

تقنيات النانو من أجل هندسة الأنسجة القلبية الوعائية

Nanotechnologies for Cardiovascular Tissue Engineering

Kristen A. Wieghaus and Edward A. Botchwey

المحتويات CONTENTS

٤٧٨.....	INTRODUCTION	مقدمة (١٣,١)
٤٨٠.....	VASCULAR TISSUE ENGINEERING PARADIGMS	نماذج من هندسة الأنسجة الوعائية (١٣,٢)
٤٨٠.....	Tissue-Engineered Cardiac Wall Tissue	نسيج جدار قلبي مُهندَس نسيجياً (١٣,٢,١)
٤٨١.....	Tissue-Engineered Cardiac Valves	صمامات قلبية مهندسة نسيجياً (١٣,٢,٢)
٤٨٢.....	Cardiac Stents	دعامات قلبية (١٣,٢,٣)
٤٨٢.....	Tissue-Engineered Vessels and Vascular Grafts	طُعوم أوعية دموية ووعائية مهندسة نسيجياً (١٣,٢,٤)
٤٨٣.....	Tissue-Engineered Scaffolds	حاملات خلايا وأنسجة مهندسة نسيجياً يجب أن تدعم التوعي الجديد (١٣,٢,٥)
٤٨٣.....	That Must Support Neovascularization	
٤٨٤.....	NANOSCALE FEATURES OF NATIVE	السّمات النانوية للأنسجة القلبية الوعائية الأصلية (١٣,٣)
٤٨٤.....	CARDIOVASCULAR TISSUES	
٤٨٤.....	NANOTECHNOLOGICAL	الإستراتيجيات التقنية النانوية من أجل هندسة أنسجة قلبية وعائية مُحسّنة (١٣,٤)
٤٨٦.....	STRATEGIES FOR IMPROVED CARDIOVASCULAR TISSUE ENGINEERING	
٤٨٦.....	Engineering of Nanotopographical Features on	هندسة سمات طوبوغرافية نانوية على المواد الحيوية (١٣,٤,١)
٤٨٦.....	Biomaterials	

٤٨٩.....	Biomaterial Surfaces With Nanosized Motifs	(١٣, ٤, ٢) التحديد الوظيفي لسطوح المواد الحيوية باستخدام عناصر ذات حجم نانوي Functionalization of
٤٩١.....	Electrospun Nanofibrous Scaffolds	(١٣, ٤, ٣) حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المغزولة كهربائياً
٤٩٨.....	CONCLUSIONS	(١٣, ٥) الاستنتاجات
٤٩٩.....	REFERENCES	المراجع

١٣, ١) مقدمة INTRODUCTION

إن الدور الرئيسي للجهاز الدوراني (circulatory system) هو توزيع الغازات المنحلّة والجزيئات الأخرى اللازمة للتغذية والنمو وإصلاح أنسجة وأعضاء الجسم. وتشمل الوظائف الأخرى للجهاز الدوراني نقل الإشارات الكيميائية (chemical signaling) بسرعة إلى الخلايا عن طريق دوران الهرمونات (hormones) أو الناقلات العصبية (neurotransmitters) وتبديد الحرارة (heat dissipation) من مركز الجسم إلى السطح وتوسط الاستجابات الالتهابية (mediation of inflammation responses) وتوسط الاستجابات الدفاعية للمضيف (host defense responses).

يتكون القلب من أربع حجيرات (chambers): الأذين (atria) الأيمن والأذين الأيسر والبطين (ventricles) الأيمن والبطين الأيسر. ويتألف عضل القلب (myocardium) من ألياف عضلية قلبية (cardiac muscle fibers) تتقلص بشكلٍ تلقائي أو عفوي بحيث تسمح للقلب بالتقلص وضخ الدم، وهي مغطاة بنسيجٍ نخاعيٍّ ونسيجٍ شغافيٍّ (epi- and endocardial tissue) من أجل الحماية. وتعمل صمامات القلب (heart valves) على الحفاظ على اتجاه أحادي لتدفق الدم (unidirectional blood flow) بين حجيرات القلب وبين الحجيرات والأوعية الدموية (blood vessels) الموصّلة. إن الصمامات الأبهريّة والرئوية الهلالية (aortic and pulmonary semilunar valves) هي صمامات ثلاثية الوريقات (trileaflets)، في حين أن الصمامات الأذينية البطينية (atrioventricular valves) (التاجيّة (mitral) وثلاثية الشرف (tricuspid)) هي صمامات ثنائية الوريقات (bileaflet). وخلافاً لمعظم الأنسجة، فإن صمامات القلب لا تحوي أوعية دموية بشكلٍ جيد، لأن الأنسجة رقيقة بما فيه الكفاية للحفاظ على التغذية (nourishment) من خلال الانتشار المباشر (direct diffusion) من دم القلب. ومن بين الصمامات القلبية، فإن الصمام الأبهري (aortic valve) هو الأكثر اعتياداً ويتطلب معظم الزرع (transplantation) المتكرر [1]. ويتشكل الصمام الأبهري من نوعين من الخلايا: الخلايا البطانية (endothelial cells - ECs) التي تغطي سطحه والخلايا الخلالية (interstitial cells) التي لها خصائص متغيرة من أنواع خلايا الأرومة الليفية (fibroblast cells) والخلايا العضلية الملساء (smooth muscle cells) وخلايا الأرومة الليفية العضلية (myofibroblast cells) [2]. وتوضع هذه الخلايا على سرير من المصفوفة خارج الخلية (ECM)، والتي تتألف بشكلٍ أساسي من الكولاجين الذي يوفر المتانة (strength) والصلابة (stiffness) للأنسجة والإيلاستين الذي يسمح بتمدد الأنسجة أثناء الانبساط (diastole) وتقلص الأنسجة في الانقباض (systole)، والغليكوز أمينوغليكانات (glycosaminoglycans) التي تُكَيّف القص (shear) لطبقات الشرفات (cuspal layers) وتساعد على تخفيف الصدمة (cushion shock) للأنسجة الصمام [1].

إن النظام الوعائي (vascular system) هو نظام الأعضاء الأول الذي يتطور أثناء مرحلة التكوّن الجنيني الفقاريّ (vertebrate embryogenesis)، لتزويد الدم إلى خلايا وأنسجة الجسم. وهو يتألف من شبكة معقدة من الشرايين (arteries) والأوردة (veins) والأوعية الدموية المايكروية الأصغر (smaller microvessels) والشعيرات الدموية (capillaries) التي تُسهّل تبادل الأكسجين والغذاء والفضلات بالإضافة إلى هجرة وانتقال الخلايا من جهاز الدوران إلى الأنسجة المختلفة. إن تركيب الأوعية الدموية معقد إلى حد بعيد [3]. وعلى وجه الخصوص، تتألف الشرايين من ثلاث طبقات متميزة تحيط بلمعة مجوفة (hollow lumen) يتدفق من خلالها الدم. تتألف الطبقة الأعمق، وهي الطبقة الباطنة الوعائية (tunica intima)، من طبقة واحدة من الخلايا البطانية مُدعّمة بواسطة غشاء قاعدي (basement membrane). وتتضمن الطبقة الوسطى الوعائية (tunica media)، وهي أسمك الطبقات الثلاث، عدة طبقات من الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vascular smooth muscle cells - vSMC) ومصفوفة خارج الخلية (ECM) محيطة ومرتبطة في طبقات متراكزة (concentric layers) (متحدة المركز) لتشكيل بنية مركبة [4]. وتشكل الطبقة الخارجية، المسماة الطبقة البرانيّة (adventitia)، من أرومات ليفية (fibroblasts) (خلايا ليفية) ومصفوفة كولاجين من النمط الأول وهي تضيء متانة على جدار الوعاء الدموي [3].

ولما كان العديد من الأمراض المرتبطة بالعمر (age - associated diseases) مثل النوبة القلبية (heart attack) ونقص تروية الأطراف المحيطية (peripheral limb ischemia) والجروح المزمنة (chronic wounds) تنشأ من وظيفة مختلة أو وظيفة غير طبيعية للجسملة الوعائية (vasculature)، فإن الحاجة إلى علاجات فعّالة لمعالجة أوجه القصور القلبية الوعائي (cardiovascular deficiencies) هي مشكلة سريرية كبيرة على نحو متزايد. وقد تسببت الأمراض القلبية الوعائية بـ ٢.٤ مليون حالة وفاة في الولايات المتحدة في العام ٢٠٠٠ وحده [5]. إن أكبر سبب للوفيات في العالم الغربي هو مرض التصلّب العصيدي الوعائي (atherosclerotic vascular disease) [6]، والذي يتجلى كمرض شريان تاجي (coronary artery disease) أو مرض وعائي محيطي (peripheral vascular disease). ويتميز تصلب الشرايين (arteriosclerosis) من خلال سماكة الجدار الشرياني (مع انخفاض مقابل في قطر اللمعة)؛ مما يؤدي في نهاية المطاف إلى انخفاض أو فقدان الدوران وراء منطقة الوعاء الدموي التي تعاني من التصلب الشرياني. بالإضافة إلى ذلك، يؤثر المرض الوعائي المحيطي على أكثر من ١٢ مليون أمريكي مع عدد قليل من الخيارات العلاجية المهمّة [3]. إن فشل القلب (heart failure) هو سبب رئيسي آخر لانتشار المرض والوفيات، وبسبب قدرة القلب المحدودة على إصلاح نفسه، فإن التدخل الجراحي (surgical intervention) يكون مطلوباً من أجل علاج المشاكل القلبية الحادة (severe cardiac problems). وعلى الرغم من التطورات في العلاج الجراحي تبقى زراعات الأعضاء الكاملة الخيار الوحيد ما إن تفشل العلاجات الأكثر تحفظاً. إن محدودية التزويد بالعضو المتبرّع والإمكانية الكبيرة لرفض العضو (organ rejection) والمضاعفات الأخرى تحد وبشدة من نجاح هذه الإجراءات.

وعلى الرغم من وجود عدد كبير من المرضى الذين يعانون من هذه الأمراض والنفقات الهائلة للبحوث الداعمة للعلوم التي تُشكّل الأساس وراء باثولوجيا هذه الأمراض (disease pathologies)، فإن للعلاجات المتوافرة لمعالجة عدم الكفاية الوعائية فعالية محدودة نسبياً. فمن بين العديد من الاعتبارات، يتجلى ذلك بشكل واضح من خلال كون ما يصل إلى ٢٥٪ من المرضى الذين يخضعون لجراحات تحويل الشريان التاجي (coronary bypass surgeries) يعانون من النوبات القلبية المتكررة.

في السنوات الأخيرة، تم توجيه تركيز متزايد نحو دراسة التفاعل المعقد للعديد من العوامل القابلة للذوبان (soluble factors) وجزيئات الالتصاق غير القابلة للذوبان (insoluble adhesion molecules) ضمن المصفوفة خارج الخلية (ECM) والعوامل الديناميكية الدموية (hemodynamic factors) التي تنظم النمو الوعائي وإعادة التشكيل في الجسم الحي. في هذا الفصل، سيتم استكشاف الإستراتيجيات الحالية لهندسة الأنسجة القلبية والأنسجة الوعائية (cardiac and vascular tissue engineering)، مع التركيز على التلاعب العلاجي (therapeutic manipulation) لنقل الإشارات الخاصة بالخلايا القلبية والخلايا الوعائية (cardiac and vascular cell - specific signaling) في مستوى النانو. في الفقرة (١٣،٢)، سنسلط الضوء على النماذج الرئيسية لهندسة الأنسجة القلبية الوعائية (cardiovascular tissue engineering): تصنيع أنسجة قلبية (cardiac tissue) وصمامات قلبية (cardiac valves) ودعامات وعائية (vascular stents) وطعوم تحويل مهندسة نسيجياً صغيرة القطر (small - diameter tissue - engineered bypass grafts) وإنتاج بُنى وعائية جديدة (neovascular structures) في الحاملات المهندسة نسيجياً وفي الأنسجة المزروعة. بعد ذلك، سيتم عرض تفاصيل النظام القلبي الوعائي الطبيعي في المستوى النانوي وأهمية البنية النانوية في سلوك الخلايا القلبية والوعائية في الفقرة (١٣،٣). وفي الفقرة (١٣،٤)، سيتم عرض الإستراتيجيات التقنية النانوية الحالية من أجل تحسين البنى القلبية الوعائية المهندسة نسيجياً (cardiovascular tissue - engineered constructs) بالتفصيل. ويمكن تنظيم مجالات البحوث تلك في ثلاثة أنواع من الطرق: تعديل سطوح المواد الحيوية (modification of biomaterial surfaces) مع سمات أو ميزات طبوغرافية سطحية نانوية (nanotopographical features) والتخصيص أو التحديد الوظيفي المباشر للسطوح (direct functionalization of surfaces) (إضافة مجموعات وظيفية كيميائية للسطح) باستخدام أنماط أو عناصر في مستوى النانو (nanoscale motifs)، وتصنيع شبكات وحاملات خلايا وأنسجة ذات ألياف نانو محاكية حيويًا (biomimetic nanofibrous meshes and scaffolds). وأخيراً، سنختتم مع التحديات المتبقية في مجال تقنية النانو من حيث علاقتها بهندسة الأنسجة القلبية الوعائية.

(١٣،٢) نماذج من هندسة الأنسجة الوعائية VASCULAR TISSUE ENGINEERING PARADIGMS

(١٣،٢،١) نسيج جدار قلبي مُهندس نسيجياً Tissue-Engineered Cardiac Wall Tissue

إن قدرة عَضَل القلب على تجديد نفسه بعد احتشاء واسع (extensive infarction) محدودة جداً؛ ونتيجة لذلك؛ يجب أن يتم البحث عن وسائل علاجية جديدة من أجل تجديد الأنسجة العضلية القلبية الوظيفية (functional myocardial tissue). وستطلب تصنيع قلب كامل مُهندس نسيجياً لجميع العضل القلبي الأذيني (atrial myocardium) والعضل القلبي البطيني (ventricular myocardium) القابل للاستئثار والتقلص والنَّخَاب (epicardium) والشَّعَاف (endocardium) والصمامات والجملة الوعائية [7]. بالإضافة إلى ذلك، فإن متطلبات التصميم لأنسجة القلب هي أكثر قسوة بكثير من تلك الخاصة بالأنواع الأخرى الكثيرة من الأنسجة والأعضاء، حيث أن لدى العضلة القلبية (cardiac muscle) وأنسجتها الداعمة خصائص معقدة ومتخصصة، والتي هي جزء لا يتجزأ من الوظيفة القلبية المضبوطة. وتشمل هذه الخصائص تشكيل مَحَلَى كهربائي

(electrical syncytium) (كتلة من الجبلية العديدة النوى) وتطوير قوة انقباضية (systolic force) وتحمل التحميل الانبساطي (diastolic loading) والتكيف مع كلا المنبهات الفيزيولوجية (physiological stimuli)، والمتضمنة على سبيل المثال، استجابة المحاربة أو الفرار (fight or flight response) وزيادة الطلب الدوراني (circulatory demand) [7].

(١٣،٢،٢) صمامات قلبية مهندسة نسيجياً Tissue-Engineered Cardiac Valves

بالإضافة إلى العضلة القلبية، تعتبر صمامات القلب أنسجة متخصصة يجب استبدالها نتيجة للمرض. وتتم حالياً إزالة الصمامات المريضة جراحياً واستبدالها باستخدام إما صمامات اصطناعية (prosthetic valves) تعمل بشكل ميكانيكي وإما صمامات من طعم أجنبي (طعم غيروي) (xenograft valves) وإما صمامات من طعم خيفي جثي (cadaveric allograft valves) أو صمامات من طعم ذاتي رئوي - إلى - أبهري (pulmonary - to - aortic autograft valves) (والمعروفة أيضاً بإجراء Ross) [1]. ومع ذلك، يرتبط كل نوع من طعم الصمام (valve implant) بقيود كبيرة، بما في ذلك إمكانية حدوث انصمام خثاري (جلطات دموية) (thromboembolism) وتكلس (calcification) وتدهور بنيوي (structural deterioration) [8-10].

يمكن لصمامات القلب الناشئة من خلال تقنيات هندسة الأنسجة أن تكون أكثر فائدة من تلك الموجودة حالياً في الاستخدام السريري، لأنها ستكون على الأرجح غير مُخترّة (nonthrombogenic) ومُقاومة للعدوى (infection resistant) وتحث على بقاء الخلايا على قيد الحياة أكثر من الأنواع الأخرى من الطعوم [1]. ومع ذلك، تُظهر هندسة أنسجة صمامات القلب الوظيفية عدداً من التحديات الكبيرة. إن صمامات القلب أنسجة ديناميكية (dynamic tissues) تتألف من خلايا متخصصة ومصفوفة خارج الخلية (ECM) يجب أن يتم محاكاتها بشكل دقيق من أجل تحقيق النجاح السريري للطعوم المهندسة نسيجياً، كما يجب أن تقوم هذه الأنسجة بالاستجابة وإعادة التشكيل وفقاً للتغيرات المعقدة في القوى الميكانيكية الموضعية (local mechanical forces) [11,12]. لأكثر من ٤٠ مليون مرة في السنة، تقوم وريقة الصمام (valve leaflet) بالفتح والإغلاق مؤديةً إلى تغيرات متكررة في الإجهاد (stress) والشكل (shape) على نسيج الصمام والبنى الداعمة [13]؛ وبالتالي يجب أن تكون متانة ومرونة (flexibility) وثبات أو تحمل (durability) هذه الأنسجة متطابقة بشكل دقيق في الصمامات المهندسة نسيجياً.

واحدة من الميزات الفريدة لصمامات القلب المهندسة نسيجياً (tissue - engineered heart valves) هي إمكانية الاستخدام السريري الناجح وعلى المدى الطويل في المرضى الأطفال (pediatric patients). إن الحاجة الأكثر إلحاحاً لتقنية صمام القلب هي من أجل الأطفال والبالغين الشباب، والتي لا تكون فيها نتائج إجراءات استبدال الصمام مرضية كما هو الحال في المرضى البالغين [14,15]. بالإضافة إلى ذلك، قد تُلغى إمكانية نمو وإعادة تشكيل طعوم الصمامات المهندسة نسيجياً الحاجة إلى العمليات الجراحية المتكررة اللازمة عادةً للمرضى صغار السن، حيث لا يمكن للصمامات الاصطناعية التقليدية أن تكبر عندما ينمو المريض [1].

Cardiac Stents دعامة قلبية (١٣,٢,٣)

إن خيار العلاج الأكثر استخداماً للتصلب العصيدي الحاد (severe atherosclerosis) هو غالباً التدعيم الوعائي (vascular stenting)، حيث يتم زرع الدعامة (stents) في الشرايين المسدودة باللويحات والمتضيق بشدة (severely plaqued and stenosed arteries) كآلية لاستعادة تدفق الدم الطبيعي إلى الأعضاء الإقفارية (ischemic organs) (التي تعاني من نقص التروية). ويتم صنع هذه الدعامة غالباً من معدن التيتانيوم (titanium - Ti)، وذلك بسبب خصائصه الميكانيكية. وعلى أي حال، فإن التيتانيوم والمعادن التقليدية الأخرى غير متوافقة حيوياً؛ مما يؤدي إلى مضاعفات حادة ومزمنة مثل التخثر أو تجلط الدم (thrombosis) وعودة التضيق (restenosis) [16] وذلك بسبب الخلل الوظيفي (dysfunction) في الخلايا العضلية الوعائية الملساء في اللمعة [17]. وعلى هذا النحو، فقد جرت محاولات عديدة لتعديل التيتانيوم والمعادن الأخرى المستخدمة كدعامة وعائية [18-21]، ولكن تم بذل محاولات قليلة لتغيير السطح المعدني نفسه من أجل تحسين التفاعلات مع الأنسجة المحيطة.

Tissue-Engineered Vessels and Vascular Grafts طعوم أووعية دموية ووعائية مهندسة نسيجياً (١٣,٢,٤)

حالمًا يُسَدُّ تدفق الدم بسبب أمراض الشرايين التاجية أو المحيطية (coronary or peripheral artery diseases)، يكون التحويل الوعائي (vascular bypass) غالباً الخيار العلاجي الوحيد لاستعادة تدفق الدم إلى الأنسجة البعيدة. وقد تم في عام ٢٠٠٠ إجراء ما يُقدَّر بـ ٥١٩٠٠٠٠ إجراء تحويل [6]. تشمل الطعوم ذاتية المنشأ (autologous grafts) النمذجية أجزاء من الوريد الصافن (saphenous vein) والشريان الثديي الداخلي (internal mammary artery) وطعوم مثليّة (خيفية) وريدية (venous homografts) [3]. ومع ذلك، فإن حوالي ٣٠٪ من مرضى التصلب العصيدي يفقدون إلى مادة تحويل ذاتية المنشأ (autologous bypass material) كافية من أجل التطعيم الذاتي (autografting) وذلك بسبب المرض أو الاستخدام السابق [22,23]؛ وبالتالي لا بد من زرع طعوم وعائية (vascular grafts) مصنوعة من مواد بديلة متوافقة حيوياً. وقد تم تطبيق البديل الوعائي الاصطناعي (synthetic vascular prosthesis) الأول سريرياً في عام ١٩٥٤؛ مما يدل على أن الأنابيب الاصطناعية التعويضية (prosthetic tubes) يمكن أن تعمل كبداية شريانية (arterial replacements) [24,25]. ومع ذلك، فإن هذه الأنابيب لم تدمج أي نوع من أنواع الخلايا المشاركة بالوظيفة الوعائية (vascular function).

وكما تمت مناقشته سابقاً، تسمح هندسة الأنسجة بإنشاء بُنى بديلة باستخدام خلايا وحاملات خلايا وأنسجة مصنوعة من مواد حيوية (biomaterial scaffolds) من دون الحصول على طعوم ذاتية المنشأ من المريض. وقد أضاف الجيل الأول من البدائل الاصطناعية الوعائية صغيرة القطر المهندسة نسيجياً (tissue - engineered small - diameter vascular prosthetics) خلايا بطانية ذاتية المنشأ (autologous EC) على السطح المُعَيَّن (luminal surface) للطعم في محاولة لإنشاء بطانة وظيفية (function endothelium) [26-29]؛ إلا أن نقص التكسد أو التجمع البطاني (endothelial confluence) على لُمة أنابيب البوليمر قد حدَّ من نجاح هذه التجارب. وقد شملت مواد الطعوم من الجيل الثاني إضافة المزيد من العناصر الأصلية للأوعية الدموية، بما في ذلك الخلايا البطانية (EC) والخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC) والمصفوفة خارج الخلية (ECM) وذلك لدعم المواد التركيبية [30-33]. على سبيل المثال، كانت الإصدارات البسيطة من هذه الطعوم تتألف من طبقة برآنية تركيبية

(synthetic adventitial layer) ومُركب وسطي من الكولاجين مبدور بخلايا عضلية وعائية ملساء (vSMC) وباطنة شريان جديدة مُبطنَة للخلايا البطانيَّة (neointimal lining of EC) [30]. وتتكون البدائل الاصطناعية الوعائية الأحدث من مواد طبيعية بشكلٍ كاملٍ [34,35]، على الرغم من أن البوليمرات الاصطناعية لا تزال تُستخدم عادةً في هذه التطبيقات.

قد توفر الطعوم المهندسة نسيجياً بديلاً بالغ الأهمية للطعوم الوريدية ذاتية المنشأ (autologous vein grafts). لقد تم ونجاح تصنيع مواد تتضمن بولي (إيثيلين تيريفثالات) ((poly(ethylene terephthalate))، وهو الـ (Dacron) وبولي تترافلورو إيثيلين (polytetrafluoroethylene - PTFE) في طعوم وعائية لاستبدال الشرايين الكبيرة (large arteries) بينما شهدت الشرايين ذات القطر الأصغر (التي قطرها أقل من ٦ ميليمترات) نجاحاً محدوداً للغاية [36]. حيث تؤدي المضاعفات مثل التخثر أو تجلط الدم الحاد (acute thrombosis) الناجم عن عدم وجود بطانة (endothelium) (ظاهرة مُبطنَة للأوعية) وفرط تنسُّج (تضخم) باطنة الشريان (intimal hyperplasia) وعودة التضيُّق الناجم عن عدم تطابق المطاوعة (compliance mismatch) والاستجابة للالتهابات (inflammatory response) والقابلية للعدوى (susceptibility to infection) [36-42] إلى انخفاض سَالَكِيَّة (patency) زرعات الطعوم صغيرة القطر إلى ٣٠٪ بعد خمس سنوات [36]. ولإبطال هذه المضاعفات، فقد تم اختبار أنواع جديدة من المواد الحيوية لاستخدامها كماد طعوم وعائية صغيرة القطر. وقد تم تصنيع بولي (إسترات طبيعية) ((poly(orthoesters)) تتضمن بولي (حمض اللاكتيك) ((poly(lactic acid)) وبولي (حمض الغليكوليك) ((poly(glycolic acid)) وبوليمراتهما المشتركة في حاملات خلايا وأنسجة أنبوية (tubular scaffolds) تدعم نمو الخلايا البطانيَّة والخلايا العضلية الوعائية الملساء في المختبر [43,44]. ويتم حالياً اختبار مواد بوليميرية جديدة جنباً إلى جنب مع التقنيات الناشئة لتحسين نمو وبقاء الخلايا وذلك لتزويد المرضى بأوعية دموية اصطناعية صغيرة القطر (synthetic small diameter vessels) من أجل إجراءات التطعيم.

(١٣،٢،٥) حاملات خلايا وأنسجة مهندسة نسيجياً يجب أن تدعم التوعي الجديد Tissue-Engineered Scaffolds That Must Support Neovascularization

بالإضافة إلى تصنيع طعوم وعائية صغيرة القطر، فإن هندسة الأنسجة الوعائية تشمل أيضاً تعزيز التوعي الجديد (neovascularization) (نمو شعيرات دموية وشُرَبِنَات (arterioles) وورِيَدَات (venules) جديدة) إلى منطقة الأنسجة أثناء إصلاح الجروح (wound repair) أو بعد زرع حاملات خلايا وأنسجة مهندسة نسيجياً. وتعتبر البنية السليمة للأوعية الدموية المايكروية الدقيقة عنصراً أساسياً لوظيفة أنسجة طبيعية [45]؛ ومع ذلك، فبعد مرض الشرايين المحيطية ونقص تروية عضلة القلب (myocardial ischemia) وزرع الخلايا الجَزِيرِيَّة (islet cell transplantation) والجراحة التجميلية (plastic surgery) [46] والأذيَات النسيجية (tissue insults) الأخرى، فإن الجملة الوعائية الدموية الدقيقة الأصلية تتعرض في كثير من الأحيان إلى الخطر. إن تشكيل أوعية دموية جديدة من خلال تولُّد أو تكوُّن الأوعية الدموية (angiogenesis) هو أمرٌ حاسم بالنسبة للكثير من التطبيقات السريرية [47-52]، ولا سيما تلك النماذج الخاصة بإصلاح الجروح ونمو الأنسجة التي تنشأ فيها احتياجات غذائية واستقلابية (nutritive and metabolic demands) كبيرة. ولذلك فإن أحد التحديات المهمة بشكلٍ خاص بالنسبة لتقدم تطبيقات هندسة الأنسجة هو تطوير علاجات فعّالة لتعزيز التوعي الجديد للأنسجة المهندسة [46,53-56]،

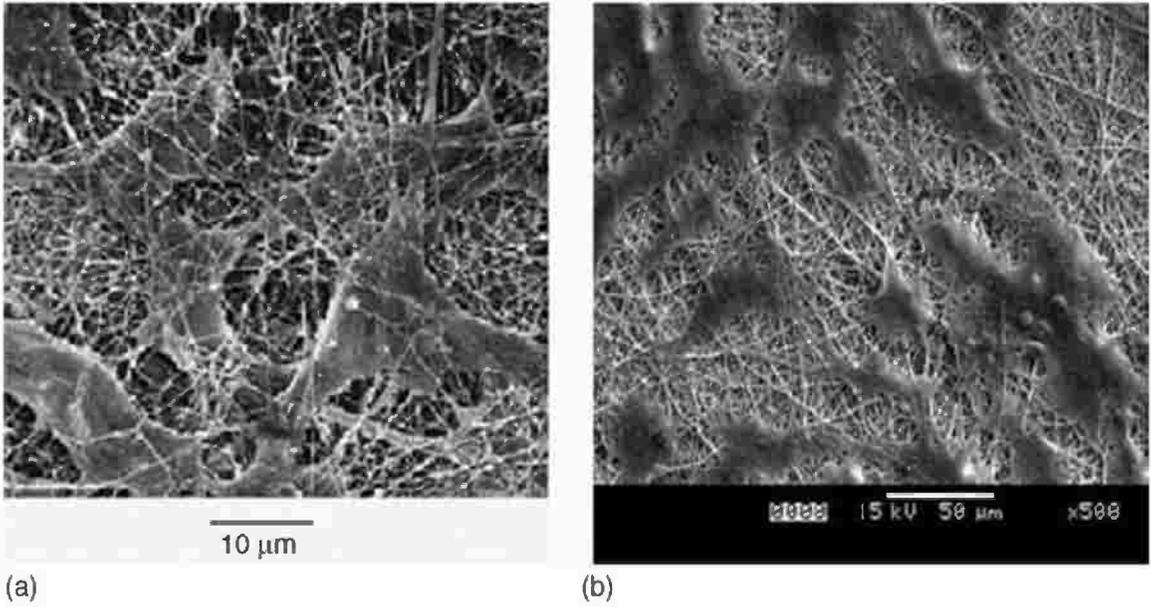
وذلك عندما تكون هجرة الخلايا ونُشوب (نمو) الأنسجة (tissue ingrowth) في هذه البنية محدودة [57]. ولأن فقدان أو فشل الأنسجة والأعضاء هي مشكلة متكررة ومُكلِّفة في مجال الرعاية الصحية البشرية، فمن المفترض أن تطوير طرق لتجديد الأنسجة البشرية سيكون له تأثير كبير على التخصصات الطبية في المستقبل [58].

(١٣,٣) السّمات النانوية للأنسجة القلبية الوعائية الأصلية NANOSCALE FEATURES OF NATIVE CARDIOVASCULAR TISSUES

تمتلك الأنسجة الحية درجة عالية من الخشونة السطحية النانوية (nanosurface roughness)؛ وفي الواقع، فإن البروتينات والجزيئات الحيوية الأخرى التي تكون الخلايا معتادة على التفاعل معها هي بُنى ذات أحجام نانوية (nanosized structures) [59,60]. وفي الحقيقة، فإن جميع جوانب المصفوفة خارج الخلية (ECM)، بما في ذلك الألياف والمسام (pores) والتواءات (ridges) والأخاديد (grooves)، تكون كلها مُنظمة في ترتيب من بضعة نانومترات إلى أكثر من ١٠٠ نانومتر [61]. وتوجد أنواع مختلفة من المصفوفة خارج الخلية (ECM) في جميع الأنسجة القلبية الوعائية (cardiovascular tissues)، بما في ذلك عَضَلُ القلب وصمامات القلب والنظام الوعائي الشرياني (arterial vascular system) والنظام الوعائي الوريدي (venular vascular system). وعلى الرغم من الاختلاف في بُنى المصفوفة خارج الخلية (ECM) في جسم الإنسان والناشئ عن الجزيئات الضخمة (macromolecules) المختلفة وتنظيمها، فإنه يتم الحفاظ على الأبعاد في المستوى النانوي في كل مكان [62]. تقوم المصفوفة خارج الخلية (ECM) بأكثر من مجرد توفير الدعم البنيوي للخلايا؛ فتعتبر المصفوفة خارج الخلية (ECM) هامة جداً لتعديل تحرك (motility) وتكاثر (proliferation) وشكل (مورفولوجيا) (morphology) واستقلاب (metabolism) وتمايز (differentiation) وترسيب مصفوفة (matrix deposition) الخلايا [63]. فعلى سبيل المثال، لقد تم اقتراح أن الخلايا البطانية (ECs) تكون مُحَثَّة (thrombogenic) أكثر على المواد التي هي "ملساء" ("smooth") في المستوى النانوي؛ ولهذا فإن أي من السمات السطحية للمادة هي أكبر بكثير مما هو مُقاس في حجم النانو. إن هذا النقص في مقاومة التخرش (thromboresistance) يعني بأن الخلايا لن تكون متميزة بشكلٍ كامل، لأنها تعاني من نقص في الوظيفة المضادة للتخرش (anticoagulant function) [64,65]. وقد افترضَ بأن نقص القوى الميكانيكية للركيزة (substrate - mechanical forces) مع خلايا على مستوى نانوي يؤدي إلى فقد التمايز (dedifferentiation). وفي الواقع، فإن القوى المناسبة تكون مُولدة أكثر على الأرجح في الجسم الحي عن طريق سمات طوبوغرافية (topographic features) في نطاق قياس من ١٠٠ إلى ١٠٠٠ نانومتر، حيث تجري تفاعلات الخلايا - المصفوفة خارج الخلية (cell - ECM interactions) [66].

إن الغشاء القاعدي هو نوع واحد معين من المصفوفة خارج الخلية (ECM) والذي تركز عليه كافة صفيحات الخلايا الظهارية والبطانية (epithelial and endothelial cell sheets) [61]. بما في ذلك البطانة الوعائية (vascular endothelium). وتفصل هذه الطبقة (الغشاء) ذات السماكة من ٤٠ إلى ١٢٠ نانومتر تلك الأنسجة عن الأنسجة الضامة (connective tissues) الكامنة تحتها، وتتألف بشكلٍ رئيسي من الكولاجين من النمط الرابع (type IV collagen) وألياف اللامينين النانوية (laminin nanofibers) المنطومة أو المتضمنة في هلامات مائية من بروتيوغليكان سلفات الهيبارين (heparin sulfate)

(proteoglycan hydrogels) [62]. وتعتبر هذه الخصائص حاسمة في إعادة إنشاء تصاميم حاملات الخلايا والأنسجة من أجل هندسة الأنسجة الوعائية لأن الطبقات البطانية الأحادية (endothelial monolayers) تنمو بشكل مباشر على الغشاء القاعدي في الأوعية الدموية الأصلية [62]. وبشكل مماثل، فإن المصفوفة التي تقع تحت الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC) تتألف من منبهات بيولوجية (biological cues) ذات حجم نانوي وعناصر بنيوية (structural elements) ذات حجم نانوي. وتتضمن المصفوفة خارج الخلية (ECM) أليافاً من الكولاجين من النمط الأول (ما يقرب من ٤٤٪) والكولاجين من النمط الثالث (٤٤٪) والإيلاستين (١٢٪) [4,67,68] مبعثرة فيما بين البروتيوغليكانات (proteoglycans) المختلفة. انظر الشكل رقم (١٣,١) لصورة تمثيلية للمصفوفة خارج الخلية (ECM) الأصلية مقارنة مع بعض التقنيات الناشئة من أجل المواد الحيوية ذات السمات النانوية (nanofeatured biomaterials).



الشكل رقم (١٣,١). التشابه بين البنية البروتينية للمصفوفة خارج الخلية الأصلية (native ECM protein structure) ومصفوفة ألياف النانو البوليمرية المغزولة كهربائياً (electrospun polymeric nanofiber matrix). (a) خلايا الأرومة الليفية (fibroblasts) مزروعة على ليفات الكولاجين (collagen fibrils) لقرنية جرد (rat cornea). (من Nishida, et al., *Invest. Ophthalmol.*، 1988، 29، *Vis. Sci.*). (b) مزارع خلايا بطانية (endothelial cells) على مصفوفة من ألياف البولي كابرولاكتون النانوية المغزولة كهربائياً (electrospun PCL nanofiber matrix). (من Ma, Z., et al., *Tissue Eng.*, 11, 101, 2005).

ويمكن لنشر الدعامات الوعائية أن يُقابل أيضاً مع نجاح سريري مُحسّن فيما إذا تم تصنيعها باستخدام تصميم هندسي في مستوى النانو (nanoscale architecture). وعلى الرغم من أنها ليست طبيعية في الأصل، إلا أنها يجب أن تكون مصممة لتحاكي بنية الأنسجة الوعائية الطبيعية التي تمتلك درجة عالية من البنية النانوية. وعلى الرغم من هذه الحقيقة، فإن معظم الدعامات الوعائية التي تُستخدم حالياً هي ملساء في مستوى النانو، وتحد من نمو الخلايا البطانية على هذه البنى [17].

(١٣،٤) الإستراتيجيات التقنية النانوية من أجل هندسة أنسجة قلبية وعائية مُحسّنة NANOTECHNOLOGICAL STRATEGIES FOR IMPROVED CARDIOVASCULAR TISSUE ENGINEERING

تُشكل الخصائص والمميزات المعقدة والمتخصصة لأنسجة عضل القلب والأنسجة الصمامية (valvular tissues)، بما في ذلك الخصائص الميكانيكية التي تسمح بتقلص الأنسجة القلبية وتغيير شكل الصمامات، عقبات كبيرة لإنشاء طُعم وظيفية مهندسة نسيجياً من أجل المداخلات القلبية (cardiac interventions). وبشكلٍ مماثل، فإن تركيب وبنية الجدار الوعائي (vascular wall) تضيف تحديات فريدة من نوعها من أجل تطوير بدائل حية لأوعية دموية صغيرة القطر مهندسة نسيجياً، والتي يمكن أن تقاوم الضغوط العالية والبيئات النبضية (pulsatile environments) [3]. تُنشئ الطبيعة المعقدة للأوعية الدموية تحدياً هندسياً هائلاً لإعادة التزويد بأنسجة مزروعة ونامية ذات جملة وعائية مابكرية وظيفية (functional microvasculature) بعد المرض أو الإصابة أو الجراحة. وقد تم الافتراض بأن تعديل سطح المادة الحيوية في مستوى النانو يمكن أن يؤدي إلى تحسّن استجابة الخلايا والأنسجة للمواد الحيوية المزروعة [69-71]. ويمكن للمنبهات الطبوغرافية النانوية (nanotopographical cues) أن تغير الوظائف الخلوية الأساسية بما في ذلك الالتصاق والإجلاب (recruitment) (الزيادة التدريجية في شدة المنعكس عند استمرار التنبيه) والحركة (movement) والشكل أو المورفولوجيا والموت المبرمج للخلايا (apoptosis) والتعبير الجيني وإنتاج البروتين؛ ولهذه الأسباب [69,72,73]، فقد أصبح البناء النانوي (nanostructuring) للمواد المهندسة نسيجياً مجالاً مهماً جداً في بحوث المواد الحيوية. ومن أجل إستراتيجيات هندسة الأنسجة القلبية الوعائية والتي تتضمن الأنسجة العضلية القلبية وطعوم الصمامات القلبية وتطوير طعوم الأوعية الدموية صغيرة القطر (small caliber vessel grafts) والبنى التي تحمل الخلايا والأنسجة المهندسة نسيجياً والتي تشجع على التوعي الجديد (تكوّن الأوعية الجديدة) في الأنسجة المحيطة، فإنه من الواضح أن إنشاء سمات ذات حجم نانوي على المواد الحيوية يمكن أن يحاكي بشكل أكثر دقة السمات الطبيعية للمصفوفة خارج الخلية (ECM) لأنواع الخلايا القلبية الوعائية (cardiovascular cell types) من أجل تحسّن التصاق ونمو الخلايا.

(١٣،٤،١) هندسة سمات طبوغرافية نانوية على المواد الحيوية Engineering of Nanotopographical Features on Biomaterials

كما نُوقش سابقاً، فإن الإجراءات التي تشمل مواد الدعامات الوعائية ستستفيد من البنية النانوية على الطعم المعدني. لقد قام Choudhary وآخرون [17] بتصنيع بُنى من التيتانيوم (Ti) ذات بنية نانوية وذات نعومة نانوية (nanosmooth) لدراسة القدرة على البقاء على قيد الحياة ودراسة وظيفة الخلايا الوعائية على مثل هذه البنى. وقد تم استخدام التصوير بواسطة مجهر

القوة الذرية (atomic force microscopy - AFM) لتأكيد وجود البنى النانوية الهندسية على مركبات التيتانيوم المدججة ذات البنية النانوية، مُظهرًا زيادة في خشونة السطح تقرب من حوالي ٢.٥ ضعفًا، بالمقارنة مع مركبات التيتانيوم المدججة التقليدية. وقد كان التصاق كلٍ من الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMCs) والخلايا البطانية (ECs) أكبر بكثير على سطوح التيتانيوم ذات البنية النانوية مقارنة مع سطوح التيتانيوم ذات النعومة النانوية. وقد أظهرت التجارب طويلة الأمد لدراسة قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة ودراسة كثافة الخلايا أن سطوح التيتانيوم ذات البنية النانوية قد سهلت نمو طبقة أحادية متكدسة (confluent monolayer) لكلٍ من الخلايا البطانية (ECs) والخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMCs) في أيام تسبق تلك على سطوح التيتانيوم التقليدية. والأهم من ذلك، أن كلاً من الخلايا البطانية (ECs) والخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMCs) قد أظهرت زيادة لأكثر من ضعفين في إنتاج الكولاجين والإيلاستين على سطوح التيتانيوم النانوية الخشنة (nanorough Ti)؛ مما يُظهر أن البنية النانوية الهندسية (nanoarchitecture) قد أدت إلى زيادة في تركيب المصفوفة خارج الخلية (ECM) وفي وظيفة الخلية.

ينطوي تصميم معظم إستراتيجيات هندسة الأنسجة الوعائية على بذر وزراعة الخلايا البطانية (ECs) والخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMCs) لإنشاء أوعية دموية أكثر وظيفية قبل عملية الزرع. وعلى أي حال، تتألف هذه المواد من ألياف ذات حجم مايكروبي وسمات سطحية لا تحاكي على نحو كافٍ الطوبوغرافيا الطبيعية ذات الأبعاد النانوية (natural nanodimensional topography) للأنسجة الوعائية التي سيتم استبدالها [61,74]. وقد تكون هندسة السمات النانوية (nanofeatures) على سطوح المواد الحيوية ضرورية لتوضيح المصفوفة خارج الخلية (ECM) الطبيعية للخلايا البطانية والخلايا العضلية الوعائية الملساء بشكل أكثر دقة.

لقد زرع Miller وآخرون [75] خلايا بطانية وخلايا عضلية ملساء أبهرية جُرذبية على أفلام من بولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) (poly(lactic-co-glycolic acid) - PLAGA) تم معالجتها مع هيدروكسيد الصوديوم (10 N NaOH) لمدة ساعة واحدة وذلك لإنشاء سمات نانوية على سطح الفيلم. لقد أدت هذه المعالجة إلى حفر خشونة سطحية (surface roughness) أكبر بمقدار من ٤٧٦٪ إلى ٥٠٢٪ على هذه الأفلام مقارنة مع العينات غير المعالجة (untreated samples)، وذلك اعتمادًا على طريقة تصنيع الفيلم. وقد تم بعد ذلك مقارنة هذه الأفلام المعالجة مع الأفلام غير المعالجة ذات البنية المايكروبية (المعالجة باستخدام هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) المخفف أكثر ولفترة زمنية أقصر)؛ وذلك لتحديد تأثيرات الطوبوغرافيا النانوية على التصاق ونمو الخلايا البطانية (ECs) والخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMCs). ومن المثير للاهتمام، أن التصاق الخلايا البطانية (ECs) قد انخفض بشكل كبير على الأفلام ذات السمات النانوية (nanofeatured films)، على الرغم من أنها زادت وبشكل ملحوظ من التصاق الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC) على البوليمر. وبطريقة مماثلة، فقد بيّنت تجارب كثافة الخلايا مع مرور الوقت أن بولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) (PLAGA) ذا السمات النانوية قد دعم وبشكل ملحوظ زيادة كثافة الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC) على مدى خمسة أيام في المزرعة، في حين يمنع وبشكل كبير نمو الخلايا البطانية (ECs) على السطح نفسه. ومع ذلك، فقد تم إنشاء تحفيز كبير لنمو الخلايا البطانية (ECs)

على البولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) (PLGA) ذي السمات النانوية، والذي تمت صناعته من خلال صب (قولة) مطاط صناعي من السيليكون (silicone elastomer casting method) بدلاً من طريقة صب المذيب (solvent - casting approach) الأكثر تقليدية [75]. وقد أظهرت هذه الدراسات أنه عن طريق المحاكاة الأفضل للميزات السطحية (surface characteristics) للمصفوفة خارج الخلية (ECM) الطبيعية، تم تحسين التصاق ونمو الخلايا البطانية (ECs) والخلايا العظمية الوعائية الملساء (vSMC) على المواد الحيوية. وقد اختبرت تجارب أخرى الآلية التي من خلالها تحفز زيادة الطوبوغرافيا النانوية السطحية (surface nanotopography) التصاق ونمو الخلايا الوعائية، حيث أظهرت أن عينات البوليمر ذات البنية النانوية قد امتزت (امتصت) فبرونيكتين (fibronectin) وفيترونكتين (vitronectin) أكثر بشكل ملحوظ من السطوح ذات الحشونة النانوية (nonroughened surfaces) [76]. ولأن هذين النوعين من البروتينات حاسمان من أجل التوسط للتصاق الخلوي (cellular adhesion)، فإنه من الواضح أن زيادة تجاذب بروتينات المصفوفة خارج الخلية (ECM) على المواد ذات السمات النانوية قد يوفر الأساس لتحسين أداء الخلايا الوعائية.

كما يمكن أيضاً تطبيق الطوبوغرافيا النانوية على سطوح المواد الحيوية بطرق أكثر دقة ومفصلة أكثر مما هو ممكن باستخدام الحفر القاعدي (base - etching) للبوليمرات من خلال الحفر العرواني (colloidal lithography) ونقش الطبقة الرئيسية (embossing master). فباستخدام تقنيات الحفر العرواني، تتم المبادعة بين غرويات نانوية (nanocolloids) (مواد غروانية نانوية) ويتم تجميعها بشكل كهروستاتيكي على سطح البوليمر وتستخدم كقناع لتغيير سطح الركيزة. ومن ثم تتم إزالة هذه الغرويات عن طريق الحفر؛ مما يؤدي إلى إنتاج سطح ذي أعمدة نانوية أسطوانية (cylindrical nanocolumns) [70,71]. وتستخدم تقنيات نقش الطبقة الرئيسية ركائز معدنية أو ركائز إيبوكسية (epoxy substrates) ذات شكل أو نمط مرغوب، والتي يتم إنتاجها عن طريق تقنية الكتابة باستخدام الحزم الإلكترونية (electron beam writing technology). ومن ثم يتم ضغط الطبقة الرئيسية (master) حرارياً في مادة لنقل الشكل أو النمط المعكوس (reverse pattern) على السطح [72]. وقد استخدم Giavaresi وآخرون [73] هذه التقنيات لإنشاء حُفر نانوية (nanopits) بعمق ١٠٠ نانومتر وقطر ١٢٠ نانومتر على سطح من بوليستر ٣-هيدروكسي بوتيرات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate - 3HB - 3HV) الذي يحتوي على ٨٪ من (3HV)، وأسطوانات نانوية (nanocylinders) من البولي كابرولاكتون (PCL) ذات ارتفاع ١٦٠ نانومتر وقطر ١٠٠ نانومتر على كتلة البولي كابرولاكتون (PCL). وقد اختبر المؤلفون استجابة الأنسجة الموضعية في الجسم الحي لعملية زرع مواد ذات سمات نانوية تحت الجلد (subcutaneous)، بالمقارنة مع عينات مراقبة من البوليمر غير المعالج (untreated polymer controls). ومن الجدير بالذكر أن السطوح ذات البنية النانوية قد أظهرت كبسولات النهائية (inflammatory capsules) محيطة بالطعوم أسماك من تلك المحيطة بسطوح البوليمر غير المعدلة. وقد حُثت طعوم البولي كابرولاكتون (PCL) وبشكل ملحوظ على توليد كثافة وعائية بعد ١٢ أسبوعاً من عملية الزرع أكبر من تلك الخاصة بطعوم الـ (3HB - 3HV)، كما حُثت طعوم البولي كابرولاكتون (PCL) ذات البنية النانوية على توليد كثافة وعائية أكبر من تلك الخاصة بعينات المراقبة من البولي كابرولاكتون (PCL). إن هذه المجموعة من التجارب تمثل التقييم الأول

لاستجابة الأنسجة الموضعية للسماوات الطوبوغرافية النانوية؛ مما يدل على أن السطوح ذات الطوبوغرافيا النانوية قد تشجع على زيادة التوعي الجديد في الجسم الحي. ولذلك؛ فإن إنشاء سطوح مواد حيوية ذات سمات نانوية (وعلى وجه الخصوص إنشاء أعمدة نانوية (nanocolumns)) يمكن أن يكون وسيلة جذابة لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة مهندسة نسيجياً تهدف إلى زيادة نمو أوعية دموية جديدة في الأنسجة المتجددة.

وكإستراتيجية بديلة لتشكيل سمات نانوية على شكل خشونة سطحية أو أسطوانات نانوية على سطح كتلة من البوليمر، قام Goodman وآخرون [65] بقولبة (cast) (وضع قالب صب) المصفوفة خارج الخلية (ECM) الفعلية الأصلية على سطح البوليمر. وقد تم إعداد نسخة معكوسة مطابقة للأصل (inverse replica) من سطح المصفوفة خارج الخلية (ECM) تحت البطانة (subendothelial ECM surface) لوعاء دموي مُعرى ومتفخ (denuded and distended vessel) عن طريق قولبة أو صب الحيز اللعبي (luminal space) براتن (راتنج) بوليمري (polymeric resin). بعد ذلك تم نسخ سطح المصفوفة خارج الخلية المنسوجة (textured ECM surface) في البولي يوريثين (polyurethane)، وقد تم أيضاً ملاحظة طوبوغرافيا معقدة في مستوى ما دون المايكرومتر مع العديد من السمات التي يمكن قياسها في ترتيب من ١٠٠ نانومتر. وبعد ذلك أظهر Goodman وآخرون بأن الخلايا البطانية قد أظهرت التصاقاً وشكلاً أفضل على أفلام البوليمر التي تم قولبة أو صب المصفوفة خارج الخلية عليها (ECM - cast polymer films) من تلك على عينات المراقبة غير المنسوجة (nontextured control). ففي حين أن هذه التقنية قد التقطت وبشكلٍ مؤكد السمات النانوية للمصفوفة خارج الخلية (ECM) الأصلية، إلا أنه قد تم تدمير قالب الصب من أجل استعادة النسخة المطابقة للأصل من مادة البولي يوريثين وذلك من أجل إجراء المزيد من الدراسة. ولذلك؛ فإن كل طعم / حاملة خلايا وأنسجة (graft / scaffold) سيتطلب قالب المصفوفة خارج الخلية (ECM - cast) الخاص به، الأمر الذي يعتبر غير ناجح من حيث الوقت والتكلفة [75].

(١٣،٤،٢) التحديد الوظيفي لسطوح المواد الحيوية باستخدام عناصر ذات حجم نانوي Functionalization of Biomaterial Surfaces With Nanosized Motifs

كبدل لهندسة الخشونة السطحية أو السمات السطحية في الأبعاد ذات المستوى النانوي على سطوح المواد الحيوية، فقد تم اقتراح التحديد الوظيفي المباشر للسطح (direct surface functionalization) (إضافة مجموعات وظيفية كيميائية للسطح) باستخدام أمطاط أو عناصر بيتيدية وبروتينية نشطة حيوياً (bioactive peptide and protein motifs) وذلك لتحسين التصاق ونمو ووظيفة الخلايا الوعائية. يجب على المواد المناسبة لتطبيقات هندسة الأنسجة، بما في ذلك الأنظمة الوعائية، أن تكون لها خصائص ميكانيكية وبنوية وتحليلية (degradation) ضمن المجالات الصلبة (rigid ranges)، ويجب أن تدعم أيضاً نقل الإشارات (signal transmission) مع الأنسجة المحيطة بها [77]. واحدة من الطرق لدمج جميع هذه القيود التصميمية هي استخدام طريقة التغليف بطبقة خارجية، أو التحديد الوظيفي لسطح مادة كتلية (bulk material).

إن الأوستيوبونتين (Osteopontin - OPN) هو واحد من تلك البروتينات المقترحة لمثل هذه الإستراتيجيات. يربط الأوستيوبونتين (OPN) وهو بروتين متعدد الوظائف (multifunctional protein) العديد من أنواع الخلايا من خلال

التفاعلات التي تتم بوساطة قليل الببتيد الأرجينين - غليسين - أسبارتات (RGD - mediated interactions) مع إنتغرينات (integrins) متنوعة [78]، ويمكن أن يربط نفسه مع مكونات المصفوفة خارج الخلية (ECM) بما في ذلك الكولاجين [79] والفيبرونيكتين [80]، وقد ثبت بأنه يعزز التئام الجروح (wound healing) [81] وبقاء الخلايا البطانية [82] وتولد الأوعية الدموية [83]. عندما يرتبط عنصر (motif) بسطح المواد الحيوية في تشكيل وتوجيه وثيق الصلة بالناحية الفيزيولوجية، يمكن للأوستيوبونتين (OPN) تسهيل البقاء والنمو البطاني والتئام الجروح وانخفاض رد الفعل الالتهابي (inflammatory reaction) لحاملات الخلايا والأنسجة المزروعة والمصنوعة من مواد حيوية [84]. وقد استغل Liu وآخرون [84] التحكم بطبقة الغلاف الخارجية للسطح والناجمة من خلال طبقات أحادية مُجمّعة ذاتياً (self - assembled monolayers - SAMs) مبنية على أساس الهيدروكربون (hydrocarbon) وذات تحديد وظيفي أنتهائي وذلك لربط الأوستيوبونتين (OPN) على سطوح المواد الحيوية. وقد انتهى المؤلفون إلى أن الطبقة الأحادية المجمعّة ذاتياً والمنتهية بـ (NH_2^-) مع استخدام بروتين الأوستيوبونتين (OPN) الممتز قد زادت من طبقة الغلاف الخارجية إلى الحد الأعلى، وقد تم إظهار تكّؤس (تجميع) بروتيني (protein aggregation) وتغطية غير كاملة ببروتين الأوستيوبونتين (OPN) على عينات كارهة للماء (hydrophobic) منتهية بـ (CH_3^-). وقد كان هناك تشابه بين التغطية بخلايا بطانية أبهرية بقرية (bovine aortic endothelial cells) على سطح المادة وصور مجهر القوة الذرية (AFM)؛ مما يشير إلى أن الربط البروتيني بجزء الـ (NH_2^-) قد يُحسّن تشكيل / توجيه بروتين الأوستيوبونتين (OPN) الذي تلتصق به الخلايا البطانية. وبما أنه قد وُجد بأن امتداد انتشار الخلايا يعزز نمو ووظيفة الخلايا [85,86]، فيمكن إذاً لحاملات الخلايا والأنسجة المعالجة ببروتين الأوستيوبونتين (OPN) أن تزيد من البقاء البطاني ومن القدرة وعائية المنشأ (angiogenic potential) [84]. ويمكن لهذه الحاملات بسبب فائدتها أن تُستخدم في المستقبل لزيادة الوعي الجديد في حاملات الخلايا والأنسجة المهندسة نسيجياً وأن توفر طبقة غلاف خارجية لسطوح المواد الحيوية المصممة من أجل الطعوم الوعائية صغيرة القطر (small - diameter vascular grafts).

ويمكن أيضاً للأفلام النانوية متعددة الطبقات (multilayer nanofilms) والمصنوعة من خلال طريقة طبقة تلو الطبقة (layer - by - layer - LbL) أن تُستخدم لإنشاء أفلام رقيقة نشطة حيويًا (bioactive thin films) على المواد بطريقة بسيطة ويمكن التحكم بها. وينطوي هذا النوع من التجميع على الامتصاص المتبادل (alternate adsorption) لمتعدّدات الكهارل المشحونة إيجابياً وسلبيًا (positively and negatively charged polyelectrolytes) [93-87]، ويمكن للفيلم التالي أن يُزخرف في وقت لاحق باستخدام جزيئات نشطة حيويًا (bioactive molecules) قادرة على نقل الإشارات إلى الخلايا. وقد قام Wittmer وآخرون [77] بإنشاء فيلم نانوي ذي طبقات من البولي (إل - ليزين) (poly(L-lysine) - PLL) وثنائي سلفات الديكستران (DS - dextran disulfate)، وإنهاء الفيلم باستخدام أجزاء الفيبرونيكتين (fibronectin moieties) لتعزيز التصاق وانتشار الخلايا البطانية على سطح المادة [94]. وقد سمحت هذه الطريقة بإنشاء أفلام ذات سماكات نانوية: فقد كانت سماكة طبقة البولي (إل - ليزين) - ثنائي سلفات الديكستران (DS - PLL) حوالي ١٠ نانومترات، مع طبقة غلاف خارجية من الفيبرونيكتين بسماكة ٢٢ نانومتراً موضوعة فوقها. بعد ذلك اختبر Wittmer وآخرون حركيات (kinetics)

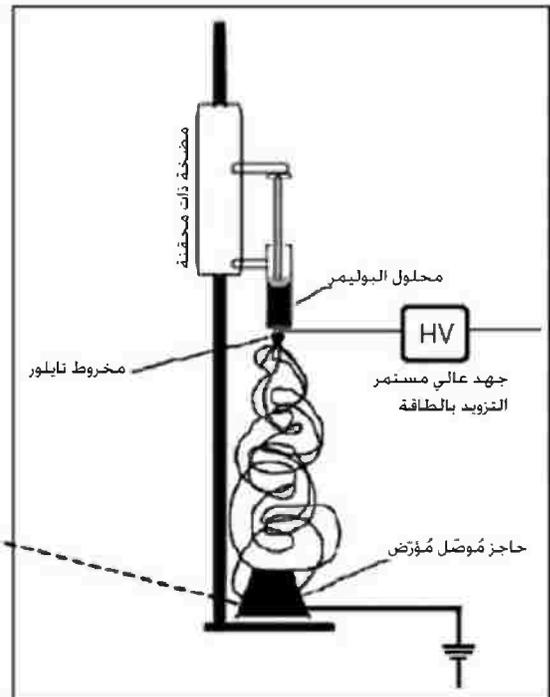
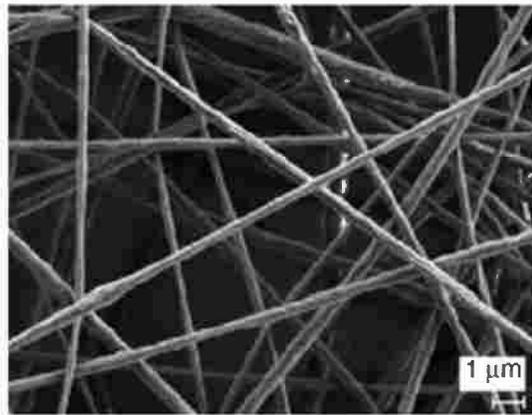
الخلايا البطانية الوريدية السريعة البشرية (human umbilical vein EC) على سطوحها، مشيراً إلى أن الخلايا على السطح المغطى بالفبرونيكتين قد انتشرت بنسبة ١٤٠٪ بالمقارنة مع تلك من أجل سطوح التيتانيوم غير المعالجة. وبالتالي؛ قد يكون هذا النموذج بمثابة إستراتيجية واعدة لعرض طبقات ذات أحجام نانوية (nanosized layers) من المنبهات أو الإشارات البيولوجية، مثل الفبرونيكتين، على المواد الحيوية المستخدمة من أجل هندسة الأنسجة الوعائية لتعديل تفاعلات الخلايا؛ وبالتالي زيادة وظيفة الخلايا.

بالإضافة إلى البروتينات، فقد تم اقتراح مواد غير عضوية (inorganics) / مواد سيراميكية (ceramics) وثيقة الصلة من الناحية الفيزيولوجية كطبقات غلاف خارجية من أجل المواد المستخدمة في هندسة الأنسجة الوعائية. وقد قام Furozono وآخرون [95] بإنشاء طبقة غلاف خارجية من بلورات الهيدروكسي أباتيت البلورية النانوية (nanocrystalline hydroxyapatite (HA) crystals) على نسيج من الداكرون (Dacron fabric) من خلال الارتباطات التساهمية (covalent linkages)، واقترحوا استخدامه كمادة لطعم صغير القطر. وكما نُوقش في الفقرة (١٣.٢)، فإن الداكرون هو مادة تُستخدم بنجاح كمادة طعم تحويلى من أجل الأوعية الدموية ذات القطر الأكبر من ٦ ميليمترات؛ فعندما يتم إدراج الداكرون (أو أي مادة تقليدية أخرى) في أوعية صغيرة القطر (smaller caliber vessels)، يفشل التحويل بسبب التخرش أو عودة التضيق. وقد اقترح Furozono وآخرون أن استخدام طبقة غلاف خارجية من الهيدروكسي أباتيت ذات حجم نانوي (nanosized HA coating) يمكن أن تزود بتفاعلات مُمرضة (pathogenic interactions) مع الخلايا البطانية أقل من نسيج الداكرون وحده. يُظهر المؤلفون وبوضوح أن نسيج الداكرون خاصتهم المغلف بالهيدروكسي أباتيت (HA) يسمح بالتصاق الخلايا البطانية الوريدية السريعة البشرية بشكل أفضل بكثير من نسيج الداكرون وحده، موضحين أن طبقة الغلاف الخارجية يمكن أن تشجع على تحسين الوظيفة البطانية مقارنة مع ما هو متاح سريريًا في الوقت الحالي.

(١٣،٤،٣) حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو المغزولة كهربائياً Electrospun Nanofibrous Scaffolds

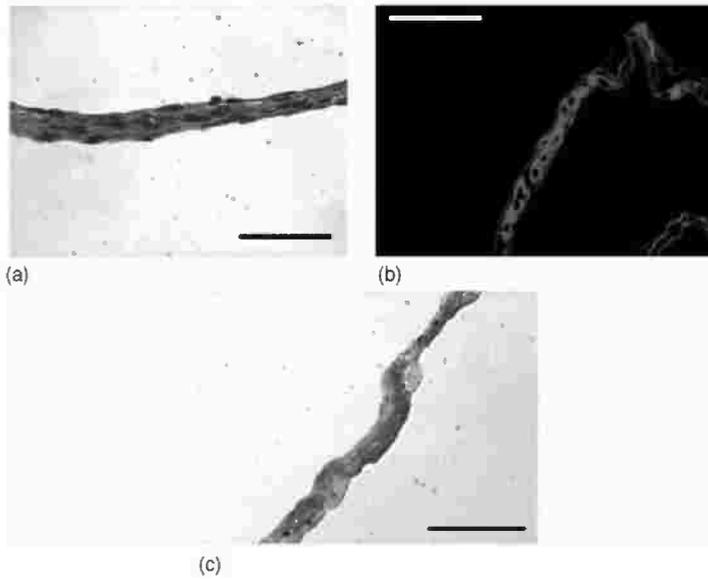
لقد أصبح الغزل الكهربائي طريقة تصنيع شائعة من أجل المواد الحيوية، ولا سيما في مجتمع هندسة الأنسجة؛ وذلك بسبب الاهتمام المتزايد في إنشاء حاملات خلايا وأنسجة مصممة (tailored scaffolds) مع خصائص في مستوى النانو [96]. إن هذه الطريقة تتطلب فقط جهازاً بسيطاً وغير مكلف يتضمن مضخة حقن (syringe pump) ومصدر جهد عالٍ (high voltage source) ومُجمّعاً (collector). ويظهر في الشكل رقم (١٣.٢) مثال على جهاز غزل كهربائي نموذجي (typical electrospinning setup). لإنشاء شبكة من ألياف النانو (nanofibrous mesh)، فإنه يتم تحميل محلول بوليمر (polymer solution) في محفنة وإطلاقه منها ببطء، بحيث تبقى كمية صغيرة من المادة مُعلّقة في طرف الإبرة بواسطة التوتر السطحي. ويقوم جهد عالٍ مُزوّد عن طريق حقل كهربائي (electric field) بشحن المحلول، مؤدياً إلى إنشاء قوة كهروستاتيكية (electrostatic force) في شكل تنافر شحنة (charge repulsion) ضمن المحلول. فعندما يتم التغلب على التوتر السطحي، يتم البدء بنفاث (jet) محلول البوليمر. وعندما يغادر النفاث باتجاه المجمع يتبخّر المذيب ويتم التقاط الألياف [96].

إن هذه الطريقة في تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة قد تم استخدامها لغزل عدد من المواد البوليمرية الاصطناعية والطبيعية كهربائياً [96] إلى ألياف يتراوح قطرها من ٣ نانومترات إلى أكثر من ٥ مايكرومترات [97]. لقد بقيت إمكانية الحصول على سمات في المستوى النانوي على الشبكات المغزولة كهربائياً (electrospun meshes) لا مثيل لها بواسطة أي من التقنيات الأخرى لمعالجة المواد الحيوية. حيث يمكن إنجاز نسبة سطح إلى حجم (surface - to - volume ratio) عالية ومسامية عالية في الشبكات المغزولة كهربائياً وذلك من أجل دمج (incorporation) وإرواء (تدفق أو حقن متواصل) (perfusion) أفضل للخلايا. بالإضافة إلى ذلك، يسمح التحكم بالبنية النانوية بمرونة في تصميم الأنسجة [98]. وقد تم توثيق أن قطر ألياف حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو يمكن أن يمارس تأثيراً ملموساً على سلوك الخلايا [99]؛ وبالتالي يمكن تحديد المجالات المناسبة للألياف من أجل أنواع محددة من الخلايا والبنى النسيجية. ويمكن لحاملات الخلايا والأنسجة المشكّلة من الشبكات المغزولة كهربائياً الاستفادة من الطبيعة الكامنة (inherent nature) للمصفوفة خارج الخلية الأصلية (native ECM) في المستوى النانوي ويمكن بذلك أن تدعم نمو الخلايا والأنسجة التي لا يتم دعمها من خلال التصاميم ذات السمات الماكروية (الكبيرة أو الضخمة) أو المايكروية (الصغيرة أو الدقيقة) (macro - or microfeatured designs).



الشكل رقم (٢، ١٣). جهاز غزل كهربائي نموذجي (typical electrospinning setup) ومنتجه: طبقة مستوية من الألياف غير الخبوكة (nonwoven fiber mat). (من (Yordem, O.S., *Mater. Des.*, 29, 34, 2008).

بسبب العديد من مزايا حاملات الخلايا والأنسجة المغزولة كهربائياً (electrospun scaffolds)، فقد تم استغلال هذه الطريقة من قبل مهندسي الأنسجة القلبية الوعائية في محاولة لإنشاء أنسجة قلبية. وقد أنتج Shin وآخرون [100]، شبكات غير محبوكة من ألياف البولي كابريولاكتون النانوية (PCL nanofibrous nonwoven meshes) مع متوسط قطر ألياف من ٢٥٠ نانومتر، وقاموا بتغليفها بواسطة الكولاجين لتعزيز التصاق الخلايا. وقد تم تمديد الشبكة عبر حلقة سلكية (wire ring)، مضافة كجهاز تمديد سلبي أو حامل (passive stretching device) لتكييف وإنضاج الخلايا المبذورة على الطعوم وللسماح بالتقلصات (contractions) عند التردد الطبيعي للخلايا. وبعد ٣ أيام في المزرعة، بدأت الخلايا العضلية القلبية الجُرْدِيَّة (rat cardiomyocytes) بالتقلص على حاملة الخلايا والأنسجة، وأظهرت قَلْوَصِيَّة أو انقباضاً متواصلًا (continuous contractility) على مدار ١٤ يوماً من الاختبار. ومن المشاهد المقطعية العرضية (cross-sectional views) للشبكات، فقد قامت الخلايا العضلية القلبية بتشكيل ترتيب مُحكم والعديد من الاتصالات ما بين الخلايا (intercellular contacts) في كل مكان من كامل الشبكة (انظر الشكل رقم ١٣.٣ a). وبالإضافة إلى ذلك، فإن تلوين خيوط الأكتين (actin filaments) (الشكل رقم ١٣.٣ b) يُظهر الأكتين في كل مكان من كامل سماكة الشبكة. ويتلون أيضاً وبشكلٍ إيجابي بروتين التروبونين - I القلبي (cardiac troponin - I) (وهو بروتين عضلي) في داخل بُنى حاملة الخلايا والأنسجة - الخلايا (cell - scaffold structures) (الشكل رقم ١٣.٣ c). يُزود هذا العمل بطريقة من أجل تصنيع عضل قلب مُهندَس (engineered myocardium) باستخدام بوليمر اصطناعي ذي سمات نانوية (nanoscale features).

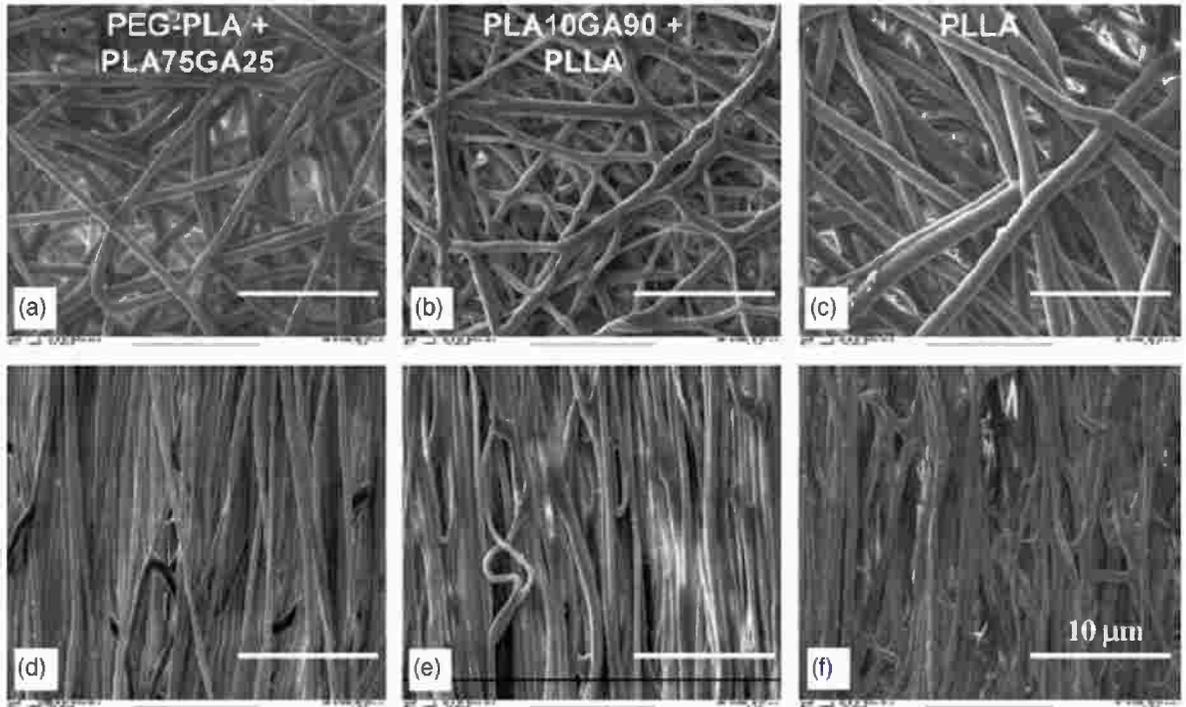


الشكل رقم (١٣،٣). تلوين الخلايا العضلية القلبية الجُرْدِيَّة (rat cardiomyocytes) على شبكة مغزولة كهربائياً من ألياف البولي كابريولاكتون النانوية (nanofibrous PCL electrospun mesh) والتمتددة على حلقة سلكية (wire ring) لتسهيل تقلص الأنسجة (tissue contraction). (a) يبين تلوين الهيماتوكسيلين (hematoxylin) واليوزين (eosin) أن الخلايا التصقت خلال كامل الشبكة. (b) تلوين كيميائي هيستولوجي مناعي (immunohistochemical staining) للأكتين (F-actin)؛ تجتاز ألياف الأكتين (actin fibers) كامل سماكة حاملة الخلايا والأنسجة البوليمرية. (c) تلوين بروتين التروبونين - I القلبي (cardiac troponin - I)، حيث وُجد في داخل بنية حاملة الخلايا والأنسجة - الخلايا. جميع الصور: بتكبير ٤٠٠ مرة، شريط المقياس - ٥٠ مايكرومتراً. (من (Shin, M., et al., *Biomaterials*, 25, 3717, 2004).

يمكن استخدام الغزل الكهربائي لمعالجة مشاكل النمو الاتجاهي (directional growth) أو تباين الخواص المتأثر بالاتجاه (anisotropy) في تنظيم الخلايا / الأنسجة بسهولة. إن تباين الخواص المتأثر بالاتجاه أمرٌ بالغ الأهمية من الناحية الوظيفية من أجل هندسة الأنسجة القلبية [101-103]، وبالتالي، فقد أصبح الغزل الكهربائي وسيلة شائعة لتصنيع حاملات الخلايا والأنسجة من أجل نماذج هندسة الأنسجة القلبية. على سبيل المثال، لقد قام Zong وآخرون بتصنيع أغشية من بولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) ذات بنية نانوية ما دون المايكرون (submicron nanostructured PLGA membranes) باستخدام نسب متفاوتة من البوليمرات والتراكيب، بما في ذلك الاختلافات في معدل الكراهية للماء (hydrophobicity rate) ومعدل التحلل (حيث تم استخدام حمض البولي لاكتيك (polylactic acid)، و ٢٥:٧٥ من بولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) (PLGA)، وبوليمر مشترك من ٢٥:٧٥ من بولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) (PLGA) وبولي إيثيلين غليكول - بولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) (IPEG - PLGA). ولإنتاج بنية هندسية ذات ألياف موجهة ومتباينة في الخواص (oriented, anisotropic fiber architecture) من حاملات الخلايا والأنسجة المغزولة كهربائياً والموجهة بشكل عشوائي (randomly - oriented electrospun scaffolds)، فقد تم تمديد الشبكات بشكلٍ أحادي المحور بنسبة تمديد تصل إلى ٢٠٠٪ وبمعدل ثابت من ٤ ميليمترات / دقيقة عند درجة حرارة ٦٠ مئوية، ومن ثم تبريدها إلى درجة حرارة الغرفة تحت التوتر (الشد) (tension). ويُظهر الشكل رقم (١٣.٤) نتائج إجراء التمدد أحادي المحور (uniaxial stretching)، والذي أنتج حاملات خلايا وأنسجة بوليميرية موجهة ومتباينة في الخواص بشكلٍ متجانس. وقد أظهرت دراسات لاحقة باستخدام الخلايا العضلية القلبية الجُرذِيَّة أن الخلايا تراصفت مع اتجاه ألياف المادة الحيوية (biomaterial fiber direction) مع نوى متطاولة (elongated nuclei)، وأن محاذاة الألياف (fiber alignment) في مرحلة ما بعد المعالجة (post - processing) قد وفّرت توجيهاً للخلايا لتنمو على طول اتجاه التمدد. وبالتالي؛ يمكن لتقنيات الغزل الكهربائي مع إجراءات معالجة لاحقة لإنشاء شبكات متباينة في الخواص أن تُطور هندسة أنسجة قلبية، من حيث إنشاء حاملات خلايا وأنسجة ذات خصائص هامة من أجل النمو الاتجاهي للأنسجة القلبية (directional growth of cardiac tissue).

وقد تم اقتراح الغزل الكهربائي كوسيلة من أجل تصنيع طعم الصمام الأبهر (aortic valve implant)، حيث إن للصمامات القلبية أشكالاً هندسية (geometries) ومتطلبات ميكانيكية (mechanical requirements) معقدة للغاية. وبشكلٍ نظري، يمكن للشبكات أن تكون مغزولة كهربائياً على مُجمَع بأي شكلٍ هندسي يمكن تصوره، وكما هو موصوف أعلاه، فقد تم تطوير طرق من أجل التلاعب بالخصائص الميكانيكية للشبكات المغزولة. وقد قارن Van Lieshout وآخرون [104] جدوى الغزل الكهربائي للبولي كابرولاكتون (PCL) من أجل الطُعوم الصمامية (valve implants)، بالمقارنة مع نسج أو حياكة (knitting) نفس البوليمر. تشير الحياكة إلى التقنية المستخدمة لإنشاء حاملات خلايا وأنسجة وبدائل اصطناعية معينة، بما في ذلك الدعامة الوعائية، والتي يمكن أن تُنتج أيضاً أشكالاً هندسية معقدة. وقد تم تصنيع البولي كابرولاكتون (PCL) في الشكل الهندسي للصمام الأبهر باستخدام كلتا تقنيتي تنظيم الألياف، وتم تعريض الطُعوم الصمامية الناتجة إلى اختبار ناسخ (مُقلد) النبض (pulse duplicator testing) لفحص وظيفتها في نظام نسخ (تقليد) التدفق (system replicating the flow)

لقلب الإنسان. وقد كانت طريقة أداء الطعوم الصمامية المنسوجة (Knitted valve implants) أفضل من الطعوم المغزولة (spun implants) وذلك لفترة أكثر من ٦ ساعات أثناء اختبار تقليد النبض. حيث إن الصمام المغزول كهربائياً لا يفتح بشكلٍ متناظر، وقد شوهد انفصال لوحدة وريقية - جيبيّة (leaflet - sinus unit) واحدة من جدار الشريان الأبهري (aortic wall)، وفي نهاية المطاف، تتمزق واحدة من الوريقات (leaflets) بشكلٍ كامل. ومع ذلك، فإن كلاً من حاملات الخلايا والأنسجة المغزولة كهربائياً والمنسوجة وذات الطبقات والتي تحتوي على كلٍ من التقنيتين قد تم اختبارها على حدٍ سواء من أجل استخدامها كطعوم صمامية أبهرية.



الشكل رقم (٤، ١٣). (من a إلى c) صور المجهر الإلكتروني الماسح (SEM photographs) لأغشية مغزولة كهربائياً (electrospun membranes) مُعدّة كما هي بدون معالجة إضافية (a) PEG - PLA + PLA75GA25 و (b) PLA10GA90 + PLLA و (c) PLLA. (من d إلى f) صور المجهر الإلكتروني الماسح المقابلة لأغشية مغزولة كهربائياً بعد تمديد أحادي المحور (uniaxialstretching) لتصنيع شبكات بوليمرية موجهة متباينة في الخواص من أجل هندسة الأنسجة القلبية. (من

(Zong, X., et al., *Biomaterials* 26, 5330, 2005).

ومن أجل تطبيقات هندسة الأنسجة الوعائية، درس الباحثون استجابة الخلايا البطانية لمجالات مختلفة من حجم الألياف لتحسين التصاقها ونموها على سطوح بمستوى النانو (nanoscaled surfaces). على سبيل المثال، قام Kwon وآخرون [105] ببذر خلايا بطانية وريدية سرية بشرية على مصفوفات (matrices) من البولي (لاكتيد - كو - كابرولاكتون) (poly (lactide-co-caprolactone) - PLCL) المغزول كهربائياً وبمتوسط أقطار ألياف مختلف، وقد حددوا أن نمو الخلايا كان أفضل على الألياف عند النهاية الأعلى لمستوى النانو (ما يقرب من ١ مايكرومتر). إن النمو الأمثل للخلايا البطانية سوف يكون في حاجة إلى تحسين وذلك من أجل كل مادة حيوية يتم اختبارها ومن أجل كل نوع من الخلايا البطانية يتم استخدامها في الدراسات.

لقد تم اختيار عدد لا يحصى من المواد الحيوية لإجراءات الغزل الكهربائي من أجل هندسة الأنسجة الوعائية. وقد تم اقتراح بولي (الفوسفازينات العضوية) (poly(organophosphazenes)) كمادة حيوية مناسبة لتطبيقات الغزل الكهربائي من أجل هندسة الأنسجة الوعائية. إن لدى هذه البوليمرات جزءاً أساسياً ذا وزن جزيئي مرتفع (high molecular weight backbone) من تناوب لذرات الفوسفور (phosphorus atoms) وذرات النتروجين (nitrogen atoms) ومجموعتين عضويتين جانبيتين. وتشير الخصائص التي تتضمن التحلل الحامضي (التحلل بالماء) (hydrolytic degradation) إلى منتجات غير سامة [106] والقدرة على دعم الالتصاق لأنواع مختلفة من الخلايا، بما في ذلك الخلايا البطانية [107]، إلى أن بولي (الفوسفازينات العضوية) قد تكون مناسبة من أجل بُنى الخلايا - البوليمرات الوعائية (vascular cell - polymer constructs). وقد قام Carampin وآخرون [108] بتركيب بوليمر مشترك جديد، وهو بولي لفوسفازين (إيثيل فينيل آلانواتو)_{١.٤} (إيثيل غليسيناتو)_{٠.٦} (poly[(ethyl phenylalanato)_{1.4} (ethyl glycinato)_{0.6} phosphazene] - Pphe - GlyP)، وإجراء الغزل الكهربائي لأنابيب باستخدام ألياف ذات مجالات قياس مختلفة. وباختيار البارامترات التي أعطت متوسط حجم ألياف بمقدار 850 ± 150 نانومتر، أظهر الباحثون بأن تكاثر الخلايا البطانية العصبية الوعائية المايكروية (rat neuromicrovascular EC) ازداد بشكل ملحوظ، وذلك بالمقارنة مع عينات مراقبة مزارع الأنسجة (tissue - culture controls). ولفترة زراعة امتدت لـ ١٦ يوماً، انتشرت طبقة أحادية متكلسة من الخلايا البطانية من خلال القطر الداخلي لأنبوب الـ (Pphe - GlyP) من دون الدخول في الطبقات الداخلية؛ وبالإضافة إلى ذلك، لم ينهار الأنبوب أثناء هذا الإطار الزمني. وبالتالي، يمكن لهذه المواد الأنبوية ذات الألياف النانوية (nanofibrous tubular materials) أن تكون واعدة كبداية وعائية صغيرة القطر (small - diameter vessel substitutes).

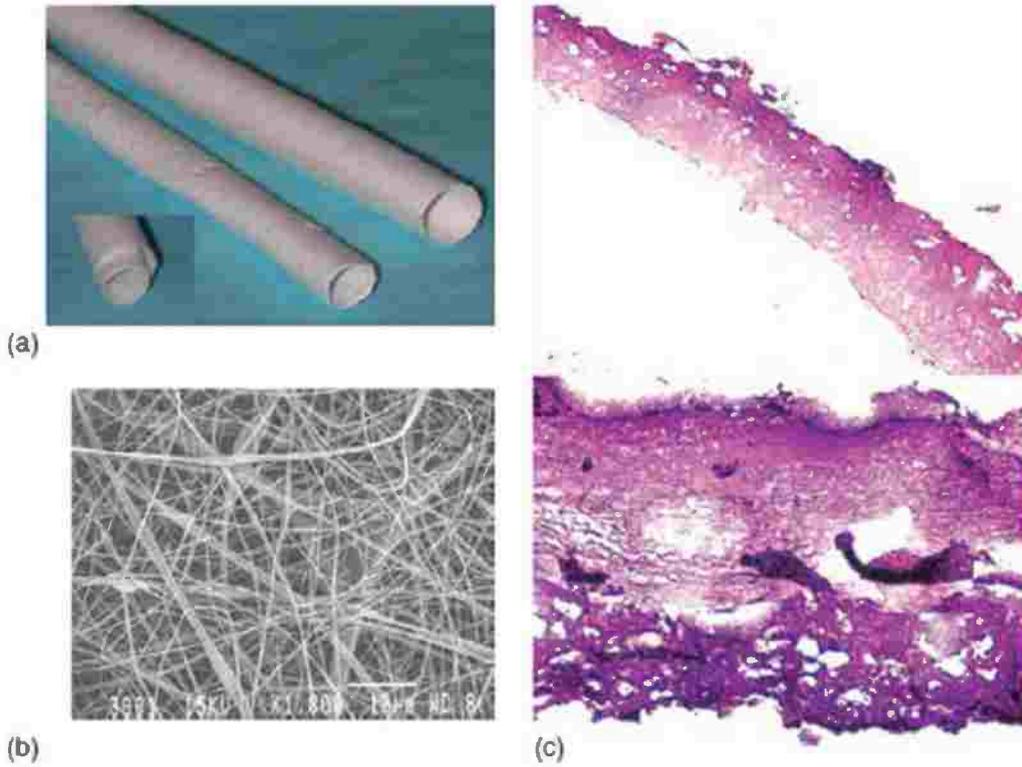
بالإضافة إلى البوليمرات القابلة للتحلل (biodegradable polymers)، فقد تم اقتراح المواد الطبيعية أيضاً كحاملات خلايا وأنسجة من أجل البنى الوعائية. وقد تمت مناقشة الكولاجين [109] والإيلاستين [110] سابقاً على اعتبار أنهما من العناصر الأساسية للمصفوفة خارج الخلية الوعائية (vascular ECM)، وقد تم غزلهما كهربائياً لإنتاج ألياف ذات أقطار نانوية تحاكي الخصائص الجزيئية والنيوية للغشاء الأصلي (native membrane) بطريقة لا مثيل لها بواسطة المواد التركيبية أو الاصطناعية. لقد خلط He وآخرون [111] البولي (لاكتيد - كو - كابرولاكتون) (PLCL) مع الكولاجين لتشكيل ألياف

نانوية مع متوسط أقطار ما بين ١٠٠ و ٢٠٠ نانومتر. وقد كانت الطبقات المستوية (mats) من هذه الألياف النانوية أقل صلابة بكثير من مادة الداكرون التقليدية، والتي تعتبر مفيدة من أجل هندسة أنسجة الأوعية الدموية التي سوف تواجه تدفقاً نبضياً (pulsatile flow). وقد أظهر المؤلفون أيضاً زيادة في انتشار الخلايا البطانية على أليافهم النانوية المصنوعة من البوليمرات المخلوطة (blended polymer nanofibers) مما هو عليه على الألياف النانوية الاصطناعية. وقد جمع Stitzel وآخرون [112] بين البوليمرات الطبيعية والبوليمرات الاصطناعية من خلال الغزل الكهربائي لمزيج من الكولاجين (٤٥٪) والإيلاستين (١٥٪) والبولي (حمض كو - غليكوليك - لاكتيك) (PLGA) (٤٠٪)، قد تم تضمينها من أجل منتج غزل كهربائي أفضل بكثير مما كان ممكناً باستخدام المواد الطبيعية لوحدها). وقد عرضت الأنابيب ذات ألياف النانو مطاوعة (compliance) مماثلة لتلك الخاصة بالجملة الوعائية الطبيعية (natural vasculature) (تغير القطر من ١٢٪ إلى ١٤٪ مقابل ٩٪ من أجل الأوعية الدموية الأصلية)، كما استطاعت أن تقاوم ضغوطاً انفجارية (burst pressures) إلى ما يقرب من ١٠ مرات من تلك العائدة لضغط الدم الانقباضي (systolic blood pressure) الطبيعي. وقد كان المؤلفون قادرين على زراعة طبقات متكلسة من الخلايا البطانية (EC) والخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC) على السطوح الداخلية والخارجية لحاملة الخلايا والأنسجة الأنوبية، على التوالي، مع الحد الأدنى من الاستجابة الالتهابية. وقد بدأت حاملات خلايا وأنسجة بوليمرية / بروتينية مركبة (polymer / protein composite scaffolds) حديثة بإظهار كل من الخصائص الميكانيكية وتوافق الأنسجة والتي سوف تكون مطلوبة من أجل مواد تطعيم تحويلية صغيرة القطر (small - diameter bypass grafting materials) وناجحة.

في حاملة الخلايا والأنسجة الوعائية المغزولة كهربائياً والتي هي ربما الأكثر تطوراً حتى الآن، طور Boland وآخرون [3] بنية وعائية ثلاثية الطبقات بقطر ٤ ميليمترات. وشملت هذه الطبقات طبقات وسطانية (medial layers) وطبقات برآنية (adventitial layers) منفصلة من الكولاجين والإيلاستين المغزولين كهربائياً (متوسط القطر 490 ± 220 نانومتر) مبدورة بخلايا عضلية وعائية ملساء (vSMC) وأرومات ليفية (خلايا ليفية)، بالإضافة إلى بطانة من الخلايا البطانية المبدورة (endothelium of seeded EC) (انظر الشكل رقم ١٣.٥). وقد أشار المؤلفون في تقريرهم إلى طبقة ناضجة مورفولوجياً (من الناحية الشكلية) (morphologically mature layer) من الخلايا البطانية مع غشاء قاعدي واضح المعالم، ومع طبقة كثيفة من الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC)، والتي تتحاذى بطريقة كفاية (محيطية) (circumferential fashion) في الأسفل. وقد كانت الخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC) وخلايا الأرومة الليفية في الطبقة البرآنية تتخلل في كل أنحاء الطبقات الخارجية لألياف الكولاجين / الإيلاستين النانوية. إن هذه البنية الهندسية متعددة الأبعاد لحاملة الخلايا والأنسجة تسمح بتفاعلات خلايا - خلايا وتفاعلات خلايا - مصفوفة أكثر تعقيداً مما هي ممكنة مع طبقة واحدة فقط من حاملة الخلايا والأنسجة [3]. ويمكن لإنشاء حاملات خلايا وأنسجة من طبقات متناوبة أن يحث على تطوير وثيق الصلة أكثر من الناحية الفيزيولوجية للتنظيم الخلوي وتنظيم المصفوفة خارج الخلية (ECM).

CONCLUSIONS (١٣,٥) الاستنتاجات

من الواضح أن البنى القلبية والأوعية الدموية المهندسة نسيجياً والقابلة للحياة ستتطلب محاكاة كاملة (full mimicry) للبنية الوعائية الأصلية (native vascular structure) [3]. وتتطور التصاميم الهندسية للبنى القلبية الوعائية وتزداد تعقيداً باستمرار، حيث يحاول الباحثون تضمين أعدادٍ متزايدة من تفاعلات الخلايا - الخلايا وتفاعلات الخلايا - المصفوفة ذات الصلة في تصاميمهم. ومع ذلك، تظل هناك تحديات كبيرة من أجل التحسين والترجمة السريرية في المستقبل لتقنيات النانو المستخدمة في تطبيقات هندسة الأنسجة الوعائية.



الشكل رقم (١٣,٥). (a) حاملات خلايا وأنسجة مغزولة كهربائياً من الكولاجين مصنوعة في بُنى أنبوبية (tubular structures) بقطر ٢ و ٤ ميليمترات من أجل هندسة طُعم وعائي صغير القطر (small - diameter vascular graft). (b) مزيج مغزول كهربائياً من الكولاجين من النمط الأول ومن النمط الثالث والإبلاستين (في نسبة ٤٠:٤٠:٢٠) يُظهر ألياف مع متوسط قطر من 490 ± 220 نانومتر، وتوجيه ألياف عشوائي. (c) في الأعلى: مقطع هيستولوجي (histological section) يُظهر ثلاث طبقات محددة من البنية الهندسية لجدار وعائي (vessel wall architecture): باطنة (intimal) (لون أرجواني داكن، على اليسار)، مُتوسّطة (medial) (لون أرجواني خفيف، في الوسط) وِبَرائِيَّة (adventitial) (لون أرجواني داكن، على اليمين). في الأسفل: حاملة خلايا وأنسجة ثلاثية الطبقات اصطناعية مغزولة كهربائياً (three - layered prosthetic electrospun scaffold) بعد البذر باستخدام الخلايا البطانِيَّة والخلايا العضلية الوعائية الملساء والخلايا الليفية، تُظهر تحديد مماثل لتوضع الطبقات كما هو في الأنسجة الأصلية. (من (Boland, E.D., et al., *Front Biosci.*, 9, 1422, 2004)).

وقد تم إحراز الكثير من التقدم في هندسة الأنسجة القلبية، بما في ذلك البنى المغزولة كهربائياً التي تسمح بتقلصات طبيعية (natural contractions) للخلايا العضلية القلبية المبذورة والتقنيات التي تبدأ في توفير تباين في الخواص البنيوية الهندسية النانوية (nanoarchitected anisotropy) إلى الخلايا والأنسجة المزروعة. وعلى أي حال، فإن الطُعم القلبية (cardiac grafts) الناجحة فعلاً مع خصائص ميكانيكية وكهربائية مماثلة للأنسجة الطبيعية لم يتم تطويرها حتى الآن. وعلى اعتبار أن الخيار الوحيد للفشل القلبي (cardiac failure) هو حالياً زراعة كامل العضو، فلا يزال هذا المجال البحثي يشكل أولوية بالنسبة لمجتمع البحوث القلبية الوعائية. بالإضافة إلى ذلك، فإن أفضل التقنيات المستخدمة من أجل هندسة أنسجة الصمامات القلبية ستطور بالتأكيد مجال زراعة الصمامات (valve implantation). إن هذا المجال البحثي لم يتحول بعد بشكل كامل إلى النماذج ذات السمات النانوية (nanofeatured paradigms) من أجل تصميم الصمامات.

إن أحد التحديات الحاسمة لهندسة الأنسجة الوعائية الباقية هو تحديد أي حجم وأي نوع من السمات النانوية سوف يزيد إلى الحد الأعلى من نمو الخلايا البطانية (EC) والخلايا العضلية الوعائية الملساء (vSMC) على البنى الوعائية (vascular constructs). بالإضافة إلى ذلك، لم يحدد مجتمع هندسة الأنسجة الوعائية حتى الآن المادة الحيوية الأنسب والتغليف أو طبقة الغلاف الخارجية المحتملة. والأهم من ذلك، يجب على الطُعم الوعائية أن تماثل الأوعية الدموية الأصلية في الخصائص الميكانيكية الحرجة (critical mechanical properties)، بما في ذلك المطاوعة وضغط الانفجار، أو أن الطُعم سوف تفشل في نهاية الأمر في الطب السريري.

بالإضافة إلى ذلك، فإن العديد من الإستراتيجيات المقترحة أعلاه لديها القدرة أن تُترجم من تقنيات مخصصة من أجل الطُعم الوعائية صغيرة القطر إلى تصاميم لبني مهندسة نسيجياً والتي تشجع على التوعي المايكروبي الدقيق للطُعم (implant microvascularization). ويمكن استغلال العديد من السمات الطبوغرافية النانوية (nanotopographical features) المقترحة لتعزيز النمو البطاني على الطُعم التحويلية صغيرة القطر من قبل مهندسي الأنسجة وهؤلاء المهتمين في الطب التجديدي وذلك لزيادة الكثافة الوعائية (vascular density) في الأنسجة الجديدة النامية. ومن الواضح أن النجاح السريري لإستراتيجيات هندسة الأنسجة سوف يكون مرهوناً بإعادة التوعي (revascularization) في الوقت المناسب لتجديد الأنسجة. ويمكن للتطورات في التقنيات التي تنقل بنية هندسية نانوية لتشجيع تَبَطُّن (اندمال البطانة) (endothelialization) طُعم المواد الحيوية المهندسة نسيجياً (tissue - engineered biomaterial implants) أن تثبت بأنها علاجات فعّالة من أجل تحسين التوعي الجديد.

المراجع REFERENCES

- [1] Mendelson, K. and F.J. Schoen. 2006. Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng* 34:1799–1819.
- [2] Aikawa, E., P. Whittaker, M. Farber, et al. 2006. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: Implications for postnatal adaptation, valve pathology, and tissue engineering. *Circulation* 113:1344–1352.

- [3] Boland, E.D., J.A. Matthews, K.J. Pawlowski, et al. 2004. Electrospinning collagen and elastin preliminary vascular tissue engineering. *Front Biosci* 9:1422–1432.
- [4] Rhodin, J. 1980. Architecture of the vessel wall. In *Handbook of Physiology: The Cardiovascular System*, D. Borh, A. Somlyo, and H. Sparks (Eds.), pp. 1–31. Massachusetts: American Physiological Society.
- [5] American Heart Association, 2003. Heart disease and stroke statistics–2003 update. <http://www.americanheart.org/downloadable/heart/10590179711482003HDSStatsBookREV7-03.pdf>
- [6] National Heart, Lung, and Blood Institute, 1981. Report of the Working Group on Arteriosclerosis, MD. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; DHEW, NIH Publ. No. 82-2035:114–122.
- [7] Zimmermann, W.-H., M. Didie, S. Doker, et al. 2006. Heart muscle engineering: An update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res* 71:419–429.
- [8] Hammermeister, K., G.K. Sethi, W.G. Henderson, et al. 2000. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: Final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 36:1152–1158.
- [9] Jamieson, W.R., O. von Lipinski, R.T. Miyagishima, et al. 2005. Performance of bioprostheses and mechanical prostheses assessed by composites of valve-related complications to 15 years after mitral valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 129:1301–1308.
- [10] Schoen, F.J. 2001. Pathology of heart valve substitution with mechanical and tissue prostheses. In *Cardiovascular Pathology*, M.D. Silver, A.I. Gotlieb, and F.J. Schoen (Eds.), pp. 402–405. New York: Churchill Livingstone.
- [11] Rabkin-Aikawa, E., M. Farber, M. Aikawa, et al. 2004. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis* 13:841–847.
- [12] Schoen, F.J. 1997. Aortic valve structure–function correlations: Role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J Heart Valve Dis* 6:1–6.
- [13] Schoen, F.J. and W.D. Edwards. 2001. Valvular heart disease: General principles and stenosis. In: *Cardiovascular Pathology*, M.D. Silver, A.I. Gotlieb, and F.J. Schoen (Eds.), pp. 402–405. New York: Churchill Livingstone.
- [14] Erez, E.K., K.R. Kanter, E. Isom, et al. 2003. Mitral valve replacement in children. *J Heart Valve Dis* 12:25029.
- [15] Kanter, K.R., J.M. Bude, W.J. Parks, et al. 2002. One hundred pulmonary valve replacements in children after relief of right ventricular outflow tract obstruction. *Ann Thorac Surg* 73:1801–1806.
- [16] Robertson, S.W., V. Imbeni, H.R. Wenk, et al. 2005. Crystallographic texture for tube and plate of the superelastic/shape-memory alloy Nitinol used for endovascular stents. *J Biomed Mater Res* 72A: 190–199.
- [17] Choudhary, S., K.M. Haberstroh, and T.J. Webster TJ. 2007. Enhanced functions of vascular cells on nanostructured Ti for improved stent applications. *Tissue Eng* 13:1421–1430.
- [18] Schuler, P., D. Assefa, J. Ylanne, et al. 2003. Adhesion of monocytes to medical steel as used for vascular stents is mediated by the integrin receptor Mac-1. *Cell Commun Adhes* 10:17–26.
- [19] Cejna, M., R. Virmani, and R. Jones, 2002. Biocompatibility and performance of the Wallstent and the Wallgraft, Jostent, and Hemobahn stent-grafts in a sheep model. *J Vasc Interv Radiol* 12:823–830.
- [20] Chen, Y.J., T.X. Leng, X.B. Tian, et al. 2002. Antithrombogenic investigation of surface energy and optical bandgap and hemocompatibility mechanism of Ti (Ta(5)O₂) thin films. *Biomaterials* 23: 2545–2552.
- [21] Mason, M., K.P. Vercruyse, K.R. Kirker, et al. 2000. Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 21:31–36.
- [22] Darling, R.C. and R.R. Linton. 1972. Durability of femoropopliteal reconstructions: Endarterectomy versus vein bypass grafts. *Am J Surg* 123:472–479.
- [23] Clayson, K.R., W.H. Edwards, T.R. Allen, et al. 1976. Arm veins for peripheral arterial reconstruction. *Arch Surg* 111:1276–1280.
- [24] Voorhees, A.B., A. Jaretski, and A.H. Blakemore. 1952. Use of tubes constructed from vinyon ‘n’ cloth in bridging arterial deficits. *Ann Surg* 135:332–338.

- [25] Blakemore, A. and A.B. Voorhees. 1954. The use of tube constructed of vinyon 'n' cloth in bridging arterial deficits: Experimental and clinical. *Ann Surg* 140:324–330.
- [26] Herring, M., A. Gardner, and J. Glover. 1978. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 84:498–504.
- [27] Anderson, J.S., T.M. Price, S.R. Hanson, et al. 1987. In vitro endothelialization of small-caliber vascular grafts. *Surgery* 101:577–586.
- [28] Foxall, T.L., K.R. Auger, A.D. Callow, et al. 1986. Adult human endothelial cell coverage of small-caliber Dacron and polytetrafluoroethylene vascular prostheses in vitro. *J Surg Res* 41:158–172.
- [29] Kempczinski, R.F., J.E. Rosenman, W.H. Pearce, et al. 1985. Endothelial cell seeding of a new PTFE vascular prosthesis. *J Vasc Surg* 2:424–429.
- [30] Weinberg, C. and E. Bell. 1986. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231:397–400.
- [31] Miwa, H. and T. Matsuda. 1994. An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prostheses. *J Vasc Surg* 19:658–667.
- [32] Hirai, J. and T. Matsuda. 1996. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen: Tissue regeneration process. *Cell Transplant* 5:93–105.
- [33] Ishibashi, K. and T. Matsuda. 1994. Reconstruction of a hybrid vascular graft hierarchically layered with three cell types. *ASAIO J* 40:M284–290.
- [34] L'Heureux, N., L. Germain, R. Labbe, et al. 1993. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: A morphologic study. *J Vasc Surg* 17:499–509.
- [35] L'Heureux, N., S. Paquet, R. Labbe, et al. 1998. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12:47–56.
- [36] Abbott, W.M., A. Callow, W. Moore, et al. 1993. Evaluation and performance standards for arterial prosthesis. *J Vasc Surg* 17:746–756.
- [37] Veith, F.J., S.K. Gupta, E. Ascer, et al. 1986. Six year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg* 3:104–114.
- [38] Quiñones-Baldrich, W.J., A. Prego, R. Ucelay-Gomez, et al. 1991. Failure of PTFE infrainguinal revascularization: Patterns, management alternatives, and outcome. *Ann Vasc Surg* 5:163–169.
- [39] Seeger, J.M. 2000. Management of patients with prosthetic vascular graft infection. *Am Surg* 66: 166–177.
- [40] Sarkar, S., H.J. Salacinski, G. Hamilton, et al. 2006. The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: Their role in influencing patency. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 31:627–636.
- [41] Murray-Wijelath, J., D.J. Lyman, and E.S. Wijelath. 2004. Vascular graft healing—III: FTIR analysis of ePTFE graft samples from implanted biografts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 70:223–232.
- [42] Hagerty, R.D., D.L. Salzman, L.B. Kleinert, et al. 2000. Cellular proliferation and macrophage populations associated with implanted expanded polytetrafluoroethylene and polyethyleneterephthalate. *J Biomed Mater Res* 49:489–497.
- [43] Gao, K., L. Niklason, and R. Langer. 1998. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res* 3:417–423.
- [44] Solan, A., V. Prabhakar, and L. Niklason. 2001. Engineered vessels: Importance of the extracellular matrix. *Trans Proc* 33:66–68.
- [45] Jain, R.K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 6:685–693.
- [46] Brey, E.M., S. Uriel, H.P. Greisler, et al. 2005. Therapeutic neovascularization: Contributions from bioengineering. *Tissue Eng* 11:567–584.
- [47] Hockel, M., K. Schlenger, S. Doctrow, et al. 1993. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surgery* 128:423–429.
- [48] Berglund, J.D. and Z.S. Galis. 2003. Designer blood vessels and therapeutic revascularization. *Br J Pharmacol* 140:627–636.
- [49] Bernas, G.C. 2003. Angiotherapeutics from natural products: From bench to clinics? *Clin Hemorheol Microcirc* 29:199–203.

- [50] Freedman, S.B. and J.M. Isner. 2002. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* 136:54–71.
- [51] Hughes, G.C., S.S. Biswas, B. Tin, et al. 2004. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: Comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg* 77:812–818.
- [52] Lei, Y., H.K. Haider, J. Shujia, et al. 2004. Therapeutic angiogenesis: Devising new strategies based on past experiences. *Basic Res Cardiol* 99:121–132.
- [53] Madeddu, P. 2005. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 90:315–326.
- [54] Levenberg, S., J. Rouwkema, M. Macdonald, et al. 2005. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23:879–884.
- [55] Li, W.W., K.E. Talcott, A.W. Zhai, et al. 2005. The role of therapeutic angiogenesis in tissue repair and regeneration. *Adv Skin Wound Care* 18:491–500.
- [56] Cassell, O.C.S., S.O.P. Hofer, W.A. Morrison, et al. 2002. Vascularization of tissue-engineered grafts: The regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *Br J Plast Surg* 55:603–610.
- [57] Botchwey, E.A., M.A. Dupree, S.R. Pollack, et al. 2003. Tissue-engineered bone: Measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. *J Biomed Mater Res* 67A:357–367.
- [58] Laschke, M.W., Y. Harder, M. Amon, et al. 2006. Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substrates. *Tissue Eng* 12:2093–2103.
- [59] Webster, T.J., E.L. Hellenmeyer, and R.L. Price. 2005. Increased osteoblast functions on thetadelta nanofiber alumina. *Biomaterials* 26:953.
- [60] Savaiano, J.K. and T.J. Webster. 2004. Altered responses of chondrocytes to nanophase PLGA/nanophase Titania composites. *Biomaterials* 25:1205.
- [61] Flemming, R.G., C.J. Murphy, G.A. Abrams, et al. 1999. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 6:573–588.
- [62] Ma, Z., M. Kotaki, R. Inai, et al. 2005. Potential of a nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng* 11:101–109.
- [63] Martins-Green, M. 1997. The dynamics of cell-ECM interactions with implications for tissue engineering. In *Principles of Tissue Engineering*, Lanza, R., R. Langer, and W. Chick (Eds.), pp. 23–46. Texas: Academic Press.
- [64] Williams, S.K. and B.E. Jarrell. 1987. Thrombosis on endothelializable prostheses. *Ann NY Acad Sci* 516:154–157.
- [65] Goodman, S.L., P.A. Sims, and R.M. Albrecht. 1996. Three-dimensional extracellular matrix textured biomaterials. *Biomaterials* 17:2087–2095.
- [66] Ingber, D.E. and J. Folkman. 1989. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: Role of extracellular matrix. *J Cell Biol* 109:317–330.
- [67] Madri, J.A., B. Dreyer, F.A. Pitlick, et al. 1980. The collagenous components of the subendothelium. Correlation of structure and function. *Lab Invest* 43:303–315.
- [68] McCullagh, K.A. and G. Balian. 1975. Collagen characterisation and cell transformation in human atherosclerosis. *Nature* 258:73–75.
- [69] Lenhart, S., M.B. Meier, U. Meyer, et al. 2005. Osteoblast alignment, elongation and migration on grooved polystyrene surfaces patterned by Langmuir-Blodgett lithography. *Biomaterials* 26:563–570.
- [70] Dalby, M.J., M.O. Riehle, D.S. Sutherland, et al. 2004. Fibroblast response to a controlled nanoenvironment produced by colloidal lithography. *J Biomed Mater Res* 69A:314–322.
- [71] Dalby, M.J., M.O. Riehle, D.S. Sutherland, et al. 2004. Changes in fibroblast morphology in response to nano-columns produced by colloidal lithography. *Biomaterials* 25:5415–5422.
- [72] Rice, J.M., J.A. Hunt, J.A. Gallagher, et al. 2003. Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model in vitro. *Biomaterials* 24:4799–4818.

- [73] Giavaresi, G., M. Tschon, J.H. Daly, et al. 2006. In vitro and in vivo response to nanopographically modified surfaces of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone. *J Biomater Sci Polymer Edn* 17:1405–1423.
- [74] Chu, C.F.L., A. Lu, M. Liszkowski et al. 1999. Enhanced growth of animals and human endothelial cells on biodegradable polymers. *Biochim Biophys Acta* 3:479–485.
- [75] Miller, D.C., A. Thapa, K.M. Haberstroh, et al. 2004. Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured features. *Biomaterials* 25:53–61.
- [76] Miller, D.C., K.M. Haberstroh, and T.J. Webster. 2004. Mechanisms controlling increased vascular cell adhesion to nano-structured polymer films. *Bioengineering Conference 2004: Proceedings of the IEEE 30th Annual Northeast*. 120–121.
- [77] Wittmer, C.R., J.A. Phelps, W.M. Saltzman, et al. 2007. Fibronectin terminated multilayer films: Protein adsorption can cell attachment studies. *Biomaterials* 28:851–860.
- [78] Giachelli, C. and S. Steitz. 2000. Osteopontin: A versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 19:615–622.
- [79] Chen, Y., B.S. Bal, and J.P. Gorsik. 1992. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem* 267:24871–24878.
- [80] Mukherjee, B.B., M. Nemir, S. Beninato, et al. 1995. Interaction of osteopontin with fibronectin and other extracellular matrix molecules. *Ann NY Acad Sci* 760:201–212.
- [81] Liaw, L., D.E. Birk, C.B. Ballas, et al. 1998. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* 101:1468–1478.
- [82] Khan, S.A., C.A. Lopez-Chua, J. Zhang, et al. 2002. Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *J Biol Chem* 277:728–736.
- [83] Asou, Y., S.R. Rittling, H. Yoshitake, et al. 2001. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoblasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 142:1325–1332.
- [84] Liu, L., S. Chen, C.M. Giachelli, et al. 2005. Controlling osteopontin orientation on surfaces to modulate endothelial cell adhesion. *J Biomed Mater Res* 74A:23–31.
- [85] Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, et al. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276:1425–1428.
- [86] Singhvi, R., A. Kumar, G.P. Lopez, et al. 1994. Engineering cell shape and function. *Science* 264:696–698.
- [87] Decher, G., J.D. Hong, and J. Schmitt. 1992. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. 3. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* 210:831–835.
- [88] Decher, G. 1997. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277: 1232–1237.
- [89] Decher, G., M. Eckle, J. Schmitt, et al. 1998. Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 3:32–39.
- [90] Hammond, P.T. 1999. Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 4:430–442.
- [91] Bertrand, P., A. Jonas, A. Laschewsky, et al. 2000. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: Suitable materials, structure and properties. *Macromol Rapid Commun* 21:319–348.
- [92] Decher, G. and J.B. Schlenoff. 2003. *Multilayer Thin Films*. Weinheim: Wiley-VCH.
- [93] Hammond, P.T. 2004. Form and function in multilayer assembly: New applications at the nanoscale. *Adv Mater* 16:1271–1293.
- [94] Potts, J.R. and I.D. Campbell. 1996. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol* 15:313–320.
- [95] Furuzono, T., M. Masuda, M. Okada, et al. 2006. Increase in cell adhesiveness on a poly(ethylene terephthalate) fabric sintered hydroxyapatite nanocrystal coating in the development of an artificial blood vessel. *ASAIO J* 52:315–319.
- [96] Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos. 2006. Electrospinning of polymeric nanofibres for tissue engineering applications: A review. *Tissue Eng* 5:1–15.
- [97] Subbiah, T., G.S. Bhat, R.W. Tock, et al. 2005. Electrospinning of nanofibers. *J Appl Polym Sci* 96:557.

- [98] Zong, X., H. Bien, C.-Y. Chung, et al. 2005. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* 26:5330–5338.
- [99] Laurencin, C.T., A.M.A. Ambrosio, M.D. Borden, et al. 1999. Tissue engineering: Orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1:19–46.
- [100] Shin, M., O. Ishii, T. Sueda, et al. 2004. Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh. *Biomaterials* 25:3717–3723.
- [101] Fast, V. and A. Kleber. 1994. Anisotropic conduction of monolayers of neonatal rat hearts cultured on collagen substrate. *Circ Res* 75:591–595.
- [102] Simpson, D.G., L. Terracio, M. Terracio, et al. 1994. Modulation of cardiac monocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. *J Cell Physiol* 161:89–105.
- [103] Bursac, N., N.N. Parker, S. Irvanian, et al. 2002. Cardiomyocyte cultures with controlled macroscopic anisotropy: A model for functional electrophysiological studies of cardiac muscle. *Circ Res* 91:45–54.
- [104] Van Lieshout, M.I., C.M. Vaz, M.C. Rutten, et al. 2006. Electrospinning versus knitting: Two scaffolds for tissue engineering of the aortic valve. *J Biomater Sci Polymer Edn.* 17:77–89.
- [105] Kwon, I.K., S. Kidoaki, and T. Matsuda. 2005. Electrospun nano- to micro-fiber fabrics made of biodegradable copolyesters: Structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* 26:3929–3939.
- [106] Allcock, H.R., T.J. Fuller, D.P. Mack, et al. 1977. Synthesis of poly[(amino acid alkyl ester) polyphosphazenes. *Macromolecules* 10:824–830.
- [107] Nair, L.S., S. Bhattacharyya, J.D. Bender, et al. 2004. Fabrication and optimization of methylphenoxy substituted polyphosphazenes nanofibers for biomedical applications. *Biomacromolecules* 5:2212–2220.
- [108] Carampin, P., M.T. Conconi, S. Lora, et al. 2007. Electrospun polyphosphazene nanofibers for in vitro rat endothelial cells proliferation. *J Biomed Mater Res* 80A:661–668.
- [109] Matthews, J., G. Spinson, G. Wnek, et al. 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 3:232–238.
- [110] Bowlin, G., K. Pawlowski, J. Stitzel, et al. 2002. Electrospinning of polymer scaffolds for tissue engineering. In *Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents: Scientific and Clinical Applications*, K. Lewandrowski, D. Wise, D. Trantolo, et al. (Eds.), pp. 165–178. New York: Marcel Dekker, Inc.
- [111] He, W., T. Yong, W.E. Two, et al. 2005. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: Potential vascular graft of blood tissue engineering. *Tissue Eng* 11:1574–1588.
- [112] Stitzel, J., J. Liu, S.J. Lee, et al. 2006. Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* 27:1088–1094.