

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

آرمین حسن‌زاده ایناللو^۱، جواد اشرفی هلان^۲، زهرا آقازاده^۳، مرضیه آقازاده^۴، رضا رهبرقاسمی^۵، رؤیا صالحی^۶

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

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: زیست‌سازگاری به معنی نبود مطلق سمیت سلولی نیست. در صورتی که 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 زیست‌سازگار است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات هیستولوژیک، ایمونولوژیک و بیوشیمیایی به تزریق زیرجلدی هیدروژل‌های کلاژن+PCL-PEG-PCL، ژلاتین+PCL-PEG-PCL و آلژینات+PCL-PEG-PCL جهت تزریق به‌صورت زیرجلدی در موش بعد از گذشت ۳۰ روز می‌باشد.

مواد و روش کار: داربست‌ها با روش فریزدراینگ تهیه‌شده با استفاده از روش‌های FTIR مشخصه‌یابی 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 زیست‌سازگاری داربست با استفاده از آوردن داروی بیهوشی دی‌اتیل 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 مشخصه‌یابی شد. نسبت آسپارات 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) از لحاظ 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 ($P < 0.001$). ژن‌های SOD، CAT و CD31، در گروه آلژینات+PCL-PEG-PCL به ترتیب ۳/۵، ۳/۳، ۱۰/۸ برابر بیان بیشتری را نسبت به ژن بتا اکتین نشان دادند و تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های مورد مطالعه نشان داد ($P < 0.001$). در بررسی هیستوپاتولوژیک در بازرسی خارجی و بررسی ماکروسکوپی اندام‌ها، نشانه‌ای از بروز عوارض سیستمیک از قبیل شوک، سیتی سمی، توکسمی و 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، زیست‌سازگار، هیستوپاتولوژیک، تزریق زیرجلدی

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

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه نانو تکنولوژی 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

^۴ متخصص بیماری‌های دندان و دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۵ استادیار کلینیکال پاتولوژی، گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۶ استادیار نانو تکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و گروه نانو تکنولوژی 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 از لحاظ 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 Arg- RGD : Gly-Asp و Gly-Phe-HYP-GLY-GLU- (GFOGER) است. مشکل اساسی که این پلیمر دارد این است که تحمل مکانیکی پایینی دارد طوری که ساخت داربست‌های کلاژنی مشکل است (۱، ۹، ۷-۱۱).

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. از جمله: آسانی مدیفیکیشن (تبدیل و تغییر)، تحریک ایمنی پایین بدن (ایمونونژنسیته پایین)، سمیت سلولی پایین (سیتوتوکسیسیته پایین)، استفاده به‌عنوان عامل دلمه کننده دارد (۸).

آلژینات پلی ساکارییدی 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 مورد توجه 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 می‌شود. سپس به‌وسیله یک سری رویدادهای پیچیده ترمیم بافتی شروع می‌شود. به‌طور کلی زیست سازگاری به معنی نبود مطلق سمیت سلولی نیست. در صورتی که 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 ذکر شده 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 جهت تزریق به‌صورت هیدرورژل در زیر جلد موش انتخاب شد. هدف از انجام این مطالعه تحلیلی (مورد-شاهد) بررسی اثرات هیستولوژیک، ایمونولوژیک و بیوشیمیایی به تزریق زیر جلدی هیدرورژل‌های ذکر شده در مدت یک ماه می‌باشد.

مواد و روش کار

اپسیلون کاپرولاکتون، پلی اتیلن 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 ALT,AST,ALP 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 کوپلیمر PCL-PEG-PCL، مونومر اپسیلون کاپرولاکتون (E-CL) (و پلی اتیلن گلیکول ۱۰۰۰ با نسبت وزنی ۲ به ۱ به روش پلیمریزاسیون حلقه گشا در حضور کاتالیزور اکتانئات قلع (۵/۰ درصد وزنی کل مونومرها) در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت تحت جریان گاز ازت سنتز

ه) بررسی آنزیمی:

سطوح آنزیمی در نمونه‌های سرمی به‌وسیله آنالیز 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, AST توسط استاندارد معرفی شده توسط IFCC با روش فتومتریک توسط کیت پارس آزمون انجام گرفت. قرائت جذب این آنزیم‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام گرفت. سنجش آنزیم ALP توسط استاندارد معرفی شده توسط DGKC با روش فتومتریک توسط کیت پارس آزمون انجام گرفت. قرائت جذب آنزیم در طول موج ۴۰۵ نانومتر انجام گرفت. سنجش این آنزیم بر اساس روش اوره از GLDH - با روش فتومتریک انجام می‌گیرد. کیت مربوط به شرکت پارس آزمون می‌باشد. قرائت جذب آنزیم در طول موج 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 ماکروسکوپییک 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 دستگاه DS2080/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 انوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. مطالعه میکروسکوپییک 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 مورد استفاده قرار گرفتند. مقدار ۱۰ ماکرولیتر از RNA استخراج‌شده توسط کیت سنتز (شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل

شد؛ سپس پلیمر به‌دست‌آمده در حلال دی کلرو متان حل شده و در ضد حلال دی اتیل اتر سرد رسوب‌گیری شده؛ و در آن حلال 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 منقل 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 مورد بررسی 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 شفاف از پودر مذکور تهیه شد. سپس این قرص در سل مخصوص قرار داده شد و طیف‌های با عدد موج ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ 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 UV قرار 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.

شدند. برای به دست 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 R- 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' مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

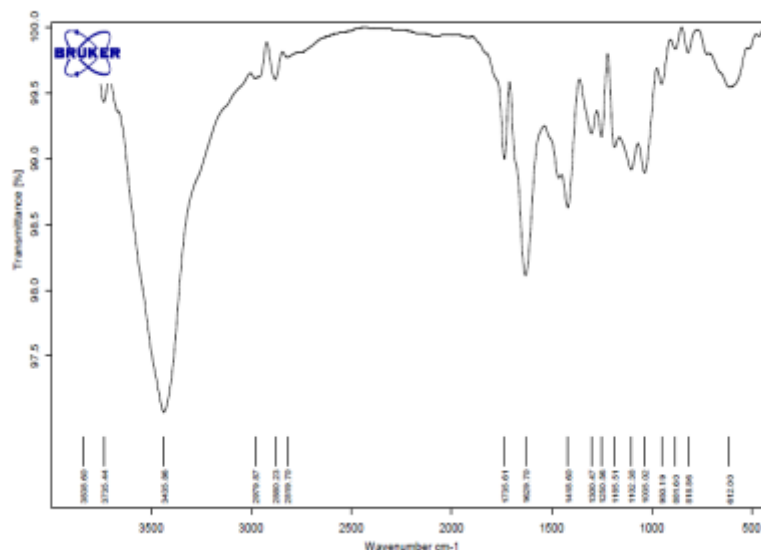
الف) نتایج FTIR

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

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

ج) آنالیز آماری:

در مطالعه حاضر نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ بیان و $P < 0.05$ به صورت معنی‌دار تلقی شد. برای آنالیز آماری از نرم‌افزار spss ورژن ۲۱ استفاده شد.



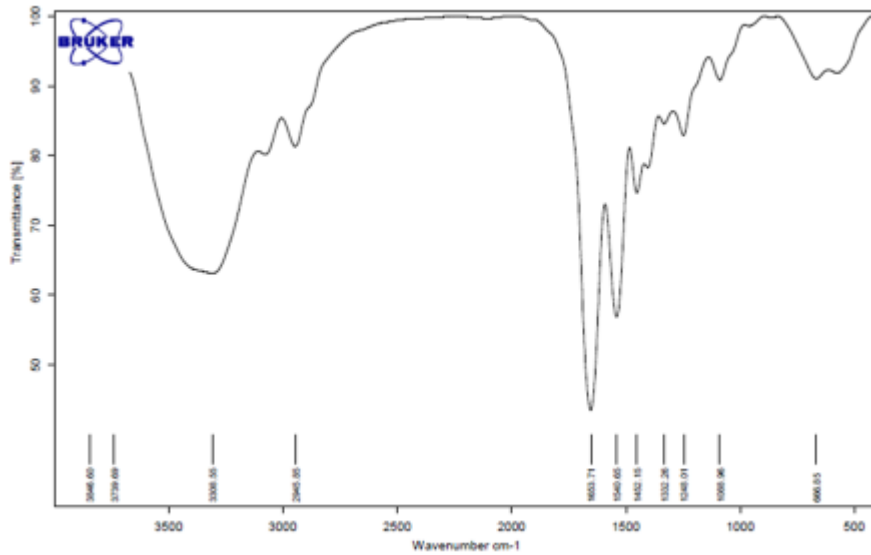
تصویر (۱): FTIR داربست PCL-PEG-PCL + کلاژن

مربوط به پلی‌اتیلن گلیکول و پیک آمینی گروه‌های آمینواسیدی ژلاتین به ترتیب در نواحی 1653 cm^{-1} ، 1540 cm^{-1}

پیک FTIR نمونه ژلاتین + PCL-PEG-PCL حضور پیک‌های شاخص کربونیل استری پلی کاپرولاکتون، پیک اتری

آلیفاتیک زنجیر پلیمری در ناحیه $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ ظاهر شدند (تصویر ۲).

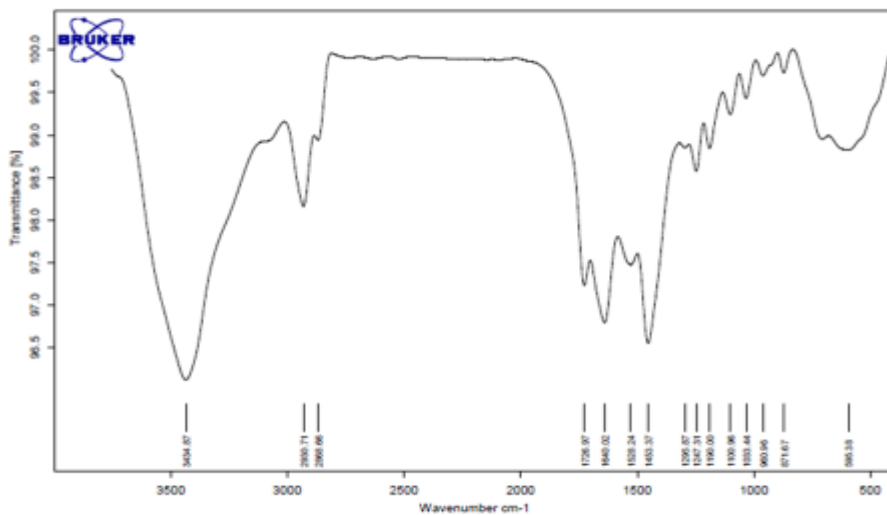
۱۰۸۸ ظاهر شد. پیک پهن در ناحیه $3200-3500\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه هیدروکسیل انتهای زنجیر کوپلیمر-PCL و PEG-PCL و گروه‌های آمینی ژلاتین می‌باشد. گروه‌های CH



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

کربونیل استری پلی کاپرولاکتون و گروه‌های هیدروکسیل اسیدی آلژینات می‌باشد. همچنین ارتعاشات کششی گروه‌های کربوکسیل آلژینات در 1630 cm^{-1} و 1419 cm^{-1} ظاهر شد.

در پیک نمونه آلژینات + PCL-PEG-PCL حضور پیک‌های شاخص در نواحی $1735, 1710, 1100\text{ cm}^{-1}$ و 3435 cm^{-1} به ترتیب مربوط به گروه‌های اتری پلی‌اتیلن گلیکول، گروه

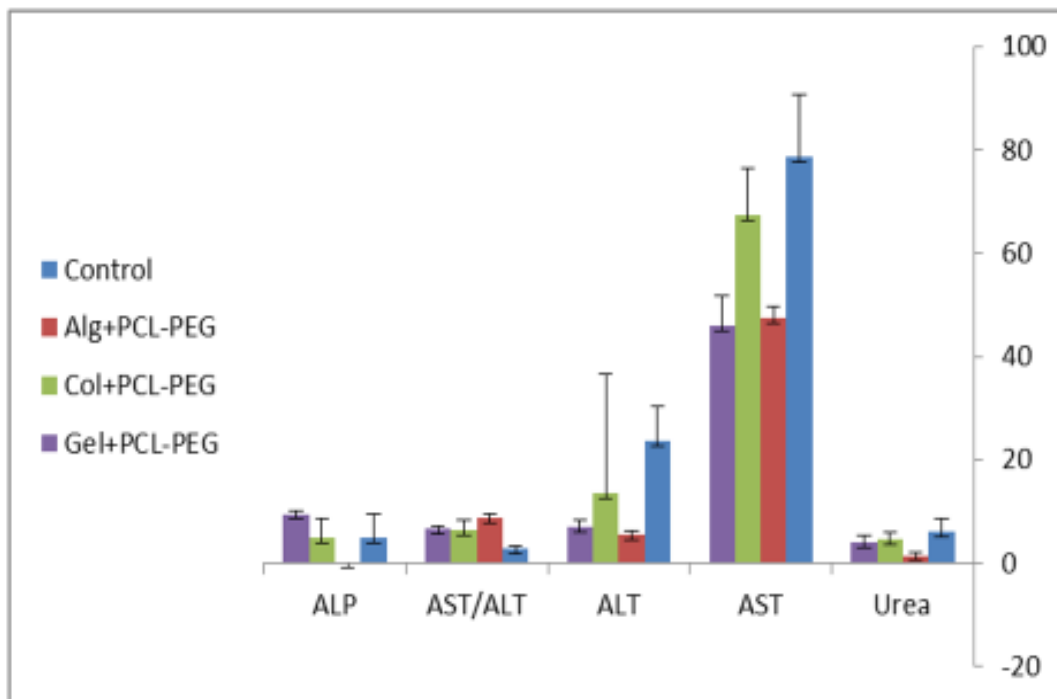


تصویر (۳): FTIR داربست PCL-PEG-PCL + آلژینات

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-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) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (تصویر ۴).

ب) نتایج آنزیمی:

آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، استاندارد طلایی برای تشخیص آسیب کبدی محسوب می‌شود. نسبت (AST) آسپاراتات 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



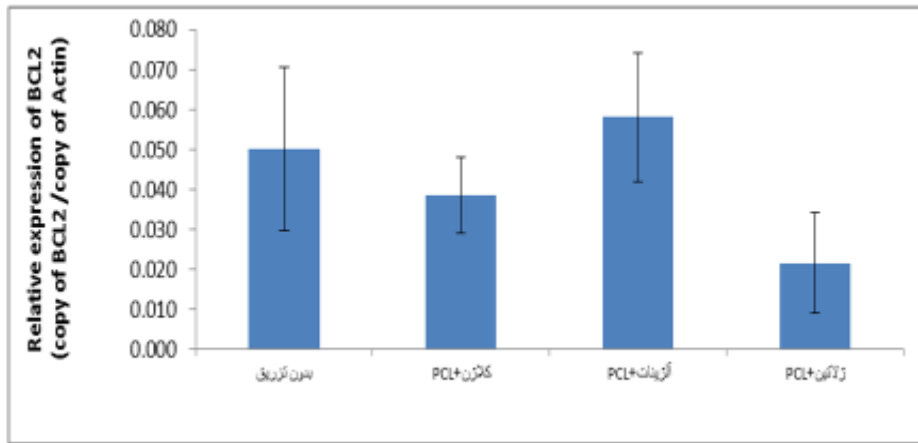
تصویر (۴): آنالیز بیوشیمیایی خون در موش‌های با ایمپلنت داربست هیدروژلی بعد از گذشت ۳۰ روز

ژن IL10 نیز گروه‌های دریافت کننده PCL-PEG + PCL-PEG-PCL کلاژن و ژلاتین بیان خیلی بالاتر و معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها نشان دادند باشد ($P < 0.001$) (تصویر ۶).

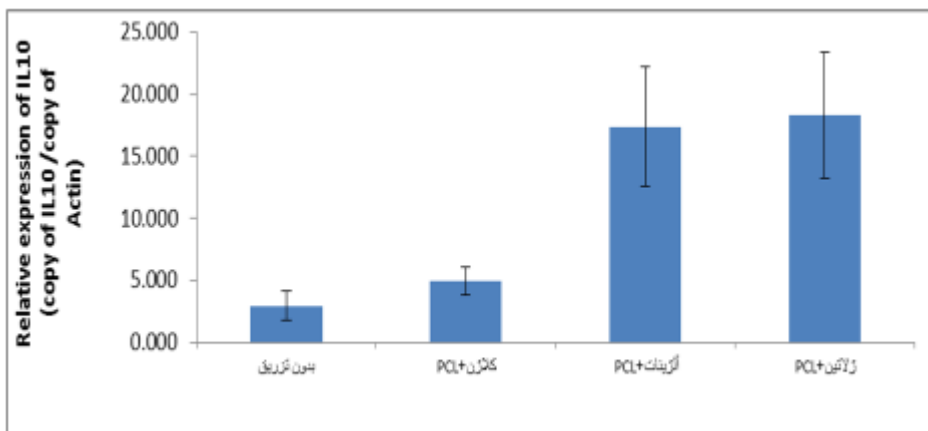
ژن‌های SOD، CAT و CD31، در گروه PCL-PEG + PCL-PEG-PCL آلژینات به ترتیب ۱۰/۸، ۳/۳ و ۳/۵ برابر نسبت به ژن بتا اکتین بیان بیشتری را نشان دادند و این تفاوت با دیگر گروه‌های مورد مطالعه معنی‌دار گزارش شد ($P < 0.001$) (تصاویر ۱۰-۸). بیان ژن CCL2 در گروه PCL-PEG-PCL + کلاژن 7/1 برابر نسبت به ژن بتا اکتین ارزیابی شد اما با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

ج) نتایج Real time PCR:

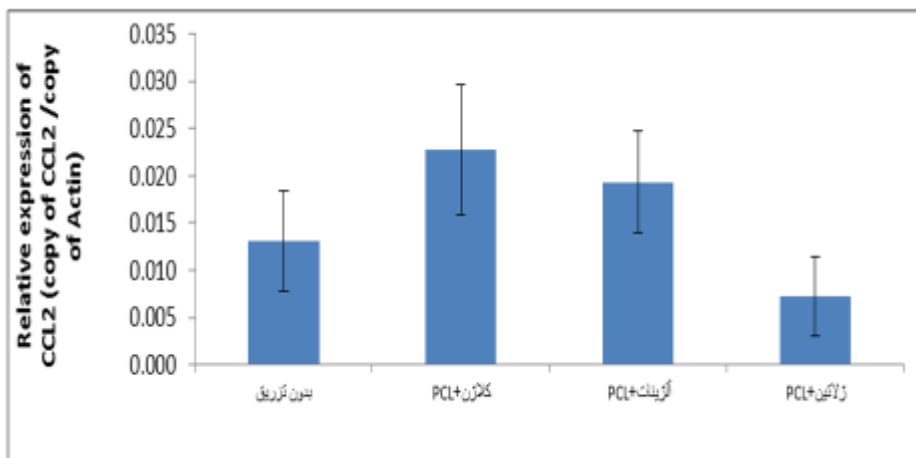
بیان ژن‌های CD31، BCL2، IL10، SOD، CCL2 و کاتالاز در گروه‌های کنترل (بدون تزریق)، PCL-PEG-PCL + آلژینات، کلاژن PCL-PEG-PCL +، ژلاتین نسبت به ژن بتا اکتین بررسی شد. در گروه دریافت کننده PCL-PEG-PCL + آلژینات، ژن‌های SOD، CAT و CD31 بیان بیش‌تر و معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها نشان دادند (تصاویر ۱۰-۵). بیان ژن CCL2 در گروه دریافت کننده PCL-PEG-PCL + کلاژن بالاتر از سایر گروه‌ها بود ولی معنی‌دار نبود (تصویر ۷).



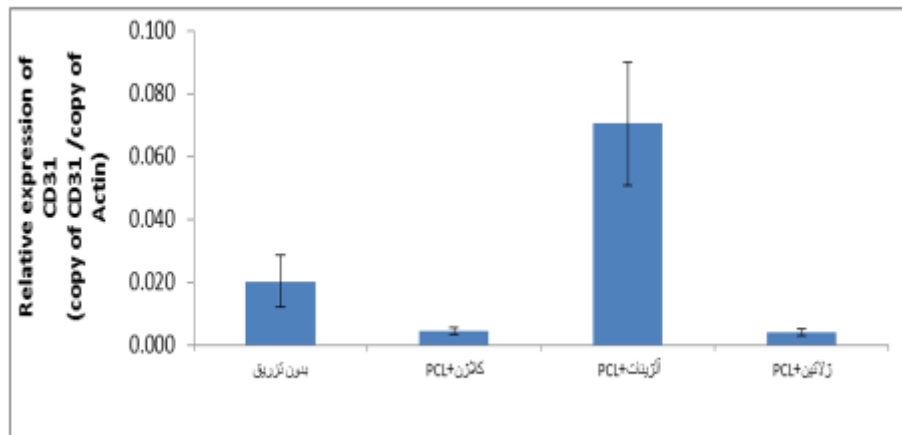
تصویر (۵): بیان ژن BCL2 در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



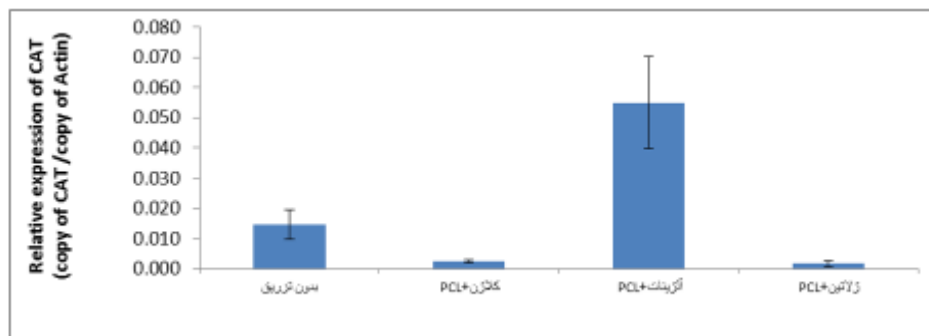
تصویر (۶): بیان ژن IL 10 در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



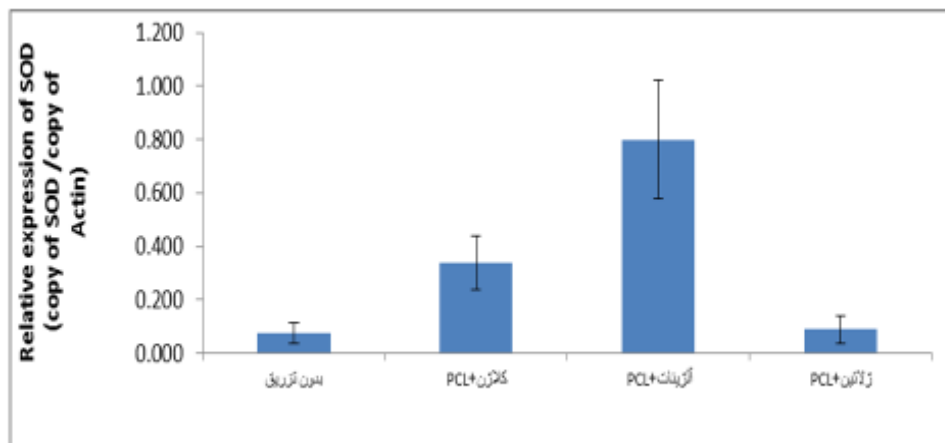
تصویر (۷): بیان ژن CCL2 در گروه‌های داربست هیدروژلی بعد از گذشت یک ماه



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

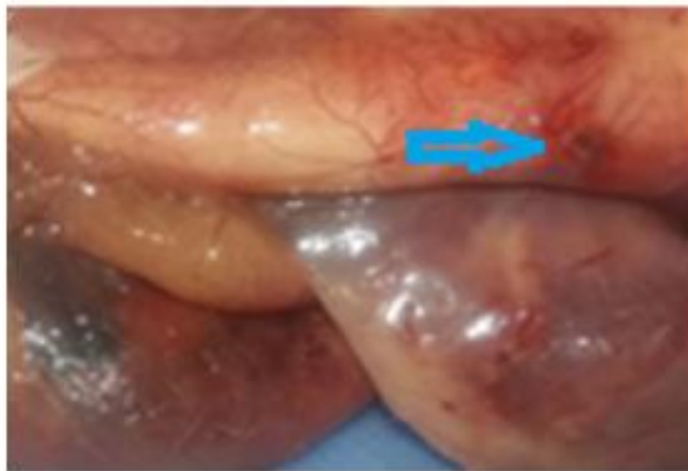
د) نتایج هیستولوژیک:

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

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.

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

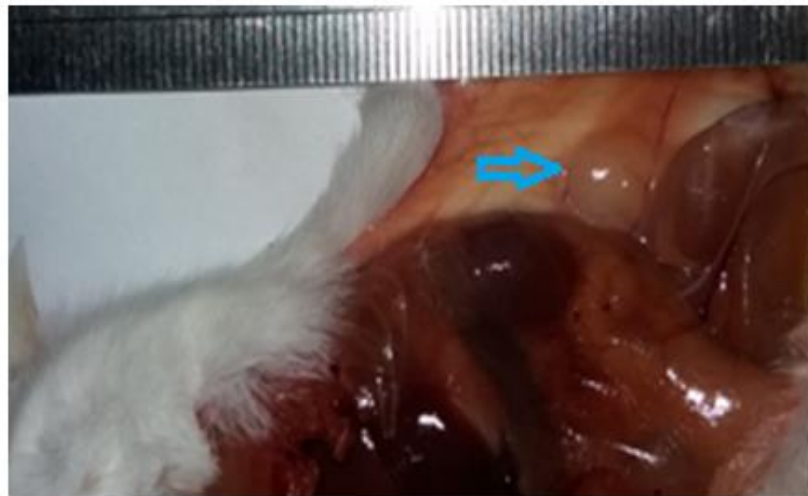
تنها ضایعه قابل ذکر د که در برخی از موشها مشاهده گردید در جاتی از پرخونی زیر جلدی در ناحیه تزریق و عضلات ناحیه مجاور بود. در بسیاری از حیوانات مورد مطالعه، قسمت عمده مواد تزریق شده جذب و بخشی از آنها که جذب نشده بود به‌صورت کانون‌های کوچک گرد در ناحیه زیر جلد قابل مشاهده بود بدون آن که چسبندگی شدیدی به ناحیه غشاء پایه یا لایه عضلانی داشته باشد. این توده‌ها از نظر قوام نرم و از ۲



تصویر (۱۱): تصویر ماکروسکوپی 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 تزریق شده با قطر هشت میلی متر دیده می شود (فلش).

بحث

کلاژن تیپ یک در بدن موجودات به صورت نانو فیبر است که این نانو فیبر دارای جایگاه اتصال سلولی شامل RGD و GFOGER (Gly-Phe-HYP-GLY-GLU-ARG) می باشد که باعث اتصال فیبروبلاست به کلاژن می شود. کلاژن همچنین باعث سنتز پروتئین های ماتریکس خارج سلولی می شود؛ به طوری که سبب بهبود ترمیم پوست می شود. ویژگی های ذکر شده باعث می شود 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 سلول های L929 فیبروبلاست موش در داربست ژلاتین+ پلی کاپرولاکتون+کلاژن (۱/۱) مشاهده شد. (۹-۱۱)

واکنش هایی که منجر به تولید کربوکسیل فعال شده سبب می شود که این گروه عاملی با ماکرو مولکول های بیولوژیکی ارتباط برقرار کند و موجب بهبود سازگاری ماده با سلول شود. به طور کلی این اصل پذیرفته شده 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. گروه های سطحی عملکردی تأثیر زیادی بر روی نتایج تکثیر سلولی می گذارند. برای مثال COOH با بار منفی در برابر اتصال سلول و پروتئین از خود مقاومت نشان می دهد (قطب های هم نام همدیگر را دفع می کنند). جالب این که تحرک بالای زنجیره های هیدروفیلیک نیز سبب اتصال کند سلولی می شود. از طرفی پلیمرهای زیستی طبیعی از جمله هیالورونیک اسید،

به علت تخریب تدریجی پلی کاپرولاکتون در شرایط *in vivo* در طول ۲-۴ سال، قدرت مکانیکی مناسب، زیست سازگاری با انواع سلول، عدم واکنش های التهابی (پلی کاپرولاکتون بر خلاف پلی لاکتاید و گلیکولاید در طی تخریب منجر به تولید اسید نمی شود) (۱۲، ۱۳). PCL به صورت گسترده ای به عنوان ماده اولیه داربست ها برای مهندسی بافت مورد ارزیابی واقع شده است (۱۴-۱۶). از طرف دیگر وقتی صحبت از مهندسی بافت می شود، PCL از برخی کاستی ها رنج می برد مانند هیدروفوب (آب گریز) بودن این ماده و نبود موتیف های مولکولی برای تشخیص سلولی سبب ضعف در اتصال و تکثیر سلولی می شود بنا به مطالعات، سلول های اندکی روی این ماده اتصال و تکثیر می یابند (۱۷). بنابراین دست یافتن به روشی که بتواند میانگش سطحی PCL با سلول ها را بهبود دهد برای ما مطلوب خواهد بود. به منظور بهبود هیدروفیلیسیتی (آب دوستی) و ویژگی های فعالیت فیزیولوژیکی پلی کاپرولاکتون از روش اصلاح سطحی آن استفاده می شود. برای اصلاح سطحی از روش های متنوعی از جمله تشعشع UV، استفاده از پلاسما، استفاده از اوزون و آمینولیز استفاده می شود (۹، ۱۰). در واقع این عوامل سبب به حرکت درآوردن مولکول های ماتریکس خارج سلولی مثل کلاژن و ژلاتین و یا سکانس های کوچک پپتیدهای فعال مثل RGD (Arg-Gly-Asp) بر روی سوسترای PCL به منظور تحریک میانگش سلولی می شود.

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 سلکتین‌ها به پلیمرهای کربوهیدراتی نظیر کیتوزان و آلزینات اتصال می‌یابند. بنابراین سلول‌های ایمنی بدن از جمله نوتروفیل به این پلیمرها جذب می‌شوند. در مطالعه‌ای که وندرورد در سال ۲۰۰۲ انجام داد نشان داد که نوتروفیل‌ها در هفته اول، دوم و چهارم به سمت داربست کیتوزانی ارتشاح یافته بودند. نوتروفیل‌ها نه تنها در هفته اول (به خاطر فاز حاد التهاب) بلکه در هفته‌های بعدی نیز در محل داربست وجود داشتند. بااینکه نوتروفیل‌ها در محل داربست حضور داشتند (نوتروفیل‌ها 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 ماکروفاژ به فیبروبلاست تغییر یافت. در هفته‌های آخر مطالعه جمعیت سلولی متنوعی از جمله منوسیت، ماکروفاژ و سلول‌های غول‌پیکر حضور داشتند؛ بااین‌حال اکثریت سلول‌ها را فیبروبلاست‌ها 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 زیست‌مواد 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 زیست‌مواد آلودگی منبع اولیه استفاده‌شده در مطالعه است. به‌خصوص این نوع آلودگی در مواد پلی‌ساکارییدی به‌خصوص آلزینات گزارش شده 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 تشکیل شده میزبان بود (۱۹). بررسی ارتشاح ماکروفاژ توسط تکنیک ایمونوهیستوشیمی ماکروفاژهای مشخصی اطراف داربست مشاهده شدند. ماکروفاژها می‌توانند سبب تخریب و جذب زیست ماده شوند

آلزینات، کلاژن، کیتوزان و الاستین تخریب پذیری وابسته به آنزیم (تحت کنترل آنزیم) دارند. همچنین این پلیمرهای طبیعی زیست‌سازگاری 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 موتیف‌های زیست‌فعال 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 نجسید و به‌صورت پخش روی PCL را بیوشاند (۱۰، ۱۱). در مطالعه حاضر اثر متقابل بین کلاژن و PCL-PEG-PCL مطلوب 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-PCL را 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 متابولیت‌ها کارایی لازم را ایفا کند در نتیجه 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 تزریق شده می‌بندد. هیدروژل‌هایی 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 زیست‌سازگاری 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. از جمله تکنیک‌های ساخت داربست می‌توان به: گاز کف،

و کلیه مورد مطالعه قرار گرفت. جهت ارزیابی اثرات التهابی این داربست‌ها از اینترلوکین ۱۰ (پروتئین ضدالتهابی)، CCL2 (کموکین پیش التهابی) استفاده شده همچنین ارزیابی هیستوپاتولوژیکی ناحیه تزریق مشاهده شد. برای بررسی رگ زایی و خاصیت ضدآپوپتوزی این مواد نیز به ترتیب فاکتور CD31 و BCL2 مورد بررسی 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 آلرژن‌ها حیاتی است. این سیتوکین باعث ممانعت از محرک‌های مولکول‌های MHC کلاس دو در سلول‌های ماکروفاژ و سلول‌های دندریتیک 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-10 مشاهده شده است (۲۳، ۲۴). در مطالعه حاضر در گروه کنترل و کلانژن PCL-PEG-PCL + میزان بیان این ژن چهار برابر کم‌تر از گروه‌های آلژینات PCL-PEG-PCL + و ژلاتین PCL-PEG-PCL + است.

CCL2 کموکینی پیش التهابی است که در شکل‌گیری سلول‌های غول‌پیکر 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 فیبروز مرتبط می‌داند. 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 کارسینوما کبدی رگ‌زایی بالای سینوزوئیدهاست که این فاکتور می‌تواند در پیش‌آگهی 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).

BCL2 مارکر پیش‌آپوپتوتیک مرتبط با مرگ سلولی می‌باشد. در افزایش آپوپتوز میزان این مارکر کاهش می‌یابد. ارتباط این مارکر با سیتوکین‌ها معکوس عنوان شده است

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 غول‌پیکر) و سبب تخریب بافتی شده بودند مشاهده شد (۱۹).

زیست‌تخریب‌پذیری یک داربست داخل بدن دارای اهمیت است. به دلیل 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 شناسایی شده 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 chamber موش دارای یک سری مزیت‌ها برای تزریق زیر جلدی زیست‌مواد هست. علت تزریق به ناحیه dorsal موش، خون‌رسانی مناسب این ناحیه است. به‌طوری‌که در مطالعاتی که مربوط به آنژیوژنز زیست‌مواد یا داربست‌ها بوده است از این ناحیه بارها استفاده شده است. از طرفی در مطالعات مربوط به زیست‌سازگاری 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 کلانژن PCL-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/ALT و آوره بررسی شد. تفاوت این فاکتورها بین گروه‌های مختلف معنی‌دار گزارش نشد. برای بررسی اثرات سمیت هیدروژل‌ها ارزیابی هیستوپاتولوژیکی کبد

تولید این آنزیم‌ها را بالا نگه داشته تا آسیب‌های اکسیداتیو را به حداقل برساند (۳۳-۳۵).

نتیجه‌گیری

در مجموع، با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که داربست کلاژن + PCL-PEG-PCL در بدن موش به صورت 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. با این حال جهت استفاده بالینی از این داربست هیدروژلی نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه وجود دارد تا در نهایت 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.

به طوری که با افزایش سیتوکین‌های 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 ضد آپوپتوزی 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 در ترمیم 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 آلزینات + PCL-PEG-PCL توانسته تولید ژن‌های مسئول

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 (ϵ -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/poly(laminin)-coated poly- ϵ -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.

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

Armin Hassanzadeh Inalou¹, Javad Ashrafihelan², Zahra Aghazadeh³, Marziyeh Aghazadeh⁴, Reza Rahbarghazi⁵, Roya Salehi⁶

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 Veterinary, Tabriz University, Tabriz, Iran

² Professor of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary, 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)