

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

- REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT -

Autor:
Asist. Ing. Andreea ROBU

Coordonatori:
Prof. Dr. Ing. Lăcrămioara Stoicu – Tivadar,
Prof. Dr. fiz. Adrian NEAGU

Actualitatea și importanța temei tratate

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

Ingineria tisulară se ocupă cu crearea *in vitro* de structuri biologice tisulare implantabile, menite să substituie regiuni ale corpului defectuoase, lezate sau afectate de diverse boli.

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.

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 doctoratură -Calculatoare și Tehnologia Informației-, și anume: (i) pe modelarea elementelor ce intervin în dezvoltarea controlată a substitutelor 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 le / îi înglobează.

Structura și conținutul tezei

Lucrarea se întinde pe 255 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 **Introducere**, prezentând actualitatea temei abordate și structura tezei.

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 biomatrici 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 biomatrici 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. Multitudinea de algoritmi dezvoltați în acest capitol **-în majoritatea lor originali-** au fost prezentați 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 prezentați 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).

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 biomatrici 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 biematrice asupra procesului de însămânțare. Mișcarea celulelor în sistem se simulează considerând că sistemul celular tinde să atingă starea de energie minimă (DAH).

Pe baza configurațiilor obținute, se face o analiză a evoluției coordonatei z a centrului de masă al celulelor din sistem, respectiv din biematrice 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.

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 biomatrice 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 biomatrice, 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.

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.

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).

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**, cotate **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 împrăstierii 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 împrăstiere 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 chemoattractantă, 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.