

ZJAWISKO NAPROWADZANIA KOMÓREK ZWIERZĘCYCH PRZEZ KONTAKT Z PODŁOŻEM – WYKORZYSTANIE W PRAKTYCE KLINICZNEJ*

CONTACT GUIDANCE OF ANIMAL CELLS – CLINICAL APPLICATION

Jolanta SROKA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: W pracy przedstawiono reakcje różnych typów komórek na rzeźbę podłoża i jego właściwości chemiczne oraz mechanizmy kontaktowego naprowadzania komórek. Właściwości fizyczne i chemiczne podłoża wpływają na morfologię, kierunek migracji komórek, reorganizację cytoszkieletu, zmiany aktywacji ekspresji genów oraz białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału w komórce. Wykorzystanie w praktyce klinicznej materiałów charakteryzujących się określoną rzeźbą podłoża jako rusztowania dla nowo tworzącej się tkanki może mieć znaczący wpływ na właściwości i budowę struktur tkankowych powstałych w wyniku procesu regeneracji.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 63–80*)

Słowa kluczowe: naprowadzanie przez kontakt, migracja komórek, inżynieria tkankowa

Summary: Reactions of cells to the topography and chemical properties of the substratum and mechanisms of contact guidance are outlined. Responses to the physical and chemical properties of the substratum include cell orientation, changes in cell shape and cell motility, reorganisation of the cytoskeleton, activation and inactivation of gene expression and activation of proteins involved in signal transduction. Contact guidance phenomenon is discussed in terms of application of patterned substrata as a scaffold for regenerating tissue in clinical practice.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 63–80*)

Key words: contact guidance, cell movement, tissue engineering

I. WSTĘP

Ukierunkowana migracja komórek jest zjawiskiem powszechnym. Odgrywa ona istotną rolę podczas morfogenezy, gojenia się ran, tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe, a także zaangażowana jest w reakcje obronne organizmu [1, 26, 35, 36, 61, 67]. Jednym z czynników wpływających na ukierunkowanie wzrostu i ruchu komórek zwierzęcych oraz zmianę morfologii jest rzeźba podłoża oraz jego właściwości chemiczne [7, 8, 19, 22, 34, 45, 63, 64].

Komórki organizmów tkankowych żyją w środowisku, które charakteryzuje się określoną mikro-, a nawet nanotopografią. Macierz zewnątrzkomórkowa stanowiąca bezpośrednie otoczenie komórek, jej skład i organizacja przestrzenna elementów strukturalnych mogą wywierać wpływ na morfologię komórek oraz ich aktywność ruchową. Migrujące komórki mogą kierować się układem adhezyjnych białek substancji międzykomórkowej, takich jak: fibronektyny, kolageny czy lamininy. Również kształty komórek mogą determinować kierunkowość ruchu sąsiadujących komórek i stanowić szlaki, wzdłuż których komórki migrują [13, 15, 16, 23, 48].

Zjawisko naprowadzania komórek przez kontakt z podłożem (*ang. contact guidance*) zostało opisane i nazwane tak po raz pierwszy w 1934 roku przez Paula Weissa, który zaobserwował orientację wypustek komórek nerwowych wzdłuż długiej osi włókien fibryny [cyt. za [14]]. W kolejnych latach Weiss wykazał, że wiele innych typów komórek wykazuje reakcję kontaktowego naprowadzania i zasugerował, że zjawisko to może mieć podstawowe znaczenie podczas procesu morfogenezy [56, 57, 58]. W 1964 roku Curtis i Varde badając zachowanie fibroblastów serca kurczącego na włóknach silikonowych wykazali zmianę orientacji i morfologii tych komórek [12]. W latach dziewięćdziesiątych dał się zaobserwować znaczny postęp w badaniach reakcji komórek na właściwości fizyczne i chemiczne podłoża dzięki wprowadzeniu nowych technik przygotowania podłoży o regularnie powtarzających się wzorach oraz zastosowaniu komputerowych metod analizy obrazu, pozwalających na dokonanie ilościowej analizy aktywności ruchowej oraz zmian kształtu i orientacji komórek.

II. PODŁOŻA WYKORZYSTYWANE DO BADAŃ ZJAWISKA NAPROWADZANIA KOMÓREK PRZEZ KONTAKT I SPOSOBY ICH PRZYGOTOWANIA

W badaniach zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek istotną rolę odgrywa wybór odpowiedniego podłoża. Badania często prowadzone są pod kątem wykorzystania podłoży charakteryzujących się określoną rzeźbą jako implantów, które wprowadzane są chirurgicznie do różnych tkanek i narządów organizmów zwierzęcych [18, 28, 49, 51, 55]. Takie materiały powinny aktywnie wpływać na

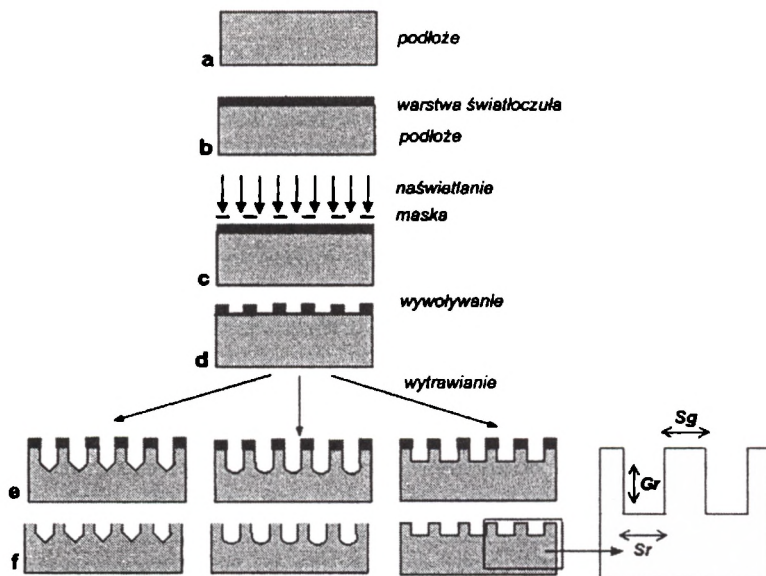
przebiegające w bezpośrednim sąsiedztwie implantu procesy regeneracji tkanek. Wprowadzenie protezy do tkanki powoduje wytworzenie łącznotkankowej torebki, w której komórki przylegają nawzajem do siebie i do substancji zewnątrzkomórkowej, a nie do implantu, co w znacznym stopniu utrudnia odtworzenie prawidłowej struktury tkankowej. Za jedną z miar biokompatybilności uważa się zatem grubość wytworzonej wokół protezy torebki łącznotkankowej. Im jest ona cieńsza, tym materiał, z którego wytworzono implant, jest bardziej biokompatybilny [2]. Uważa się, że na przebieg procesu gojenia ran zachodzącego wokół implantu mają wpływ fizyczne i chemiczne właściwości materiału, z którego przygotowuje się protezy, kształt implantu i jego mechaniczne właściwości oraz rzeźba jego powierzchni (czyli mikro- i nanotopografia).

W badaniach *in vitro* najczęściej wykorzystuje się rowkowane podłoża. Zwykle rowki ułożone są w regularnie powtarzające się wzory o wymiarach od 30 nm do 100 μm . Powszechnie wykorzystywane są także zorientowane włókna (tab. 1).

W celu uzyskania podłoży o określonym wzorze stosuje się różne techniki, od ręcznego zarysowywania powierzchni (np. przy użyciu proszku korundowego) do precyzyjnych metod mechanicznych, pozwalających na uzyskanie struktur o ściśle kontrolowanych parametrach [12, 13, 23, 45]. Nowoczesną techniką przenoszenia wzoru na powierzchnię podłoża jest fotolitografia. Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie kolejne etapy procesu fotolitograficznego. W metodzie tej powierzchnia, najczęściej krzemionki, pokrywana jest warstwą materiału światłoczułego (rys. 1b) i poddawana działaniu światła UV przez „maskę” o określonym wzorze (rys. 1c), czego efektem jest naświetlenie tylko określonych obszarów fotouczulacza. Reakcja fotochemiczna zachodząca w obrębie naświetlonych miejsc warstwy światłoczułej czyni te obszary mniej lub bardziej rozpuszczalnymi w roztworze zwanym wywoływaczem, w którym zanurzane jest następnie podłoże (rys. 1d). Obszary podłoża pozbawione działaniem wywoływacza substancji światłoczułej mogą być następnie wytrawiane przy użyciu fluorowodoru, wodorotlenku potasu czy reaktywnych jonów, dzięki czemu uzyskuje się podłoża o zróżnicowanym rowkowaniu (rys. 1e). Ostatnim etapem procesu fotolitograficznego jest usunięcie pozostałej warstwy substancji światłoczułej (rys. 1f) [23].

Do przygotowania podłoży o określonym urzeźbieniu wykorzystuje się również światło laserowe [41], promieniowanie rentgenowskie [68] i promieniowanie elektronowe [24].

Jak wcześniej wspomniano, jednym z głównych celów badań zjawiska naprowadzania komórek przez kontakt z podłożem jest możliwość wykorzystania tego zjawiska w praktyce klinicznej. Istotne jest zatem zrozumienie zachowania komórek w przestrzeni trójwymiarowej w warunkach zbliżonych do warunków panujących *in vivo*, czyli w żelach kolagenowych i fibrynowych [46, 47, 48]. Włókna kolagenowe orientuje się przy użyciu pól magnetycznych o wysokiej częstotliwości.



RYSUNEK 1. Schemat kolejnych etapów procesu fotolitograficznego: Podłoże (a) pokrywane jest warstwą materiału światłoczułego (b), który jest następnie naświetlany przez „maskę” o określonym wzorze (c) i wywoływany (d). Po odpłukaniu, regiony podłoża pozbawione warstwy światłoczułego poddawane są procesowi wytrawiania w celu uzyskania rowków o określonym kształcie (e), po czym materiał światłoczuły zostaje całkowicie usunięty (f). Na powiększonym obrazie fragmentu podłoża (zaznaczonego kwadratem) przedstawiono podstawowe parametry, charakteryzujące jego rzeźbę: S_g – szerokość grzbietu; S_r – szerokość rowka; G_r – głębokość rowka (zmodyfikowane wg [23])

Prowadzone są również badania reakcji komórek wewnątrz wąskich tuneli, które uzyskiwane są metodą, polegającą na wprowadzeniu cienkich drucików do polimerów i szybkim ich usunięciu w momencie, gdy temperatura zbliża się do temperatury przejścia fazowego polimeru [14].

Obserwację kontaktowego naprowadzania komórek zwierzęcych przeprowadza się także na warstwie równolegle zorientowanych ludzkich fibroblastów zarówno żywych, jak i utrwalonych np. formaldehydem. Zwarta warstwa komórek oraz uporządkowane rozmieszczenie fibronektyny, białka macierzy zewnątrzkomórkowej

TABELA 1. Podłoża wykorzystywane do badań zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek

Rzeźba podłoża	Materiał
Rowki	krzemionka, silikon, celuloza, szkło, polistyren, kwarc, tytan pokryty dwutlenkiem tytanu, złoto, poliuretan, platyna
Włókna	kolagen, fibronektyna, fibryna, krzemionka, nylon
Cylindry i kanały	krzemionka, polistyren

wzdłuż długiej osi fibroblastów po ich stronie grzbietowej, zapewniają regularną anizotropię środowiska [30, 45].

III. WPŁYW WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNYCH I CHEMICZNYCH PODŁOŻA NA ZACHOWANIE KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

Większość wcześniejszych doniesień na temat zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek ograniczała się do jakościowego opisu zmian kształtu i orientacji komórek oraz fotograficznej dokumentacji. Zastosowanie w latach dziewięćdziesiątych nowych metod badania reakcji komórek na poziomie molekularnym oraz wprowadzenie komputerowych metod analizy obrazu, umożliwiających określenie w sposób ilościowy zmian zarówno morfologii, jak i aktywności ruchowej komórek pod wpływem kontaktu z podłożem pozwoliło stwierdzić, że właściwości fizyczne i chemiczne podłoża wywołują szereg reakcji komórek, szczegółowo przedstawionych w tabeli 2.

Wiele typów komórek, wśród nich fibroblasty, makrofagi, komórki endotelialne i epitelialne, neurony, leukocyty, osteoblasty reaguje na rzeźbę podłoża [4, 7, 17, 20, 30, 31, 33, 65, 66]. Istnieje wiele sprzecznych doniesień na temat występowania reakcji kontaktowego naprowadzania nawet tych samych komórek. Wykazano, że np. leukocyty nie orientują się wzdłuż rowków [32], natomiast włókna fibrynowe wpływają na ukierunkowanie ruchu tych komórek [60]. Komórki epitelialne rosnące w płatach, a więc kontaktujące się ze sobą, wykazują całkowity brak reakcji na rzeźbę podłoża, podczas gdy izolowane zmieniają kształt na wydłużony i orientują się wzdłuż rowków [10]. Podobną reakcję wykazano w przypadku neuronów izolowanych ze zwojów rdzeniowych zarodków kurczęcia. Pojedyncze neurony reagowały na rysy w podłożu, natomiast w gęstych hodowlach neurony aksony „ignorowały” rowki [45]. Także dobór odpowiedniego podłoża o charakterystycznym urzeźbieniu może wpływać na wystąpienie reakcji. Makrofagi P388D1 wykazują orientację w odpowiedzi na kontakt z rowkami o głębokości 30 nm [65], podczas gdy np. komórki endotelialne reagują dopiero na rysy o głębokości 100 nm i większej [14].

Większość badaczy ogranicza się w swoich pracach do jakościowego opisu zmian kształtu komórek oraz ich orientacji. W wielu przypadkach orientacja komórek wzdłuż długiej osi włókien i rowków oraz wydłużony kształt komórek są dobrze udokumentowane na fotografiach (rys. 2), konieczne jest jednak stosowanie precyzyjnych metod umożliwiających określenie zmian morfologii komórek pod wpływem kontaktu z podłożem.

Komputerowa analiza obrazu stosowana między innymi w Zakładzie Biologii Komórki IBM UJ pozwala na określenie wielu parametrów charakteryzujących

TABELA 2. Reakcje komórek na właściwości fizyczne i chemiczne podłoża

Typ komórek	Podłoże	Rzeźba podłoża [µm]	Reakcje komórek	Lite-ratura
Makrofagi szczurze (P388D1)	Krzemionka	Równoległe rowki Sr: 10; Gr: 0,5; 5	Wzrost stopnia rozplaszczania; orientacja komórek wzdłuż rowków; przyspieszenie migracji; aktywacja LPS wpływa na wzrost ukierunkowania komórek	[64]
Fibroblasty chemiczne (BHK) Makrofagi szczurze (P388D1) Neurony szczurze	Fibronektyna	Włókna Ø: 0,2-0,5	Orientacja komórek wzdłuż rowków; przyspieszenie migracji; wzrost persystencji ruchu	[66]
Fibroblasty chemiczne (BHK)	Kwarc	Równoległe rowki Sr: 5; 10; 25 Gr: 0,5; 1; 2; 5	Orientacja komórek wzdłuż rowków; kolcemid wywołuje wzrost stopnia rozplaszczania komórek i znosi ich orientację; cytochalazyna D redukuje stopień rozplaszczania, znosi ich orientację i elongację; taksol redukuje wydłużenie komórek	[63]
Fibroblasty skóry ludzkiej	Tytan	V-rowki Gr: 3	Orientacja komórek wzdłuż rowków; kształt komórek wydłużony; ekspresja mRNA fibronektyny; 2-krotny wzrost ilości fibronektyny w macierzy zewnątrzkomórkowej	[7]
Fibroblasty skóry ludzkiej	Tytan	V-rowki Gr: 3	Wzrost ekspresji metaloproteinazy-2	[8]
Fibroblasty pochwewki ścięgna szczura	Krzemionka	Równoległe rowki Sr: 10; Gr: 5	Orientacja komórek wzdłuż rowków; elongacja komórek; ukierunkowanie migracji; wzrost średniej prędkości migracji	[62]
Komórki epitelialne świni	Krzemionka pokryta tytanem	V-rowki Sr: 15; Gr: 3	Orientacja komórek wzdłuż rowków; orientacja filamentów aktynowych i mikrotubul wzdłuż ścian i krawędzi rowków	[37]
Fibroblasty skóry ludzkiej, keratynocyty drążała, neutrofile, monocyty, makrofagi	Krzemionka	Równoległe rowki Sr: 0,5; Gr: 1	Orientacja fibroblastów (100%) i makrofagów (20%) wzdłuż rowków; brak reakcji keratynocytów i neutrofilii na rzeźbę podłoża	[32]
Fibroblasty skóry szczura	Silikon	Równoległe rowki Sr: 2; 5; 10 Gr: 0,5	Mikrofilamenty i winkulina zorientowane wzdłuż rowków o szerokości 2 µm, w mniejszym stopniu wzdłuż rowków o szerokości 5 i 10 µm; winkulina zlokalizowana wzdłuż krawędzi rowków; orientacja bydlęcej oraz endogennej fibronektyny i witronektyny wzdłuż rowków	[19]
Ludzkie neutrofile	Szklone pokryte surowicą	Równoległe rowki Sr: 2 Gr: 2	Ukierunkowanie migracji wzdłuż rowków	[59]

TABELA 2 cd.

Typ komórki	Podłoże	Rzeźba podłoża [µm]	Reakcje komórek	Literatura
Ludzkie neutrofile	Fibryna	Włókna	Ukierunkowanie migracji wzdluz włókien; efektywniejsza reakcja chemotaktyczna (wzrost wartości przemieszczenia) neutrofilii poruszających się wzdluz włókien fibryny zorientowanych równolegle do kierunku rozwoju gradientu fMPLP w porównaniu z odpowiednią komórką poruszających się w sieci włókien zorientowanych prostopadle	[60]
Komórki szczurzego mięsaka XC	Równolegle zorientowane fibroblasty		Polaryzacja kształtu komórek; migracja wzdluz długiej osi fibroblastów; 5-krotny wzrost wartości przemieszczenia komórek wynikający ze wzrostu persystencji ruchu w porównaniu z komórkami poruszającymi się po gładkim podłożu szklanym i polistyrenowym	[30]
Makrofagi P388D1 Szczurze makrofagi otrzewnowe	Kwarc	Równoległe rowki Sr: 2; 10 Gr: 0,03-0,3	Orientacja komórek i ich ukierunkowany ruch; wzrost stopnia fagocytozy; akumulacja F-aktyny i winkuliny wzdluz krawędzi rowków; wzrost fosforylacji tyrozyny związany ze wzrostem ilości F-aktyny w komórkach; pojawienie się mikrowypustek prostopadłych w stosunku do rowków	[65]
Neurony zarodków kureczęcia	Sztko	Równoległe rowki Sr: 2; Gr: 2	Filopodia stożków wzrostu neuronów rozpoznają rysy o średnicy 100–200 nm i orientują się wzdluz długiej osi rys; lamella stożków wzrostu wykazuje ukierunkowany ruch wzdluz długiej osi rowków	[45]
Neurony zarodków kureczęcia	Równolegle zorientowane fibroblasty		Agregaty neuronów przyjmują wrzecionowaty kształt; pojedyncze neurony orientują się wzdluz długiej osi fibroblastów	[45]
Fibroblasty dżiąsta ludzkiego	Tytan	Rysy Gr: 0,14; 0,41; 0,80	Komórki migrują wzdluz nieregularnie ułożonych rys	[29]
Osteoblasty cielęce	Tytan	V-rowki	Orientacja komórek wzdluz rowków	[43]
Fibroblasty skóry Komórki epitelialne	Tytan	V-rowki Sr: 3; Gr: 40	Stymulacja migracji fibroblastów; kontaktowe zahamowanie migracji fibroblastów; brak kontaktowego zahamowania migracji epiteliocytów; wzrost stopnia inwazji fibroblastów do warstwy komórek epitelialnych	[17]
Fibroblasty skóry szczurzej	Polistyren	Równoległe rowki Sr: 1; 2; 5; 10; Gr: 1	Orientacja komórek wzdluz długiej osi rowków; komórki ustawione wzdluz krawędzi rowków o szerokości 1 i 2 µm; fibroblasty zdolne do penetracji rowków o szerokości 5 i 10 µm; orientacja filamentów aktynowych i kontaktów zogniskowanych	[50]

TABELA 2 cd.

Typ komórek	Podłoże	Rzeźba podłoża [μm]	Reakcje komórek	Lite-ratura
Szczurze osteoblasty	Polistyren	Rowki Gr: 0,5; 5	Przyspieszenie migracji; elongacja komórek; wzrost syntezy białek kolagenowych i niekolagenowych	[6]
Komórki epitelialne (MDCK)	Perspex	Równoległe rowki Gr: 0,2–1,9	Głębokość rowków najważniejszym czynnikiem determinującym orientację komórek wzdłuż ich długiej osi; pojedyncze komórki bardziej wrażliwe na rzeźbę podłoża niż komórki występujące w platach	[9]
Fibroblasty działła ludzkiego	Tytan	Równoległe rowki Gr: 3	Rzeźba podłoża i stężenie surowicy w pożywce wpływają na syntezę tenascyny	[25]
Fibroblasty działła ludzkiego	Tytan	Równoległe rowki Gr: 3	Rozbicie mikrotubul i mikrofilamentów kolemidem i cytochalazyną B nie wpływa na orientację komórek wzdłuż długiej osi rowków	[38]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu pod skórę szczura	Silikon	Struktury cylindryczne \varnothing : 50-500 Wysokość: 100–1000	Przyspieszenie wnikania naczyń krwionośnych do regenerowanej tkanki; redukcja grubości torebki łącznotkankowej dookoła implantu	[42]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu pod skórę kozy	Polistyren	Równoległe rowki S _r : 1; 2; 5; 10; Gr: 1	Po 1 tygodniu od wprowadzenia implantu pojawienie się torebki łącznotkankowej o grubości 80 μm ; obecność dużej liczby makrofagów, granulocytów i monocytów; po 4 tygodniach pojawienie się nowych naczyń krwionośnych; podobna reakcja tkanki na gładkim i rowkowanym podłożu	[51]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu pod skórę świnki morskiej	Silikon	Równoległe rowki S _r : 2; 2,5; Gr: 0,5; 1; 1,5; 6	Po 10 tygodniach od wprowadzenia implantu pod skórę implant otoczony torebką łącznotkankową; cienka pojedyncza warstwa jedno i wielojądrzastych komórek fagocytykujących; brak istotnych różnic histomorfologicznych w odniesieniu do reakcji komórek na podłożu o różnym urzeźbieniu	[55]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu do kości ciemieniowej szczura	Tytan	Rowki Gr: 30–120	Penetracja rowków przez komórki; tkanka kościopodobna zorientowana na wzdłuż rowków; wzrost stopnia mineralizacji kości wraz ze wzrostem głębokości rowków	[4]

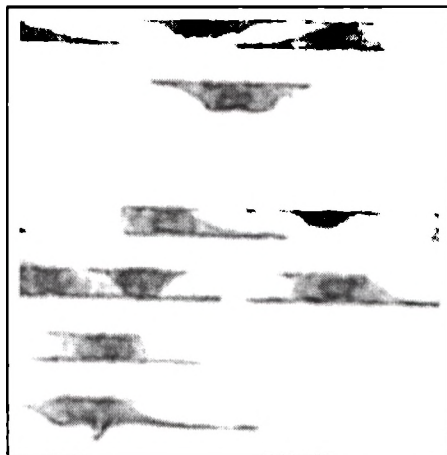
¹S_r – szerokość rowka; ²Gr – głębokość rowka

zarówno kształt, jak i orientację komórek, wśród nich wydłużenie komórek (ang. *elongation*), rozciągnięcie (ang. *extension*), rozproszenie (ang. *dispersion*) i orientację komórek względem wybranej osi. Umożliwia także dokonanie precyzyjnej analizy ilościowej aktywności ruchowej komórek [30, 45, 64].

Badania migracji komórek, zjawiska zaangażowanego w wiele procesów zachodzących w organizmach zwierzęcych, prowadzone są intensywnie w wielu pracowniach. W standardowych warunkach hodowli komórki poruszają się w sposób przypadkowy we wszystkich kierunkach z takim samym prawdopodobieństwem. W obrębie wielokomórkowych organizmów komórki poddawane są jednak bardzo często działaniu wielu bodźców naprowadzających, takich jak: gradient stężenia substancji chemicznej, gradient potencjału elektrycznego, gradient adhezynności lub architektura tkanki [1, 36, 44, 52, 53, 61, 69]. Czynniki te wpływają na zmianę polaryzacji komórek oraz na ukierunkowanie ich ruchu.

Fibroblasty, makrofagi, leukocyty i neurony są najczęściej wykorzystywanymi komórkami do badań aktywności ruchowej na podłożach charakteryzujących się określoną rzeźbą. Jak wykazano, architektura podłoża ma wpływ zarówno na persistencję ruchu, jak i na zmiany prędkości migracji. Wójciak-Stothard i współpracownicy badając zachowanie makrofagów szczurzych, komórek szybko reagujących na czynniki chemotaktyczne, efektem czego jest ich akumulacja w miejscach zapalnych wykazali, że rowki o głębokości 0,5 μm i szerokości 10 μm wpływają w znaczący sposób na prędkość migracji tych komórek oraz kierunkowość ruchu. Wszystkie komórki reagowały na rzeźbę poruszając się wzdłuż rowków po torach zbliżonych do prostoliniowych [64]. Makrofagi wykazują także ukierunkowaną migrację w odpowiedzi na kontakt z podłożem o nanometrowej topografii. Reagują na rowki o głębokości 30 nm, co odpowiada średnicy pojedynczego włókna kolagenowego [65].

Jak wcześniej wspomniano, zdolność komórek do migracji po składnikach zewnątrzkomórkowej macierzy odgrywa istotną rolę w czasie embriogenezy, gojenia się ran i regeneracji nerwów. Fibronektyna obok kolagenu jest głównym składnikiem substancji międzykomórkowej i zaangażowana jest w adhezję komórek, ich rozplaszczanie, organizację cytoszkieletu, przebudowę tkanek, odgrywa też znaczącą



RYSUNEK 2. Utrwalone i wybarwione Coomasie Brilliant Blue makrofagi szczurze (P388D1) hodowane na rowkowanym podłożu kwarcowym z równoległe zorientowanymi rowkami o głębokości 0,5 μm i szerokości 10 μm . Komórki przyjmują wydłużony kształt i orientują się wzdłuż długiej osi rowków

rolę w stymulowaniu ruchu komórek, szczególnie w ranach. W macierzy zewnątrzkomórkowej występuje pod postacią fibrylli. Wójciak-Stothard i współpracownicy zaobserwowali, że makrofagi szczurze, fibroblasty pochodzące ze ścięgna mięśnia zginacza szczura były znacznie lepiej przyczepione i rozplaszczone na włóknach fibronektyny niż na powierzchni szkła. Orientacja komórek wzdłuż dłuższej osi włókien obserwowana była już po 15 minutach inkubacji i włókna fibronektynowe stymulowały migrację makrofagów i fibroblastów w porównaniu z kontrolą na szkle. Obydwa typy komórek migrowały z prędkością blisko dwukrotnie większą, znacznie wzrosła również persystencja ruchu, co było wynikiem wyprostowania trajektorii ruchu komórek. Kontakt makrofagów z włóknami fibronektyny wpłynął znacząco na wzrost długości trajektorii i translokacji komórek. Również neuryty wykazywały znacznie wyższą persystencję ruchu [66].

Wykazano także, że zorientowane włókna fibryny mają wpływ na migrację i odpowiedź chemotaktyczną neutrofilii poruszających się w gradiencie stężenia fMLP. Komórki poruszały się w sposób ukierunkowany w stronę wyższego stężenia chemoatraktantu, zarówno w przypadku gdy włókna fibryny zorientowane są równolegle, jak i prostopadle do kierunku rozwoju gradientu, jednak włókna fibryny zorientowane równolegle wpływały na blisko dwukrotny wzrost wartości przemieszczenia reagujących chemotaktycznie komórek [64]. Tak więc architektura tkanki lub wprowadzenie implantu o określonej topografii mogą w znacznym stopniu wpływać na odpowiedź komórek układu immunologicznego.

Korohoda i Madeja przeprowadzając analizę aktywności ruchowej komórek nowotworowych (szczurzego mięsaka XC) na zwartej warstwie żywych fibroblastów ludzkich zaobserwowali, że komórki migrują wzdłuż dłuższej osi równolegle zorientowanych fibroblastów. Wykazali również, że komórki XC przemieszczały się na odległość blisko pięciokrotnie większą niż komórki poruszające się po gładkim podłożu szklanym i polistyrenowym. Wzrost translokacji komórek był spowodowany wyprostowaniem trajektorii ruchu i wzrostem persystencji migracji, a nie wynikiem przyspieszenia ruchu. Zaobserwowana reakcja komórek nowotworowych wskazuje, że zjawisko naprowadzania komórek przez kontakt z komórkami prawidłowymi może być zaangażowane w proces tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe [30].

Badano również wpływ zmian kształtu komórek wywołany reakcją na rzeźbę podłoża na ekspresję białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazano wzrost ekspresji genu odpowiedzialnego za syntezę fibronektyny w fibroblastach skóry ludzkiej, reagujących na rowkowane podłoże tytanowe i znaczny wzrost ilości tego białka we frakcji zewnątrzkomórkowej po 90 godzinach inkubacji komórek na tym podłożu [7]. Zaobserwowano także wzrost ekspresji metaloproteinazy-2 w tych komórkach [8]. W fibroblastach ścięgna reagujących na topografię wykazano aktywację przynajmniej 30 genów, w tym między innymi kinazy tymidyny, elastyny, receptora kinazy tyrozynowej, różnych rodzajów aminoglikozaminidaz, enzymów zaangażowanych

zowanych w metabolizm fosfatydyloinozytoli [15]. W komórkach odpowiedzialnych za regenerację kości stwierdzono aktywację enzymów zaangażowanych w proces mineralizacji kości [4].

IV. PROPONOWANE MECHANIZMY REAKCJI KONTAKTOWEGO NAPROWADZANIA KOMÓREK

Istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić mechanizm zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek. Pierwsza z nich została zaproponowana w 1976 roku przez Dunna i Heatha, którzy badali zachowanie fibroblastów na styku dwóch płaszczyzn szklanych, nachylonych w stosunku do siebie pod różnym kątem. Wykazali oni, że zdolność komórek do przechodzenia z jednej powierzchni na drugą jest uzależniona od kąta nachylenia płaszczyzn i występuje tylko wtedy gdy jest on mniejszy niż 16° . Zaobserwowali również tworzenie się nowych struktur cytoszkieletu w obszarach komórki oddzielonych krawędzią rowka. Struktury te nie wykazywały ciągłości z pozostałymi elementami cytoszkieletu, co pozwoliło autorom wysunąć hipotezę, że nieciągłości mikrofilamentów leżą u podstaw mechanizmu reakcji komórek na rzeźbę podłoża [21].

Kolejna hipoteza, wysunięta w 1979 roku Ohara i Buck sugeruje, że warunkiem wystąpienia reakcji komórki na kontakt z rowkami w podłożu lub włóknami jest wytworzenie kontaktów zogniskowanych (ang. *focal contacts*), co umożliwi ściąsłe przyleganie komórki do podłoża oraz związanie jej z podłożem przy udziale elementów cytoszkieletu [40]. Wiele obserwacji wskazuje na udział elementów cytoszkieletu w regulacji zjawiska naprowadzania komórek przez kontakt. Wykazano, że rozpad cytoszkieletu w znacznym stopniu zaburza reakcję komórek. Oakley i Brunette postulowali, że mikrotubule odgrywają najważniejszą rolę w reakcji komórek na rzeźbę podłoża i jako pierwsze ulegają reorganizacji w komórce [37]. Wyniki uzyskane przez Wójciak-Stothard wykazują jednak, że zmiany ilości i rozmieszczenia F-aktyny w komórce zachodzą znacznie szybciej niż orientacja struktur mikrotubularnych [65], a niektóre komórki, takie jak keratynocyty i neutrofile, reagują na topografię podłoża mimo, że mikrotubule nie są zaangażowane w reakcje ruchowe tych komórek [14]. Ponadto regularny układ winkuliny [65], polimeryzacja aktyny przy grzbiecie krawędzi rowka i występowanie kontaktów zogniskowanych [39] wskazują, że cytoszkielet aktynowy jest w znacznie większym stopniu zaangażowany w wystąpienie omawianych reakcji komórek niż układ mikrotubul w komórce. Przedstawione hipotezy kładące nacisk na udział elementów cytoszkieletu, a szczególnie kontaktów zogniskowanych w reakcjach naprowadzania komórek nie wyjaśniają jednak w jaki sposób zostaje zapoczątkowana reakcja komórek na topografię podłoża. Należy również zaznaczyć, że nie wszystkie komórki (np. neutrofile) reagujące na właściwości anizotropowe podłoża wytwarzają kontakty zogniskowane. Wy-

kazana przez Stepien i współpracowników reakcja filopodiów stożka wzrostu neuronów izolowanych ze zwojów rdzeniowych zarodka kurczenia także wskazuje, że kontakty zogniskowane nie mogą decydować o rozpoznawaniu krawędzi rysy. Autorzy zaobserwowali bowiem, że filopodia stożka wzrostu o średnicy 200 nm reagują na rysy o średnicy 100–200 nm, a więc pięciokrotnie mniejszej niż średnica kontaktów zogniskowanych [45]. Być może integryny i białka CAM występujące licznie w filopodiach zaangażowane są w przekazywanie sygnału zainicjowanego w tych wypustkach [3].

Wyniki te potwierdzają obserwacje Wójciak-Stothard i współpracowników, którzy wykazali akumulację aktyny, winkuliny i αV integryny w miejscach ścisłego kontaktu błony komórkowej makrofagów z krawędzią rowków o głębokości 30–70 nm. W komórkach tych zaobserwowano również fosforylację białek na resztach tyrozynowych towarzyszącą wzrostowi ilości F-aktyny. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników zasugerowali, że mechaniczna interakcja krawędzi z błoną komórkową odpowiedzialna jest za selektywną adhezję komórek, która następnie determinuje ich morfologię i orientację wzdłuż długiej osi rowków. Na powierzchni makrofagów zaobserwowano pojawienie się licznych mikrowypustek, charakterystycznych między innymi dla komórek stymulowanych czynnikami wzrostowymi, takimi jak EGF, PDGF i HGF/SF, inicjującymi przekazywanie sygnału w komórce poprzez aktywację fosforylacji receptora tyrozynowego. Wykazano również, że białka wiążące filamenty aktynowe (ABP), takie jak: ezryna, spektryna czy aneksyna II, są fosforylowane na tyrozynie w odpowiedzi na działanie czynników wzrostowych. Dlatego sugeruje się, że białka te mogą być potencjalnymi mediatorami reakcji komórek na kontakt z podłożem [65].

Walboomers i Jansen na podstawie badań przeprowadzonych na fibroblastach skóry szczura wykazali, że cytoszkielet aktynowy nie jest bezpośrednio zaangażowany w wystąpienie reakcji naprowadzania komórek przez kontakt z podłożem, a orientacja elementów cytoszkieletu aktynowego w obrębie ciała komórki jest raczej wynikiem, a nie przyczyną ukierunkowania komórek. Również oni sugerują, że reakcja naprowadzania komórek przez kontakt jest indukowana przez kontakt filopodiów komórki z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, a następnie stabilizację tego kontaktu. Siły przyciągania i odpychania pomiędzy białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i mikrowypustką błony komórkowej są czynnikiem determinującym wystąpienie reakcji. Następnie dochodzi do akumulacji winkuliny i innych białek i ewentualnego powstania kontaktów zogniskowanych, które w dalszej kolejności indukują powstanie włókien naprężeniowych w cytoplazmie komórki. Autorzy zaobserwowali również, że wraz ze wzrostem głębokości rowków wzrasta tendencja komórek do przyczepiania się i rozplaszczania wzdłuż krawędzi rysy, a zjawisko to jest niezależne od rzeźby podłoża. Reakcja komórek zachodziła w przypadku napotkania przez nie nieciągłości powierzchni. Sugerują oni, że fizyczno-chemiczne właściwości podłoża determinują ilość oraz rozmieszczenie białek

macierzy zewnątrzkomórkowej, co z kolei wpływa na zachowanie komórek na podłożu charakteryzującym się określoną rzeźbą [54].

Na uwagę zasługuje również fakt naprowadzania komórek hodowanych na zwartej warstwie fibroblastów ludzkich. Zarówno neurony DRG (ang. *dorsal root ganglions*) izolowane z zarodków kurczęcia, jak i komórki szczurzego mięsaka XC wykazywały na takim podłożu reakcję kontaktowego naprowadzania [30, 45]. Pozostaje jednak niejasne, czy komórki reagują na urzeźbienie podłoża czy też na skład chemiczny białek wydzielanych i odkładanych przez fibroblasty. Migrujące fibroblasty odkładają wzdłuż przebytej drogi fibronektynę [27, 66], prawdopodobne jest zatem, że zarówno uporządkowanie fibroblastów, jak i uporządkowanie białek deponowanych na powierzchni tych komórek może być czynnikiem zaangażowanym w reakcję naprowadzania komórek przez kontakt [30, 45].

V. WPŁYW TOPOGRAFII PODŁOŻA NA ORGANIZACJĘ STRUKTUR TKANKOWYCH

Obserwacja reakcji naprowadzania pojedynczych komórek przez kontakt z podłożem skłoniła badaczy do sprawdzenia, w jaki sposób zjawisko to może wpływać na regenerację niektórych struktur tkankowych. Jednym z przykładów jest udział tej reakcji w procesie regeneracji ścięgna. Ścięgno stanowi bierną, niekurczliwą część mięśnia przytwierdzającą go do kości i przenoszącą jego siłę skurczu. Siłę i elastyczność warunkują podłużnie ułożone włókna kolagenowe, natomiast zdolność do ślizgania warstwa komórek maziowych, zwanych także komórkami ościęgnej lub pochewki ścięgna (ang. *epitenon cells*). Gdy ścięgno ulega uszkodzeniu, obserwuje się syntezę kolagenu i namnażanie komórek ościęgnej, które migrują w kierunku wytworzonej rany. W ciągu 3–4 tygodni dochodzi do regeneracji ścięgna, jednak obserwuje się wiele komplikacji towarzyszących temu zjawisku. Jedną z najczęstszych jest powstanie włóknistych połączeń w wyniku niekontrolowanej migracji komórek pomiędzy ścięgnem i pochewką maziową, znajdującą się pod ścięgnem, co uniemożliwia ruch ślizgowy ścięgna. Wójciak i współpracownicy badali zachowanie szczurzych komórek ościęgnej izolowanych ze ścięgien mięśnia zginacza na rowkowanym podłożu krzemowym. Komórki ościęgnej reagowały na rzeźbę podłoża zmianą kształtu z wielobiegunowego na wydłużony w porównaniu z komórkami rosnącymi na gładkiej powierzchni. Zaobserwowano także wzrost średniej prędkości migracji komórek poruszających się po rowkowanym podłożu.

Gdy umieszczono przerwane ścięgna na gładkiej lub rowkowanej powierzchni, po tygodniu zaobserwowano wymigrowywanie komórek ze ścięgna. Na gładkiej powierzchni komórki poruszały się w sposób przypadkowy we wszystkich kierunkach, natomiast na powierzchni rowkowanej komórki wykazywały zjawisko naprowadzania przez kontakt i tworzyły komórkowe mostki pomiędzy dwoma końcami

przerwanego ścięgna. Szerokość tych połączeń była równa szerokości ścięgna, albowiem komórki nie były zdolne do opuszczania rowków. Po 6 tygodniach pojawiały się w regenerowanej tkance włókna kolagenowe. Ścięgno jest strukturą wysoce uporządkowaną. Wykorzystanie podłoża zawierającego równolegle ułożone rowki przyspiesza gojenie ścięgien poprzez naprowadzanie komórek, ich ukierunkowaną migrację oraz przyspieszenie prędkości ruchu. Tak więc otoczenie gojącego się ścięgna specjalnie spreparowanym materiałem, którego struktura wpływa na orientację i migrację komórek może w znacznym stopniu przyspieszać proces jego regeneracji [62].

Zaobserwowano również, że użycie włókien węglowych ma pozytywny wpływ na proces gojenia się więzadeł ścięgniastych kończyn dolnych u ludzi, jednak zastosowanie ich w innych miejscach organizmu nie przyniosło oczekiwanych rezultatów [13].

Prowadzone były także badania nad wpływem rowkowanych implantów tytanowych na proces regeneracji kości. Osteoblasty powstające z mezenchymalnych komórek pnia muszą posiadać zdolność syntetyzowania i wydzielania białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zdolność regulowania procesu mineralizacji kości. Wykazano, że komórki te kontaktując się z rowkowanym podłożem wytwarzają znacznie więcej związków kościo-podobnych w porównaniu komórkami umieszczonymi na gładkim podłożu. Topografia podłoża wzmacnia proces mineralizacji i wpływa na orientację zmineralizowanej tkanki wzdłuż rowków. Zaobserwowano również przyspieszenie migracji komórek [4].

Chen i współpracownicy wykorzystali substytuty tkankowe sporządzone na bazie macierzy kolagenowej pozbawionej komórek do rekonstrukcji cewki moczowej. Po dwóch tygodniach od operacji zaobserwowano penetrację komórek gospodarza do wnętrza macierzy kolagenowej oraz zachodzący proces angiogenezy. Po dwóch miesiącach wykazano ukierunkowaną migrację komórek włókien mięśniowych, a po 6 miesiącach prawidłową organizację mięśni. Tkanka została odtworzona w sposób prawidłowy i nie zaobserwowano objawów zwłóknienia, co może czynić macierz kolagenową użytecznym materiałem wykorzystywanym w medycynie [5].

Walboomers i współpracownicy wprowadzali pod skórę kozy implanty polistyrenowe o gładkim i rowkowanym podłożu (1–10 μm). Po tygodniu zaobserwowali oni pojawienie się łącznotkankowej torebki równomiernie rozmieszczonej wokół protezy oraz pojawienie się dużej liczby komórek stanu zapalnego w obydwu badanych przypadkach. Grubość włóknistej torebki (około 80 μm) nie malała nawet po 4 tygodniach od wszczęcia implantu, stwierdzono natomiast zagęszczenie macierzy kolagenowej oraz pojawienie się dużej liczby nowych naczyń krwionośnych w obrębie regenerowanej tkanki miękkiej [51]. Podskórne wprowadzenie implantu do świnki morskiej również wywołało wytworzenie cienkiej torebki łącznotkankowej oddzielonej od protezy przez pojedynczą warstwę jedno- i wielojądrzastych komórek fagocytykujących [55].

Chociaż w niektórych przypadkach wykorzystane rowkowane podłoża nie ograniczały formowania włóknistej otoczki wokół implantu, jednak wyniki badań zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek, przeprowadzanych w warunkach *in vitro* i *in vivo* wskazują na znaczącą rolę wpływu właściwości fizycznych i chemicznych podłoża na zachowanie komórek. Konieczne jest zatem poszukiwanie nowych podłoży, które mogą być stosowane jako rusztowanie dla nowo tworzących się tkanek. Ukierunkowanie migracji komórek wzdłuż rowków i włókien może mieć bowiem istotny wpływ na właściwości i budowę struktur tkankowych powstałych w wyniku procesu gojenia, odtwarzania dużych ubytków tkankowych, takich jak: rozszczypty podniebienia, rany pooparzeniowe oraz na przyspieszenie procesu regeneracji wysoce zorientowanych struktur, takich jak: ścięgna lub nerwy.

Należy spodziewać się zatem, że rozwój badań w tej dziedzinie będzie zmierzał w kierunku powszechnego wykorzystania w praktyce klinicznej materiałów, które charakteryzują się określoną rzeźbą powierzchni.

LITERATURA

- [1] BITTLEMAN DB, ERGER RA, CASALE TB. Cytokines induce selective granulocyte chemotactic responses. *Inflamm Res* 1996; **45**: 89–95.
- [2] BRUNETTE DM, CHEHROUDI B. The effect of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior *in vitro* and *in vivo*. *J Biomech Eng* 1999; **121**: 49–57.
- [3] BURRIDGE K, CHRZANOWSKA-WODNICKA M. Focal adhesion, contractility and signaling. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 463–519.
- [4] CHEHROUDI B, McDONNELL D, BRUNETTE DM. The effect of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Sci* 1997; **34**: 279–290.
- [5] CHEN F, YOO JJ, ATALA A. Acellular collagen matrix as a possible „off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology* 1999; **54**: 407–410.
- [6] CHESMEL KD, CLARK CC, BRIGHTON CT, BLACK J. Cellular response to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res* 1995; **29**: 1101–1110.
- [7] CHOU L, FIRTH JD, VELLI-JUKKA U, BRUNETTE DM. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J Cell Sci* 1995; **108**: 1563–1573.
- [8] CHOU L, FIRTH JD, UITTO VJ, BRUNETTE DM. Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1998; **39**: 437–445.
- [9] CLARK P, CONNOLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata. *Development* 1990; **108**: 635–644.
- [10] CLARK P, CONNOLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Cell guidance by ultrafine topography *in vitro*. *J Cell Sci* 1991; **99**: 73–77.
- [11] CLARK P, CONNOLY P, MOORES R. Cell guidance by micropatterned adhesiveness *in vitro*. *J Cell Sci* 1992; **103**: 287–292.
- [12] CURTIS ASG, VARDE M. Control of cell behavior. Topological factors. *J Natl Canc Inst* 1964; **31**: 15–26.

- [13] CURTIS ASG, WILKINSON CDW. Reaction of cell to topography. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1998; **9**: 1313–1329.
- [14] CURTIS A, WILKINSON C. Topographical control of cell migration. [w] Soll DR i Wessels D [red] Motion Analysis of Living Cells. New York, John Wiley & Sons, Inc., Publication 1998: 141–157.
- [15] CURTIS A, WILKINSON C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. [w] Lackie JM, Dunn GA, Jones GE [red] Cell Behaviour: Control and Mechanism of Motility, The Biochemical Society, London 1999: 15–27.
- [16] CZYZ J. Zjawisko kontaktowego naprowadzania komórek. *Postępy Biologii Komórki* 1993; **20** (Supl.2): 125–135.
- [17] DAMJI A, WESTON L, BRUNETTE DM. Directed confrontations between fibroblasts and epithelial cells on micromachined grooved substrata. *Exp Cell Res* 1996; **228**: 114–124.
- [18] DEN BRABER ET, DE RUIJTER JE, JANSEN JA. The effect of a subcutaneous rubber implant with shallow surface microgrooves on the surrounding tissues in rabbits. *J Biomed Mater Res* 1997; **37**: 539–547.
- [19] DEN BRABER ET, DE RUIJTER JE, GINSEL LA, VON RECUM AF, JANSEN JA. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998; **40**: 291–300
- [20] DOOLABH VB, HERTLM MC, MacKINNON SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci* 1996; **7**: 47–84.
- [21] DUNN GA, HEATH JP. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Exp Cell Biol* 1976; **101**: 1–14.
- [22] EISENBARTH E, MEYLE J, NACHTIGALL W, BREME J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials* 1996; **17**: 1399–1403.
- [23] FLEMING RG, MURPHY CJ, ABRAMS GA, GOODMAN SL, NEALEY PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999; **20**: 573–588.
- [24] GOLD J, KASEMO B. Morphological and chemical characterization of microfabricated fibres for biological application. *J Mater Sci Mater Med* 1997; **8**: 251–263.
- [25] GOTO T, BRUNETTE DM. Surface topography and serum concentration affects the appearance of tenascin in human gingival fibroblasts *in vitro*. *Exp Cell Biol* 1998; **244**: 474–480.
- [26] GRINELL F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci* 1992; **101**: 1–5.
- [27] HALFTER W, LIVERANI D, VIGNY M, MONARD D. Deposition of extracellular matrix along the pathways of migrating fibroblasts. *Cell Tis Res* 1990; **262**: 467–481.
- [28] KELLER JC. Tissue compatibility to different surfaces of dental implants; *in vitro* studies. *Implant Dent* 1998; **7**: 331–337.
- [29] KONONEN M, HORMIA M, KIVALATHI J, HAUTANIEMI J, THESLEFF I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992; **26**: 1325–1341.
- [30] KOROHOODA W, MADEJA Z. Contacts of sarcoma cells with aligned fibroblasts accelerates their displacement: computer-assisted analysis of tumour cell locomotion in co-culture. *Biochem Cell Biol* 1997; **75**: 263–276.
- [31] MATSUZAKA K, WALBOOMERS XF, de RUIJTER JE, JANSEN JA. The effect of microgrooved poly-l-lactic acid on osteoblast-like cells *in vitro*. *Biomaterials* 1999; **20**: 1293–1301.
- [32] MEYLE J, GUTLIG K, NISCH W. Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. *J Biomed Mater Res* 1995; **29**: 81–88.
- [33] MUDERA VC, PLEASS R, EASTWOOD M, TARNUZZER R, SCHILTZ G, KHAW P, McGROUTHER DA, BROWN RA. Molecular responses of human dermal fibroblasts to dual cues: contact guidance and mechanical load. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; **45**: 1–9.

- [34] NEHLS V, HERRMANN R, HUHNNEN M. Guided migration as a novel mechanism of capillary network remodelling is regulated by basic fibroblast growth factor. *Histochem Cell Biol* 1998; **109**: 319–329.
- [35] NICOLSON GL, MENTER DG, HERRMANN J, CAVANAUGH P, JIA L, HAMADA J, YUN Z, NAKAJIMA M, MARCHETTI D. Tumor metastasis to brain: role of endothelial calls, neutrophins, and paracrine growth factor. *Critical Rev Oncogenesis* 1994; **5**: 451–471.
- [36] NOLTE C, MOLLER T, WALTER T, KETTENMANN H. Complement 5a controls motility of murine microglial cells *in vitro* via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neurosci* 1996; **73**: 1091–1107.
- [37] OAKLEY C, BRUNETTE DM. Response of single, pairs, and clusters of epithelial cells to substratum topography. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 473–489.
- [38] OAKLEY C, JAEGER NAF, BRUNETTE DM. Sensitivity of fibroblasts and their cytoskeletons to the substratum topographies: topographic guidance and topographic compensation by micromachined grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 1997; **232**: 413–424.
- [39] O'CONNOR TP, BENTLEY D. Accumulation of actin in subsets in pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues *in situ*. *J Cell Biol* 1993; **123**: 935–948.
- [40] OHARA PT, BUCK RC. Contact guidance *in vitro*. *Exp Cell Res* 1979; **121**: 235–249.
- [41] PHILLIPS HM, SAUERBREY RA. Excimer-laser-produced nanostructures in polymers. *Opt Eng* 1993; **32**: 2424–2436.
- [42] PICHA GJ, DRAKE RF. Pillared-surface microstructure and soft-tissue implants: effects of implant site and fixation. *J Biomed Mater Res* 1996; **30**: 305–312.
- [43] QU J, CHEHROUDI B, BRUNETTE DM. The use of micromachined surfaces to investigate the cell behavior factors essential to osseointegration. *Oral Dis* 1996; **2**: 102–115.
- [44] RAJNICEK A, BRITLANDS, McCAIG. Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J Cell Sci* 1997; **110**: 2905–2913.
- [45] STEPIEŃ E, STANISZ J, KOROHODA W. Contact guidance of chick embryo neurons on single scratches in glass and on underlying aligned human skin fibroblasts. *Cell Biol Inter* 1999; **23**: 105–116.
- [46] TRANQUILLO RT, DURRANI MA, MOON AG. Tissue engineering science: consequences of cell traction force. *Cytotechnology* 1992; **10**: 225–250.
- [47] TRANQUILLO RT, GIRTON TS, BROMBEREK BA, TRIEBES TG, MOORADAN L. Magnetically orientated tissue-equivalent tubes – Application to a circumferentially orientated media equivalent. *Biomaterials* 1996; **17**: 349–357.
- [48] TRANQUILLO RT. Self organization of tissue-equivalents: the nature and role of contact guidance. [w] Lackie JM, Dunn GA, Jones GE [red] Cell Behaviour: Control and Mechanism of Motility, The Biochemical Society, London 1999: 27–43.
- [49] URABE M, HOSOKAWA R, CHIBA D, SATO Y, AKAGAWA Y. Morphogenetic behavior of periodontum on inorganic implant materials: an experimental study of canines. *J Biomed Mater Res* 2000; **49**: 17–24.
- [50] WALBOOMERS XF, CROES HJE, GINSEL LA, JANSEN JA. Growth behaviour of fibroblasts on microgrooved polystyrene. *Biomaterials* 1998; **19**: 1861–1868.
- [51] WALBOOMERS XF, CROES HJE, GINSEL LA, JANSEN JA. Microgrooved subcutaneous implants in the goat. *J Biomed Mat Res* 1998; **42**: 634–641.
- [52] WALBOOMERS XF, CROES HJE, GINSEL LA, JANSEN JA. Contact guidance of rat fibroblasts on various implant materials. *J Biomed Mat Res* 1999; **47**: 204–212.
- [53] WALBOOMERS XF, MONAGHAN W, CURTIS ASG, JANSEN JA. Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. *J Biomed Mat Res* 1999; **46**: 212–220.
- [54] WALBOOMERS XF, JANSEN JA. Early spreading events of fibroblasts on microgrooved substrates. [w] Wasenaar RW, van der Steen RJT [red] Engineered Implant Surfaces: Modification of Cell and Tissue Response by Microgrooves 2000: 85–105.

- [55] WALBOOMERS XF, JANSEN JA. Microgrooved silicone subcutaneous implants in guinea pigs. [w] Wasenaar RW, van der Steen RJT [red] *Engineered Implant Surfaces: Modification of Cell and Tissue Response by Microgrooves* 2000: 139–152.
- [56] WEISS P, TAYLOR AC. Fish scales as substratum for uniform orientation of cells *in vitro*. *Anat Rec* 1956; **124**: 381.
- [57] WEISS P. Cell contact. *Int Rev Cytol* 1958; **7**: 391–423.
- [58] WEISS P. Cellular dynamics. [w] *Biophysical Science – A Study Program*. Oncley JL, Schmitt FO, Williams RC, Rosenberg MD, Bolt RH (red), New York, London, Sydney: John Wiley & Sons, INC. 1959: 11–20.
- [59] WILKINSON PC, SHIELDS JM, HASTON WS. Contact guidance of human neutrophil leukocytes. *Exp Cell Res* 1982; **140**: 55–62.
- [60] WILKINSON PC, LACKIE JM. The influence of contact guidance on chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Exp Cell Res* 1983; **145**: 255–264.
- [61] WILKINSON PC, KOMAI-KOMA M, NEWMAN I. Locomotion and chemotaxis of lymphocytes. *Autoimmunity* 1997; **26**: 55–72.
- [62] WÓJCIAK B, CROSSAN J, CURTIS ASG, WILKINSON CDW. Grooved substrata facilitate *in vitro* healing of completely divided flexor tendons. *J. Mater Sci : Materials in Medicine* 1995; **6**: 266–271.
- [63] WÓJCIAK-STOTHARD B, CURTIS ASG, MONAGHAN W, McGRATH M, SOMMER I, WILKINSON CDW. Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; **31**: 147–158.
- [64] WÓJCIAK-STOTHARD B, MADEJA Z, KOROHODA W, CURTIS A, WILKINSON C. Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behavior. *Cell Biol Int* 1995; **19**: 485–490.
- [65] WÓJCIAK-STOTHARD B, CURTIS A, MONAGHAN W, McDONALD K, WILKINSON C. Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. *Exp Cell Res* 1996; **223**: 426–425.
- [66] WÓJCIAK-STOTHARD B, DENYER M, MISHRA M, BROWN RA. Adhesion, orientation, and movement of cells cultured on ultrathin fibronectin fibers. *In vitro Cell Dev Biol Animal* 1997; **33**: 110–117.
- [67] YOUNGS S, ALI SA, TAUB DD, REES RC. Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int. J Cancer* 1997; **71**: 257–266.
- [68] XIA Y, KIM E, ZHAO XM, ROGERS JA, PRENTISS M, WHITESIDES GM. Complex optical surfaces formed by replica molding against elastomeric surfaces. *Science* 1996; **273**: 347–349.
- [69] ZHAO M, AGIUS-FERNANDEZ A, FORRESTER JV, McCAIG CD. Directed migration of corneal epithelial sheets in physiological electric fields. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1996; **37**: 2548–2558.

Adres autora Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków