

تقنيات التصنيع المايكروي في

تطوير حاملة الخلايا والأنسجة

Microfabrication Techniques in Scaffold Development

Christopher J. Bettinger, Jeffrey T. Borenstein, and Robert Langer

المحتويات CONTENTS

١٣٥.....	INTRODUCTION مقدمة (٤,١)
	APPLICATION OF TRADITIONAL MICROFABRICATION تطبيق تقنيات التصنيع المايكروي التقليدية (٤,٢)
١٣٨.....	TECHNIQUES
١٣٨.....	Replica Molding Of Biomaterials قوالب النسخة المطابقة للأصل للمواد الحيوية (٤,٢,١)
	Micromolding القوالب المايكروية والقوالب النانوية للمواد الحيوية من أجل طوبوغرافية حاملة الخلايا والأنسجة (٤,٢,٢)
١٣٩.....	And Nanomolding Of Biomaterials For Scaffold Topography
	Micromolding القوالب المايكروية وربط المواد الحيوية من أجل حاملات هندسة الأنسجة ذات الجريان المايكروي (٤,٢,٣)
١٤١	And Bonding Of Biomaterials For Microfluidic Tissue Engineering Scaffolds
	Microfluidic حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروي باستخدام بوليمرات اصطناعية (٤,٢,٣,١)
١٤١	Scaffolds Using Synthetic Polymers
	Microfluidic Scaffolds حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروي باستخدام بوليمرات طبيعية (٤,٢,٣,٢)
١٤٢.....	Using Natural Polymers

- Future of Microfluidic Systems in Tissue مستقبل أنظمة الجريان المايكروفي في هندسة الأنسجة (٤,٢,٣,٣)
 ١٤٦..... Engineering
- ١٤٧..... Soft Lithography Of Biomaterials الحفر اللين (الطري) للمواد الحيوية (٤,٢,٤)
- ١٤٨..... Microcontact Printing الطباعة بالاتصال المايكروفي (٤,٢,٤,١)
- Capillary Force Lithography and Other Soft الحفر بالقوة الشعرية وتقنيات الحفر اللين (الطري) الأخرى (٤,٢,٤,٢)
 ١٤٩..... Lithography Techniques
- Applications of Soft Lithography in تطبيقات الحفر اللين (الطري) في تطوير حاملة الخلايا والأنسجة (٤,٢,٤,٣)
 ١٥١..... Scaffold Development
- ١٥١..... Electrodeposition Of Biomaterials الترسيب الكهربائي للمواد الحيوية (٤,٢,٥)
- ١٥٢..... Advanced Patterning Techniques تقنيات التشكيل (الزخرفة) المتقدمة (٤,٢,٦)
- ١٥٣..... Laser Micromachining القطع (الحفر) الآلي المايكروفي بأشعة الليزر (٤,٢,٦,١)
- ١٥٤..... Colloidal Lithography الحفر الغرواني (٤,٢,٦,٢)
- ١٥٥..... Dip-Pen Nanolithography الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (٤,٢,٦,٣)
- ١٥٥ . FABRICATION OF THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLDS تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد (٤,٣)
 Stereolithography And Selective الحفر الجسّم (ثلاثي الأبعاد) والتصليب (التليد) الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (٤,٣,١)
 ١٥٨..... Laser Sintering
- ١٦٠..... Three-Dimensional Printing الطباعة ثلاثية الأبعاد (٤,٣,٢)
- ١٦٠..... Fused Deposition Modeling النمذجة (التشكيل) بترسيب المصهور (٤,٣,٣)
- ١٦١..... Microsyringe Deposition الترسيب بالمحقنة المايكروفي (٤,٣,٤)
- ١٦٢..... Two-Photon Absorption الامتصاص ثنائي الفوتون (٤,٣,٥)
- ١٦٢..... Three-Dimensional Nanotopography الطوبوغرافيا (السمات السطحية) النانوية ثلاثية الأبعاد (٤,٣,٦)
- ١٦٢..... Electrospinning الغزل الكهربائي (٤,٣,٦,١)
- ١٦٣..... Colloidal Adsorption الامتزاز (الامتصاص) الغرواني (٤,٣,٦,٢)
- Future Of Solid Free-Form Fabrication For مستقبل تصنيع الشكل الحر الصلب من أجل هندسة الأنسجة (٤,٣,٧)
 ١٦٤..... Tissue Engineering

١٦٥.....	٤,٤) التصنيع المايكروفي لحاملات الخلايا والأنسجة باستخدام الخصائص الفيزيائية MICROFABRICATION OF SCAFFOLDS USING PHYSICAL PROPERTIES
١٦٦.....	٤,٤,١) الفصل الطوري المايكروفي Microphase Separation
١٦٧.....	٤,٤,٢) التجميع الذاتي بمساعدة المواد الغروائية Colloidal-Assisted Self-Assembly
١٦٩.....	٤,٤,٣) التجميع الذاتي فوق الجزيئي Supramolecular Self-Assembly
١٧٠.....	٤,٥) التصنيع المايكروفي لحاملات الخلايا والأنسجة المبذورة بالخلايا MICROFABRICATION OF CELL-SEEDED SCAFFOLDS
١٧١.....	٤,٥,١) ترسيب طبقة تلو الطبقة Layer-By-Layer Deposition
١٧٢.....	٤,٥,٢) التَمَحُّظُفُظ (التغليف) الضوئي لُبْنَى حَامِلَاتِ الخَلايا والأنسجة-خَلايا Photoencapsulation Of Cell-Scaffold Constructs
١٧٤.....	٤,٥,٣) الترسيب المباشر للخلايا في المستوى المايكروفي Microscale Direct Deposition Of Cells
١٧٤.....	٤,٥,٣,١) إِرْدَاذ (رش) الخَلايا Cell Spraying
١٧٥.....	٤,٥,٣,٢) طباعة الخلايا بتقنية نفث الحبر Inkjet Printing of Cells
١٧٥.....	٤,٥,٣,٣) الطرق الضوئية لترسيب الخلايا بدون اتصال Optical Methods for Noncontact Cell Deposition
١٧٧.....	٤,٦) مستقبل تكنولوجيا التصنيع المايكروفي لتطوير حاملة الخلايا والأنسجة FUTURE OF MICROFABRICATION TECHNOLOGY FOR SCAFFOLD DEVELOPMENT
١٧٩.....	المراجع REFERENCES

٤,١) مقدمة INTRODUCTION

لقد قدّم مجيء صناعة أنصاف النواقل (semiconductors) في القرن العشرين منفعة ثانوية لعمليات التصنيع المتقدم بما في ذلك الدقة (precision) المتزايدة للتصنيع المايكروفي (microfabrication) للمواد الهندسية الحديثة مثل المعادن والبوليمرات. وقد أدى التقدم في تقنيات التصنيع المايكروفي بما فيها القطع (الحفر) المايكروفي (micromachining) وعمليات التصنيع بمساعدة الحفر الضوئي (photolithography - aided processes) مثل الحفر أو الحُزْرَط الجاف (dry etching) والحفر الرطب (wet etching) والترسيب المعدني (metal deposition) وإنتاج طبقة فيلم رقيقة (thin film growth) إلى القدرة على هندسة أنظمة ومواد ذات سمات (خصائص) محددة بشكل جيد بمقياس المايكرون وما دون المايكرون. وقد سمحت تقنيات أكثر

تقدماً مثل الحفر الضوئي بالحزمة الإلكترونية (electron-beam (e-beam) photolithography) والتلاعب أو المعالجة النانوية (nanomanipulation) بتصنيع بُنى ذات دقة بمستوى النانومتر. وعلى الرغم من أن هذه التقنيات قد صممت في البداية لدعم احتياجات التطوير السريع المرتبطة بصناعة الدارات المتكاملة أو المدججة (integrated circuits)، فقد أظهر تطبيق تقنيات التصنيع في المستوى المايكرومترى والمستوى النانومتري فائدة لا تُقَدَّر بثمن في تصميم وتطوير أنظمة مُهندَسة من أجل تطبيقات بيولوجية وهندسية حيوية.

وقد أتاحت الدقة المتزايدة في الأجهزة المصنَّعة مايكروياً وبشكلٍ منهجي معالجة أنظمة بيولوجية (biological systems) بمقاييس طولية واسعة التنوع تبدأ من أنسجة وأعضاء كاملة بطول سنتيمترات، إلى خلايا مفردة بمقياس المايكرون، فجزئيات حيوية مفردة بمقياس النانومتر. وعلى وجه الخصوص، فإن واحدة من التطبيقات الواعدة تكمن في مجال هندسة الأنسجة (tissue engineering)، وهي أحد فروع الهندسة الحيوية (bioengineering) حيث تكتسب، وسوف تستمر، الأنظمة المايكروية والنانوية في اكتساب أهمية كبرى. لقد أثبتت تطبيقات هذه الأنظمة المصنَّعة مايكروياً فائدتها ليس فقط في تطوير وهندسة الجيل التالي للأنظمة المهندسة نسيجياً، ولكن أيضاً في مساندة جهود الأبحاث الأساسية. تستطيع التجهيزات العاملة في مستوى أطوال بمقياس المايكرون وما دون المايكرون أن تسبر خلايا وأنسجة عند مقاييس طول تناسبها بيولوجياً، والتي أدت إلى توضيح بعض المحددات أو البارامترات الأساسية للبيئة المايكروية الخلوية (cellular microenvironment) والتي تؤثر على العمليات البيولوجية الأساسية المتنوعة مثل تمايز الخلايا [1] وهجرة الخلايا [2] والتطور الجنيني (embryonic development) [3] وموت الخلايا المبرمج (apoptosis) [4]. إن تطبيق الأنظمة المصنَّعة مايكروياً وذلك باتجاه دراسة وهندسة تفاعلات الخلايا - المصفوفة هو أيضاً غاية في الأهمية. ففي حين أن التفاعلات الكيميائية والبيولوجية للخلايا - المصفوفة قد تم دراستها بشكلٍ مركز، فإن الطبوغرافية السطحية (topography) (السمات السطحية) لهذا السطح البيني الفاصل (interface) تلعب أيضاً دوراً مهماً في تنظيم وظائف الخلايا. تتكون المصفوفة خارج الخلية (ECM) من عدد من البروتينات البنيوية والمعروفة باحتوائها سمات أو خصائص عند مستويات طول تتراوح من ميليمترات حتى نانومترات. فبينما يتم تصميم البنى الأكبر لتوفر دعم ماكروبي (macroscopic support)، فإنه من المعروف أن السمات في المستوى النانوي للمصفوفة خارج الخلية (ECM) تقدم إشارات أو منبهات (cues) تُؤثِّر على الوظائف الأساسية للخلايا مثل التكاثر (proliferation) والهجرة (migration) والانتشار (spreading) والقَلْوصِيَّة (contractility) والتوتر (tension) وقوى الجذب أو الجَرِّ (traction forces). وقد تم استخدام أنظمة اصطناعية مع مجموعة متنوعة من أحجام السمات والأشكال الهندسية في مستوى ما دون المايكرون؛ وذلك لدراسة سلوك الخلايا في استجابتها لركائز غنية بالإشارات أو المنبهات الطبوغرافية السطحية [5].

وبالإضافة إلى الركائز المحددة بشكلٍ جيد، فإن الخلايا وكما هو معروف تستجيب أيضاً للطبوغرافية السطحية الموجهة بشكلٍ عشوائي (randomly oriented topography) مثل الخشونة (roughness) في المستوى النانومتري. ويمكن أن تؤثر سمات أو خصائص الطبوغرافية السطحية بمقياس واحد مايكرومتر أو أصغر على وظائف الخلايا، والتي قد تكون حاسمة من أجل

الأنظمة الهندسة نسيجياً بما في ذلك التصاق الخلايا وشكلها وهجرتها المباشرة، والتي هي كلها عمليات خلوية حاسمة من أجل التحكم بالنمط الظاهري للخلايا (cell phenotype) في بُنى الخلايا - حاملات الخلايا والأنسجة. على سبيل المثال، لقد تبين أن تراصف أو محاذاة الخلايا (cell alignment) يلعب دوراً مهماً في تطوير أنسجة أقوى في حالة الخلايا العضلية الملساء والعضلات الهيكلية وخلايا الأرومة الليفية. وقد أظهرت الطبوغرافية السطحية أيضاً أنها تؤثر على النمط الجيني (genotype) والنمط الظاهري [6] بما في ذلك تنظيم مستويات الفبرونيكتين (fibronectin) للحمض النووي الـ RNA (الحمض النوويّ الريبسي) المرسل (mRNA) في خلايا الأرومة الليفية [7]. وقد تم استعراض التفاعل المعمم للخلايا مع الطبوغرافية السطحية وعلى نطاق واسع في مكان آخر [5,8,9] بما في ذلك الفصول الأخرى ضمن هذا الكتاب. إن فهم العمليات الأساسية المرتبطة بتفاعلات الخلايا - الخلايا وتفاعلات المصفوفة - الخلايا والمبنية على إشارات أو منبهات كيميائية وفيزيائية وطبوغرافية سطحية وبيئية مايكروية مكانية هو أحد المفاهيم الأساسية من أجل التصميم المنطقي لأنظمة هندسة الأنسجة. ومن المهم أيضاً أن تكون هناك قدرة على تطبيق هذه الاكتشافات العلمية من خلال هندسة كل من المواد وتقنيات تصنيع المواد من أجل تحقيق مزيد من الإمكانية لاستخدامها في هندسة الأنسجة والطب التجديدي (regenerative medicine).

وسوف يستمر نمو الأنظمة المتطورة المصنعة مايكروياً بشكل متزايد لتلعب دوراً مهماً في تقدم هندسة الأنسجة والطب التجديدي. وعلى الرغم من أن النموذج الحالي لتصميم وتصنيع حاملات هندسة الأنسجة هو نموذج المحاكاة الحيوية (biomimicry)، فإن التطورات في علم الجينات (genomics) وبيولوجيا الخلايا (cell biology) والبيولوجيا التطورية (developmental biology) ستؤدي إلى تطورات متناسبة في مجموعة الأدوات المستخدمة من أجل تصنيع حاملة لهندسة الأنسجة بما في ذلك القدرة على التحكم بالبيئتين الخلوية المكانية والخلوية الزمانية (spatial and temporal cellular environments) في مستوى المايكرون وفي مستوى ما دون المايكرون. ويتواجد حالياً مجال واسع من عمليات "الحفر من الأعلى - إلى الأسفل" ("top - down") و "الحفر من الأسفل - إلى الأعلى" ("bottom - up") والتي تم تطويرها لتلبي الاحتياج المتزايد لتحقيق دقة في مستوى المايكرومتر والنانومتر في هندسة المواد الحيوية من أجل أنظمة تجديد الأعضاء والأنسجة [10,11]. وعلى أي حال، هناك الكثير من التحديات الهندسية التي لا يزال يتعين معالجتها، والتي تتضمن الدمج الفعّال (efficient incorporation) للخلايا في حاملات الخلايا والأنسجة مع دقة مكانية كافية وتحويل العمليات المبنية في الأساس على الحفر الضوئي ثنائي الأبعاد (2D photolithographic) إلى حفر ثلاثي الأبعاد (3D). يُركّز هذا الفصل على تصميم وتصنيع حاملات هندسة الأنسجة مع سمات أو خصائص في مستوى المايكرون وما دون المايكرون. وقد تم استطلاع الحالة الراهنة للمواد ومعالجة المواد من أجل هندسة الأنسجة مع تركيز خاص على ربط هذه التخصصات مع تقنيات التصنيع المايكروفي والنانوي.

٤,٢) تطبيق تقنيات التصنيع المايكروني التقليدية APPLICATION OF TRADITIONAL MICROFABRICATION TECHNIQUES

٤,٢,١) قوالب النسخة المطابقة للأصل للمواد الحيوية Replica Molding Of Biomaterials

إن قوالب النسخة المطابقة للأصل (replica molding - RM) هي مصطلح عام يشمل مجالاً واسعاً من عمليات القوالب (molding processes) بما في ذلك النقش الساخن (hot embossing) وصبّ (قوالب) المذيب (solvent casting) والقوالب بالحقن (injection molding). وعلى الرغم من أن قوالب النسخة المطابقة للأصل قد تم استخدامها بشكل تقليدي لإنشاء بُنى مقوّلة في مجموعة متنوعة من المواد الهندسية [12]، إلا إن قوالب النسخة المطابقة للأصل (RM) للمواد الحيوية هي أكثر تقنية مباشرة لإنشاء بُنى مُصنّعة مايكروياً من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة. ويبقى الحفر الضوئي (photolithography) تقنية أساسية في تصنيع القوالب من أجل استخدامها في عمليات قوالب النسخة المطابقة للأصل (RM). تتضمن ميزات قوالب النسخة المطابقة للأصل (١) دقات تباين السمات (feature resolutions) التي تصل إلى أقل من ٣٠ نانومتراً باستخدام مواد بوليمرية، و (٢) الإنتاج السريع والقابل للتجسيم (scalable) (لتغيير القياس) للبنى المايكروية على مساحات سطحية كبيرة، و (٣) البساطة الكامنة في هذه العملية. ومع ذلك، فإن هذه المزايا تؤدي إلى قيود بما في ذلك الطبيعة ثنائية الأبعاد للقوالب من أجل قوالب النسخة المطابقة للأصل (RM) باستخدام عمليات الحفر الضوئي. وقد تم استخدام قوالب النسخة المطابقة للأصل (RM) وعلى نطاق واسع لمواد غير عضوية (inorganic materials) مثل بولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (poly(di-methylsiloxane) - PDMS) من أجل تطبيقات طبية حيوية بما في ذلك الحساسات الحيوية (biosensors) وشبكات الجريان المايكروني (microfluidic networks) من أجل زراعة الخلايا (cell culture) [13-14]. وعلى أي حال، فإن قوالب النسخة المطابقة للأصل (RM) للمواد الحيوية تتطلب تكييفاً أو تعديلاً (adaptation) للعمليات التقليدية للملاءمة الخصائص الكيميائية والفيزيائية لكل من المواد الحيوية الاصطناعية والمواد الحيوية الطبيعية.

يمكن صب البوليمرات الاصطناعية القابلة للتحلل الحيوي وكذلك المواد الحيوية الطبيعية على حد سواء على قوالب مصنّعة مايكروياً لإنتاج بُنى على ركائز مع دقات تباين للسمات أصغر من ٣٠ نانومتراً. وقد تم معالجة بوليمرات حيوية تركيبيّة لدنة بالحرارة (thermoplastic) مثل بولي (ε-كابرولاكتون) (poly(ε-caprolactone) - PCL) وبولي (إل - حمض اللاكتيك) (poly(L-lactic acid) - PLA) وبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (poly(L-lactic-co-glycolic acid) - PLGA) في هذه الطريقة من أجل تطبيقات طبية حيوية متنوعة بما في ذلك حاملات وأجهزة هندسة الأنسجة من أجل إطلاق الدواء المتحكم به (controlled drug release) [10,17]. ويمكن استخدام كل من صبّ (قوالب) المصهور (melt casting) وصبّ المذيب (solvent casting) والقوالب بالحقن والنقش الساخن وذلك للحصول على أشكال هندسية ذات سمات محددة بشكل جيد في المواد الحيوية الاصطناعية اللدنة بالحرارة متعددة البلورات (polycrystalline) أو غير المتبلورة (amorphous). ويمكن لعمليات مشابهة أن تُكَيّف أو تُعدّل ليتم تصنيع حاملات خلايا لهندسة الأنسجة باستخدام بوليمرات توصيلية (conductive polymers) من أجل الاستخدام المحتمل في تطبيقات تجديد الأعصاب (nerve regeneration applications) [18,19]. إن المواد الحيوية المجهّزة حرارياً والتي تحوي شبكات مرنة متقاطعة (متشابكة) (crosslinked elastomeric networks) مثل البولي (غليسيرول-كو-حمض السيسايك) (poly (glycerol-co-sebacic acid) - PGS) [20] والبولي (٨، ١-أوكتانيدول-كو-حمض السيتريك)

(POC) - poly (1,8-octanediol-co-citric acid) [21] تتطلب أن تُوضع في شكلٍ محدد مسبقاً عند قبولتها الأولية متبوعة بعملية ربط تقاطعي أو تشابكي كيميائي أو فيزيائي. وبالتالي؛ يمكن أن تتطلب معالجة مثل هذه المواد استخدام طبقة لتحرير القالب المستخدم والتي تتألف من مادة حميدة بيولوجياً (biologically benign material) لتجنب التصاق هذه المواد الهجومية (aggressive materials) المضغفة لمقاومة القالب المستخدم أثناء عملية البلمرة النهائية. إن محاليل السُكروز المخففة (dilute sucrose solutions)، والتي يتم استخدامها في العادة للوقاية من التندُّف (flocculation) (التلبد) والتخثر (coagulation) في صيغ أو تشكيلات الجسيمات المايكروية، يمكن استخدامها لإنشاء طبقات أفلام رقيقة (thin films) من أجل المساعدة على تحرير طبقات الأفلام في القالب بينما تقوم بالحفاظ على دقة السمات بحجم ما دون المايكرون [22].

وقد تم استخدام قوالب النسخة المطابقة للأصل (RM) لإنتاج سمات أو خصائص بمستوى المايكرون وما دون المايكرون في المواد الحيوية الطبيعية بما في ذلك البروتينات البنيوية مثل الكولاجين والماتري جل (Matrigel) والجزئيات المبنية على السكر بما في ذلك الآغاروز (agarose) [23-26]. وقد تم ذكر طريقة من خلال Tang وآخرين قادرة على دمج خلايا ضمن بُنى هلامية مُصنَّعة مايكروياً تم إنتاجها عن طريق القوالب المايكروية (micromolding). وعلى أي حال، فإن هناك قيوداً صارمة أكثر بشكل ملحوظ على المعالجة المرتبطة بتجهيز البروتينات، بشكل خاص تلك التي تدمج أيضاً الخلايا في داخل البنى. إن احتمال فقدان الوظيفة من خلال تَمَسُّخ البروتين (protein denaturation) تحد من شروط المعالجة إلى عمليات منخفضة الحرارة بشكل عام باستخدام شروط مائية (aqueous conditions). إن عدم القدرة على استخدام درجات حرارة مرتفعة أو مذيبات عضوية (organic solvents) يحد من ملاءمة التقنيات المحتملة. وعلى أي حال، فإن هناك طرقاً كيميائية محتملة يمكن تطبيقها بما في ذلك الربط الكيميائي المتشابك من خلال طرق الأقتران الحيوي (bioconjugation) التي يتم إنشاؤها مثل ١-ميثيل-٣-ثنائي-ميثيل أمينو بروبيلا كاربو ثنائي الإيميد هيدروكلوريد (1-ethyl-3[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride - EDC) و/أو-هيدروكسي سوسين إيميد (N-hydroxysuccinimide - NHS)، والتي تُعتبر طريقاً كيميائياً يتم إنشاؤه من أجل الأقتران الحيوي بين الأمينات (amines) والكربوكسيلات (carboxylates). إن البلمرة الضوئية (photopolymerization) هي طريقة أخرى لتصنيع رقائق مستوية من البوليمر مُقابلة عن طريق النسخة المطابقة للأصل باستخدام شروط معالجة معتدلة مثل درجات حرارة منخفضة ومذيبات مائية.

(٤,٢,٢) القوالب المايكروية والقوالب النانوية للمواد الحيوية من أجل طوبوغرافية حاملة الخلايا والأنسجة

Micromolding And Nanomolding Of Biomaterials For Scaffold Topography

تحتوي المصفوفة خارج الخلية (ECM) سمات في مستوى النانومتر (nanometer - scale features)، والتي توفر إشارات أو منبهات تتوسط الوظائف الأساسية للخلايا مثل التكاثر والهجرة وإعادة تشكيل هيكل الخلية (cytoskeleton remodeling) والتمايز. وقد تم استخدام أنظمة اصطناعية مع أحجام وأشكال هندسية مختلفة لسمات في مستوى ما دون المايكرون وذلك من أجل دراسة سلوك الخلايا في استجابتها لركائز غنية بإشارات أو منبهات طوبوغرافية سطحية في مستوى النانومتر [5]. وقد تمت كذلك الإشارة إلى أن الخلايا تستجيب أيضاً للطوبوغرافية (السمات السطحية) الموجهة بشكل عشوائي مثل الخشونة في المستوى النانومتري بالإضافة إلى الركائز المحددة بشكل جيد مع سمات أو خصائص في مستوى ما دون

المايكرون. ويمكن أن تؤثر السمات الطبوغرافية السطحية والتي هي بقياس في مستوى ١ مايكرومتر أو أقل على عدد من وظائف الخلايا التي تتضمن ارتكاز (attachment) والتصاق (adhesion) وشكل (morphology) (مورفولوجيا)، وهجرة (migration) الخلايا. كما تؤثر الطبوغرافية السطحية أيضاً على البروفيل (الشكل) الجيني (gene profile) [6] بما في ذلك تنظيم مستويات الفبرونيكتين للحمض النووي الـ (RNA) (الحمض النوويّ الرّبيبي) المرّسال (mRNA) في خلايا الأرومة الليفية [7]. وقد تم استعراض التفاعل المعمّم للخلايا مع الطبوغرافية السطحية وعلى نطاق واسع في مكان آخر (في مراجع أخرى) [5,8,9] وبما في ذلك في فقرات أخرى ضمن هذا الكتاب.

ونظراً للفائدة التي تم استعراضها على قدرة التحكم بوظيفة الخلية من خلال استخدام طبوغرافية سطحية نانوية؛ فإنه يمكن لهذه التقنية أن تستمر في لعب دور مهم في تطوير حاملة الخلايا والأنسجة؛ وذلك نظراً لكون الطبوغرافية السطحية النانوية تطبق على المواد الحيوية الطبيعية والمواد الحيوية الاصطناعية. وكما ذكر سابقاً، يمكن لقبولة النسخة المطابقة للأصل (RM) إعادة إنتاج سمات تصل إلى ٣٠ نانومتراً، والتي تعتبر بدورها أكثر من كافية من أجل إحداث تغييرات في وظيفة الخلية. وقد تم تكييف أو تعديل عمليات قبول النسخة المطابقة للأصل (RM) وذلك لتصنيع طبوغرافية سطحية نانوية للركيزة باستخدام مجموعة متنوعة من المواد الحيوية [23,27,28]. إن بعض المواد الحيوية تحتاج إلى إضافة طبقات تحرير، والتي تشجع على تحرير القالب المستخدم [22]. ينبغي أن تكون المواد المستخدمة في عوامل تحرير القالب غير سامة وغير مكلفة وأن تكون قابلة للذوبان في عوامل مائية وذلك لتسهيل الذوبان والتحرير في الشروط المعتدلة.

على الرغم من أن قبول النسخة المطابقة للأصل (RM) هي طريقة سريعة وقابلة للتجسيم (لتغيير القياس) وسهلة من أجل إنتاج ركائز بطوغرافية سطحية نانوية، إلا أن هناك عمليات أخرى متوفرة من أجل إنتاج سمات طبوغرافية سطحية نانوية، والتي سيتم استعراضها لاحقاً في هذا الفصل. إن أحد القيود الظاهرة مع الركائز ذات الطبوغرافية السطحية النانوية والمنتجة باستخدام قبول النسخة المطابقة للأصل (RM) التقليدية هو التقييد على هندسة الأنظمة ثنائية الأبعاد خصوصاً، إن هذا التقييد لا يحد من تصميم وتصنيع أنظمة مهندسة نسيجياً، والتي هي بشكل أساسي بُنى ثنائية الأبعاد مثل البَشْرَة (epidermis) والظَهارة (epithelium) لأعضاء مختلفة. فعلى سبيل المثال، تم استخدام رقائق مُصنّعة مايكروياً بواسطة أشعة الليزر وذلك لتصنيع قوالب رئيسية من بولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) من أجل قبول النسخة المطابقة للأصل (RM) لإسْفَنجات الكولاجين من النمط الأول (collagen I sponges) في العمل المقدم من قبل Pins وآخرون. وقد احتوت هذه الإسْفَنجات على سمات أو خصائص ذات قياس يتراوح من ٤٠ إلى ٣١٠ مايكرومتر، والتي تم تصميمها لمحاكاة بُنى البَشْرَة الأصلية (native epidermis). لقد شكلت الإسْفَنجات المصنّعة مايكروياً بواسطة قبول النسخة المطابقة للأصل (RM) صفيحة قاعدية (basal lamina) متناظرة عندما يتم بذرها بخلايا كيراتينية بشروية بشرية (human epidermal keratinocytes). وتطبيق محتمل آخر من أجل الأنظمة ثنائية الأبعاد هو في شبكية العين (retina of the eye). فقد أظهرت الظهارة القرنية (corneal epithelium) بأنها تستجيب للطبوغرافية السطحية النانوية لركائز ذات حاجز أو إطار شبكي الشكل محددة بشكل جيد مع سمات بحجم أصغر من ٤٠ نانومتراً مصنّعة باستخدام السيلكون [29]. وعلى أي حال، يجب إنجاز المزيد من العمل في مواد حيوية جديدة لإتاحة الفرصة لإمكانية زرعها. ويمكن توسيع قبول النسخة المطابقة

للأصل (RM) ثنائية الأبعاد ليتم استخدامها في تطبيقات أخرى، حيث تكون البنية السائدة في الطبقة الأحادية. فعلى سبيل المثال، يمكن أيضاً تصور قولبة النسخة المطابقة للأصل (RM) لركائز باستخدام مواد حيوية ملائمة من أجل تطبيقات الطُعوم (الغرسات) الوعائية (vascular implant applications) [30]، حيث إن توجيه الخلايا قد يُثبت أنه مهمٌ في توليد النمط الظاهري المناسب. كما يمكن كذلك تشكيل أنابيب من طبقات رقيقة مستوية ثنائية الأبعاد من أجل استخدامها في تطبيقات تجديد الأعصاب المحيطية (peripheral nerve regeneration) [31].

تتطلب هندسة الأعضاء الحيوية ذات البنى الهندسية المايكروية المعقدة التوسع من المستوى ثنائي الأبعاد. ولتحديد هذه الاحتياجات غير المحققة، تتجه استراتيجيات هندسة الأنسجة وتقنيات تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة نحو تطوير أنظمة ثلاثية الأبعاد. وسوف يتوجب أيضاً في نهاية المطاف على طرق تصنيع الطوبوغرافية السطحية النانوية اللاحقة التوسع إلى الأنظمة ثلاثية الأبعاد لاستيعاب أنظمة حاملات هندسة الأنسجة المتقدمة. إن واحدة من الطرق للسعي نحو تحقيق هذا الهدف هي إلغاء استخدام عملية المعالجة بالحفر الضوئي وبدلاً من ذلك استخدام الخصائص الفيزيائية للمواد لإنتاج مواد ذات طوبوغرافية سطحية نانوية تكون تفاعلية مع الخلايا [32]. وسوف يتم وصف هذه التقنيات بشكلٍ مفصّل في مكان آخر في هذا الفصل.

(٤,٢,٣) القولبة المايكروية وربط المواد الحيوية من أجل حاملات هندسة الأنسجة ذات الجريان المايكروفي Micromolding And Bonding Of Biomaterials For Microfluidic Tissue Engineering Scaffolds

لقد تم ربط قولبة النسخة المطابقة للأصل (RM) مع مواد بوليمرية غير قابلة للتحلل من أجل تصنيع أجهزة ذات جريان مايكروفي (microfluidic devices) [33]. إن تطوير الجريانات المايكروية (microfluidics) من أجل تطبيقات الهندسة الطبية الحيوية هو واسع النطاق ويتخلل في مجالات دراسة مثل اكتشاف الدواء (drug discovery) والفحص عالي الإنتاجية (high throughput screening). ومع ذلك، يجب أن تكون العمليات المناسبة مفصلة بشكلٍ ملائم من أجل تأسيس عمليات فعّالة تستخدم مواد قابلة للتحلل الحيوي. وقد أثبتت قولبة النسخة المطابقة للأصل (RM) للمواد الحيوية أنها مفيدة في مجموعة متنوعة من التطبيقات الطبية الحيوية بما في ذلك توزيع أو توصيل الدواء (drug delivery). وقد أدت قولبة النسخة المطابقة للأصل (RM) المقترنة بعمليات تصفيح (lamination processes) مناسبة إلى مجال فرعي حديث لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة ذات جريان مايكروفي. إن هذا الفرع من هندسة الأنسجة هو مصمم لمعالجة مشكلة النقل السطحي للمواد المغذية (facile nutrient transport) وإزالة الفضلات ضمن حاملات الخلايا والأنسجة المبذورة بالخلايا. وهناك مجال واسع من المواد الحيوية الاصطناعية والمواد الحيوية الطبيعية، وكلٌّ من هذه المواد تتطلب عمليات على مواد محددة، والتي تم اختيارها لتلبية هذا الاحتياج من أجل حاملات خلايا وأنسجة ذات جريان مايكروفي وقابلة للتحلل الحيوي.

(٤,٢,٣,١) حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروفي باستخدام بوليمرات اصطناعية Microfluidic Scaffolds Using Synthetic Polymers

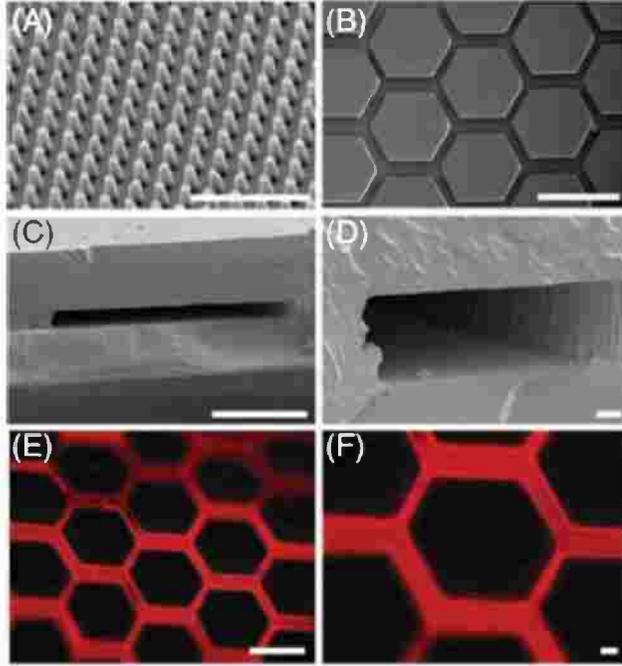
إن الميزات الرئيسية للبوليمرات الاصطناعية هي المجال الواسع من الخصائص والعمليات، والتي هي متوفرة من أجل الاستخدام في التصميم والتصنيع. إن البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) هو من بين المواد الحيوية الأولى المستخدمة في أنظمة الجريان المايكروفي القابلة للتحلل الحيوي [34]. فباستخدام تقنية النقش الساخن المعدلة، تمت قولبة طبقات البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) مع سمات في مستوى المايكرون وذلك باستخدام

قالب من البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS). إن تسخين البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) إلى درجة حرارة قريبة من نقطة الذوبان (melting point) جنباً إلى جنب مع كميات مناسبة من الضغط الميكانيكي قد أدى إلى انصهار البوليمر عند السطح البيني الفاصل. ومن ثم يتم تصفيح طبقات متعددة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) مع بعضها البعض باستخدام عملية الربط الدقيق بالانصهار الحراري وذلك لتشكيل قنوات الجريان المايكروبي المغلقة. وقد تم تطوير عمليات ربط ونقش المذيب من أجل حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروبي (microfluidic scaffolds) والتي تتألف من البولي (حمض اللاكتيك) (PLA) والبولي (حمض الغليكولايد) (PGA) والبوليمرات المشتركة المقابلة لبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) [35,36]. وقد تم كذلك تطوير قوالب النسخة المطابقة للأصل (RM) وعمليات التصفيح من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ذات جريان مايكروبي مبدورة بالخلايا من بوليمرات مرنة مُجهّزة حراريًا وقابلة للتحلل الحيوي. وقد تم تصنيع بُنى ذات طبقة واحدة وبنى متعددة الطبقات باستخدام البولي (غليسيرول-كو-حمض السيباسيك) (PGS)، والتي تم استخدامها لدعم مزرعة خلايا طويلة الأمد ذات تدفق أو حقن متواصل (long-term perfused cell culture) داخل لُمعة (lumen) (تجويف) القنوات المايكروبية (microchannels) [37]. وقد أظهرت هذه الأنظمة القدرة على دعم أنواع متعددة من الخلايا بما في ذلك الخلايا البطانية (endothelial cells) والخلايا الكبدية (hepatocytes).

(٤,٢,٣,٢) حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروبي باستخدام بوليمرات طبيعية Microfluidic Scaffolds Using Natural Polymers

تُوفر المواد الحيوية الطبيعية العديد من المزايا زيادة على البوليمرات الاصطناعية المستخدمة كمادة منصة أو قاعدة (platform) من أجل حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروبي. وعادةً ما تتألف المواد الحيوية الطبيعية من البروتينات التي يمكن أن تدعم عادةً الارتباط السريع بالخلايا وتملك الطاقات الحركية المرغوبة للتحلل بما في ذلك الفترات الزمنية الطويلة للتحلل والمنتجات الثانوية غير السامة. وكما هو الحال في البوليمرات الاصطناعية، فإن تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة باستخدام المواد الحيوية الطبيعية يتطلب تكييف تقنيات مبتكرة للحفر اللين (الطري) (soft - lithography techniques) من أجل قوالب وتصفيح طبقات أفلام البروتين (طبقات رقيقة من البروتين). وقد تم تصنيع أجهزة جريان مايكروبي من الجيلاتين، وهو عبارة عن بروتين يتألف بشكل أساسي من الكولاجين، وتم بذرها بخلايا ظهارية فأرية ثديية طبيعية (normal murine mammary epithelial cells - NMuMG). إن شكل أو مورفولوجيا الخلايا الظهارية الفأرية الثديية الطبيعية (NMuMG) الملاحظ في مزرعة خلايا ذات جهاز جريان مايكروبي مبني على الجيلاتين ومزرعة خلايا ساكنة كانت متشابهة. وعلى رغم أن الحافز من تصنيع هذه الأجهزة كان إنشاء بيئة مايكروبية أصيلة أكثر (مشابهة لتلك في الكائن الحي) من أجل تجارب زرع الخلايا في المختبر، فإنه من الممكن استخدام العمليات الخاصة بالمواد المطورة لهذا الغرض من أجل تطوير حاملات خلايا وأنسجة متطورة. ويتم استخدام مادة حيوية طبيعية أخرى من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ذات جريان مايكروبي هي فبروين الحرير (silk fibroin)، وهو عبارة عن بروتين ذي وزن جزيئي ٣٩١ كيلو دالتون (kDa) ويتم إنتاجه عن طريق دودة الحرير (Bombyx mori). إن فبروين الحرير هو مادة حيوية قابلة للتحلل الحيوي [38] وقد أظهر قدرة من أجل استخدامه كمادة حيوية في العديد من التطبيقات الطبية الحيوية [39] بما في ذلك استخدامه كمادة حيوية لحاملة الخلايا والأنسجة [40,41]. ويمكن تحويل فبروين الحرير، مثل العديد من البروتينات الطبيعية، إلى محاليل مائية. وقد تم استخدام محاليل فبروين الحرير المائية لإنتاج

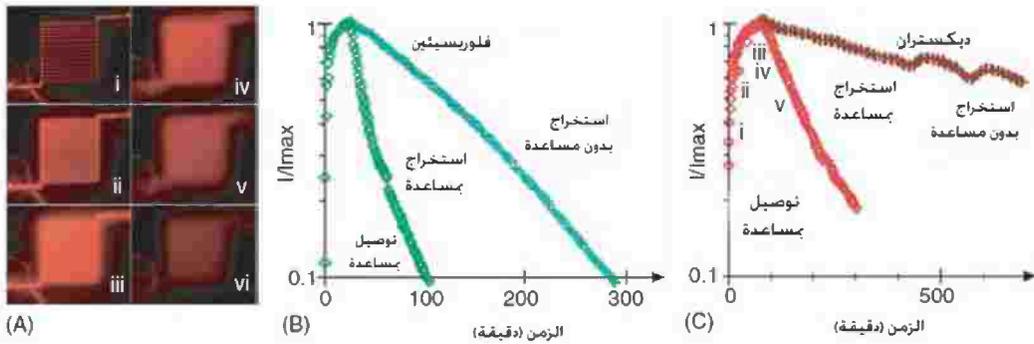
طبقات أفلام ذات سمات في مستوى المايكرون والنانومتر عن طريق قولبة النسخة المطابقة للأصل (RP) على قوالب رئيسية سلبية من البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) [23]. وقد تم ربط طبقات أفلام من فبروين الحرير غير المصفحة لتشكيل أجهزة ذات جريان مايكروي (الشكل رقم ٤.١). وقد تم بذر الخلايا الكبدية وزراعتها تحت التدفق المتواصل لغاية خمسة أيام، مع الحفاظ على مورفولوجيا أو شكل الخلايا وإنتاج الخلايا للألبومين للخلايا النامية في مزرعة ساكنة (static culture).



الشكل رقم (٤, ١). أجهزة جريان مايكروي مبنية من فبروين الحرير (silk fibroin - based microfluidic devices). يمكن استخدام قولبة النسخة المطابقة للأصل (replica molding) بالتعاون مع صب المذيب (solvent - casting) لخلايا مائية من فبروين الحرير على قوالب رئيسية مرنة (elastomeric masters) تم تصنيعها مايكروياً. تُنتج طبقات أفلام من فبروين الحرير المقلوبة بالنسخة المطابقة للأصل لخصائص أو سمات ذات بدقة عالية بما في ذلك (A) ركائز عامودية (أعمدة على شكل نتوءات) في مستوى النانو (nanoscale posts) مع أدنى عرض من ٤٠٠ نانومتر تقريباً، و (B) قنوات جريان (fluidic channels) في مستوى المايكرون، والتي تم استخدامها في تجارب لاحقة. (أطوال شريط المقياس هي ٥ مايكرومترات و ٥٠٠ مايكرومتر في كل من (A) و (B)، على التوالي). (C و D) صور مايكروية أو مجهرية باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) للمقاطع العرضية (cross sections) لأجهزة تم تصنيعها مايكروياً (microfabricated devices) تُظهر المحافظة على خصائص الأشكال الهندسية في طبقات أفلام رقيقة ذات قنوات مايكروية (microchannel) بعرض من حوالي (C) ٢٤٠ مايكرومتر و (D) ٩٠ مايكرومترًا. (أطوال شريط المقياس هي ٢٠٠ مايكرومتر و ١٠ مايكرومترات في كل (C) و (D)، على التوالي). (E و F) أجهزة جريان مايكروي واضحة معروضة بصور مايكروية مجهرية متألقة لأجهزة تم ترويتها بتدفق من محلول الرودامين (rhodamine solution). إن الحفاظ على سائل الإرواء (perfusate) ضمن القنوات المايكروية يقترح ربط قوي عند السطح البيني الفاصل (interface). (أطوال شريط المقياس هي ٥٠٠ مايكرومتر و ٥٠ مايكرومترًا في كل (E) و (F)، على التوالي). (من (Bettinger, C.J. et al., *Adv. Mater.*, 19, 2847, 2007).

لقد تم وصف أجهزة ذات جريان مايكروبي تم تصنيعها من الجيلاتين ومن فبروين الحرير لدعم زرع الخلايا ضمن لمعة (تجفيف) الأجهزة. إن قلة النفاذية (permeability) النسبية للسوائل ضمن هذه المواد الحيوية تمكن من التحكم الدقيق بالسوائل ضمن وحدات هذه الأجهزة. ويوفر عزل أو حجز السائل في لمعة الجهاز وحدها التزويد بالغذاء وإزالة الفضلات للخلايا المبذورة ضمن القنوات المايكروبية للأجهزة. وعلى أي حال، فإن أحد التطبيقات الواعدة لحاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروبي هو استخدام النقل الكتلي بمساعدة الحمل (convection - aided mass transfer) من أجل حاملات هندسة الأنسجة ذات الحجم الكبير. إن تحقيق هذا المبدأ يتطلب تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ذات جريان مايكروبي باستخدام مواد حيوية عالية النفاذية للماء. ولتحقيق هذه الغاية، فقد تم تصنيع أجهزة جريان مايكروبي باستخدام الألجينات (alginate) [25]، وهي عبارة عن عديدة السكاريد (polysaccharide) تنشأ بشكل طبيعي وتم استخدامها على نطاق واسع في تطبيقات هندسة الأنسجة [42,43]. إن إحدى الخصائص المفيدة على وجه التحديد للمواد الحيوية المبنية من الألجينات هي القدرة على الربط المتشابك القابل للعكس (reversible crosslink) لهذه المواد باستخدام محاليل تحتوي على الكالسيوم وذلك للتحكم بخصائص المواد [44]. وقد تم تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ذات جريان مايكروبي من الألجينات عن طريق قولبة النسخة المطابقة للأصل لطبقات أفلام من الألجينات متبوعة بعملية الربط بواسطة الربط المتشابك المحرض بأيونات الكالسيوم (calcium ion - induced crosslinking). ويتم سد أو إحكام إغلاق القنوات عبر الربط الكيميائي المتشابك عن طريق نزع الكالسيوم أولاً من كل الوجوه للتخلص من الروابط المتشابكة، ومن ثم تصفيح ألواح أو شرائح من الهلامات المائية مع بعضها بعضاً، وبعد ذلك إنتاج ارتباطات كيميائية عبر إضافة كلوريد الكالسيوم (calcium chloride). ويؤدي التدفق أو الحقن المتواصل للشبكة (الشكل رقم ٤.٢ A) باستخدام محاليل تحتوي على كل من المركبات ذات الوزن الجزيئي المرتفع وأخرى ذات الوزن الجزيئي المنخفض إلى مجموعة متنوعة من الإمكانيات لبروفيلات أو لأشكال التراكيز العابرة (transient concentration profiles) من خلال شبكة الهلام المائي (الشكل رقم ٤.٢ B و C). ويمكن ضبط المحددات أو البارامترات مثل الشكل الهندسي للتدفق (flow geometry) ومعدل التدفق الحجمي (volumetric flow rate) وتركيز المذاب (solute concentration) والوزن الجزيئي للمذاب (molecular weight of solute) وكثافة الربط المتشابك للهلام المائي (crosslinking density of hydrogel) وذلك من أجل التحكم بالإحداثيات المكانية والزمانية للتركيز. وتكمن الفائدة من استخدام مثل هذا النظام في القدرة على الإرواء أو التدفق المتواصل (perfuse) المحتمل لشبكة الهلام المائي المحيطة، والذي من المفترض أن يُعطي بدوره الخلايا المبذورة، لتعزيز الإمداد بالغذاء والتخلص من الفضلات. وسيكون هذا التطبيق مفيداً على وجه الخصوص من أجل الخلايا ذات النشاط الاستقلابي العالي مثل الخلايا الكبدية. إن تطوير انتشار الجزيئات الحيوية بمساعدة الحمل من خلال الشبكات ذات الجريان المايكروبي باستخدام مواد حيوية طبيعية هو أساس التطوير في تقدم مجال حاملات الخلايا المهندسة نسيجياً والتي تكون قادرة على تجاوز القيود المكانية المحددة من خلال القيود على الانتشار. إن الانتشار السريع من خلال الشبكات سيدعم نمو الخلايا المغلفة (encapsulated cells) عبر الشبكة. وقد تم أيضاً تصنيع شبكات ذات جريان مايكروبي باستخدام الآغاروز (agarose) [45]، وهو عبارة عن عديد سكاريد غير متفرع ينشأ بشكل طبيعي ويتواجد في جدار خلايا بعض الكائنات الدقيقة (microorganisms). وبشكل مشابه للألجينات، فإن الآغاروز هو عبارة عن بوليمر طبيعي يمكن صبه في هلامات نفوذة (تسمح بالنفوذ) (permeable gels). وقد تم تصنيع شبكات ذات جريان مايكروبي باستخدام عمليات قولبة النسخة المطابقة للأصل جنباً إلى جنب مع تقنيات التصفيح الفيزيائية. إن هذه المعالجة المائية المعتدلة هي ميزة تمكن من المساعدة على تغليف الخلايا مع قابلية كافية للحياة والنمو. وقد تم تصنيع شبكات ذات جريان مايكروبي من الألجينات مع خلايا كبدية فأرية مغلفة

(AML-12) وتم إروائها بشكل متواصل بوسط التغذية. وقد كانت قابلية الخلايا للحياة والنمو في الشبكات التي يتم ترويتها بالحقن أو التدفق المتواصل ٥٨٪. بينما بقيت قابلية الخلايا للحياة والنمو (cell viability) في الشبكات الساكنة (static networks) أقل من ٢٠٪. وذلك في اليوم الثالث بعد عملية بذر الخلايا. ويوضح العمل الموجز في هذا القسم، بالإضافة إلى أعمال أخرى لم يتم الإشارة إليها هنا، المنفعة المحتملة من استخدام حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروفي التي يتم ترويتها بالتدفق أو الحقن المتواصل كأداة من أجل الجيل التالي من حاملات هندسة الأنسجة والتي تهدف إلى تجاوز القيود القائمة منذ فترة طويلة.



الشكل رقم (٢، ٤). وصف خصائص النقل الكتلي (mass transfer) في مادة حيوية ذات جريان مايكروفي (μ FBM) مُصنَّعة من أجهزة جريان مايكروفي من الأليجات (alginate microfluidic devices). (A) صور مجهرية تألقية لمادة حيوية ذات جريان مايكروفي (μ FBM) أثناء التوصيل بمساعدة (assisted delivery) (i-iii) والاستخلاص أو الطرح بمساعدة (assisted extraction) (iv-vi) مادة الـ (RITC - dextran). يشير التوصيل بمساعدة إلى النمط التشغيلي للجهاز، والذي يتم فيه إرواء أو تدفق المذاب من خلال القنوات المايكروية وينحل في كل مكان من الشبكة. ويشير الاستخلاص أو الطرح بمساعدة إلى النمط التشغيلي حيث تتم إزالة المذاب المُحمَّل داخل شبكة الأليجات عن طريق الإرواء أو التدفق بالحقن المتواصل لشبكة القنوات المايكروية مع محلول مائي. تقابل هذه الأنماط حالات التزويد بالغذاء وإزالة الفضلات، على التوالي. إن معدل الانتشار (rate of diffusion) هو بشكل أساسي وظيفة للوزن الجزيئي للمذاب (solute molecular weight) وكثافة الترابط المتشابك للشبكة (crosslinking density of the network) وتركيز المذاب في محلول الإرواء المتدفق (solute concentration in the perfused solution) ومعدل التدفق لوسط التغذية المتدفق (flow rate of the perfused medium). (B) التطور الزمني للشدة الكلية الطبيعية من الصور المتألقية، مثل تلك الصور في (A)، أثناء توصيل واستخلاص أو طرح المواد المذابة (الفلوريسئين (fluorescein)، مُلوَّن متألِّق، الوزن الجزيئي MW = 376 Da؛ (RITC - dextran)، الوزن الجزيئي MW = 70 kDa). تمثل الرموز الأمامية على المخطط الشدات أثناء التوصيل بمساعدة والاستخلاص أو الطرح بمساعدة. بينما تمثل رموز التقاطع على المخطط الشدات أثناء الاستخلاص أو الطرح بدون مساعدة (unassisted extraction) من نفس الشرط الأولي (أي المنجزة عن طريق التوصيل عبر القنوات) كما هو في تجربة الاستخلاص أو الطرح بمساعدة. وقد تم إزاحة زمن البدء للتفريغ بدون مساعدة (unassisted evacuation) ليُطابق ذلك الزمن في الاستخلاص أو الطرح بمساعدة. إن أبعاد البنية هي كالتالي؛ ارتفاع الهلامية $H = 0.29$ cm، والبعد الجانبي للهلامية $L = 1$ cm، وارتفاع القناة المايكروية $h = 200$ μ m، وعرض القناة $w = 100$ μ m. السرعات الخطية (flow velocities) لتدفق السائل خارج البنية هي $u_c = 1$ cm/s، بينما سرعة السائل داخل القنوات المايكروية هي $u_c = 0.6$ cm/s. وتراكيز المذاب هي $c_0 = 20$ μ mol/L من أجل الفلوريسئين و 10 μ mol/L من أجل الـ (RITC - dextran). (تمت إعادة إنتاجها من Cabodi, M. et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 127, 13788, 2005).

Future of Microfluidic Systems in Tissue Engineering (٤,٢,٣,٣) مستقبل أنظمة الجريان المايكروفي في هندسة الأنسجة

لقد ركز النمو السريع لاستخدام الجريانات المايكروية كأنظمة هندسية وبشكل كبير على تصغير التحليل الجزيئي (molecular analysis) والجينومات (genomics) والأجهزة المحمولة من أجل حساسات حيوية قابلة للانتشار الحقل (field - deployable biosensors) وربط معالجة السوائل مع أنظمة إلكترونية ميكانيكية مايكروية (MEMS - microelectromechanical systems) وذلك من أجل تحسين الأتمتة (automation) (المعالجة الآلية) [46]. وعلى أي حال، يمكن أن يستفيد مجال هندسة الأنسجة أيضاً وبشكل كبير من التقدم في تقنية الجريانات المايكروية، نظراً إلى أن المواد الحيوية والعمليات المتوافقة حيويًا الملائمة تكون مرتبطة بطرق التصنيع المايكروية التقليدية. إن التحديات التي تواجه تطبيقات الجريانات المايكروية من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة متقدمة توازي تلك التحديات التي واجهت صناعة الإلكترونيات المايكروية الدقيقة (microelectronic) في منتصف القرن العشرين. وتوجد هناك مشاكل تقليدية تواجه أي حقل دراسة مبني على التصنيع المايكروفي بما في ذلك زيادة إنتاجية الجهاز (device yield) والتغليف (packaging)، وهو المصطلح من أجل ربط الأدوات المايكروية العيانية (macroscopic) بشكل سلس مع الأجهزة التي تعمل بأبعاد طولية مايكروية. وهناك حجر أساس جوهري آخر لتطوير الجيل التالي لحاملات الخلايا والأنسجة ذات الجريان المايكروفي وهو التصميم والتركيب والتحقق من صحة قدرات المواد والعمليات الجديدة. إن تطبيق البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) كمادة من أجل تصنيع أجهزة جريان مايكروفي [13] والمعدة من أجل تطبيقات تحليلية وتشخيصية كان أساسياً لأن البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) قد وُفي بمعايير اختيار المادة المنصوص عليها عن طريق الاحتياجات الجماعية للمستخدم النهائي. إن المرحلة المتوسطة لتبني أو تطبيق الجريانات المايكروية من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة هي تصميم وتصنيع بنية هندسية مايكروية معقدة من أجل زرع الخلايا باستخدام مواد هندسية تقليدية، مثل البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) الذي تم ذكره سابقاً. على سبيل المثال، لقد تم إنجاز الكثير من العمل في إنشاء بيئات مايكروية مصممة (designer microenvironments) من أجل الخلايا الكبدية ضمن أجهزة ذات جريان مايكروفي [47,48]. هذه الأنظمة، ورغم أنها في النهاية مقيدة بموادها غير العضوية وغير القابلة للتحلل الحيوي، فهي مفيدة من أجل دراسة الشروط المثالية بما في ذلك التأثيرات البيئية المايكروية (microenvironmental effects) مثل إجهاد القص (shear stress) ونقل الكتلة (mass transport) والزراعة المشتركة (coculture). وقد تجاوز Lee وآخرون الأشكال الهندسية التقليدية للجريان المايكروفي من أجل تصنيع جهاز يحاكي الشكل الهندسي في الجسم الحي وخصائص نقل الكتلة في الجيوب الكبدية (liver sinusoid) [49]. وعلى الرغم من أن هذه الأنظمة وغيرها هي غير قابلة للتطبيق بشكل مباشر في تطبيقات هندسة الأنسجة وتطبيقات تجديد الأعضاء، إلا أن التطورات التقنية المحيطة بالتصميم والتصنيع وتقنيات زراعة الخلايا بهذه الأجهزة تستمر في تمهيد الطريق من أجل أنظمة مستقبلية مهندسة نسيجياً قابلة للتطبيق بشكل مباشر. وعلى أي حال، يتطلب استخدام الجريانات المايكروية من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة مجموعة أكثر صرامة من متطلبات المواد. إن المواد المستخدمة من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة ذات الجريان المايكروفي ستكون وبشكل مثالي قابلة للارتشاف (resorbable) وتشجع على ارتكاز أو ارتباط الخلايا (cell attachment) وتسمح بتعديل السطح (surface modification) وتكون قابلة للمعالجة السهلة. وستستمر هذه الاحتياجات غير

المحققة في قيادة البحث الفعّال في تركيب وتطوير المواد الحيوية الاصطناعية بالإضافة إلى تنقية (purification) وتحديد خصائص (characterization) المواد الحيوية الطبيعية. وبالإضافة إلى تطوير المواد، يجب أن تتم متابعة التقدم أيضاً في عمليات المواد وذلك من أجل السماح باستراتيجيات تصنيع مايكروفي فعّالة للمواد الجديدة. فعلى سبيل المثال، يجب القيام بالتوسع إلى أنظمة جريان مايكروفي ثلاثية الأبعاد متقدمة باستخدام البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) [50] وذلك من أجل تسهيل استراتيجيات مشابهة باستخدام مواد قابلة للتحلل الحيوي. وبشكل عام، فإن تطوير استراتيجيات موازية من أجل تركيب ومعالجة مواد حيوية جديدة متوافقة مع الخلايا سيؤدي إلى إنتاج حاملات خلايا وأنسجة متقدمة ذات جريان مايكروفي وإلى مزيد من تطوير حاملة الخلايا والأنسجة وفي نهاية المطاف سيؤدي إلى تطوير هندسة الأنسجة.

(٤,٢,٤) الحفر اللين (الطري) للمواد الحيوية Soft Lithography of Biomaterials

تكمّن عمليات التشكيل أو الزخرفة بالحفر الضوئي (photolithographic patterning processes) عند حجر الزاوية لأنظمة في مستوى المايكرون كواحدة من الأدوات الأكثر تطبيقاً على نطاق واسع من أجل إنتاج بُنى مصنعة مايكروياً. لقد تم نقل مبادئ الحفر الضوئي التقليدي بشكل مباشر إلى تطبيقات طبية حيوية من أجل استخدامها في التشكيل أو الزخرفة الانتقائية (selective patterning) للبروتينات والمواد الحيوية الاصطناعية والمواد الحيوية المبدورة بالخلايا. تنطوي إحدى هذه التقنيات على استخدام التنشيط الضوئي (photoactivation) لإنتاج مناطق نشطة موضعياً يمكن أن تُثبت البروتينات والجزيئات الحيوية الأخرى بسهولة. وعلى الرغم من فعّاليتها، فإن بدائل التطعيم الضوئي (photografting) للجزيئات الحيوية سوف تثبت أنها مفيدة لتعزيز المعالجة السريعة والقابلة للتجسيم (لتغيير القياس) وغير المكلفة مع الحفاظ على النشاط البيولوجي لأنواع العينات. إن الطباعة بالاتصال المايكروفي (microcontact printing - μ CP)، والتي تم تطويرها في الأساس من أجل تشكيل أو زخرفة أنواع العينات الكيميائية [51]، تم تعديلها منذ ذلك الحين من أجل تشكيل أو زخرفة الجزيئات الحيوية [52]. ويتم جمع الطباعة بالاتصال المايكروفي (μ CP) والعمليات المرتبطة بها معاً في تقنية عامة تُعرف باسم الحفر اللين (الطري) (soft lithography). وقد أدى تشكيل أو زخرفة المواد البيولوجية باستخدام الحفر اللين (الطري) من خلال تقنيات متنوعة إلى إنتاج حاملات هندسة أنسجة متقدمة. ويُظهر الجدول رقم (٤.١) موجز عن العمليات التي تستخدم الحفر اللين (الطري) والتقنيات المرتبطة بها.

الجدول رقم (٤, ١). مقارنة بين تقنيات التشكيل (الزخرفة) المايكروية (micropatterning) للمواد الحيوية من أجل استخدامها في تصنيع وتطوير حاملة هندسة الأنسجة.

المراجع	دقة التباين الصغرى للميزة	المواد المتوافقة	نمط التشكيل أو الزخرفة	التقنية
[13,22,23,26,34,37,143]	30 nm	بوليمرات طبيعية واصطناعية	قالب رئيسي من (Silicon / PDMS)	قوالب النسخة المطابقة للأصل (Replica molding - RM)
[52,144]	35 nm (جزئيات صغيرة، بروتينات)	جزئيات صغيرة، بوليمرات، بروتينات	طبعة من (PDMS)	طباعة بالاتصال المايكرو (Microcontact Printing - μ CP)
[58]	10 - 15 μ m (خلايا مفردة)	خلايا	طبعة من الأغاروز	
[57,62,63]	100 nm	بوليمرات، بوليمرات حيوية	طبعة من (PDMS)	حفر بالقوة الشعرية (Capillary force Lithography - CFL)
[67,68,128-130]	3 - 10 μ m (بروتينات) 15 - 50 μ m (خلايا)	جزئيات صغيرة، بروتينات، خلايا	جريانات مايكروية باستخدام (PDMS) ثلاثي الأبعاد	تشكيل أو زخرفة بالجريان مايكرو (Microfluidic patterning)
[65,66]	100 μ m	خلايا	مرسام من (PDMS)	تشكيل أو زخرفة مايكروية بالمرسام (Stencil micropatterning)
[86,89-145]	10 nm	جزئيات صغيرة، بروتينات	رأس مجهر القوة الذرية (AFM tip)	حفر نانوي بالقلم المنغمس (Dip - pen Nanolithography - DPN)

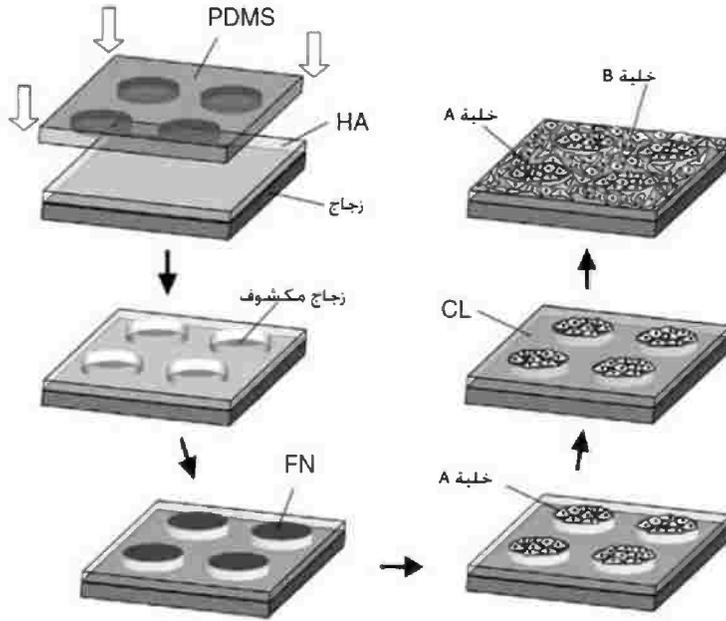
(٤, ٢, ٤, ١) الطباعة بالاتصال المايكرو Microcontact Printing

إن الطباعة بالاتصال المايكرو (μ CP) هي الترسيب المباشر (direct deposition) للجزئيات باستخدام ختم أو طبعة مرنة (elastomeric stamp) مُقَوَّلة بالنسخة المطابقة للأصل، وعادةً ما يتم صنعها من البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS)، وعلى الرغم من أن الطباعة بالاتصال المايكرو (μ CP) قد تم استخدامها منذ منتصف التسعينيات من أجل تشكيل أو زخرفة الجزئيات، إلا أن هذه التقنية قد تم تطبيقها فقط منذ عهدٍ قريب في تطبيقات هندسة الأنسجة. وقد تم توظيف الطباعة بالاتصال المايكرو (μ CP) عادةً في هذا الصدد عبر التشكيل أو الزخرفة المايكروية لبروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM) التي تعزز الالتصاق وذلك من أجل الالتصاق الانتقائي للخلايا (selective adhesion of cells). وقد تم وصف الطباعة بالاتصال المايكرو (μ CP) على مجموعة متنوعة من المواد الحيوية بما في ذلك بولي (حمض اللاكتيك) (PLA) وبولي (حمض إيل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) [53]، وحتى على مستوى الأنسجة البشرية [54]. وقد أظهرت البروتينات المشكَّلة أو المزخرفة باستخدام هذه الطريقة قدرتها على التحكم بشكل الخلايا (cell morphology) وانتشارها (spreading) وأبعادها

الهندسية (geometry) [55] وترتيبها المكاني (spatial arrangement) وتوجيهها النسبي [56] (relative orientation). وقد تم كذلك استعراض الطباعة بالاتصال المايكروفي (μCP) لبروتينات متعددة. وقد أدى تشكيل أو زخرفة البروتين متعدد الخطوات باستخدام الطباعة بالاتصال المايكروفي (μCP) والمتبوعة بردم أو ملء (backfilling) بروتينات إضافية من خلال تقنيات الطبقة - تلو - الطبقة (layer - by - layer techniques) إلى القدرة على تطوير أنظمة زراعة مشتركة بشكلٍ دقيقٍ مع تفاعلات الخلايا - الخلايا غيرية التَّمَط (heterotypic) محددة بشكلٍ جيد [57]. وربما تُثبت القدرة على التحكم بمورفولوجيا أو شكل الخلايا المفردة وتوجيهها وتفاعلات الخلايا - الخلايا أنها حاسمة في هندسة بيئات مايكروية محاكية حيويًا ضمن حاملات هندسة الأنسجة. ولذلك فقد تم أيضاً تبني التقدم في الطباعة بالاتصال المايكروفي (μCP) من أجل استخدامها في التشكيل أو الزخرفة المباشرة للخلايا [58]. وقد استعرض Stevens وآخرون استخدام طبقات الآغاروز المرنة (elastomeric agarose stamps) المقبولة بالنسخة المطابقة للأصل من أجل الترسيب المباشر للخلايا البشرية البانية للعظم (human osteoblasts) على حاملات خلايا وأنسجة مسامية من الهيدروكسي آباتيت (porous hydroxyapatite scaffolds) من أجل التطبيقات في هندسة أنسجة العظم. يسלט هذا العمل الضوء على منافع استخدام مواد "صديقة للخلايا" ("cell - friendly") في الطباعة بالاتصال المايكروفي (μCP) والتي تسمح بتشكيل أو زخرفة سريعة وذات خطوة واحدة لخلايا الثدييات. وسيتم تناول موضوع التشكيل أو الزخرفة المباشرة للخلايا بمزيد من التفصيل في فقرات لاحقة من هذا الفصل.

(٤,٢,٤,٢) الحفر بالقوة الشعرية وتقنيات الحفر اللين (الطري) الأخرى Capillary Force Lithography and Other Soft Lithography Techniques

هناك أيضاً عدد من التقنيات المشتقة التي ترتبط بالطباعة بالاتصال المايكروفي (μCP) والمصممة من أجل بُنى بوليمرية مُصنَّعة بدقة عالية باستخدام قوالب مرنة (elastomeric molds) ومرسامات أو استنسل (stencils) وركائز (substrates). وتتضمن هذه التقنيات القوالب المايكروية في الشعيرات المايكروية (micromolding in microcapillaries - MIMIC) [59] والقوالب بالاتصال المايكروفي بمساعدة المذيب (solvent - assisted microcontact molding - SAMIM) [60] والقوالب بالنقل المايكروفي (microtransfer molding - μTM) [61]. وعلى أي حال، فإن إحدى التقنيات والتي هي بصورةٍ خاصة مفيدة من أجل تطوير حاملة الخلايا والأنسجة هي الحفر بالقوة الشعرية (capillary force lithography - CFL)، وهي تقنية حفر لين (طري) مُكمَّلة للطباعة بالاتصال المايكروفي (μCP) [62]. وكما هو الحال في الطباعة بالاتصال المايكروفي (μCP) يمكن استخدام الحفر بالقوة الشعرية (CFL) من أجل تشكيل أو زخرفة البنى مع أحجام سمات أو خصائص تصل إلى أقل من ١٠٠ نانومتر في مجموعة متنوعة من المواد البوليمرية. ويستخدم الحفر بالقوة الشعرية (CFL) قوالب مرنة لحجز أو عزل البوليمرات في فراغات القالب، والذي يُنتج بُنى مايكروية بعد إزالة القالب. إن الحفر بالقوة الشعرية (CFL) مفيد على وجه الخصوص في تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة؛ نظراً للارتفاعات الكبيرة للسمات أو الخصائص (large feature heights) التي يمكن إنجازها بالإضافة إلى المصفوفة الكبيرة (large array) للمواد الحيوية المتوافقة [63]. فعلى سبيل المثال، تم استخدام هذه التقنية من أجل التشكيل أو الزخرفة المايكروية لمواد حيوية مُنْفَرَة أو طاردة (repellant biomaterials) مثل بولي (غليكول الإيثيلين) (poly(ethylene glycol) - PEG) وحمض الهالورونيك (hyaluronic acid - HA)، والتي عندما تُستخدم بالاشتراك مع بروتينات الالتصاق (الشكل رقم ٤.٣)، يمكن أن يتم استخدامها لتشكيل أو زخرفة الخلايا بشكلٍ انتقائي [64].



الشكل رقم (٣، ٤). مخطط تصنيع نظام زراعة الخلايا المشترك (coculture system) باستخدام الحفر بالقوة الشعرية (capillary force) lithography) وترسيب الطبقة - تلو - الطبقة (layer - by - layer deposition). ويمكن الجمع بين أنواع متعددة من تقنيات الحفر اللين (الطري) لتشكيل مجموعة متنوعة من أنظمة الزراعة المشتركة للخلايا. يستعرض هذا المخطط واحد من هذه الأمثلة، والذي يتم فيه الجمع بين التشكيل أو الزخرفة بالحفر بالقوة الشعرية لحمض الهيالورونيك (HA) والترسيب طبقة - تلو - الطبقة لبروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM) لزخرفة حمض الهيالورونيك وذلك من أجل إنشاء مزجعة مشتركة خلايا الأرومة الليفية (3T3 fibroblasts) والخلايا الجذعية الجنينية الفأرية (murine embryonic stem cells). وبشكل مختصر، فقد تم غزل بضع قطرات من محلول حمض الهيالورونيك (HA) وطلاؤها على شريحة من الزجاج، وتم وضع قالب من البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) مباشرة على طبقة حمض الهيالورونيك (HA) الرقيقة. وقد تراجع حمض الهيالورونيك (HA) تحت المساحة الفارغة لقالب البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) إلى أن أصبح السطح الزجاجي مكشوفاً. وقد تم تغليف أو طلاء المنطقة المكشوفة على الركيزة الزجاجية بمادة الفيرونيكتين، حيث يمكن للخلايا الأولية أن تلتصق بشكل انتقائي. وبعد ذلك، تم تجميع سطح حمض الهيالورونيك (HA) مع الكولاجين، مما يسمح بالالتصاق اللاحق للخلايا الثانوية. إن هذا الإجراء هو إجراء عام ويمكن تكييفه عملياً لأي زوج من أنواع الخلايا. (تمت إعادة إنتاجها من Fukuda, J. et al., *Biomaterials*, 27, 1479, 2006).

وقد أدى انتشار التصنيع المايكروني ومختبرات تقنيات المايكرو والكلفة المنخفضة للمواد إلى العديد من الاختلافات في تقنيات الحفر اللين (الطري). وقد توسع الحفر اللين (الطري) إلى ما هو أبعد من تقنيات الحتم أو الطبع البسيطة من أجل التشكيل أو الزخرفة المباشرة للبروتينات والخلايا. وقد طور Folch وآخرون مرسامات (استنسل) مرنة (elastomeric stencils) مصنعة مايكروياً باستخدام بولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) وذلك من أجل تشكيل أو زخرفة خلايا ثديية على ركائز ثنائية الأبعاد [65]. وبعد التغلب على التحديات التقنية المرتبطة بالطبيعة غير المتوافقة الكارهة للماء (hydrophobic) للبولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) والبيئة المائية للمواد الحيوية، تم تشكيل أو زخرفة الخلايا على

مجموعة متنوعة من مواد الركائز مع درجات انحناء أو تقوس (curvatures) مختلفة بما في ذلك الذهب والبوليستيرين (polystyrene) وهلامات الكولاجين. وقد تم استخدام التشكيل أو الزخرفة المايكروية باستخدام مرسامات أو استنسل مرنة في مزرعة مشتركة من الخلايا الكبدية مع خلايا كُوبفَر (Kupffer cells) (خلايا وعائية كبدية) وذلك لتحسين وظيفة الخلايا الكبدية في المختبر [66]. وقد استخدم Chiu وآخرون أجهزة جريان مايكروفي معقدة من أجل التشكيل أو الزخرفة المايكروية لبروتينات وخلايا متعددة [67]. وقد استخدمت هذه التقنية دارات جريان مايكروفي ثلاثية الأبعاد (3D microfluidic circuits) معقدة والتي تم تركيبها على الركيزة ليتم تشكيلها أو زخرفتها. وبعد ذلك تم ضخ محاليل من البروتينات المتعددة في جميع أنحاء الشبكة، بحيث يحدث الامتزاز أو الامتصاص بشكل انتقائي (selectively adsorbing) للركيزة فقط في المناطق المحددة من خلال بُنى الجريان المايكروفي (microfluidic structures). ويمكن أن يتم بعد إزالة البنية لإظهار الركيزة النهائية المشكّلة أو المزخرفة. لقد تم تطوير هذه الطريقة سابقاً من قبل Delamarche وآخرون وذلك من أجل تشكيل أو زخرفة الغلوبولين المناعي (immunoglobulins) [68].

Applications of Soft Lithography in Scaffold Development (٤,٢,٤,٣) في تطوير حاملة الخلايا والأنسجة (الطري)

سيستمر الحفر اللين (الطري) في لعب دورٍ مهمٍّ في تطبيقات الهندسة الطبية الحيوية الأساسية والتطبيقية. فعلى سبيل المثال، لقد ساعد تشكيل أو زخرفة البروتينات في توضيح أساسيات بيولوجيا الخلايا من خلال استخدام بيئات مايكروية مُصممة (تركيبية). وسيعمل الحفر اللين (الطري) أيضاً في مساعدة فحوصات التَّحَرِّي عالية الإنتاجية (high - throughput screening assays) من أجل تطوير الدواء أو ترسيب المواد الحيوية من أجل دراسات تمايز الخلايا [69,70]. وعلى الرغم من أن الحفر اللين (الطري) قد تم استخدامه لوضع الأرضية من أجل الدراسات الأساسية في بيولوجيا الخلايا، إلا أن التطبيق المباشر للحفر اللين (الطري) في هندسة الأنسجة من خلال تطوير حاملة خلايا وأنسجة متقدمة كان إلى حدٍّ ما محدوداً. إن السبب في ذلك هو بشكلٍ رئيسي ناتج عن الطبيعة ثنائية الأبعاد الكامنة في هذه التقنيات، والتي سبق وأن تمت الإشارة إليها. وبما أنه لا يزال يتم تطوير نماذج من أجل هندسة أنسجة أعضاء معقدة في الأبعاد الثلاثة، فإن الحفر اللين (الطري) سوف يحتاج إلى أن يحدو حذوها إذا أُريد له أن يحظى بدورٍ مهمٍّ في الجيل التالي من حاملات الخلايا والأنسجة.

Electrodeposition of Biomaterials (٤,٢,٥) الترسيب الكهربائي للمواد الحيوية

لقد تم استخدام عمليات الترسيب الكهربائي (electrodeposition processes) بالاشتراك مع الحفر الضوئي وعلى نطاقٍ واسعٍ في التصنيع المايكروفي التقليدي في عملية أُطلق عليها مصطلح (LIGA). إن (LIGA) هو أوائل حروف الكلمات الألمانية (Lithographie, Galvanoformung, Abformung) والتي تُترجم في اللغة الإنجليزية إلى الكلمات "lithography, electroplating, and molding" أي "الحفر، والتلييس (الطلاء) الكهربائي أو التشكيل الغلفاني، والقولبة". ويتم استخدام (LIGA) في تصنيع البنى مع سمات أو خصائص ذات أحجام تقع بين القطع (الحفر) الآلي المايكروفي (micromachining) لسطح من السيليكون والقطع (الحفر) الآلي المايكروفي الدقيق (precision micromachining). ويتم استخدام (LIGA) للبنى المصنّعة مع أبعاد جانبية

بعرض من بضعة مايكروونات وعدة ميليمترات، وهي تؤدي إلى إنتاج بُنى ذات نسبة جانبية عالية للغاية. ويمكن تصنيع مجموعة واسعة من المواد باستخدام (LIGA) بما في ذلك المعادن والسبائك المعدنية (metal alloys) والبلاستيك (اللدائن) والسيراميك. وقد تم استعراض (LIGA) وكذلك العمليات المرتبطة بها من أجل القطع أو الحفر الآلي المايكروني عالي الدقة باستخدام مواد هندسية تقليدية على نحوٍ واسع في مكان آخر [71]. وقد كان هناك اهتمام في الآونة الأخيرة في استخدام بوليمرات قابلة للتحلل الحيوي ومُوصَّلة كهربائياً (eclectically conducting) في هندسة الأنسجة [72,73]، مع اهتمام خاص في تطبيقات تجديد الأنسجة العصبونية (neural tissue regeneration) [19]. وتُقدم (LIGA) طريقة مناسبة من أجل التصنيع المايكروني لبوليمرات مُوصَّلة كهربائياً من أجل استخدامها إما كبدائيات (بدائل) عصبية (neural prosthetics) وإما كحاملات خلايا وأنسجة عصبية وذلك للمساعدة في توجيه نمو العصب من أجل التطبيقات في تجديد الأعصاب المحيطية (peripheral nerve regeneration). وفي العمل المقدم من قبل Lavan وآخرين تم ترسيب البولي (بيرول) (poly(pyrrole) - PPy) كهربائياً، وهو بوليمر مُوصَّلة كهربائياً يُستخدم على نطاقٍ واسع في التطبيقات الطبية الحيوية [18,74]، على جُزُر من الذهب (gold islands) تم بناؤها أو زخرفتها ميكروياً وذلك لتشكيل بُنى من البولي (بيرول) (PPy) في مستوى المايكرون على ركيزة من السيليكون [75]. إن هذه العملية هي قادرة أيضاً على التشكيل الكهربائي لبُنى ثلاثية الأبعاد مع ارتفاعات متفاوتة للسمات وذلك عن طريق تصميم التباعد المناسب للسمات الموصلة على الركيزة العازلة. إن التصنيع المايكروني لمادة مُوصَّلة كهربائياً يمكن أن يملك مجموعة متنوعة من التطبيقات بما في ذلك التشكيل أو الزخرفة المايكرونية (micropatterning) وتوجيه اتصال العصبونات (contact guidance of neurons). وعلى الرغم من أنه توجد هناك حالياً مجموعة واسعة من البوليمرات الموصلة والمتاحة من أجل التطبيقات الطبية الحيوية، إلا أنه يوجد هناك الكثير من القيود التي تحول دون الاستخدام واسع الانتشار للبوليمرات الموصلة في هندسة الأنسجة بما في ذلك المعدلات البطيئة للتحلل الحيوي والخصائص الميكانيكية الهشة والارتكاز أو الالتصاق الضعيف للخلايا في بعض الحالات. إن قصور هذه المواد والتحرك من أجل مواد حيوية مُوصَّلة قابلة للزرع أو الغرس سيدفع أيضاً إلى تطوير عمليات جديدة للمواد الموصلة من أجل مجموعة مشابهة من تطبيقات هندسة الأنسجة العصبونية (العصبية) (neural tissue engineering). وكما هو الحال مع العمليات الأخرى للمواد، يجب أن يُصاحب التحرك لتطوير المواد بالسعي وعلى التوازي للحصول على قدرات معالجة جديدة للمواد.

(٤,٢,٦) تقنيات التشكيل (الزخرفة) المتقدمة Advanced Patterning Techniques

يمكن لقبولبة النسخة المطابقة للأصل (RM) وللحفر اللين (الطري) مجتمعين معاً إعادة تشكيل سمات تكون ذات دقات تباين مناسبة من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة والخلايا. وتوجد هناك تطبيقات أخرى يمكن أن تعيد إنتاج سمات في مستوى ما دون المايكرون من دون الحاجة إلى عمليات الحفر الضوئي. عوضاً عن ذلك، تُوظف هذه التقنيات تجهيزات أو أدوات دقيقة لإنتاج دقة تباين للسمات في مستوى المايكرون وما دون المايكرون. وعلى أي حال، وكما هو الحال في عمليات الحفر الضوئي، فإن هذه التقنيات تكون مقصورة بشكلٍ أساسي على تشكيل أو زخرفة السطوح ثنائية الأبعاد.

(٤,٢,٦,١) القطع (الحفر) الآلي المايكروفي بأشعة الليزر Laser Micromachining

إن القطع أو الحفر الآلي المايكروفي باستخدام أشعة الليزر (laser micromachining) هو عملية حفر من الأعلى إلى الأسفل من أجل الإنتاج السريع لسماوات أو خصائص في مستوى المايكرون. ويتم إنجاز فصل أو جَدّ البوليمرات بأشعة الليزر (laser ablation of polymers) عادةً باستخدام أنواع من أشعة ليزر فوق البنفسجية (UV laser) مثل الإكزامير (excimer) والآرغون - أيون (argon - ion) والفلورين (fluorine) والهيليوم - كاديوم (helium - cadmium) وبخار المعدن (metal vapor) والنتروجين (nitrogen). ويتم حفر البوليمرات عندما تكون طاقة الفوتو إلكترون (photoelectron) (إلكترون مُحَرَّض الإصدار بالضوء) الوارد أو الساقط كبيرة بما يكفي لفصل الروابط الكيميائية بشكل مباشر في حين يتم حدوث ضرر حراري طفيف على المناطق غير المشكَّلة أو المعالجة بالحفر الآلي. ويمكن إنجاز التصنيع المايكروفي للبوليمرات باستخدام الفصل أو الجَدّ بأشعة الليزر (laser ablation) إما عن طريق تعريض كامل ركيزة البوليمر للتشعيع فوق البنفسجي (UV irradiation) من خلال قناع ضوئي (photomask) أو عن طريق استخدام عملية الطباعة أو الكتابة المباشرة (direct writing process). إن دقة التباين الصغرى للسماوات باستخدام الفصل أو الجَدّ بأشعة الليزر هي تقريباً ١٠٠ نانومتر [76]، والتي تعتبر أنها قياس طولي مقبول للبنى المصنَّعة مايكروياً من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة. إن مزايا كل طريقة هي قابلية التحجيم (تغيير القياس) والتخلص من أشكال أو زخارف الحفر الضوئي، على التوالي. وقد تم استخدام الفصل أو الجَدّ بأشعة الليزر لتصنيع عدد من الأنظمة المايكروية والتي، من ناحية أخرى، سيكون من الصعب إنتاجها باستخدام تقنيات قولبة النسخة المطابقة للأصل (RM). فعلى سبيل المثال، يمكن إنتاج أشكال هندسية مثل الثقوب مفتوحة النهاية (through holes) والخنادق أو الأثلام (trenches) في ركائز قابلة للتحلل الحيوي مع حد أدنى من أحجام السماوات بما يقارب ١٠ مايكرومترات في بوليمرات مثل بولي (إيثر-إيثر-كيتون) (poly(ether-ether- ketone) - PEEK [77]، وبولي (ميثاكريلات الميثيل) (poly(methyl methacrylate) - PMMA [78]، وبولي (فينيل الكحول) (poly(vinyl alcohol) - PVA)، وبولي كابرولاكتون (PCL)، وبولي (حمض اللاكتيك) (PLA) [79]. وقد تم أيضاً استخدام الفصل أو الجَدّ بأشعة الليزر بالاشتراك مع تقنيات التصفيح (lamination techniques) مثل تقنيات التصفيح الحراري أو تقنيات تصفيح المذيب (solvent) وذلك لتصنيع نماذج أولية ذات جريان مايكروفي [78,80]. يمكن للفصل أو الجَدّ بأشعة الليزر، حيث تم إثبات فائدته بشكل مباشر من أجل القطع أو الحفر الآلي المايكروفي، أن يضيف وفي نفس الوقت مجموعات وظيفية على السطوح التي خضعت للمعالجة بأشعة الليزر. ويمكن للتشعيع بواسطة الليزر (laser irradiation) أن يؤدي إلى دمج جزيئات النتروجين أو جزيئات الأكسجين وبالتالي إنشاء مجموعات وظيفية (functional groups) مثل الأمينات (amines) أو الأحماض الكربوكسيلية (carboxylic acids). ويمكن لهذه المجموعات الوظيفية أن تعمل كمجموعات طليعية (precursors) من أجل تعديلات السطوح مثل الروابط التساهمية (covalent linkages) للبيبتيدات أو عوامل الأوساخ (الفضلات) غير الحيوية (non - bio - fouling agents). ويمكن لتعديلات السطوح هذه أن تؤدي أيضاً إلى عدد من التأثيرات الضارة على المواد المستخدمة في الجريانات المايكروية في تطبيقات محددة. فعلى سبيل المثال، لقد تبين أن الفصل أو الجَدّ بأشعة الليزر لا يؤثر بشكل كبير على الخصائص السطحية للبولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA)، بل يؤثر على التنقل أو التحرك التناضحي الكهربائي (electroosmotic mobility) للقنوات المايكروية البوليمرية في مواد مثل بولي (غليكول تيريفثالالات الإيثيلين) (poly(ethylene terephthalate glycol) و بولي (كلورايد الفينيل) (poly(vinyl chloride) و بولي (كربونات) (poly(carbonate) [81]. وكما اقترح سابقاً، فإن أحد القيود المحتملة

للفصل أو الجَدِّ بأشعة الليزر هو اختيار المادة، وذلك اعتماداً على التطبيق النهائي المستهدف. يجب على البوليمر العضوي المثالي الذي سيتم استخدامه من أجل الفصل أو الجَدِّ بأشعة الليزر أن يكون مستقرًا حراريًا وميكانيكيًا، بل وأن يكون أيضًا قابلاً لتفكك الروابط (bond dissociation) عند تعرضه للتشعيع فوق البنفسجي. بالإضافة إلى ذلك، فإن من شأن عملية الفصل أو الجَدِّ بأشعة الليزر أن تؤدي من الناحية المثالية إلى التعديل المرغوب للسطح وذلك لتسهيل معالجة المادة النهائية مثل التعديل الكيميائي (chemical modification) أو امتزاز (امتصاص) البروتين (protein adsorption) أو يمكن أن تؤدي إلى خصائص فيزيائية مناسبة من أجل استخدامها في أنظمة الجزيئات المايكروية.

(٤,٢,٦,٢) الحفر الغرواني Colloidal Lithography

تتيح الجسيمات النانوية (nanoparticles) الفرصة من خلال استغلالها في السعي لتحقيق تصنيع مايكروني لمناطق سطحية كبيرة من دون الحاجة إلى استخدام القناع الضوئي أو الطباعة (الكتابة) المباشرة. ويمكن صناعة عدد كبير من الجسيمات النانوية مع أبعاد ذات قياس من ٥٠ نانومتراً باستخدام مجموعة متنوعة من المنهجيات المبنية على المحلول مثل طريقة الفصل الطوري للمُستحلب (emulsion phase separation). يمكن استخدام تقنيات الفصل أو الجَدِّ بأشعة الليزر بالاشتراك مع الجسيمات النانوية من أجل التصنيع السريع لركائز البوليمرات مع مصفوفات ذات سمات أو خصائص في مستوى النانو وبأبعاد أصغر بكثير من طول موجة الضوء، والتي تكون عادةً محدودة باستخدام الحفر الضوئي التقليدي. تقوم إحدى الطرق، والتي يُطلق عليها مصطلح الحفر بالكُرَّات النانوية (nanosphere lithography)، باستخدام قالب مُرتب من جسيمات في مستوى النانومتر كطريقة لتركيز التشعيع بالليزر والذي يتم توجيهه مباشرةً إلى سطح ركيزة البوليمر لإنشاء مصفوفات من الحفر (التجاويف) في مستوى النانو (arrays of nanoscale pits) [82]. ويتم ترسيب محلول من جسيمات السيليكا (ثنائي أكسيد السيليوم) النانوية (silica nanoparticles) على سطح الركيزة. وعندما يتبخّر المذيب، يؤثر التوتر السطحي (surface tension) بشكل يفوق إلى حدٍ كبير الطاقة الحرارية (thermal energy) (kT)، والذي يؤدي إلى حالة التعبئة المرغوبة بشكلٍ قوي. والنتيجة هي ترتيب تلقائي عفوي للجسيمات النانوية في تشكيلة سداسية مغلقة ومعبأة. ويمكن استخدام طريقة مطابقة تقريباً لإنشاء قوالب مرتبة في المستوى المايكروني من أجل استخدامها في تصنيع حاملات خلايا وأنسجة بواسطة انْتِفاذ أو اسْتِعْسَال مَوْلد المسام (porogen - leaching)، والتي سيتم وصفها بالقسم القادم في التجميع الذاتي في المستوى المايكروني. يتم إنجاز الفصل أو الجَدِّ الموضوعي بأشعة الليزر عندما تقوم جسيمات السيليكا النانوية المرتبة بتركيز التشعيع فوق البنفسجي، والذي يمكن أن يُنتج خصائص أو سمات مثل الحُفَر ذات الأقطار الأقل من ٣٠ نانومتراً. ويمكن تغيير الحجم والشكل الهندسي للسمات من خلال ضبط بارامترات أو محددات المعالجة بما في ذلك قطر الجسيمات النانوية وطول موجة أشعة الليزر وطاقة الأشعة وزاوية سقوط التشعيع [83]. إن الحفر بالكُرَّات النانوية يوفر طريقة ملائمة من أجل إنشاء مصفوفات كبيرة مرتبة مع أبعاد سمات أو خصائص تكون بالطرق الأخرى بطيئة جداً ومكلفة وفي حالة السمات ذات القياس من رتبة ١٠ نانومترات فإنها تكون مستحيلة باستخدام طرق الحفر الضوئي التقليدية. ففي حين أن مجموعة الأشكال الهندسية للسمات المحتملة تكون مقيدة أو محدودة في جوهرها من خلال طبيعة عمليات الحفر بالكُرَّات النانوية من الأعلى - إلى الأسفل، فإن مصفوفة المواد المناسبة تكون مشابهة بشكلٍ أساسي لتلك المستخدمة في عملية الفصل أو الجَدِّ بأشعة الليزر. ومع ذلك، يمكن أن تعمل هذه الطريقة لتكون مفيدة في هندسة الركائز البوليمرية وذلك من أجل دراسة أو تعزيز تفاعلات الخلايا - المصفوفة عن طريق توفير إشارات طوبوغرافية سطحية نانوية (nanotopographic signals).

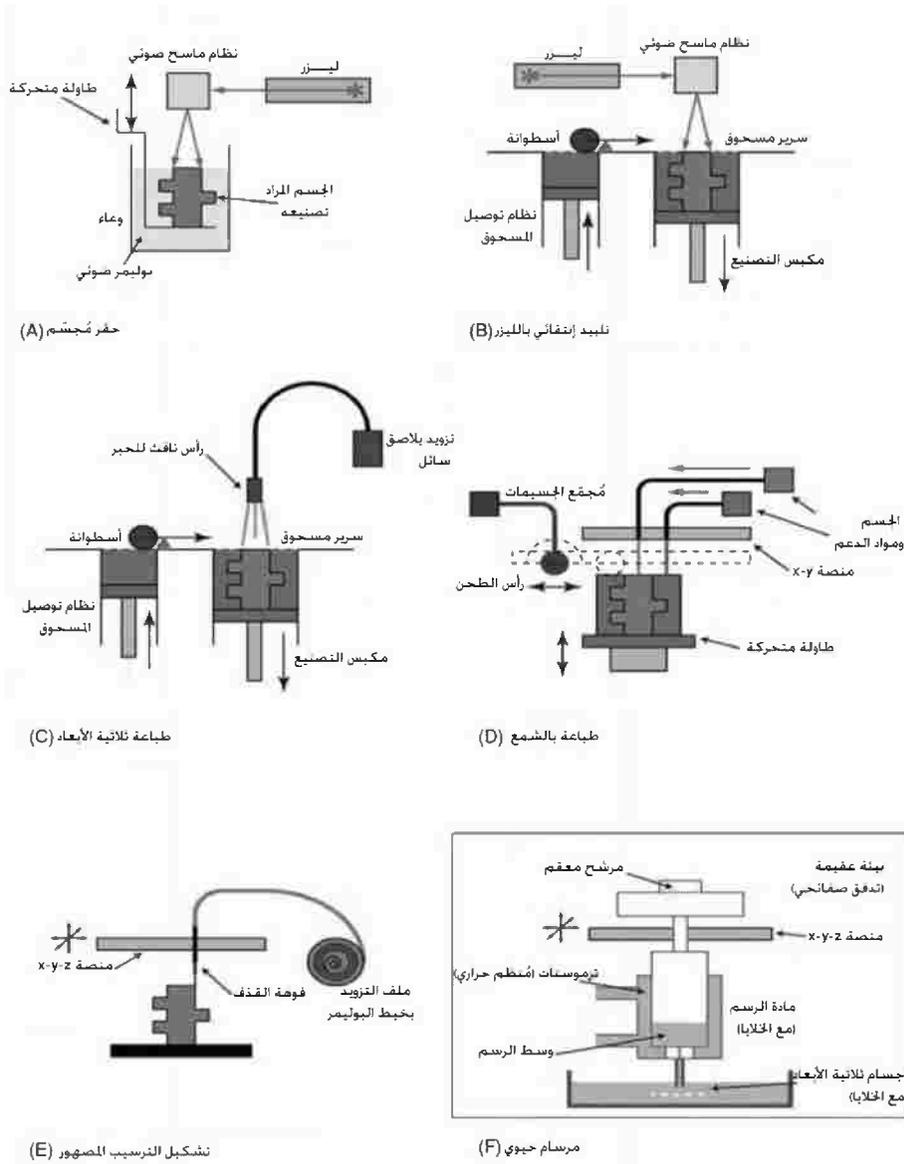
(٤, ٢, ٦, ٣) الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس Dip-Pen Nanolithography

إن الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (dip-pen nanolithography - DPN) هو طريقة تُوظف استخدام تجهيزات أو أدوات مجهر القوة الذرية (atomic force microscopy - AFM) من أجل تشكيل أو زخرفة جزئيات مفردة (single molecules) [84] أو جزيئات متعددة (multiple molecules) [85] مع دقة تباين في مستوى النانومتر. لقد تم تكييف الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN) من أجل تشكيل أو زخرفة الجزئيات العضوية بما في ذلك أسلاك البوليمر النانوية (polymer nanowires) والبروتينات [86] والغلوبولين المناعي [87] وقليلات النوكليوتيدات (oligonucleotides) المعدلة كيميائياً [88] والكولاجين من النمط الأول [89]. وقد تم تطوير الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN) في الأصل لإنجاز دقات تباين للتشكيل أو الزخرفة في المستوى النانوي وذلك من أجل إنشاء وتعديل الأجهزة في المستوى النانوي. لقد قدّم تطور الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN) بعض الحلول لأوجه القصور التي شهدها الجيل الأول من التقنيات مثل التركيبة الأكثر توسعاً لكيميائية السطح وتحسين التحكم بدقة التباين والطباعة [90]. وعلى أي حال، فإنه يوجد هناك بعض القيود الملازمة والمعقدة لاستخدام مجهر القوة الذرية (AFM) كأداة من أجل الحفر في المستوى النانوي بما في ذلك الأجهزة المكلفة وقابلية التحجيم (تغيير القياس) الضعيفة والقيود للطباعة على السطوح ثنائية الأبعاد في المقام الأول. على أي حال، وكما هو الحال مع العديد من تقنيات التصنيع المايكروني التي تم ذكرها سابقاً، فإنه توجد هناك مجموعة واسعة من تطبيقات هندسة الأنسجة من أجل الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN)، وإن كانت مجموعة أقل قدرًا بالنظر إلى تقنيات الحفر اللين (الطري). وكما هو الحال في التقنيات التي تم ذكرها سابقاً، فمن الممكن استخدام الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN) دائماً من أجل التحديد الوظيفي (functionalizing) لحاملات الخلايا والأنسجة ثنائية الأبعاد من أجل القيام بمزيد من التحكم في توجيه شكل (مورفولوجيا) والتصاق وهجرة وتفاعلات الخلايا - الخلايا.

(٤, ٣) تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد FABRICATION OF THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLDS

إن الدافع من أجل تصميم حاملة خلايا وأنسجة يكون مُركّزاً عادةً على القدرة على إنشاء حاملات خلايا وأنسجة ذات أشكال هندسية لوحات خلايا محددة مسبقاً ومُتحكم بها بدقة. إن تحسين بُنى المسام سيكون مفيداً في تكييف محددات أو بارامترات التصميم مثل النسبة المئوية للفراغ (void percentage) من أجل بذر الخلايا والخصائص الميكانيكية الكتلية (bulk mechanical properties) والتراكيز المتوقعة للمواد الغذائية والفضلات في كل مكان من حاملة الخلايا والأنسجة. ويتطلب التحكم ببنية المسام في مستوى المايكرون توظيف تقنيات تصنيع ثلاثية الأبعاد متقدمة وأدوات تصميم طوبولوجيا حسابية (computational topology design tools). يقوم المجال العام للنماذج الأولية السريعة (RP)، والذي تم تطويره في الأصل من أجل تقنيات التصنيع السريعة، بتشكيل أجسام ثلاثية الأبعاد بمساعدة عتاد أو أجهزة تصنيع مخصصة ونماذج صلبة أو سطحية مُولّدة بواسطة الحاسب. وقد سمحت برامج مثل برامج التصميم بمساعدة الحاسب (computer - aided design - CAD)

والمقترنة مع القدرة على تصنيع بُنى ثلاثية الأبعاد كيفية ومعقدة من خلال استخدام نماذج أولية سريعة وتقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) بإنتاج حاملات خلايا وأنسجة تركيبية مُصممة ذات بنية هندسية مايكروية محددة مسبقاً. لقد كان أحد القيود الرئيسية في حاملات الخلايا والأنسجة المصنّعة مايكروياً هو التقييد الكامن في الحفر الضوئي وعلوم السطح للمنصات المستوية ثنائية الأبعاد. يمكن تعديل بعض عمليات الحفر الضوئي لإنشاء بُنى ثلاثية الأبعاد بما في ذلك استخدام تقنيات الحُطى (الخطوة) (stepping techniques) والأوريغامي في المستوى المايكرو (microscale origami) (فن صناعة المجسمات من خلال طي الورق). وعلى أي حال، فإن هذه التقنيات هي تقنيات مُكلفة وغير عملية من أجل الكثير من التطبيقات بما في ذلك تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة من أجل استخدامها في هندسة الأنسجة. إن تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF)، من خلال تطبيق الترسيب المتحكم به باستخدام برامج الحاسب، لا تتطلب استخدام أقنعة ضوئية متعددة أو محاذة الخطوة بين الطبقات. إن الأنظمة التي يمكنها أن تدمج وبشكلٍ حر عمليات التصنيع المايكرو المتحكم بها في "الاتجاه - z" (البعد الثالث) تملك تحكماً كاملاً بالأشكال الهندسية في المستوى المايكرو والخصائص الماكروسكوبية (الماكروية) ذات الصلة الناتجة عنها. وقد تم ابتكار طرق تصنيع تتحكم بالتصنيع ثلاثي الأبعاد من أجل تصنيع أنواع متعددة من المواد بما في ذلك البوليمرات والمركبات والسيراميك (الشكل رقم ٤.٤). وهناك اهتمام خاص في التحكم بالمسامية (porosity) والمعاملات الميكانيكية (mechanical moduli) والتفاعل (interplay) بينها وبين محددات أو بارامترات تصميم حاملات الخلايا والأنسجة الأخرى. فعلى سبيل المثال، قد يكون من المفيد تصميم حاملات خلايا وأنسجة ذات مُعاملات ميكانيكية تُطابق مجال المعاملات التي وُجدت سواهاً في الأنسجة الرخوة (soft tissues) (من ٠.٥ إلى ٣٥ ميغا باسكال MPa) أو في الأنسجة الصلبة (hard tissues) (من ١٠ إلى ١٥٠٠ ميغا باسكال). وتستعرض الفقرة التالية الحالة الراهنة لتطور تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) كما أنها تستعرض التقدم المحتمل والتطبيقات المحتملة من أجل استخدامها في تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة.



الشكل رقم (٤، ٤). مخططات أنظمة تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) مُصنَّفة حسب تقنية المعالجة. (A، B) أنظمة معالجة مبنية على أشعة الليزر

تتضمن أنظمة الحفر المُجَسَّم (ثلاثي الأبعاد) (SLA)، والتي تقوم باللمرة الضوئية (photopolymerizes) لسائل (A) وأنظمة تصليب أو تلييد انتقائي بواسطة الليزر (SLS)، والتي تقوم بتصليب أو تلييد مادة مسحوقة على شكل بودرة (powdered material) (B). في كل نظام، يتم رش أو فرش مادة على منصة مستوية مبنية والتي يتم تخفيضها من أجل كل طبقة. (C، D) أنظمة مبنية على الطباعة، تتضمن الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) (C) وألة الطباعة بواسطة الشمع (D). تقوم أنظمة الطباعة ثلاثية الأبعاد بطباعة رابط كيميائي على سرير مفروش بمسحوق. ويقوم نظام الطباعة المبنى على استخدام الشمع بطباعة نوعين من المواد الشمعية على التسلسل. (E، F) أنظمة طباعة مبنية على استخدام الفوهة. يطبع الجهاز المُشكَّل للنموذج بواسطة ترسيب المصهور خيط رفيع من المادة التي يتم تسخينها من خلال فوهة (E). وتطبع الراسمة الحيوية (bioplotter) مادة تتم معالجتها إما كيميائياً وإما حرارياً (F). (من موقع Springer Science and Business Media and Worldwide and Guide to

Rapid Prototyping، حقوق الطبع والنشر لـ Castle Island Co.، <http://home.att.net/~castleisland/>).

(٤,٣,١) الحفر المُجَسَّم (ثلاثي الأبعاد) والتصليب (التليد) الانتقائي بواسطة أشعة الليزر Stereolithography And Selective Laser Sintering

إن الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (stereolithography - SLA) والتصليب (التليد) الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS) هي تقنيات تصنيع للشكل الحر الصلب (SFF) والتي تستخدم جهاز معالجة مبنياً على أشعة الليزر وذلك من أجل البلمرة الضوئية لمونومات (مواحد) سائلة (liquid monomers) أو من أجل تصليب أو تليد مواد على شكل مسحوق بودرة (powered materials)، على التوالي (الشكل رقم ٤,٤ A و B). وتبدأ كل من عمليتي الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) وكذلك التصليب أو التليد الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS) من خلال تحويل بنية ثلاثية الأبعاد محددة من قبل المستخدم باستخدام برامج التصميم بمساعدة الحاسب (CAD) أو برامج حاسب مشابهة، والتي يتم تحويلها بعد ذلك إلى سلسلة من "الشرائح" ("slices") ثنائية الأبعاد مُشكَّلة أو مُزخرفة بأشكال هندسية ذات سماكة من حوالي ١٠٠ مايكرومتر. تُرسل آليّة مُنظِّمة (آلية للتضييق بالارتجاع) يتم التحكم بها بواسطة حاسب (computer - controlled servo mechanism) معلومات إلى أشعة ليزر ماسحة تقوم بتوجيه الموقع ضمن المستوى ثنائي الأبعاد $(x - y)$ ، رابطةً بشكل انتقائي المادة لتشكيل البنية. ويتم بعد ذلك إنزال المنصة المستوية (platform) المبنية بخطوة إلى الأسفل بنفس المسافة المعادلة لسماكة الشريحة ومن ثم يتم مسح شريحة جديدة. ويقوم الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) ببلمرة المادة بشكل انتقائي من وعاء لمحلول بوليمري ضوئي في عملية طبقة تلو الطبقة (layer - by - layer process). وقد تم استخدام الحفر المُجَسَّم لتصنيع حاملات الخلايا والأنسجة من البولي (فومارات البروبيلين) (poly(propylene fumarate)) و خلائط من فومارات ثنائي الإيثيل (diethyl fumarate mixtures) من أجل الأنسجة الصلبة بما في ذلك إصلاح العيوب العظمية (bone defects) [91]. وقد تم استخدام الهلامات المائية المصنوعة من بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) التي تم تعديلها بشكل نهائي مع مجموعات من الأكريلات النشطة ضوئياً (photoactive acrylate) وهي البولي (غليكول الإيثيلين) - ثنائي ميثا كريات (poly(ethylene glycol) - di methacrylate) - PEG - DMA وعلى نطاق واسع من أجل الأنظمة القابلة للربط الضوئي المتشابك (photocrosslinkable systems) ليتم استخدامها مع هندسة الأنسجة. وقد تم كذلك تصنيع حاملات خلايا وأنسجة من بولي (غليكول الإيثيلين) - ثنائي ميثا كريات (PEG - DMA) مندمجة مع جسيمات مايكروية من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) من أجل استخدامها في هندسة الأنسجة الرخوة [92]. وقد ذكرت العديد من المجموعات البحثية استخدام أجهزة مرايا مايكروية رقمية (digital micromirror devices - DMDs) للمساعدة في الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) لمواد متنوعة بما في ذلك البوليمرات [93] والسيراميك [94]. إن أحد القيود السابقة للعمليات المبنية على الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) كانت عدم القدرة على تصنيع حاملات خلايا وأنسجة كبيرة بما فيه الكفاية من أجل استخدامها في التطبيقات الطبية. لقد تم تجاوز هذا القيد في العمل المقدم من قبل Cooke وآخرين، حيث يمكن تصنيع المستويات الطولية المطلوبة ذات الصلة من أجل إصلاح العيوب العظمية ذات الأحجام الحرجة باستخدام الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA). إن التصليب أو التليد الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS)، وهو طريقة لتصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) والذي يعمل بشكل مشابه للحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA)، يقوم بالربط وبشكل انتقائي لمادة من سطح مستوي يحوي مسحوق البودرة باستخدام أشعة ليزر ثاني أكسيد

الكربون (carbon dioxide laser) يتم توجيهها على سرير مستوي يحوي على مسحوق بودرة المادة. تتم عملية المسح بواسطة أشعة الليزر عبر كامل السطح وتقوم بتصليب أو تليد البوليمرات أو المركبات في شكل أو زخرفة يتم برمجتها بشكل مسبق لكل طبقة. وتؤدي قوى الضغط المنخفضة (low compaction forces) أثناء التصنيع باستخدام طريقة التصليب أو التليد الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS) إلى بُنى مسامية للغاية. لقد تم استخدام التصليب أو التليد الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS) لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة باستخدام فوسفات الكالسيوم (calcium phosphate) وبولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLA) وبولي كابرولاكتون (PCL) وبولي (إيثر-إيثر-كيتون) (PEEK).

يتم ضبط دقة التباين المكاني (spatial resolution) والحجم الأدنى للميزة أو السمة (feature) في عملية الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) وعملية التصليب أو التليد الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS) من خلال حجم بقعة أشعة الليزر (laser spot) في المستوى السطحي ($x-y$) ومن خلال سماكة الشريحة في البعد (z). ومن الممكن عادةً إحراز أحجام بقع ليزرية من رتبة ٢٥٠ مايكرومتر، في حين تم إنجاز أحجام بقع ليزرية أقل من ٧٠ مايكرومترًا من أجل الأنظمة المعدلة. إن دقة تباين الميزة أو السمة في المحور (z) تكون محدودة نظريًا من خلال دقة نظام الخطى (الخطوة) الميكانيكي (mechanical stepping system) الذي يقوم بضغط سماكة الشريحة وهي عادةً ليست أصغر من ١٠٠ مايكرومتر. وبشكل عام، فإن تقليص دقة تباين الميزة أو السمة وسماكة الشريحة في عمليات الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) والتصليب أو التليد الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS) يؤدي إلى انخفاض شديد في سرعة الإنتاج. ويتطلب النموذج الحالي من أجل هندسة الأنسجة فقط تقنيات تصنيع مايكروفي تكون قادرة على إنتاج سمات أو خصائص تكون ذات قياس أو ترتيب مشابه لحجم عدد قليل من الخلايا أو ما يقارب من ٥٠ مايكرومترًا. وبالرغم من ذلك، فإنه يوجد هناك حلول هندسية محتملة لتجاوز مشاكل دقة التباين وذلك في حال الحاجة إلى تطوير حاملة خلايا وأنسجة ذات دقات تباين من رتبة ١ مايكرومتر. يمكن للتغيرات في عمليات الحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) أن تغلب على القيود المتعلقة بسماكة الشريحة. ويمكن للربط المتشابك للمواد الحيوية عبر إثارة الفوتونات المتعددة (multiphoton excitation) أن يوفر أيضًا طريقة فعالة للتصنيع المايكروفي لحاملة خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد. وقد تم تطبيق الربط المتشابك من خلال إثارة الفوتونات المتعددة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) لتشكيل مصفوفات ثلاثية الأبعاد وذلك لنطاق واسع من البوليمرات والتشكيلات أو الصيغ البروتينية الكتلية مثل الكولاجين واللامينين (laminin) والفيبرونيكتين والبولي أكريلاميد (polyacrylamide) وألبومين (زلال) المصل البقري (bovine serum albumin) والفوسفاتاز القلوي (alkaline phosphatase) وخلايا متنوعة مما سبق ذكره [95]. إن توزيع شدة الإشعاع (intensity of irradiation) في المحور (z) يمكن أن يُخَفِّض نظريًا من الأحجام الدنيا للسمات أو الخصائص في هذا المحور إلى ما يقرب من ٢٠ مايكرومترًا أو أصغر. ومن الجدير بالملاحظة، أن مصفوفات البروتين التي يتم تصنيعها باستخدام هذه الطريقة قد أظهرت أنها تبقى فعالة في هذه البيئة من مصفوفة البوليمر [96]. إن المزيد من التقدم في هذه التقنية يمكن أن يؤدي إلى تصنيع سريع وفعال لبُنى ثلاثية الأبعاد باستخدام مجموعة متنوعة من المواد الحيوية بينما تقوم وفي نفس الوقت بالمحافظة على الشروط الدقيقة التي يمكنها أن تصون أو تحافظ على النشاط البيولوجي (الحيوي).

(٤,٣,٢) الطباعة ثلاثية الأبعاد Three-Dimensional Printing

إن عملية الطباعة ثلاثية الأبعاد (three - dimensional printing - 3DP) هي مشابهة عملياً لتلك الخاصة بالحفر المُجَسَّم ثلاثي الأبعاد (SLA) والتصلب أو التليد الانتقائي بواسطة أشعة الليزر (SLS) والتي يتم فيها تصنيع جسم ثلاثي الأبعاد من شريحة واحدة ثنائية الأبعاد في وقت واحد باستخدام نظام الخطوة. والاستثناء الوحيد هو أن الطباعة ثلاثية الأبعاد (DP3) تستخدم تقنية الطباعة النافثة للحبر (ink - jet printer) وذلك للتحكم بترسيب رابط كيميائي وصهر المادة بشكل انتقائي في سطح مستوٍ من مسحوق بودرة المادة (سريز مسحوق powder bed) من أجل إنشاء الجسم. وقد تم تصنيع أجهزة توصيل الدواء وأجهزة هندسة الأنسجة من بولي (أكسيد الإيثيلين) (poly(ethylene oxide) - PEO)، وبولي كابرولاكتون (PCL) وبولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) باستخدام الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP). وعلى أي حال، يمكن من حيث المبدأ تصنيع أي مادة بيولوجية باستخدام الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) وذلك وفقاً لاختيار رابط كيميائي (chemical binder) مناسب. وتختلف دقة تباين الأجسام التي يتم إنشاؤها باستخدام الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) بناءً على تعقيد الجسم. وقد تم إنتاج خطوط ذات عرض من ٢٠٠ و ٥٠٠ مايكرومتر وذلك باستخدام الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) لمحايل من البوليمرات ومذيبات نقية، على التوالي. إن دقات تباين لسمات أو خصائص من رتبة حوالي ١ ميليمتر تكون مناسبة أكثر على الأرجح من أجل الأشكال الهندسية المعقدة. إن أحد القيود الهامة في تطبيق الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) من أجل حاملات الخلايا والأنسجة هو إضافة الرابط الكيميائي. فحتى لو كان تركيب الرابط الكيميائي نفسه غير سام ومتوافق حيويًا، فإن تقديم مذيبات عضوية سامة للخلايا مثل الكلوروفورم (chloroform) أو كلوريد الميثيلين (methylene chloride) يكون غير مرغوب فيه. إن جهود ما بعد التصنيع من أجل إزالة ما تبقى من المذيب مثل التجفيف بالتخلية أو السحب (vacuum drying) هي ليست فعالة تمامًا؛ وبناءً على ذلك تبقى مشكلة سمية الخلايا في حاملات الخلايا والأنسجة المصنعة عن طريق الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP).

(٤,٣,٣) النمذجة (التشكيل) بترسيب المصهور Fused Deposition Modeling

إن النمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (fused deposition modeling - FDM) هي طريقة أخرى من أجل تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) والتي تم توظيفها في تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد (الشكل رقم ٤، ٤). تستخدم النمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (FDM) تقنيات ترسيب طبقة تلو الطبقة والتي يتم فيها قذف بوليمرات مصهورة أو سيراميك مصهور من خلال فوهة (nozzle) ذات فتحة صغيرة، والتي تندمج مع المادة على الطبقة التي تم ترسيبها سابقاً. ويتم التحكم بنمط أو شكل كل طبقة عن طريق التلاعب الميكانيكي (mechanical manipulation) لموقع الفوهة في المستوي (x - y) وهذا النمط أو الشكل يمكن أن يكون مختلفاً أو كفيئاً من أجل كل طبقة يتم ترسيبها. لقد تم تطبيق هذه التقنية من أجل إنتاج حاملة خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد باستخدام بوليمرات بولي كابرولاكتون (PCL) وبولي إيثيلين عالي الكثافة (HDPE) ومركبات (بولي كابرولاكتون) (PCL) / هيدروكسي آباتيت (HA). وقد تم أيضاً تطوير ترسيب مصهور السيراميك من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة من بي - فوسفات ثلاثي الكالسيوم (B - tricalcium phosphate). يمكن لعمليات النمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (FDM) أن تُنجز أحجام مسام تقع في المجال من ١٦٠ إلى ٧٠٠ مايكرومتر مع مسامية تقع ضمن المجال من ٤٨٪ إلى ٧٧٪.

إن حاملات الخلايا والأنسجة التي يتم تصنيعها من البولي كابرولاكتون (PCL) من خلال النمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (FDM) تملك صلابة ضاغطة (compressive stiffness) تتراوح من ٤ إلى ٧٧ ميغا باسكال، والتي تتجاوز الصلابة الميكانيكية (mechanical stiffness) لكل من الأنسجة الرخوة والأنسجة الصلبة [97]. إن واحدة من الميزات الأساسية للنمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (FDM) والعمليات المرتبطة بها هي درجة الدقة التي يمكن الوصول إليها في المستوى ($x-y$). وعلى أي حال، يبقى التحكم في البعد الثالث على المحور (z) محدوداً ويتم ضبطه عن طريق قطر المادة المقذوفة من خلال الفوهة. إن القيود الإضافية بما في ذلك تباين المسام (pore anisotropy) وكذلك الشكل الهندسي لترباط أو اتصال المسام (pore connectivity) تكون محدودة بصورة ملحوظة وذلك بسبب عملية الترسيب المستمرة. وتحد عملية القذف من أنواع المواد التي يمكن معالجتها وبالتالي فقد حُدّت من قابلية التطبيق الواسع للنمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (FDM) من أجل تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة. إن عملية النمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (FDM) هي عادةً محدودة للبوليمرات الاصطناعية اللدنة بالحرارة وبالتالي فإنها تستبعد العديد من المواد الحيوية الطبيعية أو البوليمرات الاصطناعية التي تتصلد (تتصلب) بالحرارة.

(٤,٣,٤) الترسيب بالمحقنة المايكروية Microsyringe Deposition

إن الترسيب بالمحقنة المايكروية (microsyringe deposition) هو عملياً مشابه للنمذجة أو التشكيل بترسيب المصهور (FDM) والذي يتم فيه تشكيل أو زخرفة بوليمر على شكل سطح مُتحكم به بدقة باستخدام جريان مادة مستمر من خلال ترسيب طبقة تلو الطبقة وذلك من أجل إنشاء بُنى ثلاثية الأبعاد [98]. ويستخدم الترسيب المبني على المحقنة المايكروية بمساعدة الضغط (pressure assisted microsyringe - based deposition - PAM) هواءً مضغوطاً لقذف أو دفع محلول من البوليمر في مذيب طيار (volatile solvent) من خلال إبرة شعرية (capillary needle) ضيقة ذات قطر بين ١٠ و ٢٠ مايكرومتراً. يتم التحكم بوضع المحلول في المستوى ($x-y$) عن طريق نظام استيضاع (وضع) مايكروفي (micropositioning system)، والذي يمكنه أن ينجز دقات جانبية (lateral precisions) بمقدار ٠,١ مايكرومتراً بينما يمكن أن تتراوح الأبعاد الفيزيائية للبنى من ٥ إلى ٦٠٠ مايكرومتر اعتماداً على بارامترات أو محددات المعالجة المختلفة. وقد تم استخدام الترسيب المبني على المحقنة المايكروية بمساعدة الضغط (PAM) من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد مُصنّعة مايكروياً من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA)، ولكن يمكن نظرياً توسيعه إلى أي بوليمر، اصطناعي أو طبيعي قابل للذوبان في المذيبات الطيارة. يُقدم الترسيب المبني على المحقنة المايكروية بمساعدة الضغط (PAM) العديد من المزايا المختلفة زيادةً على طرق تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) بما في ذلك دقة تباين جانبية وأبعاد سمات أو خصائص مُحسّنة بشكل كبير. ومن المعروف أن عمليات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) تملك الحد الأدنى من دقات التباين وهي من رتبة ١٠٠ مايكرومتر أو أكبر وكذلك فإنها تملك قيوداً رئيسية عند الحد الأدنى من حجم السمة أو الميزة. إن الترسيب المبني على المحقنة المايكروية بمساعدة الضغط (PAM) يوفر طريقة مريحة وملائمة نحو تصنيع حاملات خلايا وأنسجة متعددة الأطوار (multiphase scaffolds) مع دقة وضع في مستوى المايكرون للعديد من البوليمرات. كما تسمح درجات الحرارة المنخفضة أيضاً بأنظمة دمج محتملة من أجل الإطلاق المتحكم به للبروتينات والجزيئات الحيوية الأخرى وذلك من أجل إنشاء بيئات مايكروية مناسبة لتجديد الأنسجة.

(٤,٣,٥) الامتصاص ثنائي الفوتون Two-Photon Absorption

إن الامتصاص ثنائي الفوتون (two - photon absorption) هو تقنية تصنيع مايكروبي ثلاثية الأبعاد قادرة على إنتاج سمات أو خصائص ذات دقات تباين من ١٢٠ نانومتر، أي أقل بكثير من حد الانعراج (diffraction limit) لعمليات الحفر الضوئي الأخرى [99]. إن المواد التي يتم استخدامها في هذه التقنية هي راتينات (راتنجات) اليورثين المعدلة بالأكريلات (acrylate - modified urethane resins)، والتي تكون مترافقة مع بادئات أو مُحَرِّصَات ضوئية (photoinitiators) وذلك من أجل الحث على البلمرة (polymerization). وتكون راتينات البوليمرات الأولية تلك شفافة للأشعة تحت الحمراء (infrared)، بحيث تسمح بالاختراق (penetration) العميق للتشعيع والتحكم اللاحق بعمق الشكل الهندسي للسمة أو الميزة ضمن البنى ذات السمات أو الخصائص. وعلى الرغم من أن هذه التقنيات قد تم تصميمها في الأصل من أجل استخدامها في الأنظمة الكهربائية الميكانيكية الدقيقة (MEMS)، إلا أنه قد تم استخدامها في تطوير حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد. وقد تم استخدام تقنيات البلمرة ثنائية الفوتون (two - photon polymerization techniques) وذلك من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة باستخدام (ORMOCER)، وهي مادة مُلكية هجينة مركبة من مواد غير عضوية - عضوية قابلة للبلمرة الضوئية. وقد تم بذر مجموعة متنوعة من أنواع الخلايا على حاملات الخلايا والأنسجة تلك بما في ذلك الخلايا البطانية وخلايا الأورام الأرومائية العصبية (neuroblastoma cells) [100]. ويوجد هناك العديد من المزايا الواضحة لاستخدام التقنيات ثنائية الفوتون من أجل التصنيع المايكروبي ثلاثي الأبعاد بما في ذلك دقات التباين للسمات أو الخصائص الصغيرة والمعالجة السريعة نسبياً. وعلى أي حال، فإن هناك سيئات مختلفة بما في ذلك تكلفة الأجهزة والخصائص الضعيفة للمواد المتوفرة حالياً من أجل الاستخدام في الأنظمة ثنائية الفوتون. إن هذه السيئات من المرجح أكثر أن توجد فقط بسبب عدم نضوج هذه التقنية بشكل كامل في المجال التجاري. ونظراً إلى أن التقنيات ثنائية الفوتون تصبح أكثر دقة ويتم اعتمادها في مجالات مختلفة من التطبيقات مثل هندسة الأنسجة وتجديد الأعضاء، فإنه سيتم الاستجابة للحاجة إلى تجهيزات بأسعار معقولة ومواد حيوية جديدة مناسبة لقدرات معالجة هذه المواد.

(٤,٣,٦) الطوبوغرافيا (السمات السطحية) النانوية ثلاثية الأبعاد Three-Dimensional Nanotopography**(٤,٣,٦,١) الغزل الكهربائي Electrospinning**

يعتبر الغزل الكهربائي (electrospinning) طريقة ملائمة من أجل إنتاج شبكات ليفية (fibrous networks) تحتوي على نسيج غني بالمستوى النانومتري مع أقطار ألياف مفردة من رتبة مئات النانومترات. تقوم عملية الغزل الكهربائي بسحب جريان أو دفق مادة ضيق ومستمر من مُسْتَوْدَع (خزان) من البوليمر المنصهر (polymer melt) أو محلول البوليمر إلى صَفِيحَة تجميع حيث تتراكم عليها المادة؛ مما يؤدي إلى إنتاج طبقة ليفية رقيقة مستوية (fibrous mat) (حصيرة ليفية). ويتم إنجاز ذلك عن طريق تحريض شحنة متراكمة على سطح المحلول عبر تطبيق جهود قوية (strong voltages). فعندما يكون الجهد قوياً بما فيه الكفاية، يتجاوز الجهد الكهربائي الساكن (electrostatic potential) الطاقة المرتبطة بالتوتر السطحي (surface tension) للمادة الكتلية

عند الفوهة ويتم تسريع المحلول باتجاه المجمع المؤرض (grounded collector) (الموصول بالأرض). وفي اللحظة التي يتم فيها دفع محلول البوليمر باتجاه المجمع يتبخّر المذيب؛ مما يؤدي إلى نشوء جريان أو دفق مستمر من الألياف الرفيعة جداً. وقد تم استخدام الغزل الكهربائي من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة ليفية باستخدام مجموعة متنوعة من المواد الطبيعية مثل فبروين الحرير [101] والكولاجين والبولي ببتيدات والبوليمرات الاصطناعية مثل البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) والبولي كابريولاكتون (PCL) وبولي (فينيل الكحول) (PVA) وبولي (أكسيد الإيثيلين) (PEO). وقد تم إنتاج شبكات ألياف من السيراميك ومن المواد المركبة باستخدام تقنيات الغزل الكهربائي [102]. ويمكن أن تتراوح أقطار الألياف المفردة من ٣٠ نانومتراً تقريباً إلى ١ مايكرومتر، ويختلف هذا القطر من خلال التحكم بخصائص العملية مثل تركيز البوليمر (polymer concentration) واللزوجة (viscosity) والناقلية (conductivity) والجهد المطبق (applied voltage). إن حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية (nanofibrous scaffolds) (المكونة من ألياف النانو) التي يتم إنتاجها عن طريق الغزل الكهربائي تؤدي عادةً إلى إنتاج طبقة فيلم رقيقة ثلاثية الأبعاد من شبكة غير محبوكة (nonwoven mesh) تتألف من ألياف موجهة بشكل عشوائي. ويمكن بعد ذلك تصفيح البنى الشبكية مع بعضها عن طريق التقنيات الحرارية (thermal techniques) أو تقنيات المذيب (solvent techniques)، كما تمت الإشارة إلى ذلك سابقاً. تقوم هذه العمليات بإنتاج روابط عند نقاط الاتصال بين الألياف ويؤدي ذلك إلى إنتاج شبكة ذات ألياف متشابكة (crosslinked network). وقد تم أيضاً تصنيع أنظمة ليفية نانوية ذات ألياف متراففة أو متحاذاة (aligned fibers) باستخدام أسطوانة دوّارة كمجمع (rotating drum) [103] أو كما هو الحال مع البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA)، عن طريق تليدين أو تلييب (annealing) الشبكة الليفية بعد تطبيق قوى ميكانيكية [104]. يمكن لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة غنية طوبوغرافياً (بالسمات السطحية) وذات ألياف نانوية متراففة أن يستغل أو يستثمر استجابة التوجيه بالاتصال (contact guidance response) في الخلايا ويمكن أن يؤدي ذلك إلى وظائف خلايا مهندسة (engineered cell functions) مثل التحرك الموجه (directed motility). وقد تم عرض العمليات والتطبيقات التفصيلية فيما يتعلق بالغزل الكهربائي لحاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانو وعلى نطاق واسع في مكان آخر [105] بما في ذلك ضمن الأجزاء الأكثر تفصيلاً في هذا الكتاب.

(٤، ٣، ٦، ٢) الامتزاز (الامتصاص) الغرواني Colloidal Adsorption

إن امتزاز (الامتصاص الكيميائي) المواد الغروانية (adsorption of colloids) من المحاليل من خلال الطلاء أو التغليف بالغمس (dip coating) هي طريقة اقتصادية أخرى من أجل إضفاء طوبوغرافية سطحية نانوية (nanotopography) على حاملات هندسة الأنسجة ثلاثية الأبعاد [106]. ببساطة يتم حضان حاملة الخلايا والأنسجة المراد تغليفها بطبقة غلاف خارجية في مُستعلق (مُعلّق) غروانيّ (colloidal suspension) لجسيمات نانوية ذات حجم وتركيب محدد، والتي يتم بعد ذلك امتزازها أو امتصاصها على سطح حاملة الخلايا والأنسجة. ويمكن لتركيبة الجسيمات النانوية أن يكون من البوليمرات القابلة للارتشاف (resorbable polymers) مثل البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) أو من المعادن الحاملة حيويًا (bioinert metals) مثل الذهب أو من السيراميك مثل ثاني أكسيد السيليكون (silicon dioxide) وثاني أكسيد

التيتانيوم (titanium dioxide). ويجب بذل العناية لضمان أن تكون الخصائص السطحية لحاملة الخلايا والأنسجة والمادة الغروانية متوافقة؛ وذلك لضمان امتزاز أو امتصاص مستقر وغير قابل للعكس على السطح. ويتضمن ذلك أخذ الطاقات النسبية للسطح وتفاعلات الشحنات في الوسط الأيوني بعين الاعتبار. إن مزايا هذه التقنية واضحة إلى حد ما، وهي أن الامتزاز أو الامتصاص الغرواني متوافق مع حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد ذات الأشكال غير المنتظمة. كما أن الامتزاز أو الامتصاص الغرواني غير مكلف وسريع وقابل للتجسيم (لتغيير القياس). وعلى أي حال، فإن هناك قيوداً مهمة بما في ذلك التحديد أو التشكيل الوظيفي المحدود (limited functionality) الذي يمكن أن يكون مفروضاً على حاملة الخلايا والأنسجة الموجودة. كما أنه من الصعب الحصول على مستعلقات غروانية من جسيمات نانوية ذات أقطار أحادية التبثر (monodisperse diameters)، والذي يؤثر بشكل سلبي على القدرة على تشكيل بُنى ذات ترتيب طويل المدى. إن الطوبوغرافية السطحية النانوية بدون الترتيب طويل المدى غير كافية من حيث التحكم في وظائف الخلايا في المستوى الذي يكون مطلوباً عادةً من أجل تصميم حاملة الخلايا والأنسجة. إن الامتزاز أو الامتصاص الغرواني مناسب من أجل تغيير التركيب الكيميائي للسطح (surface chemistry) والطوبوغرافية السطحية بشكلٍ فعالٍ وذلك من أجل ضبط ارتكاز والتصاق وانتشار الخلايا على حاملات الخلايا والأنسجة.

(٤,٣,٧) مستقبل تصنيع الشكل الحر الصلب من أجل هندسة الأنسجة Future Of Solid Free-Form Fabrication For Tissue Engineering

لقد تم تأسيس تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) كمجموعة ملائمة من الطرق من أجل الاستخدام في تصنيع حاملة خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد من مواد متنوعة بما في ذلك البوليمرات والهلامات المائية والسيراميك والمواد الحيوية المعدنية. إن واحداً من العناصر الأساسية في الاستخدام المستمر للنماذج الأولية السريعة (RP) في تطوير حاملة الخلايا والأنسجة هو القدرة ليس فقط على تطوير طرق تصنيع تكون متوافقة مع المواد الهندسية فحسب، بل أيضاً القدرة على تعديل تقنيات التصنيع وذلك للتمكن من معالجة المواد الحيوية. فعلى سبيل المثال، تم استخدام تقنيات الطباعة بالحبر النافث في تصنيع حاملات خلايا وأنسجة من الكولاجين [107]. ويجب تحسين التقنيات المماثلة من أجل التمكن من معالجة مواد حيوية أخرى ذات نوافذ المعالجة المحدودة باستخدام النماذج الأولية السريعة (RP).

وقد سمح التصميم الهندسي المعقول المقترن مع تقنيات معالجة المواد المتحكم بها من قبل الحاسب بتقنيات تصنيع دقيقة والتي تُمكن من التحكم بالبنية الهندسية المايكروية لحاملات الخلايا والأنسجة المسامية ثلاثية الأبعاد. وفي المدى القريب، سيسمح تصميم حاملات الخلايا والأنسجة باستخدام تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) بإمكانية التحكم غير المباشر بالخصائص الماكروسكوبية العيانية (macroscopic properties) (العيانية الكبيرة) مثل الخصائص الميكانيكية الكتلية والنفاذية من أجل اعتبارات نقل المواد الغذائية. ويمكن أن يؤدي التحكم بتحديد خصائص المسام في مستوى المايكرون مثل الشكل الهندسي للمسام والاتصال بين المسام والمسامية إلى تصنيع حاملة خلايا وأنسجة من أجل نسيج محدد. كما يسمح تصنيع الشكل الحر الصلب أيضاً بإمكانية تصنيع حاملات خلايا وأنسجة مصممة من أجل تطبيقات تجديد عضو ما لمرضى محدد. وبشكل عام،

فإن مفهوم حاملات الخلايا والأنسجة المصنّعة حسب الطلب (made - to - order scaffolds) هو مسعى منشود، والذي يمكن ان يخدم الاحتياجات السريرية التي لم يتم تلبيتها حالياً مثل حاملات الخلايا والأنسجة من أجل الجراحة الترميمية (reconstructive surgery). وعلى الرغم من أن تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) قد ثبت أنه مفيد في هندسة الخصائص الكتلية من خلال التصميم الهرمي (hierarchical design)، إلا أن أنظمة هندسة الأنسجة المستقبلية ربما تتطلب حاملات خلايا وأنسجة مع سمات أو خصائص ذات أحجام بدقات تباين أصغر من تلك التي تكون قابلة للإنجاز باستخدام طرق تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) الحالية. وتعمل استراتيجيات التصميم والتصنيع الحالية عند مستوى طول من ١٠٠ مايكرومتر أو أطول، وهذه الاستراتيجيات يمكن أن تكون دقيقة بشكلٍ غير كافٍ من أجل التحكم بوظيفة خلايا محددة. ولناخذ في عين الاعتبار مثال هندسة الأنسجة العظمية باستخدام حاملة خلايا وأنسجة مسامية. فعلى الرغم من أنه قد تم اقتراح أحجام مسام مثالية بين ٢٠٠ و ٦٠٠ مايكرومتر، إلا أن المعطيات التجريبية لعدد من الأنظمة تقترح خلاف ذلك. إن تغيير أحجام المسام بين ٥٠٠ و ١٦٠٠ مايكرومتر لم يكن له تأثير كبير في نمو العظم لحاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) بتقنية الطباعة ثلاثية الأبعاد (3DP) ومبدورة بخلايا عظمية [108,109]. وقد تم استخدام حاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من الهيدروكسي أباتيت (HA) مع أحجام مسام تتراوح من ٤٠٠ إلى ١٢٠٠ مايكرومتر في نموذج فكّ سفلي معطوب (mandibular defect model). ومرة ثانية، لم يتم الكشف عن أي فرق كبير في نمو العظم عبر مجال أحجام المسام المستخدمة في هذه الدراسة. إن هذه الاكتشافات تتفق مع المفهوم المثبت بشكلٍ تجريبي وهو بأن المستويات الطولية للبنى التي تحكم أو تضبط الكثير من وظائف الخلايا المهمة مثل الالتصاق والهجرة والانتشار والتمايز هي من رتبة ١٠ مايكرومترات أو أصغر. ففي حين أنه يجب عدم استبعاد قيمة أو أهمية التحكم بالخصائص الماكروسكوبية عبر التصميم الهرمي بشكلٍ تام، فإن تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) الحالية والتي تقف وحدها وراء تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة ربما تكون غير كافية من أجل إنتاج استجابات بيولوجية (biological responses) مناسبة. إن واحداً من الخيارات من أجل تصنيع حاملات خلايا وأنسجة مع سمات أو خصائص في مستوى النانو باستخدام تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) هو ببساطة تحسين دقة التباين الحالية للعمليات، والذي ربما يُثبت بأنه أيضاً مُلحٌّ من الناحية التقنية أو مكلف وذلك من أجل تبرير العمل المستقبلي. إن تحسين دقة التباين إلى دقة في مستوى ما دون المايكرون من شأنه أن يبطئ على الأرجح من سرعة التصنيع ومن شأنه أن يُخفّض الحد الأعلى لحجم حاملة الخلايا والأنسجة. ومن أجل ذلك، قد يحدث في المدى القريب تقدم أكثر في هذا المجال من خلال دمج البنى المايكروية والبنى ما دون المايكروية كتعديل لما بعد تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة التي يتم إنتاجها عن طريق تقنية تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) مثل تقنيات الغزل الكهربائي أو الامتزاز الغرواني أو الفصل الطوري والتجفيف بالتجميد والتي سيتم مناقشتها في القسم التالي.

(٤,٤) التصنيع المايكروفي لحاملات الخلايا والأنسجة باستخدام الخصائص الفيزيائية MICROFABRICATION OF SCAFFOLDS USING PHYSICAL PROPERTIES

من المعروف جيداً أن سلوك مجموعة متنوعة من الخلايا النامية في البيئات المايكروية ثلاثية الأبعاد يختلف إلى حدٍ كبير عن سلوك الخلايا النامية على السطوح ثنائية الأبعاد [110-112]. وقد شجعت هذه الظاهرة المفهومة على نطاقٍ واسع على

التوجه إلى تصميم وتصنيع حاملات لهندسة الأنسجة تقوم بتوفير بنية ثلاثية الأبعاد مناسبة لدعم الوظيفة الأصلية للخلية. وقد أظهر التجارب نحو حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد تحديات كبيرة في دمج التحكم بالتوزيع المكاني (spatial distribution) والأشكال الهندسية للبنى. وفي كثيرٍ من الأحيان، على أي حال، ربما ليس من الضروري التحكم ببنى محددة عند المستوى الطولي المايكرومترى. وبدلاً من ذلك، فإن تصميم المتوسط الإجمالي للشكل الهندسي وتحديد خصائص حاملات الخلايا والأنسجة يمكن أن يتم عن طريق التحكم بمحددات أو بارامترات مثل تركيب البوليمر بالتزامن مع بارامترات أو محدّدات المعالجة الفيزيائية. وقد تم إنجاز تقنيات تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة باستخدام مجموعة متنوعة من طرق معالجة المواد التي تقوم بهندسة الظاهرة الفيزيائية الكيميائية (physiochemical phenomenon). وقد تم مسح أو استطلاع بعض من هذه التقنيات في القسم التالي، مع وجود استعراض أكثر تفصيلاً لهذه التقنيات في فصول أخرى ضمن هذا الكتاب.

(٤,٤,١) الفصل الطوري المايكرومي Microphase Separation

يوفر سلوك الفصل الطوري المميز (characteristic phase separation) لخلائط بوليمر-مذيب وبوليمر-بوليمر وسائل مفيدة من أجل التصنيع السريع لحاملات هندسة أنسجة مسامية مع سمات أو خصائص مرتبة في مستوى طولي من رتبة المايكرون وما دون المايكرون. ويمكن ضبط المورفولوجيا أو الشكل الطوري المايكرومي (microphase morphology) والمستوى الطولي المميز للسمات أو الخصائص في خلائط البوليمرات عن طريق تعديل البارامترات أو المحدّدات التي تعتمد على الديناميكية الحرارية (thermodynamic - dependent parameters) (البارامترات الترموديناميكية) مثل تركيب المزيج وبارامترات الطاقة الحركية (kinetic parameters) مثل الحرارة، والتي تحكّم أو تضبط القدرة على حدوث التفكك الطوري (spinodal decomposition) (أي تحول المركب الكيميائي متعدد الأطوار إلى مركبات أحادية ذات طور مستقر) والقدرة على الفصل (demixing) اللاحق لمكونات مزيج البوليمر. إن المورفولوجيات أو الأشكال الطورية المايكروية الأكثر شيوعاً التي تتم ملاحظتها هي الأشكال الكروية والأسطوانية والصفائحية على الرغم من أن غيرها من الأصناف العديدة من المورفولوجيات أو الأشكال قد تمت ملاحظتها في مجموعة متنوعة من الأنظمة بما في ذلك الخلائط الكتلية للبوليمرات المشتركة (block copolymer blends) [113]. ويمكن أن يؤدي تعديل هذه الخلائط الكتلية للبوليمرات من خلال الحفر أو التذويب الانتقائي للبوليمر إلى تطوير حاملات لهندسة الأنسجة ذات ترتيب قصير المدى. كما يمكن أيضاً تكييف ظاهرة فصل مكونات مزيج البوليمر والفصل الطوري للبوليمر وذلك من أجل تطوير طبقات أفلام رقيقة كطريقة تُستخدم من أجل التعديل الطوبولوجي المحرّض كيميائياً (chemical - induced topological modification). فعلى سبيل المثال، يمكن لغزل خلائط من البوليمرات المتوافقة جزئياً والمغلّفة في داخل طبقة فيلم رقيقة أن يُنتج سطوحاً غنية بالسمات الطوبوغرافية مع بُنى ذات مورفولوجيات أو أشكال لركائز عامودية (أعمدة) مستديرة (rounded pillar morphologies) من رتبة ١٠٠ نانومتر في الارتفاع والعرض [114]. وقد أظهرت السطوح مع بوليمرات ذات طوبوغرافية سطحية نانوية مفصولة المكونات أنها تؤثر على نمو وانتشار خلايا الأرومة الليفية البشرية. يمكن للتجميع الذاتي (self - assembly) للبوليمرات الكتلية المشتركة أن يُجمع جنباً إلى جنب أيضاً مع ركائز مُشكّلة أو مُخرّفة نانويّاً وذلك من أجل تحقيق تحكم إضافي بعمليات

الفصل الطوري. وقد عرض Kim وآخرون طريقة من أجل الحصول على صفائح متماثلة الشكل على نحو كبير مع كميات متغيرة من تراتيب طويلة المدى باستخدام طبقات أحادية مُجمّعة ذاتياً ومُشكّلة أو مُرخفة نانويًا على ركيزة ثنائية الأبعاد [115]. ويمكن أن يؤدي التطوير الإضافي لعملية مشابهة إلى تطوير عملية الدمج لسطوح غنية بالسماط الطبوغرافية مع بُنى مسامية ثلاثية الأبعاد معقدة والتي تسمح بدورها بمظهر تماثل الشكل لإشارات أو منبهات طبوغرافية سطحية في جميع أنحاء الحيز المكاني لحاملة الخلايا والأنسجة. إن الغزل الكهربائي لخلائط البوليمرات يوفر طريقًا آخر من أجل تصنيع ألياف في المستوى النانومتري مع فصل طوري مشترك متواصل من خلال استخدام خلائط ثلاثية من بولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLA) وبولي (بيروليدون) (poly(pyrrolidone) [116].

تقدم طريقة التجفيف بالتجميد (freeze drying) (التجفيد) طريقًا آخر ممكنًا لإنتاج حاملات خلايا وأنسجة ذات سمات أو خصائص في مستوى المايكرون [117]، على الرغم من أنه يتم تقليل التحكم بالمواقع والتوزيعات المكانية. يبدأ الإجراء النموذجي للتجفيف بالتجميد بإضافة الماء إلى محلول من مواد حيوية اصطناعية شائعة مثل بولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLA) أو بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) في مذيب عضوي مثل تيتراهدروفوران (tetrahydrofuran) (رباعي هيدرو الفوران) أو كلوريد الميثيلين (methylene chloride) [118]. يتم صب المحلول المتجانس في القالب المناسب، ثم يتم تبريده بشكلٍ سريع عند درجة حرارة - ١٨٠ مئوية باستخدام النتروجين السائل (liquid nitrogen). يؤدي إجراء التبريد السريع هذا إلى فصل طوري فوري ضمن حاملة الخلايا والأنسجة، والتي يتم بعد ذلك تجفيفها (تجفيفها بالتجميد) لإزالة الماء وما تبقى من المذيب. يمكن أن تُنتج هذه العملية حاملات خلايا وأنسجة ذات أحجام مسامات تقع في المجال من ١٥ إلى ٣٥ مايكرومتراً. وقد تم استعراض طريقة مشابهة في إنتاج حاملات خلايا وأنسجة مسامية من البولي (إل - حمض اللاكتيك) (PLA) مع إدراج جزيئات فعّالة حيويًا (bioactive molecules) والتي يمكن أن توفر إشارات أو منبهات لعمليات بيولوجية محددة عند عملية الزرع أو الغرس [119]. وتشير الطاقات الحركية للإطلاق أو التحرير لمثل هذه الأنظمة بأن درجات الحرارة المرتفعة بشكلٍ طفيف في المجال من ٥٥ إلى ٨٥ درجة مئوية، واستخدام المذيبات العضوية أثناء عملية تحضير حاملات الخلايا والأنسجة تلك قد أظهرت بأنها تُؤثر بشكلٍ سلبي وطفيف على فعالية الجزيئات التي يتم إطلاقها. وفي سياق هندسة البنية في المستوى المايكروفي لحاملات الخلايا والأنسجة هذه، يكون التحكم الدقيق بحجم المسام والشكل الهندسي والترابط البيئي (interconnectivity) محدودًا للغاية وذلك من خلال تأجيل عمليات التوازن في تحضير حاملات الخلايا والأنسجة تلك (تأجيل الزمن اللازم لتصبح شروط التفاعل مستقرة). ويؤدي ذلك إلى التحكم بالسماط أو الخصائص المتوسطة لحاملة الخلايا والأنسجة (متوسط أبعاد المسامات)، والتي يمكن أن يتم معالجتها من خلال تعديل بارامترات أو محددات عملية المعالجة.

(٤, ٤, ٢) التجميع الذاتي بمساعدة المواد الغروائبة Colloidal-Assisted Self-Assembly

إن اتّيفاد أو استغسّال مولد المسام (porogen leaching) (ترشيح مولد المسام) هو طريقة شائعة لتطوير حاملات خلايا وأنسجة مسامية كبيرة ثلاثية الأبعاد. يتم في هذه التقنية الوطيدة دمج مادة حاملة الخلايا والأنسجة مع مولد مسام غير

متوافق معها كيميائياً أو فيزيائياً. ووفقاً لتصنيع حاملة الخلايا والأنسجة عبر عمليات مثل تبخر المذيب أو الربط المتشابك الكيميائي أو الفيزيائي تتم إزالة مولد المسام بشكل انتقائي. إن إحدى نتائج طريقة التصنيع هذه هي الدرجة العالية من المسامية (تكون عادةً في المجال ٩٠٪ أو أكثر)، والتي تكون ضرورية لإنجاز شبكة مترابطة بينياً من أجل التنظيم العشوائي لمولد المسام. تعتبر حاملات الخلايا والأنسجة ذات المساميات العالية جداً مفيدة من أجل هندسة أنسجة نشطة استقلابياً (metabolically active) من خلال سماحها بانتشار أكثر سرعة للمواد الغذائية وإزالة منتجات الفضلات. وتوفر المساميات العالية أيضاً مساحات سطحية كبيرة في نفس الحجم والذي يسمح بالتصاق أو ارتكاز الخلايا وانتشارها. وعلى أي حال، فإن الخصائص الميكانيكية للشبكات ذات المسامية المرتفعة تكون منقوصة بشكلٍ شديد بما في ذلك النقص الشديد في الصلابة النسبية لحاملات الخلايا والأنسجة المسامية والصلبة، ($E_{cellular}$) و (E_{solid})، على التوالي، مع زيادة المسامية (P). فمن أجل الحالة الخلوية الصلبة مع سمات أو خصائص مسامية مرتبة بشكلٍ عشوائي، فإن هذه العلاقة تكون متناسبة مع الثابت المحدد لأبعاد الشكل الهندسي (الجيومترى) من خلال المعادلة التالية:

$$(٤.١) \quad \frac{E_{cellular}}{E_{solid}} = C(1 - P)^2$$

حيث إن (C) هو ثابت اعتباطي أو كفي. ويمكن الحصول على تقليل المسامية المطلوب من أجل الربط البيئي من خلال التجميع المرتب لجسيمات غروانية كروية متماثلة الشكل في مستوى المايكرون [120]. يمكن لعملية القولة الفيزيائية من خلال استخدام القيود الهندسية أن تُنتج حاملات خلايا وأنسجة تُظهر زيادة في الصلابة بشكلٍ شديد وتحسناً في المتانة، والتي ظهر بأن لها تأثيراً على سلوك الخلايا (cell behavior)، عندما تقارن مع بُنى من مولد المسام مُجمعة بشكلٍ عشوائي. لقد تم توظيف تقنية التصنيع هذه من أجل الاستخدام في إنشاء شبكات من الهلامات المائية مع زيادة في معاملات المرونة (moduli) وذلك باستخدام الربط المتشابك لشبكة مكونة من جسيمات كروية مايكروية مُرتبة من مولد المسام. لقد تم ترسيب جسيمات كروية مايكروية من البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) ذات أقطار تتراوح من ٢٠ إلى ٦٠ مايكرومتراً في مزيج من الماء / الإيثانول (ethanol) بنسبة ٣٠ إلى ٧٠ تحت اضطراب فيزيائي (physical perturbation) وذلك لتعزيز الترتيب أو التنظيم المميز لأشكال سداسية الأضلاع (hexagonal) متقاربة ومعبأة. وقد تمت إضافة محلول من بولي (غليكول الإثيلين) - ثنائي ميثاكريلات (PEG - DMA) ذي وزن جزيئي منخفض ومعدّل بواسطة بيتيدات تساعد على الالتصاق إلى القالب ومن ثم القيام بعملية التشيع باستخدام الأشعة فوق البنفسجية وذلك للحث على الربط المتشابك لحاملة الخلايا والأنسجة. وتم حفر شبكة مولد المسام المكونة من البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) باستخدام حمض الأسيتيك (acetic acid) (حمض الخليك)، تاركاً شبكة مسامية من الهلامات المائية والتي أظهرت بأنها تدعم التصاق وهجرة خلايا الأرومة الليفية (NR6). لقد أظهر استخدام البنية المسامية التقريبية المرتبة زيادة في الصلابة بنسبة تصل إلى عدة مضاعفات المطال حتى مجال ١٠ كيلو باسكال (kPa)، والتي تماثل صلابة الأنسجة الرخوة. ومن حيث المبدأ، يمكن تطبيق هذه العملية على أي عدد من أنظمة مولد المسام - البوليمر التي تُظهر خصائص فيزيائية تسمح بالتخلص من الطور التقريبي (sacrificial phase) مثل الانتقائية النسبية في الانحلال أو التحلل أو نقاط الذوبان المتباينة.

(٤, ٤, ٣) التجميع الذاتي فوق الجزيئي Supramolecular Self-Assembly

يمكن أيضاً إنجاز تجميع قالب مُرتَّب من خلال التجميع الذاتي لجزيئات حيوية مثل البروتينات أو الحمض النووي (DNA). يتطلب التجميع الذاتي لأنظمة الببتيدات في بُنى فوق جزيئية (supramolecular structures) دمجاً منطقيّاً أو معقولاً لتفاعلات محددة وانتقائية فيما بين كتل بناء الأحماض الأمينية. ويمكن ضبط البنى الناتجة عن طريق المعالجة أو التلاعب بتسلسلات الأحماض الأمينية (amino acid sequences) التي توفر المجموعات المناسبة من الخصائص مثل الشحنة والبقايا المحبة للماء (residue hydrophilicity). ويمكن إنتاج بُنى بيتا الصفيحية (الورقية) (beta sheet structures) من خلال دمج ببتيدات مع سطح كاره للماء (hydrophobic surface) و سطح محب للماء (hydrophilic surface) في محلول مائي. تصبح السطوح الكارهة للماء محمية في حين تبقى البقايا المشحونة المحبة للماء على اتصال مع البيئة المائية في حالة تنظيم والتي تشبه في الطبيعة البروتينات القابلة للطي (protein folding) في الجسم الحي. إن البنية الهرمية لعملية التجميع هذه تكون واضحة من خلال القدرة على تركيب أو تجميع بُنى من رتبة ٣٠ - ١٠٠ نانومتر من خلال التأثير على كتل بناء الببتيدات المفردة ذات الأطوال من رتبة واحد نانومتر. وقد تم استخدام هذه التقنية مع تسلسلات الأحماض الأمينية الطبيعية لإنتاج مجال واسع من البنى مع سمات أو خصائص في مستوى النانومتر بما في ذلك السطوح المعدلة (modified surfaces) والخيوط (filaments) والليفات (fibrils) والأنابيب النانوية الببتيدية (peptide nanotubes) من أجل مجموعة متنوعة من التطبيقات بما في ذلك هندسة الأنسجة وتوصيل الدواء [121].

يمكن لجزيئات ماكروية (كبيرة) أيضاً أن تُجمع لإنتاج شبكات مستقرة من ألياف في مستوى النانومتر. ويمكن هندسة قليلات النوكليوتيدات لتشكيل بُنى من الحمض النووي (DNA) بالتجميع الذاتي مع سمات أو خصائص كبيرة بقدر ١٠٠ نانومتر ومع دقة تباين من ٦ نانومترات [122,123]. في العمل المقدم من قبل Rothmund، تم وصف تقنية للتجميع، تُدعى "أوريغامي الحمض النووي DNA" ("DNA origami") (الأوريغامي origami هو فن صناعة المجسمات من خلال طي الورق) وهي تنطوي على تركيب "حاملات خلايا وأنسجة" من الحمض النووي DNA ("DNA scaffolds") التي توفر المكونات الكتلية للمادة، "والأجزاء الأساسية" للحمض النووي DNA ("DNA staples") التي تُحفز على التجميع الذاتي في مجموعة متنوعة من البنى المبرمجة مسبقاً. وقد تم استخدام شبكات التجميع الذاتي للببتيدات وذلك لدعم أنظمة زراعة الخلايا وتوفير أقطار ألياف من رتبة ١٠ نانومترات مع أحجام مسام بين ٢٠٠ و ٥٠٠ نانومتر [124]. كما تم أيضاً تركيب بُنى قابلة للعكس من الهلامات المائية عن طريق هندسة بُنى ببتيدية اصطناعية ثلاثية الكتلة (tri - block peptide structures) [125]. وقد تم استخدام البنى الببتيدية لإنتاج أنابيب ببتيدية نانوية مرتبة، والتي قد تشمل مواد أخرى من أجل الاستخدام في تطبيقات متعددة. ففي واحدة من الطرق، تم استخدام ببتيدات ألياف الأميلويد (amyloid fiber peptides) (ألياف نَشَوَانِيَّة)، وهي طلائع للبريونات (precursors to prions) (جزيئات بروتينية تسبب العدوى) والتي يمكن أن تؤدي إلى مرض الزهايمر (Alzheimer's disease)، حيث يمكن للتجميع الذاتي أن يُنتج أسلاك الفضة النانوية (silver nanowires) بقطر من رتبة ١٠٠ نانومتر [126]. وعلى الرغم من أن القصد الأصلي من دراسة هذه العمليات كان للمساعدة في تجميع مواد غير عضوية مثل الأسلاك المعدنية النانوية من

أجل التطبيقات في مجال الإلكترونيات [127]، إلا أنه من المكن تطبيق طرق مماثلة وذلك لتطوير بُنى متقدمة لهندسة الأنسجة. إن واحد من القيود المحتملة لهذا النوع من المواد من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة هو المستوى الطولي المميز والصغير للغاية للتجميع الذاتي للبيبتيدات. وقد يكون من الضروري لتصنيع بُنى هندسة الأنسجة عند تحديد السمات أو الخصائص أن تمتد على نطاق واسع من المستويات الطولية. فعلى الرغم من أن السمات أو الخصائص في المستوى النانوي يمكنها أن تُعدّل الوظيفة البيولوجية في المستوى الخلوي، إلا أن التحكم ببنى حاملات الخلايا والأنسجة في المستوى الطولي من مئات المايكرومترات أو أكبر قد يكون هناك حاجة له من أجل بعض الأنسجة وذلك لإنشاء أشكال هندسية ماكروسكوبية (عيانية كبيرة) تتسم بالمحاكاة الحيوية أو لتحسين القوة الميكانيكية أو لتحسين الاتصالات المسامية وذلك لتعزيز نقل المواد الغذائية والتخلص من الفضلات. ويمكن أن يؤدي توسيع المستوى الطولي الممكن إجراؤه لهذه التقنية إلى إحراز تقدم في التجميع في المستوى المتوسط للبنى الأكبر مع أحجام سمات أو خصائص من رتبة عشرات المايكرومترات؛ مما قد يؤدي إلى إنتاج بيئة مايكروية لهندسة الأنسجة تدعم بشكل أفضل عمليات الخلايا التي تعتمد على المكان مثل الهجرة والانتشار وإعادة تشكيل المصفوفة (matrix remodeling). وربما يكون الجمع بين تقنيات القالب أو التجميع الذاتي مع غيرها من تقنيات تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة مع الحد الأدنى لدقات تباين تكون أعلى من ذلك بكثير حلاً للتحكم بسمات أو خصائص حاملة الخلايا والأنسجة وشكلها الهندسي عبر عدة درجات من الحجم.

(٤،٥) التصنيع المايكروبي لحاملات الخلايا والأنسجة المبذورة بالخلايا MICROFABRICATION OF CELL-SEEDED SCAFFOLDS

إن تنسيق المواقع الدقيقة لوضع الخلايا على حاملات الخلايا والأنسجة هو طريقة واعدة للاستفادة من تفاعلات الخلايا - الخلايا المحددة والتي يمكن أن تؤدي إلى ظروف مُفضّلة من أجل تشكيل الأنسجة. وعلى أي حال، فإن حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد التي يتم بذرها لاحقاً بالخلايا لا يمكنها عادةً الإبقاء أو الحفاظ على الفصل المكاني أو التحكم في تفاعلات الخلايا - الخلايا المحددة عبر أنواع متعددة من الخلايا. ففي حين تعتبر تقنيات التشكيل أو الزخرفة باستخدام الخلايا والمبينة على الحفر الضوئي وسيلة قوية من أجل التحكم بمثل هذه التفاعلات في بيئة مايكروية ثنائية الأبعاد، فإن هذه الطرق نادراً ما تنتقل أو تتحول بكفاءة إلى أنظمة ثلاثية الأبعاد. لقد أدى التقدم في التصنيع المايكروبي للمواد الحيوية وتصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) إلى القدرة على التحكم بوضع البوليمرات والخلايا مع دقة في مستوى المايكرون. إن الجمع بين جوانب هذه التكنولوجيات القائمة مع طريقة طبقة تلو الطبقة هو طريقة واعدة لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة يتم تحميلها مسبقاً بالخلايا التي يتم التحكم بها مكانياً في أشكال هندسية اعتباطية أو كيفية. وفي كثير من الأحيان تستخدم تقنيات تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة النموذجية ظروفًا قاسية مثل استخدام المذيبات السامة للخلايا (cytotoxic solvents) أو درجات حرارة مرتفعة. وبالتالي، فإن تطوير عمليات تصنيع جديدة لحاملة الخلايا والأنسجة التي تكون قادرة على الحفاظ على خلايا يمكنها البقاء على قيد الحياة هو أمر أساسي. إن هذا القيد يعمل أيضاً على تقليل عدد المواد الحيوية بشكل كبير، والتي تكون مناسبة لمثل هذه العمليات. وعلى الرغم من هذه التحديات، فقد تم عرض عدد من الإمكانيات باستخدام هذه الطريقة من أجل تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة.

Layer-By-Layer Deposition (٤,٥,١) ترسيب طبقة تلو الطبقة

توفر المنصات ذات الجريان المايكروفي (microfluidic platforms) طريقة مناسبة من أجل التحكم بالعديد من جوانب البيئة المايكروية الخلوية بما في ذلك التراكيز المحددة مكانياً للمواد الغذائية والأكسجين وإجهادات القص الميكانيكية (mechanical shear stresses) كما هو مُدرَك من خلال تدفق السوائل (fluid flow). كما يمكن استخدام الجريانات المايكروية أيضاً للتحكم بالتوجيه المكاني من خلال الحجز داخل القنوات المايكروية. وقد تم استخدام التشكيل أو الزخرفة من خطوة واحدة بواسطة الخلايا في أجهزة الجريان المايكروفي؛ وذلك لإنشاء مصفوفات خلوية من أجل الأغراض التشخيصية (diagnostic purposes). فعندما تم استخدامها بالاشتراك مع استراتيجية التجميع طبقة تلو الطبقة والتشكيل أو الزخرفة المايكروية والجريانات المايكروية، أثبتت أنها مفيدة من أجل التجميع المتحكم به (controlled assembly) للبنى الهرمية للعديد من أنواع المصفوفات خارج الخلية وللعديد من أنواع الخلايا [128]. وقد تم وصف نظام زراعة خلايا مشترك تم زخرفته أو تشكيله بالجريان المايكروفي مع ثلاثة أنواع من الخلايا من أجل استخدامه المحتمل في تطبيقات هندسة الأنسجة الوعائية (vascular tissue engineering applications). حيث يمكن مزج كلٍ من الخلايا البطانية وخلايا العضلات الملساء (smooth muscle cells) وخلايا الأرومة الليفية (fibroblasts) مع محاليل بروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM) مثل الكولاجين والكولاجين - شيتوزان (chitosan - collagen) والماتري جل (Matrigel) وترسيبها بشكل متسلسل في طريقة طبقة تلو الطبقة [129,130]. والنتيجة هي طبقة ثلاثية الأبعاد من أنواع متعددة من الخلايا التي تم تضمين كل واحدٍ منها ببروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM) المحددة مسبقاً. ففي البداية، تم تعديل سطوح أكسيد السيليكون (silicon oxide surfaces) مع ٣ - أمينو بروبييل تريثوسيلين (3-aminopropyltriethoxysilane) باستخدام ترسيب البخار (vapor deposition) وذلك لتعزيز التصاق بروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM). وقد تم تصنيع أجهزة جريان مايكروفي من البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) على الزجاج باستخدام سطوح أكسيد السيليكون المعدلة. ويتم تحديد التصميم المكاني للأنسجة عن طريق تصميم شبكة الجريان المايكروفي. بعد ذلك يتدفق واحد من المحاليل المختارة للمصفوفة - خلايا في الشبكة ذات الجريان المايكروفي عند درجة حرارة ٢ مئوية وعند هذه النقطة يتم تسخين النظام إلى درجة حرارة ٣٨ مئوية وذلك للحث على إنتاج الدبق أو الهلام (gelation). ويمكن إضافة طبقات لاحقة من أنظمة المصفوفة - خلايا بطريقة ماثلة. وبعد تشكيل بُنى الزراعة المشتركة، تتم إزالة طبقة البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) للسماح لمزيد من وصف (characterization) وظائف الخلايا أو خصائص المصفوفة. إن الميزة الواضحة لهذه العملية هي استخدام الظروف الصديقة للخلايا (cell - friendly conditions) أثناء عملية التصنيع مثل عدم وجود المواد الكيميائية السامة كالمذيبات أو البادئات الضوئية (photoinitiators) (المحرِّضات الضوئية) والتشعيع باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV irradiation)، والتي يمكن أن تُحسِّن من قدرات الخلايا المبذورة للبقاء على قيد الحياة. إن تكييف تركيبات أو مجموعات محددة من المصفوفة - خلايا يمكن أن تتم هندسته وذلك لإنتاج الظروف المثلى التي من شأنها أن تُحسِّن الأداء الكلي لحاملات الخلايا والأنسجة المبذورة بالخلايا. وعلى الرغم من أن استخدام جهاز جريان مايكروفي واحد يحد من الزخرفة أو التشكيل المستقل لأنواع متعددة من الخلايا، إلا أنه من المحتمل أنه يمكن التغلب على هذا القيد من خلال استخدام التقنيات المتعددة لزخرفة أو تشكيل الجريان المايكروفي، والتي تم وصفها في أنظمة أخرى [131].

٤,٥,٢) التَمَحْفُظ (التغليظ) الضوئي لُبني حاملات الخلايا والأنسجة-خلايا Photoencapsulation Of Cell-Scaffold Constructs

عادةً ما تُستخدم الأقنعة الضوئية (photomasks) من أجل الحفر الضوئي (photolithography) في عمليات التصنيع المايكروبي التقليدي والتي يمكن أن تُستخدم بالاشتراك مع محاليل من بولي (جليكول الإثيلين) - ثنائي ميثا كريات (PEG - DMA) لتشكيل أو زخرفة بُنى من الهلامات المائية مع دقة تباين لا تقل عن ١٠ مايكرومترات. وفي واحدة من الطرق المذكورة، يمكن للخطوات المتعددة لعمليات البلمرة الضوئية المشكّلة أو المزخرفة مايكروياً (micropatterned photopolymerization processes) أن تُربط أو تُقرن معاً لإنتاج بُنى ثلاثية الأبعاد من المصفوفة - الخلايا مع دقة تباين في مستوى المايكرون [132]. وقد تم في البداية إجراء تحديد وظيفي لسطوح ركائز مصنوعة من ثاني أكسيد السيليكون باستخدام ٣ - (تري ميثو إكسيليل) - بروبييل ميثا كريات (3-TPM) - propyl methacrylate (3-trimethoxysilyl) وذلك للسماح بالربط التساهمي (covalent bonding) للهلامات المائية. وقد تم تطبيق طبقات رقيقة من محاليل هلامات مائية مصنوعة من البولي (جليكول الإثيلين)-ثنائي ميثا كريات (PEG - DMA) الحاوية على الخلايا مع نموذج خلايا الـ (HepG2) على السطح المحدد وظيفياً (functionalized surface)؛ ومن ثم تم تعريضها للتشعيع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية من خلال قناع ضوئي. وقد تم إظهار الركيزة (توضيح تفاصيلها) عن طريق غسلها في محلول متساوي التوتر (isotonic solution) لإزالة المناطق غير المترابطة أو المتشابكة. بعد ذلك يتم تحريك الركيزة خطوة في الاتجاه (z) عن طريق إدراج مُباعد من السيليكون (silicone spacer). ويمكن تكرار هذه العملية باستخدام معلقات اعتباطية أو كيفية من الخلايا في محاليل بولي (جليكول الإثيلين) - ثنائي ميثا كريات (PEG - DMA) وذلك لإنشاء طبقات إضافية مُشكّلة أو مزخرفة مايكروياً. توفر البلمرة الضوئية للهلامات المائية المغلفة بالخلايا (cell - encapsulated hydrogels) في تقنية طبقة تلو الطبقة المرونة لتشكيل أو زخرفة طبقات من الخلايا في أشكال هندسية اعتباطية أو كيفية. ويمكن لجزيئات بولي (جليكول الإثيلين) - ثنائي ميثا كريات (PEG - DMA) المعدلة مع بتيدات محددة والتي تعزز وظائف الخلايا مثل الالتصاق أو الهجرة أن تكون مدججة مع حاملات الخلايا والأنسجة بسهولة. والنتيجة هي منصة مرنة لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة من الهلامات المائية التي يمكن استخدامها للتحكم بالبيئة المايكروية لأنواع متعددة من الخلايا في حين أنها وفي نفس الوقت تضبط التكوين أو التشكيل المكاني مع دقة في مستوى المايكرون. إن واحداً من العيوب لمثل هذا النظام هو استخدام البادئات الضوئية (المحرّضات الضوئية) التي من المحتمل أن تكون سامة للخلايا بالاشتراك مع التشعيع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية كوسيلة لإنشاء بُنى مايكروية دقيقة (microstructures) (بُنى مجهرية). ففي هذه الطريقة المذكورة، يتم التقليل من قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة، والتي يتم قياسها عن طريق فحص الـ MTT (MTT assay)، بطريقة تعتمد على الجرعة وذلك عندما يتم تغيير وقت التعرض للأشعة فوق البنفسجية وتركيز البادئة أو المحرّض الضوئية أسيتوفينون (acetophenone) بين صفر و ٦٠ ثانية، وصفر و ٣ ملليغرامات / ميليلتر، على التوالي. ويمكن للتشعيع بواسطة الأشعة فوق البنفسجية أيضاً أن يسبب أضراراً للحمض النووي (DNA) لا رجعة فيها (غير عكوسة)، والذي قد يؤثر على إمكانية استخدامه مع الخلايا الجذعية (stem cells) وخلايا الطليعة (progenitor cells) (الخلايا

الأولية) الأخرى. وثمة عامل آخر يمكن أن يحد من إمكانية استخدام حاملات الخلايا والأنسجة التي يتم تصنيعها مايكروياً والمبدورة بالخلايا باستخدام الهلامات المائية القابلة للتشابهك أو الترابط الضوئي وهو الحفاظ على صحة الشكل أو النمط (pattern fidelity) للسمات أو الخصائص الصغيرة مع وجود درجة عالية من الدقة. فبينما يتم الحفاظ على دقة تباين للسمات أو الخصائص الأكبر من ٢٠٠ مايكرومتر عند حوالي ١٠٪ من حجم السمة أو الميزة، فإن الحد الأدنى لدقة التباين المكاني يزداد بشكل كبير عندما يتم تقليل حجم السمة أو الميزة إلى أقل من ١٠٠ مايكرومتر. ويمكن زيادة الأبعاد الفعلية للسمات أو الخصائص إلى ما يصل من ٢٠٠٪ أكبر من أحجام السمات أو الخصائص على القناع الضوئي، حيث إن هذه النسبة تعتمد وبشكل أساسي على زمن التعرض. إن واحدة من الآليات التي يمكن أن تُفسر الزيادة في حجم السمة أو الميزة قد تكون الطبيعة المنتفخة (swelling nature) الكامنة في الهلامات المائية المصنوعة من بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG). وقد تكون الاحتمالات الأخرى هي الهجرة السريعة للأنواع أو الأصناف المتفاعلة ضوئياً داخل الهلامات المائية أثناء عملية البلمرة، والتي من شأنها أن تؤدي إلى نقص أو عجز شامل في إنتاج سمات أو خصائص أصغر من ٥٠ مايكرومتر مع دقة تباين ضيقة. وعلى الرغم من أنه قد تم تكييف هذه العملية من أجل تصنيع الهلامات المائية من البولي (غليكول الإيثيلين) (PEG)، إلا أنه يمكن توسيعها لأنواع أخرى من الأصناف البوليمرية المتفاعلة ضوئياً [133].

وقد أظهرت تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) بشير نجاح كبير في مجال تصميم وتصنيع حاملات هندسة أنسجة قابلة للتخصيص. إن حاملات الخلايا والأنسجة المبدورة لاحقاً بالخلايا، والتي يتم تصنيعها عبر تقنيات تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) أو الطرق الأخرى، تحد من تعلق أو ارتكاز الخلايا على سطح حاملة الخلايا والأنسجة وحدها، والذي يؤدي إلى كثافات خلايا منخفضة نسبياً في الحجم. إن الجمع بين جوانب الحفر المجسّم ثلاثي الأبعاد (SLA) مع محاليل البوليمرات - الخلايا يسمح بإمكانية دمج الخلايا بشكل مباشر في حاملة الخلايا والأنسجة وذلك لإنجاز كثافة عالية للخلايا. وقد تم ذكر مثل هذا النظام، حيث تم إجراء عملية التمحفظ أو التغليف الضوئي (photoencapsulation) لخلايا مبيض الهامستر الصيني (Chinese hamster ovary - CHO) في الهلامات المائية المصنوعة من البولي (غليكول الإيثيلين) - ثنائي ميثا كريات (PEG - DMA) باستخدام عملية الحفر المجسّم ثلاثي الأبعاد (SLA) المعدلة [134]. إن المشاكل التقنية المرتبطة مع تقنية التصنيع تلك هي ببساطة تحادها مع عمليات الحفر المجسّم ثلاثي الأبعاد (SLA) المعيارية والتمحفظ أو التغليف الضوئي للخلايا الحية. إن مثل هذه التحديات تشمل تحقيق الحد الأدنى الصغير والمعقول لحجم السمة أو الميزة وإنتاج دقات تباين ضيقة والحفاظ على قدرة عالية لبقاء الخلايا على قيد الحياة من أجل الخلايا المغلفة. وفي العملية التي تم تطويرها من قبل Dhariwala وآخرين، تم إنجاز الحد الأدنى من أحجام السمات أو الخصائص من ١٥٠ مايكرومتر في الاتجاه (z) و ٢٥٠ مايكرومتر في المستوي (x - y)، والتي هي مماثلة لعمليات الحفر المجسّم ثلاثي الأبعاد (SLA) التقليدية. وكما ورد في دراسات التمحفظ أو التغليف الضوئي السابقة، فقد كانت قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة معتمدة بشكل كبير على تركيز البادئة أو المحرصة الضوئية.

(٤,٥,٣) الترسيب المباشر للخلايا في المستوى المايكروبي Microscale Direct Deposition Of Cells

إن مفهوم الترسيب المباشر للخلايا (direct deposition of cell) هو طريقة أخرى واعدة ومحتملة وذلك من أجل الحصول على أنماط أو زخارف من الخلايا في أشكال هندسية اعتباطية أو كيفية. وقد تمت في هذه المعالجة الإشارة سابقاً إلى طريقتين من أجل ترسيب الخلايا المباشر باستخدام الحفر بالاتصال (contact lithography). هاتان الطريقتان هما: (١) استخدام ختم أو طبعة من الآغاروز (agarose stamp) من أجل ترسيب الخلايا المباشر المتحكم به على الركائز [58]، و (٢) استخدام مرسام أو استنسل من اللدائن المرنة (elastomeric stencil) من أجل الترسيب الخلووي المشكّل أو المزخرف [65]. وعلى أي حال، فإنه يمكن إنجاز الترسيب المباشر للخلايا باستخدام تقنيات أخرى أيضاً.

(٤,٥,٣,١) إِرْدَاذ (رش) الخلايا Cell Spraying

إن الترسيب المباشر للخلايا باستخدام تقنية الإِرْدَاذ أو الرش (spraying technique) بالتزامن مع استخدام قناع التشكيل أو الزخرفة (patterning mask) هو طريقة ملائمة من أجل إنشاء تشكيل أو زخرفة ثنائية الأبعاد للخلايا بشكلٍ متتابع؛ مما يؤدي إلى إنتاج حاملة خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد من الخلايا المشكّلة أو المزخرفة مايكروياً (micropatterned cells). تقوم هذه الطريقة البسيطة بنشر محلول من الخلايا باستخدام جهاز مرذاذ (رش) هوائي جاهز للاستخدام لإنشاء مُعلّق من قطرات سائلة (suspension of liquid droplets) (قطرات صغيرة جداً) تحتوي على الخلايا، والتي يتم توجيهها نحو سطح مادة الكولاجين الهلامية [135]. فعندما تتم عملية ترسيب الخلايا، يتم إزالة القناع تاركاً الخلايا المشكّلة أو المزخرفة على ركيزة من الكولاجين مع دقات تباين تقرب من ١٠٠ مايكرومتر. بعد ذلك يتم امتزاز أو امتصاص مادة هلامية ثانية من الكولاجين (بسماعة من حوالي ٤٠٠ مايكرومتر) على سطح الركيزة ويعقب ذلك مرحلة إضافية من إِرْدَاذ أو رش الخلايا. ويمكن تكرار هذه التسلسلات من الخطوات بشكلٍ متتابع وذلك لإنتاج طبقات متناوبة من الخلايا وبروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM). وقد لوحظ تزايد في نشاط السيتوكروم (cytochrome P450 activity) (P450)، وهو فحص وظيفة الخلايا المحددة للكبد (liver - specific cell function)، عندما يتم تشكيل أو زخرفة خلايا الأرومة الليفية (NIH 3T3) بالمشاركة مع خلايا الكبد الأساسية (primary hepatocytes) المتوضعة في مزرعة خلايا قصيرة المدى. إن القدرة على إنشاء أشكال هندسية كيفية أو اعتباطية من الخلايا المشكّلة أو المزخرفة في شظيرة (بين شريحتين) من الكولاجين (collagen sandwich) هي تقنية جذابة من أجل الحفاظ على قطبية (polarity) ووظيفة الخلايا الكبدية التي يتم زراعتها في المختبر [136]. وقد تبين أن عملية الإِرْدَاذ أو الرش لا تؤثر بشكلٍ كبير على قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة أو وظيفة خلايا الحبل السُريّ البطنيّ البشرية (human umbilical endothelial cells) أو خلايا الكبد الأساسية. ففي حين أن هذه الطريقة تشبه من حيث المبدأ غيرها من التقنيات الخاصة بتشكيل أو زخرفة الخلايا بما في ذلك استخدام الأختام (الطبقات) أو الاستنسل (المرسام) المشكّلة أو المزخرفة مايكروياً [65]، إلا أنها توفر تحديداً وظيفياً إضافياً من خلال الجمع بين ترسيب الخلايا المشكّلة أو المزخرفة مع طريقة طبقة تلو الطبقة، والتي تتحكم بموقع الخلايا في الاتجاه (z). وعلى الرغم من أن الكولاجين كان قد تم استخدامه كبروتين للمصفوفة خارج الخلية (ECM) في هذا المثال المحدد، إلا أنه يمكن استخدام أي من

البروتينات المناسبة للمصفوفة خارج الخلية (ECM) في ما بين طبقات الخلايا، كما يمكن تحسينها اعتماداً على الأنسجة المحددة التي هي قيد الاهتمام والدراسة. كما يوجد هناك بعض العيوب لهذه الطريقة وللتقنيات المشابهة. فإرذاذ أو رش الخلايا يتطلب استخدام أقنعة متعددة (multiple masks) من أجل تشكيل أو زخرفة الخلايا في أشكال هندسية مختلفة لكل شريحة متناظرة في المستوي $(x - y)$. وكذلك فإن الحد الأدنى لدقة التباين لا يزال أكبر من المقياس الطولي المميز من أجل العديد من البنى الهندسية المايكروية الدقيقة (microarchitectures) الموجودة في أنسجة الأعضاء المعقدة. على سبيل المثال، فإن كلاً من البنى الموجودة في الحويصلات الرئوية (lung alveoli) وأسرة الشعيرات (capillary beds) والجيوب الكبدية (liver sinusoids) لديها بنية هندسية مايكروية دقيقة والتي تتطلب نظرياً دقة من ٥ إلى ١٠ مايكرومترات لوضع خلية مفردة.

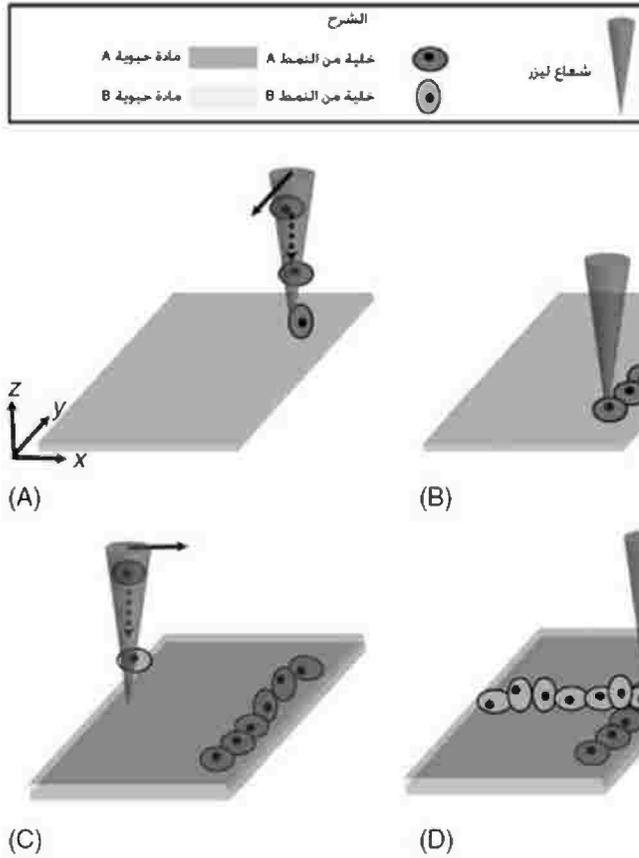
(٤,٥,٣,٢) طباعة الخلايا بتقنية نفث الحبر Inkjet Printing of Cells

هناك طريقة أخرى للترسيب المباشر للخلايا تعمل على استخدام طابعة نافثة للحبر جاهزة للاستخدام حيث تستخدم طريقة الترسيب الحراري للحبر الذي يتم تحميله مع مُعلّق (suspension) من خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO) في محلول الدَرء (العزل) (buffer solution). ومن ثم يتم ترسيب الخلايا بطريقة دقيقة على ركائز مبنية من الهلامات المائية باستخدام برنامج رسوم بيانية (graphics program) بسيط لتحديد مكان الخلايا المترسبة في المستوي $(x - y)$ (الشكل ٤,٤, F٤). إن هذه العملية تتطلب القليل من التعديل في الطابعة المتاحة تجارياً، فعلى الرغم من الإجهادات الشديدة (extreme stresses) المطبقة على الخلايا والتي تكون مرتبطة بعملية الطباعة، فقد تم المحافظة على قدرات الخلايا على البقاء على قيد الحياة لحوالي ٩٠٪ في ترسيب نوع خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO) القوية وذلك كإثبات لصحة المفهوم. وقد تبين إن دقة التباين لطباعة مُعلّقات من الخلايا بتقنية نفث الحبر تكون من رتبة مئات المايكرونات، والتي هي نموذجية في معظم طرق تصنيع الشكل الحر الصلب (SFF) التي سبق وأن تم وصفها. وعلى الرغم من أن هذه الطريقة قد عرضت فقط الترسيب المشكّل أو المزخرف بشكلٍ ثنائي الأبعاد ولنوع واحد من الخلايا، إلا أن هذه التكنولوجيا تمثل منصة مرنة (flexible platform) للتطوير المستقبلي لحاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد مبدورة بالخلايا.

(٤,٥,٣,٣) الطرق الضوئية لترسيب الخلايا بدون اتصال Optical Methods for Noncontact Cell Deposition

إن التلاعب بالخلايا أو معالجتها بدون اتصال (noncontact manipulation of cells) من خلال استخدام المصائد الضوئية المتدرجة ذات الحزمة المفردة (single - beam gradient optical traps) هي طريقة فعّالة للتحكم بالإحداثيات المكانية لمجموعة متنوعة من أنواع الخلايا في المعلّقات. وقد تم عرض هذه التكنولوجيا، والتي يُطلق عليها أيضاً مصطلح الملاقيط البصرية أو الضوئية (optical tweezers)، في التلاعب أو معالجة مجموعة متنوعة من المكونات البيولوجية بما في ذلك الخلايا والمكونات دُوَيْن (دون) الخلوية (subcellular components) والجسيمات المايكروية أو المجهرية الدقيقة (microparticles) المغلفة بجزيئات حيوية وظيفية. ويؤدي استخدام عدسات الفتحة الرقمية العالية (high numerical aperture lenses) إلى الحجز المحكم (tight confinement) للجسيمات على طول محور الحزمة مما يحد من مجال الحركة في هذا الاتجاه، الأمر الذي يؤدي في نهاية المطاف إلى انخفاض كبير في كفاءة ترسيب الخلايا في هذه الطريقة. ببساطة وعن طريق تصغير الفتحة الرقمية للعدسة، يمكن توجيه

الجسيمات ذات الحجم المايكروني وما دون المايكروني على طول مسار الحزمة في تدفق مستمر، ويمكن أن تُمتص على الهدف المراد دراسته. إن هذه التقنية العامة والتي يُطلق عليها مصطلح الكتابة المباشرة الموجهة بالليزر (laser - guided direct writing - LGDW) قد تم تطبيقها على مجموعة متنوعة من الجسيمات العضوية وغير العضوية بالإضافة إلى خلايا الثدييات [137]. فأتى عملية الكتابة المباشرة للخلايا الموجهة بالليزر (LGDW)، يتم تكوين أشعة ليزر ينبعث منها إشعاع قريب من الأشعة تحت الحمراء بالقرب من عدسة يتم التحكم بها باستخدام معالج مايكروني ثلاثي المحاور (three - axis micromanipulator) ويتم توجيهها إلى غرفة معقمة (sterile chamber) تحتوي على مُعلّق من الخلايا وركيزة هدف في قعر المكان المخصص لزراعة الخلايا (well). فعندما يحدث انزياح للخلايا بشكل عشوائي في مسار أشعة الليزر، تسيطر قوة التدرج (gradient force) وتجلب الخلية إلى مركز الشعاع أو الحزمة. ومن ثم تقوم حزمة أشعة الليزر بتوجيه الخلية على طول مسار الحزمة حتى تصل إلى الركيزة. ويمكن توجيه موقع الخلايا المفردة أو تدفقات الخلايا عن طريق المعالجة أو التلاعب بموقع العدسة. وقد تم استخدام هذه التقنية من أجل الترسيب المباشر لخلايا الحبل الشوكي الجنينية لصُوص (صغير الطائر) (embryonic chick spinal cord cells) على ركيزة هدف مصنوعة من الزجاج غير المعالج. إن واحدة من ميزات هذه التقنية هي أنه يمكن ترسيب الخلايا على ركائز مختلفة بما في ذلك الكولاجين والماتري جل (Matrigel)، والتي ربما تفتقر إلى الخصائص الميكانيكية القوية واللازمة من أجل غيرها من تقنيات الطباعة اللينة (الطرية) أو التشكيل اللين (الزخرفة اللينة). فعلى سبيل المثال، لقد تم نقش أو زخرفة الخلايا البطانية الوعائية السريعة البشرية (human umbilical vascular endothelial cells - HUVECs) بشكل مباشر على أفلام رقيقة من الماتري جل، وهو معروف بأنه يقوم بتعزيز التنظيم الوعائي [138,139]. ويمكن الجمع بين تقنية الطبقة تلو الطبقة تلك مع ترسيب فيلم أو طبقة رقيقة من المواد الحيوية للمصفوفة خارج الخلية (ECM) وذلك من أجل إنشاء بُنى ثلاثية الأبعاد (الشكل رقم ٤.٥). ويمكن تدوير العديد من التسلسلات لترسيب أنواع مختلفة من الخلايا متبوعاً بامتزاز أو امتصاص طبقة رقيقة من مادة حيوية وذلك من أجل إنشاء بُنى ثلاثية الأبعاد مبدورة بالخلايا. يمكن ترسيب أنواع متعددة من الخلايا بسهولة، والتي يمكن أن تُستخدم لإنتاج مزارع خلايا مشتركة وذلك من أجل الاستفادة من تفاعلات الخلايا - الخلايا غيرية النمط (heterotypic cell - cell interactions). في العمل المقدم من قبل Nahmias وآخرين، تم تشكيل أو زخرفة الخلايا الكبدية بالاشتراك مع الخلايا البطانية الوعائية السريعة البشرية (HUVECs) وذلك لتشكيل بُنى جيبانية (شبه جيبية) كبدية ناشئة أو حديثة الولادة (nascent liver sinusoid structures). ويمكن أن تكون أحد العيوب المحتملة للتنفيذ على مستوى كبير الحجم باستخدام هذه التكنولوجيا هو السرعة البطيئة لعملية الترسيب. ففي النظام المذكور، تم ترسيب الخلايا على السطح بمعدل ٢.٥ خلية في الدقيقة الواحدة؛ مما يوحي بأن الترسيب المشكّل أو المزخرف من ١٠٠ إلى ١٠٠٠ خلية سيأخذ ساعات لاستكمالها. ويمكن لهذا المعدل أن يزداد بشكل نظري عن طريق زيادة تركيز الخلايا داخل المعلق أو عن طريق استخدام مصفوفة من أشعة الليزر لتشكيل أو زخرفة مناطق متعددة في وقت واحد.



الشكل رقم (٤, ٥). رسم تخطيطي للكتابة المباشرة الموجهة بالليزر (LGDW) من أجل هندسة أنسجة ثلاثية الأبعاد. (A) يتم وضع مُعلق من الخلايا (suspension of cells) على الطبقة العلوية لركيزة من مادة حيوية (biomaterial substrate) في وجود أشعة الليزر التي تكون قابلة للتحرك على طول المحور ($x-y$). (B) عندما يحدث انزياح للخلايا في مسار أشعة الليزر، يتم توجيهها نحو الركيزة. ويمكن عندئذٍ لأشعة الليزر أن تتحرك لإنشاء خطوط فردية من الخلايا أو لتشكيل أشكال هندسية مُنقّطة (rasterized geometries). (C) يمكن لطبقات إضافية من المادة الحيوية أن تلتصق على السطح وذلك لإنشاء ركائز جديدة من أجل الترسيب اللاحق لنوع مختلف من الخلايا، إذا كان ذلك مرغوباً. ويمكن القيام بعملية تكرار خطوات الكتابة المباشرة وترسيب المادة الحيوية من أجل استخدامها في إنشاء ركائز ثلاثية الأبعاد، والتي من المحتمل أن تكون مفيدة من أجل مجموعة متنوعة من ركائز الأنسجة (انظر النص).

(٤, ٦) مستقبل تكنولوجيا التصنيع المايكروفي لتطوير حاملة الخلايا والأنسجة FUTURE OF MICROFABRICATION TECHNOLOGY FOR SCAFFOLD DEVELOPMENT

إن أساس التقدم في تطوير حاملة الخلايا والأنسجة هو التسهيل وبشكلٍ مستمرٍ للتفاعل بين ما لا يقل عن ثلاثة مجالات رئيسية للدراسة، وهي: (١) علم المواد والهندسة والمعالجة و (٢) علم بيولوجيا الخلايا و (٣) علم الكيمياء وتركيب المواد.

ومما لا شك فيه أن هذه المجالات والمجالات المرتبطة بها ستتقدم بشكلٍ عفوي عندما تستمر التطورات الكبيرة في مجالات مثل تركيب البوليمر وتوصيل الدواء وتحديد خصائص البروتين والعلاج الجيني والخلايا الجذعية بمعدلٍ سريع ونشط. وعلى أي حال، فإن هذا التفاعل أو الارتباط سيكون ضرورياً في تصميم حاملات الخلايا والأنسجة، والذي سيُسَهِّل استجابات تجديد الأنسجة المخطط لها مسبقاً. ولا بد من دراسة بيولوجيا الخلايا وتركيب المواد في نفس الوقت وذلك لتحديد خصائص تفاعلات الخلايا - المواد الحيوية، والذي سيُستخدم في نهاية المطاف ليكون كأساس من أجل تصميم وتركيب المواد الحيوية الذكية (smart biomaterials). ويجب المضي قُدماً في تركيب المواد وفي معالجة المواد بشكلٍ متأزر وذلك من أجل تطوير استراتيجيات لمعالجة المواد والتي لا تكون فقط متوافقة مع المواد الحيوية المناسبة، وإنما تكون قادرة كذلك على استيعاب العوامل التقنية والاقتصادية أيضاً. وأخيراً لا بد من تنفيذ علم المواد وبيولوجيا الخلايا في انسجام تام لدراسة، وفي نهاية المطاف لهندسة بيئات ميكروية مكانية وزمانية في مستوى دقيق والذي يُعتبر أمراً حاسماً من أجل إحداث الاستجابة الخلوية المطلوبة، وهو أمرٌ مهم بشكلٍ خاص في مجال هندسة الأنسجة وتجديد الأعضاء. إن واحداً من التوجهات الرئيسية للتطوير المتبادل يكمن في القدرة على إنشاء مواد وأنظمة في المستوى الطولي النانومتري. وقد دفعت القيود المفروضة على الحفر الضوئي التقليدي إلى تنفيذ عمليات تصنيع نانوي أخرى بما في ذلك الحفر باستخدام الطبعة النانوية. وتكون عمليات الحفر باستخدام الطبعة النانوية (nanoimprint lithography) قادرة على إنشاء سمات أو خصائص قابلة لإعادة الإنتاج في مستوى أقل من ٣٠ نانومتراً [140]. ومن المحتمل لسمات أو خصائص في هذا المستوى الطولي أن تُستخدم لتصنيع بُنى أغشية قاعدية تركيبية (synthetic basement membrane)، والتي من المعروف أنها تحتوي على سمات أو خصائص في مستوى طولي مماثل [141,142]. ويمكن استخدام ركائز الخلايا الاصطناعية وذلك كي تتفاعل وبشكلٍ دقيق مع الأرجل الكاذبة الخيطية للخلايا (filopodia of cells) ومع الأرجل الكاذبة الصفائحية للخلايا (lamellopodia of cells)، والتي من المحتمل أن يتم استخدامها من أجل التحكم في وظائف الخلايا مثل الهجرة والتمايز.

إن نموذج هندسة الأنسجة الحالي يشير إلى أن القوة الدافعة من أجل تصميم وتصنيع حاملة الخلايا والأنسجة هي الرغبة في إنشاء نظام محاكٍ حيويًا (biomimetic system). إن هذه المتابعة المناسبة وإن كانت بدائية في الوقت الراهن غالباً ما تتجلى في تصميم المواد المحاكية حيويًا والعمليات وبُنى الحاملة - الخلايا التي تحاول أن تحاكي خصائص البيئة المايكروية للأنسجة مثل الشكل أو النمط الظاهري للخلية والبنية الهندسية المايكروية أو الدقيقة والخصائص الميكانيكية والطوبوغرافيا السطحية (السمات السطحية) والإشارات أو المنبهات الكيميائية. وتوفر الاستراتيجيات المحاكية حيويًا المستخدمة في تصنيع حاملة الخلايا والأنسجة تحديات تؤدي إلى التحسين الشامل في تقنيات التصنيع المايكروبي من أجل تطوير حاملة الخلايا والأنسجة وهندسة الأنسجة بشكلٍ عام. وقد تأتي هذه التحسينات في شكل مواد جديدة مع تحسّن في استجابة الأنسجة أو سهولة المعالجة، أو في شكل طرق جديدة من أجل التحكم بتفاعلات الخلايا - الخلايا أو الخلايا - المواد الحيوية، أو في شكل طرق جديدة من أجل التصنيع السهل للمواد الحيوية لحاملات خلايا وأنسجة وظيفية، والتي يمكن أن تعزز عمليات التجديد عبر جميع المستويات الهرمية من البروتينات والخلايا إلى الأنسجة والأعضاء.

إن الدور الأساسي للتصنيع المايكروفي في تطوير حاملة الخلايا والأنسجة وفي هندسة الأنسجة هو أن يعمل كأداة يمكنها تقديم العون والمساعدة في تقدم المجالات الفردية للعلوم والهندسة، والتي إما أن تكون مرتبطة بشكل مباشر وإما أن تكون بشكل غير مباشر بتجديد الأنسجة والأعضاء. بالإضافة إلى ذلك، يجب أن يُنظر إلى تقنيات التصنيع المايكروفي للمواد الحيوية على اعتبار أنها أيضاً أداة توحيد من أجل إنشاء منصات (platforms) للأبحاث متعددة التخصصات (interdisciplinary research). وبالنسبة للجزء الأكبر، فقد تم تثبيت الدور الفعال للتصنيع المايكروفي في تجديد الأنسجة والأعضاء بصورة دائمة فقط في الآونة الأخيرة. وعلى أي حال، فإن دور تكنولوجيا التصنيع المايكروفي في هندسة الأنسجة سيصبح أكثر وضوحاً عندما يصبح أكثر وأكثر جدوى من الناحية الاقتصادية وواسع الانتشار في كل مكان وسهل المنال أو يمكن الحصول عليه في المجالات العلمية الأخرى ويستمر في اكتساب القوة كأداة من أجل كل من العلوم الأساسية والعلوم البيولوجية التطبيقية (applied biological sciences).

المراجع REFERENCES

- [1] McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, and Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004;6:483–495.
- [2] Jiang X, Bruzewicz DA, Wong AP, Piel M, and Whitesides GM. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005;102(4):975–978.
- [3] Lucchetta EM, Lee JH, Fu AL, Patel NH, and Ismagilov RF. Dynamics of Drosophila embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics. *Nature* 2005;434:1134–1138.
- [4] Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, and Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997;276:1425–1428.
- [5] Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, and Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999;20:573–588.
- [6] Dalby MJ, Riehle MO, Yarwood SJ, Wilkinson CDW, and Curtis ASG. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: Response to a micro-grooved topography. *Exp Cell Res* 2003;284:274–282.
- [7] Chou L, Firth JD, Uitto VJ, and Brunette DM. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J Cell Sci.* 1995;108:1563–1573.
- [8] Curtis ASG and Wilkinson CDW. Reactions of cells to topography. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998; 9(12):1313–1329.
- [9] Curtis A and Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 1997;18(24):1573–1581.
- [10] Armani DK and Liu C. Microfabrication technology for polycaprolactone, a biodegradable polymer. *J Micromech Microeng* 2000;10:80–84.
- [11] Chen SC and Lu Y. Micro- and nano-fabrication of biodegradable polymers. In: Mallapragada S, Narasimhan B (Eds.), *Handbook of Biodegradable Polymeric Materials and Their Applications: American Scientific Publishers* 2005:1–17.
- [12] Hecke M and Schomburg W. Review on micro molding of thermoplastic polymers. *J Micromech Microeng* 2004;14:R1–R14.

- [13] Duffy DC, McDonald JC, Schueller JA, and Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem* 1998;70(23):4974–4984.
- [14] Borenstein JT, Terai H, King KR, Weinberg EJ, Kaazempur-Mofrad MR, and Vacanti JP. Microfabrication technology for vascularized tissue engineering. *Biomed Microdevices* 2002;4(3):167–175.
- [15] Leclerc E, Sakai Y, and Fujii T. Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes. *Biotechnol Prog* 2004;20:750–755.
- [16] Leclerc E, Yasuyuki S, and Fujii T. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomed Microdevices* 2003;5(2):109–114.
- [17] Richards-Grayson AC, Choi IS, Tyler BM, Wang PP, Brem H, Cima MJ, et al. Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device. *Nat Mater* 2003;2:767–772.
- [18] Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, and Langer R. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;94:8948–8953.
- [19] George PM, Lyckman AW, LaVan DA, Hegde A, Leung Y, Avasthi R, et al. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. *Biomaterials* 2005;26:3511–3519.
- [20] Wang Y, Ameer GA, Sheppard BJ, and Langer R. A tough biodegradable elastomer. *Nat Biotechnol* 2002;20:602–606.
- [21] Yang J, Webb AR, and Ameer GA. Novel citric acid-based biodegradable elastomers for tissue engineering. *Adv Mater* 2004;16(6):511–515.
- [22] Bettinger CJ, Orrick B, Misra A, Langer R, and Borenstein JT. Microfabrication of poly(glycerolsebacate) for contact guidance applications. *Biomaterials* 2006;27:2558–2565.
- [23] Bettinger CJ, Cyr KM, Matsumoto A, Langer R, Borenstein JT, and Kaplan DL. Silk fibroin microfluidic devices. *Adv Mater* 2007;19(19):2847–2850.
- [24] Paguirigan A and Beebe DJ. Gelatin based microfluidic devices for cell culture. *Lab Chip* 2005;6:407–413.
- [25] Cabodi M, Choi NW, Gleghorn JP, Lee CSD, Bonassar LJ, and Stroock AD. A microfluidic biomaterial. *J Am Chem Soc* 2005;127:13788–13789.
- [26] Tang MD, Golden AP, and Tien J. Molding of three-dimensional microstructures of gels. *J Am Chem Soc* 2003;125(43):12988–12989.
- [27] Owen GR, Jackson J, Chehroudi B, Burt H, and Brunette DM. A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration. *Biomaterials* 2005;26:7447–7456.
- [28] Mills CA, Escarr J, Engel E, Martinez E, Errachid A, Bertomeu J, et al. Micro and nanostructuring of poly(ethylene-2,6-naphthalate) surfaces, for biomedical applications, using polymer replication techniques. *Nanotechnology* 2005;16(4):369.
- [29] Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, Murphy CJ, and Nealey PF. Epithelial contact guidance on welldefined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci* 2003;116:1881–1892.
- [30] Sarkar S, Dadhania M, Rourke P, Desai TA, and Wong JY. Vascular tissue engineering: Microtextured scaffold templates to control organization of vascular smooth muscle cells and extracellular matrix. *Acta Biomater* 2005;1(1):93–100.
- [31] Belkas JS, Shoichet MS, and Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res* 2004;26(2):151–160.
- [32] Jiang X, Takayama S, Qian X, Ostuni E, Wu H, Bowden N, et al. Controlling mammalian cell spreading and cytoskeletal arrangement with conveniently fabricated continuous wavy features on poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* 2002;18:3273–80.
- [33] Metz S, Holzer R, and Renaud P. Polyimide-based microfluidic devices. *Lab Chip* 2001;1:29–34.
- [34] King KR, Wang CCJ, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP, and Borenstein JT. Biodegradable microfluidics. *Adv Mater* 2004;16(22):2007–2009.

- [35] Ryu W, Min SW, Hammerick KE, Vyakarnam M, Greco RS, Prinz FB, et al. The construction of threedimensional micro-fluidic scaffolds of biodegradable polymers by solvent vapor based bonding of micromolded layers. *Biomaterials* 2007;28(6):1174–1184.
- [36] Wang GJ, Chen CL, Hsu SH, and Chiang YL. Bio-MEMS fabricated artificial capillaries for tissue engineering. *Microsyst Technol* 2005;12:120–127.
- [37] Bettinger CJ, Weinberg EJ, Kulig KM, Vacanti JP, Wang Y, Borenstein JT, et al. Three-dimensional microfluidic tissue engineering scaffolds using a flexible biodegradable polymer. *Adv Mater* 2006;18:165–169.
- [38] Horan RL, Antle K, Collette AL, Wang Y, Huang J, Moreau JE, et al. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials* 2005;26:3385–3393.
- [39] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003;24:401–416.
- [40] Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, and Kaplan DL. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 2001;54:139–148.
- [41] Karageorgiou V, Meinel L, Hofmann S, Malhotra A, Volloch V, and Kaplan D. Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res* 2004;71A(3):528–537.
- [42] Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, and Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001;80(11):2025–2029.
- [43] Kuo CK and Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 2001;22(6):511–521.
- [44] Lee KY, Rowley JA, Eiselt P, Moy EM, Bouhadir KH, and Mooney DJ. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules* 2000;33:4291–4294.
- [45] Ling Y, Rubin J, Deng Y, Huang C, Demirci U, Karp JM, et al. A cell-laden microfluidic hydrogel. *Lab Chip* 2007;7:756–762.
- [46] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006;442:368–373.
- [47] Shito M, Kim NH, Baskaran H, Tilles AW, Tompkins RG, Yarmush ML, et al. In vitro and in vivo evaluation of albumin synthesis rate of porcine hepatocytes in a flat-plate bioreactor. *Artif Organs* 2001;25(7):571–578.
- [48] Park J, Berthiaume F, Mehmet T, Yarmush ML, and Tilles AW. Microfabricated grooved substrates as platforms for bioartificial liver reactors. *Biotechnol and Bioeng* 2005;90(5):632–644.
- [49] Lee PJ, Hung PJ, and Lee LP. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnol and Bioeng* 2007;97(5):1340–1346.
- [50] Wu H, Odom TW, Chiu DT, and Whitesides GM. Fabrication of complex three-dimensional microchannel systems in PDMS. *J Am Chem Soc* 2003;125:554–559.
- [51] Xia Y and Whitesides GM. Soft lithography. *Angew Chem Int Edit* 1998;37(5):550–575.
- [52] Bernard A, Renault JP, Michel B, Bosshard HR, and Delamarche E. Microcontact printing of proteins. *Adv Mater* 2000;12(14):1067–1070.
- [53] Lin CC, Co CC, and Ho CC. Micropatterning proteins and cells on polylactic acid and poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 2005;26(17):3655–3662.
- [54] Lee CJ, Blumenkranz MS, Fishman HA, and Bent SF. Controlling Cell Adhesion on Human Tissue by Soft Lithography. *Langmuir* 2004;20(10):4155–4161.

- [55] Lehnert D, Wehrle-Haller B, David C, Weiland U, Ballestrem C, Imhof BA, et al. Cell behaviour on micropatterned substrata: Limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci* 2004;117:41–52.
- [56] McDevitt TC, Woodhouse KA, Hauschka SD, Murry CE, and Stayton PS. Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair. *J Biomed Mater Res* 2003;66A(3):586–595.
- [57] Fukuda J, Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Cheng J, Farokhzad OC, et al. Micropatterned cell cocultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components. *Biomaterials* 2006; 27(8):1479–1486.
- [58] Stevens MM, Mayer M, Anderson DG, Weibel DB, Whitesides GM, and Langer R. Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps. *Biomaterials* 2005; 26(36):7636–7641.
- [59] Kim E, Xia Y, and Whitesides GM. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature* 1995;376:581–584.
- [60] Kim E, Xia Y, Zhao XM, and Whitesides GM. Solvent-assisted microcontact molding: A convenient method for fabricating three-dimensional structures on surfaces of polymers. *Adv Mater* 1997;9:651–654.
- [61] Zhao XM, Xia Y, and Whitesides GM. Fabrication of three-dimensional micro-structures: Microtransfer molding. *Adv Mater* 1996;8:837–840.
- [62] Suh KY, Kim YS, and Lee HH. Capillary force lithography. *Adv Mater* 2001;13(18):1386–1389.
- [63] Suh KY and Lee HH. Capillary force lithography: Large-area patterning, self-organization, and anisotropic dewetting. *Adv Funct Mater* 2002;12(6–7):405–413.
- [64] Suh KY, Seong J, Khademhosseini A, Laibinis PE, and Langer R. A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials* 2001;25:557–563.
- [65] Folch A, Jo BH, Hurtado O, Beebe DJ, and Toner M. Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *J Biomed Mater Res* 2000;52:346–353.
- [66] Zinchenko YS, Schrum LW, Clemens M, and Coger RN. Hepatocyte and kupffer cells co-cultured on micropatterned surfaces to optimize hepatocyte function. *Tissue Eng* 2006;12(4):751–761.
- [67] Chiu DT, Jeon NL, Huang S, Kane RS, Wargo CJ, Choi IS, et al. Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000;12:2408–2413.
- [68] Delamarche E, Bernard A, Schmid H, Michel B, and Biebuyck H. Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science* 1997;276(5313):779–781.
- [69] Flaim CJ, Chien S, and Bhatia SN. An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation. *Nat Methods* 2005;2(2):119–125.
- [70] Anderson DG, Levenberg S, and Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:863–866.
- [71] Malek CK and Saile V. Applications of LIGA technology to precision manufacturing of high-aspect-ratio micro-components and -systems: A review. *Microelectron J* 2004;35(2):131–143.
- [72] Rivers TJ, Hudson TW, and Schmidt CE. Synthesis of a novel, biodegradable electrically conducting polymer for biomedical applications. *Adv Funct Mater* 2002;12(1):33–37.
- [73] Zelikin AN, Lynn DM, Farhadi J, Martin I, Shastri V, and Langer R. Erodible conducting polymers for potential biomedical applications. *Angew Chem Int Edit* 2002;41(1):141–144.
- [74] Gomez N and Schmidt CE. Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: Bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension. *J Biomed Mater Res* 2007;81A(1):135–149.

- [75] Lavan DA, George PM, and Langer R. Simple, three-dimensional microfabrication of electrodeposited structures. *Angew Chem Int Edit* 2003;42(11):1262–1265.
- [76] Koch J, Fadeeva E, Engelbrecht M, Ruffert C, Gatzen HH, Stendorf AO, et al. Maskless nonlinear lithography with femtosecond laser pulses. *Appl Phys A-Mater* 2006;82:23–26.
- [77] Jensen MF, McCormack JE, Helbo B, Christensen LH, Christensen TR, and Geschke O. Rapid prototyping of polymer microsystems via excimer laser ablation of polymeric moulds. *Lab Chip* 2004;4:391–395.
- [78] Snakenborg D, Klank H, and Kutter JP. Microstructure fabrication with a CO2 laser system. *J Micromech Microeng* 2004;14:182–189.
- [79] Kancharla VV and Chen S. Fabrication of biodegradable polymeric micro-devices using laser micromachining. *Biomed Microdevices* 2002;4(2):105–109.
- [80] Locascio LE, Ross DJ, Howell PB, Gaitan M. Fabrication of polymer microfluidic systems by hot embossing and laser ablation. *Methods Mol Biol* 2006;339:37–46.
- [81] Pugmire DL, Waddell EA, Haasch R, Tarlov MJ, and Locascio LE. Surface characterization of laserablated polymers used for microfluidics. *Anal Chem* 2002;74(4):871–878.
- [82] Lu Y, Theppakuttai S, and Chen SC. Marangoni effect in nanosphere-enhanced laser nanopatterning of silicon. *Appl Phys Lett* 2003;82(23):4143–4145.
- [83] Kosiorek A, Kandulski W, Glaczynska H, and Giersig M. Fabrication of nanoscale rings, dots, and rods by combining shadow nanosphere lithography and annealed polystyrene nanosphere masks. *Small* 2005;1(4):439–444.
- [84] Piner RD, Zhu J, Xu F, Hong S, and Mirkin CA. “Dip-pen” nanolithography. *Science* 1999;283(5402):661–663.
- [85] Hong S, Zhu J, and Mirkin CA. Multiple ink nanolithography: Toward a multiple-pen nano-plotter. *Science* 1999;286(5439):523–525.
- [86] Noy A, Miller AE, Klare JE, Weeks BL, Woods BW, and DeYoreo JJ. Fabrication of luminescent nanostructures and polymer nanowires using dip-pen nanolithography. *Nano Lett* 2002;2(2):109–112.
- [87] Lee K-B, Park S-J, Mirkin CA, Smith JC, and Mrksich M. Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science* 2002;295(5560):1702–1705.
- [88] Demers LM, Ginger DS, Park SJ, Li Z, Chung SW, and Mirkin CA. Direct patterning of modified oligonucleotides on metals and insulators by dip-pen nanolithography. *Science* 2002;296(5574):1836–1838.
- [89] Wilson DL, Martin R, Hong S, Cronin-Golomb M, Mirkin CA, and Kaplan DL. Surface organization and nanopatterning of collagen by dip-pen nanolithography. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001;98(24):13660–13664.
- [90] Ginger DS, Zhang H, and Mirkin CA. The evolution of dip-pen nanolithography. *Angew Chem Int Ed* 2004;43,30.
- [91] Cooke MN, Fisher JP, Dean D, Rimnac C, and Mikos AG. Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth. *J Biomed Mater Res* 2002;64B:65–69.
- [92] Lu Y, Mapili G, Chen SC, and Roy K. Proceedings of the 30th annual meeting and exposition; 2003; Glasgow, Scotland.
- [93] Lu Y, Mapili G, Suhali G, Chen S, and Roy K. A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2006;77A:396–405.
- [94] Chen W, Kirihara S, and Miyamoto Y. Fabrication of three-dimensional micro photonic crystals of resinincorporating TiO2 particles and their terahertz wave properties. *J Am Cer Soc* 2007;90(1):92–96.

- [95] Basu S and Campagnola PJ. Properties of crosslinked protein matrices for tissue engineering applications synthesized by multiphoton excitation. *J Biomed Mater Res* 2004;71A(2):359–368.
- [96] Basu S and Campagnola PJ. Enzymatic activity of alkaline phosphatase inside protein and polymer structures fabricated via multiphoton excitation. *Biomacromolecules* 2004;5(2):572–579.
- [97] Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 2005;4:518–524.
- [98] Vozzi G, Flaim C, Ahluwalia A, and Bhatia S. Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. *Biomaterials* 2003;24:2533–2540.
- [99] Kawata S, Sun H-B, Tanaka T, and Takada K. Finer features for functional microdevices. *Nature* 2001;412(6848):697–698.
- [100] Schlie S, Ngezhayo A, Ovsianikov A, Fabian T, Kolb HA, Haferkamp H, et al. Three-dimensional cell growth on structures fabricated from ORMOCER by two-photon polymerization technique. *J Biomater Appl* 2007;22:275–287.
- [101] Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, and Kaplan DL. Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* 2002;3:1233–1239.
- [102] Li D, Wang Y, and Xia Y. Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano Letters* 2003;3(8):1167–1171.
- [103] Xu CY, Inai R, Kotaki M, and Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: A potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 2004;25:877–886.
- [104] Zhong XH, Ran SF, Fang DF, Hsiao BS, and Chu B. Control of structure, morphology, and property in electrospun poly(glycolide-co-lactide) non-woven membranes via post-draw treatments. *Polymer* 2003;44:4959.
- [105] Ma Z, Kotaki M, Inai R, and Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng* 2005;11:101–109.
- [106] Wood MA. Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications *J R Soc Interface* 2007;4:1–17.
- [107] Yeong W-Y, Chua C-K, Leong K-F, Chandrasekaran M, and Lee M-W. Indirect fabrication of collagen scaffold based on inkjet printing technique. *Rapid Prototyping J* 2006;12(4):229–237.
- [108] Roy TD, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, and Parsons JR. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(2):283–291.
- [109] Simon JL, Roy TD, Parsons JR, Rekow ED, Thompson VP, Kemnitzer VP, et al. Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(2):275–282.
- [110] Cukierman E, Pankov R, and Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:633–639.
- [111] Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, and Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:9064–9068.
- [112] Liu H and Roy K. Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. *Tissue Eng* 2005;11(1–2):919–330.
- [113] Tang P, Qui F, Zhang H, and Yang Y. Morphology and phase diagram of complex block copolymers: ABC linear triblock copolymers. *Phys Rev E* 2004;69:031803, 1–8.
- [114] Dalby MJ, Childs S, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, and Curtis ASG. Fibroblast reaction to island topography: Changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials* 2003;24:927–935.
- [115] Kim SO, Solak HH, Stoykovich MP, Ferrier NJ, Pablo JJD, and Nealey PF. Epitaxial self-assembly of block copolymers on lithographically defined nanopatterned substrates. *Nature* 2003;424(6947):411–414.

- [116] Bognitzki M, Frese T, Steinhart M, Greiner A, and Wendorff JH. Preparation of fibers with nanoscaled morphologies: Electrospinning of polymer blends. *Polym Eng Sci* 2001;41(6):982–989.
- [117] Whang K, Thomas H, and Healy KE. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer* 1995;36:837–841.
- [118] Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma YX, and Wang S. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(10):1891–1900.
- [119] Lo H, Ponticciello MS, and Leong KW. Fabrication of controlled release biodegradable foams by phase separation. *Tissue Eng* 1995;1:15–27.
- [120] Stachowiak AN, Bershteyn A, Tzatzalos E, and Irvine DJ. Bioactive hydrogels with ordered cellular structure combine interconnected macroporosity and robust mechanical properties. *Adv Mater* 2005;14(4):399–403.
- [121] Zhang S. Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnol Adv* 2002;20:321–339.
- [122] Park SH, Pistol C, Ahn SJ, Reif JH, Lebeck AR, Dwyer C, et al. Finite-size, fully addressable DNA tile lattices formed by hierarchical assembly procedures. *Angew Chem Int Ed* 2006;735–739.
- [123] Rothmund PWK. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 2006;440:297–302.
- [124] Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol* 2003;21:1171–1178.
- [125] Petka WA, Harden JL, McGrath KP, Wirtz D, and Tirrell DA. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins. *Science* 1998;281(5375):389–392.
- [126] Reches M and Gazit E. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science* 2003;300:625–627.
- [127] Scheibel T, Parthasarathy R, Sawicki G, Lin XM, Jaeger H, and Lindquist SL. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003;100(8):4527–4532.
- [128] Tan JL, Liu W, Nelson CM, Raghavan S, and Chen CS. Simple approach to micropattern cells on common culture substrates by tuning substrate wettability. *Tissue Eng* 2004;10(5/6).
- [129] Tan W and Desai TA. Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures. *Biomaterials* 2004;24:1355–1364.
- [130] Tan W and Desai TA. Microscale multilayer cocultures for biomimetic blood vessels. *J Biomed Mater Res* 2005;72A:146–160.
- [131] Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Karp J, Kaji H, Borenstein J, et al. Cell docking inside microwells within reversibly sealed microfluidic channels for fabricating multiphenotype cell arrays. *Lab Chip* 2005;5:1380–1386.
- [132] Liu VA and Bhatia SN. Three-dimensional patterning of hydrogels containing living cells. *Biomed Microdevices* 2002;4(4):257–266.
- [133] Nijst CLE, Bruggeman JP, Karp JM, Ferreira L, Zumbuehl A, Bettinger CJ, et al. Synthesis and characterization of photocurable elastomers from poly(glycerol-co-sebacate). *Biomacromolecules* 2007;8(10):3067–3073.
- [134] Dhariwala B, Hunt E, and Boland T. Rapid prototyping of tissue-engineering constructs using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. *Tissue Eng* 2004;10(9/10):1316–1322.
- [135] Nahmias Y, Arneja A, Tower TT, Renn MJ, and Odde DJ. Cell patterning on biological gels via cell spraying through a mask. *Tissue Eng* 2005;11(5–6):701–708.
- [136] Moghe PV, Berthiaume F, Ezzell RM, Toner M, Tompkins RG, and Yarmush ML. Culture matrix configuration and composition in the maintenance of hepatocyte polarity and function. *Biomaterials* 1996;17(3):373–385.

- [137] Odde DJ and Renn MJ. Laser-guided direct writing of living cells. *Biotechnol Bioeng* 2000;67:312–318.
- [138] Nahmias Y, Schwartz RE, Verfaillie CM, and Odde DJ. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2005;92(2):129–136.
- [139] Nahmias Y and Odde DJ. Micropatterning of living cells by laser-guided direct writing: Application to fabrication of hepatic-endothelial sinusoid-like structures. *Nat Protocols* 2006;1(5):2288–2296.
- [140] Chou SY, Krauss PR, and Renstrom PJ. Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. *Appl Phys Lett* 1995;67(21):3114.
- [141] Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF, Franco M, and Murphy CJ. Nanoscale topography of the basementmembrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res* 2000;299:39–46.
- [142] Abrams GA, Schaus SS, Goodman SL, Nealey PF, and Murphy CJ. Nanoscale topography of the corneal epithelial basement membrane and Descemet's membrane of the human. *Cornea* 2000;19:57–64.
- [143] Xia Y, Kim E, Zhao X-M, Rogers JA, Prentiss M, and Whitesides GM. Complex optical surfaces formed by replica molding against elastomeric masters. *Science* 1996;273(5273):347–349.
- [144] Kumar A and Whitesides GM. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *Appl Phys Lett* 1993;63(14):2002–2004.
- [145] Ginger DS, Zhang H, and Mirkin CA. The evolution of dip-pen nanolithography. *Angew Chem Int Edit* 2004;43(1):30–45.