

## البنى النانوية من أجل هندسة الأنسجة العظمية الهيكلية

### Nanostructures for Musculoskeletal Tissue Engineering

*Susan Liao, Casey K. Chan, and Seeram Ramakrishna*

#### المحتويات CONTENTS

٥٠٦.....	INTRODUCTION	مقدمة (١٤,١)
	NANOSTRUCTURES IN NATURAL	البنى النانوية في الأنسجة العظمية الهيكلية الطبيعية (١٤,٢)
٥٠٧.....	MUSCULOSKELETAL TISSUES	
	PROBLEM (DISEASE-DISORDER) OF	مشكلة (مرض-اضطراب) الأنسجة العظمية الهيكلية (١٤,٣)
٥١٠.....	MUSCULOSKELETAL TISSUES	
٥١١.....	Current Treatment Methods	طرق العلاج الحالية (١٤,٣,١)
	Tissue Engineering for the Treatment of	هندسة الأنسجة لعلاج المشاكل العظمية الهيكلية (١٤,٣,٢)
٥١١.....	Musculoskeletal Problems	
	STRATEGIES OF MUSCULOSKELETAL TISSUE	إستراتيجيات هندسة الأنسجة العظمية الهيكلية (١٤,٤)
٥١٢.....	ENGINEERING	
٥١٢.....	General Principles for Tissue Engineering	المبادئ الأساسية العامة لهندسة الأنسجة (١٤,٤,١)
٥١٢.....	Biomimetic Scaffolds	حاملات الخلايا والأنسجة المحاكية حيويًا (١٤,٤,٢)
٥١٣.....	Stem Cells	الخلايا الجذعية (١٤,٤,٣)
٥١٦.....	Growth Factors	عوامل النمو (١٤,٤,٤)

٥١٧.....	INTERACTIONS	(١٤,٥)
٥٢٢.....	APPLICATIONS	(١٤,٦)
٥٢٣.....	OF NANOFIBROUS SCAFFOLDS FOR MUSCULOSKELETAL TISSUE ENGINEERING	(١٤,٦,١)
٥٢٥.....	Bone العظم	(١٤,٦,٢)
٥٢٧.....	Cartilage الغضروف	(١٤,٦,٣)
٥٢٩.....	Muscle العضل	(١٤,٦,٤)
٥٣٤.....	Ligament الرباط	(١٤,٧)
٥٣٤.....	CHALLENGES التحديات	(١٤,٧,١)
٥٣٤.....	Nanoscaffolds With Tissue- Hamالات الخلايا والأنسجة المحددة للأشكال المحددة للأنسجة-Specific Patterns	(١٤,٧,٢)
٥٣٥.....	Mechanical Property الخصائص الميكانيكية	(١٤,٧,٣)
٥٣٦.....	Exploring Advanced Nanofiber Technologies استكشاف تقنيات الألياف النانوية المتقدمة	(١٤,٨)
٥٣٦.....	CONCLUSIONS الاستنتاجات	(١٤,٨)
٥٣٧.....	ACKNOWLEDGMENTS شكر وتقدير	(١٤,٨)
٥٣٧.....	REFERENCES المراجع	(١٤,٨)

## ١٤,١) مقدمة INTRODUCTION

يمكن أن تسبب أمراض وإصابات الجهاز العضلي الهيكلي (musculoskeletal system) الألم والتشوّه (deformity) وفقد الوظيفة. فهي تحد من نشاطات الحياة اليومية وتسبب العجز للكثير من الناس أكثر من اضطرابات (disorders) أي جهاز عضوي آخر. تقدم هندسة الأنسجة العضلية الهيكلية (musculoskeletal tissue engineering) أسلوباً واعداً لعلاج هذه الأمراض والإصابات. في هندسة الأنسجة، فإن حاملات الخلايا والأنسجة المستخدمة كدعامة مؤقتة لنُشوب أو نمو الخلايا (cells ingrowth) وكناقلة أو حاملة لعوامل النمو، يتم الاعتراف بها تدريجياً على أنها الوظائف الأساسية لإصلاح الأنسجة بنجاح. وفي الآونة الأخيرة، أصبحت القدرة على هندسة البنى النانوية لمواد حاملات الخلايا والأنسجة (scaffold materials) وذلك للتحكم الدقيق بسلوك الخلايا من أجل تجديد الأنسجة (tissue regeneration) حقيقة ماثلة. في هذا الفصل سنسلط الضوء على آخر التطورات الحالية للبنى النانوية في حاملات الخلايا والأنسجة وذلك لاستكشاف التقدمات

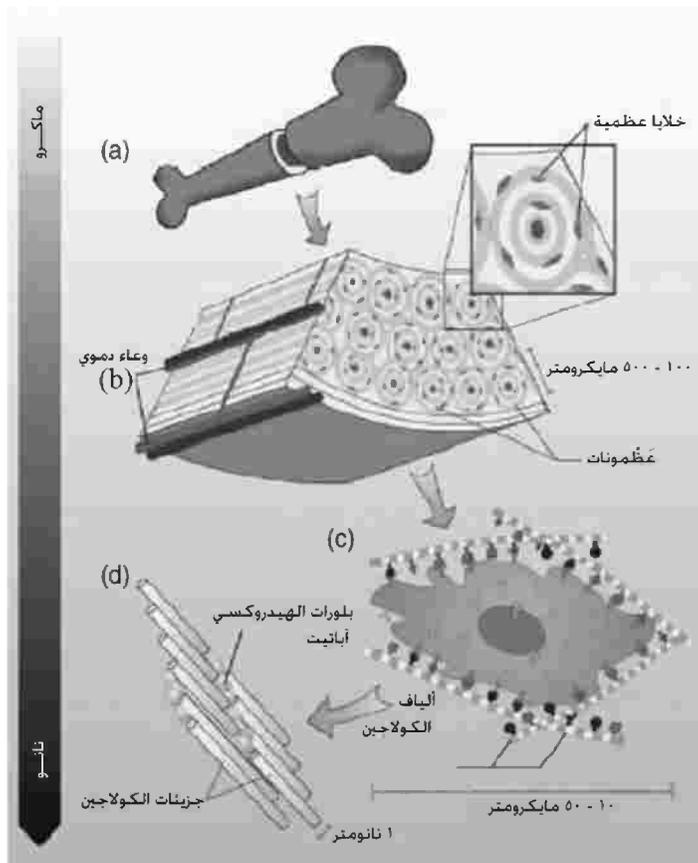
المحتملة في مجال هندسة الأنسجة العضلية الهيكلية. في البداية، سيتم مناقشة البُنى النانوية في الأنسجة العضلية الهيكلية الطبيعية في الفقرة (١٤.٢). وستكون أمراض وإصابات الجهاز العضلي الهيكلي والعلاجات الحالية وهندسة الأنسجة العضلية الهيكلية موضحة في الفقرة (١٤.٣). وسيتم مناقشة إستراتيجيات هندسة الأنسجة العضلية الهيكلية وتأثير البُنى النانوية على سلوك الخلايا في الفقرتين (١٤.٤ و ١٤.٥)، على التوالي. واستناداً إلى المبادئ الأساسية آفة الذكر المبينة في الفقرتين (١٤.٤ و ١٤.٥)، فإننا سوف نوضح التطبيقات المحددة للبُنى النانوية من أجل هندسة الأنسجة الهيكلية العضلية في الفقرة (١٤.٦). وأخيراً، ستتم مناقشة التحديات الحالية في تطبيقات البُنى النانوية لهندسة الأنسجة العضلية الهيكلية في الفقرة (١٤.٧). ولتحقيق الاستفادة القصوى من البُنى النانوية من أجل هندسة الأنسجة، فإنه يجب دمج تصنيع البُنى النانوية بسلاسة مع البُنى المايكروية (microstructures) وكذلك مع البُنى الماكروية (macrostructures) وذلك لتحقيق الفوائد الأمثل من البُنى النانوية وإنجاز الغرض المقصود من إصلاح الأنسجة.

## (١٤,٢) البُنى النانوية في الأنسجة العضلية الهيكلية الطبيعية NANOSTRUCTURES IN NATURAL MUSCULOSKELETAL TISSUES

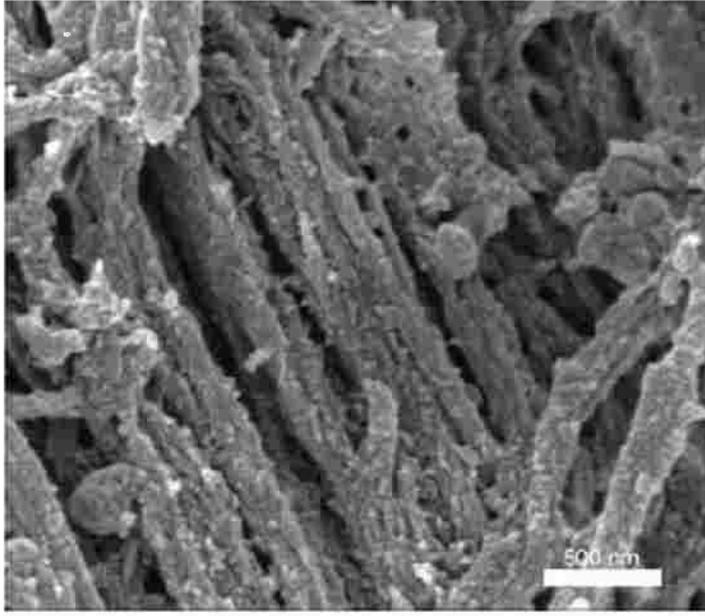
يتوقف استقرار وحركة الجسم على الأنسجة التي تتشكل من الجهاز العضلي الهيكلي - العظم (musculoskeletal system bone -) والغضروف والأنسجة الليفية الكثيفة (dense fibrous tissue) (الرباط والوتر) والعضل. وتختلف هذه الأنسجة في الوعائية (vascularity) والتعصيب (innervation) والخصائص الميكانيكية والخصائص البيولوجية والتركيب، إلا أنها تنشأ من نفس خلايا السلف أو الطليعة (precursor cells)، والتي هي الخلايا الجذعية المتوسّطة (mesenchymal stem cells - MSCs) [1]. ولإنتاج الأنسجة العضلية الهيكلية (musculoskeletal tissues) عن طريق هندسة الأنسجة، فإننا بحاجة إلى معرفة البنية الطبيعية لهذه الأنسجة وبصفة خاصة على مستوى المقياس النانوي والكيفية التي تتطور بها في الجسم.

تتألف مصفوفات الأنسجة العضلية الهيكلية من بنية دقيقة على درجة عالية من التنظيم لألياف نانوية ذات جزيئات عضوية ماكروية ضخمة (organic macromolecule nanofibers) منطّمة في مادة أساسية أو قاعدية لا بلورية (غير متبلورة) (amorphous ground substance). وتتألف الألياف من أنواع متعددة من الكولاجين والإيلاستين، بينما تتألف المادة القاعدية بشكل أساسي من ماء وبروتيوغليكانات وبروتينات غير كولاغينية (noncollagenous proteins). وبالإضافة إلى النسيج الغشائي أو المصفوفة العضوية (organic matrix)، فإن للعظم نسيجاً غشائياً أو مصفوفة غير عضوية (inorganic matrix)، وهي من الهيدروكسي أباتيت ذي الطور النانوي (nanophase hydroxyapatite - HA)، وذلك من أجل زيادة الصلابة والمتانة الضغطية (compressive strength) لأنسجة العظم. لقد تم اكتشاف هذا المركب الرائع لألياف الكولاجين النانوية والهيدروكسي أباتيت (HA) ذي الطور النانوي بشكل أساسي من قبل Landis و Weiner وذلك باستخدام الفحص المجهرى باستخدام المجهر الإلكتروني الناقل (transmission electron microscopy - TEM) [2-5]. تشمل بنية العظم خمسة مستويات هرمية من المستوى النانوي (nanolevel) في شكل مركب كولاغيني جزيئي إلى المستوى المايكرووي (microlevel) كعظم مَحْبُوك (woven bone) أو كعظم صُفاحي (lamellar bone) وأخيراً إلى المستوى الماكرووي (macrolevel) كعظم بنيوي

(structural bone) [6] (الشكل رقم ١٤.١). وفي الآونة الأخيرة، أظهر العظم المكسور عند مراقبته مباشرةً تحت المجهر الإلكتروني الماسح ذي الإصدار الحَقلي (field emission scanning electron microscopy - FESEM) بنية نانوية ليفية مُعدنة (mineralized fibrous nanostructure) [7] (الشكل رقم ١٤.٢). وبسبب عدم وجود توجيه لِيُفني للكولاجين (collagen fibril orientation) والمحتوى العالي للخلايا والماء والتمعدن غير المنتظم (irregular mineralization) فإن الخصائص الميكانيكية للعظم المحبوك هي أضعف من تلك للعظم الصُّفاحي. وقد تم أيضاً تحديد الألياف العصبية (nerve fibers) المترابطة مع الأوعية الدموية داخل القنوات النخاعية (medullary canals) للعظم. ومن المحتمل إن هذه الألياف العصبية تتحكم في تدفق دم العظم. ومن أجل أن تبقى الخلايا على قيد الحياة يجب عليها أن تكون موجودة ضمن مسافة ٣٠٠ مايكرومتر من أي وعاء دموي.

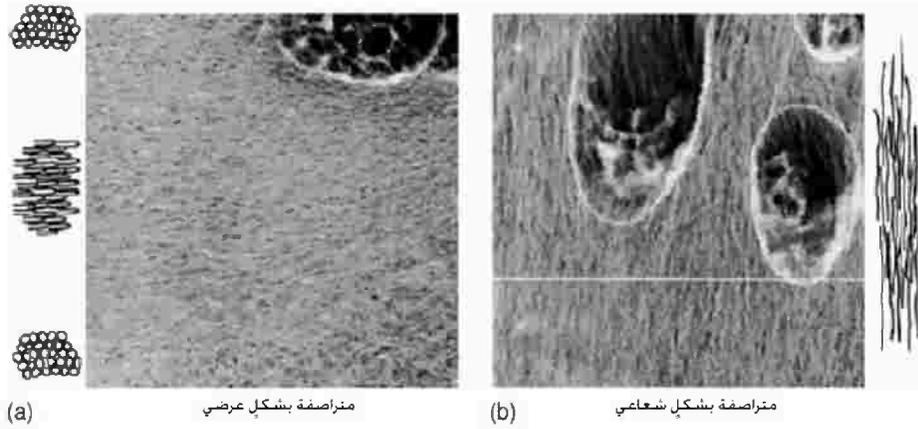


الشكل رقم (١٤،١). تنظيم هرمي تخطيطي للعظم على مستويات طولية مختلفة. (a) يملك العظم طبقة خارجية مكنزة مُتكلسة قوية، (b) والتي تضم العديد من الأنظمة الهافيرسيّة الأسطوانية (cylindrical Haversian systems)، أو العظُمونات (osteons) (الوحدة الأساسية في بناء العظم). (c) تكون الخلايا الداخلية المقيمة مُغلقة في غابة من مستقبلات غشاء الخلية (cell membrane receptors) التي تستجيب إلى مواقع ربط محددة و (d) بنية هندسية نانوية (nanoarchitecture) محددة بشكل جيد للنسيج الغشائي أو المصفوفة خارج الخلية (extracellular matrix) الخيطة. (من Stevens, M.M. and George, J.H., Science, 310, 1135, 2005).



الشكل رقم (١٤،٢). المراقبة باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لسطح عظم بشري مكسور ذي ألياف من الكولاجين المعدن (mineralized collagen fibers) في شكل حزمة متراففة. (من Fantner, G.E., Hassenkam, T., Kindt, J.H. et al., (Nat. Mater., 4, 612, 2005).

باستثناء العظم، فإن الأنسجة الأربعة الأخرى الرئيسية في الجهاز العضلي الهيكلي هي الأربطة (ligaments) والغضروف (cartilage) والعضلات الهيكلية (skeletal muscles) والأوتار (tendons). تكون هذه الأنسجة ملتصقة أو مرتبطة بالعظام المفردة وذلك لتأمين الوظائف الأساسية لاستقرار وحركة الجهاز العضلي الهيكلي. وتتألف هذه الأنسجة من لُيفات كولاجينية (collagen fibrils) ذات أنماط أو أشكال مختلفة. فعلى سبيل المثال، يبين الشكل رقم (١٤،٣) تراصاً مختلفاً لشبكة الألياف النانوية الكولاجينية (collagen nanofiber network) في الغضروف [8]. إن العضلات الهيكلية هي أكثر الأنسجة وفرةً في جسم الإنسان. إن لهذه العضلات أيضاً بنية هرمية (hierarchical structure) مشابهة كما هي البنية في العظم. فعند المستوى الهرمي الأدنى، تكون اللُيفة العضلية (myofibril) عبارة تقريباً عن ليف نانوي أسطواني (cylindrical nanofiber) يحتوي على العديد من النوى (nuclei)، وفيه تناوب من خطوط فاتحة اللون وخطوط داكنة اللون تسمى التخطّطات (striations). وتشكل حزمة من اللُيفات العضلية ليفاً عضلياً (muscle fiber) وتُكوّن حزمة من الألياف العضلية بدورها حزمة صغيرة (fascicle)، والتي عادةً ما ترى بالعين المجردة. وأخيراً، يتم تنظيم الحزم الصغيرة تشريحياً (بشكل هيسطولوجي) بواسطة الأنسجة الضامة (connective tissue) المحيطة لتتشكل في عضلة كتلية (bulk muscle) تمثل وحدة وظيفية قابلة للتقلص. ومن أجل تحقيق وظيفة مستدامة، تتواجد العضلات الهيكلية كبنى مُركّبة تتألف من العديد من الألياف العضلية والأعصاب والأوعية الدموية والأنسجة الضامة.



الشكل رقم (١٤,٣). مراقبة شبكة من الكولاجين في العضروف بواسطة المجهر الأيوني الانتقالي الماسح ( scanning transmission ion microscopy - STIM): (a) بُنى متراصفة بشكل عرضي (tangentially aligned structures)، و (b) بُنى متراصفة بشكل شعاعي (radially aligned structures). ويمكن تفسير البنى في الفقرة (a) كعناقيد من النبيبات الكولاجينية (bunches of collagen tubuli) في محاذاة عرضية مختلفة (المستوى الأفقي). في (b) ألياف الكولاجين المتراصفة أو المتحاذاة شعاعياً (المستوى العمودي) تكون مرئية بسهولة. (من Reinert, T., Reibetanz, U., Schwertner, M. et al., (Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B., 188, 1, 2002).

### مشكلة (مرض-اضطراب) الأنسجة العضلية الهيكلية (١٤,٣) PROBLEM (DISEASE-DISORDER) OF MUSCULOSKELETAL TISSUES

أدت التطورات في التقنية والتحسينات في مجال الرعاية الصحية إلى توقع فترات حياة أطول. وقد يسبب السكان المتقدمون في السن في المجتمع الثري الذي يكون فيه توقع نوعية حياة رفيعة المستوى الإجهاد لنظام الرعاية الصحية. وتحتل المشاكل العضلية الهيكلية (musculoskeletal problems) المرتبة الثانية في السبب الذي من أجله يسعى المرضى إلى الرعاية الطبية، وأن حوالي ١٠٪ من سكان الولايات المتحدة الأمريكية يعانون من مثل هذه المشاكل العضلية الهيكلية الحادة للدرجة التي تجعل نشاطهم مقيداً إلى حد كبير [1].

وكلما تقدم السكان في العمر، زاد توقع عدد الإصابات المرتبطة بالرياضة والترفيه. وسبب ذلك هو تقدم السكان في العمر بشكل سريع، وهو ما يؤدي إلى الانتقال وعلى نحو متزايد نحو أنماط الحياة النشطة التي غالباً ما تؤدي إلى الإصابات العظمية (orthopedic injuries). في السكان المسنين، سيكون هناك عدد متزايد من الكسور المرتبطة بالعمر (age - related fractures) مثل كسور الورك (hip fractures) أو الكسور المرضية (pathological fractures) الناتجة عن اكتئاب أو ارتباط العظم بالسرطان (cancer involvement of bone). إن معظم الالتهابات التنكسية (degenerative arthritis) لمفاصل الركب أو مفاصل الأوراك، والحالة التنكسية (degenerative condition) للعمود الفقري سوف تتطلب تدخلاً جراحياً ترميمياً (reconstructive surgical intervention) لاستعادة الحركة والوظيفة.

### (١٤,٣,١) طرق العلاج الحالية Current Treatment Methods

تشمل العلاجات الحالية للمشاكل العضلية الهيكلية استخدام الأدوية (medications) والمعالجة الفيزيائية (physical therapy) وتقويم العظام (orthotics) والبدائل أو الأطراف الاصطناعية (prosthetics) والجراحة. وبصورة عامة، فإن المعالجات غير الجراحية هي أول أسلوب للعلاج قبل التفكير في التدخل الجراحي. وتُشكل التمارين التي تُحسّن نطاق الحركة العضلية الهيكلية والقوة العضلية (muscle strength) جزءاً من المعالجة الفيزيائية للعديد من الحالات العضلية الهيكلية. ويُستخدم تقويم العظام في علاج الجَنَف (scoliosis) وألم الجزء السفلي من الظهر وألم القدم وبعض تشوهات القدم. وتشمل العلاجات المتعلقة بالعمليات الجراحية المعالجة اليدوية البارة (manipulation) والجراحة بمنظار المفصل (arthroscopic surgery) وإعادة البناء أو الترميمات الجراحية المفتوحة (open surgical reconstructions). وقد أدى تطور المواد الاصطناعية أو التركيبية والفهم الأفضل للجهاز العضلي الهيكلي إلى عمليات جراحية ناجحة بشكل كبير من أجل استبدال مفاصل اصطناعية بالمفاصل التالفة. إن عمليات استبدال المفاصل الكاملة في الالتهابات التَنكُسيّة لمفاصل الأوراك والركب هي واحدة من أكثر عمليات جراحة العظام نجاحاً مع نتيجة إيجابية يمكن التنبؤ بها في غالبية المرضى. إلا أنه لا يزال هناك الكثير من المشاكل العضلية الهيكلية التي لم يتم حلها بعد مثل التَتام أو شفاء العيوب العظمية الكبيرة (bony defects) والضرر المفصلي (articular damage) في المرضى صغار السن واندماج أو انحلال العمود الفقري (دمج الفقرات) (spinal fusion). يُقدم تطبيق البنى النانوية ميزة على حاملة الخلايا والأنسجة التقليدية ذات الأساس المايكروبي (traditional microbased scaffold) لمعالجة بعض من هذه المشاكل الصعبة للغاية.

### (١٤,٣,٢) هندسة الأنسجة لعلاج المشاكل العضلية الهيكلية Tissue Engineering for the Treatment of Musculoskeletal Problems

إن هندسة الأنسجة مجال طبي حيوي متعدد التخصصات (interdisciplinary) يجمع بين المعرفة المتراكمة خلال ١٤ سنة الماضية لعلم المواد ومبادئ الهندسة والخلايا والبيولوجيا الجزيئية والتطويرية. إن الهدف النهائي لهندسة الأنسجة هو تطوير البدائل البيولوجية (biological substitutes) التي سوف تستعيد أو تحافظ على أو تُحسّن من وظائف الأنسجة المتضررة [9]. وعلى الرغم من أن بناء الأنسجة الوظيفية (functional tissue) مهمة شاقة، فإن هذا المجال يقدم طريقة واعدة للتغلب على المشاكل الحالية مثل النقص في الأنسجة المناسبة المتبرع بها [10]. إن الأنسجة العضلية الهيكلية مثل العظم والغضروف هي أقل تعقيداً عندما يتم مقارنتها مع الأعضاء الصلبة مثل الكلى والرئتين. وبالمقارنة مع الأنسجة الأخرى، فقد تم تحقيق عدد من التطبيقات العملية لهندسة الأنسجة في إصلاح العظم [11].

في عام ٢٠٠٣، بلغ إجمالي مبيعات المنتجات العضلية الهيكلية المهندسة نسيجياً (tissue-engineered musculoskeletal products) حوالي ٢٣.٨ بليون دولار أمريكي. وبحلول العام ٢٠١٣، فإنه من المتوقع أن يزداد هذا الرقم ليصل إلى ٣٩ بليون دولار أمريكي. يمثل إصلاح واستبدال الغضروف والمفاصل أكبر التوقعات المحتملة في سوق المنتجات العضلية الهيكلية بنسبة ٦٧.٤٪ من حصة السوق المحتملة، يليه حقن مكملات اللزوجة (viscosupplementation) (وهو الإجراء الذي ينطوي على حقن مواد شبيهة بالهلام مثل الهيالورونات في مفصل؛ وذلك من أجل استكمال خصائص اللزوجة للسائل الزليلي) بنسبة ١٣.٧٪، وتثبيت الكسور وإصلاح العظام / العمود الفقري بنسبة ٩.٤٪ من حصة السوق [12].

## STRATEGIES OF MUSCULOSKELETAL TISSUE (١٤,٤) إستراتيجيات هندسة الأنسجة العضلية الهيكلية ENGINEERING

### General Principles for Tissue Engineering (١٤,٤,١) المبادئ الأساسية العامة لهندسة الأنسجة

تشمل المبادئ الأساسية لهندسة الأنسجة ثلاثة مكونات رئيسية هي: حاملات الخلايا والأنسجة، والخلايا، والجزيئات الحيوية التي تنقل الإشارات (signaling biomolecules) (أو عوامل النمو)، وهو ما يسمى بالثالوث أو الثلاثي (triad) في هندسة الأنسجة. إن المكونات الأساسية للمصفوفة خارج الخلية (ECM) هي بوليمرات حيوية كولاجينية (collagen biopolymers)، وبشكل أساسي في شكل ألياف وليفيات. يجب على حاملات الخلايا والأنسجة المسامية (porous scaffold)، والتي يُفضل أن تكون مصنوعة من البوليمرات القابلة للامتصاص (absorbable polymer)، أن تحاكي (mimic) المصفوفة خارج الخلية (ECM) وذلك من أجل دعم تكاثر وتنظيم الخلايا. وقد تم أيضاً استخدام أشكال أخرى من التنظيم البوليمري مثل المواد الهلامية (gels) والمواد الرغوية (foams) والأغشية (membranes) كحاملات من أجل هندسة الأنسجة. ويمكن الجمع بين الأشكال المختلفة في المختبر وذلك لإنشاء محاكاة للتنظيم البوليمري الحيوي (biopolymer organization) في أنسجة محددة [13]. ويمكن أن تكون حاملات الخلايا والأنسجة غنية بالجزيئات الحيوية التي تنقل الإشارات. سوف تشكل الخلايا المدججة في حاملات الخلايا والأنسجة مصفوفة خارج الخلية (ECM) وسوف توفر كذلك الإشارات اللازمة لبناء الأنسجة. وقد تم استخدام المصفوفات الكولاجينية اللاخلوية (acellular collagen matrices)، في شكل إسفنجيات (sponges) مزودة أو غير مزودة بمعادن طليعة العظم (bone precursor minerals) (فوسفات الكالسيوم calcium phosphate)، كسواغات أو وسائط نقل (vehicles) من أجل توصيل مجموعة متنوعة من البروتينات المكوّنة للعظم (bone morphogenetic proteins - BMPs). وكمثال على تطبيق الثالوث أو الثلاثي في هندسة الأنسجة من أجل هندسة الأنسجة العظمية، تنطوي إحدى الإستراتيجيات على إضافة فوسفات الكالسيوم إلى حاملات الخلايا والأنسجة وبذر حاملات الخلايا والأنسجة بخلايا نقي العظم السدويّة (bone marrow stromal cells - BMSCs) وتزويد حاملات الخلايا والأنسجة بعوامل النمو (البروتين المكوّن للعظم - اثنان BMP-2) والبروتين المكوّن للعظم - سبعة (BMP-7) وعامل تحويل النمو - بيتا (TGF-β)، إلخ. وللمزيد من محاكاة المصفوفة خارج الخلية (ECM) للعظم الطبيعي، يمكن تصنيع حاملات الخلايا والأنسجة مع بنية نسيجية نانوية (nanotexture) وربطها بفوسفات الكالسيوم النانوي (nanocalcium phosphate).

### (١٤,٤,٢) Biomimetic Scaffolds حاملات الخلايا والأنسجة المحاكية حيويًا

تدعم المصفوفة خارج الخلية (ECM) في النسيج الطبيعي التصاق وتكاثر وتمايز الخلايا. وبطريقة مثالية يجب على حاملات الخلايا والأنسجة أن تحاكي المصفوفة خارج الخلية (ECM) الطبيعية إلى أقصى حدٍّ ممكن. وقد تم دراسة حاملات الخلايا والأنسجة ذات المستوى المايكروى بتفصيل كبير في العشرين سنة الأخيرة. ولوحظ أن المسامية العالية وحجم مسام يتراوح بين ٥٠ و ٤٠٠ مايكرومتر ضروريان في حاملات الخلايا والأنسجة من أجل نُشُوب أو نمو الخلايا (cell ingrowth). ولتعزيز التصاق وتكاثر وتمايز الخلايا، فإنه من الضروري محاكاة بعض البنى النانوية للمصفوفة خارج الخلية (ECM). إن البنية ذات

المستوى النانوي للمصفوفة خارج الخلية (ECM) هي شبكة طبيعية من الألياف النانوية المعقدة، والتي توفر خلفية مفيدة تقوم على توجيه سلوك الخلايا [6,10,14,15]. ويمكن أن تكون الإشارات أو المنبهات الوظيفية (functional cues) التي يتم تقديمها من قبل المصفوفة خارج الخلية (ECM) كيميائية في طبيعتها مثل وجود البروتينات اللاصقة (adhesive proteins)، أو فيزيائية بحثة مثل الطوبوغرافيا السطحية من مستوى المقياس النانومتري إلى مستوى المقياس المايكرومتري للمصفوفة خارج الخلية (ECM). وسوف تتم مناقشة التفاعلات التفصيلية بين الخلايا وحاملات الخلايا والأنسجة النانوية فيما بعد في الفقرة (١٤.٥). وسوف تتم مناقشة تعزيز السلوك الخلوي عن طريق تراكب (superposition) البنية النسيجية النانوية على حاملة الخلايا والأنسجة ذات المستوى المايكرومي.

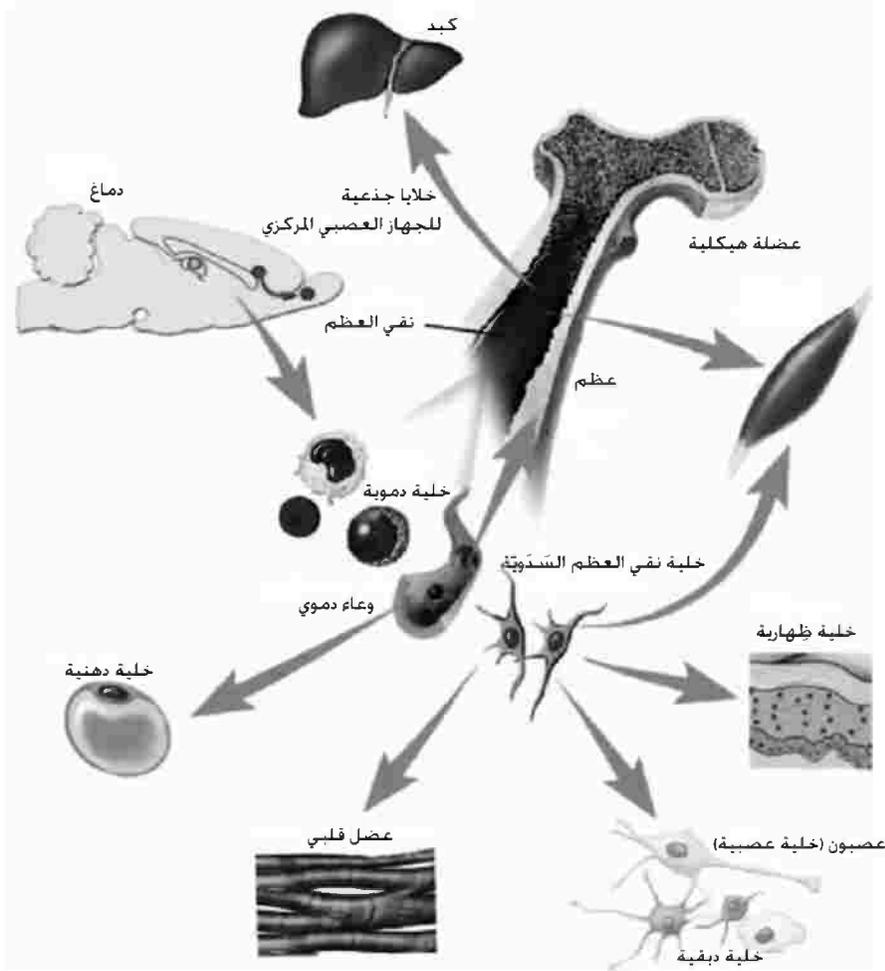
فعلى المستوى المايكرومتري (micrometer level)، يمكن تصنيف العظم كعظم إسفنجي مع العديد من المسامات ومع مسامية عالية أو كعظم صُفاحيٍّ مع عَظْمونات أسطوانية مكتنزة (compact cylindrical osteons) (العَظْمونات هي الوحدات الأساسية في بناء العظم). وعلى المستوى النانومتري (nanometer level)، تتجمع اللييفات الكولاجينية والهيدروكسي آباتيت ذو الطور النانوي (nanophase HA) ذاتياً في شكلٍ مُنظَّم ومتراصف. وترتبط الأنسجة المختلفة في الجهاز العضلي الهيكلي مع بعضها البعض بسلاسة، إما في شكل نسيج صلب مع نسيج صلب (hard to hard tissue) وإما في شكل نسيج لين مع نسيج صلب (soft to hard tissue) وإما في شكل نسيج لين مع نسيج لين (soft to soft tissue). وتبدأ عملية الارتباط من المستوى الجزيئي (molecular level) وتتطابق بشكلٍ هرمي. ويُعتقد أن قوة الالتصاق الفائقة (superadhesive strength) تنشأ عن التفاعل الكهرستاتيكي (الكهربائي الساكن) (electrostatic interaction). وبالتالي؛ فإن البنية النانوية لحاملة الخلايا والأنسجة هي مسألة حاسمة عند تطوير حاملة من أجل الأنسجة المركبة مثل حاملة الخلايا والأنسجة المستخدمة من أجل التطعيم بطعم عظمي غضروفي (osteochondral graft).

### (١٤،٤،٣) الخلايا الجذعية Stem Cells

في الوقت الحالي، توجد أنواع عديدة من الخلايا المتوفرة من أجل تجديد نوع محدد من الأنسجة. إن لاستخدام الخلايا الناضجة (mature cells) من أجل تجديد الأنسجة مثل استخدام الخلايا الغضروفية (chondrocytes) من أجل تجديد الغضروف (cartilage regeneration) تاريخاً ناجحاً. إن مثل هذا الاستخدام يبقى تقنية هامة في هندسة الأنسجة. وعلى أي حال، فإن التطورات السريعة في بيولوجيا الخلايا وفي تحديد أو الكشف عن هوية أنواع جديدة من الخلايا قد حسنت من القدرة على استخدام خيارات واسعة من أنواع الخلايا لتحوُّل ونمو الخلايا إلى أنسجة مناسبة. وقد تم الاعتراف بالخلايا الجذعية على أنها بديلٌ واعد عن الخلايا الناضجة نظراً لمقدرتها على تجديد نفسها من خلال انقسام الخلايا وعلى التمايز إلى مجموعة واسعة من أنواع الخلايا المتخصصة (specialized cell). في البداية، كانت الأبحاث العلمية على الخلايا الجذعية تدور حول كيفية تطور الكائن الحي من خلية مفردة وكيف تحل الخلايا السليمة محل الخلايا المتضررة في الكائنات الحية البالغة. وقد قاد التقدم في فهم التجديد الذاتي (self - renewal) والتمايز الموجه (directed differentiation) العلماء إلى اقتراح إمكانية استخدام العلاجات المبنية على أساس الخلايا (cell - based therapies) لعلاج الأمراض، بما في ذلك استخدام الخلايا الجذعية في هندسة الأنسجة.

يوجد ثلاثة أنواع من الخلايا الجذعية: الخلايا الجذعية الجنينية (embryonic stem cells) وخلايا دم الحبل السري الجذعية (cord blood stem cells) والخلايا الجذعية البالغة (adult stem cells). تعتبر الخلايا الجذعية البالغة مناسبة بشكل خاص للتطبيقات في هندسة الأنسجة من أجل الجهاز العضلي الهيكلي وذلك بسبب توافرها وعدم وجود جدال أو خلاف حولها. إن المصدر المريح أو المناسب للخلايا الجذعية البالغة هو من نقي العظم (bone marrow). فبالإضافة إلى خلايا الدم الحمراء (red blood cells) وخلايا الدم البيضاء (white blood cells) والصفائح الدموية (platelets) يحتوي نقي العظم على نوعين بارزين من الخلايا الجذعية هي: الخلايا الجذعية المكوّنة للدم (hematopoietic stem cells - HSCs) والتي تكون مسؤولة عن تكوين خلايا الدم، والخلايا الجذعية المتوسّطة (MSCs)، والتي لديها القدرة على التمايز إلى الخلايا البانية للعظم (osteoblasts) والخلايا الغضروفية والخلايا العضلية (myocytes) وأنواع أخرى من الخلايا. وبالتالي، فإن الميزة المحتملة لاستخدام الخلايا الجذعية البالغة هي أن خلايا المريض نفسه يمكن قطفها أو حصدها وعزلها وتوسيع نموها بسهولة في مزرعة الخلايا، ومن ثم يتم زرعها أو غرسها في جسم المريض في المكان الذي يكون فيه تجديد الأنسجة مطلوباً [16]. تُجنب هذه الطريقة ذاتية المنشأ الرفض المناعي (immune rejection) الذي يحدث مشاكل عندما يتم استخدام طُعم خَفِيّة (allografts) (طُعم من فرد ينتمي لنفس النوع) أو طُعم أجنبيّة (xenografts) (طُعم غير وِية). وثمة إستراتيجية أخرى هي بذر الخلايا الجذعية ذاتية المنشأ (autologous stem cells) على حاملات خلايا وأنسجة محاكية حيويًا (biomimetic scaffolds) وذلك من أجل محاكاة الأنسجة الطبيعية للمريض وبالتالي فإن الأنسجة المهندسة سوف تحتفظ ببعض من مزايا الطُعم ذاتية المنشأ. إن مثل هذه الطرق في هندسة الأنسجة تتغلب على انتشار المرض المرتبط بالجراحة الترميمية (reconstructive surgery) التقليدية التي يتم فيها قطف أو حصاد الأنسجة الطبيعية من جسم المريض نفسه.

تعتبر أنواع معينة من الخلايا الجذعية البالغة متعددة القدرات (pluripotent)؛ أي أنها يمكن أن تتمايز إلى خلايا مستمدة من الطبقات الثلاثة المتشّبة (في الجنين) (three germ layers) [17-19]. إن هذه القدرة على التمايز إلى أنواع متعددة من الخلايا تُدعى بالتكيفية (plasticity) أو التمايز العابر (transdifferentiation). تُقدم القائمة التالية أمثلة على تكيفية الخلايا الجذعية البالغة التي تم ذكرها أثناء السنوات القليلة الماضية كما هو موضح في الشكل رقم (١٤.٤). وبالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تتمايز الخلايا الجذعية المكوّنة للدم (HSCs) إلى ثلاثة أنواع رئيسية من الخلايا الدماغية (brain cells) (العصبونات (neurons) والخلايا الدبقية قليلة التغصن (oligodendrocytes) والخلايا النجمية (astrocytes))؛ والخلايا العضلية الهيكلية (skeletal muscle cells)؛ والخلايا العضلية القلبية (cardiac muscle cells)؛ والخلايا الكبدية (liver cells). وبالإضافة إلى تمايز خلايا نقي العظم السدويّة (BMSCs) إلى الخلايا العضلية الهيكلية فإنها من الممكن أن تتمايز أيضاً إلى الخلايا العضلية القلبية [20]. وتوفر التكيفية الإمكانية الأساسية لهندسة الأنسجة المتعددة باستخدام أنواع محددة من الخلايا الجذعية.



الشكل رقم (٤، ١٤). تكيّفية (plasticity) الخلايا الجذعية البالغة. (من تقرير المعهد الوطني للصحة عن الخلايا الجذعية بعنوان: الخلايا الجذعية: التقدم العلمي واتجاهات البحث المستقبلية *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, Kirschstein, R. and Skirboll, L.R., Department of Health and Human Services, June 2001. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4> [accessed Feb 06, 2007])

على الرغم من أن تقنيات زراعة الخلايا القياسية كانت ناجحة من أجل توسيع نمو الخلايا الناضجة أو تامة النمو، إلا أن تقنيات زراعة الخلايا الجذعية المتوسّطة (MSCs) من أجل هندسة الأنسجة المبنية على أساس الخلايا الجذعية المتوسّطة (MSCs) والمستخدمه بشكل خاص من أجل التوسع ثلاثي الأبعاد (3D expansion) تتطلب مزيداً من التطورات. وللمحافظة على النمط الظاهري (phenotype) والوظائف التمايزة (differentiated functions) للخلايا الجذعية المتوسّطة (MSCs)، فيجب على البيئة الطبيعية المحاكاة (simulated natural environment) لدعم المصفوفة خارج الخلية المحاكاة حيويًا (biomimetic ECM) أن توفر الإشارات المناسبة للخلايا الملتصقة. ويمكن أن توفر حاملات الخلايا والأنسجة ذات

البنية النسيجية النانوية الإشارات أو المنبهات الفيزيائية وكذلك المكانية والتي تعتبر أساسية لمحاكاة نمو الأنسجة الطبيعية. وبالإضافة إلى الإشارات أو المنبهات الفيزيائية والمكانية، يمكن أن تكون حاملات الخلايا والأنسجة نفسها ناقلة أو حاملة للجزيئات الحيوية التي تنقل الإشارات.

#### (١٤,٤,٤) عوامل النمو Growth Factors

لقد تم استخدام عوامل النمو بشكلٍ سريري لعدد من السنوات وتم عرض كفاءتها لتعزيز إصلاح الأنسجة وعلى وجه التحديد من أجل إصلاح العظم إلى درجة معينة. في الماضي، كان يتم حقن عوامل النمو أو تطبيقها بشكلٍ مباشر على الأنسجة. قد يتطلب توصيل عوامل النمو بهذه الطريقة جرعة أكبر كما هو في حالة عوامل النمو: البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2) والبروتين المكوّن للعظم - سبعة (BMP-7) (كونهما من الجزيئات الصغيرة نسبياً التي سوف تنتشر بسرعة بعيداً أو أنها ستصبح مُعطّلة inactive). وبالتالي؛ فإن بعض أشكال أنظمة النقل والتوصيل (carrier and delivery systems) سوف تكون مطلوبة في عملية الإطلاق المتواصل أو المستدام (sustained release) للبروتينات المكوّنة للعظم (BMPs) وذلك من أجل أن تكون عوامل النمو فعّالة عند سرير المضيف أثناء فترة الشفاء. إن أحد متطلبات ناقلات البروتينات المكوّنة للعظم (BMP carriers) هو أن تكون المادة الكتلية بعد عملية الزراعة قادرة على مقاومة البروتينات المكوّنة للعظم المُشترّبة أو الممتصة (imbibed BMPs) من أن تُضغَط أو تُعصر إلى خارج الأنسجة المحيطة وبالتالي يتم إعادة امتصاصها بسرعة [21-23]. تشير التجارب السريرية الباكراة وإلى الآن إلى أن استخدام بدائل الطعوم العظمية (bone graft substitutes) الحالية بالاشتراك مع عوامل النمو المحرّضة للعظم (osteoinductive growth factors) يمكن أن يحل محل استخدام الطعم العظمي ذاتي المنشأ (autogenous bone graft) في تطبيقات سريرية معينة مثل اندماج أو الخلال العمود الفقري (دمج الفقرات) [24]. وقد تم التكهن أيضاً بأنه يمكن تخفيض الجرعة الحالية الموصى بها باستخدام أنظمة نقل وتوصيل أفضل. ويبقى التحدي هو تحسين جرعة البروتينات المكوّنة للعظم (BMPs) المطلوبة وتحديد الناقل أو الحامل المناسب من أجل البروتينات المكوّنة للعظم (BMPs) [25].

يُنظر إلى المواد النانوية (nanomaterials) كناقلات أو حاملات مناسبة وذلك بسبب امتلاكها نسبة عالية من المساحة السطحية إلى الحجم. وبالتالي؛ فإنه من الممكن التحكم بالإشارات الممتصة فيزيائياً (physically absorbed signals) أو الإشارات المرتبطة كيميائياً (chemically bonded signals) على السطح بصورة أكثر فعالية من خلال مواد الناقلات. وبالتالي فإن الجزيئات الحيوية، سواءً أكانت تلك التي تُمتص فيزيائياً أو تلك التي ترتبط كيميائياً على سطح المادة الناقلة، يمكن تعديلها أو التلاعب بها بصورة أكثر فعالية عبر مجال أكبر من الطاقات الحركية لإطلاق أو تحرير الدواء (release kinetics). وقد تم تطوير المواد ذات الطور النانوي (nanophase materials) كمواد ناقلة متقدمة ويمكن أن تكون هذه المواد في شكل جسيمات نانوية [26-28] أو ألياف نانوية [29] مصنوعة من السيراميك الحيوي (bioceramics) و/ أو البوليمرات الحيوية (biopolymers). على سبيل المثال، فإن لهيدروكسي آباتيت (HA) ذي الطور النانوي خصائص سطحية فريدة من

نوعها مثل العدد المتزايد من الذرات وحدود الحبيبات (boundaries of the grains) للمادة والعيوب في المنطقة السطحية والبنية الإلكترونية المتغيرة، وذلك بالمقارنة مع الهيدروكسي آباتيت التقليدي ذي الحجم المايكروني (conventional micron size HA). فعلى سبيل المثال، يملك الهيدروكسي آباتيت (HA) ذو الطور النانوي (ذو حجم بمقدار ٦٧ نانومتراً) خشونة سطحية (surface roughness) أعلى قدرها ١٧ نانومتراً مقابل خشونة قدرها ١٠ نانومتراً من أجل الهيدروكسي آباتيت (HA) التقليدي ذي الحجم ما دون المايكروني (بمقدار ١٧٩ نانومتر) في حين أن زوايا التماس أو الاتصال (contact angles) (وهي قياس كمي لابتلال أو ترطيب (wetting) مادة صلبة بمادة سائلة) تكون أقل بكثير من أجل الهيدروكسي آباتيت (HA) ذي الطور النانوي مع زاوية تماس قدرها ٦,١ درجة مقارنة مع زاوية تماس قدرها ١١,٥١ درجة من أجل الهيدروكسي آباتيت (HA) التقليدي. وبالإضافة إلى ذلك، فإن قطر المسامات المفردة في رصة الهيدروكسي آباتيت (HA) ذي الطور النانوي (nanophase HA compact) (مع قطر مسام ٦,٦ أنغستروماً ( $Å$ )) هو أصغر بخمس مرات من قطر المسامات المفردة في رصات الهيدروكسي آباتيت (HA) ذي الحجم الحبيبي التقليدي (يتراوح قطر المسام بين ١٩,٨ و ٣١ أنغستروماً). وبالتالي؛ فقد كان للهيدروكسي آباتيت (HA) ذي الطور النانوي بروتينات أكثر بنسبة ١١٪ في المصل البقري الجنيني (fetal bovine serum) ممزوجة أو مُمتصة في الستيمتر مربع مقارنة مع الهيدروكسي آباتيت (HA) التقليدي. إن امتزاز أو امتصاص بروتينات محددة مثل الفبرونيكتين (fibronectin) والفيترونيكتين (vitronectin) والكولاجين المتمسّخ (denatured collagen) من الدم ونقي العظم والأنسجة الأخرى على سطح الطعم أو المادة المزروعة يتوسط في عمليات الالتصاق والتمايز والنمو اللاحقة الخاصة بالخلايا البانية للعظم أو الخلايا الأخرى المرغوبة.

وقد اتضح في الآونة الأخيرة بأنه يمكن دمج الجزئيات الحيوية في جزء اللب من بنية ذات لب - قشر (core - shell structure) لجسيمات نانوية أو ألياف نانوية وذلك من أجل توصيل أكثر استمرارية [30-35]. وعلى أي حال، فإنه من الصعب دمج الجسيمات النانوية في حاملة خلايا وأنسجة ثلاثية الأبعاد. وهكذا، يبدو أن حاملات الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو جذابة. وبالطبع، يمكن استخدام الجسيمات النانوية كمُضافات (additives) للمركبات الليفية النانوية [36]. في الأقسام التالية، سوف تُركّز على استخدام حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية (nanofibrous scaffolds) في هندسة الأنسجة، إما كركائز (substrates) من أجل نمو الخلايا وإما كناقلات (carriers) لتوصيل الدواء (drug delivery).

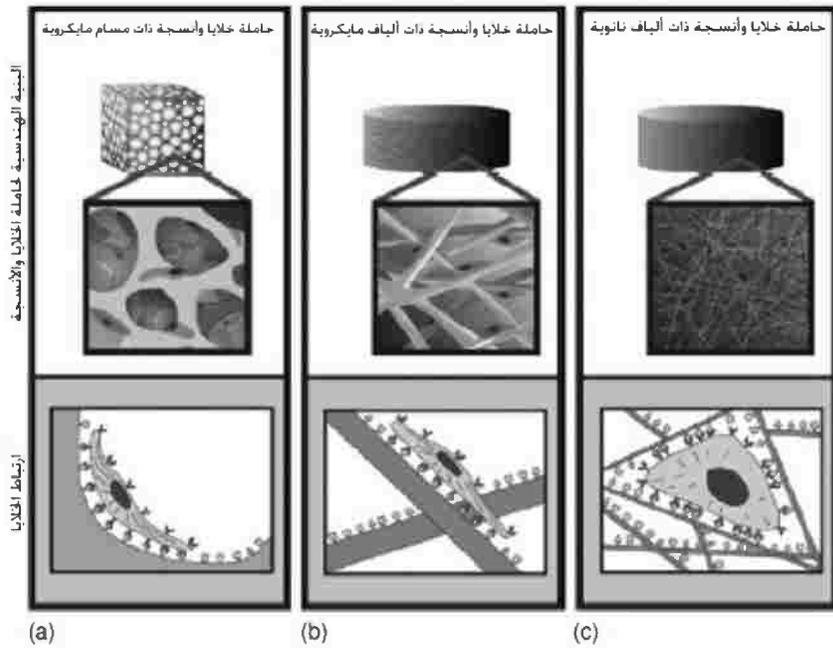
## (١٤,٥) تفاعلات حاملة الخلايا والأنسجة ذات ألياف النانو-الخلايا NANOFIBROUS SCAFFOLD-CELL

### INTERACTIONS

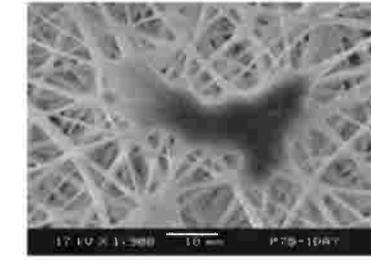
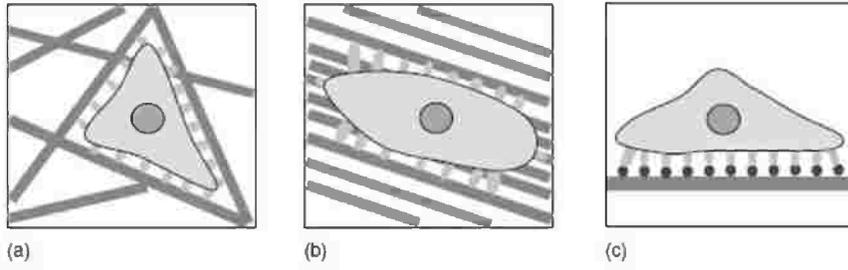
بدراسة الكيفية التي تؤثر بها الإشارات أو المنبهات الوظيفية على توضع وترصف الخلايا أثناء العملية التطويرية (developmental process)، يمكن لمهندسي الأنسجة أن يُحسّنوا من تصميم حاملة الخلايا والأنسجة الخاصة بهم وذلك من أجل تحقيق تجديد فعّال للأنسجة. إن التعديلات في المستوى النانوي في الطوبوغرافيا السطحية تثير سلوكاً مختلفاً للخلايا، يتراوح من تغييرات في التصاق الخلايا وتوجيه الخلايا وحركة الخلايا وإظهار المستضد السطحي (surface antigen) والتكاثف

الهيكل الخلوي (cytoskeletal condensation) وتفعيل إنزيمات كيناز التيروسين (حمض أميني) (tyrosine kinases) وتعديل مسارات نقل الإشارات داخل الخلايا (intracellular signaling pathways) التي تنظم النشاط النسخي (activity transcriptional) والتعبير الجيني (gene expression) [37]. فعلى سبيل المثال، لقد وُجد بأن الخلايا البانية للعظم تلتصق بشكلٍ تفضيلي بألياف الكربون النانوية (carbon nanofibers) مقارنةً مع الخلايا الغضروفية وخلايا الأرومة الليفية والخلايا العضلية الملساء (SMCs) [38,39]. ولتجديد الأنسجة، تكون حاملات الخلايا والأنسجة المهندسة بمثابة مضيفات للخلايا المقطوفة أو المحصودة من الأنسجة الطبيعية. إن الخلايا التي ترتبط بحاملات الخلايا والأنسجة ذات البنى الهندسية في المستوى المايكرو (microscale architectures) تتسطح (flatten) وتنتشر كما لو أنها مزروعة على سطوح مستوية، إلا أن حاملات الخلايا والأنسجة ذات البنى الهندسية في المستوى النانوي لها مساحات سطحية أكبر لامتزاز أو امتصاص البروتينات؛ مما يوفر مواقع ارتباط أكثر بكثير لمستقبلات أغشية الخلايا (الشكل رقم ١٤.٥). ويمكن للبروتينات الممزوجة أو الممتصة أن تُغيّر أيضاً التشكل، مما يؤدي إلى تعريض أو كشف مواقع ارتباط إضافية مخفية (cryptic binding sites). وقد قامت مجموعتنا بإجراء بحثٍ رائدٍ على تفاعلات الخلايا - الألياف النانوية البوليمرية [40-48]. تشير هذه الملاحظات إلى أن حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المغزولة كهربائياً (electrospun nanofibrous scaffolds) يمكن أن تعزز التفاعلات الإيجابية للخلايا - النسيج الغشائي أو المصفوفة؛ مما يشجع الخلايا على الارتكاز أو التثبيت بالألياف النانوية المبنية في الشكل رقم (١٤.٦ a إلى c). باختصار (١) تُشجع الألياف النانوية وبشكلٍ ملحوظ على التصاق وتكاثر الخلايا؛ (٢) يُوجّه اتجاه ألياف النانو المتراففة (aligned nanofibers) اتجاه البروتينات الهيكلية الخلوية (cytoskeletal proteins) (الخاصة بهيكل الخلية)؛ (٣) يمكن لألياف النانو المحددة أو المخصصة وظيفياً (functionalized nanofibers) أن تعزز تأثيرات ألياف النانو المذكورة أعلاه على تصرفات أو سلوكيات الخلايا. وكمثال على تأثير التحديد أو التخصيص الوظيفي السطحي (surface functionalization) لبولي (إل-لاكتيد-كو-ε-كابرولاكتون) (Poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) - P(LLA-CL))، من أجل ألياف النانو المطلية أو المغلفة بالكولاجين، فقد تحسّن التصاق وتكاثر الخلايا (انظر الشكل رقم ١٤.٦ f و g). لقد التصقت الخلايا البانية للعظم المزروعة ليومٍ واحدٍ على الألياف النانوية المؤلفة من البولي (ε-كابرولاكتون) / كربونات الكالسيوم (PCL / CaCO<sub>3</sub>) بصورةٍ جيدة مع أشكالٍ أو مورفولوجيا مضلعة (polygonal morphology) [40]. وقد توجهت الخلايا العضلية الملساء (SMCs) المزروعة على الألياف النانوية المتراففة المؤلفة من البولي (إل-لاكتيد-كو-ε-كابرولاكتون) (PLLA-CL) على طول الألياف النانوية [41]. وقد التصقت الخلايا العضلية الملساء (SMCs) وانتقلت على طول محور الألياف النانوية المتراففة وأظهرت نمطاً ظاهرياً أشبه بالمغزل قابل للتقلص (spindle-like contractile phenotype). وقد كان توزيع وتنظيم بروتينات هيكل الخلايا العضلية الملساء (smooth muscle cytoskeleton proteins) داخل الخلايا العضلية الملساء (SMCs) موازياً لاتجاه الألياف النانوية. وقد تحسّن معدل التصاق وتكاثر الخلايا العضلية الملساء (SMCs) بشكلٍ ملحوظ على حاملة الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية المتراففة أكثر مما كان عليه على الأفلام البوليمرية المستوية (plane polymer films). وبعد طلاء الكولاجين على الألياف النانوية المؤلفة من البولي (إل-لاكتيد-كو-ε-كابرولاكتون) (PLLA-CL)، ازداد كلٌّ من التصاق الخلايا وقدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة بشكلٍ كبير [42]. كما ازداد أيضاً التمعدن الحيوي (التشبع بالمواد المعدنية) بشكلٍ ملحوظ (٥٥٪) في حاملات الخلايا والأنسجة

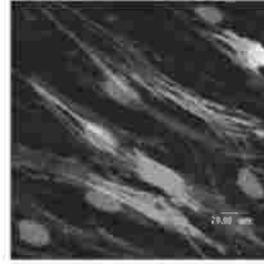
الليفية النانوية المؤلفة من المركب الحيوي (biocomposite) البولي كابرولاكتون / الهيدروكسي آباتيت ذي الطور النانوي / الكولاجين (PCL / nHA / Col) بعد عشرة أيام من الزراعة وظهرت كمعادن تم تركيبها عن طريق الخلايا الجنينية البشرية البانية للعظم (human fetal osteoblasts - hFOB). لقد كان لنظام المركب الحيوي الفريد في المستوى النانوي مع مورفولوجيا ليفية نانوية تحديد أو تخصيص وظيفي سطحي طبيعي مُتأصل (كامن) من أجل التصاق وهجرة وتكاثر وتمعدن الخلايا الجنينية البشرية البانية للعظم (hFOB) [48]. وستتم مناقشة تفاصيل تفاعل الخلايا الجذعية على الألياف النانوية من أجل تجديد أنسجة محددة في الفقرة (١٤.٦). إن تأثير الألياف النانوية على تمايز الخلايا الجذعية هو مسألة أساسية من أجل المزيد من تطبيقات الألياف النانوية في هندسة الأنسجة. فيمكن تحفيز الخلايا الجذعية على التمايز إلى أنواع مختلفة من الخلايا عن طريق عوامل النمو أو عوامل أخرى في أوساط التغذية، ويمكننا دمج مثل هذه الجزئيات الحيوية في الألياف النانوية وذلك لتوجيه التمايز (direct differentiation) إلى النوع المطلوب من الخلايا. كما يمكن لمورفولوجيا الألياف النانوية المحاكية حيويًا مع أنماط أو أشكال مختلفة أن تساعد أيضًا في توجيه تمايز الخلايا الجذعية. وهذا لا يزال موضع شك ومُختلفًا عليه حيث إن الأبحاث على المسلمات أو الفرضيات المذكورة أعلاه ما زالت جارية حاليًا.



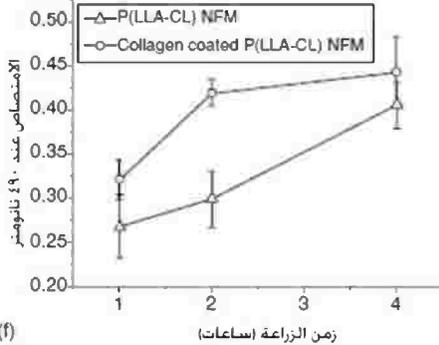
الشكل رقم (١٤،٥). تُؤثر بنية حاملة الخلايا والأنسجة على ربط وانتشار الخلايا. (a, b) ربط الخلايا بحاملات الخلايا والأنسجة مع بُنى هندسية في المستوى المايكروي بحيث تتسطح وتنتشر كما لو أنها مزروعة على سطوح مستوية. (c) حاملات خلايا وأنسجة مع بُنى هندسية نانوية تملك مساحات سطحية أكبر لامتراز أو امتصاص البروتينات، مما يوفر مواقع ربط عديدة جدًا لمستقبلات غشاء الخلية (cell membrane receptors). ويمكن للبروتينات الممزوجة أو الممتصة أن تغير أيضًا من التشكل؛ مما يؤدي إلى عرض أو كشف مواقع ربط إضافية خفية. (من Stevens, M.M. and George, J.H., (Science, 310, 1135, 2005).



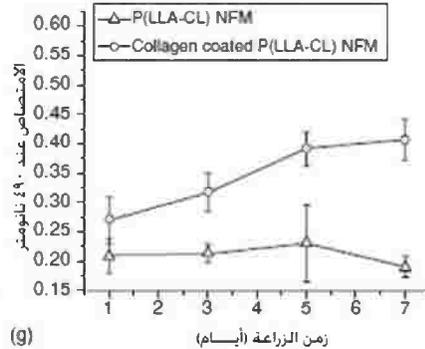
(d) التصاق الخلايا



(e) تكتل الخلايا



(f)



(g)

الشكل رقم (١٤,٦). رسم تخطيطي لردود فعل أو استجابات الخلايا - الألياف النانوية على (a) ألياف نانو عشوائية، (b) ألياف نانو متراصة، و (c) ألياف نانو محددة أو مخصصة وظيفياً. (d إلى g) هي نتائج من مجموعةنا: (d) خلايا بانية للعظم مزروعة ليوم واحد على ألياف النانو المصنوعة من البولي كابرولاكتون / كربونات الكالسيوم (PCL / CaCO<sub>3</sub>). (تمت إعادة طباعتها من Fujihara, K., Kotaki, M., and Ramakrishna, S., *Biomaterials*, 26, 4139, 2005). (e) خلايا العضلات الملساء مزروعة على ألياف النانو المتراصة المصنوعة من البولي (إل-لاكتيد-كو-ε-كابرولاكتون) (PLLA - CL). (من Xu, C.Y., Inai, R., Kotaki, M. et al., *Biomaterials*, 25, 877, 2004). (f) التصاق الخلايا و (g) بقاء الخلايا على قيد الحياة على ألياف النانو المصنوعة من الكولاجين المطلي بالبولي (إل-لاكتيد-كو-ε - كابرولاكتون) (PLLA - CL). (من He, W., Ma, Z., Yong, T. et al., *Biomaterials*, 26, 7606, 2005).

بالإضافة إلى الألياف النانوية المغزولة كهربائياً، تعطي الألياف النانوية التي يتم تصنيعها بواسطة طرق أخرى، مثل التجميع الذاتي (self - assembly) والفصل الطوري (phase separation)، نتائج مماثلة على ردود فعل أو استجابات الخلايا [49-53]. وبصورة أساسية، يتم نسج أو حيك هذه الألياف النانوية بشكل عشوائي (randomly interweaved) بدون شكل دوري طويل الأمد (long - term periodic pattern). لقد طور Elia Beniash وآخرون [49] فئة من جزيئات بيتيدية

مزدوجة الألفة (peptide amphiphile molecules - PA) تمتلك كلاً من الخصائص المحبة للماء (hydrophilic properties) والخصائص الكارهة للماء (hydrophobic properties) بحيث إنها ستتجمع ذاتياً في شبكات من ألياف نانوية ثلاثية الأبعاد تحت ظروف فيزيولوجية وفي وجود الأيونات المعدنية متعددة التكافؤ (polyvalent metal ions). يُحاصر التجميع الذاتي الببتيدي مزدوج الألفة (PA) خلايا الـ (MC3T3-E1) في المصفوفة اللييفية النانوية (nanofibrillar matrix)، وتبقى الخلايا على قيد الحياة في مزرعة الخلايا لمدة ٣ أسابيع على الأقل. لقد كان الانجاس (entrapment) قادراً على دعم تكاثر وتحرك الخلايا. وقد أشار التحليل الكيميائي الحيوي (biochemical analysis) إلى أن الخلايا المحصورة قد استوطنت الألياف النانوية وربما استخدمت الجزيئات الببتيدية مزدوجة الألفة (PA) في مساراتها الاستقلابية أو الأيضية (metabolic pathways).

لقد تم تطوير حاملات خلايا وأنسجة ليفية نانوية مصنوعة من بولي (حمض إل - لاكتيك) (poly(L-lactic acid) - PLLA) مع مسامات مترابطة بينياً (interconnected pores) عن طريق الفصل الطوري [54,55]. تملك حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجدران مع مسامات مترابطة بينياً بنية نسيجية ليفية نانوية (nanofibrous texture) امتصت بروتينات المصل أكثر بأربعة أضعاف من حاملات الخلايا والأنسجة مع مسامات مترابطة بينياً ولها جدران صلبة. إن البنية الهندسية للألياف النانوية قد عززت وبشكل انتقائي من امتزاز أو امتصاص البروتينات بما في ذلك الفبرونيكتين والفيترونيكتين، على الرغم من أن كلاً من حاملتي الخلايا والأنسجة قد تم تصنيعهما من نفس مادة البولي (حمض إل - لاكتيك) (PLLA). علاوة على ذلك، فقد سمحت أيضاً حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية بالتصاق الخلايا البانية للعظم بمعدل أكبر بمقدار ١.٧ ضعفاً من حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجدران بمسامات صلبة (solid pore walls). كما عرضت الخلايا البانية للعظم المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية أيضاً نشاطاً أكبر لإنزيم الفوسفاتاز القلوي (alkaline phosphatase)، وتعبيراً أبكر ومُعزراً للنمط الظاهري للخلايا البانية للعظم مقابل حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجدران الصلبة (solid - walled scaffolds) (حاملات الخلايا والأنسجة المايكروية (microscaffolds) المصنوعة عن طريق الفصل الطوري. إن أكثر ما لُوَحظ هو الزيادة في بروتين الـ (runx2) وفي الـ (RNA) المرسل للبروتين اللعابي العظمي (bone sialoprotein mRNA) في الخلايا المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات الألياف النانوية بالمقارنة مع تلك المزروعة على حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجدران الصلبة. ففي اليوم الأول من الزراعة، تم التعبير عن الإنتغرينات  $\alpha_2$  و  $\beta_1$  بالإضافة إلى الإنتغرينات  $\alpha_v$  و  $\beta_3$  بشكل كبير على سطح الخلايا المبدورة على حاملات الخلايا والأنسجة اللييفية النانوية، وبالارتباط مع ذلك فقد كانت هناك مستويات أعلى من الفوسفو - باكسيلين (phosphor - Paxillin) والالتصاق الفوسفاتي - البؤري لإنزيم الكيناز (phospho - focal adhesion kinase - FAK) في حَلَالَات الخلايا (cell lysates). بالإضافة إلى ذلك، فقد تم تعزيز التمدن الحيوي (biomineralization) بصورة ملحوظة على حاملات الخلايا والأنسجة اللييفية النانوية بالمقارنة مع حاملات الخلايا والأنسجة ذات الجدران الصلبة. وهكذا، فإن البنية الهندسية للألياف النانوية تعزز من التمايز ومن التمدن الحيوي للخلايا البانية للعظم.

## APPLICATIONS (١٤,٦) تطبيقات حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية من أجل هندسة الأنسجة العضلية الهيكلية OF NANOFIBROUS SCAFFOLDS FOR MUSCULOSKELETAL TISSUE ENGINEERING

لقد تم إنتاج حاملات خلايا وأنسجة ليفية نانوية بصورة ناجحة من العديد من البوليمرات الاصطناعية والطبيعية باستخدام تقنية الغزل الكهربائي البسيطة نسبياً. تمتلك الألياف التي يتم إنتاجها عن طريق الغزل الكهربائي أقطاراً تتراوح من بضعة نانومترات إلى مايكرومترات [29,56,57]. ومن المحتمل أن تسمح الألياف النانوية المتواصلة (continuous nanofibers) بتصنيع مدمج لمصفوفات ثلاثية الأبعاد ذات ألياف نانوية (3D nanofiber matrices) مع مسامية عالية وترابط بيني مكاني (spatial interconnectivity) عالٍ وترافف مُحكم به (controlled alignment) للألياف لتوجيه اتجاه وهجرة الخلايا [58,59]. إن المواد والخلايا وعوامل النمو الخاصة بهندسة الأنسجة العضلية الهيكلية المستخدمة حالياً مُدرّجة في الجدول رقم (١٤,١). وبشكلٍ أساسي، يمكن استخدام معظم البوليمرات الحيوية المستخدمة حالياً لتصنيع الألياف النانوية عن طريق الغزل الكهربائي. تدعم عملية الغزل الكهربائي تراكم مختلف من الألياف النانوية ويمكن أيضاً الجمع بين هذه التقنية وطرق التصنيع النانوي (nanofabrication methods) الأخرى. إن هذه المرونة في التصنيع بالإضافة إلى سمات أخرى مفيدة تجعل المركب ذا الألياف النانوية محتوى رائداً من أجل تطبيقات هندسة الأنسجة.

الجدول رقم (١٤,١). المواد والخلايا وعوامل النمو الخاصة بهندسة الأنسجة العضلية الهيكلية

عوامل النمو	الخلايا	المواد الخاصة بحاملات الخلايا والأنسجة			النسيج العضلي الهيكلية
		مركب	بوليمر اصطناعي	بوليمر طبيعي	
BMP-2, BMP-7, TGF-β	الخلايا البانية للعظم (Osteoblast)، الخلايا الجذعية المتوسّطية (MSCs)	PLA/HA/collagen, PCL/HA/ collagen, PCL/CaCO3,PCL/HA, PCL/Gelatin/HA, Silk/HA [64]			عظم
TGF-β	الخلايا الغضروفية (Chondrocyte)، الخلايا الجذعية المتوسّطية (MSCs)		PLA, PGA, PLGA, PCL, PLA-CL, PU	كولاجين [56]، جيلاتين، حرير [57]، [60- HYA، ChS، 63]	غضروف
TGF-β, IGF-I, VEGF [70,71]	خلايا الأرومة العضلية الهيكلية (Skeletal myoblasts)، الخلايا الجذعية العضلية الهيكلية (Skeletal muscle stem cells) (MSCs) [68,69]	PLGA-gelatin/chondroitin/HYA [65]		شيتوزان	عضل
TGF-β, BMP-12, EGF, PDGF, b-FGF, VEGF, IGF-II [72]	خلايا الأرومة الليفية (Fibroblasts)، الخلايا الجذعية المتوسّطية (MSCs)	PLLA/PLGA [66,67]			رباط

ملاحظة: b-FGF، عوامل نمو الأرومة الليفية الأساسية (basic-fibroblast growth factors)؛ BMP، بروتين مُكوّن للعظم (bone morphologic protein)؛ ChS، سلفات الكُنْدُرُوْتين (مادة من مكونات الغضروف) (chondroitin sulfate)؛ EFG، عامل النمو البشريّ (epidermal growth factor)؛ HA، هيدروكسي آباتيت (hydroxyapatite)؛ HYA، حمض الهيالورونيك (hyaluronic acid)؛ IGF، عامل النمو الذي يشبه الأنسولين (insulin-like growth factor)؛ PCL، بولي (ε-كابتولاكتون) (poly(ε-caprolactone))؛ PDGF، عامل النمو المستمد من الصفائح الدموية (platelet-derived growth factor)؛ PGA، بولي (حمض الغليكوليك) (poly(glycolic acid))؛ PLA، بولي (حمض إل - لاكتيك) (poly(L-lactic acid))؛ PLGA، بولي (إل-لاكتيد/جليكولايد) (poly(L-lactide/glycolide))؛ PLLA، بولي (إل-لاكتيد-كو-ε-كابتولاكتون) (poly(L-lactide-co-ε-caprolactone))؛ PU، بولي يوريثان (polyurethane)؛ TGF، عامل تحويل النمو (transforming growth factor)؛ VEGF، عامل النمو البطانيّ الوعائي (vascular endothelial growth factor).

## Bone العظم (١٤,٦,١)

من أجل تجديد الأنسجة العظمية (bone tissue regeneration)، عادةً ما يتم دمج البوليمرات القابلة للتحلل الحيوي (biodegradable polymers) مع السيراميك الحيوي سواءً قبل أو بعد عملية الغزل الكهربائي وذلك لمحاكاة مُكوّن النسيج العظمي الطبيعي. لقد قام Fujihara وآخرون [40] بالغزل الكهربائي لألياف النانو كمركب من البولي (E-كابرولاكتون) / كربونات الكالسيوم (PCL / CaCO<sub>3</sub>). وقد شجع هذا المركب ذو الجسيمات النانوية المؤلفة من كربونات الكالسيوم (CaCO<sub>3</sub>) التصاق الخلايا البانية للعظم في التجارب التي تمت في المختبر. وفي تجربة أخرى، تم استخدام تقنية الغزل الكهربائي لتصنيع حاملات خلايا وأنسجة ليفية نانوية مؤلفة من مركب حيوي من البولي كابرولاكتون / الهيدروكسي آباتيت ذي الطور النانوي / الكولاجين (PCL / nanophase HA / Col) وذلك لتوفير الدعم الميكانيكي وتوجيه نمو الخلايا الجنينية البشرية البانية للعظم (hFOB) من أجل هندسة أنسجة العظام. إن حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المركبة حيويًا تلك والمبنية من البولي كابرولاكتون (PCL) والهيدروكسي آباتيت (HA) ذي الطور النانوي والكولاجين من النمط الأول هي ذات بنية مسامية بشكلٍ عالٍ (أكبر من ٨٠٪) وتوفر بنية ذات مسامات مفتوحة (open pore structure) بما في الكفاية من أجل استيطان الخلايا (cell occupancy) في الوقت الذي تسمح فيه بنقل المواد المغذية ومنتجات الفضلات الاستقلابية أو الأيضية (metabolic waste products) والنشوب أو النمو الوعائي (vascular ingrowth) بدون قيود. وقد ازداد التمعدن بشكلٍ ملحوظ (٥٥٪) في حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المؤلفة من المركب الحيوي للبولي كابرولاكتون / الهيدروكسي آباتيت ذي الطور النانوي / الكولاجين (PCL / nano-HA / Col) بعد ١٠ أيام من الزراعة وظهرت كمواد معدنية مركبة بواسطة الخلايا البانية للعظم [48].

بدلاً من ذلك، يمكن دمج الهيدروكسي آباتيت (HA) مع فيلم ليفي نانوي مغزول كهربائياً (electrospun nanofibrous film) عن طريق النقع (soaking) في سائل محاكي للجسم (simulated body fluid - SBF)، كما هو الحال في الدراسة التي قام بها Ito وآخرون [73]. فلقد غيّر الهيدروكسي آباتيت المشكّل فيلم البولي (٣-هيدروكسي بوتيرات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات) (PHBV) - poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) الذي يعتبر كارهاً للماء إلى حالة أكثر حباً للماء، وكنتيجة لذلك فقد ازداد معدل التحلل (degradation rate). وعلى أي حال، لم يؤثر تركيب الهيدروكسي آباتيت (HA) بشكلٍ ملحوظ على التصاق الخلايا. فعند استبدال البولي (٣-هيدروكسي بوتيرات-كو-٣-هيدروكسي فاليرات) (PHBV) الحرير / أكسيد البولي إيثيلين (PEO) الذي يحتوي على البولي (إل - أسبارتات) (poly(L-aspartate) - poly-Asp)، وتغيير السائل المحاكي للجسم (SBF) إلى محلول كلورايد الكالسيوم (CaCl<sub>2</sub>) ومحلول فوسفات الصوديوم ثنائي القاعدة (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)، ظهر نمو الآباتيت (وهو أحد المكونات المعدنية للعظم) بصورة تفضيلية على طول الاتجاه الطولي للألياف [74].

لقد تم استخدام الخلايا الجذعية المتوسطة (MSCs) المستمدة من نقي العظم لجرذان وكيدة وذلك بذرهما على حاملات خلايا وأنسجة ليفية نانوية مصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) من قبل Yoshimoto وآخرين [75]. وتمت زراعة بُنى الخلايا - البوليمر بمكملات الخلايا البانية للعظم (osteogenic supplements) ضمن نظام مفاعل حيوي دوراني نفوذ للأكسجين (يسمح بنفاذ الأكسجين) (rotational oxygen - permeable bioreactor system). في الأسابيع الأربعة، تمت تغطية سطوح بُنى الخلايا - البوليمر بطبقات متعددة من الخلايا (cell multilayers). بالإضافة إلى ذلك، فقد تم اكتشاف كلٍّ من إفراز الكولاجين من النمط الأول وتمعدن الخلايا في نفس الوقت.

وقد تم تصنيع الألياف النانوية المغزولة كهربائياً من المركب المؤلف من الجيلاتين والبولي كابرولاكتون (Gelatin / PCL) عن طريق مزج محلول الجيلاتين بنسبة ٥٠٪ مع محلول البولي كابرولاكتون (PCL) بنسبة ٥٠٪؛ حيث تراوح تركيز الجيلاتين من ٢,٥٪ وزن / حجم إلى ١٢,٥٪ وزن / حجم [76]. وقد أشار كلٌّ من القياس الخاص بزاوية التماس (contact angle measurement) واختبارات الشد (tensile tests) إلى أن الغشاء الليفي المركب من الجيلاتين / البولي كابرولاكتون (PCL) قد أظهر ازدياداً في قابلية التبلل (wettability) بالإضافة إلى تحسّن في الاستطالة أو التمدد (elongation) مما تم الحصول عليه سواءً من الجيلاتين لوحده أو من البولي كابرولاكتون (PCL) لوحده. إن خلايا نقي العظم السدويّة (BMSCs) لا تلتصق بصورة مفضلة ولا تنمو بشكل جيد على سطح حاملات الخلايا والأنسجة هذه فحسب، بل لقد كانت قادرة أيضاً على الهجرة أو التحرك داخل حاملة الخلايا والأنسجة إلى مسافة تصل حتى ١١٤ مايكرومتر خلال الأسبوع الأول من عملية الزراعة. إن هذه التصرفات أو السلوكيات الخلوية (cellular behaviors) تُظهر توافقية حيوية أفضل مع الألياف النانوية للمركب المؤلف من الجيلاتين / البولي كابرولاكتون (PCL) مما هو عليه مع المادة الليفية النانوية المصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) والصرف. وتحافظ الخلايا الجذعية المتوسطة (MSCs) المزروعة على مصفوفة مصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) أو الحرير على القدرة على التمايز إلى أنواع أو سلالات مختلفة مثل السلالات المكوّنة للشمع (adipogenic lineages) والسلالات المكوّنة للغضروف (chondrogenic lineages) والسلالات المكوّنة للعظم (osteogenic lineages) [77,78].

لقد أصبحت عوامل النمو العظمي (bone growth factors) مثل البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2) والبروتين المكوّن للعظم - سبعة (BMP-7)، ... إلخ، وبشكل تدريجي أدوية سريرية (clinical drugs) جذابة من أجل إصلاح العيوب العظمية. وقد أظهرت نتيجة استخدام حاملة الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد المصنوعة من مركب الكولاجين / بولي (حمض اللاكتيك) (PLA) المتمعدن والمشار إليها سابقاً مع البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2) بعضاً من آثار الشفاء الإيجابية في الجسم الحي [79]. ومن حيث المبدأ، فإن المواد الليفية النانوية (nanofibrous materials) تتمتع عوامل النمو بصورة أفضل وذلك نظراً إلى مساحتها السطحية الكبيرة وبنيتها النسيجية النانوية.

وقد تم اختيار حاملات خلايا وأنسجة ليفية نانوية مصنوعة من فبروين الحرير (Silk fibroin) وتحتوي على البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2) و/ أو الجسيمات النانوية للهيدروكسي آباتيت (HA)، ومُحصّرة عن طريق الغزل الكهربائي كنسيج غشائي أو كمصفوفة من أجل تشكيل العظم في المختبر من الخلايا الجذعية المتوسّطة البشرية (hMSCs) المستمدة من بقيّ العظم [80]. لقد دعمت حاملات الخلايا والأنسجة تلك والمحتوية على البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2) ترسيباً (deposition) أعلى للكالسيوم وتبلوراً (crystallinity) أعلى للآباتيت ومستويات أنيساخ (transcript levels) مُعزّزة للواسمات المحددة للعظم (bone - specific markers) مما هو عليه في عينات المراقبة التي لا تحتوي على البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2)؛ مما يشير إلى أن حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المصنوعة من الحرير المغزول كهربائياً يمكن أن تمثل نظاماً فعالاً لتوصيل البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2). والأهم من ذلك، فإن التواجد المشترك للبروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2) والهيدروكسي آباتيت (HA) ذي الطور النانوي في ألياف فبروين الحرير المغزولة كهربائياً قد أدى إلى أعلى ترسيب للكالسيوم وأعلى تنظيم لمستويات أنيساخ البروتين المكوّن للعظم - اثنان (BMP-2). ولحسن الحظ، فإن المعالجة المائية المعتدلة (mild aqueous process) المطلوبة لغزل الألياف كهربائياً تقدم خياراً مهماً من أجل توصيل السيبتوكينات اللامستقرة (labile cytokines) والجزيئات الحيوية الأخرى.

#### (١٤,٦,٢) الغضروف Cartilage

الغضروف هو نسيج ضام كثيف والذي يكون إلى حدّ ما مطوّعاً (pliable) ومرناً (resilient). إن هذه الخصائص ناجمة عن طبيعة نسيجه الغشائي الغني بالبروتيوغليكانات التي تتكون من بروتين لُبي أساسي (core protein) ملتصق بوحدات متكررة من ثنائيات السكاريد (disaccharides)، والتي تُسمى غليكوز أمينو غليكانات (glycosaminoglycans - GAGs) وهي تتألف بشكلٍ أساسي من حمض الهالورونيك (hyaluronic acid - HYA) وسلفات أو كبريتات الكُنْدرويتين (chondroitin sulfate) (وهي مادة من مكونات الغضروف) والكولاجين من النمط الثاني وسلفات أو كبريتات الكيراتين (keratin sulfate) (وهو بروتين في الأنسجة المتقرّنة). إن الغضاريف المفصليّة (articular cartilages) ضرورية في سند أو تحمل الأحمال (load - bearing) والتقليل من احتكاك السطوح المفصليّة (articular surfaces). ونظراً إلى القدرة المحدودة للغضروف المفصلي على إصلاح نفسه، فإن عيوب الغضروف الناتجة عن التقدم في العمر وإصابات المفاصل والاضطرابات التطورية (developmental disorders) يمكن أن تسبب آلام المفاصل وفقدان الحركة [81]. وكمواد مُرشّحة واعدة، فقد تم وبصورةٍ ناجحة تصنيع ألياف نانوية مغزولة كهربائياً من حمض الهالورونيك (HYA) أو ألياف نانوية مركبة مغزولة كهربائياً ومبنية على أساس حمض الهالورونيك (HYA). وعلى الرغم من أن هذه المواد مُرشّحة كحاملات خلايا وأنسجة واعدة من أجل تجديد الغضروف، إلا أن فعالية هذه الحاملات من أجل إصلاح الغضروف واستجابة الخلايا الغضروفية لهذه الألياف لا تزال غير معروفة [60-63].

لقد تمت دراسة الألياف النانوية المغزولة كهربائياً من الكولاجين من النمط الثاني [82] والمبدورة بخلايا غضروفية وذلك للتحقق من إمكانية استخدامها في هندسة الأنسجة الغضروفية (cartilage tissue engineering). وقد تم تقييم أنواع حاملات الخلايا والأنسجة الفردية كحاملات مترابطة بشكلٍ غير متشابك (غير متقاطع) (uncross - linked) أو مترابطة

بشكلٍ متشابك (cross - linked) أو مترابطة بشكلٍ متشابك / ومبدورة في دراسة قام بها Shields وآخرون [83]. وقد أظهر الفحص المجهرى باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لحاملات الخلايا والأنسجة المترابطة بشكلٍ متشابك والمزروعة بالخلايا الغضروفية قدرة هذه الخلايا على ارتشاح (infiltrate) السطح والدخول ضمن حاملة الخلايا والأنسجة. وقد خلصت الدراسة إلى أن حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من الكولاجين من النمط الثاني المغزول كهربائياً قد أنتجت بيئة مناسبة من أجل نمو الخلايا الغضروفية، وهذا يمكن أن يكون أساساً لتطوير عملية إصلاح الغضروف المفصلي.

وقد تمت أيضاً دراسة ألياف الشيتوزان المتراففة (aligned chitosan fibers) وذلك للتحقق من توافقيتها الحيوية مع الخلايا الغضروفية من قبل Subramanian وآخرين [84]. وكما هو متوقع، فإن ألياف الشيتوزان المغزولة كهربائياً والمتراففة توفر قدرة أفضل للخلايا للبقاء على قيد الحياة (cell viability) مما يوفره فيلم الشيتوزان المشكّل بقوالب الصب (cast chitosan film). إن لهذا الغشاء المغزول كهربائياً معامل مرونة (elastic modulus) أعلى بشكلٍ ملحوظ (٢.٢٥ ميغا باسكال) مما هو عليه لفيلم الشيتوزان المشكّل بقوالب الصب (١.١٩ ميغا باسكال). وكما هو الحال مع جميع الأغشية المغزولة كهربائياً (electrospun membrane)، فإن الأغشية ذات الألياف النانوية المغزولة كهربائياً من الشيتوزان لا تزال بحاجة إلى معالجة إضافية في حاملات الخلايا والأنسجة ثلاثية الأبعاد من أجل استخدامها في إصلاح الأنسجة الغضروفية.

لقد تمت أيضاً دراسة البوليمرات التركيبية القابلة للتحلل الحيوي وذلك للتحقق من ملاءمتها كحاملة خلايا وأنسجة للخلايا الغضروفية. فقد درس Shin وزملاؤه [85] إمكانية استخدام أربعة أنواع مختلفة من حاملات الخلايا والأنسجة المصنوعة من بولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) والمبنية على أساس الألياف النانوية (نسبة محتوى حمض اللاكتيك / حمض الغليكوليك - ٧٥ / ٢٥ أو ٥٠ / ٥٠ أو مزيج من ٧٥ / ٢٥ و ٥٠ / ٥٠) من أجل إعادة بناء الغضروف (cartilage reconstruction). لقد كانت الخصائص الميكانيكية لحاملة الخلايا والأنسجة الليفية النانوية أقل فقط بقليل من تلك الخصائص الميكانيكية الخاصة بالغضروف البشري مما يشير إلى أن حاملة الخلايا والأنسجة الليفية النانوية كانت مستقرة ميكانيكياً بصورة كافية لتحمل عملية الزراعة ولدعم عملية تجديد الغضروف. وقد لوحظ أن تكاثر الخلايا الغضروفية للخنازير (porcine chondrocytes) وتشكيل المصفوفة خارج الخلية (ECM) في حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية كان أفضل مما هو عليه في الغشاء التقليدي المشكّل بقوالب الصب.

لقد تم تقييم البولي كابورولاكتون الليفى النانوي (nanofibrous PCL) وذلك للتحقق من قدرته على المحافظة على الخلايا الغضروفية في حالتها الوظيفية باستخدام الخلايا الغضروفية الجنينية للأبقار (fetal bovine chondrocytes - FBCs) [86]. وقد أظهر تحليل التعبير الجيني عن طريق الاثناساخ العكسي - رد فعل أو استجابة سلسلة إنزيم البوليميراز (reverse transcription - polymerase chain reaction - RT - PCR) بأن الخلايا الغضروفية المبدورة على حاملة الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المصنوعة من البولي كابورولاكتون (PCL) قد حافظت وبشكلٍ مستمر على نمطها الظاهري الغضروفي من خلال التعبير عن جينات المصفوفة خارج الخلية المحددة للغضروف (cartilage - specific ECM genes)، بما في ذلك الكولاجين من النمط الثاني والكولاجين من النمط التاسع والأغريكان (aggrecan) (وهو بروتين بروتيوغليكاني أساسي مُحدد للغضروف) وبروتين النسيج الغشائي للغضروف ذي البلازميدة قليلة القسيمات (cartilage oligomeric matrix protein). لقد

كان التعبير عن الأنتيساخ المتغير لصفيرة (splice variant transcript) من الكولاجين من النمط الثاني، والذي يشير إلى النمط الظاهري للخلايا الغضروفية الناضجة أو مكتملة النمو، مُنظماً بشكل ملحوظ. وبالإضافة إلى تعزيز تمايز النمط الظاهري، فقد دعمت حاملة الخلايا والأنسجة اللبغية النانوية أيضاً التكاثر الخلوي كما يتضح من الزيادة في نمو الخلايا والتي هي بمقدار ٢١ ضعفاً لمدة أكثر من ٢١ يوماً عندما تم الحفاظ على مزارع الخلايا في وسط زراعة يحتوي على مصل الدم (serum - containing medium). وبالتالي؛ قد تكون ألياف النانو المصنوعة من البولي كابرولاكتون (PCL) مُرشحاً مناسباً كحاملة خلايا وأنسجة من أجل هندسة الأنسجة الغضروفية. وعلاوة على ذلك، يمكن للمركب اللبغية النانوي الذي يتكون من البوليمرات الطبيعية والاصطناعية أن يجمع بين مزايا كل من المادتين واللازمة من أجل ألفة الخلايا الغضروفية (chondrocytes' affinity).

### (١٤,٦,٣) العضل Muscle

لتفادي انتشار المرض المصاحب للتضحية بالوظيفة العادية من جانب الشخص المتبرع، توفر هندسة الأنسجة الهيكلية العضلية (skeletal muscle tissue engineering) مزايا مقنعة. لقد ركزت الأبحاث في الماضي وبشكل أساسي على استخدام حاملات الخلايا والأنسجة اللبغية المايكروية (microfibrous scaffolds) في هندسة الأنسجة العضلية (muscle tissue engineering). وفيما يتعلق بهندسة الأنسجة العضلية الملساء (smooth muscle tissue engineering)، فقد نظرت كمية كبيرة من الأبحاث في إمكانية استخدام الألياف النانوية كحاملات محتملة للأنسجة. ولفهم إمكانية استخدام حاملات الخلايا والأنسجة من أجل تجديد العضلات الهيكلية (skeletal muscle regeneration)، قمنا باستعراض بعض الأعمال البحثية عن حاملات الخلايا والأنسجة اللبغية المايكروية وتفاعلات الخلايا العضلية الملساء - الألياف النانوية. ومن أجل العديد من التطبيقات المرتبطة بهندسة الأنسجة العضلية، فإن القدرة على التحكم بالشكل الهندسي لحاملة الخلايا والأنسجة (scaffold geometry) عند المستويات المايكروية والمستويات النانوية تعتبر مهمة. وبصفة خاصة، فإن القدرة على التحكم بتراصف الألياف سوف تؤثر في مورفولوجيا أو شكل الخلايا لإنشاء بنية عضلية فعالة وقابلة للتقلص.

إن الديدغرابولز (DegraPols) هو بولي إستر يوريثان (polyesterurethane) كتلي قابل للتحلل، ويتألف من كتل قابلة للتبلور من البولي ((آر)-٣-حمض الهيدروكسي بوتيريك)-ديول (3-hydroxybutyric acid)-diol)) وكتل من البولي (E-كابرولاكتون-كو-غليكولايد)-ديول (poly(ε-caprolactone-co-glycolide)-diol) المرتبطة بشئائي إيزوسيانات (diisocyanate). وقد تمت دراسة الأغشية اللبغية المايكروية المصنوعة من الديدغرابولز (DegraPols) المغزول كهربائياً كحاملة خلايا وأنسجة محتملة يمكن استخدامها في هندسة الأنسجة العضلية الهيكلية [87]. يبلغ قطر الألياف حوالي ١٠ مايكرومترات، وتبلغ المسافة بين الليف والآخر (fiber - to - fiber distance) ١٠ مايكرومترات تقريباً. وبسبب الاتجاه الدوراني للمُجمّع (collector) (أداة تجميع الألياف) أثناء عملية الغزل الكهربائي، فإن هناك توجيهاً تفضيلاً طفيفاً للألياف. لم تُظهر هذه الأغشية أي بقايا سامة (toxic residuals) وهي تمتاز بخصائص ميكانيكية مُرضية (سلوك مرونة خطّي (linear elastic behavior) يصل إلى ١٠٪ من معدل التشويه (deformation) ومعامل يونغ (Young's modulus) من رتبة الميغا باسكال). وقد تمت دراسة قدرة الخلايا على البقاء على قيد الحياة والتصاقها وتمايزها على أغشية الديدغرابولز (DegraPols) المغلفة أو المطلية بالبروتين (الماتري جل (Matrigels) والفيبرونيكتين والكولاجين) وغير المغلفة وذلك باستخدام أنواع خلايا الـ (C2C12) والـ (L6) والخلايا السائلة الأولية البشرية (primary human satellite cells - SCs). وقد أظهر جميع أنواع الخلايا التصاقاً

واندماجاً وتكاثراً على الأغشية المغلفة المغزولة كهربائياً. وقد لوحظ تلويح إيجابي لسلسلة الميوزين الثقيلة (myosin heavy chain) في نوع خلايا الـ (C2C12)؛ مما يشير إلى أنه حدث تمايز لخلايا الـ (C2C12) متعددة النوى (multinucleated cells).

لقد حاول Neumann وآخرون [88] إنشاء صفائح عضلية هيكلية (skeletal muscle sheets) باستخدام خلايا الأرومة العضلية الهيكلية (C2C12 skeletal myoblasts). وقد تم بذر هذه الخلايا على مصفوفات من ألياف البولي بروبيلين المايكروية الموجهة بشكل متوازي (parallel oriented polypropylene microfibers). وتم طلاء أو تغليف الألياف المايكروية باللامينين (laminin) وتراوحت أقطار الألياف من ١٠ إلى ١٥ مايكرومتراً. ولم يكن هناك التصاق للخلايا في مجموعات عينات المراقبة التي لم يتم استخدام اللامينين فيها؛ مما يدل على أهمية تعديل السطح بمثل بروتينات الالتصاق (attachment proteins) تلك. وقد لوحظ أن مسافة الفصل الحرجة أو الحاسمة بين الألياف المتوازية هي ٥٥ مايكرومتراً أو أقل. إن مسافة الفصل بين الألياف الأكبر من ٥٥ مايكرومتراً سوف تؤدي إما إلى عدم وجود صفائح خلايا وإما إلى عدم اكتمال الصفائح. وقد نجحوا في الحصول على طبقات من الأنسجة المزروعة التي يصل سمكها إلى ٥٠ مايكرومتراً مُشكّلة بواسطة الخلايا المتراصة بشكل طولاني (longitudinally aligned cells). والأهم من ذلك، أنهم كانوا قادرين على الحفاظ على صفيحة خلايا قابلة للتقلص (contractile cell sheet) في المختبر في مصفوفة ذات أبعاد ١ في ٢ سنتيمتر مربع لمدة وصلت إلى ٧٠ يوماً.

وقد قيل جديلاً أن الألياف غير القابلة للتحلل الحيوي (non - biodegradable fibers) سوف تؤثر سلباً على قلوصلية أو انقباض (contractility) البناء العضلي. ومن المفضل استخدام الألياف المصنوعة من المواد القابلة للتحلل الحيوي، مثل البولي (حمض إل - لاكتيك) (PLLA) أو البولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PLGA) أو البولي (حمض الغليكوليك) (PGA)، والتي هي بالفعل في الاستخدام السريري. وعلى أي حال، تلتصق الخلايا بصورة سيئة بمثل هذه البوليمرات الاصطناعية ما لم تخضع لتعديلات سطحية (surface modifications) عن طريق المعالجة بالبلازما الهوائية (air plasma) أو من خلال التطعيم باللجائن (grafting of ligands) أو عن طريق الطلاء ببروتينات الالتصاق التي يُستخدم منها في الغالب اللامينين والفيبرونيكتين. وقد اتضح أيضاً بأن الطلاء أو التغطية بهلام المصفوفة خارج الخلية (ECM) على الألياف المايكروية المصنوعة من البولي (حمض إل - لاكتيك) (PLLA) (بقطر ٦٠ مايكرومتراً) قد عزز من التصاق وتمايز خلايا الأرومة العضلية (myoblast) المبدورة في الألياف العضلية متعددة النوى (multinucleated myofibers) والتي تم التأكد من وجودها من خلال التعبير عن الواسمات العضلية (muscle markers) مثل الميوزين (myosin) والألفا أكتين ( $\alpha$ -actin) [89]. وعلى عكس الألياف غير المطلية أو المغلفة، يبدو سطح الألياف المايكروية المطلية بهلام المصفوفة خارج الخلية (ECM gel - coated microfibers) ليفياً في طبيعته وعلى الأرجح، فإن هذه البنى النسيجية ذات الأبعاد ما دون المايكرون قد زودت الخلايا بالعديد من نقاط الالتصاق.

لقد قام مختبرنا بدراسة التصاق وتمايز الخلايا العضلية الملساء (SMCs) على حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المصنوعة من البولي (إل - لاكتيد - كو - إ - كابرولاكتون) (PLLA - CL). وقد تم إنتاج حاملة خلايا وأنسجة ليفية نانوية متراصة من البوليمر المشترك بولي (إل - لاكتيد - كو - إ - كابرولاكتون) (PLLA - CL) (٧٥ : ٢٥) عن طريق استخدام نظام غزل كهربائي خاص [41]. وتمت عملية الغزل الكهربائي لبولي (إل - لاكتيد - كو - إ - كابرولاكتون) (PLLA - CL) إلى ألياف نانوية وذلك بمعدل ٧٥ % من إل - لاكتيد إلى ٢٥ % من إ - كابرولاكتون. وتشير نتائج مقياس الانعراج بالأشعة السينية (x-ray diffractometer) ومقياس الألوان التفاضلي المسح (differential scanning calorimeter)

إلى أن الألياف النانوية التي تم غزلها كهربائياً قد طوّرت بنية مُوجّهة بشكلٍ عالٍ في تسلسلات من وحدات الكابرولاكتون (CL) أثناء عملية الغزل الكهربائي [90]. وقد بلغ قطر الألياف النانوية التي تم إنتاجها حوالي ٥٠٠ نانومتر مع طوبوغرافيا سطحية متراففة. وقد تم إظهار تفاعلات إيجابية بين حاملات الخلايا والأنسجة تلك مع الخلايا العضلية الملساء للشريان التاجي البشري (human coronary artery SMCs) من خلال الاختبار (MTS assay) (وهو فحص كيميائي حيوي للخلايا) والفحص المجهرى الضوئي متباين الطور (phase contrast light microscopy) والفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) واختبار الهيستولوجيا المناعية (immunohistology assay) والفحص المجهرى المباثر (البؤري) بالمسح الليزري (laser scanning confocal microscopy). وقد ظهر بأن الخلايا العضلية الملساء قد التصقت وهاجرت أو انتقلت على طول محاور الألياف النانوية المتراففة وأظهرت أو عبّرت عن نمط ظاهري مشابه للمغزل وقابل للتقلص؛ وقد كان توزيع وتنظيم بروتينات هيكل الخلايا العضلية الملساء داخل الخلايا العضلية الملساء (SMCs) موازياً لاتجاه الألياف النانوية. يمكن لهذه المصفوفة الاصطناعية المتراففة وبلاستفاد من مزايا البوليمرات التركيبية القابلة للتحلل الحيوي، ومن محاكاة المصفوفة خارج الخلية (ECM) الطبيعية ذات الأبعاد في المستوى النانومتري، ومن نسخ بنية النسيج الطبيعي في بنية هندسية محددة، أن تكون مفيدة في تطبيق محدد من تطبيقات هندسة الأنسجة والتي تلعب فيها الخلايا العضلية الملساء (SMCs) دوراً مهماً، وذلك مثل دورها الهام في هندسة الأوعية الدموية (blood vessel engineering).

#### ٤,٦,١٤) الرباط Ligament

لقد تم استخدام مجموعة متنوعة من المواد الاصطناعية من أجل استبدال الرباط (مثل غرسة فيرسي (Versigraft) والداكرون (Dacron) والغور - تكس (Gore - Tex) وبوليستر اليلدز - كايو (Leeds - Keio polyester) وجهاز كينيدي لتكبير الرباط المبني على أساس البولي بروبيلين (polypropylene - based Kennedy ligament - augmentation device))، ولكن مع نجاح محدود جداً وقصير الأمد. فمن بين ٨٥٥ رباط اصطناعي تمت متابعتها لمدة ١٥ عاماً، فشلت نسبة ٤٠٪ إلى ٧٠٪ منها بسبب الحطام الناتج عن الاهتراء (wear debris) وردود فعل الأنسجة (tissue reactions) والقيود الميكانيكية (mechanical limitations). وقد كانت التجربة مع استبدال هذه الطعوم من الأربطة الاصطناعية مخيبة للآمال ويعتبر السرد التاريخي للفشل مفيداً بشكلٍ خاص من وجهة نظر هندسة الأنسجة [91].

هناك حاجة لم يتم تلبيتها لأنسجة الأربطة المهندسة نسيجياً (tissue - engineered ligament tissues) من أجل إصلاح الأربطة والأوتار الممزقة والمصابة بالفتق. إن الحاجة الوظيفية لبدائل الأربطة (ligament replacements) ملحة وذلك بسبب الأحمال الفيزيولوجية (physiological loads) العالية التي يمكن أن تخضع لها الأربطة البديلة. ويجب أن يكون الرباط المهندس نسيجياً قوياً بما فيه الكفاية مباشرة بعد عملية الزراعة وذلك لتحمل (withstand) الأحمال الفيزيولوجية. ولبقاء الرباط المستبدل على قيد الحياة لمدة طويلة يجب أن يكون لحاملات الخلايا والأنسجة بنية هندسية تكون قادرة على تشجيع التصاق وتكاثر وتمايز الخلايا. ومن أجل تمكين الرباط المجدد من تولي الحمل عن مادة حاملة الخلايا والأنسجة الأصلية، يجب أن تدعم حاملة الخلايا والأنسجة توجيه الخلايا وترسيب المصفوفة خارج الخلية (ECM) استجابةً للأحمال الفيزيولوجية. وعلى الرغم من أن البوليمرات الطبيعية مثل الكولاجين والحرير تعتبر مرشحات محتملة كمادة حاملة للخلايا والأنسجة، إلا أنها بحد ذاتها قد لا تمتاز بالقوة الكافية لدعم الأحمال الفيزيولوجية [92,93].

لقد لوحظ أن النسيج الغشائي للحريز (مصنوفة الحرير) (silk matrix) يدعم التصاق وتوسع نمو وتمايخ خلايا سلف نقي العظم السدويّة البشرية البالغة (progenitor bone marrow stromal cells)، وذلك بناءً على الفحص المجهرى باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) والتحديد الكميّ للحمض النووي (DNA quantitation) والتعبير عن الواسمات (markers) الخاصة بالكولاجين من النمط الأول والكولاجين من النمط الثالث والتيناسين - سي (C - tenascin). تدعم النتائج الاستنتاج بأن الأنسجة الغشائية أو المصفوفات المصنوعة من ألياف حرير دودة القذ (silkworm fiber matrices) والمحضرة بشكل صحيح، وبصرف النظر عن توفير المزايا الفريدة من حيث الخصائص الميكانيكية بالإضافة إلى التوافقية الحيوية (biocompatibility) والتحلل الحيوي (biodegradability) البطيء، هي أنسجة غشائية أو مصفوفات مواد حيوية (biomaterial matrices) مناسبة لدعم تمايز الخلايا الجذعية البالغة باتجاه سلالات الأربطة (ligament lineages). يتضمن الجدول رقم (١٤.٢) قائمة بالخصائص الميكانيكية للأنسجة العضلية الهيكلية والبوليمرات الطبيعية أو الاصطناعية [16,42,66,67,83,94,105]. تعتبر البوليمرات الاصطناعية أو التركيبية مواداً من الممكن استخدامها كحاملات خلايا وأنسجة وذلك نظراً لتشابه متانة شدتها (tensile strength) مع الأنسجة الرخوة (soft tissues). وقد افترض Bashur وآخرون [106] بأن شبكات الألياف البوليمرية التركيبية في المستوى المايكروني (micro - scale synthetic polymer fiber meshes) الموجهة والمشكلة بواسطة طريقة الغزل الكهربائي يمكن أن تُنظم مورفولوجياً أو شكل الخلايا، ويمكن للسماح أو المزايا الطبوغرافية السطحية في المستوى المايكروني (microscale topographic features) أن تُحفّز توجيه الخلايا من خلال ظاهرة التوجيه بالاتصال أو التلامس (contact guidance phenomenon). ولاختبار هذه الظاهرة، فقد تم غزل شبكات ألياف مُدمجة (fused fiber meshes) من البولي (حمض دي، إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) - PLGA) على دعامات صلبة (rigid supports) في ظروف أنتجت أليافاً ذات متوسط أقطار يتراوح من ٠.١٤ إلى ٣.٦ مايكرومتراً، وانحرافات معيارية زاوية (angular standard deviations) تتراوح بين ٣١ درجة و ٦٠ درجة. وقد أشار التحليل المورفولوجي لخلايا الأرومة الليفية الملتصقة (NIH 3T3 fibroblasts) أن المنطقة المعرضة للخلايا والنسبة الجانبية، أي نسبة العرض إلى الارتفاع (aspect ratio)، قد زادت بشكلٍ منهجي مع الازدياد في كلٍ من قطر الليف ودرجة توجيه الليف. والأهم من ذلك، فقد كان مورفولوجياً أو شكل الخلايا على الألياف ذات القطر ٣.٦ مايكرومتراً مماثلاً لمورفولوجيا الخلايا على أفلام من البولي (حمض دي، إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) المطلية أو المغلفة بواسطة الغزل (spin - coated PLGA films). وعلى أي حال، لم تكن كثافات الخلايا على الشبكات المغزولة كهربائياً (electrospun meshes) مختلفة بشكلٍ كبير عن تلك على البولي (حمض دي، إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) المطلي أو المغلف بواسطة الغزل، مما يدل على أن تكاثر خلايا الأرومة الليفية ليس حساساً لقطر أو اتجاه الألياف. وثمة دراسة أخرى قارنت ألياف البولي (حمض إل - لاكتيك) (PLLA) مع ألياف البولي (كربونات دي تي إي) (poly(DTE carbonate)) [103]. وقد تم إنجاز الدراسة على ثلاث مراحل. في المرحلة الأولى، وُجد بأن الألياف من الجيل الأول تعزز نشوب أو نمو النسيج (tissue ingrowth) في نموذج تحت الجلد (subcutaneous model). وفي المرحلة الثانية، تم تصنيع ألياف من الجيل الثاني من البولي (كربونات دي تي إي) والبولي (حمض إل - لاكتيك) مع أقطار قدرها ٧٩ و ٧٢ مايكرومتراً، ومتانات شد قصوى قدرها ٢٣٠ و ٢٩٩ ميغا باسكال (MPa) ومعاملات مرونة أو رُجوعية (moduli) قدرها ٣.١ و ٤.٩ غيغا باسكال (GPa)، وأوزان جزيئية قدرها ٦٥٠٠٠ و ١٧٠٠٠٠ دالتون (Da)،

على التوالي. وقد تم تقييم هذه الألياف على أساس القدرة على الاحتفاظ بالوزن الجزيئي (molecular weight) والقدرة على الاحتفاظ بالمتانة والتوافقية الخلوية (cytocompatibility). وبعد ٣٠ أسبوعاً من الحضانة في محلول ملحي مدرء بالفوسفات (phosphate - buffered saline)، بلغ معدل القدرة على الاحتفاظ بالمتانة لألياف البولي (كربونات دي تي إي) وألياف البولي (حمض إل - لاكتيك) ٨٧٪ و ٧٪، على التوالي. وقد التصقت خلايا الأرومة الليفية وتكاثرت بشكل جيد وبالتساوي على كل من نوعي حاملات الخلايا والأنسجة في المختبر. وأخيراً، في المرحلة الثالثة تم تصنيع نموذج أولي (prototype) لجهاز إعادة بناء الرباط الأمامي المتصلب (anterior cruciate ligament - ACL) من ألياف البولي (كربونات دي تي إي) مع قيم متانة قابلة للمقارنة مع تلك القيم الخاصة بالرباط الأمامي المتصلب (ACL) الطبيعي (٥٧ ميغا باسكال). وبشكل جماعي، أشارت هذه البيانات إلى أنه من الممكن أن تكون ألياف البولي (كربونات دي تي إي) مفيدة من أجل تطوير حاملات خلايا وأنسجة قابلة للارتشاف (resorbable scaffolds) من أجل إعادة بناء الرباط الأمامي المتصلب (ACL) ويمكن مقارنتها مع البولي (حمض دي، إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) الذي تم إنشاؤه على نحو جيد. لقد تم استخدام حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المصنوعة من البولي يوريثان (polyurethane nanofibrous scaffold) وذلك لتقييم تأثير الألياف النانوية المتراصة على الاستجابة الخلوية (cellular response) لخلايا الأرومة الليفية للرباط البشري (human ligament fibroblasts - HLFs) ولتقييم تأثير تراصف واتجاه انفعال (strain direction) خلايا الأرومة الليفية للرباط البشري (HLFs) على ميكانيكا التبادل (mechanotransduction) (وهي تمثل العديد من الآليات التي عن طريقها تحول الخلايا التحفيز الميكانيكي إلى نشاط كيميائي) [107]. وقد تم تقييم تأثيرات تراصف الألياف واتجاه المحفزات الميكانيكية (mechanical stimuli) على توليد المصفوفة خارج الخلية (ECM) لخلايا الأرومة الليفية للرباط البشري (HLFs). ومن أجل تحقيق تراصف الألياف النانوية، تم استخدام هدف دوار (rotating target). لقد كانت خلايا الأرومة الليفية للرباط البشري (HLFs) على الألياف النانوية المتراصة ذات شكلٍ مغزلي (spindle - shaped) وموجّهة في اتجاه الألياف النانوية. وقد تم تقييم درجة إنتاج المصفوفة خارج الخلية (ECM) عن طريق مقارنة كمية الكولاجين على البنى المتراصة والموجّهة بشكلٍ عشوائي. وبشكلٍ ملحوظ، فقد تم تركيب كولاجين أكثر على الصفائح ذات الألياف النانوية المتراصة (aligned nanofiber sheets)، على الرغم من أن التكاثر لم يختلف بشكلٍ كبير. وهذا يُوحى بأن الشكل المغزلي الذي يمكن ملاحظته في الأربطة السليمة يُعتبر مفضلاً من أجل إنتاج المصفوفة خارج الخلية (ECM). ولتقييم تأثير اتجاه الانفعال على إنتاج المصفوفة خارج الخلية (ECM)، تم بذر خلايا الأرومة الليفية للرباط البشري (HLFs) على صفائح مصنوعة من الألياف النانوية المتراصة بشكلٍ متوازٍ، والمتراصة بشكلٍ عمودي على اتجاه الانفعال، والموجّهة بشكلٍ عشوائي وتكون هذه الصفائح ملتصقة بأطباق أو رقائق خلايا مرنة (flexcell plates). وبعد مرور ٤٨ ساعة على عملية الزراعة، تم تطبيق انفعال أحادي المحور (uniaxial strain) بنسبة ٥٪ ولمدة ٢٤ ساعة عند تردد قدره ١٢ دورة في الدقيقة. وقد تم قياس كمية الكولاجين المنتجة بعد يومين من إيقاف تطبيق الانفعال. لقد كانت خلايا الأرومة الليفية للرباط البشري (HLFs) أكثر حساسية للانفعال في الاتجاه الطولي. وفي الختام، تشكل حاملات الخلايا والأنسجة الليفية النانوية المتراصة المستخدمة في هذه الدراسة مادة أساسية واعدة من أجل الرباط المهندس نسيجياً لأنها في هذا توفر بنية محاكية حيويًا (biomimetic structure) مفضلة بشكلٍ أكثر، جنباً إلى جنب مع بيئة ميكانيكية مناسبة.

الجدول رقم (٢، ١٤). الخصائص الميكانيكية للأنسجة في الجهاز العضلي الهيكلي والبوليمرات الحيوية المستخدمة كحاملات للخلايا والأنسجة

المواد Materials	معامل يونغ (غيغا باسكال) Young's Modulus (GPa)	متانة الشد (ميغا باسكال) Tensile Strength (MPa)	الحمل الأقصى للشد (نيوتن) Ultimate Tensile Load (N)
الأنسجة الصلبة (Hard Tissue) [16,94]			
عظم قشري (Cortical bone)	٣٠ - ٧	١٥٠ - ٥٠	
عظم إسفنجي (Cancellous bone)	١٤ - ١	٧,٤	
عاج الأسنان (Dentin)	١٧ - ١١	٥٣ - ٢١	
ميناء الأسنان (Enamel)	١٣١ - ٨٤	١٠	
الأنسجة الرخوة (Soft Tissue) [94]			
عُضْرُوف مَفْصَلِي (Articular cartilage)	$١٠ \times ١٠,٥ - ٤,٥$ [95] ٠,١١٠	٢٧,٥	[96] ٢١٦٠ - ١٧٢٥
عُضْرُوف مُلَيَّف (Fibrocartilage)	$١٠ \times ١٥٩,١$	١٠,٤	
رِباط (Ligament)	$١٠ \times ٣٠٣,٠$	٢٩,٥	[97] ٢٩٨,٢٩٥
وتر (Tendon)	$١٠ \times ٤٠١,٥$ [97] ١,٨ - ١,٢	٤٦,٥ [98] ١٥٠ - ٥٠	[98] ٧٠٠
العضل (Muscle)		[99] ٠,٢	
البوليمرات الطبيعية (Natural Polymers)			
مصنوفة أو نسيج غشائي من الحرير المجدول / المتوازي (Twist / parallel silk matrix) [93]			٢٢١٤ / ٢٧ ± ٢٣٣٧
ألياف الكولاجين النانوية من النمط الأول (Type I collagen nanofibers) [55]	$١٠ \times (٥,٢ \pm ٥٢,٣)$	٠,٢ ± ١,٥	٠,٣٤ ± ١,١٧
ألياف الكولاجين النانوية من النمط الأول (Type I collagen nanofibers) [100]	$١٠ \times (١٨ \pm ٢٦٢)$	١,١٧ ± ٧,٤ ١,٢ ± ١١,٤٤ (مترابطة أو متشابكة عرضياً) [101]	
ألياف الكولاجين النانوية من النمط الثاني (Type II collagen nanofibers) [101]	$١٠ \times (٣٦,١ \pm ١٧٢,٥)$	٠,٣ ± ٣,٣	
ألياف الجيلاتين النانوية (Gelatin nanofibers) [102]	$١٠ \times (٢٠,٧ \pm ٤٩٩)$	٠,٩٦ ± ٥,٧٧	
البوليمرات الاصطناعية (Synthetic Polymers) [16]			
بولي (حمض إل - لكتيك) (PLLA)	٢,٧	٥٠	
بولي (حمض دي - لكتيك) (PDLA)	١,٩	٢٩	
بولي كابرولاكتون (PCL)	٠,٤	١٦	
بولي يوريثان (PU)	٠,٠٢	٣٥	
حاملة خلايا وأنسجة محبوكة من بولي (حمض إل - لكتيك) - بولي (حمض إل - لكتيك) - كو - غليكوليك (PLLA - PLGA) [66]	٠,٢٨٣		[65] ٢٩,٤

تابع الجدول رقم (٢، ١٤).

المواد Materials	معامل يونغ (غيغا باسكال) Young's Modulus (GPa)	متانة الشد (ميغا باسكال) Tensile Strength (MPa)	الحمل الأقصى للشد (نيوتن) Ultimate Tensile Load (N)
ألياف نانوية مصنوعة من بولي (حمض إل - لاكتيك - كابرولاكتون) (PLA - CL) [41]	$3 \times 10^3 (4 \pm 44)$	$1,4 \pm 6,3$	
ألياف مايكروية مصنوعة من البولي (كربونات دي تي إي) Poly(DTE carbonate) [103]	3,1	230	
ألياف مايكروية مصنوعة من البولي (حمض إل - لاكتيك) (PLLA) [103]	4,9	299	
ألياف مايكروية مصنوعة من البولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PLGA) (10 : 90) [104]			
خيوط مفرد متعدد الشعيرات (Single multifilament yarn)		$1,8 \pm 0,3$	$0,02 \pm 2,4$
حزمة من 10 خيوط (10-Yarn bundle)		$1,1 \pm 8,8$	$3 \pm 20$
جديلة مستطيلة (Rectangular braid)		$29 \pm 393$	$40 \pm 606$
جديلة دائرية (Circular braid)		$20 \pm 212$	$132 \pm 907$
ألياف نانوية مصنوعة من البولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PLGA) (10 : 90) [105]		6 - 4,9	
ألياف نانوية مصنوعة من البولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PLGA) (85 : 15) [56]		22,67	

ملاحظة: بولي (كربونات دي تي إي) Poly(DTE carbonate)، بولي (كربونات ديس أمينو تيروسيل - تيروزين إيثيل إستر) (desamino tyrosyl - tyrosine ethyl ester) .Poly(carbonate)

لقد ثبت بأن حاملات الخلايا والأنسجة المحبوكة (knitted scaffolds) تدعم ترسيب مصفوفة النسيج الكولاجيني الضام (collagenous connective tissue matrix)، والذي يُعتبر حاسماً من أجل إعادة بناء الوتر / الرباط (tendon / ligament reconstruction) [67]. إلا أن عملية بذر الخلايا في مثل حاملات الخلايا والأنسجة تلك غالباً ما تتطلب نظاماً هلامياً (gel system)، والذي يكون غير مستقر في الحالة الديناميكية، وعلى وجه الخصوص في مفصل الركبة (knee joint). وقد قام Sahoo وآخرون [108] بتطوير حامل خلايا وأنسجة بوليمرية ليفية نانوية - مايكروية (nano - microfibrinous polymer scaffold) جديدة قابلة للتحلل الحيوي وذلك عن طريق الغزل الكهربائي لألياف البولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PLGA) النانوية على حامل خلايا وأنسجة محبوكة من البولي (حمض إل - لاكتيك - كو - غليكوليك) (PLGA) لتوفير سطح كبير محاكي حيوياً من أجل التصاق الخلايا. وقد تم بذر خلايا نقي العظم السدويّة (BMSCs) للخنازير إما على حاملات الخلايا والأنسجة الجديدة وذلك عن طريق توزيع معلق الخلايا بواسطة الممصّ (pipetting a cell suspension) (المجموعة ١) وإما على حاملات الخلايا والأنسجة المحبوكة من البولي (حمض إل -

لاكتيك-كو-غليكوليك (PLGA) وذلك عن طريق التثبيت في هلام الفبرين (immobilizing in fibrin gel) (المجموعة ٢). لقد كان التصاق الخلايا مائلاً، وكان تكاثر الخلايا أسرع في المجموعة ١. علاوة على ذلك، فقد ظهر بأن الوظيفة الخلوية (cellular function) كانت أكثر فعالية في المجموعة ١، وذلك حسب ما يثبته التعبير الأعلى لجينات الكولاجين من النمط الأول والديكورين (decorin) والبيغليكان (biglycan). وبالتالي، فإن حاملة الخلايا والأنسجة الليفية النانوية - المايكروية تلك، والتي تُسهّل عملية بذر الخلايا وتعزز تكاثر ووظيفة وتميز الخلايا، يمكن تطبيقها في هندسة الأنسجة لتجديد الوتر / الرباط (tendon / ligament regeneration).

### (١٤,٧) التحديات CHALLENGES

على الرغم من أنه يتضح وبشكل متزايد من التجارب التي يتم إجراؤها في المختبر أن البنى النانوية المناسبة يمكن أن تمارس ردود فعل أو استجابات إيجابية للخلايا، فإن التطبيق العملي لمثل هذه المعرفة لا يزال بعيداً جداً عن نقله إلى رعاية المرضى. إن هناك ثلاث مشاكل مرتبطة بشكل وثيق بحاملات الخلايا والأنسجة النانوية الحالية وهي:

- ١- التحكم غير الدقيق بالبنية النسيجية النانوية لمحاكاة الأنسجة الطبيعية المحددة.
  - ٢- بعض البنى النسيجية النانوية تؤدي إلى حدوث تفاعل خلايا - ركيزة (cell - substrate interaction)؛ وعلى أي حال، فإن التحكم الدقيق لا يزال غير مفهوم بشكل جيد.
  - ٣- انتقال بنيوي هندسي (architextural transition) غير مناسب من المستوى النانوي إلى المستوى الماكروي.
- إن الإستراتيجية المثالية هي أن تتم محاكاة المصفوفة خارج الخلية (ECM) الطبيعية بشكل كيميائي ونسيجي وميكانيكي معاً في نفس الوقت.

### (١٤,٧,١) حاملات الخلايا والأنسجة النانوية ذات الأشكال المحددة للأنسجة Nanoscaffolds With Tissue-Specific Patterns

تحاول الأساليب المعاصرة لتصميم المواد اللازمة لتجديد الأنسجة محاكاة الظروف الخاصة لتطوير الأنسجة الطبيعية لتوجيه النمو لنوع واحد من الأنسجة. وبالتالي؛ فإنه من المحتمل أن تتطلب طرق تجديد الأعضاء ثلاثية الأبعاد المعقدة تقدماً متزامناً وفي نفس الوقت لمحفزات متميزة ومتعددة ضمن بنية المادة الواحدة. وقد تجاوز التقدم المحرز في حاملة الأنسجة ببساطة متطلب أن تكون حاملة الخلايا والأنسجة ذات بنية غير سامة (nontoxic structure) أو ذات بنية خاملة أو غير فعالة (inert structure) مع مسامات مترابطة فيما بينها. لقد تم وصف القدرة على التأثير على السلوك الخلوي في المستوى النانوي بإسهاب. ومع ذلك، فإنه لا تزال هناك فجوة في المعرفة فيما يتعلق بالتأثير الدقيق لآثار المستوى النانوي على الآلية الخلوية (cellular mechanism). إن تصنيع حاملة خلايا وأنسجة ذات سمات أو خصائص في المستوى النانوي لا يزال غير واضح وسابقاً لأوانه وبعيداً عما يمكن أن تفعله الطبيعة [6,109]. ولا يزال التصنيع النانوي لحاملة الخلايا والأنسجة الموجهة بشكل اصطناعي والمتحكم بها بشكل دقيق مجالاً خصباً للبحث العلمي.

**Mechanical Property الخصائص الميكانيكية (١٤,٧,٢)**

لقد تم استخدام طريقة اختبار الشد (tensile testing) القياسية لاختبار الغشاء الليفي النانوي (nanofibrous membrane). إن هناك نقصاً في الطرق المنهجية للاختبار حتى بالنسبة لبوليمر البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) الأكثر استخداماً وعلى نطاقٍ واسع. وقد أدرجنا في الجدول رقم (١٤.٢) الخصائص الميكانيكية للألياف النانوية المصنوعة من البوليمرات الطبيعية والبوليمرات التركيبية. ولا تزال متانة شد الألياف النانوية أقل بشكلٍ كبير من متانة شد الأنسجة الطبيعية. لقد حصل Zong وآخرون [105] على متانة شد بقيمة ٦ و ٤.٩ ميغا باسكال للألياف المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) (معدل اللاكتيك إلى الغليكوليك هو  $GA : LA = 10 : 90$ ) ذات القطر ٤٠٠ و ١٠٠٠ نانومتر، على التوالي، ومن دراسة Li وآخرين [57] فإن متانة الشد هي ٢٢.٦٧ ميغا باسكال للألياف النانوية المصنوعة من البولي (حمض إل-لاكتيك-كو-غليكوليك) (PLGA) (معدل اللاكتيك إلى الغليكوليك هو  $GA : LA = 85 : 15$ ) ذات القطر من حوالي ٥٠٠ إلى ٨٠٠ نانومتر. وبالنسبة للأغشية ذات الألياف النانوية المتراصة، تنبغي دراسة خاصية الشد في الاتجاهات المتعامدة.

إن تأثير الحجم على الخاصية الميكانيكية لليف نانوي مفرد مغزول كهربائياً هو موضوع دراسة في عدد من الأوراق العلمية. ففي الوقت الحالي، يوجد هناك ثلاثة طرائق لقياس خصائص الشد والحني (التقوس) (bending) لليف نانوي مفرد وهي: تقنية الكابول أو الدعامة الناتئة (cantilever technique) المثبتة من طرف واحد، ونظام ثلثة الأخدود النانوي (nanoindentation system) المبني على الفحص المجهرى باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM)، وجهاز اختبار الشد النانوي (nanotensile tester) [110-114]. وباستخدام نظام ثلثة الأخدود النانوي المبني على الفحص المجهرى باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM - based nanoindentation system)، تم إجراء اختبار حني أو تقوس ليف مفرد مصنوع من البولي (حمض إل - لاكتيك) (bending test of PLLA single fiber) وذلك عن طريق تعليق الليف على أخدود محفور (etched groove) في رقاقة من السيليكون (silicon wafer) ذات عرض ٤ مايكرومترات وعمق ٢.٥ مايكرومترًا [112]. وبلغت سرعة وصلة الذراع (crosshead) لطرف الكابول أو الدعامة الناتئة ١.٨ مايكرومترًا في الثانية وبلغ الحمل الأعظمي (maximum load) المطبق على الليف المفرد المصنوع من البولي (حمض إل - لاكتيك) (PLLA) ١٥ نانو نيوتن (nN). ومن الممكن أن تقيس هذه الطريقة الخصائص الميكانيكية للخلايا المزروعة على ليف نانوي مغزول كهربائياً وأن تقيس تأثير ألياف المصفوفة خارج الخلية (ECM) في الموضع. ويمكن أن توفر لنا هذه التقنية النانوية أداة جديد لدراسة تأثير تحفيز الإجهاد (stress stimulus effect) على نمو الخلايا والأنسجة. ولا يزال البحث العلمي على التفاعل بين الخلايا والألياف النانوية تحت الإجهاد الميكانيكي (mechanical stress) في مراحل الأولى.

**Exploring Advanced Nanofiber Technologies** (١٤,٧,٣) استكشاف تقنيات الألياف النانوية المتقدمة

تُمكن تقنية الغزل الكهربائي من إنتاج ألياف نانوية متواصلة إلا أن لديها القيود المتعلقة وبشكل أساسي بإنتاج غشاء الألياف النانوية. وقد أُجريت محاولات لعمل خيوط (yarns) من خلال الألياف النانوية ومن ثم تصنيع المنسوجات (textiles). فإذا كان من الممكن تصنيع بنية ثلاثية الأبعاد باستخدام مثل هذا النوع من الأنسجة القماشية (fabrics)، فسيكون لهذا التركيب بالتالي بنية هندسية ذات خصائص في المستوى النانوي والميكروني والماكروني.

وفي محاولة للحصول على خيط متواصل مصنوع من الألياف المتراصة، فقد تم تصنيع حزم من الألياف (fiber bundles) عن طريق جمع الألياف المغزولة كهربائياً على أسطوانة دوّارة (rotating drum). وقد تم ربط الألياف النانوية التي تم جمعها مع بعض ولفها في خيوط [115]. في الجهاز المصمم من قبل Khil وآخرين [116] من أجل جمع الخيط، تم استخدام مغطس مائي (water bath) لجمع الألياف المغزولة كهربائياً. وتم سحب الألياف التي تم جمعها خارج الماء على شكل حزمة من جانب واحد من المغطس المائي باستخدام شريط دليل توجيه الخيط (filament guide bar) وجمعها على بكرة في شكل خيط.

وفي نظام آخر، تم استبدال حلقات بالإلكترودات الموازية (parallel electrodes) للأشرطة المستقيمة. وبتدوير واحدة من الحلقات يتم لف الألياف المتراصة في شكل حزمة (bundle) [112]. إن العقبة الكبيرة لهذه العملية هي أن طول حزمة الألياف الملفوفة (twisted fiber bundle) يكون مقتصرًا على الحيز بين الحلقات.

**CONCLUSIONS** (١٤,٨) الاستنتاجات

يبدو أن الطبيعة هي المتخصصة في نهاية المطاف في تصميم وتصنيع المواد الجديدة بالأحجام والخصائص المناسبة تمامًا من المستوى النانوي إلى المستوى الميكروني. إن دراسة وفهم آليات الطبيعة في تشكيل المواد النانوية يمكن أن تقدم بدورها أفكاراً مُلهمة لإستراتيجيات التصنيع الجديدة لمواد حيوية ذات بُنى نانوية مُحسّنة من أجل هندسة الأنسجة. وعلى الرغم من التقدم الذي تم إحرازه مؤخرًا في تطوير البنى النانوية لهندسة الأنسجة العضلية الهيكلية، فلا يزال العديد من التحديات والقضايا الحرجة قائمة. وجنباً إلى جنب مع تطوير التقنيات النانوية والفهم الأفضل لتفاعل الخلايا - البنى النسيجية النانوية، سوف تكون مواد حاملات الخلايا والأنسجة في المستقبل بنية نانوية تحاكي بشكل أفضل البيئة الطبيعية للنسيج الغشائي أو المصفوفة خارج الخلية (ECM). إن الهدف النهائي هو معالجة ودمج ليس فقط بنية نسيجية نانوية في المواد الحيوية، بل أيضاً دمج الإشارات الكيميائية والميكانيكية المناسبة وذلك لتحقيق تحكم أفضل بسلوك الخلايا من أجل تجديد الأنسجة.

## شكر وتقدير ACKNOWLEDGMENTS

نُعبّر عن تقديرنا وامتناننا للدعم المادي المقدم من جامعة سنغافورة الوطنية (National University of Singapore) ومنحة Lee Kuan Yew الجامعية لما بعد الدكتوراه (LKY PDF).

## المراجع REFERENCES

- [1] Weistein, S.L. and Buckwalter, J.A. 1994. Turek's Orthopaedics Principles and Their Application, fifth edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- [2] Landis, W.J., Song, M.J., Leith, A. et al. 1993. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. *J Struct Biol* 110(1): 39–54.
- [3] Landis, W.J., Hodgens, K.J., Arena, J. et al. 1996. Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microsc Res Tech* 33(2): 192–202.
- [4] Weiner, S. and Traub, W. 1986. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett* 206(2): 262–266.
- [5] Weiner, S. and Traub, W. 1989. Crystal size and organization in bone. *Connect Tissue Res* 21(1–4): 589–595.
- [6] Stevens, M.M. and George, J.H. 2005. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* 310(5751): 1135–1138.
- [7] Fantner, G.E., Hassenkam, T., Kindt, J.H. et al. 2005. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat Mater* 4(8): 612–616.
- [8] Reinert, T., Reibetanz, U., Schwertner, M. et al. 2002. The architecture of cartilage: Elemental maps and scanning transmission ion microscopy/tomography. *Nucl Instr Methods Phys Res B* 188: 1–8.
- [9] Langer, R. and Vacanti, J.P. 1993. Tissue engineering. *Science* 260(5110): 920–926.
- [10] Lutolf, M.P. and Hubbell, J.A. 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 23(1): 47–55.
- [11] Robert, F. 2000. Tissue engineers build new bone. *Science* 289(5483): 1498–1500.
- [12] Medtech@Insight, Tissue Engineering and Cell Transplantation: Technologies, Opportunities, and Evolving Markets. Industry Report July, 2004.
- [13] Lanza, R.P., Langer, R., and Vacanti, J. 2000. Principles of Tissue Engineering, second edition. Academic Press, USA.
- [14] Griffith, L.G. and Naughton, G. 2002. Tissue engineering—current challenges and expanding opportunities. *Science* 295(5557): 1009.
- [15] Langer, R. and Tirrell, D.A. 2004. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428(6982): 487–492.
- [16] Murugan, R. and Ramakrishna, S. 2006. Nanophase biomaterials for tissue engineering. In *Tissue, Cell and Organ Engineering*, ed. Challa Kumar. 226–256. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [17] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C. et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143–147.
- [18] Seshi, B., Kumar, S., and Sellers, D. 2000. Human bone marrow stromal cell: Co-expression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 26(3): 234–246.
- [19] Caplan, A.I. and Bruder, S.P. 2001. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7(6): 259–264.

- [20] NIH Stem Cell Report entitled: Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, Kirschstein, R. and Skirboll, L.R., Department of Health and Human Services, June 2001. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4> [accessed Feb 06, 2007].
- [21] Kraiwattanapong, C., Boden, S.D., Louis-Ugbo, J. et al. 2005. Comparison of HEALOS/bone marrow to INFUSE(rhBMP-2/ACS) with a collagen-ceramic sponge bulking agent as graft substitutes for lumbar spine fusion. *Spine* 30(9): 1001–1007.
- [22] Martin, G.J. Jr., Boden, S.D., Marone, M.A. et al. 1999. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in non-human primate: Important lessons learned regarding dose, carrier and safety. *J Spinal Disord* 12(3): 179–186.
- [23] Barnes, B., Boden, S.D., Louis-Ugbo, J. et al. 2005. Lower dose of rhBMP-2 achieves spine fusion when combined with an osteoconductive bulking agent in non-human primates. *Spine* 30(10): 1127–1133.
- [24] Schimandle, J.H. and Boden, S.D. 1997. Bone substitutes for lumbar fusion: Present and future. *Oper Tech Ortho* 7(1): 60–67.
- [25] Chan, C.K., Sampath Kumar, T.S., Liao, S. et al. 2006. Biomimetic nanocomposites for bone graft applications. *Nanomedicine* 1(2): 177–188.
- [26] Leroux, J.C., Allemann, E., Da Jaeghere, F. et al. 1996. Biodegradable nanoparticles—From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *J Control Release* 39: 339–350.
- [27] Soppimath, K., Aminabhavi, T., Kulkarni, A. et al. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70: 1–20.
- [28] Saltzman, W.M. and Olbricht, W.L. 2002. Building drug delivery into tissue engineering. *Drug Discov* 1: 177–186.
- [29] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E. et al. 2005. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- [30] Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H. et al. 2000. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomater Med Res* 51: 475–483.
- [31] Soppimath, K.S., Tan, D.C.W., and Yang, Y.Y. 2005. pH-triggered thermally responsive polymer core-shell nanoparticles for drug delivery. *Ad Mater* 17(3): 318–323.
- [32] Lo, C.L., Lin, K.M., and Hsiue, G.H. 2005. Preparation and characterization of intelligent core-shell nanoparticles based on poly(D,L-lactide)-g-poly(N-isopropyl acrylamide-co-methacrylic acid). *J Control Release* 104(3): 477–488.
- [33] Feng, S.S. 2006. New-concept chemotherapy by nanoparticles of biodegradable polymers—where are we now? *Nanomedicine* 1(3): 297–309.
- [34] Zhang, Y., Huang, Z.M., Xu, X. et al. 2004. Preparation of core-shell structured PCL-r-Gelatin bi-component nanofibers by coaxial electrospinning. *Chem Mater* 16: 3406–3409.
- [35] Zhang, Y.Z., Wang, X., Feng, Y. et al. 2006. Coaxial electrospinning of fitcBSA encapsulated PCL nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules* 7(4): 1049–1057.
- [36] Wei, G., Jin, Q., Giannobile, W.V. et al. 2007. The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials* 28(12): 2087–2096.
- [37] Curtis, A. and Wilkinson, C. 1999. New depths in cell behaviour: Reactions of cells to nanotopography. *Biochem Soc Symp* 65: 15–26.
- [38] Price, R.L., Ellison, K., Haberstroh, K.M. et al. 2004. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res* 70A: 129–138.
- [39] Price, R.L., Waid, M.C., Haberstroh, K.M. et al. 2003. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials* 24(11): 1877–1887.

- [40] Fujihara, K., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. 2005. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* 26(19): 4139–4147.
- [41] Xu, C.Y., Inai, R., Kotaki, M. et al. 2004. Aligned biodegradable nanofibrous structure: A potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 25(5): 877–886.
- [42] He, W., Ma, Z., Yong, T. et al. 2005. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials* 26(36): 7606–7615.
- [43] Yang, F., Murugan, R., Wang, S. et al. 2005. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 26(15): 2603–2610.
- [44] He, W., Yong, T., Teo, W.E. et al. 2005. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: Potential vascular graft for the blood vessel tissue engineering. *Tissue Eng* 11(9–10): 1575–1589.
- [45] Venugopal, J. and Ramakrishna, S. 2005. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofiber scaffolds for vascular tissue engineering. *Nanotechnology* 16(10): 2138–2142.
- [46] Ma, Z.W., He, W., Yong, T. et al. 2005. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) PCL nanofibers to improve endothelial cell's spreading & proliferation & to control cell orientation. *Tissue Eng* 11(7–8): 1149–1158.
- [47] He, W., Yong, T., Teo, W.E. et al. 2006. Biodegradable polymer nanofiber mesh to maintain functions of endothelial cells. *Tissue Eng* 12(9): 2457–2466.
- [48] Venugopal, J., Vadgama, P., Sampath Kumar, T.S. et al. 2007. Biocomposite nanofibres and osteoblasts for bone tissue engineering. *Nanotechnology* 18: 1–8.
- [49] Beniash, E., Hartgerink, J.D., Storrer, H. et al. 2005. Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment. *Acta Biomater* 1: 387–397.
- [50] 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.
- [51] 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 U S A* 97(12): 6728–6733.
- [52] Semino, C.E., Kasahara, J., Hayashi, Y. et al. 2004. Entrapment of migrating hippocampal neural cells in three-dimensional peptide nanofiber scaffold. *Tissue Eng* 10(3–4): 643–655.
- [53] Rajangam, K., Behanna, H.A., Hui, M.J. et al. 2006. Heparin binding nanostructures to promote growth of blood vessels. *Nano Lett* 6(9): 2086–2090.
- [54] Woo, K.M., Jun, J.H., Chen, V.J. et al. 2007. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials* 28(2): 335–343.
- [55] Woo, K.M., Chen, V.J., and Ma, P.X. 2003. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res* 67A: 531–537.
- [56] Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G. et al. 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 3: 232–238.
- [57] Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J. et al. 2002. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 60: 613–621.
- [58] Dzenis, Y. 2004. Spinning continuous fibers for nanotechnology. *Science* 304(5679): 1917–1919.
- [59] Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R. et al. 2005. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng* 11(1–2): 101–109.
- [60] Wang, X., Um, I.C., Fang, D. et al. 2005. Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments. *Polymer* 46: 4853–4867.
- [61] Um, I.C., Fang, D., Hsiao, B.S. et al. 2004. Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules* 5: 1428–1436.

- [62] Li, J., He, A., Han, C.C. et al. 2006. Electrospinning of hyaluronic acid (HA) and HA/gelatin blends. *Macromol Rapid Commun* 27: 114–120.
- [63] Ji, Y., Ghosh, K., Shu, X.Z. et al. 2006. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* 27(20): 3782–3792.
- [64] Liao, S., Li, B., Ma, Z. et al. 2006. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed Mater* 1: R45–R53.
- [65] Fan, H., Hu, Y., Zhang, C. et al. 2006. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a PLGA-gelatin/chondroitin/hyaluronate hybrid scaffold. *Biomaterials* 27(26): 4573–4580.
- [66] Ge, Z., Goh, J., and Lee, E.H. 2006. The effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fascia wrap application to anterior cruciate ligament tissue engineering. *Cell Transplant* 14(10): 763–773.
- [67] Ge, Z., Goh, J.C., Wang, L. et al. 2005. Characterization of knitted polymeric scaffolds for potential use in ligament tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 16: 1179–1192.
- [68] Golding, J.P., Calderbank, E., Partridge, T.A. et al. 2007. Skeletal muscle stem cells express antiapoptotic ErbB receptors during activation from quiescence. *Exp Cell Res* 313: 341–356.
- [69] Price, F.D., Kuroda, K., and Rudnicki, M.A. 2007. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1772: 272–283.
- [70] Payne, A.M., Messi, M.L., Zheng, Z. et al. 2007. Motor neuron targeting of IGF-1 attenuates age-related external Ca<sup>2+</sup>-dependent skeletal muscle contraction in senescent mice. *Exp Gerontol*, 42(4): 309–319.
- [71] Becker, C., Lacchini, S., Muotri, A.R. et al. 2006. Skeletal muscle cells expressing VEGF induce capillary formation and reduce cardiac injury in rats. *Int J Cardiol* 113: 348–354.
- [72] Ge, Z., Yang, F., Goh, J.C.H. et al. 2006. Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 77A: 639–652.
- [73] Ito, Y., Hasuda, H., Kamitakahara, M. et al. 2005. A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. *J Biosci Bioeng* 100(1): 43–49.
- [74] Li, C.M., Jin, H.J., Botsaris, G.D. et al. 2005. Silk apatite composites from electrospun fibers. *J Mater Res* 20: 3374–3384.
- [75] Yoshimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H. et al. 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24(12): 2077–2082.
- [76] Zhang, Y.Z., Ouyang, H.W., Lim, C.T. et al. 2005. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res* 72B: 156–165.
- [77] Li, W.J., Tuli, R., Huang, X. et al. 2005. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 26(25): 5158–5166.
- [78] Boudriot, U., Goetz, B., Dersch, R. et al. 2005. Role of electrospun nanofibers in stem cell technologies and tissue engineering. *Macromol Symp* 225: 9–16.
- [79] Liao, S.S., Cui, F.Z., Zhang, W. et al. 2004. Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: Nano-HA/collagen/PLA composite. *J Biomed Mater Res* 69B: 158–165.
- [80] Li, C., Vepari, C., Jina, H.J. et al. 2006. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(16): 3115–3124.
- [81] Li, W.J., Tuli, R., Okafor, C. et al. 2005. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26(6): 599–609.
- [82] Matthews, J.A., Boland, E.D., Wnek, G.E. et al. 2003. Electrospinning of collagen type II: A feasibility study. *J Bioact Comp Poly* 18: 125–134.
- [83] Shields, K.J., Beckman, M.J., Bowlin, G.L. et al. 2004. Mechanical properties and cellular proliferation of electrospun collagen type II. *Tissue Eng* 10(9–10): 1510–1517.

- [84] Subramanian, A., Vu, D., Larsen, G.F. et al. 2005. Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 16: 861–873.
- [85] Shin, H.J., Lee, C.H., Cho, I.H. et al. 2006. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: Mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed* 17: 103–119.
- [86] Li, W.J., Danielson, K.G., Alexander, P.G. et al. 2003. Biological response of chondrocytes cultured in three dimensional nanofibrous poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res* 67A: 1105–1114.
- [87] Riboldi, S.A., Sampaolesi, M., Neuenschwander, P. et al. 2005. Electrospun degradable polyesterurethane membranes: Potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials* 26(22): 4606–4615.
- [88] Neumann, T., Hauschka, S.D., and Sanders, J.E. 2003. Tissue engineering of skeletal muscle using polymer fiber arrays. *Tissue Eng* 9(5): 995–1003.
- [89] Cronin, E.M., Thurmond, F.A., Bassel-Duby, R. et al. 2004. Protein-coated poly(L-lactic acid) fibers provide a substrate for differentiation of human skeletal muscle cells. *J Biomed Mater Res* 69A(3): 373–381.
- [90] Mo, X.M., Xu, C.Y., Kotaki, M. et al. 2004. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 25(10): 1883–1890.
- [91] Vunjak-Novakovic, G., Altman, G., Horan, R. et al. 2004. Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 131–156.
- [92] Chvapil, M., Speer, D.P., Holubec, H. et al. 1993. Collagen fibers as a temporary scaffold for replacement of ACL in goats. *J Biomed Mater Res* 27: 313–325.
- [93] Altman, G.H., Horan, R.L., Lu, H.H. et al. 2002. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 23(20): 4131–4141.
- [94] Black, J. and Hastings, G.W. 1998. *Handbook of Biomaterials Properties*. Chapman and Hall, London.
- [95] Noyes, F.R. and Grood, E.S. 1976. The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys. *J Bone Joint Surg Am* 58: 1074–1082.
- [96] Dunn, M.G. 1998. Anterior cruciate ligament prostheses. In *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*, ed. Fahey, T. Internet Society of Sport Science: <http://sportsoci.org>, 10 March 1998.
- [97] LaPrade, R.F., Bollom, T.S., Wentorf, F.A., Wills, N.J., and Meister, K. 2005. Mechanical properties of the posterolateral structures of the knee. *The American Journal of Sports Medicine* 33: 1386–1391.
- [98] Mow, V.C. and Hayes, W.C., Eds. 1991. *Basic Orthopaedic Biomechanics*, Raven Press, New York.
- [99] Dee, R., Hurst, L.C., Gruber, M.A. et al. 1997. *Principles of Orthopaedic Practice*. The McGraw-Hill Co., Inc. New York.
- [100] Li, M., Mondrinos, M.J., Gandhi, M.R. et al. 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 26(30): 5999–6008.
- [101] Rho, K.S., Jeong, L., Lee, G. et al. 2006. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials* 27(8): 1452–1461.
- [102] Li, M., Guo, Y., Wei, Y. et al. 2006. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 27(13): 2705–2715.
- [103] Bourke, S.L., Kohn, J., and Dunn, M.G. 2004. Preliminary development of a novel resorbable synthetic polymer fiber scaffold for anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng* 10(1–2): 43–52.
- [104] Cooper, J.A., Lu, H.H., Ko, F.K. et al. 2005. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: Design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials* 26(13): 1523–1532.
- [105] Zong, X., Ran, S., Fang, D. et al. 2003. Control of structure, morphology and property in electrospun poly(glycolide-co-lactide) non-woven membranes via post draw treatments. *Polymer* 44: 4959–4967.

- [106] Bashur, C.A., Dahlgren, L.A., and Goldstein, A.S. 2006. Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes. *Biomaterials* 27(33): 5681–5688.
- [107] Lee, C.H., Shin, H.J., Cho, I.H. et al. 2005. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials* 26(11): 1261–1270.
- [108] Sahoo, S., Ouyang, H., Goh, C.H.J. et al. 2006. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Eng* 12(1): 91–99.
- [109] Moroni, L. and Van Bitterswijk, C.A. 2006. Biomaterials converge and regenerate. *Nat Mater* 5(6): 437–438.
- [110] Dalton, P.D., Klee, D., and Moller, M. 2005. Electrospinning with dual collection rings. *Polym Commun* 46: 611–614.
- [111] Buer, A., Ugbohue, S.C., and Warner, S.B. 2001. Electrospinning and properties of some nanofibers. *Tex Res* 71(4): 323–328.
- [112] Tan, E.P.S. and Lim, C.T. 2004. Physical properties of a single polymeric nanofiber. *Appl Phys Lett* 84(9): 1603–1605.
- [113] Tan, E.P.S., Ng, S.Y., and Lim, C.T. 2005. Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber. *Biomaterials* 26(12): 1453–1456.
- [114] Inai, R., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. 2005. Structure and property of electrospun PLLA single nanofibers. *Nanotechnology* 16: 208–213.
- [115] Fennessey, S.F. and Farris, R.J. 2004. Fabrication of aligned and molecularly oriented electrospun polyacrylonitrile nanofibers and the mechanical behavior of their twisted yarns. *Polymer* 45: 4217–4225.
- [116] Khil, M.S., Bhattarai, S.R., Kim, H.Y. et al. 2005. Novel fabricated matrix via electrospinning for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 72B: 117–124.