(19)

جمهورية العراق

وزارة التخطيط

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية

براءة اختراع

(12)

(11) رقم البراءة : 4721

(51) التصنيف الدولي A61L27/36 A61L2430/34

(21) رقم الطلب : 2016/132

(22) تاريخ تقديم الطلب: 2016/3/28

(30) تاريخ طلب الأسبقية - بلد الأسبقية - رقم طلب الأسبقية

(52) التصنيف العراقي 36

(45) تاريخ منح البراءة: 2016/10/27

(72) اسم المخترع وعنوانه :

1- أ.م.د. اكرم رحيم جبر / الجامعة التكنولوجية - قسم هندسة المواد
2- أ.م.د. عماد سعدي عبد الكريم / الجامعة التكنولوجية - قسم هندسة المواد
3- أ.م.د. احمد مجيد الشمري / الجامعة المستنصرية - المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية
4- م.د. منار عبد الجبار نجم / الجامعة التكنولوجية - قسم هندسة المواد

(73) اسم صاحب البراءة : الذوات اعلاه

(74) اسم الوكيل:

(54) تسمية الأختراع: تحضير وتوصيف نسيج اصطناعي من خلائط بوليمرية باستخدام تقنية البرم الكهربائي.

منحت هذه البراءة استناداً لأحكام المادة (21) من القانون براءة الأختراع والنماذج الصناعية رقم (65) لسنة 1970 المعدل وعلى مسؤولية المخترع.

سعد [illegible] الوهاب عبد القادر
توقيع المسجل
رئيس الجهاز

C.O.S.Q.C IRAQ

تحضير و توصيف نسيج صناعي من خلائط بوليمرية بإستخدام تقنية البرم الكهربائي

الأسماء :-

أ.م.د أكرم رحيم جبر[1]

أ.م.د. عماد سعدي عبد الكريم[1]

أ..م.د. أحمد مجيد الشمري[2]

م.د. منار عبد الجبار نجم [1]

العناوين:-

1 الجامعة التكنولوجية/ قسم هندسة المواد

2 الجامعة المستنصرية/ المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية

تحضير و توصيف نسيج صناعي من خلائط بوليمرية بإستخدام تقنية البرم الكهربائي

Abstract

This study focuses on the preparation of a synthetic tissue from a biodegradable polymer that can be used for soft tissue applications using electrospinning technique. Biodegradable thermoplastic polymer which is polycaprolactone (PCL) used for making electrospun scaffolds in three concentrations (10, 15 and 20%) Weight/Volume PCL. The results revealed the increasing in fiber diameter with increasing PCL concentration in the prepared solutions for electrospinning. Then the growth of horse adipose derived mesenchymal stem cells was evaluated in vitro over these prepared scaffolds for 21 days with and without soaking in fetal bovine serum to study cells' growth rate and proliferation over the scaffold surface. The Scanning electron microscope (SEM) analysis showed high growth rates for stem cells on these prepared scaffolds especially 15% w/v PCL which supported stem cells growth even when it was not soaked in serum. The histological analysis revealed that the suitable structure for cells spread and penetration resulted in 15 and 20% PCL scaffolds. In conclusions, these prepared scaffolds could be a candidate for use in soft tissues repair and thus for regenerative .medicine application, because they highly supported stem cells growth

تحضير و توصيف نسيج صناعي من خلائط بوليمرية بإستخدام تقنية البرم الكهربائي

الموجز:-

يركز هذا العمل على تحضير أنسجة من مواد بوليمرية قابلة للتحلل في الجسم بتقنية البرم الكهربائي (Electrospinning) مع دراسة بعض الخواص الميكانيكية والفيزيائية والبايولوجية لإختبار إمكانية إستخدامها كبديل للأنسجة المرنة التالفة نتيجة الإصابة بالأمراض السرطانية أو التالفة نتيجة الإصابة بالحوادث. إذ تم إستخدام تقنية البرم الكهربائي لتحضير أنسجة بديلة من مادتي البولي كابرولاكتون (PCL) و البولي يوريثان (PU) بشكل خلائط بوليمرية(Polymer blends) وبثلاث نسب (PCL:PU) وهي (2:1)، (1:1)، و (1:2)، حيث أن مادة البولي كابرولاكتون تمتاز بتركيبها الجزيئي البسيط مما يزيد من تبلورها و بالتالي يحسن من الخواص الميكانيكية، لكن من ناحية أخرى قد تؤدي زيادة التبلور إلى الهشاشية لذلك تم إدخال مادة البولي يوريثان والتي تمتاز بالمطيلية العالية لجمع أفضل الخواص الميكانيكية. بالإضافة إلى الخواص الميكانيكية تعتبر مادتي البولي كابرولاكتون والبولي يوريثان من المواد البوليمرية القابلة للتحلل داخل الجسم، كما أن نواتج تحللها غير سامة حسب تقارير منظمة الغذاء والدواء العالمية "Food and Drug Administration" (FDA) [1] .

أظهرت نتائج المجهر الألكتروني الماسح، تقارب أقطار الألياف الناتجة للتراكيز الثلاثة المستخدمة للخلائط البوليمرية من مادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان، بينما أعطت زيادة نسبة البولي يوريثان في الخلائط إنخفاضاً في التجانس و تكون عيوب في النسيج المصنع، كما خفضت من حجم المسامات الناتجة مما يؤثر على إنتشار وتغلغل الخلايا المزروعة داخل النسيج المصنع. في حين أظهرت نتائج قياس قابلية التبلل "wettability" للعينات المصنعة، أن إدخال مادة البولي يوريثان مع مادة البولي كابرولاكتون أدى إلى تحسين قابلية التبلل لمادة البولي كابرولاكتون ذات الخواص الكارهة للماء "hydrophobic"، مما يحسن من إلتصاق وإنتشار الخلايا بشكل منتظم على سطح الأنسجة المصنعة. نتائج فحص معامل المرونة والمطيلية أظهرت أن زيادة نسبة البولي يوريثان إلى نسبة البولي كابورلاكتون أدت إلى تحسن مطيلية العينة مع بقائها ضمن منطقة التشوه المرن "Elastic deformation"، أي أنها تحافظ على شكلها بعد زوال القوى المؤثرة مما يقلل من تأثر النسيج المصنع بالإجهادات الشدية والإنضغاطية التي يولدها نمو الخلايا أثناء تكوين نسيج خلوي جديد يأخذ شكل هيكل النسيج المصنع و يحل محل النسيج الطبيعي المريض أو التالف.

تم زرع خلايا جنينية من نوع "Rat Embryonic Fibroblast" (REF) على الأنسجة المصنعة لبيان ملائمة التركيب الهندسي لهذه الأنسجة لنمو الخلايا مما يعطي هيكل مشابه للأنسجة الطبيعية التالفة المراد إستبدالها. حيث أظهرت نتائج الزرع الخارجي "*in vitro*" والذي إستمر لفترة 21 يوم، أن الخلايا تفضل التركيب الليفي المنتظم الخالي من العيوب من أجل تحقيق إلتصاق و إنتشار أفضل على سطح النسيج البديل. كما أظهرت نتائج الزرع أن الخلايا الجنينية تفضل حجم الفجوات أكبر من 5000 نانومتر من أجل أن تتغلغل داخل النسيج لتحقيق نمو ثلاثي الأبعاد والذي يعتبر ضرورياً لتكوين النسيج البديل للنسيج الطبيعي، وقد تحقق تغلغل الخلايا في عينة الخلائط البوليمرية (PCL:PU) بنسبة (2:1).

تحضير و توصيف نسيج صناعي من خلائط بوليمرية بإستخدام تقنية البرم الكهربائي

المقدمة:-

يعتبر علم هندسة الأنسجة (Tissue Engineering) من العلوم المتقدمة التي تستخدم التطور الحاصل في كل من علم الزراعة النسيجية (Tissue Culture) وعلم هندسة المواد (Materials Engineering) لغرض تصنيع أنسجة صناعية بديلة للأنسجة التالفة أو المريضة في جسم الإنسان من مواد طبيعية أو صناعية قابلة للتحلل داخل الجسم [2]. يكمن نجاح هذا العلم في اختيار التقنية المناسبة لتصنيع الأنسجة البديلة والتي توفر التركيب الهندسي المناسب لنمو الخلايا من حيث المسامية وحجم المسامات لتكوين نسيج مشابه للنسيج الخلوي الطبيعي في جسم الإنسان [3]. يسمى هذا النسيج المصنع والذي تنمى عليه الخلايا بالمادة الأساس الهيكل "scaffold" والذي يجب أن يكون بخواص ميكانيكية وفيزيائية و بايولوجية مناسبة لنمو و إنتشار الخلايا مما يدعم إعادة بناء الأنسجة التالفة أو المريضة [4].

تعد تقنية البرم الكهربائي "Electrospinning" من التقنيات الحديثة المستخدمة في تصنيع الأنسجة والتي تنتج هيكل نسيجي ثلاثي الأبعاد مناسب لنمو الخلايا لكونه يوفر التركيب المسامي المطلوب لتغلغل الخلايا، كما أنها تناسب العديد من المواد البوليمرية الطبيعية و الصناعية مما يوفر سماحية في إختيار المواد المستخدمة لتصنيع الأنسجة وحسب المواصفات المطلوبة [5]. يتم في عملية البرم الكهربائي إستخدام محاليل من المواد البوليمرية المستخدمة مع مذيباتها المناسبة والتي يتم ضخها بمعدل معين من خلال أبرة معدنية مرتبطة بمصدر للفولتية يتراوح بين 5-30 كيلو فولت، وهذا يعتبر القطب الأول في المجال الكهربائي العالي الشدة الذي يتولد عند تشغيل الفولتية. أما القطب الثاني فيتمثل بالمجمع المعدني المؤرض [6]. عندما يتم توليد المجال الكهربائي بتشغيل مصدر الفولتية، سيتم عندها توليد قوة كهربائية ساكنة والتي تتغلب على الشد السطحي للمحلول البوليمري مما يغير شكل القطرة الخارجة من حافة الأبرة من الشكل الكروي إلى شكل مخروطي يعرف بمخروط تايلور "Taylor cone". زيادة مقدار الفولتية المسلطة سيؤدي إلى زيادة عدم استقرارية مخروط تايلور وبالتالي سينقسم هذا المخروط إلى نفاث دوار من الألياف البوليمرية بعد أن يتبخر المذيب والتي تغزل و تترسب على سطح المجمع مكونة نسيج من الألياف البوليمرية للمواد المستخدمة [7].

الجزء العملي:-

المواد والقياسات:-

تم في الجزء العملي إستخدام مادتي البولي كابرولاكتون والبولي يوريثان والمجهزتان من شركة " Sigma Aldrich" لتحضير الخلائط البوليمرية وذلك بإذابتهما مع حامض الخليك الثلجي بتركيز 15% وزن بوليمر/ حجم مذيب بإستخدام الخلاط المغناطيسي "Magnetic stirrer". الشكل رقم (1) يوضح منظومة البرم الكهربائي التي تم إستخدامها لتصنيع الأنسجة، بينما يبين الجدول رقم (1) متغيرات عملية البرم الكهربائي المستخدمة.

بعد تصنيع الأنسجة تم أولاً قياس قطر بعض الألياف و حجم بعض المسامات الناتجة في هذه الأنسجة بإستخدام برنامج مرفق مع جهاز المجهر الألكتروني الماسح (SEM) نوع (Phenom G2 Pro desktop) في المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية، مع فولتية معجلة مقدارها 10 KV، بالإضافة إلى تطبيق برنامج الأوتوكاد (AutoCAD 2010) على صور المجهر الألكتروني الماسح لأخذ أكبر عدد من القراءات لأقطار الألياف و حجوم المسامات لغرض حساب المعدل و بيان ملائمة التركيب الهندسي لهذه الأنسجة من حيث المساحة السطحية لإلتصاق الخلايا وحجم المسامات المناسب لتغلغلها داخل النسيج لتحقيق النمو الثلاثي الأبعاد للخلايا.

تم أيضاً قياس قابلية التبلل للأنسجة المصنعة لمعرفة الوقت المناسب لها لكي تصبح قابلة للتبلل، لأهمية هذه الصفة لإلتصاق الخلايا ولمعرفة مدى تحسن قابلية التبلل للعينات عند زيادة نسبة البولي يوريثان إلى نسبة البولي كابرولاكتون في الخلائط البوليمرية. وقد تم إجراء هذا الفحص بإستخدام جهاز قياس زاوية التماس و الشد السطحي موديل (Kino- SL 200KS) في جامعة بابل/ كلية هندسة المواد، حسب المواصفة الهندسية الأمريكية ASTM standard D5946-04. يتلخص هذا الفحص بوضع قطرة من الماء المقطر بحجم 8 مايكرولتر وقياس زاوية التماس مع السطح كل 15 دقيقة لحين الوصول الى زاوية تماس مقدارها صفر بحيث يصبح السطح قابل للتبلل وبالتالي معرفة الوقت اللازم لتنقيع العينات بالوسط الزرعي قبل إضافة الخلايا لتحقيق أفضل إلتصاق للخلايا على السطح. كما تم أيضاً إجراء فحص الشد على الأنسجة المصنعة لبيان مدى تحسن الخواص الميكانيكية عند زيادة نسبة البولي يوريثان إلى نسبة البولي كابرولاكتون وقد أجري هذا الفحص في وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة بحوث المواد، حسب المواصفة الهندسية الأمريكية ASTM standard D-882-02. الشكل رقم (2) يوضح أبعاد وشكل عينات الشد المستخدمة حسب المواصفة المذكورة.

تم أخيراً إجراء زرع للخلايا الجنينية نوع "Rat Embryo Fibroblast " (REF) على أنسجة الخلائط البوليمرية المصنعة، حيث تم إستخدام عينتين من كل نسبة خلائط مستخدمة. تم تنقيع العينة الأولى من كل نسبة خلائط مستخدمة في سيروم بقري "fetal bovine serum" بنسبة 100% قبل إضافة الخلايا ووسط الزرع الخلوي لغرض بيان مدى تأثير إضافة السيروم على تحسين إلتصاق الخلايا على سطح النسيج المصنع، في حين تم ترك العينة الأخرى من كل نسبة خلائط مستخدمة بدون تنقيع في السيروم. تم إستخدام وسط زرعي نوع (Roswell Park Memorial Institute Media (RPMI)) مضافاً إليه مضاد حيوي يتكون من:

- 0.3 ml fungin.
- 0.6 ml plasmocin.
- 0.6 ml normocin.
- 10% fetal bovine serum.

تم تنقيع جميع العينات في الوسط الزرعي لمدة ساعتين قبل إضافة الخلايا، لغرض الوصول إلى أفضل قابلية تبلل للعينات لتحسين إلتصاق الخلايا بالنسيج عند إضافتها وذلك بالإستناد على قياسات زوايا التماس التي تم

الحصول عليها من فحص قابلية التبلل للأنسجة المصنعة. إستمرت فترة الزرع الخلوي الخارجي "*in vitro*" لمدة 21 يوم تم خلالها وضع العينات المرتبة بعد تعقيمها بإستخدام الأشعة الفوق البنفسجية في وعاء الزرع الخلوي ذو الاربعة والعشرين حفرة "well cell culture plate –24" في حاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وبتركيز 5% من غاز ثنائي أوكسيد الكاربون، كما تم تبديل الوسط الزرعي كل 2–3 أيام تقريباً. يوضح الشكل رقم (3) شكل و أبعاد العينات المستخدمة في الزرع، أما الشكل رقم (4) فيوضح وعاء الزرع الخلوي المستخدم لحفظ الأنسجة مع الخلايا المزروعة أثناء فترة الزرع داخل الحاضنة.

النتائج والمناقشة:-

1. نتائج قياس أقطار الألياف وحجم المسامات للأنسجة المصنعة:

تظهر صور المجهر الألكتروني الماسح الموضحة في الشكل رقم (5) بتكبير 10000X التركيب المجهري للأنسجة المصنعة، حيث تم الحصول على قطر متقارب للألياف في الأنسجة المصنعة من جميع نسب الخلائط البوليمرية المستخدمة، ويعود سبب ذلك لكون جميع الأنسجة المصنعة تم تحضيرها بإستخدام نفس التركيز للبوليمر (بولي كابرولاكتون و بولي يوريثان) وهو 15% بوليمر لكن مع تغيير نسبة البولي كابرولاكتون الى البولي يوريثان في كل نسبة خلائط، ولكون البوليمرين المستخدمين يمتلكان كثافة متقاربة وهي 1.145 غم/مللتر للبولي كابرولاكتون و 1.140 غم/مللتر للبولي يوريثان عند درجة حرارة 25° م. أظهرت النتائج التحليلية من صور المجهر الألكتروني أن عينة الخلائط البوليمرية (PCL:PU) بنسبة (2:1) تمتلك معدل قطر للألياف بمقدار 479 نانومتر وكما موضح في الشكل (6.أ)، أما معدل قطر الألياف في عينة الخلائط البوليمرية بنسبة (1:1) كان بمقدار 455 نانومتر كما موضح في الشكل (6.ب) و بمقدار 444 نانومتر في عينة الخلائط البوليمرية بنسبة (1:2) وكما موضح في الشكل (6.ج). كما أظهرت النتائج التحليلية من صور المجهر الألكتروني، إمتلاك عينة الخلائط البوليمرية (PCL:PU) بنسبة (2:1) أكبر معدل لحجم الفجوات بمقدار 6400 نانومتر وكما موضح في الشكل (7.أ)، في حين بلغ معدل حجم الفجوات في عينة الخلائط البوليمرية بنسبة (1:1) 4500 نانومتر كما موضح في الشكل (7.ب). أصغر معدل لحجم الفجوات ظهر في عينة الخلائط البوليمرية بنسبة (1:2) حيث بلغ 4100 نانومتر وكما موضح في الشكل (7.ج).

يمكن الإستنتاج من النتائج التحليلية لحساب معدل قطر الألياف ومعدل حجم الفجوات بالإستناد على صور المجهر الألكتروني الماسح، أن التركيز الموحد لجميع نسب الخلائط البوليمرية المستخدمة وهو 15%، قد أدى إلى الحصول على معدل متقارب لقطر الألياف مما يعطي مساحة سطحية متقاربة لجميع الأنسجة المصنعة. أما عن حجم الفجوات فقد تأثر بظهور بعض العيوب وهي بشكل إنتفاخات مغزلية تتكون نتيجة لعدم التجانس بزيادة نسبة البولي يوريثان إلى نسبة البولي كابرولاكتون في الخلائط البوليمرية، حيث إن زيادة نسبة هذه العيوب سوف يقلل من حجم المسامات الناتجة لذلك إنخفض معدل حجم المسامات مع زيادة نسبة البولي يوريثان إلى البولي كابرولاكتون في الخلائط البوليمرية.

2. نتائج قياس قابلية التبلل للأنسجة المصنعة:

أظهرت نتائج قياس قابلية التبلل للأنسجة المصنعة من الخلائط البوليمرية لمادتي البولي كابرولاكتون والبولي يوريثان، تغير طبيعة البولي كابرولاكتون الكارهة للماء "hydrophobic" مع زيادة نسبة البولي يوريثان في الخلائط لكون البولي يوريثان يتميز بخصائص محبة للماء "hydrophilic" [8]. تحسين قابلية التبلل "wettability" للأنسجة سوف يؤدي إلى تحسين إلتصاق الخلايا على السطح مما يدعم نمو الخلايا بشكل طبقة كاملة على السطح وتغلغلها إلى داخل النسيج أيضاً لتحقيق النمو ثلاثي الأبعاد "3-D growth". يظهر الجدول رقم (2) نتائج قياسات زوايا التماس لقطرة الماء المقطر مع سطح الأنسجة المصنعة، في حين يظهر الشكل (8) إنخفاض زاوية التماس مع الزمن ومع إزدياد نسبة البولي يوريثان إلى نسبة البولي كابرولاكتون في الخلائط البوليمرية.

3. نتائج فحص الشد للأنسجة المصنعة:

أظهرت نتائج فحص الشد للأنسجة المصنعة من الخليط البوليمري (PCL:PU) بنسب (2:1)، (1:1)، و (1:2) خواصاً ميكانيكية مختلفة على الرغم من إمتلاكها معدل متقارب لقطر الألياف، ويعود سبب ذلك لإختلاف نسب البولي كابرولاكتون إلى البولي يوريثان في الأنسجة المحضرة حيث أن كلاً منهما يمتلك خواص ميكانيكية مختلفة. يمتاز البولي كابرولاكتون بكونه مادة بوليمرية ثرموبلاست، يمتلك نسبة تبلور عالية لبساطة سلاسله البوليمرية وكما موضح في الشكل رقم (9) [9]، في حين يمتاز البولي يوريثان بكونه مادة بوليمرية ايلاستومر وذو مطيلية عالية وسلاسل بوليمرية أكثر تعقيداً وكما موضح في الشكل رقم (10) [10]. أدت زيادة نسبة البولي يوريثان إلى نسبة البولي كابرولاكتون إلى زيادة نسبة المطيلية للعينات، حيث إمتلكت عينة الخلائط البوليمرية بنسبة (1:2) أعلى نسبة مطيلية إذ بلغت 118.3%، و تؤدي زيادة نسبة المطيلية إلى عدم تأثر الأنسجة المصنعة بالإجهادات الشدية والضغطية التي تتولد أثناء نمو الخلايا مما يحافظ على طبقة مستمرة لنمو الخلايا على سطح النسيج وبدون تكسر. يوضح الجدول رقم (3) نتائج الخواص الميكانيكية للأنسجة المصنعة من الخلائط البوليمرية لمادتي (PCL:PU)، في حين يوضح الشكل رقم (11) منحنيات الإجهاد- الإنفعال لنفس الأنسجة.

4. نتائج الزرع الخلوي الخارجي "*In vitro*" للأنسجة المصنعة:

أظهرت نتائج الزرع الخلوي بالخلايا الجنينية نوع "Rat Embryonic Fibroblast (REF)" على الأنسجة المصنعة من الخلائط البوليمرية لمادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان ولمدة 21 يوم، ملائمة هذا الخليط البوليمري لإلتصاق الخلايا حيث وفرت أقطار الألياف البوليمرية في هذه الأنسجة المصنعة المساحة السطحية الملائمة لإلتصاق الخلايا، في حين أعطت الأنسجة المصنعة تبايناً من حيث إنتشار الخلايا على السطح لتكوين طبقة واحدة من الخلايا و أيضاً تبايناً من حيث تغلغل الخلايا داخل النسيج، ويعود سبب ذلك إلى إختلاف حجم الفجوات في هذه الأنسجة المصنعة من نسب مختلفة لمادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان و أيضاً إلى تزايد نسبة العيوب التي ظهرت بشكل إنتفاخات مغزلية مع زيادة نسبة البولي يوريثان إلى نسبة البولي كابرولاكتون. تظهر صور المجهر الألكتروني الماسح لنسيج الخليط البوليمري (PCL:PU) بنسبة (2:1) بعد فترة الزرع الخلوي الخارجي، تكون طبقة كاملة من الخلايا الجنينية المزروعة على طول سطح النسيج المصنع في حالة التنقيع في السيروم لمدة 24 ساعة أو

بدونه وكما هو موضح في الشكل رقم (12). كما أظهرت هذه العينة أيضاً في حالة التنقيع في السيروم تغلغل الخلايا إلى داخل النسيج مما يدعم النمو ثلاثي الأبعاد للخلايا وبالتالي تكوين نسيج بديل من الخلايا يأخذ الشكل الهيكلي للنسيج المصنع ويحل محل الأنسجة الطبيعية التالفة أو المصابة داخل جسم الإنسان، و يوضح الشكل رقم (13) تغلغل الخلايا داخل هذا النسيج. أما الأنسجة المصنعة من الخلائط البوليمرية بنسبة (1:1) و (1:2) فقد أظهرت إزدياد في نسبة العيوب و التي ظهرت بشكل إنتفاخات مغزلية أدت إلى إنخفاض حجم الفجوات دون 5000 نانومتر مما يصعب من تغلغل الخلايا ويعرقل النمو الثلاثي الأبعاد، كما تؤدي هذه العيوب إلى إلتصاق ضعيف للخلايا على السطح مما يقلل من إنتشارها و توزيعها بشكل منتظم و بالتالي يقلل من معدل نمو الخلايا وكما هو موضح في الشكلين رقم (14) و (15) على التوالي.

التطبيقات ومميزات فكرة الإبداع:

تدخل تطبيقات الأنسجة المصنعة من مواد بوليمرية قابلة للتحلل داخل الجسم، كبدائل للأنسجة الطبيعية التي تتعرض للتلف نتيجة حوادث معينة أو نتيجة الإصابة بالأمراض السرطانية. حيث تنمى خلايا معينة حسب نوع النسيج الطبيعي المستبدل على الأنسجة المصنعة، لذلك يجب أن تكون هذه الأنسجة المصنعة بحجم مسامات ومسامية مفتوحة مناسبة لتغلغل الخلايا داخل النسيج. تمتاز الأنسجة المصنعة من مادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان بكونها أنسجة مصنعة من مواد قابلة للإنحلال داخل الجسم كما إن نواتج تحللها تعتبر غير سامة أيضاً، بالإضافة إلى الخواص الأخرى لهذه المواد المستخدمة من حيث تحسين قابلية التبلل بإدخال البولي يوريثان إضافةً للخواص الميكانيكية المناسبة لنمو الخلايا بحيث يمتلك النسيج المصنع المطيلية اللازمة لعدم تأثر تركيب النسيج بالإجهادات الشدية و الضغطية الناتجة أثناء نمو الخلايا على النسيج خلال فترة الزرع وبناء طبقة الخلايا. كما أن من مميزات المواد المستخدمة كونها مواد صناعية فقط ذات خواص ميكانيكية عالية وكلفة أقل من المواد الطبيعية مثل الكولاجين الذي قد أستخدم كثيراً في السابق لصناعة الأنسجة البديلة، كون المواد الطبيعية تحسن من قابلية الإلتصاق للخلايا، لكن مع ذلك أعطت المواد المستخدمة معدلات إلتصاق عالية للخلايا. أما التقنية المستخدمة هنا في تصنيع الأنسجة وهي تقنية البرم الكهربائي "Electrospinning" فتمتاز بكونها تقنية مناسبة لإنتاج ألياف بأقطار نانوية ومايكروية بشكل نسيج مشابه للنسيج الطبيعي داخل جسم الإنسان، و ذات مسامية مفتوحة مناسبة لتغلغل الخلايا داخل النسيج من أجل تحقيق نمو ثلاثي الأبعاد للخلايا لتكوين نسيج مشابه و بديل للنسيج الطبيعي.

الإدعاءات:

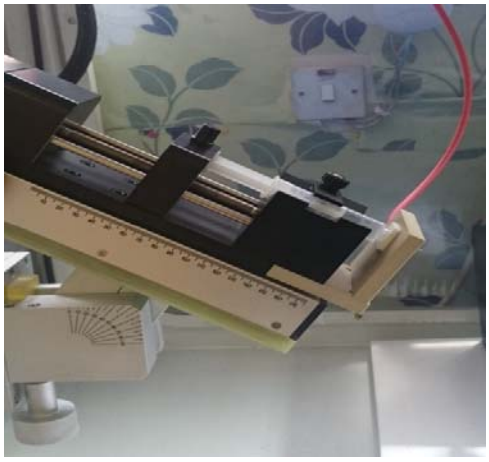
تم إجراء براءة الإختراع هذه لغرض تصنيع أنسجة بديلة من مواد بوليمرية قابلة للتحلل داخل الجسم، تزرع عليها خلايا تؤخذ من جسم المريض نفسه وتنمى على هذه الأنسجة المصنعة لحين تحللها وتأخذ الخلايا النامية الشكل الهيكلي للنسيج المصنع. و بالتالي تكون نسيج من نفس خلايا المريض وليس من مادة خارجية غريبة أو من شخص آخر متبرع فيكون تقبل المريض لهذا النسيج أفضل. كما أن هذه الطريقة تعتبر أيضاً أفضل من أخذ نسيج من عضو آخر سليم من جسم المريض نفسه، حيث أن ذلك سيتطلب إجراء أكثر من جراحة لغرض الإستئصال ثم الزرع و بالتالي قد يؤدي ذلك إلى مضاعفات أكثر.

الأشكال:

شاشة لمس تستخدم للتحكم بمتغيرات عملية البرم الكهربائي مثل معدل التغذية للمحلول البوليمري، و سرعة دوران المجمع المعدني.

مجهز القدرة ذو الفولتية العالية 1- 30 كيلو فولت

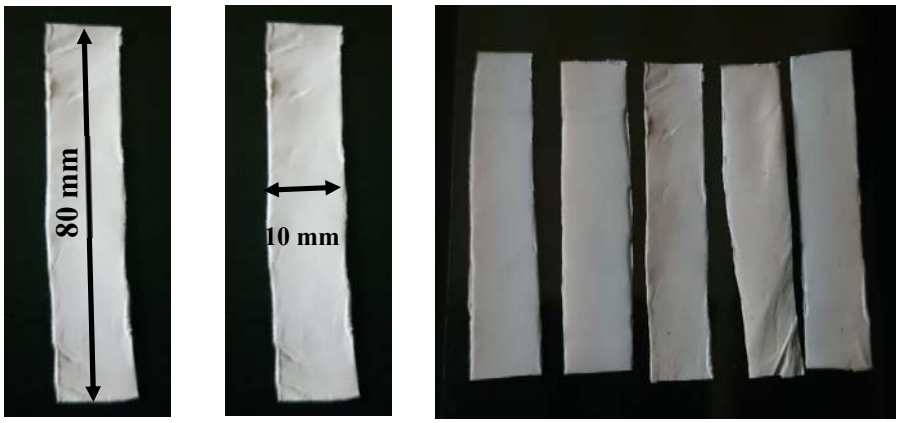
أ



ب

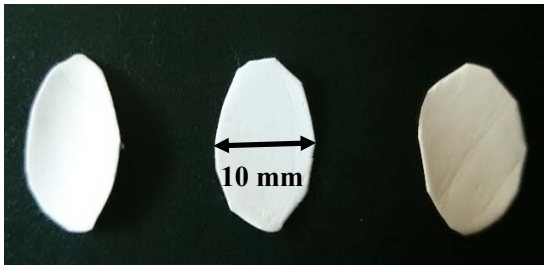
ج

شكل رقم (1): أ. منظومة البرم الكهربائي المستخدمة لتصنيع الأنسجة(ESB-200)، ب. المضخة المرفقة داخل الجهاز والتي تستخدم لضخ المحاليل البوليمرية المحضرة، ج. المجمع المعدني المستخدم لتجميع الألياف البوليمرية بشكل أنسجة.

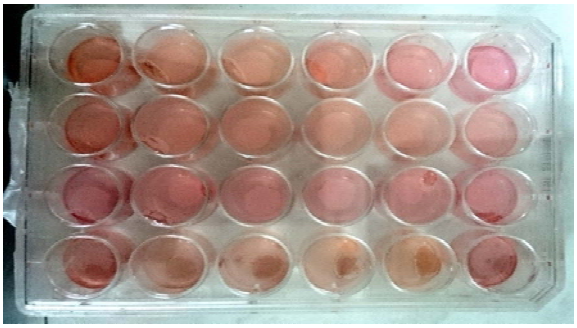


ج ب أ

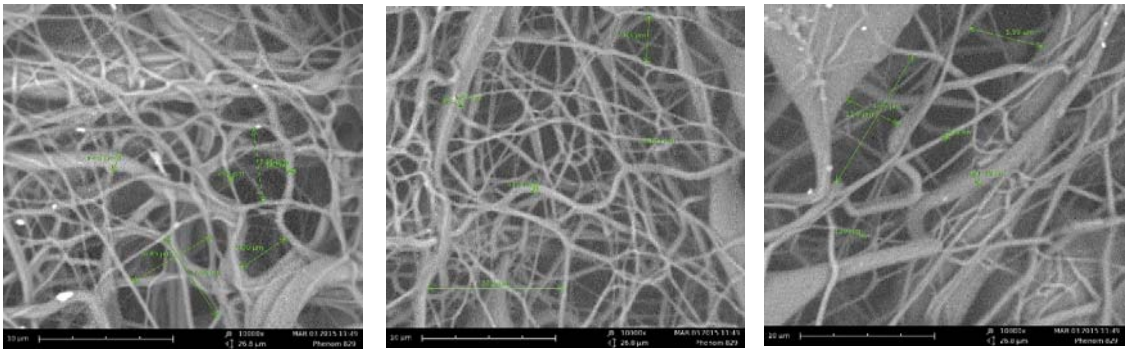
شكل رقم (2): عينات فحص الشد. أ. عدد عينات الشد المستخدمة أثناء فحص الشد لكل نسبة خلائط مستخدمة حسب المواصفة الأمريكية ASTM D-822-02 ، ب. عرض العينة 10 ملم، ج. طول العينة 80 ملم.



شكل رقم (3): عينات الزرع الخلوي.

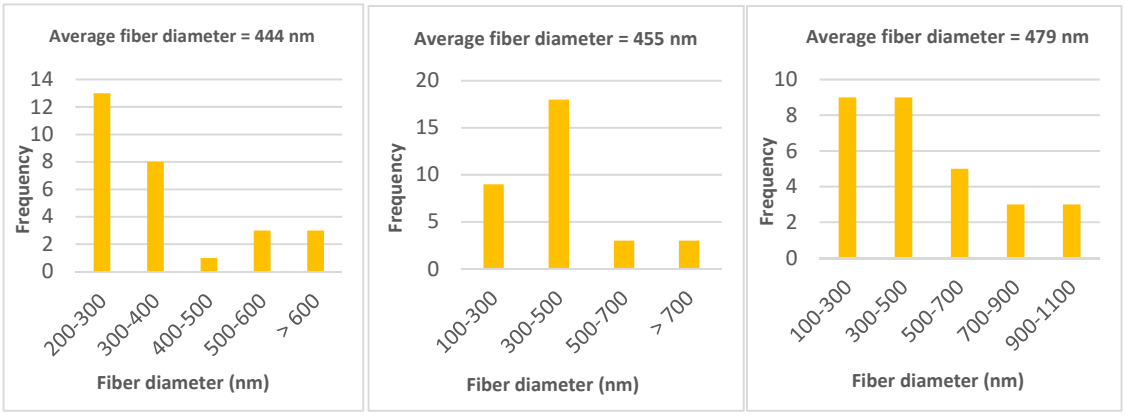


شكل رقم (4): وعاء الزرع الخلوي ذو ال24 حفرة.



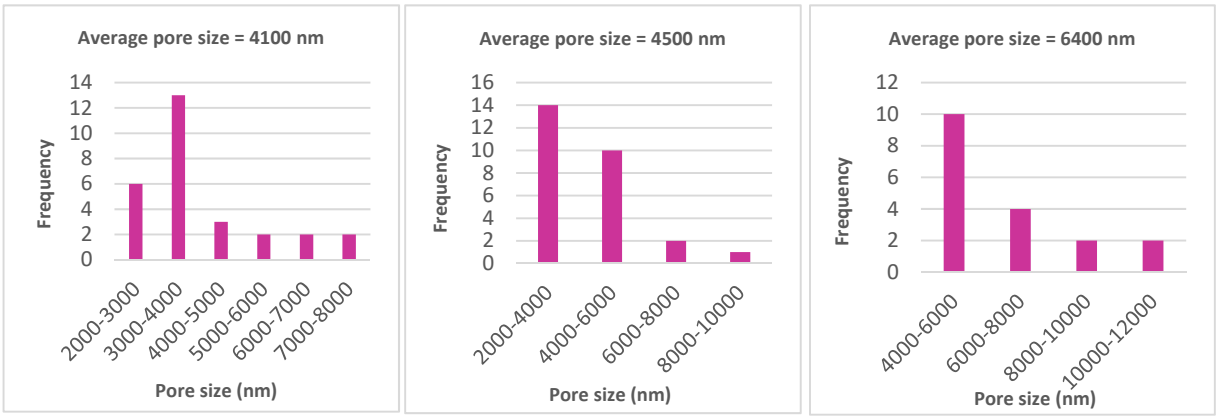
ج ب أ

شكل رقم (5): صور المجهر الألكتروني الماسح SEM للأنسجة المصنعة من الخليط البوليمري لمادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان [PCL:PU] بنسب مختلفة. أ. [2:1]، ب. [1:1]، ج. [1:2].



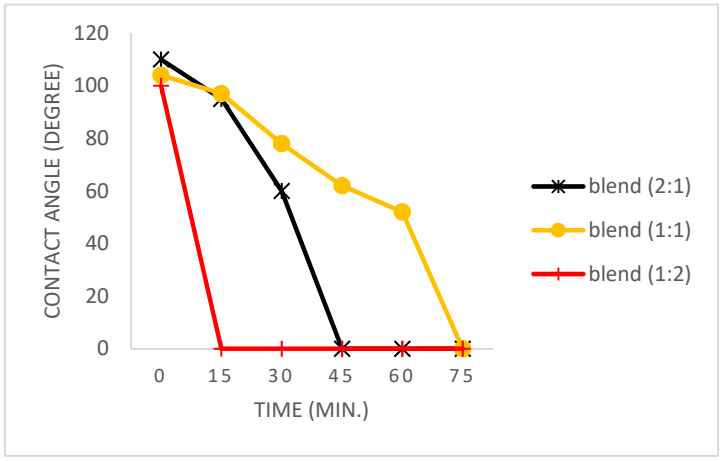
ج ب أ

شكل رقم (6): معدل قطر الألياف للأنسجة المصنعة من الخليط البوليمري لمادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان [PCL:PU] بنسب مختلفة. أ. [2:1]، ب. [1:1]، ج. [1:2].



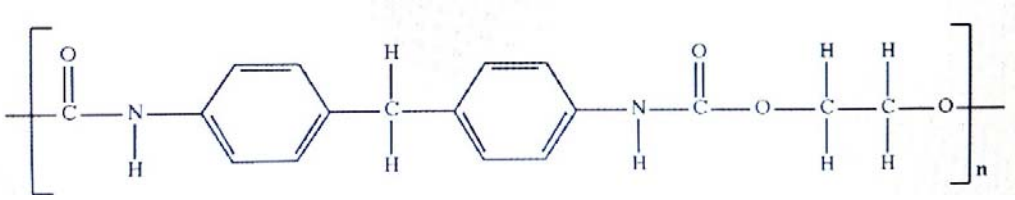
ج ب أ

شكل رقم (7): معدل حجم الفجوات للأنسجة المصنعة من الخليط البوليمري لمادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان [PCL:PU] بنسب مختلفة. أ. [2:1]، ب. [1:1]، ج. [1:2].

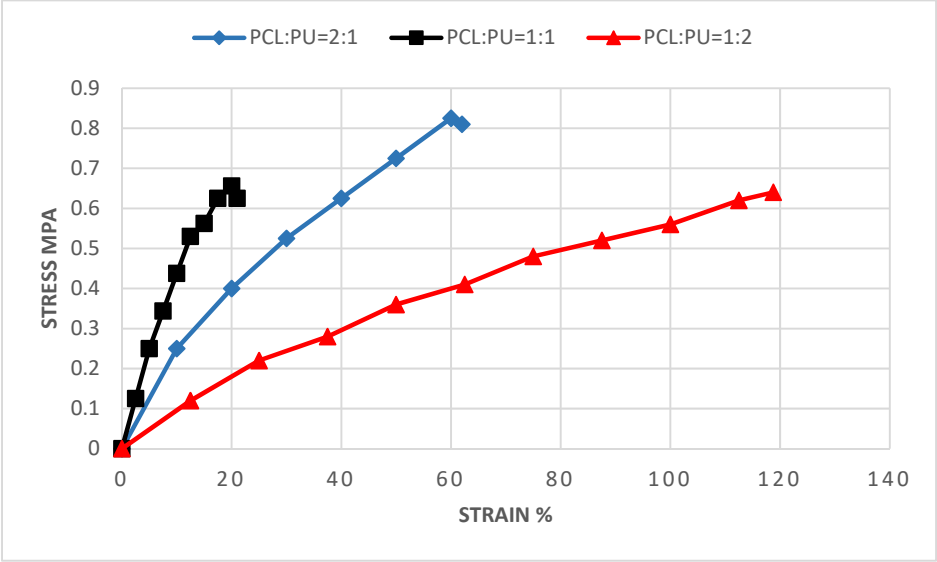


شكل رقم (8): يوضح إنخفاض زاوية التماس مع زيادة نسبة البولي يوريثان ومع زيادة الوقت.

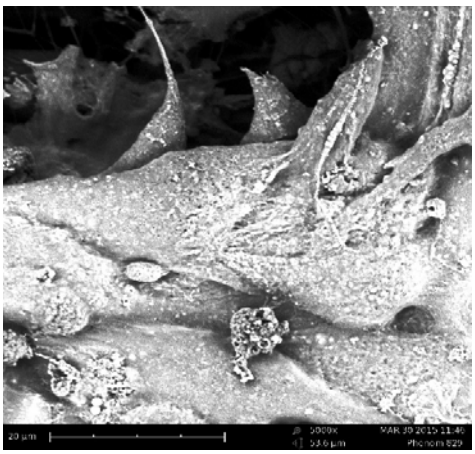
شكل رقم (9): التركيب الجزيئي لمادة البولي كابرولاكتون [9].



شكل رقم (10): التركيب الجزيئي لمادة البولي يوريثان [10].

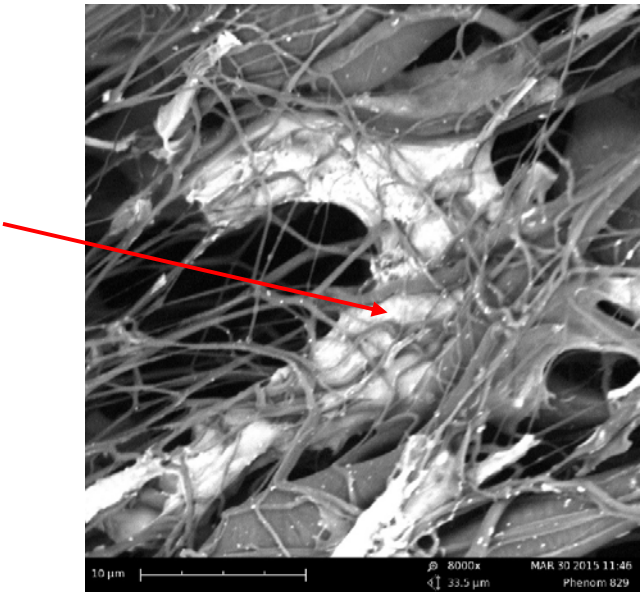


شكل رقم (11): منحنيات الإجهاد– الإنفعال للأنسجة المصنعة من الخليط البوليمري لمادتي البولي كابرولاكتون و البولي يوريثان [PCL:PU] و بنسب مختلفة.

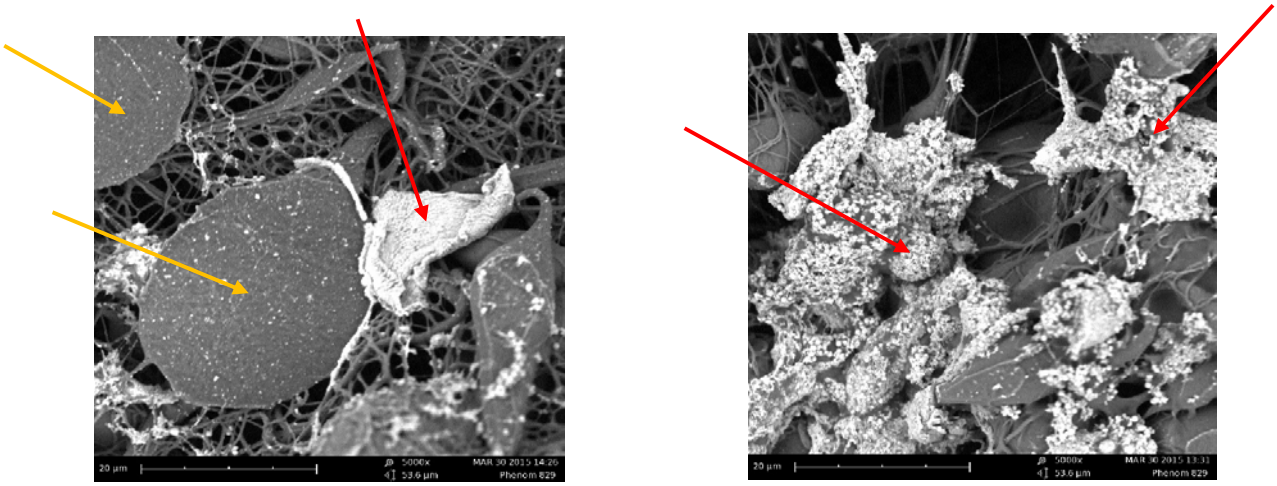


أ ب

شكل رقم (12): صور المجهر الألكتروني الماسح للنسيج المصنع من الخليط البوليمري(PCL:PU) بنسبة [2:1] بعد الزرع بالخلايا الجنينية لمدة 21 يوم وبتكبير 5000X. أ. بالتنقيع في السيروم البقري لمدة 24 ساعة، حيث يظهر هنا تكون طبقات متعددة من الخلايا و إختفاء النسيج المصنع ، ب. بدون تنقيع في السيروم البقري، أيضاً نلاحظ تكون طبقة كاملة من الخلايا و إختفاء النسيج المصنع.

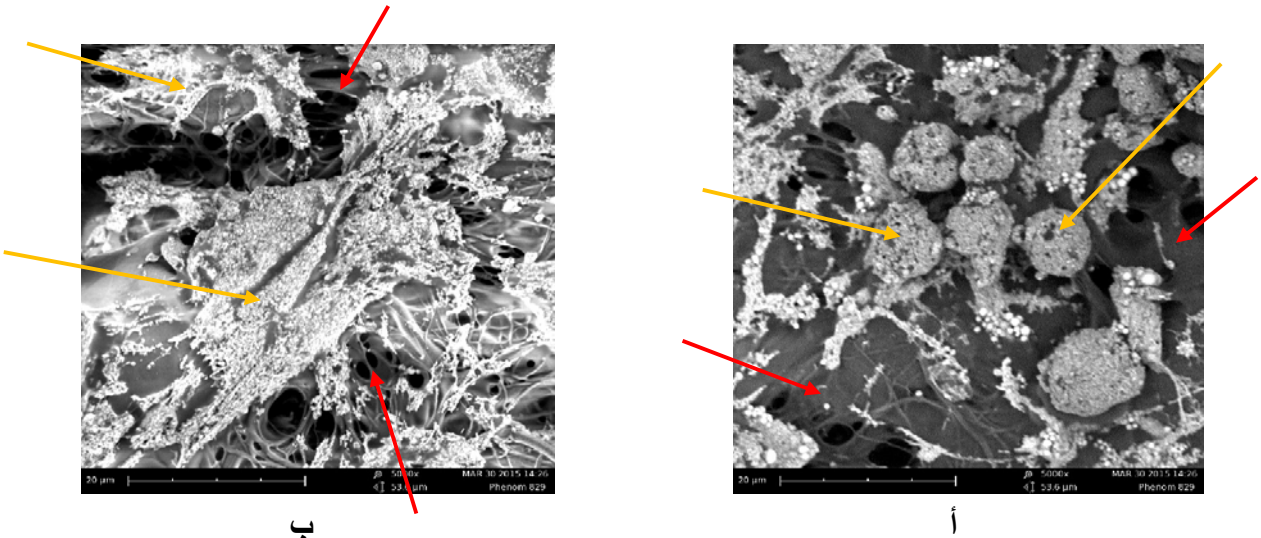


شكل رقم (13): يوضح صورة المجهر الألكتروني الماسح للنسيج المصنع من الخليط البوليمري(PCL:PU) بنسبة [2:1] بتكبير 8000X و التي تظهر تغلغل الخلايا المزروعة إلى داخل النسيج مما يؤدي إلى نمو الخلايا بشكل ثلاثي الأبعاد. السهم باللون الأحمر يشير إلى الخلايا المتغلغلة داخل النسيج.



ب أ

شكل رقم (14): صور المجهر الألكتروني الماسح للنسيج المصنع من الخليط البوليمري(PCL:PU) بنسبة [1:1] بعد الزرع بالخلايا الجنينية لمدة 21 يوم وبتكبير 5000X. أ. بالتنقيع في السيروم البقري لمدة 24 ساعة، حيث تشير الأسهم باللون الأحمر إلى الخلايا الملتصقة على النسيج المصنع مع إنتشار ومعدل نمو ضعيف ، ب. بدون تنقيع في السيروم البقري، يشير السهم باللون الأحمر إلى الإلتصاق الضعيف للخلايا نتيجةً لإزدياد نسبة العيوب في النسيج والتي تشير إليها الأسهم باللون الأصفر.



ب أ

شكل رقم (15): صور المجهر الألكتروني الماسح للنسيج المصنع من الخليط البوليمري(PCL:PU) بنسبة [1:2] بعد الزرع بالخلايا الجنينية لمدة 21 يوم وبتكبير 5000X. أ. بالتنقيع في السيروم البقري لمدة 24 ساعة، حيث تشير الأسهم باللون الأحمر إلى طبقة من الخلايا المتكونة على النسيج المصنع و بتوزيع جيد، في حين تشير الأسهم باللون الأصفر إلى تكون طبقة أخرى من الخلايا لكن بإنتشار و توزيع ضعيف ، ب. بدون تنقيع في السيروم البقري، يشير الأسهم باللون الأحمر إلى تكون طبقة من الخلايا على النسيج المصنع و بتوزيع جيد، في حين تشير الأسهم باللون الأصفر إلى تكون طبقة أخرى من الخلايا بتوزيع و إنتشار أقل من الطبقة الداخلية.

الجداول:

جدول رقم (1): يوضح مقدار متغيرات عملية البرم الكهربائي المستخدمة.

متغيرات عملية البرم الكهربائي	مقدار المتغيرات
مقدار الفولتية العالية المسلطة بالكيلو فولت	15 كيلو فولت
المسافة بين الأبرة المعدنية و المجمع المعدني	12.5 سم
القطر الداخلي للأبرة المعدنية	0.7 ملم
نوع المجمع المعدني	إسطواني بقطر 2 سم
سرعة الدوران للمجمع المعدني	100 دورة في الدقيقة
معدل ضخ المحلول البوليمري	2 مل/ساعة

جدول رقم (2): يوضح قياسات زوايا التماس لقطرة الماء المقطر مع سطح الأنسجة المصنعة.

نوع النسيج	معدل قطر الليف بالنانومتر	مقدار زاوية التماس مع سطح النسيج المصنع (درجة)					
		0 دقيقة	15 دقيقة	30 دقيقة	45 دقيقة	60 دقيقة	75 دقيقة
نسيج (PCL:PU) بنسبة[2:1]	479	º110	º 95	º 60	º 0	º 0	º 0
نسيج (PCL:PU) بنسبة[1:1]	455	º 104	º 97	º 78	º 62	º 52	º 0
نسيج (PCL:PU) بنسبة[1:2]	444	º 100	º 0	º 0	º 0	º 0	º 0

جدول رقم (3): يوضح نتائج الخواص الميكانيكية للأنسجة المصنعة.

نوع النسيج	معدل قطر الألياف (النانومتر)	مقاومة الشد (ميكا باسكال)	النسبة المئوية للمطيلية	معامل المرونة (ميكا باسكال)
نسيج (PCL:PU) بنسبة[2:1]	479	0.83	62	2.66
نسيج (PCL:PU) بنسبة[1:1]	455	0.654	21.2	5
نسيج (PCL:PU) بنسبة[1:2]	444	0.634	118.3	0.756

References:

1- Athira K. S., Pallab Sanpui, Kaushik Chatterjee, "**Fabrication of Poly (Caprolactone) nanofibers by electrospinning**", Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry, Vol.2, No.4, pp. 62-66, 2014.

2- Bit Na Lee, Jae Ho Kim, Jae Ho Kim, Heung Jae Chun, and Moon Suk Kim, "**Three- dimensional Nanofiber scaffolds for regenerative medicine**", Nanofiber- production, properties and functional applications, Dr. Tong Lin, ISBN: 978-953-307-420-7, 2011.

3- Augusto Zani, Agostino Pierro, Nicola Elvassore, and Paolo De Coppi, "**Tissue Engineering: An option for esophageal replacement**", Elsevier Inc., Vol. 18, pp. 57-62, 2009.

4- Zhi- Cai Xing, Seung- Jin Han, Yong- Suk Shin, and Innkyu Kang, "**Fabrication of biodegradable polyester nanocomposite by electrospinning for tissue engineering**", Journal of Nano materials, Article ID 929378, 18 pages, 2011.

5- Rajesh Vasita, and Dhirendra S. Katti, "**Nanofibers and their applications in tissue engineering**", International Journal of Nanomedicine, Vol. 1, No. 1, pp. 15-30, 2006.

6- B. Subia, J. Kundu, and S. C. Kundu, "**Biomaterial scaffold fabrications techniques for potential tissue engineering applications**", Tissue Engineering, Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7, 2010.

7- Pamela Tsing, "**Electrospinning natural polymers for tissue engineering applications**", NSF Undergraduate Fellowship in Sensor Technologies, Bioengineering, University of Pennsylvania.

8- Lee K. H., Kwon G. H., Shin S. J., Baek J. Y., Han D. K., Park Y., and Lee S. H., "**Hydrophilic electrospun polyurethane nanofiber matrices for hMSC culture in microfluidic cell chip**", Journal of Biomedical M aterials Recearch Part A, Volume 90A, Issue 2, pp. 619-628, 2009.

9- Woodruff M A, Hutmacher D W, "**The return of a forgotten polymer Polycaprolactone in the 21st century**", Progress in polymer science (2010), doi: 10.1016/ j.progpolymsci.2010.04.002.

10- Valeria Chiono, Pamela Mozetic, Monica Boffito, Susanna Sartori, Emilia Gioffredi, Antonella Silvestri, Alberto Rainer, Sara Maria Giannitelli, Marcella Trombetta, Daria Nurzynska, Franca Di Meglio, Clotilde Castaldo, Rita Miraglia, Stefania Montagnani, and Gianluca Ciardelli, "**Polyurethane- based scaffolds for Myocardial tissue engineering**", Interface Focus Royal Society Publishing, Vol.4, pp. 1-11, 2013.