

تقنيات الغزل الكهربائي للتحكم بالترسيب

والترافف البنيوي لحاملات الخلايا والأنسجة

ذات الألياف النانوية من أجل التوجيه الخلوي

وإعادة التنظيم الهيكلي الخلوي

Electrospinning Techniques to Control Deposition and Structural Alignment of Nanofibrous Scaffolds for Cellular Orientation and Cytoskeletal Reorganization

Joel K. Wise, Michael Cho, Eyal Zussman, Constantine M. Megaridis, and Alexander L. Yarin

المحتويات CONTENTS

٣٧٠	INTRODUCTION مقدمة (٩,١)
	FABRICATION OF ALIGNED نانو المتراففة المغزولة كهربائياً (٩,٢)
٣٧٣	ELECTROSPUN NANOFIBER SCAFFOLDS
٣٨٠	MATERIALS AND METHODS المواد والطرق (٩,٣)
	Electrospinning الغزل الكهربائي لحاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون النانوية (٩,٣,١)
٣٨٠	of PCL Nanofibrous Scaffolds
	زرع وبذر الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (٩,٣,٢)
٣٨١	Human Mesenchymal Stem Cell Culture and Seeding on PCL Nanofibrous Scaffolds النانوية
	Laser Scanning Confocal Microscopy الفحص المجهرى المباتر المساح بواسطة الليزر وتحليل التوجيه (٩,٣,٣)
٣٨١	and Orientation Analysis

٣٨٢ and Fluorescence Visualization	(٩,٣,٤) قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية على البقاء على قيد الحياة والإظهار التألقي hMSC Viability
٣٨٣ Statistics	(٩,٣,٥) إحصائيات
٣٨٣ RESULTS AND DISCUSSION	(٩,٤) النتائج والمناقشة
٣٨٣ Characterization of Electrospun PCL Nanofibrous Scaffolds	(٩,٤,١) تحديد خصائص حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون المغزولة كهربائياً
٣٨٤ and Nanofibers for Random and Oriented Scaffolds	(٩,٤,٢) توجيه الخلايا وألياف النانو من أجل حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية والموجهة Orientation of Cells
٣٨٤	(٩,٤,٣) محاذاة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية المتسقة طويلة الأمد على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة Consistent Long-Term Hmsc Alignment on Oriented Nanofibrous Scaffolds
٣٨٨	(٩,٤,٤) قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية على البقاء على قيد الحياة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون النانوية hMSC Viability on PCL Nanofibrous Scaffolds
٣٨٩ Reorganization and hMSC–Nanofiber Adhesions	(٩,٤,٥) إعادة التنظيم الهيكلي الخلوي والتصاقات الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية–ألياف النانو Cytoskeletal
٣٩٠	(٩,٥) الاستنتاجات CONCLUSIONS
٣٩٣ ACKNOWLEDGMENTS	شكر وتقدير
٣٩٤ REFERENCES	المراجع

(٩,١) مقدمة INTRODUCTION

إن الخلايا ولييفات المصفوفة خارج الخلية (ECM fibrils) في معظم الأنسجة الطبيعية ليست عشوائية، ولكنها تُظهر أنماطاً محددة بشكل جيد وتوجيهاً مكانياً محددًا. وقد أظهرت النتائج الأخيرة بأن حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة والمبنية من البوليمرات الحيوية لديها القدرة على هندسة الأوعية الدموية (blood vessels) [1] والأنسجة العصبية (neural tissue) [2] وأنسجة الأربطة (ligament tissue) [3]. بالإضافة إلى ذلك، فقد تبين أنه يتم تحسين التصاق الخلايا وتكاثرها بشكل كبير على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة (oriented nanofibrous scaffolds) [1]. وتقتصر نظرية توجيه الاتصال (contact guidance theory) بأن الخلايا لديها الاحتمال الأكبر للهجرة أو التنقل في اتجاهات مفضلة (preferred orientations) ترتبط بالخصائص الكيميائية والبنوية و / أو الميكانيكية للركيزة [4-6]. وبناءً على ذلك، فقد يكون من المفترض أن حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة ستوجه محاذاة الخلايا (cell alignment) على

طول ألياف النانو. ويمكن أن يكون تنظيم أو ترتيب الخلايا (cell arrangement) على حاملة الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة راجعاً إلى توجيه الاتصال و / أو إلى إعادة التنظيم الهيكلي الخلوي (cytoskeletal reorganization). ويمكن بالتالي للخلايا المتراصة أن تُستخدم لإعادة تشكيل (remodel) أو تعديل (modulate) المصفوفة خارج الخلية (ECM) والبيئة المايكروية (microenvironment) المشكّلة من جديد [7].

إن الدافع الخاص لهذا العمل هو هندسة بنية شبيهة بالأنسجة (tissue-like construct)، والتي سوف تحاكي المنطقة السطحية للغضروف المفصلي (superficial zone of articular cartilage). فمن المعروف أن الغضروف المفصلي يتألف بشكل أساسي مما لا يقل عن أربع مناطق مختلفة، وكل منطقة ذات تنظيم أو توجيه معين للخلايا والمصفوفة خارج الخلية (ECM) [10-80]. وهذه المناطق معروفة على أنها منطقة سطحية أو تماسية (superficial or tangential zone) ومنطقة متوسطة أو انتقالية (intermediate or transitional zone) ومنطقة عميقة أو شعاعية (deep or radial zone) ومنطقة متكلسة (calcified zone). ويمكن أن يُعزى التنظيم المحدد للخلايا والمصفوفة خارج الخلية (ECM) داخل كل منطقة غضروفية إلى التاريخ التطوري (developmental history) والقوى الميكانيكية التي يتعرض لها كل من هذه المناطق الغضروفية؛ مما يدعم الوظيفة الكلية للنسيج الغضروفي المفصلي (articular cartilage tissue) [12,13]. لقد ركّز العديد من التقارير المنشورة على التنظيم المناطقي للخلايا الغضروفية (zonal organization of chondrocytes) ضمن البوليمرات المتوافقة حيويًا من أجل البنى الغضروفية المفصلية المهندسة نسيجياً [14-18]. بالإضافة إلى ذلك، فقد استخدمت الأوراق التي نُشرت مؤخراً خلايا غضروفية وخلايا جذعية متوسطة بشرية (human mesenchymal stem cells - hMSCs) وحاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد ذات ألياف نانو بوليميرية عشوائية من أجل هندسة الأنسجة الغضروفية (cartilage tissue engineering) [19-23]. ومع ذلك، فإن محاولات هندسة المنطقة السطحية على وجه التحديد للغضروف المفصلي باستخدام خلايا جذعية متوسطة بشرية (hMSCs) وحاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانو موجهة لم يتم ذكرها في التقارير. تُظهر المنطقة السطحية للنسيج الغضروفي المفصلي الطبيعي خلايا غضروفية مسطحة شبه إهليلجية أو بيضاوية (flattened, ellipsoidal-like chondrocytes) ولييفات من الكولاجين في مستوى النانو (nanoscale collagen fibrils)، والتي تكون موجهة على التوازي مع مستوى السطح المفصلي (articular surface)، مع درجة كبيرة من التوجيه في ذلك السطح [8-11]. وعلى الرغم من أنها عبارة عن عدد قليل من الطبقات الرقيقة فقط، إلا أنه قد تم تأكيد أهمية هذه المنطقة السطحية؛ لأنها توفر خصائص الشد العالي (high tensile properties) التي يتم الحفاظ عليها عن طريق توجيه الخلايا ولييفات الكولاجين [12,13]؛ وبالتالي فهي حاسمة من أجل وظيفة طبيعية عند السطح الغضروفي المفصلي. إن الخطوة الضرورية الأولى نحو هندسة الأنسجة الوظيفية (functional tissue engineering) للمنطقة السطحية الغضروفية تتطلب تقيماً كمياً لالتصاق وتوجيه الخلايا.

من أجل العمل بشكل صحيح، يجب على الخلايا المبذورة في حاملة الخلايا والأنسجة أن تكون قادرة على الاتصال مع بيئتها عن طريق إشارات كيميائية حيوية (biochemical signals) وإشارات كهربائية حيوية (bioelectrical signals) وإشارات طوبولوجية (topological signals) مناسبة. وتؤثر طوبوغرافيا وتركيب البيئة المايكروية (أي المصفوفة خارج الخلية

الأصلية (native ECM)) على الوظائف الخلوية (cellular functions) مثل الالتصاق (adhesion) والنمو (growth) والتحرك (motility) والإفراز (secretion) والتعبير الجيني (gene expression) والموت المبرمج للخلايا (apoptosis). ومن المعروف جيداً أن لدى البنية المادية للمصفوفة خارج الخلية الأصلية أبعاداً في مستوى النانو. إن ارتفاع نسبة المساحة السطحية إلى الحجم (surface area - to - volume ratio) لحاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو وقطر الألياف في مستوى النانو من المحتمل أن يوفر الظروف الملائمة من أجل التصاق ونمو الخلايا. فعلى سبيل المثال، ولأن الكولاجين هو العنصر الأكثر وفرة في المصفوفة خارج الخلية (ECM)، لا تكون حاملات الخلايا والأنسجة المبنية من الكولاجين والمؤلفة من ليفيات في مجال أقطار يتراوح من ١٠ إلى ٣٠٠ نانومتر متوافقة حيويًا فحسب بل يمكنها أن توفر أيضاً واحدة من البنى الليفية النانوية (nanofibrous structures) الأكثر مثالية من أجل هندسة الأنسجة [24]. وفي الواقع، فقد تبين أن الخلايا تلتصق وتنظم حول الألياف ذات الأقطار الأصغر من أقطار الخلايا [24,25].

إن لدى الخلايا الجذعية (stem cells) خاصية فريدة للتجديد الذاتي (self-renewal) من دون أن تتمايز حتى، وما لم يتم تزويدها بالإشارات البيولوجية والفيزيائية (biological and physical signals) المناسبة. وفي سياق هندسة الأنسجة، فإن استخدام الخلايا الجذعية له مزايا عديدة. على عكس بنى الأنسجة المهندسة باستخدام الخلايا المتمايزة، فإن الخلايا الجذعية (١) لديها قدرة تكاثرية (proliferative capacity) عالية، و (٢) توفر قدرة تجديدية (regenerative capability) ممتازة والتي ستؤدي على الأرجح إلى الكمال والوظيفة المرغوبة للنسيج المهندس، و (٣) تجعل من الممكن التفكير ملياً في بنى نسيجية متعددة الوظائف (multifunctional tissue constructs) (على سبيل المثال، نسيج عظمي غضروفي (osteocondral tissue))، و (٤) تخفض أو تتخلص من رفض وفشل الأنسجة (tissue rejection and failure). ومن المثير للدهشة أن الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) يمكن زراعتها وتميئتها في المختبر (in vitro)، ويمكن تحريضها لتكاثر وتتمايز إلى أنماط خلايا ظاهرة محددة للأنسجة (tissue-specific cell phenotypes) مثل الخلايا المولدة للغضروف (chondrogenic cells) والخلايا المولدة للعظم (osteogenic cells) والخلايا المكونة للشحم (adipogenic cells) والخلايا المولدة للععضل (myogenic cells) وذلك باستخدام المحفزات البيولوجية والفيزيائية (biological and physical stimuli) [26-29]؛ وبالتالي فإنها توفر القدرة على إصلاح وتجديد الأنسجة العضلية الهيكلية (musculoskeletal tissue). ففي حين تم التعرف على القدرة العلاجية الهائلة للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) من أجل علاج الأنسجة التالفة أو المريضة، فإن تعقيد الأحداث المرتبطة بتحول خلايا الطليعة أو خلايا السلف (precursor cells) تلك يترك الكثير من الأسئلة لم يتم الرد عليها حول التغييرات الشكلية والبنوية والبروتينية والوظيفية في الخلايا الجذعية. وستسمح المعرفة الأكثر تفصيلاً حول سلوك الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) باستخدام طرق أفضل وأكثر فعالية لتوسيع نمو هذه الخلايا في المختبر، وتنظيم التزامها بنمط ظاهري محدد. فعلى سبيل المثال، لقد تبين أن التحكم بتوجيه وتكاثر وتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) يُعدّل الجوانب الوظيفية (functional aspects) للبنى النسيجية المهندسة (engineered tissue constructs) [30,31]. ولذلك؛ فإن هندسة بيئة تفضي إلى توجيه والتصاق وتكاثر وتمايز الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) هو بالأهمية القصوى في هندسة الأنسجة.

الغزل الكهربائي (electrospinning) [32-37] هو تقنية واعدة لإنشاء بنى هندسية نمطية من الألياف من أجل تنظيم التفاعلات الخلوية والجزيئية للالتصاق وتكاثر وتمايز وتوجيه الخلايا الجذعية. وقد تم استخدام مجموعة متنوعة من البوليمرات الطبيعية أو التركيبية في إطار الغزل الكهربائي لتصنيع وتصميم حاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية متوافقة حيويًا من

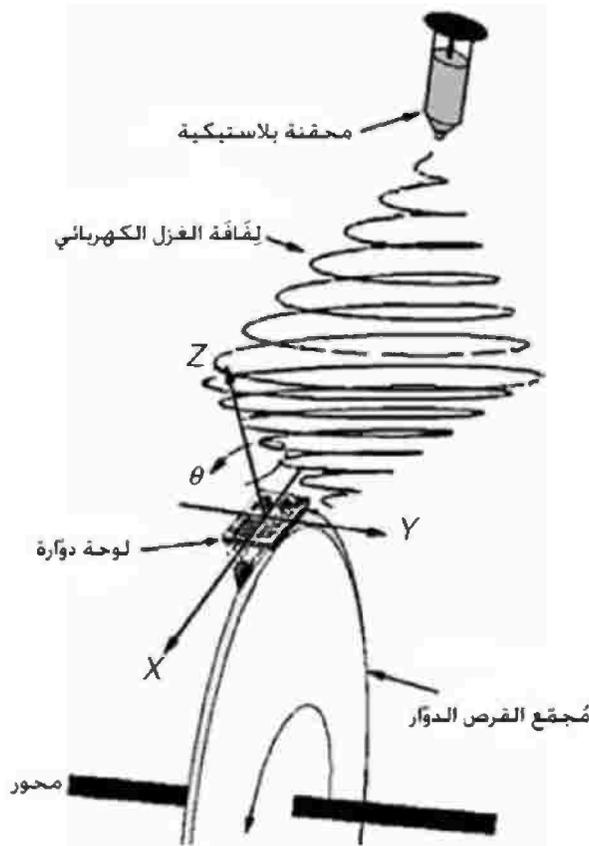
أجل تطبيقات هندسة الأنسجة. فعلى سبيل المثال، البولي كابرولاكتون (PCL) هو مادة قابلة للتحلل الحيوي ويُظهر عملياً عدم سُمِّية وتحللاً قابلاً للتحكم به (controllable degradation) وهو غير مكلف [38]. البولي كابرولاكتون (PCL) هو بوليمر شبه بلوري (semicrystalline polymer) وهو ينتمي إلى عائلة البوليسترَات ألفا - هيدروكسي (α -hydroxy polyesters) (على سبيل المثال PLA، PGA) ويمكن أن يعزز وبشكل كبير من الخصائص الميكانيكية لحاملة الخلايا والأنسجة بسبب معامل الشد (tensile modulus) العالي الخاص به (٤٠٠ ميغا باسكال (MPa)؛ [39,40]). وتتجاوز هذه الخصائص الميكانيكية معامل المرونة (elastic modulus) للنسيج الغضروفي (تقريباً ١٠ ميغا باسكال) وتقع في مجال معامل المرونة لألياف الكولاجين (collagen fibers) (تقريباً ٥٠٠ ميغا باسكال)؛ مما يوحي بأن حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) تُظهر بشير نجاح ممتاز من أجل هندسة الأنسجة الغضروفية. وبالإضافة إلى ذلك، فقد تم مؤخراً استخدام البولي كابرولاكتون (PCL) لإثبات توافقه مع بذر واستيعاب الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) ودعم التمايز متعدد السلالات (multilineage differentiation) [20,21,38].

في العمل الحالي، سنستعرض أولاً التقنيات المختلفة المستخدمة لمحاذاة ألياف النانو (align nanofibers) أثناء الغزل الكهربائي. وفي الفقرات اللاحقة، سنسعى إلى تنظيم وتحديد توجيه الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) كمياً على اثنتين على الأقل من حاملات الخلايا والأنسجة المختلفة ذات الألياف النانوية من البولي كابرولاكتون (PCL) والمصنعة باستخدام الغزل الكهربائي. وباستخدام تحليل الصور المتطور، فقد تم تحديد توجيه الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) على حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية العشوائية والموجهة كمياً أثناء فترة زراعة من ١٨ يوماً. بالإضافة إلى ذلك، فقد تم استكشاف وربط قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة على المدى الطويل (long-term cell viability) وإعادة التنظيم الهيكلي الخلوي (cytoskeletal reorganization) والتصاقات الخلايا - ألياف النانو (cell-nanofiber adhesions) مع توجيه الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية المحرّض بالاتصال (contact-induced hMSC orientation) على ألياف النانو. يمكن للتطبيقات العلاجية وهندسة الأنسجة المبنية على أساس الخلايا الجذعية أن تكون مُعززة ومُبسطة بواسطة الطرق الفيزيائية، كذلك الطريقة المعروضة هنا، وذلك للتحكم بالبيئة المايكروية من أجل نمو وتمايز الخلايا الموجه.

(٩،٢) تصنيع حاملات خلايا وأنسجة من ألياف النانو المترصفة المغزولة كهربائياً FABRICATION OF ALIGNED ELECTROSPUN NANOFIBER SCAFFOLDS

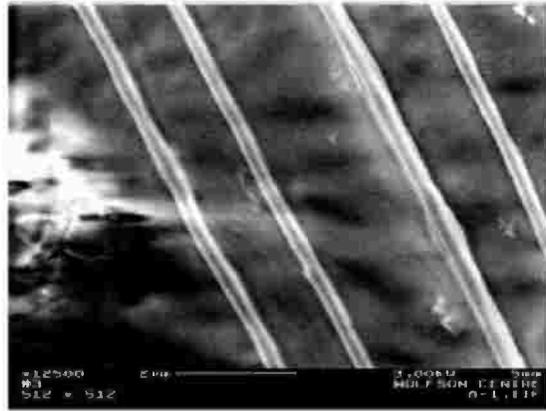
يعود تاريخ تقنيات المحاذاة الموضوعية (in situ alignment) لألياف النانو المغزولة كما هي، والتي لم تخضع لمعالجة إضافية (as-spun nanofibers) باستخدام قوى التنافر الكهرستاتيكي (electrostatic repulsion forces) إلى الأعمال [41,42]، حيث تم تقديم أول عدسة كهرستاتيكية (electrostatic lens) من أجل الغزل الكهربائي. وقد اكتسبت فكرة العدسة الكهرستاتيكية في الغزل الكهربائي الزخم في دراسات أخرى [43-46]، حيث تم استخدام بعض التعديلات الإضافية باستخدام هذا المبدأ. ويظهر في الشكل رقم (٩،١) رسم تخطيطي للجهاز التجريبي المستخدم في المراجع [41,42]. فقد تدفق النفثات نزولاً من سطح القطرة المتدلّية (pendant drop) من محلول البوليمر المعلق في نهاية إبرة نحو مجمع على شكل عجلة دوّارة

(rotating wheel collector) موضوع على مسافة ١٢٠ ميليمتر تحت القطيرة (droplet). وكان لعجلة الألمنيوم (التي يبلغ قطرها ٢٠٠ ميليمتر) حافة مدببة (tapered edge) مع نصف زاوية بقيمة ٢٦.٦ درجة من أجل إنشاء حقل كهروستاتيكي تقاربي (converging electrostatic field) بشكل قوي. وقد طُبّق في البداية فرق جهد كهربائي من حوالي ٨ كيلو فولت بين سطح القطرة السائلة والعجلة الدوّارة. فعندما تمت زيادة فرق الجهد بين القطيرة المتدلّية والعجلة المؤرّضة (grounded wheel)، اكتسبت القطيرة شكلاً شبيهاً بالمخروط (cone-like shape) (مخروط تايلور Taylor cone). وعند فرق جهد عالٍ بما فيه الكفاية، ظهر نفث ثابت من المخروط وانتقل نحو الأسفل باتجاه العجلة. وتدفق النفث بعيداً عن القطيرة في خط مستقيم تقريباً ومن ثم انحنى في مسار معقد حيث تم احتواءه ضمن منطقة مخروطية الشكل تقريباً (conical region) (مخروط مغلف envelope cone)، [32]، ذروته إلى الأعلى. ومن ثم وعند نقطة معينة فوق العجلة بدأ المخروط المغلف بالتقلص، مؤدياً إلى إنتاج مخروط مغلف مقلوب وذروته عند حافة العجلة.



الشكل رقم (٩، ١). رسم تخطيطي لعملية الغزل الكهربائي (electrospinning process) يُظهر مغلف ثنائي المخروط من النفثات (double-cone envelope of the jet). ويمكن أن تُزوّد عجلة المجمع (collector wheel) بلوحة (table) بحيث تساعد على جمع ألياف النانو. ويمكن أن تدور اللوحة حول محور Z عند توقف دوران العجلة بشكل مؤقت للسماح بجمع طبقة تلو الطبقة عند زاوية مرغوبة بين طبقات مصفوفة ألياف النانو. (من (Zussman, E., Theron, A., and Yarin, A.L., *Appl. Phys. Lett.*, 82, 973, 2003).

أثناء عملية الغزل الكهربائي، تدور العجلة بسرعة ثابتة لجمع ألياف النانو النامية على حافتها الحادة. وعندما يصل ليف النانو المغزول كما هو والذي لم يخضع لأي معالجة إضافية إلى حافة العجلة، فإنه يلتف حول العجلة. ويمكن أيضاً للوحة صغيرة (بقياس ٥ × ٤ ميليمترات) مصنوعة من الألمنيوم أن تُربط إلى حافة العجلة لتسهيل الجمع المتتالي لألياف النانو. ويمكن أن تدور اللوحة حول محورها (Z) (انظر الشكل رقم ٩.١) عند توقف دوران العجلة بشكل مؤقت؛ وبالتالي يمكن التحكم في اتجاه ألياف النانو التي يتم جمعها. وعادةً ما يتم جمع ألياف النانو لفترة أكثر من ١٠ ثوانٍ. ويظهر في الشكل رقم (٩.٢) مصفوفات ألياف نانو (nanofiber arrays) نموذجية ثنائية الأبعاد مصنوعة من بولي (أكسيد الإيثيلين) (poly(ethylene oxide) - PEO) باستخدام هذه الطريقة. وقد كانت السرعة الخطية (linear speed) عند طرف المجمع القرصي ١١ متراً / ثانية في هذه الحالة. ولم يكن قطر ألياف النانو في الشكل رقم (٩.٢) متجانساً، فهو يتغير من ٢٥٠ إلى ٤٠٠ نانومتر، ومن ٢٠٠ إلى ٥٠٠ نانومتر في الشكل رقم (٩.٢) (b). ويتغير الفصل بين الألياف النانو المتوازية من ١ إلى ٢ مايكرومتر في كلتا صورتين.



(a)

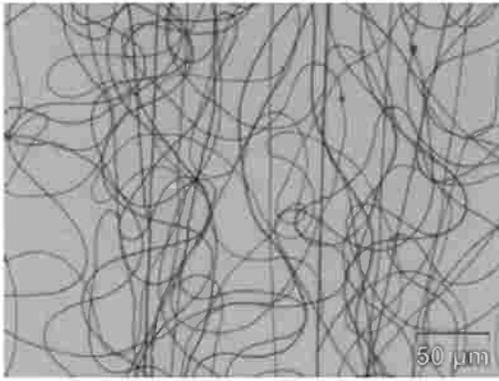


(b)

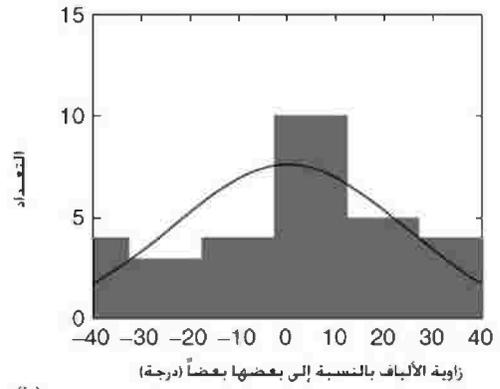
الشكل رقم (٩.٢). صور المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لألياف بولي (أكسيد الإيثيلين) النانوية المتراصة (aligned PEO nanofibers) التي تم جمعها على شريط من الكربون (carbon tape) ملتصق بحافة عجلة المجمع. في (a)، يتغير قطر الألياف من ٢٥٠ إلى ٤٠٠ نانومتر. في (b)، يتغير قطر الألياف من ٢٠٠ إلى ٥٠٠ نانومتر. ويتغير الانحدار (pitch) (من المركز إلى مركز) من ١ إلى ٢ مايكرومتر في كلتا صورتين. (من (Theron, A., Zussman, E., and Yarin, A.L., *Nanotechnology*, 12, 384, 2001).

يبقى جزء من ليف نانوي طويل مترسب على اللوحة مشحوناً لفترة وجيزة. لذلك ؛ فعندما تسقط حلقة جديدة من الليف النانوي (nanofiber loop) على اللوحة ، فإنها تنفر من خلال الأجزاء الساقطة سابقاً التي لا تزال مشحونة. تسمح هذه الآلية بتشكيل مصفوفات ثنائية الأبعاد (2D arrays) على اللوحة مشابهة لتلك التي تظهر في الشكل رقم (٩.٢). إن سرعة الدوران الخطية (linear rotation speed) للعجلة تلعب دوراً حاسماً في تمدد (stretching) وتراصف أو محاذاة (aligning) أجزاء ألياف النانو على طول اللوحة بعد هبوطها (انظر الشكل رقم ٩.٣). ويمكن عند سرعات دوران خطية للعجلة من ٥ إلى ١٠ مترات / ثانية تحقيق محاذاة كافية لألياف النانو (الشكل رقم ٩.٣ c و e). تُظهر توزيعات الزوايا (angle distributions) (المتعلقة باتجاه دوران العجلة) والمبينة في الشكل رقم (٩.٣ b و d و f) بأنه عند سرعات دوران منخفضة لم يتحقق التوجيه المرغوب للألياف (الشكل رقم ٩.٣ b) ؛ وعند سرعات دوران أعلى ، تُظهر التوزيعات الزاوية (angular distributions) التوجيه المرغوب للألياف وتصبح أضيق مع زيادة سرعة الدوران الخطية (الشكل رقم ٩.٣ d و f). تعمل نفس الآلية بشكلٍ رئيسي عندما يتم غزل ألياف النانو كهربائياً على شياقات (أعمدة دوران اسطوانية) دوارة (rotating mandrels) [46-48]. ومع ذلك ، فعندما لا يكون هناك أي تقييدات جانبية مفروضة بواسطة الحافة الحادة للعجلة (العدسة الكهرستاتيكية) ، فإن الانحرافات الجانبية (sideways excursions) للألياف تكون كبيرة جداً ويمكن تحقيق درجة أقل من المحاذاة. يقابل متغير وسيط (intermediate variant) شريطاً معدنياً (metal ribbon) (وهو ما يعادل لوحة ممدودة ضيقة (elongated narrow table)) موضوعاً على أعلى الحافة الحادة للعجلة. وقد كان من الممكن لشرايط ألياف النانو (nanofiber strips) المتراكمة على مثل هذا الشريط أن تتراصف بشكلٍ جيد أيضاً. وهذا هو السبب أن الطبقات المستوية من ألياف النانو الموجهة (oriented nanofiber mats) والمستخدمة في الفقرات التالية من هذا العمل كانت مغزولة كهربائياً على شريطٍ موضوع في أعلى العجلة الدوارة الحادة.

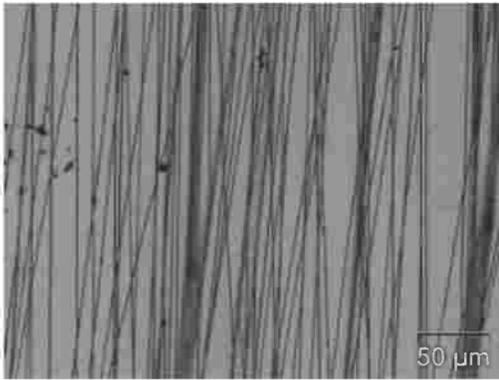
وقد تم التأكيد على أن تمدد أجزاء ألياف النانو بعد الهبوط الأول على المجمع الدوّار يعزز وبشكلٍ إضافي من متانة شدها (tensile strength) ، والذي هو مرغوب فيه من أجل عدد من التطبيقات الطبية الحيوية [46-48].



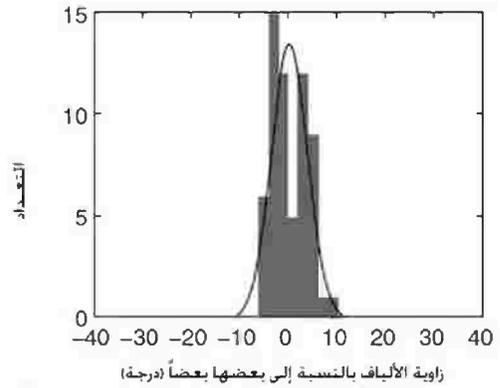
(a)



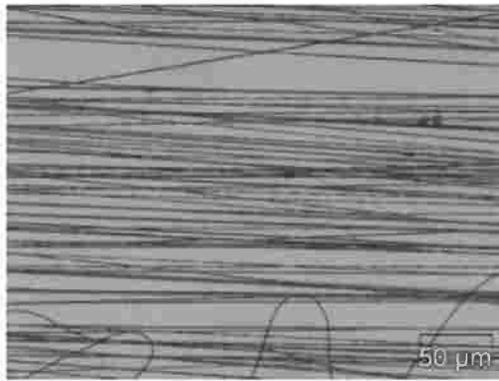
(b)



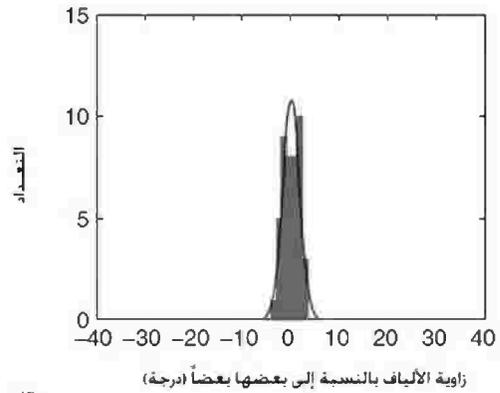
(c)



(d)



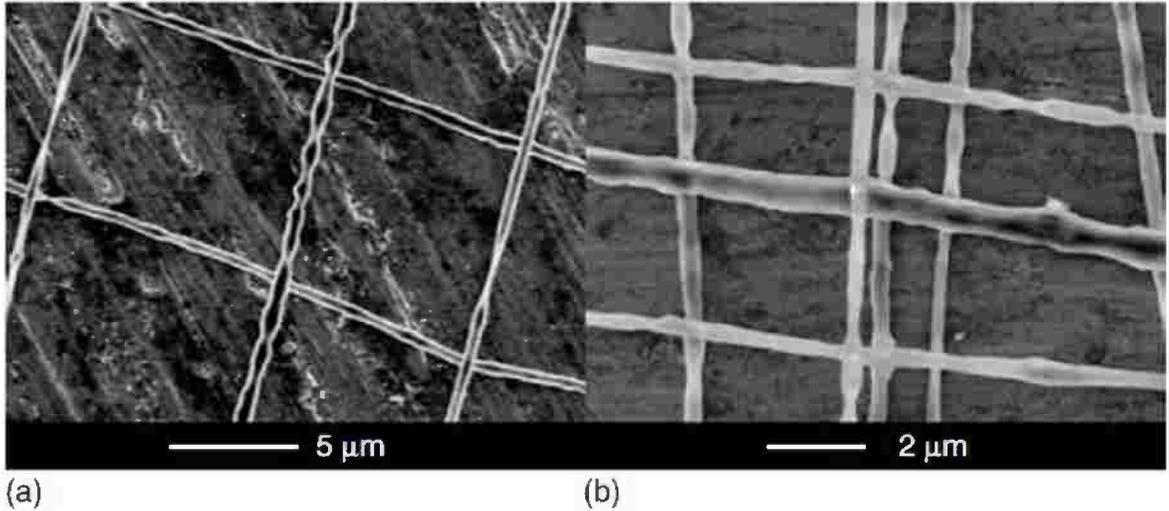
(e)



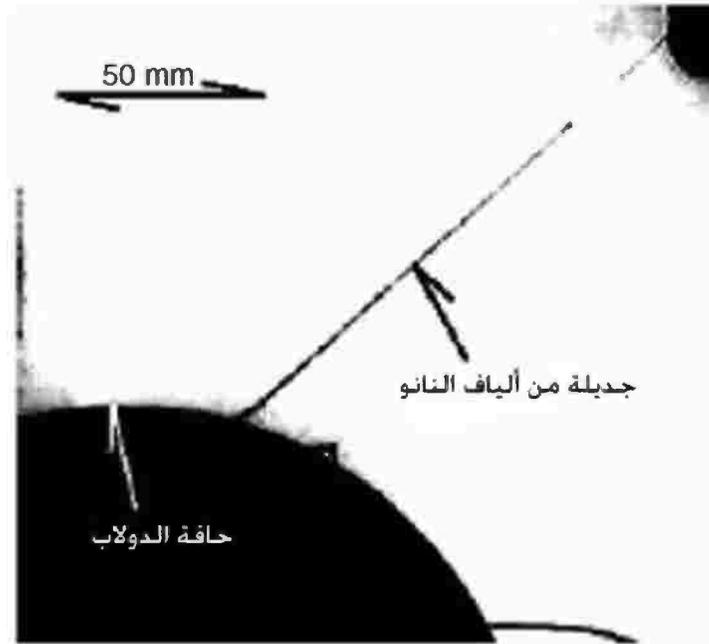
(f)

الشكل رقم (٩,٣). توجيه ألياف النانو عند سرعات دوران خطية مختلفة للعجلة: (a) ٢,٩ مترًا / ثانية؛ (b) التوزيع المقابل للتوجيه الزاوي للألياف والمعبّر عنه من حيث الزاوية بالنسبة لاتجاه دوران العجلة (الانحراف المعياري SD = ٢٣,٤٤ درجة)؛ (c) ٥,٣ مترًا / ثانية؛ (d) التوزيع المقابل للتوجيه الزاوي للألياف (SD = ٣,٧ درجة)؛ (e) ٧,٧ مترًا / ثانية؛ (f) التوزيع المقابل للتوجيه الزاوي للألياف (SD = ١,٨ درجة). ويُعزى القسم المتموج من الليف في (e) إلى الجزء الأخير من الخيط المجمع عندما تم بالفعل إيقاف الحقل الكهربائي. وكانت ألياف النانو مغزولة كهربائيًا من ٤٪ وزنًا من بولي (أكسيد الإيثيلين) (PEO) (الوزن الجزيئي = ١٠٠٠ كيلو دالتون) في محلول الإيثانول / الماء.

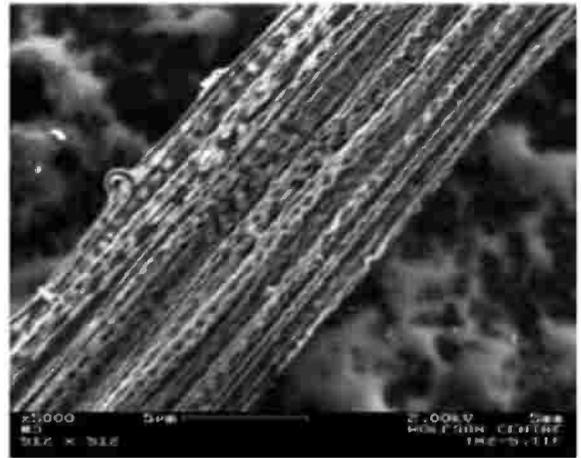
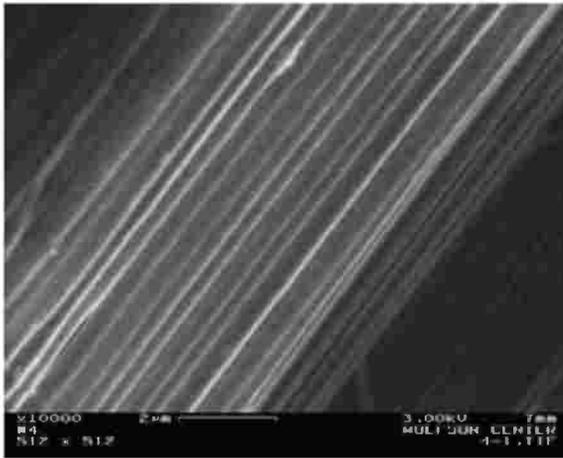
وقد تم وصف مصفوفات نموذجية ثلاثية الأبعاد من ألياف النانو (ذات خطوط مستعرضة crossbars) في الشكل رقم (٩.٤). وتُظهر ألياف البولي (أكسيد الإيثيلين) (PEO) النانوية التي تم جمعها درجة عالية من المحاذاة. إن قطر ألياف النانو في هذه الحالة هو أيضاً غير متجانس (nonuniform) ويتغير في المجال من ١٠٠ إلى ٨٠٠ نانومتر. وعندما تمت عملية الغزل الكهربائي لألياف النانو على الحافة الحادة للعجلة بدون اللوحة، تم الحصول على حزم (bundles) (حبال ropes) من ألياف النانو. وتظهر في الشكل رقم (٩.٥) صورة نموذجية لحبل من ألياف النانو تم سحبه من حافة العجلة. وقد كانت مدة عملية الجمع في هذه الحالة ٦٠ ثانية. وتم فصل الحبل يدوياً من حافة العجلة [41]. ويظهر في الشكل رقم (٩.٦) تفاصيل صورتين من صور المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لحبال من ألياف البوليمر المنتجة بهذه الطريقة. تكون ألياف النانو متلامسة، وتبقى متوازية تقريباً لمسافات طويلة.



الشكل رقم (٩.٤). صور نموذجية بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لمصفوفات متشابكة (crossed arrays) من ألياف النانو المبنية من بولي (أكسيد الإيثيلين) (PEO)، والتي تم جمعها على لوحة من الألمنيوم. وقد تم الحصول على بني الخطوط المستعرضة (crossbar structures) في عملية التجميع المتتالي مع اتجاهات متعامدة مع موضع اللوحة. (a) تجميع ثنائي الطبقات (two - layer assembly) و (b) تجميع رباعي الطبقات (four - layer assembly). (من Zussman, E., Theron, A., and Yarín, A.L., *Appl. Phys. Lett.*, 82, 973, 2003).



الشكل رقم (٩,٥). حزمة (حبل) من ألياف النانو المتراصة (aligned nanofibers) مسحوة يدوياً من المجموع. وقد تم جمع كل ألياف النانو تقريباً على الحافة الحادة لمعجلة المجموع (edge of the sharpened wheel collector). (من Theron, A., Zussman, E., and Yarin, A.L., *Nanotechnology*, 12, 384, 2001).



الشكل رقم (٩,٦). صور نموذجية بالجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لحزمتين (حبلين) من ألياف بولي (أكسيد الإيثيلين) (PEO) النانوية المتراصة. الكثافة هي حوالي ١٠٠ ليف نانو في المايكرومتر المربع. (من Theron, A., Zussman, E., and Yarin, A.L., *Nanotechnology*, 12, 384, 2001).

(٩,٣) المواد والطرق MATERIALS AND METHODS**(٩,٣,١) الغزل الكهربائي لحاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون النانوية Lectrospinning of PCL Nanofibrous Scaffolds**

تم إنتاج ألياف النانو بأقطار من عدة مئات من النانومتر باستخدام طريقة الغزل الكهربائي كما هو موصوف سابقاً [32,33,41,42] (راجع الفقرة ٩,٢). وقد كانت كل حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو البوليمرية المغزولة كهربائياً مصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) مع وزن جزيئي (molecular weight) ٨٠ كيلو دالتوناً (Sigma - Aldrich) والمغزول كهربائياً من محلول ١٠٪ وزن في كلوريد الميثيلين/ثنائي ميثيل الفورم أميد (methylene chloride / dimethylformamide) بنسبة ٢٥/٧٥ (حجم). وقد تم الحصول على نوعين مختلفين من حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية المغزولة كهربائياً وتم تصنيفها على أنها عشوائية أو موجهة. وقد تم إنتاج حاملة الخلايا والأنسجة العشوائية (random scaffold) عن طريق الغزل الكهربائي لألياف النانو البوليمرية على ركيزة مسطحة من الألمنيوم (flat aluminum substrate)؛ مما أدى إلى إنتاج حاملة خلايا وأنسجة موجهة (oriented scaffold) عن طريق جمع ألياف النانو على شريط معدني ضيق عند حافة عجلة دوارة [41,42] (راجع الفقرة ٩,٢)؛ مما أدى إلى إنتاج حاملة خلايا وأنسجة ذات ألياف نانو مع توجيه محدد بشكل واضح. وقد تمت عملية الغزل الكهربائي لمحلول البوليمر من محقنة ذات حجم ٥ ميلي لترات مرتبطة بإبرة معدة للاستعمال تحت الجلد (hypodermic needle) (قطرها الداخلي ٠,١ ميليمترًا) وباستخدام معدل تدفق بقيمة ١ ميلي لتر/ساعة. وقد تم وضع قطب كهربائي من النحاس (copper electrode) في محلول البوليمر وتم الغزل الكهربائي للأخير باتجاه الحافة الحادة للمجمع المؤرض كهربائياً (electrically grounded collector) (الشكل رقم ٩,١). وقد كانت شدة الحقل الكهربائي (strength of the electric field) ١,١ كيلو فولتًا / سنتيمتر. وكانت السرعة الخطية لحافة عجلة المجمع ١٠ مترات / ثانية. لقد أجريت جميع التجارب في درجة الحرارة المحيطة (ambient temperature) (تقريباً ٢٥ درجة مئوية) في الهواء مع رطوبة نسبية (humidity) ٤٠٪. وقد تم استخدام التصوير بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) للحصول على صور لكل نوع من حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية. وقد تم إجراء مشاهدات التصوير بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لحاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) باستخدام المجهر الإلكتروني متغير الضغط (variable pressure electron microscope) من نوع (Hitachi S-3000N). إن لهذا الجهاز مصدر إلكترونات من التنغستن (tungsten electron source) وهو قادر على تصوير عينات في ضغوط متغيرة تتراوح من ١ إلى ٢٧٠ باسكال (Pa). تحت الضغط المتغير، يمكن تصوير العينات غير الموصلة (nonconducting specimens) من دون طلاء طبقة فيلم موصلة (conductive film). ويمكن أن يتغير الجهد المسارع (الجهد المسرع) (accelerating voltage) ضمن المجال من ٠,٣ إلى ٣٠ كيلو فولتًا مع دقة تباين أو ميز بقيمة ٥ نانومتترات عند جهد كهربائي بقيمة ٢٥ كيلو فولتًا. وقد تم تقدير أقطار ألياف النانو باستخدام معالج صور (image processor) وهو (MetaMorph, Molecular Device Corp., Downingtown, Pennsylvania).

(٩,٣,٢) زرع وبذر الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون

النانوية Human Mesenchymal Stem Cell Culture and Seeding on PCL Nanofibrous Scaffolds

تم الحصول على الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) من مصدر الخلايا الجذعية المتوسطة البالغة (Adult Mesenchymal Stem Cell Resource) (جامعة تولين Tulane في نيو أورليانز، لويزيانا). وقد تمت زراعة الخلايا في أوساط نمو كاملة (complete growth media) تتكون من وسط eagle المعدّل بالـ Dulbecco's modified eagle's (medium - DMEM) والمزوّد بـ ١٥ ٪ من المصل البقري الجنيني (fetal bovine serum - FBS) و ٢ ميلي مول من إل - جلوتامين (L-glutamine) و ١ ٪ من المضادات الحيوية (antibiotics) والمضادات الفطرية (antimycotics) (التركيز النهائي: البنسلين (penicillin) ١٠٠ وحدة / ميلي لتر، والستربتوميسين (streptomycin) ١٠٠ مايكرو غرام / ميلي لتر، والأمفوتريسين بي (amphotericin B) ٠,٢٥ مايكرو غراماً / ميلي لتر). في هذه التجارب تم استخدام الخلايا في مرحلة الإمرار أو الانتقال ٦ (passage 6). ومن المادة الكتلية (bulk material) للطبقات المستوية والشرائط ذات ألياف النانو المغزولة كهربائياً، تم تقطيع أقراص صغيرة من حاملات الخلايا والأنسجة (scaffold disks) مع مساحة من حوالي ٠,٣ سنتيمتراً مربعاً من أجل تجارب زرع وبذر الخلايا. وقد تم نقع حاملات الخلايا والأنسجة في البداية في الإيثانول (ethanol) ٧٠ ٪ لمدة ساعة واحدة وتم تجفيفها وتعقيمها تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية (UV light) لمدة ٦ ساعات على كل جانب، وقد تم تبليها مسبقاً عن طريق النقع في أوساط زراعة خلايا كاملة (complete cell culture media) مع المصل لمدة ٤٨ ساعة وذلك لتعزيز امتصاص البروتين (protein adsorption). ولبذر الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو من البولي كابرولاكتون (PCL)، تم توزيع الخلايا بالمص بشكل مباشر على حاملات الخلايا والأنسجة عند كثافة $10 \times 7,5$ خلية / سنتيمتر مربع. وقد تمت إضافة أوساط الزراعة، ومن أجل الزراعة طويلة الأمد، تم استبدال هذه الأوساط كل ٢ إلى ٣ أيام.

(٩,٣,٣) الفحص المجهري الماسح بواسطة الليزر وتحليل التوجيه Laser Scanning Confocal Microscopy and

Orientation Analysis

تم تصوير العينات في اليوم الأول (٢٤ ساعة بعد البذر الأولي للخلايا الجذعية على حاملات الخلايا والأنسجة)، ومن ثم في الأيام ٤ و ٨ و ١٢ و ١٥ و ١٨. ومن أجل تحليل اتجاه الخلايا (cell orientation analysis)، تم تلوين مجموعة واحدة من العينات باستخدام الـ (CellTracker CMFDA) (١٥ مايكرو مولاً من ثنائي أسيتات ٥-كلوروميثيل فلوريسئين (15 μ m 5-chloromethylfluorescein diacetate) (وهو مُلوّن متألق باللون الأخضر)، من مسابير الإنفيتروجين الجزئية Molecular Probes Invitrogen، كارلسباد Carlsbad، كاليفورنيا) من أجل التصوير المتألق (fluorescence imaging) وتم تثبيتها في ٣,٧ ٪ من محلول ملحي مَدْرُوء بفوسفات الفورمالدهايد (formaldehyde phosphate buffered saline - PBS) لضمان أن توجيهات وأشكال الخلايا كانت في حالات غير متغيرة أثناء التصوير. سمحت النسب القوية للإشارة إلى الضجيج (signal - to - noise ratios) بتحليل كمي موثوق لصور توجيه الخلايا. وقد تم استخدام مجهر مُبائز ماسح بواسطة الليزر/

الفوتونات المتعددة (multiphoton / laser scanning confocal microscope) (Radiance 2000, Bio-Rad, Hercules, California) ومجهر عاكس (inverted microscope) من نوع (Nikon TE2000-S) مع عدسة مجهر بتكبير ٢٠ مرة من (Plan Apo) ($NA = 0.75$) لإنتاج الصور. ففي حين تم اكتشاف الخلايا الملوّنة بواسطة (CMFDA) بشكلٍ متألق، تم تصوير ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية نفسها في النمط المنعكس [49]. وبالتناوب بين النمطين المتألق والمنعكس، أمكن تصوير الخلايا وألياف النانو من موقع المنطقة نفسه على العينة. وقد تم أخذ صور من خمس مشاهدات مختلفة على الأقل تم اختيارها عشوائياً على كل عينة في نقاط زمنية مختلفة لزراعة الخلايا من اليوم ١ إلى اليوم ١٨. وباستخدام تحليل الصور، تم تحديد توجيه الخلايا والألياف كمياً بالنسبة إلى مرجع (على سبيل المثال، محور أفقي horizontal axis) لكل مشهد مُصوّر. وقد تم تسهيل قياس توجيه الخلايا عن طريق الشكل الممدود (elongated shape) للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs)، والذي أظهر محوراً رئيسياً محددًا بشكلٍ واضح.

(٩,٣,٤) قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية على البقاء على قيد الحياة والإظهار التألقي hMSC Viability and Fluorescence Visualization

تم تلوين العينات باستخدام مُقايِسة (فحص) قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة (cell viability assay) (من المسابير الجزيئية Molecular Probes). وباختصار، ينتشر الـ (calcein AM) (٢ مايكرو مول) عبر غشاء الخلايا الحية، ويتفاعل مع إنزيم الإستراز داخل الخلية (intracellular esterase) ليعت تألُقاً أخضر (green fluorescence)، في حين يمكن للإيثيديوم المشوي المتماثل ١- (ethidium homodimer-1) (٤ مايكرو مولات) أن يدخل فقط الخلايا الميتة ذات غشاء الخلية التالف ليعت تألُقاً أحمر (red fluorescence) عند الارتباط بالأحماض النووية (nucleic acids). ومن أجل كل عينة تم تحديد العدد الكلي من الخلايا والنسبة المئوية للخلايا الحية والميتة من ثلاث مناطق مشاهدة على الأقل تم اختيارها بشكلٍ عشوائي.

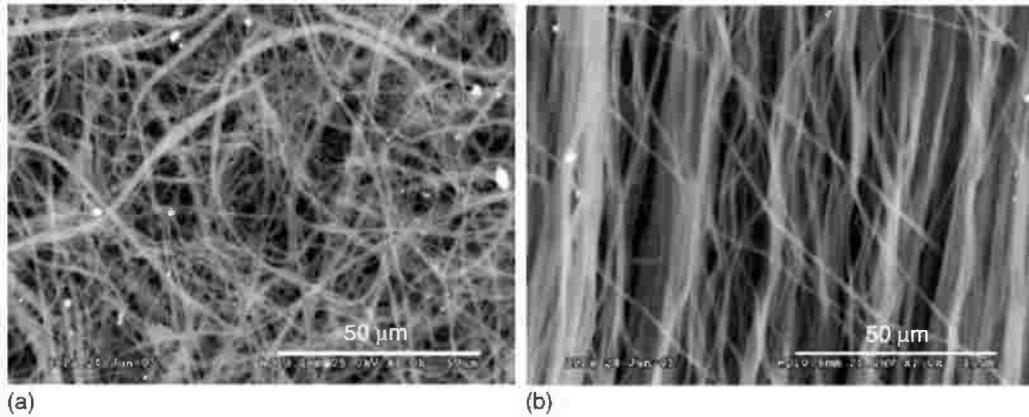
وقد تم تلوين الخيوط المايكروية (microfilaments) باستخدام رودامين - فالويدين (rhodamine - phalloidin) (١٧٠ نانو مول، من المسابير الجزيئية Molecular Probes). وقد تم اختيار عينات من الأيام ٤ و ١٨ من أجل تلوين الخيوط المايكروية وتم تثبيتها في ٣.٧٪ لمحلول ملحي مَدْرُوء بالفوسفات الفورمالدهايد (formaldehyde PBS). وللسماع بالنفوذ (permeabilize) عبر غشاء الخلية، تم وضع العينات في ٠.٥٪ من الـ (Triton X-100) في محلول ملحي مَدْرُوء بالفوسفات (PBS) لمدة ٥ دقائق عند درجة حرارة ٤ مئوية، وتم غسلها ثلاث مرات باستخدام محلول ملحي مَدْرُوء بالفوسفات (PBS). ولتقييد مواقع الربط غير المحددة (nonspecific binding sites)، تم وضع العينات في الحاضنة بشكلٍ مسبق مع ١٪ من (BSA) لمدة ٣٠ دقيقة، وتم غسلها ثلاث مرات باستخدام محلول ملحي مَدْرُوء بالفوسفات (PBS). وتم تلوين خيوط الأكتين (actin filaments) حتى صباح اليوم التالي باستخدام رودامين - فالويدين في ١٪ من الـ (BSA). وقد تم العثور على بنى فريدة شبه ملتصقة من الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية - ألياف النانو (hMSC - nanofiber adhesion - like structures) وتم فحصها أيضاً باستخدام عدسات مجهر عالية التكبير.

STATISTICS إحصائيات (٩,٣,٥)

لكل مشهد مُصوَّر من عينات حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة المذورة بالخلايا (cell - seeded oriented nanofibrous scaffolds) والمقابلة للأيام ١ و ٤ و ٨ و ١٢ و ١٥ و ١٨، تم حساب متوسط زاوية اتجاه الخلايا (cell orientation angle) ومتوسط زاوية اتجاه الألياف (fiber orientation angle) بالنسبة إلى اتجاه مرجعي. وقد حدد الفرق بين هاتين الكميتين متوسط الزاوية النسبية للخلايا - ألياف النانو. وبالإضافة إلى ذلك، فقد تم الحصول على توزيعات زوايا الخلايا (cell angle distributions) النسبية بالنسبة إلى متوسط زوايا توجيه الألياف المقابلة من أجل ثلاثة مشاهد على كل عينة من حاملات الخلايا والأنسجة. وتم تحليل هذه التوزيعات الثلاث بشكل إحصائي باستخدام اختبار تي ستودنت ثنائي الطرف (Student's two-tailed *t* test) وتم تحديد التفاوتات بحيث لا تكون مُعتدًا بها إحصائيًا ($P < 0.05$). وبالتالي، ومن خلال الجمع بين البيانات من المشاهد الثلاث المنفصلة، تم تشكيل توزيع إجمالي لكل يوم. وهكذا تم الحصول على متوسط الزاوية النسبية للخلايا - الألياف جنباً إلى جنب مع الانحراف المعياري (standard deviation) المقابل لكل يوم. وتشير الزوايا النسبية المتوسطة للخلايا - الألياف بقيمة ١٠ درجات أو أقل إلى محاذاة خلايا موازية لألياف النانو الموجهة أساساً. وفيما يتعلق بحاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو العشوائية، فإن جميع القيم ضمن توزيعات زوايا الخلايا - ألياف النانو لديها احتمالات متساوية؛ وبالتالي لا يمكن تحديد أي قيم متوسطة للزوايا. ومع ذلك، فيمكن مقارنة توزيعات زوايا الخلايا - ألياف النانو في حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو العشوائية بشكل نوعي مع تلك الموجودة في حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة.

RESULTS AND DISCUSSION النتائج والمناقشة (٩,٤)**(٩,٤,١) تحديد خصائص حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون المغزولة كهربائياً****Characterization of Electrospun PCL Nanofibrous Scaffolds**

تم إنجاز التصوير باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لمراقبة الشكل البنيوي (structural morphology) لألياف النانو في كل من نوعي حاملات الخلايا والأنسجة (العشوائية أو الموجهة). وتُظهر حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية (الشكل رقم ٩.٧ a) بأنها تتكون من ألياف نانو ليس لها توجيه محدد. وفي المقابل، أظهرت حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة (الشكل رقم ٩.٧ b) ألياف نانو ذات توجيه محدد (شمال - جنوب في هذه الحالة). وقد كانت غالبية ألياف النانو في حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة متراففة بالنسبة إلى بعضها بعضاً. وقد تم تقدير متوسط قطر ليف النانو على أنه 820 ± 340 نانومتر. وبناءً على صور المجهر الإلكتروني الماسح (SEM)، فإن هذه الحاملات تتميز بمسامية (porosity) مناسبة لالتصاق وتكاثر وقدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة.

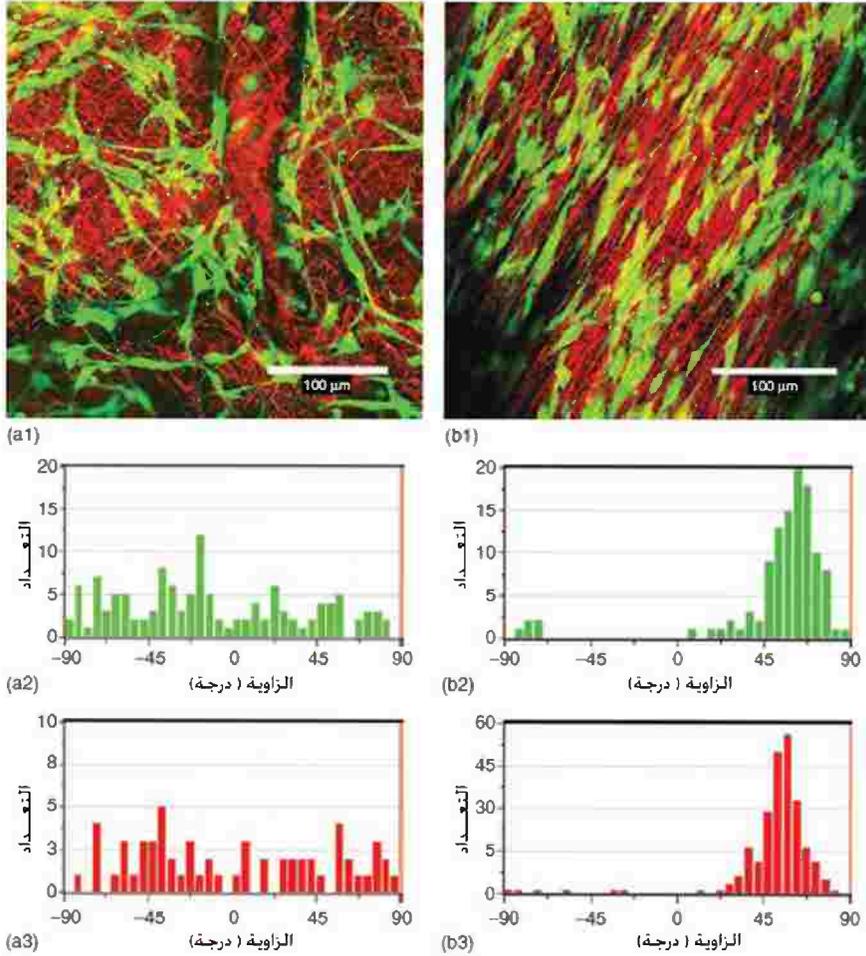


الشكل رقم (٩،٧). صور المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية في حاملات الخلايا والأنسجة من البولي كابرولاكتون (PCL) العشوائية، و (b) الموجهة. البقع البيضاء الظاهرة في كلتا الصورتين هي فئات (أجزاء صغيرة) من البولي كابرولاكتون (PCL fragments) تتولد من إنشاء قشرة البوليمر عند مخرج فوهة جهاز الغزل الكهربائي.

Orientation of Cells (٩،٤،٢) توجيه الخلايا وألياف النانو من أجل حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية والموجهة and Nanofibers for Random and Oriented Scaffolds

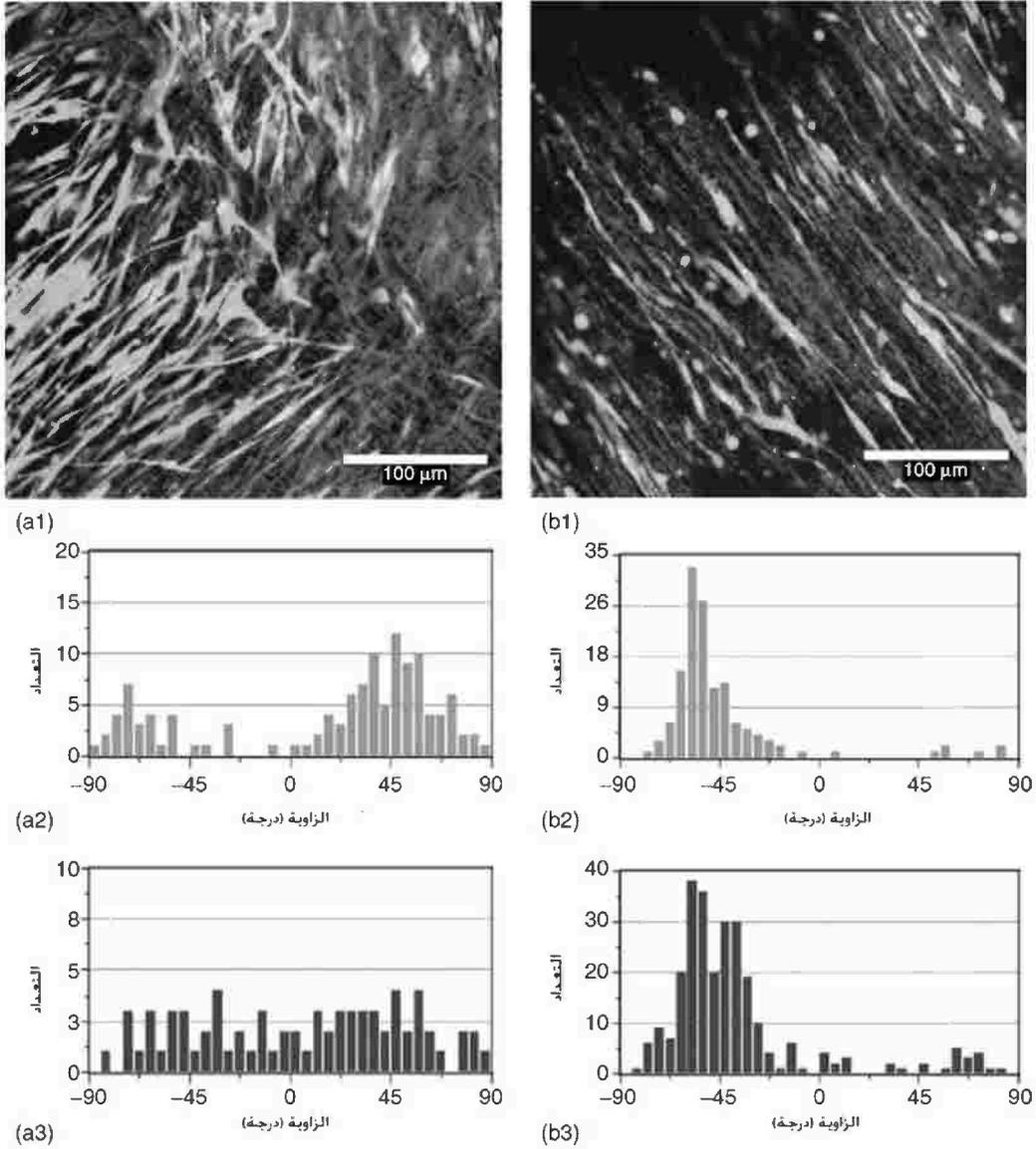
تم تصوير الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) وألياف النانو في وقت واحد عن طريق الفحص المجهر الإلكتروني الماسح بواسطة الليزر (laser scanning confocal microscopy - LSCM) لتحديد تأثير توجيه ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية المغزولة كهربائياً على محاذاة الخلايا. يُظهر الشكل رقم (٩،٨) صوراً متراكبة بألوانٍ مستعارة للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) (باللون الأخضر)، وألياف النانو (باللون الأحمر) على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية (a1) العشوائية و (b2) الموجهة بعد يوم واحد من زراعة الخلايا. فعندما تمت مراقبة الصور أصبح من الملاحظ وبشكل واضح أنه، وبعد فقط ٢٤ ساعة من الحضنة، كانت هناك اختلافات كبيرة في توجيه الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية بالمقارنة مع تلك المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة. وقد تم تحديد زوايا اتجاه الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) بالنسبة إلى المحور الأفقي من أجل عينات حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية والموجهة. وتُظهر الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي (histograms) توزيعات زوايا توجيه الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) بعد يوم واحد من زراعة الخلايا في الرسوم البيانية ذات الشريط الأخضر في الشكل رقم (٩،٨). وكما هو مؤكد من خلال التوزيع الضيق لزوايا الخلايا المبين في الرسم البياني للتوزيع الإحصائي في الشكل رقم (٩،٨ b2) (الانحراف المعياري ١٦ درجة)، فقد تم تحفيز الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) لتتراصف على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة. بالإضافة إلى ذلك، فقد تطابقت محاذاة الخلايا على حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة إلى حد بعيد مع التوجيه الأساسي لألياف النانو في حاملات الخلايا والأنسجة (الشكل رقم ٩،٨ b3)، حيث بلغ الانحراف المعياري لتوزيع زوايا ألياف النانو ١٥ درجة. ومن ناحية أخرى، فقد أظهرت الخلايا المبذورة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو العشوائية

لمدة ٢٤ ساعة عدم وجود اتجاه محدد للخلايا (الشكل رقم ٩.٨ a1)، والتي تم تأكيدها من خلال التوزيع الزاوي العريض في الرسم البياني للتوزيع الإحصائي من الشكل رقم (٩.٨ a2). وبشكلٍ مماثل، فقد أظهرت ألياف النانو في حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية أيضاً توزيعاً زاوياً عريضاً (الشكل رقم ٩.٨ a3).



الشكل رقم (٩,٨). صور متراكبة وبألوانٍ مستعارة للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) (باللون الأخضر)، وألياف النانو (باللون الأحمر) في حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية (a1) العشوائية و (b1) الموجهة بعد ٢٤ ساعة من زراعة الخلايا. تُظهر الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي توزيعات زوايا اتجاه الخلايا بالنسبة إلى المحور الأفقي من أجل الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) على حاملات الخلايا والأنسجة (a2) العشوائية و (b2) الموجهة. وتُظهر الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي توزيعات زوايا اتجاه ألياف النانو بالنسبة إلى المحور الأفقي من أجل حاملات الخلايا والأنسجة (a3) العشوائية و (b3) الموجهة. وقد تم بناء الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي في (a2) و (a3) اعتماداً على القياسات لـ ١٢٧ خلية و ٢٣٤ ليف نانوي، على التوالي، بينما تم استخدام ١٢٤ خلية و ٢٤٩ ليف نانوي لبناء الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي في (b2) و (b3)، على التوالي.

وكانت اتجاهات الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) وألياف النانو في كل نوع من حاملات الخلايا والأنسجة بعد فترة زراعة أطول ولمدة ١٨ يوماً مشابهة وبشكل ملحوظ لتلك التي وجدت بعد زراعة الخلايا لمدة يوم واحد. ويُظهر الشكل رقم (٩.٩) نتائج اليوم ١٨. لقد بقيت الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة (الشكل رقم ٩.٩ b1) لمدة ١٨ يوماً محافظةً على درجة ممتازة من المحاذاة التامة للخلايا. وقد تم تأكيد ذلك مرة أخرى من خلال الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي لمحاذاة الخلايا المكاني على حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة (الشكل رقم ٩.٩ b2) واتجاه ألياف النانو (الشكل رقم ٩.٩ b3)؛ حيث يُظهر كلاهما توزيعات ضيقة للزوايا (الانحرافات المعيارية من ٢٠ درجة و ٣٢ درجة، على التوالي) وتطابقاً ملحوظاً مع بعضها بعضاً. وقد أظهرت الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة وبشكلٍ نوعي شكلاً أرقاً وأكثر امتداداً من الخلايا المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية؛ مما يشير إلى أن شكل الخلية قد يكون متأثر من خلال البنية المنظمة لألياف النانو. وبشكلٍ مشابه للنتائج التي تم الحصول عليها بعد يوم واحد من الحضارة، لم تُظهر الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية بعد ١٨ يوماً (الشكل رقم ٩.٩ a1) أي توجيه للخلايا ذات أهمية، وقد حافظت على توزيعٍ أعرض بشكلٍ بارزٍ لزاويا توجيه الخلايا يمتد على أكثر من ١٨٠ درجة (الشكل رقم ٩.٩ a2)، والذي يرتبط مع التوزيع العشوائي لزاويا اتجاه ألياف النانو (الشكل رقم ٩.٩ a3). ومع ذلك، فلا بد من الإشارة إلى أنه وبعد ١٨ يوماً من زراعة الخلايا قد بدت الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) بأنها تُظهر بضع مناطق من المحاذاة الذاتية "الموضعية" (self-alignment "localized") في حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية. وكما هو مشاهد في الجزء السفلي الأيسر من الشكل رقم (٩.٩ a1)، تبدو بعض الخلايا بأنها تُظهر توجيهاً تفضيلاً أو محددًا (preferred orientation)، على النحو الذي تم تأكيده من خلال الجزء جرسى الشكل (bell-shaped portion) لتوزيع زوايا الخلايا المقابل في الشكل رقم (٩.٩ a2). وتُعزى هذه النتيجة إلى زراعة خلايا تكاثرية ومتكدسة (مجمعة) (proliferative and confluent cell culture) أكثر من محاذاة الخلايا الموجهة بواسطة ألياف النانو الضمنية أو الكامنة (underlying nanofibers). إن هذا التجميع الذاتي الموضعي (localized self-assembly) للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs)، والذي يظهر على الرغم من عشوائية الألياف الضمنية، يفترق إلى ميزات التنظيم الشامل (global organization) التي يتم مشاهدتها على حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة (الشكل رقم ٩.٩ a1). غير أن نقص التحكم بتوجيه الخلايا - وإن كان على المستوى الموضعي (localized scale) - يجعل لهذا التأثير المحلي القليل من الأهمية على الهدف الكلي لهذا العمل، وبالتحديد على محاذاة الخلايا بطريقة شاملة وقابلة للتحكم بها.

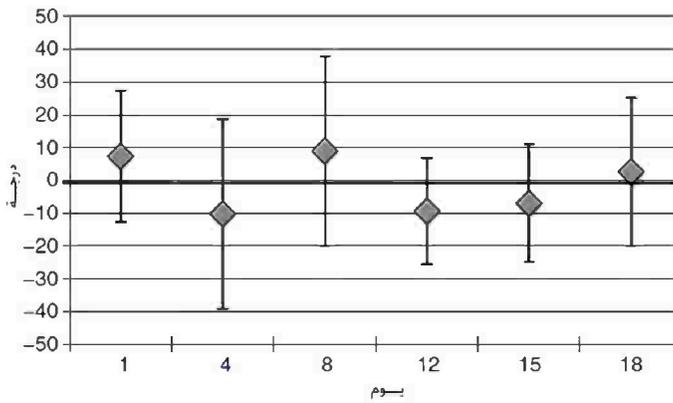


الشكل رقم (٩, ٩). صور متراكبة وبألوان مستعارة للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) (ساطعة) وألياف النانو (داكنة) في حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية (a1) العشوائية و (b1) الموجهة بعد ١٨ ساعة من زراعة الخلايا. تُظهر الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي توزيعات زوايا اتجاه الخلايا بالنسبة إلى المحور الأفقي من أجل الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) على حاملات الخلايا والأنسجة (a2) العشوائية و (b2) الموجهة. وتُظهر الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي توزيعات زوايا اتجاه ألياف النانو بالنسبة إلى المحور الأفقي من أجل حاملات الخلايا والأنسجة (a3) العشوائية و (b3) الموجهة. وقد تم بناء الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي في (a2) و (a3) اعتماداً على القياسات لـ ١٣٢ خلية و ١٩٤ ليف نانوي، على التوالي، بينما تم استخدام ١٣٨ خلية و ٢٥٨ ليف نانوي لبناء الرسوم البيانية للتوزيع الإحصائي في (b2) و (b3)، على التوالي.

(٩,٤,٣) محاذاة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية المتسقة طويلة الأمد على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو

الموجهة Consistent Long-Term hMSC Alignment on Oriented Nanofibrous Scaffolds

تم إجراء التحليل الكمي لفعالية حاملة الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية الموجهة في تعزيز محاذاة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المبذورة في نقاط زمنية مختلفة. وقد تم تحديد التوزيعات الزاوية النسبية للخلايا من أجل حاملات الخلايا والأنسجة الموجهة عن طريق طرح متوسط زاوية الألياف النانوية من توزيعات زوايا الخلايا، وتحديد متوسط الزاوية النسبية للخلايا - الألياف في كل نقطة زمنية. وقد تم استخدام النتائج للعينات المزروعة من اليوم ١ حتى اليوم ١٨ كمقياس لتقييم الفعالية ولتقييم أي تغييرات تعتمد على الزمن في محاذاة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC). وكما هو مبين في الشكل (٩,١٠)، فقد كانت الزوايا النسبية للخلايا، ومن أجل جميع عينات حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة من اليوم ١ إلى اليوم ١٨، ضمن ± 10 درجة. وبالتالي، فقد تم تأكيد المحاذاة الدقيقة والمتسقة للخلايا على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة من أجل الزراعة الأولية والزراعة طويلة الأمد. فمن اليوم ١ إلى اليوم ١٨، بقيت الانحرافات المعيارية للتوزيعات الزاوية النسبية للخلايا - الألياف من أجل حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة في المجال من ١٥ درجة إلى ٣٠ درجة، مع كل القيم اليومية المتوسطة ضمن انحراف معياري واحد للزاوية المرجعية المشتركة صفر درجة (المحاذاة الكاملة). وهذا يشير إلى أنه قد تم الحفاظ على الالتصاق الأولي للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) بحاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو لكامل فترة الحضانة الممتدة ١٨ يوماً.



الشكل رقم (٩,١٠). المحاذاة الزمنية للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة. لقد أظهر تحليل اختبار - تي (T-test) (ثنائي الطرف two-tailed، مفرد unpaired) أن ثلاثة مشاهد على الأقل لكل حاملة خلايا وأنسجة ذات ألياف نانو في كل يوم لم تكن مُعتدلة إحصائياً ($P < 0.05$)، وتم تحديد الزاوية النسبية المتوسطة لاتجاه الخلايا (average relative cell orientation angle) والانحراف المعياري (standard deviation) المقابل من أجل عينات حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة في الأيام ١ و ٤ و ٨ و ١٢ و ١٥ و ١٨. وقد كانت الزوايا النسبية المتوسطة للخلايا - الألياف على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الموجهة في كل الأيام في نطاق ± 10 درجات؛ مما يشير إلى محاذاة جيدة جداً مع ألياف النانو التي تقوم عليها. وتشير خطوط الخطأ إلى انحرافين معياريين ($\pm \sigma$).

(٩، ٤، ٤) قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية على البقاء على قيد الحياة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف

البولي كابرولاكتون النانوية hMSC Viability On PCL Nanofibrous Scaffolds

تم اختبار قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة العشوائية والموجهة على البقاء على قيد الحياة على المدين القصير والطويل الأجل من خلال استخدام مُقايَسَة (فحص) التآلق الحي / الميت (live / dead fluorescence assay). وتم إحصاء العدد الكلي للخلايا الحية والميتة من أجل كل نوع من حاملات الخلايا والأنسجة فيما لا يقل عن ثلاث مناطق مشاهدة مختلفة بعد ٤ و ١٨ يوماً من زراعة الخلايا. وقد تم احتساب النسبة المئوية للخلايا الحية من إجمالي عدد الخلايا وتظهر النتائج في الجدول رقم (٩.١). بالإضافة إلى ذلك، ومن إجمالي عدد الخلايا الملاحظ، فقد تم احتساب متوسط كثافة الخلايا عن طريق قياس مجال منطقة المشاهدة واستقراء البيانات في وحدات من الخلايا لكل سنتيمتر مربع. وقد كانت معظم الخلايا المبدورة على كلا النوعين من حاملات الخلايا والأنسجة حية (أكبر من ٧٠٪)، ولكن قدرة هذه الخلايا على البقاء على قيد الحياة كانت أقل من تلك التي لوحظت من أجل الخلايا المزروعة في تجربة عينة المراقبة (control experiment) (على سبيل المثال، على أطباق بترّي (petri dishes)). ويمكن أن تُعزى النسب المئوية الأقل الظاهرة لقدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة إلى حقيقة أننا استخدمنا خلايا جذعية متوسطة بشرية (hMSCs) غير متميزة، ولكنها تكاثرية بشكلٍ عالٍ. فعلى سبيل المثال، وعلى الرغم من أن الكثافة الأولية لبذر الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (initial hMSCs seeding density) كانت متواضعة (7.5×10^4 خلية / سنتيمتر مربع)، إلا أن الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) قد تكاثرت بشكلٍ سريع وأصبحت متكدسة أو مجمعة مع بعضها. وكما هو مبين في الجدول رقم (٩.١)، فقد ازدادت كثافات الخلايا على كل من حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو العشوائية والموجهة بشكلٍ ملحوظ من اليوم ٤ إلى اليوم ١٨، في حين أن النسبة المئوية للخلايا الحية قد بقيت ثابتة نسبياً. ولأن البولي كابرولاكتون (PCL) هو مادة متوافقة حيوياً معروفة جيداً، فمن غير المرجح أن تكون مسؤولة عن القدرة الأقل الظاهرة للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) للبقاء على قيد الحياة. وبدلاً من ذلك، فقد تم اقتراح أن كثافة بذر الخلايا المثالية يمكن أن تكون قد حسنت من قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة. على سبيل المثال، لقد ظهر بأن الكثافة الأولية لبذر الخلايا على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية عامل مهم من أجل قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) على البقاء على قيد الحياة ومن أجل تكاثرها وتمييزها وذلك على المدى القصير والطويل الأجل [20,21,38,50]. ومع ذلك، فإنه من المتوقع عندما يتم تحريض الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) لتمييز إلى نوعٍ محدد من الخلايا (specific cell lineage)، فسيؤدي الانخفاض في تكاثر الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC proliferation) إلى قدرة أفضل لبقاء الخلايا على قيد الحياة. بالإضافة إلى ذلك، وعلى الرغم من أن حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المغزولة كهربائياً (electrospun nanofibrous scaffolds) والمستخدمة في هذا العمل كان قد تم تجفيفها بواسطة الهواء قبل التعقيم (prior to sterilization) ولاحقاً قبل النقع (presoaking) في أوساط زراعة الخلايا، فلم يتم وضع أيًا من حاملات الخلايا والأنسجة في غرفة تخلية (شفط) (vacuum chamber) قبل التعقيم. وينبغي لإنجاز هذه الخطوة في الدراسات المستقبلية إزالة أي مذيب عضوي متبقٍ (residual organic solvent) من عملية الغزل الكهربائي، والذي يمكن أن يؤثر بشكلٍ سلبي على قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة.

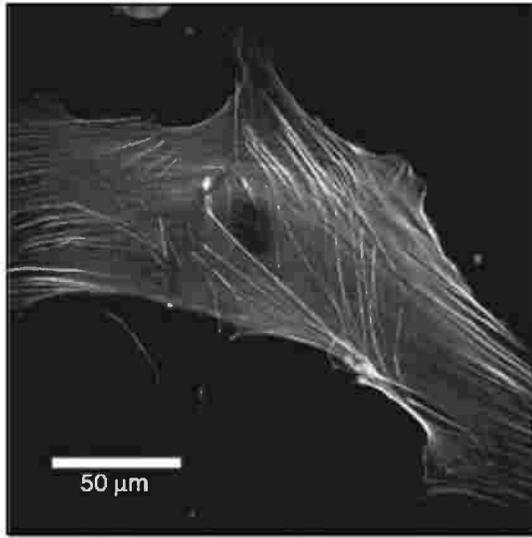
الجدول رقم (٩،١). قدرة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) على البقاء على قيد الحياة مُعبر عنها بالنسبة التوتية للخلايا الحية والعدد الكلي للخلايا المفحوصة

اليوم	العينة	نسبة الخلايا الحية %	خلية تم مشاهدتها / سنتيمتر مربع
٤	عشوائية	٧٦	$10 \times 7,0$
	موجّهة	٨٠	$10 \times 11,6$
١٨	عشوائية	٧٣	$10 \times 32,9$
	موجّهة	٧٦	$10 \times 20,2$

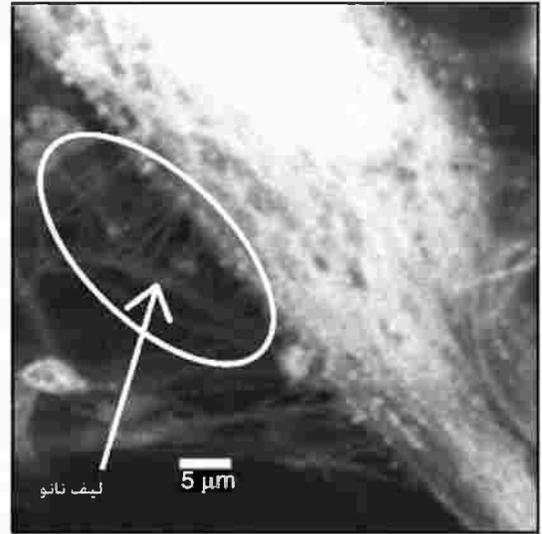
(٩،٤،٥) إعادة التنظيم الهيكلي الخلوي والتصاقات الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية – ألياف النانو Cytoskeletal Reorganization and hMSC-Nanofiber Adhesions

من المتوقع أن استطالة الخلايا (cell elongation) الناجمة عن ألياف البولي كابريولاكتون النانوية المتراصة (aligned PCL nanofibers) تعيد تنظيم البنى الهيكلية الخلوية (cytoskeletal structures) التي تُنظم شكل والتصاق وتنقل (locomotion) الخلايا. وقد تم تلويح الخيوط المايكروية للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة لمدة ٤ أيام على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابريولاكتون (PCL) النانوية العشوائية والموجهة وعلى الزجاج بمثلق ساطع (brightly fluorescent) باستخدام رودامين - فالويدين، وتم تصويرها باستخدام الفحص المجهر الماسح بواسطة الليزر (LSCM). وقد أظهرت الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على ركيزة زجاجية الشكل النموذجي والمتوقع لانتشار الخلايا (الشكل رقم ٩.١١ a). وقد كانت ألياف إجهاد الأكتين (actin stress fibers) الكبيرة مرئية ومن الممكن أن تكون مسؤولة عن الالتصاق الأقوى للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) على هذه الركيزة المسطحة (ثنائية الأبعاد) [51]. وقد بدأ أن ألياف الإجهاد الكثيرة تعمل معاً وتنتهي عند نقطة مشتركة على غشاء الخلية (cell membrane)، مُشكّلةً على الأرجح موقع اتصال بؤري (focal contact site). وبالمقارنة مع الخيوط المايكروية الموجودة في الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على ركائز مسطحة (flat substrates)، فقد لوحظ اختلاف كبير في التنظيم الهيكلي الخلوي الأكتيني (actin cytoskeletal organization) للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابريولاكتون (PCL) النانوية العشوائية والموجهة. على سبيل المثال، لقد أظهرت الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المبذورة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو العشوائية والمزروعة لمدة ٤ أيام (الشكل رقم ٩.١١ b) شكل ممدود للخلايا (elongated cell morphology) وأكتينات مُركزة على نحو كثيف (densely concentrated actins). ومن المثير للاهتمام، أن البنى الأكتينية الليفية (fibrous actin structures) الرقيقة بين الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) وألياف النانو المحيطة كانت واضحة، وقد تم ملاحظتها بشكل خاص في المنطقة الموضوعية ضمن دائرة في الشكل مع سهم يشير إلى ليف بولي كابريولاكتون (PCL) نانوي مجاور. وعندما تم بذر الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) على حاملة الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابريولاكتون (PCL) النانوية

الموجهة، كانت الخلايا حتى أكثر استطالة ومحاذاة بجانب حزمة ألياف النانو، والذي هو ظاهر مرة أخرى من خلال الأسهم في الشكل رقم (٩،١١ c). وقد كانت الأكتينات في هذه الخلايا المترصفة مركزة أيضاً بشكل كثيف، وكانت بعض حزم الخيوط الأكتينية (actin filament bundles) في الغالب مترصفة في نفس اتجاه ألياف النانو المجاورة. ومع ذلك، فقد لوحظ أيضاً بنى أكتينية ليفية شبيهه بالحبلى (fibrous tether - like actin structures) رقيقة تربط الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) مع حزمة ألياف النانو المترصفة المجاورة، وهو ما يُلاحظ بشكل خاص في المناطق الموضوعية ضمن دوائر في الشكل رقم (٩،١١ c). ويمكن أن تؤدي هذه النتائج إلى مفهوم الخصائص الفريدة لربط الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) بألياف النانو. وتتفق نتائجنا مع تقرير سابق بأن الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vascular smooth muscle cells) المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو البوليمرية المترصفة تُطوّر أيضاً اتصالات ليفية (fibrous connections) مماثلة [1]. ومع ذلك، فتجدر الإشارة إلى أن الصور التي ذُكرت فيه تقدم دليلاً على التصاقات ممكنة للخلايا - ألياف النانو وقد تم الحصول عليها باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM). وفي المقابل، تُظهر النتائج التي توصلنا إليها بأنه لا يوجد فقط اتصالات ليفية مماثلة في تفاعلات الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) - ألياف النانو، ولكن من المحتمل أيضاً أن تشارك خيوط الأكتين في تطوير تلك البنى الفريدة المشابهة للتصاق (adhesion - like structures). ومن المثير للاهتمام أيضاً أن نلاحظ أن شبكات الأكتين الكثيفة (dense actin networks) المشاهدة في الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) الممتدة والمزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو العشوائية والموجهة تبدي تشابهاً مع هيكل الخلية (cytoskeleton) الملاحظ في الخلايا الغضروفية المفصليّة الناضجة (mature articular chondrocytes)، وبشكل خاص على السطح المفصلي (articular surface) [52]؛ مما يشير إلى أن استخدام حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو البوليمرية الموجهة يمكن أن يكون مفيداً لمحاكاة أفضل للنسيج الغضروفي المفصلي [19-21]. ولأن نجاح هندسة الأنسجة سيتطلب أن تحاكي بنية الأنسجة المهندسة (engineered tissue construct) البنى المايكروية والنانوية (micro- and nanostructures) والمحاذاة المكانية (spatial alignment) ووظيفة الأنسجة الطبيعية، فإن الاستخدام الأمثل لحاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المترصفة (aligned nanofibrous scaffolds) جنباً إلى جنب مع المعالجة البارعة (manipulation) للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) يمكن أن يُنتج واحدة من حاملات الخلايا والأنسجة المحاكية حيويًا (biomimetic scaffolds) الأكثر توافقاً.



(a)



(b)



(c)

الشكل رقم (٩, ١١). صور متألقة لخيط مايكروية (microfilaments) في الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) بعد ٤ أيام من زراعة الخلايا على (a) سطح زجاجي مسطح (flat glass surface)، و (b) في حاملات الخلايا والأنسجة من البولي كابرولاكتون (PCL scaffolds) العشوائية أو (c) الموجهة. ولم يُلاحظ أي التصاقات ليفية مشابهة للحبل (fibrous tether-like adhesions) عندما كانت الخلايا مطبقة على ركيزة نموذجية، ولكن على ما يبدو تشكلت الحبال الحاوية على الأكتين (actin-containing tethers) من خلال التصاق الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) بألياف النانو. وسوف يتم دراسة هذه البنى الفريدة بشكل إضافي لاختبار وجود بروتينات الالتصاق (adhesion proteins) المعروفة مثل الإنتغرينات (integrins) وغيرها من البروتينات داخل الخلية (intracellular proteins).

CONCLUSIONS (٩,٥) الاستنتاجات

في الدراسة الحالية، تم استعراض واستخدام تقنيات لمحاذاة ألياف النانو (nanofiber alignment) في الغزل الكهربائي في زراعة الخلايا الجذعية (stem cell culturing). وقد تمت زراعة الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) بنجاح على نوعين مختلفين من حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية المغزولة كهربائياً. وقد تم إجراء تحديد كمي لاتجاه الخلايا بالنسبة إلى شبكة ألياف النانو الداعمة. وقد تم اختبار فعالية الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) لتتصاف في اتجاه ألياف النانو الموجهة. وقد أظهرت الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) المزروعة على حاملة الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية الموجهة المحاذة الأكثر دقة واتساقاً للخلايا. وقد تم اختبار قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة للتأكد من أن الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) كانت قادرة على البقاء على قيد الحياة وتكاثر على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية أثناء فترة زراعة الخلايا الممتدة لـ ١٨ يوماً. بالإضافة إلى ذلك، فقد لوحظ إعادة تنظيم هيكلي خلوي أكتيني للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSC) على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو، وقد تم الكشف عن وجود خيوط مايكروية في الالتصاقات الليفية المشابهة للحبال والتي ربطت الخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) بألياف النانو المجاورة. إن المزيد من الدراسات جارية لاختبار التمايز المولد للغضروف (chondrogenic differentiation) للخلايا الجذعية المتوسطة البشرية (hMSCs) على حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف البولي كابرولاكتون (PCL) النانوية الموجهة، وتأثيرات تغيير قطر ألياف النانو ومسامية حاملة الخلايا والأنسجة. ومعاً مجتمعة، تشير النتائج التي توصلنا إليها إلى أنه يمكن تحسين هندسة بيئة المصفوفة خارج الخلية الموجهة (oriented ECM environment) لتنظيم محاذاة الأنسجة (tissue alignment) عن طريق ألياف النانو المغزولة كهربائياً والموجهة، وأن تطبيقات هندسة الأنسجة المحددة مثل إنشاء المنطقة السطحية للغضروف المفصلي يمكن أن يتحسن بشكل ملحوظ عن طريق الجمع بين الخلايا الجذعية والمواد النانوية (nanomaterials).

شكر وتقدير ACKNOWLEDGMENTS

يشكر المؤلفون مساهمات طلابهم Andre Theron و Nicole Pearson. ويُعبّر المؤلفون عن امتنانهم للدكتور Igor Titushkin لخبرته ومساعدته التي لا تقدر بثمن في استخدام الفحص المجهرى الماسح بواسطة الليزر وتحليل الصور. ونشكر أيضاً Kristina Jarosius من مركز موارد البحوث (UIC Research Resources Center) لإنجاز المشاهدات باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM). وقد كان هذا العمل مدعوماً، بشكل جزئي، من خلال منح المعهد الوطني للصحة (NIH) (GM60741, EB06067, MC)، ومنحة مكتب البحوث البحرية (Office of Naval Research) (N00014-06-1-0100, MC)، والمؤسسة الوطنية للعلوم (National Science Foundation) في إطار المنحة (NSF-NER-CBET 0708711)، ومنحة مؤسسة فولكس فاكن (Volkswagen Foundation) (AY, EZ). وقد تم تقديم بعض المواد المستخدمة في هذا العمل من قبل مركز تولن للعلاج الجيني (Tulane Center for Gene Therapy) من خلال المنحة المقدمة من الـ (NCRR) للمعهد الوطني للصحة (NIH)، منحة رقم (P40RR017447).

المراجع REFERENCES

- [1] Xu C.Y., Inai R., Kotaki M. et al. 2004. Aligned biodegradable nanofibrous structure: A potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 25:877–886.
- [2] Yang F., Murugan R., Wang S. et al. 2005. Electrospinning of nano=micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 26:2603–2610.
- [3] Lee C.H., Shin H.J., Cho I.H. et al. 2005. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials* 26:1261–1270.
- [4] Dunn G.A. 1982. Contact guidance of cultured tissue cells: A survey of potentially relevant properties of the substratum. In *Cell Behaviour*, ed. R. Bellairs, A. Curtis, G. Dunn, 247–280. Cambridge: Cambridge University Press.
- [5] Rajnicek A.M., Britland S., and McCaig C.D. 1997. Contact guidance of CNS neuritis on grooved quartz: Influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J Cell Sci* 110:2905–2913.
- [6] Karlson W.J., Hsu P.-P., Li S. et al. 1999. Measurement of orientation and distribution of cellular alignment and cytoskeletal organization. *Ann Biomed Eng* 27:712–720.
- [7] Wang J.H.-C., Jia F., Gilbert T.W. et al. 2003. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *J Biomech* 36:97–102.
- [8] Hunziker E.B. 1992. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, ed. K.F. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G. Peyron, V.C. Hascall, 183–199. New York: Raven Press, Ltd.
- [9] Jackson D.W., Scheer M.J., and Simon T.M. 2001. Cartilage substitutes: Overview of basic science and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 9:37–52.
- [10] Hunziker E.B., Quinn T.M., and Haeuselmann H.-J. 2002. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarth Cartilage* 10:564–572.
- [11] Eyre D. 2002. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4:30–35.
- [12] Setton L.A., Elliott D.M., and Mow V.C. 1999. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: Human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarth Cartilage* 7:2–14.
- [13] Wong M. and Carter D.R. 2003. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: A research perspective. *Bone* 33:1–13.
- [14] Klein T.J., Schumacher B.L., Schmidt T.A. et al. 2003. Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarth Cartilage* 11:595–602.
- [15] Kim T.-K., Sharma B., Williams C.G. et al. 2003. Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarth Cartilage* 11:653–664.
- [16] Sharma B. and Elisseeff J.H. 2004. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biomed Eng* 32:148–159.
- [17] Woodfield T.B.F., Van Blitterswijk C.A., De Wijn J. et al. 2005. Polymer scaffolds fabricated with poresize gradients as a model for studying the zonal organization within tissue-engineering cartilage constructs. *Tissue Eng* 11:1297–1311.
- [18] Sharma B., Williams C.G., Kim T.K. et al. 2007. Designing zonal organization into tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 13:405–414.
- [19] Li W.-J., Danielson K.G., Alexander P.G. et al. 2003. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 67:1105–1114.
- [20] Li W.-J., Tuli R., Okafor C. et al. 2005. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26:599–609.

- [21] Li W.-J., Tuli R., Huang X. et al. 2005. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 26:5158–5166.
- [22] Kuo C.K., Li W.-J., Mauck R.L. et al. 2003. Cartilage tissue engineering: Its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 18:64–73.
- [23] Xin X., Hussain M., and Mao J.J. 2007. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospon PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials* 28:316–325.
- [24] Ma Z., Kotaki M., Inai R. et al. 2005. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng* 11:101–109.
- [25] Laurencin C.T., Ambrosio A.M., Borden M.D. et al. 1999. Tissue engineering: Orthopedic applications. *Ann Rev Biomed Eng* 1:19–46.
- [26] Caplan A.I. and Bruder S.P. 2001. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Molec Med* 7:259–264.
- [27] Tuan R.S., Boland G., and Tuli R. 2002. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5:32–45.
- [28] Baksh D., Song L., and Tuan R.S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Molec Med* 8:301–316.
- [29] Alhadlaq A. and Mao J.J. 2004. Mesenchymal stem cells: Isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 13:436–448.
- [30] Yang S., Leong K.F., Du Z. et al. 2001. The design of scaffold for use in tissue engineering. Part 1. Traditional factors. *Tissue Eng* 7:679–689.
- [31] Karande T.S., Ong J.L., and Agrawal C.M. 2004. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Ann Biomed Eng* 32:1728–1743.
- [32] Reneker D.H., Yarin A.L., Fong H. et al. 2000. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys* 87:4531–4547.
- [33] Reneker D.H., Yarin A.L., Zussman E. et al. 2007. Electrospinning of nanofibers from polymer solutions and melts. In *Advances in Applied Mechanics*, Vol. 41, ed. H. Aref, E. van der Giessen, 43–195. Oxford: Elsevier.
- [34] Frenot A. and Chronakis I.S. 2003. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 8:64–75.
- [35] Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki M. et al. 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Sci Technol* 63:2223–2253.
- [36] Dzenis Y. 2004. Spinning continuous fibers for nanotechnology. *Science* 304:1917–1919.
- [37] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W.E. et al. 2005. *An Introduction to Electrospinning of Nanofibers*. Singapore: World Scientific.
- [38] Shin M., Yoshimoto H., and Vacanti J.P. 2004. In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng* 10:33–41.
- [39] Engelberg I. and Kohn J. 1991. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study. *Biomaterials* 12:292–304.
- [40] Thomas V., Jose M.V., Chowdhury S. et al. 2006. Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning. *J Biomater Sci Polym Ed* 17:969–984.
- [41] Theron A., Zussman E., and Yarin A.L. 2001. Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology* 12:384–390.

- [42] Zussman E., Theron A., and Yarin A.L. 2003. Formation of nanofiber crossbars in electrospinning. *Appl Phys Lett* 82:973–975.
- [43] Deitzel J.M., Kleinmeyer J.D., Hirvonen J.K. et al. 2001. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* 42:8163–8170.
- [44] Sundaray B., Subramanian V., Natarajan T.S. et al. 2004. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl Phys Lett* 84:1222–1224.
- [45] Li D., Wang Y., and Xia Y. 2004. Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. *Adv Mat* 16:361–366.
- [46] Courtney T., Sacks M.S., Stankus J. et al. 2006. Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy. *Biomaterials* 27:3631–3638.
- [47] Baker B.M. and Mauck R.L. 2007. The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. *Biomaterials* 28:1967–1977.
- [48] Li W.J., Mauck R.L., Cooper J.A. et al. 2007. Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomech* 40:1686–1693.
- [49] Hoheisel W., Jacobsen W., Luetge B. et al. 2001. Confocal microscopy: Applications in materials science. *Macromol Mater Eng* 286:663–668.
- [50] Yoshimoto H., Shin Y.M., Terai H. et al. 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24:2077–2082.
- [51] Curran J.M., Chen R., and Hunt J.A. 2005. Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. *Biomaterials* 26:7057–7067.
- [52] Langelier E., Suetterlin R., Hoemann C.D. et al. 2000. The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: Structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem* 48:1307–1320.