

تقنيات الحفر النانوي في هندسة الأنسجة

Nanolithographic Techniques in Tissue Engineering

Ber.jamin Moody and Gregory S. McCarty

المحتويات CONTENTS

| | |
|----------|---|
| ٣٩٨..... | INTRODUCTION مقدمة (١٠,١) |
| ٣٩٩..... | BOTTOM-UP LITHOGRAPHY الحفر من الأسفل إلى الأعلى (١٠,٢) |
| ٣٩٩..... | Block Copolymer Lithography حفر بوليمر مشترك كتلي (١٠,٢,١) |
| ٤٠١..... | Self-Assembling Polymerization البلمرة بالتجميع الذاتي (١٠,٢,٢) |
| ٤٠٢..... | Contact Printing الطباعة بالاتصال (١٠,٢,٣) |
| ٤٠٣..... | TOP-DOWN LITHOGRAPHY الحفر من الأعلى إلى الأسفل (١٠,٣) |
| ٤٠٤..... | Wafer-Scale Techniques تقنيات مستوى الرقاقة (١٠,٣,١) |
| ٤٠٤..... | Optical الضوئية (١٠,٣,١,١) |
| ٤٠٧..... | Nanoimprint الطبعة النانوية (١٠,٣,١,٢) |
| ٤١٣..... | Direct-Write Techniques تقنيات الكتابة المباشر (١٠,٣,٢) |
| ٤١٣..... | Accelerated Particle Beam حزمة الجسيمات المسرعة (١٠,٣,٢,١) |
| ٤١٣..... | Electron Beam الحزمة الإلكترونية (١٠,٣,٢,١,١) |
| ٤١٤..... | Proton Beam الحزمة البروتونية (١٠,٣,٢,١,٢) |

| | |
|-----|--|
| ٤١٥ | Focused Ion Beam الحزمة الأيونية المركزة (١٠،٣،٢،١،٣) |
| ٤١٦ | Scanning Probe مسبار المسح (١٠،٣،٢،٢) |
| ٤١٦ | Atomic Force Microscopy مجهر القوة الذرية (١٠،٣،٢،٢،١) |
| ٤١٨ | Dip-Pen الرأس المنغمس (١٠،٣،٢،٢،٢) |
| ٤٢١ | Near-Field Scanning Probe مسبار المسح في الحقل القريب (١٠،٣،٢،٢،٣) |
| ٤٢٢ | MISCELLANEOUS طرق متنوعة (١٠،٤) |
| ٤٢٢ | Etching الحفر أو النقش (١٠،٤،١) |
| ٤٢٥ | Shadow Deposition ترسيب الظل (١٠،٤،٢) |
| ٤٢٦ | CONCLUSIONS الاستنتاجات (١٠،٥) |
| ٤٢٧ | REFERENCES المراجع |

INTRODUCTION مقدمة (١٠،١)

ربما تكون أصول الحفر (lithography) مدهشة وربما تكون للبعض مثيرة للاهتمام بشكلٍ مدهش. وتشمل معالم الأحداث المهمة في تطوره سلالة صينية حاكمة قوية سلالة تانغ الحاكمة (Tang Dynasty) [1] وكاتب مسرحي نمساوي ناجح (Alois Senefelder) [2] وفنان ألماني كثير الإنتاج (Godefroy Engelmann) [3] ومصور فرنسي تجريبي (Nicephore Niepce) [4] وفي الآونة الأخيرة، صناعة الكمبيوتر (computer industry) التي تبلغ مليارات الدولارات. ومثل العديد من التقنيات، كانت تقنية الحفر في بداياتها بعيدة عن الرغبات السياسية، وقد تم تبنيها من خلال إبداع الفنانين، وأصبحت منذ ذلك الحين عملية ذات قدرة لم يسبق لها مثيل للنهوض بالصناعات التجارية وفروع العلوم المتعددة على حدٍ سواء.

وفي الواقع كانت صناعة الكمبيوتر وظهور الرقاقة المايكروية (microchip) هو الذي بشر بتقنية الحفر في العصر الحديث ولكن من المرجح أكثر أن يكون الطب والبيولوجيا هي من سينشرها في المستقبل. وقد تزايدت التطبيقات الطبية الحيوية (biomedical applications) للحفر وتحديداً للحفر النانوي (nanolithography) باطراد، وبشكلٍ أساسي كتركيز على إنشاء حاملات الخلايا والأنسجة التي تم تصميمها بشكلٍ معقد لتقليد أو محاكاة الميزات والوظائف الكامنة بشكلٍ طبيعي فقط في سيناريوهات الجسم الحي. ويُطبق مصطلح الحفر النانوي عموماً على مجموعة متنوعة من العمليات التي تكون قادرة على "طباعة" ("printing") ملامح أو ميزات (features) ذات أبعاد أقل من ١٠٠ نانومتر. وبشكلٍ مثالي، تكون تقنية الحفر النانوي المفردة (single nanolithography technique) قادرة على (١) الكتابة بدقة تباين نانومتري (nanometer resolution) عند سرعات بالسنتيمتر في الثانية على مناطق مستوى الرقاقة (wafer - scale areas)، و (٢) نقل

التحديدات الوظيفية الكيميائية / البيولوجية (chemical / biological functionalities) المختلفة على مجموعة متنوعة من المواد، تحت مجموعة متنوعة من الظروف، و (٣) أن تكون قادرة على الموازنة الكبيرة (massive parallelization) لكل من الكتابة (writing) و المقاييس (علم القياس) (metrology) [5]. حتى الآن لا توجد ولا طريقة واحدة تناسب جميع المعايير المذكورة أعلاه. وعلى أي حال، فإن هناك مجموعة من الطرق الفردية الفريدة بحيث تكون كل واحدة منها مناسبة على الأقل لوظيفة واحدة. وتختلف تفاصيل كل تقنية من الناحية التكتيكية، ولكن مبدأ توجيهه (guiding principle) يبقى هو نفسه: فعلى أقل تقدير، تقوم عملية الحفر النانوي ببناء أو نقل النمط المرغوب (desired pattern) بدقة تباين في مستوى ما دون المايكرون (submicron scale resolution) على سطح مناسب. بشكل عام، توجد هناك طرائق لتحقيق ذلك: الطرائق المعروفة اختصاراً باسم "من الأسفل إلى الأعلى" ("bottom - up") مثل تقنيات حفر بوليمر مشترك كتلي (block copolymer lithographies) والحفر بالتجميع الذاتي (self - assembly lithographies)، أو تلك الطرائق المسماة "من الأعلى إلى الأسفل" ("up - bottom") مثل تقنيات الحفر الضوئي (optical lithographies) والحفر باستخدام الطبعة أو الختم (imprint lithographies) والحفر باستخدام مسبار المسح (scanning probe lithographies). ففي حين أن العديد من هذه الطرائق لا تزال في مراحل الطفولة في أبحاث حمل الخلايا والأنسجة (scaffolding research) في هندسة الأنسجة، فإن لجميعها القدرة الحقيقية جداً على لعب أدوار مهمة في الطب الحيوي (biomedicine) وهندسة الأنسجة.

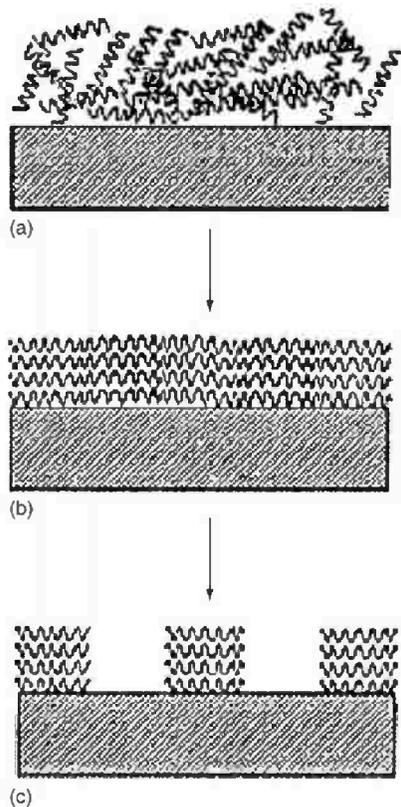
(١٠,٢) الحفر من الأسفل إلى الأعلى BOTTOM-UP LITHOGRAPHY

تشير من الأسفل إلى الأعلى إلى عملية بناء البنى باستخدام الجزيئات والأنماط الجزيئية (molecular patterns) كلبنات بناء (building blocks) مباشرة لبنية ما، وبعبارة أخرى، تبدأ من الجزيئات وتزداد لتصل إلى نمط مفيد. ويشمل هذا غالباً سلاسل البوليمرات القصيرة (الطبيعية أو الاصطناعية) التي تترسب على السطوح الملساء (smooth surfaces) أو السطوح المنقوشة (المزخرفة) (patterned surfaces)؛ مما يؤدي إلى إنتاج طبقات أفلام رقيقة ولكن مفيدة. وتستخدم هذه العملية في واحدة من الطريقتين، إما كوسيلة لتشكيل أو نقش (patterning) سطح بشكل هندسي معين (certain geometry) وإما كطريقة لإنشاء سطح ذي وظيفة محددة (specific functionality). تقع طريقة "حفر بوليمر مشترك كتلي" و"البلمرة بالتجميع الذاتي" ("self - assembling polymerization") في النظام الأول؛ بينما تقع طريقة "الطباعة بالاتصال" ("contact printing") عادةً في النظام الأخير.

(١٠,٢,١) حفر بوليمر مشترك كتلي Block Copolymer Lithography

يتم الحصول على بوليمر مشترك كتلي (block copolymer) عند خلط اثنين أو ثلاثة من البوليمرات؛ مما يؤدي إلى إنتاج سلسلة بوليمر (polymer chain) تتكون من وحدات متكررة من المونومرات (مواحد) (monomers) من البوليمرات الأصلية. على سبيل المثال، إذا كان البوليمر A يتكون من مونومرات A (A - A - A - A...) مرتبطة بشكل تساهمي (covalently

(bonded) والبوليمر B يتكون من مونومرات B ($B - B - B - B \dots$) مرتبطة بشكلٍ تساهمي؛ وبالتالي يمكن لسلسلة بوليمر مشترك ثنائية الكتلة (diblock copolymer chain) من البوليمر A والبوليمر B أن تبدو مثل ($A - A - A - A - B - B - B - B \dots$) أو ($A - A - A - B - B - B - A - A - A - B - B - B - B \dots$)، إلخ. تفصل التراكيب الكيميائية السطحية (surface chemistries) المختلفة أو طور الخصائص السطحية (surface properties phase) الأخرى وحدات المونومرات إلى أشكالٍ يمكن التنبؤ بها. وبعبارةٍ أخرى، تُوجه سلسلة البوليمر المشترك نفسها مكانياً في نمطٍ وشكلٍ هندسي معين اعتماداً على نسب البوليمرات (وهذا ما يعطي بدوره الفيزياء السطحية surface physics) التي يتألف منها البوليمر المشترك. بعد الترسيب على السطح، يمكن أن ينحل واحد من البوليمرات عن طريق مذيب مناسب تاركاً فقط البوليمر الآخر مع الشكل الهندسي الذي تم تحديده بشكلٍ مسبق من خلال تصنيع البوليمر المشترك (الشكل رقم ١٠،١). إلا أن العيب هو أن هناك مجموعة محدودة من الأنماط الممكنة التي يمكن تشكيلها باستخدام هذه التقنية وتكون المصفوفات (arrays) بسيطة وكثيفة بشكلٍ عام [1].



الشكل رقم (١٠،١). رسم تخطيطي لحفر بوليمر مشترك كتلي (block copolymer lithography). (تمت إعادة طباعته من Trawick, M., Angelescu, D., Chaikin, P., and Register, R., *Nanolithography and Patterning Techniques in Microelectronics*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2005).

بالنسبة للتطبيقات السطحية التي تتطلب شبكات بسيطة وكثيفة، يُثبت التركيب الكيميائي لكتلة البوليمر المشترك أنه مفيد. وبالجمع بين التنظيم الذاتي لبوليمر مشترك كتلي (block copolymer self-organization) مع تقنية الإطلاق (lift-off technique) والحفر الأيوني التفاعلي (reactive ion etching) (ستتم مناقشتها في الفقرات (١٠،٣،٢،١،١) و (١٠،٤،١)، على التوالي)، عرض Park وآخرون تقنية تستخدم مزيجاً بوليمرياً من البوليمرين - بي - بولي أيزوبرين (polystyrene-*b*-polyisoprene) كقناع حفر تقريبي (sacrificial etch mask) ويكون قادراً على ترسيب نقاط من الذهب (gold dots) بحجم ٢٠ نانومتراً مع فترات تعاقب من ٤٠ نانومتراً على ركائز من السيليكون [6]. ويمكن لهذه المصفوفات الذهبية الكثيفة (dense gold arrays) أن تُستخدم بشكلٍ تصوري في عمل هندسة الأنسجة في ما يتعلق بالتصاق الخلايا [7] أو تطبيقات الحمض النووي الرببي منقوص الأكسجين (deoxyribonucleic acid - DNA) والطبقة الأحادية ذاتية التجميع (self-assembling monolayer - SAM) [8].

(١٠،٢،٢) البلمرة بالتجميع الذاتي Self-Assembling Polymerization

إن البلمرة بالتجميع الذاتي هي تقنية مشابهة لحفر بوليمر مشترك كتلي من حيث إنها لا تزال تستخدم بوليمرات مشتركة لبناء بُنى ثلاثية الأبعاد (3D structures) إلا أن البناء الفعلي يكون أقل ارتباطاً بتقنيات الحفر التقليدية (conventional lithographies) وأكثر ارتباطاً بالتركيب العضوي (organic synthesis). وبالرغم من ذلك، فقد بدأت الأبحاث باستخدام التجميع الذاتي للبوليمرات لتصنيع بيئات مايكروية دقيقة ذات بُنى في المستوى النانومتري. وقد أظهرت البيئات المتعددة، عندما يتم ترتيبها كبوليمرات ثنائية الكتلة ويتم معالجتها باستخدام مُحَرِّض (initiator) مناسب، أنها تتجمع ذاتياً في أفلام بوليمرية (polymer films) وهلامات مائية [9]. وتصف مقالة تم نشرها عام ٢٠٠٢ في مجلة *Nature* استخدام تركيبات من الأحماض الأمينية كالليزين (lysine) واللوسين (leucine) والفالين (valine) وحمض الغلوتاميك (glutamic acid) لتشكيل هلامات مائية صلبة ذات بُنى مسامية (porous structures) تسمح بانتشار جزيئية (molecular diffusions) كبيرة، حيث يمكن أن تكون ضرورية من أجل حاملات الخلايا والأنسجة لغرض تغذية أو نمو الخلايا. بالإضافة إلى ذلك، وإلى جانب المزايا الفيزيائية، توفر الهلامات المائية المبنية من مكونات بروتينية طبيعية إمكانية التحديد الوظيفي الحيوي (biofunctionality) والتحلل الحيوي (biodegradation) [9].

وتحت الشروط المناسبة، فقد تم عرض البيئات على أنها تتجمع ذاتياً في ألياف نانوية بحيث تتوجه ويمكن أن تُمعدن (mineralized) مع الهيدروكسي آباتيت (hydroxyapatite) على نحوٍ مماثل كما يفعل الكولاجين في العظام [10]. وقد استخدم باحثون آخرون التجميع الذاتي لألياف النانو كحاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد لتشجيع الخلايا الغضروفية على إنتاج مصفوفة خارج الخلية غنية بالكولاجين (collagen-rich ECM) [11] وللسماح بتميز أكثر اكتمالاً لخلايا السَلَف الكبدية (hepatocyte progenitor cells) [12]. وقد استخدم Holmes وآخرون التجميع الذاتي لمزرعة من حاملات خلايا وأنسجة بيتيدية (peptide scaffold culture) لعصبونات جُرَدِيَّة (rat neurons). لم تعزز حاملات الخلايا والأنسجة الالتصاق العصبوني (neuronal attachment) وأُتِيبَات (نمو) المحوار (neurite outgrowth) فقط ولكن وبعد عدة أيام بدأت بعض المحاور (neuritis) الاتصال بالعصبونات المجاورة (adjacent neurons) والمحاور الأخرى، مُشكِّلةً أنظمة وظيفية بشكلٍ مَسْبُوكِيٍّ (synaptically functional systems) [13].

١٠,٢,٣) الطباعة بالاتصال Contact Printing

هناك طريقة أخرى ينبغي أن يتم إدراجها على اعتبار أنها حفر من الأسفل إلى الأعلى (bottom - up lithography) وهي "الطباعة بالاتصال المايكروني" ("μCP" - "micro - contact printing"). وكما يوحي اسمها، فإن الكثير من الأبحاث في مجال الطباعة بالاتصال قد تم إنجازها على سمات ذات حجم مايكروني (micron - sized features) وقد بدأت مؤخراً فقط في التقدم في المجال النانومتري [14]. وعلى الرغم من ذلك، فإن الاستخدامات الحالية للطباعة بالاتصال جنباً إلى جنب مع الإمكانيات المستقبلية لدقات ميز أو تباين مُحسَّنة في المجال النانومتري (nanometer resolutions) سيتم مناقشتها هنا. في الأساس، فإن للطباعة بالاتصال المايكروني (μCP) ثلاث خطوات هي: (١) إنشاء وقولبة (تصميم قالب) ختم "لين" من اللدائن المرنة ("soft" elastomeric stamp)، و (٢) "تجيير" (وضع حبر) ("ink") أو امتزاز (امتصاص) (adsorb) كيان كيميائي أو بيولوجي (chemical or biological entity) مرغوب على الختم، و (٣) استخدام الختم لطباعة سمات على السطوح المستهدفة (target surfaces). وتكون الأختام عادةً مصنوعة من البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS - poly (dimethylsiloxane))، وهو مطاط صناعي ثنائي الأجزاء (two - part elastomer) يتم استخدامه من أجل تطبيقات النماذج الأولية السريعة (rapid prototyping applications). إن إنتاج ختم من هذه المادة يُمكن الختم نفسه من أن يُستخدم لطباعة السمات على سطوح متعددة لأكثر من ١٠٠ مرة من دون أن يفقد أداءه. وقد أدت القدرة على تجيير مجموعة واسعة من البروتينات إلى اهتمام كبير في الطباعة بالاتصال المايكروني (μCP) من قبل الباحثين المشاركين في مجال المواد الحيوية وهندسة الأنسجة واكتشاف الدواء (drug discovery) [15] من بين أمورٍ أخرى. كما أنه تُنتج مرونة (flexibility) إضافية من القدرة على الطباعة على مجموعة متنوعة من السطوح بما في ذلك السيليكون والزجاج والبلاستيك [16]. وتُستخدم الطباعة بالاتصال المايكروني (μCP) على نطاقٍ واسعٍ لطباعة البروتينات على السطوح لغرض استخدام تلك البروتينات كمثبتات (anchors) ومُعَالِجَات (manipulators) لدراسة وظائف الخلايا في العمق (in - depth cell functions) مثل دورات الحياة والموت (life and death cycles) [17] والتمايز (differentiation) [18] والانجذاب الكيميائي (chemotaxis) [19] على سبيل المثال لا الحصر.

على أي حال، ولأن الختم بشكلٍ عام يتم تشكيله أو نقشه باستخدام الحفر الضوئي في مستوى المايكرون (micron - scale photolithography) (ستتم مناقشة ذلك في الفقرة ١٠,٣,١,١)، فإن القليل من التطبيقات متوفرة في مستوى النانو. استثناء من القاعدة هو العمل التمهيدي الذي تم القيام به من قبل Stellacci وآخرين في معهد ماساتشوستس للتكنولوجيا (MIT - Massachusetts Institute of Technology). فبناءً على المفهوم البيولوجي لكيفية نسخ الحمض النووي (DNA) على جداول (strands) الحمض النووي الريبي (ribonucleic acid - RNA)، تقوم المجموعة البحثية من معهد ماساتشوستس للتكنولوجيا باستخدام أختام من حمض نووي ذي جديلة واحدة (single stranded DNA) لربط الحمض النووي المتَّمم (complimentary DNA) على سطح مُستهدف، وعادةً ما يكون من الذهب. يمكن لهذه التقنية طباعة رُقَع من الحمض النووي (DNA patches) والتي تُظهر دقات ميز أو تباين تصل إلى ٤٠ نانومتراً [20]، فتكسر بذلك حاجز الـ ٥٠ نانومتراً

الشائعة لتقنيات الطباعة بالاتصال المايكروبي (μCP) الأخرى (Xia et al. 1995, 9576-9577). وعلى الرغم من أن Stellacci وآخرين يذكرون فقط الطباعة على السطوح الذهبية، إلا أن هناك بالفعل خطأً لبدء "الطباعة على ركائز عازلة (insulating substrates) مثل الزجاج أو ثاني أكسيد السيليكون (silicon dioxide) وكذلك على البوليمرات" [20]، على اعتبار أنها ممكنة باستخدام تقنيات الطباعة بالاتصال المايكروبي (μCP).

فبينما تُظهر منهجيات (methodologies) حفر البوليمر المشترك الكتلي والتجميع الذاتي دقات تباين أعلى وقد يكون من الممكن في يوم ما الجمع بينها لإعطاء الزخرفة أو التصميم المحدد (specific patterning) القدرة على التحكم بتشكيلات المصفوفات ثلاثية الأبعاد (3D matrix formations)، فإنه وحتى الآن لم يتم متابعة هذا الأمر على نطاقٍ واسع. وعلى العكس، فإن الطباعة بالاتصال تُستخدم بالفعل على نطاقٍ واسع في هندسة الأنسجة، لكنها لم تُرَسَّخ بعد قدرتها كتقنية حفر في المستوى النانومتري (nanometer scale lithography).

(١٠,٣) الحفر من الأعلى إلى الأسفل TOP-DOWN LITHOGRAPHY

على الرغم من أن استخدامات طرق الحفر من الأسفل إلى الأعلى تُظهر بشير نجاح، إلا أن طرق الحفر من الأعلى إلى الأسفل (top - down lithographies) كانت ولفترة طويلة تُشكل الدعائم الأساسية الحقيقية لمهندسي السطوح. وتباين طريقة الحفر من الأعلى إلى الأسفل عن طريقة الحفر من الأسفل إلى الأعلى في أن طريقة الحفر من الأعلى إلى الأسفل تُضيف أنماطاً (نقوشاً) عن طريق تقشير (stripping away) مادة كتلية بدلاً من ترسيب المادة المنطبعة (المنقوشة) (patterned material) فقط. وبالتالي؛ فإن طرق الحفر من الأعلى إلى الأسفل تبدأ عادةً عن طريق ترسيب مادة كتلية، ونحت أو نقش (carving out) نمط معين من خلال وسائل كيميائية أو فيزيائية، ومن ثم بناء أو نقل أنماط (نقوش) على أعلى القاعدة من أجل استكمال البنية. أحياناً تكون الركيزة نفسها هي التي يتم نقشها من أجل تشكيل سطح تعيش عليه الخلايا (cell - inhabitable surface) أو سطح وظيفي (functional surface) [21]. وأحياناً أخرى يتم بناء نمط أو نقش عن طريق تقشير طبقة مقاومة كتلية (bulk resist) من خلال إضافة جزيئات وظيفية (functional molecules) على السطح [22]، [23]. ويمكن تقسيم طرق الحفر من الأعلى إلى الأسفل إلى فئتين منفصلتين: الفئة الأولى هي تلك التي يمكن أن تُطور وعلى نحوٍ فعّالٍ أنماطاً أو نقوشاً بمساحات كبيرة على مستوى رقاقة سيليكون (silicon wafer) معيارية، أي مستوى الرقاقة (wafer scale) المعتبرة، والفئة الثانية هي تلك التي تُعرف باسم الكتابة المباشرة (direct write)، والتي يتم من خلالها كتابة نقش ما بسطر واحد في وقت واحد. وهكذا، ففي حين أن طرق مستوى الرقاقة هي بصورة عامة فعّالة جداً زمنياً (temporally efficient)، فإن طرق الكتابة المباشرة مُكلفة زمنياً (temporally expensive).

Wafer-Scale Techniques الرقاقة مستوى تقنيات (١٠,٣,١)

تشمل تقنيات مستوى الرقاقة (wafer - scale techniques) عمليات الحفر الضوئي والحفر باستخدام الطبقات. إن الميزة الكبيرة لهذه الطرق هي قدرتها على زخرفة أو نقش مناطق كبيرة في وقت قصير نسبياً. ومن خلال المشاركة والتطوير المشترك مع صناعات الكمبيوتر وصناعات أشباه الموصلات (semiconductor industries)، فإن العديد من الطرق تكون متوافقة بشكل مباشر مع التقنيات القائمة بالفعل مما يجعلها مريحة وفعالة من حيث التكلفة للاستخدام.

Optical الضوئية (١٠,٣,١,١)

لقد كانت عمليات الحفر الضوئية هي الأكثر استخداماً وبشكل واسع على مر السنين على اعتبار أنها تتطلب من الناحية الفنية فقط مصدراً ضوئياً (light source) وقناعاً ضوئياً مزخرفاً أو منقوشاً (patterned photomask) وطبقة المقاومة (resist) التي سوف تتأثر بالضوء. ففي جوهر هذه العمليات، يتم إنشاء قناع ضوئي مع نمط أو زخرفة شفافة عليه (transparent pattern). ويمر الضوء من خلال هذا الجزء الشفاف من القناع على المقاومة الضوئية (photoresist)؛ وبالتالي تضيء (illuminating) المقاومة بنمط زخرفة مماثل لذلك الموجود على القناع. إن المقاومات الضوئية هي محاليل من البوليمرات (polymer solutions) مصممة بشكل خاص، والتي لديها ذوبانية (قابلية ذوبان) متغيرة من خلال التعرض للضوء (light exposure)؛ مما يجعلها أكثر أو أقل عرضة للإزالة من قبل مذيب ما (solvent). فالمقاومات "السلبية" ("negative" resists) تصبح أقل قابلية للذوبان عند التعرض للضوء بينما تصبح المقاومات "الإيجابية" ("positive" resists) أكثر قابلية للذوبان. لذلك، وبعد التعرض والتحميض (exposure and development)، تنحلّ المقاومات الضوئية السلبية بعيداً تاركةً فقط النقش الذي تم تعريضه للضوء. أما بالنسبة للمقاومات الضوئية الإيجابية، فإن النقش هو فقط الذي ينحلّ بعيداً.

على أي حال، ولأغراض الحفر النانوي، فإن الحفر الضوئي يصبح أكثر صعوبة. ولأن الضوء ينعرج (diffract) عندما يمر من خلال فتحة (aperture)، وهو ما يسمّى عادة بانعراج فراونهوفر (Fraunhofer diffraction) [24]، فإن هناك حداً أساسياً لدقة تباين عمليات الحفر الضوئية، والتي تتناسب مع طول موجة الضوء (wavelength of light) المستخدمة. وتصف المعادلة التالية العلاقة بين حجم السمة الأصغر الممكنة (d)، وطول موجة الضوء (λ)، والفتحة العددية (numerical aperture) لمصدر الضوء (NA)، وثابت (k) [25].

$$d = k (\lambda / NA)$$

لتخفيض مستوى حد الانعراج (diffraction limit) أو على الأقل للحد من تأثيره، فقد تم في الآونة الأخيرة تطوير عدة تقنيات غير تقليدية. ففي بداية الأمر بدأ الباحثون بتخفيض طول موجة الضوء إلى مناطق الأشعة فوق البنفسجية الشديدة (extreme ultraviolet regions) ومناطق الأشعة السينية (x-ray regions). بالإضافة إلى ذلك، فقد بدأ القليل من الباحثين اختبار تأثيرات المقاومات الضوئية والأفئعة المشربة بالمعادن (metal - impregnated photoresists and masks) من أجل الاستفادة من البلازمونات السطحية (مواد جينية خارج النواة) المثارة بالضوء (light excited surface plasmons). وسيتم في الفقرة (١٠.٣.٢.٢.٣) تغطية محاولة أخرى لتجنب حد الانعراج وهي الحفر الضوئي في الحقل القريب (near - field optical lithography).

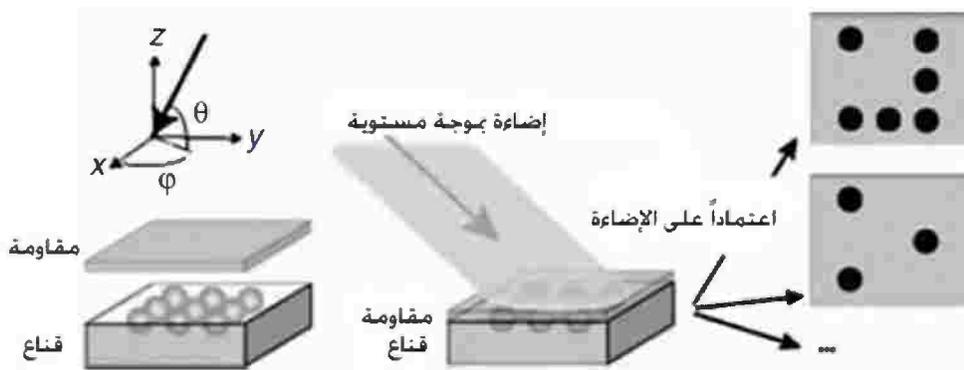
إن المتغير الأكثر وضوحاً، والذي يمكن أن يتغير في معادلة الانعراج / دقة التباين (diffraction / resolution equation) هو طول الموجة. نظرياً، فإن تقليل طول موجة الضوء الساقط سوف يقلل حجم السمة إلى السمة الأصغر. وقد بدأ العديد من الباحثين وفقاً لذلك باختبار عمليات الحفر بالأشعة السينية والأشعة فوق البنفسجية الشديدة (EUV) باستخدام نفس المصدر والقناع ومخطط المقاومة (resist blueprint)، ولكن مع ضوء أشعة سينية أو ضوء أشعة فوق بنفسجية شديدة (EUV) يجري استخدامها بدلاً من الضوء التقليدي. فعلى سبيل المقارنة، تتراوح أطوال موجات الضوء المرئي (visible light wavelengths) بين تقريباً ٤٠٠ إلى ٧٠٠ نانومتر في حين أن أطوال موجات الأشعة السينية المستخدمة في الحفر هي عادةً ما تكون في أي مكان من ٠.٥ إلى ٤.٥ نانومتراً وذلك اعتماداً على الاستخدام [26]. وقد ذكر Seunarine وآخرون مؤخراً استخدام مجموعتهم "للحفر بالأشعة السينية" ("x-ray lithography") لتشكيل ركائز عامودية (أعمدة) صغيرة (pillars) من بولي (ميثاكريلات الميثيل) (polymethyl methacrylate - PMMA) على ركيزة نصف أنبوبية من الكوارتز (half - pipe quartz substrate) [27]. وعلى الرغم من أن النتائج السابقة تُوضح بأن مصفوفات الحفر النانوية المنتظمة (regular nanopit arrays) تُؤخّر التصاق الخلايا [28]، إلا أن مجموعة Seunarine قد حاولت إنشاء مصفوفات من الركائز العامودية (الأعمدة) النانوية (nanopillar arrays) على بنية أنبوبية (tubular structure) لإنشاء بيئة للتصاق الضعيف للخلايا تشبه الجملة الوعائية البشرية (human vasculature). وقد قامت هذه المجموعة بإنشاء ركائز عامودية (أعمدة) بأقطار تتراوح من ١٧٨ حتى ٢١٣ نانومتر، وذلك عن طريق تغطية أو طلاء (coating) الكوارتز بطبقة من فيلم مقاومة (resist film) من مادة البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) ذات سماكة بقيمة ٥٠٠ نانومتر؛ ومن ثم تعريض هذه المقاومة للأشعة السينية على مقربة من ١٠ ميكرومترات تقريباً (10 μm) مع (0.8 nm) 2keV. ومع ذلك، وحتى عند طول موجة أشعة سينية قصيرة، فإن القرب بين الفتحة والعينة ضمن المجال للحصول على التشعيع يكون متأثراً بنوع آخر من الانعراج يُسمى انعراج فريسنل [24] (Fresnel diffraction). لذلك وفي حين أن أحجام السمات الصغيرة تكون ممكنة؛ تحدث التشوهات (distortions) التي تعطي الركائز العامودية شكلاً سداسي الأضلاع جزئياً (slightly hexagonal shape) (بدلاً من الشكل المستدير) مع ثقب صغيرة في وسط الركيزة العامودية [27]. وقد توقفت هذه المجموعة فجأة عن ذكر أي من دراسات التصاق الخلايا على الركيزة نصف الأنبوبية المطلية بطبقة غلاف خارجي (coated half - pipe) التي قامت بإنشائها.

إن الحفر بالأشعة فوق البنفسجية الشديدة (EUV lithography) هو تقنية أخرى تقوم على نفس المبدأ من استخدام أطوال موجات قصيرة لتقليل حد الانعراج. وهو يُظهر القدرة على إنتاج سمات ذات دقة تباين بمقدار ٢٠ نانومتراً مع جودة عالية وعلى مساحات واسعة نسبياً [25]. ورغم ذلك وفي حين أن الأشعة فوق البنفسجية الشديدة (EUV) تكسب اهتماماً في صناعة الإلكترونيات الدقيقة (microelectronics industry)، فهي بعيدة عن الاندماج في الطب الحيوي، وذلك على الأغلب بسبب مصادر الانبعاث (emission sources) والبصريات (optics) الخاصة التي تحتاجها. وعلى أي حال، فإن التطورات الحديثة في مصادر السنكروترونات (synchrotrons sources) (أجهزة توليد الإلكترونات السريعة) ومصادر البلازما (plasma sources) وبصريات الانعراج (diffraction optics) وبصريات الأشعة فوق البنفسجية الشديدة العاكسة متعددة الطبقات (multilayer reflective EUV optics) قد جعلت مؤخراً هذه القيود أقل إعاقة [25]. وفي الواقع، فإن تقرير

الإستراتيجية الدولية والبصيرة في علم النانو وتقنية النانو لعام ٢٠٠٤ (International Strategy and Foresight 2004) Report on Nanoscience and Nanotechnology) يدعم "بقوة" الأشعة فوق البنفسجية الشديدة (EUV) على اعتبار أنها تقنية نانو مستقبلية، مشيراً إلى أنه "لا بد من المزيد الجهود البحثية المكثفة على المستوى الأكاديمي والمؤسسي لرفع مستوى الحالة العامة لجميع عناصر العملية" [29].

وهناك ابتكار آخر في الحفر الضوئي وهو استخدام "الحفر بالبلازمون" ("plasmon lithography"). فقد استفاد الباحثون مؤخراً في جامعة تكساس من فكرة حفر سطح بالبلازمون عن طريق استخدام قناع من الكوارتز (quartz mask) مطلي بطبقة غلاف خارجية من معدن مُثَقَّب (perforated metal) (الذهب أو التيتانيوم) على مقربة من مقاومة ضوئية تقليدية تم غزلها على ركيزة من السيليكون، والتي تم طلاؤها أيضاً بطبقة غلاف خارجي من المعدن (التيتانيوم). بعد ذلك تم استخدام ضوء مُسْتَقْطَب (polarized light) بطول موجة ٣٥٥ نانومتر لإنشاء أنماط أو نقوش خطية (line patterns) في المقاومات مع عرض يصل إلى ١٣٠ نانومتر [30]. ومن خلال التوضيح، يشير الباحثون إلى أنه يتم تعزيز الضوء بواسطة بلازمونات سطحية مثارة عندما يمر من خلال الفتحة التي هي أقل من طول الموجة؛ ومن ثم يتم حجزه عن طريق الاقتران (coupling) بالبلازمونات السطحية المثارة على الركيزة [30].

بالإضافة إلى ذلك، ففي عام ٢٠٠٧، وبالعامل على البحوث التجريبية السابقة من قبل Hubert وآخرين [31]، اعتقد Koenderink وآخرون أنه من خلال تزييع (زرع) (implanting) القناع الضوئي (optical mask) فقط بجسيمات نانوية من الفضة (silver nanoparticles) يصبح من الممكن إنشاء أنماط أو نقوش مختلفة على المقاومة وذلك بمجرد تغيير طول موجة أو زاوية أو استقطاب الضوء الساقط. ومن ثم أعلنوا أيضاً أن مستوى عالياً من حرية التصميم يمكن أن يتم إنجازها على مساحة كبيرة وذلك عن طريق تحريك القناع وإثارة وحدات جزئية صغيرة (small subunits) من العينة بشكل متعاقب [32] (الشكل رقم ١٠،٢).



الشكل رقم (١٠،٢). الحفر باستخدام البلازمون (plasmon lithography) مع جسيمات الفضة النانوية (silver nanoparticles). (تمت إعادة

طباعتها من Koenderink, A.F., Hernandez, J.V., Robicheaux, F. et al., *Nano Lett.*, 7, 745, 2007).

وكما هو الحال مع الحفر النانوي لبوليمر كتلي، وفي حين أنه واعد بالخير، فإن الحفر النانوي الضوئي (optical nanolithography) لا يزال أيضاً في المراحل المبكرة جداً من التطوير وما زال يعاني من بعض العيوب المهمة جداً. وبشكلٍ مماثل لما علق به الكيميائي الشهير من جامعة هارفارد الدكتور George Whitesides على الحفر الضوئي في عام ١٩٩٨ :

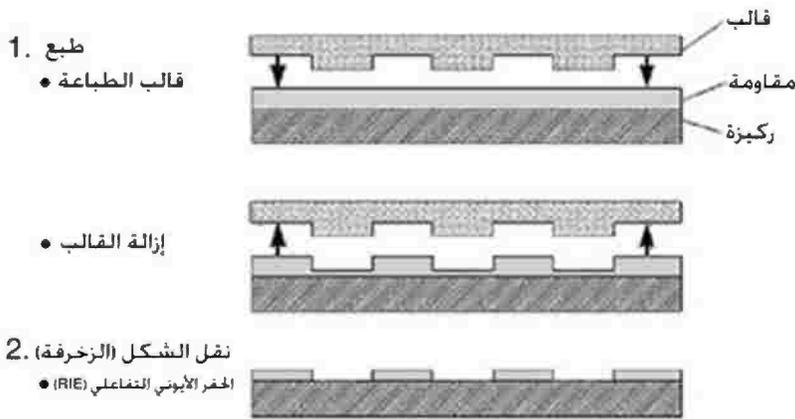
"إنه باهظ الثمن؛ ... لا يمكن اعتماده بسهولة لتشكيل أو زخرفة سطوح غير مستوية (nonplanar surfaces)؛ ... غير مناسب لإدخال تحديدات وظيفية كيميائية معينة (specific chemical functionalities)؛ قابل للتطبيق بشكلٍ مباشر فقط على مجموعة محدودة من المواد التي يتم استخدامها كمقاومات ضوئية" [33].

وكتيجة لذلك؛ فإن معظم التقنيات الضوئية لا تزال تُركّز على استكشاف السمات السطحية المختلفة التي من الممكن إنشاؤها في حين لا يزال عدد أقل بكثير عند نقطة استكشاف آثار أو نتائج تطبيق السطوح التي تم تشكيلها بأنماط أو زخرفة نانوية بشكلٍ ضوئي على الحالات البيولوجية. وعلى أي حال، فقد بدأت التجارب البيولوجية والطبية الحيوية على "الحفر باستخدام الطبعة النانوية" ("nanoimprint lithography")، وهي تقنية مستوى الرفاقة غير الضوئية (nonoptical wafer - scale technique).

(١٠,٣,١,٢) الطبعة النانوية Nanoimprint

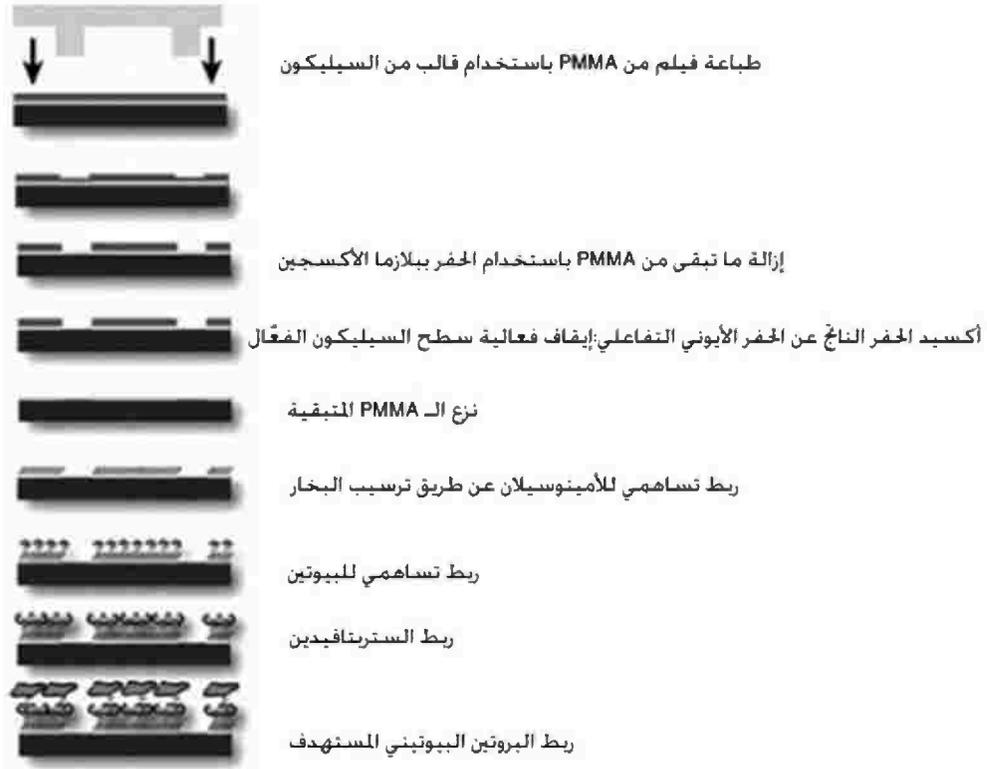
تم اقتراح هذه التقنية في البداية في عام ١٩٩٥، وتستخدم تقنية الحفر بالطبعة النانوية (NIL) قالباً ذا بنية نانوية (nanostructured mold) لضغط أو طبع (press) نمط أو نقش في فيلم مقاومة على ركيزة. وعلى عكس الحفر الضوئي، فإن الحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL) لا يعتمد على التشعيع (radiation)؛ وبالتالي فإن دقة تباينه لا تتأثر بتلك المشاكل الشائعة للحفر مثل الانعراج وتشتت المقاومة (resist scattering) والتشتت المرتد من الركيزة (substrate backscattering)، ... إلخ. [34]. وكما هو موضح في الشكل رقم (١٠,٣) فإن فيلم المقاومة المستخدم في الحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL) هو إما (١) بوليمر يتم تسخينه إلى ما بعد درجة حرارة التحول الزجاجي (glass transition temperature) ويتم ضغطه ثم يُترك ليبرد قبل إزالة القالب، وإما (٢) أن المقاومة هي بوليمر قابل للمعالجة (curable polymer) يتم ضغطه؛ ومن ثم تتم معالجته (عن طريق الأشعة فوق البنفسجية UV أو معامل معالجة curing agent) قبل أن تتم إعادة تقشيريه من القالب. وبغض النظر، فإن هناك خطوة أخيرة، وهي نقل النمط أو النقش (pattern transfer)، والذي يستخدم شكل من أشكال الحفر (وهو غالباً الحفر الأيوني التفاعلي) لإزالة المقاومة التي تبقى في المناطق المضغوطة (الشكل رقم ١٠,٣). وعادةً ما تكون القوالب من مادة السيليكون (Si) أو ثاني أكسيد السيليكون (SiO₂) ويتم تشكيل بنيتها النانوية في البداية من خلال تقنيات الكتابة المباشرة (direct writing techniques) مثل الحفر باستخدام الحزمة الإلكترونية (electron beam lithography) [35]، والتي سيتم مناقشتها بشكلٍ أوسع في الفقرة ١٠.٣.٢.١.١. وباستخدام الحفر بالطبعة النانوية (NIL) جنباً إلى جنب مع تقنيات الإطلاق

التقليدية (conventional lift-off techniques)، فقد تم استخدام بوليمرات المقاومات مثل البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) لإنجاز مصفوفات منقوشة أو مزخرفة (patterned arrays) بالثقوب (holes) [35] أو بالأعمدة الصغيرة (pillars) [34] مع أقطار تصل إلى ٦ نانومتر. وبالمقارنة مع عمليات الحفر بالحزمة الإلكترونية والحفر الضوئي، فإن الحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL) يمكن أن يكون رخيصاً مع سرعة أعلى في تشكيل الزخرفة أو النقش ودقة تباين أعلى وقدرة أعلى على إعادة الإنتاج (reproducibility) [21]. إلا أن السليبات هي تكلفة تصميم القالب الأولي (initial mold design) وضغوط الكبس العالية (high compression pressures) التي قد تكون هناك حاجة لها [36].



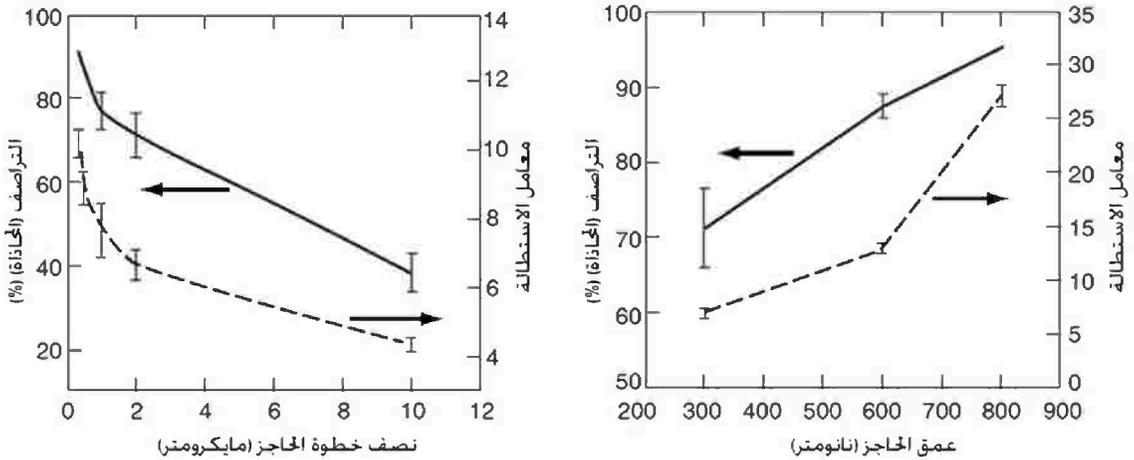
الشكل رقم (٣، ١٠). نظرة عامة على عملية الحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL). (من Chou, S.Y., Krauss, P.R., Zhang, W. et al., *J. Vac. Sci. Technol. B*, 15, 2897, 1997).

وإلى جانب دقة التباين، فثمة ميزة رئيسية أخرى للحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL) زيادةً على الحفر الضوئي، وهي أنه ليس من الضروري أن تقتصر التجارب على زخرفة أو نقش سمات غير فعالة (inactive features) على سطح ما؛ ومن ثم مراقبة الاستجابة الخلوية (cellular response) للشكل الهندسي. في كثيرٍ من الأحيان وبالاتصال مع الطباعة بالاتصال، يمكن للمرء أن يحاكي البروتينات النمطية (pattern proteins) والجزيئات الوظيفية الحيوية (biofunctional molecules) الأخرى التي تم تصميمها خصيصاً من أجل تطبيقات تتراوح من تجارب التصاق الخلايا (cell anchoring experiments) البسيطة [23] إلى دراسات التعبير عن النمط الظاهري (phenotype expression studies) ودراسات التمايز [37] (الشكل رقم ٤، ١٠). وقد أظهر Gaubert وآخرون بأن أنماط أو زخارف نانوية من الذهب (gold nanopatterns) مع حجم تقريبي من حوالي ٦٠ نانومتراً يمكن أن يتم ترسيبها على خلفية من ثاني أكسيد السيليكون (SiO_2 background) ويمكن بعد ذلك أن يتم تحديدها وظيفياً باستخدام إما الفيرونيكتين (fibronectin) وإما بولي غليكول الإيثيلين (polyethylene glycol - PEG) لتعزيز أو لتأخير نمو الخلايا البطانية الوريدية السريعة البشرية (human umbilical vein endothelial cell growth) في المناطق ذات الصلة [23].



الشكل رقم (٤, ١٠). تثبيت البروتين (protein immobilization) على سطح ذي نقوش أو زخرفة. (تمت إعادة طباعته من Hoff, D.J., Cheng, (١٠, ٤).
 (L., Meyhofer, E. et al., *Nano Lett.*, 4, 5, 853, 2004).

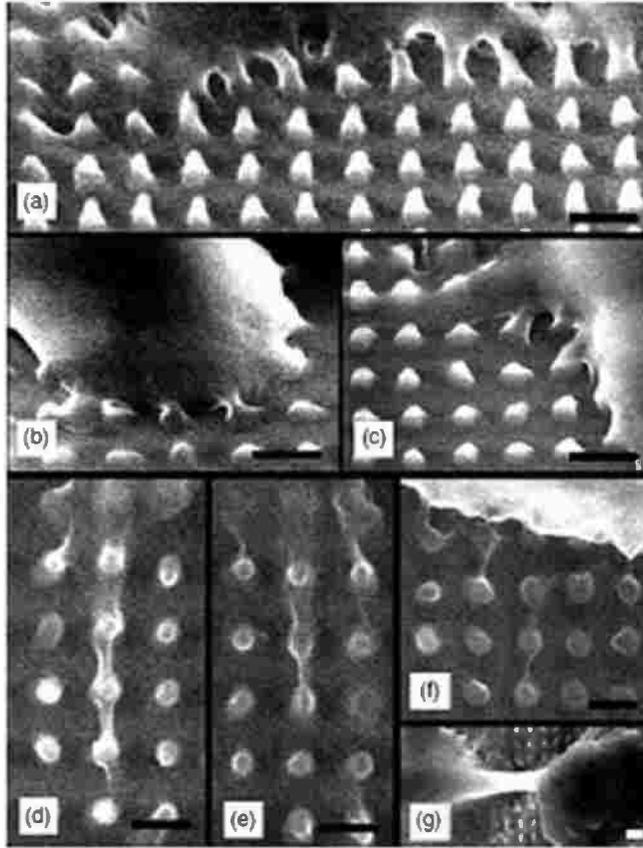
وهناك فائدة أخرى نهائية للحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL) وهي قدرته على طباعة سمات على مجموعة متنوعة من الركائز. ولا تتأثر دقات تباين تشكيل الزخرفة أو النقش باستخدام الطبعة (imprint patterning resolutions) على الركائز ذات الوزن الذري (atomic weight) المرتفع (كرقائق الذهب السميكة، على سبيل المثال) بالتشتت المرتد، والذي يسبب مشاكل في عمليات الحفر القائمة على التشعيع (radiation - based lithographies) [34]. ويصبح من الممكن أيضاً القيام بزخرفة أو نقش ركائز أرقص وأقل تعقيداً وذلك كما هو ظاهر من خلال مشروع مشترك بين جامعة ميشيغان وكلية جون هوبكنز للطب الذين نشروا مؤخراً عملية للطباعة باستخدام طبعة نانوية لأطباق مزارع أنسجة مصنوعة من البولستيرين (nanoimprint polystyrene tissue - culture dishes) واستخدام هذه الأطباق المنقوشة لدراسة ردود فعل الخلايا العضلية الملساء للشريان الرئوي البقري (bovine pulmonary artery smooth muscle cells) على الطوبوغرافيا النانوية (السمات السطحية النانوية) (nanotopography). ويظهر الشكل رقم (١٠, ٥) المحاذاة الخلوية (cellular alignment) والاستطالة الخلوية (cellular elongation) على هذه الأطباق المزخرفة وذلك وفقاً للارتباط بالطوبوغرافيا (التضاريس) السطحية [21] (الشكل رقم ١٠, ٥).



الشكل رقم (١٠,٥). تأثيرات الطبوغرافيا النانوية (السمات السطحية النانوية) (nanotopography) على سلوك الخلايا (cell behavior). (من (Hu, W., Yim, E.K.F., Reano, R.M. et al., *J. Vac. Sci. Technol. B*, 23, 2984, 2005).

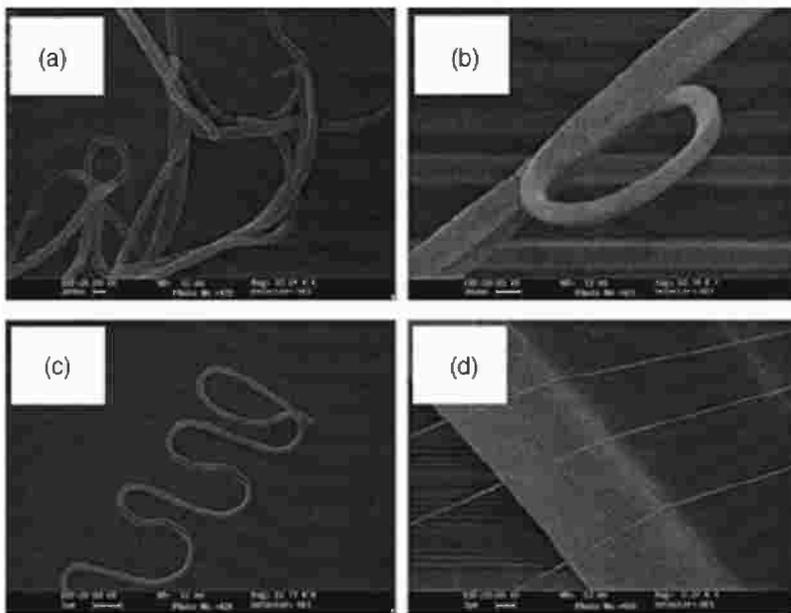
وتُذكر تقنية الحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL) بتقنية تُدعى القَوْلبة بالمساعدة الشعريّة (capillary - assisted molding)، أو ببساطة "الحفر الشعري" ("capillary lithography"). إن هاتين التقنيتين متشابهتان من حيث إن كليهما غالباً ما يستخدم قوالب رئيسية يتم تصنيعها عن طريق الحزم الإلكترونية (electron beamed master templates) لنقش أو زخرفة مساحة واسعة من البوليمر الذي يكون سريع التأثر إما بالحرارة وإما بالضوء وإما بالانذياب (solvation) وإما بالضغط. ويستخدم الحفر الشعري المُحدث حراريّاً (thermally induced capillary lithography) قالباً من بولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS mold) ذا أنماط أو نقوش مجوفة (recessed patterns) لتؤثر على فيلم رقيق من البوليمر. يُوضع القالب على تماس مع الفيلم، ويتم تسخين الفيلم فوق درجة حرارة تحوله، ويقوم الفعل الشعري (capillary action) بسحب البوليمر إلى داخل تجاويف البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS recesses). ويترك الفيلم ليبرد ويتصلب مرة أخرى، وتتم بعد ذلك إزالة قالب البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) تاركاً نمطاً أو نقشاً إيجابياً للبوليمر. ويحدد الاستقرار الكامن (inherent stability) في قالب البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) كثافة ودقة التباين من حوالي ١٠٠ نانومتر [38]. ويعمل "الحفر الشعريّ الناجم عن المذيبات" ("solvent - induced capillary lithography") بشكلٍ مشابه باستثناء أن قالب البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) ذا النقش المجوف يكون موضوعاً على فيلم البوليمر الذي يتم حله في كمية قليلة من المذيب. ويقوم الفعل الشعري بسحب المذيب إلى داخل التجاويف ساحباً معه البوليمر. وعلى أي حال، يتم امتصاص المذيب إلى داخل قالب البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) الذي يسمح بالانتشار بشكلٍ نسبي تاركاً فقط البوليمر وراءه. وفي النهاية سيبتشر المذيب من خلال القالب ويتبخر (evaporate) في الجو (atmosphere). ولا تزال الكثافة ودقة التباين محدودة بواسطة استخدام قالب البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) [38].

وقد عرض باحثون في مؤتمر عُقد عام ٢٠٠٧ في الصين استخدامهم لحفرٍ شعريٍّ مبني على المذيب وعلى الأشعة فوق البنفسجية لتعزيز نمو الخلايا العضلية القلبية (cardiac myocytes) على ركيضة من الزجاج [39]. وقد استخدموا قالباً من مادة البولي يوريثين المعدلة (modified polyurethane mold) وذلك للنقل الشعريِّ لكميات ضئيلة من محلول بولي (غليكول الإيثيلين) - ثنائي الميثاكريلات (PEG - DMA) الذي تم توزيعه بالتنقيط على الركيضة. ومن ثم تمت معالجة بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) باستخدام ضوء من الأشعة فوق البنفسجية قبل إزالة قالب البولي يوريثين تاركاً وراءه أعمدة نانوية على شكل مخروط (cone shaped nanopillars) مع طول من حوالي ٤٠٠ نانومتر وعرض من حوالي ١٥٠ نانومتر عند القاعدة. وقد أظهر بذر الخلايا العضلية القلبية الأساسية الجرذية (rat primary cardiomyocytes) بعد ذلك أن الخلايا العضلية (myocytes) قد نشرت أو مدت أرجلاً خيطية كاذبة (filopodia) وأقداماً صُفاحية (lamellipodia) بشكلٍ أساسي على طول الأعمدة النانوية (nanopillars)، كما هو واضح في الشكل رقم (١٠،٦). ورغم أن الالتصاق كان أقل بكثير منه من أجل عينات المراقبة الزجاجية، إلا أن التصاق الخلايا قد ازداد مع وجود الأعمدة النانوية بالمقارنة مع ركيضة من بولي (غليكول الإيثيلين) (PEG) خالية من الأعمدة [39].



الشكل رقم (١٠،٦). استجابة الخلايا العضلية القلبية الجرذية (rat cardiomyocyte cell) لركائز عامودية (أعمدة) نانوية من بولي غليكول الإيثيلين (PEG nanopillars). (من Kim, D., Kim, P., Suh, K. et al., *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 4, 4091, 2005).

وعلى النقيض من تشكيل حاملات خلايا وأنسجة ثنائية الأبعاد عن طريق الطلاء بطبقات غلاف خارجية من البوليمرات (coating polymers) على ركيزة، فقد استخدم Pisignano وآخرون الحفر الشعري لتشكيل ألياف صغيرة من البولي يوريثين (polyurethane fibers) ذات أقطار من حوالي ٣٠٠ نانومتر. وتعطي هذه العملية نتائج مماثلة لتلك التي تعطيها عملية الغزل الكهربائي، لكن لديها القدرة الإضافية على إنتاج حزم من الألياف (fiber bundles) المتراففة والموجهة بشكل عالٍ [40] (الشكل رقم ١٠,٧). لم يتم إجراء أي دراسات بيولوجية مباشرة على الألياف على الرغم أنه قد تم إنجاز بحوث سابقة على استخدام ألياف النانو المغزولة كهربائياً في هندسة الأنسجة [41].



الشكل رقم (١٠,٧). ألياف نانوية ناشئة عن طريق الحفر اللين (soft lithography). (تمت إعادة طباعته من Pisignano, D., Maruccio, G., (Mele, E. et al., *Appl. Phys. Lett.*, 87, 123109, 2005).

ومن الأشكال المختلفة الأخرى للحفر الشعري والتي لم تجد بعد الكثير من الاستخدام في الهندسة الطبية الحيوية (biomedical engineering) هو "الحفر الشعري بمساعدة الضغط" ("pressure assisted capillary lithography"). وكما يوحي الاسم، فإن هذا الحفر يستخدم قالباً مصنوعاً من مسحوق بوليمير تالقي غير متبلور (amorphous fluoropolymer powder mold) مُشكّل بالضغط بدلاً من البولي (ثنائي سيلوكسين الميثيل) (PDMS) ويضغط على البوليمر باستخدام ضغط بقيمة من ٢ إلى تقريباً ٣ بار (bar) عند درجة حرارة ١٦٠ مئوية (°C). ولا تزال أحجام السمات أكبر من ١٠٠ نانومتر ولكن لديها كثافات محسنة على السطح [38].

(١٠,٣,٢) تقنيات الكتابة المباشر Direct-Write Techniques

تتفوق تقنيات مستوى الرقاقة في السرعة والحجم إلا أنها تفتقر في كثيرٍ من الأحيان إلى حرية التصميم لأنها تستخدم قالباً واحداً كبيراً ليؤثر على العديد من المناطق بشكلٍ متطابق. النظير لهذه الطرق هي تقنيات الكتابة المباشرة (direct - write techniques). إن تقنيات الكتابة المباشرة قادرة على إنتاج نقوش أو زخرفة مفصلة بشكلٍ دقيق جداً (very finely detailed patterning) مع قدر كبير من الحرية فيما يتعلق بالتصميم إلا أنها تستهلك بشكلٍ عام وقتاً طويلاً جداً وتكون عملية فقط عندما يتم استخدامها على مناطق صغيرة. إن النظام العام لهذه التقنيات هو إما استخدام حزمة جسيمات مُركزة بإحكام (tightly focused particle beam) وإما استخدام مسبار (probe) صغير للمسح عبر سطح، للتأثير بدقة على نقش أو زخرفة تصميم محدد سلفاً.

(١٠,٣,٢,١) حزمة الجسيمات المُسرَّعة Accelerated Particle Beam

إن تقنيات حزمة الجسيمات المُسرَّعة (accelerated particle beam techniques) هي عائلة من التقنيات التي يتم فيها تسريع الجسيمات المشحونة (charged particles) بواسطة حقول كهربائية (electric fields) ويتم تركيزها في حزمة بواسطة مغناطيس (magnets). ويمكن توجيه حزم الجسيمات لضرب المواقع المستهدفة بدقة عالية وبدقات تباين نانومترية.

(١٠,٣,٢,١,١) الحزمة الإلكترونية Electron Beam

إن تقنية الكتابة المباشرة الأكثر شيوعاً هي "الحفر بالحزمة الإلكترونية" ("electron beam (e-beam) lithography") أو (EBL). إن الحفر بالحزمة الإلكترونية (EBL) هي تكنولوجيا كانت موجودة منذ الستينيات وتطورت بشكلٍ طبيعي من تطور المجهر الإلكتروني الماسح (scanning electron microscope) [26]. وكما يوحي الاسم، يبعث مصدر إلكترونات (electron source) حزمة إلكترونية مُركزة بإحكام والتي يتم استخدامها لزخرفة أو نقش مقاومة بشكلٍ مباشر تماماً بنفس طريقة الحفر الضوئي التي تستخدم الضوء، ولكن مع دقات تباين أصغر بكثير، تصل تقليدياً إلى ١٠ نانومترات. وعلى سبيل المقارنة، فإنه من المفيد أن نشير إلى أن طول موجة الضوء الأزرق (blue light) هو في حدود ٤٨٠ نانومتر، في حين أن طول موجة الإلكترون هي فقط جزء من النانومتر. إن مخطط الإنتاج (production scheme) هو إجراء إطلاق (lift - off procedure) عام - حيث يتم طلاء الركيزة بطبقة غلاف خارجية من مقاومة ليتم تعريضها لحزمة إلكترونية (e-beam resist)، تقوم الحزمة الإلكترونية بحفر نمط أو نقش في المقاومة ومن ثم يتم ترسيب معدن على السطح وأخيراً تتم إزالة المقاومة تاركةً فقط النمط أو النقش المعدني الملتصق بالركيزة في المكان الذي تم تعريضه للحزمة الإلكترونية. وقد كان البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) مُستخدمًا ولفترةٍ طويلة كمقاومة تقليدية [42] على الرغم من أن الباحثين ومنذ ذلك الحين كانوا قادرين وبشكلٍ مباشر على حفر مقاومات من ثاني أكسيد السيليكون (SiO₂ resists) [43] ومقاومات من فلوريد الليثيوم المستخلص من فلوريد الألومنيوم (AlF₃ - doped lithium fluoride resists) [44] لدقات تباين أدق قليلاً وذلك باستخدام تعرضات إلكترونية (electron exposures) أعلى بكثير. وعلى أي حال، إذا كانت مزايا استخدام الحفر بالحزمة الإلكترونية هي دقة التباين المحسنة وقدرات الكتابة المباشرة، إلا إن السليبات هي الحاجة لمعدات باهظة الثمن وأوقات معالجة (processing times) طويلة [23].

وقد استخدمت دراسات طبية حيوية في وقت سابق الحفر بالحزمة الإلكترونية (e-beam lithography) لإنشاء قوالب ذات ركائز عامودية (أعمدة) نانوية (nano - pillared molds) والتي يتم استخدامها بعد ذلك لزخرفة سطوح البولي كابرولاكتون (polycaprolactone - PCL) الساخنة بأعمدة نانوية. وقد بينت مثل هذه الدراسات أن خلايا الأرومة الليفية البشرية (human fibroblast cells) تُظهر، على سبيل المثال، أرجل استشعار خيطية كاذبة (sensing filipodia) أكثر على السطوح ذات الحفر النانوية (nanopits) بقطر من ٣٥ إلى ١٢٠ نانومتر بالمقارنة مع السطوح المستوية [45] (planar surfaces)، وتُظهر التصاقاً ضعيفاً [28]. ويبدو أنه يتم التحسس أو الاستشعار بالحفر من قبل الأرجل الخيطية الكاذبة التي تقوم بعد ذلك بتوجيه الخلايا لتكون متحركة أكثر بدلاً من أن تكون ملتصقة [45]. وقد تم أيضاً دمج التشكيل أو الزخرفة بالحزمة الإلكترونية (e-beam patterning) جنباً إلى جنب مع التجميع الذاتي للطبقات الأحادية [46] (self - assembling monolayers) والبوليمرات ذات الاستجابة الحرارية (thermally responsive polymers) [47] لإنشاء سطوح تتحكم بالتصاق وتشكيل أو زخرفة الخلايا أثناء البذر. وحتى على نطاق أكثر اتساعاً، يتم استخدام الحفر بالحزمة الإلكترونية بالتعاون مع عمليات الحفر الأخرى مثل الطبعة النانوية والحفر الشعري لتحسين دقات تباينها الطبيعية بشكل جذري. وفي الواقع، فإن عدداً قليلاً جداً من تقنيات الحفر النانوي لا تستخدم الحفر بالحزمة الإلكترونية (EBL) في شكل ما، عادةً لإنشاء أفنعة لنقل النقش أو الزخرفة (pattern transfer masks).

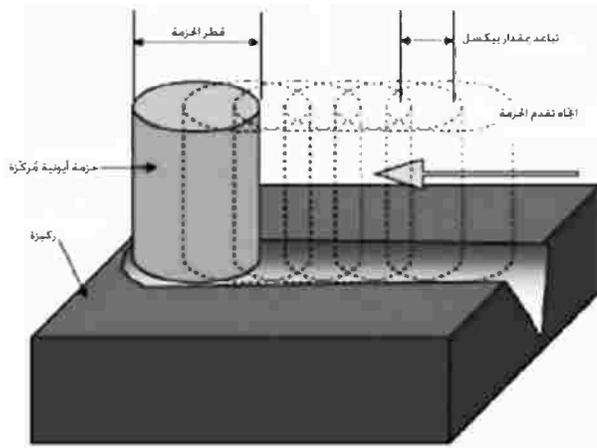
(١,٢,٣,١٠) الحزمة البروتونية Proton Beam

إن الكتابة بالحزمة البروتونية (proton beam writing - PBW) هي حفر مباشر بحزمة أيونية (ion beam direct lithography) ذات طاقة عالية حيث يتم فيها إنشاء أيون صغير (غالباً ما يكون الهيدروجين (hydrogen) أو الهيليوم (helium)) مع طاقة عالية ويتم فصله عن سحابه الإلكترونية (electron cloud) باستخدام حقول كهربائية اتجاهية (directional electric fields) قوية. فعندما يتم تركيزها وتوجيهها على الركيزة المستهدفة، تقصف هذه الحزمة الذرة المستهدفة (target atom) وتؤثر في الغالب على السحابة الإلكترونية للذرة؛ وبالتالي تؤثر إما على ذوبانيتها (قابلية ذوبانها) وإما في بعض الأحيان تؤثر على مؤشر انكسارها (refractive index) أو تبلورها (crystallinity). وكما هو الحال مع تقنيات المقاومة السابقة، تتأثر المقاومات البوليمرية (polymer resists) في مثل هذه الطريقة لتعزيز الربط البوليمري المتشابك (polymer cross - linking) (المقاومة السلبية negative resist) وجعلها منيعة على الذوبان (dissolution) أو لكسر الروابط التساهمية للبوليمر (polymer's covalent bonds) من خلال انفصال السلسلة (chain scission) (المقاومة الإيجابية positive resist)، مما يجعلها بالتالي عُرضة للمذيئات [48]. وقد تبين أن هذه العملية تنتج سمات تصل إلى ٥٠ نانومتراً في المقاومة الضوئية (SU-8) و ٣٠ نانومتراً في البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) [49] و ٢٢ نانومتراً في سيلسيس كيوأوكسين الهيدروجين (hydrogen silsesquioxane - HSQ) [50]. وبالمقارنة مع الحفر بالحزمة الإلكترونية (EBL)، فإن الكتابة بالحزمة البروتونية (PBW) لها مدى أطول مع انتشار جانبي (lateral spreading) أقل و "يمكن أن تُنشئ بُنى ذات أعماق من عشرات المايكرومترات وذات زاوية جدارية جانبية قريبة جداً من ٩٠ درجة وخشونة منخفضة جداً" [48]؛ ولذلك فهي مناسبة جداً لتعرض مواد المقاومات السميكة مثل البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) [51].

وعلى الرغم من أنها ليست شائعة مثل الحفر بالحزمة الإلكترونية، إلا أن الكتابة بالحزمة البروتونية (PBW) تشق طريقها في مجال بحوث هندسة الأنسجة. وتستههد مقالة منشورة في عام ٢٠٠٧ في (*Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*) على استخدام الكتابة بالحزمة البروتونية (PBW) لنقش أو زخرفة المقاومة الضوئية (SU-8) من أجل دراسة استجابة الخلايا البانية للعظم (osteoblasts response) للبنى النانوية (nanostructures) [52] وتُظهر أوراق أخرى عديدة بشير نجاح باستخدام الكتابة بالحزمة البروتونية (PBW) لنقش أو زخرفة السطوح ذات الصلة بالطب الحيوي مثل البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) والزجاج الحساس للضوء (photosensitive glass) وأرسنيد الغاليوم (GaAs) [51].

(١٠,٣,٢,١,٣) الحزمة الأيونية المركزة Focused Ion Beam

يستخدم الحفر بالحزمة الأيونية المركزة (focused ion beam lithography - FIBL) فيزياء القصف الأيوني (ion bombardment physics) المشابه لذلك المستخدم في الكتابة بالحزمة البروتونية (PBW) ولكن من خلال استخدامه لذرة أو جزيء أكبر. وتعتبر المجموعات العنقودية الصغيرة من الذهب (small gold clusters) وجزيئات الكوبالت ستين (C_{60} molecules) من الأمثلة الشائعة لجسيمات الحزمة الأيونية المركزة. يمكن لحزمة الجسيمات المركزة إزالة المادة مثل "الحفر بالرش" ("sputter etching") (ستتم مناقشته في الفقرة ١٠.٤.١)، ولكن يعتبر هذا الحفر أيضاً وبشكل عام تقنية كتابة مباشرة مثل الحفر بالحزمة الإلكترونية (EBL). ويستخدم الحفر بالحزمة الأيونية المركزة (FIBL) حقولاً كهربائية ساكنة (electrostatic fields) (كهروستاتيكية) وحقولاً مغناطيسية (magnetic fields) لتركيز حزمة أيونية ذات طاقة منخفضة (low energy ion beam) [48] عادةً تصل إلى أقطار من ٥٠ نانومتراً [53] (الشكل رقم ١٠.٨). ويمكن أن تُمرر الحزمة من خلال مرسام (stencil) على سطح ما مثل الحفر الضوئي التقليدي، ولكن يتم استخدامه في كثيرٍ من الأحيان في عمليات ترقيق (تحويل إلى رقائق) الشكل الحر (free - form milling processes) نظراً لتعقيدات بصريات الحزمة الأيونية (ion beam optics) [53]. وبسبب سرعاتها البطيئة في الكتابة، يتم اختيار الحزمة الأيونية المركزة (FIB) في كثيرٍ من الأحيان من أجل مهام الترقيق صغير المستوى [54,55] أكثر منها من أجل التطبيقات الطبية الحيوية. ومع ذلك، فإن بشير النجاح الحقيقي للحفر بالحزمة الأيونية المركزة (FIBL) في مستقبل هندسة الأنسجة وهندسة حاملة الخلايا يبقى في قدرته على الكتابة المباشرة على مجموعة متنوعة من السطوح الصلبة المتوافقة حيوياً (أي الزجاج والسيليكون وبعض المعادن) من دون استخدام المقاومات البوليمرية التي تكون عادةً ضرورية من أجل عملية الزخرفة أو النقش [55]. ولا يمكن حتى الآن لعمليات الحفر الضوئي والحفر باستخدام الحزمة الإلكترونية الادعاء بالقيام بذلك بكفاءة. بالإضافة إلى ذلك، يمكن لهذه التقنية أن تُوجّه بدقة وأن تكون مناسبة تماماً لإصلاح الأتعة التي تحتوي على أخطاء [48].



الشكل رقم (٨، ١٠). رسم تخطيطي لعملية الترقيق باستخدام الحزمة الأيونية المركزة (FIB milling). (تمت إعادة إنتاجها من Tseng, A.A., J. (2004). *Micromech. Microeng.* 14, R15, 2004).

وغالبًا ما يكون العيب المترتب على ذلك هو إعادة الترسيب (redeposition)، أي أن الذرات السطحية (surface atoms) التي تتم إزالتها يتم ترسيبها في أماكن أخرى على العينة. ويمكن التقليل من إعادة الترسيب باستخدام غاز تفكك كيميائي (chemical decomposition gas). وأثناء عملية الترقيق، فإن المادة السطحية المنزاحة (displaced surface material) إما أن تتحلل إلى غاز وإما أن تتفاعل مع غاز محيطي (ambient gas)، في كثير من الأحيان يكون الأكسجين، وذلك لتشكيل غاز مستقر (stable gas)، وبالتالي إزالة مشكلة انحراف الرش (sputter drift) وجعل النمط أو النقش أكثر نظافة [48].

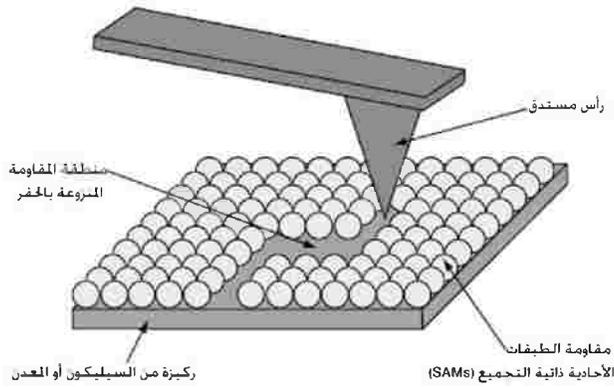
إن امتداد تقنية الحفر بالحزمة الأيونية المركزة (FIBL)، والذي لم ينتشر حتى الآن كأداة لهندسة الأنسجة هو "الترسيب باستخدام الحزمة الأيونية" ("ion beam deposition"). يتم هنا إنشاء غاز طليعة مؤقت (precursor gas) عن طريق تعريض مادة ما لحزمة أيونية ذات طاقة منخفضة بحيث تفكك المادة إلى مادة صلبة ومادة غازية (حيث تكون المادة الصلبة مُعلّقة في المادة الغازية). ويتم تقديم هذا الغاز عبر سطح قطعة العمل (workpiece surface) وتصطدم حزمة أيونية مُركزة ذات طاقة منخفضة بغاز الطليعة عند السطح، مؤديةً إلى تفككه إلى شكله الصلب وترسيبه على السطح [48].

(١٠، ٣، ٢، ٢) مسبار المسح Scanning Probe

(١٠، ٣، ٢، ٢، ١) مجهر القوة الذرية Atomic Force Microscopy

إذا كان من الممكن اعتبار الحفر الكيميائي (chemical etching) الشائع تقنية ذات قوة عمياء لنقش أو حفر سطح، فإن "الحفر النانوي باستخدام مسبار المسح" ("SPNL - scanning probe nanolithography") هو البديل الدقيق. فباستخدام تقنية مجهر القوة الذرية (atomic force microscopy - AFM)، يتم تغيير السطح، عادةً يتم حفره أو كتابته باستخدام رأس أو طرف صغير حاد (small sharp tip)، وفي القرب منه تتفاعل مواد كيميائية مع الجزء المحفور أو المكتوب (scribed)

(الشكل رقم ١٠,٩). وقد تم في البداية استخدام رؤوس من الماس (diamond tips) على اعتبار أنها الكاتب أو الناسخ (scribe) ولكن أصبحت الآن رؤوس مجهر القوة الذرية (AFM) (المغلّفة بطبقة من نثريد السيليكون (SiN) مع أنصاف أقطار من حوالي ٢٠ نانومتراً) شائعة ويمكن أن تكتب سمات مع عرض يصل إلى أقل من ٢٠ نانومتراً [56]. وفي أغلب الأحيان يتم غمر السطح في كاشف كيميائي (chemical reagent)؛ وبالتالي يحدث التفاعل بمجرد ما يُعري الكاتب أو الناسخ السطح الجديد. ومثل طرق الكتابة المباشرة الأخرى كالحفر باستخدام الحزمة الإلكترونية، فإن الفوائد التجريبية الرئيسية هي دقات التباين المحسّنة والحرية في كتابة أو نسخ معظم الأنماط أو النقوش ثنائية الأبعاد التي يمكن تخيلها. وبطريقة مماثلة، فإن العيوب هي الكفاءات المنخفضة وأوقات المعالجة الطويلة على الرغم من أنه في السنوات الأخيرة يحاول العديد من الابتكارات الجديدة التغلب على هذه المشكلة.



(الشكل رقم ١٠,٩). رسم تخطيطي للحفر بمسبار المسح (scanning probe lithography) باستخدام مقاومة ذات طبقات أحادية ذاتية التجميع (self-assembling monolayers - SAM). (من Norman, J.J. and Desai, T.A., *Ann. Biomed. Eng.*, 34, 89, 2006).

على سبيل المثال، إن الفكرة التي انطوت على تشكيل أو زخرفة الكولاجين (collagen patterning) هي استخدام طرق كيميائية حيوية طبيعية (normal biochemical methods) من أجل ترسيب الكولاجين بالتجميع الذاتي (deposition of self - assembling collagen)، ولكن بعد ذلك باستخدام تقنية مبنية على مجهر القوة الذرية (AFM) لتشكيل أو زخرفة البروتين. ففي عام ٢٠٠٤ أظهر Jian وآخرون أن الكولاجين الجلدي البقري المذاب (collagen solubilized bovine dermal) سيترسب ويتجمع بشكل ذاتي عندما ينتشر على سطح الميكا المشقوق (cleaved mica surface) حديثاً. وبعد ٤ إلى ٥ ساعات استقرت مصفوفة الكولاجين (collagen array) في بُنى صلبة ولكن في غضون ذلك الوقت أمكن معالجة هذا البروتين عن طريق إنفاذ رأس مجهر القوة الذرية (AFM tip) عبر السطح. وعند استخدام المسح الإبري (stylus scanning) بواسطة قلم مستدق الرأس عند قوى بقيمة ٣٠٠ بيكو نيوتن (300pN)، يمكن إعادة ترتيب أو محاذاة ليفات الكولاجين المايكروية الأصلية (native collagen microfibrils) أو حتى تجميعها في ألياف طويلة ذات طول من حوالي ١٠٠ مايكرومتر بينما يتم الحفاظ على ارتفاع طبيعي من حوالي ٣ نانومتراً. بالإضافة إلى ذلك، حتى وعلى الرغم

من كون الليفيات المايكروية مُجبرة على الترتيب أو المحاذاة بشكل ميكانيكي، فقد وضَّح المؤلفون بأن "هذه المادة تبقى متواصلة جزيئياً" مضيفين بأنه، "إذا كانت إعادة توجيه الليفيات المايكروية بواسطة إبرة مجهر القوة الذرية (AFM stylus) تقطع الروابط بين جزيئات الكولاجين، فإن هذه الروابط ستعيد بعد ذلك وبوضوح إصلاح نفسها من جديد" [57].

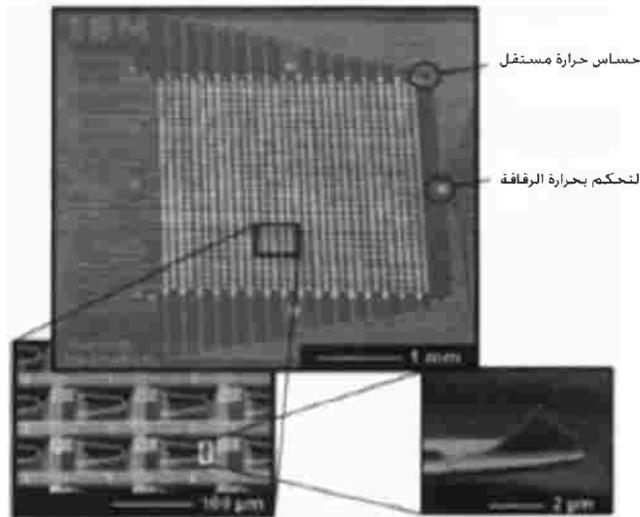
وهناك طريقة أقل قوة وهي تسخين رأس مجهر القوة الذرية (AFM) باستخدام المقاومة الكهربائية (resistively heat) بدلاً من تطبيق المزيد من الضغط. ويمكن لرأس مجهر القوة الذرية (AFM) الساخن أن يقوم بتعديل سطح ما إما كيميائياً عن طريق التأثير على منطقة حساسة بشكل كيميائي حراري (thermochemically susceptible region) (من خلال الأكسدة (oxidation) أو التحلل (degradation) أو الربط المتشابك، ... إلخ) وإما بشكل فيزيائي، عموماً من خلال تغيير الشكل (التشويه) (deformation). ففي عام ٢٠٠٧ تبين بأن هذه الطريقة تكتب خطوطاً عريضة تصل إلى أقل من ١٢ نانومتراً في بوليمر مشترك خاص ويمكن أن تُنشئ كثافة خطوط تصل إلى 2×10^6 خطوط في المتر الواحد [5].

(١٠,٣,٢,٢,٢) الرأس المنغمس Dip-Pen

واحدة من الأفكار المنتشرة بشكل متزايد والتي أتت من الحفر النانوي باستخدام مسبار المسح (SPNL) هي "الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس" ("DPN - dip - pen nanolithography"). حيث يتم هنا "تعبير" ("inked") أو غمس (dipped) رأس مجهر القوة الذرية (AFM tip) في محلول من بروتين أو ببتيد أو مادة كيميائية أخرى ذات الاهتمام؛ ومن ثم يتم مسحه (scanned) على طول السطح، حيث يقوم بترسيب الجزيئات المحببة (inked molecules) من خلال الانتشار الكتلي (mass diffusion) [58]. وبطبيعة الحال، فإن الكولاجين هو واحد من بروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM) الأكثر شهرة، فهو يجذب قدرًا لا بأس به من البحوث من خلال الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN). وقد ذكر Wilson وآخرون في عام ٢٠٠٧ الطباعة الإيجابية (positive printing) لخطوط من الكولاجين من ٣٠ إلى ٥٠ نانومتراً على رقائق من الميكا الخضراء الخزفية المطلية بطبقة من الذهب (gold - coated muscovite green mica wafers). إن الميزة الحقيقية لهذه الطريقة هي أنها "حافظت على البنية الحلزونية الثلاثية (triple - helical structure) والفعالية البيولوجية (biological activity) للكولاجين وحتى أنها عززت تشكيل مستويات تنظيم بنيوي أعلى وبخصائص مميزة" [58]. بالإضافة إلى ذلك، كان تشكيل مثل هذه الزخرفة ناجحاً من أجل ارتفاعات تصل إلى ٣٠٠ نانومتر وأطوال تصل إلى ١٠٠ مايكرومتر.

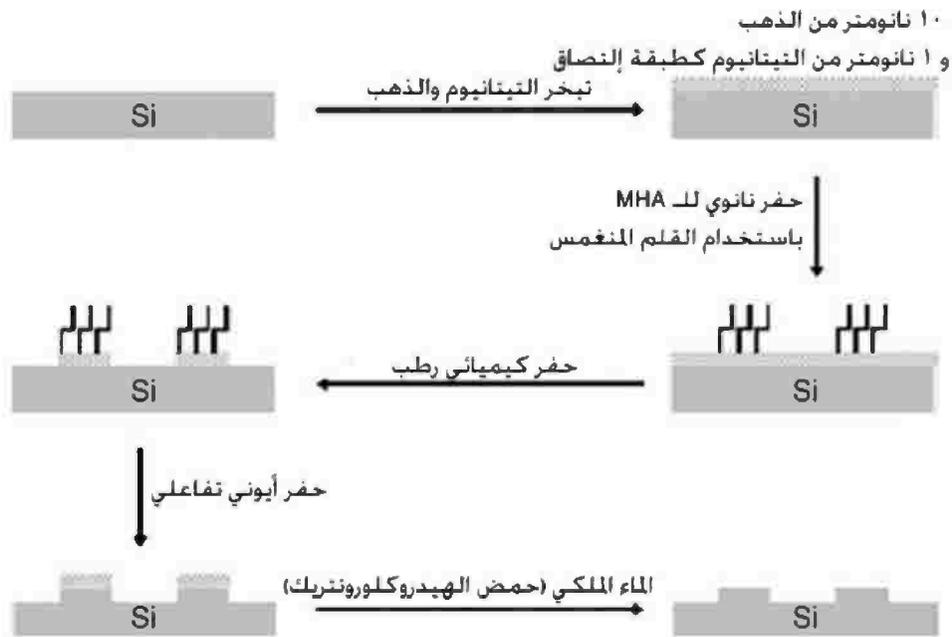
بالإضافة إلى ذلك، يمكن للإنزيمات (enzymes) أن تلتصق برأس مجهر القوة الذرية المغلف بطبقة من نثر يد السيليكون (SiN AFM tip) وذلك من أجل التحريض بقوة على مزيد من التفاعلات الكيميائية الموضعية (localized chemical reactions). فعلى سبيل المثال، لقد تبين أنه يمكن استخدام إنزيم الفسفاناز - ستربتايفدين القلوي (alkaline phosphatase - streptavidin) المثبت على رأس مجهر القوة الذرية (AFM) لنزع فسفات (dephosphorylate) الـ (BCIP) في وجود العامل المشارك (NBT) (cofactor) وبذلك يترسب الـ (BCIP). وبالتالي؛ فإن مسح مثل رأس مجهر القوة الذرية (AFM) هذا عبر سطح الميكا المغطى بالـ (BCIP / NBT) يترك آثاراً خطية (linear traces) خفيفة من رواسب (precipitate) ذات عرض من ١٥٠ إلى ١٧٠ نانومتر وارتفاع من ١٠ نانومتراً [59].

ولأن سرعة الكتابة للحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN) هي بشكلٍ عام محدودة من خلال معدلات الانتشار الكتلي (mass diffusion rates) للجزيئات الملتصقة برأس المجهر (عندما يتم نقلها إلى الركيزة) أو في الحالات الكيميائية الحرارية (thermochemical cases) من خلال الانتشار الحراري (heat diffusion) [5]، فإن زمن المعالجة وقابلية التوسع (scalability) قد تمت الإشارة إليها في أغلب الأحيان على أنها العوائق الرئيسية للحفر باستخدام مسبار المسح [22,23]. مع أخذ ذلك في الاعتبار، فقد بدأ الباحثون باستكشاف طرق موازية لعمليات الحفر باستخدام مسبار المسح وبدرجات متفاوتة من القبول. ففي حين يؤكد المؤيدون بأن كفاءة الحفر النانوي باستخدام الرأس أو القلم المنغمس (DPN) يمكن تحسينها بشكلٍ كبير وببساطة عن طريق استخدام رؤوس متعددة لمجهر القوة الذرية (multiple AFM tips) موضوعة على التوازي [5,60]، يبقون المتقدين على أن التقنيات الأخرى مثل الحفر باستخدام الطبعة النانوية (NIL) ستبقى على الأرجح "أكثر مرونة وأكثر سرعة" [23]. ومع ذلك، فإن لشركة آي بي إم (IBM) تجارب جارية حالياً لدراسة فعالية مصفوفات الرقاقت ثنائية الأبعاد عالية الكثافة (high - density 2D chip arrays) مع رؤوس نانوية (ذات عتلات) مشابهة لرؤوس مجهر القوة الذرية (AFM - like cantilever tips) [61] في مشروع أطلق عليه اسم "الدودة الألفية" ("Millipede") [61,62] (الشكل رقم ١٠.١٠). فعلى الرغم من أنه قد تم تصورها لتستخدم من أجل أغراض تخزين البيانات [63]، إلا أن استخدامها للتقنيات الكيميائية الحرارية المعيارية (standard thermochemical techniques) للحفر أو الكتابة على البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) سيجد بلا شك تطبيقات طبية حيوية في المستقبل.



الشكل رقم (١٠، ١٠). مصفوفات رقاقت ثنائية الأبعاد (2D chip arrays) مع رؤوس نانوية (ذات عتلات) مشابهة لرؤوس مجهر القوة الذرية (AFM-like cantilever tips). (من Vettiger, P., Brugger, J., Despont, M. et al. 1999. *Microelectron. Eng.*, 46, 11, 1999).

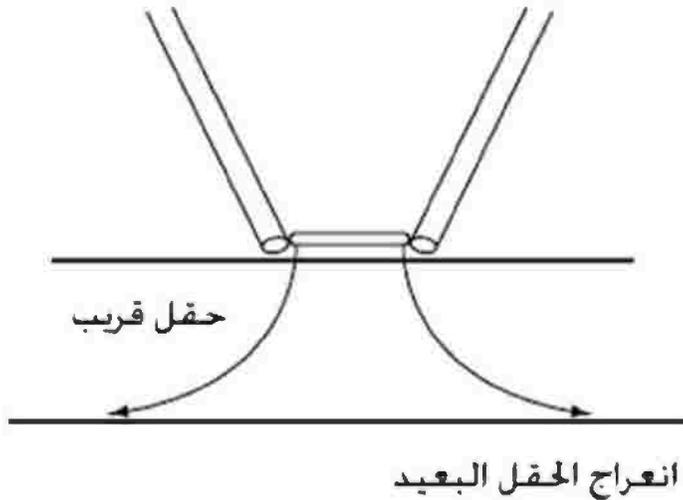
ويمكن للحفر بواسطة مسبار المسح أن يتم استخدامه أيضاً بالتعاون مع تقنيات الزخرفة أو النقش (patterning techniques) الأخرى. فكما ذكر سابقاً، يتم انجاز الحفر الأيوني التفاعلي بشكل عام من خلال قناع مقاوم (resistive mask) تم تشكيله أو نقشه من خلال الحفر بالحزمة الإلكترونية. ومع ذلك، تذكر نشرة دورية تم إصدارها مؤخراً من قبل Zhang وآخرين استخدام الحفر النانوي بالرأس أو القلم المنغمس (DPN) لكتابة حمض ١٦ - ميركابتو هيكسا ديكانويك (16-mercaptohexadecanoic acid - MHA)؛ مما يؤدي إلى حفر قناع (etching mask) مع أبعاد في المجال النانومتري على ركيزة من السيليكون مغلقة بطبقة من الذهب / التيتانيوم (Au / Ti - coated Si substrate) [60]. ومن ثم يقوم حفر كيميائي رطب (wet chemical etch) بحفر كامل السطح، كاشفاً الزخارف أو النقوش الذهبية المكتوبة (written gold patterns). ويقوم حفر أيوني تفاعلي لاحق بإزالة الذهب تاركاً البنى النانوية السيليكونية (Si nanostructures) في النقش الذي تمت كتابته في البداية بواسطة مجهر القوة الذرية (AFM). في هذه الطريقة تم نقش الركيزة السيليكونية (Si substrate) مع خطوط سيليكونية إيجابية (positive Si lines) (بعرض ٣١٢ نانومتر وبارتفاع ١٦ نانومتراً) ومع نقاط (بقطر ٣٨٥ نانومتر وبارتفاع ٧٥ نانومتراً) [60] (الشكل رقم ١٠، ١١).



الشكل رقم (١٠، ١١). استخدام الحفر النانوي بالرأس أو القلم المنغمس (DPN) لإنشاء خطوط سيليكونية (nanopatterned Si lines) نانوية منقوشة أو مزخرفة (nanopatterned Si lines) على ركيزة من السيليكون (Si). (تمت إعادة إنتاجها من Zhang, H.,

Near-Field Scanning Probe مسبار المسح في الحقل القريب (١٠,٣,٢,٢,٣)

ثمة طريقة أخرى وراء التلاعب بطول الموجة (wavelength manipulation) وذلك لتجنب حد الانعراج الخاص بالحفر الضوئي الذي تم مناقشته سابقاً وهي استخدام طريقة الحقل القريب (near - field approach). إن وضع القناع على تماس مع المقاومة يحد من مقدار الفراغ أو المساحة التي يتوجب على الضوء أن ينعرج فيها؛ وبالتالي يؤدي إلى زيادة دقة التباين. وثمة خيار لا يُستخدم فيه القناع يُسمى "الحفر الضوئي بواسطة المسح في الحقل القريب" ("near - field scanning optical lithography") حيث يتم إطلاق ضوء من خلال مسبار من الألياف الضوئية مُغلف بالألمنيوم (aluminum - wrapped fiber - optic probe) وضيق جداً، حيث يقوم بالمسح عبر السطح. واعتماداً على حجم المسبار، يمكن الحصول على دقات تباين من حوالي ٥٠ نانومتراً (الشكل رقم ١٠,١٢). ولأن هذه الطريقة تتطلب تحكماً دقيقاً بالمسافة بين مصدر الضوء والمقاومة، فإنه يجري حالياً دراسة الطبقات الأحادية ذاتية التجميع (self - assembling monolayers - SAMs) بحماسة إضافية. ومن الممكن تعديل سماكة الطبقات الأحادية ذاتية التجميع (SAMs) في المستوى النانومتري عن طريق إضافة سلاسل بطول من ١ إلى ٢ نانومتر بشكلٍ متعاقب. ومن المثير للاهتمام، أن الحفر الضوئي في الحقل القريب باستخدام الطبقات الأحادية ذاتية التجميع (SAMs) يمكن أن يُنجز سمات بين ٢٠ و ٤٠ نانومتراً حتى وعلى الرغم من أن حجم المسبار هو على وجه التقريب ٥٠ نانومتراً [64]. إن أحد التفسيرات لذلك هو أن الضوء يحث البلازمون (plasmon) المحتوى بشكلٍ عالٍ على السطح الذهبي، والذي يؤثر بالتالي على التركيب الكيميائي للطبقة الأحادية ذاتية التجميع (SAM) في المواضع القريبة جداً تاركاً أجزاءً عُرضة للإزالة من قبل المذيب [64].



الشكل رقم (١٠,١٢). يُلغى الحفر الضوئي باستخدام المسح في الحقل القريب (near - field scanning optical lithography) حد الانعراج

(diffraction limit). (تمت إعادة طباعته من Legget, G.J., *Nanolithography and Patterning Techniques in*

Microelectronics, (Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2005).

١٠,٤) طرق متنوعة MISCELLANEOUS

وتوجد أيضاً تقنيات حفر نانوي متنوعة تعتمد على عمليات الحفر الأخرى، وفي بعض الأحيان تعتمد على كلٍ من الحفر من الأعلى إلى الأسفل والحفر من الأسفل إلى الأعلى على حدٍ سواء. فعلى سبيل المثال، ينطوي الحفر أو النقش النانوي دائماً تقريباً على شكل من أشكال الحفر باستخدام الحزمة الإلكترونية (e-beam) أو الحزمة الأيونية المركزة (FIB) وذلك لإنشاء قناع. وبطريقة ماثلة، فإن دقة تباين ترسيب الظل (shadow deposition) تعتمد على أي عدد من مجموعات أو مزاولات حزمة الجسيمات المسرّعة (accelerated particle beam) ومسبار المسح (scanning probe) والحفر الكيميائي (chemical etching). وقد تحدت النتائج والقبول العام لهذه الطرق في الحفر النانوي والطب الحيوي عن طريق الجمع والتوازن بين المزايا والمساوئ لسابقتها أو أسلافها التأسيسية.

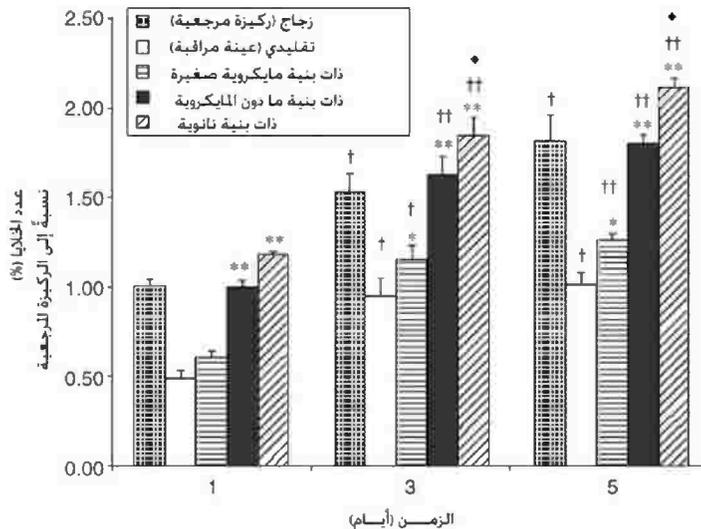
١٠,٤,١) الحفر أو النقش Etching

لقد جدد في الآونة الأخيرة أيضاً حب الاستطلاع حول العلاقة بين السلوك الخلوي (cellular behavior) ومناطقه المحيطة ذات البنية النانومترية تلك التقنيات الكيميائية الكلاسيكية كالحفر أو النقش الكيميائي والحفر أو النقش بالرش (sputter etching). ويستخدم الحفر بالرش حالة من أنواع أيونية ذات طاقة منخفضة (low energy ion species) مع أيونات أثقل (أكسجين (O) أو أرغون (Ar) أو غالسيوم (Ga) أو زينون (Xe)) في شكل بلازما (plasma form) ليزيل بالحفر الذرات السطحية بعيداً عن "قطعة العمل" ("workpiece"). ويتم إنجاز زخرفة أو نقش السطح عن طريق استخدام أقنعة مقاومات نموذجية مرسومة بواسطة مرسام (typical stenciled resist masks) وذلك لتغطية قطعة العمل. ويتم تشكيل سحابة البلازما (plasma cloud) عن طريق تطبيق حقل كهربائي مستمر أو ذي تردد راديوي (DC or radio - frequency electric field) على غاز من ذرات منخفض الضغط وهكذا فإن الأيونات والإلكترونات المتأينة (ionized electrons) ستواجه بالتالي بشكلٍ مشتركٍ في نفس حجم الأنواع التي تتأين وتعيد تركيبها باستمرار. ويتم بعد ذلك "قصف قطعة العمل المغمورة بشكلٍ عشوائي" ("randomly bombarded") بواسطة الأيونات الموجبة التي تؤثر على قطعة العمل المعرضة وأي طبقة مقاومة في نفس الوقت. ومن المناسب اعتبار هذه الاصطدامات الأيونية ذات الطاقة المنخفضة (low energy ion collisions) وكأنها في الأساس كرات لعبة بلياردو ذرية؛ حيث تنطلق الأيونات الموجبة الأكبر بسرعة فائقة من خلال السحابة الإلكترونية للذرة المستهدفة، بحيث تصطدم مع النواة ويمكن أن تطرد أو تُطلق الذرات السطحية المستهدفة إذا كانت طاقة مثل ذلك التصادم أكبر من طاقة الربط الشعريّ أو الشبكيّ (lattice binding energy) للذرة المستهدفة. ويكون عمق الاختراق (penetration depth) عادةً من ١ إلى ١٠٠ نانومتر، ومرة أخرى يمكن أن يُشكّل إعادة الترسيب مشكلة [48].

والبدليل للحفر بالرش هو "الحفر الأيوني التفاعلي" ("reactive ion etching" - RIE)، ويُسمّى أيضاً "الحفر الجاف" ("dry etching"). وهو في الأساس مثل الحفر أو النقش بالرش ما عدا أن غاز البلازما (plasma gas) يكون تفاعلياً مع المادة التي سيتم حفرها بالنسبة للمقاومة. إن نفس التقنية يمكن أن تُستخدم أيضاً للتفاعل مع الجسيمات التي تتم إزالتها من أجل الحد من إعادة الترسيب. وليس من الضروري أن تُغمر قطعة العمل في البلازما إذا ما تم وضع انحياز (bias) عبر النظام لسحب الأيونات الموجبة ويمكن ضبط أو تعديل كثافة البلازما (plasma density) والطاقة عن طريق تغيير تيار الإثارة

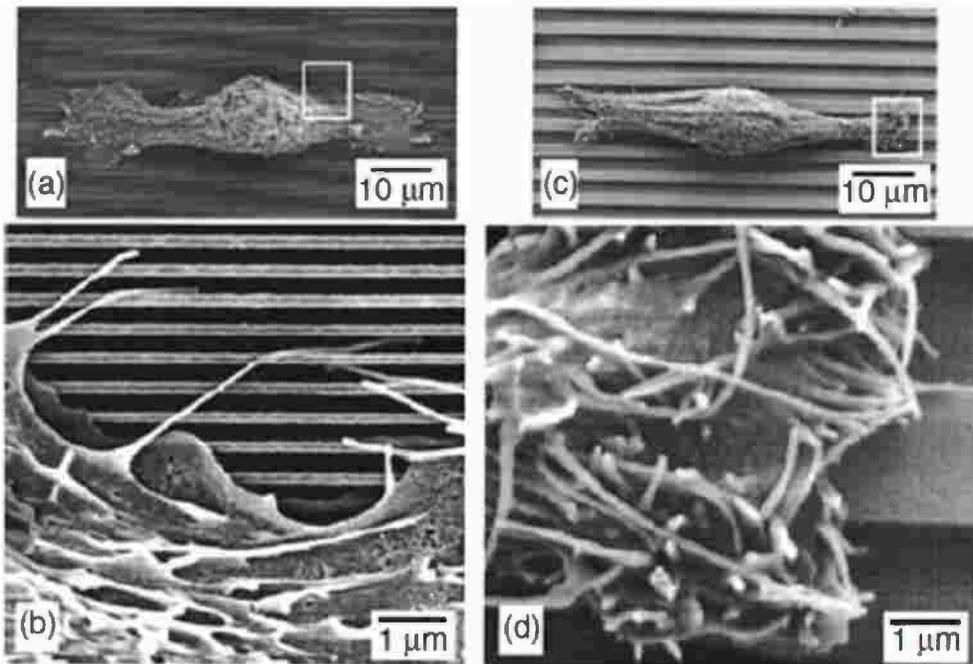
(excitation current) أو ضغط الغاز (gas pressure). وهناك شكل آخر مختلف يدعى الحفر أو النقش بمساعدة الغاز (gas assisted etching) حيث يستخدم حزمة أيونية بدلاً من البلازما لفصل أو تحديد السمات. إن هذا التركيب مشابه لمخطط الترسيب باستخدام الحزمة الأيونية (ion beam deposition scheme) الذي سبق وأن تمت الإشارة إليه ما عدا أنه يتم استبدال غاز الحفر الكيميائي بغاز الطليعة [48].

وقد استخدم فريق بحثي في إنديانا بالولايات المتحدة بقيادة Karen Haberstroh الحفر أو النقش في عام ٢٠٠٣ للتلاعب بالتصاق الخلايا العضلية الملساء لثلاثة العنم (ovine bladder smooth muscle cells - SMCs) على أفلام من بولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PLGA) ومن البولي يوريثان (PU). ويرى الفريق بأنه ومن خلال الزخرفة أو النقش النانوي (nanopatterning) سوف يعزز التفاعل المتزايد بين الخلايا والركيزة (cell - substrate interaction) آمالاً جديدة في المستقبل من أجل بُنى اصطناعية بديلة للثلاثة (artificial bladder replacement constructs). ففي حين أن هذه الدراسة لا تشرح الحفر أو النقش بالرش أو الحفر الأيوني التفاعلي، ولكن تشرح إلى حد ما استخدامات الحفر الكيميائي بواسطة هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) وحمض النتريك (HNO_3)، فإنه وعلى الرغم من ذلك فقد تم تشكيل حفر نانوي عشوائي لسمات ما بين ٥٠ و ١٠٠ نانومتر. وتُظهر النتائج في الشكل رقم (١٠،١٣) أن الخلايا العضلية الملساء (SMCs) للثلاثة تزيد في الواقع من وظيفة الخلايا على بولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) ذي البنية النانومترية (nanostructured PGLA) بالمقارنة مع ركيزة عينة المراقبة الزجاجية (glass control substrate) وبولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PGLA) غير المعالج [65] (الشكل رقم ١٠،١٣).



الشكل رقم (١٠،١٣). تأثيرات الطوبوغرافيا النانوية (السمات السطحية النانوية) (nanotopography) على وظيفة الخلايا العضلية الملساء للثلاثة (bladder SMC). (من (Thapa, A., Miller, D.C., Webster, T.J. et al., *Biomaterials*, 24, 2915, 2003).

وفي العام نفسه، استخدم Teixeira وآخرون في ولأبي ويسكونسن بالولايات المتحدة تقنية الحفر أو النقش الأيوني التفاعلي الأكثر تحديداً وذلك لحفر رقائق السليكون إلى أخاديد (grooves) بعرض ٧٠ نانومتراً، والتي زرعوها عليها خلايا ظهارية قَرْنِيَّة بشرية (human corneal epithelial cells). وقد فعلوا ذلك من خلال قناع من البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA mask) الذي تم نقشه أو زخرفته بواسطة الحفر بالحزمة الإلكترونية وقد تم استخدام (SF_6) و ($C_2H_2F_4$) على اعتبار أنه الغاز التفاعلي (reactive gas). ونتيجة لذلك؛ فقد رصفت الخلايا نفسها على طول الأخاديد، متخليّة عن الشكل المستدير (round shape) الذي هو شائع عادةً عندما تُزرع الخلايا على السطوح الملساء (smooth surfaces) [66] (الشكل رقم ١٠،١٤). وبطريقة مماثلة، وفي العام نفسه قامت مجموعة بحثية في اليابان بتعديل سطح رقاقة من السيليكون باستخدام غاز سداسي فلوريد الكبريت (SF_6) وغاز الأكسجين (O_2) من خلال قناع من الكوبالت (cobalt mask). وقد كان هدفهم النهائي من وراء الحفر بالغاز (gas etch)، على أي حال، هو ترسيب طبقة أحادية ذاتية التجميع (SAM) في النقش أو الزخرفة [67]، والتي يمكن بعد ذلك وبشكلٍ مفترض أن تُحدّد وظيفياً (functionalized) من أجل الأغراض الطبية الحيوية مثل امتزاز أو امتصاص البروتين (protein adsorption) [68].

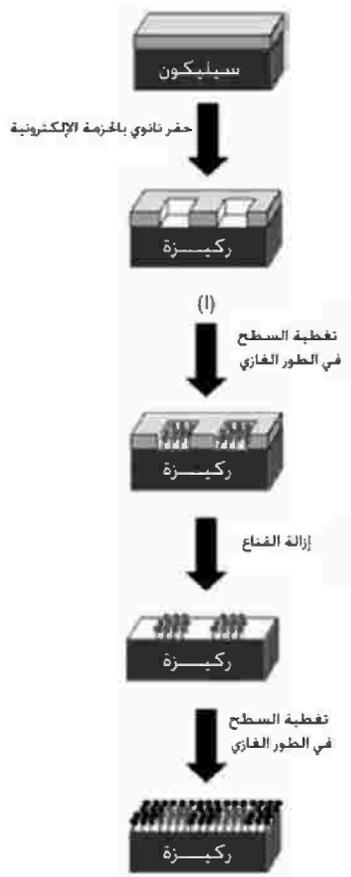


الشكل رقم (١٠،١٤). محاذاة الخلايا (cell alignment) لسطح ذي نقوش أو زخرفة نانوية (nanopatterned surface). (من Teixeira, A.I.,

(Abrams, G.A., Murphy, C.J. et al., *J. Vac. Sci. Technol. B*, 21, 683, 2003).

Shadow Deposition ترسيب الظل (١٠،٤،٢)

هناك تقنية أخرى تعتمد على دقات تباين الحزمة الإلكترونية (e-beam resolution) وهي "ترسيب الظل" ("shadow deposition") وذلك من خلال استخدام مرسام (استنسل) نانوي (nanostencil). إن المادة التي سيتم ترسيبها هنا يتم تبخيرها إما فيزيائياً وإما كيميائياً، غالباً في بيئة خَلَائِيَّة (vacuum environment). يغادر البخار بشكل عمودي من السطح بحيث يمكن تمريره من خلال مرسام ذو نمط زخرفة أو نقش محدد ويطرسب على سطح آخر وراء المرسام. ويمكن نحت أو نقش المرسام (الاستنسل) عند مستويات ما دون المايكرون (submicron levels) وذلك باستخدام طرق الحزمة الإلكترونية أو الحزمة الأيونية المركزة (FIB) أو مسبار المسح. إن أحد الجوانب السلبية يتمثل في احتمال أن يصبح المرسام عرضة للانسداد (clogging) والانحناء (bending) والمشاكل المرتبطة باختلال أو سوء المحاذاة (misalignment) [69] (الشكل رقم ١٠،١٥).



الشكل رقم (١٠،١٥). تفاعل السيلنة في الطور الغازي (gas - phase silanization reaction) لتغطية السطح بالتجميع الذاتي للجزيئات ألكوكسي سيلين العضوية الوظيفية من خلال مرسام أو استنسل من البولي (ميثاكريلات الميثيل) محفور بواسطة حزمة إلكترونية (e-beamed PMMA stencil). (تمت إعادة طباعتها من Pallandre, A., Glinel, K., Jonas, A.M. et

في عام ٢٠٠٤، ذكر Pallandre وآخرون استخدام تفاعل سيلنة في الطور الغازي (gas - phase silanization reaction) وذلك لترسيب طبقة أحادية من السيلين (silane monolayer) (وهو مركب سيليكون هيدروجيني) على رقاقة من السيليكون من خلال مرسام أو استنسل من البولي (ميثاكريلات الميثيل) (PMMA) محفور بواسطة حزمة إلكترونية (e-beam - etched PMMA stencil). وقد كان النمط أو النقش النانومتري (nanopattern) الناتج ليس فقط بدقة تباين عالية (من ٢٠ إلى ٢٥ نانومتراً) ولكن كان علاوة على ذلك سريع التأثير أيضاً بالتصاق مجموعة واسعة من المحددات الوظيفية الكيميائية (chemical functionalities) [70] والتي يمكن أن تُستخدم بعد ذلك وبشكلٍ تصوري من أجل الالتصاقات البيولوجية (biological attachments) والمعالجات أو التلاعبات البيولوجية (biological manipulations). وكإثبات للمفهوم، فقد أتبع Pallandre وآخرون تجربة السيلنة الغازية (gas - silanization) (تغطية السطح بالتجميع الذاتي لجزيئات آلوكوسي سيلين العضوية الوظيفية، أي جزيئات آلكيل أكسجين سيليكون - هيدروجين، بواسطة الغاز) في وقت لاحق من العام نفسه بتقرير حول امتزاز أو امتصاص (adsorption) بروتين كروي نموذجي (typical globular protein) (وهو بروتين P.69 pertactin) على شرائط أو خطوط نانوية (nanostripes) متوازية من آلكيل سيلين (alkylsilane). وقد وجدوا أنهم لم يستطيعوا فقط أن يحددوا موضع امتزاز أو امتصاص البروتين ولكن من خلال تغيير عرض الشرائط أو الخطوط النانوية استطاعوا أيضاً تغيير اتجاه البروتين. فشرائط أو خطوط نانوية بعرض أقل من ٥٠ نانومتراً من شأنها أن تشجع البروتين على الالتصاق عند محوره الأطول المتعامد مع الشريط أو الخط في حين شجعت الشرائط أو الخطوط النانوية الأعرض على الامتزاز الموازي أو "المسطح" (parallel or "flat" adsorption) [71].

(١٠,٥) الاستنتاجات CONCLUSIONS

عند مناقشة استخدامات الحفر النانوي في حمل الخلايا والأنسجة (scaffolding) وهندسة الأنسجة، فإنه وفي الوقت نفسه يصبح من المثير أن نتخيل الكثير من الإمكانيات التي نتظرنا ومن العائق أن نفكر في الكمية الكبيرة من البحوث التي لا يزال يتعين القيام بها. فعلى الرغم من أن الحفر كان موجوداً منذ قرون وحتى أن الكثير من التقنيات المتقدمة كانت موجودة منذ عقود عدة، إلا أن تطبيقات الحفر النانوي من تلك التقنيات تعتبر تطورات حديثة إلى حد ما. إن جميع عمليات الحفر بواسطة الأشعة السينية (X-ray) والحزمة الإلكترونية (e-beam) والطبعة (imprint) والنقش (etching) ومسبار المسح (scanning probe) قد تم استخدامها في الطرق الخاصة بها وذلك من أجل زخرفة أو نقش السطوح بهدف أن تكون حاملات خلايا وأنسجة يتم استخدامها في هندسة الأنسجة. إن كل طريقة من هذه الطرق لها ميزاتها وعيوبها الخاصة بها، ولا تزال بعد كل طريقة تنمو وتتوسع يوماً بعد يوم مع كل التطورات الجديدة التي تحدث في المواد والتقنية. وربما قد تم الآن نقل الحفر النانوي من أصوله العلمية الأدنى، إلا أنه ومن المفارقات أنه يقود ويُقاد على حد سواء من خلال الهدف الحالي وأكثر من أي وقت مضى بحيث سيؤدي في يوم من الأيام إلى إنشاء سطوح قادرة على دعم أنسجة كاملة الوظيفة بشكلٍ اصطناعي.

المراجع REFERENCES

- [1] Trawick M, Angelescu D, Chaikin P, et al. 2005. Block copolymer nanolithography. In *Nanolithography and Patterning Techniques in Microelectronics*. 1st ed. Bucknall DG (Ed.), 1–38. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- [2] Senefelder A. 1968. *A Complete Course of Lithography*. 2nd ed. New York: Da Capo Press.
- [3] Wenniger MA. 1983. *Lithography: A Complete Guide*. 1st ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall.
- [4] Fouque V. 1973. *The Truth Concerning the Invention of Photography: Nicephore Niepce, His Life, Letters, and Works*. 2nd ed. New York: Arno Press.
- [5] Szoszkiewicz R, Okada T, Jones SC, et al. 2007. High-speed, sub-15 nm feature size thermochemical nanolithography. *Nano letters* 7(4):1064–1069.
- [6] Park M, Chaikin PM, Register RA, et al. 2001. Large area dense nanoscale patterning of arbitrary surfaces. *Applied Physics Letters* 79(2):257–259.
- [7] Wei, XL, Mo, ZH, Li, B, and Wei, JM. 2007. Disruption of HepG2 cell adhesion by gold nanoparticle and paclitaxel disclosed by in situ QCM measurement. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces* 59(1):100–104.
- [8] Zhang, H, Amro, NA, Disawal, S, et al. 2007. High-throughput dip-pen-nanolithography-based fabrication of Si nanostructures. *Small* 3(1): 81.
- [9] Nowak AP, Breedveld V, Pakstis L, et al. 2002. Rapidly recovering hydrogel scaffolds from self-assembling diblock copolypeptide amphiphiles. *Nature* 417(6887):424.
- [10] Hartgerink JD, Beniash E, and Stupp SI. 2001. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science* 294(5547):1684.
- [11] Kisiday J, Jin M, Kurz, B, et al. 2002. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(15):9996.
- [12] Semino CE, Merok JR, Crane GG, et al. 2003. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation* 71(4–5):262.
- [13] Holmes T, de Lacalle S, Su X, et al. 2000. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12):6728.
- [14] Colin JR. 2005. MIT soft-lithography method harnesses DNA. *Electronic Engineering Times* (1376): 46–46.
- [15] Patel, N, Bhandari, R, Shakesheff, KM, et al. 2000. Printing patterns of biospecifically-adsorbed protein. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 11(3):319–331.
- [16] Kane RS, Takayama S, Ostuni E, et al. 1999. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 20:2363–2376.
- [17] Chen CS, Mrksich M, Huang S, et al. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276(5317):1425–1428.
- [18] Dike LE, Chen CS, Mrksich M, et al. 1999. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal* 35(8):441–448.
- [19] Bailly M, Yan L, Whitesides GM, et al. 1998. Regulation of protrusion shape and adhesion to the substratum during chemotactic responses of mammalian carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 241(2):285–299.

- [20] Colin JR. 2005. MIT soft-lithography method harnesses DNA. *Electronic Engineering Times* (1376):46–46.
- [21] Hu W, Yim EKF, Reano RM, et al. 2005. Effects of nanoimprinted patterns in tissue-culture polystyrene on cell behavior. *Journal of Vacuum Science Technology. B, Microelectronics Processing and Phenomena* 23(6):2984.
- [22] Hoff DJ, Cheng L, Meyhofer E, et al. 2004. Nanoscale protein patterning by imprint lithography. *Nano Letters* 4(5):853–857.
- [23] Gaubert HE and Frey W. 2007. Highly parallel fabrication of nanopatterned surfaces with nanoscale orthogonal biofunctionalization imprint lithography. *Nanotechnology* 18(13):135101.
- [24] Fowles, GR. 1968. *Introduction to Modern Optics*. 1st ed. 105–144. New York: Holt, Rinehart and Winston, Inc.
- [25] Solak HH. 2006. Topical review: Nanolithography with coherent extreme ultraviolet light. *Journal of Physics. D, Applied Physics* 39(10):R171–R188.
- [26] Hohn FJ. 1994. Nanolithography, the integrated system. In *Nanolithography: A Borderland between STM, EB, IB, and X-Ray Lithographies*. 1st ed. Gentili M, Giovannella C, and Selci S (Eds.), pp. 1–11. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- [27] Seunarine K, Tormen M, Gadegaard N, et al. 2006. Progress towards tubes with regular nanopatterned inner surfaces. *Journal of Vacuum Science Technology. B, Microelectronics Processing and Phenomena* 24(6):3258.
- [28] Gallagher JO, McGhee KF, Wilkinson CDW, et al. 2002. Interaction of animal cells with ordered nanotopography. *IEEE Transactions on Nanobioscience* 1(1):24.
- [29] Luther W. 2004. International strategy and foresight report on nanoscience and nanotechnology. 1–47.
- [30] Shao DB and Chen SC. 2005. Surface-plasmon-assisted nanoscale photolithography by polarized light. *Applied Physics Letters* 86(25):253107.
- [31] Hubert C, Romyantseva A, Lerondel G, et al. 2005. Near-field photochemical imaging of noble metal nanostructures. *Nano Letters* 5(4):615.
- [32] Koenderink AF, Hernandez JV, Robicheaux F, et al. 2007. Programmable nanolithography with Plasmon nanoparticle arrays. *Nano Letters* 7(3):745.
- [33] Xia Y and Whitesides GM. 1998. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science* 28:153.
- [34] Chou SY, Krauss PR, Zhang W, et al. 1997. Sub-10 nm imprint lithography and applications. *The Journal of Vacuum Science and Technology B* 15(6):2897.
- [35] Chou SY. 2003. Nanoimprint lithography. In *Alternative Lithography: Unleashing the Potentials of Nanotechnology*. 1st ed. Sotomayor Torres, Clivia M (Eds.), pp. 15–23. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [36] Choi S, Yoo PJ, Baek SJ, et al. 2004. An ultraviolet-curable mold for sub-100-nm lithography. *Journal of the American Chemical Society* 126:7744–7745.
- [37] Chen CS, Jiang X, and Whitesides GM. 2005. Microengineering the environment of mammalian cells in culture. *MRS Bulletin* 30(March):194–201.
- [38] Yoo PJ, Suh KY, Kim YS, et al. 2005. Patterning of polymer thin films. In *Nanolithography and Patterning Techniques in Microelectronics*. 1st ed. Bucknall DG (Ed.), 155–183. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- [39] Kim D, Kim P, Suh K, et al. 2005. Modulation of adhesion and growth of cardiac myocytes by surface nanotopography. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 4:4091.
- [40] Pisignano D, Maruccio G, Mele E, et al. 2005. Polymer nanofibers by soft lithography. *Applied physics letters* 87(12):123109.

- [41] Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, et al. 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24(12):2077–2082.
- [42] Hatzakis M. 1994. Electron beam resists and pattern transfer methods. In *Nanolithography: A Borderland between STM, EB, IB, and X-Ray Lithographies*. 1st ed. Gentili M, Giovannella C, and Selci S (Eds.), 13–23. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- [43] Pan X and Broers AN. 1994. Direct writing of nanoscale patterns in SiO₂. In *Nanolithography: A Borderland between STM, EB, IB, and X-Ray Lithographies*. 1st ed. Gentili M, Giovannella C, Selci S (Eds.), 45–51. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- [44] Langheinrich W and Beneking H. 1994. Sub-10nm Electron beam lithography: -AlF₃-doped lithium fluoride as a resist. In *Nanolithography: A Borderland between STM, EB, IB, and X-Ray Lithographies*. 1st ed. Gentili M, Giovannella C, Selci S (Eds.), 53–56. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- [45] Dalby MJ, Gadegaard N, Riehle MO, et al. 2004. Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology* 36(10):2005.
- [46] Geyer W, Stadler V, Eck W, et al. 2001. Electron induced chemical nanolithography with self-assembled monolayers. *Journal of Vacuum Science Technology. B, Microelectronics Processing and Phenomena* 19(6):2732.
- [47] Yamato M, Konno C, Utsumi M, et al. 2002. Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture. *Biomaterials* 23(2):561.
- [48] Grime GW. 2005. Ion beam patterning. In *Nanolithography and Patterning Techniques in Microelectronics*. 1st ed. DG Bucknall (Ed.), 184–217. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- [49] van Kan JA, Bettiol AA, and Watt F. 2003. Three-dimensional nanolithography using proton beam writing. *Applied Physics Letters* 83(8):1629.
- [50] van Kan, Jeroen A., Bettiol AA, et al. 2006. Proton beam writing of three-dimensional nanostructures in hydrogen silsesquioxane. *Nano Letters* 6(3):579.
- [51] Mistry P, Gomez-Morilla I, Grime GW, et al. 2006. Proton beam lithography at the University of Surrey's Ion Beam Centre. *Nuclear Instruments Methods in Physics Research. Section B, Beam Interactions with Materials and Atoms* 242(1–2):387–389.
- [52] Gorelick S, Rahkila P, Sajavaara T, et al. 2007. Growth of osteoblasts on lithographically modified surfaces. *Nuclear Instruments Methods in Physics Research. Section B, Beam Interactions with Materials and Atoms* 260(1):130.
- [53] Tseng AA. 2004. Recent developments in micromilling using focused ion beam technology. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 14:R15.
- [54] Arshak K, Mihov M, Arshak A, et al. 2004. Novel dry-developed focused ion beam lithography scheme for nanostructure applications. *Microelectronic Engineering* 73=74:144–151.
- [55] Youn SW, Takahashi M, Goto H, et al. 2006. Microstructuring of glassy carbon mold for glass embossing- Comparison of focused ion beam, nano/femtosecond-pulsed laser and mechanical machining. *Microelectronic Engineering* 83(11–12):2482.
- [56] Linford M, Davis R, Magleby S, et al. 2005. Chemomechanical surface modification of materials for patterning. In *Nanolithography and Patterning Techniques in Microelectronics*. 1st ed. Bucknall DG (Ed.), 120–154. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- [57] Jiang F, Khairy K, Poole K, et al. 2004. Creating nanoscopic collagen matrices using atomic force microscopy. *Microscopy Research and Technique* 64(5–6):435.
- [58] Wilson DL, Martin R, Hong S, et al. 2001. Surface organization and nanopatterning of collagen by dip-pen nanolithography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(24):13660.

- [59] Riemenschneider L, Blank S, and Radmacher M. 2005. Enzyme-assisted nanolithography. *Nano letters* 5(9):1643.
- [60] Zhang H, Amro NA, Disawal S, et al. 2007. High-throughput dip-pen-nanolithography-based fabrication of Si nanostructures. *Small* 3(1):81.
- [61] Vettiger P, Brugger J, Despont M, et al. 1999. Ultrahigh density, high-data-rate NEMS-based AFM data storage system. *Microelectronic Engineering* 46(1–4):11.
- [62] Vettiger P, Despont M, Drechsler U, et al. 2000. Millipede' more than one thousand tips for future AFM data storage. *IBM Journal of Research and Development* 44(3):323.
- [63] Torres, Clivia M. Sotomayor. 2003. Alternative lithography: An introduction. In *Alternative Lithography: Unleashing the Potentials of Nanotechnology*. 1st ed. Sotomayor T, Clivia M (Eds.), 1–14. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [64] Legget GJ. 2005. Photolithography beyond the diffraction limit. In *Nanolithography and Patterning Techniques in Microelectronics*. 1st ed. Bucknall DG (Ed.), 238–266. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- [65] Thapa A, Miller DC, Webster TJ, et al. 2003. Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. *Biomaterials* 24(17):2915.
- [66] Teixeira AI, Abrams GA, Murphy CJ, et al. 2003. Cell behavior on lithographically defined nanostructured substrates. *Journal of Vacuum Science Technology. B, Microelectronics Processing and Phenomena* 21(2):683.
- [67] Wang C, More SD, Wang Z, et al. 2003. Patterning SiO thin films using synchrotron radiation stimulated etching with a Co contact mask. *Journal of Vacuum Science Technology. B, Microelectronics Processing and Phenomena* 21(2):818.
- [68] Sheller NB, Petrash S, and Foster MD. 1998. Atomic force microscopy and X-ray reflectivity studies of albumin adsorbed onto self-assembled monolayers of hexadecyltrichlorosilane. *Langmuir* 14 (16):4535.
- [69] Brugger J and Kim G. 2005. Nanofabrication by shadow deposition through nanostencils. In *Nanolithography and Patterning Techniques in Microelectronics*. 1st ed. Bucknall DG (Ed.), 218–237. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- [70] Pallandre A, Glinel K, Jonas AM, et al. 2004. Binary nanopatterned surfaces prepared from silane monolayers. *Nano Letters* 4(2):365–371.
- [71] Pallandre A, De Meersman B, Blondeau F, et al. 2005. Tuning the orientation of an antigen by adsorption onto nanostructured templates. *Journal of the American Chemical Society* 127:4320–4325.
- [72] Norman JJ and Desai TA. 2006. Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering* 34(1):89.