

حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية

التجميع من أجل هندسة الأنسجة والطب التجديدي

Designer Self-Assembling Peptide Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine

Akihiro Horii, Xiumei Wang, and Shuguang Zhang

المحتويات CONTENTS

| | | |
|-----|--|---|
| ٤٣٢ | INTRODUCTION | مقدمة (١١,١) |
| ٤٣٢ | SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING | حاملات الخلايا والأنسجة من أجل هندسة الأنسجة (١١,٢) |
| ٤٣٤ | IDEAL BIOLOGICAL SCAFFOLD | حاملة الخلايا والأنسجة البيولوجية المثالية (١١,٣) |
| ٤٣٤ | SELF-ASSEMBLING PEPTIDE SCAFFOLDS | حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع (١١,٤) |
| ٤٣٥ | IN VITRO TISSUE CULTURES | مزارع الأنسجة في المختبر (١١,٥) |
| | SELF-ASSEMBLING | حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع من أجل الطب التجديدي (١١,٦) |
| ٤٣٦ | PEPTIDE SCAFFOLDS FOR REGENERATIVE MEDICINE | |
| | DESIGNER SELF-ASSEMBLING | حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع (١١,٧) |
| ٤٣٨ | PEPTIDE SCAFFOLDS | |
| | Designer Peptide | حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة من أجل تمايز وهجرة الخلايا (١١,٧,١) |
| ٤٤٣ | Scaffolds for Cell Differentiation and Migration | |
| | WHY DESIGNER | لماذا حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع؟ (١١,٨) |
| ٤٤٥ | SELF-ASSEMBLING PEPTIDE SCAFFOLDS? | |
| ٤٤٦ | REFERENCES | المراجع |

INTRODUCTION (١١،١) مقدمة

يتطلب تقدم علم الأحياء في الغالب تطوير مواد وطرق وأدوات جديدة بإمكانها تسريع الاكتشافات العلمية إلى حد كبير. وقد أدى إدخال طبق البتري (petri dish) قبل أكثر من مائة عام إلى توفير أداة لا غنى عنها لزراعة الخلايا في المختبر (culturing cells in vitro)؛ مما يسمح بإجراء تحليل أو تشريح مُفصّل لأنظمة بيولوجية وفيزيولوجية على ما يبدو أنها مستعصية إلى وحدات تحكم طيّعة ودراسات واضحة المعالم. وقد كان لهذا الطبق البسيط أثرٌ عميقٌ على فهمنا لعلم الأحياء المعقد، وبصفة خاصة بيولوجيا الخلايا (cell biology) وبيولوجيا الأعصاب (neurobiology).

وبهذه الطريقة، يتطلب الطب التجديدي (regenerative medicine) وهندسة الأنسجة مكونين رئيسين مكملين لبعضهما بعضاً. أحدهما، هو حامله الخلايا والأنسجة المتوافقة بيولوجياً (biologically compatible scaffold)، والتي يمكن أن يتقبلها الجسم بسهولة من دون أي أضرار، والعنصر الآخر هو الخلايا الملائمة بما في ذلك مختلف الخلايا الجذعية أو الخلايا الأولية (primary cells) التي تحل بصورة فعالة محل الأنسجة المتضررة (damaged tissues) من دون أي آثار سلبية (adverse consequences). وعلى أي حال، فإنه من المفيد لو أمكن استخدام حاملات خلايا وأنسجة بيولوجية مناسبة وفعالة لتحفيز (stimulate) وتعزيز (promote) تمايز الخلايا، بالإضافة إلى تجديد الأنسجة من دون إدخال خلايا أجنبية غريبة (foreign cells).

يشهد مجال الطب التجديدي نمواً سريعاً ومن غير الممكن تغطيته بصورة شاملة في بضعة صفحات؛ وبالتالي فإننا سنركّز في هذه الاستعراض فقط على العمل الذي يختص بحاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية التركيبية المصممة ذاتية التجميع (synthetic designer self - assembling peptide scaffolds) التي تم تطويرها في مختبرنا ومن قبل زملائنا منذ عام ١٩٩٢. ويمكن للقراء المهتمين بالتطورات التي حدثت في المواد الحيوية الاطلاع على الفصول الأخرى في هذا الكتاب وبصورة واسعة على مجموع المقالات التي كتبت حول هذا الموضوع.

SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING (١١،٢) حاملات الخلايا والأنسجة من أجل هندسة الأنسجة

ما هي المواد الحيوية؟ يختلف التعريف. من وجهة نظرنا، هناك اختلاف بين المواد الحيوية (biomaterials) والمواد البيولوجية (biological materials). فالمواد الحيوية تشير إلى المواد المستخدمة في التطبيقات الطبية (medical applications) في العقود القليلة الأخيرة بما في ذلك العديد من البوليمرات الاصطناعية أو التركيبية (synthetic polymers)، مثل البولي (دي، إل - لاكتيد) (poly-(D,L-lactide) - PLLA) والبولي (حمض اللاكتيك - كو - غليكوليك) (poly-(lactic-co-glycolic acid) - PLGA). ومن ناحية أخرى، تشير المواد البيولوجية في الواقع إلى المواد ذات الأصل البيولوجي، بما في ذلك الألبينات (alginate) والسيليلوز (cellulose) والمواد الشحمية (lipid materials) والكتيتين (chitin) والببتيد (peptide)، والمواد ذات الأساس البروتيني (protein - based materials) على سبيل المثال، الكولاجين (collagen) والحريير (silk) وحريير العنكبوت (spider silk) والمواد اللاصقة الحيوية (bioadhesives).

لقد طورت أنظمة الزراعة المصنوعة من المواد الحيوية البوليمرية (polymer biomaterial culture systems) فهما لتفاعلات الخلايا - المادة بشكل كبير وعززت مجالاً جديداً لهندسة الأنسجة [1]. ومع ذلك، فإن حاملات الخلايا والأنسجة ذات المسامية العالية (high - porosity scaffolds) والتي تضم هذه المواد الحيوية غالباً ما يتم صنعها من ألياف مايكروية دقيقة (microfibers) ذات قطر من حوالي ٥ إلى ٥٠ مايكرومتراً أو مسامات مايكروية دقيقة (micropores) يبلغ حجمها من ١٠ إلى ٥٠ مايكرومتراً. وحيث أن حجم معظم الخلايا (حوالي من ٥ إلى ٢٠ مايكرومتراً) يماثل أو أصغر من حجم هذه البنى المايكروية (microstructures) (حوالي من ١٠ إلى ١٠٠ مايكرومتراً)، فإن الخلايا عند التصاقها أو ارتكازها ستبقى تُظهر سطحاً طوبوغرافياً ذا بعد ثنائي (-2-D topography) مع انحناء (curvature) يتوقف على أقطار الألياف المايكروية الدقيقة أو على حجم المسام على التوالي. ولزراعة الخلايا فعلاً في بيئة مايكروية ثلاثية الأبعاد (3-D microenvironment)، فإن هذه الأبعاد يجب أن تكون أصغر بكثير من حجم الخلايا بحيث ينبغي على الخلايا أن تكون محاطة تماماً بحاملات الخلايا والأنسجة، بشكل يشابه وإلى حد كبير البيئة خارج الخلية (extracellular environment).

وغالباً ما يتم تحديد أو تخصيص المواد الحيوية البوليمرية (polymer biomaterials) وظيفياً باستخدام عنصر بيتيد حمض الأرجينين - الغليسين - الأسبارتيك (RGD peptide motif) أو عناصر أخرى؛ وذلك من أجل تعزيز الفعاليات البيولوجية (biological activities) المرغوب فيها من خلال التفاعلات الكيميائية (chemical reactions) أو الطلاء (التغليف) (coating). ونظراً لأن أحجامها في المستوى المايكروي، فإن متانتها الميكانيكية (mechanical strength) عادةً ما تمنع المزيد من عمليات التكيف البنوية للمادة (material structural adaptations) من القوى التي يتم بذلها بواسطة الهيكل الخلوي (cytoskeleton) للخلايا أثناء عمليات التصاقها وهجرتها ونضوجها أو اكتمال نموها. وهكذا، وعلى الرغم من أن هذه الألياف المايكروية الدقيقة توفر بيئة خارج خلوية اصطناعية، إلا أنها لا تزال بعيدة عن المصفوفة خارج الخلية الطبيعية في المستوى النانوي (natural nanoscale extracellular matrix - ECM). وقد تم في السنوات الأخيرة اعتماد تقنية راسخة، وهي تقنية الغزل الكهربائي (electrospinning)، وذلك لغزل الألياف المايكروية الدقيقة لنفس هذه المواد [2]؛ وعلى أي حال، فإن قسوة أو شدة العملية بصورة عامة ووجود المذيب الكيميائي الضار (harmful chemical solvent) يحولان دون أي إمكانية لإضافة الخلايا أثناء تشكيل حاملات الخلايا والأنسجة. وقد أُجريت محاولات لبذر حاملة الخلايا والأنسجة في ظروف ديناميكية (dynamic conditions) أو فقط على سطوحها، إلا أنه حتى لو حدث انتقال أو هجرة كبيرة للخلايا (cell migration)، فإن عملية البذر المنتظمة والصحيحة للخلايا في مصفوفة حقيقية ثلاثية الأبعاد (3-D matrix) لا تزال تمثل عقبة يجب التغلب عليها.

لتغليف (encapsulation) المواد غير المستقرة والنشطة حيوياً (labile bioactive substances) والخلايا الحية (living cells)، فإن حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية المتشابكة فيزيائياً بشكل مستعرض (cross - linked nanofiber scaffolds) تكون ذات أهمية كبرى، وبشكل خاص إذا حدث تشكيل حاملة الخلايا والأنسجة في ظروف فيزيولوجية معتدلة (mild physiological conditions) من دون أي معالجات بالمذيبات العضوية (organic solvents). إن هناك حاجة إلى معالجة حاملات الخلايا والأنسجة في بيئة مائية (aqueous environment) ذات مجال مرغوب فيه من درجة الحموضة (pH) أو درجة الحرارة أو المحفزات المحددة (specific catalysts) التي يمكن أن تتحكم بخصائصها البنوية المايكروية (microstructure properties).

IDEAL BIOLOGICAL SCAFFOLD (١١،٣) **حاملة الخلايا والأنسجة البيولوجية المثالية**

هناك عدد من الإستراتيجيات لتصنيع المواد البيولوجية. وعلى أي حال، فإن حاملة الخلايا والأنسجة البيولوجية المثالية يجب أن تفي بالعديد من المتطلبات. (١) يجب أن تكون كتل البناء (building blocks) مُستَمَدّة من مصادر بيولوجية (biological sources)، و (٢) يجب أن تكون الوحدات الأساسية (basic units) قابلة للتصميم وللتعديل وذلك من أجل تحقيق احتياجات محددة، و (٣) أن تُبدي معدلاً مُتحكماً به من التحلل الحيوي للمادة (material biodegradation)، و (٤) ألا تُظهر سمية خلوية (cytotoxicity)، و (٥) أن تُعزز تفاعلات الخلايا - الركيزة (cell - substrate interactions)، و (٦) ألا تُثير استجابات مناعية (immune responses) أو تُثير القليل منها، ولا تؤدي إلى حدوث التهاب (inflammation)، و (٧) أن يكون هناك قدرة على إنتاج وتنقية (purification) ومعالجة المادة مع إمكانية تغيير حجمها (scalable) وبطريقة قابلة لإعادة الإنتاج (reproducible) ويمكن تحملها اقتصادياً، و (٨) أن تكون قابلة للنقل (transportable) بسهولة، و (٩) أن تكون متوافقة كيميائياً (chemically compatible) مع المحاليل المائية (aqueous solutions) والظروف الفيزيولوجية، و (١٠) أن تندمج في الجسم من دون أي ضرر.

SELF-ASSEMBLING PEPTIDE SCAFFOLDS (١١،٤) **حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع**

تتتمي حاملة الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع (self - assembling peptide scaffold) إلى فئة المواد المحفزة بيولوجياً (biologically inspired materials). وقد تم اكتشاف العضو الأول في العائلة، وهو الـ (EAK16-II AEAEAKAKAEAEAKAK)، من جزء من بروتين الخميرة (yeast protein) وهو الزوتين (Zuotin) [3]. وتتألف حاملات الخلايا والأنسجة من أحماض أمينية متناوبة (alternating amino acids) والتي تحتوي على بقايا مشحونة (charged residues) بنسبة ٥٠٪ [3,4]. وتمتاز هذه الببتيدات بعدد مرات تكرارها الدوري (periodic repeats) من تناوب للأحماض الأمينية الأيونية المحبة للماء (hydrophilic) والأحماض الأمينية الأيونية الكارهة للماء (hydrophobic) والتي تشكل عفوياً بُنى بيتا الصفيحية (β -sheet structures). إن لصفائح بيتا سطوحاً قطبية وغير قطبية (polar and nonpolar surfaces) متميزة. فهي قابلة للطفو بشكلٍ متماثل (isobuooyant) في المحاليل المائية ويمكن نقلها بسهولة إلى بيئات مختلفة. وعند التعرض لمحاليل مائية ذات درجة حموضة (pH) محايدة، تحجز الأيونات البقايا الببتيدية المشحونة (charged peptide residues) وتتجمع آلياً (alanines) (التي تُشكل السطوح غير القطبية للصفائح بيتا) صفائح بيتا المختلفة معاً، وذلك بفعل تفاعلاتها الكارهة للماء (hydrophobic interactions) في الماء؛ مما يعطي أليافاً نانوية ثنائية الطبقات من صفائح بيتا (double - layered β -sheets) (nanofibers)، وهي بنية موجودة في فيبروين الحرير (silk fibroin) من دودة القز ومن العناكب. وبالتالي؛ فإن الخطوة النهائية للتجميع الذاتي التي تُكوّن حاملة الخلايا والأنسجة الببتيدية تتم تحت ظروف فيزيولوجية، ويبلغ قطر الألياف الفردية حوالي ١٠ نانومترات. في المواقع المشحونة، يتم تراكم كلٍّ من الشحنات الموجبة والشحنات السالبة معاً من خلال التفاعلات الأيونية بين الجزيئات (intermolecular ionic interactions) بطريقة مشابهة لرقعة الشطرنج أو الداما (checkerboard - like manner). وبصورة عامة، تشكل الببتيدات ذاتية التجميع تلك (self - assembling peptides) بُنى

مستقرة من صفائح بيتا في الماء، والتي تكون مستقرة عبر مجال واسع من درجة الحرارة ومجالات واسعة من درجة الحموضة (pH) في تركيز عالٍ لعامل اليوريا المحول للصفات الطبيعية (denaturing agent urea) وهيدروكلوريد الغوانيديوم (guanidium hydrochloride). وترتبط كثافة ألياف النانو بتركيز المحلول الببتيدي وتحتفظ الألياف النانوية بدرجة هيدراتية أو إمامة (إضافة الماء) (hydration) عالية جداً، أكبر من ٩٩٪ في الماء (من ٥ إلى ١٠ ميلليغرامات / ميليلتر، وزن / حجم). وقد تم تصميم وتمييز عدد من الببتيدات الإضافية ذاتية التجميع بما في ذلك: RADA16-I (AcN-RADARADARADARADA- CNH2) و RADA16-II (AcN-RARADADARARADADA- CNH2)، والتي تحل فيها بقايا الأرجينين (arginine) والأسبارتات (aspartate) محل الليسين (lysine) والغلوتامات (glutamate) وذلك لتكوين حاملة خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية بمساعدة الملح (salt - facilitated nanofiber scaffold).

لقد تم ذكر العديد من الببتيدات ذاتية التجميع التي تشكل حاملات الخلايا والأنسجة ولا تزال الأعداد تتزايد [5,6]. تؤثر العديد من العوامل على تشكيل حاملة الخلايا والأنسجة وخصائصها الميكانيكية (mechanical properties)، اثنان منها هما مستوى الكره للماء (hydrophobicity) [7-12] وطول التسلسل الببتيدي (peptide sequence). وهكذا، بالإضافة إلى التفاعلات الأيونية التكميلية (ionic complementary interactions)، يمكن أن يؤثر امتداد البقايا الكارهة للماء (hydrophobic residues، Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp) (أو الرموز ذات الأحرف المفردة A, V, I, L, Y, P, W) وبناءً على ذلك يمكن أن يؤثر عدد مرات تكرار العنصر ذاتي التجميع وبشكل ملحوظ على الخصائص الميكانيكية لحاملات الخلايا والأنسجة وسرعة تجميعها الذاتي. وكلما زاد المحتوى الكاره للماء وزاد طول التسلسل الببتيدي؛ كان تشكيل حاملة الخلايا والأنسجة أسهل وكانت خصائصها الميكانيكية أفضل [7,8,11,13].

(١١،٥) مزارع الأنسجة في المختبر IN VITRO TISSUE CULTURES

لقد أصبحت حاملات الخلايا والأنسجة البيولوجية الببتيدية ذاتية التجميع الجديدة هذه مهمة بشكل متزايد ليس فقط في دراسة السلوكيات المكانية للخلايا (spatial behaviors of cells)، بل أيضاً في تطوير الطرق من أجل مجموعة واسعة من التكنولوجيات الطبية المبتكرة بما في ذلك الطب التجديدي. إن أحد الأمثلة على ذلك هو استخدام حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية لدعم نمو ونضوج المحوار أو محور العصب (neurite growth and maturation) [14] وتمييز الخلايا الجذعية العصبية (neural stem cell differentiation) والخلايا العصبية القلبية (cardiac myocytes) وخلايا العظم ومزارع الخلايا الغضروفية (cartilage cell cultures). تشكل حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصنوعة من الـ (RADA16-I) والـ (RADA16-II) حاملة خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية في المحاليل الفيزيولوجية، حيث حفزت النمو الممتد لمحور العصب الجُرُذ (extensive rat neurite outgrowth) وقد تم وبنجاح إنجاز تشكيل نقاط الاشتباك العصبي أو المشابك (active synapses formation) على سطح الببتيد (peptide surface) [14].

وقد أظهر Navarro - Alvarez وآخرون [15] بأن حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية التي تتألف من RADA16-I يمكن أن تدعم زراعة خلايا كبد الخنزير المعزولة (isolated porcine hepatocytes culture) والتشكيل الكروي ثلاثي الأبعاد (3D spheroidal formation) لمدة أسبوعين. وهذا يدل على أن خلايا الكبد حافظت على حالة تمايز الخلايا. ومن ناحية أخرى، أظهرت خلايا الكبد في الكولاجين من النمط الأول (collagen type I) شكلاً منتشرًا أو ممتدًا (spread shape) مما يدل على التمايز. وقد تم الحفاظ على ساعات استقلاب الأمونيا والدواء (ammonia and drug - metabolizing capacities) وعلى قدرات إنتاج الألبومين أو الزلال (albumin - producing abilities) لمدة أسبوعين في خلايا الكبد المزروعة في حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من الـ RADA16-I، في حين أنه كان هناك فقدان كبير لهذه القدرات في خلايا الكبد المزروعة في الكولاجين (hepatocytes cultured in collagen). وهذا يدل على أن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع يمكن أن تساعد في الحفاظ على وظيفة الخلايا من أجل الزراعة طويلة الأمد وحتى أفضل من المصفوفة الطبيعية المستمدة في بعض أنواع الخلايا.

وقد تم تطوير طريقة لتمحفظ أو تغليف الخلايا الغضروفية (encapsulate chondrocytes) ضمن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية باستخدام ببتيد آخر ذاتي التجميع وهو KLD12 (AcN - KLDLKLDLKLDL - CNH2) وذلك لأغراض إصلاح الغضروف [10]. فإثناء الأسابيع الأربعة من الزراعة في المختبر، طورت الخلايا الغضروفية المزروعة داخل حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية مصفوفة أو نسيجًا غشائيًا خارج الخلية مشابهًا للغضروف (cartilage - like ECM) وغنيًا بالبروتيوغليكانات (proteoglycans) وبالكولاجين من النمط الثاني (type II collagen) مما يدل على نمط ظاهري مستقر للخلايا الغضروفية (stable chondrocyte phenotype). وقد تمت موازنة التراكم الذي يعتمد على الزمن (time dependent accumulation) لهذه المصفوفة خارج الخلية (ECM) عن طريق الزيادات في صلابة المادة (material stiffness)؛ مما يدل على ترسيب النسيج الوظيفي (functional tissue) بشكل ميكانيكي. وقد زاد محتوى الخلايا الغضروفية المتمايزة والقابلة للبقاء على قيد الحياة ضمن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية بمعدل ازداد أربع مرات عن محتوى الخلايا الغضروفية في مزرعة الخلايا الموازية المصنوعة من مادة الآغاروز (agarose) والمبدورة بالخلايا الغضروفية، وهي نظام مرجعي معروف تمامًا لزراعة الخلايا الغضروفية. وتُظهر هذه النتائج إمكانية استخدام حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع كحاملات خلايا وأنسجة من أجل تركيب وتجميع مصفوفة خارج الخلية (ECM) تشبه الغضروف الحقيقي في مزرعة خلايا ثلاثية الأبعاد من أجل إصلاح النسيج الغضروفي. وقد أوضحت هذه النتائج أن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ملائمة من أجل الاستكشافات الإضافية مع أنواع أخرى من الأنسجة.

(١١،٦) حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع من أجل الطب التجديدي SELF-ASSEMBLING PEPTIDE SCAFFOLDS FOR REGENERATIVE MEDICINE

لقد أوضح Misawa وآخرون [16] أن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع المطوّرة من الـ RADA-I قد عززت تجديد العظم (bone regeneration). وقد تم حقن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع في عيوب عظمية

(bone defects) لجمجمة الفئران (mice calvaria). وقد تم حقن محلول ملحي (Saline) ومادة الماتري جل (Matrigel) كعينات مراقبة. بعد أربعة أسابيع أوضحت نتائج صور الأشعة السينية (x-ray radiograph) والنتائج النسيجية (histological findings) بأنه كانت هناك تجديدات عظمية أقوى في حاملة الخلايا والأنسجة الببتيدية بالمقارنة مع عينات المراقبة. وبشكلٍ خاص، فقد كانت متانة العظم المجدد (strength of the regenerated bone) أكبر من ١,٧ ضعفاً من أجل حاملة الخلايا والأنسجة الببتيدية المصنوعة من الـ (RADA-I) منها من أجل مادة الماتري جل (Matrigel).

وقد أظهر Ellis - Behnke وزملاؤه بأن المادة الببتيدية ذاتية التجميع هي حاملة خلايا وأنسجة واعدة من أجل الطب التجديدي العصبي (neural regeneration medicine) [17]. وقد تم إجراء تطبيق في الجسم الحي (in vivo application) لجروح في الدماغ (brain wounds) باستخدام جراء هامستر سورية (Syrian hamster pups) عمرها يومان. فقد تم قطع المسالك البصرية (optic tract) بشكلٍ كامل ضمن الأكيمة العلوية (superior colliculus - SC) بواسطة جرح عميق بالسكين، يمتد إلى عمق ١ ميليمتر على الأقل تحت السطح. في العملية الجراحية، تم معالجة ١٠ حيوانات عن طريق الحقن في الجرح بـ ١٠ إلى ٣٠ مايكرو لترًا من الـ (RADA16) بنسبة ١٪ وماء بنسبة ٩٩٪ / وزن / حجم. وقد شملت حيوانات المراقبة (control animals) الحيوانات المصابة بنفس الآفة الدماغية (brain lesion) بما في ذلك ٣ حيوانات تم حقنها بمحلول ملحي متساوي التوتر (10 isotonic saline مايكرو لترت) والعديد من الحالات الإضافية، بما في ذلك ١٠ حالات تم فيها إضافة صبغة الكونغو الحمراء (dye Congo red) إلى حاملة الخلايا والأنسجة الببتيدية و ٢٧ حيواناً سابقاً تم جرحهم بالسكين ومن دون حقن بقوا على قيد الحياة لمدة من ٦ إلى ٩ أيام. وقد تم التضحية بالحيوانات في اليوم ١ و ٣ و ٦ و ٣٠ و ٦٠ من أجل اختبارات الدماغ (brain examinations). لقد كشفت الاختبارات النسيجية للعينات التي أُجريت فقط على الحيوانات التي تم حقنها بحاملة الخلايا والأنسجة الببتيدية، وليس في الحيوانات التي لم يتم معالجتها، بأنه يبدو أن أنسجة الدماغ قد أعادت ربط نفسها مع بعضها بعضاً في كل الأوقات التي بقيت فيها على قيد الحياة. بالإضافة إلى ذلك، فقد وُجد بأن المحاور العصبية (axons) المميزة من منشأها الشبكي (retinal origin) بواسطة جزيء تتبع (tracer molecule) قد نمت إلى ما بعد الجسر النسيجي (tissue bridge). مما يعيد تعصيب (reinnervation) الأكيمة العلوية الذيلية (SC caudal) إلى الآفة. والأهم من ذلك، فقد أثبتت الاختبارات الوظيفية (functional tests) استعادة كبيرة للوظيفة البصرية (visual function) في جميع الحيوانات التي تم معالجتها بحاملة الخلايا والأنسجة الببتيدية.

وفي عملٍ آخر تم نشره من قبل مجموعة Richard Lee، تم تعليق خلايا جذعية جنينية (embryonic stem cell) في محاليل حاملات خلايا وأنسجة ببتيدية مصنوعة من الـ (RADA16-II)، وتم حقنها في عضلة قلب (myocardium) فأر عمره ١٠ أسابيع [18]. وقد اتضح في تلك الدراسة بأنه يمكن حقن الببتيدات ذاتية التجميع في عضلة القلب لإنشاء بيئة مايكروية ثلاثية الأبعاد. وبعد ٧ و ١٤ و ٢٨ يوماً تُطَوِّع هذه البيئات المايكروية كلاً من الخلايا البطانية الداخلية المنشأ (باطنية النمو) (endogenous endothelial cells) والخلايا العضلية الملساء داخلية المنشأ (endogenous smooth muscle cells)، وتبقى الخلايا المحقونة بشكلٍ خارجي (خارجية المنشأ) (exogenously injected cells) على قيد الحياة في البيئات المايكروية: وبالتالي؛ يمكن للببتيدات ذاتية التجميع أن تُنشئ بيئات مايكروية قابلة للحقن تعزز التوعي (vascularization) (تكوّن الأوعية الدموية).

بالإضافة إلى ذلك، فقد طورت مجموعة Lee أيضًا إستراتيجية جذابة لتوصيل الدواء (drug delivery) وذلك بواسطة استخدام نسخة الـ (RADA-II) المرتبطة بالبيوتين (biotinylated version) لإظهار الإطلاق أو التحرير البطيء (slow release) لعامل النمو المشابه للإنسولين-١ (IGF-1) في عضلة قلب جُرَدَ مَحْتَشِيَة (infarctuated rat myocardia) [19]. لقد سمحت إستراتيجية شطيرة البيوتين (biotin sandwich strategy) بربط عامل النمو المشابه للإنسولين-١ (IGF-1) ولم تمنع التجميع الذاتي للبيتيدات في ألياف النانو ضمن عضلة القلب. وبالإشتراك مع زرع الخلايا العضلية القلبية (cardiomyocyte transplantation)، أوضحت هذه الإستراتيجية أن العلاج باستخدام الخلايا (cell therapy) مع توصيل عامل النمو المشابه للإنسولين-١ (IGF-1) عن طريق ألياف النانو المرتبطة بالبيوتين قد حسّن الوظيفة الانقباضية (systolic function) بشكل ملحوظ بعد الاحتشاء التجريبي لعضلة القلب (experimental myocardial infarction).

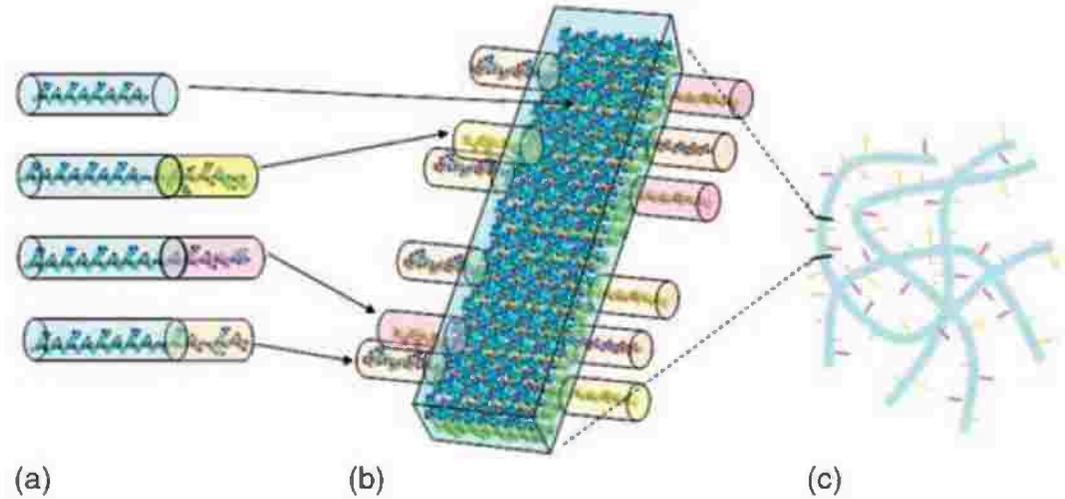
ومن اللافت للنظر، وحيث إن كتل البناء لهذه الفئة من حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة يتم صناعتها من الأحماض الأمينية-إل الطبيعية النقية (pure natural L-amino acids)، فإن الـ (RADA16)، وبخلاف معظم الألياف المايكروية الاصطناعية الأخرى، قد ظهر بأنه لا يُبدي استجابة مناعية ملحوظة ولا يبدي تفاعلات التهابية في الحيوانات [16-19] وأن منتجات الأحماض الأمينية الطبيعية المتحللة يمكن إعادة استخدامها من جديد من قبل الجسم. وبالتالي، فإن هذه الفئة من حاملات الخلايا والأنسجة يمكن أن تكون مفيدة كحاملة للخلايا والأنسجة قابلة لإعادة الامتصاص بشكل حيوي (bio - reabsorbable scaffold) من أجل إصلاح الأنسجة (tissue repair) والهندسة العصبية (neuroengineering) وذلك لتخفيف ومعالجة عدد من الصدمات أو الرضوض (trauma) وأمراض الانحلال أو التكتس العصبي (neuro - degeneration diseases) وكذلك إصابات (injures) وأضرار (damage) وشيخوخة (aging) بعض الأنسجة.

ويتم حاليًا تقييم إستراتيجيات بديلة لمعالجة اتجاهية (directionality) ومحاذاة أو ترانصف (alignment) حاملات الخلايا والأنسجة تلك، وذلك عن طريق استخدام طرق الجريان المايكروبي (microfluidic approaches) أو الطرق المغناطيسية (magnetic approaches) للدفع بعملية التجميع الذاتي، حيث إنه ليس لدى حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية مسامية أو اتجاه مسام (pore orientation) محددة مسبقًا أو بنية هندسية ثلاثية الأبعاد مُوجَّهَة (3-D oriented architecture) ومحددة مسبقًا.

DESIGNER SELF-ASSEMBLING PEPTIDE (١١,٧) حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع SCAFFOLDS

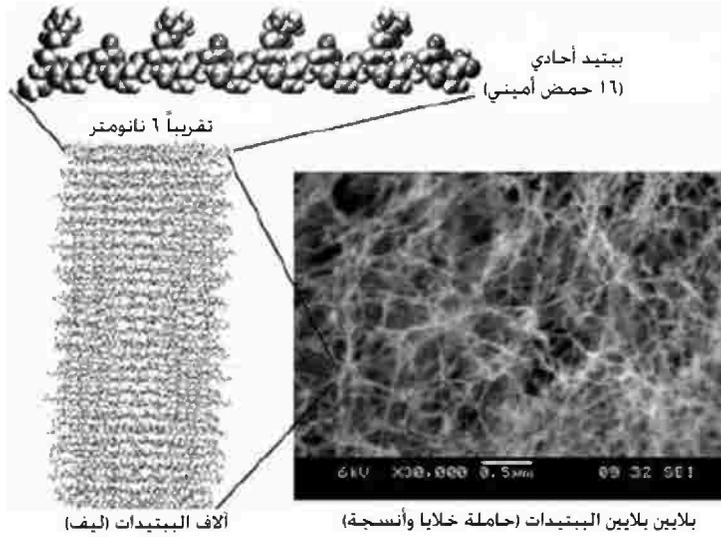
على الرغم من أن البيتيدات ذاتية التجميع هي حاملات خلايا وأنسجة واعدة، إلا أنها لا تُظهر تفاعلًا محددًا للخلايا (specific cell interaction) وذلك لأن تسلسلاتها غير موجودة بشكل طبيعي في الأنظمة الحية (living systems). إن الخطوة المنطقية الثانية هي البحث عن العناصر الببتيدية النشطة والوظيفية (active and functional peptide motifs) من مجمل ما كُتِبَ عن بيولوجيا الخلايا، وبالتالي فإن الجيل الثاني من حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة سيعزز وبشكل كبير تفاعلاتها مع الخلايا والأنسجة [20-22].

إن أسهل طريقة لدمج أو إدخال العناصر الوظيفية (functional motifs) هي بتركيبها المباشر من خلال تمديد العناصر على الببتيدات ذاتية التجميع نفسها (الشكل رقم ١١.١) [22,23]. تتواجد العناصر الوظيفية على النهايات أو الأطراف (C-termini) (C) حيث يبدأ تركيب الببتيدات من هذه النهايات أو الأطراف (C) وذلك لتفادي إلغاء العناصر الوظيفية أثناء التركيب. وغالباً ما يتم إضافة فاصل (spacer) يضم اثنين من بقايا الغليسينات (glycines residues) لضمان تعرض العناصر بشكلٍ مرنٍ وصحيحٍ للمستقبلات السطحية للخلايا (cell surface receptors). ويمكن دمج أو إدخال عناصر وظيفية مختلفة بنسب متنوعة في نفس حاملة الخلايا والأنسجة. فعند التعرض إلى محلول ذي درجة حموضة (pH) محايدة تتجمع التسلسلات المحددة وظيفياً (functionalized sequences) بشكلٍ ذاتي تاركة العناصر المضافة متدلّية (flagging) على جانبي كل ليف من الألياف النانوية. تشارك الألياف النانوية في حاملة الخلايا والأنسجة بأكملها؛ وبالتالي فإنها تمنح البيئات المايكروية المحددة أو المخصصة وظيفياً محفزات بيولوجية محددة (specific biological stimuli) (الشكل رقم ١١.١).



الشكل رقم (١١،١). توضيح تخطيطي لحاملة خلايا وأنسجة ببتيدية مصممة ذاتية التجميع (designer self-assembling peptide scaffold). (a) امتداد مباشر لتسلسل ببتيد ذاتي التجميع (self-assembling peptide sequence) عن طريق إضافة عناصر وظيفية مختلفة. تمثل الأسطوانات الأطول على الجانب الأيسر الجزء الأساسي ذاتي التجميع وتمثل الأسطوانات الأقصر على الجانب الأيمن عناصر ببتيدية وظيفية (functional peptide motifs) مختلفة. (b) نموذج جزئي لليف ببتيدي نانوي ذاتي التجميع (self-assembling peptide nanofiber) مع عناصر وظيفية متدلّية من كلا جانبي ألياف صفائح بيتا النانوية المزدوجة (double β -sheet nanofibers). يمكن مزج العناصر الببتيدية الوظيفية إما الأحادية وإما المتعددة (أو الموسومة (labeled) في نفس الوقت. ويمكن تعديل كثافة هذه العناصر بسهولة عن طريق مزجها فقط في نسب مختلفة، ١:١-١،٠٠٠،٠٠٠ أو أكثر قبل خطوة التجميع. (c) ومن ثم سوف تكون جزءاً من حاملة الخلايا والأنسجة المجمعة ذاتياً.

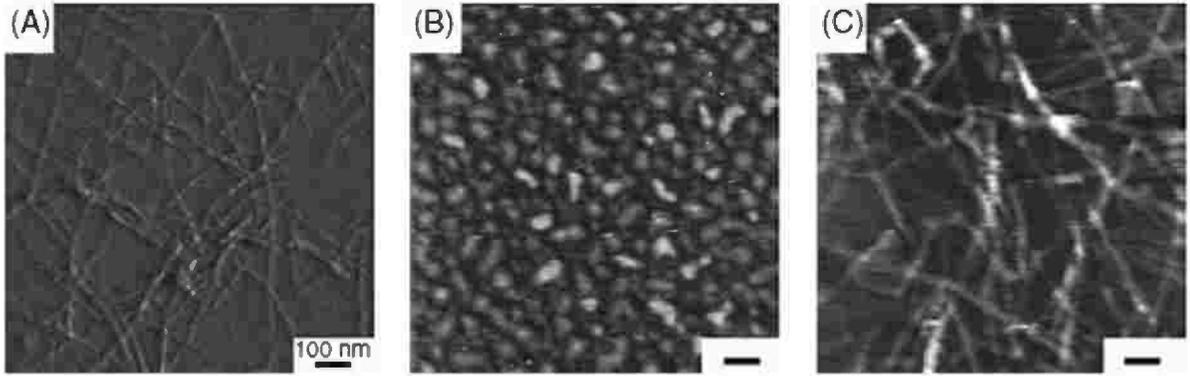
لقد تم إظهار عملية دمج أو إدخال الببتيد المحدد وظيفياً (functionalized peptide) (لأداء وظائف محددة) في الليف النانوي بواسطة مجهر القوة الذرية (AFM) [23]. فقد تم اختبار محلول ببتيدي (peptide solution) من الـ (RADA16-I) بنسبة ١٪ (وزن / حجم)، وهو عبارة عن ببتيد الـ (RADA16-I) المحدد وظيفياً مع ببتيد حمض الأرجينين - الغليسين - الأسبارتيك (RGD) ثنائي الوحدة والذي يرتبط بتسلسل الببتيد (PRGDSGYRGDS) (PRG). كما تم أيضاً فحص مزيج المحلول الببتيدي (mixed peptide solution) من الـ (RADA16-I) وببتيد الـ (PRG) المحدد وظيفياً في نسبة ١ : ١ باستخدام نمط النقر بواسطة مجهر القوة الذرية (AFM tapping mode). يُظهر الشكل رقم (١١,٢) صور مجهر القوة الذرية (AFM) للمحاليل الببتيدية. وقد لوحظت ألياف النانو في المحاليل المائية للـ (RADA 16-I) وكل محاليل الـ (RADA 16-I) الممزوجة، على الرغم من أنه لم يُلاحظ أي تشكيل للألياف فقط في محلول ببتيد الـ (PRG) المحدد وظيفياً. وقد تم تأكيد هذه النتائج عن طريق الفحص البصري للزوجة المتزايدة لمحاليل حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية. لقد لاحظنا زيادة في سماكة الليف (fiber thickness) في المحلول الممزوج (3.1 ± 29.5 نانومتراً) مقارنة مع محلول الـ (RADA16-I) (1.4 ± 16.1 نانومتراً). وقد كان هناك ارتباط بين عرض سماكة ليف الببتيد مع النموذج الموضح في الشكل رقم (١١,١). تدل هذه النتائج على أن ببتيدات حمض الأرجينين - الغليسين - الأسبارتيك (RGD) المحددة وظيفياً كانت مُدمجة في ليف النانو عندما تم مزجه.



الشكل رقم (١١,٢). حاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانوية ببتيدية مصممة ذاتية التجميع (designer self-assembling peptide nanofiber scaffold). ويظهر ببتيد مفرد، حوالي ٦ نانومتراً. تتجمع الآلاف من الببتيدات بشكل ذاتي لتشكيل ليف نانوي واحد، وتربليونات من الببتيدات أو مليارات من الألياف النانوية لتشكيل حاملات الخلايا والأنسجة، والتي تحتوي على حوالي ٩٩,٥٪ من الماء و ٠,٥٪ من المواد الببتيدية.

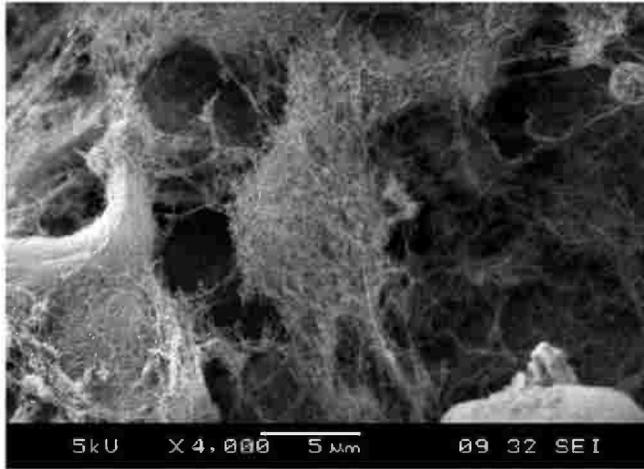
يمكن إنتاج حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية ذاتية التجميع مع عناصر وظيفية بشكلٍ تجاري وبتكلفة معقولة. وبالتالي؛ فإن هذه الطريقة يمكن اعتمادها بسهولة من أجل الاستخدامات الواسعة الانتشار بما في ذلك دراسة تفاعل الخلايا مع بيئاتها الموضعية والبيئات المايكروية (local - and micro - environments)؛ وانتقالات أو هجرات الخلايا في الأبعاد الثلاثية (cell migrations in 3D) والأورام (tumor) وتفاعل الخلايا السرطانية (cancer cells interaction) مع الخلايا الطبيعية؛ وعمليات الخلايا (cell process) وامتدادات المحوار أو المحاور العصبية (neurite extensions)؛ وتجارب فحص الدواء المبنية على الخلايا (cell - based drug test assays)؛ والتطبيقات المتنوعة الأخرى.

لقد أنتجنا ببتيدات مصممة مختلفة من مجموعة متنوعة من العناصر الوظيفية بأطوال مختلفة [22,23]. ولقد أوضحنا أن إضافة العناصر (ما يصل إلى حد ١٢ من البقايا الإضافية (additional residues)) إلى الببتيد ذاتي التجميع (RADA16-I) لم تكبح خصائص التجميع الذاتي (self - assembling properties) وتشكيلات الألياف النانوية (nanofiber formations). وعلى الرغم من أنه يبدو أن بُنى الألياف النانوية (nanofiber structures) لا يمكن تمييزها من حاملة الخلايا والأنسجة المصنوعة من الـ (RADA16-I) (الشكل رقم ١١.٣)، إلا أن العناصر الوظيفية المضافة قد أثرت على سلوك الخلايا بشكلٍ ملحوظ [22-26].



الشكل رقم (١١،٣). صور مجهر القوة الذرية (AFM) باستخدام نمط النقر (tapping mode) مخلول من الببتيدات بنسبة ١٪ وزن / حجم لـ (A) (RADA16-I)، (B) ببتيد (PRG) المحدد أو المخصص وظيفياً، (C) ببتيد (PRG) المحدد أو المخصص وظيفياً + (RADA16-I) (١:١). يمثل شريط المقياس ١٠٠ نانومتر. ويظهر تشكيل ليف النانو في (A) (RADA16-I) و (C) (RADA16-I) + (PRG) (١:١). وقد لوحظ زيادة في سماكة الليف في (C) (RADA16-I) + (PRG) (١:١) (٢٩،٥) \pm ٣،١ نانومتراً) عن (A) (RADA16-I) (١٦،٣) \pm ١،٤ نانومتراً، والتي ارتبطت بعرض الليف الببتيدي على غرار الشكل رقم (١١،١).

باستخدام نظام الألياف النانوية الببتيدية المصممة ذاتية التجميع، فإنه من الممكن تحديد أي مُكوّن من حاملات الخلايا والأنسجة جنباً إلى جنب مع التحديدات الوظيفية المختلفة بما في ذلك العوامل القابلة للذوبان (soluble factors). وهذا يمثل تبايناً حاداً (sharp contrast) بالمقارنة مع طبق البتري ثنائي الأبعاد (2-D petri dish) حيث تلتصق فيه الخلايا وتنتشر فقط على السطح؛ تبقى الخلايا في بيئة ثلاثية الأبعاد، حيث يمكن لمستقبلات المصفوفة خارج الخلية (extracellular matrix receptors) على أغشية الخلايا (cell membranes) أن ترتبط بالليجان الوظيفية (functional ligands) المضافة إلى حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية (الشكل رقم ١١.٤). فمن الممكن إنشاء بُنى هندسية نسيجية أعلى تحتوي على أنواع متعددة من الخلايا، بشكل أفضل من الطبقات الأحادية، وذلك باستخدام حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد تلك ذات الألياف النانوية الببتيدية المصممة ذاتية التجميع.



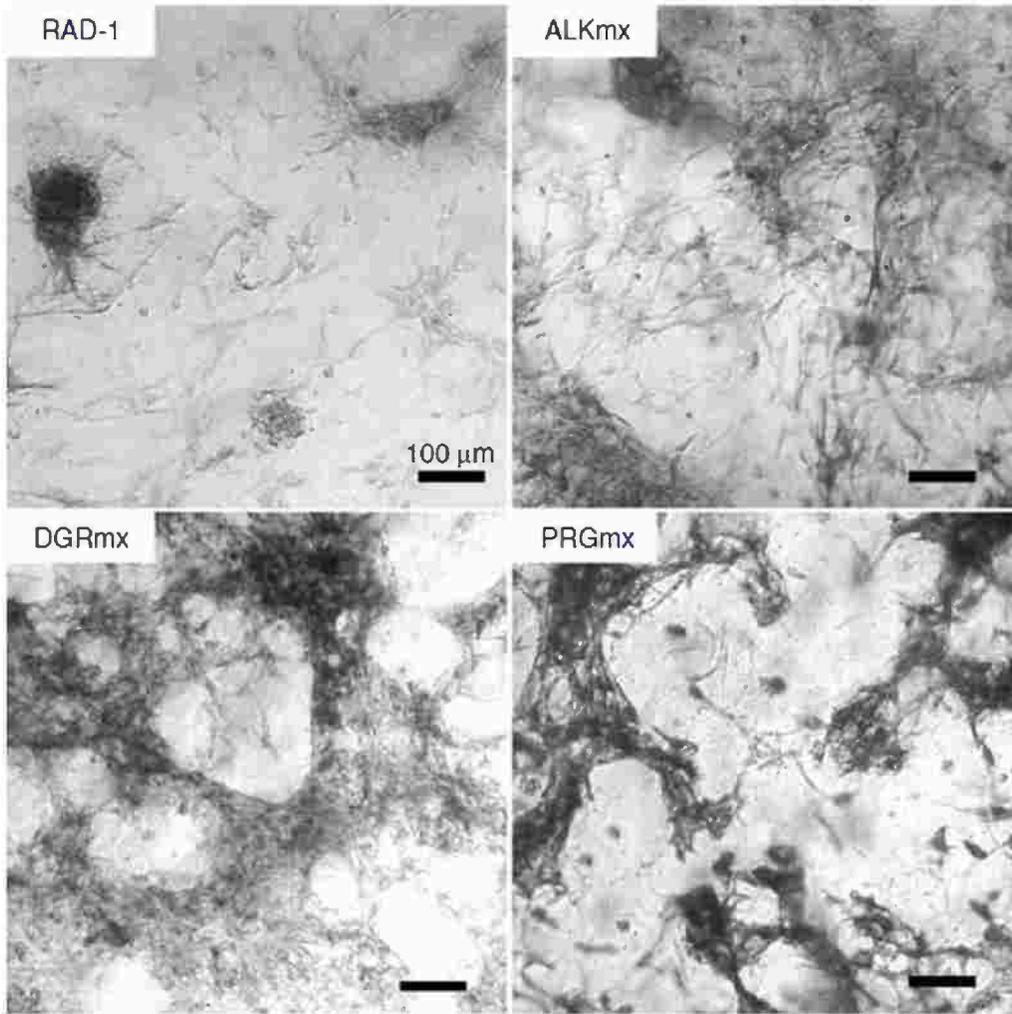
الشكل رقم (١١,٤). صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لخلية مُتضمّنة في حاملات خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد ذات ألياف نانوية ببتيدية مصممة ذاتية التجميع (3-D designer self-assembling peptide nanofiber scaffold). حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية المفردة تلف بشكل كامل جسم وغشاء الخلية، وبالتالي فإنها تجلب العناصر الوظيفية المختارة إلى جميع أنحاء غشاء الخلية.

حتى لو توفر فقط جزء من العناصر الوظيفية على حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد (3-D scaffold) لربط مستقبلات الخلايا (cell receptors)، فإنه من المحتمل أن تستقبل الخلايا محفزات خارجية (external stimuli) أكثر مما تستقبلها عندما تكون على اتصال مع أطباق بتري المطلية ثنائية الأبعاد (coated 2-D petri dishes) أو ألياف بوليميرية مطلية بواسطة ببتيد حمض الأرجينين - الغليسين - الأسبارتيك (RGD) أو مطلية بعناصر أخرى في مستوى المايكرون، والتي هي فعلياً أكبر من المستقبلات السطحية للخلايا، وفي معظم الحالات تكون أكبر من الخلايا نفسها. إن هناك خلايا هي في الحقيقة ليست في بيئة ثلاثية الأبعاد، بل هي بالأحرى في بيئة ثنائية الأبعاد تلتف حول البوليمرات مع المناء يعتمد على قطر البوليمرات. ففي بيئة ثنائية الأبعاد، حيث يكون جانب واحد فقط من جسم الخلية على تلامس مباشر مع السطح، حيث يمكن تحفيز المستقبلات التي تتجمع في موقع الالتصاق (attachment site)؛ ومن ناحية أخرى، تكون المستقبلات الخاصة

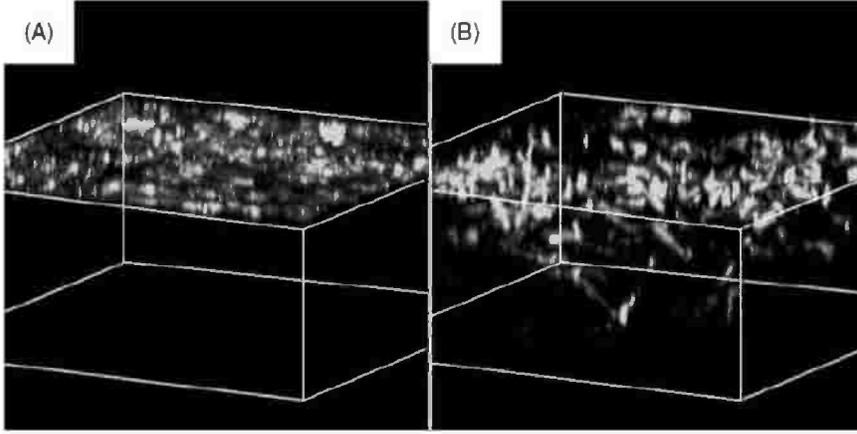
بمكونات النمو (growth factors) والسيتوكينات (cytokines) والمواد المغذية (nutrients) والإشارات (signals) موجودة على المواقع الأخرى التي تتعرض بشكل مباشر إلى أوساط الزراعة (culture media)؛ وبالتالي يمكن أن تصبح الخلايا مُستقطبة جزئياً (partially polarized). وفي البيئة ثلاثية الأبعاد، تحيط العناصر الوظيفية الموجودة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية بكامل جسم الخلية في جميع الأبعاد ويمكن أن تشكل العوامل (factors) تدرجاً في البيئة المايكروية ثلاثية الأبعاد ذات المسامية النانوية (3-D nanoporous microenvironment).

(١١,٧,١) حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة من أجل تمايز وهجرة الخلايا Designer Peptide Scaffolds for Cell Differentiation and Migration

لقد تبين أن حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية الببتيدية المصممة ذاتية التجميع تُشكل مادة بيولوجية ممتازة من أجل عمليات زراعة الخلايا ثلاثية الأبعاد (3-D cell cultures) وقادرة على تحفيز انتقال أو هجرة الخلايا في حاملات الخلايا والأنسجة وقادرة أيضاً على إصلاح عيوب الأنسجة في الحيوانات وذلك عن طريق إضافة تسلسلات محددة رابطة للخلايا (specific cell binding sequences) أو تسلسلات محددة جاذبة كيميائياً (specific chemotactic sequences). لقد قمنا بتطوير عدة حاملات خلايا وأنسجة ببتيدية ذات ألياف نانوية مصممة خصيصاً للخلايا البانية للعظم (osteoblasts) [23]. وقمنا بتصميم واحدة من حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية النقية ذاتية التجميع من الـ (RADA16-I) من خلال الاقتران أو الربط المباشر (direct coupling) بعناصر قصيرة ونشطة بيولوجياً (short biologically active motifs). وقد شملت العناصر ببتيد النمو (ALK) المكوّن للعظم (osteogenic growth peptide) (ALKRQGRPLYGF) وهو ببتيد إشارة يتم إفرازه من قبل الخلايا العظمية (bone cell - secreted signal peptide) وعنصر الـ (DGR) لالتصاق خلايا الأوستيوبونتين (osteopontin cell adhesion motif) (DGRGDSVAYG) وتسلسل الـ (PRG) الرابط لببتيد حمض الأرجينين - الغليسين - الأسبارتيك ذي الوحداتين (two - unit RGD binding sequence PRG) (PRGDSGYRGDS). وقد قمنا بتصنيع حاملات خلايا وأنسجة ببتيدية جديدة عن طريق مزج الـ (RAD16) النقي ومحاليل ببتيدية مصممة (designer peptide solutions). وبالمقارنة مع حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من الـ (RAD16) النقي، وجدنا بأن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة تلك قد عززت وبشكل كبير من تكاثر خلايا الـ (MC3T3-E1) الأولية البانية للعظم لدى الفئران (mouse preosteoblast MC3T3-E1 cell). وعلاوة على ذلك، فقد ازداد أيضاً وبشكل ملحوظ نشاط إنزيم الفوسفاتاز القلوي (alkaline phosphatase - ALP) وإفراز الأوستيوكالسين (osteocalcin secretion)، والتي تعتبر دلالات أو علامات (markers) مبكرة ومتأخرة على تمايز خلايا راب العظم أو الخلايا المكوّنة للعظم (osteoblastic differentiation). وقد تم تأكيد هذه النتائج عن طريق تلوين إنزيم الفوسفاتاز القلوي (ALP) (الشكل رقم ١١,٥). لقد أوضحنا أن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع قد عززت من تكاثر وتمايز خلايا الـ (MC3T3-E1) المكوّنة للعظم (osteogenic) لدى الفئران. وفي الظروف المماثلة لوسط الزراعة أوضحت الصور المباشرة (متحدة البؤرة) (confocal images) وبشكل قاطع بأن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة من الـ (PRG) قد حفّزت انتقال أو هجرة الخلايا في حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد. (الشكل رقم ١١,٦) [23]. وتشير النتائج التي توصلنا إليها إلى أن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة يمكن أن تكون مفيدة جداً لتعزيز تجديد الأنسجة العظمية (bone tissue regeneration).



الشكل رقم (١١,٥). صور تلوين إنزيم الفوسفاتاز القلوي (ALP) بعد عملية الزراعة على الهلامات المائية (hydrogels) المختلفة لمدة أسبوعين. يمثل شريط القياس ١٠٠ مايكرومتر. (RAD-I)، (RADA16-I) ١٪ (وزن / حجم)؛ (ALKmx)، بيتيد الـ (ALK) الخدد أو المخصص وظيفياً ١٪ (وزناً / حجم) + (RADA16-I)؛ (DGRmx)، بيتيد الـ (DGR) الخدد أو المخصص وظيفياً ١٪ (وزناً / حجم) + (RAD)؛ (PRGmx)، بيتيد الـ (PRG) الخدد أو المخصص وظيفياً ١٪ (وزناً / حجم) + (RADA16-I) (كل نسب المزج ١:١). يرتبط اللون الداكن بالنشاط العالي لإنزيم الفوسفاتاز القلوي (ALP). يُظهر الـ (RADA16-I) التصاقاً منخفضاً للخلايا بالهلامات المائية وتتجمع الخلايا. وقد تم اعتبار الزيادة في التصاق الخلايا لـ (DGR) و (PRG) هي بسبب تسلسل الـ (RGD) للتصاق الخلايا. وقد أظهرت الـ (ALK) و (DGR) و (PRG) فعاليات أعلى لإنزيم الفوسفاتاز القلوي (ALP) بالمقارنة مع الـ (RADA16-I)، وبشكلٍ خاص كثافة تلوين الـ (PRG).



الشكل رقم (٦، ١١). صورة أعيد تشكيلها من صورة ثلاثية الأبعاد بواسطة المجهر المباتر (3-D confocal microscope image) لعملية الزراعة على حاملات الخلايا والأنسجة المختلفة التي تتكون من نسب مختلفة لمزيج من الـ (RADA16) ١٪ (وزناً/حجم) والـ (PRG) ١٪ (وزن / حجم) باستخدام التلوين بالـ (calcein-AM). يمثل شريط القياس ١٠٠ مايكرومتر. (A) الـ (PRG) ١٠٪ و (B) الـ (PRG) ٧٠٪. وفي حالة حاملية الخلايا والأنسجة المصنوعة من الـ (PRG) ١٠٪، كانت الخلايا ملتصقة على سطح الحاملة في حين تم تحريك أو نقل الخلايا في الحاملة في حالة حاملية الخلايا والأنسجة مع الـ (PRG) ٧٠٪. ويوجد هناك انتقال أو هجرة كبيرة للخلايا في حاملية الخلايا والأنسجة ذات التركيز الأعلى لعنصر الـ (PRG).

بالإضافة إلى الببتيدات ذاتية التجميع المشتقة من اللامينين (laminin - derived self - assembling peptides) والتي تمت دراستها سابقاً عن طريق إضافة سلسلة قلووية طويلة (long alky chain) والتي تُعزز التجميع الذاتي [24]، فإن هناك دراسة أخرى تُقيم الفبرونيكتين (fibronectin) وكذلك التسلسلات المشتقة من الكولاجينات (collagens derived sequences) [25].

(١١،٨) لماذا حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع؟ WHY DESIGNER SELF-ASSEMBLING PEPTIDE SCAFFOLDS?

لماذا يجب على المرء اختبار حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع في حين أن هناك عدداً كبيراً من المواد الحيوية في السوق وقد تمت الموافقة على بعض منها من قبل إدارة الغذاء والدواء (FDA)؟ إن مزايا استخدام حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو الببتيدية المصممة ذاتية التجميع متعددة جداً. (١) يمكن للمرء تعديل الببتيدات المصممة بسهولة عند مستوى الحمض الأميني المفرد (single amino acid level) عند الرغبة بصورة غير مكلفة وبشكلٍ سريع. إن هذا المستوى من التعديل يكون مستحياً باستخدام حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من الماتري جل (Matrigel) ومن البوليمرات الأخرى. (٢) بعكس الماتري جل (Matrigel)، الذي يحتوي على مكونات غير معروفة ونوعية تختلف من دفعة إلى دفعة، فإن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع تنتمي إلى فئة حاملات الخلايا والأنسجة البيولوجية التركيبية أو الاصطناعية

(synthetic biological scaffolds) التي تحتوي على مركبات نقية وأن كل مُكون من هذه المكونات محدد بشكلٍ كامل. (٣) وحيث إن حاملات الخلايا والأنسجة الببتيدية المصممة ذاتية التجميع هذه نقية وذات عناصر معروفة، فإنه من الممكن استخدامها لدراسة التعبير الجيني المتحكم به (controlled gene expression) أو عملية نقل إشارات الخلايا (cell signaling process). وبالتالي؛ فقد أثبتت حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المصممة الجديدة تلك أنها أدوات واعدة لدراسة مسارات إشارات الخلايا (cell signal pathways) بطريقة انتقائية تكون غير ممكنة باستخدام أي ركائز بما في ذلك الماتري جل (Matrigel) وهلامات الكولاجين المائية (collagen gels) التي تؤدي إلى إرباك نشاط نقل إشارات الخلايا (cell signaling activation). (٤) إن بداية عملية التجميع الذاتي تكون من خلال تغيير القوة الأيونية (ionic strength) في الظروف الفيزيولوجية بدون تأثير درجة الحرارة. وهذا مرة أخرى بخلاف هلامات الكولاجين المائية، التي يتم تحويلها إلى هلامات مائية دقيقة أو جامدة (gelation) عن طريق تغيير درجة الحرارة التي يمكن أن تُحدث أحياناً عملية بيولوجية غير معروفة بما في ذلك الصدمات الباردة أو الحارة (cold or heat shocks). (٥) تتيح حاملات الخلايا والأنسجة هذه الفرصة لدمج أو إدخال عدد من العناصر الوظيفية المختلفة وتركيباتها لدراسة سلوك الخلايا في بيئة مايكروية واضحة المعالم ماثلة للمصفوفة خارج الخلية (ECM)، ليس فقط من دون أي ردود فعل كيميائية تشعبية (chemical cross - link reactions) بل أيضاً كحاملات خلايا وأنسجة قابلة لإعادة الامتصاص الحيوي (bio - reabsorbable scaffolds) بشكلٍ كامل.

يُعتبر تطوير مواد بيولوجية جديدة، وعلى وجه التحديد حاملات الخلايا والأنسجة ذات المستوى النانوي تلك المستوحاة بشكلٍ بيولوجي والتي تحاكي البيئة في الجسم الحي وتعمل كركائز اختبارية من أجل نمو وتكاثر الخلايا ووظيفتها البيولوجية هي مجال العمل أو المتابعة الأكثر نشاطاً والذي بدوره يمكن أن يُطور الطب التجديدي إلى حدٍ كبير. إن هذه المواد سوف تكون مفيدة ليس فقط من أجل زيادة فهمنا لبيولوجيا الخلايا في البيئة ثلاثية الأبعاد بل أيضاً من أجل تطوير التقنية الطبية (medical technology) وهندسة الأنسجة والبيولوجيا التجديدية (regenerative biology) والطب.

المراجع REFERENCES

- [1] Lanza, R., Langer, R., and Vacanti, J. 2000. Principles of Tissue Engineering. Academic Press, San Diego.
- [2] Ashammakhi, N., Ndreu, A., Piras, A. et al. 2006. Biodegradable nanomats produced by electrospinning: Expanding multifunctionality and potential for tissue engineering. J. Nanosci. Nanotechnol. 6:2693–2711.
- [3] Zhang, S., Holmes, T., Lockshin, C., and Rich, A. 1993. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3334–3338.
- [4] Zhang, S., Holmes, T., DiPersio, M. et al. 1995. Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian-cell attachment. Biomaterials 16:1385–1393.
- [5] Zhang, S. 2002. Emerging biological materials through molecular self-assembly. Biotechnol. Adv. 20:321–339.
- [6] Zhang, S. 2003. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. Nat. Biotechnol. 21:1171–1178.
- [7] Caplan, M., Moore, P., Zhang, S., Kamm, R., and Lauffenburger, D. 2000. Self-assembly of a beta-sheet protein governed by relief of electrostatic repulsion relative to van der Waals attraction. Biomacromolecules 1:627–631.

- [8] Caplan, M., Schwartzfarb, E., Zhang, S., Kamm, R., and Lauffenburger, D. 2002. Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence. *Biomaterials* 23:219–227.
- [9] Marini, D., Hwang, W., Lauffenburger, D. et al. 2002. Left-handed helical ribbon intermediates in the self-assembly of a beta-sheet peptide. *Nano Lett.* 2:295–299.
- [10] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9996–10001.
- [11] Hwang, W., Marini, D., Kamm, R., and Zhang, S. 2003. Supramolecular structure of helical ribbons self-assembled from a beta-sheet peptide. *J. Chem. Physics* 118:389–397.
- [12] Yokoi, H., Kinoshita, T., and Zhang, S. 2005. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8414–8419.
- [13] Leon, E.J., Verma, N., Zhang, S., Lauffenburger, D., and Kamm, R. 1998. Mechanical properties of a self-assembling oligopeptide matrix. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 9:297–312.
- [14] Holmes, T.C., De Lacalle, S., Su, X. et al. 2000. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6728–6733.
- [15] Navarro-Alvarez, N., Soto-Gutierrez, A., Rivas-Carrio, J.D. et al. 2006. Self-assembling peptide nanofiber as a novel culture system for isolated porcine hepatocytes. *Cell Transplant.* 15:921–927.
- [16] Misawa, H., Kobayashi, N., Soto-Gutierrez, A. et al. 2006. Puramatrix facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice. *Cell Transplant.* 15:903–910.
- [17] Ellis-Behnke, R.G., Liang, Y.X., You, S.W. et al. 2006. Nano neuro knitting: Peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:5054–5059.
- [18] Davis, M.E., Motion, J.P., Narmoneva, D.A. et al. 2005. Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells. *Circulation* 111:442–450.
- [19] Davis, M.E., Hsieh, P.C., Takahashi, T. et al. 2006. Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:8155–8160.
- [20] Ayad, S., Boot-Handford, R.P., Humphreise, M.J., Kadler, K.E., and Shuttleworth, C.A. 1998. *The Extracellular Matrix: Facts Book*. Academic Press, San Diego.
- [21] Kreis, T. and Vale, R. 1999. *Guide Book to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. Oxford: Oxford University Press.
- [22] Ricard-Blum, S., Dublet, B., and Van Der Rest, M. 2000. *Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XIV, XVI & XIX*. Oxford: Oxford University Press.
- [23] Gelain, F., Bottai, D., Vescovi, A., and Zhang, S. 2006. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. *PLoS ONE* 1:e119.
- [24] Horii, A., Wang, X., Gelain, F., and Zhang, S. 2007. Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration. *PLoS ONE* 2:e190.
- [25] Silva, G.A., Czeisler, C., Niece, K.L. et al. 2004. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science* 303:1352–1355.
- [26] Nowakowski, G.S., Dooner, M.S., Valinski, H.M. et al. 2004. A specific heptapeptide from a phage display peptide library homes to bone marrow and binds to primitive hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 22:1030–1038.