الفصل الأول

هندسة الأنسجة: الإستراتيجية العلاجية للقرن الحادي والعشرين

Tissue Engineering: The Therapeutic Strategy of the Twenty-First Century

Fan Yang, William L. Neeley, Michael J. Moore, Jeffrey M. Karp, Anita Shukla, and Robert Langer

المحتويات CONTENTS

(١,١) مقدمة Introduction ٥
(١,٢) الخلايا Cells ٧
(١,٢,١) مصادر الخلايا من أجل هندسة الأنسجة Cell Sources for Tissue Engineering ٧
(١,٢,٢) قدرة الخلايا الجذعية لتطبيقات هندسة الأنسجة Potential of Stem Cells for Tissue Engineering Applications ٨
(١,٢,٣) مصدر الخلايا الجذعية Stem Cell Source ٨
(١,٢,٤) العلاجات الصِرفَة المبنية على أساس الخلايا الجذعية Pure Stem Cell-Based Therapies ١٠
(١,٢,٥) العلاجات بالخلايا الجذعية المبنية على أساس حاملات الخلايا والأنسجة Scaffold-Based Stem Cell Therapies ١١
(١,٣) حاملات الخلايا والأنسجة وعملية التصنيع Scaffolds and Fabrication ١٤
(١,٣,١) أهمية حاملات الخلايا والأنسجة لتعزيز تشكيل الأنسجة Impotance of Scaffolds to Promote Tissue Formation ١٤
(١,٣,٢) تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة Scaffold Fabrication ١٥
(١,٣,٢,١) الطرق التقليدية والقيود Conventional Methods and Limitations ١٥
(١,٣,٢,٢) طرق تصنيع الشكل الحر الصلب Solid Freeform Fabrication Methods ١٦
(١,٣,٢,٢,١) تشكيل الترسيب المَصْهور Fused Deposition Modeling ١٦
(١,٣,٢,٢,٢) الطباعة ثلاثية الأبعاد 3D Printing ١٨

(١,٣,٢,٢,٣) التصليب الانتقائيّ باستخدام الليزر Selective Laser Sintering ١٨
(١,٣,٢,٢,٤) الطباعة الشمعيّة Wax Printing ١٨
(١,٣,٢,٢,٥) الطباعة المجَسّمَة Stereolithography ١٩
(١,٣,٢,٣) حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو Nanofibrous Scaffolds ١٩
(١,٣,٢,٣,١) الغزل الكهربائي Electrospinning ١٩
(١,٣,٢,٣,٢) حاملات الخلايا والأنسجة ذاتية التجميع Self-Assembling Scaffolds ١٩
(١,٣,٢,٤) البُنى الهجينة (خلايا / حاملة الخلايا) Hybrid (Cell / Scaffold) Constructs ٢٠
(١,٣,٢,٤,١) الهلامات المائية التقليدية الحاملة للخلايا Conventional Cell-Laden Hydrogels ٢٠
(١,٣,٢,٤,٢) التشكيل الثلاثي الأبعاد للهلامات المائية الحاملة للخلايا 3D Patterning of Cell-Laden Hydrogels ٢١
(١,٤) توصيل العوامل المحفِّزة للأنسجة Delivery of Tissue-Inducing Factors ٢١
(١,٤,١) قدرة نظام الإطلاق المتحكّم به لتعزيز تشكيل الأنسجة Potential of Controlled Release System to Enhance Tissue Formation ٢١
(١,٤,٢) أنواع العوامل المحفِّزة للأنسجة Types of Tissue-Inducing Factors ٢٣
(١,٤,٣) توصيل الجزيء الصغير من أجل هندسة الأنسجة Small Molecule Delivery for Tissue Engineering ٢٣
(١,٤,٤) توصيل البروتين من أجل هندسة الأنسجة Protein Delivery for Tissue Engineering ٢٤
(١,٤,٤,١) التحديات في توصيل البروتين المتحكّم به Challenges for Controlled Protein Delivery ٢٤
(١,٤,٤,٢) إستراتيجيات لتوصيل البروتين Strategies for Protein Delivery ٢٥
(١,٤,٤,٣) الإطلاق المتحكّم به لعوامل النمو لتعزيز تشكيل الأنسجة Controlled Release of Growth Factors to Enhance Tissue Formation ٢٥
(١,٤,٥) توصيل الحمض النووي من أجل هندسة الأنسجة Nucleic Acid Delivery for Tissue Engineering ٢٧
(١,٤,٥,١) تقنيات لتوزيع الجينات Techniques for Gene Delivery ٢٧
(١,٤,٥,٢) العوائق الرئيسية في توصيل الجينات والحلول التقليدية Major Barriers in Gene Delivery and Conventional Solutions ٢٨
(١,٤,٥,٣) طريقة عالية الإنتاجية لتحديد مواد جديدة قابلة للتحلل الحيوي لتوصيل الجينات High-Throughput Approach to Identify Novel Biodegradable Material for Gene Delivery ٢٩
(١,٤,٥,٤) الإطلاق المتواصل للحمض النووي (DNA) من حاملات خلايا وأنسجة بوليمرية من أجل هندسة الأنسجة Sustained DNA Release from Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering ٣٠
(١,٤,٥,٥) توصيل الجينات المستهدف من أجل التطبيقات في الجسم الحي Targeted Gene Delivery for In Vivo Applications ٣٢

(١,٤,٥,٦) توصيل قليلة النوكليُوتيدات المضادة للاتجاه والـــ (RNA) (الحَمْضُ النّوَوِيّ الرّيبِي) قصير التداخل Antisense Oligonucleotides and siRNA Delivery ٣٢

(١,٥) المفاعلات الحيوية في هندسة الأنسجة BIOREACTORS IN TISSUE ENGINEERING ٣٣

(١,٥,١) متطلبات المفاعلات الحيوية في هندسة الأنسجة Requirements for Bioreactors in Tissue Engineering ٣٣

(١,٥,٢) المفاعلات الحيوية لبذر الخلايا الديناميكيّ Bioreactors for Dynamic Cell Seeding ٣٤

(١,٥,٣) المفاعلات الحيوية لتحسين النقل الكتلي Bioreactors to Improve Mass Transfer ٣٥

(١,٥,٤) المفاعلات الحيوية لتوفير محفزات ميكانيكية لتشكيل أنسجة مُحسّنة Bioreactors to Provide Mechanical Stimuli for Enhanced Tissue Formation ٣٦

(١,٥,٥) الاتجاهات المستقبلية لاستخدام المفاعلات الحيوية في هندسة الأنسجة Future Directions for Using Bioreactors in Tissue Engineering ٣٧

(١,٦) الاستنتاجات CONCLUSIONS ٣٧

المراجع REFERENCES ٣٨

(١,١) مقدمة INTRODUCTION

يعد فقدان أو فشل عضو أو نسيج واحدة من أكثر المشاكل المتكررة والمسببة للصدمة والمكلفة في مجال الرعاية الصحية. وقد ولدت هندسة الأنسجة على الأغلب لحاجة الباحثين للانتقال إلى طرق متعددة التخصصات لحل هذه المشكلة التي طال أمدها في مجال الطب. وقد تمت مواكبة التطوّرات في الطب من خلال التفاعلات المتزايدة بين العديد من التخصصات مثل علم الأحياء وعلوم المواد والهندسة، والتي أدت إلى إحراز تقدم في التشخيص والمراقبة وظهور أجهزة مزروعة (implanted devices) وطُعوم نسيجية (tissue grafts). بالإضافة إلى ذلك، فقد واصل الطب تقدمه وازداد عدد الناجين من الاضطرابات والإصابات الشديدة، وكذلك فقد ازداد عدد المرضى الذين يتلقون وينتظرون هذه العلاجات الحاسمة، وأصبحت الحاجة إلى علاجات بديلة ظاهرة بشكلٍ واضح.

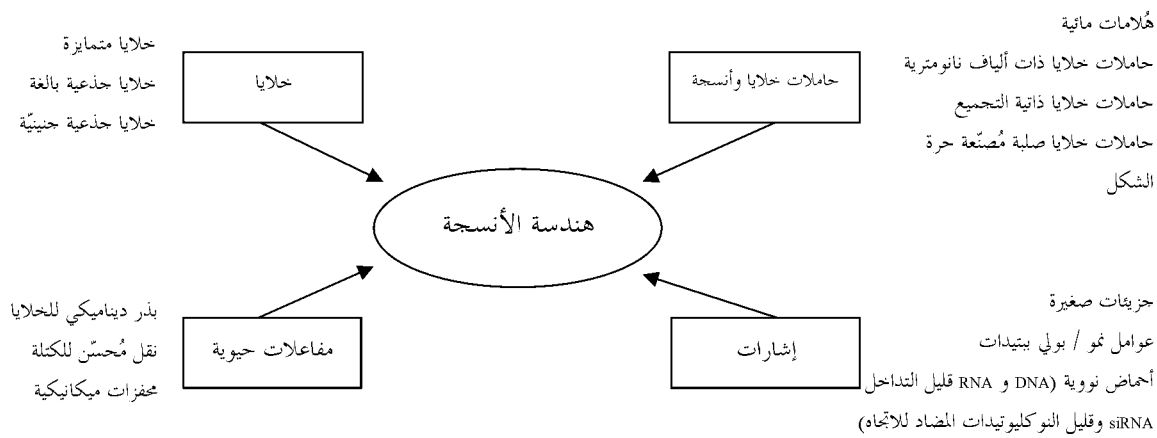
وقد كان الأطباء السَريرِيّون قوة دفع قوية للابتكار في مجال الطب. إن أصل هندسة الأنسجة (tissue engineering) نابع من حاجات الجراحين لتجديد أنسجة نشطة وظيفيًّا لتحل محل تلك التي فُقدت بسبب الجروح أو التشوهات الخلقية أو التطوّرات المرضية المختلفة. تستخدم الطرق الحالية لاستبدال الأعضاء والأنسجة بشكلٍ أساسي طُعومًا ذاتية (autografts) أو طُعومًا خيفيّة (غيرية) (allografts) (طُعم خيفيّ: طُعم من فرد ينتمي لنفس النوع) أو أجهزة معدنية (metallic devices). ترتبط تلك الطرق الفعّالة بقيودٍ واضحة تتضمن مرض الجانب المتبرع ونقصًا في البدائل المتوفرة واندماجًا ضعيفًا وردود فعل مناعية محتملة. وتؤكّد هذه القيود أيضًا على أهمية التطوير في الوقت المناسب والترجمة الناجحة لعلاجات تقوم على مبادئ هندسة الأنسجة. تاريخيًّا، فقد عمل الأطباء الباطنيون أيضًا على علاجات أكثر تعقيدًا، من الإدارة الدوائية للجزيئات الصغيرة إلى استخدام البروتينات والحمض النووي وجزيئات ضخمة أخرى إلى الأجهزة خارج الجسم وذلك لاستبدال وظيفة الخلايا

أو الأنسجة المفقودة. وأصبحت العلاجات القائمة على أساس الخلايا مرغوبة لقدرتها على القيام بالعديد من الوظائف الكيميائية الحيوية المعقدة. وهكذا، فقد ألهمت هذه المشاكل الصعبة في الطب السريري العلماء والأطباء باستمرار في بحثهم للكشف عن الآليات البيولوجية لاستثمارها عند سرير المريض.

لقد بدأت أبحاثنا بالتعاون مع مجموعة فاكانتي في البحث عن بديل للمرضى الذين ينتظرون عمليات زرع الكبد. وقد بحثنا معًا طرق توسيع مفهوم بذر الخلايا إلى بذر ثلاثي الأبعاد كمحاولة في اتجاه استبدال كامل العضو. وأدى تعاوننا إلى عملٍ منشور يصف استخدام الشبكات البوليمرية الاصطناعية القابلة للامتصاص (synthetic, resorbable, polymeric meshes) من أجل زرع الخلايا (cell transplantation) (Vacanti et al. 1988). وقد تم اعتماد هذه الطريقة من قبل عدد من المهندسين الكيميائيين وغيرهم من العاملين في مجال البوليمرات الاصطناعية، مؤثرةً على الكثير في استخدام تقنيات مماثلة مع بوليمرات قابلة للتحلل.

لقد حوّل العديد مهاراتهم في مجال علم الأحياء أو الهندسة باتجاه هندسة الأنسجة، ورأوا في ذلك الإثارة في القطاع الأكاديمي كما هو الحال في القطاع الخاص. إن بحوث هندسة الأنسجة تتمتع بتدفقٍ كبير في التمويل من القطاع الخاص، وذلك بسبب ميل الوكالات الاتحادية المبكر في اتجاه تمويل البحوث التي من المفترض أنها ذات أولوية من جهة ومن جهة أخرى بسبب الموجة المعاصرة لاستثمار الشركات في مجال التقنية الحيوية. فمنذ منتصف الثمانينات حتى نهاية الألفية، تم استثمار أكثر من ٣.٥ مليار دولار في جميع أنحاء العالم في مجال البحث والتطوير، وأكثر من ٩٠٪ من تلك الأموال تم توفيرها من قبل القطاع الخاص. وفي نهاية العام ٢٠٠٠، شاركت أكثر من ٧٠ شركة في البحث والتطوير و/ أو التصنيع في مجال هندسة الأنسجة. وكانوا ينفقون ما يُقدّر بنحو ٦٠٠ مليون دولار سنويًّا، وقد تم توظيف ما يقارب من ٣٣٠٠ عالم وموظف دعم بدوامٍ كامل، في حين أن اثنين فقط من جميع المنتجات قد حصلا على موافقة إدارة الأغذية والأدوية (Lysaght and Reyes 2001).

في العقد الأول من القرن الواحد والعشرون، تتواصل التقدمات العلمية بخطىً ثابتة. وقد أصبحت الوكالات الاتحادية وعلى نحوٍ متزايد قوية في رعاية هذا المجال، سواءً في الولايات المتحدة أو في خارجها، ليس فقط عن طريق زيادة التمويل، ولكن أيضًا عن طريق رعاية ورشات العمل والدراسات والمساعدة على تحديد مستقبل هذا المجال (McIntire 2003; Viola et al. 2003). والأهم من ذلك، فقد أصبحت التعقيدات والتحديات التي تواجه هندسة الأنسجة الحية مفهومة بشكلٍ كاملٍ تمامًا، ووصلت البحوث أعماقًا أكبر من أي وقتٍ مضى في الابتكار والتقنية. وأصبح مهندسو الأنسجة يتوجهون بشكلٍ متزايد نحو مجالات جانبية، بشكلٍ خاص نحو الخلايا الجذعية (stem cell) وعلم الأحياء التطوّري (developmental biology) وتقنية النانو (nanotechnology) (Ingber et al. 2006; Vunjak-Novakovic and Kaplan 2006). وبالتالي؛ ومع أن منتجات الجيل الأول لا تزال تأتي إلى السوق، فإنه يجري حاليًا وضع الأساس العلمي لهندسة أنسجة وظيفية أكثر تعقيدًا من أي وقتٍ مضى. في هذا الفصل، سنستعرض بإيجاز عددًا من الإنجازات المهمة في هذا المجال من بدايتها وحتى يومنا هذا، بما في ذلك الخلايا (cells) وحاملات الخلايا والأنسجة (scaffolds) والعوامل المحفزة لنسيج (tissue - inducing factors) والمفاعلات الحيوية (bioreactors) (الشكل رقم ١.١).



الشكل رقم (١,١). المكونات الرئيسية لهندسة الأنسجة.

(١,٢) الخلايا CELLS

(١,٢,١) مصادر الخلايا من أجل هندسة الأنسجة Cell Sources for Tissue Engineering

الخلايا هي لبنَات بناء الأنسجة، و يُعتقد أن الخلايا الموجودة في الأنسجة المطعّمة تلعب دورًا حاسمًا في تعزيز شفاء الأنسجة وتجديدها (tissue healing and regeneration). وبالتالي ؛ فإن معظم طرق هندسة الأنسجة تشمل عزل وتوسيع نمو الخلايا في المختبر (in vitro). يعد مصدر الخلية عاملاً مهمًّا عند تطبيق إستراتيجيات هندسة الأنسجة ؛ وذلك لإعادة إنتاج الأنسجة والوظائف المفقودة. واحدة من العقبات الرئيسية في بُنى هندسة الأنسجة من أجل الاستخدام السريري هي النقص في الخلايا البشرية المتاحة. تستخدم الطرق التقليدية عادةً أنواع خلايا بالغة متمايزة بشكلٍ كامل، والتي تشكل العضو أو النسيج المستهدف. وهذا يتطلب في كثيرٍ من الأحيان جمع النسيج من المانح كنسيج ذاتي المنشأ (autogenous tissue) أو كنسيج خيفيّ (allogeneic tissue) وهضم النسيج إنزيميًّا (enzymatically digesting) لتحرير الخلايا وزراعة الخلايا المنفصلة في حوجلات (قوارير) زرع الأنسجة (tissue culture flasks) للبدء في توسيع نمو الخلايا. على سبيل المثال، إن عملية زرع الخلايا الغضروفية ذاتية المنشأ (autologous chondrocytes transplantaion - ACT) هي إجراء مبني على الخلايا من أجل إصلاح الغضروف، ويشمل هذا الإجراء الحصول على الخلايا الغضروفية من المريض وتوسيع نمو الخلايا في المختبر وإعادة زرع الخلايا مرة أخرى في نفس المريض (Brittberg et al. 1994; Peterson et al. 2000). وعلى أي حال، فإن طرق هندسة الأنسجة بحاجة إلى عددٍ كبير من الخلايا، في حين أن قدرة تكاثر الخلايا المتمايزة تمامًا محدودة جدًّا. بالإضافة إلى ذلك، فإن الخلايا البالغة المتمايزة بشكلٍ كامل تميل لأن تفقد نمطها الظاهري (phenotype) أو تمايزها (differentiate) أثناء النمو في المختبر (in vitro) (Schnabel et al. 2002). ونظرًا للقيود المفروضة على الخلايا المتمايزة بشكلٍ كامل، فقد تعاون العلماء والأطباء للاستفادة من قدرة الخلايا الجذعية، والتي يعتقد العديد بأنها تملك المفتاح لفتح أسرار تجديد الأنسجة. سنُركّز في هذا الفصل وبشكلٍ أساسي على التطوّرات في مجال الخلايا الجذعية التي ولّدت إثارةً كبيرة في العقد الماضي.

(١,٢,٢) قدرة الخلايا الجذعية لتطبيقات هندسة الأنسجة Potential of Stem Cells for Tissue Engineering Applications

توفر الخلايا الجذعية مصادر بديلة للخلايا من أجل هندسة الأنسجة، مثل الإصلاح القحفي الوجهي (craniofacial repair) (Bruder et al. 1994; Aubin 1998; Shamblott et al. 1998; Thomson et al. 1998; Pittenger et al. 1999; Sottile et al. 2003; Cowan et al. 2004; Kim et al. 2005a). وعلى عكس الأنواع الأخرى من الخلايا في الجسم، فإن الخلايا الجذعية هي خلايا غير متخصصة (unspecialized cells) قادرة على تجديد نفسها لفتراتٍ طويلة مع الحفاظ على قدرتها على التمايز إلى عدة أنواع متخصصة من الخلايا وذلك عند التعرض لتنبيهات أو إشارات تحريضية محددة (specific induction cues). ويمكن لتطوير تقنيات زراعة وتنظيم الخلايا الجذعية البشرية أن يؤدي إلى علاجات تجديدية (regenerative treatments) لم يسبق لها مثيل وعلاجات لأمراض لا يمكن أن تُعالج في الوقت الحاضر عن طريق وسائل أخرى. وتشير التقديرات إلى أن ما يقرب من ٣٠٠٠ شخص يموتون كل يوم في الولايات المتحدة من الأمراض التي كان يمكن أن تُعالج باستخدام أنسجة مستمدة من الخلايا الجذعية (Lanza et al. 2001). فبالإضافة إلى توليد الأنسجة والأعضاء لعلاج السرطان (cancer) أو الرضوض (trauma) أو الالتهابات (inflammation) أو تدهور الأنسجة المرتبط بالعمر (age - related tissue deterioration)، يمكن للخلايا الجذعية أن تكون مفيدة أيضًا لعلاج العديد من الأمراض بما فيها مرض باركنسون (Parkinson) ومرض الزهايمر (Alzheimer) وهشاشة العظام (osteoporosis) وأمراض القلب. ويجرى حاليًا اختبار الخلايا الجذعية من الناحية العلاجية لعلاج أمراض الكبد وأمراض الشرايين التاجية (coronary) واضطرابات المناعة الذاتية والاضطرابات الاستقلابية (autoimmune and metabolic disorders) والأمراض الالتهابية المزمنة وأمراض السرطان المتقدمة الأخرى. ويمكن أن تكون الخلايا الجذعية خلايا أجنبية (xenogenic) أو خلايا خيفيّة (allogeneic) أو خلايا ذاتية المنشأ (autologous)، حيث تُفضَّل الخلايا ذاتية المنشأ لأنها لن تثير استجابة مناعية (immunologic response)؛ وبالتالي يمكن تجنّب التأثيرات الجانبية الضارة للعوامل المثبّطة للمناعة (immunosuppressive agents). ويمكن للخلايا الجذعية ذاتية المنشأ وخلايا السَلَف (الخلايا الأصل) (progenitor cells) ذاتية المنشأ أن تُستمد بعد الولادة (postnatally) في مرحلة البلوغ أو في سنٍ مبكرة من دم الحبل السُرِّيّ (umbilical cord) (Cetrulo 2006) أو من نسيج الحبل السُرِّيّ (Baksh et al. 2007). ويمكن أيضًا توليد خلايا مشابهة لذاتية المنشأ (autologous - like cells) باستخدام الاستنساخ العلاجي (therapeutic cloning) أو بنقل نواة خلية جسدية (somatic cell nuclear transfer - SCNT)، وهي العملية التي تم من خلالها استنساخ النعجة دوللي في عام ١٩٩٧ (Hwang et al. 2004). وقد أظهرت الدراسات حتى الآن بأنه يمكن توسيع نمو الخلايا المشتقة أو المستمدة بواسطة الـ (SCNT) في مزرعة خلايا ويمكن تنظيم هذه الخلايا في بُنى نسيجية بعد الزراعة في الجسم الحي (transplantation in vivo) وذلك بالاشتراك مع حاملات خلايا وأنسجة قابلة للتحلل الحيوي (biodegradable scaffolds) (Lanza et al. 1999).

(١,٢,٣) مصدر الخلايا الجذعية Stem Cell Source

اعتمادًا على مرحلة تطوّر الأنسجة التي يتم عزل الخلايا الجذعية منها، يمكن للخلايا الجذعية أن تُقسم بصورةٍ عامة إلى فئتين: الخلايا الجذعية البالغة (adult stem cells) والخلايا الجذعية الجنينية (embryonic stem cells) (Shamblott et al. 1998; Thomson et al. 1998; Pittenger et al. 1999). يمكن العثور على الخلايا الجذعية البالغة في العديد من أنواع الأنسجة البالغة بما في ذلك نقي العظم (bone marrow) أو الدم المحيطي (peripheral blood) أو الأنسجة الشحمية (adipose tissue)

أو الأنسجة العصبية (nervous tissue) أو العضلات (muscle) أو الأدمة (dermis) (باطن الجلد تحت البشرة)، .. إلخ (الجدول رقم ١.١). ويمكن أن يَنتُج عن الخلايا الجذعية البالغة، والتي تُعتبر متعددة القدرات (multipotent)، العديد من أنواع الخلايا الأخرى. ومن بين الخلايا الجذعية البالغة، أظهرت الخلايا الجذعية المشتقة من نقي العظم (bone marrow - derived stem cells - MSCs) أن لديها القدرة على التمايز إلى أنواعٍ متعددة من الأنسجة، بما في ذلك العظم (bone) والغضروف (cartilage) والعضلات والوتر (tendon) وغيرها، ولها قدرة كبيرة في العلاج المبني على أساس الخلايا ذاتية المنشأ (autologous cell - based therapy) (Pittenger et al. 1999). وهناك ميزة أخرى مهمَّة للخلايا الجذعية المشتقة من نقي العظم (MSCs) في الطب التجديدي (regenerative medicine) وهي قدرة استخدامها كخلايا خيفيّة من دون استخدام علاج مثبّط للمناعة (immunosuppressive therapy) (Le Blanc et al. 2003; Maitra et al. 2004; Aggarwal and Pittenger 2005). بالإضافة إلى الأنسجة البالغة المذكورة أعلاه، فقد تم أيضًا تحديد الخلايا الجذعية في أنسجة جنينية (fetal tissues) مثل دم الحبل السُرِّيّ وهُلام وارطون (Wharton's jelly) (المادة الهُلامِيَّة في الحبل السُرِّيّ). وبالرغم من أنه كان يُعتقد أصلاً أن الخلايا الجذعية المستمدة من نسيج محدد يمكن أن تجدد فقط أنسجة معينة، فقد دحضت دراسات عديدة هذه الفكرة (Macpherson et al. 2005). فعلى سبيل المثال، يمكن لكلٍّ من الخلايا الجذعية المتوسّطِيّة (mesenchymal stem cells - MSCs) المشتقة من نقي العظم ومن الأنسجة الشحمية التمايز إلى الخلايا والأنسجة ذات المنشأ أو الأصل الأديمي المتوسطي (mesodermal origin) بما في ذلك الخلايا الشحمية (adipocytes) والخلايا الغضروفية (chondrocytes) والخلايا البانية للعظم (osteoblasts) والخلايا العضلية الهيكلية (skeletal myocytes)، كما يمكن استخدامها لتوليد أنسجة خاصة بها بما في ذلك الدهن والغضروف والعظم والعضلات (Caplan and Bruder 2001; Zuk et al. 2001; Baksh et al. 2003; Izadpanah et al. 2006). بخلاف عزل نقي العظم، والذي يتطلب عادةً عمليات بزل متعددة (multiple punctures) باستخدام إبرة ذات ثقب كبير، فإنه من الممكن الحصول على الأنسجة الشحمية تحت الجلد (subcutaneous) عن طريق الاستئصال الجراحي باستخدام مشارط أو من خلال شفط الشحوم (liposuction)، والتي قد يراها بعض المرضى أنها مفيدة. ومع ذلك، وعلى الرغم من قدرتها على التمايز إلى أنواعٍ متعددة من الخلايا، تُعتبر الخلايا الجذعية البالغة وبشكلٍ عام بأنها تنتج فقط مجالاً محددًا من أنواع الخلايا المتمايزة وذلك بالمقارنة مع الخلايا الجذعية الجنينية.

بالمقارنة مع الخلايا الجذعية المتوسّطِيّة (MSCs)، والتي يمكن أن يُوسَّع نموها في حالة غير متمايزة ولمراحل محدودة، فإن الخلايا الجذعية الجنينية (embryonic stem cells - ES) أو الخلايا الجنسية الجنينية (embryonic germ cells - EG) يمكن أن تجدد نفسها بدون تمايز لفترة أطول. إن هذه الخاصية تجعلها من المرشحين المرغوبين كمصادر خلايا من أجل هندسة الأنسجة، والتي تحتاج في كثيرٍ من الأحيان إلى أعدادٍ كبيرة من الخلايا. تُشتق الخلايا الجذعية الجنينية من كتلة الخلايا الداخلية لكيسَات أُرَيمِيّة (inner cell mass of blastocyst)، وتُعزل الخلايا الجنسية الجنينية من حرف الغدّة التّناسُلية النامية (developing gonadal ridge). وبما أن هذه الخلايا معزولة من المرحلة الجنينية، فهي تُعتبر متعددة القدرات (pluripotent)، ويمكن أن تتطوّر إلى أي من الطبقات المتِشَة (germ layers) الثلاث وهي: الأديمُ الباطن (endoderm) (البطانة الداخلية للمعدة (interior stomach lining)، السبيل الهضمي المعدي المعوي (gastrointestinal tract)، الرئتين) أو الأديمُ المتوسط (mesoderm) (العضلات، العظم، الدم، والسبيل البولي التناسلي (urogenital)) أو الأديمُ الظاهر (ectoderm) (أنسجة

البشرة (epidermal tissues) والجهاز العصبي (nervous system)). وقد اندلع الجدل السياسي والأخلاقي حول الخلايا الجذعية فقط في عام ١٩٩٨ مع إنشاء خلايا جذعية جنينية بشرية مُستمدة من الأجنّة البشرية (human embryos) التي تم التخلص منها (Thomson et al. 1998). فبالإضافة إلى الاستخدام العلاجي المباشر، تُمثّل الخلايا الجذعية الجنينية مصدرًا جذّابًا للخلايا من أجل دراسة البيولوجيا التطوّرية ومن أجل دراسات التحرّي أو الفحص الدوائي / السُّمّي (drug / toxin screening) ومن أجل تطوير العوامل العلاجية (therapeutic agents) للمساعدة في علاجات استبدال نسيج أو عضو. وعلى الرغم من أن الخلايا الجذعية الجنينية (ES) قد تملك السر لعلاجات متعددة ولتطورات رائدة في مجال الطب التجديدي، إلا أنها تثير مخاوف أخلاقية كبيرة لأنها تُجنى من الأجنّة.

الجدول رقم (١,١). أنواع ومصادر الخلايا الجذعية البشرية.

المنشأ (Origin)	أنواع الخلايا الجذعية (Types of Stem Cells)	مصادر العزل (Sources of Isolation)
خلايا بالغة (Adult)	خلايا جذعية مُتوسّطِيّة (Mesenchymal stem cells)	نقي العظم (Bone marrow)
	خلايا جذعية مُكوّنة للدم (Hemopoietic stem cells)	نقي العظم والدم المحيطي (Bone marrow and peripheral blood)
	خلايا جذعية عصبية (Neural stem cells)	نسيج عصبي (Neural tissue)
	خلايا جذعية مشتقة من الشحم (Adipose - derived stem cells)	نسيج شحمي (Adipose tissue)
	خلايا جذعية مشتقة من العضلات (Muscle - derived stem cells)	عضلات (Muscle)
	خلايا جذعية مشتقة من البشرة (Epidermal - derived stem cells)	جلد، شعر (Skin, hair)
	خلايا جذعية من دم الحبل السُرِّيّ (Umbilical cord blood stem cells)	دم الحبل السُرِّيّ (Umbilical cord blood)
	خلايا جذعية من مصفوفة الحبل السُرِّيّ (Umbilical cord matrix stem cells)	هُلام وارطون (Wharton's jelly)
خلايا جنينيّة (Embryonic)	خلايا جذعية جنينيّة (Embryonic stem cells)	كتلة خلايا داخلية لكيسَة أُرَيمّية بعمر ٥ – ٧ أيام (Inner cell mass of 5 – 7 day blastocyst)
	خلايا جنسيّة جنينيّة (Embryonic germ cells)	حرفُ الغُدّة التّناسُلية لجنين بعمر ٦ – ١١ أسبوعًا (Gonadal ridge of 6 – 11 week fetus)

(١,٢,٤) العلاجات الصِرفَة المبنية على أساس الخلايا الجذعية Pure Stem Cell-Based Therapies

على الرغم من أن أبحاث الخلايا الجذعية لا تزال في مرحلة الطفولة، إلا أن هناك بعض قصص النجاح الجديرة بالملاحظة تتضمن عمليات نقل الدم (blood transfusions) وزرع نقي العظم (bone marrow transplantation) والتي استُخدمت في آلاف المرضى للعلاج الناجح لحجم الدم المنخفض (low blood volume) وأمراض الدم ونقي العظم مثل الأورام اللمفاوية (lymphoma). إن زرع نقي العظم يُمثّل الطريقة الأكثر شيوعًا الموافق عليها سريريًّا للعلاج المبني على أساس الخلايا الجذعية (stem cell - based therapy). ويتم هنا إعطاء عوامل نمو (growth factors) في البداية مثل عامل تحفيز مستعمرة

الخلايا المحَبّبَة (granulocyte colony - stimulating factor - G-CSF) لتضخيم وتحريك الخلايا الجذعية المكوّنة للدم في الدورة الدموية المحيطية حيث يمكنها بسهولة أن تُجمع باستخدام تقنيات فِصادةُ الكُريّات البيض (leukapheresis techniques). تقوم عملية زرع نقي العظم والتي كانت تُستخدم منذ الستينيات على نقل أو حقن الخلايا الجذعية في الدورة الدموية المحيطية للمتلقّي من خلال قِنْطار وريدي (intravenous catheter). تصل الخلايا الجذعية إلى نقي العظم، حيث تتكاثر وتبدأ في إنتاج خلايا الدم. ومن اللافت للنظر، أنه حتى خلية جذعية واحدة مُكوِّنة للدم يمكن أن تُستخدم لإعادة تشكيل الجملة اللمفاويّة المكوِّنة للدم (lymphohematopoietic system) بشكلٍ كامل (Osawa et al. 1996). إن العديد من العلاجات الصِرفَة القائمة على أساس الخلايا الجذعية هي حاليًا في طور التجارب السريرية. فعلى سبيل المثال، تعمل شركة أوزيريس للمعالجة (Osiris Therapeutics Inc.) على مُنتجٍ يُسمّى بروشيمال (Prochymal)، وهو علاج لمرض يهدد الحياة يدعى داءُ الطُعم حيالَ الثّويّ الحاد (acute graft versus host disease - AGHD) والذي يهاجم الجهاز الهضمي المعدي المعوي والجلد والكبد. ويؤثر داءُ الطُعم حيالَ الثّويّ الحاد (AGHD) على نصف مجموع المرضى الذين يحصلون على زرع نقي العظم لعلاج فقر الدم (anemia) وأمراض أخرى. كما يجرى حاليًا إجراء تجارب باستخدام بروشيمال لتقييم قدرته على الحد من أعراض داء كرون (Crohn's disease) المتوسط إلى الشديد (داء الورم الحُبيبيّ الالتهابي الهضمي المزمن). وقد بدأت مؤخرًا شركة أسترالية للخلايا الجذعية البالغة، ميسوبلاست المحدودة (Mesoblast Ltd.)، المرحلة الثانية من التجارب السريرية في علاجها لمرضى النوبات القلبية (heart attacks) باستخدام الخلايا الجذعية البالغة الخيفيّة. ويقوم هذا العلاج على حقن الخلايا الجذعية عن طريق قثطار في عضلة القلب المتضررة ويهدف إلى تحسين وظيفة القلب والحد من فشل القلب الاحتقاني (congestive heart failure).

(١,٢,٥) العلاجات بالخلايا الجذعية المبنية على أساس حاملات الخلايا والأنسجة Scaffold-Based Stem Cell Therapies

على عكس العلاجات المبنية على أساس الخلايا الصِرفَة، حيث يتم حقن الخلايا الجذعية مباشرةً في الدورة الدموية المحيطية (الدوران المحيطي) (peripheral circulation) أو في نسيجٍ معين، فإن العديد من التطبيقات يتطلب حاملاً للخلايا (cell carrier)، وذلك لنقل و/أو ترتيب الخلايا الجذعية ضمن تكوينٍ ثلاثي الأبعاد، أو لعزلها ضمن مكانٍ معين في الجسم. بالإضافة إلى ذلك، فإن بعض التطبيقات يتطلب تمايز الخلايا إلى سُلالات أدنى محددة (down particular lineages) قبل عملية الزرع. إن هذه الطرق شائعة في مجال هندسة الأنسجة، حيث يتم دمج الخلايا الجذعية مع المصفوفات المهندَسَة (engineered matrices) إما لبناء أنسجة خارج الجسم الحي (ex vivo) قابلة للزراعة، وإما لحقن أو زرع بُنى حية مبرمجة لتحفيز وإما لبدء التجديد. ففي حين أن مراكز البحوث الأساسية تركّز على تطوير فهم الآليات التي تنظم الخلايا الجذعية، تهدف المجالات التطبيقية مثل هندسة الأنسجة إلى تسخير هذه المعرفة للبدء في تجديد أنسجة معينة. وقد شجّع مجال هندسة الأنسجة على الانتقال من أنظمة زراعة الخلايا الجذعية القياسية ثنائية الأبعاد (2D stem cell culture systems) إلى منصات (وحدات) ثلاثية الأبعاد (3D platforms) في محاولة لمحاكاة بيئة الزراعة ثلاثية الأبعاد في الجسم الحي والتي قد تكون أكثر ملاءمة لتنظيم وظيفة الخلايا الجذعية.

وقد ركزت أبحاث سابقة للخلايا الجذعية الجنينية (ES cells) بشكلٍ أساسي على فهم بيولوجيا الخلايا الجذعية (stem cell biology)، ولا تزال تطبيقات هندسة الأنسجة باستخدام الخلايا الجذعية الجنينية أو الخلايا الجنسية الجنينية (EG cells) بالاشتراك مع حاملات الخلايا والأنسجة في مرحلة الطفولة (Elisseeff et al. 2006; Hwang et al. 2006). يمكن للحاملات أن تُعزز من تطوير الخلايا والأنسجة وذلك عن طريق توفير بيئة ثلاثية الأبعاد يمكن للخلايا فيها أن تتكاثر وأن تلتصق وأن تُرسّب المصفوفة خارج الخلية (extracellular matrix - ECM) (Peppas and Langer 1994; Hubbell 1995; Langer and Tirrell 2004; Lutolf and Hubbell 2005). ويمكن أيضًا للإشارات البيولوجية (biological signals) المختلفة مثل عوامل النمو أو الببتيدات (peptides) أن تُدمج في حاملات الخلايا والأنسجة وذلك لتحفيز التمايز المرغوب (Hubbell 1999; Healy et al. 1999). على سبيل المثال، لقد تبيّن أنه يمكن للخلايا الجذعية المتوسّطِيّة المشتقة من العظم (Bone MSCs) أن تخضع لعملية تكوّن العظم (osteogenesis) في حاملة خلايا ثلاثية الأبعاد مصنوعة من الهلام المائي (3D hydrogel scaffold)، كما أن دمج ببتيد التصاق خلايا الـ (YRGDS) في الحاملة يُحفّز الخلايا الجذعية المشتقة من العظم على تكوين العظم بطريقة تعتمد على الجرعة (dosage - dependent manner)، ويكون التركيز الأمثل عند استخدام ٢,٥ ميلي مولاً (Yang et al. 2005b).

إن أحد التحديات الرئيسية لزراعة الخلايا المبنية على حاملة الخلايا والأنسجة هو نقص نمو الطُعم (engraftment) الذي ينشأ عادةً ضمن النسيج اللاوعائي (avascular tissue) المتضرر بسبب النقص في النقل الكتلي (mass transport) للأكسجين والمواد المغذية، والذي يعد شرطًا أساسيًّا من أجل بقاء الخلايا على قيد الحياة (cell survival) ومن أجل وظيفة سليمة للخلايا. إن المعدلات القصوى المذكورة لتكوين الأوعية الدموية هي تقريبًا ١ ميليمتر/اليوم (Folkman 1971; Li et al. 2000) وتحتاج الخلايا إلى أن تكون ضمن تقريبًا من ١٠٠ إلى ٢٠٠ ميليمتر من أقرب وعاء دموي (Muschler et al. 2004). وبالتالي؛ فإن الخلايا المزروعة في مركز العيوب الكبيرة (< ١ – ٢ سنتيمتر) لا تعيش طويلاً بما يكفي لتساهم في عملية الشفاء (healing process). وعلى وجه التحديد، قد يستغرق استكمال التوعّي (vascularization) (تكوُّن الأوعية الدموية) للعيب عدة أسابيع أو عدة أشهر (Mooney et al. 1994; Sanders et al. 2002)؛ مما يؤدي إلى حدوث نقص تروية (ischemia) ونخر الأنسجة (necrosis) (Helmlinger et al. 1997) (موت الخلايا والأنسجة) في أماكن الطُعم بحجم أصغر من ١–٢ ميليمتر (Muschler et al. 2004). إن هذا يقلل وبشكلٍ كبير من قدرة مصدر الخلايا خارجية المنشأ (exogenous cell source) على المساهمة في عملية التجديد. بالإضافة إلى ذلك، فإن معظم إستراتيجيات هندسة الأنسجة المبنية على حاملة الخلايا والأنسجة تسمح وبشكلٍ غير مباشر بملء مسام حاملة الخلايا (scaffold pores) بخثرة دمويّة (blood clot) (Karp et al. 2004)، وهذا يمثل بيئة ساكنة من المحتمل أن تكون قاسية على الخلايا المزروعة. وعلى الرغم من أن الأورام الدموية (hematomas) تحتوي على عوامل مثل عامل النمو البطانيّ الوعائي (vascular endothelial growth factor - VEGF) الذي يُحرّض على التوعّي الحديث (neovascularization) (تكوُّن أَوعِيَة دموية جديدة) (Street et al. 2000)، فإن الأورام الدموية تكون حمضية (acidic) وناقصة التأكسج (hypoxic) وتُظهر مستويات مرتفعة من الفوسفور (phosphorous) والبوتاسيوم (potassium)

وحمض اللاكتيك (lactic acid)، والتي تكون سامة لأنواعٍ متعددة من الخلايا (Wray 1970). وبالتالي؛ فإن الخلايا المزروعة تكون عُرضة للموت نظرًا لبعدها عن الجملة الوعائية للمضيف (host vasculature) وموقعها ضمن البيئة الساكنة والقاسية نسبيًّا في الخثرة الدمويّة. وقد حدّ هذا وبشكلٍ ملحوظ من التقدم في مجال استبدال الأنسجة والأعضاء (tissue and organ replacement). وبعد ثلاثة عقود من البحوث الأساسية في هذا المجال، لم تتحقق بشكلٍ كامل القدرة على توفير الأنسجة والأعضاء لملايين المرضى الذين يعانون من الرُّضوض والعيوب الخِلقِيّة (congenital defects) والأمراض المزمنة (chronic diseases) (Mikos et al. 2006). وعلى الرغم من أن ذلك يعود وبشكلٍ جزئي إلى عدم اليقين والصعوبات في الأسواق السريرية، إلا أن النتائج المثالية في النماذج الحيوانية قبل السريرية تبقى متغيرة جدًّا مع معدلات نجاح متدنية في العيوب الأكبر وأنواع الحيوانات الأعلى والذي ربما يعود إلى النسبة الضعيفة لبقاء الخلايا المزروعة على قيد الحياة (Petite et al. 2000; Muschler et al. 2004). وعلى الرغم من أنه ليس من المستغرب أن فعالية العلاجات القائمة على الخلايا تعتمد على الحفاظ على قدرة الخلايا على الحياة والنمو بعد عملية الزرع (Wilson et al. 2002; Kruyt et al. 2003)، إلا أن القليل من الاهتمام قد تم تركيزه على هذه المشكلة.

في الآونة الأخيرة، استُعملت وبنجاح طريقة متطوّرة لهندسة أنسجة مُوجِّهة للخلايا (cell - instructive tissue engineering) والتي استخدمت (١) لجائِن لالتصاق الخلايا (cell adhesion ligands) تحتوي على الحمض الأميني أرجينين، غليسين، حمض الأسبارتيك (arginine, glycine, aspartic acid - RGD) (RGD) بكثافةٍ عالية، و (٢) مصدر خلايا أرومة عضلية متمايزة خارجية المنشأ (exogenous differentiated myoblast)، و(٣) عوامل نمو لتعزيز القدرة التجديدية للخلايا المزروعة من خلال تعزيز بقائها على قيد الحياة ومنع تمايزها النهائي وتشجيع هجرتها نحو الخارج (outward migration) (Hill et al. 2006). وعلى وجه التحديد، تم توزيع الخلايا على حاملات خلايا مسامية مصنوعة من ألجينات / سلفات أو كبريتات الكالسيوم (porous alginate / calcium sulfate scaffolds) والتي احتوت على كلٍّ من عامل نمو الخلايا الكبدية (hepatocyte growth factor - HGF) وعامل نمو خلايا الأرومة الليفية-٢ (fibroblast growth factor-2 - FGF-2)، والتي استُعملت للحفاظ على الخلايا في حالة نشطة وفي حالة تكاثر ولكن في حالة غير متمايزة. وفي حين كان لمجموعات عينات المراقبة (control groups) تأثير متواضع على تجديد العضلات فقط، فقد عزّزت إستراتيجية الجمع باستخدام الإطلاق المتحكم به (controlled release) لعامل نمو الخلايا الكبدية (HGF) ولعامل نمو خلايا الأرومة الليفية-٢ (FGF-2) وبالاشتراك مع الحاملات والخلايا وبشكلٍ كبير مشاركة الخلايا المزروعة مما أدى إلى تجديدٍ كبير في الأنسجة. وعلى الرغم من الحجم الصغير نسبيًّا لحاملات الخلايا والأنسجة المستخدمة هنا ($50\ mm^3$) والشكوك في نقل هذه الإستراتيجية سريريًّا إلى عيوبٍ أكبر ذات صلة، فإن هذا العمل يُظهر وبوضوح دليلاً على مفهوم العلاجات المبنية على الخلايا التي يمكن وضعها لتجديد الأنسجة بشكلٍ مباشر.

(١,٣) حاملات الخلايا والأنسجة وعملية التصنيع SCAFFOLDS AND FABRICATION

(١,٣,١) أهمية حاملات الخلايا والأنسجة لتعزيز تشكيل الأنسجة Impotance of Scaffolds to Promote Tissue Formation

هناك ثلاث إستراتيجيات شائعة مستخدمة في تجديد الأنسجة، وهي حقن الخلايا المعزولة (infusion of isolated cells) والمعالجة باستخدام مواد مُحفزة للأنسجة (tissue - inducing substances) وزرع مُرَكّب خلايا - حاملة (cell - scaffold composite) (Langer and Vacanti 1993). من الإستراتيجيات الثلاث، عادةً ما يؤدي استخدام مركبات الخلايا - الحاملة إلى نتائج أكثر نجاحًا. وغالبًا ما تكون هذه الحاملات مهمَّة، في المختبر (in vitro) وكذلك في الجسم الحي (in vivo)، من أجل استعادة العملية الطبيعية لتطوّر الأنسجة والسماح للخلايا بصوغ بيئاتها المايكروية (microenvironments) الخاصة بها. وعلى العكس من استخدام الخلايا وحدها، تزوّد حاملة الخلايا والأنسجة بمصفوفة ثلاثية الأبعاد (3D matrix) يمكن للخلايا أن تتكاثر عليها وتهاجر وتُنتج مصفوفة وتُشكّل أنسجة وظيفية بالشكل المطلوب. كما تُزوّد حاملة الخلايا والأنسجة بالثبات البنيوي (structural stability) من أجل تطوير الأنسجة وتسمح بدمج إشارات بيولوجية أو ميكانيكية لتعزيز تشكيل الأنسجة. ويمكن للخصائص البيولوجية والميكانيكية لحاملات الخلايا والأنسجة أن تختلف اعتمادًا على التطبيق، ويمكن أن تكون مُصممة لتوفير بيئة ذات إشارات ملائمة تُحفّز الخلايا لتتكاثر و / أو تتمايز.

يجب عدم الاستهانة بأهمية حاملة الخلايا والأنسجة ذات المصفوفة خارج الخلية (ECM) في تطوّر الخلايا. فمنذ ما يقرب من ٣٠ عامًا، اقترح Bissell التبادلية الديناميكية (dynamic reciprocity)، والتي تنص على أن نسيجًا ما يُنجز وظيفة محددة في جزء منه من خلال تفاعلات الخلايا مع المصفوفة خارج الخلية (ECM) (Bissell et al. 1982). وقد وضّح عملٌ لاحق أنه يمكن للتعبير الجيني (gene expression) أن يُعدَّل بواسطة ربط المصفوفة خارج الخلية (ECM) بمستقبلات المصفوفة خارج الخلية (ECM receptors) على سطح الخلية، والتي توفر رابطًا لهيكل الخلية (cytoskeleton) وفي نهاية المطاف توفر رابطًا للمصفوفة النووية (nuclear matrix) (Nickerson 2001). إن تضمين تفاعلات الخلايا المجاورة والإشارات الذوّابة (soluble signals) الناشئة بشكلٍ نظامي أو الناشئة من الخلايا في المنطقة المجاورة المباشرة أو البعيدة يقدم نموذجًا أكثر اكتمالاً لبيئة النسيج (Nelson and Bissell 2006).

وقد أُولي اهتمامٌ كبير لمحاكاة (simulation) البيئة خارج الخلية. وأُعطي عناية خاصة لإنشاء حاملات الخلايا والأنسجة كبدائل للمصفوفة خارج الخلية (ECM). تحتل حاملات الخلايا والأنسجة المستخدمة لتجديد الأنسجة دورًا أساسيًّا في تطوّر الأنسجة لأنها يجب أن تدعم تكاثر (proliferation) وتمايز (differentiation) الخلايا عندما تنضج إلى أنسجة وظيفية. إن التجديد للحالة الأصلية يستلزم إزالة أو تبديد حاملة الخلايا والأنسجة الاصطناعية (artificial scaffold)، والأكثر شيوعًا عن طريق الامتصاص الحيوي (bioabsorption). وتحقيقًا لهذه الغاية، فقد تم اقتراح العديد من المواد الطبيعية (natural materials) والمواد التركيبية أو الاصطناعية (synthetic materials) من أجل الاستخدام في حاملات الأنسجة (Nair and Laurencin 2006; Velema and Kaplan 2006). إلا أنه يوجد هناك عقبات لاستخدام المواد الموجودة في تطبيقات

محددة لهندسة الأنسجة؛ ومع ذلك يُشكّل اليوم تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد ودمج العوامل الحيوية في الحاملة التحديات المركزية في هذا المجال. بالإضافة إلى ذلك وعلى الرغم من أن المواد الحيوية قد تلقت الكثير من الاهتمام خلال التسعينيات، فإن التركيز الحالي على الأنظمة الاصطناعية – الحية الهجينة (hybrid living - artificial systems) يتطلب تطويرًا مستمرًا لطرق التصنيع.

كبديل للمصفوفة خارج الخلية (ECM)، ينبغي على حاملة الخلايا والأنسجة وبشكلٍ عام نقل الشكل الهندسي ثلاثي الأبعاد (3D geometry) وأن تكون لها خصائص ميكانيكية (mechanical properties) مناسبة وأن تسمح بالتصاق الخلايا (cell attachment) وأن تُسهّل عملية التطوّر لنسيج وظيفي. فعلى المستوى المجهري، هناك حاجة إلى بنية مسامية عالية جدًّا (highly porous structure) من أجل انتشار (diffusion) المواد المغذية ونواتج الفضلات من خلال حاملة الخلايا والأنسجة. وينبغي تكييف الحجم الأمثل للمسام (optimal pore size) مع النوع المحدد من الخلايا وينبغي أن يكون حجم المسام كبيرًا بما يكفي للسماح لتَنقّل أو هجرة الخلايا وتشكيل المصفوفة خارج الخلية (ECM) وألا يكون أيضًا صغيرًا جدًّا بحيث يؤدي إلى حدوث انسداد في المسام (pore occlusion). ويجب على التصميم البنيوي الهندسي والتركيب الكيميائي السطحي (surface architecture and chemistry) لحاملة الخلايا والأنسجة تسهيل تَنقّل الخلايا عبر الحاملة وتوفير إشارات تطويريّة للخلايا وتعزيز عملية إجلاَب الخلايا (cell recruitment) من الأنسجة المحيطة. بالإضافة إلى ذلك، وفي معظم الحالات يجب أن تُبنى حاملة الخلايا والأنسجة من مادة غير سامة قابلة للتحلل (degradable nontoxic material) (Leong et al. 2003). وستتم مناقشة التطورات الأخيرة في تقنيات تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة أدناه.

(١,٣,٢) تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة Scaffold Fabrication

(١,٣,٢,١) الطرق التقليدية والقيود Conventional Methods and Limitations

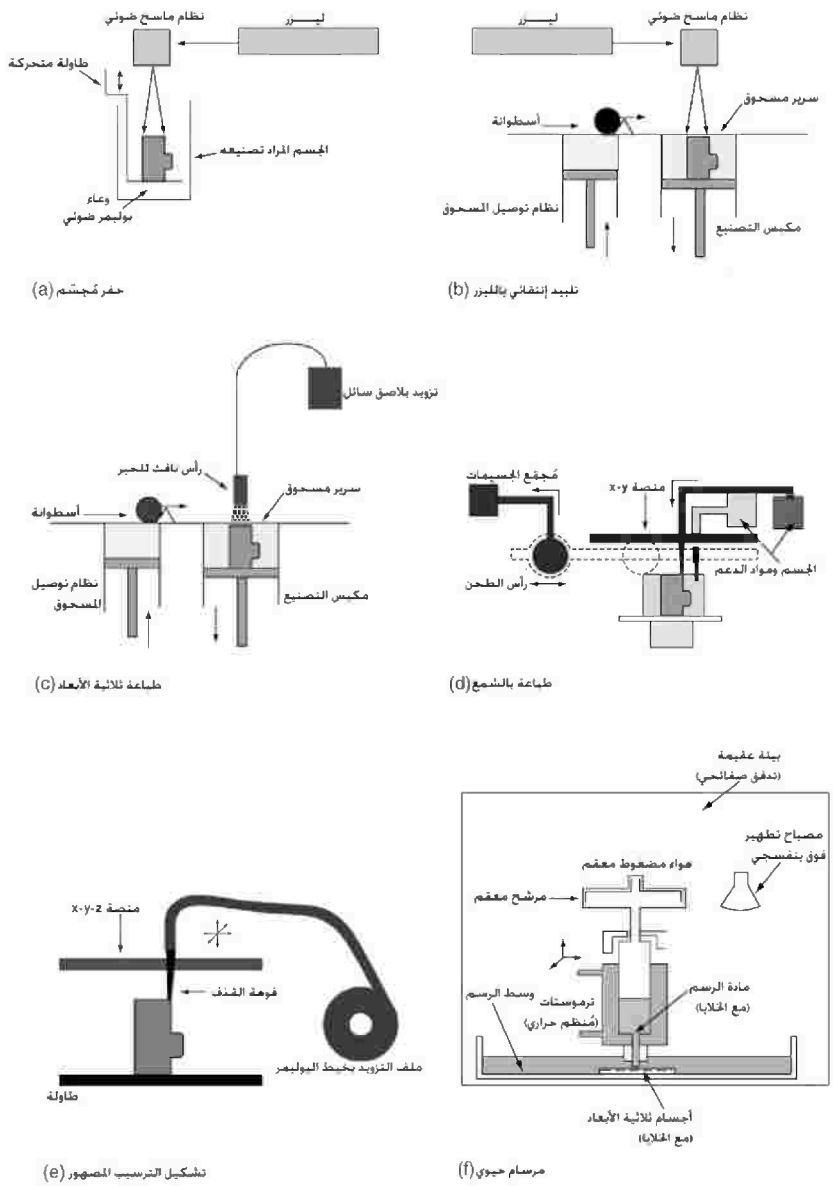
يعد تشكيل البنية المسامية الهدف الرئيسي لتصنيع حاملة الخلايا والأنسجة وقد تم تطوير عدد من التقنيات لتحقيق هذا الهدف تتضمن تقنية فصل الطور (Lo et al. 1995) (فصل الطور المحدَث باستخدام اللامذيبات (nonsolvent - induced phase separation) وفصل الطور المحدَث حراريًّا (thermally induced phase separation)) وتقنية رغوة الغاز (gas foaming) (Mooney et al. 1996) وتقنية صب المذيبات / انْتِفاذ أو ترشيح الجسيمات (solvent casting / particulate leaching) (Wald et al. 1993) وتقنية التجفيف بالتجميد (التَجْفيد) (freeze drying) (Dagalakis et al. 1980). وبسبب السهولة النسبية في استخدام هذه التقنيات في صنع حاملات الخلايا والأنسجة، فإنها لا تزال تُستخدم بشكلٍ شائع. إن التقييد الأساسي لهذه التقنيات هو نقص التحكم الدقيق بمواصفات الحاملة مثل حجم وشكل وتوزيع وترابط المسامات البيني (pore interconnectivity) بالإضافة إلى الشكل الكلي للحاملة. يُظهر العديد من الدراسات أهمية حجم المسام في قدرة الخلايا على الالتصاق والتكاثر على حاملة الخلايا والأنسجة (Hulbert et al. 1970)، ولكن يقترح عمل حديث لحاملات خلايا وأنسجة تم إنتاجها باستخدام تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (solid freeform fabrication - SFF) حيث يتم التحكم بحجم المسام بشكلٍ دقيق، بأن التخلص من أو تجاهل التغيُّر في حجم وبنية المسام يلغي اعتماد التصاق الخلايا وتكاثرها على

خصائص المسام (pore characteristics) (Itala et al. 2001; Hollister 2005) (الشكل رقم ١,٢). ومع ذلك، فإن مسامية المادة (porosity)، والتي تُعرَّف على أنها نسبة مساحة الفراغ في جسم صلب، لا تزال تشكل عاملاً حاسمًا (Karageorgiou and Kaplan 2005). إن تصنيع البُنى المسامية التراتُبيّة أو الهرمية (hierarchical porous structures) (ذات ترتيب هرمي)، والتي تتكوّن من كلٍّ من البنية المسامية النانوية أو المايكروية المجهرية (nano- or microscopic) والبنية المسامية الماكروية العيانيّة (macroscopic)، يتم بسهولة أكبر بواسطة استخدام طرق تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF). إن هذه التقنيات تسمح بتصنيعٍ قابل لإعادة الإنتاج (reproducible fabrication) لحاملات الخلايا والأنسجة بشكلٍ مباشر من ملف التصميم بمساعدة الحاسوب (computer - aided design - CAD). إن القدرة على ترجمة مجموعة البيانات الإلكترونية إلى حاملة خلايا وأنسجة يفتح الإمكانية لحاملات محددة للمرضى مبنية على أساس بيانات التصوير المقطعيّ المَحوسَب (computed tomography - CT) أو التصوير بالرنين المغناطيسي (MRI) (Mankovich et al. 1990; Hollister et al. 2000; Wettergreen et al. 2005).

(١,٣,٢,٢) طرق تصنيع الشكل الحر الصلب Solid Freeform Fabrication Methods

(١,٣,٢,٢,١) تشكيل الترسيب المَصْهور Fused Deposition Modeling

إن تشكيل الترسيب المصْهور (fused deposition modeling - FDM) (Crump 1992) هي عملية يتم بموجبها قذف مادة مُنصهِرة (molten material) من خلال أنبوب حقن وتُرسّبها كطبقة على سطح. وعند الانتهاء من ترسيب الطبقة، يتم تخفيض مستوى العينة؛ ومن ثم يتم ترسيب طبقة جديدة. في هذا النمط، تصنع تلك التقنية بنية ثلاثية الأبعاد. إن فائدة هذه الطريقة هي غياب المذيبات العضوية في عملية التصنيع. ويتم التحكم بهذه العملية بواسطة الحاسوب الذي يسمح باستخدام بيانات الـ (CAD) في تصميم حاملة الخلايا والأنسجة. وقد تم استخدام هذه التقنية لإعداد حاملات خلايا وأنسجة مسامية من بوليمرات مثل البولي كابرولاكتون (PCL) (Hutmacher et al. 2001) و الـ (PEG - PCL - PLA) (Hoque et al. 2005) ومركب الـ (HA / PCL) (Sun et al. 2007). إن شرط وجود تغذية مُنصهرة يُحدّ من مجال المواد التي يمكن استخدامها ويستثني جزيئات حساسة (sensitive molecules) مثل البروتينات من أن تُدمج بشكلٍ مباشر في حاملة الخلايا والأنسجة.



الشكل رقم (١,٢). أنظمة تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) مصنفة حسب تقنية المعالجة. (a، b) أنظمة المعالجة المبنية على الليزر، تتضمن (a) نظام الطباعة المُجَسّمَة، الذي يقوم بالبلمرة الضوئية لسائل و (b) أنظمة التلبيد أو التصليب الانتقائيّ (تحويل المادة إلى الشكل الصلب بالحرارة) باستخدام الليزر (SLS)، والتي تُلَبّد أو تُصَلّب المواد المسحوقة. في كل نظام، يتم فرش مادة على منصة مبنيّة بحيث يتم تخفيض مستواها من أجل كل طبقة. (c، d) أنظمة مبنية على الطباعة، تتضمن (c) طباعة ثلاثية الأبعاد و (d) آلة طباعة شمعيّة. طباعة ثلاثية الأبعاد لمادة كيميائية رابطة على طبقة مسحوق. يطبع النظام المبني على الشمع نوعين من المواد الشمعيّة على التسلسل. (e، f) أنظمة مبنية على أنبوب الحقن. (e) يطبع جهاز تشكيل الترسيب المَصْهور خيط رفيع من مادة يتم تسخينها من خلال أنبوب الحقن. (f) تطبع المِرْسَمَة الحيوية مادة يتم معالجتها إما حراريًّا وإما كيميائيًا. (من Hollister, S.J., *Nat. Mater.*, 4, 7, 518, 2005).

(١,٣,٢,٢,٢) الطباعة ثلاثية الأبعاد 3D Printing

تتكون تقنية الطباعة ثلاثية الأبعاد (3D printing) (Sachs et al. 1993) من نشر طبقة من مسحوق (layer of powder) على سطح واستخدام رأس طابعة الحبر النفّاث (ink - jet printer) لرش السطح بشكلٍ دقيق بمادة رابطة تساعد على التماسك (binder) لربط جزيئات المسحوق. ويتم تكرار هذه العملية بعد نشر طبقة جديدة من المسحوق فوق الطبقة السابقة مما يؤدي إلى إنشاء بنية ثلاثية الأبعاد. لقد تم في الماضي استخدام المذيبات العضوية كمواد رابطة تساعد على التماسك (Giordano et al. 1996)؛ بينما تُؤكّد الأمثلة الحديثة على استخدام المواد المتوافقة حيويًّا. ففي أحد الأمثلة، استُخدم مسحوق هيدروكسي آباتيت (hydroxyapatite) لتحضير حاملات خلايا وأنسجة لإصلاح العظم باستخدام مواد رابطة تتألف من ٢٥٪ حجم/حجم من حمض البولي أكرليك (polyacrylic acid) في مزيج من ماء – غليسيرُول (water - glycerol mixture) (Dutta Roy et al. 2003). كما تم استخدام محلول حمض السِّتريك المائِيّ (aqueous citric acid) كمادة رابطة في إعداد سيراميك مبني على أساس فوسفات الكالسيوم (calcium phosphate - based ceramics) (Khalyfa et al. 2007).

(١,٣,٢,٢,٣) التصليب الانتقائيّ باستخدام الليزر Selective Laser Sintering

بشكلٍ مشابه للطباعة ثلاثية الأبعاد، تبدأ أيضًا عملية التلبيد أو التصليب الانتقائيّ باستخدام الليزر (Selective Laser Sintering - SLS) من خلال تطبيق طبقة رقيقة من مسحوق على سطح. يقوم شعاع من الليزر (laser beam) بتلبيد جزيئات المسحوق مع بعضها في الشكل المطلوب. وعند الانتهاء من تشكيل الطبقة، يتم ترسيب طبقة مسحوق جديدة وتُكرر نفس العملية. لقد تم استخدام هذه التقنية لتحضير حاملات خلايا وأنسجة من البوليمرات القابلة للتحلل الحيوي (biodegradable polymers) مثل: بولي إثير إثير كيتون (polyetheretherketone) وبولي (فينيل الكحول) (poly(vinyl alcohol)) وبولي كابرولاكتون (polycaprolactone) (Williams et al. 2005) وبولي (حمض إل – لاكتيك) (poly(L-lactic acid)) (Tan et al. 2005). كما تم تحضير مُركبات من بعض هذه البوليمرات والهيدروكسي آباتيت باستخدام عملية التصليب الانتقائيّ بواسطة الليزر (SLS) (Chua et al. 2004; Tan et al. 2005; Wiria et al. 2007).

(١,٣,٢,٢,٤) الطباعة الشمعيّة Wax Printing

يتم في تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد باستخدام طابعة شمعيّة (wax printer) إنشاء قالب سلبي عن طريق طباعة قطيرات (droplets) من شمع بناء (build wax) وشمع دعم (support wax) على سطح، والتي تتصلب بعد التبريد. وبمجرد طباعة طبقة، يتم وضع السطح بشكلٍ مستوٍ وتُطبع طبقة أخرى. تستمر هذه العملية حتى اكتمال البنية وعند هذه النقطة ينحلّ شمع الدعم لينتُج قالب مسامي سلبي (porous negative mold). تُضاف المادة المرغوبة لحاملة الخلايا والأنسجة إلى القالب كمحلول صب (casting solution) وتُترك لتتصلّب، ومن ثم يتم حلّ أو إذابة القالب السلبي لتحرير حاملة الخلايا والأنسجة. لقد تم استخدام هذه التقنية لتحضير، على سبيل المثال، حاملات خلايا وأنسجة لاستبدال العظم والغضروف (Manjubala et al. 2005). وكمعظم عمليات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF)، لم تكن هذه التقنية مصممة أصلاً للاستخدام في الأنظمة البيولوجية (biological systems). إن الشموع والمذيبات المستخدمة هي غالبًا ما تكون عبارة

عن تركيبات مُسجَّلة المِلكيّة وتحتوي على أصباغ، وكلاهما يمكن أن يُلّوث حاملة الخلايا والأنسجة بعوامل غير متوافقة حيويًّا (nonbiocompatible agents) (Sachlos et al. 2003). وتشير التقارير الحديثة إلى استخدام شموع مُسجَّلة المِلكيّة ومتوافقة حيويًّا بشكلٍ واضح (BioBuild و BioSupport) بحيث يمكن حلُّها بشكلٍ مستقل (orthogonally) باستخدام الإيثانول (ethanol) والماء (Sachlos et al. 2006)؛ بينما لم يتم الكشف عن هُوِيّات هذه المواد في المراجع.

(١,٣,٢,٢,٥) الطباعة المُجَسّمَة Stereolithography

تعتمد الطباعة المجَسّمَة (stereolithography) على التفاعلات الكيميائية بوساطة الضوء (light - mediated chemical reactions) لإنشاء كائن ثلاثي الأبعاد (3D object) من بوليمر سائل. في هذه العملية، يتم إنزال سطح في حامل من البوليمر القابل للتصلب بواسطة الضوء (photocurable polymer) ويتم تعريض طبقة البوليمر السائل الناتجة على الجزء العلوي من السطح إلى الليزر وذلك لكي يتصلب البوليمر. ومن ثم يُغمر السطح برفق، بحيث يُغطّى بطبقة جديدة من البوليمر السائل التي يمكن تعريضها لليزر. ويمكن رفع أو خفض السطح بحسب الحاجة لإنشاء الكائن ثلاثي الأبعاد. وتشمل المواد الحيوية المستخدمة في هذا التطبيق بولي (فومارات البروبيلين) (poly(propylene fumarate)) (Cooke et al. 2003; Lee et al. 2007)، الذي يحتوي على روابط ثنائية قابلة للارتباط بواسطة الضوء (photocrosslinkable double bonds)، وبولي (غليكول الإيثيلين) المضاف إليه الأكريليت (acrylated poly(ethylene glycol)) (Dhariwala et al. 2004; Arcaute et al. 2006).

(١,٣,٢,٣) حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو Nanofibrous Scaffolds

(١,٣,٢,٣,١) الغزل الكهربائي Electrospinning

تُنتِج هذه التقنية ألياف نانو (nanofibers) بطريقة مستمرة بحيث تكون مترابطة مع بعضها. ويمكن لقطر الليف أن يتراوح بين ٥ نانومترات (nm) إلى أكثر من ١ مايكرومتر (μm) (Murugan and Ramakrishna 2006). ويختلف الغزل الكهربائي (electrospinning) عن التقنيات الحالية لتصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) حيث أنه يُنتج حاملة خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية. إن مثل هذا البناء يحاكي المصفوفة خارج الخلية (ECM) من خلال امتلاكه مساحة سطح كبيرة ونسبة مرتفعة للعرض إلى الارتفاع (نسبة البعد الأكبر إلى البعد الأصغر) (aspect ratio) ومسامية عالية وحجم مسام صغير وكثافة منخفضة (Murugan and Ramakrishna 2007). ونظرًا لطبيعة عملية الغزل الكهربائي، فإنه يتم إنتاج ألياف مُوجّهة بشكلٍ عشوائي (randomly oriented fibers) (Matthews et al. 2002). ولقد ركّزت الجهود المبذولة مؤخرًا على الغزل الكهربائي لألياف متراصفة (aligned fibers) (Yang et al. 2005a). إن كلاً من المواد الطبيعية والاصطناعية قد تم غزلها كهربائيًّا في شبكات عشوائية ومتراصفة (random and aligned meshes) بما في ذلك الكولاجين (collagen) والجيلاتين (gelatin) والشيتوزان (chitosan) (Murugan and Ramakrishna 2006).

(١,٣,٢,٣,٢) حاملات الخلايا والأنسجة ذاتية التجميع Self-Assembling Scaffolds

يعتمد التجميع الذاتي (self - assembly) على تفاعلات غير تساهُميّة (noncovalent interactions) لتحقيق الهدف المتمثل في تجميع بنية ثلاثية الأبعاد (3D structure) بطريقة تلقائية. تمتلك هذه الخاصية بوليمرات حيوية (biopolymers) مثل الببتيدات

والأحماض النووية (nucleic acids) والتي تُعتبر مناسبة بشكلٍ مثالي لهذا الدور. إن البيتيدات المصمّمة بشكلٍ محكم والتي تُشكّل تلقائيًا حاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد استجابةً لمحفزات بيئية (environmental triggers) محددة قد تتملك إمكانات كبيرة في مجال هندسة الأنسجة. وقد ذُكرت عدة طرق رائعة للاستفادة من البيتيدات (Hartgerink et al. 2001, 2002; Beniash et al. 2005). بالإضافة إلى ذلك، فقد وُصِفت مؤخرًا حاملات خلايا وأنسجة ببتيدية مصممة ذاتية التجميع (designer self - assembling peptide scaffolds) لإصلاح النسيج العصبي ولإيقاف النزيف (bleeding) في ثوان ولإصلاح أنسجة عضلة القلب المتنخّرة (المَيّتة) (infarctuated myocardia)، بالإضافة إلى كونها أجهزة طبية (medical devices) مفيدة من أجل الإطلاق البطيء للدواء (slow drug release) (Zhang et al. 2005; Gelain et al. 2007). كما تم تطبيق هذا المفهوم على الحمض النووي (DNA) (الحمض الرّيبيّ النّووي المنزُوع الأكسجين)، فقد تم تصميم الجزيئات المتفرّعة (branched molecules) بحيث يمكن لأذرُع الحمض النووي (DNA) أن تتهجّن (hybridize) مع بعضها البعض. وفي وجود ليغاز (ligase) الحمض النووي (DNA) (إنزيم رابط)، والذي يعمل على ربط الحمض النووي (DNA)، تتجمّع جزيئات الحمض النووي (DNA) بشكلٍ ذاتّي في هلام مائي (hydrogel) (Um et al. 2006).

(١,٣,٢,٤) البُنى الهجينة (خلايا / حاملة الخلايا) Hybrid (Cell / Scaffold) Constructs

(١,٣,٢,٤,١) الهلامات المائية التقليدية الحاملة للخلايا Conventional Cell-Laden Hydrogels

تكون الهلامات المائية منتفخة، وهي عادةً عبارة عن شبكات مترابطة (crosslinked networks) وتكون مفيدة بشكلٍ خاص لتعليق (suspending) الخلايا في الأبعاد الثلاثية. لقد تم استخدام مجموعة متنوعة من البوليمرات الاصطناعية والطبيعية لهذا التطبيق وتتضمن بولي (غليكول الإيثيلين) (poly(ethylene glycol) - PEG) وبوليمرات مشتركة (copolymers) تحتوي على البولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) (Tessmar and Gopferich 2007a) وحمض الهيالورونيك (hyaluronic acid) (Baier Leach et al. 2003) والشيتوزان (Leach et al. 2004) والألجينات (alginate) (Mosahebi et al. 2001). وقد استُخدِمت أنظمة قابلة للارتباط بواسطة الضوء على نطاقٍ واسع لتشكيل الهلامات، وتم تطوير طرق أخرى تتضمن أنظمة إنزيمية (enzymatic systems) (Um et al. 2006) وأنظمة حسّاسة للحرارة (thermosensitive system) (Park et al. 2007) وذلك لتجنُّب استخدام الضوء فوق البنفسجي (UV light) والجذور (radicals) التي من المحتمل أن تكون سامّة للخلايا (cytotoxic). لقد استُخدمت الهلامات المائية على نطاقٍ واسع لتجنُّب الالتصاقات وذلك بسبب النَقْص النسبي في لَصُوقِيَّتها للخلايا (cell adhesiveness) (Sawada et al. 2001; Yeo et al. 2006). ووفقًا لذلك، فقد تم مزج بروتينات التصاق الخلايا في الهلامات المائية لتعزيز التصاق الخلايا (Hern and Hubbell 1998; Rowley et al. 1999; Shu et al. 2004). إن تحلل الهلامات المائية يحدث عادةً بواسطة الحَلْمَهَة أو التحلل المائي (hydrolysis) (شطر مُركّب بإقحام الماء)؛ إلا أنه قد تمت الإشارة إلى الهلامات المائية التي تنحل إنزيميًّا (He and Jabbari 2007). إن الخصائص الميكانيكية للهلامات المائية تُعتبر ضعيفة عمومًا لذلك فقد بُذِلت جهود لإنشاء هلامات مائية قوية (Kaneko et al. 2005). ومن أجل تشكيل بنية ثلاثية الأبعاد، تَستخدم الهلامات المائية التقليدية الحاملة للخلايا قالبًا (mold) يُصبّ فيه الهلام المائي الحامل للخلايا (cell - laden hydrogel).

(١,٣,٢,٤,٢) التشكيل الثلاثي الأبعاد للهلامات المائية الحاملة للخلايا 3D Patterning of Cell-Laden Hydrogels

من أجل إنجاز المزيد من التحكّم بالموضع الثلاثيّ الأبعاد للخلايا داخل الهلامات المائية وتحقيق أشكال هندسية محددة للمرضى (patient - specific geometries)، تم تكييف عدد من تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) للاستخدام مع الهلامات المائية الحاملة للخلايا. تَستخدم الكتابة المباشرة الموجهة بالليزر (laser - guided direct writing) شعاعًا من الليزر مُركّزًا بشكلٍ خفيف لحصر الخلايا ومن ثم ترسيبها على سطح (Odde and Renn 2000; Nahmias et al. 2005). تسمح هذه التقنية بتشكيل (patterning) ذي مَيز أو تباين بمقدار خلية واحدة (single - cell resolution)، وقد تم استخدام هذه التقنية لكتابة أو طباعة الخلايا البطانية بشكلٍ مباشر بحيث تتجمع ذاتيًّا في بُنى الأوعية الدموية (Nahmias et al. 2005). باستخدام طابعة حبر نفّاث معدّلة وهلامات حساسة للحرارة، يمكن طباعة طبقات متعددة من أنواع مختلفة من الخلايا لإنشاء عضو ثلاثيّ الأبعاد (طباعة عضو organ printing) (Boland et al. 2003). تحاول هذه التقنية تقليد أو محاكاة (mimic) التصميم البنيوي الهندسي للأعضاء، والتي تتكوّن من بُنى معقدة تحتوي على العديد من أنواع الخلايا المتوضّعة في مواقع دقيقة. تَستخدم المِرْسَمَة الحيوية (bioplotter)، وهي أداة متوفرة تجاريًّا، إبرة لتوزيع مادة بطريقة طبقة تلو الطبقة (layer - by - layer) في وسط التخطيط أو الرسم (plotting medium)، وهو ما يسبب التصلّب للمادة. ويمكن لمزيج من بوليمر – خلايا (polymer - cell mixture) أن يُوزّع باستخدام هذه التقنية مؤديًا إلى تشكيل هلام مائي حامل للخلايا (Landers and Mülhaupt 2000). كما تم استخدام الجريانات المايكروية (microfluidics) لإنشاء بُنى ثلاثية الأبعاد باستخدام طريقة طبقة تلو الطبقة (Tan and Desai 2004). في هذه الطريقة، يتم استخدام جريانات مايكروية مُوجَّهة بواسطة الضغط (pressure - driven microfluidics) لنقل محاليل بوليمر – خلايا، والتي تترسَّب على هيئة طبقات ضمن القنوات المايكروية (microchannels). وقد تم استخدام الطباعة أو الحفر الضوئي (photolithography) لإنشاء بُنى من هلامات مائية مُنْطَبِعَة أو مُشكَّلة بحيث تُغلّف الخلايا (Liu and Bhatia 2002). كما تم إنشاء هلامات مائية حاملة للخلايا من محاليل بوليمرية قابلة للبلمرة الضوئية (photopolymerizable) حيث تتوضّع الخلايا بدأي باستخدام قوى رَحَلانِيّة مُزدوجة (dielectrophoretic forces) ومن ثم تتثبّت في المكان عن طريق تشكيل هلام مائي بوساطة الضوء (Albrecht et al. 2006). كما ركّزت الجهود التي بُذلت مُؤخرًا على تكييف تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) التقليدية للاستخدام مع الهلامات المائية، على سبيل المثال باستخدام الطباعة المَجسّمَة لإنشاء هلامات مائية مُركّبة من بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) (Arcaute et al. 2006).

(١,٤) توصيل العوامل المُحفِّزة للأنسجة DELIVERY OF TISSUE-INDUCING FACTORS

(١,٤,١) قدرة نظام الإطلاق المُتحكّم به لتعزيز تشكيل الأنسجة Potential of Controlled Release System to Enhance Tissue Formation

منذ بداية البيولوجيا الجزيئية، عمل علماء الأحياء بشكلٍ ثابت على تحديد وعزل عوامل جزيئية (molecular agents) مسؤولة عن تشكيل وإصلاح الأنسجة. ويجري باستمرار توضيح آليات التطوير والْتِئام أو شفاء الجروح (wound healing) كما يجري

دائمًا استكشاف قواعدها الجزيئية للاستغلال العلاجي. إن العلاجات الخلوية (cellular therapies) المهمَّة لهندسة الأنسجة تعتمد أيضًا وبشكلٍ كبير على عوامل نقل الإشارات الخلوية (cell - signaling factors)، كما أن زراعة الخلايا المتمايزة بشكلٍ كافٍ أو غير المتمايزة غالبًا ما تتطلب إضافة العوامل الجزيئية المعزولة التي تعزّز المحافظة على أنماط ظاهرية محددة للخلايا (specific cell phenotypes). فعلى سبيل المثال، يمكن الحفاظ على خلايا السَلَف المعزولة من شبكية العين (retina) في حالة غير متمايزة لفترات زمنية طويلة في وجود عامل نمو البشرة المأشوب (المعاد تركيبه) (recombinant epidermal growth factor - EGF). وبالتالي يمكن لهذه الخلايا أن تُزرَع مع عامل نمو البشرة (EGF) عوضًا عن عامل النمو العصبي (nerve growth factor - NGF) وعامل التغذية العصبية المستمد من الدماغ (brain - derived neurotrophic factor - BDNF) وعامل نمو خلايا الأَرومَة الليفيّة الأساسي (basic fibroblast growth factor - bFGF) للحث على التمايز إلى خلايا تُعبِّر عن دلالات عصبية وديقيّة (neuronal and glial markers) (Tomita et al. 2006). إنّ الهدف في هندسة الأنسجة هو تزويد الخلايا بالعوامل الضرورية للحث على التكاثر و / أو التمايز بحيث يمكن للخلايا بالتالي أن تُفرز مكونات مناسبة خارج الخلية لتكوين الأنسجة. ويمكن لعملية إضافة العوامل المحفّزة للنسيج في وسط النمو (growth medium) أن تكون كافية لنمو الأنسجة في المختبر، ولكن إعطاء مثل هذه الجزيئات الحيوية من أجل الحث على تشكيل الأنسجة في الجسم الحي هو عمومًا غير كافٍ، كما أن الجزيئات تنتشر بشكلٍ سريع بعيدًا عن الموقع المطلوب وتنحل بسرعة. لهذا السبب، فإنه غالبًا ما تكون أنظمة توصيل الدواء المتحكّم به (controlled drug - delivery systems) ضرورية.

عندما كانت طرق هندسة الأنسجة تتبلور في منتصف السبعينيات، كانت تُنجز تطورات في مجال مختلف على ما يبدو والذي سيُعَّد في نهاية المطاف واحدًا من أكثر التقنيات المساعدة أهمية في هندسة الأنسجة. ففي عام ١٩٧٦، عرض Langer و Folkman، في بحث الطرق التجريبية لاختبار عوامل توليد الأوعية الدموية (angiogenesis factors) في الجسم الحي، الإطلاق المتواصل (sustained release) لإنزيم من بوليمرات اصطناعية (Langer and Folkman 1976). وقد ساهم هذا التطور بتمهيد الطريق لتطوير أنظمة توصيل متنوعة قادرة على توصيل جزيئات حيوية بطريقة مُتحَكّم بها. وقد تمت الإشارة إلى أنظمة توصيل بوليمرية على شكل أقراص ورقاقات وألياف وزرعات مقذوفة (extruded implants) وأفلام (films) وجسيمات مايكروية (microparticles) وغيرها الكثير (Wise 2000). في الواقع، لقد تقدمت تقنية الإطلاق البوليمري المتحَكّم به (polymeric controlled release) إلى درجة أنها أصبحت تقريبًا من أجل كل جزيء ماكروي عياني (macromolecule) خاضع للتطوير العلاجي، إلا أنه وعلى الأرجح قد تم أخذ الإطلاق البوليمري قليلاً بعين الاعتبار (Schwendeman 2002). لقد أجرى الباحثون تجارب متعددة على أنظمة توصيل الدواء المصنوعة من بوليمرات قابلة للتحلل الحيوي، والتي تم الموافقة عليها من قبل إدارة الغذاء والدواء (FDA) لاستخدامات أخرى. وبالمصادفة، بدأت مجموعات بحثية في هندسة الأنسجة بشكلٍ مبكر باستخدام نفس المواد لتصنيع حاملة الخلايا والأنسجة، ولم يكن بالوقت الطويل قبل أن يتم البدء باستخدام الحاملة كجهاز توصيل لكلٍّ من الخلايا والجزيئات الحيوية المحفّزة للنسيج (tissue - inducing biomolecules) (Sokolsky - Papkov et al. 2007).

(١,٤,٢) أنواع العوامل المُحفِّزة للأنسجة Types of Tissue-Inducing Factors

لقد تم اختبار مجموعة كبيرة من الجزيئات الحيوية للتحفيز المتحَكّم به لتشكيل الأنسجة (controlled induction of tissue formation)، ولكن يمكن تقسيم غالبية العوامل المهمة إلى ثلاثة فئات: جزيئات صغيرة (small molecules)، وبروتينات وببتيدات متعددة (polypeptides)، وقليلي النُّوكليوتيدات (oligonucleotides).

١ - الجزيئات الصغيرة (تم جمعها هنا بشكلٍ كيفي في فئةٍ واحدة من أجل الملاءمة) هي مكونات مهمَّة في العديد من تتاليات نقل إشارات الخلايا (cell signaling cascades)، في كلٍّ من الاتصالات بين الخلايا (intercellular communication)، كما في حالة الستيرويدات القشرية (corticosteroids) والهرمونات الأخرى، وفي نقل الإشارات داخل الخلايا (intracellular signaling). تقوم هذه الجزيئات عادةً بقدح أو إثارة تتاليات من الإشارات داخل الخلايا بواسطة الارتباط مع مستقبلات بروتينية (protein receptors) محددة، الأمر الذي يؤدي إلى النسخ الجيني (gene transcription).

٢ - الببتيدات المتعددة، في معظم الأحيان كبروتينات كاملة، يمكن أن تعمل على الخلايا كمُحْدِثات للانقسَامِ الفتيليّ (mitogens) ومُحْدِثات للتَّخَلُّق (morphogens) وعوامل نمو وعوامل بقاء (survival factors) وسيتوكينات (cytokines) (إن هذه المصطلحات هي تقنيًا ليست مترادفة ولا تتنافى مع بعضها البعض، ولكن لأغراض هذا الفصل سوف لن يتم التمييز بينها). يمكن لهذه البروتينات المحفِّزة للأنسجة أن تكون قابلة للذوبان أو مرتبطة بالمصفوفة خارج الخلية (ECM)، وتعمل عادةً على الخلايا من خلال ارتباط مستقبل - لجين (receptor - ligand binding).

٣ - قليلي النُّوكليوتيدات، إما كحمض نووي (DNA) أو كحمض نووي (RNA)، يمكن أن ترتبط إما بالحمض النووي (DNA) لتؤثر على النسخ الجيني وإما بالحمض النووي (RNA) لتؤثر على النقل الجيني (gene translation) أو عندما يتم توصيلها على هيئة جينات كاملة، تصبح مندمجة بشكلٍ مباشر في جينوم الخلية (cell's genome).

إن التحديات والإستراتيجيات اللازمة لتوصيل هذه الأنواع من المركبات تختلف بسبب الاختلافات في خصائصها الفيزيائية والكيميائية. وسوف نقوم هنا وبشكلٍ مختصر باستعراض الاعتبارات المهمَّة لتوصيل كل واحدٍ منها وتقديم بعض الأمثلة البارزة. ومع ذلك، ولأن الغالبية العظمى من العوامل المحفِّزة للأنسجة التي تم اختبارها لهندسة الأنسجة هي جزيئات ماكروية، فسوف يتم تخصيص الجزء الأكبر من هذا القسم لمناقشة توصيل البروتينات والجينات.

(١,٤,٣) توصيل الجزيء الصغير من أجل هندسة الأنسجة Small Molecule Delivery for Tissue Engineering

بسبب حجمها، تميل الجزيئات الصغيرة للانتشار بسرعة، لذلك يعتمد التوصيل المتحكّم به بشكلٍ كبير على إستراتيجيات تخفيف أو منع الانتشار. تختلف هذه الإستراتيجيات إلى حدٍّ كبير اعتمادًا على بنية الجزيء الذي سيتم توصيله والبيئة المستهدفة. تشمل بعض طرق تأخير الانتشار الاستفادة من التفاعلات الأيونية (ionic interactions) لتشكيل مركبات غير قابلة للذوبان (insoluble complexes) أو تطابق خصائص الأُلْفَة للماء (hydrophilic) (امتصاص الماء) وخصائص الأُلْفَة للدهون (lipophilic) (امتصاص الشحوم) للدواء ولجهاز التوصيل وذلك لتأخير الإطلاق. وهناك المزيد من التقنيات المتقدمة التي

تشمل تعديل الجزيء بشكلٍ كيميائي أو ربطه إلى جهاز التوصيل. فعلى سبيل المثال، قام Nuttelman وزملاؤه مؤخرًا بتركيب هلامات مائية من بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) تحتوي على الديكساميثازون (dexamethasone) المرتبط بشكلٍ تساهُمي (covalently) مع أساس الهلام المائي (hydrogel backbone) بواسطة وحدات من اللاكتيد (lactide) القابل للتحلل. إن الديكساميثازون هو ستيرويد قشري يُشجّع وعلى نحوٍ موثوق التمايز المكوِّن للعظم (osteogenic differentiation) للخلايا الجذعية المتوسّطِيّة البشرية (hMSCs). وقد أظهر المؤلفون بأنه قد تم إطلاق الديكساميثازون ببطء من الهلام المائي وقد حفَّزَ الخلايا الجذعية المتوسّطِيّة البشرية (hMSCs) لتُعبّر عن أنماط ظاهرية لتشكيل الخلايا العظمية (osteocytic phenotypes) (Nuttelman et al. 2006).

إن الجزيئات الصغيرة هي بمثابة عناصر مهمَّة في الاتصالات بين الخلايا، كما في حالة الهرمونات ونقل الإشارات داخل الخلايا وبشكلٍ خاص كرُسُل ثانوية (second messengers). وغالبًا ما يكون في هذا المرْسال الثانوي القدرة بحيث تُستخدم الجزيئات الصغيرة لتحفيز الأنسجة، كما يتضح من خلال إعطائها بالمشاركة مع غيرها من العوامل. على سبيل المثال، لقد وُجد بأن أُحاديّ فوسفات الأَدينُوزين الحلقيّ (cyclic adenosine monophosphate - cAMP) يعمل بشكلٍ تآزُريّ (synergistically) عندما يُعطى بشكلٍ مشترك مع غِرْسَات خلايا شفان (Schwann cell implants) (خلايا مُغَمِّدة للألياف العصبية) في الحبل الشوكي (spinal cord) المصاب (Pearse et al. 2004). وقد قامت مجموعة بحثية أخرى بتوصيل أُحاديّ فوسفات الأَدينُوزين الحلقيّ (cAMP) جنبًا إلى جنب مع عامل النمو العَصَبونِيّ (neuronal growth factor) عبر جسيمات مايكروية تم حقنها في العين وقد وُجد بأن هذه التركيبة فعّالة لتعزيز تجديد العصب البصري (optic nerve regeneration) (Yin et al. 2006). وبما أن توصيل العديد من العوامل بتشكيلات إطلاق مختلفة أصبح أكثر شيوعًا، فمن المرجح أن يزداد دور الجزيئات الصغيرة في هندسة الأنسجة.

(١,٤,٤) توصيل البروتين من أجل هندسة الأنسجة Protein Delivery for Tissue Engineering

(١,٤,٤,١) التحديات في توصيل البروتين المُتحكّم به Challenges for Controlled Protein Delivery

لقد تم اختبار التوصيل المتحكّم به للبروتينات والببتيدات المتعددة على نطاقٍ واسع ولمجالٍ عريض من التطبيقات وقد لاقى بعض النجاح؛ ولكن تبقى هناك تحديات كبيرة. وبسبب أن البروتينات معقدة للغاية وتعتمد وظائف جزيئاتها المرتّبة على السلامة الكيميائية والبنيوية، فإن أكبر الصعوبات في ابتكار أنظمة إطلاق بروتين مُتحكّم به تنشأ من عدم الاستقرار في تركيبَة وتخزين وإطلاق البروتين (Fu et al. 2000). ولقد شُرِعَ بالكثير من العمل لتوضيح آليات تحلل (degradation) وتعطيل (inactivation) البروتين ومن ثم ابتكار طرق لتسهيل هذه العمليات. تشمل الآليات الرئيسية لتعطيل البروتين في أنظمة التوصيل البوليمرية التَكَدُّس (aggregation) الناتج عن التَجْفاف (dehydration) (ضياع السوائل والشوارد) والإمْهَاء (rehydration) (تعويضُ السوائل)، ونشر (unfolding) أو تَكَدُّس البروتين على طول السطوح الكارهة للماء (hydrophobic surfaces) أو عند السطوح البينية المائية – العضوية (aqueous - organic interfaces)، وتَحْميض (acidification) البيئة المايكروية الدقيقة (microclimate) داخل نظام التوصيل (Schwendeman 2002). تتضمن الطرق

المذكورة للتغلب على هذه التحديات تشكيل مُركّب زنكي (zinc complexation) (Johnson et al. 1997) أو إضافة واقيات الذوبان (lyoprotectants) (Prestrelski et al. 1993) لمنع التَكَدُّس المرتبط بالرطوبة، واختيار تقنيات معالجة لطيفة بالبروتين لمنع التَكَدُّس على سطوح البوليمرات والسطوح البينية (Herbert et al. 1998; Burke 2000)، وإضافة مُضادّات الحُموضة (antacids) (Zhu et al. 2000) أو سِواغات تشكيل المسام (pore - forming excipients) مثل بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) (Jiang and Schwendeman 2001) لمنع تَحْميض البيئة المايكروية الدقيقة. ففي حين أن هذه التحسينات كانت مفيدة، إلا أن بروتينات مختلفة تكون عُرضة لأشكال مختلفة من عدم الاستقرار؛ وبالتالي فمن الضروري تحسين كل نظام توصيل على حدا بحسب تطبيقه المحدد.

(١,٤,٤,٢) إستراتيجيات لتوصيل البروتين Strategies for Protein Delivery

يمكن لتوصيل البروتين المتحكّم به من أجل هندسة الأنسجة أن يُنجز باستخدام وسائل نقل أو توصيل (delivery vehicles) متعددة بما في ذلك الخلايا المزروعة التي تم تعديلها وراثيًّا أو جينيًّا (genetically modified) (Chang et al. 1999; Tresco et al. 2000) والجسيمات البوليمرية المايكروية (polymer microparticles) (Edelman et al. 1991; Krewson et al. 1996; Oldham et al. 2000; Lu, Yaszemski, and Mikos 2001) وحاملات الخلايا والأنسجة. إن الميزة الرئيسية للطريقة التي لا تستعمل حاملة هي أن متطلبات نظام التوصيل يمكن أن تتحقق بشكلٍ مستقل عن تلك المتطلبات الخاصة بحاملة الخلايا والأنسجة. ومع ذلك، فقد تحوّل الباحثون وبشكلٍ متزايد إلى استخدام حاملات الخلايا والأنسجة نفسها كوسائل للتوصيل. ومن أجل تحقيق هذا الهدف، يتم امتزاز أو امتصاص (adsorb) البروتينات على سطح الحاملة أو تغليفها (encapsulate) في كتلة الحاملة أو ربطها بشكلٍ تساهُمي إلى حاملة الخلايا والأنسجة (Tessmar and Gopferich 2007b). إن الحفاظ على استقرار البروتين في هذه الحالات هو أمرٌ مهم وعنصر أساسي بشكلٍ واضح. إن الطاقات الحركية (kinetics) لإطلاق البروتين ستتغير بشكلٍ طبيعي فيما بين هذه التقنيات، وقد ثَبت بأن استخدام مجموعات من تقنيات الإطلاق يكون مفيدًا. على سبيل المثال، لقد وصفت مجموعة بحثية إطلاق اثنين من عوامل النمو مع طاقات حركية مختلفة من خلال إدراج جسيمات مايكروية من الجيلاتين ضمن حاملة خلايا وأنسجة مصنوعة من الهلام المائي (Holland et al. 2005). كما وصفت مجموعة بحثية أخرى طاقات إطلاق حركية مزدوجة (dual release kinetics) عن طريق استخدام تقنية المستحْلَب أو المزيج التتابُعِيّة (sequential emulsion technique) لتشكيل طبقات غلاف خارجية (coatings) تحتوي على البروتين على حاملة خلايا تم تشكيلها مسبقًا (Sohier et al. 2006).

(١,٤,٤,٣) الإطلاق المُتحكّم به لعوامل النمو لتعزيز تشكيل الأنسجة Controlled Release of Growth Factors to Enhance Tissue Formation

لقد تم اختبار توصيل مجموعة ضخمة من البروتينات من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة، ويرجع ذلك بشكلٍ جزئي إلى الأهمية البالغة للبروتينات في نقل الإشارات الخلوية (cellular signaling). وقد تمت دراسة مجموعات البروتينات المحفّزة للأنسجة على نطاقٍ واسع وهي غالبًا ما تسمى مجتمعةً عوامل النمو (Tessmar and Gopferich 2007b). تشمل إستراتيجيات عوامل النمو المستخدمة من أجل تشكيل الأنسجة: تعزيز تكاثر الخلايا، والتمايز إلى أنواع الخلايا المرغوبة المشَكِّلة للأنسجة، والهجرة أو التَنقّل إلى المواقع المطلوبة، ونمو الخلايا جنبًا إلى جنب مع إفراز المصفوفة (secretion of matrix) من أجل تشكيل الأنسجة،

وتوليد تغذية دموية (blood supply) (Boontheekul and Mooney 2003; Tabata 2003; Tessmar and Gopferich 2007b). وغالبًا ما تعمل عوامل النمو بالتنسيق مع بعضها بعضًا، ويمكن أن يعمل كل واحدٍ منها على العديد من أنواع الأنسجة ويُنتج تأثيرات متفاوتة على أنواع مختلفة من الخلايا. بالإضافة إلى ذلك، فإنها تعمل بطرقٍ مختلفة، على سبيل المثال بواسطة ربط مستقبلات سطح الخلية قبل الاستيعاب أو التدخيل (internalization) أو بواسطة ربط المصفوفة خارج الخلية (ECM) قبل تفاعل الخلية، وغالبًا ما تستجيب الخلايا لعوامل النمو القابلة للذوبان وفقًا لتدرج التركيز (Boontheekul and Mooney 2003). لهذه الأسباب، تُعتبر هندسة نظام التوصيل المستخدم لتقديم هذه الجزيئات الحيوية للخلايا المشكِّلة للأنسجة ذات أهمية بالغة.

لقد أثبتت حاملات الخلايا والأنسجة وأنظمة التوصيل أنها فعّالة لتوليد بُنى أنسجة جديدة بسيطة نسبيًّا في المختبر وفي الجسم الحي. ومع ذلك، فإن تطور والتِئام الأنسجة غالبًا ما يستجيب لتراكيز عابرة أو متدرجة لجزيئات نقل الإشارات؛ لذلك فإن تشكيل أنسجة معقدة فراغيًا (spatially complex tissues) سيتطلب على الأرجح تقديم جزيئات حيوية بطريقة مُتحكّم بها مكانيًّا وزمانيًّا (spatiotemporally controlled manner) (Saltzman and Olbricht 2002). فبينما هو صعب، فقد حفَّزَ هذا التحدي ابتكارات مثيرة للإعجاب. حيث يمكن للطرق الجديدة لبَذْر حاملة الخلايا والأنسجة مثل ترسيب فيلم (film deposition) بطريقة طبقة تلو الطبقة أن تساعد في توجيه مجموعات زمنية معقدة داخل الأنسجة، وذلك من خلال دمج عوامل النمو والبروتينات وغيرها من المكونات الخلوية المهمَّة داخل طبقات معينة (Wood et al. 2005). ويمكن أن يساعد هذا في التحكم بامتدادات سرعة وزمن التكاثر والتمايز أثناء عملية زراعة الخلايا (culture process). وقد أظهرت حاملات الخلايا والأنسجة المزودة بتدرج مكاني (spatial gradient) لعامل النمو العصبي (NGF) نجاحًا في توجيه الانْتِبات أو النمو المحْوارِيّ (axonal outgrowth) (Moore et al. 2006)، وشجعت تلك الحاملات المزودة بتدرج لعامل نمو خلايا الأَرومَة الليفيّة الأساسي (bFGF) التَنقّل الموجَّه لخلايا العضلات الوعائية الملساء (vascular smooth muscle cells) (DeLong et al. 2005). وقد طورت إحدى المجموعات البحثية وسيلة لتلبيد أو تصليب كُريّات مايكروية (microspheres) تحتوي على البروتين والتي سمحت بإطلاق بروتينات متعددة بمعدلات مختلفة ومن مناطق مختلفة داخل حاملة الخلايا والأنسجة (Suciati et al. 2006). كما أن التحكم المكاني والزماني قد أظهر فعالية أيضًا في الجسم الحي. على سبيل المثال، لقد وصف Chen وزملاؤه عملية إطلاق اثنين من عوامل النمو وعائيّة المنشأ (angiogenic growth factors) مع طاقات إطلاق حركية مختلفة من داخل مناطق معينة بحاملة الخلايا والأنسجة. فعندما زُرعت في قائمة خلفية إقفارِيّة (ischemic hindlimb) (تعاني من نقص التروية)، عززت منطقة حاملة الخلايا والأنسجة التي أطلقت عاملي النمو بشكلٍ تسلسلي تطوير شبكة وعائية ناضجة (mature vascular network) بحيث كانت أفضل بكثير من تلك الموجودة في المنطقة التي توزع عامل نمو واحد فقط (Chen et al. 2007). من ناحية أخرى، ومن أجل الأنسجة التي تخضع لمنبهات أو محفزات ميكانيكية (mechanical stimuli)، مثل العظم والعضلات والأوعية الدموية، فقد وصف Lee وآخرون نظام إطلاق عامل نمو مُتحكّم به يمكن أن يستجيب لمنبهات ميكانيكية متكررة (Lee et al. 2000). فلقد تم إطلاق عامل النمو البطانيّ الوعائي (VEGF) المغلَّف في هلامات مائية مصنوعة من الألجينات استجابةً لتطبيق الضغط (compression) في كلٍّ من المختبر والجسم الحي، وقد ظهر بأن التنبيه الميكانيكي يزيد من معدل تشكيل الأوعية الدموية في الجسم الحي.

(١,٤,٥) توصيل الحمض النووي من أجل هندسة الأنسجة Nucleic Acid Delivery for Tissue Engineering

(١,٤,٥,١) تقنيات لتوزيع الجينات Techniques for Gene Delivery

لقد أتاحت التطورات في توصيل الجينات (gene delivery) مكانًا بديلاً لاختصار عملية تطوير الأنسجة الطبيعية لأغراض هندسة الأنسجة. فمن أجل مختلف تطبيقات هندسة الأنسجة، يمكن نقل جين مستهدف (target gene) لأنواع معينة من الخلايا، مثل الخلايا الجذعية، وذلك من أجل تعزيز التمايز المطلوب للخلايا وتشكيل الأنسجة. فيمكن للخلايا أن تُعدّل جينيًّا في المختبر؛ ومن ثم تُبذر على حاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد ليتم زراعتها في الجسم الحي، أو أنه من الممكن تعديلها جينيًّا في الجسم الحي بشكلٍ مباشر.

يمكن لتقنيات توصيل المواد الجينية (genetic materials) في خلايا الثدييات (mammalian cells) أن تُقسم إلى فئتين: طرق فيروسية (viral - based methods) وطرق تركيبية غير فيروسية (synthetic nonviral methods). إن لكلٍّ من الطريقتين مزاياها وعيوبها، ولا يوجد هناك ناقل (vector) وحيد مناسب لجميع تطبيقات توصيل الجينات. تَستخدم الطريقة الفيروسية خاصية رئيسية للفيروسات، حيث إنها تقوم بتوصيل الجينوم الخاص بها إلى الخلايا المستهدفة. يمكن تحويل العديد من الأنواع المختلفة من الفيروسات، مثل الفيروس القهقريّ أو الارتجاعي (retrovirus) والفيروس الغُدّانيّ (adenovirus) والفيروس البطيء (lentivirus) إلى وسائل للنقل الجيني عن طريق استبدال جزء من الجينوم الفيروسي (viral genome) بجين مستهدف (Vile et al. 1996; During 1997). وبما أن الطريقة الفيروسية تَستخدم وبشكلٍ أساسي آلية مُطورة بشكلٍ طبيعي للتنَسُّخ أو التكاثر الفيروسي الذاتي (viral self - replication)، فهي عادةً فعّالة جدًّا ولذلك فقد كانت تُعتبر على أنها الطريقة الرئيسية لمعظم التطبيقات. في الواقع، تَستخدم ٦٩٪ من التجارب السريرية الجارية حاليًا الطريقة الفيروسية (التجارب السريرية للعلاج الجيني على الإنترنت، http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/، تم الوصول إلى هذا الموقع في عام ٢٠٠٥). وعلى الرغم من الكفاءة العالية للتعديل الجيني، إلا أن الطريقة الفيروسية ترتبط أيضًا بالعديد من القيود الرئيسية. فبما أن الفيروسات مُستَمْنِعة (immunogenic) بطبيعتها ومن المحتمل أن تكون مُمْرِضة (pathogenic)، فهناك دائمًا مخاوف تتعلق بالسلامة وتُعتبر مشكلة رئيسية في التطبيقات السريرية (clinical applications) لتوصيل الجينات المبني على الطريقة الفيروسية. بالإضافة إلى ذلك، فإن النواقل الفيروسية لا تُسهّل تصميم تحديدية الخلية المستهدفة (target cell specificity) وهي مرتبطة بتكاليف تصنيع عالية نسبيًّا.

تزود الناقلات التركيبية غير الفيروسية، غالبًا البوليمرات الكاتْيونِيّة (cationic polymers) والدهون أو الشحوم (lipids)، بوسيلة نقل جذابة أخرى لتوصيل الجينات. وبشكلٍ عام، تكون الناقلات التركيبية مواد كاتْيونِيّة يمكنها أن ترتبط من خلال الكهرباء الساكنة بالحمض النووي (DNA) أو الحمض النووي (RNA) لتُشكّل جسيمات نانوية مُكَثَّفة (condensed nanoparticles) (الضفائر المتعددة (polyplexes) أو الضفائر الشحمية (lipoplexes)). تشمل المواد الحيوية التي تم استكشافها: البوليمرات الكاتْيونِيّة والشحوم الكاتْيونِيّة والليبوزومات (liposomes) (جسيمات شحمية) والشيتوزانات (chitosans) (عديدات السكاريد في الحشرات) والمتغصّنات (dendrimers) (جزيئات كروية كبيرة متفرعة) والجسيمات النانوية غير العضوية (inorganic nanoparticles) (Merdan et al. 2002; Partridge and Oreffo 2004; Wagner et al. 2004). تتغلب

هذه النواقل الاصطناعية على المشاكل المرتبطة بالطريقة الفيروسية وهي غير مُسْتَمْنِعة (nonimmunogenic). كما أنها تسمح بقدرٍ أكبر من المرونة في تصميم البنية وإدماج الجزء أو العنصر المستهدف (targeting moiety)، بالإضافة إلى التركيب السهل نسبيًّا وانخفاض تكاليف التصنيع. ومع ذلك، فقد عانت الناقلات المبنية على أساس الطريقة غير الفيروسية من الكفاءة المنخفضة في عملية إدخال الأحماض النووية في الخلايا (التعديل الجيني) (transfection) والسُّمّية (toxicity) التي تظهر في بعض الأحيان، كما أن معظم الناقلات التركيبية (synthetic vectors) تكون غير مستقرة في وجود المصل (serum)، وبالتالي فإن هذا يمنع وبشدة تطبيقاتها في الجسم الحي.

(١,٤,٥,٢) العوائق الرئيسية في توصيل الجينات والحلول التقليدية Major Barriers in Gene Delivery and Conventional Solutions

لتعزيز توصيل الجينات المستهدفة إلى نواة الخلية (cell nucleus)، فإنه من المهم جدًّا فهم العوائق الرئيسية التي تحتاج ناقلات الجينات (gene vectors) التغلب عليها. فقبل الوصول إلى نواة الخلية المستهدفة، يجب على الضفائر المتعددة أن تلتصق أولاً بسطح الخلية (cell surface) وأن تُدخل من خلال الالتقام (endocytosis) وأن تَفلُت من الدُخْلُول (endosome) (جُسَيم داخليّ) / اليَحْلُول (lysosome) (جُسَيم حالّ) الناتجة وأن تنتقل من خلال السيتوبلازم (cytoplasm) نحو نواة الخلية وأخيرًا أن تعبر الغشاء النووي (nuclear membrane) (Pack et al. 2005). بالإضافة إلى ذلك، يجب على الضفائر المتعددة أن تتحرر عند نقطة زمنية معينة بحيث يمكن إطلاق الحمض النووي (DNA).

يتطلب التغلب على العوائق أو الحواجز خارج الخلية (extracellular barriers) تكثيف فعّال لبلازميدة الحمض النووي (plasmid DNA) (البنية جينية التركيب خارج الصبغيات) واستقرار الجسيمات النانوية في مجرى الدم والأنسجة المحيطة والاستهداف المحدد للخلايا ذات الاهتمام. تتشكل الضفائر المتعددة تلقائيًّا عند مزج بوليمرات كاتْيونيّة مع الحمض النووي (DNA) وتتكثف في جسيمات نانوية بحجم يتراوح بين ثلاثين إلى عدة مئات نانومتر. تحمي الضفائر المتعددة الحمض النووي المكشوف من أن ينحل بواسطة الدِنَاز (DNase). يعتمد استقرار الضفائر المتعددة في المصل على التركيب الكيميائي (chemistry) للبوليمر وعلى نسبة شحنة (charge ratio) الحمض النووي (DNA) / البوليمر. وبشكلٍ عام، تُظهر الضفائر المتعددة موجبة الشحنة استقرارًا أفضل في ظل الظروف المِلْحِيّة الفيزيولوجيّة (physiological salt conditions) وذلك بالمقارنة مع الضفائر المتعددة متعادلة الشحنة. ولكن بوجود المصل يمكن للبروتينات سالبة الشحنة مثل الألبُومين (albumin) أن تُمْتَزّ فوق الجسيمات النانوية وتُحدث تَكَدُّسًا (aggregation)، الأمر الذي يؤدي إلى إزالة الجسيمات النانوية من قبل الخلايا البَلْعَمِيّة (phagocytic cells) (Dash et al. 1999).

يتم إدخال الضفائر المتعددة بمجرد أن تلتصق بسطح الخلية وذلك إما عن طريق الالْتِقام بوساطة مُستَقبلات سطح الخلية (cell - surface receptor - mediated endocytosis) وإما عن طريق الاحْتِساء الامْتِزازي (adsorptive pinocytosis) (Mislick and Baldeschwieler 1996). عندئذٍ تصبح الضفائر المتعددة مُتوَضِّعة في الجُسَيمات الداخليّة (endosomes)، والتي هي عبارة عن حُوَيْصِلات (vesicles) تُحَمِّض (acidify) بسرعة لدرجة حموضة (pH) من ٥ إلى ٦ نتائج لعمل إنزيم مضخة – بروتون الأَتَباز (ATPase proton - pump enzyme) (ATPase: فُسْفاتاز ثُلاثِيُّ فُسْفاتِ الأَدينُوزين) في غشاء الحويصلة. ويمكن للضفائر المتعددة أن تُنقل بعد ذلك إلى الجُسَيمات الحالّة (lysosomes)، والتي هي عُضَيَّات (organelles) ذات درجة

حموضة داخلية حوالي ٤,٥ ووافرة بالإنزيمات الحالّة (degradative enzymes). ويُعتقد أن كميات كبيرة من الحمض النووي (DNA) تنحلّ خلال الطور دُخْلُول / يَحْلُول، ويمكن فقط لتلك التي تفلت إلى السيتوبلازم أن تصل إلى نواة الخلية. وهناك طريقة واحدة للتغلب على هذا العائق وهي باستخدام بوليمرات "إِسْفَنْج – بروتون" (''proton - sponge'' polymers)، مثل المتَغَصِّنات العديدة (dendrimers) للبولي إيثيلين إيمين (polyethylenimine - PEI) والبولي أميدو أمين (polyamidoamine - PAMAM) (Haensler and Szoka 1993; Boussif et al. 1995). تحتوي هذه البوليمرات على العديد من الأمينات الثانوية (secondary amines) والأمينات الثالثية (tertiary amines)، وتخضع لتبدلات كبيرة في إضافة البروتون أثناء المرور الالْتِقامِيّ (endocytic trafficking). وتكون هذه العملية مترافقة بِانْدِفاق متزايد للأيونات المعاكِسة (counterions) وضغط تَناضُحِيّ (osmotic pressure) متزايد وتمزق الحويصلة الذي يؤدي إلى إطلاق الضفائر المتعددة في السيتوبلازم (Behr 1997). وفي محاولة لمحاكاة آليات إفْلاَت الدُخْلُول التي تستخدمها الفيروسات، فقد تم أيضًا إدراج ببتيدات ذات غشاء فَعَّال (membrane - active peptides)، مثل مُتَوالِيَة الجين الخاص بفَيروسُ العَوَزِ المَناعِيِّ البَشَرِيّ (فَيروسُ الإيدز) (HIV TAT sequence) ووُحَيْدَة الراصَّة الدَمَوِيَّة لفيروس الإنفلونزا (influenza virus hemagglutinin subunit - HA-2)، في بوليمرات متعددة الكاتْيونات (polycationic polymers) (Plank et al. 1998; Beerens et al. 2003). بالإضافة إلى ذلك، يمكن لمَتوالِيَة التَوَضُّع النووي (nuclear localization sequence) أن تكون مُقترِنة أيضًا بناقِلٍ من البوليمر (polymer vector) لتعزيز استهداف الحمض النووي (DNA) لنواة الخلية (Cartier and Reszka 2002; Chan and Jans 2002).

(١,٤,٥,٣) طريقة عالية الإنتاجية لتحديد مواد جديدة قابلة للتحلل الحيوي لتوصيل الجينات High-Throughput Approach to Identify Novel Biodegradable Material for Gene Delivery

لتحسين التوافق الحيوي (biocompatibility) وإطلاق الحمض النووي (DNA)، فقد أدرجت الأعمال البحثية الأخيرة في مجال توصيل الجينات المبني على أساس البوليمرات مكونات قابلة للتحلل الحيوي، مثل روابط الإسْتِر القابلة للحَلْمهة (hydrolyzable ester bonds)، في التصميم البنيوي (structural design). وقد تم تركيب العديد من النواقل الجينية البوليمرية القابلة للتحلل الحيوي بما في ذلك البولي (أمينو إستر) (poly(amino - ester)) (Lim et al. 2002) وحمض البولي أمينو (poly - amino acid) (Guping et al. 2005) والبولي (بيتا – أمينو إسترات) (poly(β-amino esters)) (Lynn and Langer 2000; Lynn et al. 2001; Akinc et al. 2003a,b; Anderson et al. 2004; Kim et al. 2005b). من بين هؤلاء البوليمرات، تُعتبر البولي (بيتا – أمينو إسترات) مرغوبة بشكلٍ خاص نظرًا لتركيبها السهل وكفاءتها العالية للتعديل الجيني وسمّيتها المنخفضة. وعلى عكس الطريقة التقليدية لتركيب البوليمرات، والتي تشمل غالبًا عمليات تنقية (purifications) متعددة المراحل وإجراءات الحماية / إزالة الحماية، فإن هذه البوليمرات يمكن تركيبها بسهولة من خلال الإضافة المتَقارِنة (conjugate addition) لأمينات أولية (primary amines) أو أمينات ثانوية مُضَاعَفة (bis - secondary amines) لمرَكَّبات أكريليت ثنائية (diacrylate compounds) (Lynn and Langer 2000). بالإضافة إلى ذلك، فإن تركيب البوليمرات المستخدمة وفحصها على أساس فردي هي عملية بطيئة وتحتاج إلى عمل مخبري مكثف وهي غير فعّالة. ويسمح التركيب (synthesis) والفحص (screening) عالي الإنتاجية لمكتبة واسعة من البوليمرات باستخدام طرق اندماجية (combinatorial methods) باكتشاف أسرع لناقلات البوليمر المحتملة وفهم أفضل لعلاقة البنية/الخاصية (structure / property relationship)

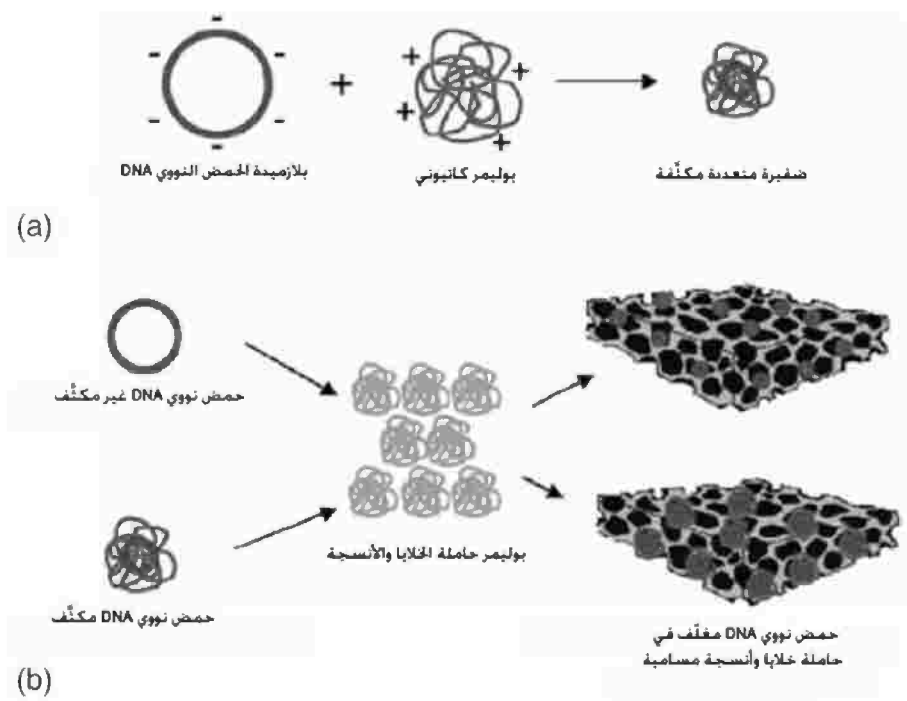
وتصميم مُحكم لبوليمرات جديدة من أجل التوصيل الجيني. وفي الآونة الأخيرة، ذكر Anderson وآخرون عملية تركيب وفحص على التوازي شبه آلية في الطور السائل (solution - phase) لمكتبة ضخمة تتكون من ٢٣٥٠ بولي (بيتا – أمينو إسترات) متنوعة بنيويًّا وقابلة للتحلل وذلك باستخدام مَواحيد (مونومرات) (monomers) متوفرة تجاريًّا (Anderson et al. 2003). وقد اكتشف الفحص عالي الإنتاجية ٤٧ بوليمرًا وهي تُظهر كفاءة تعديل جيني أفضل من البولي إيثيلين إيمين (PEI)، والذي يعد أفضل كاشِف تعديل جيني بوليمري متاح تجاريًّا (Anderson et al. 2003). وقد أظهرت تحاليل البنية/الخاصية تشابه بنيوي في البوليمرات عالية الأداء، والتي تتشكل جميعها من كُحُولات أمينية (amino alcohols). إن مثل هذا التقارب البنيوي يوفر فكرة قيّمة حول التصميم المحكم لنواقل البوليمر المستخدمة من أجل التوصيل الجيني (Anderson et al. 2005). إن (C32) هو البوليمر ذو الكفاءة الأعلى للتعديل الجيني، وهو بوليمر منتهي بالأمينو بنتانول (aminopentanol) مع وزن جزيئي (molecular weight) حوالي ١٨ كيلو دالتون (kDa) نسبةً إلى معايير البوليسترين (polystyrene). فعندما يتم حقنه داخل ورم (intratumorally) في الجسم الحي في الفئران، يُظهر البوليمر (C32) توافقًا حيويًّا كبيرًا ويقلل بشكلٍ ملحوظ من حجم الورم (tumor)، وهي الصفة المميزة التي تُعزى إلى موت الخلايا المبرمج (cell apoptosis) (Anderson et al. 2004; Peng et al. 2007). كما أظهرت البولي (بيتا – أمينو إسترات) عالية الأداء فعالية كبيرة وسُمّية منخفضة في التعديل الجيني للخلايا البِطانِيَّة الوعائية البشرية الأولية (primary human vascular endothelial cells - HUVEC) في وجود المصل، وهو ما كان يُشكّل تحديًا كبيرًا (Green et al. 2006). وقد أظهرت هذه النتائج إمكانية كبيرة لاستخدام هذه البوليمرات من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة الوعائية (vascular tissue engineering).

وقد أظهرت البولي (بيتا – أمينو إسترات) المنتهية بالأمين (amine) بأنها وبشكلٍ عام ذات كفاءة أكثر في فعالية التعديل الجيني. ولمواصلة دراسة تأثير نوع مجموعة الأمينات في نهاية السلسلة على التوصيل الجيني، فقد عُرِضت طريقة تم تعميمها لتعديل البولي (بيتا – أمينو إسترات) دون الحاجة لعملية التنقية (Zugates et al. 2007). يسمح هذا النظام بالتركيب والفحص السريع للعديد من الأشكال البنيوية المختلفة في نهاية سلسلة البوليمر. إن تعديل نهاية البوليمر (C32) يُحسّن وإلى حدٍّ كبير من كفاءته في التعديل الجيني في المختبر. وعلى نحوٍ بارز، فقد أدت إستراتيجية تعديل النهاية إلى اكتشاف العديد من البوليمرات الفعّالة التي تعمل بشكلٍ جيد جدًّا في وجود المصل، والتي تتغلب على عقبة كبيرة في استخدام النواقل غير الفيروسية (nonviral vectors) للتوصيل الجيني. في الجسم الحي، يؤدي التوصيل الجيني داخل الصِّفاق (intraperitoneal - IP) باستخدام بوليمرات الـ (C32) ذات النهاية المعدّلة إلى مستويات تعبير ولأكثر من نوع ذات مقدار أعلى من المستويات التي بلغتها باستخدام بوليمرات الـ (C32) غير المعدّلة.

(١,٤,٥,٤) الإطلاق المتواصل للحمض النووي (DNA) من حاملات خلايا وأنسجة بوليمرية من أجل هندسة الأنسجة Sustained DNA Release from Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering

يسمح توصيل بلازميدات الحمض النووي (DNA) باستخدام حاملات خلايا وأنسجة بوليمرية (polymeric scaffolds) بتوصيل محدد الموقع (localized delivery) على مدى فترة زمنية مَدِيْدة. ففي هذه الطريقة يمكن لبلازميدات الحمض النووي (DNA)، إما المعَرَّاة وإما المكَثَّفة، أن تُغلّف في حاملات الخلايا والأنسجة البوليمرية وأن تُستخدم مع أو بدون خلايا (الشكل رقم ١,٣). وقد تم استخدام حاملات الخلايا والأنسجة البوليمرية على نطاقٍ واسع

لأغراض إطلاق الدواء المتحكّم به (controlled drug release) ويمكن للمعرفة المكتسبة من تلك التطبيقات أن تُطبق أيضًا على توصيل الحمض النووي (DNA). فعلى سبيل المثال، يمكن للتوصيل المحلي لعوامل النمو أن يُشجّع التمايز المطلوب للخلايا وتشكيل الأنسجة، ولكنه عادةً ما يرتبط بمشاكل مثل شكل الإطلاق الانفجاري (burst release profile) وفَقْد النشاط البروتيني بعد التغليف (encapsulation). وفي المقابل، فإن الإطلاق المتحكّم به لبلازميدات الحمض النووي (DNA) يُرمّز (encoding) عوامل النمو تلك باستخدام حاملات الخلايا والأنسجة البوليمرية ويمكنه أن يتغلب على القيود المذكورة أعلاه. وقد تم استخدام كلٍّ من البوليمرات الاصطناعية والطبيعية المتوافقة حيويًّا لأغراض توصيل الحمض النووي (DNA) مثل بولي (لاكتيد-كو-غليكوليد) (poly(lactide-*co*-glycolide) - PLGA) (PLGA)، والكولاجين والهيالورونان (hyaluronan) (Cohen et al. 2000; Walter et al. 2001; Eliaz and Szoka 2002; Huang et al. 2003, 2005a; Segura et al. 2005). وقد تبين بأن توصيل الجينات المحدد الموقع باستخدام حاملات الخلايا والأنسجة يُحسّن تجديد العظم (bone regeneration) (Huang et al. 2005b)، وتَوَلُّد الأَوعِيَة الدموية (angiogenesis) (Shea et al. 1999)، بالإضافة إلى تجديد الجلد (skin regeneration) وتجديد الأعصاب (nerve regeneration) (Tyrone et al. 2000; Berry et al. 2001).



الشكل رقم (١,٣). رسم تخطيطي لتكثيف وتغليف الحمض النووي (DNA) في أنظمة تخزين بوليمرية. (a) تجميع الحمض النووي (DNA) مع البوليمرات الكاثيونيّة (cationic polymers) يؤدي إلى تشكيل ضفائر متعددة بأحجام نانوية (nanometer sized polyplexes). (b) يمكن للحمض النووي (DNA) المكثف أو غير المكثف أن يُغلّف في حاملات الخلايا والأنسجة البوليمرية للتوصيل المستدام (sustained delivery). (من Sorrie, H. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 500, 2006).

(١,٤,٥,٥) توصيل الجينات المستهدف من أجل التطبيقات في الجسم الحي Targeted Gene Delivery for In Vivo Applications

لتوصيل الجينات في الجسم الحي، تُعتبر التحديدية (النوعية) (specificity) أمرًا بالغ الأهمية، وإحدى الطرق لتحقيق التحديدية هي ربط اللجائن (ligands) المستهدفة بسطح الجسيمات النانوية بحيث يتم التعديل الجيني فقط لنوع الخلايا المستهدفة. إن أحد التحديات الرئيسية يكمن في دراسة التغير في الخصائص الفيزيائية الحيوية (biophysical properties) للجسيمات النانوية بعد عملية التغطية (coating) (Suh et al. 2002; Kursa et al. 2003). وقد تم في الآونة الأخيرة تطوير طريقة عامة لتغطية الجسيمات النانوية للبوليمر / الحمض النووي (DNA)، وقد عُثر على جسيمات نانوية مُغلّفة (coated) بالبيتيد تمتلك خصائص فيزيائية حيوية ملائمة بما في ذلك جسيمات صغيرة الحجم وجهد زيتا شبه المحايد (near - neutral zeta potential) والاستقرار في المصل (Green et al. 2007). وعند شروط التشكيل المناسبة والتي تتضمن نسبة شحنة شبه محايدة (near - neutral charge ratio)، تسمح الجسيمات النانوية المغلّفة بتوصيل جيني فعّال محدّد الألجين (ligand - specific gene delivery) للخلايا البِطانِيّة البشرية الأولِيّة (human primary endothelial cells) في الأوساط التي تحتوي على المصل. ولأن نظام توصيل الدواء الجُسَيمانِيّ النانوي (nanoparticulate drug delivery system) هذا (المكوّن من جُسَيمات نانوية) ذو فعالية عالية ونوعية مبنية على الألجين (ligand - based specificity) وقابلية للتحلل الحيوي (biodegradability) وسُمّية منخفضة للخلايا (cytotoxicity)، فإنه من المحتمل أن يكون مفيدًا في العديد من التطبيقات السريرية.

(١,٤,٥,٦) توصيل قليلة النوكلِيُوتيدات المضادة للاتجاه والـ (RNA) (الحَمْضُ النَوَوِيّ الرّيبي) قصير التداخل Antisense Oligonucleotides and siRNA Delivery

على العكس من توصيل الحمض النووي (DNA)، حيث تتم إثارة جينات معينة، يمكن أيضًا لقليلات النوكلِيُوتيدات (oligonucleotides) المحتوية على تسلسل مُتَمِّم لجين معين أو الحمض النووي (RNA) المِرْسال (mRNA) أن يتم توصيلها بحيث تبدأ عملية تحللها وتفككها. وقد تبين أن قليلات النوكلِيُوتيدات المضادة للاتجاه (antisense oligonucleotides) تُخمِد من تعبير جينات معينة لإنجاز وظيفة خلوية مرغوبة. وقد وسّع اكتشافٌ جديد لمسار تداخل الحمض النووي الريبي (RNA interference - RNAi) مجال التوصيل الجيني وفتح أبوابًا جديدة لتنظيم النمط الظاهري للخلية (cell phenotype). وقد كان *Caenorhabditis elegans* أول من اكتشف ووصف مسار تداخل الحمض النووي الريبي (RNAi) في عام ١٩٩٨ (Fire et al. 1998)، وبعد ذلك عُثر على هذه الظاهرة موجودة أيضًا في خلايا الثدييات (Elbashir et al. 2001). إن تداخل الحمض النووي الريبي (RNAi) هو عملية التخميد الجيني بعد النسخ (posttranscriptional gene silencing) والمحدد التسلسل وذلك بوساطة الحمض النووي الريبي قصير التداخل (small interfering RNA - siRNA)، وهو نوع من جزيئات الحمض النووي الريبي مزدوج الضفيرة (double - stranded) والتي عادةً ما يكون طولها من ٢٠ إلى ٢٥ نيوكليوتيدًا. وقد أظهرت العديد من المجموعات البحثية بأن تداخل الحمض النووي الريبي (RNAi) يمكن أن يُحدَث في خلايا الثدييات باستخدام الحمض النووي الريبي قصير التداخل (siRNA)

المستمد بشكلٍ خارجي (Caplen et al. 2001; Elbashir et al. 2001). ونظرًا لكفاءته العالية في تخميد التعابير الجينية وسهولة الاستخدام، فقد لفت وبشكلٍ سريع انتباهًا كبيرًا في الجينُومات الوظيفية (functional genomics) وتحليل المسار (pathway analysis) وتجارب التحقق من صحة الهدف الدوائي (drug target validation).

لا يزال التوصيل الآمن والفعال للأحماض النووية يُشكّل التحدي الرئيسي للعلاجات المبنية على الأحماض النووية. ويمكن استخدام العديد من الطرق لتوصيل الحمض النووي الريبي قصير التداخل (siRNA) إلى خلايا الثدييات بما في ذلك النَفوذِيّة الكهربائية (electroporation) والتعديل الجيني العكسي (reverse transfection) والتعديل الجيني الكيميائي (chemical transfection). إن التوصيل غير الفيروسي باستخدام الشحوم أو البوليمرات الكاتْيونيّة هي آمنة وواعدة، إلا أن المجموعة الحالية من مواد التوصيل المتاحة لا تزال محدودة وكفاءة التعديل الجيني ليست مثالية بعد. ومن المأمول في المستقبل أن يؤدي استخدام الطرق عالية الإنتاجية لتركيب وفحص مكتبات ضخمة من جزيئات توصيل غير فيروسية محتملة إلى تحديد مواد جديدة يمكن أن يكون لها تطبيقات واسعة للعلاجات بواسطة توصيل الحمض النووي الريبي قصير التداخل (siRNA) أو قليلة النوكلِيُوتيدات المضادة للاتجاه.

(١,٥) المفاعلات الحيوية في هندسة الأنسجة BIOREACTORS IN TISSUE ENGINEERING

(١,٥,١) متطلبات المفاعلات الحيوية في هندسة الأنسجة Requirements for Bioreactors in Tissue Engineering

مع التقدم السريع في مجال هندسة الأنسجة اكتسبت المفاعلات الحيوية (bioreactors) اهتمامًا متزايدًا باعتبارها أداة قوية لتقديم محفزات خارجية (exogenous stimuli) إضافية لبناء الأنسجة المهندَسَة (engineered tissue) من أجل تحقيق النجاح على المدى الطويل. وكوعاء يمكن فيه أن يُتحكم وبشكلٍ دقيق بالعديد من المحددات أو البارامترات (parameters)، يمكن تصميم المفاعلات الحيوية لتوفير الظروف المطلوبة للخلايا لتجديد الأنسجة الوظيفية. أمثلة عن مثل هذه المتغيرات تتضمن الإشارة الميكانيكية (mechanical signal) ودرجة الحرارة ومعدل تدفق أوساط التغذية (media flow rate) وتراكيز الأكسجين وثاني أكسيد الكربون ومحفزات أخرى خاصة بأنسجة محددة. ولتعزيز تجديد الأنسجة في المختبر، يجب أن يتم تلبية العديد من المتطلبات عند تصميم المفاعلات الحيوية. هذه المتطلبات موصوفة على أفضل وجه بحسب ما يلي: (١) وجود الحاجة لمحاكاة (simulate) البيئة في الجسم الحي واللازمة لتكاثر الخلايا وتمايزها، و (٢) أهمية التوزيع الخلوي المتجانس (uniform cellular distribution) في حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد (3D scaffolds)، و (٣) ضرورة المحافظة على تراكيز كافية من المواد المغذية، و (٤) نقل كتلي (mass transfer) ملائم للمواد المغذية إلى الأنسجة النامية، و(٥) التعرض للمحفزات الفيزيائية (physical stimuli) التي تحاكي ظروف الأنسجة في الجسم الحي (Freed and Vunjak - Novakovic 2000; Ellis, Jarman - Smith, and Chaudhuri 2005).

لتقييم أداء مفاعل حيوي تم تصميمه، ينبغي تقييم الأنسجة المهندَسَة المزروعة داخل المفاعل الحيوي بشكلٍ بنيوي ووظيفي معًا، ويعتمد التقييم المحدد على نوع الأنسجة المستهدفة. وبشكلٍ عام، يجب على جميع الأنسجة أن تمتلك توزيعًا كافيًا للخلايا والمصفوفة خارج الخلية (ECM) والمكونات ذات الخصائص المحددة للأنسجة. فعلى سبيل المثال، تُعتبر كمية الغلُوكُوزامينوغليكان (glucosaminoglycan - GAG) المقدمة مُتطَلّبًا بنيويًّا محددًا من أجل الغضروف المهندَس (engineered cartilage) (Freed and Vunjak - Novakovic 2000). ولتحديد الخصائص الوظيفية لأنسجة معينة، مثل الغضروف والأنسجة القلبية، ينبغي أن يتم أيضًا فحص الخصائص الميكانيكية والخصائص الفيزيولوجية الكهربائية (electrophysiological properties)، على التوالي (Bursac et al. 1999; Vunjak - Novakovic et al. 1999). وبالإضافة إلى المتطلبات العامة لجميع المفاعلات الحيوية، يجب أخذ المتطلبات البنيوية والوظيفية الخاصة للأنسجة المستهدفة بعين الاعتبار عند تصميم واتخاذ قرار استخدام أي مفاعل حيوي.

(١,٥,٢) المفاعلات الحيوية لبذر الخلايا الديناميكيّ Bioreactors for Dynamic Cell Seeding

يمكن استخدام المفاعلات الحيوية لبنية مُهندسَة في هيئات مختلفة بحيث تضمن تعزيز بَذْر الخلايا (cell seeding) وزيادة حجم البنية والخَلَوِيَّة (cellularity) وتعزيز ترسيب المصفوفة خارج الخلية (ECM). وبشكلٍ عام، فإن الخطوة الأولى في هندسة نسيج ما تشمل بَذْر الخلايا المناسبة على حاملات الخلايا والأنسجة. وعادةً ما تكون هذه الحاملات بُنى بوليمرية ثلاثية الأبعاد (3D polymeric constructs) قابلة للتحلل الحيوي وتتكون عادةً من البوليمرات الاصطناعية: بولي غليكولايد (polyglycolide) وبولي لاكتيد (polylactide) وبولي لاكتيد كو غليكولايد (polylactide coglycolide) (Griffith and Naughton 2002). إن الطريقة التقليدية لبذر الخلايا على حاملات الخلايا والأنسجة تتم في الحالة الساكنة (static manner)؛ مما يؤدي وفي كثيرٍ من الأحيان إلى كفاءة بذر منخفضة وتوزيع غير متجانس (heterogeneous distribution) للخلايا المبذورة. وعلى أي حال، يتطلب النمو المتجانس للأنسجة عملية ذات قدرة إنتاجية عالية في بذر الخلايا ودرجة كبيرة من التجانس في التصاق الخلايا. وقد تبين بأن البَذْر المتجانس للخلايا (uniform cell seeding) وبكثافات عالية يؤدي إلى تشكيل أنسجة ثلاثية الأبعاد مُحسّنة عند عملية زراعة الخلايا (Martin et al. 2004). وعلى النقيض من عملية البَذْر الساكنة (static seeding)، قد تُحفّز عملية البَذْر الديناميكي (dynamic seeding) التدفق في الوعاء، سواءً عن طريق مزج الحمل (convective mixing) باستخدام المفاعلات الحيوية ذات الحَوجَلة الدّوارة (spinner flask bioreactors) أو عن طريق تدفق الحمل (convective flow) باستخدام المفاعلات الحيوية ذات التدفق المتواصل (perfused bioreactors). تؤدي هذه الطريقة إلى نقل كتلي يظهر من خلال الحمل إلى سطح حاملة الخلايا والأنسجة ومن ثم وبشكلٍ أساسي عن طريق الانتشار عبر حاملة الخلايا والأنسجة. ونظرًا لدمج النقل الكتلي بواسطة الحمل، فقد تبين بأن عملية البذر الديناميكي تُنتج كفاءات بذر أعلى (Martin et al. 2004). وعلى الرغم من تلك الكفاءات العالية، فقد لا يؤدي النقل الكتلي بواسط الحمل إلى توزيعات خلايا متجانسة بشكلٍ كبير. ولضمان التجانس فإنه ومن بين العديد من المحددات الأخرى، يجب تحسين شروط التدفق أو السرعات التدويرية (rotational speeds) وذلك بناءً على خصائص الأنسجة المطلوبة ونوع حاملات الخلايا والأنسجة، الخ. وقد تبين على سبيل المثال، أن التدفق المتواصل المباشر (direct perfusion) في أنظمة البذر يزيد من مستوى التجانس لعملية

البذر والأنسجة اللاحقة، وذلك بالمقارنة مع الأوعية الساكنة (static vessels) والأوعية ذات حَوَاجِل المزج بالتحريك (stirred - flask vessels) (Wendt et al. 2003). في هذه الدراسة، جرى التدفق المتواصل المباشر ضمن المفاعل الحيوي المستخدم للزراعة اللاحقة للأنسجة أيضًا. إن هذه الطريقة تُزيل كل الصعوبات المرتبطة بنقل حاملات الخلايا والأنسجة المبذورة إلى المفاعل الحيوي من أجل الزراعة. بالإضافة إلى ذلك، ومن أجل الخلايا الحساسة للقص (shear sensitive)، فإنه يجب تقليل الوقت الذي تستغرقه في المعْلَّق (suspension) أثناء عملية البذر إلى الحد الأدنى (Freed and Vunjak - Novakovic 2000). تعتمد الطريقة الدقيقة التي يتم اختيارها في عملية بذر الخلايا وبشكلٍ كبير على نوع الخلايا والأنسجة. وقد أظهرت الدراسات أن الحَوَاجِل المازجة تعمل بشكلٍ جيد من أجل الغضروف، حيث إن معدل الحركة (kinetic rate) ومعدلات تشوهات الخلايا (cell deformation rates) هي أقل ما يمكن (Vunjak - Novakovic et al. 1998). وفي حالة الأنسجة القلبية (cardiac tissues)، فإن الطريقة المختارة لعملية البذر والزراعة هي استخدام أوعية المفاعلات الحيوية الدّوارة (rotating bioreactor vessels) حيث إنها تترافق مع فعّالية استِقْلابية (metabolic activity) عالية (Carrier et al. 1999).

(١,٥,٣) المفاعلات الحيوية لتحسين النقل الكتلي Bioreactors to Improve Mass Transfer

إن أحد أكبر التحديات في هندسة البُنى النسيجية يكمن في السماح لنقلٍ كتلي كافٍ من المواد المغذية إلى حاملة الخلايا والأنسجة المبذورة. وقد تبين أن الجملة الوعائية التي تقوم بالتزويد بالمواد المغذية تكون عادةً ضمن المجال من ١٠٠ إلى ٢٠٠ ميليمتر لنسيج حي في الجسم الحي (Yang et al. 2001)، في حين يجب أن تكون للأنسجة المهندسة على الأقل ضمن مجال عدة مليمترات في الحجم لتكون مفيدة (Martin et al. 2004). إن ضمان نقل الأكسجين والمواد المغذية على طول هذا المجال مهم جدًّا في إنشاء أنسجة متعددة الطبقات (multilayer tissues) في تمام الصحة. ولمعالجة هذه المشكلة، فقد تم تطوير العديد من المفاعلات الحيوية بما في ذلك الحواجل الساكنة / الدّوارة المازجة (static/mixed spinner flasks) والأوعية الجانبية ذات الدّوران البطيء (slow turning lateral vessels - STLV) والأوعية الدّورانية ذات النسبة الجانبية العالية (نسبة العرض إلى الارتفاع) (high aspect ratio rotating vessels - HARV) والأوعية ذات التدفق المتواصل والجدار الدّوار (rotating wall perfused vessels - RWPV) وأعمدة التدفق المتواصل (perfused columns) وحُجَيرات التدفق المتواصل (perfused chambers) (للمراجعة، انظر Freed and Vunjak - Novakovic (2000)). في أوعية التدفق المتواصل، يتم الاحتفاظ بالخلايا داخل حُجيرة بدلاً من إزالتها بشكلٍ مستمر وتضمن هذه الحُجيرة التزويد المستمر بالمواد المغذية؛ مما يؤدى إلى إنتاج كثافات خلايا عالية ضمن النسيج. إن جميع أوعية المزج بالتحريك تؤدي أيضًا إلى إنتاج كثافات مرتفعة من الخلايا، ولكن يجب توخي الحذر لضمان ألا يتم المزج بشكلٍ قوي جدًّا في حالة الخلايا الحساسة للقص. لقد تم في البداية تطوير الأوعية الدّورانية، مثل الأوعية الجانبية ذات الدّوران البطيء (STLV) والأوعية ذات التدفق المتواصل والجدار الدّوار (RWPV)، من قبل الإدارة الوطنية للملاحة الجوية والفضاء (NASA) لاستخدامها في تجارب الجاذبية المايكروية (microgravity)، مما أسفر عن حاملات خلايا وأنسجة عائمة بشكلٍ حر (free - floating scaffolds) (حرة الحركة أو غير مرتبطة) وشروط تدفق صَفائِحيّ (laminar flow) بشكلٍ عالٍ. ومع وجود التدفق الصَفائِحيّ بشكلٍ كبير، فإنه يتم التقليل إلى الحد الأدنى من قيود النقل الكتلي إلى سطح حاملة الخلايا والأنسجة ويمكن أن ينشئ النقل الفعّال للمواد المغذية (Ellis et al. 2005). وقد تم

فحص تأثيرات استخدام الأوعية الجانبية ذات الدّوران البطيء (STLVs) والأوعية ذات التدفق المتواصل والجدار الدّوار (RWPVs) في مزارع الغضاريف والجلد، وقد أنتج كلٌّ منهما أنسجة ذات خصائص أفضل بشكلٍ عام مما كانت عليه عندما كانت تُستخدم الأوعية الأخرى (Ellis et al. 2005).

عند التصميم واتخاذ القرار أي من المفاعلات الحيوية سيتم تنفيذه، فمن المهم الأخذ بعين الاعتبار مجالات الطول الضرورية والتوازنات بين النقل الكتلي بواسطة الحمل وبواسطة الانتشار (عدد بيكليت Peclet number, Pe)، ولا سيما في حالة بذر الخلايا. وأثناء عملية الزراعة، فإنه من الأهمية بمكان الأخذ بعين الاعتبار التوازن بين معدلات التفاعل (reaction rates) والنقل الكتلي الانتشاري (diffusional mass transfer) (عدد دامكولار Damköhler number, Da)، وهو النمط السائد للنقل الكتلي ضمن حاملة الخلايا والأنسجة. إن معدلات التفاعل ذات الصلة هي تلك الخاصة باستهلاك المواد المغذية (nutrient consumption). وبأخذ متطلبات الأنسجة بعين الاعتبار، فإن تجريب أعداد مختلفة من Pe و Da يمكن أن يساعد على تحديد القيم المثلى لمحددات أو بارامترات المفاعل الحيوي (bioreactor parameters)، مثل الفترات الزمنية للإقامة (residence times) وتراكيب المواد المغذية المستخدمة.

(١,٥,٤) المفاعلات الحيوية لتوفير محفزات ميكانيكية لتشكيل أنسجة مُحسّنة Bioreactors to Provide Mechanical Stimuli for Enhanced Tissue Formation

تسمح المفاعلات الحيوية أيضًا بدراسات المحفزات الميكانيكية على الخلايا وبُنى الأنسجة ثلاثية الأبعاد. وقد تبين أن المحفزات الميكانيكية، مثل إجْهاد القص (shear stress) الناشئ عن خصائص التدفق، يكون لها تأثير كبير على تطور الأنسجة (Ellis et al. 2005). على سبيل المثال، تواجه عضلة القلب (cardiac muscle) في الجسم الحي تدفقات نابضة (pulsatile flows) قوية، في حين يواجه العظم وبشكلٍ مستمر إجهاد وضغط ميكانيكي. وفي محاولة لمحاكاة الظروف في الجسم الحي، أدى التعرض لمحفزات ميكانيكية مختلفة أثناء عملية البذر والزراعة في المفاعلات الحيوية إلى تحسّنٍ كبير في وظائف الأنسجة المهندَسة. فعلى سبيل المثال، يؤدي تعريض الخلايا القلبية (cardiac cells) إلى شَدّ ميكانيكي دوري (cyclical mechanical stretching) إلى تحسّنٍ ملحوظ في تكاثر وتوزيع الخلايا بالإضافة إلى تنظيم المصفوفة خارج الخلية (ECM)، الأمر الذي يؤدي في نهاية المطاف إلى زيادة أكبر في قوة النسيج (Akhyari et al. 2002). وفي حالة الخلايا الغضروفية، يُحسّن كلٌّ من الضغط الديناميكي (dynamic compression) والقص الديناميكي (dynamic shearing) من إنتاج المصفوفة خارج الخلية (ECM) والخصائص الميكانيكية للأنسجة (Waldman et al. 2003). ومن المثير للاهتمام، فقد لوحظ أيضًا أن نقل إجهادات القص على النسيج الغضروفي النامي يؤدي إلى مزيدٍ من التحسّن في الخواص الميكانيكية بالمقارنة مع الضغط على الأنسجة المعرّضة (Waldman et al. 2003). تدعم هذه النتيجة فكرة أن التأثيرات الدقيقة للمحفزات الميكانيكية المختلفة على هذه الأنسجة تختلف بشكلٍ كبير مع نوع المحفزات المطبقة ونوع النسيج، وهي تؤكد أيضًا على الحاجة لدراسة تأثيرات المحددات أو البارامترات الفردية على تطور الأنسجة بشكلٍ منفصل.

(١,٥,٥) الاتجاهات المستقبلية لاستخدام المفاعلات الحيوية في هندسة الأنسجة Future Directions for Using Bioreactors in Tissue Engineering

تُعتبر المفاعلات الحيوية أدوات قوية لتوفير بيئة أكثر ملاءمة لهندسة بُنى نسيجية في المختبر. وتمثل تطبيقاتها لزراعة الأنسجة المهندَسَة من أجل الاستخدام في التطبيقات الطبية الحيوية الاتجاهات الحالية والمستقبلية والتي اكتسبت جاذبية كبيرة. ولقد كان (Dermagraft) المنتج الأول الذي أظهر استخدام المفاعلات الحيوية على نطاقٍ واسع، وهو عبارة عن طُعْم جِلْدِيّ (skin graft) تم تطويره من قبل علوم الأنسجة المتقدمة (Advanced Tissue Sciences) (Martin et al. 2004). فبالإضافة إلى قدرتها الكبيرة في إنشاء طُعْموم نسيجية (tissue grafts) من أجل التطبيقات السريرية، تُعتبر المفاعلات الحيوية وستستمر كأدوات مفيدة جدًّا لدراسة نمو الأنسجة بشكلٍ عام. وعلى عكس الشروط في الجسم الحي، تسمح المفاعلات الحيوية بالتحكم وفحص تأثيرات العوامل المحددة على تطوير الأنسجة بشكلٍ فردي أو في تركيبات متنوعة. إن المعرفة المكتسبة من مثل هذه الدراسات الميكانيكية ستوفر بدورها التوجيه للبحوث في مجال تصنيع الأنسجة من أجل الاستخدامات السريرية. وكمجال آخر مثير للاهتمام، حيث يمكن استخدام المفاعلات الحيوية باعتبارها أداة قيمة، هو دراسة تأثير المحددات المختلفة على تطوير الأنسجة أثناء العمليات البَاثُولوجيّة (المَرَضِيّة) (pathological processes) والأمراض المختلفة (Griffith and Naughton 2002). وستؤدي مثل هذه الأفكار الجديدة جنبًا إلى جنب مع تطوير أنظمة تحكم جديدة على وشك الظهور والدراسات الحسابية لديناميكية السوائل إلى تطوير مفاعلات حيوية وأنسجة مُهندسَة أكثر تطورًا في المستقبل.

(١,٦) الاستنتاجات CONCLUSIONS

لقد نما مجال هندسة الأنسجة نموًا سريعًا على مدى العقدين الماضيين، مدفوعًا بالطلب الهائل والقدرة الواقعية لهذا التخصص الجديد. وقد أُحرز تقدمٌ كبير بما في ذلك عزل واستخدام الخلايا البالغة والخلايا الجذعية الجنينية وتطوير حاملات خلايا وأنسجة قابلة للتحلل الحيوي وتوصيل العديد من العوامل المحفزة للأنسجة وتطبيقات المفاعلات الحيوية لتعزيز تشكيل الأنسجة. وعلى الرغم من تحقيق تقدمات كبيرة، إلا أن معظم العلاجات التجديدية (regenerative therapies) لا تزال في المرحلة التطويرية. إن فهم البيولوجيا الأساسية (fundamental biology) المرتبطة بتطوير الأنسجة الطبيعية هو أمرٌ مهم جدًّا لتطوير طرق أكثر قوة لإنجاز تمايز الخلايا المتحكم به وتشكيل الأنسجة. ويمكن لطريقة أكثر كَمّيّة مثل بيولوجيا النظام (system biology) والنمذجة الحسابية (computational modeling) أن تُسلّط الضوء أيضًا على فك رموز الشبكة المعقدة لنقل الإشارات. ويمكن للتطورات في تقنية التصنيع المايكروي (microfabrication technology) أن تساعد أيضًا في تصميم حاملات خلايا وأنسجة اصْطِناعيّة (artificial scaffolds) وأن تسمح بدراسات ميكانيكية للمنبهات المكانية (spatial cues) والتدرجات (gradients)، ... إلخ. إن توليد أنسجة تحتوي على أوعية دموية هو شرط أساسي لمعظم أنواع الأنسجة لتكون مفيدة سريريًّا. وباختصار، فإن تحقيق مزيد من التقدم في هذا المجال سيعتمد على التقدم والتفاعلات الدقيقة بين التخصصات المتعددة، مثل البيولوجيا التطورية وتقنية النانو وعلوم المواد (material sciences) وعلم المناعة (immunology) والبيولوجيا الحسابية (computational biology).

REFERENCES المراجع

Aggarwal, S. and M.F. Pittenger. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 105(4):1815–1822.

Akhyari, P., P.W.M. Fedak, R.D. Weisel, T.Y.J. Lee, S. Verma, D.A.G. Mickle, and R.K. Li. 2002. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. Circulation 106:I137–I142.

Akinc, A., D.G. Anderson, D.M. Lynn, and R. Langer. 2003a. Synthesis of poly(beta-amino ester)s optimized for highly effective gene delivery. Bioconjug Chem 14(5):979–988.

Akinc, A., D.M. Lynn, D.G. Anderson, and R. Langer. 2003b. Parallel synthesis and biophysical characterization of a degradable polymer library for gene delivery. J Am Chem Soc 125(18):5316–5323.

Albrecht, D.R., G.H. Underhill, T.B. Wassermann, R.L. Sah, and S.N. Bhatia. 2006. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. Nat Methods 3(5):369–375.

Anderson, D.G., A. Akinc, N. Hossain, and R. Langer. 2005. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters). Mol Ther 11(3):426–434.

Anderson, D.G., D.M. Lynn, and R. Langer. 2003. Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery. Angew Chem Int Ed Engl 42(27):3153–3158.

Anderson, D.G., W. Peng, A. Akinc, N. Hossain, A. Kohn, R. Padera, R. Langer, and J.A. Sawicki. 2004. A polymer library approach to suicide gene therapy for cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 101(45): 16028–16033.

Arcaute, K., B.K. Mann, and R.B. Wicker. 2006. Stereolithography of three-dimensional bioactive poly (ethylene glycol) constructs with encapsulated cells. Ann Biomed Eng 34(9):1429–1441.

Aubin, J.E. 1998. Bone stem cells. J Cell Biochem Suppl 30–31:73–82.

Baier Leach, J., K.A. Bivens, C.W. Patrick, Jr., and C.E. Schmidt. 2003. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. Biotechnol Bioeng 82(5):578–589.

Baksh, D., J.E. Davies, and P.W. Zandstra. 2003. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. Exp Hematol 31(8):723–732.

Baksh, D., R. Yao, and R.S. Tuan. 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells 25(6):1384–1392.

Beerens, A.M., A.F. Al Hadithy, M.G. Rots, and H.J. Haisma. 2003. Protein transduction domains and their utility in gene therapy. Curr Gene Ther 3(5):486–494.

Behr, J.P. 1997. The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. Chimia 51(1–2):34–36.

Beniash, E., J.D. Hartgerink, H. Storrie, J.C. Stendahl, and S.I. Stupp. 2005. Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment. Acta Biomater 1(4):387–397.

Berry, M., A.M. Gonzalez, W. Clarke, L. Greenlees, L. Barrett, W. Tsang, L. Seymour, J. Bonadio, A. Logan, and A. Baird. 2001. Sustained effects of gene-activated matrices after CNS injury. Mol Cell Neurosci 17(4):706–716.

Bissell, M.J., H.G. Hall, and G. Parry. 1982. How does the extracellular matrix direct gene expression? J Theor Biol 99(1):31–68.

Boland, T., V. Mironov, A. Gutowska, E.A. Roth, and R.R. Markwald. 2003. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 272(2): 497–502.

Boontheekul, T. and D.J. Mooney. 2003. Protein-based signaling systems in tissue engineering. Curr Opin Biotechnol 14(5):559–565.

Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A 92(16):7297–7301.

Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, and L. Peterson. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331(14): 889–895.

Bruder, S.P., D.J. Fink, and A.I. Caplan. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. J Cell Biochem 56(3):283–294.

Burke, P.A. 2000. Controlled release protein therapeutic effects of process and formulation on stability. In Handbook of Pharmaceutical Release Technology, edited by D.L. Wise. New York: Marcel Dekker.

Bursac, N., M. Papadaki, R.J. Cohen, F.J. Schoen, S.R. Eisenberg, R. Carrier, G. Vunjak-Novakovik, and L.E. Freed. 1999. Cardiac muscle tissue engineering: Toward an in vitro model for electrophysiological studies. Am J Physiol Heart Circ Physiol 277(2):433–444.

Caplan, A.I. and S.P. Bruder. 2001. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol Med 7(6):259–264.

Caplen, N.J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R.A. Morgan. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc Natl Acad Sci U S A 98(17): 9742–9747.

Carrier, R., M. Papadaki, M. Rupnick, F.J. Schoen, N. Bursac, R. Langer, L.E. Freed, and G. Vunjak-Novakovic. 1999. Cardiac tissue engineering: Cell seeding, cultivation parameters and tissue construct characterization. Biotechnol Bioeng 64(5):580–589.

Cartier, R. and R. Reszka. 2002. Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. Gene Ther 9(3):157–167.

Cetrulo, C.L. Jr. 2006. Cord-blood mesenchymal stem cells and tissue engineering. Stem Cell Rev 2(2): 163–168.

Chan, C.K. and D.A. Jans. 2002. Using nuclear targeting signals to enhance non-viral gene transfer. Immunol Cell Biol 80(2):119–130.

Chang, P.L., J.M. Van Raamsdonk, G. Hortelano, S.C. Barsoum, N.C. MacDonald, and T.L. Stockley. 1999. The in vivo delivery of heterologous proteins by microencapsulated recombinant cells. Trends Biotechnol 17(2):78–83.

Chen, R.R., E.A. Silva, W.W. Yuen, and D.J. Mooney. 2007. Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation. Pharm Res 24(2):258–264.

Chua, C.K., K.F. Leong, K.H. Tan, F.E. Wiria, and C.M. Cheah. 2004. Development of tissue scaffolds using selective laser sintering of polyvinyl alcohol/hydroxyapatite biocomposite for craniofacial and joint defects. J Mater Sci Mater Med 15(10):1113–1121.

Cohen, H., R.J. Levy, J. Gao, I. Fishbein, V. Kousaev, S. Sosnowski, S. Slomkowski, and G. Golomb. 2000. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. Gene Ther 7(22):1896–1905.

Cooke, M.N., J.P. Fisher, D. Dean, C. Rimnac, and A.G. Mikos. 2003. Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 64B(2):65–69.

Cowan, C.M., Y.Y. Shi, O.O. Aalami, Y.F. Chou, C. Mari, R. Thomas, N. Quarto, C.H. Contag, B. Wu, and M.T. Longaker. 2004. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Nat Biotechnol 22(5):560–567.

Crump, S.S. 1992. Apparatus and method for creating three-dimensional objects. Stratasys Inc., assignee. U.S. Patent 5,121,329.

Dagalakis, N., J. Flink, P. Stasikelis, J.F. Burke, and I.V. Yannas. 1980. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. J Biomed Mater Res 14(4):511–528.

Dash, P.R., M.L. Read, L.B. Barrett, M.A. Wolfert, and L.W. Seymour. 1999. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. Gene Ther 6(4):643–650.

DeLong, S.A., J.J. Moon, and J.L. West. 2005. Covalently immobilized gradients of bFGF on hydrogel scaffolds for directed cell migration. Biomaterials 26(16):3227–3234.

Dhariwala, B., E. Hunt, and T. Boland. 2004. Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. Tissue Eng 10(9–10):1316–1322.

During, M.J. 1997. Adeno-associated virus as a gene delivery system. Adv Drug Deliv Rev 27(1):83–94. Dutta Roy, T., J.L. Simon, J.L. Ricci, E.D. Rekow, V.P. Thompson, and J.R. Parsons. 2003. Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques. J Biomed Mater Res A 67(4):1228–1237.

Edelman, E.R., E. Mathiowitz, R. Langer, and M. Klagsbrun. 1991. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. Biomaterials 12(7):619–626.

Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411(6836):494–498.

Eliaz, R.E. and F.C. Szoka, Jr. 2002. Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants. Gene Ther 9(18):1230–1237.

Elisseeff, J., A. Ferran, S. Hwang, S. Varghese, and Z. Zhang. 2006. The role of biomaterials in stem cell differentiation: Applications in the musculoskeletal system. Stem Cells Dev 15(3):295–303.

Ellis, M., M. Jarman-Smith, and J.B. Chaudhuri. 2005. Bioreactor systems for tissue engineering: A fourdimensional challenge. In Bioreactors for Tissue Engineering, edited by J. Chaudhuri and M. Al-Rubeai. Dordrecht: Springer.

Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391(6669):806–811.

Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. N Engl J Med 285(21):1182–1186. Freed, L.E. and G. Vunjak-Novakovic. 2000. Tissue engineering bioreactors. In Principles of Tissue Engineering, edited by R.P. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti. San Diego: Academic Press.

Fu, K., A.M. Klibanov, and R. Langer. 2000. Protein stability in controlled-release systems. Nat Biotechnol 18(1):24–25.

Gelain, F., A. Horii, and S. Zhang. 2007. Designer self-assembling peptide scaffolds for 3-d tissue cell cultures and regenerative medicine. Macromol Biosci 7(5):544–551.

Gene Therapy Clinical Trials online, http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/. Accessed 2005.

Giordano, R.A., B.M. Wu, S.W. Borland, L.G. Cima, E.M. Sachs, and M.J. Cima. 1996. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. J Biomater Sci Polym Ed 8(1):63–75.

Green, J.J., E. Chiu, E.S. Leshchiner, J. Shi, R. Langer, and D.G. Anderson. 2007. Electrostatic ligand coatings of nanoparticles enable ligand-specific gene delivery to human primary cells. Nano Lett 7(4): 874–879.

Green, J.J., J. Shi, E. Chiu, E.S. Leshchiner, R. Langer, and D.G. Anderson. 2006. Biodegradable polymeric vectors for gene delivery to human endothelial cells. Bioconjug Chem 17(5):1162–1169.

Griffith, L.G. and G. Naughton. 2002. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. Science 295:1009–1016.

Guping, Y., T. Guping, and Yanjie. 2005. A new biodegradable poly-amino acid: Alpha,beta-poly[(N-hydroxypropyl/ aminoethyl)-DL-aspartamide-co-L-lysine], a potential nonviral vector for gene delivery. Drug Deliv 12(2):89–96.

Haensler, J. and F.C Szoka. 1993. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. Bioconjug Chem 4(5):372–379.

Hartgerink, J.D., E. Beniash, and S.I. Stupp. 2001. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. Science 294(5547):1684–1688.

Hartgerink, J.D., E. Beniash, and S.I. Stupp. 2002. Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. Proc Natl Acad Sci U S A 99(8):5133–5138.

He, X. and E. Jabbari. 2007. Material properties and cytocompatibility of injectable MMP degradable poly (lactide ethylene oxide fumarate) hydrogel as a carrier for marrow stromal cells. Biomacromolecules 8(3):780–792.

Healy, K.E., A. Rezania, and R.A. Stile. 1999. Designing biomaterials to direct biological responses. Ann N Y Acad Sci 875:24–35.

Helmlinger, G., F. Yuan, M. Dellian, and R.K. Jain. 1997. Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. Nat Med 3(2):177–182.

Herbert, P., K. Murphy, O. Johnson, N. Dong, W. Jaworowicz, M.A. Tracy, J.L. Cleland, and S.D. Putney. 1998. A large-scale process to produce microencapsulated proteins. Pharm Res 15(2):357–361.

Hern, D.L. and J.A. Hubbell. 1998. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. J Biomed Mater Res 39(2):266–276.

Hill, E., T. Boontheekul, and D.J. Mooney. 2006. Regulating activation of transplanted cells controls tissue regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 103(8):2494–2499.

Holland, T.A., Y. Tabata, and A.G. Mikos. 2005. Dual growth factor delivery from degradable oligo (poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. J Control Release 101(1–3):111–125.

Hollister, S.J. 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. Nat Mater 4(7):518–524.

Hollister, S.J., R.A. Levy, T.M. Chu, J.W. Halloran, and S.E. Feinberg. 2000. An image-based approach for designing and manufacturing craniofacial scaffolds. Int J Oral Maxillofac Surg 29(1):67–71.

Hoque, M.E., D.W. Hutmacher, W. Feng, S. Li, M.H. Huang, M. Vert, and Y.S. Wong. 2005. Fabrication using a rapid prototyping system and in vitro characterization of PEG–PCL–PLA scaffolds for tissue engineering. J Biomater Sci Polym Ed 16(12):1595–1610.

Huang, Y.C., M. Connell, Y. Park, D.J. Mooney, and K.G. Rice. 2003. Fabrication and in vitro testing of polymeric delivery system for condensed DNA. J Biomed Mater Res A 67(4):1384–1392.

Huang, Y.C., K. Riddle, K.G. Rice, and D.J. Mooney. 2005a. Long-term in vivo gene expression via delivery of PEI-DNA condensates from porous polymer scaffolds. Hum Gene Ther 16(5):609–617.

Huang, Y.C., C. Simmons, D. Kaigler, K.G. Rice, and D.J. Mooney. 2005b. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). Gene Ther 12(5):418–426.

Hubbell, J.A. 1995. Biomaterials in tissue engineering. Biotechnology (N Y) 13(6):565–576.

Hubbell, J.A. 1999. Bioactive biomaterials. Curr Opin Biotechnol 10(2):123–129.

Hulbert, S.F., F.A. Young, R.S. Mathews, J.J. Klawitter, C.D. Talbert, and F.H. Stelling. 1970. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. J Biomed Mater Res 4(3):433–456.

Hutmacher, D.W., T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, and K.C. Tan. 2001. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. J Biomed Mater Res 55(2):203–216.

Hwang, N.S., M.S. Kim, S. Sampattavanich, J.H. Baek, Z. Zhang, and J. Elisseeff. 2006. Effects of threedimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. Stem Cells 24(2):284–291.

Hwang, W.S., Y.J. Ryu, J.H. Park, E.S. Park, E.G. Lee, J.M. Koo, H.Y. Jeon, B.C. Lee, S.K. Kang, S.J. Kim, C. Ahn, J.H. Hwang, K.Y. Park, J.B. Cibelli, and S.Y. Moon. 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. Science 303(5664):1669–1674.

Ingber, D.E., V.C. Mow, D. Butler, L. Niklason, J. Huard, J. Mao, I. Yannas, D. Kaplan, and G. Vunjak-Novakovic. 2006. Tissue engineering and developmental biology: Going biomimetic. Tissue Eng 12(12): 3265–3283.

Itala, A.I., H.O. Ylanen, C. Ekholm, K.H. Karlsson, and H.T. Aro. 2001. Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. J Biomed Mater Res 58(6):679–683.

Izadpanah, R., C. Trygg, B. Patel, C. Kriedt, J. Dufour, J.M. Gimble, and B.A. Bunnell. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. J Cell Biochem 99(5):1285–1297.

Jiang, W. and S.P. Schwendeman. 2001. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D,L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. Pharm Res 18(6): 878–885.

Johnson, M.E., D. Blankschtein, and R. Langer. 1997. Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: Lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism. J Pharm Sci 86(10): 1162–1172.

Kaneko, T., S. Tanaka, A. Ogura, and M. Akashi. 2005. Tough, thin hydrogel membranes with giant crystalline domains composed of precisely synthesized macromolecules. Macromolecules 38(11):4861–4867.

Karageorgiou, V. and D. Kaplan. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials 26(27):5474–5491.

Karp, J.M., F. Sarraf, M.S. Shoichet, and J.E. Davies. 2004. Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: An in vivo study. J Biomed Mater Res A 71(1):162–171.

Khalyfa, A., S. Vogt, J. Weisser, G. Grimm, A. Rechtenbach, W. Meyer, and M. Schnabelrauch. 2007. Development of a new calcium phosphate powder-binder system for the 3D printing of patient specific implants. J Mater Sci Mater Med 18(5):909–916.

Kim, M.S., N.S. Hwang, J. Lee, T.K. Kim, K. Leong, M.J. Shamblott, J. Gearhart, and J. Elisseeff. 2005a. Musculoskeletal differentiation of cells derived from human embryonic germ cells. Stem Cells 23(1): 113–123.

Kim, T.I., H.J. Seo, J.S. Choi, J.K. Yoon, J.U. Baek, K. Kim, and J.S. Park. 2005b. Synthesis of biodegradable cross-linked poly(beta-amino ester) for gene delivery and its modification, inducing enhanced transfection efficiency and stepwise degradation. Bioconjug Chem 16(5):1140–1148.

Krewson, C.E., R. Dause, M. Mak, and W.M. Saltzman. 1996. Stabilization of nerve growth factor in controlled release polymers and in tissue. J Biomater Sci Polym Ed 8(2):103–117.

Kruyt, M.C., J.D. de Bruijn, C.E. Wilson, F.C. Oner, C.A. van Blitterswijk, A.J. Verbout, and W.J. Dhert. 2003. Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats. Tissue Eng 9(2):327–336.

Kursa, M., G.F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedl, R. Kircheis, and E. Wagner. 2003. Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. Bioconjug Chem 14(1):222–231.

Landers, R. and R. Mülhaupt. 2000. Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers. Macromol Mater Eng 282:17–21.

Langer, R. and J. Folkman. 1976. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. Nature 263(5580):797–800.

Langer, R. and D.A. Tirrell. 2004. Designing materials for biology and medicine. Nature 428(6982):487–492.

Langer, R. and J.P. Vacanti. 1993. Tissue engineering. Science 260(5110):920–926.

Lanza, R.P., J.B. Cibelli, and M.D. West. 1999. Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation. Nat Biotechnol 17(12):1171–1174.

Lanza, R.P., J.B. Cibelli, M.D. West, E. Dorff, C. Tauer, and R.M. Green. 2001. The ethical reasons for stem cell research. Science 292(5520):1299.

Le Blanc, K., L. Tammik, B. Sundberg, S.E. Haynesworth, and O. Ringden. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand J Immunol 57(1):11–20.

Leach, J.B., K.A. Bivens, C.N. Collins, and C.E. Schmidt. 2004. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. J Biomed Mater Res A 70(1):74–82.

Lee, K.W., S. Wang, B.C. Fox, E.L. Ritman, M.J. Yaszemski, and L. Lu. 2007. Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: Effects of resin formulations and laser parameters. Biomacromolecules 8(4):1077–1084.

Lee, K.Y., M.C. Peters, K.W. Anderson, and D.J. Mooney. 2000. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. Nature 408(6815):998–1000.

Leong, K.F., C.M. Cheah, and C.K. Chua. 2003. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. Biomaterials 24(13):2363–2378.

Li, G., A.S. Virdi, D.E. Ashhurst, A.H. Simpson, and J.T. Triffitt. 2000. Tissues formed during distraction osteogenesis in the rabbit are determined by the distraction rate: Localization of the cells that express the mRNAs and the distribution of types I and II collagens. Cell Biol Int 24(1):25–33.

Lim, Y.B., S.M. Kim, H. Suh, and J.S. Park. 2002. Biodegradable, endosome disruptive, and cationic networktype polymer as a highly efficient and nontoxic gene delivery carrier. Bioconjug Chem 13(5):952–957.

Liu, V.A. and S.N Bhatia. 2002. Three-dimensional photopatterning of hydrogels containing living cells. Biomed Microdev 4(4):257–266.

Lo, H., M.S. Ponticiello, and K.W. Leong. 1995. Fabrication of controlled release biodegradable foams by phase separation. Tissue Eng 1(1):15–28.

Lu, L., M.J. Yaszemski, and A.G. Mikos. 2001. TGF-beta1 release from biodegradable polymer microparticles: Its effects on marrow stromal osteoblast function. J Bone Joint Surg Am 83-A Suppl 1(Pt 2):S82–S91.

Lutolf, M.P. and J.A. Hubbell. 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nat Biotechnol 23(1):47–55.

Lynn, D.M., D.G. Anderson, D. Putnam, and R. Langer. 2001. Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: Parallel synthesis and screening of a degradable polymer library. J Am Chem Soc 123(33): 8155–8156.

Lynn, D.M. and R. Langer. 2000. Degradable poly(beta-amino esters): Synthesis, characterization, and selfassembly with plasmid DNA. J Am Chem Soc 122(44):10761–10768.

Lysaght, M.J. and J. Reyes. 2001. The growth of tissue engineering. Tissue Eng 7(5):485–493. Macpherson, H., P. Keir, S. Webb, K. Samuel, S. Boyle, W. Bickmore, L. Forrester, and J. Dorin. 2005. Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo. J Cell Sci 118(Pt 11): 2441–2450.

Maitra, B., E. Szekely, K. Gjini, M.J. Laughlin, J. Dennis, S.E. Haynesworth, and O.N. Koc. 2004. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. Bone Marrow Transplant 33(6):597–604.

Manjubala, I., A. Woesz, C. Pilz, M. Rumpler, N. Fratzl-Zelman, P. Roschger, J. Stampfl, and P. Fratzl. 2005. Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture. J Mater Sci Mater Med 16(12):1111–1119.

Mankovich, N.J., A.M. Cheeseman, and N.G. Stoker. 1990. The display of three-dimensional anatomy with stereolithographic models. J Digit Imaging 3(3):200–203.

Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol 22(2):80–86.

Matthews, J.A., G.E. Wnek, D.G. Simpson, and G.L. Bowlin. 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. Biomacromolecules 3(2):232–238.

McIntire, L.V. 2003. WTEC panel report on tissue engineering. Tissue Eng 9(1):3–7.

Merdan, T., J. Kopecek, and T. Kissel. 2002. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. Adv Drug Deliv Rev 54(5):715–758.

Mikos, A.G., S.W. Herring, P. Ochareon, J. Elisseeff, H.H. Lu, R. Kandel, F.J. Schoen, M. Toner, D. Mooney, A. Atala, M.E. Van Dyke, D. Kaplan, and G. Vunjak-Novakovic. 2006. Engineering complex tissues. Tissue Eng 12(12):3307–3339.

Mislick, K.A. and J.D. Baldeschwieler. 1996. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. Proc Natl Acad Sci U S A 93(22):12349–12354.

Mooney, D.J., D.F. Baldwin, N.P. Suh, J.P. Vacanti, and R. Langer. 1996. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. Biomaterials 17(14): 1417–1422.

Mooney, D.J., G. Organ, J.P. Vacanti, and R. Langer. 1994. Design and fabrication of biodegradable polymer devices to engineer tubular tissues. Cell Transplant 3(2):203–210.

Moore, K., M. MacSween, and M. Shoichet. 2006. Immobilized concentration gradients of neurotrophic factors guide neurite outgrowth of primary neurons in macroporous scaffolds. Tissue Eng 12(2):267–278.

Mosahebi, A., M. Simon, M. Wiberg, and G. Terenghi. 2001. A novel use of alginate hydrogel as Schwann cell matrix. Tissue Eng 7(5):525–534.

Murugan, R. and S. Ramakrishna. 2006. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: A review of spinning methodologies. Tissue Eng 12(3):435–447.

Murugan, R. and S. Ramakrishna. 2007. Design strategies of Ttissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. Tissue Eng.

Muschler, G.F., C. Nakamoto, and L.G. Griffith. 2004. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. J Bone Joint Surg Am 86-A(7):1541–1558.

Nahmias, Y., R.E. Schwartz, C.M. Verfaillie, and D.J. Odde. 2005. Laser-guided direct writing for threedimensional tissue engineering. Biotechnol Bioeng 92(2):129–136.

Nair, L.S. and C.T. Laurencin. 2006. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. Adv Biochem Eng Biotechnol 102:47–90.

Nelson, C.M. and M.J. Bissell. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: Tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol 22:287–309.

Nickerson, J. 2001. Experimental observations of a nuclear matrix. J Cell Sci 114(Pt 3):463–474.

Nuttelman, C.R., M.C. Tripodi, and K.S. Anseth. 2006. Dexamethasone-functionalized gels induce osteogenic differentiation of encapsulated hMSCs. J Biomed Mater Res A 76(1):183–195.

Odde, D.J. and M.J. Renn. 2000. Laser-guided direct writing of living cells. Biotechnol Bioeng 67(3): 312–318.

Oldham, J.B., L. Lu, X. Zhu, B.D. Porter, T.E. Hefferan, D.R. Larson, B.L. Currier, A.G. Mikos, and M.J. Yaszemski. 2000. Biological activity of rhBMP-2 released from PLGA microspheres. J Biomech Eng 122(3):289–292.

Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science 273(5272):242–245.

Pack, D.W., A.S. Hoffman, S. Pun, and P.S. Stayton. 2005. Design and development of polymers for gene delivery. Nat Rev Drug Discov 4(7):581–593.

Park, K., H.H. Jung, J.S. Son, J.-W. Rhie, K.D. Park, K.-D. Ahn, and D.K. Han. 2007. Thermosensitive and cell-adhesive pluronic hydrogels for human adipose-derived stem cells. Key Engineering Materials 342–343 (Advanced Biomaterials VII):301–304.

Partridge, K.A. and R.O. Oreffo. 2004. Gene delivery in bone tissue engineering: Progress and prospects using viral and nonviral strategies. Tissue Eng 10(1–2):295–307.

Pearse, D.D., F.C. Pereira, A.E. Marcillo, M.L. Bates, Y.A. Berrocal, M.T. Filbin, and M.B. Bunge. 2004. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. Nat Med 10(6):610–616.

Peng, W., D.G. Anderson, Y. Bao, R.F. Padera, Jr., R. Langer, and J.A. Sawicki. 2007. Nanoparticulate delivery of suicide DNA to murine prostate and prostate tumors. Prostate 67(8):855–862.

Peppas, N.A. and R. Langer. 1994. New challenges in biomaterials. Science 263(5154):1715–1720.

Peterson, L., T. Minas, M. Brittberg, A. Nilsson, E. Sjogren-Jansson, and A. Lindahl. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. Clin Orthop Relat Res (374):212–234.

Petite, H., V. Viateau, W. Bensaid, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, and G. Guillemin. 2000. Tissue-engineered bone regeneration. Nat Biotechnol 18(9):959–963.

Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284(5411):143–147.

Plank, C., W. Zauner, and E. Wagner. 1998. Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes. Adv Drug Deliv Rev 34(1):21–35.

Prestrelski, S.J., N. Tedeschi, T. Arakawa, and J.F. Carpenter. 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. Biophys J 65(2):661–671.

Rowley, J.A., G. Madlambayan, and D.J. Mooney. 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. Biomaterials 20(1):45–53.

Sachlos, E., D. Gotora, and J.T. Czernuszka. 2006. Collagen scaffolds reinforced with biomimetic composite nano-sized carbonate-substituted hydroxyapatite crystals and shaped by rapid prototyping to contain internal microchannels. Tissue Eng 12(9):2479–2487.

Sachlos, E., N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, and J.T. Czernuszka. 2003. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. Biomaterials 24(8):1487–1497.

Sachs, E.M., S.H. John, J.C. Michael, and A.W. Paul, 1993. Three-dimensional printing techniques. Massachusetts Institute of Technology, assignee. U.S. Patent 5,204,055.

Saltzman, W.M. and W.L. Olbricht. 2002. Building drug delivery into tissue engineering. Nat Rev Drug Discov 1(3):177–186.

Sanders, J.E., S.G. Malcolm, S.D. Bale, Y.N. Wang, and S. Lamont. 2002. Prevascularization of a biomaterial using a chorioallontoic membrane. Microvasc Res 64(1):174–178.

Sawada, T., K. Tsukada, K. Hasegawa, Y. Ohashi, Y. Udagawa, and V. Gomel. 2001. Cross-linked hyaluronate hydrogel prevents adhesion formation and reformation in mouse uterine horn model. Hum Reprod 16(2):353–356.

Schnabel, M., S. Marlovits, G. Eckhoff, I. Fichtel, L. Gotzen, V. Vecsei, and J. Schlegel. 2002. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. Osteoarthritis Cartilage 10(1):62–70.

Schwendeman, S.P. 2002. Recent advances in the stabilization of proteins encapsulated in injectable PLGA delivery systems. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 19(1):73–98.

Segura, T., P.H. Chung, and L.D. Shea. 2005. DNA delivery from hyaluronic acid-collagen hydrogels via a substrate-mediated approach. Biomaterials 26(13):1575–1584.

Shamblott, M.J., J. Axelman, S. Wang, E.M. Bugg, J.W. Littlefield, P.J. Donovan, P.D. Blumenthal, G.R. Huggins, and J.D. Gearhart. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci U S A 95(23):13726–13731.

Shea, L.D., E. Smiley, J. Bonadio, and D.J. Mooney. 1999. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. Nat Biotechnol 17(6):551–554.

Shu, X.Z., K. Ghosh, Y. Liu, F.S. Palumbo, Y. Luo, R.A. Clark, and G.D. Prestwich. 2004. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. J Biomed Mater Res A 68(2):365–375.

Sohier, J., T.J. Vlugt, N. Cabrol, C. Van Blitterswijk, K. de Groot, and J.M. Bezemer. 2006. Dual release of proteins from porous polymeric scaffolds. J Control Release 111(1–2):95–106.

Sokolsky-Papkov, M., K. Agashi, A. Olaye, K. Shakesheff, and A.J. Domb. 2007. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 59(4–5):187–206.

Sottile, V., A. Thomson, and J. McWhir. 2003. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. Cloning Stem Cells 5(2):149–155.

Street, J., D. Winter, J.H. Wang, A. Wakai, A. McGuinness, and H.P. Redmond. 2000. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? Clin Orthop Relat Res (378):224–237.

Suciati, T., D. Howard, J. Barry, N.M. Everitt, K.M. Shakesheff, and F.R. Rose. 2006. Zonal release of proteins within tissue engineering scaffolds. J Mater Sci Mater Med 17(11):1049–1056.

Suh, W., S.O. Han, L. Yu, and S.W. Kim. 2002. An angiogenic, endothelial-cell-targeted polymeric gene carrier. Mol Ther 6(5):664–672.

Sun, J.J., C.J. Bae, Y.H. Koh, H.E. Kim, and H.W. Kim. 2007. Fabrication of hydroxyapatite-poly(epsiloncaprolactone) scaffolds by a combination of the extrusion and bi-axial lamination processes. J Mater Sci Mater Med 18(6):1017–1023.

Tabata, Y. 2003. Tissue regeneration based on growth factor release. Tissue Eng 9(Suppl 1):S5–S15.

Tan, K.H., C.K. Chua, K.F. Leong, C.M. Cheah, W.S. Gui, W.S. Tan, and F.E. Wiria. 2005. Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering. Biomed Mater Eng 15(1–2): 113–124.

Tan, W. and T.A. Desai. 2004. Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures. Biomaterials 25(7–8):1355–1364.

Tessmar, J.K. and A.M. Gopferich. 2007a. Customized PEG-derived copolymers for tissue-engineering applications. Macromol Biosci 7(1):23–39.

Tessmar, J.K. and A.M. Gopferich 2007b. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 59(4–5):274–291.

Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282(5391):1145–1147.

Tomita, M., T. Mori, K. Maruyama, T. Zahir, M. Ward, A. Umezawa, and M.J. Young. 2006. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. Stem Cells 24(10):2270–2278.

Tresco, P.A., R. Biran, and M.D. Noble. 2000. Cellular transplants as sources for therapeutic agents. Adv Drug Deliv Rev 42(1–2):3–27.

Tsuboi, R., M. Yamazaki, Y. Matsuda, K. Uchida, R. Ueki, and H. Ogawa. 2007. Antisense oligonucleotide targeting fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1 stimulates cellular activity of hair follicles in an in vitro organ culture system. Int J Dermatol 46(3):259–263.

Tyrone, J.W., J.E. Mogford, L.A. Chandler, C. Ma, Y. Xia, G.F. Pierce, and T.A. Mustoe. 2000. Collagenembedded platelet-derived growth factor DNA plasmid promotes wound healing in a dermal ulcer model. J Surg Res 93(2):230–236.

Um, S.H., J.B. Lee, N. Park, S.Y. Kwon, C.C. Umbach, and D. Luo. 2006. Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel. Nat Mater 5(10):797–801.

Vacanti, J.P., M.A. Morse, W.M. Saltzman, A.J. Domb, A. Perez-Atayde, and R. Langer. 1988. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Pediatr Surg 23(1) (Pt 2):3–9.

Velema, J. and D. Kaplan. 2006. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. Adv Biochem Eng Biotechnol 102:187–238.

Vile, R.G., A. Tuszynski, and S. Castleden. 1996. Retroviral vectors. From laboratory tools to molecular medicine. Mol Biotechnol 5(2):139–158.

Viola, J., B. Lal, and O. Grad. 2003. The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field. Arlington, VA: National Science Foundation.

Vunjak-Novakovic, G. and D.L. Kaplan. 2006. Tissue engineering: The next generation. Tissue Eng 12(12): 3261–3263.

Vunjak-Novakovic, G., I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A.J. Grodzinsky, R. Langer, and L.E. Freed. 1999. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage. J Orthop Res 17(1):130–138.

Vunjak-Novakovic, G., B. Obradovic, P. Bursac, I. Martin, R. Langer, and L.E. Freed. 1998. Dynamic seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. Biotechnol Prog 14(2):193–202.

Wagner, E., R. Kircheis, and G.F. Walker. 2004. Targeted nucleic acid delivery into tumors: New avenues for cancer therapy. Biomed Pharmacother 58(3):152–161.

Wald, H.L., G. Sarakinos, M.D. Lyman, A.G. Mikos, J.P. Vacanti, and R. Langer. 1993. Cell seeding in porous transplantation devices. Biomaterials 14(4):270–278.

Waldman, S.D., C.G. Spiteri, M.D. Grynpas, R.M. Pilliar, J. Hong, and R.A. Kandel. 2003. Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation in vitro. J Bone Joint Surg Am 85:101–105.

Walter, E., D. Dreher, M. Kok, L. Thiele, S.G. Kiama, P. Gehr, and H.P. Merkle. 2001. Hydrophilic poly(DLlactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. J Control Release 76(1–2):149–168.

Wendt, D., A. Marsano, M. Jakob, M. Heberer, and I. Martin. 2003. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. Biotechnol Bioeng 84(2):205–214.

Wettergreen, M.A., B.S. Bucklen, W. Sun, and M.A. Liebschner. 2005. Computer-aided tissue engineering of a human vertebral body. Ann Biomed Eng 33(10):1333–1343.

Williams, J.M., A. Adewunmi, R.M. Schek, C.L. Flanagan, P.H. Krebsbach, S.E. Feinberg, S.J. Hollister, and S. Das. 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. Biomaterials 26(23):4817–4827.

Wilson, C.E., W.J. Dhert, C.A. Van Blitterswijk, A.J. Verbout, and J.D. De Bruijn. 2002. Evaluating 3D bone tissue engineered constructs with different seeding densities using the alamarBlue assay and the effect on in vivo bone formation. J Mater Sci Mater Med 13(12):1265–1269.

Wilton, S.D., A.M. Fall, P.L. Harding, G. McClorey, C. Coleman, and S. Fletcher. 2007. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript. Mol Ther 15(7): 1288–1296.

Wiria, F.E., K.F. Leong, C.K. Chua, and Y. Liu. 2007. Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. Acta Biomater 3(1):1–12.

Wise, D.L., ed. 2000. Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology. New York: Marcel Dekker.

Wood, K.C., S.R. Little, R. Langer, and P.T. Hammond. 2005. A family of hierarchically self-assembling linear-dendritic hybrid polymers for highly efficient targeted gene delivery. Angew Chem Int Ed Engl 44(41):6704–6708.

Wray, J.B. 1970. The biochemical characteristics of the fracture hematoma in man. Surg Gynecol Obstet 130(5):847–852.

Yang, F., R. Murugan, S. Wang, and S. Ramakrishna. 2005a. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. Biomaterials 26(15):2603–2610.

Yang, F., C.G. Williams, D.A. Wang, H. Lee, P.N. Manson, and J. Elisseeff. 2005b. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. Biomaterials 26(30):5991–5998.

Yang, S., K.F. Leong, Z. Du, and C.K. Chua. 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Eng 7(6):679–689.

Yeo, Y., C.B. Highley, E. Bellas, T. Ito, R. Marini, R. Langer, and D.S. Kohane. 2006. In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels prevent post-operative abdominal adhesions in a rabbit model. Biomaterials 27(27):4698–4705.

Yin, Y., M.T. Henzl, B. Lorber, T. Nakazawa, T.T. Thomas, F. Jiang, R. Langer, and L.I. Benowitz. 2006. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. Nat Neurosci 9(6):843–852.

Zhang, S., F. Gelain, and X. Zhao. 2005. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. Semin Cancer Biol 15(5):413–420.

Zhu, G., S.R. Mallery, and S.P. Schwendeman. 2000. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly(lactide-co-glycolide). Nat Biotechnol 18(1):52–57.

Zugates, G.T., W. Peng, A. Zumbuehl, S. Jhunjhunwala, Y.H. Huang, R. Langer, J.A. Sawicki, and D.G. Anderson. 2007. Rapid optimization of gene delivery by parallel end-modification of poly(betaamino ester)s. Mol Ther 15(7):1306–1312.

Zuk, P.A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, H.P. Lorenz, and M.H. Hedrick. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7(2):211–228.