بررسی پاسخ هیستولوژیک، ایمونولوژیک و بیوشیمیایی به تزریق زیرجلدی داربست هیدروژلی ترکیبی طراحی‌شده برای کانال‌های دندانی در موش سوری

آرمین حسن‌زاده ایناللو[۱]، جواد اشرفی هلان [۲] زهرا آقازاده[۳]، مرضیه آقازاده[٤]، رضا رهبرقاضی[٥]، رؤیا صالحی[٦×]

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۸/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۱/۱۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: زیست سازگاری به معنی نبود مطلق سمیت سلولی نیست. درصورتی‌که ماده ایمپلنت شده عملکرد خود را در بدن ایفا کند و فعل‌وانفعالات بین مواد و سلول انجام شود و اندام موردنظر عملکرد طبیعی خود را حفظ کند طوری که واکنش عمومی بدن نیز طبیعی باشد ماده موردنظر زیست سازگار است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات هیستولوژیک، ایمونولوژیک و بیوشیمیایی به تزریق زیر جلدی هیدروژل‌های کلاژن+PCL-PEG-PCL، ژلاتین+PCL-PEG-PCL و آلژینات+PCL-PEG-PCL جهت تزریق به‌صورت زیر جلدی در موش بعد از گذشت ۳۰ روز می‌باشد.

مواد و روش کار: داربست‌ها با روش فریزدراینگ تهیه‌شده با استفاده از روش‌های FTIR مشخصه یابی شد. ۵۰۰ میکرولیتر داربست هیدروژلی به ناحیه dorsal flank موش سوری نژاد Swiss CD1 تزریق شد. حیوانات به گروه‌های شاهد، کلاژن+PCL-PEG-PCL، ژلاتین+PCL-PEG-PCL و آلژینات+PCL-PEG-PCL تقسیم شدند. موش‌ها بعد از ۳۰ روز جهت بررسی زیست سازگاری داربست با استفاده از اوردز داروی بیهوشی دی اتیل اتر یوتنایز شدند. پوست، کبد و کلیه حیوانات جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک، بیان ژن و آنزیمی نمونه‌برداری شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه داربست هیدروژلی ترکیبی به‌خوبی ساخته شده سپس مشخصه یابی شد.. نسبت آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) به آلانین آمینوترانسفراز (ALT) می‌تواند آسیب کبدی را از سایر احتمالات تمییز نماید. در گروه‌ها در بررسی آنزیمی نسبت AST به ALT در گروه آلژینات+ PCL-PEG-PCL بالاتر از سایر موارد است (۲/۹ برابر گروه کنترل) ولی باوجود اختلاف، بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری (آنالیز بیوشیمیایی خون) ازلحاظ آماری معنی‌دار نبود مشاهده نشد. در مطالعه حاضر در گروه کنترل و کلاژن+ PCL-PEG-PCL میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰، چهار برابر کم‌تر از گروه‌های آلژینات+ PCL-PEG-PCL و ژلاتین + PCL-PEG-PCL است که اختلاف در سطح معنی‌دار می‌باشد (P<۰،۰۰۱). ژن‌های SOD، CAT و CD31، در گروه PCL-PEG-PCL+ آلژینات به ترتیب ۱۰/۸، ۳/۳ و ۳/۵ برابر بیان بیشتری را نسبت به ژن بتا اکتین نشان دادند و تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های موردمطالعه نشان داد (P<۰،۰۰۱). در بررسی هیستوپاتولوژیک در بازرسی خارجی و بررسی ماکروسکوپیک اندام‌ها، نشانه‌ای از بروز عوارض سیستمیک از قبیل شوک، سپتی سمی، توکسمی و یا واکنش‌های التهابی گسترده در هیچ‌یک از گروه‌ها مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که داربست ترکیبی کلاژن+PCL-PEG-PCL عوارض کم‌تری نسبت به سایر گروه‌ها داشته است. احتمالاً داربست (کلاژن+PCL-PEG-PCL) زیستسازگار محسوب شده و قابلیت استفاده در مطالعات آتی جهت انتقال دارو، سلول و فاکتورهای رشد را دارا می‌باشد و می‌توان به‌عنوان داربست مناسب در مهندسی بافت (پوست‌واستخوان) استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: داربست تزریقی، کلاژن، ژلاتین، آلژینات، زیست سازگار، هیستوپاتولوژیک، تزریق زیر جلدی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره دوم، ص ۹۷-۸۲، اردیبهشت ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن:۰۴۱۳۳۳۵۵۷۸۹

Email: salehiro@tbzmed.ac.ir

[۱] دکترای عمومی، دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[۲] استاد آسیب شناسی دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[۳] متخصص بیماری‌های دندان و دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[٤] متخصص بیماری‌های دندان و دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[٥] استادیار کلینیکال پاتولوژی، گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[٦] استادیار نانوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

مقدمه

هدف مهندسی بافت شبیه‌سازی مکانیسم بدن به‌منظور بازسازی بافت‌های آسیب دیده است تا بدن ازلحاظ کارایی و شکل ظاهری به حالت اول برگردد. یکی از روش‌های مهم و کاربردی در مهندسی بافت استفاده از داربست‌های با قابلیت انتقال سلول‌های بنیادی مشتق شده از بدن میزبان، برای مقابله با کمبود ذخایر زیستی و همچنین مقابله با واکنش رد پیوند ارائه شده است(۱-۶).

داربست‌ها از پلیمرهای طبیعی، سنتتیک و یا هیبریدی (ترکیبی از داربست‌های طبیعی و سنتتیک) ساخته می‌شوند.

داربست‌های طبیعی معمولاً دارای گیرنده‌هایی برای اتصال سلولی می‌باشند. از طرف دیگر ویژگی‌های مکانیکی این داربست‌ها پایین است. داربست‌های با منشأ سنتتیک ویژگی‌های مکانیکی مطلوبی در قیاس با داربست‌های طبیعی دارند ولی این داربست‌ها نیز لیگاند برای اتصال سلولی ندارند.(۱، ۷-۱۱)

کلاژن ترکیب اصلی بافت همبندی در بدن موجودات است که دارای جایگاه اتصال سلولی است. کلاژن تخلخل بالایی دارد و بین این منافذ ارتباط خوبی برقرار است.

جایگاه‌های اتصال سلولی در کلاژن شامل RGD (Arg-Gly-Aspو GFOGER (Gly-Phe-HYP-GLY-GLU-ARG)است. مشکل اساسی که این پلیمر دارد این است که تحمل مکانیکی پایینی دارد طوری که ساخت داربست‌های کلاژنی مشکل است. (۱، ۷،۹ -۱۱)

ژلاتین قدرت مکانیکی پایینی دارد. این ماده به‌سرعت توسط روش آنزیماتیک تخریب می‌شود. ژلاتین در شرایط فیزیولوژیکی خاصیت آنتی¬ژنیک از خود نشان نمی‌دهد. هرچند این ماده سبب فعال شدن ماکروفاژ می‌شود. ژلاتین ویژگی‌های جذابی برای مهندسی بافت دارد. ازجمله: آسانی مدیفیکیشن (تبدیل و تغییر)، تحریک ایمنی پایین بدن (ایمونوژنیسیته پایین)، سمیت سلولی پایین (سیتوتوکسیسیتی پایین)، استفاده به‌عنوان عامل دلمه کننده دارد (۸).

آلژینات پلی ساکاریدی است که از جلبک به دست می‌آید. این ماده می‌تواند به حالت ژل دربیاید. آلژینات در حالت مایع قابل تزریق است. پلی ساکارید مذکور می‌تواند با کلسیم کراسلینک برقرار کند. عیب بزرگ آلژینات سرعت پایین تخریب-پذیری آن است که می‌تواند در مورد رشد بافت جدید مسئله ایجاد کند (۷).

پلی کاپرولاکتون پلیمر سنتتیکی است که در مهندسی بافت موردتوجه است. زیست سازگاری خوب، آنتی ژنسیته پایین، فرآیندپذیری ساده و آسان و غیر سمی بودن محصولات حاصل از تخریب آن سبب کاربرد این پلیمر در صنایع پزشکی شده است. از طرف دیگر هیدروفوب بودن درون این ماده و نبود موتیف‌های مولکولی برای تشخیص سلولی سبب ضعف در اتصال و تکثیر سلولی می‌شود همچنین این ماده منجر به تولید اسید در طی تخریب می‌شود که منجر به واکنش‌های التهابی می‌شود (۷، ۹، ۱۰).

حضور مداوم مواد خارجی ایمپلنت شده در داخل بدن سبب آسیب بافتی شده که در ادامه باعث واکنش التهابی می¬شود. سپس به‌وسیله یک سری رویدادهای پیچیده‌ترمیم بافتی شروع می‌شود. به‌طورکلی زیست سازگاری به معنی نبود مطلق سمیت سلولی نیست. درصورتی‌که ماده ایمپلنت شده عملکرد خود را در بدن ایفا کند و فعل‌وانفعالات بین مواد و سلول انجام شود و اندام موردنظر عملکرد طبیعی خود را حفظ کند طوری که واکنش عمومی بدن نیز طبیعی باشد ماده موردنظر زیست سازگار است.

بنابراین نقاط ضعف و قوت پلیمرهای ذکرشده ما را بر آن داشت تا پلیمر ترکیبی (هیبریدی) تهیه کنیم تا نقاط قوت هر دو نوع پلیمر (طبیعی و سنتتیک) را داشته باشد.

در این مطالعه سه نوع پلیمر ترکیبی کلاژن+-PCL-PEG PCL، ژلاتین+PCL-PEG-PCL و آلژینات+-PCL-PEG PCL جهت تزریق به‌صورت هیدروژل در زیر جلد موش انتخاب شد. هدف از انجام این مطالعه تحلیلی (مورد- شاهد) بررسی اثرات هیستولوژیک، ایمونولوژیک و بیوشیمیایی به تزریق زیر جلدی هیدروژل‌های ذکرشده در مدت یک ماه می‌باشد.

مواد و روش کار

اپسیلون کاپرولاکتون، پلی‌اتیلن گلیکول با جرم مولکولی متوسط ۱۰۰۰ دالتون، اکتانئات قلع، کلاژن نوع یک، ژلاتین و آلژینات از شرکت سیگما خریداری شدند. پارافین، فرمالین، حلال دی کلرو متان حل شده و حلال دی اتیل اتر از شرکت مرک خریداری شدند. کیت‌های سنجش ALP,ALT,AST از شرکت پارس آزمون خریداری شدند. کیت‌های استخراج RNA و سنتز cDNA از شرکت یکتا تجهیز آزما خریداری شد.

الف) سنتز و تهیه پلیمر سنتتیک:

جهت سنتز کوپلیمرPCL-PEG-PCL ، مونومر اپسیلون کاپرولاکتون (Ɛ-CL) (و پلی‌اتیلن گلیکول ۱۰۰۰ با نسبت وزنی ۲ به ۱ به روش پلیمریزاسیون حلقه گشا در حضور کاتالیزور اکتانات قلع (۰/۵ درصد وزنی کل مونومرها) در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت تحت جریان گاز ازت سنتز

شد؛ سپس پلیمر به‌دست‌آمده در حلال دی کلرو متان حل شده و در ضد حلال دی اتیل اتر سرد رسوب‌گیری شده؛ و در آون خلأ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌کنیم.

ب) تهیه داربست هیبریدی:

میزان برابری از کلاژن همراه با PCL-PEG-PCL در آب مقطر دیونیزه حل شده و توسط دستگاه هموژنایزر با دور ۲۵۰۰۰ دور در ۱۲۰ دقیقه با هم در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد ترکیب شده و محلول به‌دست‌آمده در دمای منفی ۲۰ درجه به مدت یک روز نگهداری می‌شود، سپس به فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک روز منتقل شده در مرحله بعد ۴۸ ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار داده شده تا داربست متخلخل حاصل شود. این مراحل برای ژلاتین و آلژینات نیز تکرار شده با این تفاوت که حلالیت این ترکیبات در دمای بالای ۴۰ درجه مخلوط شده‌اند همچنین نسبت آلژینات به PCL-PEG-PCL یک‌به‌چهار محاسبه شد (برخلاف ژلاتین و کلاژن که با نسبت یک‌به‌یک مخلوط شده‌اند).

ج)FTIR :

ساختار شیمیایی پلیمرهای ترکیبی با روش FTIR موردبررسی قرار گرفت. برای بررسی طیف FTIR نمونه‌ها از دستگاه Bruker مدل Tensor 27 دانشکده شیمی دانشگاه تبریز استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها ابتدا این نمونه‌ها با نسبت یک‌به‌صد با KBr خالص به‌صورت پودر یکنواخت درآورده شده سپس با استفاده از دستگاه پرس قرص شفافی از پودر مذکور تهیه شد. سپس این قرص در سل مخصوص قرار داده شد و طیف‌های با عدد موج ۵۰۰ تا $4000\ cm^{-1}$ با ۳۲ اسکن ثبت شد.

د) تهیه و تزریق هیدروژل:

پودرهای مذکور به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر استریل توسط همزن مغناطیسی حل شدند. نمونه‌های کلاژن در دمای ۴ درجه مخلوط شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در مقابل اشعه UVقرار گرفت. سپس هیدروژل‌های مذکور به سرنگ ۳ سی‌سی آسپیره شد.

در این مطالعه از موش‌های نر بالغ با وزن تقریبی بالای ۵۰ گرم استفاده شدند. موش‌ها در دمای استاندارد ۲۰ درجه سانتی‌گراد در حیوان‌خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز تحت شرایط استاندارد نگهداری شدند. برای انجام این مطالعه ۵۰۰ میکرولیتر از هیدروژل سنتز شده در فضای فلانک تزریق شد. گروه‌ها شامل: گروه کنترل (بدون تزریق)، گروه PCL-PEG-PCL + کلاژن، گروه PCL-PEG-PCL + ژلاتین و گروه PCL-PEG-PCL + آلژینات.

ه) بررسی آنزیمی:

سطوح آنزیمی در نمونه‌های سرمی به‌وسیله آنالیزر اتوماتیک بیوشیمیایی دستگاه mindray مدل BS-480 آنالیز شد. سطوح آنزیم‌های بیومارکر عملکرد کبدی و کلیوی (ALP,ALT,AST,Urea)بررسی شدند. سنجش آنزیم‌های ALT, ASTتوسط استاندارد معرفی‌شده توسط IFCC با روش فتومتریک توسط کیت پارس آزمون انجام گرفت. قرائت جذب این آنزیم‌ها در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر انجام گرفت. سنجش آنزیم ALP توسط استاندارد معرفی‌شده توسط DGKC با روش فتومتریک توسط کیت پارس آزمون انجام گرفت. قرائت جذب آنزیم در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر انجام گرفت. سنجش این آنزیم بر اساس روش اوره آز GLDH -با روش فتومتریک انجام می‌گیرد. کیت مربوط به شرکت پارس آزمون می‌باشد. قرائت جذب آنزیم در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر انجام گرفت.

و) مطالعه آسیب‌شناسی:

دو و چهار هفته پس از تزریق هیدروژل، موش‌ها ابتدا با دز بالای کتامین و زایلازین، به روش انسانی، آسان کشی شده و مورد کالبدگشایی کلاسیک قرار گرفتند. بعد از بازرسی ماکروسکوپیک اندام‌ها، از پوست ناحیه پهلو (dorsal flank) که در ابتدای این مطالعه مورد تزریق قرار گرفته بود همچنین از کبد و کلیه نمونه‌های لازم برداشته شد و در فرمالین ۱۰٪ بافره پایدار گردید. این نمونه‌ها، پس از طی کردن مراحل پروسس بافتی، در دستگاهDS2080/H Tissue Processor ، در پارافین قالب‌گیری و سپس مقاطع بافتی به ضخامت ۵ میکرون، با استفاده از میکروتوم DS4055، تهیه و به روش ماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. مطالعه میکروسکوپیک بافت‌ها توسط دامپزشک آسیب‌شناس، با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus-CH30 انجام شد.

ز)Real time PCR:

برای انجام واکنش real-time PCR مقدار ۱۰۰ الی ۲۰۰ میلی‌گرم بافت کبد نمونه‌برداری شد. سپس نمونه‌ها در داخل ۱۵۰ ماکرولیتر محلول) RNA later شرکت یکتا تجهیز، ایران) انداخته شدند و به فریزر منهای ۲۰ درجه منتقل شدند. برای استخراج RNA کل، ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها ابتدا به‌خوبی هموژن شدند و سپس با استفاده از کیت یکتا تجهیز (شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورداستفاده قرار گرفتند. مقدار ۱۰ ماکرولیتر از RNA استخراج‌شده توسط کیت سنتز) cDNA یکتا تجهیز آزما، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل

شدند. برای به‌دست آوردن بیان ژن‌های مرتبط با سمیت، پرایمرهای

SOD, F-CAT-5’……3’, R-CAT-5’…….-3’,F-SOD-5’…….-3’, R-SOD-5’……..-3’.

و ژن‌های مرتبط با ایمنی پرایمرهای BCL2, IL10, CCL2, F-CD31-5’ CGGCAAAGTGGTCAAGAGAAG -3’, R-CD31-5’ GTGGTAAGTGATGGGTGCAGT -3’, F-CCL2-5’…….-3’, R-CCL2-5’…….-3’,F-IL10-5’-……..-3’, R-IL10-5’……..-3’, F-BCL2-5’-…….-3’, R-BCL2-5’-…….-3’ مورداستفاده قرار گرفت.

مقدار ۱۰ ماکرولیتر از محلول مسترمیکس سایبرگرین (Real time PCR یکتا تجهیز آزما، ایران)، به همراه ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (فوروارد و ریورز) و با ۱ ماکرولیتر از cDNA سنتز شده، حجم نهایی واکنش با استفاده از آب مقطر به ۲۰ ماکرولیتر رسانده شد و واکنش با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q(.USA.QIAGEN) انجام شد. درنهایت با استفاده از CT های گرفته شده از دستگاه، بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه نسبت به ژن خانه‌دار بتا اکتین و با استفاده از نرم‌افزار REST مورد ارزیابی و آنالیز قرار گرفتند.

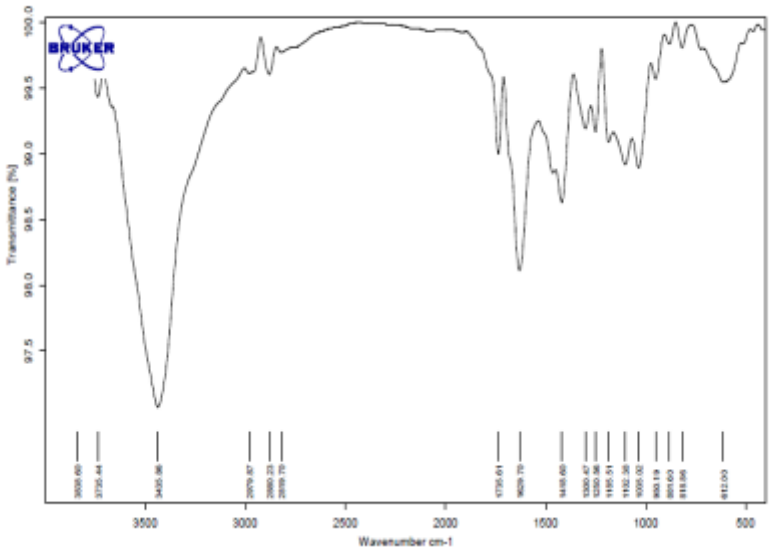
ح) آنالیز آماری:

در مطالعه حاضر نتایج به‌صورت mean±SD بیان و $P<0.05$ به‌صورت معنی‌دار تلقی شد. برای آنالیز آماری از نرم‌افزار spss ورژن ۲۱ استفاده شد.

یافته‌ها

الف) نتایج:FTIR

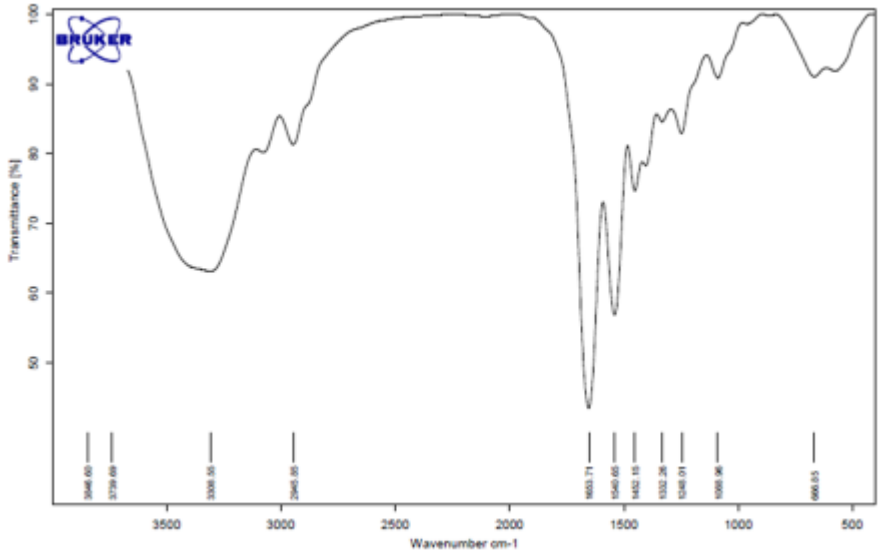
پیک FTIR مربوط به PEG-PCL –PCL + کلاژن نشان‌دهنده گروه‌های عاملی تشکیل‌دهنده شاخص قسمت PEG،PCL و کلاژن می‌باشد. ظهور پیک در ناحیه cm-1 1727مربوط به گروه کربونیل استری (C=O)کاپرولاکتون می‌باشد. پیک ناحیه $1640\ cm^{-1}$ مربوط به گروه‌های آمینی موجود در کلاژن و پیک ناحیه $1000\text{-}1100\ cm^{-1}$ مربوط به گروه اتری (C-O-C) پلی‌اتیلن گلیکول می‌باشد. پیک قوی در ناحیه cm-13435 مربوط به گروه هیدروکسیل انتهای زنجیر پلی کاپرولاکتون و آمین کلاژن می‌باشد. ظهور پیک ناحیه $2868\text{-}2930\ cm^{-1}$مربوط به CH های آلیفاتیک زنجیره پلیمری می‌باشد (تصویر ۱).



تصویر (۱): FTIR داربست PCL-PEG-PCL + کلاژن

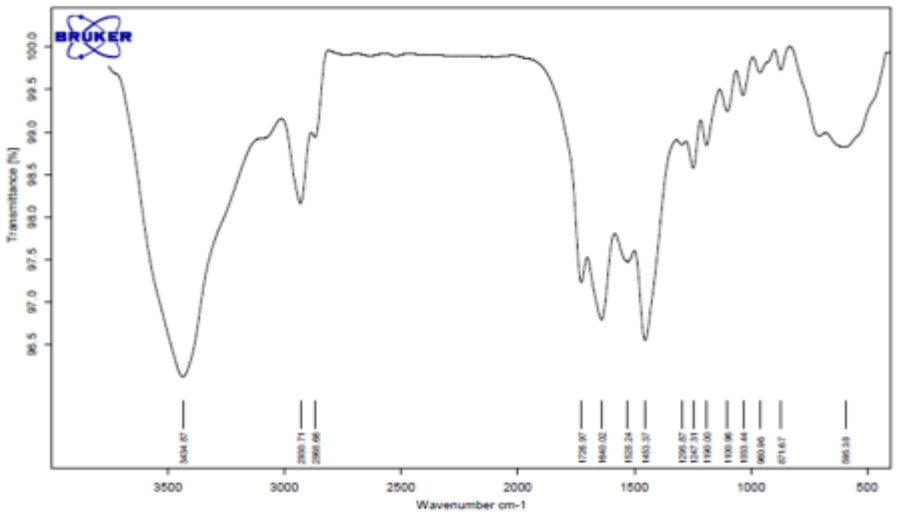
پیک FTIR نمونه ژلاتین PCL-PEG-PCL+ حضور پیک‌های شاخص کربونیل استری پلی کاپرولاکتون، پیک اتری مربوط به پلی‌اتیلن گلیکول و پیک آمینی گروه‌های آمینواسیدی ژلاتین به ترتیب در نواحی $۱۶۵۳cm^{-1}$، ۱۵۴۰،

۱۰۸۸ ظاهر شد. پیک پهن در ناحیه $۳۵۰۰-۳۲۰۰ cm^{-1}$ مربوط به گروه هیدروکسیل انتهای زنجیر کوپلیمر PCL-PEG-PCLو گروه‌های آمینی ژلاتین می‌باشد. گروه‌های CH آلیفاتیک زنجیر پلیمری در ناحیه $۲۹۰۰-۲۸۰۰ cm^{-1}$ ظاهر شدند (تصویر ۲).



تصویر (۲): FTIR داربست PCL-PEG-PCL + ژلاتین

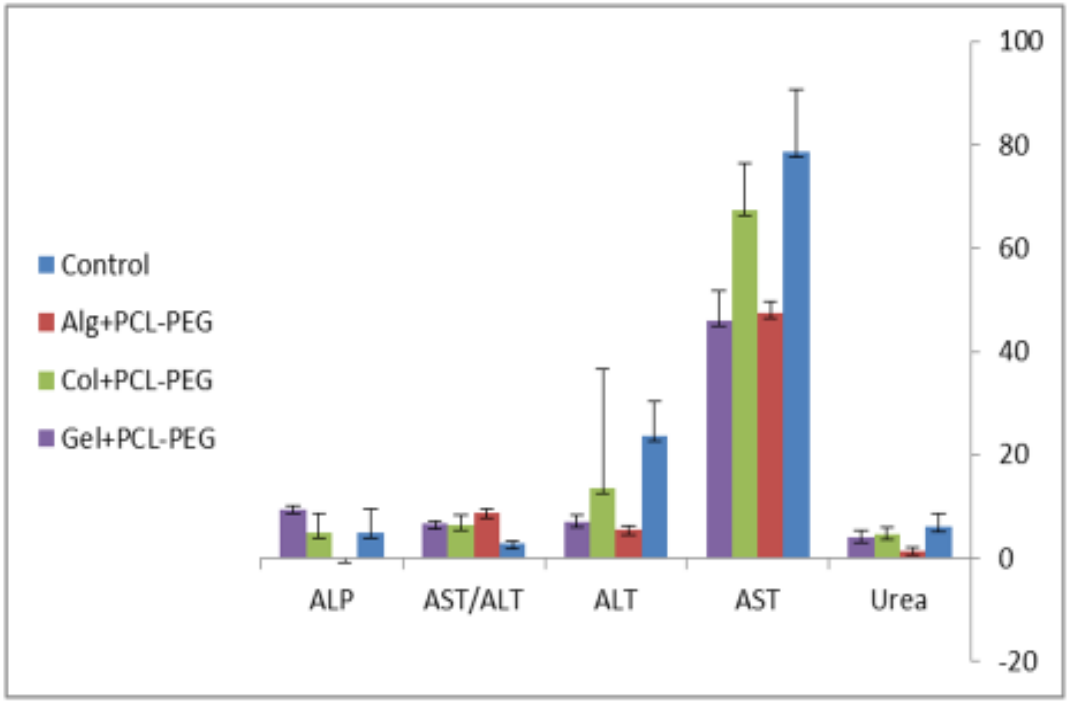
در پیک FTIR نمونه آلژینات +PCL-PEG-PCL حضور پیک‌های شاخص در نواحی cm-1 ۱۷۳۵، ۱۱۰۰ و ۳۴۳۵ به ترتیب مربوط به گروه‌های اتری پلی‌اتیلن گلیکول، گروه کربونیل استری پلی کاپرولاکتون و گروهای هیدروکسیل اسیدی آلژینات می‌باشد. همچنین ارتعاشات کششی گروه‌های کربوکسیل آلژینات در $۱۶۳۰ cm^{-1}$ و ۱۴۱۹ ظاهر شد.



تصویر (۳): FTIR داربست PCL-PEG-PCL + آلژینات

ب) نتایج آنزیمی:

آلانین آمینوترانسفراز ((ALT، استاندارد طلایی برای تشخیص آسیب کبدی محسوب می‌شود. نسبت (AST) آسپارتات آمینوترانسفراز به ALT می‌تواند آسیب کبدی را از سایر احتمالات تمییز نماید. تغییرات آلکالین فسفاتاز (ALP) بیانگر آسیب غشای سلولی (خصوصاً آسیب غشای سلول‌های کبدی)، کولستاز ناشی از داروها و آسیب استخوانی است ALT و AST آنزیم‌هایی هستند که در کبد تولید می‌شوند که در ارتباط با متابولیسم آمینواسیدها هستند. میزان اوره در گروه PCL-PEG-PCL+ کلاژن بیش‌تر از سایر گروه‌ها است (۱/۶۶ برابر گروه کنترل)، در مورد ALP گروه دریافت کننده-PCL+ PEG-PCL ژلاتین بالاتر از سایر گروه‌ها بوده (۱/۹ برابر گروه PCL-PEG-PCL+ کلاژن (، همچنین نسبت AST به ALT در گروه آلژینات PCL-PEG-PCL +بالاتر از سایر موارد است (۲/۹ برابر گروه کنترل) اختلاف بین این گروه‌ها (آنالیز بیوشیمیایی خون) ازلحاظ آماری معنی‌دار نبود (تصویر ۴).



تصویر (۴): آنالیز بیوشیمیایی خون در موش‌های با ایمپلنت داربست هیدروژلی بعد از گذشت ۳۰ روز

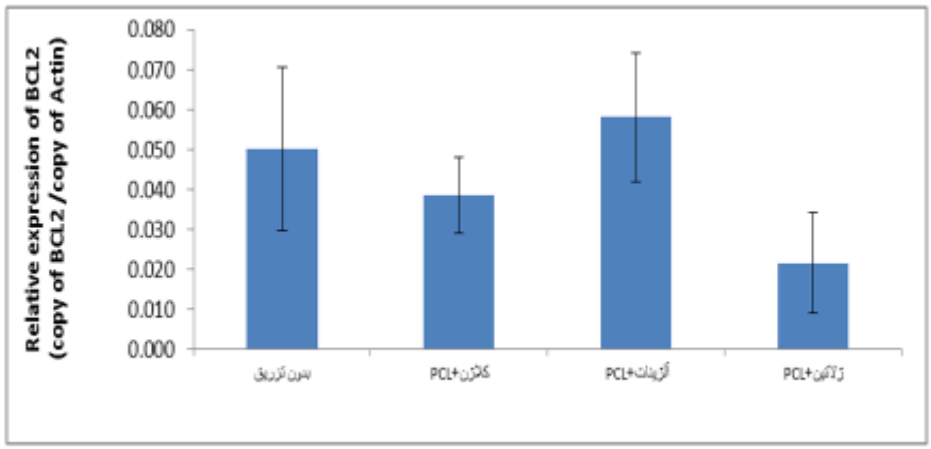
ج) نتایج:Real time PCR

بیان ژن‌هایCD31 ، BCL2، IL10، SOD، CCL2و کاتالاز در گروه‌های کنترل (بدون تزریق)،PCL-PEG-PCL + آلژینات، کلاژنPCL-PEG-PCL +، PCL-PEG-PCL + ژلاتین نسبت به ژن بتا اکتین بررسی شد. در گروه دریافت کننده PCL-PEG-PCL + آلژینات، ژن‌هایSOD ، CATو CD31بیان بیش‌تر و معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها نشان دادند (تصاویر ۱۰-۵). بیان ژن CCL2 در گروه دریافت کننده PCL-PEG-PCL + کلاژن بالاتر از سایر گروه‌ها بود ولی معنی‌دار نبود (تصویر ۷) .

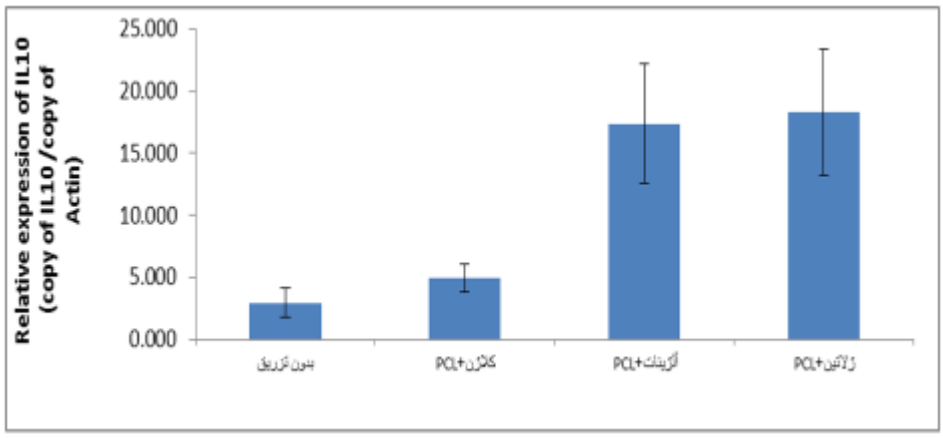
ژن IL10 نیز گروه‌های دریافت کننده -PCL-PEG + PCLکلاژن و PCL-PEG-PCL + ژلاتین بیان خیلی بالاتر و معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها نشان دادند باشد (P<۰،۰۰۱) (تصویر ۶).

ژن‌هایSOD ، CATوCD31 ، در گروه-PCL-PEG + PCL آلژینات به ترتیب ۱۰/۸، ۳/۳ و ۳/۵ برابر نسبت به ژن بتا اکتین بیان بیشتری را نشان دادند و این تفاوت با دیگر گروه‌های مورد مطاله معنی‌دار گزارش شد (P<۰،۰۰۱) (تصاویر ۱۰-۸).

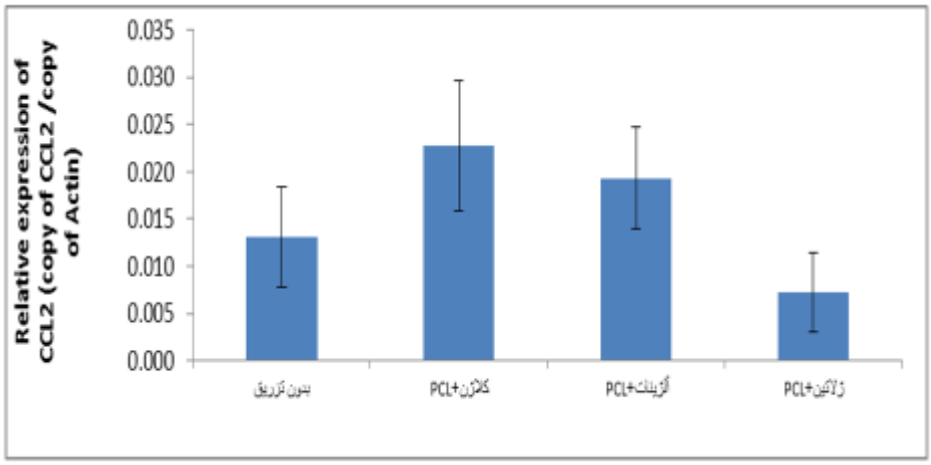
بیان ژن CCL2 در گروه PCL-PEG-PCL + کلاژن 7/1برابر نسبت به ژن بتا اکتین ارزیابی شد اما با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.



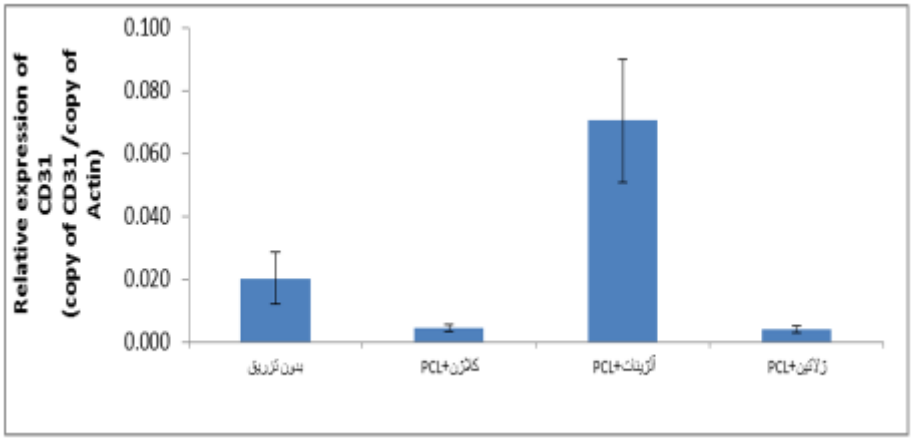
تصویر (۵): بیان ژن BCL2 در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



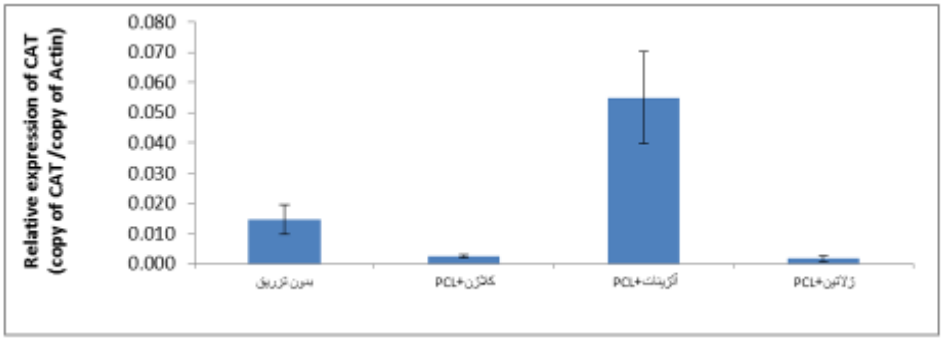
تصویر (۶): بیان ژن IL 10 در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



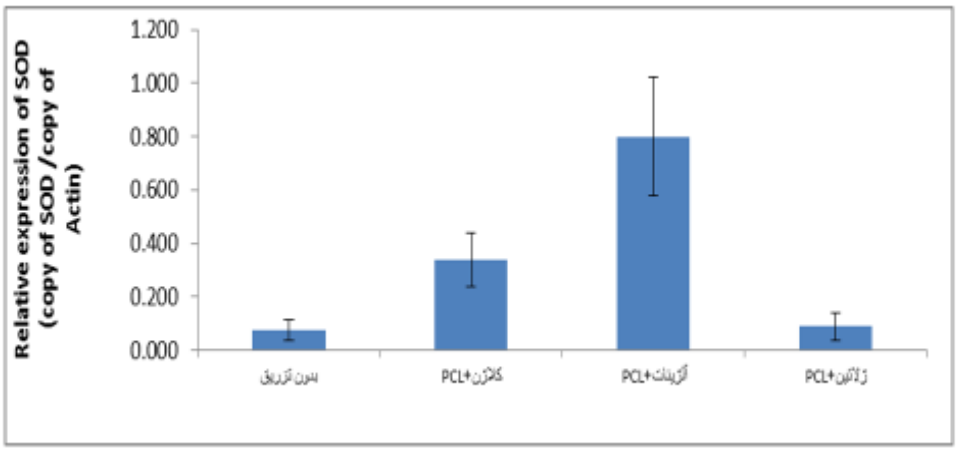
تصویر (۷): بیان ژن CCL2 در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



تصویر (۸): بیان ژن CD31 در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



تصویر (۹): بیان ژن CAT در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



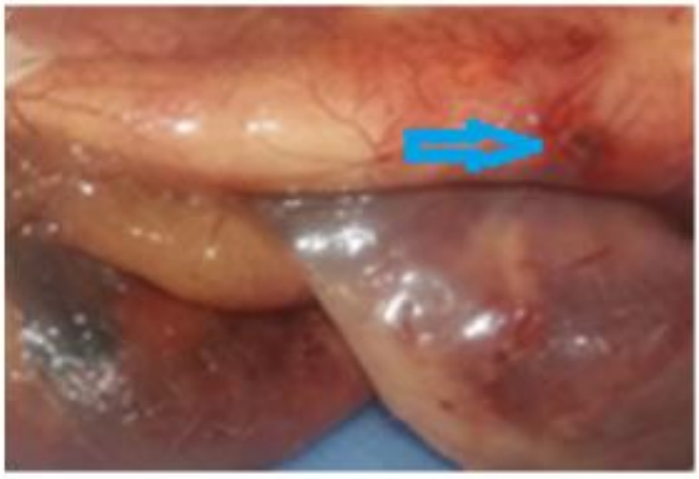
تصویر (۱۰): بیان ژن SOD در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه

د) نتایج هیستولوژیک:

در بازرسی خارجی و بررسی ماکروسکوپیک اندام‌ها، نشانه‌ای از بروز عوارض سیستمیک از قبیل شوک، سپتی سمی،

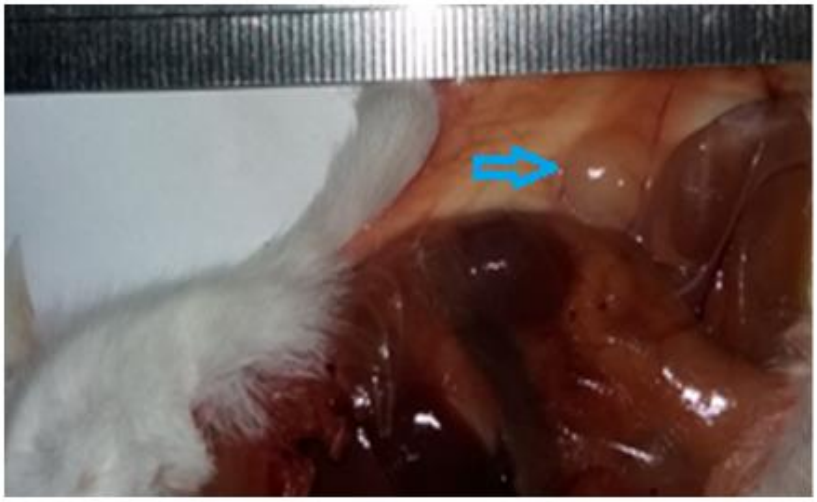
توکسمی و یا واکنش‌های التهابی گسترده در هیچ‌یک از گروه‌ها مشاهده نشد.

تنها ضایعه قابل ذکر د که در برخی از موشها مشاهده گردید درجاتی از پرخونی زیر جلدی در ناحیه تزریق و عضلات ناحیه مجاور بود. در بسیاری از حیوانات مورد مطالعه، قسمت عمده مواد تزریق شده جذب و بخشی از آنها که جذب نشده بود به‌صورت کانون‌های کوچک گرد در ناحیه زیر جلد قابل مشاهده بود بدون آن که چسبندگی شدیدی به ناحیه غشاء پایه یا لایه عضلانی داشته باشد. این توده‌ها از نظر قوام نرم و از ۲ تا ۸ میلی متر قطر داشتند و پس از برش دادن تنها حاوی بقایای ماده تزریق شده بودند. در هیچ‌یک از این توده‌ها، تجمع چرک و تشکیل آبسه‌های جرکی، تغییرات نکروز و خونریزی گسترده و یا نکروز و یا آثار التهاب گرانولوماتوزی شدید نظیر انباشت اکسودای کازئوس و کلسیفیکاسیون دیده نشد (تصاویر ۱۱ الی ۱۳). در بسیاری از موشها پس از دو هفته کانون‌های تجمع مواد تزریق شده قابل مشاهده بود اما پس از ۴ هفته (در گروه PCL-PEG-PCL+ کلاژن)، این کانون‌ها از بین رفته بود یا به کانون‌های بسیار کوچک تبدیل شده بود.



تصویر (۱۱): تصویر ماکروسکوپیک از یک سر موش از گروه PCLPEG-PCL+ کلاژن، در تصویر پرخونی در ناحیه تزریق، زیر جلد و عضلات و احشاء مشاهده می‌شود (فلش).

تصویر (۱۲): کالبدگشایی یک سر موش از گروه PCL-PEG-PCL+کلاژن دو هفته بعد از تزریق، هیدروژل تزریق شده دارای با قوامی سفت‌تر و به قطر ۷/۵ میلی متر قابل مشاهده است (فلش).



تصویر (۱۳): کالبدگشایی یک سر موش از گروه PCLPEG-PCL+ کلاژن چهار هفته بعد از تزریق، توده نرم حاوی هیدروژل تزریق‌شده با قطر هشت میلی‌متر دیده می‌شود (فلش).

بحث

به علت تخریب تدریجی پلی کاپرولاکتون در شرایط in vivoدر طول ۲-۴ سال، قدرت مکانیکی مناسب، زیست سازگاری با انواع سلول، عدم واکنش‌های التهابی (پلی کاپرولاکتون بر خلاف پلی لاکتاید و گلیکولاید در طی تخریب منجر به تولید اسید نمی‌شود) (۱۲، ۱۳). PCL به‌صورت گسترده‌ای به‌عنوان ماده اولیه داربست‌ها برای مهندسی بافت مورد ارزیابی واقع‌شده است (۱۴-۱۶). از طرف دیگر وقتی صحبت از مهندسی بافت می‌شود، PCL از برخی کاستی‌ها رنج می‌برد مانند هیدروفوب (آب گریز) بودن این ماده و نبود موتیف های مولکولی برای تشخیص سلولی سبب ضعف در اتصال و تکثیر سلولی می‌شود بنا به مطالعات، سلول‌های اندکی روی این ماده اتصال و تکثیر می‌یابند(۱۷). بنابراین دست یافتن به روشی که بتواند میانکنش سطحی PCL با سلول‌ها را بهبود دهد برای ما مطلوب خواهد بود. به‌منظور بهبود هیدروفیلیسیتی (آب دوستی) و ویژگی‌های فعالیت فیزیولوژیکی پلی کاپرولاکتون از روش اصلاح سطحی آن استفاده می‌شود. برای اصلاح سطحی از روش‌های متنوعی ازجمله تشعشعUV ، استفاده از پلاسما، استفاده از اوزون و آمینولیزیز استفاده می‌شود(۹، ۱۰). درواقع این عوامل سبب به حرکت درآوردن مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی مثل کلاژن و ژلاتین و یا سکانس‌های کوچک پپتیدهای فعال مثل RGD (Arg-Gly-Asp) بر روی سوبسترای PCL به‌منظور تحریک میانکنش سلولی می‌شود. کلاژن تیپ یک در بدن موجودات به‌صورت نانو فیبر است که این نانو فیبر دارای جایگاه اتصالی سلولی شامل RGD و GFOGER (Gly-Phe-HYP-GLY-GLU-ARG)می‌باشد که باعث اتصال فیبروبلاست به کلاژن می‌شود. کلاژن همچنین باعث سنتز پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌شود؛ به‌طوری‌که سبب بهبودترمیم پوست می‌شود. ویژگی‌های ذکرشده باعث می‌شود که کلاژن برای ساخت داربست¬های مهندسی بافت پوست مناسب باشد. در مطالعه گواتام و همکاران در سال ۲۰۱۴، اتصال خوب، تکثیر بالا و مهاجرت بالای سلول‌های L929 فیبروبلاست موش در داربست ژلاتین+ پلی کاپرولاکتون+کلاژن(۱٪) مشاهده شد. (۹-۱۱)

واکنش‌هایی که منجر به تولید کربوکسیل فعال‌شده سبب می‌شود که این گروه عاملی با ماکرو مولکول‌های بیولوژیکی ارتباط برقرار کند و موجب بهبود سازگاری ماده با سلول شود. به‌طورکلی این اصل پذیرفته‌شده است که سطح پلیمر با هیدروفیلیسیتی متوسط و زاویه تماس بین ۴۰ تا ۷۰ درجه و نانو توپوگرافی سخت برای اتصال و تکثیر سلولی مناسب است. گروه‌های سطحی عملکردی تأثیر زیادی بر روی نتایج تکثیر سلولی می‌گذارند. برای مثال COOH با بار منفی در برابر اتصال سلول و پروتئین از خود مقاومت نشان می‌دهد (قطب‌های هم نام همدیگر را دفع می‌کنند). جالب این‌که تحرک بالای زنجیره‌های هیدروفیلیک نیز سبب اتصال کند سلولی می‌شود. از طرفی پلیمرهای زیستی طبیعی ازجمله هیالورونیک اسید،

آلژینات، کلاژن، کیتوزان و الاستین تخریب پذیری وابسته به آنزیم (تحت کنترل آنزیم) دارند. همچنین این پلیمرهای طبیعی زیست سازگاری مناسب، پتانسیل التهابی پایین، تنوع شیمیایی بالا و همچنین شباهت بالایی با ماتریکس خارج سلولی دارند. زمانی که مثلاً کلاژن به PCL متصل می‌شود اتصال و رشد سلولی بهبود می‌یابد. در توجیه این مطلب بایستی گفته شود که موتیف¬های زیست فعال بر روی کلاژن سبب ویژگی‌های مذکور شده است. اتصال بین کلاژن و PCL از طریق COOH اتفاق می‌افتد ولی ممکن است کلاژن به PCL با این گروه عاملی نچسبد و به‌صورت پخش روی PCL را بپوشاند.(۱۰،۱۱) در مطالعه حاضر اثر متقابل بین کلاژن و PCL-PEG-PCLمطلوب گزارش شد. احتمالاً این اثر متقابل مطلوب ناشی از همپوشانی مزایای این پلیمرها با معایب پلیمر دیگر بود به‌طوری‌که کلاژن توانسته بود میزان سمیت ناشی از PCL-PEG-PCLرا کاهش دهد و ارتباط مناسب با سلول‌های بدن را برقرار کند به‌طوری‌که ماده تزریقی به‌عنوان جسم خارجی تلقی نشود؛ از طرف دیگر PCL-PEG-PCL توانسته بود ضعف مکانیکی کلاژن و پایداری پایین آن را رفع سازد.

جذب آب کافی برای بسیاری از داربست‌ها ضروری است. به خاطر این‌که می‌تواند در جذب مایعات بدن و انتقال مواد مغذی و متابولیت ها کارایی لازم را ایفا کند درنتیجه سبب تکثیر و ترمیم بافت آسیب‌دیده شود.(۱۰) در مطالعه حاضر نیز هر دو داربست ترکیبی قابلیت حل شدن در حلال‌های آبی را داشتند.

تشکیل ژل در برخی مطالعات به‌وسیله سرد کردن محلول اتفاق می‌افتد. سرعت تشکیل ژل نقش مهمی در بستن ژل در ناحیه مذکور و همچنین در انتقال سلول حائز اهمیت است. یوان و همکاران در سال ۲۰۱۲ از هیدروژل گلوکوزیل – نوکلئوزیل فلورونید (GNF) استفاده کردند. هیدروژل GNF به‌وسیله سرد کردن تبدیل به ژل می‌شود همچنین این تبدیل به آهستگی اتفاق می‌افتد. این هیدروژل قابلیت تزریق داشته و همچنین در ناحیه تزریق‌شده می‌بندد. هیدروژل¬هایی که پایه GNF دارند تخریب پذیری نسبتاً پایینی از خود نشان می‌دهند. به‌دلیل تخریب پذیری پایینی که دارند در مهندسی بافت استخوان اسفنجی مناسب هستند.(۱۱)

یکی از دلایلی که نتایج ناشی از زیست سازگاری و واکنش ایمنی در مطالعات مختلف نتایج یکسانی به بار نمی‌دهد تفاوت در نحوه پردازش و ساخت این مواد است. تکنیک‌های مختلف سنتز داربست سبب ایجاد سایز حفرات مختلفی می‌شود. ازجمله تکنیک‌های ساخت داربست می‌توان به: گاز کف، فروشویی ذره‌ای و قالب‌گیری حلال، اتصال رشته‌ای، روش حرارتی ناشی از جداسازی دو فاز اشاره کرد. مهم‌ترین ضعفی که این تکنیک‌ها دارند اندازه متفاوت حفرات ایجادشده است و حفرات دقیقاً به یک اندازه نیستند. از طرفی سایز حفرات در ورود عروق به داخل داربست و رشد و تکامل عروق داخل داربست نقش حائز اهمیتی دارد (۱۸، ۱۹).

ترکیب پلیمرها در جذب سلول‌های ایمنی حائز اهمیت است. در اتصالات سلولی سلکتین¬ها به پلیمرهای کربوهیدراتی نظیر کیتوزان و آلژینات اتصال می‌یابند. بنابراین سلول‌های ایمنی بدن ازجمله نوتروفیل به این پلیمرها جذب می‌شوند. در مطالعه‌ای که وندرورد در سال ۲۰۰۲ انجام داد نشان داد که نوتروفیل ها در هفته اول، دوم و چهارم به سمت داربست کیتوزانی ارتشاح یافته بودند. نوتروفیل ها نه‌تنها در هفته اول (به خاطر فاز حاد التهاب) بلکه در هفته‌های بعدی نیز در محل داربست وجود داشتند. بااینکه نوتروفیل ها در محل داربست حضور داشتند (نوتروفیل ها آنزیم لیزوزیم ترشح می‌کنند) ولی نتوانسته بودند سبب تخریب داربست مذکور شوند. ماده مذکور بعد از ۱۲ هفته یکپارچگی خود را حفظ کرده بود. بعد از ۴ هفته از ایمپلنت ماده مذکور جمعیت سلولی از ماکروفاژ به فیبروبلاست تغییر یافت. در هفته‌های آخر مطالعه جمعیت سلولی متنوعی ازجمله منوسیت، ماکروفاژ و سلول‌های غول‌پیکر حضور داشتند؛ بااین‌حال اکثریت سلول‌ها را فیبروبلاست ها تشکیل می‌دادند. رسوب کلاژنی همراه با تغییراتی در ظاهر سلول‌ها مشاهده شد بااین‌حال کلاژن داخل ایمپلنت رسوب نکرده بود.(۱۸)

واکنش ایمنی و نوع التهاب نسبت به زیست-مواد بایستی به‌خوبی و به دقت قبل از استفاده در انسان، شناسایی و تعیین شود. پلیمرهای طبیعی در بدن می‌توانند سبب آلرژی و التهاب شدید در میزبان شوند (۲۰) .در مطالعه وندورد در سال ۲۰۰۲ بعد از ایمپلنت داربست کیتوزانی ارتشاح بالای سلول‌های التهابی مشاهده شد. یکی از دلایل واکنش ایمنی نسبت به زیست مواد آلودگی منبع اولیه استفاده‌شده در مطالعه است. به‌خصوص این نوع آلودگی در مواد پلی-ساکاریدی به خصوص آلژینات گزارش‌شده است(۱۸) .در مطالعه راکر و همکاران در سال ۲۰۰۶، بعد از ایمپلنت داربست متخلخل هیدروژلی التهاب شدیدی در ناحیه زیر جلد موش Balb/c مشاهده شد که به‌دلیل رشد ناکافی عروق تازه تشکیل‌شده میزبان بود .(۱۹)در بررسی ارتشاح ماکروفاژ توسط تکنیک ایمونوهیستوشیمی ماکروفاژهای مشخصی اطراف داربست مشاهده شدند. ماکروفاژها می‌توانند سبب تخریب و جذب زیست ماده شوند

هرچند ماکروفاژها در تحریک آنژیوژنز نیز مؤثرند. در مطالعه راکر و همکاران در سال ۲۰۰۶ سلول‌های چندهسته‌ای (PMNs)در گروه داربست متخلخل PLGA مشاهده نکردند. احتمالاً عدم مشاهده این سلول‌ها به خاطر نبود التهاب شدید در این گروه است. درحالی‌که در گروه هیدروژل التهاب شدیدی که سلول‌های گلبول سفید به همدیگر اتصال یافته (تشکیل سلول‌های غول پیکر) و سبب تخریب بافتی شده بودند مشاهده شد(۱۹).

زیست‌تخریب‌پذیری یک داربست داخل بدن دارای اهمیت است. به‌دلیل این‌که بعد از رشد سلولی و تکثیر کافی سلول‌ها و اتصالات سلولی و ترمیم بافتی حضور ماده خارجی می‌تواند مانع از عملکرد صحیح سلول‌ها و بافت‌ها شود. تخریب عامل خارجی در بدن به فرآیندهای شیمیایی، بیولوژیکی و مکانیکی وابسته است. تغییرات شیمیایی و فیزیکی که سبب کاهش برخی ساختارهای ترکیبات طبیعی می‌شود و یا سبب افزایش آب‌دوستی ترکیب می‌شود سبب کاهش زمان تخریب پذیری ماده موردنظر می‌شود. مارتسون و همکاران پیشنهاد کردند که برای تخریب کامل اسفنج سلولزی در حالت in vivo بیش از ۶۰ هفته زمان نیاز است(۲۱، ۲۲).

مدل آزمایشگاهی موش دارای یک سری برتری‌ها نسبت به سایر حیوانات در این مطالعه است. ژنتیک موش به‌خوبی شناسایی‌شده از طرفی آنتی‌بادی‌های فراوانی علیه فاکتورهای رشد مختلف وجود دارد؛ همچنین گیرنده‌های اتصال سلولی در موش مشخص است. علاوه بر همه این‌ها موش‌ها به لحاظ اقتصادی نیز به‌صرفه هستند .ناحیه dorsal skin fold chamberدر موش دارای یک سری مزیت‌ها برای تزریق زیر جلدی زیست مواد هست. علت تزریق به ناحیه dorsal موش، خون‌رسانی مناسب این ناحیه است. به‌طوری‌که در مطالعاتی که مربوط به آنژیوژنز زیست مواد یا داربست‌ها بوده است از این ناحیه بارها استفاده‌شده است. از طرفی در مطالعات مربوط به زیست سازگاری و واکنش ایمنی مواد خارجی معمولاً از این ناحیه در موش استفاده می‌شود بنابراین امکان مقایسه بین مطالعات امکان‌پذیر می‌شود(۱۹) .

در مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات مختلف هیدروژل‌های کلاژنPCL-PEG-PCL +، ژلاتین PCL-PEG-PCL +و آلژینات PCL-PEG-PCL +یک ماه پس از تزریق ارزیابی شدند. به‌منظور بررسی آنالیز بیوشیمیایی خون فاکتورهای ALT، AST، ALP، AST/ALTو اوره بررسی شد. تفاوت این فاکتورها بین گروه‌های مختلف معنی‌دار گزارش نشد. برای بررسی اثرات سمیت هیدروژل‌ها ارزیابی هیستوپاتولوژیکی کبد و کلیه مورد مطالعه قرار گرفت. جهت ارزیابی اثرات التهابی این داربست‌ها از اینترلوکین ۱۰ (پروتئین ضدالتهابی)، CCL2 (کموکئین پیش التهابی) استفاده شده همچنین ارزیابی هیستوپاتولوژیکی ناحیه تزریق مشاهده شد. برای بررسی رگ زایی و خاصیت ضدآپوپتوزی این مواد نیز به ترتیب فاکتور CD31و BCL2 موردبررسی واقع گرفت. در نهایت به‌منظور بررسی اثرات اکسیداتیو پلیمرهای ترکیبی مذکور از کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز بهره برده شد.

اینترلوکین ۱۰ در مقاومت محیطی نسبت به آلرژن ها حیاتی است. این سیتوکین باعث ممانعت از محرک‌های مولکول‌های MHC کلاس دو در سلول‌های ماکروفاژ و سلول‌های دندرتیک می‌شود. به خاطر این عمل اینترلوکین ۱۰ مانع از فعال شدن سلول‌های T و خاتمه واکنش ایمنی سلولی وابسته به سلول T می‌شود؛ این در حالی است که این سیتوکین سبب پولاریزه شدن و فعال شدن ماکروفاژ M2 می‌شود (فعال شدن ایمنی همورال در رد پیوندهای مختلف افزایش بیان-IL 10مشاهده شده است(۲۳، ۲۴). در مطالعه حاضر در گروه کنترل و کلاژن PCL-PEG-PCL + میزان بیان این ژن چهار برابر کم‌تر از گروه‌های آلژینات PCL-PEG-PCL +و ژلاتین PCL-PEG-PCL +است.

CCL2کموکئینی پیش التهابی است که در شکل گیری سلول‌های غول پیکر ناشی از جسم سلولی (FBGCs) نقش دارد و توسط ماکروفاژ فعال شده ترشح می‌شود که خود سبب جذب مونسیت-ماکروفاژ می‌شود. حضور اندوتوکسین نیز در ترکیب داربست از طریق مسیر TLR4 سبب ترشح CCL2 می‌شود. از طرف دیگر این ترکیب پیش التهابی را با فیبروزیز مرتبط می‌دانند. با توجه به این که این ترکیب پیش التهابی بوده و احتمالاً در چند روز اول تزریق میزان بالایی داشته و بعد از یک ماه میزان این ترکیب در گروه‌های مختلف این مطالعه چشمگیر نمی‌باشد(۲۵-۲۷).

CD31 (PECAM-1)مارکر سلول‌های اندوتلیال و نشان دهنده رگزایی است. در کبد این فاکتور با رگزایی سینوزوئیدها مرتبط می‌باشد. یکی از ویژگی‌های کارسینومای کبدی رگزایی بالای سینوزوئیدهاست که این فاکتور می‌تواند در پیش آگهی کارسینوما در کنار سایر عوامل مفید باشد. در مطالعه حاضر میزان بیان ژن آلژینات PCL-PEG-PCL +بیش‌تر از سایر گروه‌ها گزارش شده است.(30-28).

BCL2مارکر پیش آپوپتوتیک مرتبط با مرگ سلولی می‌باشد. در افزایش آپوپتوز میزان این مارکر کاهش می‌یابد. ارتباط این مارکر با سیتوکین ها معکوس عنوان شده است

به‌طوری که با افزایش سیتوکین هایی نظیر TNF-α و IL-6 بیان این ژن کاهش یافته است؛ از طرف دیگر در آسیب کبدی نیز بیان این ژن کم‌تر گزارش شده است. در مطالعه حاضر نیز با وجود بیان بالای اینترلوکین ۱۰، این مارکر ضدآپوپتوزی بیان کم‌تری داشته است(۳۱، ۳۲).

آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز نقش مهمی در بالانس ردوکس در موجودات زنده با برداشت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) انجام می‌دهند. افزایش ROS در موجودات زنده می‌تواند به استرس اکسیداتیو منجر می‌شود که آن هم سبب آسیب به مولکول‌های زیستی بدن می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود. فرآیند ترمیم زخم در بدن سبب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و از طرفی فعالیت آنزیم‌ها و عوامل آنتی‌اکسیدان نیز همزمان بیش‌تر می‌شود؛ عدم بالانس بین این عوامل، می‌تواند منجر به تأخیر درترمیم بافت مورد نظر شود. در مطالعات مختلفی کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اطراف ایمپلنت‌های فلزی گزارش شده است بنابراین ایمپلنت‌های غیرفلزی نظیر هیدروژل‌های این مطالعه از این جهت برای بدن سودمند است. در مطالعه حاضر نیز بدن موش با گذشت یک ماه از ایمپلنت هیدروژل فقط در گروه آلژینات+ PCL-PEG-PCL توانسته تولید ژن‌های مسئول تولید این آنزیم‌ها را بالا نگه داشته تا آسیب‌های اکسیداتیو را به حداقل برساند(۳۳-۳۵) .

نتیجه‌گیری

درمجموع، با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که داربست کلاژن + PCL-PEG-PCL در بدن موش به‌صورت زیست سازگار محسوب می‌شود. این داربست یک ماده غیر سمی محسوب شده که می‌توان در مطالعات بعدی با بیوگلسها و مواد معدنی استخوان ساز مانند هیدروکسی آپاتایت، نانو سیلیکاها و زئولیت‌ها ترکیب کرد و سمیت آن را مورد مطالعه قرار داد و در صورت عدم سمیت در ترکیب با مواد معدنی ذکر شده جهت ترمیم بافت استخوان به‌کاربرده شود. بااین‌حال جهت استفاده بالینی از این داربست هیدروژلی نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه وجود دارد تا درنهایت بتوان در انسان و دام‌های خانگی از این داربست استفاده شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با کد اخلاق IR.TBZMED.REC.11960512 در دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسیده است.

References:

1. Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. Biomater 2016;86:68-82.
2. Sánchez P, Pedraz J, Orive G. Biologically active and biomimetic dual gelatin scaffolds for tissue engineering. Int J Biol Macromol 2017;98:486-94.
3. Farzin A, Fathi M, Emadi R. Multifunctional magnetic nanostructured hardystonite scaffold for hyperthermia, drug delivery and tissue engineering applications. Mater Sci Eng C 2017;70:21-31.
4. Islam A, Yasin T, Gull N, Khan SM, Sabir A, Munawwar MA, et al. Fabrication and performance characteristics of tough hydrogel scaffolds based on biocompatible polymers. Int J Biol Macromol 2016;92:1-10.
5. Nayak KK, Gupta P. In vitro biocompatibility study of keratin/agar scaffold for tissue engineering. Int J Biol Macromol 2015;81:1-10.
6. Atala A, Mooney DJ. Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Springer Science & Business Media; 1997.
7. Cheung H-Y, Lau K-T, Lu T-P, Hui D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. Compos B Eng 2007;38(3):291-300.
8. Naahidi S, Jafari M, Logan M, Wang Y, Yuan Y, Bae H, et al. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. Biotechnol Adv 2017;35(5):530-44.
9. Gautam S, Chou C-F, Dinda AK, Potdar PD, Mishra NC. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. Mater Sci Eng C 2014;34:402-9.
10. Kim MS, Kim G. Three-dimensional electrospun polycaprolactone (PCL)/alginate hybrid composite scaffolds. Carbohydr Polym 2014;114:213-21.

11. Yuan S, Xiong G, Wang X, Zhang S, Choong C. Surface modification of polycaprolactone substrates using collagen-conjugated poly (methacrylic acid) brushes for the regulation of cell proliferation and endothelialisation. J Mater Chem 2012; 22(26):13039-49.
12. Nagy NZ, Varga Z, Mihály J, Kasza G, Iván B, Kiss É. Highly efficient encapsulation of curcumin into and pH-controlled drug release from poly (e-caprolactone) nanoparticles stabilized with a novel amphiphilic hyperbranched polyglycerol. Express Polym Lett 2020;14(1): 90-101.
13. Grossen P, Witzigmann D, Sieber S, Huwyler J. PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. J Control Release 2017;260:46-60.
14. Kang J-H, Kaneda J, Jang J-G, Sakthiabirami K, Lui E, Kim C, et al. The Influence of Electron Beam Sterilization on In Vivo Degradation of β-TCP/PCL of Different Composite Ratios for Bone Tissue Engineering. Micromachines 2020;11(3):273.
15. Tran N, Le A, Ho M, Dang N, Huong TT, Truong L, et al.Polyurethane/polycaprolactone membrane grafted with conjugated linoleic acid for artificial vascular graft application. Sci Technol Adv Mater 2020;21(1):56-66.
16. de Siqueira-Santos R, Sardella-Silva G, Nascimento M, de Oliveira LT, Coelho-Sampaio T, Ribeiro-Resende V. Biological activity of laminin/polylaminin-coated poly-Ɛ-caprolactone filaments on the regeneration and tissue replacement of the rat sciatic nerve. Mater Today Bio 2019;3:100026.
17. Hajiali F, Tajbakhsh S, Shojaei A. Fabrication and properties of polycaprolactone composites containing calcium phosphate-based ceramics and bioactive glasses in bone tissue engineering: a review. Polym Rev 2018;58(1):164-207.
18. VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. J Biomed Mater Res 2002;59(3):585-90.
19. Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, et al. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. Biomater 2006;27(29):5027-38.
20. Ziane S, Schlaubitz S, Miraux S, Patwa A, Lalande C, Bilem I, et al. A thermosensitive low molecular weight hydrogel as scaffold for tissue engineering. Eur Cell Mater 2012;23:147-60.
21. Märtson M, Viljanto J, Hurme T, Laippala P, Saukko P. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. Biomater 1999;20(21):1989-95.
22. Märtson M, Viljanto J, Hurme T, Saukko P. Biocompatibility of cellulose sponge with bone. Eur Surg Res 1998;30(6):426-32.
23. Alhamdi JR, Peng T, Al-Naggar IM, Hawley KL, Spiller KL, Kuhn LT. Controlled M1-to-M2 transition of aged macrophages by calcium phosphate coatings. Biomater 2019;196:90-9.
24. Annamalai RT, Turner PA, Carson IV WF, Levi B, Kunkel S, Stegemann JP. Harnessing macrophage-mediated degradation of gelatin microspheres for spatiotemporal control of BMP2 release. Biomater 2018;161:216-27.
25. Daly K, Liu S, Agrawal V, Brown B, Johnson S, Medberry C, et al. Damage associated molecular patterns within xenogeneic biologic scaffolds and their effects on host remodeling. Biomater 2012;33(1):91-101.
26. Marinaro F, Sánchez-Margallo F, Álvarez V, López E, Tarazona R, Brun M, et al. Meshes in a mess: Mesenchymal stem cell-based therapies for soft tissue reinforcement. Acta Biomater 2019;85:60-74.
27. Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. Biomater 2019;196:80-9.

28. Morris AH, Stamer DK, Kunkemoeller B, Chang J, Xing H, Kyriakides TR. Decellularized materials derived from TSP2-KO mice promote enhanced neovascularization and integration in diabetic wounds. Biomater 2018;169:61-71.
29. Bösmüller H, Pfefferle V, Bittar Z, Scheble V, Horger M, Sipos B, et al. Microvessel density and angiogenesis in primary hepatic malignancies: Differential expression of CD31 and VEGFR-2 in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. Pathol Res Pract 2018;214(8):1136-41.
30. Kenar H, Ozdogan CY, Dumlu C, Doger E, Kose GT, Hasirci V. Microfibrous scaffolds from poly (l-lactide-co-ε-caprolactone) blended with xeno-free collagen/hyaluronic acid for improvement of vascularization in tissue engineering applications. Mater Sci Eng C 2019;97:31-44.
31. Qin J-J, Mao W, Wang X, Sun P, Cheng D, Tian S, et al. Caspase recruitment domain 6 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing ASK1. J Hepatol 2018;69(5):1110-22.
32. Ramhøj L, Petersen MA, Boberg J, Egebjerg KM, Madsen CB, Hass U, editors. Investigation of Immunotoxicity and Thyroid Disrupting Effects after Developmental Exposure to Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) in Rats. 55th Annu Meet and ToxExpo; 2016: Society of Toxicol.
33. Fan J, Yin J-J, Ning B, Wu X, Hu Y, Ferrari M, et al. Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin–platinum nanoparticles. Biomater 2011;32(6):1611-8.
34. Geesala R, Bar N, Dhoke NR, Basak P, Das A. Porous polymer scaffold for on-site delivery of stem cells–protects from oxidative stress and potentiates wound tissue repair. Biomater 2016;77:1-13.
35. Mouthuy P-A, Snelling SJ, Dakin SG, Milković L, Gašparović AČ, Carr AJ, et al. Biocompatibility of implantable materials: an oxidative stress viewpoint. Biomater 2016;109:55-68.

Original Article

HISTOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL, AND BIOCHEMICAL RESPONSES TO SUBCUTANEOUS INJECTION OF A COMBINED HYDROGEL SCAFFOLD DESIGNED FOR DENTAL CANALS IN MICE

Armin Hassanzadeh Inalou[1], Javad Ashrafihelan[2], Zahra Aghazadeh[3], Marziyeh Aghazadeh[4], Reza Rahbarghazi[5], Roya Salehi[6]

Received: 25 Oct, 2019; Accepted: 6 Apr, 2020

Abstract

Background & Aims: Biocompatibility does not mean the absolute lack of cytotoxicity. If the implant material performs its function in the body and keeps the interaction between the material and the cell in the body and the organ maintains its normal function, in a way that the general reaction of the body is normal, then we can say the material is biocompatible. The aim of this study was to evaluate the histological, immunological, and biochemical effects of collagen + PCL-PEG-PCL, gelatin + PCL-PEG-PCL, and alginate + PCL-PEG-PCL in mice after 30 days of subcutaneous injection.

Materials & Methods: The scaffolds were prepared by freeze-thinning and characterized using FTIR methods. A 500 µl hydrogel scaffold was injected into the dorsal flank region of a Swiss CD1 mouse. Animals were divided into control, collagen + PCL-PEG-PCL, gelatin + PCL-PEG-PCL, and alginate + PCL-PEG-PCL groups. The mice were euthanized after 30 days to investigate the biocompatibility of the scaffold with the use of antidiabetic drugs. Skin, liver, and kidney were sampled for histopathological investigation, gene expression, and enzyme expression.

Results: In this study, a hybrid hydrogel scaffold was well-constructed and characterized. The ratio of aspartate aminotransferase (AST) to alanine aminotransferase (ALT) can distinguish liver damage from other possibilities. In the enzymatic study, the ratio of AST to ALT in the alginate + PCL-PEG-PCL group was higher than the others (2.9 times more than that of the control group). Despite the differences between the groups (blood biochemical analysis), no significant differences were observed in the enzymatic study between the groups. In the present study, in the control and collagen + PCL-PEG-PCL groups, the expression level of interleukin 10 gene was four times lower than the alginate + PCL-PEG-PCL and gelatin + PCL-PEG-PCL groups, and the findings showed significant differences ($p < 0.001$). SOD, CAT, and CD31 genes in the PCL-PEG-PCL + alginate group showed 10.8, 3.3, and 3.5 times more expression than the beta-actin gene, respectively, and demonstrated significant differences compared to the other groups ($p < 0.001$). In histopathological examination of external examination and macroscopic examination of organs, there was no indication of systemic complications such as shock, septicemia, toxemia, or extensive inflammatory reactions in any of the groups.

***Conclusion*:** According to the results of this study, it can be concluded that the combination scaffold of collagen + PCL-PEG-PCL has fewer complications than other groups. The scaffold (collagen + PCL-PEG-PCL) is likely to be biocompatible and has the potential for future studies to transfer the drug, cell and growth factors and it can be used as a suitable scaffold for tissue engineering (skin and bone).

Keywords: Injectable scaffold, collagen, gelatin, alginate, biocompatible, histopathologic, subcutaneous injection

Address: Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Science, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

Tel: +984133355789

Email: salehiro@tbzmed.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(2): 97 ISSN: 2717-008X

[1] *DVM (Dr of Veterinary Medicine), Faculty of Veternity, Tabriz University, Tabriz, Iran*

[2] *Professor of Veterinary Pathology, Faculty of Veternity, Tabriz University, Tabriz, Iran*

[3] *Assistant Professor of Oral Medicine, Department of Dentistry, Faculty of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

[4] *Assistant Professor of Oral Medicine, Department of Dentistry, Faculty of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

[5] *Assistant Professor of Clinical Pathology, Department of Applied Cellular Sciences, Faculty of Modern Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*

[6] *Ph.D., Assistant Professor of Pharmaceutical Nanotechnology,Stem Cell Research Center, Department of Medical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. (Corresponding Author)*