

## مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های آلژینات و کیتوسان - ژلاتین در تولید ماتریکس خارج سلولی در سلول‌های نوکلئوس پالپوزوس دیسک بین مهره‌ای

مسعود قربانی<sup>۱</sup>، دکتر حمید بهرامیان<sup>۲</sup>، دکتر بتول هاشمی‌بنی<sup>۳</sup>، زینب کریمی<sup>۴</sup>،  
نفیسه اسماعیل<sup>۵</sup>، محمد صالحی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** یکی از مهم‌ترین علل کمر درد، تخریب دیسک بین مهره‌ای (Intervertebral disc یا IVD) است. تخریب IVD در اثر کاهش تعداد سلول‌ها و کاهش تولید و تخریب ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix یا ECM) بافت IVD به خصوص در ناحیه‌ی نوکلئوس پالپوزوس (Nucleus pulposus یا NP) ایجاد می‌شود. در مهندسی بافت از داربست‌های طبیعی و غیر طبیعی مختلف برای ترمیم و بازسازی IVD استفاده می‌گردد. اگرکان یکی از پروتئوگلیکان‌های مهم در بافت NP دیسک می‌باشد. هدف این مطالعه، مقایسه‌ی میزان ترشح اگرکان تولیدی توسط سلول‌های NP در IVD انسانی در دو داربست آلژینات و کیتوسان - ژلاتین بود.

**روش‌ها:** سلول‌های NP با تجزیه‌ی آنزیمی کلاژناز از بافت NP بیماران مبتلا به فتق IVD در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان تهیه گردید. محلول کیتوسان با محلول ژلاتین مخلوط شد. مخلوط حاصل پس از Freeze drying، به عنوان داربست مورد استفاده قرار گرفت. داربست آلژینات نیز تهیه گردید. سوسپانسیون سلولی حاوی سلول‌های NP جداسازی شده، به دو داربست منتقل و تا ۱۴ روز کشت داده شد. برای بررسی میزان ترشح اگرکان از تکنیک ELISA و برای بررسی مورفولوژی سلول‌ها نیز از میکروسکوپ نوری استفاده شد.

**یافته‌ها:** میزان ترشح اگرکان از روز ۳ تا ۱۴ به صورت معنی‌داری افزایش داشت. مقایسه‌ی میزان ترشح در دو داربست آلژینات و کیتوسان - ژلاتین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دو داربست در روزهای ۷ و ۱۴ کشت وجود داشت، ولی در روز ۳ کشت این اختلاف معنی‌دار نبود. با توجه به نتایج، میزان ترشح ماتریکس خارج سلولی توسط سلول‌های نوکلئوس پالپوزوس در داربست آلژینات نسبت به داربست کیتوسان - ژلاتین اختلاف معنی‌داری داشت.

**نتیجه‌گیری:** داربست آلژینات نسبت به داربست کیتوسان - ژلاتین محیط مناسب‌تری برای ترشح ECM توسط سلول‌های NP انسانی در *In vitro* فراهم می‌کند و پیشنهاد می‌شود از این داربست برای کشت سلول‌های NP در *In vivo* استفاده گردد.

**واژگان کلیدی:** دیسک بین مهره‌ای، مهندسی بافت، کیتوسان، ژلاتین، آلژینات، اگرکان

**ارجاع:** قربانی مسعود، بهرامیان حمید، هاشمی‌بنی بتول، کریمی زینب، اسماعیل نفیسه، صالحی محمد. مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های آلژینات و کیتوسان - ژلاتین در تولید ماتریکس خارج سلولی در سلول‌های نوکلئوس پالپوزوس دیسک بین مهره‌ای. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۲۵): ۸۲-۹۱

\* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای به شماره‌ی ۳۸۹۴۳۷ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه آمار زیستی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بتول بنی‌هاشمی

## مقدمه

دیسک بین مهره‌ای (Intervertebral disc یا IVD) از خارج به داخل شامل ۲ منطقه‌ی حلقه‌ی فیبری (Annulus fibrosus یا AF) و نوکلئوس پالپوزوس (Nucleus pulposus یا NP) که هسته‌ی مرکزی ژلاتینی دیسک را می‌سازد، است (۱). AF و NP به طور عمده از ماتریکس خارج سلولی (ECM یا Extracellular matrix) تشکیل شده‌اند. IVD و به خصوص بافت NP تعداد سلول‌های کمی دارد و ۱ درصد حجم بافت دیسک را تشکیل می‌دهد (۲). ECM در NP شامل: آب، کلاژن نوع ۲، هیالورونان و پروتئوگلیکان‌ها می‌باشد. اگرکان یکی از پروتئوگلیکان‌های مهم و از فراوان‌ترین پروتئوگلیکان در ECM می‌باشد. پروتئوگلیکان‌ها، خاصیت آبکی و ویسکوالاستیکی به دیسک می‌دهند که سبب جذب شوک‌های وارده، حفظ الاستیسیته‌ی دیسک و محافظت در برابر نیروهای وارده به دیسک می‌شوند (۳).

یکی از اتفاقات بافتی بدن در اثر افزایش سن، دژنره شدن IVD است که در آن، تعداد سلول‌های بافت و میزان تولید ECM کاهش می‌یابد و در نهایت سبب تغییر در ساختار و عملکرد بافت مورد نظر می‌شود (۴). بنابراین سلول‌درمانی راه حل مفید و مؤثر برای ترمیم IVD می‌باشد؛ چرا که خطرات ژن‌درمانی و مولکول‌درمانی را ندارد (۵-۶).

در مطالعه‌ای که توسط Mochida و Nishimura انجام شد، مشخص گردید که تزریق سلول‌های NP بافت اتولوگ به دیسک دژنره شده سبب کاهش دژنراسیون در IVD می‌شود (۷). همچنین تمایز سلول‌های MSC (Mesenchymal stem cells) به سلول‌های NP و انتقال آن‌ها با داربست آلژینات،

سبب افزایش تولید ECM توسط سلول‌های NP و ترمیم دیسک آسیب‌دیده می‌شود (۸).

انتخاب داربست مناسب به عنوان محیطی برای رشد، تکثیر، تولید و ترشح ECM، یکی از اصول اساسی در مهندسی بافت و سلول‌درمانی محسوب می‌شود. داربست مورد استفاده باید ویژگی‌های منحصر به فردی داشته باشد. به عنوان مثال باید زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگار و دارای منافذ مناسب با تخلخل کنترل شده باشد (۹-۱۰).

آلژینات یک بیوپلیمر طبیعی است که به طور عمده از جلبک قهوه‌ای و به میزان کمتر از باکتری‌ها استخراج می‌شود (۱۱). مطالعات نشان داده است که آلژینات سبب افزایش تکثیر، تمایز و ترشح ECM توسط کندروسیت‌های کشت داده‌شده بر روی این داربست می‌شود (۱۲).

Stevens و همکاران با کشت سلول‌های NP بر روی داربست آلژینات گزارش کردند که داربست آلژینات سبب تکثیر بیشتر سلول‌های NP و افزایش ترشح ECM توسط این سلول‌ها می‌شود (۱۳). همچنین برخی مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های جدا شده از IVD انسان و خرگوش، پس از کشت بر روی داربست آلژینات، کلاژن نوع ۲، اگرکان و گلیکوزآمینوگلیکان‌های بیشتری ترشح می‌کنند (۱۴).

از دیگر داربست‌های پر کاربرد و بیوپلیمری در مهندسی بافت، کیتوسان می‌باشد. کیتوسان پلیمر گلیکوزآمین و N-استیل گلیکوزآمین است که از دپلاریزاسیون و د-استیلاسیون کیتین به دست می‌آید (۱۵-۱۶). خاصیت کاتیونی کیتوسان آن را به عنوان داربست جذاب و مفیدی تبدیل کرده است که برای اگرکان تولیدی کندروسیت‌ها، که خاصیت آنیونی

خالص فراهم می‌کند (۲۸-۲۹).

با توجه به اهمیت داربست‌های بیوپلیمری پر کاربرد آلژینات و کیتوسان در ترشح ECM که جزء اصلی یک بافت زنده محسوب می‌شود و نیز این که در بررسی متون، مطالعه‌ای که تأثیر دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین در ترشح ECM توسط سلول‌های NP در IVD انسانی را بررسی و مقایسه کرده باشد، یافت نشد؛ هدف این مطالعه، مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های آلژینات و کیتوسان-ژلاتین در تولید ECM در سلول‌های NP در IVD انسانی بود.

### روش‌ها

برای انجام این مطالعه، کیتوسان (با درجه‌ی د-استیلاسیون ۸۵ درصد)، ژلاتین و آلژینات از کمپانی سیگمای آمریکا خریداری شد. برای تهیه‌ی داربست کیتوسان-ژلاتین، گرد کیتوسان در اسید استیک ۰/۲ مولار حل شد تا محلول کیتوسان ۱/۵ درصد (نسبت وزن بر حجم) با  $\text{pH} = 4/4$  به دست آمد. گرد ژلاتین نیز در آب غیر یونیزه (Analar water) حل و محلول ژلاتین ۰/۵ درصد ساخته شد. سپس کیتوسان ۱/۵ درصد با محلول ژلاتین ۰/۵ درصد به نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط گردید. مخلوط کیتوسان-ژلاتین در دیش ۱۰ سانتی‌متری ریخته شد. ضخامت مخلوط در دیش ۴ سانتی‌متر بود. پس از آن، دیش در فریزر در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. در نهایت به مدت ۳۶ ساعت Lyophilized شد.

برای تهیه‌ی داربست آلژینات ابتدا پودر آلژینات در محلول ۰/۹ درصد NaCl حل و محلول آلژینات ۱/۲ درصد ساخته شد. سپس محلول فیلتر گردید.

دارند، بسیار مفید است و یک محیط سازگار برای کندروسیت‌ها ایجاد می‌کند (۱۷-۱۸).

کیتوسان از لحاظ زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری بسیار مناسب است و ساختاری شبیه گلیکوزآمینوگلیکان‌های ECM در غضروف دارد (۱۷-۱۸).

در بسیاری از مطالعات از کیتوسان به عنوان داربست در ترمیم استخوان و غضروف (۱۹-۲۰)، سیستم عصبی (۱۹)، ترمیم پوست (۲۱) استفاده شده است.

طبق تحقیقات انجام شده بر روی تأثیر داربست کیتوسان در تکثیر سلول‌های NP و میزان ترشح ECM، نتایج نشان داد که این نوع داربست باعث افزایش تکثیر سلول‌های NP و ترشح ECM می‌شود (۲۲-۲۳).

در مهندسی بافت از روش‌های متعددی برای افزایش استحکام داربست‌ها استفاده می‌شود. افزودن ژلاتین و Freeze drying دو روش بسیار مناسب برای افزایش استحکام داربست می‌باشد (۲۴-۲۵).

ژلاتین بیوپلیمر طبیعی است که از هیدرولیز کلاژن به دست می‌آید. زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و تحریک نکردن سیستم ایمنی از خصوصیات خوب ژلاتین محسوب می‌شود (۲۶).

مطالعات نشان داده است که افزودن ژلاتین به داربست کیتوسان، سبب افزایش خاصیت هیدروفیلیکی کیتوسان می‌شود (۲۱). همچنین به عنوان جزء اصلی ECM نیز محسوب می‌شود (۲۷). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که داربست کیتوسان-ژلاتین در تکثیر سلول‌های بنیادی پالپ دندان بسیار مؤثر است (۲۴). داربست کیتوسان-ژلاتین، ساختار شبکه‌ای مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌ها، در مقایسه با کیتوسان

رسوب سلولی که محتوی  $10^5 \times 1$  سلول بود، محلول آلژینات اضافه شد. این محلول به صورت قطره قطره، توسط سرنگ ۲۲ Gage، به هر خانه از پلیت ۲۴ خانه که حاوی محلول کلرید کلسیم ۱۰۲ میلی‌مولار بود، اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه حباب‌های آلژینات سلولی به صورت هیدروژل در آمدند و با محلول NaCl به مدت ۱۰ دقیقه شستشو انجام گرفت. سپس بیدهای واقع در خانه‌های پلیت ۲۴ خانه با مدیوم شستشو داده شد. پس از شستشو با مدیوم، مدیوم F12 (شامل FBS ده درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین) به هر خانه اضافه شد و در نهایت پلیت‌ها به انکوباتور منتقل گردیدند و تا ۱۴ روز کشت داده شدند. هر ۳ روز یک بار مدیوم تعویض می‌گردید.

رنگ‌آمیزی تریپان بلو بر روی نمونه‌های آلژینات طبق پروتکل مقالات انجام گردید. به طور خلاصه قطره‌های آلژینات با PBS دو بار شستشو داشته شدند و سیترات سدیم به پلیت حاوی قطرات اضافه شد. سانتی‌فوژ با دور ۱۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی برداشته شد و با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو بر روی لام مخلوط گردید.

در مرحله‌ی بعدی، هموسایتومتر به زیر میکروسکوپ معکوس انتقال داده شد و شمارش سلولی صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی تریپان بلو برای نمونه‌های کیتوسان-ژلاتین مانند رنگ‌آمیزی نمونه‌های آلژینات انجام شد با این تفاوت که برای جدا کردن سلول‌ها از داربست کیتوسان-ژلاتین، از تریپسین EDTA استفاده شد.

مقدار اگرکان در مایع رویی محیط‌های کشت در

برای جدا کردن سلول‌های NP ابتدا قطعات بافتی از مرکز NP در IVD افرادی که تحت جراحی فتق IVD قرار گرفته بودند، استخراج گردید. سپس این قطعات بافتی به قطعات کوچک‌تری خرد شد و در محلول HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Gibco BRL) با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (سیگمای آمریکا) قرار گرفت.

با قرار دادن قطعات سلول‌های NP در محلول آنزیمی محتوی کلاژناز نوع ۱ (۰/۲ درصد) به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، قطعات بافت NP تجزیه شد. بافت هضم شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتی‌فوژ شد. سوسپانسیون سلولی در ظروف کشت که حاوی DMEM/F12، ۵۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین-استرپتومایسین (سیگمای آمریکا) و ۲۵ میکروگرم ال-آسکوربیک اسید (سیگمای آمریکا) بود، کشت داده شد. ظروف کشت در انکوباتور، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با  $CO_2$  ۵ درصد قرار گرفتند.

برای انتقال سلول‌های NP به داربست کیتوسان/ژلاتین، داربست‌های کیتوسان-ژلاتین تهیه‌شده به قطعات ۵ میلی‌متری با ضخامت ۴ میلی‌متر بریده شدند و به پلیت ۲۴ خانه انتقال یافتند و با اشعه‌ی UV (Ultraviolet) به مدت نیم ساعت استریل گردید.

سلول‌های NP انسانی در پاساژ اول کشت مونولایر با تریپسین، تریپسینه و سانتی‌فوژ شدند. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی محتوی  $10^5 \times 1$  سلول، با پیپت به داربست کیتوسان-ژلاتین انتقال داده شد.

برای انتقال سلول‌ها به داربست آلژینات، به

در پاساژهای بالاتر این سلول‌ها به اشکال فیبروبلاستی با زواید بلند تغییر یافتند (شکل ۲). در داربست آلژینات، سلول‌ها با مورفولوژی گرد یافت شدند (شکل ۳).



شکل ۲. سلول‌های نوکلئوس پالپوزوس در کشت مونولایر در پاساژ اول و دوم  
شکل فیبروبلاستی با زواید بلند سلول‌ها واضح است (۶۰×).



شکل ۳. در این تصویر قطره‌ی کروی شکل ژل آلژینات (Bead) دیده می‌شود.

سلول‌های نوکلئوس پالپوزوس با مورفولوژی کروی شکل در منافذ ژل آلژینات قرار دارند (۶۰×)

نتایج شمارش سلول‌ها که توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد، نشان داد که میانگین تعداد سلول‌ها در هر دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین، در روز ۱۴ نسبت به روز ۷ کاهش معنی‌داری

روزهای ۳، ۷ و ۲۱ طبق پروتکل کیت (Invitrogen) Human aggrecan direct ELISA تعیین شد. به طور خلاصه، مایع رویی به عنوان آنتی‌ژن به پلیت ELISA اضافه شد و مولکول‌های اگرکان که با آنتی‌بادی‌های پوشش داده شده رقابت می‌کنند، اضافه گردید تا آن‌ها به آنتی‌ژن‌ها اتصال داده شوند و ساندویچ تشکیل گردد. سرانجام سوبستراهای آنزیمی اضافه شدند و جذب مخلوط در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله‌ی اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. برای مقایسه‌ی میزان ترشح ECM سلول‌های NP در داربست‌های آلژینات و کیتوسان-ژلاتین، داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون Mann-Whitney مورد مقایسه و آنالیز آماری قرار گرفت.

### یافته‌ها

سلول‌های NP کشت داده شده در محیط کشت مونولایر در ابتدا بسیار کوچک و نواری شکل بودند (شکل ۱).

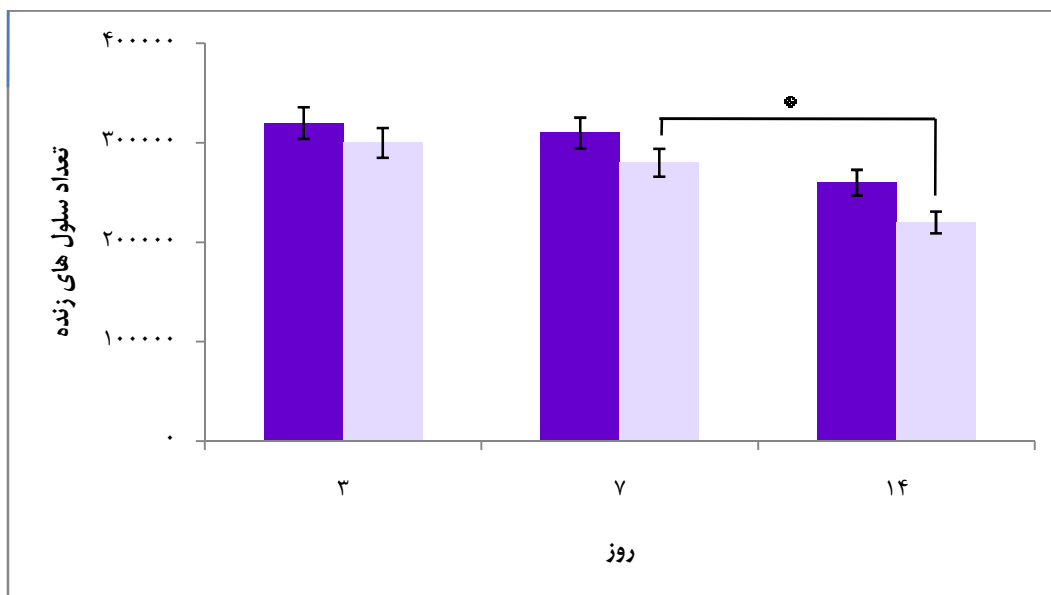


شکل ۱. سلول‌های نوکلئوس پالپوزوس در کشت مونولایر در پاساژ صفر  
نواری شکل بودن و کوچک بودن سلول‌ها در این شکل مشهود است (۶۰×).

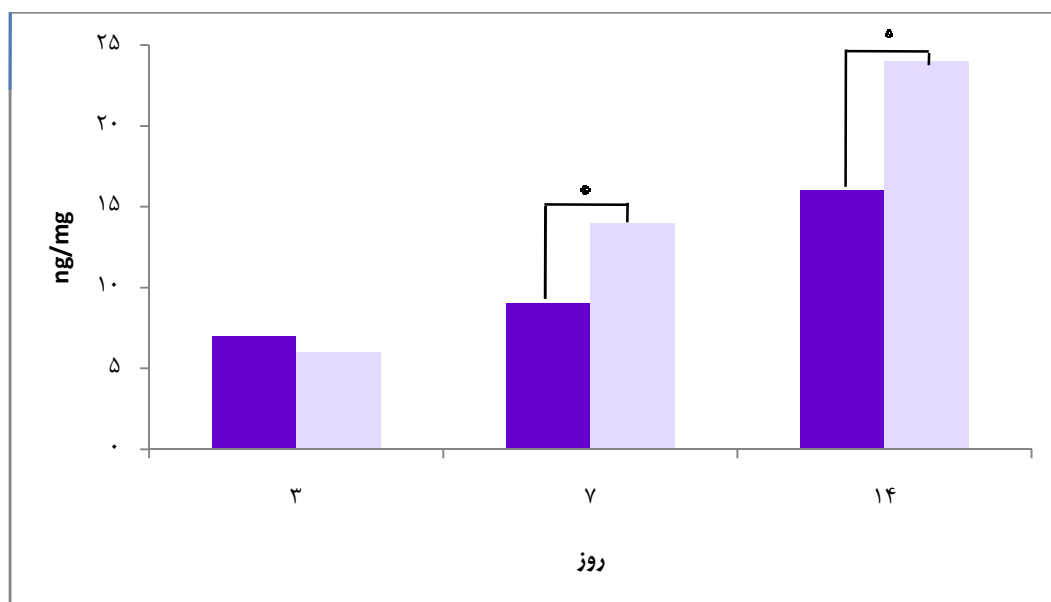
اگرگان ترش‌حی سلول‌های NP در داربست آلژینات نسبت به داربست کیتوسان-ژلاتین افزایش معنی‌داری داشت و این افزایش در روز ۷ و ۱۴ نسبت به روز ۳ بیشتر بود (شکل ۵).

داشت و این کاهش در داربست کیتوسان-ژلاتین به صورت معنی‌داری بیشتر از داربست آلژینات بود (شکل ۴).

بر اساس نتایج آزمایش ELISA، میانگین مقدار



شکل ۴. مقایسه‌ی تعداد سلول‌های زنده در روزهای مورد مطالعه در دو داربست. ستون آبی: داربست آلژینات، ستون خاکستری: داربست کیتوسان-ژلاتین  
\*: اختلاف معنی‌دار



شکل ۵. تغییرات غلظت اگرگان در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین در روزهای ۳، ۷ و ۱۴  
\*: اختلاف معنی‌دار

همچنین مشاهده شد که در هر دو داربست میانگین اگرکان تولیدی، از روز ۳ تا ۱۴ افزایش معنی‌داری داشت.

### بحث

استفاده از داربست مناسب، یکی از شرایط لازم در مهندسی بافت و ترمیم بافت‌ها می‌باشد. در ترمیم غضروف‌هایی مانند IVD نیز انتخاب داربست مناسب نقش بسزایی در موفقیت درمان دارد. بنابراین در روند ترمیم بافت مورد نظر باید از بهترین داربست که شرایط لازم و کافی را داشته باشد، استفاده نمود.

نتایج مطالعات نشان داده است که ژل آلژینات سبب افزایش تکثیر سلول‌های NP و افزایش ترشح ECM می‌شود. همچنین در تمایز کندروژنیک نیز نقش دارد (۱۲-۱۴).

نتایج ELISA در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین نشان داد که میزان ترشح اگرکان تولیدی توسط سلول‌های NP در داربست‌های آلژینات و کیتوسان-ژلاتین، از روز ۳ تا ۲۱ افزایش معنی‌داری داشت و این افزایش در داربست آلژینات نسبت به داربست کیتوسان-ژلاتین، مشخص‌تر بود.

هاشمی‌بنی و همکاران گزارش کرده‌اند که داربست آلژینات سبب رشد و تکثیر استئوبلاست‌های مشتق از کالوریا نیز می‌گردد. همچنین آن‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی تحت تأثیر فاکتور رشد BMP-6 در داربست آلژینات به کندروسیت تبدیل می‌شوند و ECM ترشح می‌کنند (۳۰).

نتایج شمارش سلول‌های NP کشت داده شده در مطالعه‌ی ما نشان داد که درصد سلول‌های زنده در روز سوم کشت نسبت به روز اول همان کشت

افزایش معنی‌داری داشت. به علاوه درصد سلول‌های زنده از روز سوم کشت به بعد، به صورت معنی‌داری تا روز ۲۱ کاهش یافت. این نتایج مشابه گزارش Bertolo و همکاران بود (۳۱). آن‌ها سلول‌های MSC را در داربست آلژینات کشت دادند و به سلول‌های NP متمایز کردند و مشاهده نمودند که میزان تکثیر سلول‌ها در روزهای اول کشت به بیشترین مقدار خود رسید، ولی بعد از آن این میزان به صورت معنی‌داری کاهش یافت. این در حالی بود که سلول‌های NP از همان روزهای اول کشت شروع به ترشح ECM کردند و این مقدار در روز ۳۵ به حداکثر مقدار خود رسید. پس می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌ها با کاهش تکثیر، شروع به ترشح ECM می‌کنند؛ به گونه‌ای که این کاهش تکثیر سلول‌ها، با افزایش ترشح ECM همراه است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان ترشح اگرکان در داربست آلژینات از روز ۷ تا ۲۱ نسبت به داربست کیتوسان-ژلاتین، اختلاف معنی‌داری داشت. قربانی و همکاران طی مطالعه‌ای، سلول‌های NP را در IVD انسانی در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین به مدت سه هفته کشت دادند و گزارش کردند که میزان تکثیر و رشد سلول‌های NP، از روز ۳ تا ۲۱ به صورت معنی‌داری در هر دو داربست کاهش داشت؛ به گونه‌ای که این کاهش تکثیر و رشد در داربست کیتوسان-ژلاتین به صورت معنی‌داری بیشتر از داربست آلژینات بود. آن‌ها دلیل این کاهش تکثیر و رشد را خاصیت هیدروژل بودن آلژینات که سبب تبادلات بهتر مواد غذایی و اکسیژن می‌شود، بیان کردند؛ ترشح ECM توسط سلول‌های NP به صورت ذاتی پس از مدتی تکثیر و بسته شدن

برای رشد، تکثیر و ترشح ECM مناسب‌تر باشند و این دلیلی بر مناسب‌تر بودن داربست آلژینات برای رشد، تکثیر و ترشح ECM توسط سلول‌های NP می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه داربست آلژینات نسبت به داربست کیتوسان-ژلاتین جهت ترشح ECM توسط سلول‌های NP انسانی در *In vitro* مناسب‌تر است. بنابراین پیشنهاد می‌شود که از این داربست در مهندسی بافت و درمان تخریب IVD در *In vivo* نیز استفاده شود.

### تشکر و قدردانی

از زحمات خانم فرشته علی‌اکبری که در انجام این طرح ما را یاری دادند، سپاسگزاری می‌نمایم.

منافذ سطحی داربست کیتوسان-ژلاتین که منجر به کاهش تبادلات غذایی به سلول‌های عمقی می‌شود (۳۲). بهرامیان و همکاران نیز در مطالعه‌ای جداگانه با کشت سلول‌های NP دیسک بین مهره‌ای انسانی در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین، نتایجی مشابه گزارش کردند (۳۳).

Roughley و همکاران، سلول‌های NP دیسک بین مهره‌ای گاو را در ژل کیتوسان که با پروتئین جنین مخلوط شده بود، کشت دادند و دریافتند که هیدروژل‌های کیتوسان قادر است سبب حفظ و نگهداری ECM تولید شده توسط سلول‌های NP شود و مانع آزاد شدن آن به محیط گردد. علاوه بر این، هیدروژل کیتوسان سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها نیز می‌گردد (۲۲).

با این وجود می‌توان ادعا کرد که شاید هیدروژل‌ها نسبت به داربست‌های غیر هیدروژلی

### References

- Oegema TR, Jr. The role of disc cell heterogeneity in determining disc biochemistry: a speculation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6): 839-44.
- Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering. *Tissue Eng* 2003; 9(4): 667-77.
- Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88(Suppl 2): 10-4.
- Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2008; 8(6): 888-96.
- Sobajima S, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Gene therapy for degenerative disc disease. *Gene Ther* 2004; 11(4): 390-401.
- Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng* 2007; 24(1): 5-21.
- Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)* 1998; 23(14): 1531-8.
- Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, Iwashina T, Serigano K, Tamura F, et al. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2010; 28(5): 623-30.
- Bronzino JD. The biomedical engineering handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis; 2006.
- Vunjak-Novakovic G, Freshney RI. Culture of cells for tissue engineering. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2006.
- Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2529-43.
- Guo JF, Jourdan GW, MacCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes



- encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res* 1989; 19(2-4): 277-97.
13. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Prasad S, V. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(5): 887-94.
  14. Leone G, Torricelli P, Chiumiento A, Facchini A, Barbucci R. Amidic alginate hydrogel for nucleus pulposus replacement. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84(2): 391-401.
  15. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2589-98.
  16. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2339-49.
  17. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(4): 586-95.
  18. Elder SH, Nettles DL, Bumgardner JD. Synthesis and characterization of chitosan scaffolds for cartilage-tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2004; 238: 41-8.
  19. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000; 21(21): 2155-61.
  20. Lee JY, Nam SH, Im SY, Park YJ, Lee YM, Seol YJ, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release* 2002; 78(1-3): 187-97.
  21. Mao J, Zhao L, de Yao K, Shang Q, Yang G, Cao Y. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(2): 301-8.
  22. Roughley P, Hoemann C, DesRosiers E, Mwale F, Antoniou J, Alini M. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation. *Biomaterials* 2006; 27(3): 388-96.
  23. Dang JM, Sun DD, Shin-Ya Y, Sieber AN, Kostuik JP, Leong KW. Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disc cells. *Biomaterials* 2006; 27(3): 406-18.
  24. Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madhally SV. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(36): 7616-27.
  25. Miranda SC, Silva GA, Hell RC, Martins MD, Alves JB, Goes AM. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. *Arch Oral Biol* 2011; 56(1): 1-15.
  26. Hong SR, Lee SJ, Shim JW, Choi YS, Lee YM, Song KW, et al. Study on gelatin-containing artificial skin IV: A comparative study on the effect of antibiotic and EGF on cell proliferation during epidermal healing. *Biomaterials* 2001; 22(20): 2777-83.
  27. Mao JS, Zhao LG, Yin YJ, Yao KD. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2003; 24(6): 1067-74.
  28. Thein-Han WW, Saikhun J, Pholpramoo C, Misra RD, Kitiyanant Y. Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells. *Acta Biomater* 2009; 5(9): 3453-66.
  29. Sun LP, Wang S, Zhang ZW, Wang XY, Zhang QQ. Biological evaluation of collagen-chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. *Biomed Mater* 2009; 4(5): 055008.
  30. Hashemibeni B, Razavi Sh, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Sadeghi F, et al. Effect of transforming growth factor- $\beta$ 3 and bone morphogenetic protein-6 growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in alginate scaffold. *J Isfahan Med Sch* 2010; 28(112): 607-20.
  31. Bertolo A, Mehr M, Aebli N, Baur M, Ferguson SJ, Stoyanov JV. Influence of different commercial scaffolds on the in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to nucleus pulposus-like cells. *Eur Spine J* 2012; 21(Suppl 6): S826-S838.
  32. Ghorbani M, Hashemibeni B, Bahramian H, Karimi Z, Zamani S, Mirhosseini SA, et al. Recognition of cytokeratin 18 marker by flow cytometry of nucleus pulposus cells in human intervertebral disc and comparison of proliferation and morphology of these cells in chitosan-gelatin and alginate scaffolds. *J Isfahan Med Sch* 2012; 30(188): 633-48.
  33. Bahramian Renani H, Ghorbani M, Hashemibeni Beni B, Karimi Z, Mirhosseini MM, Zarkesh H, et al. Determination and comparison of specifics of nucleus pulposus cells of human intervertebral disc in alginate and chitosan-gelatin scaffolds. *Adv Biomed Res* 2012; 1: 81.

## Comparison of the Production of Extracellular Matrix in Nucleus Pulposus of Intervertebral Disc in Alginate and Chitosan-Gelatin Scaffolds

Masoud Ghorbani MSc<sup>1</sup>, Hamid Bahramian PhD<sup>2</sup>, Batoul Hashemi Beni PhD<sup>2</sup>,  
Zeinab Karimi<sup>3</sup>, Nafiseh Esmaeel MSc<sup>4</sup>, Mohammad Salehi MSc<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Low back pain is an important disorder linked with degenerative changes in the intervertebral disc (IVD). Degradation of IVD is caused by decreased number of cells, reduced production and degradation of extracellular matrix of IVD tissue especially in nucleus pulposus (NP). Natural and synthetic scaffolds are used for regeneration of IVD in tissue engineering. Aggrecan is an important proteoglycan in NP tissue of IVD. This study aimed to levels of aggrecan secreted by human NP cells of IVD in alginate and chitosan-gelatin scaffolds.

**Methods:** Collagenase enzymatic hydrolysis was used to extract NP cells from NP tissue of patients with IVD hernia in Alzahra Hospital (Isfahan, Iran). Chitosan gel was mixed with gelatin gel and freeze dried to make the scaffold. An alginate scaffold was also prepared. Cellular suspension containing the extracted NP cells was transferred to each scaffold and cultured for 14 days. The levels of secreted aggrecan were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. A light microscope was used to assert the morphology of NP cells.

**Findings:** Secretion of aggrecan had significant increases during the third to the 14<sup>th</sup> day. The increments were more considerable in alginate scaffolds. There were significant differences in secreted aggrecan between alginate and chitosan scaffolds on the seventh and 14<sup>th</sup> days. However, no such a significant difference was observed on the third day. The two scaffolds were significantly different in terms of the secretion of extracellular matrix by NP.

**Conclusion:** Compared to the chitosan-gelatin scaffold, the alginate scaffold provided better conditions for aggrecan secretion in NP cells in vitro. The use of thus scaffold is suggested to culture NP cell in vivo.

**Keywords:** Alginate, Chitosan-gelatin, Scaffold, Intervertebral disc, Tissue engineering, Aggrecan

**Citation:** Ghorbani M, Bahramian H, Hashemi Beni B, Karimi Z, Esmaeel N, Salehi M. **Comparison of the Production of Extracellular Matrix in Nucleus Pulposus of Intervertebral Disc in Alginate and Chitosan-Gelatin Scaffolds.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(225): 82-91

\* This paper is derived from a medical doctorate thesis No. 389437 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- PhD Student, Department of Tissue Engineering, School of New Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- PhD Student, Department of Biostatistics, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

**Corresponding Author:** Batoul Hashemi Beni PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir