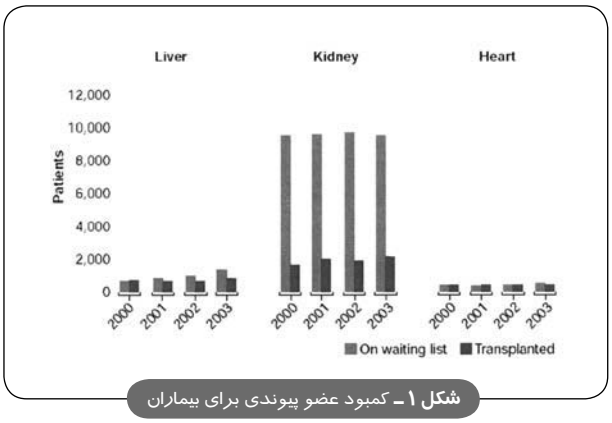
مهندسی بافت

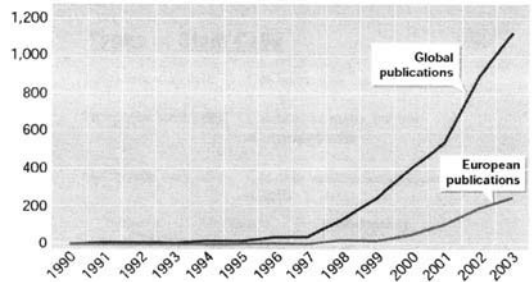
دکتر جمال شمس آرا، دکتر سید محمد تقدیسی حیدریان
دانشجوی تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی مشهد

■ مقدمه

وقتی بافت یا اندامی به شدت آسیب ببیند، یا در اثر سرطان، ناهنجاری‌های مادرزادی و یا تروما از بین برود، داروهای معمول کاربردی ندارند و انتخاب اول اندام‌های مصنوعی (که شامل بافت مصنوعی نیز می‌شوند) یا پیوند بافت می باشد. با این وجود این اقدامات با مشکلاتی مواجه هستند. اندام‌های مصنوعی که با پیشرفت‌های حاصل شده در مهندسی پزشکی ارتقا پیدا کرده اند. هنوز نیازمند بهبود سازگاری زیستی (biocompatibility) و عمل‌کرد زیستی (biofunctionality) هستند. مشکلات در زمینه پیوند عضو شامل کمبود دهنده اندام و پس‌زدن ایمونولوژیک اندام می‌شود. شکل [۱] نشان دهنده کمبود دهندگان بافت خصوصاً در مورد کلیه می‌باشد (۱، ۲).



شکل ۱ ـ کمبود عضو پیوندی برای بیماران



شکل ۲ ـ این نمودار نشان دهنده رشد فزاینده مقالات در ارتباط با مهندسی بافت می‌باشد. برای رسم این نمودار واژه «Tissue engineering» در PubMed جستجو شده است.

در حدود سه دهه قبل رویکردی جدید برای ساخت مجدد اندام و بافت به وجود آمد که مهندسی بافت نام گرفت. مشخصه آن تولید دوباره بافت و اندام یک بیمار است که کاملاً biocompatible و biofunctional باشد، در عین حال واکنش ایمنی شدیدی به‌دنبال نداشته باشد.

شکل [۲] شتاب افزایش تعداد مقالات نمایه شده در ارتباط با مهندسی بافت را نشان می‌دهد (۱، ۲).

■ تاریخچه

۱۹۸۰: اولین تجربه بالینی مهندسی بافت که برای ساخت پوست از سلول‌های فیبروبلاست کراتینوسیت، یا قالب (scaffold) استفاده شد.

۱۹۸۸: تلاش برای ساخت بافت با استفاده از غشاها به‌منظور حفظ محل ایجاد بافت جدید از هجوم فیبروبلاست‌ها.

۱۹۸۹: مطالعه انتقال سلول‌ها با استفاده از پلیمرهای سنتزی قابل جذب به‌عنوان زمینه (matrices).

۱۹۸۹: گزارشی از ترمیم سطوح غضروف مفصلی خرگوش به‌وسیله کندروسیت‌های allograft که ژل کلاژن آن‌ها را در برگرفته بود.

۱۹۹۳: ارایه مقاله مروری با عنوان tissue engineering در مجله science که نقش زیادی در پیش برد تحقیقات مهندسی بافت داشت.

۱۹۹۸: موفقیت در کشت سلول‌های بنیادی جنینی (ES)

در ادامه مروری بر مواد اولیه کلیدی در مهندسی بافت خواهیم داشت.

■ سلول‌ها

□ انواع سلول‌ها از نظر منشا

Autologous : سلول‌های خود بیمار

Allogenic : سلول‌های انسانی به‌جز خود فرد

Xenogenic : سلول‌های با منشا حیوانی

سلول‌های Allogenic و Xenogenic ایمنوژن هستند و نیاز به درمان‌های سرکوب کننده سیستم

ایمنی دارند، علاوه بر این گزارشاتی مبنی بر وجود رتروویروس در سلول‌های دارای منشا خوکی در سال ۱۹۹۷ منتشر شد، با این وجود سلول‌های حیوانی به منظور تولید بافت اپیدرمی از سلول‌های کراتینوسیت (به دلیل فعالیت بالای آن ها از نظر رشد) در مهندسی بافت به‌کار برده می‌شوند و سلول‌های Allogenic به‌دلیل ترشح عوامل رشد بر پوشش های غیر زیستی به‌کار برده شده برای ترمیم زخم برتری دارند و بیش‌تر در این مورد به‌کار می‌روند.

سلول‌های Autologous به‌دلیل ایمنوژن نبودن مناسب‌ترین سلول‌ها برای مهندسی بافت به‌شمار می‌آیند. مشکل استفاده از این سلول‌ها به‌طور عمده ناشی از عوامل زیر است:

۱ ـ مقدار سلولی که می‌توان از فرد گرفت کم است و در نتیجه نیاز به کشت دارد.

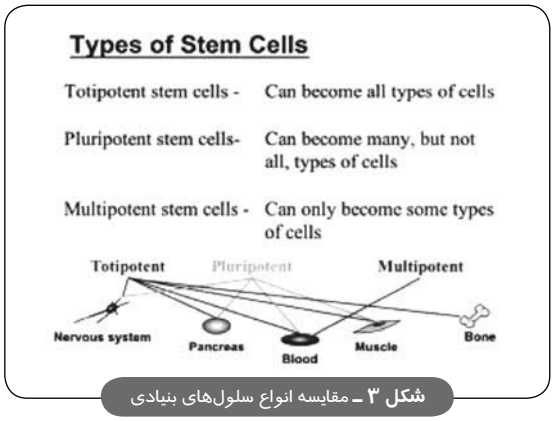
۲ ـ فرآیند کشت سلولی نیازمند انجام فرآیند به‌صورت تمیز برای اجتناب از آلودگی می‌باشد. به‌علاوه، این فرآیند زمان بر است و خطر آلودگی ویروسی که ممکن است به‌دلیل استفاده از FCS (سرم گوساله)، که به‌طور معمول در محیط‌های کشت به‌کار می‌رود، نیز وجود دارد.

□ انواع سلول‌ها از نظر میزان تمایز

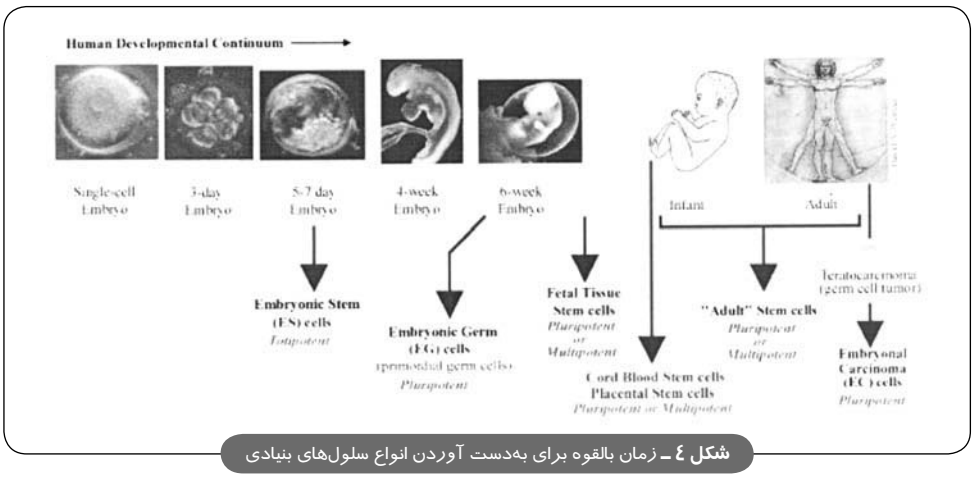
شکل [۳] نشان دهنده قابلیت تمایز انواع سلول‌های بنیادی است که سلول‌های totipotent بیش‌ترین و multipotent کم‌ترین طیف سلول برای تبدیل شدن را در بر می‌گیرند و سلول‌های pluripotent در بین این دو حالت قرار دارند. شکل [۴] زمانی را که هر کدام از این سلول‌ها را می‌توان به‌دست آورد، نشان می‌دهد و همان‌طور که در این شکل نشان داده شده خون بندناف منبعی غنی از سلول‌های بنیادی است (۱).

■ سلول‌های بنیادی جنینی

سلول‌های بنیادی جنینی (ECS) می توانند به تمام سلول‌های بدن تبدیل شوند (pluripotent هستند) و قابلیت زیاد شدن بدون محدودیت را دارند. اگر این سلول‌ها از تخم بارور بدون استفاده باقی مانده از درمان زوج‌های نابارور تهیه شود نسبت به فرد گیرنده این سلول‌ها ایمنوژن خواهند بود و اگر برای حل این مشکل تلاش گردد تا



شکل ۳ ـ مقایسه انواع سلول‌های بنیادی

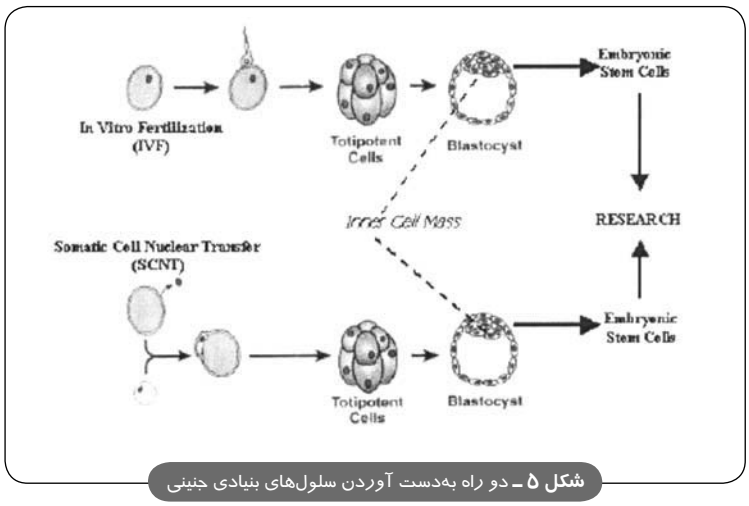


شکل ٤ ـ زمان بالقوه برای به‌دست آوردن انواع سلول‌های بنیادی

از طریق واردکردن هسته یک سلول پیکری (somatic) فرد گیرنده، به‌درون تخم فاقد هسته سلول جنینی تولید شوند، این تحقیقات ممکن است مورد سوء استفاده قرار گیرد و به سمت کلون کردن انسان پیش برود (شکل ۵ این دو راه تولید را نشان می‌دهد: در بالا تولید با استفاده از تخم باقی مانده از IVF و در پایین تولید سلول بنیادی با استفاده از وارد کردن هسته یک سلول سوماتیک به‌درون تخم فاقد هسته نشان داده است).

- سلول‌های بنیادی موجود در بدن فرد بالغ (adult stem cells)

این سلول‌ها بیش‌تر multipotent هستند یعنی هر کدام توانایی تبدیل به سلول‌هایی خاص را دارند.



شکل ۵ ـ دو راه به‌دست آوردن سلول‌های بنیادی جنینی

یک دسته سلول‌های بنیادی تولیدکننده سلول‌های خونی (HSC) هستند که در مغز استخوان قرار دارند و به فراوانی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و توانایی تبدیل به ائوزینوفیل‌ها اریتروسیت‌ها، مگاکاریوسیت‌ها، استئوکلاست‌ها و سلول‌های B و T را دارند.

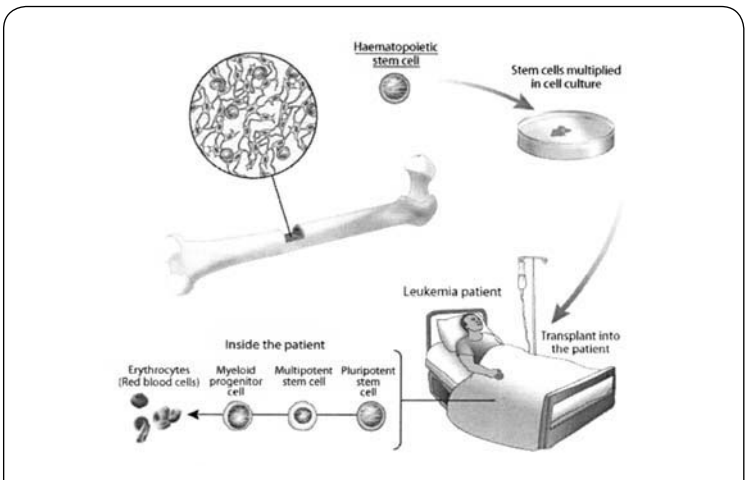
مغز استخوان هم‌چنین حاوی گروه دیگری از این سلول‌ها به‌نام سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) است که توانایی تبدیل به تعدادی از انواع سلول‌های بافت هم‌بند را از جمله استئوسیت‌ها کندروسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها، تنوسیت‌ها، میوسیت‌ها و سلول‌های استرومایی مغز استخوان را دارند.

از طرف دیگر، تعدادی از بافت‌ها دارای سلول های پیش ساز برای تبدیل و تمایز به سلول‌های اختصاصی اندام مربوط می‌شوند مثل کراتینوسیت‌های پوست، هپاتوسیت‌های پاسخ دهنده به آسیب‌های کبدی و .....

مزیت استفاده از سلول‌های MSC بی‌خطر بودن آن‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی است. سلول‌های بنیادی جنینی بعد از پیوند و قبل از تمایز پیدا کردن ممکن است باعث ایجاد trateoma شوند، در حالی‌که در بین سلول‌های تمایز یافته از MSC سلول ناخواسته‌ای ایجاد نمی‌شود. وقتی سلول‌های MSC بر روی محیط کشت دوبعدی کشت داده می‌شوند، رشد به میزان مناسبی انجام می‌گیرد ولی سلول‌ها دچار تمایز زدایی (de-differentiation) می‌شوند، در حالی‌که در کشت در محیط سه بعدی تمایز زدایی صورت نمی‌گیرد ولی سرعت رشد مناسب نیست.

برای جایگزینی FCS مواردی مطرح شده است که یکی از آن‌ها سرم انسانی‌ای است که برخلاف معمول حاوی مواد حاصل از شکسته شدن پلاکت‌ها باشد.

در حال حاضر تنها سلول بنیادی که استفاده



شکل ۵ ـ استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان برای درمان بیمار مبتلا به لوکمی

بالینی از آن مورد تاکید قرار گرفته است، HSC برای پیوند مغز استخوان است.

شکل [۶] این استفاده بالینی را به تصویر کشیده است.

■ قالب (scaffold)

به‌جز موارد نادر انتقال سلول‌ها به محل هدف برای تشکیل بافت یا اندام کافی نیست. بیش‌تر بافت‌ها و اندام‌های بزرگ که دارای ساختار سه بعدی مشخص هستند برای تشکیل، نیاز به یک حمایت‌کننده (support) دارند. این حمایت‌کننده با نام‌های قالب، الگو (template) و ماتریکس خارج سلولی مصنوعی نیز شناخته می‌شود. باید توجه داشت که اصطلاحات جدیدی بدون تعریف واضح وجود دارند که شاید بتوان آن‌ها را بر اساس به‌کار بردن قالب تقسیم‌بندی کرد (شکل ۷).

برای داشتن یک قالب مناسب باید مواردی را در نظر گرفت:

۱ ـ باید دارای میکروپورهای به هم متصلی باشد که بتواند به سلول‌ها اجازه رشد کردن بدهد و آن‌ها را به‌وسیله مقدار کافی از مواد مغذی تغذیه کند و هم‌چنین مانعی برای رگزایی (vascularization) و دور شدن مواد زاید نباشد. اندازه مناسب میکروپورها باید بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکرومتر باشد.

۲ ـ قالب باید دارای میزان تخلخل (porosity) مناسب، سطح کافی و مقاومت مکانیکی لازم باشد.

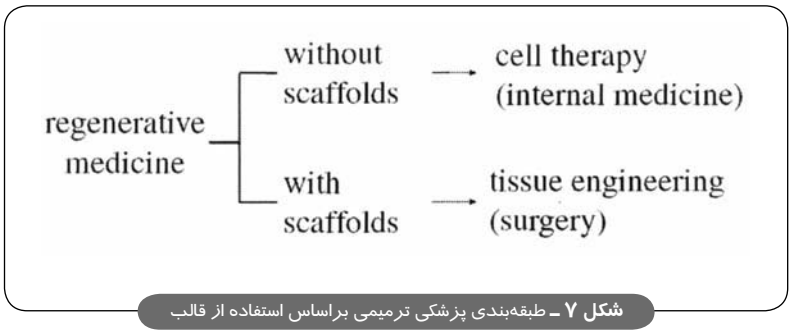
۳ ـ سرعت (kinetics) جذب مناسب قالب نیز دارای اهمیت است و برحسب بافت مورد نظر متفاوت می باشد.

به‌عنوان مثال، برای مهندسی بافت سیستم اسکلتی نیاز به قالب‌های با سرعت تجزیه کم و برای مهندسی بافت پوست نیاز به قالب با سرعت جذب بالا می‌باشد.

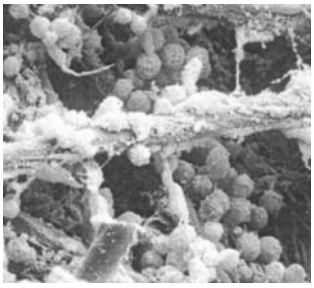
□ پلیمرهای آلی سنتزی

بیش‌ترین کاربرد در این گروه را پلی‌آلفا ـ هیدروکسی اسیدها، به ویژه پلیمرهای گلیکولیک و لاکتیک اسید دارند. برای تولید پلیمرهای با سرعت تجزیه مناسب از ترکیبات مختلف این پلیمرها استفاده می‌شود.

شکل ۸ سلول‌های رشد یافته درون رشته‌های



شکل ۷ ـ طبقه‌بندی پزشکی ترمیمی براساس استفاده از قالب



شکل ۸ ـ سلول‌های رشد یافته درون رشته‌های پلیمری

پلیمری را نشان می‌دهد.

شکل ۹ نموداری است که سرعت جذب انواع این پلیمرها را نشان می‌دهد.

□ قالب‌های با منشا طبیعی

این مواد چون هیدروفیل هستند و مقاومت کمی دارند کم‌تر به‌کار می‌روند و معمولاً از این گروه از آلژینات‌ها استفاده می‌شود. آلژینات‌ها از طریق جذب یون‌های دو ظرفیتی، مثل کلسیم، پیوند عرضی تشکیل داده و به‌صورت نامحلول در آب در می‌آیند و بعد از قرار گرفتن در بدن به تدریج یون سدیم جایگزین یون کلسیم شده و پلیمر به‌صورت محلول در آب در می‌آید.

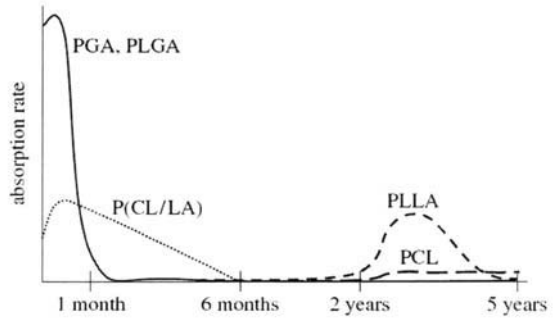
□ قالب‌های معدنی

این پلیمرها بیش‌تر در مهندسی بافت استخوان به‌کار می‌روند. از این گروه می‌توان به هیدروکسی آپاتیت و بتا ـ تری کلسیم فسفات اشاره کرد که به‌دلیل شکننده بودن همراه با پلیمرهای نرم به‌کار می‌روند.

دو نوع استفاده از قالب بعد از این‌که سلول‌ها به آن اضافه شدند وجود دارد:

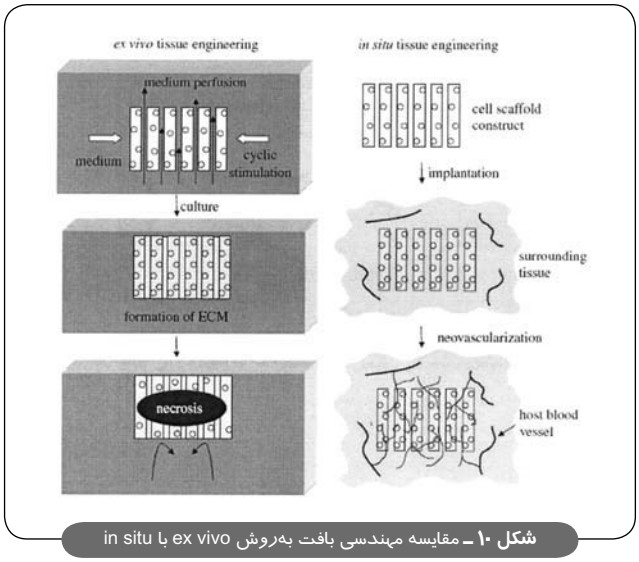
۱ ـ قرار دادن ساختار فوق در bioreactor تا بافت به‌صورت in vitro یا ex vivo ساخته شود.

۲ ـ قرار دادن ساختار در بدن تا بافت به‌صورت in vivo یا in situ تولید شود.



PGA, polyglycolide; PLGA, lactide–glycolide copolymer; P(CL/LA), ε-caprolactone–lactide copolymer; PLLA, poly-L-lactide; PCL, poly-ε-caprolactone.

شکل ۹ ـ سرعت جذب پلیمرهای پر استفاده



شکل ۱۰ ـ مقایسه مهندسی بافت به‌روش ex vivo با in situ

روش اول از نظر قابلیت تبدیل شدن به یک فرآیند اقتصادی و درآمدزا، آینده بهتری را نشان می دهد ولی مشکلاتی بر سر راه گسترش آن وجود دارد از جمله این‌که به‌نظر می‌رسد رگ‌زایی در این روش غیر ممکن باشد (شکل ۱۰) (۱، ۳).

■ عوامل رشد (growth factors)

عوامل رشدی که تاکنون به فراوانی در مهندسی بافت به‌کار رفته‌اند شامل موارد زیر می‌باشند:

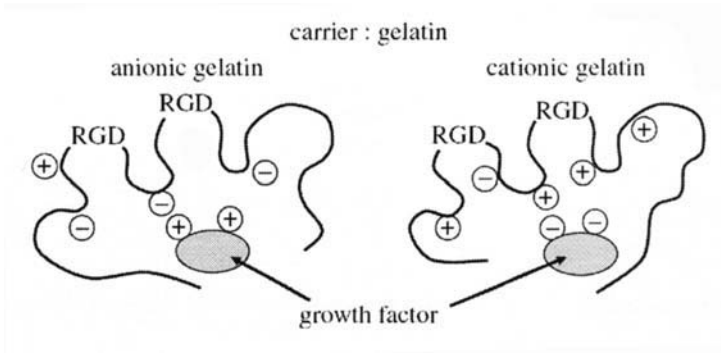
- Bone Morphogenic Proteins (BMPs)
- basic Fibroblast Growth Factor (bFGF or FGF-2)
- Vascular Epithelial Growth Factor and Transforming Growth Factor-β (VEGF,TGF-β)

توانایی زیاد این عوامل با در نظر گرفتن این حقیقت که BMP و bFGF به تنهایی می‌توانند به ترتیب باعث القای ترمیم بافت استخوانی و عروق، بدون استفاده از سلول و قالب شوند؛ مشخص می‌گردد.

نکته مهم در به‌کارگیری این مواد نحوه رساندن آن‌ها به محل دل‌خواه است، چون مشخص شده که تزریق یک‌جای این مواد در محلول باعث گسترش آن‌ها در تمام محیط، رقیق شدن و عدم اثر مناسب آن‌ها می شود. سه روش برای رساندن این عوامل به بافت هدف مورد استفاده قرار گرفته است:

۱ ـ استفاده از پلاسمیدی که کد کننده ژن پروتئین مورد نظر ما باشد و در نتیجه سلول‌های آلوده شده با این پلاسمید، پروتئین مورد نظر را ترشح می‌کنند.

۲ ـ وارد کردن ژن کد کننده عامل رشد توسط



شکل ۱۱ ـ بدام انداختن عامل رشد در ژلاتین قابل جذب که با استفاده از تداخلات یونی صورت گرفته است

حامل به سلول و انتقال سلول به محلی که بافت مورد نظر باید تشکیل شود.

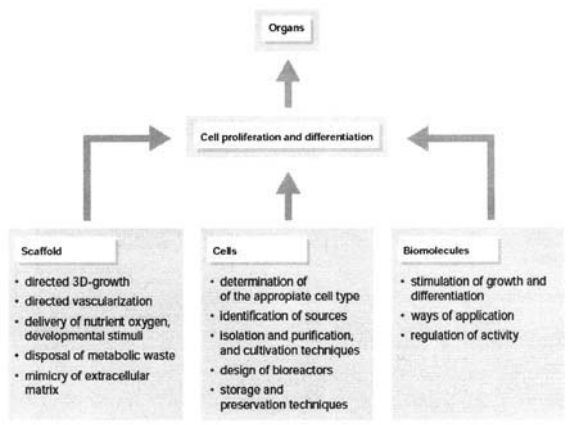
۳ ـ انتقال پروتئین عامل رشد به محل با استفاده از یک حامل، که بیش‌ترین استفاده را تا به حال در مهندسی بافت داشته است. ویژگی‌های حامل مورد استفاده:

الف) به میزان حداقل باعث دناتوره شدن پروتئین شود.

ب) سرعت آزاد شدن پروتئین از آن مناسب باشد.

ج) و در بدن قابل تجزیه و جذب باشد.

BMP به این شیوه همراه با کلاژن در آمریکا به کار رفته است. ضمن این‌که اخیراً FDA نوع ترکیب BMP-2 انسانی را برای اعمال جراحی ستون مهره‌ها تایید کرده است.



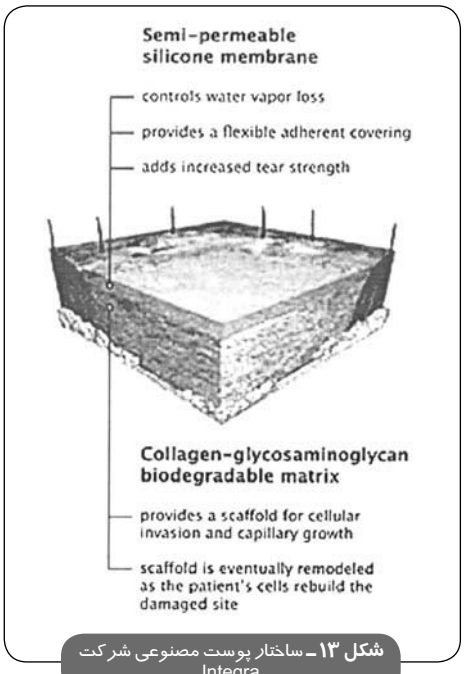
شکل ۱۲ ـ نقش عوامل سه‌گانه در مهندسی بافت

شکل [۱۱] در مورد استفاده از نیروهای یونی برای به دام انداختن پروتئین در حامل می‌باشد؛ ضمن این‌که وجود توالی RGD (آرژینین، گلایسین و آسپارتیک اسید) باعث اتصال بهتر پلیمر به بافت می‌شود.

شکل [۱۲] خلاصه‌ای از آن‌چه در مورد سه عنصر کلیدی مهندسی بافت ذکر شد را در بر دارد (۱، ۲).

■ کاربردهای بالینی

در ادامه به مروری بر روی بعضی از کاربردهای بالینی مهندسی بافت می‌پردازیم که در بعضی موارد شامل cell therapy نیز می‌شود.



شکل ۱۳ـ ساختار پوست مصنوعی شرکت Integra

□ پوست

■ پوست مصنوعی شرکت Integra: این پوست از کلاژن نوع I گاوی و گلوکزامینو گلیکان کندرتین ۶ ـ سولفات به‌صورت یک شبکه (matrix) بسیار متخلخل تشکیل شده است و برای ایجاد پیوندهای عرضی بیش‌تر در کلاژن، از گلوتارآلدهید استفاده شده است. یک لایه سیلیکونی بر روی سطح به‌کار برده شده است تا به‌طور موقت وظیفه اپیدرم را انجام دهد و مانع تبخیر آب، آلودگی میکروبی و وارد شدن ضربه گردد.

شکل [۱۳] این ساختار را به خوبی نشان می‌دهد.

□ غضروف مفصلی

فرآیند ترمیم غضروف از طریق انتقال سلول‌های کندروژنیک خود فرد که به‌صورت سوسپانسیون سلولی یا از بیوپسی غضروف (۱۹۹۴) به‌دست آمده یا با استفاده از سلول‌های پیش‌ساز (precursor) جدا شده از periosteum (۱۹۹۹) و periochondrium (۱۹۹۰)، به منطقه دارای آسیب غضروف و با امید به این‌که سلول‌ها در نهایت به کندروسیت‌ها تمایز پیدا می‌کنند؛ انجام می‌گیرد و با وجود این‌که این روش در بعضی از کلینیک‌ها صورت می‌پذیرد هنوز به‌صورت فراگیر در نیامده است.

□ سیستم اعصاب مرکزی

سلول‌های مزانسفالیک انسانی جنینی (که شامل سلول‌های بنیادی عصبی دوپامینرژیک هستند) اولین سلول‌هایی بودند که برای درمان پارکینسون مورد استفاده قرار گرفتند (۱۹۹۸). وقتی این سلول‌ها به استریاتوم مبتلایان به پارکینسون تزریق شوند، به نورون‌های دوپامینرژیک (DANs) تمایز یافته

جدول ۱ ـ بعضی از شرکت‌ها که در زمینه مهندسی بافت فعالیت دارند

Company	Program
Advanced Tissue Sciences (La Jolla, CA)	Growth of human tissues and organs, including skin, cartilage, bone, and liver
Alertek/Bio (Quebec, QC, Canada)	Blood vessels
Cell Based Delivery (Providence, RI)	Bioartificial muscle
CellSource (Pittsburgh, PA)	Vascularized fat cells
Collagenesis (Beverly, MA)	Tissue matrix system
Creative Biomolecules (Hopkinton, MA)	NOVOS bone graft material
Cytomatrix (Cambridge, MA)	3-D hematopoietic stem cell engineering
CytoTherapeutics (Providence, RI)	Cell encapsulation; progenitor cell transplantation
ETEX (Cambridge, MA)	Bone substitute material
Genetics Institute (Cambridge, MA)	Bone morphogenetic protein
Genzyme Tissue Repair (Cambridge, MA)	Wound repair, tissue regeneration
Geron (Menlo Park, CA)	Telomerase-immortalized stem cells
Integra LifeSciences (Plainsboro, NJ)	Artificial Skin non-biologic material
Interpore International (Irvine, CA)	Pro-osteon bone graft from coral
LifeCell (The Woodlands, TX)	AlloDerm for skin replacement
MorphoGen Pharmaceuticals (New York)	Pluripotent mesenchymal stem cells
Organogenesis (Canton, MA)	Apligraf (Graftskin) human skin equivalent
Osiris Therapeutics (Baltimore, MD)	Cartilage tissue generation mechanisms
Progenitor (Menlo Park, CA)	Stem cell engineering
Protein Polymer Technologies (San Diego, CA)	Recombinant protein polymer hydrogel
Regeneron (Tarrytown, NY)	Vascular tissue engineering
Reprogenesis (Cambridge, MA)	Local and systemic tissue-engineered products
Selective Genetics (San Diego, CA)	Matrix-based delivery of DNA for tissue repair
Stratum Laboratories (La Jolla, CA)	Skin2 living human skin tissue in vitro laboratory testing kit
Stryker (Kalamazoo, MI)	Bone regeneration
Terumo (Japan)	Terudermis bilayer artificial dermis

و فعالیت مسیر خروجی استریاتوپالیدوتالامیک را به حالت معمول می‌رسانند. اگرچه در بهترین موارد بهبودی چشمگیر برای ۱۰ ـ ۵ سال دیده شده ولی نتایج بسیار متغیر بوده است. اتوپسی از دو بیمار فوت کرده و هم‌چنین مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که این متغیر بودن به‌دلیل تفاوت در زنده ماندن سلول‌های انتقال یافته است. به‌نظر می‌رسد که حداقل ۸۰۰۰۰ DANs (که تقریباً ۲۰ درصد میزان طبیعی است) برای مشاهده بهبودی بیمار لازم باشد.

□ بافت قلبی

سلول‌های اقماری (satellite) جدا شده از عضله چهار سر (quadriceps) به‌صورت in vitro برای دو هفته کشت داده شد و ۸۰۰×۱۰^{۶} سلول (۶۵ درصد میوبلاست) به قسمت آسیب دیده میوکارد یک بیمار ۷۲ ساله دچار نارسایی احتقانی قلبی به‌وسیله ۳۰ تزریق با سوزن کوچک انتقال

داده شد و هم‌زمان bypass دو گانه در قسمت‌های زنده اما ایسکمیک میوکارد انجام گرفت و شش ماه بعد علایم فرد به‌طور چشم‌گیری بهبود یافت (۲۰۰۲).

□ مجرای ادراری و مثانه

لایه زیر مخاطی مثانه گرفته شده از افراد مرده جدا شده و بعد از جداکردن سلول‌ها، آن‌را برای درمان افراد دارای نقص در سیستم ادراری به کار گرفتند (۱۹۹۹). بعد از ۷ ـ ۴ سال ۳۴ نفر از ۴۰ نفر نتایج همراه با موفقیت نشان دادند.

■ مشکلات مهندسی بافت برای پیشرفت بالینی

کنترل کیفیت مواد مورد استفاده در این فرآیند یکی از مشکلات کلیدی است که البته بیش‌تر بر سر راه صنعتی شدن آن قرار دارد.

یکی از دلایلی که باعث شده است علی‌رغم کارهای پایه‌ای زیاد، پیشرفت بالینی زیادی در این زمینه وجود نداشته باشد، موانعی است که برای scale up وجود دارد، که از آن‌ها می‌توان به عدم توانایی طراحی reactor مناسب، عدم وجود سلول به اندازه زیاد، مشکل در کشت سلول‌ها (مثل ایجاد آلودگی، عدم تمایز و ....) اشاره کرد (۳، ۴).

دلیل مهم دیگر وقوع مرگ سلولی بعد از انتقال سلول‌ها به بدن فرد دریافت‌کننده است.

شکل [۱۴] نشان دهنده فعالیت‌های تحقیقاتی شرکت‌های مختلف در زمینه مهندسی بافت است (۵).

منابع

1. IKada Y. Challenges in tissue engineering. J R Soc Interface 2006; 3(10): 589-601.

2. Moreno - Borchart A. Building organs piece by piece. Accomplishments and future perspectives in tissue engineering. EMBO Rep 2004; 5(11): 1025-1028.

3. Vacanti CA. The history of tissue engineering. J Cell Mol Med 2006; 10(3): 569-576.

4. Langer R. Tissue engineering. Mol Ther 2000;1 (1): 12-15.

5. Tissue engineering. Nat Biotechnol 2008; 18(suppl): 56-58.