN: 978-3-901509-68-1 (ISI Proceedings)

C. Lucrări științifice publicate sub formă de capitole de carte

- 1. A. Robu**, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Optimal Energetic Conditions for Cell Seeding of Scaffolds, Applied Computational Intelligence in Engineering and Information Technology, in: R.-E. Precup, S. Kovács, S. Preitl, E.M. Petriu (Eds.), **Springer Berlin Heidelberg**, 2012, pp. 261-272, ISBN: 978-3-642-28304-8 (Scholar Google)

D. Volumele unor manifestări științifice internaționale indexate în baze de date internaționale (BDI):

- 1. A. Robu**, L. Stoicu-Tivadar, Tissue Engineering in Fractured Mandible Reconstruction, Medical Informatics in a United and Healthy Europe - Proceedings of MIE 2009, The XXIIInd International Congress of the European Federation for Medical Informatics, Studies in Health Technology and Informatics, Vol. 150, pp. 788, 30 August – 2 Septembrie, 2009, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, ISBN: 978-1-60750-044-5 (SCOPUS)
- 2. A. Robu**, A. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, A computer simulation study of cell seeding of a porous biomaterial, Proceedings of the IEEE International Joint Conferences on Computational Cybernetics and Technical Informatics (ICCC-CONTI 2010), pp. 225-229, 27 – 29 Mai, 2010, ISBN: 978-1-4244-7432-5 (IEEExplore)
- 3. A. Robu**, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Simulation of Cellular Aggregate Seeding of Porous Scaffolds, Proceedings of the International Conference on Computers and Computing (ICCC 2011), pp. 100-105, 27-29 Mai, 2011, Lanzarote, Spania, ISBN: 978-161804000-8 (SCOPUS)

4. **A. Robu**, A. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, Cell seeding of Tissue Engineering Scaffolds studied by Monte Carlo simulations, Proceedings of the XXIII International Conference of the European Federation for Medical Informatics (MIE 2011), pp. 882-886, 28 - 31 august, 2011, Oslo, Norvegia, DOI: 810.3233/3978-3231-60750-60806-60759-60882 (SCOPUS)
 5. **A. Robu**, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Cell spreading on biocompatible materials studied by computer simulations, Proceedings of the 6th IEEE International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI 2011), pp. 641-644, 19-21 Mai, 2011, Timisoara, Romania, ISBN: 978-1-4244-9108-7 (IEEEExplore)
 6. **A. Robu**, A. Neagu, L. Stoicu-Tivadar, The influence of cell-substrate and cell-medium interfacial tension on the cell spreading, Proceedings of the 15th IEEE International Conference on Intelligent Engineering Systems (INES 2011), pp. 29-32, 23-25 iunie, 2011, Poprad, Slovacia, ISBN: 978-1-4244-8954-1 (IEEEExplore)
 7. **A. Robu**, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Computational modeling of multicellular systems evolution in tissue engineering, Proceedings of the 16th IEEE International Conference on Intelligent Engineering Systems (INES 2012), pp. 351-356, 13-15 Iunie, 2012, Portugalia Lisabona, ISBN: 978-1-4673-2693-3 (IEEEExplore)
- E. Articole acceptate în volumele unor manifestări științifice internaționale indexate în baze de date internaționale (BDI), în curs de publicare :**
1. **A. Robu**, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Computational Study of the Interplay of Adhesion and Chemotaxis in the Cell Seeding of Tissue Engineering Scaffolds with Incorporated Chemoattractants, The 14th World Congress on Medical and Health Informatics, MEDINFO 2013, 20 -23 August, 2013, Copenhaga, Danemarca
- F. Volumele unor manifestări științifice internaționale:**
1. **A. Robu**, L. Stoicu-Tivadar, A. Neagu, Considerations about a 3D matrix based model for a porous scaffold and a cell suspension, Annals of DAAAM for 2010 & Proceedings of the 21st International DAAAM Symposium, pp. 325-326, 22-23 Octombrie, 2010, Zadar, Croatia, ISBN:978-3-901509-73-5

A2. LISTA DE LUCRĂRI PUBLICATE (EXCEPTÂND CELE DIN DOMENIUL TEZEI)

A. Volumele unor manifestări științifice internaționale, indexate ISI:

1. I. Szeidert, O. Prostean, **A. Robu**, L. Jurca, Windmill's design and implementation aspects, Annals of DAAAM for 2008 & Proceedings of the 19th International DAAAM Symposium, pp. 1335-1336, 22-25 Octombrie, 2008, ISBN: 978-3-901509-68-1 (ISI Proceedings)

2. C. Vasar, O. Prostean, I. Filip, I. Szeidert, **A. Robu**, Using Data Aggregation to Prolong the Lifetime of Wide - area Wireless Sensor Networks, Proceedings of IEEE 4th International Conference on Intelligent Computer Communication and Processing, pp. 247-252, 28-30 August, 2008, Cluj-Napoca, ISBN: 978-1-4244-2673-7 (ISI Proceedings, IEEExplore)

3. **A. Robu**, C. Vasar, On a Software Platform for the On-line Quality Evaluation in Academic Environment, Proceedings of the 5th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics SACI 2009, pp. 355-359, 28-29 Mai, 2009, Timisoara, Romania, ISBN: 978-1-4244-4478-6 (ISI Proceedings, IEEExplore)

4. C. Vasar, G. Prostean, **A. Robu**, Issues on Low Power Routing For Wireless Sensor Networks, Proceedings of the 5th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics SACI 2009, pp. 335-339, 28-29 Mai, 2009, Timisoara, ROMANIA, ISBN: 978-1-4244-4478-6 (ISI Proceedings, IEEExplore)

5. G. Prostean, C. Vasar, R. Robu, **A. Robu**, Advantages in the supply process for obtaining a wind turbine based on SAP, Proceedings of the 7th International Conference on Management of Technological Changes, pp. 597-600, 1-3 Septembrie, 2011, Alexandroupolis, Grecia, ISBN: 978-960-99486-2-3 (ISI Proceedings)

B. Volumele unor manifestări științifice internaționale indexate in baze de date internaționale (BDI):

1. C. Koch - Ciobotaru, R. Boraci, N. Budisan, **A. Robu**, A new configuration structure of induction and synchronous generators' stator windings, Proceedings of the 9th IEEE International Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics (SAMI 2011), pp. 323-328, 27-29 Ianuarie, 2011, Smolenice, Slovakia, ISBN: 978-1-4244-7429-5 (IEEExplore)

A3. LISTA GRANTURILOR / CONTRACTELOR DE CERCETARE - DEZVOLTARE - INOVARE

A. Granturi de cercetare-dezvoltare-inovare obținute prin competiție la nivel național:

- 1.** Membru în proiectul PNII, Sistem complex, pe suport NGN, pentru teleasistență, la domiciliu, a persoanelor în vârstă – TELEASIS (2008-2010)
- 2.** Membru în proiectul PNII, Sistem integrat de management a informațiilor medicale utilizând standardul HL7 – SIMIMED (2008-2010)
- 3.** Membru în proiectul PNII, Programul “Parteneriate în domeniile prioritare”, Proiecte Colaborative de Cercetare Aplicativă, Microgrid integrated small power renewable energy hybrid systems (2012-2015)

B. Granturi de cercetare-dezvoltare-inovare internaționale:

- 1.** Membru în proiectul EEA, Improvement of the Structures and Efficiency of Small Horizontal Axis Wind Generators with Non-Regulated Blades (2009-2011)