

## وظائف ومتطلبات حاملات الخلايا والأنسجة

### الاصطناعية في هندسة الأنسجة

## Functions and Requirements of Synthetic Scaffolds in Tissue Engineering

*Tejas Shyam Karande and C. Mauli Agrawal*

### المحتويات CONTENTS

٧٩	INTRODUCTION	مقدمة (٣, ١)
٧٩	FUNCTIONS AND REQUIREMENTS OF SCAFFOLDS	وظائف ومتطلبات حاملات الخلايا والأنسجة (٣, ٢)
٨٠	Biocompatibility	التوافقية الحيوية (٣, ٢, ١)
٨٠	Biodegradation	التحلل الحيوي (٣, ٢, ٢)
	Matching Rates of Degradation of Scaffold and Regrowth of New Tissue	مطابقة معدلات تحلل حاملات الخلايا والأنسجة وإعادة نمو الأنسجة الجديدة (٣, ٢, ٣)
٨١	Mechanical Properties	الخصائص الميكانيكية (٣, ٢, ٤)
٨٣	Surface Properties	خصائص السطح (٣, ٢, ٥)
٨٥	Architectural Properties	خصائص البنية الهندسية (٣, ٢, ٦)
٨٧	Pore Size and Shape	حجم وشكل المسام (٣, ٢, ٦, ١)
٨٧	Porosity	المسامية (٣, ٢, ٦, ٢)
٨٩	Pore Interconnectivity	الربط البيئي للمسام (٣, ٢, ٦, ٣)

٩٢	Permeability النفاذية (٣, ٢, ٦, ٤)
٩٤	Scaffold Fabrication تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة (٣, ٢, ٧)
٩٤	Solvent Casting and Particulate Leaching صب المذيب واستغسال الجسيمات (٣, ٢, ٧, ١)
٩٥	Gas Foaming الرغوة الغازية (٣, ٢, ٧, ٢)
٩٦	Emulsion Freeze Drying التجفيف بتجميد المستحلب (٣, ٢, ٧, ٣)
٩٦	Thermally Induced Phase Separation الفصل الطوري المحرض حرارياً (٣, ٢, ٧, ٤)
٩٨	Gravity and Microsphere Sintering الجاذبية وتليد الكرات المايكروية (٣, ٢, ٧, ٥)
٩٩	Rapid Prototyping/Solid Freeform Fabrication النماذج الأولية السريعة/تصنيع الشكل الحر الصلب (٣, ٢, ٧, ٦)
١٠٢	Hydrogels الهلامات المائية (٣, ٢, ٧, ٧)
١٠٥	Electrospinning الغزل الكهربائي (٣, ٢, ٧, ٨)
١٠٩	MODIFICATION OF SCAFFOLDS تعديل حاملات الخلايا والأنسجة (٣, ٣)
١١١	TYPES OF SCAFFOLD MATERIALS أنواع مواد حاملات الخلايا والأنسجة (٣, ٤)
١١٢	Polyesters البوليستر (٣, ٤, ١)
١١٣	Polyfumarates البولي فومارات (٣, ٤, ٢)
١١٤	Polyanhydrides البولي أمهيدريدات (٣, ٤, ٣)
١١٥	Poly(Ortho Esters) البولي (أورثو إستر) (٣, ٤, ٤)
١١٦	Poly(Amino Acids) Or Polycarbonates بولي (الأحماض الأمينية) أو البولي كربونات (٣, ٤, ٥)
١١٦	Polyphosphazenes البولي فوسفازينات (٣, ٤, ٦)
١١٧	Composites المواد المركبة (٣, ٤, ٧)
١١٨	CONCLUSIONS الاستنتاجات (٣, ٥)
١١٨	REFERENCES المراجع (٣, ٥)

**INTRODUCTION (٣, ١) مقدمة**

هندسة الأنسجة هي حقل متعدد التخصصات (interdisciplinary) ظهر لتلبية الاحتياجات التي نشأت عن عدد من المشاكل المترابطة بما في ذلك النقص في الأعضاء المتبرع بها، واعتلال الجهة المتبرعة، وفشل الأجهزة الميكانيكية [1]. وقد ظلت هذه الحلول الناقصة تعطي قوة دفع كبيرة لمجال جديد نسبياً يقوم على تطبيق مبادئ الهندسة وعلوم الحياة نحو تطوير بدائل بيولوجية (biological substitutes) للإصلاح أو الصيانة أو تحسين وظيفة الأنسجة [1]. إن معظم تقنيات هندسة الأنسجة تستخدم حاملات خلايا وأنسجة مسامية ثلاثية الأبعاد (3D porous scaffold) مبدورة بالخلايا. وتلعب حاملات الخلايا والأنسجة هذه دوراً حيوياً في تطوير أنسجة جديدة.

إن الهدف من هذا العرض هو مناقشة وظائف ومتطلبات حاملات الخلايا والأنسجة في هندسة الأنسجة بالإضافة إلى تعديلها. وستتم في هذه الدراسة مناقشة أنواعاً مختلفة من حاملات الخلايا والأنسجة الاصطناعية بالتفصيل مع دراسة طرق تصنيعها.

**FUNCTIONS AND REQUIREMENTS OF SCAFFOLDS (٣, ٢) وظائف ومتطلبات حاملات الخلايا والأنسجة**

تُقدم حاملات الخلايا والأنسجة وظائف عديدة حاسمة من أجل نجاح عملية تجديد الأنسجة (tissue regeneration)، والتي تشمل [2]:

- ١- العمل كحاملات فراغية لمنع تجاوز الأنسجة من المنطقة المجاورة المباشرة إلى الموقع المتأثر.
- ٢- توفير بنية مؤقتة داعمة للأنسجة المراد أن تحل محلها.
- ٣- إنشاء ركيزة تسمح بالتصاق ونمو وتكاثر وهجرة وتمايز الخلايا عليها.
- ٤- العمل بمثابة مركبة لتوصيل الخلايا، لتسهيل الاحتفاظ بها وتوزيعها في المنطقة المراد نمو الأنسجة الجديدة فيها.
- ٥- توفير مساحة لحدوث التوعي (vascularization) (تكوّن الأوعية الدموية) وتشكيل أنسجة جديدة (neotissue formation) وإعادة تشكيلها.
- ٦- التمكين من النقل الفعّال (efficient transport) للمواد الغذائية وعوامل النمو والأوعية الدموية وإزالة مواد الفضلات.

ولكي تقوم حاملات الخلايا والأنسجة بأداء الوظائف المذكورة أعلاه، يجب أن تتوافر فيها بعض المتطلبات الأساسية، والتي تحتم عليها [3-5]:

- ١- أن تكون متوافقة حيوياً (biocompatible)، وهذا يعنى أنها لا تُنتج رد فعل فيزيولوجي غير مرغوب فيه.

- ٢- أن تكون قابلة للتحلل الحيوي (biodegradable)، وهذا يعني أنها تتحلل في نهأي المطاف ويتخلص الجسم منها عن طريق العمليات التي تحدث بشكل طبيعي.
  - ٣- تتحلل بمعدل يتناسب مع إعادة نمو الأنسجة الجديدة.
  - ٤- لها خصائص ميكانيكية تنسجم مع النسيج الذي تحل محله.
  - ٥- لديها خصائص سطحية مرغوبة لتمكين التصاق ونمو وتكاثر وتمايز الخلايا بالإضافة إلى تشكيل المصفوفة خارج الخلية.
  - ٦- لديها خصائص بنيوية هندسية (architectural properties) هي الأمثل من حيث حجم المسام (pore size) والمسامية (porosity) والترابط فيما بين المسام (pore interconnectivity) والنفاذية (permeability)، والسماح بكفاءة في توصيل المواد الغذائية وعوامل النمو والأوعية الدموية والتخلص من الفضلات.
  - ٧- أن تتم معالجتها بسهولة في أشكال معقدة ثلاثية الأبعاد بطريقة يمكن التحكم فيها بشكل جيد وبطريقة قابلة لإعادة الإنتاج.
- وستتم أدناه مناقشة هذه المتطلبات بمزيد من التفصيل.

### (٣,٢,١) التوافقية الحيوية Biocompatibility

وهي الشرط الأساسي لأي نوع من أنواع حاملات الخلايا والأنسجة. إن المطلوب من حاملة الخلايا والأنسجة هو إظهار استجابة مفيدة من الخلايا التي بُذرت عليها واستجابة مناعية (immune response) مناسبة من الأنسجة المضيفة عند تنفيذ عملية الزراعة، وهذا يعني أن التفاعلات التي تحدث بين الحاملة والخلايا والأنسجة المضيفة ينبغي أن تكون ملائمة من دون أي احتمال للضرر بسبب سُمِّية الخلايا (cytotoxicity) المحرّضة أو توليد استجابة مناعية معاكسة (adverse immune response) أو تفعيل تحثّر الدم أو المسارات المتّمة [6]. وهناك عدد من العوامل التي تساهم في هذا النوع من استجابة الأنسجة التي تولدها المادة الحيوية ويشمل ذلك شكل وحجم الطعم (implant) وتفاعليته الكيميائية (chemical reactivity) والآلية (mechanism) ومعدل التحلل والمنتجات الثانوية للتحلل (byproducts of degradation) وموقع الزراعة ونوع المضيف [6]. وبالتقدم مع ذلك خطوة إلى الأمام، يمكن للمرء توسيع معنى مصطلح التوافقية الحيوية ليشمل التحديد الوظيفي الحيوي (biofunctionality) الذي يدل على قدرة المادة على دعم وتعزيز تفاعلات الخلايا - المواد وفقاً للتطبيق المحدد للأنسجة المحلية [7].

### (٣,٢,٢) التحلل الحيوي Biodegradation

بما أن حاملات الخلايا والأنسجة الاصطناعية تعمل بمثابة بنى مؤقتة يتم استبدالها بالأنسجة الأصلية في وقت لاحق، فهي بحاجة لأن تُزال بشكل تدريجي من موقع الزرع من خلال عملية يُشار إليها بشكل عام بعملية التحلل الحيوي

(biodegradation). وفي الغالب يتم استعمال المصطلحات التالية بشكل غير صحيح و / أو بالتبادل في مراجع هندسة الأنسجة المنشورة مثل قابلية التحلل الحيوي (biodegradable) وقابلية الارتشاف الحيوي (bioresorbable) وقابلية التآكل الحيوي (bioerodable) وقابلية الامتصاص الحيوي (bioabsorbable) [8]. يشير مصطلح قابلية التحلل الحيوي إلى الانحلال الناجم عن التحلل الجزيئي الذي تسببه العناصر البيولوجية مما يؤدي إلى إنتاج أجزاء أو غيرها من منتجات التحلل الثانوية التي لا يتم إزالتها بالضرورة من الجسم ؛ ويعني مصطلح قابلية الارتشاف الحيوي القضاء التام على المواد الأجنبية والتحلل الكتلي للمنتجات الثانوية عن طريق الامتصاص داخل الجسم ، أي عن طريق المسارات الطبيعية مثل الترشيح أو الاستقلاب (metabolization) ؛ ويدل مصطلح قابلية التآكل الحيوي على تحلل السطح في حين يعني مصطلح قابلية الامتصاص الحيوي الانحلال في سوائل الجسم بدون أي انقسام لسلسلة البوليمر أو نقصان في الكتلة الجزيئية [9].

وبشكل عام ، تخضع بوليمرات مجموعة البولي (حمض ألفا-هيدروكسي) poly ( $\alpha$ -hydroxy acid) للتحلل الكتلي. وبالتالي ، يبدأ وزنها الجزيئي في الانخفاض بشكل فوري عند التماس مع الأوساط السائلة ولكن تنقص كتلتها ببطء أكثر من ذلك بكثير بسبب الوقت المطلوب من قبل السلاسل الجزيئية لتتخفف إلى الحجم المناسب لها للانتشار (diffuse) بحرية خارج مصفوفة البوليمر (polymer matrix). وينتج عن هذه الظاهرة تأخر التفكك في البداية ولكن بعد ذلك يحدث تفكك سريع للطعم المزروع مصحوباً في نفس الوقت بزيادة في إطلاق المنتجات الثانوية للتحلل الحمضي. وفي الجسم الحي ، لا يمكن أن ينتج عن هذا فقط تفاعلات التهابية (inflammatory reactions) ، ولكن الانخفاض المفاجئ في درجة الحموضة (pH) قد يؤدي إلى مزيد من التعارض في التوافقية الحيوية للطعم المزروع ما لم يكن هناك ما يكفي من الدرع (buffering) المقدم عن طريق سوائل الجسم المحيطة والجملة الوعائية [8,10]. وتؤثر مواد الحشو (filler materials) على آلية التحلل من خلال منع تأثير التحفيز الذاتي (autocatalytic) لمجموعات النهاية الحمضية الذي يحدث نتيجة حلمهة (hydrolysis) (التحلل بالماء) لسلسلة البوليمر [5]. وبالتالي ، وللتحكم في تسارع التحلل الحمضي ؛ قام الباحثون في مجالات هندسة الأنسجة العضلية الهيكلية (musculoskeletal tissue engineering) بإدراج مادة حشو مثل ثلاثي فوسفات الكالسيوم tricalcium phosphate (TCP) - [11] أو الزجاج الحيوي (Bioglass) [12] أو الأملاح الأساسية [10] في مصفوفة البوليمر لإنتاج مادة مركبة مع الفكرة القائلة بأن منتجات الارتشاف (resorption) لتلك الإضافات سوف تدرئ أو تعزل منتجات الارتشاف الثانوية الحمضية لمصفوفة البوليمر الأصلية وبذلك تستعيد التوافقية الحيوية وتمنع الالتهاب [8].

### (٣،٢،٣) مطابقة معدلات تحلل حاملات الخلايا والأنسجة وإعادة نمو الأنسجة الجديدة Matching Rates of Degradation of Scaffold and Regrowth of New Tissue

إن هذا المعيار مهم للغاية لكنه صعب التنفيذ. فمن الضروري لحاملة الخلايا والأنسجة أن تنقل وبشكل تدريجي وظيفة نشر الحمل ودعمه إلى النسيج النامي حديثاً ، وخصوصاً في التطبيقات العضلية الهيكلية (musculoskeletal applications) حيث تتعرض حاملات الخلايا والأنسجة بشكل عام لحمولات أعلى مقارنة مع المناطق الأخرى. من الناحية المثالية ، فإن معدل الارتشاف الحيوي أو معدل التآكل الحيوي أو معدل تحلل حاملات الخلايا والأنسجة يجب أن يتطابق مع معدل إعادة نمو

الأنسجة الجديدة في موقع وضع حامله الخلايا والأنسجة وذلك لتوفير نقل سلس تقريباً للحمل من حامله الخلايا والأنسجة التي تتفكك إلى الأنسجة التي تتعزز وتتطور من دون حدوث تعارض مع سلامة الطعم المزروع. وهناك عيوب مرتبطة إما بالمعدل السريع للغاية لتحلل حامله الخلايا والأنسجة وإما بالمعدل البطيء جداً، نسبةً إلى معدل إعادة النمو للأنسجة الجديدة. فإذا كان معدل تفكك حامله الخلايا والأنسجة مرتفعاً، فإن الأنسجة المكونة حديثاً ستعرض فجأة لقوى أكبر من ما يمكن أن تتحملة لأنها سوف لن يكون لديها ما يكفي من الوقت للتكيف مع نشر القوى الجديدة ويمكن بالتالي أن تتأثر سلباً. ومن ناحية أخرى، إذا كان معدل تحلل حامله الخلايا والأنسجة بطيئاً للغاية، فيمكن أن يؤدي إلى تدريع الإجهاد (stress shielding) للأنسجة النامية وبالتالي حمايتها من القوى المقصود منها تقويتها أثناء تطويرها، وبالتالي فإن هذا يجعلها أكثر عرضة للإصابة بالضرر في وقت لاحق. وقد حدد Hutmacher [8] استراتيجيتين من أجل اختيار المواد البوليمرية لحاملة الخلايا والأنسجة في تطبيقات هندسة الأنسجة العظمية الهيكلية وذلك اعتماداً على الوقت الذي تحتاجه حامله الخلايا والأنسجة للقيام بدور نشر الحمل. في الحالة التي يكون مطلوباً فيها أن تلعب مادة حامله الخلايا والأنسجة الدور الرئيسي في الدعم إلى حين الوقت الذي يتم فيه إعادة تشكيل البنية بشكل كامل من قبل الأنسجة المضيفة، فإن تلك المادة تحتاج إلى أن تكون مصممة بطريقة تمكنها من الاحتفاظ بقوتها إلى حين ذلك الوقت الذي تستطيع فيه الأنسجة النامية أن تبدأ في القيام بدورها البيوي. ففي حالة العظم، فإن المطلوب من حامله الخلايا والأنسجة الإبقاء على خصائصها الميكانيكية لمدة 6 أشهر على الأقل، هذا يعني 24 أسبوعاً (3 أسابيع لبذر الخلايا و 3 أسابيع لنمو الأنسجة غير الناضجة في بيئة ديناميكية و 9 أسابيع لنمو الأنسجة الناضجة في مفاعل حيوي و 9 أسابيع في موضع الزرع) والتي تبدأ بعدها وبشكل تدريجي في فقد خصائصها الميكانيكية ويجب أن يتم استقلالها عن طريق الجسم من دون رد فعل للجسم الغريب بعد 12-18 شهراً. في الاستراتيجية الثانية، تلعب حامله الخلايا والأنسجة الدور الأساسي لتدعيم وبشكل ميكانيكي تكاثر وتمايز الخلايا فقط إلى أن يحين الوقت الذي يتم فيه وضع الأنسجة غير الناضجة في المفاعل الحيوي (bioreactor)، والذي يتم بعده تولي الوظيفة من خلال المصفوفة خارج الخلية (ECM) التي تفرزها الخلايا أثناء تحلل حامله الخلايا والأنسجة. وهكذا، فإن الاختيار الدقيق لمختلف المحددات أو البارامترات المرتبطة بحاملة الخلايا والأنسجة وبتركيبها، اعتماداً على حجم الخلل وموقعه التشريحي يعتبر حاسماً. وهذه تشمل الكراهية للماء (hydrophobicity) والتبلور (crystallinity) والمتانة الميكانيكية (mechanical strength) والوزن الجزيئي (molecular weight) ونوع التعطل، ... إلخ.

إن استخدام المواد المركبة هو الآن في تصاعد لمواكبة معدلات التحلل والطاقات الحركية للارتشاف (resorption kinetics) [8]. وقد استخدم Shikinami و Okuno [13] مركب من هيدروكسي آباتيت (hydroxyapatite - HA) غير مُتكلّس وغير مُتصلّب أو مُتلبّد مع بولي - إل - لاكتيد (poly-L-lactide - PLL) ليس فقط لكسب تحكم أفضل بالارتشاف ولكن أيضاً لتعزيز المتانة الميكانيكية. وقد تمكّن Roether [14] وآخرون من صنع رغوات (foams) من بولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (poly(DL-lactic acid) - PLLA) تم تغطيتها وتثريبها بواسطة الزجاج الحيوي كحاملة خلايا وأنسجة لهندسة الأنسجة العظمية. إن التغطية بطبقة من الزجاج الحيوي على الجدران المسامية قد أثمر على معدل ومدى تحلل البوليمر عن

طريق العمل كحاجز وقائي ضد الحَلْمَهَة (التحلل بالماء) [14,15]. يوفر التبادل السريع للبروتونات (protons) في الماء من أجل القلوية في الزجاج تأثير الدَّرء لدرجة الحموضة (pH) عند سطح البوليمر؛ وبالتالي يبطئ من معدل التحلل نتيجة للتغيرات الصغيرة في درجة الحموضة (pH) أثناء المحلل الزجاج النشط حيويًا (bioactive glass) [16]. ومع ذلك، فقد وجد Ang وآخرون [17] أنه عندما تم إدراج الهيدروكسي آباتيت (HA) كمادة حشو في مصفوفة من البولي كابرولاكتون (polycaprolactone - PCL) تحللت المصفوفات ذات التراكيز الأعلى للهيدروكسي آباتيت (HA) بشكلٍ أسرع بكثير من تلك المصفوفات ذات التركيز المنخفض على الرغم من أن خصائصها الميكانيكية وفعاليتها الحيوية قد تحسّنت مبدئيًا. ويمكن أن يُعزى هذا إلى الانشقاقات أو الانقسامات العشوائية للسلسلة الحَلْمَهِيَّة (hydrolytic chain) في المناطق غير المتبلورة (amorphous regions) لحاملة الخلايا والأنسجة من البولي كابرولاكتون (PCL) أو الزيادة في حب امتصاص الماء (hydrophilicity) المنقولة عن طريق إضافة الهيدروكسي آباتيت (HA) إلى حاملات الخلايا والأنسجة من البولي كابرولاكتون (PCL) والتي تم وضعها في وسط قاعدي بدرجة عالية من هيدروكسيد الصوديوم (5M NaOH) للتسريع الفعلي في معدل التحلل البطيء للبولي كابرولاكتون (PCL) [17]. حتى في الحالات التي يمكن التحكم بها، يمكن للتحلل الكيميائي والميكانيكي للبوليمر أن يتفاوت بشكلٍ كبير بين الأصناف أو الأنواع الرئيسية والأنواع الفردية والمواقع التشريحية مما يجعل بالتالي من الصعب للغاية تحديد معدل مثالي للتحلل [2]. إن معظم استراتيجيات التصميم تؤيد تمديد فترة التحلل على مدى أشهر لتقليل خطر الفشل المبكر في البنية بدلاً من خطر تأخر الارتشاف [2].

#### (٣،٢،٤) الخصائص الميكانيكية Mechanical Properties

يُشار عادةً إلى حاملة الخلايا والأنسجة المبذورة بالخلايا وعوامل النمو على أنها بناء أو بنية (construct). وينبغي أن تتطابق الخصائص الميكانيكية (المتانة (strength) ومُعامل المرونة أو الرجوعية (modulus) والصلابة (toughness) وقابلية السَّحْب أو الليونة (ductility)) للبنية مع تلك الخصائص التي في نسيج المضيف بقدر الإمكان في وقت الزراعة حتى لا يكون النِّشام الأنسجة مُتقوصًا من خلال الفشل الميكانيكي لحاملة الخلايا والأنسجة قبل أن يحدث التوليد الجديد للأنسجة [2,8]. وقد جمع Freeman وآخرون [18] بين تقنيات تعديل (braiding) (تضفير) وفتل (twisting) (التواء) ألياف البوليمر لتصنيع حاملة خلايا وأنسجة مجدولة - مفتولة من بولي (إل - حمض اللاكتيك) (poly(L-lactic acid) - PLLA)، وذلك من أجل إعادة بناء (reconstruction) الرِّبَاط التَّصَالِبِيّ الأمامي (anterior cruciate ligament). وقد أدت هذه الإضافة من التواء الألياف لحاملة الخلايا والأنسجة المجدولة إلى خصائص ميكانيكية أفضل بشكلٍ كبير (متانة شد قصوى (ultimate tensile strength) وأقصى توتر أو انفعال (ultimate strain) ومنطقة إصبع (toe region) أكبر) مقارنة مع حاملات الخلايا والأنسجة المصفورة فقط. وقد أيد Webster و Ahn [19] استخدام الهيدروكسي آباتيت ذي البنية النانوية (nanostructured HA) كأساس لهندسة الأنسجة العظمية، وحيث إنه بالإضافة إلى كونه أقوى ميكانيكيًا، فإن الركائز ذات الطور النانوي (nanophase substrates) تعزز وظيفة الالتصاق والوظائف الأخرى للخلايا البَانيَّة للعظم (osteoblast) كما توفر أيضًا الاستقرار الكيميائي والبيئي. وقد أدرج Horch وآخرون [20] جسيمات الألوموكسين النانوية (alumoxane nanoparticles) الوظيفية في بولي (بروبيلين فومارات)

poly (propylene fumarate) - diacrylate / بولي (بروبيلين فومارات) - ثنائي الأكريليت (poly (propylene fumarate) - diacrylate) (PPF / PPF - DA) للحصول على مركب مع زيادة تصل إلى حد الثلاثة أضعاف في قيمة معامل الانحناء أو الشني (flexural modulus) مقارنة مع الراتنج البوليمري (polymer resin). وقد عزوا هذا التحسن الكبير في خصائص الانحناء إلى التشتت المتجانس (uniform dispersion) لجسيمات النانو ضمن البوليمر بالإضافة إلى التفاعلات التساهمية (covalent interactions) الأكبر بين السطح المحدد وظيفياً لمادة الحشو وسلاسل البوليمر. وبالتالي؛ يغير الباحثون الأساليب القائمة وذلك من أجل تحسين الخصائص المطلوبة عن طريق تعديل بعض جوانب تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة، سواء كان ذلك عن طريق الجمع بين التقنيات أو باستخدام مزيج من البوليمرات أو تقليل حجم المكونات.

إن التحكم بالخصائص الميكانيكية للبنية مع مرور الوقت هو مهمة صعبة للغاية. فحاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من المعدن والسيراميك لا تتحلل وستوفر خصائص ميكانيكية مثالية في ظل ظروف محددة، ولكن ذلك وبشكل عام سيتعارض مع إصلاح ووظيفة الأنسجة نتيجة لتدريج الإجهاد، والكسر أو التمزق المحتمل عند السطح البيني فيما بين الطعم - الأنسجة (tissue - implant interface)، وتضاؤل المساحة لاستيعاب نمو الأنسجة الجديدة بسبب الوجود الدائم للطعم المزروع [2]. وبشكل عام، تفتقر البوليمرات إلى الوظيفة الحيوية النشطة، أي القدرة على إنتاج رباط بيني (interfacial bond) قوي مع الأنسجة النامية، على سبيل المثال، مع النسيج العظمي (bone tissue) عبر تشكيل طبقة الآباتيت (apatite layer) الفعالة بيولوجياً [5,21]. إن هذه الطبيعة المرنة والضعيفة المقترنة بالبوليمرات تحد من قدرتها على تلبية المتطلبات الميكانيكية في الجراحة والبيئة الموضعية بعد ذلك، مما يدفع إلى استخدام المواد المركبة والتي تتكون من بوليمرات قابلة للتحلل وأنواع سيراميك نشطة حيوياً [5,21]. تُشكل مواد معينة من السيراميك مثل الهيدروكسي آباتيت (HA)، وثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCP)، والزجاج النشط حيوياً (Bioglass) روابط قوية مع النسيج العظمي من خلال النشاط الخلوي (cellular activity) في وجود السوائل الفيزيولوجية (physiological fluids) ويُشار إليها بالتالي على أنها "نشطة حيوياً" ("bioactive") [14,22].

ويتم استخدام تقنية أخرى لتحسين خصائص نشر الحمل (load - bearing) للبنية تنطوي على استخدام مفاعل حيوي وذلك للتكيف المسبق للطعم بشكل ميكانيكي وبالتالي تحضيره بشكل أفضل لنشر الأحمال التي سيتعرض لها بعد عملية الزرع، وبطريقة فعّالة. ويمكن تعريف المفاعل الحيوي كأبي جهاز يحاول محاكاة (تقليد) وإعادة إنتاج الشروط الفيزيولوجية للحفاظ على وتشجيع زرع الخلايا من أجل نمو الأنسجة [23]. وقد كتب Bilodeau و Mantovani [23] عرضاً ممتازاً للخصائص المختلفة للمفاعلات الحيوية المصممة لزراعة الغضاريف والعظم والأربطة والأنسجة القلبية والوعائية والصمامات القلبية والكبد. وقد ناقشوا كيف أن الإجهادات الميكانيكية (mechanical stresses) المتولدة ضمن المفاعلات الحيوية تؤثر على نوعية المصفوفة خارج الخلية (ECM) في حالة العظم والأربطة والغضاريف وكيف تتأثر جوانب أخرى مثل تكاثر وتمايز الخلايا أكثر في حالة الأنسجة الأخرى. وقد اختبر Androjna وآخرون [24] وبشكل ميكانيكي تأثير تكيف حاملات تحت مخاطية المعى الدقيق (small intestine submucosa - SIS) مع وبدون خلايا الوتر (tenocytes)، في المختبر

وضمن المفاعلات الحيوية، من أجل تعزيز إصلاح الوتر (tendon repair). وقد وجدوا أن الخصائص الميكانيكية الحيوية (على سبيل المثال الصلابة stiffness) لحاملات الخلايا والأنسجة المبدورة بالخلايا تزداد كنتيجة لتوتير الخلية (cell - tensioning) بسبب التحميل الدوري (cyclic loading) بالمقارنة مع حاملات الخلايا والأنسجة غير المبدورة بالخلايا والبني التي بدون أحمال أو البني ذات الأحمال الاستاتيكية الساكنة (static load constructs) (مع أو بدون خلايا). وربما تكون إعادة تنظيم المصفوفة قد أسهمت أيضاً في هذه الزيادة في الصلابة كما أن تطبيق الحمل الميكانيكي قد يكون ساهم في إعادة توجيه البنية الهندسية للكولاجين على طول محور الحمل المطبق. وقد قام Mahmoudifar و Doran [25] ببذر خلايا غضروفية على حاملات خلايا وأنسجة من بولي (حمض الغليكولايد) (poly(glycolic acid) - PGA)، والتي تمت زراعتها في مفاعلات حيوية ذات أعمدة إعادة الدوران (recirculation column bioreactors) لإنتاج بُنى غضروفية. إن تدفق الأوساط الغذائية من خلال البنية يُولد قوى قص والتي توفر محفزات ميكانيكية للخلايا؛ وبالتالي تُحسن من نوعية الغضروف المنتج [25,26]. وكذلك، فإن الضغط الهيدروستاتيكي (hydrostatic pressure) يُنتج قوى ضاغطة والتي تعود بالفائدة على تشكيل الغضروف [26]. وقد قام Jeong وآخرون [27] وبنجاح بتعريض حاملات الخلايا والأنسجة من بولي (لاكتيد - كو - كابرولاكتون)، (poly(lactide-co-caprolactone) - PLCL) [50] والمبدورة بخلايا عضلية ملساء إلى انفعال نابض (pulsatile strain) وإجهاد قص (shear stress) في مفاعل حيوي ذي حقن أو تدفق متواصل لتحفيز تطوير الأنسجة العضلية الوعائية الملساء والاحتفاظ بنمطها الظاهري المتميز. وتلعب الإشارات الميكانيكية دوراً حيوياً كذلك في هندسة البنى وذلك من أجل الأنسجة القلبية [28]. وقد عرض Akhyari وآخرون [29] مصفوفة من الجيلاتين (gelatin matrix) مبدورة بخلايا قلبية إلى نظام شد ميكانيكي دوروي (cyclical mechanical stretch)، والذي لم يُحسن فقط تكاثر وتوزيع الخلايا ولكنه زاد أيضاً من المتانة الميكانيكية للطعم وذلك بحسب الحجم. إن إعادة تشكيل الخلايا والأنسجة مهم من أجل تحقيق شروط ميكانيكية مستقرة في موقع زرع الطعم. وبالتالي، فإن هناك ضرورة لاستخدام البنية وذلك للحفاظ على سلامة بنوية كافية أثناء طور النمو وإعادة التشكيل في المختبر و / أو في الجسم الحي [8].

### (٣،٢،٥) خصائص السطح Surface Properties

إن معظم البوليمرات التقليدية لا تلبى على نحو كافٍ المتطلبات السطحية لحاملات الخلايا والأنسجة مما يستلزم تعديل سطح المادة الحيوية التي تعرض بالفعل خصائص كتلية جيدة وتحديد وظيفي حيوي جيد [30]. لقد طور Moroni وآخرون [31] نظاماً جديداً لإنشاء حاملات خلايا وأنسجة من أجل إصلاح الغضروف مع شبكة بوليمر ثنائية الطور (biphasic) مصنوعة من بولي [(أكسيد الإيثيلين) تيريفثالات - كو بولي (بوتيلين) تيريفثالات] (poly[(ethylene oxide) terephthalate] - PEOT / PBT copoly(butylene) terephthalate) وذلك للحصول على بنية هندسية لألياف ذات قشر - ولب (shell - core fiber)، حيث زود اللب بالخصائص الميكانيكية الأساسية والتنظيم لحاملة الخلايا والأنسجة في حين عمل القشر كطبقة غلاف خارجي لتعزيز خصائص السطح. وقد احتوى بوليمر القشر على وزن جزئي عالٍ لأجزاء من بولي (غليكول الإيثيلين) (poly(ethylene glycol) - PEG) التي تم استخدامها في البلمرة المشتركة (copolymerization) بالإضافة إلى نسبة

متوية من وزن أكبر لمجالات البوليمر (أكسيد الإيثيلين) تيريفثاللات (PEOT) بالنسبة إلى اللب [31]. وقد قام Liu وآخرون [32] بتصنيع حاملات خلايا وأنسجة من بولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA) ذات ألياف نانوية مُعدّلة السطح باستخدام كرات من الجيلاتين كمولد مسام (porogen). وقد التصقت جزيئات الجيلاتين بسطح حاملات الخلايا والأنسجة أثناء عملية التصنيع. لقد حسّن هذا التعديل السطحي وبشكل ملحوظ الالتصاق والتكاثر الأولي للخلايا البانية للعظم وكذلك فقد حفّز هذا التعديل على زيادة إفراز المصفوفة (matrix secretion). وقد اكتشف Li وآخرون [33] طريقة جديدة من أجل طلاء أو تغليف (coating) حاملات خلايا وأنسجة سميكة مصنوعة من بولي (حمض لاكتيك-كو-غليكوليك) (poly(lactic-co-glycolic acid) - PLGA) بطبقة غلاف خارجي من الآباتيت متجانسة نسبياً وحتى في العمق ضمن المناطق الداخلية؛ وذلك لتعزيز موصليتها العظمية (osteoconductivity). ففي البداية قاموا بتغليف طبقة من الآباتيت على سطح كرات البارافين (paraffin spheres) بالحجم المطلوب، والتي تم تشكيلها بعد ذلك في رغوة. وقد تمت صناعة محلول من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) / بيريدين (pyridine) لاختراق الأماكن البينية فيما بين الكرات. وقد تم استخدام السيكلوهيكسان (cyclohexane) لإذابة الكرات؛ مما أسفر عن حاملات خلايا وأنسجة من البوليمر (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) ذات مسامية عالية مع حجم مسام يمكن التحكم به وبترباط بنيّ ممتاز بوجود طبقة غلاف خارجي من الآباتيت المتجانسة على السطح المسامي. وقد قام Cai وآخرون [34] بتعديل سطح حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من بولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (PDLLA)، الذي تم تحضيره من خلال عملية الفصل الطوري المحرّض حرارياً (thermally induced phase separation - TIPS)، مع الباكالين (baicalin) باستخدام طريقة الانفخاخ الفيزيائي (physical entrapment)؛ وذلك من أجل زيادة إمكانية تشكيل العظم وزيادة التوافقية الحيوية والتي تم تقييمها هيسولوجياً (نسيجياً) باستخدام نموذج كُعبريّ معطوب (radialis defect model) لأرنب في الجسم الحي. إن الباكالين هو مركب فلافونويد (flavonoid compound)، وهو شكل مُنقى من نبات عشبي طبي صيني، وهو يمتلك خصائص مضادة للأكسدة (antioxidant) فضلاً عن الخصائص المضادة للالتهاب (anti-inflammatory).

تتحكم البيئة الكيميائية الموضعية في التفاعلات بين الخلايا وحاملات الخلايا والأنسجة التي تحدث عند السطح. وبشكل عام، يتم على الفور تغليف جميع المواد المزروعة بطبقة خارجية من البروتينات والدهون (الشحم)، والتي تعمل كوسيط في الاستجابة الخلوية لهذه المواد. وأخيراً، يأتي التفاعل بين سطح حاملات الخلايا والأنسجة والجزيئات الحيوية التي تُمتز عليه، وهذا ما يحدد التأثير النهائي [2]. وقد شكّل Koegler و Griffith [35] طرازاً للتركيب الكيميائي والبنية الهندسية لسطح حاملات الخلايا والأنسجة وذلك من أجل دراسة استجابة الخلايا؛ لأن ذلك من شأنه أن يُسهّل النمو أو التطوير المنظم للأنسجة الجديدة. وقد قاما بتقييم كيفية استجابة الخلايا الجُرذبة البانية للعظم (rat osteoblasts) إلى حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البوليمر (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) والمعدّلة بواسطة بولي (أكسيد الإيثيلين) (PEO)، ووجدوا بأن تراكيز البوليمر (أكسيد الإيثيلين) (PEO) الأعلى قد خفضت الالتصاق والتكاثر والانتشار والهجرة ولكنها عززت من نشاط إنزيم الفوسفاتاز القلويّ (alkaline phosphatase).

ويلعب تعديل السطح دوراً مهماً جداً في تقنيات هندسة الأنسجة التي تستخدم الأفلام أو الأغشية الرقيقة. وقد عرضَ Tiaw وآخرون [36] أفلاماً شديدة الرقة مصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) إلى الاقتطاع أو الانفصال بواسطة ليزر الفيمتو ثانية (femtosecond laser) وليزر الإكزامير (excimer laser) وذلك من أجل إنتاج ثقب مفتوحة النهاية (drilled - through holes) وثقوب مغلقة النهاية (blind holes)، على التوالي، وذلك لتعزيز النفاذية لتطبيقات مثل هندسة أنسجة البشرة (epidermal tissue engineering). إن المعالجة بالليزر قد جعلت الغشاء أكثر حياً للماء مما يمهد الطريق بالتالي لمزيد من الدراسة في مجال هندسة أنسجة الأغشية. وقد قام Nakayama وآخرون [37] بدراسة تأثير كثافة المسامات المايكروية لأفلام حاملات الخلايا والأنسجة المستخدمة في تطبيقات هندسة الأنسجة القلبية الوعائية. فقد قاموا بتشكيل طراز زخرفة مايكروية (micropattern) لأربع مناطق في فيلم من البولي يوريثين (polyurethane) مع كثافات مختلفة للمسامات واستخدموا هذا الفيلم لتغطية دعامة (stent) (واقية الطعم) تم زرعها في الشرايين في نموذج كلبى (canine model) على اعتبار أنه نموذج لنشوب أو نمو نسيج كامل الجدار (transmural tissue ingrowth) في الجسم الحي. وكان تشكيل الخثرة (thrombus formation) في حده الأقصى في المناطق غير المسامية وفي المناطق ذات الكثافة الأقل للمسامات المايكروية. وقد وجدوا أيضاً أن سماكة جدار باطنية الشريان الحديث (neointimal wall) تتناقص مع الزيادة في كثافة المسامات المايكروية.

### (٣،٢،٦) خصائص البنية الهندسية Architectural Properties

إن خصائص البنية الهندسية لحاملة الخلايا والأنسجة تحدد وبشكل أساسي النقل الذي يحدث في داخلها، والذي هو في الأصل وظيفة للانتشار. تتضمن مشاكل النقل توصيل الأكسجين وغيره من المواد الغذائية وإزالة الفضلات ونقل البروتينات وهجرة الخلايا والتي بدورها يتم التحكم فيها بواسطة مسامية ونفاذية حاملة الخلايا والأنسجة [38]. ويؤثر الحجم والشكل الهندسي (geometry) والتوجيه والترابط البيني (interconnectivity) والتفرع (branching) والتركيب الكيميائي السطحي (surface chemistry) للمسامات والقنوات تأثيراً مباشراً على مدى وطبيعة انتشار (diffusion) المواد الغذائية ونشوب أو نمو الأنسجة [39,40]. وبشكل عام، يُلاحظ وجود الأنسجة الحية في المناطق الخارجية من حاملات الخلايا والأنسجة في حين تفشل المناطق الداخلية في دعم الأنسجة الحية بسبب عدم وجود ما يكفي من الانتشار [41]. وهذا قد ينشأ نتيجة لحقيقة أن الخلايا داخل مسامات حاملة الخلايا والأنسجة تبدأ بالتكاثر وإفراز المصفوفة خارج الخلية (ECM)، فهي تبدأ في نفس الوقت في إغلاق المسامات؛ مما يقلل من التزويد بالمواد الغذائية إلى الداخل. وتتم الإشارة إلى تشكيل هذه الطبقة السطحية من الأنسجة مع المصفوفة الفراغية في الداخل بتأثير "أم أند أم" ("M & M effect")، في إشارة إلى علامة تجارية شائعة من الحلوى لها قشرة صلبة ولب ناعم [38].

### (٣،٢،٦،١) حجم وشكل المسام Pore Size and Shape

لا يمكن لحاملة الخلايا والأنسجة أن تكون صلبة تماماً حيث إن الخلايا تحتاج إلى أن تنمو في داخلها وهي تحتاج إلى أن يتم تزويدها بالمواد الغذائية. وبالتالي؛ فالحاجة لأن تملك حاملة الخلايا والأنسجة ثقوباً أو مسامات أو قنوات تبدو واضحة، ولكن

ما ليس واضحاً تماماً هو ما يجب أن يكون شكلها وأبعادها. ينبغي أن يكون حجم المسام على الأقل أضعافاً قليلة من حجم الخلايا التي سيتم بذرها عليها لتوفير مساحة كافية لدخول وخروج المواد الغذائية والفضلات، على التوالي. وكذلك فقد تحتاج الأوعية الدموية وعوامل النمو إلى الدخول إلى البنية أيضاً. ولا يوجد هناك مجال عام لحجم المسام أو القناة بحيث يناسب جميع أنواع نمو الأنسجة لأن الخلايا تُشكّل أنسجة مختلفة تكون لها أبعاد مختلفة. وقد أعدَّ Sosnowski وآخرون [42] حاملات خلايا وأنسجة من بولي إيل-لاكتيد (PLL) / بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) من جسيمات مايكروية (microparticles) مع توزيع حجم مسامي ثنائي النسق (bimodal). وقد شجّعت المسامات الماكروية في المجال من ٥٠ إلى ٤٠٠ مايكرومتر نمو وتكاثر الخلايا البانية للعظم ضمن حاملات الخلايا والأنسجة في حين أن المسامات المايكروية في المجال من ٢ نانومتر إلى ٥ مايكرومترات في جدران حاملات الخلايا والأنسجة قد سمحت بانتشار المواد الغذائية والمستقلبات (metabolites) بالإضافة إلى منتجات حلمة (تحلل) البوليستر (polyester hydrolysis). وقد استخدم Draghi وآخرون [43] ثلاثة أنواع مختلفة من مولدات المسام (كرات مايكروية من الجيلتين، وكرات مايكروية من البارافين، وبلورات من الملح) لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة من مواد قابلة للتحلل الحيوي يتم استخدامها بشكلٍ شائع وذلك عبر تقنية صبّ (قَوْلَبَة) المذيب (solvent casting) / انتفاذ أو استغسال (ترشيح) مولد المسام (porogen leaching) لمعرفة ما يسمح بتوفير أقصى قدر ممكن من التحكم بمورفولوجيا (morphology) (شكل) حاملات الخلايا والأنسجة. وعلى الرغم من أن جميع مولدات المسام قد ساهمت في إنتاج حاملات خلايا وأنسجة مسامية بشكلٍ عالٍ، إلا أن انتفاذ أو استغسال الكرات المايكروية قد أنتج مسامات كروية محددة بشكلٍ جيد وأسفر عن خصائص ميكانيكية أفضل ومقاومة أقل للتدفق.

لقد قام الباحثون بتصنيع حاملات خلايا وأنسجة مع أحجام مختلفة للمسامات أو حتى مع مجال من أحجام المسامات ضمن نفس حاملات الخلايا والأنسجة لمعرفة تأثيرها على نمو الخلايا والمحاكاة أنواع معينة من الأنسجة. وقد صنع Oh وآخرون [44] حاملات خلايا وأنسجة أسطوانية من البولي كابرولاكتون (PCL) مع زيادة تدريجية بأحجام المسامات على طول محور طولي باستخدام طريقة جديدة للتنبيد (centrifugation) (الطرد المركزي) لتقييم تأثير حجم المسام على تفاعل حاملات الخلايا والأنسجة - الخلايا. وقد ازدادت أحجام المسامات داخل حاملات الخلايا والأنسجة بشكلٍ تدريجي من ٨٨ إلى ٤٠٥ مايكرومتر والمسامية من ٨٠٪ إلى ٩٤٪ وذلك بسبب الزيادة التدريجية بقوة الطرد المركزي على طول المحور الأسطواني. وقد جرى تقييم تفاعل الخلايا الغضروفية والخلايا البانية للعظم وخلايا الأرومة الليفية (الخلايا الليفية) في المختبر مع حاملات الخلايا والأنسجة تلك المصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) وفي الجسم الحي باستخدام عيوب قبيّة (calvarial defects) في نموذج أرنب. وقد أظهر الجزء من حاملات الخلايا والأنسجة الموجود فيه أحجام مسامات في المجال من ٣٨٠ إلى ٤٠٥ مايكرومتر نمواً أفضل للخلايا الغضروفية والخلايا البانية للعظم في حين أن المجال من ١٨٦ إلى ٢٠٠ مايكرومتر كان أكثر ملاءمة لنمو خلايا الأرومة الليفية. وعلاوة على ذلك، فقد بدأ الجزء من حاملات الخلايا والأنسجة مع حجم مسام في المجال من ٢٩٠ إلى ٣١٠ مايكرومتر أنه الأنسب لتشكيل عظم جديد. وهذا يشير إلى وجود مجالات من المسامات تكون مثالية من أجل نمو بعض أنواع الخلايا، وأن هذا المجال يمكن أن يتغير في حين تتمايز الخلايا لتشكّل الأنسجة.

وقد قام Woodfield وآخرون [45] باختبار قدرة البنى الهندسية للمسامات المتباينة الخصائص (anisotropic) للتحكم بالتنظيم المناطقيّ (zonal organization) للخلايا الغضروفية ومكونات المصفوفة خارج الخلية (ECM) في حاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من بولي (غليكول الإثيلين)-تيريفثالات / بولي (بوتيلين تيريفثالات) (PEGT / PBT). وقد استخدم الباحثون تقنية ترسيب الألياف ثلاثية الأبعاد لإنتاج حاملات خلايا وأنسجة إما مع مسامات متباعدة بشكل متجانس (تباعد الألياف بمقدار ١ ميليمتر وحجم المسام بقطر ٦٨٠ مايكرومتر) وإما مع تدرجات في حجم المسام (تباعد الألياف بمقدار من ٠.٥ إلى ٢ ميليمتر وحجم المسام بقطر من ٢٠٠ إلى ١٦٥٠ مايكرومتر)، ولكنها تملك مسامية إجمالية متماثلة لحوالي ٨٠٪. وقد وجدوا أن التدرج يشجع على التوزيع المتباين الخصائص للخلايا والمماثل لذلك الموجود في المناطق العليا والوسطى والدنيا لغضروف مفصلي (articular cartilage) بقري غير ناضج، بغض النظر عما إذا كانت طريقة بذر الخلايا ساكنة أو ديناميكية. وبالإضافة إلى ذلك، فقد اكتشفوا وجود علاقة مباشرة بين المسامية المناطقيّة وكل من محتوى الحمض النووي (DNA) والغليكوز أمينوغليكان (glycosaminoglycan - GAG). وكذلك، فقد أنتج Harley وآخرون [46] حاملات خلايا وأنسجة أسطوانية مع بنية مسامية متراصة (aligned pore structure) بشكل شعاعي (نصف قطري) لها متوسط حجم مسام أصغر ومسامية أقل باتجاه الخارج. إن زيادة زمن الغزل (spinning time) و/ أو السرعة تتسبب في تشكيل أنبوب مُجوّف بقطر داخلي كبير وتدرج في المسامية على طول نصف القطر نظراً لزيادة الترسيب. وبالتالي؛ فإن الاتجاه الهام الأساسي هو الحاجة إلى أن تكون هناك حاملات خلايا وأنسجة ذات مسامية ملائمة.

#### (٣,٢,٦,٢) المسامية Porosity

المسامية هي مقدار سعة الفراغ داخل بنية حاملة الخلايا والأنسجة. وقد كرر العديد من الدراسات أن هناك حاجة لأن تمتلك حاملات الخلايا والأنسجة مسامية عالية ونسبة مرتفعة لمساحة السطح إلى الكتلة من أجل تعزيز توزيع متجانس للخلايا ونشوب أو نمو أنسجة متجانس [47] وبالإضافة إلى ذلك أن تكون لديها شبكة مسامية مفتوحة من أجل الحصول على انتشار مثالي للمواد الغذائية والفضلات [48]. وقد أشارت دراسة أخرى بأن حاملة الخلايا والأنسجة يجب أن تمتلك بشكل مثالي مسامية من ٩٠٪ للسماح للانتشار الكافي أثناء زراعة الأنسجة وتوفير مساحة كافية من أجل تفاعلات البوليمر- الخلايا [49]. ومع ذلك، فقد اقترح Goldstein وآخرون [50] بأن يتم تحضير حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من حمض بولي لاكتيك - بولي غليكوليك (polylactic - polyglycolic (PLG) acid) مع مسامية لا تتجاوز ٨٠٪ من أجل الزراعة في مناطق العيوب العظمية وخلاف ذلك قد يتعارض مع سلامة حاملة الخلايا والأنسجة. وهكذا، ففي حالة حاملات الخلايا والأنسجة البوليمرية قد يكون هناك تعارض بين تحسين المسامية وزيادة الخصائص الميكانيكية إلى الحد الأقصى. بالإضافة إلى ذلك، فقد وجد Agrawal وآخرون [51] بأن مسامية ونفاذية أولية أقل تؤدي إلى معدل أسرع للتحلل وذلك من أجل حاملات خلايا وأنسجة من البولي لاكتيك - بولي غليكوليك (PLG) وخصائص ميكانيكية أقل أثناء الأسابيع الأولى. وقد قام Wu و Ding [52] باختبار تأثيرات المسامية (من ٨٠٪ إلى ٩٥٪) وحجم المسام (من ٥٠ إلى ٤٥٠ مايكرومتر) على تحلل حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من ٨٥ / ١٥ بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك)

(PLGA)، والذي تم القيام به في محلول ملحي مَدْرُوء بالفوسفات (phosphate - buffered saline - PBS) عند درجة حرارة ٣٧ مئوية لمدة تصل إلى ٢٦ أسبوعاً. إن حاملات الخلايا والأنسجة التي تملك مسامية أعلى أو حجم مسامات أصغر قد تحللت ببطء أكثر من تلك التي بمسامية أقل أو حجم مسامات أكبر حيث أن هذه الأخيرة كان لها جدران مسام أكثر سماكةً ومساحات سطحية أصغر، الأمر الذي حال دون انتشار منتجات التحلل الحمضية مما ينتج عنه زيادة في الحُلْمَهَة (التحلل بالماء) المحفزة بواسطة الحمض.

وهكذا، وفي ضوء هذه العوامل المتناقضة، فإن هناك حاجة لتحسين حاملات الخلايا والأنسجة من أجل تجديد العظم بناءً على متطلباتها الميكانيكية المحددة والمتوازنة مع خصائصها المرغوبة الصالحة للحياة والانتشار. ويمكن تحقيق ذلك عن طريق تحسين المسامية فيما يتعلق بتوافر المواد الغذائية واستخدامها مع المواد الحيوية التي يمكن أن توفر خصائص ميكانيكية كافية. وقد طور Lin وآخرون [53] استراتيجية عامة لتحسين تصميم البنية الهندسية الداخلية ثلاثية الأبعاد لحاملة الخلايا والأنسجة لتكون لها الخصائص الميكانيكية والمسامية المطلوبة في نفس الوقت، وذلك من خلال استخدام خوارزمية تحسين الطوبولوجيا المبنية على التجانس (homogenization - based topology optimization algorithm) من أجل هندسة الأنسجة العظمية. وقد أظهر Howk و Chu [54] بأنه كان من الممكن زيادة المسامية والمتانة لحاملة الخلايا والأنسجة المستخدمة لهندسة الأنسجة العظمية من خلال تكرارات بسيطة في تصميم البنية الهندسية باستخدام برامج التصميم بمساعدة الكمبيوتر (computer - aided design - CAD) وتحليل العناصر المحددة. وقد كان الهدف من تحسينها هو الحفاظ على قوة التصميم ثابتة وفي الوقت نفسه زيادة المسامية. وقد اختار Xie وآخرون [55] حاملات خلايا وأنسجة نشطة ميكانيكياً (mechano - active scaffolds) والتي تستجيب لضغط الإجهاد المطبَّق من دون أن يحدث تشوه (deformation) دائم من أجل هندسة غضروف مفصلي من وجهة نظر ميكانيكية حيوية وبعد ذلك قاموا بتحديد المسامية الأفضل. فقد استخدموا إسفنجة البولي (إل-لاكتيد-كو-كابريولاكتون) (PLCL) (حجم المسام: من ٣٠٠ إلى ٥٠٠ مايكرومتر، والمسامية: من ٧١٪ إلى ٨٦٪) كحاملات خلايا وأنسجة نشطة ميكانيكياً وحددوا بأنه كلما انخفضت مساميتها، اقتربت خصائصها الميكانيكية نحو تلك التي للغضروف الأصلي. وبالتالي؛ فقد وُجد بأن حاملة الخلايا والأنسجة ذات المسامية من ٧١٪ هي الأنسب من أجل توليد الغضروف. وقد غير Moroni وآخرون [56] في حجم وشكل المسام عن طريق تغيير قطر الألياف والمسافات بينها بالإضافة إلى توجيه الألياف وسماكة الطبقة باستخدام طريقة ترسيب الألياف ثلاثية الأبعاد وذلك لدراسة تأثيرها على الخصائص الميكانيكية الديناميكية. وقد لاحظوا انخفاضاً في خصائص المرونة (elastic properties) مثل الصلابة الديناميكية (dynamic stiffness) ومعامل التوازن (equilibrium modulus) فضلاً عن الزيادة بمحددات أو بارامترات اللزوجة (viscous parameters) مثل عامل التخميد (damping factor) وانفعال تغيير الشكل غير المسترد (creep unrecovered strain) عندما زادت المسامية.

**٣,٢,٦,٣) الربط البيئي للمسام Pore Interconnectivity**

إنه ليس من الكافي لحاملة الخلايا والأنسجة أن تكون مسامية، ولكن المسامات في حاملة الخلايا والأنسجة تحتاج إلى أن تكون مترابطة فيما بينها وذلك من أجل توصيل فعال للمواد الغذائية إلى المناطق الداخلية وإزالة الفضلات إلى خارج حاملة الخلايا والأنسجة. وللربط البيئي للمسام أيضاً تأثيرات بقدر تلك المترابطة بنقل البروتينات وهجرة الخلايا ونشوب أو نمو الأنسجة.

وقد وجد Griffon وآخرون [57] أن تكاثر الخلايا الغضروفية والنشاط الاستقلابي (metabolic activity) يتحسن مع زيادة حجم المسام المترابطة فيما بينها لإسفنح من الشيتوزان (chitosan sponges). وقد أنتج Lee وآخرون [58] حاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) مع بنية هندسية للمسام يمكن التحكم بها وذلك من أجل دراسة تأثيرات الحجم والربط البيئي للمسام على نمو العظم. فقد قاموا بصناعة حاملات خلايا وأنسجة مع ثلاثة أحجام للمسام (٣٠٠ و ٦٠٠ و ٩٠٠ مايكرومتر) ومغلقة المسام بشكل عشوائي بنسبة ٠٪ أو ١٠٪ أو ٢٠٪ أو ٣٠٪. لقد انخفضت المسامية والنفاذية عندما ازداد عدد المسامات المغلقة، وبشكل خاص عندما كان حجم المسام ٣٠٠ مايكرومتر؛ وذلك نتيجة لانخفاض المسامية وانسداد المسام. وقد قام Sth وآخرون [59] بمقارنة تكاثر الخلايا الغضروفية على حاملات خلايا وأنسجة من بولي لاكتيك - بولي غليكوليك (PLG) بمسامية متساوية (٩٥٪) تم إعدادها بتقنية صب المذيب وانتفاذ أو استغسال (ترشيح) الجسيمات (SCPL) باستخدام اثنين من مولدات المسام المختلفة: الملح والجيلاتين. فحاملات الخلايا والأنسجة التي تم إنتاجها باستخدام الجيلاتين أظهرت التصاق وتكاثر خلايا أفضل ويعزى هذا إلى الربط البيئي الأفضل للمسام عند نفس المسامية. وقد اقترح Hou وآخرون [60] أن استخراج جسيمات الملح في عملية انتفاذ أو استغسال الملح يعني أن المسامات الناتجة عن ذلك كانت مترابطة فيما بينها. ومع ذلك، فإن الإزالة الكاملة للملح لا يعني بالضرورة ضمان وجود بنية نفوذة كما قد تكون هناك فراغات ذات طريق مسدود غير نافذة مع فتحة واحدة فقط؛ وبالتالي لا يسمح ذلك بالربط البيئي من النهاية إلى النهاية لكامل البنية [38].

تم تعديل التقنيات التقليدية لتصنيع حاملات الخلايا والأنسجة لزيادة الربط البيئي المسامي. فقد أضفى Murphy وآخرون [61] تحسناً على الربط البيئي المسامي لحاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) عن طريق صهر أو إذابة الملح بشكل جزئي قبل إنشاء مصفوفة البوليمر إما عبر عملية صب المذيب / انتفاذ أو استغسال (ترشيح) الملح وإما عبر عملية الرغوة الغازية (gas foaming) / استغسال الملح. وقد صنع Gross و Rodriguez - Lorenzo [62] جسيمات كروية من الملح في اللهب وتم تليدها أو توصيلها لإنتاج قالب ملح مترابط بيئياً، والذي كان مملوءاً بمسحوق فلور أباتيت المكرن (carbonated fluorapatite powder) وبوليمر البولي لاكتيك (polylactic polymer) لتشكيل حاملة خلايا وأنسجة مركبة. وقد كان من الممكن الحصول على حجم مسام أكبر مع استخدام جسيمات ملح كروية كبيرة وقد أمكن استخدام هذه التقنية بنجاح لإنتاج حاملات خلايا وأنسجة مع ربط بيئي جيد وأحجام مسام متدرجة. وقد قام Hou وآخرون [63] بصناعة حاملات خلايا وأنسجة ذات مسامية عالية (من ٩٣٪ إلى ٩٨٪) وترابط بيئي

عالٍ عن طريق تجفيف محاليل البوليمرات بالتجميد في وجود قالب قابل للإنفاذ أو الترشيح متبوعاً بانتفاذ أو استئصال القالب نفسه. وقد تم صهر جسيمات السكر أو الملح لتشكيل قالب مترابط بشكل جيد، وفجوات هذا القالب مملوءة بمحلول بوليمر في مذيب، وقد تلى ذلك تجفيف المذيب بالتجميد واستئصال القالب لاحقاً. وقد أدى ذلك إلى ظهور مسامات بأحجام كبيرة نسبياً مترابطة بينياً مبنية على أساس القالب ومسامات بحجم أصغر ناتجة من عملية التجفيف بالتجميد (freeze - drying process).

وقد استخدم Darling و Sun و Wang [64] وآخرون [65] التصوير المقطعي المحوسب المايكروبي (microCT) وذلك لتحديد الكمّي للربط البيئي للمسام ضمن حاملات الخلايا والأنسجة التي قاموا بتحضيرها من البولي كابرولاكتون (PCL) من أجل هندسة الأنسجة العظمية وتم تصنيعها عن طريق استخدام نوع من تقنية تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) يُدعى الترسيب بالقذف الدقيق (precision extrusion deposition). فقد أجزوا ربطاً بينياً للمسام أكبر من 98٪ في حاملات الخلايا والأنسجة التي صنعوها. وقد استخدم Moore وآخرون [66] أيضاً التصوير المقطعي المحوسب المايكروبي (microCT) متبوعاً بخوارزمية (algorithm) مخصصة لتحديد الكمّي للربط البيئي للمسام بشكل غير تحريبي. قام البرنامج بحساب المساميات التي يمكن الحصول عليها على طول مجال أحجام ارتباط في الحد الأدنى. لقد تغيرت المسامية التي يمكن الوصول إليها مع اختلاف حجم الارتباط كوظيفة لمحتوى مولد المسام. وعلى أي حال، لا يزال التصوير المقطعي المحوسب المايكروبي (microCT) غير متوفر على نطاق واسع وقد ارتجل الباحثون، مثل Li وآخرون [67] الذين أدركوا إدراكاً كاملاً مدى الصعوبة في الحصول على معلومات ثلاثية الأبعاد حول الربط البيئي للمسام من خلال صور ثنائية الأبعاد وابتكروا تجربة فريدة وبسيطة إلى حد ما للتحقق من ذلك. فلقد قاموا بنقع هيدروكسي آباتيت (HA) مسامي في صباغ تَبَعَثِرِيّ (pigment dispersion) أسود وقاموا بتثقيله بطريقة الطرد المركزي. وبعد إزالة الأصباغ، قاموا بتقطيع وتجفيف وتصوير العينة ووجدوا أن المسامات الملونة باللون الأسود يمكن الوصول إليها إما مباشرةً أو عبر المسامات المجاورة.

#### (٣،٢،٦،٤) النفاذية Permeability

النفاذية هي قياس لمدى السهولة التي معها يمكن أن يتدفق سائل من خلال بنية ما. وبشكل عام، تؤدي الزيادة في المسامية إلى الزيادة في النفاذية، ولكن من أجل حدوث هذا تحتاج المسامات إلى أن تكون مترابطة فيما بينها للغاية [38]. وقد أظهر أحد المؤلفين (Agrawal) في وقت سابق بأن حاملات الخلايا والأنسجة يمكن أن تكون لها نفاذيات مختلفة بينما تحافظ على مسامية متشابهة [51,68]؛ لذا ينبغي أن تُعالج النفاذية كبارامتر أو مُحدّد تصميم مستقل لحاملة الخلايا والأنسجة. ويمكن للنفاذية العالية أن تؤدي إلى انتشار أعلى داخل حاملة الخلايا والأنسجة، والذي من شأنه أن يُسهّل تدفق المواد الغذائية والتخلص من منتجات التحلل والفضلات الاستقلابية [38]. وتتأثر النفاذية أيضاً بتفاعلات المادة - السائل (fluid - material interactions)؛ وبالتالي فإنها تُؤثر على الاستجابة للزوجة لحاملة الخلايا والأنسجة. وهذا بدوره، يُؤثر على حركة ضخ السوائل لحاملة الخلايا والأنسجة وهو ما يُعدّ أمراً مهماً أثناء تصميم حاملات الخلايا والأنسجة وذلك من أجل إصلاح الغضروف المفصلي، بينما يمكن أن يتأثر التَحَاسّ (التحسس) الميكانيكي (mechanotransduction) وموت الخلايا المبرمج (cell apoptosis) عن طريق الضغط الهيدروستاتيكي للخلية والقص المحرّض أو الناتج عن التدفق (flow - induced shear) [69].

وترتبط مسامية ونفاذية حامله الخلايا والأنسجة بشكل واضح بالخصائص الفيزيائية والميكانيكية التي تمتلكها حامله الخلايا والأنسجة. فعلى سبيل المثال، يمكن الحصول على خصائص ميكانيكية أفضل لحاملة خلايا وأنسجة إذا تم جعلها أكثر صلابة وأقل مسامية. وما هو أقل وضوحاً هو حقيقة أن المسامية والنفاذية يمكن أيضاً أن يكون لها تأثير كبير على السلوك الكيميائي لحاملة الخلايا والأنسجة، وبشكل خاص على خصائص تحللها [38]. على سبيل المثال، وكما تم ذكره من قبل، فقد تبين أن حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي لاكتيك - بولي غليكوليك (PLG) ذات المسامية والنفاذية المنخفضة تتحلل بشكل أسرع [51,70]. وكذلك، فإن حاملات الخلايا والأنسجة تلك تُظهر انخفاضاً أقل في كتلتها، ووزنها الجزيئي، وخصائصها الميكانيكية تحت شروط التدفق الديناميكي للسوائل بالمقارنة مع الشروط الاستاتيكية الساكنة [51]. وقد عُزيت هذه الظاهرة إلى تشييط أو كبح التحلل ذاتي التحفيز (autocatalytic degradation) الناتج عن الانتشار الأفضل أو تدفق السوائل القسري (forced fluid flow).

وقد اقترح Li وآخرون [71] استخدام نسبة النفاذية / المسامية لوصف إمكانية الحصول على الفراغات الداخلية في حاملات الخلايا والأنسجة ذات المسامية الماكروية (العيانية الكبيرة) (macroporous scaffolds) حيث وُجد أن المسامية وحجم المسام لن يكونا كافيين كمعايير للوصف. إن النسبة المذكورة أعلاه هي مؤشر لمدى الكفاءة الترشيحية أو الترحيلية (percolative efficiency) (فصل الأجزاء المذابة من محلول) بوحدة الحجم المسامي لحاملة الخلايا والأنسجة، حيث يمكن وصف النفاذية على أنها الموصلية (conductance) (الناقلية) التي يتم تسويتها أو جعلها طبيعية عن طريق حجم العينة ولزوجة السائل (fluid viscosity). ويمكن للربط البيئي الجيد للمسام أن يؤدي إلى ترابط إيجابي بين المسامية والنفاذية. ويمكن للنفاذية أن تمثل توليفة أو مجموعة من خمسة بارامترات أو محددات مهمة لحاملة الخلايا والأنسجة وهي: المسامية وحجم المسام وتوزيعها والربط البيئي وحجم النوفذة (fenestration size) (الفتحات أو النوافذ) وتوزيعها وتوجيه المسام.

لقد أراد Wang وآخرون [72] تحسين مورفولوجيا (شكل) حامله الخلايا والأنسجة من أجل هندسة الأنسجة الضامة (connective tissue engineering) وذلك للتغلب على مشكلة ارتفاع تشكيل الأنسجة على نحو غير متناسب عند سطوح حاملات الخلايا والأنسجة والتي نمت في مفاعلات حيوية وذلك بالنسبة لداخل هذه الحاملات. ولذلك؛ فقد حددوا بارامترات أو محددات الشكل الهندسي لحاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من بولي (غليكول الإثيلين) - تيريفثالات / بولي (بوتيلين تيريفثالات) (PEGT / PBT) باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) والتصوير المقطعي المحوسب المايكروبي (microCT) وقياسات نفاذية التدفق وبعد ذلك بذروا خلايا الأرومة الليفية على هذه الحاملات تحت شروط تدفق ديناميكي لمدة أسبوعين. إن حاملات الخلايا والأنسجة ذات الربط البيئي المسامي المتوسط هي فقط التي دعمت التشكيل المتجانس للأنسجة في جميع أنحاء حامله الخلايا والأنسجة مع تعبئة جميع المسامات. وقد استخدم Hollister وآخرون [73] تصميمًا مُدمجاً مبنياً على الصور جنباً إلى جنب مع تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) لإنشاء حاملات خلايا وأنسجة بالمرونة والنفاذية المطلوبة من مجموعة متنوعة من المواد الحيوية بما في ذلك البوليمرات القابلة للتحلل والتيتانيوم (titanium) والسيراميك (ceramics) لتناسب أي خلل قحفيّ وجهيّ (craniofacial defect). فقد دعمت حاملات الخلايا والأنسجة

هذه وبشكل كبير نمو العظم في الفكوك السفلية (mandibles) لخنائير صغيرة وذلك من أجل مجال من أحجام المسام تتراوح من ٣٠٠ إلى ١٢٠٠ مايكرومتر. وقد استخدم Huang وآخرون [74] حاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من الشيتوزان ومن البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) ذات قنوات موجهة بشكلٍ طوليٍ تنتشر من خلالها لتعمل كأدلة لتوليد العصب (nerve generation). وقد وجدوا بأن الشيتوزان هو أفضل حامل خلايا وأنسجة لتوجيه العصب مقارنةً مع البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) وذلك بسبب نفاذيته العالية وبنيته المسامية ذات الخصائص المميزة.

بالإضافة إلى تجارب النفاذ أو الاختراق (permeation) المباشر المستخدمة على نحوٍ تقليدي والتي أُجريت من قبل Spain وآخرون [75] و Li وآخرون [71]، فقد بدأ الباحثون كذلك في استخدام التصوير بالرنين المغناطيسي (magnetic resonance imaging - MRI) وأيضاً التصوير المقطعيّ المحوسب المايكرومي (microCT) وذلك من أجل قياس النفاذية. وقد استخدم Neves وآخرون [76] التصوير بالرنين المغناطيسي (MRI) لتحديد نفاذية البنية لعامل تباين الرنين المغناطيسي (MR contrast agent) ذي الوزن الجزيئي المنخفض ولربط النتائج مع قياسات نمو وطاقات الخلايا. وقد استخدموا مفاعلات حيوية ذات حقن أو تدفق متواصل لبذر خلايا غضروفية ليفية هلالوية (meniscal fibrochondrocytes) ناضجة من الأغنام على نسيج من البولي إيثيلين تيريفثالات (polyethylene terphthalate - PET) لإنتاج بُنى غضروفية هلالوية اصطناعية حيوية. وقد استخدم Knackstedt وآخرون [77] التصوير المقطعيّ المحوسب المايكرومي (microCT) مع دقة تباين بقيمة ١٦.٨ مايكرومتر؛ وذلك من أجل قياس عدد من الخصائص البنيوية المميزة مثل نسبة حجم المسام إلى مساحة السطح وتوزيع حجم المسام والنفاذية والتعرج (tortuosity) والانتشارية (diffusivity) ومعامل المرونة (elastic modulus) لعينات طُوم عظمية مَرَجَانِيَّة (coral bone grafts).

### (٣،٢،٧) تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة Scaffold Fabrication

إن التوليد الناجح لأنسجة وظيفية بشكلٍ كاملٍ ينبغي أن يكون موجهاً ليس فقط في المستوى المايكرومي لتعريض الخلايا لبيئة تساعد على عملها على النحو الأمثل، ولكن أيضاً في المستوى المايكرومي للأنسجة وذلك من أجل امتلاك الخصائص الميكانيكية المناسبة وتسهيل نقل المواد الغذائية وتعزيز التنسيق بين العمليات الخلوية المتعددة [78].

### (٣،٢،٧،١) صب المذيب واستئصال الجسيمات Solvent Casting and Particulate Leaching

إن التقنية الأكثر شيوعاً المستخدمة لتصنيع حاملات الخلايا والأنسجة هي صب أو قَوْلْبَة المذيب المتبوعة بانتفاذ أو استئصال الجسيمات، حيث يتم التحكم في حجم مسام حاملات الخلايا والأنسجة الناتجة عن طريق حجم مولد المسام، ويتم التحكم في المسامية عن طريق نسبة مولد المسام / البوليمر. وتنطوي هذه الطريقة على خلط أو مزج مولد المسام القابل للذوبان في الماء في محلول بوليمر متبوع بصب المزيج في قالب بالشكل المرغوب. ويتم إزالة المذيب عن طريق التبخير أو التجفيف (تجفيف بالتجميد) (lyophilization) ويتم استئصال أو ترشيح مولد المسام للخارج عن طريق الغمر في ماء مُزال الأيونات (deionized water). وقد استخدم Widmer وآخرون [79] طريقة صب المذيب متبوعة بالثق (extrusion) (وهي عملية

تشكيل المادة بضغطها لتخرج من فتحة معينة متخذة الشكل المطلوب للمنتج)، وذلك لتشكيل بنية أنبوبية، ومن ثم قاموا باستئصال الملح لتوليد حاملات خلايا وأنسجة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) والبولي (حمض اللاكتيك) (poly(lactic acid) - PLA) مع حجم مسام من ٥ إلى ٣٠ مايكرومتراً ومسامية في المجال من ٦٠٪ إلى ٩٠٪. وعلى الرغم من أن الملح هو مولد المسام المستخدم بشكل أكثر شيوعاً، فإن السكر وكذلك كرات الجيلاتين [32,59] والبارافين [80] هي أيضاً مستخدمة وهي في بعض الأحيان معدلة لتعزيز التحديد الوظيفي (functionality) لحاملة الخلايا والأنسجة [33]. ففي الحالة التي يتم فيها استخدام كرات البارافين كمولد مسام، فإن المذيب المستخدم يكون عضوياً (مثل الهكسان hexane) [80] وليس الماء. إن هذه الطريقة هي الأكثر استخداماً وعلى نطاق واسع نظراً لبساطتها. ومع ذلك، يسمح التبخر الطبيعي لمولد المسام بالقليل من التحكم بالبنية الهندسية الداخلية لحاملة الخلايا والأنسجة والربط البيئي للمسام. وكذلك، فإن سماكة حاملة الخلايا والأنسجة التي يمكن أن تُصنع بواسطة هذه الطريقة يعوقها صعوبة إزالة مولد المسام من داخل أعماق حاملة الخلايا والأنسجة [81]. وقد أدى هذا إلى التعديل على تقنية صبّ المذيب واستئصال (ترشيح) الجسيمات (SCPL) لإنتاج قدر أكبر من الربط البيئي للمسام في بعض الحالات [61,68,80,82]، وأدى إلى تقنيات جديدة مثل النماذج الأولية السريعة (rapid prototyping - RP)، والمعروفة أيضاً بتصنيع الشكل الحر الصلب (SFF)، في حالات أخرى [40,83-85]. وقد قام Agrawal وآخرون [68] بتعديل هذه التقنية عن طريق هزّ القالب أثناء تذويب الملح، مما يمنع الجسيمات من الترسيب بسبب الجاذبية، وبالتالي فإن هذه الطريقة تعزز نفاذية حاملة الخلايا والأنسجة من خلال إنشاء ربط بيئي أفضل للمسام بل وأكثر من ذلك توزيعاً أفضل للمسام.

### (٣,٢,٧,٢) الرغوة الغازية Gas Foaming

يمكن استخدام هذه التقنية لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة ذات مسامية عالية في غياب المذيبات العضوية (organic solvents). ويعمل ثاني أكسيد الكربون (carbon dioxide - CO<sub>2</sub>) بشكل عام على اعتبار أنه "مولد المسام" في هذه الطريقة في شكله الغازي الطبيعي [86,87] أو دون الحرج (subcritical) [88] أو فوق الحرج (supercritical) [89,90]. فعندما يتم تعريض الأقرص البوليمرية الصلبة إلى ضغط مرتفع من غاز ثاني أكسيد الكربون (CO<sub>2</sub>) في درجة حرارة الغرفة تصبح مشبعة (saturated) بالغاز. وتنخفض قابلية ذوبان الغاز في البوليمر بشكل سريع عن طريق خفض الضغط إلى مستويات الضغط الجوي، مما يُنشئ بذلك عدم استقرار ترموديناميكي (thermodynamic) (ديناميكي حراري) لغاز ثاني أكسيد الكربون (CO<sub>2</sub>) المتحلل أو المذاب مما يؤدي إلى تنوُّي (nucleation) ونمو الفقاعات الغازية في داخل مصفوفة البوليمر. وباستخدام هذه الطريقة قام Mooney وآخرون [86] بإنشاء حاملات خلايا وأنسجة من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) مع حجم مسام من حوالي ١٠٠ مايكرومتراً ومسامية تصل إلى ٩٣٪. ومع ذلك، أدت هذه الطريقة إلى نشوء طبقة قشرية (skin layer) غير مسامية نسبياً نتيجة الانتشار السريع لغاز ثاني أكسيد الكربون (CO<sub>2</sub>) المذاب من السطح وبنية المسام المغلقة مع ربط بيئي مسامي محدود. وقد تم تحسين هذه العيوب عن طريق الجمع بين العملية المذكورة أعلاه مع استئصال أو ترشيح الجسيمات [87,91-93]. وقد قام Harris وآخرون [87] بإنجاز قوالب أنضغاطية (compression molded) لبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك)

(PLGA) وجسيمات الملح وبعد ذلك تم تعريضها لرغوة غازية كما هو موضح سابقاً. وقد انصهرت جسيمات البوليمر والملح لتشكل مصفوفة مستمرة مع جسيمات الملح والتي تم في وقت لاحق استئصالها أو ترشيحها إلى الخارج تاركة وراءها رغوة ذات مسامية ماكروية (عيانية كبيرة) مع ربط بيني جيد. وقد وجد Kim وآخرون [94] بأن حاملات الخلايا والأنسجة من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) / هيدروكسي آباتيت (PLGA / HA) والمصنوعة عن طريق الرغوة الغازية واستئصال أو ترشيح الجسيمات قد عززت من تجديد العظم وذلك مقارنةً مع حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة عن طريق تقنية صب المذيب واستئصال أو ترشيح الجسيمات (SCPL).

### (٣,٢,٧,٣) التجفيف بتجميد المُستحلب Emulsion Freeze Drying

تتطوي هذه العملية على إنشاء مستحلب (emulsion) عن طريق تجانس (homogenization) مزيج من محلول البوليمر والماء والذي يتم تبريده بسرعة ليبدو في بنية الحالة السائلة (liquid state) [81]. ومن ثم تتم إزالة المذيب والماء عن طريق التجفيف بالتجميد [81]. ومن سيئات هذه التقنية هي أنها تُنتج حاملات خلايا وأنسجة ذات بنية مسام مغلقة [95]. وقد قام Whang وآخرون [82] بدراسة تأثير متوسط حجم المسام وتحميل البروتين على الطاقات الحركية لإطلاق البروتين (protein release kinetics) من حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) والناشئة باستخدام طريقة التجفيف بتجميد المستحلب. وقد أشارت الصور الجانبية إلى انفجار أولي (initial burst) متبوع بإطلاق أبطأ مستمر. إن معامل تعرج (tortuosity coefficient) ومعامل تقسيم (partition coefficient) حاملة الخلايا والأنسجة لامتزاز أو امتصاص البروتين قد خُفّض وبشكل كبير من انتشارية البروتين. وقد تم إظهار فعالية البروتين المحرّر عن طريق التوصيل الناجح لـ (rhBMP-2) من حاملة الخلايا والأنسجة إلى موقع مُتَبَدِّ (ectopic site) (خارجي) في جُرْد [96]. وأجرى Moshfeghian وآخرون [97] تقييمًا لتشكيل حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) / الشيتوزان باستخدام معدل تجميد وتجميد (تجفيف بالتجميد) يمكن التحكم به. وقد تأثرت البنية الهندسية المايكروية لحاملة الخلايا والأنسجة بشكل كبير بالمذيب وبدرجة حرارة التجميد. وأسفر التحكم بتركيز الشيتوزان عن إنتاج حاملات خلايا وأنسجة مع مسامية تتجاوز ٩٠٪.

### (٣,٢,٧,٤) الفصل الطوري المُحرَّض حراريًا Thermally Induced Phase Separation

تشمل هذه العملية ذوبان البوليمر في مذيب عند درجة حرارة عالية متبوعًا بفصل طوري سائل - سائل أو صلب - سائل مُحرَّض عن طريق تخفيض درجة حرارة المحلول [81]. ويُسبب الاستخدام اللاحق للتصعيد (sublimation) (التبخُّر) إزالة للطور المصلَّب (solidified) الغني بالمذيب. وهذا يؤدي إلى صنع حاملة خلايا وأنسجة مسامية مع خصائص ميكانيكية جيدة [81]. وقد تم استخدام الفصل الطوري المُحرَّض حراريًا (TIPS) لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة تغطي مجالاً واسعاً من البوليمرات والمواد المركبة: من البولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA) والبولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (PDLA) والبولي (دي إل - حمض اللاكتيك غليكوليك) (PDLLGA) [98] والبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك)

(PLGA) النظامية [99] إلى البولي (إستر يوريثين) يوريا (poly(ester urethane) urea) / كولاجين [100] وفوسفات الكالسيوم غير المتبلور (calcium phosphate amorphous) / بولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA) [101] والبولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (PDLLA) / الزجاج الحيوي [102] الأكثر تطوراً على سبيل المثال لا الحصر. وقد قام Rowland وآخرون [103] بتصنيع حاملة خلايا وأنسجة مركبة من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) / بولي يوريثين (polyurethane - PU) باستخدام الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) مظهرين كيف يمكن لهذه العملية الجمع بين اثنين من البوليمرات المختلفة جداً، والتي يمكن معالجة شكلها عن طريق التحكم في سلوك الفصل الطوري لمحلول البوليمر الأولي المتجانس. وقد وجد Helen وآخرون [104] بأن مركب رغوات البولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (PDLLA) / الزجاج الحيوي والمحرّض بواسطة الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) لتوفير بيئة مايكروية مناسبة من أجل زراعة وتكاثر الخلايا الليفية الحلقية البقرية (bovine annulus fibrosus - BAF cells) بالإضافة إلى إنتاج الغليكوز أمينوغليكانات الكبريتية (sulphated glycosaminoglycans - sGAG)، والكولاجين من النمط الأول والكولاجين من النمط الثاني، يقدم دليلاً أولياً لمدى ملاءمتها من أجل معالجة الأقراص بين الفقرات (intervertebral disks) ذات المناطق الليفية الحلقية المتضررة. واستخدم Gong وآخرون [105] الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) لإنتاج حاملات خلايا وأنسجة من البولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA)، والتي كانت مليئة بالخلايا الغضروفية المحصورة أو المجمعة في هلام مائي من الأغار (agar hydrogel)، مما يؤدي بالتالي إلى طعم ذي خصائص ميكانيكية مناسبة وشكل عياني (كبير) (macroscopic shape) بينما يمتلك بنية داخلية تكون مماثلة للمصفوفة خارج الخلية (ECM) الأصلية. واستخدم Mo وآخرون [106] الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) لإنتاج طبقة غلاف مسامية من محلول البولي كابرولاكتون (PCL) على السطح الخارجي لأنبوب مضفور من ألياف البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) لإنتاج حاملة خلايا وأنسجة أنبوية مركبة من بولي كابرولاكتون / بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PCL / PLGA) من أجل هندسة أنسجة الأوعية الدموية صغيرة القطر. وقد تم استخدام طبقة الغلاف الخارجية المسامية من البولي كابرولاكتون (PCL) بقصد توفير سطح مناسب للالتصاق، وتكاثر الخلايا، وتجديد الأنسجة. وقد أجرى Cao وآخرون [107] مقارنة لخصائص تحلل حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) في المختبر وفي الجسم الحي والتي تم إنتاجها عن طريق الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) وصبّ المذيب واستغسال الجسيمات (SCPL). إن طريقة الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) قد أنتجت تغييرات أقل بكثير في البعد والكتلة والتصميم الهندسي الداخلي (internal architecture) والخصائص الميكانيكية مقارنة مع طريقة صبّ المذيب واستغسال الجسيمات (SCPL) لفترة 6 أسابيع. وأشارت مقارنة قياس الشكل إلى نشوب أو نمو أفضل قليلاً للأنسجة مترافقاً مع خسارة أكبر في بنية حاملة الخلايا والأنسجة في الحاملات المصنوعة بطريقة صبّ المذيب واستغسال الجسيمات (SCPL). وقد صنع Chun وآخرون [108] حاملات خلايا وأنسجة من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) باستخدام طريقة الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) من أجل التوصيل المتحكم به لبلازميدة الحمض النووي (plasmid DNA) على مدى فترة

٢١ يوماً، إن المحددات أو البارامترات المختلفة في صناعة الفصل الطوري المحرّض حرارياً (TIPS) والتي تؤثر بشكل مباشر على بنية المسام والربط البيئي للمسام، مثل تركيز البوليمر (polymer concentration) ونسبة المذيب / لغير المذيب (solvent / nonsolvent ratio) وطرق الإخماد (quenching methods) فضلاً عن زمن التلدين (annealing time)، قد تم أيضاً اختبارها لتحديد تأثيراتها على الإطلاق المستمر لبلازيمدة الحمض النووي.

### (٣،٢،٧،٥) الجاذبية وتلييد الكرات المايكروية Gravity and Microsphere Sintering

قام Qiu وآخرون [109] بتصليب أو تلييد كرات مايكروية مجوفة من السيراميك مُغلّفة بطبقة خارجية من الهيدروكسي آباتيت (HA) والتي تم تطويرها في أوعية ذات جدران دوّارة (rotating - wall vessels)، وذلك لإنشاء حوامل مايكروية (microcarriers) من أجل تشكيل أنسجة عظمية ثلاثية الأبعاد. وقد قام Borden وآخرون [110] بتكديس كرات مايكروية من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) بشكل عشوائي لتشكيل مصفوفة هلامية من الكرات المايكروية (gel microsphere matrix)، والتي كان لها معامل Young مرتفع ولكن مع نظام مسامي أقل مثالية لنمو العظم، ومصفوفة مُتلبّدة (متصلّبة) من الكرات المايكروية (sintered microsphere matrix)، والتي كانت لها خصائص ميكانيكية في المجال المتوسط لعظم إسفنجي (cancellous bone) مترافقة مع نظام مسامي مترابط بشكل جيد. وقد تم إنشاء المصفوفات المتلبّدة من الكرات المايكروية عن طريق الانصهار بشكل حراري (thermally fusing) لكرات البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) المايكروية في مصفوفة ثلاثية الأبعاد بدون أي استخدام للهيدروكسي آباتيت (HA). وقد واصلوا عملهم في دراسة الموصليّة العظمية والمظهر أو الشكل الجانبي لتحلل حاملات الخلايا والأنسجة تلك عن طريق تقييم كيف تتفاعل الخلايا العظمية والخلايا الليفية مع هذه الحاملات وإنجاز دراسات التحلل [111,112]. وواصلت المجموعة عملها في تقييم فعالية المصفوفات عن طريق استخدامها في خلل زندي (ulnar defect) بطول ١٥ ميليمترًا في الأرانب، ووجدوا أنها ساعدت كثيراً في تشكيل العظم عند السطح البيني الفاصل بين الطعم - والعظم (implant - bone interface) [113]. وصنع Jiang وآخرون [114] حاملات خلايا وأنسجة مركّبة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) / الشيتوزان بواسطة التلييد أو التصليب ووجدوا بأن الخلايا المشابهة للخلايا العظمية (osteoblast - like cells) تتكاثر أفضل على هذه الحاملات المركّبة بالمقارنة مع حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA). إن وجود الشيتوزان على سطوح الكرات المايكروية نظّم التعبير الجيني (gene expression) لإنزيم الفُسفاتاز القلوي (ALP) وبروتين الأوستيوبونتين (osteopontin) والبروتين اللُّعابي العظمي (bone sialoprotein) بالإضافة إلى ذلك فقد زاد من فعالية إنزيم الفُسفاتاز القلوي (ALP). وقد طوّر Kofron وآخرون [115] مصفوفات أنبوية مُتلبّدة من كرات مايكروية من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) / هيدروكسي آباتيت (PLGA / HA) باستخدام تبخر المذيب (solvent evaporation) من أجل تجديد العظم. لقد تم صنع المركّبات الأنبوية (tubular composites) لتحاكي عن كثب أكثر تجويف نُقي العظم (bone marrow cavity) وقد وُجد أن لها خصائص ميكانيكية مشابهة للمركّبات الأسطوانية (cylindrical composites) ذات نفس الأبعاد.

**النماذج الأولية السريعة/تصنيع الشكل الحر الصلب Rapid Prototyping/Solid Freeform Fabrication (٣,٢,٧,٦)**

تنطوي تقنيات النماذج الأولية السريعة (RP) على بناء أجسام ثلاثية الأبعاد باستخدام طرق تصنيع الطبقات وتقديم العديد من المزايا زيادةً على الطريقة التقليدية لاستئصال أو ترشيح مولد المسام، وبشكلٍ أساسي تقوم بالتحكم المستقل بالسماوات في المستوى المايكروني والماكروني بحيث تُمكن من تصنيع بُنى معقدة قابلة للتخصيص وفقاً لشكل الخلل أو الإصابة [78]. وقد استعرض Yang وآخرون [39] مزايا وقيود تقنيات النماذج الأولية السريعة (RP) المختلفة. وقام Leong وآخرون [116] بجدولة إيجابيات وسلبيات الطرق التقليدية وناقشوا القدرات والقيود المفروضة على تقنيات النماذج الأولية السريعة (RP) المهمة. وتشمل هذه العملية، بشكلٍ عام، تصميم نموذج لحاملة الخلايا والأنسجة باستخدام برامج التصميم بمساعدة الكمبيوتر (CAD)، وهو ما يُعبر عنه بعد ذلك على شكل سلسلة من المقاطع العرضية (cross sections) [117]. وفي مقابل كل مقطع، تقوم آلة صنع النماذج الأولية السريعة (RP) بوضع طبقة من المادة بدءاً من الأسفل وتتحرك بمقدار طبقة صعوداً في كل مرة لإنشاء حاملة الخلايا والأنسجة. وتلتصق كل طبقة جديدة بالطبقة التي تحتها، وبهذا فإنها توفر السلامة للمنتج النهائي. وقد قدّم كلٌّ من Agrawal و Ray [3] و Yang وآخرون [118] عروضاً شاملة تقوم بوزن إيجابيات وسلبيات المواد وطرق التصنيع التقليدية لحاملات الخلايا والأنسجة. إن الأنواع المختلفة للتقنيات المشمولة بتصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) تتضمن نمذجة أو تشكيل الترسيب المصهور (fused deposition modeling - FDM) والترسيب بالقذف الدقيق (precision extrusion deposition - PED) والتصليب أو التليد الانتقائي بواسطة الليزر (selective laser sintering - SLS) والحفر المُجسّم (ثلاثي الأبعاد) (stereolithography - STL) والطباعة ثلاثية الأبعاد (3D printing - 3DP) [40].

تستخدم نمذجة أو تشكيل الترسيب المصهور (FDM)، [4,85,119-121] فوهة متحركة (moving nozzle) تقذف ليفاً بوليمرياً في سطح مستوي أفقي وحالماً يتم الانتهاء من طبقة، يتم تخفيض السطح المستوي ويتم تكرار هذا الإجراء. ويعتبر الترسيب بالقذف الدقيق (PED) مشابهاً جداً لنمذجة أو تشكيل الترسيب المصهور (FDM)، باستثناء أن مادة حاملة الخلايا والأنسجة التي هي في شكل حبيبات أو كريات يتم قذفها بشكلٍ مباشر ويتم ترسيبها في شكل ألياف من دون الحاجة إلى وجوب تغيير هذه إلى خيوط طليعة (precursor filaments) كما هو الحال مع نمذجة أو تشكيل الترسيب المصهور (FDM) [65].

وتشبه المحقنة المايكروية التي تعمل بالضغط (pressure - assisted microsyringe - PAM) [78] نمذجة أو تشكيل الترسيب المصهور (FDM) ولكن لا تتطلب حرارة ولها دقة تباين أكبر إلا أنها لا تستطيع أن تُنشئ مسامات مايكروية باستخدام انقذ أو استئصال الجسيمات بسبب أبعاد المحقنة. وتنطوي هذه الطريقة على ترسيب محلول بوليمر في مذيب من خلال محقنة مزودة بإبرة شعرية (capillary needle) من الزجاج بقياس من ١٠ إلى ٢٠ مايكرومتراً. ويعمل المذيب كعامل ربط (binding agent) ويمكن تغيير كمية تدفق البوليمر الذي يتم ترسيبه عن طريق تغيير ضغط المحقنة ولزوجة المحلول وقطر رأس المحقنة بالإضافة إلى سرعة المحرك [122].

وينطوي التصليب أو التلييد الانتقائي بواسطة الليزر (SLS) على بناء الأجسام عن طريق تصليب أو تلييد مسحوق على سرير مسحوق (powder bed) باستخدام حزمة من أشعة الليزر تحت الحمراء (infrared laser). ويتفاعل شعاع الليزر مع المسحوق لزيادة درجة الحرارة الموضعية إلى درجة حرارة التحول الزجاجي (glass transition temperature) للمسحوق، مما يتسبب في صهر الجسيمات مع بعضها البعض فضلاً عن الطبقة في الأسفل [39]. تؤثر استطاعة الليزر (Laser power) وسرعة المسح الضوئي (scanning speed) بشكل كبير على التلييد [127]. وكذلك، يمكن أن يُنجز التحكم في المنتج النهائي من خلال تغيير محددات أو بارامترات المعالجة بالليزر، حيث إن هذه تتحكم بدورها في درجة انصهار الجسيمات والمسامية [127].

ويستخدم الحفر المحسّم (ثلاثي الأبعاد) (STL) [128-130] حزمة من أشعة الليزر فوق البنفسجية (ultraviolet - UV) لبلورة (polymerize) مونومر (مَوْحُود) سائل قابل للمعالجة الضوئية (liquid photocurable monomer) وبشكل انتقائي، كطبقة واحدة في وقت واحد [117]. وتقوم بيانات التصميم بمساعدة الكمبيوتر (CAD) بتوجيه حزمة من الأشعة فوق البنفسجية على سطح السائل، والذي يتم بعد ذلك تخفيضه إلى الأسفل لتمكين البوليمر الضوئي السائل (liquid photopolymer) من تغطية السطح. وقد قام Arcaute وآخرون [130] بتغليف خلايا الأرومة الليفية الجلدية البشرية (human dermal fibroblasts) في هلامات مائية نشطة حيويًا مصنوعة من بولي (غليكول الإثيلين) (PEG) والتي كانت متشابكة ضوئيًا باستخدام الحفر المحسّم (ثلاثي الأبعاد) (STL).

وتشمل الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) عملية الطباعة بتقنية نفث الحبر (ink - jet printing) لرابط (binder) على سطح يحوي مسحوقاً من السيراميك [131,132] أو من البوليمر [117,133,134] أو من مادة مركبة [135,136] كطبقة واحدة في وقت واحد. ويتم التحكم بحركة الرأس النفّاث، الذي يقوم بتوزيع الرابط، عن طريق البيانات المقطعية العرضية لنظام التصميم بمساعدة الكمبيوتر (CAD). وتلتصق جسيمات المسحوق المتجاورة مع بعضها البعض بمجرد أن يذوب الرابط [117]. ويتم أحياناً استخدام الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) غير المباشرة وذلك للتغلب على القليل من العقبات التي تواجه الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP). وقد استخدم Lee وآخرون [137] الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) غير المباشرة، حيث تمت في البداية طباعة القوالب ومن ثم تم صب المادة النهائية في تجويف القالب (mold cavity)، وذلك للتغلب على بعض القيود المفروضة على الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP). وتشمل هذه القيود المسامات الأكبر في الحجم، بسبب الحاجة إلى زيادة سماكة كل طبقة إضافية إلى المجال الحجمي لمولد المسام والتي يمكن أن تؤدي في نهاية الأمر إلى اتصال الطبقة تلو الطبقة (layer - to - layer connectivity) مما يترتب عليه عيوب في التصفيح (lamination) (الترقيق) [137]. وكذلك، فإن تعقيد الشكل عندما تتطلب مادة المسحوق مذبذباً عضوياً كرابط سائل والآلات المخصصة وبرامج التحكم الخاصة بها والخبرة الواسعة للمشغل تجعل الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) مفيدة ولكنها في بعض الأحيان تقنية يصعب استخدامها [137].

وقد جمع بعض الباحثين بين تقنيتي تصنيع أو أكثر وذلك لتحسين تصاميمهم الخاصة بحاملات الخلايا والأنسجة. فقد ربط Taboas وآخرون [40] تقنية تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) مع تقنيات تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة

الإسفنجية التقليدية (الفصل الطوري وانتشار المستحلب-المذيب وارتشاح أو انتفاذ مولد المسام) وذلك لتطوير طرق من أجل صب أو قولبة حاملات الخلايا والأنسجة ذات البنيات الهندسية المصممة، والتي يتم التحكم بها موضعياً وكذلك الحاملات ذات البنيات الهندسية الداخلية المسامية. وقد استخدم Dellinger وآخرون [138] تقنية تصنيع الشكل الحر الصلب المبنية على أساس الترسيب الروبوتي (robotic deposition) (باستخدام جهاز روبوت آلي) لمعاجين غروانية (colloidal pastes) وذلك لإنتاج حاملات خلايا وأنسجة من الهيدروكسي آباتيت (HA) مختلفة البنى الهندسية وذات مساميات تمتد إلى مستويات طولية متعددة. وقد تم الحصول على مسامات عيانية كبيرة (من ١٠٠ إلى ٦٠٠ مايكرومتر) عن طريق المبعادة بين قضبان الهيدروكسي آباتيت (HA rods) بشكل مناسب في حين تم إنتاج مسامات مايكروية دقيقة (أصغر من ٣٠ مايكرومتر) عن طريق تضمين مولدات المسام الكروية المايكروية المصنوعة من البوليمر في معجون الهيدروكسي آباتيت (HA paste) والتحكم بتصلب أو تليد حاملات الخلايا والأنسجة. وقد جمع Moroni وآخرون [31] بين الترسيب ثلاثي الأبعاد للألياف (3D fiber deposition) والفصل الطوري (phase separation) وذلك لإنشاء بنية هندسية لألياف ذات قشر - ولُب عن طريق التغليف أو التمحفظ للزج (viscous encapsulation)؛ مما يؤدي إلى إنتاج حاملات خلايا وأنسجة ذات شبكة بوليمرية ثنائية الطور (biphasic polymer network).

متأثراً بالبيولوجيا التطويرية، قام Varghese وآخرون [139] بالجمع بين إجراءات النماذج الأولية السريعة (RP) مع تغليف أو تمحفظ الخلايا وذلك لطباعة بُنى عملية قابلة للتطبيق ذات شكل حر باستخدام طابعات نافثة للحبر متخصصة أو مصممة حسب الطلب، على أمل أن توفر هذه الطريقة الإشارات (signals) والقواعد والإطار العام (البنية) المطلوبة من أجل التجميع الذاتي ذي الشكل الهرمي (hierarchical selfassembly). فلقد قاموا "بطبع" الخلايا البطانية الأبهريّة البقرية (bovine aortic endothelial cells) في أوساط زراعة الخلايا (والتي أطلقوا عليها مصطلح "الحبر الحيوي" "bioink") على إطار مطلي أو مُغطى بطبقة من الأجلينات (alginate-coated frame) والذي استخدموه كحاملة للخلايا والأنسجة، وذلك لتوليد أنبوب بطول قدره ٥٠ ميليمتراً وبقطر خارجي قدره ٤ ميليمترات. وقد قام Smith وآخرون [140] بعملية القذف المشترك للخلايا المعلقة في بوليمرات باستخدام أداة التجميع الحيوي ثلاثي الأبعاد (3D bioassembly) بالكتابة المباشرة وذلك لإنشاء بُنى هندسة أنسجة عملية قابلة للتطبيق ومُشكلة أو مزخرفة. وقد قدّم Mironov وآخرون [141,142] المفهوم المستقبلي لطباعة الأعضاء (organ printing)، وهي هندسة الأعضاء البشرية الحية ثلاثية الأبعاد المبنية على عملية النفت بمساعدة الكمبيوتر، وذلك للتغلب على عقبات توليد الأعضاء ذات الأوعية الدموية. حيث يقترحون استخدام طابعة خلايا قادرة على طباعة خلايا فردية، ومجموعات خلايا وهلامات مائية على "ورق طباعة" ("printing paper") يتألف من طبقات مرتبة بصورة متسلسلة من الهلام المائي القابل للانعكاس حرارياً (thermoreversible gel). وقد أعطى Sun وآخرون [143] لمحة واسعة عن تصميم حاملة الأنسجة بمساعدة الكمبيوتر، بما في ذلك النمذجة المحاكية حيويًا (biomimetic modeling) بالإضافة إلى الطباعة ثلاثية الأبعاد للخلايا والأعضاء.

إن الميزة الأساسية لتقنيات النماذج الأولية السريعة هي قدرتها على التحكم بشكلٍ دقيقٍ بالبنية المايكروية الدقيقة والبنية الماكروية العيانية لحاملات الخلايا والأنسجة وبالتالي إنتاج طوبوغرافيات (topographies) (سمات سطحية) معقدة من نموذج كمبيوتر؛ بينما سليلياتها الأساسية هي دقات التباين المنخفضة التي يمكن تحقيقها عن طريق الأنظمة الحالية وأنواع المواد البوليمرية التي يمكن استخدامها [39]. لم يناقش Sachlos و Czernuska [117] تقنيات تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة التقليدية وعيوبها فحسب بل قاما أيضاً بوصف العديد من تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) وكيف يمكنها التغلب على القيود الخاصة بتصميم حاملات الخلايا والأنسجة الحالية. وقد ناقش Tsang و Bhatia [78] العديد من تقنيات التصنيع وذلك عن طريق تقسيمها بناءً على نمط تجميعها، أي التصنيع بالحرارة وبالروابط بالضوء وبالقولبة، في حين وصف Hutmacher وآخرون [144] تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) وذلك عن طريق تقسيمها بناءً على تقنية معالجتها. وقد عرض Yeong وآخرون [145] وبشكلٍ جيدٍ العديد من تقنيات النماذج الأولية السريعة (RP) وكذلك فروعها الجزئية المنبثقة عنها وبالإضافة إلى ذلك فقد قاموا بمقارنة هذه الطرق وعرضوا نقاط ضعفها وقوتها.

### (٣,٢,٧,٧) الهلامات المائية Hydrogels

في كثيرٍ من الأحيان يتم تصميم حاملات الخلايا والأنسجة اللاخَلَوِيَّة (acellular scaffolds) لتوفير الخصائص الميكانيكية المطلوبة ولكن في نهاية المطاف من الصعب ملؤها بالخلايا بشكلٍ متماثل، ففي حين أن البنى التي تكون قادرة على أن تُنجز وينجح توزيعاً عالياً للخلايا بشكلٍ متجانسٍ بسبب مساميتها العالية تكون في نهاية الأمر ضعيفة ميكانيكياً [78]. وبالتالي؛ يحاول الباحثون وبشكلٍ متزايدٍ الجمع بين الاستقرار البنيوي مع كثافة خلايا عالية ومع الحفاظ على بيئة مثل بيئة الجسم الحي لإنجاز الأفضل لكلا العالمين عن طريق تصنيع هلامات مائية، والتي هي عبارة عن شبكات مترابطة (crosslinked networks) من البوليمرات المحبة للماء (hydrophilic polymers) والقادرة على امتصاص كميات كبيرة من السوائل. ويمكن أن تكون الهلامات المائية قابلة للتحلل أو غير قابلة للتحلل ويؤثر محتواها من المياه على قدرة الخلايا المغلفة (encapsulated cells) على البقاء على قيد الحياة؛ وبالتالي على معدل تطوير الأنسجة [146]. فهي تزداد في الانتشار بسبب محتواها العالي من المياه وخصائصها الميكانيكية التي تشابه الأنسجة الرخوة مثل الغضروف [147]. وتوفر حاملات الخلايا والأنسجة الصلبة ركيزة للخلايا كي تلتصق وتتشبث بها بينما تعمل حاملات الخلايا والأنسجة الهلامية والسائلة على حجز الخلايا بشكلٍ فيزيائي [148]. ويمكن تشكيل الهلامات المائية في الموضع ضمن موقع الخلل و يمكن تغليف الخلايا أثناء عملية تشكيل الهلام المائي. ويمكن التحكم في خصائصها الميكانيكية عن طريق تغيير تركيب المونومر المشترك (comonomer)، وتغيير كثافة تشابكها أو ترابطها المتشابك، وتعديل شروط بلمرتها (وقت التفاعل ودرجة الحرارة وكمية ونوع المذيب) [149].

إن البلمرة الضوئية (photopolymerization) هي تقنية يتم استخدامها عادةً من أجل صنع الهلامات المائية. ويمكن أن يتفاعل الضوء المرئي أو الضوء فوق البنفسجي مع مركبات معينة حساسة للضوء تسمى البادئات الضوئية (photoinitiators) لتشكيل هلامات مائية متشابكة الروابط (crosslinked) في المختبر أو في الجسم الحي أو في الموضع. وبالتالي، تقدم البلمرة

الضوئية العديد من المزايا زيادةً على طرق البلمرة التقليدية، وبالتحديد التحكم الحيزي أو المكاني (spatial control) فضلاً عن التحكم الزماني (temporal control) بالبلمرة ومعدلات المعالجة من أقل من ثانية إلى بضع دقائق في درجة حرارة الغرفة أو درجة الحرارة الفيزيولوجية وإنتاج أدنى حرارة وكذلك القدرة على تشكيل الأشكال المعقدة التي تلتصق وتتطابق مع موقع الخلل [147]. وعلى الرغم من أن الأنظمة البيولوجية تضع قيوداً على استخدام البلمرة الضوئية في الجسم الحي، بسبب حدود درجات الحرارة المقبولة ودرجة الحموضة (pH) وكذلك سمية معظم المونومرات والمذيبات العضوية، فإنه من الممكن عموماً التغلب على ذلك عن طريق تنفيذ شروط البلمرة المعتدلة (مثل تقليل كثافة الضوء ومستويات المذيب العضوي وتقليل زمن التَشعيع (irradiation time) ودرجة الحرارة الفيزيولوجية) [147].

وعلى الرغم من أنه قد يبدو وكأن أنظمة حاملات الخلايا والأنسجة المبنية على أساس الهلامات المائية في وضع غير مؤاتٍ من ناحية الخصائص الميكانيكية للنظام الهيكلية (skeletal system)، إلا أنها توفر بيئة من أجل التشكيل المتسارع للأنسجة والذي يوفر بدوره الاستقرار الميكانيكي المنشود [148]. وقد وجد Ferruti وآخرون [150] أن الهلامات المائية المبنية على أساس البولي (أميدو - أمين) (poly(amido-amine) - PAA) المذبذب (amphoteretic) (التمتع بخصائص متضادة) والتي تحتوي على مجموعات كربوكسيلية (carboxyl groups) ومجموعات أمينية (amino groups) في وحداتها المتكررة، لديها إمكانية جيدة لتكون كحاملات خلايا وأنسجة، وذلك بناءً على توافقيتها الخلوية (cytocompatibility) مع خلايا الأرومة الليفية (fibroblasts) بالإضافة إلى منتجات التحلل غير السامة للخلايا (noncytotoxic)، إلا أن خصائصها الميكانيكية قد احتاجت إلى تحسين. وقد قاموا بمزيد من التعديل على الهلامات المائية المبنية من البولي (أميدو - أمين) (PAA) من خلال إدخال مجموعات الغوانيديين (guanidine) الجانبية لتحسين التصاق وتكاثر الخلايا ووجد أن الخصائص الميكانيكية تتحسن عندما تم استخدام بولي (أميدو-أمين) (PAA) ثانٍ يحمل مجموعات أمينية أساسية كعامل للربط التشابكي (crosslinking agent) [151]. وغالباً ما يتم تعديل الهلامات المائية بواسطة ببتيدات التصاق الخلايا لتعزيز التصاق وانتشار الخلايا [152]. وقد قام Sannino وآخرون [155] بالجمع بين رد فعل الربط التشابكي الضوئي مع عملية تشكيل الرغوة للحث على تكوين مسامية ذات ترابط بيني ضمن الهلامات المائية المبنية من بولي (جليكول الإيثيلين) (PEG) والتي تم تعديلها باستخدام تنابعات متسلسلة من الببتيدات وذلك من أجل تعزيز التصاق الخلايا.

هناك عدة مجموعات بحثية تعمل على صنع هلامات مائية باستخدام بوليمرات مشتركة اصطناعية (synthetic copolymers) [156]، أو باستخدام توليفة أو تركيبة من البوليمرات الطبيعية والاصطناعية [157,158]. وقد قام Martens وآخرون [156] بالتغليف الضوئي (photoencapsulation) للخلايا الغضروفية في شبكة بوليمر مشترك من بولي (جليكول الإيثيلين) - بولي (كحول الفينيل) (PEG - PVA) وقد وجد أن الحمض النووي (DNA)، والجليكوز أمينوغليكان (GAG)، وإجمالي محتوى الكولاجين يتزايد مع زمن الزراعة، مما يؤدي إلى إنتاج أنسجة غضروفية جديدة موزعة بشكل متجانس في نهاية مدة الستة أسابيع. وقد أعد Hiemstra وآخرون [159] هلامات مائية من بولي (جليكول الإيثيلين) - بولي (حمض اللاكتيك) (PEG - PVA) للاستفادة من الخصائص الممتازة المانعة للتلوث (antifouling properties) والتصفية

الكلوية (renal clearance) الأقل من ٣٠ كيلو دالتون (kDa) لبولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) والتحلل الحيوي للبولي (حمض اللاكتيك) (PLA)، فضلاً عن التوافقية الحيوية لكليهما، وذلك لهندسة الغضروف. وقد أعد Cascone وآخرون [160] خلأط (blends) من بولي (كحول الفينيل) (poly(vinyl alcohol) - PVA) غير القابل للتحلل الحيوي (nonbiodegradable) مع جزيئات ماكروية بيولوجية مختلفة مثل حمض الهالورونيك (hyaluronic acid) والديكستران (dextran) والجيلاتين لتحسين التوافقية الحيوية للبولي (حمض اللاكتيك) (PLA) وبالتالي إنتاج هلامات مائية اصطناعية حيوية كحاملات خلايا وأنسجة محتملة لهندسة الأنسجة. إن الخاصية الفريدة حول الهلامات المائية والتي يجري استغلالها على نحو متزايد من قبل مهندسي الأنسجة هي القدرة على جعلها مستجيبة حيوياً وبالتالي، جعلها "مواد حيوية ذكية" ("intelligent biomaterials") [161]. وقد قام Wang وآخرون [161] بتركيب هلام مائي من فسفو إستر (phosphoester) - بولي (غليكول الإيثيلين) (PhosPEG) لتغليف الخلايا الجذعية المتوسطة المستمدة من النقي (marrow - derived mesenchymal stem cells) (MSCs) من أجل هندسة العظم. وقد ازداد معدل التحلل الحلمّي (hydrolytic degradation) لهذه الهلامات المائية الحاوية على الفسفور في وجود إنزيم الفسفاناز القلوي (ALP)، وهو عبارة عن إنزيم مشتق من العظم. إن وجود الفسفور قد زاد أيضاً من وتيرة التمعدن (mineralization) وقد وُجد كذلك أن الفسفو إستر - بولي (غليكول الإيثيلين) (PhosPEG) يزيد من التعبير الجيني للواسمات المحددة للعظم (bone - specific markers).

وقد تم البدء أيضاً باستخدام تقنيات النماذج الأولية السريعة (RP) من أجل تصنيع الهلامات المائية. فقد استخدم Landers وآخرون [162] الرسم ثلاثي الأبعاد، والذي يُمثل توزيعاً ثلاثي الأبعاد في وسط سائل، وذلك لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة من الهلامات المائية بخاصية حرارية قابلة للعكس ومع شكل خارجي محدد وبنية مسام داخلية محددة بشكل جيد. وقد استطاعوا أيضاً طلاء سطح حاملة الخلايا والأنسجة بطبقة غلاف خارجي لتسهيل التصاق الخلايا ونموها. وقد قام Dhariwala وآخرون [163] بحجز خلايا المبيض (ovary cells) لهامستر صيني (حيوان من القوارض) في حاملة خلايا هلامية من البولي (أكسيد الإيثيلين) (PEO) تم تشكيلها باستخدام الحفر المجسّم (ثلاثي الأبعاد) (STL). وقد تم تخفيض تأثير البادئة (initiator) السام للخلايا إلى الحد الأدنى باستخدام ٥٠ مايكرو لترّاً من البادئة في كل ميلي لتر من الوسط وقد كان وقت التعرض لأشعة الليزر فوق البنفسجية من أجل تجارب السمية الخلوية في المختبر أطول مما هو مُستخدم عموماً، معطياً الثقة للمؤلفين في انخفاض تأثير البادئة السام للخلايا. وعلى أي حال، فقد وُجد أن معامل المرونة يكون قابلاً للمقارنة مع قيم الأنسجة الرخوة مثل أنسجة الثدي وليس الأنسجة الغضروفية. وقد استخدم Arcaute وآخرون [130] أيضاً الحفر المجسّم (ثلاثي الأبعاد) (STL) لتصنيع هلامات مائية من بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) لتغليف خلايا الأرومة الليفية الجلدية البشرية، مع ما لا يقل عن ٨٧٪ من الخلايا التي وُجد أنها قابلة للحياة لمدة تصل إلى ٢٤ ساعة بعد التصنيع.

وقد أعطى Hoffman [164] نظرة عامة ممتازة على المحددات أو البارامترات الفيزيائية الكيميائية الهامة وخصائص الهلامات المائية ذات الصلة لاستخدامها كمنصوفات في تطبيقات هندسة الأنسجة جنباً إلى جنب مع مناقشة مزاياها وعيوبها. وقد قدّم Drury و Mooney [165] استعراضاً شاملاً للهلامات المائية المستخدمة كحاملات خلايا من أجل هندسة الأنسجة. وقد قاموا

بمناقشة البوليمرات الاصطناعية والطبيعية الرئيسية التي تُستخدم من أجل صنع حاملات خلايا وأنسجة من الهلامات المائية جنباً إلى جنب مع متغيرات تصميم حاملات الخلايا والأنسجة وحددوا ثلاثة فئات من تطبيقات حاملات الخلايا والأنسجة: عوامل ملء الحيز أو الفراغ (space filling agents) وتوصيل الجزيئات النشطة حيوياً (bioactive molecule delivery) وتوصيل الخلايا / الأنسجة. وقد وصف Brandl وآخرون [166] طريقة معقولة لتصميم الهلامات المائية من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة مع التركيز على الخصائص الفيزيائية وأوجز تأثيرها على وظيفة الخلايا وتخلق أو تشكل الأنسجة (tissue morphogenesis).

### (٣,٢,٧,٨) الغزل الكهربائي Electrospinning

تلقي تقنية أخرى لتصنيع حاملات الخلايا والأنسجة أهمية متزايدة وهي الغزل الكهربائي (electrospinning) لألياف الناتو من أجل إنتاج حاملات خلايا وأنسجة وذلك بسبب تشابهها واسع النطاق مع المصفوفة خارج الخلية (ECM) الأصلية [167]. ففي هذه العملية يتم إنتاج ألياف البوليمر بقطر في مستوى النانومتر باستخدام قوى كهربائية (electrical forces) [168]. وعندما يتم تطبيق حقل كهربائي (electric field) تنشأ قوى كبيرة بما يكفي على سطح محلول البوليمر للتغلب على التوتّر السطحي (surface tension)، فيتم إخراج نفاث مشحون كهربائياً (electrically charged jet) حيث يتصلب بدوره إلى ليف مشحون كهربائياً، والذي يمكن معالجته في أشكال مختلفة عن طريق القوى الكهربائية [168]. إن البوليمرات المستخدمة عادةً من أجل هذه الطريقة في التصنيع هي البولي إسترات الأليفاتيّة (aliphatic polyesters) (وهي عبارة عن مركب هيدروكربوني ذي سلسلة مفتوحة) [169]. فعلى سبيل المثال، يتم استخدام البولي-إل - حمض اللاكتيك (PLLA) من أجل التصاق وتمايز الخلايا الجذعية العصبية [170]؛ والبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) من أجل القدرة على البقاء على قيد الحياة ونمو وتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (MSCs) [171]؛ والبولي كابرولاكتون (PCL) من أجل التصاق خلايا الأرومة الليفية الجلدية البشرية [172] بالإضافة إلى تشكيل العظم من الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (MSCs) [173]. وقد درس Li وآخرون [167] تفاعل خلايا الأرومة الليفية والخلايا الجذعية المتوسطة البشرية المشتقة من نقي العظم (bone - marrow derived - MSCs) على بنية ذات ألياف نانوية مغزولة كهربائياً من البولي لاكتيك - بولي غليكوليك (PLG) بقطر من ٥٠٠ إلى ٨٠٠ نانومتر. وبما أنه قد تم تشكيل المسام في البنية عن طريق الألياف الموجهة بشكل عشوائي (randomly oriented fibers) والموجودة على نحوٍ حر الواحد فوق الآخر، فإن الخلايا أثناء هجرتها عبر المسامات ربما تدفع جانباً تلك الألياف المحيطة غير المقاومة ولكنها قوية ميكانيكياً، وتتسبب بالتالي في توسيع المسام [167]. وقد افترض المؤلفون أن هذا النوع من البنية الهندسية الديناميكية لحاملة الخلايا والأنسجة قد سمح للخلايا بحرية ضبط قطر المسام وفقاً لميولها وكذلك سمح لها بالمرور عبر مسامات صغيرة نسبياً ولكنهم نبهوا إلى أن نظريتهم احتاجت إلى المزيد من البحث. وقد قام Li وآخرون [174] أيضاً بتقييم حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المغزولة كهربائياً من البولي كابرولاكتون (PCL) بقطر ٧٠٠ نانومتر وذلك من حيث قدرتها على الاحتفاظ بوظائف الخلايا الغضروفية واقترحوا استخدامها كحاملات خلايا وأنسجة مناسبة من أجل هندسة الأنسجة الغضروفية. كما قام Yoshimoto وآخرون [175] أيضاً بزراعة الخلايا الجذعية المتوسطة الجردية بنجاح على حاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف النانو المغزولة كهربائياً من البولي كابرولاكتون (PCL) بقطر ٤٠٠ نانومتر ( $\pm 200$  نانومتر) لإظهار قدرتها كحاملات خلايا وأنسجة مناسبة من أجل

هندسة الأنسجة العظمية. وعلى أي حال، فقد وجدوا أن للألياف أقطاراً مختلفة على امتداد أطوالها وأن أسطحها غير منتظمة. وقد تمكن Chen وآخرون [176] من إنجاز ألياف نانوية مع أقطار بلغت إلى حد ١١٧ نانومتر إلا أنهم وجدوا أنها تحتوي على خرزات (beads)، والتي بدورها أثرت بشكلٍ سلبي على التصاق الخلايا وعلى الطاقات الحركية للنمو، مما قادهم إلى استنتاج أن التماثل أو الانتظام وقطر الألياف قد لعبا دوراً مهماً في تعديل أو ضبط التصاق وانتشار الخلايا. وبالرغم من هذه العيوب الطفيفة، إلا أن الألياف النانوية تبشر بحاملات خلايا وأنسجة واعدة نظراً لامتلاكها مسامية عالية ونسبة عالية من مساحة السطح إلى الحجم، والتي تعتبر بارامترات أو محددات مرغوبة للتصاق ونمو وانتشار الخلايا بالإضافة إلى امتلاكها خصائص ميكانيكية مفضلة [167].

وقد قام Deng وآخرون [177] بدراسة المورفولوجيا (الشكل) وكذلك التوافقية الحيوية لحاملات الخلايا والأنسجة الهجينة ذات ألياف النانو المصنوعة من هيدروكسي أباتيت-بولي (حمض اللاكتيك) (PLA - HA) والتي تم تحضيرها من خلال عملية الغزل الكهربائي. وقد وجدوا أن سطح الألياف خشن نظراً لتشكيل رابط سطحي جديد من الـ (-COO) وشاهدوا تحسناً في التصاق وانتشار خلايا الـ (MG-63) مقارنةً مع حاملات الخلايا والأنسجة الصرفة المصنوعة فقط من البولي (حمض اللاكتيك) (PLA). وقد وجد Meng وآخرون [178] أن خلايا الـ (NIH 3T3) تلتصق وتنمو بصورة أكثر فعالية على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المغزولة كهربائياً والمركبة من البولي (٣-هيدروكسي بوتيرات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات) (PHBV) - (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) / الكولاجين وذلك نسبةً إلى حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المصنوعة من البولي (٣-هيدروكسي بوتيرات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات) (PHBV). وقد قام Li وآخرون [179] بدراسة التوافقية الخلوية (cytocompatibility) لحاملة خلايا وأنسجة مغزولة كهربائياً بشكلٍ مشترك ومركبة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) والجيلاتين والألفا-إيلاستين (PGE) ( $\alpha$ -elastin) كمادة محتملة من أجل هندسة الأنسجة الرخوة (soft tissues) مثل القلب والرئة والأوعية الدموية. وقد أنشأ Pan وآخرون [180] حاملة خلايا وأنسجة مغزولة كهربائياً عالية المسامية من الديكستران / البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) وذلك عن طريق المزج الفيزيائي لبوليمرين وقد قام بتحديد خصائصها من أجل استجابات خلوية (cellular responses) مختلفة باستخدام خلايا الأرومة الليفية الجلدية (dermal fibroblasts) وذلك من منظور استخدام هذا المركب في تعزيز التئام (شفاء) الجروح المزمنة (chronic wounds) أو الجروح الناجمة عن الصدمات (trauma wounds). وقد استخدم Townsend - Nicholson و Jayasinghe [181] ترتيباً من إبرة متمحورة (coaxial needle) حيث تدفق مُعلَق الخلايا الحية المركز (concentrated living cell suspension) من خلال الإبرة الداخلية وتدفق بولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) - (poly (dimethylsiloxane)) ذو التصنيف الطبي والمسامية العالية مع خاصية التوصيل الكهربائي (electrical conductivity) المنخفض من خلال الإبرة الخارجية، وذلك لتشكيل خيوط مايكروية دقيقة مركبة تحتوي على الخلايا. ولم يظهر أن عملية التصنيع النانوي الحيوي (bionanofabrication process) هذه تؤثر على قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة بعد عملية الغزل الكهربائي؛ مما يثبت جدوى استخدام عملية الغزل الكهربائي المتمحور (coaxial electrospinning) لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة بيولوجية فعّالة (active biological scaffolds).

لقد درس الباحثون النواحي المختلفة لعلمية الغزل الكهربائي لمعرفة كيف يؤثر تغيير المحددات أو البارامترات المحددة والمرتبطة بإنتاج الألياف على خصائصها. وقد وجد Thomas وآخرون [182] أن الاختلافات في سرعات دوران المجمع (collector) (أداة تجميع الألياف) قد أثرت على متانة الشد (tensile strength) ومعامل المرونة (modulus) لشبكات البولي كابرولاكتون (PCL) الليفية النانوية المتراصة المستخدمة من أجل حاملات الخلايا والأنسجة العظمية، وذلك نظراً لزيادة تراصف وحشو الألياف بالإضافة إلى انخفاض حجم المسام بين الألياف (interfiber) عند معدلات السحب الأعلى. وبصورة ماثلة، فقد وجد Li وآخرون [183] بأن تنظيم الألياف النانوية قد تأثر بشكل كبير بسرعة الهدف الدوار (rotating target): فكلما كانت سرعة الدوران أكبر، كان تراصف الألياف أفضل، وهو ما أثر بدوره وبشكل عميق على الخصائص الميكانيكية. واستخدم Pham وآخرون [184] تقنية تعدد الطبقات لبناء حاملة خلايا وأنسجة من البولي كابرولاكتون (PCL) تحتوي على طبقات متناوبة من الألياف المايكروية والنانوية المغزولة كهربائياً وذلك للجمع بين ميزاتهما في بنية واحدة. تُظهر الألياف المايكروية ميزة توفير حجم مسامات أكبر، الأمر الذي يُسهّل الاختراق الخلوي (cellular penetration) وانتشار المواد الغذائية داخل البنية، في الوقت الذي توفر فيه الألياف النانوية مساحة سطحية أكبر من أجل التصاق وانتشار الخلايا [184]. وقد وصف Li وآخرون [185] الخصائص الفيزيائية والبيولوجية لستة أنواع من البولي (إيستر أ ألفا-هيدروكسي) (poly ( $\alpha$ -hydroxy esters) المستخدمة بشكلٍ شائع. وقد درس Moroni وآخرون [186] تأثير أقطار الألياف المختلفة والطوبولوجيا النانوية السطحية (nanotopology) للألياف على عملية بذر والتصاق وتكاثر الخلايا. وقد وجدوا أن الألياف الملساء التي يبلغ قطرها ١٠ نانومتر تدعم عملية البذر والتصاق الأمثل للخلايا ضمن المجال الذي تم تحليله، في حين أنه قد وُجد أن الأسطح ذات المسامات النانوية تُعزز وبصورة كبيرة تكاثر وانتشار الخلايا. واستخدم Vaz وآخرون [178] عملية الغزل الكهربائي المتتابع متعدد الطبقات (multilayering electrospinning - ME) وذلك لإنتاج حاملة خلايا وأنسجة أنبوبية مؤلفة من طبقتين (bilayered tubular scaffold) حيث تحتوي على طبقة خارجية من ألياف البولي (حمض اللاكتيك) (PLA) الصلبة والمتراصة (المتحاذية) وطبقة داخلية من ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) المرنة والموجهة بشكلٍ عشوائي من أجل الاستخدام في هندسة الأوعية الدموية.

وقد حاول الباحثون أيضاً دمج الجسيمات النانوية (nanoparticles) ضمن الألياف أو استخدام المركبات النانوية لتعزيز قدرات حاملات الخلايا والأنسجة المغزولة كهربائياً. فقد صنع Wutticharoenmongkol وآخرون [188] حاملات خلايا وأنسجة جديدة مغزولة كهربائياً من أجل هندسة الأنسجة العظمية وذلك باستخدام محلول من البولي كابرولاكتون (PCL) الذي يحتوي على جسيمات نانوية من كربونات الكالسيوم (calcium carbonate) أو الهيدروكسي آباتيت (HA) وقد تم تقييمها بشكلٍ ناجح في المختبر فيما يتعلق بالتصاق والتكاثر ونشاط أو فعالية إنزيم الفوسفاتاز القلوي باستخدام الخلايا البشرية البانية للعظم (human osteoblasts). وقد قام Lee وآخرون بالجمع جنباً إلى جنب بين تقنية التركيب النانوي مع تقنية الغزل الكهربائي وذلك لإنتاج حاملة خلايا وأنسجة مع حجمين مختلفين للمسامات: مسامات نانوية الحجم من أجل نقل المواد المغذية والفضلات، ومسامات مايكروية الحجم من أجل ارتشاح الخلايا وتوغلها في الأوعية الدموية. وقد تم

تحقيق ذلك عن طريق دمج صفيحات مونت موريللونيت (montmorillonite platelets) ذات الحجم النانوي في محلول من البولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA) الذي تم غزله كهربائياً بشكلٍ متتابع وتعرضه للقبولة بالضغط على البارد (cold compression molding) وقد تبع ذلك عملية ارتشاح الملح (salt leaching) / إرغاء الغاز (gas foaming) للحصول على مسامات مايكروية الحجم. وقد أنشأ Thomas وآخرون [190] حاملة خلايا وأنسجة مُركبة نانويًا (nanocomposite scaffold) عن طريق الغزل الكهرستاتيكي (الكهربائي الساكن) المشترك (electrostatic cospinning) لألياف البولي كابرولاكتون النانوية (PCL) والهيدروكسي أباتيت النانوي (nanoHA) وذلك لمحاكاة أفضل لسمات أو خصائص المصفوفة خارج الخلية (ECM) الطبيعية.

وقد وجدت حاملات الخلايا والأنسجة المغزولة كهربائية أيضاً تطبيقات في مجال هندسة الأنسجة القلبية الوعائية (cardiovascular tissue engineering) وهندسة الأنسجة الهيكلية العضلية (skeletal muscle tissue engineering). وقد قارن van Lieshout وآخرون [191] حاملة خلايا وأنسجة صمامية (electrospun valvular scaffold) مغزولة كهربائياً وحاملة خلايا وأنسجة صمامية منسوجة (knitted valvular scaffold)، وكلتاهما مصنوعتان من البولي كابرولاكتون (PCL)، وذلك للتحقق من ملاءمتها في هندسة الصمام الأورطي (aortic valve) (الأبهرى) واستنتجوا أن حاملة الخلايا والأنسجة المثالية تحتاج إلى الحصول على متانة البنية المنسوجة مجتمعة مع قدرة البنية المغزولة على ترشيح الخلايا. وقد فحص Zong وآخرون [192] نمو الخلايا العضلية القلبية (cardiomyocytes) على أغشية من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) المغزول كهربائياً ذي البنية النانوية مع مركبات مختلفة وذلك لتقييم التصاق وبنية ووظيفة الخلايا على بُنى أنسجة القلب المحتملة تلك. وقد قيّم Riboldi وآخرون [193] مدى ملاءمة البولي إستر يوريثان (polyesterurethane) الكتلي المغزول كهربائياً والقابل للتحلل والتوفر تجارياً والمسمى بالـ (DegraPol)، كحاملة من أجل هندسة الأنسجة الهيكلية العضلية، وذلك من خلال وصف خصائصها الشكلية والتحليلية والميكانيكية.

وقد تم البدء أيضاً باستخدام حاملات الخلايا والأنسجة المغزولة كهربائياً من أجل توصيل الدواء وعوامل النمو والحمض النووي (DNA). وقد عرض Kim وآخرون [194] وبشكلٍ ناجح عملية الدمج والإطلاق (التحرير) المتواصل لمضاد حيوي محب للماء (hydrophilic antibiotic) من حاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية مبنية على أساس البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) المغزول كهربائياً من دون أي فقد في البنية والفعالية الحيوية للدواء. وقد أظهر Luu وآخرون [195] وبصورةٍ ناجحة عملية الدمج والإطلاق المتحكم به لبلازميدة الحمض النووي (plasmid DNA) من مركب مؤلف من بوليمر اصطناعي مغزول كهربائياً / حمض نووي (DNA)؛ مما يدل على استخدامه المحتمل من أجل التوصيل الجيني العلاجي (therapeutic gene delivery). وقد احتوى البوليمر الاصطناعي على بوليمر عشوائي مشترك من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) وبوليمر كتلي مشترك من البولي (حمض اللاكتيك) - بولي (غليكول الإيثيلين) (PLA - PEG).

لقد ناقشت منشورات أخرى حاملات الخلايا والأنسجة المغزولة كهربائياً بشكلٍ تفصيلي. فعلى سبيل المثال، استعرض Nair وآخرون [196] التقدمات الأخيرة في تطوير حاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية اصطناعية قابلة للتحلل الحيوي ومُصنّعة عن طريق الغزل الكهربائي. وقد استعرض Boudriot وآخرون [197] محددات أو بارامترات الغزل ذات الصلة من أجل تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة وناقشوا أيضاً حاملات الخلايا والأنسجة المركّبة من الألياف النانوية. وناقش Teo وآخرون [198] المصفوفة خارج الخلية (ECM) وكيف يمكن لتقنيات الغزل الكهربائي المجتمعة مع تعديل السطح والربط المتشابك لألياف النانو أن تساعد المرء في تعديل حاملة الخلايا والأنسجة لتفي بمتطلبات الأنسجة التي يُود تجديدها. إن الغزل الكهربائي ليس العملية الوحيدة التي يمكن من خلالها إنتاج حاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية. فقد ناقش Smith و [199] Ma الكيفية التي يمكن أن تنتج بها عمليات التجميع الذاتي والغزل الكهربائي والفصل الطوري حاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية وذلك بغزل المجال الكامل من أحجام كولاجين المصفوفة خارج الخلية (ECM).

### (٣،٣) تعديل حاملات الخلايا والأنسجة MODIFICATION OF SCAFFOLDS

يمكن تعديل حاملات الخلايا والأنسجة أيضاً لتوصيل الجزيئات الحيوية (biomolecules) مثل البروتينات وعوامل النمو بالإضافة إلى الأدوية [200]. إن عوامل النمو هي ببتيدات متعددة (polypeptides) والتي إما أن تحفز أو أن تكبح الفعاليات الخلوية مثل التكاثر والتمايز والهجرة والالتصاق والتعبير الجيني [201]. ويمكن دمج عوامل النمو بشكلٍ مباشر في حاملة الخلايا والأنسجة أثناء أو بعد التصنيع. وقد دمج Sheridan وآخرون [92] عامل النمو البطاني الوعائي (vascular endothelial growth factor - VEGF) في حاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من البولي لاكتيك - بولي غليكوليك (PLG) أثناء عملية التصنيع وتم إطلاقها بطريقة مُتحكم بها. واتضح أن عامل النمو البطاني الوعائي (VEGF) يحتفظ بأكثر من ٩٠٪ من نشاطه الحيوي. وقد دمج Hu وآخرون [202] عامل النمو المحفز للعظم (osteoinductive growth factor) وهو البروتين المكوّن للعظم (bone morphogenetic protein - BMP) في حاملات خلايا وأنسجة مُركّبة مصنوعة من الهيدروكسي آباتيت / الكولاجين (HAC) والبولي (حمض اللاكتيك) (PLA)، والتي تم زراعتها في مناطق العيوب الجذليّة (diaphyseal defects) للكلاب. وقد كشفت الدراسات النسيجية أن البروتين المكوّن للعظم (BMP) لم يحفز تكوين العظم فحسب بل أدى أيضاً إلى التسريع في عملية تحلل مادة حاملة الخلايا والأنسجة. وقد قام Williams وآخرون [124] ببذر حاملات خلايا وأنسجة من البولي كابرولاكتون (PCL) تم صنعها من خلال التصليب أو التليد الانتقائي بواسطة الليزر (SLS) بخلايا الأرومة الليفية المحوّلة بالبروتين المكوّن للعظم (BMP-7) وقاموا بزراع هذه البنى تحت جلد الفئران وذلك لتقييم الخصائص البيولوجية. وقد أكد التقييم النسيجي والتحليل باستخدام جهاز التصوير الطبقي المحوري الحوسب المايكروبي (microCT) توليد العظم. وقد قام Grondahl وآخرون [203] بتعديل البولي (٣-هيدروكسي بوترات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات) (PHBV) بمحضر الأكريليك عن طريق البلمرة المشتركة للطعم. ويُستخدم البولي (٣-هيدروكسي بوترات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات) (PHBV) في هندسة الأنسجة العظمية نظراً لتوافقيته الحيوية ومميزاته التحليلية الملائمة وخصائصه الميكانيكية المناسبة ودعمه لالتصاق الخلايا البانية للعظم. وقد تم استخدام حمض الأكريليك (acrylic acid) لتحفيز امتصاص أو حب السطح للماء

(surface hydrophilicity)، وذلك لتحسين نمو الهيدروكسي آباتيت (HA) في نهاية الأمر وزيادة توافقية الخلايا (cell compatibility). وعلاوة على ذلك، فقد ارتبطت المجموعات الحمضية الكربوكسيلية (carboxylic acid groups) التي تم إدخالها على سطح البولي (٣-هيدروكسي بوتيرات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات) (PHBV) بواسطة حمض الأكريليك بالغلوكوز أمين (glucosamine)، وهو جزيء حيوي نموذجي، وذلك لإظهار القدرة على تعديل المادة من أجل استخدامها في تطبيقات هندسة الأنسجة. وبصورة مماثلة، فقد أدخل Ma وآخرون [204] طبقة من الكولاجين المستقر على سطح حاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من البولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA)، من خلال التطعيم ببولي حمض الميثاكريليك (polymethacrylic acid - PMAA)، وذلك من أجل دمج عامل النمو الأساسي لخلايا الأرومة الليفية (basic fibroblast growth factor - bFGF) لتحسين التوافقية الحيوية وتعزيز نمو الخلايا ومحاكاة المصفوفة خارج الخلية (ECM) الطبيعية عن كذب. وقد دمج Ennet وآخرون [93] عامل النمو البطاني الوعائي (VEGF) إما بشكل مباشر في حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) وإما بتغليفها بشكل مسبق في الكريات المايكروية الدقيقة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) والتي تم استخدامها لتصنيع حاملات الخلايا والأنسجة من خلال استخدام إرغاء الغاز (الرغوة الغازية). وقد أدى التغليف المسبق (pre - encapsulation) إلى إدخال أو إقحام عامل النمو البطاني الوعائي (VEGF) إلى عمق أبعد ضمن حاملات الخلايا والأنسجة؛ مما نتج عنه تأخير في عملية الإطلاق أو الإفراز. وفي الجسم الحي، عزز عامل النمو البطاني الوعائي (VEGF) المحرر تشكل الأوعية الدموية الموضعية بشكل كبير مع تحرير كميات صغيرة جداً (مهملة) في جهاز الدوران النظامي (systemic circulation). وقد قام Park وآخرون [205] بعملية التغليف المشترك للخلايا الغضروفية البقرية وجسيمات الجيلاتين المايكروية الدقيقة المحملة بعامل النمو التحويلي (transforming growth factor-β1 - TGF-β1) في مركب جديد من الهلامات المائية القابل للحقن وهو أوليغو (فومارات بولي (غليكول الإيثيلين)) (oligo (OPF) - (poly (ethylene glycol) fumarate) وذلك لاستخدامه من أجل نمو الغضروف.

وتتم أيضاً متابعة دراسة توصيل البروتين والدواء باستخدام حاملات الخلايا والأنسجة وذلك لغرض تعزيز النشاط الخلوي ومعالجة الالتهاب الموضعي الحاد (local acute inflammation)، على التوالي. وقد طور Lenza وآخرون [206] حاملات خلايا وأنسجة نشطة حيوياً من شأنها السماح بدمج وتوصيل البروتينات بمعدلات يتم التحكم بها وذلك من أجل تعزيز وظائف الخلايا ونمو الأنسجة الملساء. وقد قام Yoon وآخرون [91] بتصنيع حاملات خلايا وأنسجة مسامية من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) تحتوي على الديكساميثازون (dexamethasone) من خلال طريقة إرغاء (رغوة) الغاز / انتفاذ (ارتشاح) الملح لإنشاء دعامة قابلة للتحلل الحيوي وذلك من أجل تقليل فرط تنسج (تضخم) باطنة الشريان (intimal hyperplasia) في عودة التضييق (restenosis). وقد تم إطلاق الديكساميثازون، وهو دواء ستيرويدي مضاد للالتهاب (steroidal anti - inflammatory drug)، بصورة بطيئة من حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) بطريقة مُتحكم بها لأكثر من شهر بدون إظهار إطلاق انفجاري أو اندفاعي أولي (initial burst release) وقد كان ناجحاً في قمع أو إيقاف تكاثر الخلايا اللمفية (lymphocytes) وخلايا العضلات الملساء (smooth muscle cells) بشكل جذري في المختبر.

إن العيب الحاد في توصيل البروتين المباشر هو التحلل السريع في الجسم الحي والاستقرار المحدود حتى لو كانت مُغلّفة في حامل أو ناقل توصيل بوليمري (polymeric delivery vehicle) [207]. والحل الواعد لذلك هو استخدام العلاج الجيني الموضوعي لتعزيز إنشاء عامل النمو المطلوب في الموقع المحدد المرغوب دراسته [207]. وبالتالي؛ فإنه يمكن استخدام حاملات الخلايا والأنسجة أيضاً كحاملات أو ناقلات من أجل التوصيل الجيني وذلك لتعزيز تعبير التعديل الجيني الموضوعي لتحفيز تشكيل الأنسجة الوظيفية [208]. وقد استخدم Jang وآخرون [208] التوصيل بواسطة الركيزة (substrate-mediated delivery) والذي ينطوي على تثبيت مركبات الحمض النووي (DNA) على سطح البوليمر من أجل التوصيل النهائي إلى الخلايا التي تنمو على البوليمر. وقد قاموا بدراسة تثبيت مركب البولي إيثيلين إيمين (polyethylenimine - PEI) / الحمض النووي (DNA) والتعديل أو النقل الخلوي (cellular transfection) النهائي على حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي لاكتيك - بولي غليكوليك (PLG). وقد تمكنوا بهذه التقنية من توصيل الحمض النووي (DNA) بشكلٍ منظم أو مُوحّد من خلال حاملة الخلايا والأنسجة وبذلك تم تعديل أو نقل أكثر من ٦٠٪ من الخلايا باستخدام كميات قليلة من الحمض النووي (DNA) على السطح.

#### (٣, ٤) أنواع مواد حاملات الخلايا والأنسجة TYPES OF SCAFFOLD MATERIALS

إن مواد حاملات الخلايا والأنسجة تكون إما مصنوعة من البوليمرات الاصطناعية (التركيبية) وإما مشتقة من البوليمرات الموجودة طبيعياً. تمتاز البوليمرات الاصطناعية بامتلاكها خصائص متانة ومعدل تحلل وبنية مايكروية دقيقة قابلة للتحكم بشكلٍ عالٍ بالإضافة إلى اتّساق أو تطابق الدفعة تلو الدفعة (batch - to - batch) [81,209]. وتمتاز المواد المشتقة طبيعياً بخاصية التمييز أو التعرّف البيولوجي (biological recognition) التي يمكن أن تعزز التصاق ووظائف الخلايا [81]. وعلى أي حال، فإن لها مساوئاً معينة أيضاً تشمل التحكم المحدود بالخصائص الميكانيكية وقابلية التحلل الحيوي واتّساق أو تطابق الدفعة تلو الدفعة والتوفر المحدود؛ مما يساهم في ارتفاع تكلفتها والإظهار المحتمل للاستمناع (immunogenicity) وامتلاك الشوائب المرضية (pathogenic impurities) [81]. وقد قام Velema و Kaplan [6] بكتابة عرض ممتاز يناقش ثلاثة أنواع مهمة من الفئتين الرئيسيتين للبوليمرات المشتقة طبيعياً، والتي يتم استخدامها في تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة. وهذه البوليمرات هي البولي ساكريدات أو عديّات السكّاريد (polysaccharides) (الألجينات (alginate) والشيتوزان (chitosan) والهيالورونان (hyaluronan)) والبروتينات الليفية (الكولاجين (collagen) وفبروين الحرير (silk fibroin) والإيلاستين (elastin)). وستناقش هنا البوليمرات الاصطناعية فقط. وقد ناقش Nair و Laurencin [210] بصورة أنيقة جداً البوليمرات الأساسية الاصطناعية والطبيعية المستخدمة في هندسة الأنسجة وتوصيل الدواء في حين ذكر كلٌّ من Gunatillake و Adhikari [209] بالتفصيل الفئات الرئيسية من البوليمرات الاصطناعية القابلة للتحلل الحيوي في هندسة الأنسجة وناقشا هذه البوليمرات من حيث تركيبها وخصائصها بالإضافة إلى توافقيتها الحيوية وقابليتها للتحلل الحيوي. وقد ناقش كلٌّ من Holland و Mikos [211] مختلف

البوليمرات الاصطناعية القابلة للتحلل، والتي يتم استخدامها من أجل توصيل الدواء في تطبيقات هندسة الأنسجة العظمية في الوقت الذي ناقش فيه Agrawal و Ray [3] البوليمرات الرئيسية الاصطناعية القابلة للتحلل الحيوي التي يتم استخدامها من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة العظمية الهيكلية وطرق تصنيعها.

### (٣،٤،١) البوليسترات Polyesters

إن البوليمرات الاصطناعية الأكثر استخداماً هي البوليسترات (ألفا-هيدروكسي) الأليفاتية (aliphatic ( $\alpha$ -hydroxy) polyesters). وهي تشمل بولي (حمض الغليكولايد) (PGA)، وبولي (حمض اللاكتيك) (PLA)، وبوليمرهما المشترك بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA)، التي يتم استخدامها بصورة واسعة في عدد من التطبيقات السريرية (clinical applications)، وبشكل أساسي كغُرَز أو خيوط قابلة للارتشاف (resorbable sutures) يتم استخدامها في الجراحة وأيضاً كصفائح ومثبتات لأجهزة تثبيت الكسور (fracture fixation) [209,210]. إن البولي (حمض الغليكولايد) (PGA) هو مادة بلورية جداً مع نقطة انصهار تتجاوز ٢٠٠ درجة مئوية وتتراوح درجة حرارة تحوله الزجاجي ( $T_g$ ) من حوالي ٣٥ إلى ٤٠ درجة مئوية [209,210]. ونظراً لدرجة تبلوره العالية، فهو يمتاز بمتانة شد عالية ومعامل شد عالٍ بالإضافة إلى ذوبانيته (solubility) المنخفضة في معظم المذيبات العضوية. ويُستخدم بولي (حمض اللاكتيك) (PLA) بصورة عامة في شكل بولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA) وبولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (PDLLA) لتصنيع حاملات الخلايا والأنسجة. إن بولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA) هو مادة شبه بلورية (semicrystalline) مع درجة تبلور (crystallinity) تعتمد على الوزن الجزيئي ومحددات أو بارامترات المعالجة. وهو يمتاز أيضاً بمتانة شد عالية ومعامل شد عالٍ، وتبلغ نقطة انصهاره ١٧٠ درجة مئوية وتتراوح درجة حرارة تحوله الزجاجي ( $T_g$ ) بين ٦٠ و ٦٥ درجة مئوية. ومن ناحية أخرى، فإن بولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (PDLLA) هو مادة غير متبلورة (amorphous) مع درجة حرارة تحول زجاجي ( $T_g$ ) تتراوح بين ٥٥ و ٦٠ درجة مئوية. إن البنى الكيميائية للبولي (حمض اللاكتيك) (PLA) والبولي (حمض الغليكولايد) (PGA) متشابهة باستثناء أن البولي (حمض اللاكتيك) (PLA) يمتلك مجموعة متدلّية من الميثيل (pendant methyl group) مما يجعله أكثر كُرْهًا للماء (hydrophobic)، وبالتالي أكثر مقاومة لهجوم الحلمهي (hydrolytic attack) (التحلل بالماء) من البولي (حمض الغليكولايد) (PGA). وهذا يؤدي إلى حدوث اختلافات في الطاقات الحركية لتحلل البوليمرين وبالتالي يتم التحكم في معدل تحلل بوليمرهما المشترك البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) من خلال النسبة التي يتواجد بهما هذين البوليمرين [3]. ويخضع كلٌّ من البولي (حمض اللاكتيك) (PLA)، والبولي (حمض الغليكولايد) (PGA)، والبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) إلى تحلل كتلي عن طريق الحلمهة العشوائية لروابط الإستر الخاصة بهم، حيث يتم فقدان المادة من الحجم الكلي للبوليمر في نفس الوقت نظراً إلى تغلغل أو اختراق الماء في كتلة حامله الخلايا والأنسجة. يتحلل البولي (حمض اللاكتيك) (PLA) لتكوين حمض اللاكتيك، الذي يوجد بصورة طبيعية في الجسم، ويدخل في دورة الحمض الثلاثي الكربوكسيل (tricarboxylic acid - TCA) ليتم إفرازه على شكل ماء وثنائي أكسيد الكربون. ويتحلل البولي (حمض الغليكولايد) (PGA) عن طريق الحلمهة (التحلل بالماء) وعن طريق إنزيمات الإستراز (esterases) وإنزيمات الكربوكسي بيتيداز

(carboxypeptidases) غير المحددة. ويتم إفراز الموحد أو المونومر حمض الغليكوليك عن طريق البول أو يدخل في دورة الحمض الثلاثي الكربوكسيل (TCA) [3]. وتتضمن بعض سليلات البوليسترات الأليفاتية الخصائص الميكانيكية الرديئة وإطلاق منتجات تحلل حمضية وإمكانية المعالجة المحدودة [209].

إن البولي كابرولاكتون (PCL) هو بوليستر شبه بلوري وينصهر عند درجة حرارة حوالي ٦٠ درجة مئوية وتبلغ درجة حرارة تحوله الزجاجي ( $T_g$ ) ناقص ٦٠ درجة مئوية. ويتحلل بمعدل أبطأ بكثير مقارنة مع البوليسترات الأليفاتية الأخرى؛ وبالتالي يتم استخدامه وعلى نطاق واسع في مجال توصيل الدواء المتحكم به على المدى الطويل. فهو مرن ويسهل معالجته بالإضافة إلى أنه ثابت أو مستقر بنيويًا وحراريًا، في حين أنه في الوقت نفسه أقل حساسية للتغيرات البيئية [85]. وهو يمتاز بقدرة استثنائية على تشكيل الخلائط باستخدام مجموعة متنوعة من البوليمرات؛ مما يجعله مادة تُستخدم بصورة واسعة من أجل تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة، وبصفة خاصة فيما يتعلق بتطبيقات هندسة الأنسجة الغضروفية والأنسجة العظمية [4]. ويتحلل البولي كابرولاكتون (PCL) بالحلقة عبر كل من التآكل الكتلي والسطحي مع أحماض ٥-هيدروكسي هيكسانويك (5-hydroxyhexanoic acids) (أحماض الكابروييك) (caproic acids) كونها منتج التحلل [17].

#### (٣،٤،٢) البولي فوماراتات Polyfumarates

إن البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) هو الأكثر دراسةً وعلى نطاق واسع من فئة البوليسترات المشتركة المبنية على حمض الفوماريك (fumaric acid). وهو يُسَّر بالخير كمادة لهندسة الأنسجة العظمية [212] وذلك من أجل ملء أو تعبئة العيوب الهيكلية العظمية حيث أنه يمتاز بالخصائص الميكانيكية المشابهة للخصائص الميكانيكية للعظم التريبيقي (trabecular bone) ويمتلك القدرة على العلاج بشكلٍ موضعي مما يُمكن من ملء العيوب الهيكلية العظمية أيًا كان شكلها أو حجمها بأقل تدخل [213]. وتتوفر البوليمرات المبنية على أساس البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) على شكل أنظمة قابلة للحقن، والتي تُستخدم طريقة الربط الكيميائي المستعرض أو المتشابك (chemical cross-linking)؛ مما يسهل معالجة الشقوق العميقة في العظم وعيوب الأشكال غير المنتظمة عن طريق ربطها بشكلٍ مستعرض أو متشابك في الموضع [214]. ويمتلك البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) مواقع غير مشبعة (unsaturated sites) في جزئه الأساسي والتي تُستخدم في تفاعلات الربط المستعرض أو المتشابك؛ مما يؤدي إلى إنتاج بُنى معقدة [209]. وحيث إنه من الصعب إنجاز أو الحصول على بولي (بروبيلين فومارات) (PPF) ذي وزن جزيئي كبير نظرًا للتفاعلات الجانبية الناتجة عن وجود الرباط المزدوج للجزء الأساسي، فإنه يتم دمجها بالسيراميك مثل ثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCP) أو كربونات الكالسيوم أو سلفات (كبريتات) الكالسيوم (calcium sulfate) وذلك لتحسين خصائصه الميكانيكية [209,214]. ولم يزد بيتا-ثلاثي فوسفات الكالسيوم ( $\beta$ -TCP) المتانة الميكانيكية فحسب بل عمل أيضًا كحاجز أو عازل (buffer) عن طريق التقليل من تغير درجة الحموضة (pH) إلى الحد الأدنى أثناء عملية التحلل [214]. وقد استنتج Peter وآخرون [215] بأنه من الممكن تحضير معاجين البولي (بروبيلين فومارات) / بيتا-ثلاثي فوسفات الكالسيوم (PPF /  $\beta$ -TCP) بمعالجة الخصائص المناسبة من أجل التطبيقات

السريرية لجراحة تقويم العظام (orthopaedic) وقد وجدوا أن الخصائص الميكانيكية للمركبات التي تمت معالجتها مناسبة من أجل استبدال العظم التريفيقي. وقد قاموا أيضاً بدراسة التحلل والتوافقية الحيوية في الجسم الحي لمركبات البولي (بروبيلين فومارات) / بيتا-ثلاثي فوسفات الكالسيوم (PPF /  $\beta$ -TCP) ووجدوا بأنها تثير الاستجابة الالتهابية الأولية التي تصحب عملية التغليف الليفي (fibrous encapsulation) الرقيق [216]، وقد وجدوا أيضاً أن هذا المركب موصل للعظم في المختبر [217]. وقد تم ربط البولي (بروبيلين فومارات) / بيتا - ثلاثي فوسفات الكالسيوم (PPF /  $\beta$ -TCP) بشكل متشابك أو مستعرض مع بوليمرات أخرى مثل بولي (غليكول الإثيلين) - ثنائي ميثا كريات (PEG - DMA) [218]، في حين أنه تمت تقوية بعض مركبات البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) بجسيمات نانوية [20] وذلك لتعزيز خصائصها الميكانيكية من أجل تطبيقات هندسة أنسجة جراحة تقويم العظام. وقد تم أيضاً استخدام مركبات البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) بصورة ناجحة كناقلات من الكريات المايكروية الدقيقة التي تحمل الأدوية النموذجية [219] أو الجسيمات المايكروية الدقيقة التي تُغلف الخلايا البانية للعظم من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة العظمية [220]. وُجد أن النشاط الحيوي للبولي (بروبيلين فومارات) (PPF) قد تعزز في الجسم الحي من خلال دمج الهيدروكسي آباتيت النانوي (nano - HA) [221]، في حين أنه وُجد أن البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) المغلف بـ ( $\beta$ 1-TGF-rh) يُحفز بصورة كافية تكوين العظم في قحف أو جمجمة (cranium) الأرانب [222]. وتخضع بعض الفومارات الجديدة مثل البولي (فومارات E-كابرولاكتون) poly ( $\epsilon$ -caprolactone fumarate) [223] والبولي (فومارات غليكول الإثيلين) poly (ethylene glycol fumarate) وبوليمرهما المشترك للدراسة من أجل التطبيقات المتنوعة لهندسة الأنسجة [224]. ويخضع البولي (بروبيلين فومارات) (PPF) للتحلل الكتلي أو الحجمي عن طريق الحلمهة (التحلل المائي) وذلك لإنتاج حمض الفوماريك الذي يعتبر مادة تنشأ طبيعياً في دورة الحمض الثلاثي الكربوكسيل (دورة كريب (Kreb's cycle)، وغليكول البروبيلين (propylene glycol) [209].

### (٣, ٤, ٣) البولي أنهيدريدات Polyanhydrides

البولي أنهيدريدات هي بوليمرات تتآكل سطحياً وذات ثبات أو استقرار حلمهي منخفض؛ مما يجعلها مواد مثالية مرشحة للتطبيقات الخاصة بتوصيل الدواء [225]. ولديها جزء أساسي كاره للماء (hydrophobic) بشكل كبير مما يحول دون اختراق أو تسرب الماء إلى الجزء الداخلي من حامله الخلايا والأنسجة، ورباط أنهيدريد حساس للحلمهة يقوم على اقتصار التحلل على السطح؛ مما يؤدي إلى إنتاج طاقات حركية لفقدان خطي للكتلة وطاقات حركية لإطلاق الدواء في النظام الصفري (zero - order) (عند انعدام حركية النظام) وذلك عندما يتم استخدامها كأنظمة لتوصيل الدواء [210, 226]. وتساهم سرعة تحللها في ضعف خصائصها الميكانيكية مما يحفز على دمج شرائح أو قطع من الإيميد (imide) لإنشاء حاملات خلايا وأنسجة من البولي (أنهيدريد-كو-إيميد) poly (anhydride-co-imide) [227]، وتُستخدم بشكل خاص من أجل تطبيقات جراحة تقويم العظام [228]. وقد درس Ibim وآخرون [229] التوافقية الحيوية والتوافقية العظمية (osteocompatibility) للبولي (أنهيدريد-كو-إيميد) ووجدوا بأنها تُنتج نمو بطانة العظم (endosteal bone) ونمو العظم القشري (cortical bone) وتُحدث استجابة في النسيج الموضعي مشابهة للبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA). وقد أيدوا استخدام هذه البوليمرات في تطبيقات جراحة تقويم العظام

التي تتحمل الوزن. واستخدم Burkoth وآخرون [230] ارتشاح أو انفاذ مولد المسام؛ وذلك لإنشاء بُنى من البولي أنهيدريد (polyanhydride) يمكن تعبئتها لاحقاً بخلايا بانية للعظم وتغليفها في هلام مائي لإنشاء طعم خيفي اصطناعي (synthetic allograft) من المحتمل استخدامه في هندسة العظم. ومن الممكن تعديل معدل تحلل البولي أنهيدريدات، التي تتحلل عن طريق حلمهة رباط الأنهيدريد (anhydride linkage)، من خلال إجراء تغييرات طفيفة في بنية الجزء الأساسي للبوليمر وذلك عبر الاختيار الحكيم لمونومر (موحود) حمضي ثنائي القاعدة (diacid monomer) [209]. إن الجمع بين كميات مختلفة من هذه المونومرات (المواحد) يمكن أن يُنتج بوليمرات ذات خصائص تحلل مصممة حسب الطلب [214].

### ٣,٤,٤) البولي (أورثو إسترات) Poly (Ortho Esters)

تخضع البولي (أورثو إسترات) (Poly (ortho esters) - POEs) للتآكل السطحي (surface erosion) ويمكن التحكم بمعدل التحلل عن طريق استخدام ديولات (diols) تتسم بدرجات مختلفة من مرونة السلسلة أو بدمج سواغات (excipients) حمضية أو قاعدية [210]. وقد وجد Andriano وآخرون [231] بأن البولي (أورثو إستر) (POE) يمتاز بتحكم أفضل بفقدان كتلة البوليمر عند تكوين أنسجة جديدة بالإضافة إلى أنه يمتاز بكمال بنيوي أفضل عند نسبة ٥٠:٥٠ من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA). وقد وُجد أيضاً أن الكثافة المعدنية للعظم في حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (أورثو إستر) (POE) أكبر بنسبة ٢٥٪ من حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA)، على الرغم من أن كمية العظم الذي تكوّن كان غير هام (قليل). وقد افترض Ng وآخرون [232] بأن الاختيار الملائم للديولات ونسبها يمكن أن يؤدي إلى تكوين بولي (أورثو إسترات) (POEs)، حيث كانت عبارة عن سوائل لزجة في درجة حرارة تتراوح في المجال بين ٣٧ و ٤٥ درجة مئوية، والتي تحولت إلى مواد شديدة اللزوجة وغير قابلة للتشوه أو تغيير الشكل عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية أو أقل. ويمكن أن يُستخدم هذا بشكل مفيد جداً في الحالات التي يمكن أن تُحقن فيها المواد التي يتم تسخينها بشكلٍ طفيف في الموقع المطلوب من الإصابة أو موقع توصيل الدواء، حيث إنها تتصلب لاحقاً عند درجة حرارة الجسم في حاملات الخلايا والأنسجة المحتملة، التي تقوم بإطلاق أو تحرير الدواء. ويمكن إنجاز أو تحقيق عملية دمج البروتينات أو المستضدات (antigens) عن طريق المزج البسيط مع البوليمر معتدل الدفء بدون الحاجة إلى مذيبات أو ماء. وقد وجد Kellomaki وآخرون [233] أن معدل الحلمهة (التحلل المائي) للبولي (أورثو إسترات) (POEs)، حيث يتم قياسه عن طريق فقدان متانة البوليمرات، يكون سريعاً جداً من أجل التطبيقات المتعلقة بجراحة تقويم العظام التي تتحمل الوزن. وقد استخدم Ng وآخرون [232] البولي (أورثو إسترات) (POEs) التي تحتوي على كميات مختلفة من شرائح أو أجزاء مثبوتة (dimer) (مزدوجة الصيغة الجزيئية) من حمض الغليكوليك في الجزء الأساسي من البوليمر (الركيزة الأساسية للبوليمر) وذلك من أجل التحكم بدقة في معدل التآكل الناجم عن الطاقات الحركية في النظام الصفري (عند انعدام حركية النظام). فعندما يُوضع هذا البوليمر في بيئة مائية، فإنه يتحلل بواسطة الحلمهة (التحلل المائي) لإنتاج حمض الغليكوليك الذي يُحفز حلمهة روابط البولي (أورثو إسترات) (POEs) في الجزء الأساسي من البوليمر. وهكذا، ومن خلال تغيير كمية الجزء الحمضي في الركيزة الأساسية للبوليمر فإنه يمكن للمرء ضبط معدل التحلل بشكلٍ دقيق من بضعة أيام إلى عدة أشهر [210].

**٣، ٤، ٥) بولي (الأحماض الأمينية) أو البولي كربونات Poly (Amino Acids) Or Polycarbonates**

إن بولي (الأحماض الأمينية) أو البولي كربونات الاصطناعي مشابهة جداً للبروتينات التي تنشأ بصورة طبيعية إلا أنها تمتلك معدلات تحلل منخفضة وخصائص ميكانيكية غير مُفضَّلة واسْتِمْناعاً [234]. وبالتالي، يتم استخدام الأحماض الأمينية كبلوكات (وحدات) بناءً مونومرية أو أحادية في البوليمرات التي تفتقر إلى بنية الركيزة الأساسية التقليدية التي توجد في الببتيدات وذلك من أجل التغلب على هذه السليبيات [234]. إن البولي كربونات المشتقة من التيروسين (Tyrosine) هي الأكثر دراسة وعلى نطاقٍ واسعٍ من هذه المجموعة وتقع درجة حرارتها تحولها الزجاجي ( $T_g$ ) في المجال بين ٥٢ و ٩٣ درجة مئوية وتتجاوز درجة حرارتها تفككها أو تحللها الـ ٢٩٠ درجة مئوية [234]. وتتم حلمهة رابط الكربونات في الركيزة الأساسية بصورة أسرع من رابط الإستر في السلسلة المتدلّية، ما عدا في الظروف الحمضية جداً ( $\text{pH} \leq 3$ ) عندما يحصل تبدل في المعدلات ناتج عن التحلل المائي المحفَّز حمضياً لرابط الإستر [235]. إن منتجات التحلل النهائية للبولي كربونات في المختبر هي ديس إمينو تيروسيل - تيروسين (desaminotyrosyl - tyrosine) والكحول في حين أنه يمكن للمرء توقع تحلل الأول بفعل الإنزيمات في الجسم الحي إلى ديس إمينو تيروسين (desaminotyrosine) وإل - تيروسين (L - tyrosine) [234]. ومن منظور التحلل-التوافقية الحيوية، فقد وُجد أن البولي كربونات المشتقة من التيروسين مشابهة لبولي (حمض اللاكتيك) (PLA) عندما تمت دراستها في نموذج تجويف عظم الكلب [236] وقد أظهرت قدرة جيدة في استخدامها كمادة زراعية أو غرس في جراحة تقويم العظام [237]. وللتقليل من الاستقرار الحلمي للبولي كربونات، فقد تم استبدال أكسجين الكربونيل (carbonyl oxygen) بمجموعة إيمينو (imino)؛ مما أدى إلى إنتاج بولي إيمينو كربونات (polyiminocarbonates) ذات الألياف القابلة للتحلل بواسطة الحلمهة والتي حافظت على متانة البولي كربونات [238]. وقد أظهرت البولي كربونات التي تمتلك مجموعة متدلّية من إيثيل إستر (ethyl ester) أنها موصلة جداً للعظم، مع نمو جيد للعظم وهي تمتلك خصائص ميكانيكية كافية من أجل مثبتات العظام التي تتحمل الوزن [209]. وقد استخدم Meechaisue وآخرون [239] الغزل الكهربائي لتصنيع حصيرة أو شريحة (mat) من ألياف البولي (دي تي إي كربونات) (poly (DTE carbonate) كمادة حاملة للأنسجة والتي تدعم التصاق وتكاثر ثلاثة أنواع مختلفة من الخلايا.

**٣، ٤، ٦) البولي فوسفازينات Polyphosphazenes**

تمتلك البولي فوسفازينات (polyphosphazenes) أساساً غير عضوي من ذرات الفسفور والنتروجين المتناوبة والتي يمكن جعلها غير مستقرة بواسطة الحلمهة وذلك عن طريق استبدالها بمجموعة جانبية عضوية مناسبة على ذرات الفسفور. إن توافقيتها الحيوية الجيدة ومرونتها الاصطناعية وعدم استقرارها الحلمي ومنتجات تحللها غير السامة وسهولة تصنيعها ونفاذية مصفوفتها جعلها قابلة للتكيف بشكلٍ كبيرٍ من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة [210] وتوصيل الدواء [240] وتوصيل الجينات [241]. وتوفر خاصية التكافؤ الحماسي للفسفور في البولي فوسفازينات مواقع نشطة من أجل التصاق جزئيات الدواء. إن منتجات تحلل تلك البوليمرات هي الفُسْفَات (phosphates) والأمونيا (ammonia) والمجموعات الجانبية المقابلة، وهي جميعها طبيعية وغير سامة [210]. وقد عدلَ Laurencin وآخرون [242] نمو الخلايا وتحلل البوليمر عن طريق

تغيير طبيعة السلاسل الجانبية غير المستقرة بواسطة الحلمهة للبولي فوسفازينات. وقد وجدوا أن البوليمر يدعم التصاق وتكاثر الخلايا البانية للعظم مظهرين القدرة على تجديد الأنسجة الهيكلية [243]. وقد قام Ambrosio وآخرون [244] و Krogman وآخرون [245] بتصميم خلائط من البولي فوسفازينات مع البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) لتقليل الحموضة لمنتجات تحلل البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) وذلك من خلال تحييد التأثير الناتج عن طريق منتجات تحلل البولي فوسفازين. وقد وُجد أن شبكات ألياف النانو غير المحبُوكَة (nonwoven)، والتي تم إنشاؤها عن طريق الغزل الكهربائي تقوم على تعزيز التصاق وتكاثر الخلايا المشابهة للخلايا البانية للعظم [246]. وقد شكّل Greish وآخرون [247] مركبات من الهيدروكسي آباتيت (HA) والبولي فوسفازينات عند درجات حرارة فيزيولوجية عبر عملية الذوبان - الترسُّب (dissolution - precipitation process)، والتي نتج عنها بيئة قلبية بشكلٍ معتدل مناسبة من أجل إزالة بروتونات البولي فوسفازين الحمضي وتشكيل روابط الكالسيوم المتشابكة. وقد استخدم Carampin وآخرون [248] الغزل الكهربائي لتوليد مصفوفات مسطحة أو أنبوبية من البولي فوسفازين تحتوي على ألياف رفيعة جداً لمحاكاة الأوعية الدموية. وقد شكّلت الخلايا البطانية العصبية الوعائية الدقيقة طبقة أحادية على كامل السطح بعد ١٦ يوماً من الحضانة، مما يدل بالتالي على جدوى هذا البوليمر لتشكيل الأنسجة البشرية مثل الأوعية والصمامات القلبية.

### (٣, ٤, ٧) المواد المركبة Composites

كما تمت مناقشته في وقتٍ سابق، فإن حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من المواد المركبة تسمح بتفصيل أو تشكيل الخصائص الميكانيكية ومعدلات الارتشاف وفقاً للاحتياجات المحددة لموقع زراعة الطُعم، بالإضافة إلى تعزيز النشاط الحيوي [5,14,21]. ويكون استخدام المواد المركبة في الغالب في مجالات هندسة الأنسجة العظمية الهيكلية، وبشكلٍ أساسي العظم، حيث إنه المكان الذي يكون فيه تشكيل الخصائص الميكانيكية هو الأكثر أهمية. وتشتمل مجموعات المواد المركبة الأكثر استخداماً على: الهيدروكسي آباتيت (HA) أو ثلاثي فوسفات الكالسيوم (TCP) أو جسيمات الزجاج النشط حيوياً أو الألياف المستخدمة كحشوات أو طبقات غلاف خارجي أو كلاهما على حدٍ سواء في البولي (حمض اللاكتيك) (PLA) أو البولي (حمض الغليكولايد) (PGA) أو غيرها من البوليمرات القابلة للارتشاف [14,21]. وقد أدرج Zhang و Ma [249] الهيدروكسي آباتيت (HA) في البولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLLA) والبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة من أجل هندسة الأنسجة العظمية والتي كان لها خصائص توصيل عظمي أفضل بالإضافة إلى قدرة درء أعلى وخصائص ميكانيكية مُحسَّنة. وقد استخدم Marra وآخرون [250] خلائط من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA)، والبولي كابرولاكتون (PCL)، والهيدروكسي آباتيت (HA) بينما قام Roether وآخرون [14] بتصنيع رغوات من البولي (دي إل - حمض اللاكتيك) (PDLA) المغلفة والمشربة (impregnated) بالزجاج الحيوي كحاملات خلايا وأنسجة من أجل هندسة الأنسجة العظمية. وقد أنشأ Taboas وآخرون [40] حاملات خلايا وأنسجة ثنائية الطور ذات مناطق متشابكة ميكانيكياً من البولي (حمض اللاكتيك) (PLA) والهيدروكسي آباتيت (HA) المتلبّد أو المتصلب والتي لها مسامات كروية واسعة بمحجم ٦٠٠ مايكرومتر و ٥٠٠ مايكرومتر، على التوالي.

## CONCLUSIONS (٣,٥) الاستنتاجات

تشكل حاملات الخلايا والأنسجة واحداً من أهم مكونات بنية هندسة الأنسجة. وقد تمت مناقشة وظائفها ومتطلباتها وطرق تصنيعها وتعديلاتها بالإضافة إلى مواد حاملات الخلايا والأنسجة الاصطناعية المستخدمة عادةً وذلك بهدف إقناع القارئ بكمية البحوث التي يجري القيام بها لإنشاء حاملات خلايا وأنسجة مثالية. ويجب على المرء أن يُقدّر أن متطلبات الأنسجة المختلفة في الجسم هي فريدة من نوعها وعلى الرغم من أن معظم مواد حاملات الخلايا والأنسجة تلي هذه المتطلبات وبدرجات متفاوتة، إلا أن هناك بعض المواد أو تركيبات من المواد تصلح بشكل أفضل لتطبيقات محددة. وسيكون من المفيد للغاية، ولكنه من الصعب، القيام بمقارنة بين أفضل مرشحي المواد الحيوية من أجل تطبيقات الأنسجة المختلفة من خلال النظر في مجموعة مشتركة من المحددات أو البارامترات وإجراء التقييم وذلك لتحديد أي واحدة من المواد الحيوية ستعمل بشكل أفضل. ومع تقنيات تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة الناشئة حديثاً مثل الغزل الكهربائي بالإضافة إلى التعديل المستمر للطرق القائمة، مثل طباعة الخلايا والأعضاء، وجنباً إلى جنب مع ظهور المواد المركبة والهجينة وكذلك فوائد إضافة الجسيمات النانوية / المركبات النانوية، فإن السعي من أجل إيجاد أفضل حاملات للخلايا والأنسجة يبدو أنه في متناول اليد في المستقبل غير البعيد جداً.

## REFERENCES المراجع

- [1] Langer, R. and J.P. Vacanti, Tissue engineering. Science, 1993, 260(5110): 920–926.
- [2] Muschler, G.F., C. Nakamoto, and L. Griffith, Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. J. Bone Joint Surg., 2004, 86-A(7): 1541–1558.
- [3] Agrawal, C.M. and R.B. Ray, Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. J. Biomed. Mater. Res., 2001, 55(2): 141–150.
- [4] Hutmacher, D.W., T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, and K.C. Tan, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. J. Biomed. Mater. Res., 2001, 55(2): 203–216.
- [5] Boccaccini, A.R. and J.J. Blaker, Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. Expert Rev. Med. Devices, 2005, 2(3): 303–317.
- [6] Velema, J. and D. Kaplan, Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2006, 102: 187–238.
- [7] Rickert, D., A. Lendlein, I. Peters, M.A. Moses, and R.-P. Franke, Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: An overview. Eur. Arch. Otorhinolaryngol., 2006, 263: 215–222.
- [8] Hutmacher, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529–2543.
- [9] Vert, M., S.M. Li, G. Spenlehauer, and P. Guerin, Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. J. Mater. Sci.: Mater. Med., 1992, 3(6): 432–446.
- [10] Agrawal, C.M. and K.A. Athanasiou, Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. J. Biomed. Mater. Res., 1997, 38(2): 105–114.

- [11] Hutmacher, D.W., A. Kirsch, K.L. Ackermann, and M.B. Hurzeler, A tissue engineered cell-occlusive device for hard tissue regeneration—a preliminary report. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 2001, 21(1): 49–59.
- [12] Maquet, V., A.R. Boccaccini, L. Pravata, I. Notinger, and R. Jerome, Porous poly( $\alpha$ -hydroxyacid)/Bioglass® composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterisation. *Biomaterials*, 2004, 25(18): 4185–4194.
- [13] Shikinami, Y. and M. Okuno, Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials*, 1999, 20(9): 859–877.
- [14] Roether, J.A., J.E. Gough, A.R. Boccaccini, L.L. Hench, V. Maquet, and R. Jerome, Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2002, 13(12): 1207–1214.
- [15] Stamboulis, A., L.L. Hench, and A.R. Boccaccini, Mechanical properties of biodegradable polymer sutures coated with bioactive glass. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2002, 13(9): 843–848.
- [16] Rezwan, K., Q.Z. Chen, J.J. Blaker, and A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27(18): 3413–3431.
- [17] Ang, K.C., K.F. Leong, C.K. Chua, and M. Chandrasekaran, Compressive properties and degradability of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 80A(3): 655–660.
- [18] Freeman, J.W., M.D. Woods, and C.T. Laurencin, Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design. *J. Biomech.*, 2007, 40(9): 2029–2036.
- [19] Webster, T.J. and E.S. Ahn, Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 2007, 103: 275–308.
- [20] Horch, R.A., N. Shahid, A.S. Mistry, M.D. Timmer, A.G. Mikos, and A.R. Barron, Nanoreinforcement of poly(propylene fumarate)-based networks with surface modified alumoxane nanoparticles for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2004, 5(5): 1990–1998.
- [21] Misra, S.K., S.P. Valappil, I. Roy, and A.R. Boccaccini, Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2006, 7(8): 2249–2258.
- [22] Hench, L.L., *Bioceramics. J. Am. Ceram. Soc.*, 1998, 81(7): 1705–1728.
- [23] Bilodeau, K. and D. Mantovani, Bioreactors for tissue engineering: Focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Eng.*, 2006, 12(8): 2367–2383.
- [24] Androjna, C., R.K. Spragg, and K.A. Derwin, Mechanical conditioning of cell-seeded small intestine submucosa: A potential tissue-engineering strategy for tendon repair. *Tissue Eng.*, 2007, 13(2): 233–243.
- [25] Mahmoudifar, N. and P.M. Doran, Tissue engineering of human cartilage in bioreactors using single and composite cell-seeded scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 91(3): 338–355.
- [26] Darling, E.M. and K.A. Athanasiou, Articular cartilage bioreactors and bioprocesses. *Tissue Eng.*, 2003, 9(1): 9–26.
- [27] Jeong, S.I., J.H. Kwon, J.I. Lim, S.-W. Cho, Y. Jung, W.J. Sung, S.H. Kim, Y.H. Kim, Y.M. Lee, B.-S. Kim, C.Y. Choi, and S.-J. Kim, Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile bioreactors and elastic PLCL scaffolds. *Biomaterials*, 2005, 26(12): 1405–1411.
- [28] Shachar, M. and S. Cohen, Cardiac tissue engineering, ex-vivo: Design principles in biomaterials and bioreactors. *Heart Fail. Rev.*, 2003, 8(3): 271–276.
- [29] Akhyari, P., P.W.M. Fedak, R.D. Weisel, T.-Y.J. Lee, S. Verma, D.A.G. Mickle, and R.-K. Li, Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation*, 2002, 106(12 (Supplement I)): I-137–I-142.

- [30] Yarlagadda, P.K.D.V., M. Chandrasekharan, and J.Y.M. Shyan, Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed. Mater. Eng.*, 2005, 15(3): 159–177.
- [31] Moroni, L., J.A.A. Hendriks, R. Schotel, J.R.D. Wijn, and C.A.V. Blitterswijk, Design of biphasic polymeric 3-dimensional fiber deposited scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Tissue Eng.*, 2007, 13(2): 361–371.
- [32] Liu, X., Y. Won, and P. Ma, Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27(21): 3980–3987.
- [33] Li, J., A. Beaussart, Y. Chen, and A.F. Mak, Transfer of apatite coating from porogens to scaffolds: Uniform apatite coating within porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) scaffold in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 80(1): 226–233.
- [34] Cai, K., K. Yao, Z. Yang, and X. Li, Surface modification of three-dimensional poly(D,L-lactic acid) scaffolds with baicalin: A histological study. *Acta Biomater.*, 2007, 3(4): 597–605.
- [35] Koegler, W.S. and L.G. Griffith, Osteoblast response to PLGA tissue engineering scaffolds with PEO modified surface chemistries and demonstration of patterned cell response. *Biomaterials*, 2004, 25(14): 2819–2830.
- [36] Tiaw, K.S., S.W. Goh, M. Hong, Z. Wang, B. Lan, and S.H. Teoh, Laser surface modification of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) membrane for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2005, 26(7): 763–769.
- [37] Nakayama, Y., S. Nishi, H. Ishibashi-Ueda, and T. Matsuda, Surface microarchitectural design in biomedical applications: In vivo analysis of tissue ingrowth in excimer laser-directed micropored scaffold for cardiovascular tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, 51(3): 520–528.
- [38] Karande, T.S., J.L. Ong, and C.M. Agrawal, Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, permeability, architecture and nutrient mixing. *Ann. Biomed. Eng.*, 2004, 32(12): 1728–1743.
- [39] Yang, S., K.-F. Leong, Z. Du, and C.-K. Chua, The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng.*, 2002, 8(1): 1–11.
- [40] Taboas, J.M., R.D. Maddox, P.H. Krebsbach, and S.J. Hollister, Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer–ceramic scaffolds. *Biomaterials*, 2003, 24(1): 181–194.
- [41] Ishaug-Riley, S., G.M. Crane, M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, and A.G. Mikos, Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, 36(1): 17–28.
- [42] Sosnowski, S., P. Wozniak, and M. Lewandowska-Szumiel, Polyester scaffolds with bimodal pore size distribution of tissue engineering. *Macromol. Biosci.*, 2006, 6(6): 425–434.
- [43] Draghi, L., S. Resta, M.G. Pirozzolo, and M.C. Tanzi, Microspheres leaching for scaffold porosity control. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2005, 16(12): 1093–1097.
- [44] Oh, S.H., I.K. Park, J.M. Kim, and J.H. Lee, In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, 2007, 28(9): 1664–1671.
- [45] Woodfield, T.B., C.A.V. Blitterswijk, J.D. Wijn, T.J. Sims, A.P. Hollander, and J. Riesle, Polymer scaffolds fabricated with pore-size gradients as a model for studying the zonal organization within tissueengineered cartilage constructs. *Tissue Eng.*, 2005, 11(9–10): 1297–1311.
- [46] Harley, B.A., A.Z. Hastings, I.V. Yannas, and A. Sannino, Fabricating tubular scaffolds with a radial pore size gradient by a spinning technique. *Biomaterials*, 2006, 27(6): 866–874.
- [47] Mooney, D.J., K. McNamara, D. Hern, J.P. Vacanti, and R. Langer, Stabilized polyglycolic acid fibrebased tubes for tissue engineering. *Biomaterials*, 1996, 17(2): 115–124.

- [48] Vacanti, J.P., M.A. Morse, W.M. Saltzman, A.J. Domb, A. Perez-Atayde, R. Langer, C.L. Mazzoni, and C. Breuer, Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.*, 1988, 23: 3–9.
- [49] Freed, L.E., G. Vunjak-Novakovic, R.J. Biron, D.B. Eagles, D.C. Lesnoy, S.K. Barlow, and R. Langer, Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (NY)*, 1994, 12(7): 689–693.
- [50] Goldstein, A.S., G. Zhu, G.E. Morris, R.K. Meszlenyi, and A.G. Mikos, Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds. *Tissue Eng.*, 1999, 5(5): 421–433.
- [51] Agrawal, C.M., J.S. McKinney, D. Lanctot, and K.A. Athanasiou, Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2443–2452.
- [52] Wu, L. and J. Ding, Effects of porosity and pore size on in vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2005, 75(4): 767–777.
- [53] Lin, C.Y., N. Kikuchi, and S.J. Hollister, A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elastic properties with desired porosity. *J. Biomech.*, 2004, 37(5): 623–636.
- [54] Howk, D. and T.M. Chu, Design variables for mechanical properties of bone tissue scaffolds. *Biomed. Sci. Instrum.*, 2006, 42: 278–283.
- [55] Xie, J., M. Ihara, Y. Jung, I.K. Kwon, S.H. Kim, Y.H. Kim, and T. Matsuda, Mechano-active scaffold design based on microporous poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) for articular cartilage tissue engineering: Dependence of porosity on compression force-applied mechanical behaviors. *Tissue Eng.*, 2006, 12(3): 449–458.
- [56] Moroni, L., J.R.D. Wijn, and C.A.V. Blitterswijk, 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials*, 2006, 27(7): 974–985.
- [57] Griffon, D.J., M.R. Sedighi, D.V. Schaeffer, J.A. Eurell, and A.L. Johnson, Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater.*, 2006, 2(3): 313–320.
- [58] Lee, K.W., S. Wang, L. Lu, E. Jabbari, B.L. Currier, and M.J. Yaszemski, Fabrication and characterization of poly(propylene fumarate) scaffolds with controlled pore structures using 3-dimensional printing and injection molding. *Tissue Eng.*, 2006, 12(10): 2801–2811.
- [59] Suh, S.W., J.Y. Shin, J. Kim, J. Kim, C.H. Beak, D.-I. Kim, H. Kim, S.S. Jeon, and I.-W. Choo, Effect of different particles on cell proliferation in polymer scaffolds using a solvent-casting and particulate leaching technique. *ASAIO J.*, 2002, 48: 460–464.
- [60] Hou, Q., D.W. Grijpma, and J. Feijen, Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials*, 2003, 24: 1937–1947.
- [61] Murphy, W.L., R.G. Dennis, J.L. Kileny, and D.J. Mooney, Salt fusion: An approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng.*, 2002, 8(1): 43–52.
- [62] Gross, K.A. and L.M. Rodriguez-Lorenzo, Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2004, 25(20): 4955–4962.
- [63] Hou, Q., D.W. Grijpma, and J. Feijen, Preparation of interconnected highly porous polymeric structures by a replication and freeze-drying process. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 67(2): 732–740.
- [64] Darling, A.L. and W. Sun, 3D microtomographic characterization of precision extruded poly-epsilon-caprolactone scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, 2004, 70B(2): 311–317.
- [65] Wang, F., L. Shor, A. Darling, S. Khalil, W. Sun, S. Guceri, and A. Lau, Precision extruding deposition and characterization of cellular poly-epsilon-caprolactone tissue scaffolds. *Rapid Prototyp. J.*, 2004, 10(1): 42–49.

- [66] Moore, M.J., E. Jabbari, E.L. Ritman, L. Lu, B.L. Currier, A.J. Windebank, and M.J. Yaszemski, Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, 71(2): 258–267.
- [67] Li, S.H., J.R.D. Wijn, P. Layrolle, and K. de Groot, Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 61: 109–120.
- [68] Agrawal, C.M., J.S. McKinney, D. Huang, and K.A. Athanasiou, The use of the vibrating particle technique to fabricate highly porous and permeable biodegradable scaffolds, in *Synthetic Bioabsorbable Polymers for Implants*, ASTM STP 1396, C.M. Agrawal, J.E. Parr, and S.T. Lin, Editors. 2000, American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA. pp. 99–114.
- [69] LeBaron, R.G. and K.A. Athanasiou, Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21: 2575–2587.
- [70] Athanasiou, K.A., J.P. Schmitz, and C.M. Agrawal, The effects of porosity on degradation of PLA-PGA implants. *Tissue Eng.*, 1998, 4: 53–63.
- [71] Li, S., J.R.D. Wijn, J. Li, P. Layrolle, and K. de Groot, Macroporous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio. *Tissue Eng.*, 2003, 9(3): 535–548.
- [72] Wang, H., J. Pieper, F. Peters, C.A. van Blitterswijk, and E.N. Lammé, Synthetic scaffold morphology controls human dermal connective tissue formation. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2005, 74(4): 523–532.
- [73] Hollister, S.J., C.Y. Lin, E. Saito, C.Y. Lin, R.D. Schek, J.M. Taboas, J.M. Williams, B. Partee, C.L. Flanagan, A. Diggs, E.N. Wilke, G.H. Van Lenthe, R. Muller, T. Wirtz, S. Das, S.E. Feinberg, and P.H. Krebsbach, Engineering craniofacial scaffolds. *Orthod. Craniofac. Res.*, 2005, 8(3): 162–173.
- [74] Huang, Y.C., Y.Y. Huang, C.C. Huang, and H.C. Liu, Manufacture of porous polymer nerve conduits through a lyophilizing and wire-heating process. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, 2005, 74(1): 659–664.
- [75] Spain, T.L., C.M. Agrawal, and K.A. Athanasiou, New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant. *Tissue Eng.*, 1998, 4(4): 343–352.
- [76] Neves, A.A., N. Medcalf, M. Smith, and K.M. Brindle, Evaluation of engineered meniscal cartilage constructs based on different scaffold geometries using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Tissue Eng.*, 2006, 12(1): 53–62.
- [77] Knackstedt, M.A., C.H. Arns, T.J. Senden, and K. Gross, Structure and properties of clinical coralline implants measured via 3D imaging and analysis. *Biomaterials*, 2006, 27(13): 2776–2786.
- [78] Tsang, V.L. and S.N. Bhatia, Fabrication of three-dimensional tissues. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 2007, 103: 189–205.
- [79] Widmer, M.S., P.K. Gupta, L. Lu, R.K. Meszlenyi, G.R.D. Evans, K. Brandt, T. Savel, A. Gurlek, C.W.P. Jr, and A.G. Mikos, Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials*, 1998, 19: 1945–1955.
- [80] Ma, P.X. and J.-W. Choi, Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.*, 2001, 7(1): 23–33.
- [81] Liu, X. and P.X. Ma, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.*, 2004, 32(3): 477–486.
- [82] Whang, K., T.K. Goldstick, and K.E. Healy, A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors. *Biomaterials*, 2000, 21: 2545–2551.
- [83] Li, J.P., J.R. de Wijn, C.A. van Blitterswijk, and K. de Groot, Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: Preparation and in vitro experiment. *Biomaterials*, 2006, 27(8): 1223–1235.
- [84] Sodian, R., P. Fu, C. Lueders, D. Szymanski, C. Fritsche, M. Gutberlet, S.P. Hoerstrup, H. Hausmann, T. Lueth, and R. Hetzer, Tissue engineering of vascular conduits: Fabrication of custom-made scaffolds using rapid prototyping techniques. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2005, 53(3): 144–149.

- [85] Zein, I., D.W. Hutmacher, K.C. Tan, and S.H. Teoh, Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, 23: 1169–1185.
- [86] Mooney, D.J., D.F. Baldwin, N.P. Suh, J.P. Vacanti, and R. Langer, Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 1996, 17(14): 1417–1422.
- [87] Harris, L.D., B.S. Kim, and D.J. Mooney, Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, 42(3): 396–402.
- [88] Maspero, F.A., K. Ruffieux, B. Muller, and E. Wintermantel, Resorbable defect analog PLGA scaffolds using CO<sub>2</sub> as solvent: Structural characterization. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 62: 89–98.
- [89] Cooper, A.I., Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. *J. Mater. Chem.*, 2000, 10(2): 207–234.
- [90] Montjovent, M.O., L. Mathieu, B. Hinz, L.L. Applegate, P.E. Bourban, P.Y. Zambelli, J.A. Manson, and D.P. Pioletti, Biocompatibility of bioresorbable poly(L-lactic acid) composite scaffolds obtained by supercritical gas foaming with human fetal bone cells. *Tissue Eng.*, 2005, 11(11–12): 1640–1649.
- [91] Yoon, J.J., J.H. Kim, and T.G. Park, Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2323–2329.
- [92] Sheridan, M.H., L.D. Shea, M.C. Peters, and D.J. Mooney, Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J. Control. Release*, 2000, 64: 91–102.
- [93] Ennet, A.B., D. Kaigler, and D.J. Mooney, Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 79(1): 176–184.
- [94] Kim, S.S., K.M. Ahn, M.S. Park, J.H. Lee, C.Y. Choi, and B.S. Kim, A poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 80(1): 206–215.
- [95] Nam, Y.S. and T.G. Park, Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, 47: 8–17.
- [96] Whang, K., D.C. Tsai, E.K. Nam, M. Aitken, S.M. Sprague, P.K. Patel, and K.E. Healy, Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, 42(4): 491–499.
- [97] Moshfeghian, A., J. Tillman, and S.V. Madhally, Characterization of emulsified chitosan-PLGA matrices formed using controlled-rate freezing and lyophilization technique. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 79(2): 418–430.
- [98] Nam, Y.S. and T.G. Park, Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials*, 1999, 20(19): 1783–1790.
- [99] Cao, Y., T.I. Croll, A.J. O'Connor, G.W. Stevens, and J. Cooper-White, Systematic selection of solvents for the fabrication of 3D combined macro- and microporous polymeric scaffolds for soft tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2006, 17(4): 369–402.
- [100] Guan, J., J.J. Stankus, and W.R. Wagner, Development of composite porous scaffolds based on collagen and biodegradable poly(ester urethane)urea. *Cell Transplantation*, 2006, 15(S1): S17–S27.
- [101] Gao, Y., W. Weng, K. Cheng, P. Du, G. Shen, G. Han, B. Guan, and W. Yan, Preparation, characterization and cytocompatibility of porous ACP/PLLA composites. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 79(1): 193–200.
- [102] Blaker, J.J., V. Maquet, R. Jerome, A.R. Boccaccini, and S.N. Nazhat, Mechanical properties of highly porous PDLLA/Bioglass composite foams as scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 2005, 1(6): 643–652.

- [103] Rowland, A.S., S.A. Lim, D. Martin, and J.J. Cooper-White, Polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation. *Biomaterials*, 2007, 28(12): 2109–2121.
- [104] Helen, W., C.L. Merry, J.J. Blaker, and J.E. Gough, Three-dimensional culture of annulus fibrosus cells within PDLLA/Bioglass composite foam scaffolds: Assessment of cell attachment, proliferation and extracellular matrix production. *Biomaterials*, 2007, 28(11): 2010–2020.
- [105] Gong, Y., L. He, J. Li, Q. Zhou, Z. Ma, C. Gao, and J. Shen, Hydrogel-filled polylactide porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B, Appl. Biomater.*, 2007, 82(1): 192–204.
- [106] Mo, X., H.J. Weber, and S. Ramakrishna, PCL–PGLA composite tubular scaffold preparation and biocompatibility investigation. *Int. J. Artif. Organs*, 2006, 29(8): 790–799.
- [107] Cao, Y., G. Mitchell, A. Messina, L. Price, E. Thompson, A. Penington, W. Morrison, A. O'Connor, G. Stevens, and J. Cooper-White, The influence of architecture on degradation and tissue ingrowth into three-dimensional poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 2006, 27(14): 2854–2864.
- [108] Chun, K.W., K.C. Cho, S.H. Kim, J.H. Jeong, and T.G. Park, Controlled release of plasmid DNA from biodegradable scaffolds fabricated using a thermally-induced phase-separation method. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2004, 15(11): 1341–1353.
- [109] Qiu, Q.Q., P. Ducheyne, and P.S. Ayyaswamy, Fabrication, characterization and evaluation of bioceramic hollow microspheres used as microcarriers for 3-D bone tissue formation in rotating bioreactors. *Biomaterials*, 1999, 20(11): 989–1001.
- [110] Borden, M., M. Attawia, Y. Khan, and C.T. Laurencin, Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: Design and evaluation. *Biomaterials*, 2002, 23(2): 551–559.
- [111] Borden, M., M. Attawia, and C.T. Laurencin, The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering: In vitro osteoconductivity studies. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 61(3): 421–429.
- [112] Borden, M., S.F. El-Amin, M. Attawia, and C.T. Laurencin, Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. *Biomaterials*, 2003, 24(4): 597–609.
- [113] Borden, M., M. Attawia, Y. Khan, S.F. El-Amin, and C.T. Laurencin, Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2004, 86(8): 1200–1208.
- [114] Jiang, T., W.I. Abdel-Fattah, and C.T. Laurencin, In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27(28): 4894–4903.
- [115] Kofron, M.D., J.A.J. Cooper, S.G. Kumbar, and C.T. Laurencin, Novel tubular composite matrix for bone repair. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 82(2): 415–425.
- [116] Leong, K.F., C.M. Cheah, and C.K. Chua, Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2363–2378.
- [117] Sachlos, E. and J.T. Czernuska, Making tissue engineering scaffolds work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cell. Mater.*, 2003, 5: 29–40.
- [118] Yang, S., K.-F. Leong, Z. Du, and C.-K. Chua, The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.*, 2001, 7(6): 679–689.
- [119] Schantz, J.-T., A. Brandwood, D.W. Hutmacher, H.L. Khor, and K. Bittner, Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2005, 16(9): 807–819.

- [120] Cao, T., K.-H. Ho, and S.-H. Teoh, Scaffold design and in vitro study of osteochondral coculture in a three-dimensional porous polycaprolactone scaffold fabricated by fused deposition modeling. *Tissue Eng.*, 2003, 9 (Supplement 1(4)): S103-S112.
- [121] Rohner, D., D.W. Huttmacher, T.K. Cheng, M. Oberholzer, and B. Hammer, In vivo efficacy of bonemarrow- coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 66B(2): 574-580.
- [122] Vozzi, G., C. Fliam, A. Ahluwalia, and S. Bhatia, Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. *Biomaterials*, 2003, 24(14): 2533-2540.
- [123] Wiria, F.E., K.F. Leong, C.K. Chua, and Y. Liu, Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomater.*, 2007, 3(1): 1-12.
- [124] Williams, J.M., A. Adewunmi, R.M. Schek, C.L. Flanagan, P.H. Krebsbach, S.E. Feinberg, S.J. Hollister, and S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, 2005, 26(23): 4817-4827.
- [125] Tan, K.H., C.K. Chua, K.F. Leong, C.M. Cheah, W.S. Gui, W.S. Tan, and F.E. Wiria, Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering. *Biomed. Mater. Eng.*, 2005, 15(1-2): 113-124.
- [126] Chua, C.K., K.F. Leong, K.H. Tan, F.E. Wiria, and C.M. Cheah, Development of tissue scaffolds using selective laser sintering of polyvinyl alcohol/hydroxyapatite biocomposite for craniofacial and joint defects. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2004, 15(10): 1113-1121.
- [127] Hao, L., M.M. Savalani, Y. Zhang, K.E. Tanner, and R.A. Harris, Selective laser sintering of hydroxyapatite reinforced polyethylene composites for bioactive implants and tissue scaffold development. *Proc. Inst. Mech. Eng. H, J. Eng. Med.*, 2006, 220(4): 521-531.
- [128] Cooke, M.N., J.P. Fisher, D. Dean, C. Rimnac, and A.G. Mikos, Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 64B(2): 65-69.
- [129] Sodian, R., M. Loebe, A. Hein, D.P. Martin, S.P. Hoerstrup, E.V. Potapov, H. Hausmann, T. Lueth, and R. Hetzer, Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *ASAIO J.*, 2002, 48(1): 12-16.
- [130] Arcaute, K., B.K. Mann, and R.B. Wicker, Stereolithography of three-dimensional bioactive poly (ethylene glycol) constructs with encapsulated cells. *Ann. Biomed. Eng.*, 2006, 34(9): 1429-1441.
- [131] Khalyfa, A., S. Vogt, J. Weisser, G. Grimm, A. Rechtenbach, W. Meyer, and M. Schnabelrauch, Development of a new calcium phosphate powder-binder system for the 3D printing of patient specific implants. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2007, 18(5): 909-916.
- [132] Seitz, H., W. Rieder, S. Irsen, B. Leukers, and C. Tille, Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B, Appl. Biomater.*, 2005, 74(2): 782-788.
- [133] Giordano, R.A., B.M. Wu, S.W. Borland, L.G. Cima, E.M. Sachs, and M.J. Cima, Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 1996, 8(1): 63-75.
- [134] Park, A., B. Wu, and L.G. Griffith, Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 1998, 9(2): 89-110.
- [135] Sherwood, J.K., S.L. Riley, R. Palazzolo, S.C. Brown, D.C. Monkhouse, M. Coates, L.G. Griffith, L.K. Landeen, and A. Ratcliffe, A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*, 2002, 23: 4739-4751.
- [136] Roy, T.D., J.L. Simon, J.L. Ricci, E.D. Rekow, V.P. Thompson, and J.R. Parsons, Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 66A: 283-291.

- [137] Lee, M., J.C. Dunn, and B.M. Wu, Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing. *Biomaterials*, 2005, 26(20): 4281–4289.
- [138] Dellinger, J.G., J. Cesarano, and R.D. Jamison, Robotic deposition of model hydroxyapatite scaffolds with multiple architectures and multiscale porosity for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 82(2): 383–394.
- [139] Varghese, D., M. Deshpande, T. Xu, P. Kesari, S. Ohri, and T. Boland, Advances in tissue engineering: Cell printing. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2005, 129(2): 470–472.
- [140] Smith, C.M., A.L. Stone, R.L. Parkhill, R.L. Stewart, M.W. Simpkins, A.M. Kachurin, W.L. Warren, and S.K. Williams, Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Eng.*, 2004, 10(9–10): 1566–1576.
- [141] Mironov, V., T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, and R.R. Markwald, Organ printing: Computer-aided jetbased 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21(4): 157–161.
- [142] Boland, T., V. Mironov, A. Gutowska, E.A. Roth, and R.R. Markwald, Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat. Rec. A. Discov. Mol., Cell. Evol. Biol.*, 2003, 272(2): 497–502.
- [143] Sun, W., A. Darling, B. Starly, and J. Nam, Computer-aided tissue engineering: Overview, scope and challenges. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2004, 39(Part 1): 29–47.
- [144] Hutmacher, D.W., M. Sittinger, and M.V. Risbund, Scaffold-based tissue engineering: Rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol.*, 2004, 22(7): 354–362.
- [145] Yeong, W.Y., C.K. Chua, K.F. Leong, and M. Chandrasekaran, Rapid prototyping in tissue engineering: Challenges and potential. *Trends Biotechnol.*, 2004, 22(12): 643–652.
- [146] Bryant, S.J., C.R. Nuttelman, and K.S. Anseth, The effects of crosslinking density on cartilage formation in photocrosslinkable hydrogels. *Biomed. Sci. Instr.*, 1999, 35: 309–314.
- [147] Nguyen, K.T. and J.L. West, Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4307–4314.
- [148] Elisseeff, J., C. Puleo, F. Yang, and B. Sharma, Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod. Craniofac. Res.*, 2005, 8(3): 150–161.
- [149] Anseth, K.S., C.N. Bowman, and L. Brannon-Peppas, Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 1996, 17(17): 1647–1657.
- [150] Ferruti, P., S. Bianchi, E. Ranucci, F. Chiellini, and V. Caruso, Novel poly(amido-amine)-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering. *Macromol. Biosci.*, 2005, 5(7): 613–622.
- [151] Ferruti, P., S. Bianchi, E. Ranucci, F. Chiellini, and A.M. Piras, Novel agmatine-containing poly (amidoamine) hydrogels as scaffolds for tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2005, 6(4): 2229–2235.
- [152] Mann, B.K., A.S. Gobin, A.T. Tsai, R.H. Schmedlen, and J.L. West, Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: Synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials*, 2001, 22(22): 3045–3051.
- [153] Schmedlen, R.H., K.S. Masters, and J.L. West, Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4325–4332.
- [154] Burdick, J.A. and K.S. Anseth, Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4315–4323.
- [155] Sannino, A., P.A. Netti, M. Madaghiele, V. Cocoli, A. Luciani, A. Maffezzoli, and L. Nicolais, Synthesis and characterization of macroporous poly(ethylene glycol)-based hydrogels for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 79A(2): 229–236.

- [156] Martens, P.J., S.J. Bryant, and K.S. Anseth, Tailoring the degradation of hydrogels formed from multivinyl poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) macromers for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2003, 4(2): 283–292.
- [157] Leach, J.B., K.A. Bivens, C.N. Collins, and C.E. Schmidt, Development of photocrosslinkable hyaluronic acid–polyethylene glycol–peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, 70(1): 74–82.
- [158] Moffat, K.L. and K.G. Marra, Biodegradable poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked with genipin for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, 2004, 71(1): 181–187.
- [159] Hiemstra, C., Z. Zhong, P.J. Dijkstra, and J. Feijen, PEG-PLA hydrogels by stereocomplexation for tissue engineering of cartilage. *J. Control. Release*, 2005, 101(1–3): 332–334.
- [160] Cascone, M.G., L. Lazzeri, E. Sparvoli, M. Scatena, L.P. Serino, and S. Danti, Morphological evaluation of bioartificial hydrogels as potential tissue engineering scaffolds. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2004, 15(12): 1309–1313.
- [161] Wang, D.A., C.G. Williams, F. Yang, N. Cher, H. Lee, and J. Elisseeff, Bioresponsive phosphoester hydrogels for bone tissue engineering. *Tissue Eng.*, 2005, 11(1–2): 201–213.
- [162] Landers, R., U. Hubner, R. Schmelzeisen, and R. Mulhaupt, Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, 2002, 23(23): 4437–4447.
- [163] Dhariwala, B., E. Hunt, and T. Boland, Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. *Tissue Eng.*, 2004, 10(9–10): 1316–1322.
- [164] Hoffman, A., Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 43(1): 3–12.
- [165] Drury, J.L. and D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: Scaffolds design variables and applications. *Biomaterials*, 2003, 24(24): 4337–4351.
- [166] Brandl, F., F. Sommer, and A. Goepferich, Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*, 2007, 28(2): 134–146.
- [167] Li, W.-J., C.T. Laurencin, E.J. Caterson, R.S. Tuan, and F.K. Ko, Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 60(4): 613–621.
- [168] Reneker, D.H. and I. Chun, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 1996, 7: 216–223.
- [169] Boland, E.D., G.E. Wnek, D.G. Simpson, K.J. Pawlowski, and G.L. Bowlin, Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: A study of poly(glycolic acid) electrospinning. *J. Macromol. Sci. A, Pure Appl. Chem.*, 2001, 38(12): 1231–1243.
- [170] Yang, F., C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Wang, and S. Ramakrishna, Characterization of neural stem cells on electrospun poly(L-lactic acid) nanofibrous scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2004, 15(12): 1483–1497.
- [171] Xin, X., M. Hussain, and J.J. Mao, Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials*, 2007, 28(2): 316–325.
- [172] Kim, G. and W. Kim, Highly porous 3D nanofiber scaffold using an electrospinning technique. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, 2007, 81(1): 104–110.
- [173] Shin, M., H. Yoshimoto, and J.P. Vacanti, In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng.*, 2004, 10(1–2): 33–41.
- [174] Li, W.-J., K.G. Danielson, P.G. Alexander, and R.S. Tuan, Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 67A(4): 1105–1114.

- [175] Yoshimoto, H., Y.M. Shin, H. Terai, and J.P. Vacanti, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, 24(12): 2077–2082.
- [176] Chen, M., P.K. Patra, S.B. Warner, and S. Bhowmick, Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds. *Tissue Eng.*, 2007, 13(3): 579–587.
- [177] Deng, X.L., G. Sui, M.L. Zhao, G.Q. Chen, and X.P. Yang, Poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2007, 18(1): 117–130.
- [178] Meng, W., S.Y. Kim, J. Yuan, J.C. Kim, O.H. Kwon, N. Kawazoe, G. Chen, Y. Ito, and I.K. Kang, Electrospun PHBV/collagen composite nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2007, 18(1): 81–94.
- [179] Li, M., M.J. Mondrinos, X. Chen, M.R. Gandhi, F.K. Ko, and P.I. Leikes, Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 79(4): 963–973.
- [180] Pan, H., H. Jiang, and W. Chen, Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. *Biomaterials*, 2006, 27(17): 3209–3220.
- [181] Townsend-Nicholson, A. and S.N. Jayasinghe, Cell electrospinning: A unique biotechnique for encapsulating living organisms for generating active biological microthreads/scaffolds. *Biomacromolecules*, 2006, 7(12): 3364–3369.
- [182] Thomas, V., M.V. Jose, S. Chowdhury, J.F. Sullivan, D.R. Dean, and Y.K. Vohra, Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2006, 17(9): 969–984.
- [183] Li, W.J., R.L. Mauck, J.A. Cooper, X. Yuan, and R.S. Tuan, Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomech.*, 2007, 40(8): 1686–1693.
- [184] Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*, 2006, 7(10): 2796–2805.
- [185] Li, W.J., J.A.J. Cooper, R.L. Mauck, and R.S. Tuan, Fabrication and characterization of six electrospun poly(alpha-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater.*, 2006, 2(4): 377–385.
- [186] Moroni, L., R. Licht, J. de Boer, J.R. de Wijn, and C.A. van Blitterswijk, Fiber diameter and texture of electrospun PEOT/PBT scaffolds influence human mesenchymal stem cell proliferation and morphology, and the release of incorporated compounds. *Biomaterials*, 2006, 27(28): 4911–4922.
- [187] Vaz, C.M., S. van Tuijl, C.V. Bouten, and F.P. Baaijens, Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta Biomater.*, 2005, 1(5): 575–582.
- [188] Wutticharoenmongkol, P., N. Sanchavanakit, P. Pavasant, and P. Supaphol, Novel bone scaffolds of electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, 6(2): 514–522.
- [189] Lee, Y.H., J.H. Lee, I.G. An, C. Kim, D.S. Lee, Y.K. Lee, and J.D. Nam, Electrospun dual-porosity structure and biodegradation morphology of montmorillonite reinforced PLLA nanocomposite scaffolds. *Biomaterials*, 2005, 26(16): 3165–3172.
- [190] Thomas, V., S. Jagani, K. Johnson, M.V. Jose, D.R. Dean, Y.K. Vohra, and E. Nyairo, Electrospun bioactive nanocomposite scaffolds of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, 6(2): 487–493.
- [191] van Lieshout, M.I., C.M. Vaz, M.C. Rutten, G.W. Peters, and F.P. Baaijens, Electrospinning versus knitting: Two scaffolds for tissue engineering of the aortic valve. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2006, 17(1–2): 77–89.

- [192] Zong, X., H. Bien, C.Y. Ching, L. Yin, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu, and E. Entcheva, Electrospun finetextured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials*, 2005, 26(26): 5330–5338.
- [193] Riboldi, S.A., M. Sampaolesi, P. Neuenschwander, G. Cossu, and S. Mantero, Electrospun degradable polyesterurethane membranes: Potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*, 2005, 26(22): 4606–4615.
- [194] Kim, K., Y.K. Luu, C. Chang, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J. Control. Release*, 2004, 98(1): 47–56.
- [195] Luu, Y.K., K. Kim, B.S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J. Control. Release*, 2003, 89(2): 341–353.
- [196] Nair, L.S., S. Bhattacharyya, and C.T. Laurencin, Development of novel tissue engineering scaffolds via electrospinning. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2004, 4(5): 659–668.
- [197] Boudriot, U., R. Dersch, A. Greiner, and J.H. Wendorff, Electrospinning approaches toward scaffold engineering—a brief overview. *Artif. Organs*, 2006, 30(10): 785–792.
- [198] Teo, W.E., W. He, and S. Ramakrishna, Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix. *Biotechnol. J.*, 2006, 1(9): 918–929.
- [199] Smith, L.A. and P.X. Ma, Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2004, 39(3): 125–131.
- [200] Nof, M. and L.D. Shea, Drug-releasing scaffolds fabricated from drug-loaded microspheres. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 59(2): 349–356.
- [201] Babensee, J.E., L.V. McIntire, and A.G. Mikos, Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm. Res.*, 2000, 17(5): 497–504.
- [202] Hu, Y., C. Zhang, S. Zhang, Z. Xiong, and J. Xu, Development of a porous poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite/collagen scaffold as a BMP delivery system and its use in healing canine segmental bone defect. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2003, 67(2): 591–598.
- [203] Grondahl, L., A. Chandler-Temple, and M. Trau, Polymeric grafting of acrylic acid onto poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Surface functionalization for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2005, 6(4): 2197–2203.
- [204] Ma, Z., C. Gao, Y. Gong, and J. Shen, Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 2005, 26(11): 1253–1259.
- [205] Park, H., J.S. Temenoff, T.A. Holland, Y. Tabata, and A.G. Mikos, Delivery of TGF- $\alpha$ 1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 7095–7103.
- [206] Lenza, R.F.S., W.L. Vasconcelos, J.R. Jones, and L.L. Hench, Surface-modified 3D scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2002, 13(9): 837–842.
- [207] Chen, R.R. and D.J. Mooney, Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharm. Res.*, 2003, 20(8): 1103–1112.
- [208] Jang, J.-H., Z. Bengali, T.L. Houchin, and L.D. Shea, Surface adsorption of DNA to tissue engineering scaffolds for efficient gene delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 77A(1): 50–58.
- [209] Gunatillake, P.A. and R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.*, 2003, 20(5): 1–16.
- [210] Nair, L.S. and C.T. Laurencin, Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 2006, 102: 47–90.
- [211] Holland, T.A. and A.G. Mikos, Review: Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 2006, 102: 161–185.

- [212] Wang, S., L. Lu, and M.J. Yaszemski, Bone-tissue-engineering material poly(propylene fumarate): Correlation between molecular weight, chain dimensions, and physical properties. *Biomacromolecules*, 2006, 7(6): 1976–1982.
- [213] Peter, S.J., M.J. Yaszemski, L.J. Suggs, R.G. Payne, R. Langer, W.C. Hayes, M.R. Unroe, L.B. Alemany, P.S. Engel, and A.G. Mikos, Characterization of partially saturated poly(propylene fumarate) for orthopaedic application. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 1997, 8(11): 893–904.
- [214] Temenoff, J.S. and A.G. Mikos, Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2405–2412.
- [215] Peter, S.J., P. Kim, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, and A.G. Mikos, Crosslinking characteristics of an injectable poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate paste and mechanical properties of the crosslinked composite for use as a biodegradable bone cement. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, 44(3): 314–321.
- [216] Peter, S.J., S.T. Miller, G. Zhu, A.W. Yasko, and A.G. Mikos, In vivo degradation of a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate injectable composite scaffold. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, 41(1): 1–7.
- [217] Peter, S.J., L. Lu, D.J. Kim, and A.G. Mikos, Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite. *Biomaterials*, 2000, 21(12): 1207–1213.
- [218] He, S., M.J. Yaszemski, A.W. Yasko, P.S. Engel, and A.G. Mikos, Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)-dimethacrylate. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2389–2394.
- [219] Kempen, D.H., L. Lu, C. Kim, X. Zhu, W.J. Dhert, B.L. Currier, and M.J. Yaszemski, Controlled drug release from a novel injectable biodegradable microsphere/scaffold composite based on poly(propylene fumarate). *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 77(1): 103–111.
- [220] Payne, R.G., J.S. McGonigle, M.J. Yaszemski, A.W. Yasko, and A.G. Mikos, Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 3. Proliferation and differentiation of encapsulated marrow stromal osteoblasts cultured on crosslinking poly(propylene fumarate). *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4381–4387.
- [221] Lewandrowski, K.U., S.P. Bondre, D.L. Wise, and D.J. Trantolo, Enhanced bioactivity of a poly(propylene fumarate) bone graft substitute by augmentation with nano-hydroxyapatite. *Biomed. Mater. Eng.*, 2003, 13(2): 115–124.
- [222] Vehof, J.W.M., J.P. Fisher, D. Dean, J.-P.C.M.v.d. Waerden, P.H.M. Spauwen, A.G. Mikos, and J.A. Jansen, Bone formation in transforming growth factor beta-1-coated porous poly(propylene fumarate) scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 60: 241–251.
- [223] Jabbari, E., S. Wang, L. Lu, J.A. Gruetzmacher, S. Ameenuddin, T.E. Hefferan, B.L. Currier, A.J. Windebank, and M.J. Yaszemski, Synthesis, material properties, and biocompatibility of a novel self-crosslinkable poly(caprolactone fumarate) as an injectable tissue engineering scaffold. *Biomacromolecules*, 2005, 6(5): 2503–2511.
- [224] Wang, S., L. Lu, J.A. Gruetzmacher, B.L. Currier, and M.J. Yaszemski, Synthesis and characterizations of biodegradable and crosslinkable poly(epsilon-caprolactone fumarate), poly(ethylene glycol fumarate), and their amphiphilic copolymer. *Biomaterials*, 2006, 27(6): 832–841.
- [225] Chasin, M., D. Lewis, and R. Langer, Polyanhydrides for controlled drug delivery. *Biopharm. Manuf.*, 1998, 1: 33–46.
- [226] Gopferich, A. and J. Tessmar, Polyanhydride degradation and erosion. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 54(7): 911–931.
- [227] Uhrich, K.E., S.E. Ibim, D.R. Larrier, R. Langer, and C.T. Laurencin, Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices. *Biomaterials*, 1998, 19(22): 2045–2050.

- [228] Attawia, M.A., K.E. Uhrich, E.A. Botchwey, R.S. Langer, and C.T. Laurencin, In vitro bone biocompatibility of poly(anhydride-co-imides) containing pyromellitylimidoalanine. *J. Orthop. Res.*, 1996, 14(3): 445–454.
- [229] Ibim, S.E., K.E. Uhrich, M. Attawia, V.R. Shastri, S.F. El-Amin, R. Bronson, R. Langer, and C.T. Laurencin, Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, 43(4): 374–379.
- [230] Burkoth, A.K., J.A. Burdick, and K.S. Anseth, Surface and bulk modifications to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, 51(3): 352–359.
- [231] Andriano, K.P., Y. Tabata, Y. Ikada, and J. Heller, In vitro and in vivo comparison of bulk and surface hydrolysis in absorbable polymer scaffolds for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, 48(5): 602–612.
- [232] Ng, S.Y., T. Vandamme, M.S. Taylor, and J. Heller, Synthesis and erosion studies of self-catalyzed poly(ortho ester)s. *Macromolecules*, 1997, 30(4): 770–772.
- [233] Kellomaki, M., J. Heller, and P. Tormala, Processing and properties of two different poly(ortho esters). *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2000, 11(6): 345–355.
- [234] Bourke, S.L. and J. Kohn, Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: Polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethylene glycol). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, 55(4): 447–466.
- [235] Tangpasuthadol, V., S.M. Pendharkar, R.C. Peterson, and J. Kohn, Hydrolytic degradation of tyrosinederived polycarbonates, a class of new biomaterials. Part II: 3-yr study of polymeric devices. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2379–2387.
- [236] Choueka, J., J.L. Charvet, K.J. Koval, H. Alexander, K.S. James, K.A. Hooper, and J. Kohn, Canine bone response to tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid). *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, 31(1): 35–41.
- [237] Ertel, S.I., J. Kohn, M.C. Zimmerman, and J.R. Parsons, Evaluation of poly(DTH carbonate), a tyrosinederived degradable polymer, for orthopaedic applications. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995, 29(11): 1337–1348.
- [238] Pulapura, S., C. Li, and J. Kohn, Structure–property relationships for the design of polyiminocarbonates. *Biomaterials*, 1990, 11(9): 666–678.
- [239] Meechaisue, C., R. Dubin, P. Supaphol, V.P. Hoven, and J. Kohn, Electrospun mat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use as tissue scaffolding material. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2006, 17(9): 1039–1056.
- [240] Lakshmi, S., D.S. Katti, and C.T. Laurencin, Biodegradable polyphosphazenes for drug delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, 55(4): 467–482.
- [241] Luten, J., J.H. van Steenis, R. van Someren, J. Kemmink, N.M. Schuurmans-Nieuwenbroek, G.A. Koning, D.J. Crommelin, C.F. van Nostrum, and W.E. Hennink, Water-soluble biodegradable cationic polyphosphazenes for gene delivery. *J. Control. Release*, 2003, 89(3): 483–497.
- [242] Laurencin, C.T., M.E. Norman, H.M. Elgendy, S.F. El-Amin, H.R. Allcock, S.R. Pucher, and A.A. Ambrosio, Use of polyphosphazenes for skeletal tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1993, 27(7): 963–973.
- [243] Laurencin, C.T., S.F. El-Amin, S.E. Ibim, D.A. Willoughby, M. Attawia, H.R. Allcock, and A.A. Ambrosio, A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, 30(2): 133–138.
- [244] Ambrosio, A.M., H.R. Allcock, D.S. Katti, and C.T. Laurencin, Degradable polyphosphazene/poly(alpha-hydroxyester) blends: Degradation studies. *Biomaterials*, 2002, 23(7): 1667–1672.
- [245] Krogman, N.R., A. Singh, L.S. Nair, C.T. Laurencin, and H.R. Allcock, Miscibility of bioerodible polyphosphazene/poly(lactide-co-glycolide) blends. *Biomacromolecules*, 2007, 8(4): 1306–1312.

- [246] Nair, L.S., S. Bhattacharyya, J.D. Bender, Y.E. Greish, P.W. Brown, H.R. Allcock, and C.T. Laurencin, Fabrication and optimization of methylphenoxy substituted polyphosphazene nanofibers for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 2004, 5(6): 2212–2220.
- [247] Greish, Y.E., J.D. Bender, S. Lakshmi, P.W. Brown, H.R. Allcock, and C.T. Laurencin, Formation of hydroxyapatite-polyphosphazene polymer composites at physiologic temperature. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 77(2): 416–425.
- [248] Carampin, P., M.T. Conconi, S. Lora, A.M. Menti, S. Baiguera, S. Bellini, C. Gandhi, and P.P. Parnigotto, Electrospun polyphosphazene nanofibers for in vitro rat endothelial cells proliferation. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 80(3): 661–668.
- [249] Zhang, R. and P.X. Ma, Poly( $\alpha$ -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, 44(4): 446–455.
- [250] Marra, K.G., J.W. Szem, P.N. Kumta, P.A. DiMilla, and L.E. Weiss, In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, 47(3): 324–335.