

## شناسایی مارکر درون سلولی سیتوکراتین ۱۸ به وسیله فلوسایتومتری در سلول‌های نکلئوس پالپوزوس دیسک بین مهره‌ای انسانی و مقایسه‌ی توان تکثیر و مورفولوژی این سلول‌ها در داربست‌های بیوپلیمری آلژینات و کیتوسان-ژلاتین

مسعود قربانی<sup>۱</sup>، دکتر بتول هاشمی بنی<sup>۲</sup>، دکتر حمید بهرامیان<sup>۳</sup>، زینب کریمی<sup>۴</sup>، سعید زمانی<sup>۴</sup>، دکتر سید احمد میرحسینی<sup>۵</sup>، دکتر سید حمید زرکش اصفهانی<sup>۶</sup>

### چکیده

**مقدمه:** دژنه شدن دیسک بین مهره‌ای در اثر کاهش تعداد سلول‌ها، کاهش تولید و تخریب ماتریکس خارج سلولی بافت دیسک بین مهره‌ای به خصوص در ناحیه نکلئوس پالپوزوس (NP) ایجاد می‌شود. در مهندسی بافت از داربست‌های طبیعی و غیر طبیعی مختلف برای ترمیم و رژنه شدن دیسک بین مهره‌ای استفاده می‌گردد. داربست‌های مورد استفاده باید تخریب پذیر و زیست سازگار باشند و محیط مناسبی برای تکثیر و مهاجرت سلول‌ها فراهم کنند. کیتوسان-ژلاتین و آلژینات از داربست‌های طبیعی خوبی هستند که برای این منظور مناسب هستند. برای شناسایی سلول‌های NP مارکر و روش خاصی وجود ندارد، ولی بعضی مطالعات گزارش‌هایی از بیان بالای مارکرهای سیتوکراتین ۱۹، ۱۸ و ۸ توسط تکنیک‌های Real time و ایمنوسیتوشیمی در سلول‌های NP منتشر کرده‌اند. هدف از این مطالعه، شناسایی سلول‌های NP دیسک بین مهره‌ای انسانی توسط فلوسایتومتری مارکر سیتوکراتین ۱۸، مقایسه‌ی میزان بقا، تکثیر و مورفولوژی سلول‌های NP در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین بود.

**روش‌ها:** سلول‌های NP با تجزیه‌ی آنزیمی کلاژناز از بافت NP بیماران مبتلا به فتق دیسک بین مهره‌ای در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان تهیه گردید. محلول کیتوسان با محلول ژلاتین مخلوط شد. پس از ایجاد ارتباط بین این دو محلول توسط گلوآل‌آل‌دید، مخلوط حاصل پس از فریز کردن و Freeze-drying به عنوان داربست مورد استفاده قرار گرفت. داربست آلژینات نیز تهیه گردید. پس از تأیید NP بودن سلول‌های جدا شده توسط فلوسایتومتری کردن مارکر درون سلولی سیتوکراتین ۱۸، سوسپانسیون سلولی حاوی سلول‌های NP جدا شده به دو داربست منتقل گردید و تا ۲۱ روز کشت داده شدند. برای بررسی درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر از تکنیک‌های تریپان بلو و MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide] استفاده گردید. برای اثبات وجود منافذ و بررسی ساختار داربست و مورفولوژی سلول‌ها نیز از میکروسکوپ SEM (Scanning electron microscope) استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج فلوسایتومتری نشان داد که ۶۰ سلول زنده مارکر سیتوکراتین ۱۸ را بیان می‌کنند. نتایج MTT نیز نشان داد که درصد سلول‌های زنده در روز سوم نسبت به روز اول در هر دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین درصد سلول‌های زنده از روز ۳ تا ۲۱ به صورت معنی‌داری کاهش یافت. نتایج شمارش سلول‌ها نشان داد که اختلاف میانگین تعداد سلول‌ها در داربست آلژینات به صورت معنی‌داری بیشتر از داربست کیتوسان-ژلاتین بود ( $P < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از مارکر سیتوکراتین ۱۸ توسط فلوسایتومتری برای شناسایی سلول‌های NP استفاده نمود. همچنین داربست آلژینات نسبت به داربست کیتوسان-ژلاتین محیط مناسب‌تری برای رشد و تکثیر سلول‌های NP انسانی در *in vitro* فراهم می‌کند. پیشنهاد می‌شود از این داربست برای کشت سلول‌های NP در *in vivo* استفاده گردد.

**واژگان کلیدی:** دیسک بین مهره‌ای، مهندسی بافت، کیتوسان، ژلاتین، آلژینات، سیتوکراتین ۱۸

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۳</sup> دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۴</sup> دانشجوی دکتری، گروه آناتومی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۵</sup> استاد، گروه جراحی مغز و اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۶</sup> دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## مقدمه

کمردرد یک اختلال شایع اسکلتی عضلانی در جوامع امروزی است؛ به طوری که در ایالت متحده آمریکا حدود ۸۰-۶۰ درصد مردم آن را تجربه می‌کنند و به عنوان یکی از مشکلات عمده اقتصادی-اجتماعی محسوب می‌شود (۱). در انگلستان سالانه حدود ۱۱ بلیون پوند بابت این مشکل هزینه می‌شود (۲). مطالعات نشان داده است که بین دژنره شدن دیسک بین مهره‌ای و کمردرد ارتباط وجود دارد (۳) و فتق دیسک بین مهره‌ای یا تخریب داخلی دیسک یکی از عوامل مهم کمردرد محسوب می‌شود که در اثر غیر طبیعی بودن ساختار دیسک اتفاق می‌افتد (۴).

دیسک بین مهره‌ای یک سگمنت حرکتی است که بین مهره‌ها قرار دارد و از خارج به داخل شامل ۳ منطقه است: آنولوس فیبروزیس (AF)، ناحیه‌ی ترانزیشن یا (End plate) و نکلئوس پالپوزوس (NP) که هسته‌ی مرکزی دیسک را می‌سازد (۵-۶). NP و AF به طور عمده از ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده است. دیسک بین مهره‌ای و به خصوص NP تعداد سلول‌های کمی دارد که ۱ درصد حجم بافت دیسک را تشکیل می‌دهند (۷). ماتریکس خارج سلولی NP شامل آب، کلاژن نوع ۲، هیالورونان و پرتئوگلیکان‌ها به خصوص اگرکان می‌باشد. این عناصر خاصیت آبکی و ویسکوالاستیکی به دیسک می‌دهند که سبب جذب شوک‌های وارده، حفظ الاستیته‌ی دیسک و محافظت در برابر نیروهای وارده به دیسک می‌شوند (۸).

دژنره شدن دیسک بین مهره‌ای یک فرایند است که با افزایش سن ایجاد می‌شود و سبب ایجاد تغییر در ترکیب، ساختار و عملکرد دیسک می‌گردد (۹). استراتژی درمانی مفید برای درمان دژنره شدن

سلول درمانی و انتقال ژن است که در حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است (۱۱-۱۰). در ژن درمانی محققین با مهار کردن IL-R (Interleukin receptors) توانستند سبب بهبود عملکرد دیسک بین مهره‌ای دژنره گردند (۲).

همچنین محققین با Down regulate کردن متالوپروتئینازها در درمان دژنره شدن دیسک بین مهره‌ای مطالعاتی انجام دادند. این مطالعات نشان داد که عملکرد متالوپروتئینازها باید در حال تعادل باشد و این تعادل باید حفظ گردد. بیان بالا یا پایین متالوپروتئینازها سبب اختلال در عملکرد دیسک بین مهره‌ای می‌گردد، بنابراین با تعادل رساندن بیان متالوپروتئینازها می‌توان سبب رژنره شدن دیسک بین مهره‌ای شد (۱۲).

سلول درمانی بر خلاف ژن درمانی و مولکول درمانی خطرهای انتقال ژن ویروسی و مسایل تولید فاکتور رشد را ندارد، بنابراین یک راه حل مفید برای درمان دیسک دژنره شده می‌باشد (۱۳). سلول درمانی در مدل‌های حیوانی آزمایش شده و موفقیت‌هایی در بیماری‌های دیسک دژنره حاصل شده است (۸). مطالعاتی در درمان دژنره شدن دیسک بین مهره‌ای با سلول درمانی انجام شد و مشخص گردید که این راه درمانی سبب افزایش ارتفاع دیسک دژنره و کاهش درد در بیماران درمان شده با کندروسیت‌ها شده است (۱۴). در مهندسی بافت ابتدا یک ماده‌ی متخلخل به عنوان ماتریکس خارج سلولی یا داربست برای رشد سلول‌ها تهیه می‌شود و سپس عوامل رشد بر روی آن قرار می‌گیرند. پس از فعال شدن و رشد سلول‌ها در فضای متخلخل داربست و به وجود آمدن بافت مناسب، این ساختار تولید شده در محیط آزمایشگاه به درون بدن موجود زنده منتقل می‌شود (۱۷-۱۵، ۹).

در مورد جدا کردن سلول‌های NP از دیسک بین مهره‌ای و بررسی تکثیر آن‌ها در *in vitro* مطالعات زیادی انجام شده است که به پاره‌ای از آن‌ها اشاره می‌کنیم.

تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های شبه نکلئوس پالپوزوس به وسیله‌ی هم‌کشتی با سلول NP بالغ نیز یکی از راه‌های افزایش تکثیر سلول‌های NP و درمان دژنره شدن می‌باشد (۱۱). Nishimura و Mochida طی گزارشی اعلام کردند که تزریق سلول‌های NP بافت اتولوگ دژنره شدن دیسک بین مهره‌ای را کاهش می‌دهد (۱۸). Okuma و همکاران نیز ثابت کردند که توانایی بیولوژیکی سلول‌های NP در اثر هم‌کشتی با سلول‌های AF افزایش می‌یابد (۱۹). در اثر هم‌کشتی سلول‌های NP با سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز ساخت پروتئوگلیکان‌ها و همچنین تکثیر سلول‌های NP افزایش می‌یابد (۲۰).

با توجه به این که استفاده از داربست مناسب یکی از شرایط لازم در مهندسی بافت می‌باشد، بنابراین در ترمیم غضروف‌هایی مانند دیسک بین مهره‌ای نیز انتخاب داربست مناسب نقش بسزایی در موفقیت درمان دارد و در روند ترمیم بافت مورد نظر باید از بهترین داربست که شرایط لازم را داشته باشد، استفاده نمود. در حقیقت داربست مورد نظر یک فضای سه بعدی جهت تکثیر سلول‌ها، تولید و ترشح ماتریکس خارج سلولی و شکل‌گیری بافت طبیعی را فراهم می‌سازند (۲۱-۲۲، ۱۷).

در مهندسی بافت راهبرد مناسب برای ترمیم بافت‌ها به دست آوردن موادی است که ویژگی‌های مناسب جهت رسیدن به هدف ترمیم بافت‌های آسیب دیده را دارا باشند (۲۱-۲۴). داربست باید زیست تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و دارای منافذ مناسب با تخلخل کنترل

شده، باشد. سطح داربست باید برای چسبندگی، تکثیر، مهاجرت و رشد سلولی مناسب باشد. پلیمرها به عنوان زیر مجموعه‌ای از بیومتریال‌ها دارای بیشترین قابلیت تخریب و تخلخل‌پذیری هستند و به دودسته اصلی پلیمرهای طبیعی و مصنوعی تقسیم می‌شوند (۲۳-۲۲). از پلیمرهای مصنوعی می‌توان نایلون‌ها، پلی‌لاکتید اسیدها، پلی‌یورتان‌ها و پلی‌استرها را نام برد. از پلیمرهای طبیعی مهم می‌توان به آلژینات، کلاژن، کیتوسان، اسید هیالورونیک، آگاروز و ابریشم اشاره کرد.

آلژینات یک بیوپلیمر طبیعی است که به طور عمده از جلبک قهوه‌ای و به میزان کمتر از باکتری‌ها استخراج می‌شود (۲۴). تحقیقات فراوانی در زمینه‌ی داربست آلژینات انجام گرفته است. آلژینات در بعضی مایعات قابل حل است و در دمای اتاق و در شرایط کاتیونی مناسب (Ca، Ba) ژل‌های مناسبی را تشکیل می‌دهد. قطرات آلژینات تکثیر سلولی، عملکرد و فنوتیپ سلول‌ها را بهبود می‌بخشد (۲۶-۲۵).

Guo و همکاران سلول‌های کندروسیت را بر روی آلژینات قرار دادند و مورفولوژی سلولی را بررسی نمودند و مشاهده کردند که کندروسیت‌ها بر روی آلژینات شکل گرد خود را حفظ می‌کنند. در ضمن سیستم ژل آلژینات روند کندروژنز سلول‌های مشتق از پریوستیوم را حمایت می‌کند و سبب القای کندروژنیک در سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و بافت چربی نیز می‌شود و در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز نقش دارد (۲۵).

مطالعات نشان داده است که داربست آلژینات سبب تکثیر بیشتر سلول‌های NP و افزایش ترشح ماتریکس خارج سلولی توسط این سلول‌ها می‌شود (۲۶). طی مطالعاتی سلول‌های NP از دیسک بین مهره‌ای انسان و

مهاجرت سلولی را افزایش می‌دهد (۳۷).  
 ژلاتین یک بیوپلیمر طبیعی است که از هیدرولیز کلاژن به دست می‌آید. زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و تحریک نکردن سیستم ایمنی از خصوصیات خوب ژلاتین می‌باشد (۳۸). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که اضافه کردن ژلاتین به داربست کیتوسان سبب افزایش خاصیت هیدروفیلیکی کیتوسان می‌شود و سبب مناسب‌تر شدن این داربست برای کشت کراتینوسیت‌ها و ترمیم پوست می‌گردد (۳۹).  
 ژلاتین جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی است و سبب افزایش چسبندگی سلول‌ها می‌شود (۴۰).  
 اتصال ژلاتین به داربست کیتوسان توسط کراس لینکرهایی مانند گلو تارآلدید (۴۱) یا آنزیم (۴۲) صورت می‌گیرد که در بافت‌های مختلفی مانند پوست، غضروف و استخوان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۳۷، ۳۹، ۴۳).  
 نتایج مطالعات نشان می‌دهد که داربست کیتوسان-ژلاتین در تکثیر سلول‌های بنیادی پالپ دندان (SHED یا Stem cells from human exfoliated deciduous teeth) بسیار مؤثر است. اگر چه اتصال این سلول‌ها به داربست سست می‌باشد، ولی می‌توان از لینکرهایی برای اتصال محکم این سلول‌ها استفاده نمود (۳۷).  
 در مورد جدا کردن سلول‌های NP از دیسک بین مهره‌ای و بررسی تکثیر آن‌ها بر روی داربست‌های مختلف در *in vitro* مطالعات زیادی انجام شده است. اگر چه در مورد تأثیر داربست کیتوسان-ژلاتین در *in vitro* تحقیقات زیادی صورت گرفته است (۴۴، ۴۰)، ولی در خصوص کشت سلول‌های NP بر روی این داربست اطلاعات جامعی وجود ندارد. به تازگی گزارش شده است که داربست کیتوسان-ژلاتین ساختار شبکه‌ای مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌ها در

خرگوش جدا شدند و ترشح کلاژن نوع ۲ و اگرکان و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها توسط این سلول‌های شبه کندروسیتی اثبات گردید (۲۸-۲۷).  
 کیتوسان پلیمر گلیکوزآمین و N استیل گلیکوزآمین است که از د-پلاریزاسیون و د-استیلاسیون کیتین به دست می‌آید (۲۹-۳۰). خاصیت کاتیونی کیتوسان آن را به عنوان داربست جذاب و مفیدی تبدیل کرده است که برای اگرکان تولیدی کندروسیت‌ها که خاصیت آنیونی دارند، بسیار مفید است و یک محیط سازگار برای کندروسیت‌ها ایجاد می‌کند (۳۱-۳۲).  
 کیتوسان از لحاظ زیست سازگاری و ساختاری شبیه گلیکوزآمینوگلیکان‌های ماتریکس خارج سلولی در غضروف است (۳۱-۳۲). همچنین کیتوسان یک داربست فوق‌العاده تجزیه‌پذیر و زیست‌سازگار می‌باشد که از خصوصیات داربست‌های خوب در مهندسی بافت محسوب می‌شود (۳۰). کیتوسان به عنوان داربست در جاهای مختلف استفاده می‌شود. ترمیم استخوان و غضروف (۳۱-۳۲) و سیستم عصبی (۳۳) نمونه‌هایی از کاربرد کیتوسان می‌باشد.  
 طبق تحقیقات انجام شده تأثیر داربست کیتوسان در تکثیر سلول‌های NP و میزان ترشح ماتریکس خارج سلولی بررسی شده است. نتایج این مطالعات نشان داده است که این نوع داربست باعث افزایش تکثیر سلول‌های NP و ترشح ماتریکس خارج سلولی می‌شود (۳۴-۳۶).  
 برای بهبود خواص مکانیکی و بیولوژیکی کیتوسان می‌توان پلیمرهایی را به آن اضافه نمود. ژلاتین از جمله‌ی این پلیمرها است که سبب بهبود فعالیت بیولوژیکی می‌شود؛ چرا که از توالی اسید آمینه‌ی منحصر به فردی تشکیل شده است که چسبندگی و

مقایسه با کیتوسان خالص فراهم می‌کند (۴۴-۴۵).

سلول‌های NP سلول‌های شبه کندروسیتی هستند که از لحاظ مورفولوژی گرد می‌باشند و مانند سلول‌های غضروف مفصلی ماتریکس خارج سلولی ترشح می‌کنند، اما میزان اگرگان و کلاژن تولیدی این سلول‌ها با سلول‌های غضروف مفصلی متفاوت است و این تفاوت به دلیل عملکرد مختلف این دو بافت می‌باشد. به دلیل همین تفاوت، مارکرهای شناسایی سلول‌های NP نیز باید متفاوت باشند. تاکنون چندین مارکر برای اثبات سلول‌های NP پیشنهاد شده است. Sakai و همکاران طی مطالعه‌ای گزارش کردند که سلول‌های NP پروتئین‌های سیتوکراتین ۱۹، ۱۸ و ۸ را به میزان زیادی بیان می‌کنند. سیتوکراتین‌ها پروتئین‌های درون سلولی هستند و جزء شبکه‌ی سیتواسکلتال سلول‌های NP محسوب می‌شوند. بنابراین آن‌ها پیشنهاد کردند که می‌توان از این مارکرها برای شناسایی این سلول‌ها استفاده نمود (۴۶). مطالعات کمی در خصوص شناسایی مارکرهای ویژه سلول‌های NP انجام شده است و مارکرهای معرفی شده، مارکرهای قوی برای تأیید سلول‌های NP نیستند؛ چرا که این مارکرها هم در اکثر سلول‌های دیسک بین مهره‌ای بیان می‌شوند و هم در سلول‌های بافت‌های دیگر (۴۶)، بنابراین نمی‌توان با قطعیت از این مارکرها برای شناسایی سلول‌های NP استفاده نمود.

مارکرهای سیتوکراتین از جمله مارکرهایی هستند که در سلول‌های NP بیان می‌شوند و می‌توان از آن‌ها برای شناسایی این سلول‌ها استفاده نمود، اما در مطالعات دیگران از تکنیک‌های ایمنوسیتوشیمی و Real time-PCR (Real time-polymerase chain reaction) برای شناسایی این سلول‌ها استفاده شده

است. ما در این مطالعه، از تکنیک فلوسایتومتری که تکنیکی ساده‌تر، راحت‌تر و ارزان‌تر است برای شناسایی سلول‌های NP استفاده نمودیم.

هدف از این مطالعه، شناسایی مارکر درون سلولی سیتوکراتین ۱۸ به وسیله‌ی فلوسایتومتری در سلول‌های NP دیسک بین مهره‌ای انسانی و مقایسه‌ی توان تکثیر و مورفولوژی این سلول‌ها در داربست‌های بیوپلیمری آلژینات و کیتوسان-ژلاتین بود.

### روش‌ها

کیتوسان (با درجه‌ی داستیلیشن ۸۵ درصد)، ژلاتین و آلژینات از کمپانی سیگمای آمریکا خریداری گردید. برای تهیه‌ی داربست کیتوسان-ژلاتین، گرد کیتوسان در اسید استیک ۰/۲ مولار حل شد تا محلول کیتوسان ۱/۵ درصد (W/V) با pH = ۴/۴ به دست آید. گرد ژلاتین نیز در آب آنالار حل شد تا محلول ژلاتین ۰/۵ درصد ساخته شد (۳۱). کیتوسان ۱/۵ درصد با محلول ژلاتین ۰/۵ درصد به نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط شدند. از گلو تار آلدئید ۰/۲۵ درصد (با نسبت ۱:۳۲) برای برقراری ارتباط بین پلیمرهای ژلاتین و کیتوسان استفاده شد (۴۱). مخلوط کیتوسان-ژلاتین در دیش ۱۰ سانتی متری ریخته شد. ضخامت مخلوط در دیش ۴ سانتی متر بود. سپس دیش در فریزر در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. در نهایت هم به مدت ۳۶ ساعت Lyophilized شد. برای حذف بقایای اسید استیک، داربست در سیراتانول (Grade ethanol series) قرار گرفت و سه بار با محلول PBS (Phosphate buffer saline) شستشو داده شد و به طور مجدد Lyophilized گردید.

نفوذپذیر می‌گردید. به همین دلیل پس از سانتریفیوژ و شستشوی نمونه‌ها با PBS حدود ۲۰۰ میکرولیتر کیت Fixation/Permeabilization (BD Cytifix/Cytoperm) به نمونه‌ها اضافه گردید و حدود ۴۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شد.

بعد از نفوذپذیر کردن غشای سلول‌های NP حدود ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی سیتوکراتین ۱۸ کونژوگه شده با FITC (Fluorescein isothiocyanate) علیه مارکرهای درون سیتوپلاسمی به هر یک از لوله‌ها افزوده شد. سلول‌ها در آنتی‌بادی به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از شستشو با بافر و سانتریفیوژ، رسوب سلولی در ۵۰۰ میکرولیتر بافر سوسپانسیون شده قرار گرفت و شمارش سلول‌های نشان‌دار با دستگاه فلوسایتومتر BD به انجام رسید.

انتقال سلول‌های NP به داربست کیتوسان/ژلاتین طبق پروتکل مقالات انجام گردید (۳۱). داربست‌های کیتوسان-ژلاتین تهیه شده به قطعات ۵ میلی‌متری با ضخامت ۴ میلی‌متر بریده شدند و به پلیت ۲۴ خانه انتقال یافتند و با اشعه‌ی UV به مدت نیم ساعت استریل گردیدند. سلول‌های NP انسانی در پاساژ اول کشت مونولایر با تریپسین/EDTA تریپسینه و سانتریفیوژ شدند. حجم ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی محتوی  $4 \times 10^5$ ، با پیپت به داربست ژلاتین/کیتوسان انتقال داده شد.

بر اساس پروتکل مقالات (۲۵)، محلول آلژینات به رسوب سلولی که محتوی  $4 \times 10^5$  سلول بود، اضافه شد و با سرنگ ۲۲ به صورت قطره قطره 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 درآمدند. شستشو

برای تهیه‌ی داربست آلژینات، پودر آلژینات در محلول NaCl ۰/۹ درصد حل شد تا محلول آلژینات ۱/۲ درصد ساخته شد. سپس محلول فیلتر گردید (۲۵). قطعات بافتی طبق پروتکل مقالات (۳۴-۳۵) از مرکز NP حدود دیسک‌های بین مهره‌ای انسانی که تحت جراحی فتق دیسک بین مهره‌ای قرار گرفته شده بودند، استخراج و به قطعات کوچک‌تری خرد شد و در محلول Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 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  $1800$  دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون سلولی در ظروف کشت که حاوی DMEM/F12، ۵۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین - استرپتومایسین (سیگمای آمریکا) و ۲۵ میکروگرم اسید L-آسکوربیک بود، کشت داده شد. ظروف کشت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با  $CO_2$  ۵ درصد قرار گرفتند.

برای شناسایی سلول‌های NP و متمایز کردن آن‌ها از سلول‌های فیروبلست و دیگر سلول‌های بافت NP، فلوسایتومتری مارکر درون سلولی سیتوکراتین ۱۸ (CK-18) انجام گردید. سلول‌های کشت یافته در پاساژ اول با روش تریپسینه نمودن از کف دیش جدا گردید. سوسپانسیون سلولی با دور ۱۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با بافر PBS شستشوی سلول‌ها دوباره انجام گرفت و پس از آن سلول‌ها شمارش گردید. چون مارکر سیتوکراتین ۱۸ درون سلولی است قبل از اضافه نمودن آنتی‌بادی غشا باید

با محلول NaCl به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت و سپس بیدهای واقع در خانه‌های پلیت ۲۴ خانه با مدیوم F12 شستشو داده شدند. پس از شستشو با مدیوم، مدیوم F12 (شامل FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین - استرپتومایسین) به هر خانه اضافه شد و در نهایت پلیت‌ها به انکوباتور منتقل و تا ۲۱ روز کشت داده شدند. هر ۳ روز یک بار مدیوم تعویض گردید.

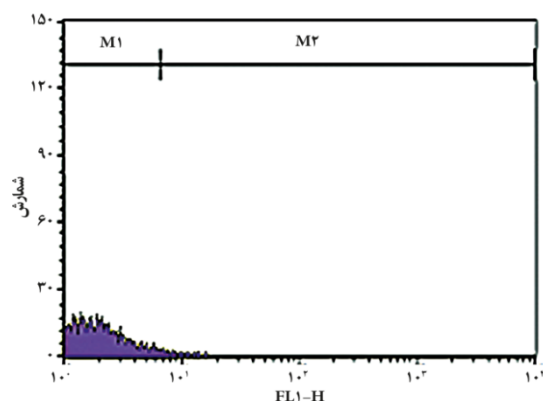
در داربست آلزینات، سلول‌های NP باید از داربست جدا می‌شدند که این کار با اضافه کردن سیترات سدیم به فالکونی که حاوی بیدهای آلزینات بود، انجام گردید. پس از ۲۰ دقیقه داربست آلزینات حل گردید و سلول‌های NP از داربست آزاد شدند. در داربست کیتوسان - ژلاتین سلول‌های NP به وسیله‌ی غوطه‌ور کردن داربست کیتوسان - ژلاتین حاوی سلول در آنزیم تریپسین / EDTA از داربست جدا شدند. حدود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی هر دو داربست پس از سانتریفیوژ کردن به ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو اضافه شد و مخلوط گردید. سپس حدود ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط به لام نئوبار منتقل گردید تا سلول‌های مرده در زیر میکروسکوپ اینورت شمارش گردد.

برای بررسی میزان بقای سلول‌ها، ابتدا داربست‌های آلزینات و کیتوسان - ژلاتین حاوی سلول‌های کاشته شده در چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و سپس مدیوم تخلیه و با PBS شستشو داده شد. در مرحله‌ی بعد مدیوم همراه با MTT به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد نگهداری شد. بعد از آن، مدیوم تخلیه و DMSO اضافه و عمل پیت کردن انجام گردید. در انتها این محلول به پلیت ۹۶ چاهک منتقل و توسط دستگاه

ELISA reader با طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب نوری آن مشخص گردید. برای مقایسه‌ی Viability و Proliferation در دو داربست آلزینات و کیتوسان - ژلاتین از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون Mann-Whitney استفاده شد.  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

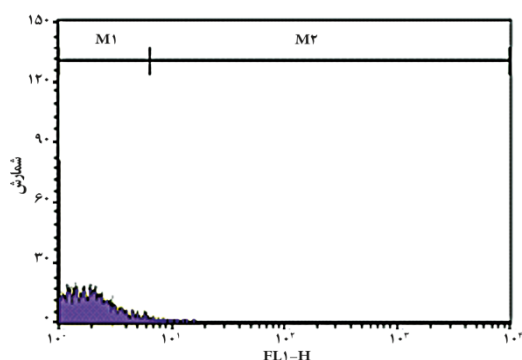
### یافته‌ها

نتایج حاصل از تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که ۶۰ درصد از سلول‌های NP در کشت اولیه مارکر سیتوکراتین ۱۸ را بیان کردند (شکل ۱-۳).



شکل ۱. مربوط به گروه Isotype ontrol سلول‌های NP بدون

افزودن آنتی‌بادی سیتوکراتین ۱۸

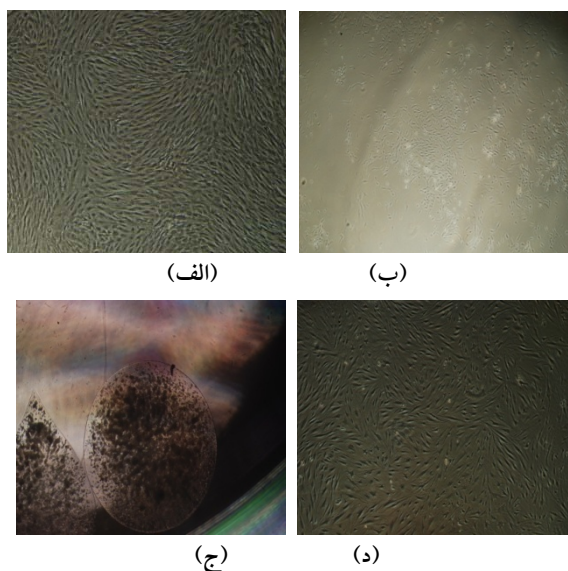


شکل ۲. مربوط به گروه Unstan: سلول‌های NP بدون افزودن

آنتی‌بادی سیتوکراتین ۱۸ که در مجاورت آنتی‌بادی منفی موشی

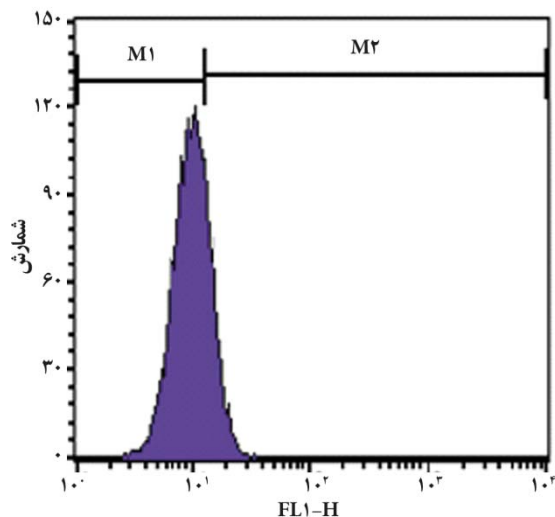
CD45 قرار گرفته‌اند

مربوط مقاطع عرضی نیز تهیه شد و مشاهده گردید که در عمق داربست اندازه‌ی منافذ به ۱ میلی‌متر هم می‌رسید (شکل ۵-ج). مورفولوژی سلول‌های NP در داربست کیتوسان-ژلاتین نیز با SEM بررسی شد و مشاهده گردید که سلول‌های NP در روز اول انتقال به داربست گرد هستند و زواید کوتاهی دارند (شکل ۵-ب)، ولی در روزهای ۳ به بعد سلول‌ها دوکی شکل شدند و زواید بلندی پیدا کردند و محکم به داربست چسبیدند (شکل ۵-د).



شکل ۴. الف) سلول‌های NP در کشت مونولایر پاساژ صفر: نواری شکل بودن و کوچک بودن سلول‌ها مشهود است. ب) سلول‌های NP در کشت مونولایر پاساژ اول: سلول‌های فیبروبلاستی شکل با زواید بلندی دیده می‌شوند. ج) پاساژ دوم، کشت مونولایر: سلول‌های NP، شکل بسیار کشیده و چند وجهی و نامناسب پیدا می‌کنند. د) قطره‌ی کروی شکل از آلژینات (Bead): سلول‌ها با مورفولوژی کروی شکل در منافذ آلژینات قرار دارند (بزرگ‌نمایی ۴۰×).

برای بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌های NP کشت داده شده در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین تکنیک MTT انجام شد. هیبریدهای سلول-



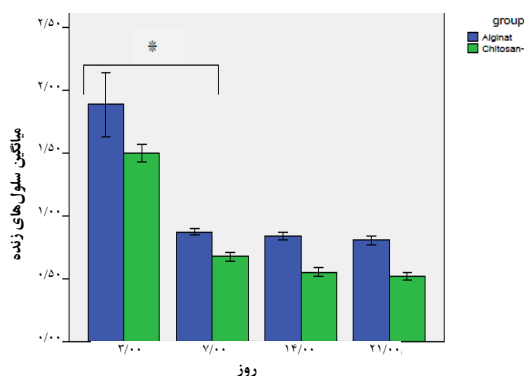
شکل ۳. مربوط به گروه سلول‌های NP با افزودن آنتی‌بادی سیتوکراتین ۱۸: نتایج و پیک نمودار نشان می‌دهد که اکثر سلول‌های NP، مارکر سیتوکراتین ۱۸ را بیان کرده‌اند.

سلول‌های NP کشت داده شده در محیط کشت مونولایر در ابتدا بسیار کوچک و نواری شکل بودند (شکل ۴-الف)، ولی در پاساژهای بالاتر این سلول‌ها به اشکال فیبروبلاستی با زواید بلند تغییر یافتند (شکل ۴-ب). میزان تکثیر سلول‌ها در کشت اولیه و پاساژ یک به نسبت زیاد، ولی در پاساژهای بالاتر میزان تکثیر این سلول‌ها کاهش و مورفولوژی آن‌ها تغییر پیدا می‌کرد (شکل ۴-ج). بنابراین از سلول‌های پاساژ یک برای انتقال به داربست‌های آلژینات و کیتوسان-ژلاتین استفاده شد تا شانس بیشتری برای جلوگیری از تغییر مورفولوژی این سلول‌ها باشد.

عکس‌های SEM (Scanning electron microscope) از داربست کیتوسان-ژلاتین، ساختاری با منافذ بسیار بالا را با میانگین ۱۲۵ میکرومتر نشان داد (۲۰۰-۵۰ میکرومتر) (شکل ۵-الف). تصاویر SEM از هیبرید سلول-داربست نشان داد که سلول‌ها در سطوح داربست توزیع شده و با زوایدشان محکم به سطوح داربست چسبیده‌اند (شکل ۵-ب). از نمونه‌های



برای بررسی میزان سلول‌های مرده و زنده‌ی NP از رنگ‌آمیزی تریپان بلو از پاساژ سلول‌ها در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ استفاده شد. لازم به ذکر است که در روزهای ۳ به بعد  $10^2 \times 1$  سلول با خارج شدن از داربست به کف خانه‌های پلیت ۲۴ خانه چسبیدند و تکثیر کردند که این مقدار سلول در روز دوم با تریپسین کردن کف خانه‌های پلیت و شمارش سلول‌ها از مقدار کل سلول‌های انتقال یافته به داربست ( $4 \times 10^5$  سلول) کسر شدند. نتایج شمارش سلول‌ها نشان داد که اختلاف میانگین تعداد سلول‌ها در داربست آلژینات به صورت معنی‌داری بیشتر از داربست کیتوسان-ژلاتین بود (شکل ۷).



شکل ۷. نتایج تریپان بلو میانگین سلول‌های زنده را نشان می‌دهد.

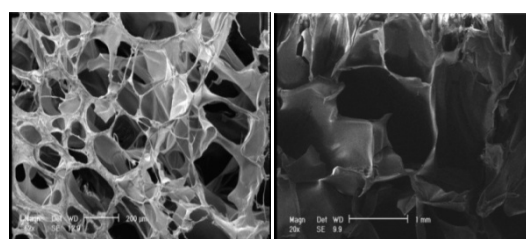
\*:  $P < 0.05$  بین هر دو گروه داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین در روزهای ۳ و ۷

## بحث

در مطالعه‌ی حاضر تأثیر دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین در رشد و تکثیر سلول‌های NP دیسک بین مهره‌ای انسانی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که داربست آلژینات در مقایسه با داربست کیتوسان-ژلاتین در تکثیر و میزان بقای سلول‌های NP نقش مؤثرتری ایفا می‌کند.

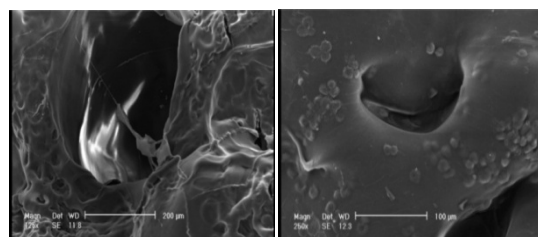
اثبات NP بودن سلول‌ها توسط فلوسایتومتری تأیید شد. حدود ۶۰ درصد سلول‌ها مارکر درون سلولی

داربست در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند و با هم مقایسه گردیدند. نتایج نشان داد که درصد سلول‌های زنده در روز سوم نسبت به روز اول در هر دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین درصد سلول‌های زنده از روز ۳ تا ۲۱ به صورت معنی‌داری کاهش داشت (شکل ۶).



(الف)

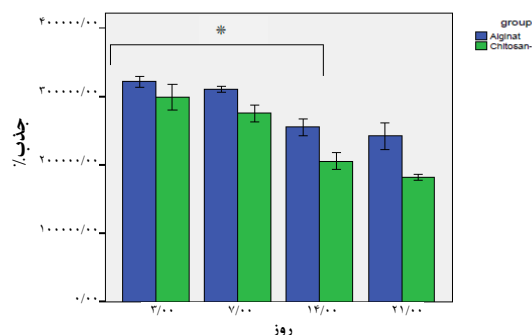
(ب)



(ج)

(د)

شکل ۵. (الف) تصویر SEM از داربست کیتوسان-ژلاتین، میانگین اندازه‌ی منافذ ۱۲۵ میکرومتر می‌باشد. (ب) تصویر SEM از مقطع عرضی داربست کیتوسان-ژلاتین، اندازه‌ی منافذ ۱ میلی‌متر می‌باشد. (ج) تصویر SEM از هیبرید سلول و داربست کیتوسان-ژلاتین در روز اول کشت. فلش سلول‌های NP را نشان می‌دهد که گرد می‌باشند. (د) تصویر SEM از هیبرید سلول و داربست کیتوسان-ژلاتین در روز سوم کشت، فلش یک سلول NP را نشان می‌دهد که با زواید محکم به لبه‌های داربست کیتوسان-ژلاتین چسبیده است.



شکل ۶. نتایج MTT میزان تکثیر سلول‌های NP را نشان می‌دهد.

\*:  $P < 0.05$  بین هر دو گروه داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین در روزهای ۳ و ۷

می‌شوند و ماتریکس خارج سلولی ترشح می‌کنند (۴۷). 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. آن‌ها سلول‌های بنیادی مزانشیمی MSc را در داربست آلژینات کشت دادند و به سلول‌های NP متمایز کردند. آن‌ها مشاهده کردند 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 (۴۸). 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.

داربست کیتوسان نیز از جمله داربست‌هایی است که در مهندسی بافت کاربرد فراوانی دارد. این داربست اثر بسزایی در تکثیر سلول‌های NP و ترشح ماتریکس خارج سلولی دارد (۳۴-۳۶). از آن جا که داربست مورد استفاده در مهندسی بافت باید خواص مکانیکی و فیزیولوژیکی مناسبی داشته باشد و چسبندگی سلولی زیاد باشد، بنابراین به داربست مورد استفاده پلیمرهایی مانند کلاژن و ژلاتین اضافه می‌گردد (۳۷).

Thein-Han و همکاران نشان دادند که افزایش میزان ژلاتین به داربست کیتوسان سبب افزایش تخلخل، نرمی، انعطاف‌پذیری و الاستیته‌ی این داربست می‌گردد (۴۴). ما نیز در این مطالعه برای

CK-18 را بیان کردند. این میزان بیان بسیار بالا نبود، ولی قابل قبول بود. دلیل کاهش بیان این مارکر، کم بودن درصد سلول‌های NP در بافت NP می‌باشد؛ چرا که تنها ۱ درصد حجم دیسک بین مهره‌ای را سلول‌ها تشکیل می‌دهند و بیشتر حجم آن را ماتریکس خارج سلولی تشکیل می‌دهد. بنابراین گروهی از سلول‌ها که فلوسایتومتری شدند، حاوی سلول‌های دیگر نیز بودند.

با مطالعات و بررسی ما تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص استفاده از فلوسایتومتری برای شناسایی مارکر سیتوکراتین ۱۸ در سلول‌های NP گزارش نشده است. در چند مطالعه‌ای که برای شناسایی این سلول‌ها انجام گرفته است از تکنیک‌های ایمنوسیتوشیمی و Real time-PCR برای شناسایی این مارکرها استفاده شده است، اما این تکنیک‌ها سخت، وقت‌گیر و گران قیمت هستند. از طرفی، مارکر سیتوکراتین یک مارکر درون سلولی است و آشکار کردن آن بسیار سخت است. بنابراین در این مطالعه از فلوسایتومتری برای شناسایی مارکر سیتوکراتین ۱۸ در سلول‌های NP استفاده شده است.

در این مطالعه میانگین تکثیر و درصد سلول‌های زنده در داربست آلژینات در مقایسه با داربست کیتوسان-ژلاتین بیشتر بود. ژل آلژینات سبب افزایش تکثیر سلول‌های NP و افزایش ترشح ماتریکس خارج سلولی می‌شود. همچنین در تمایز کندروژنیک نیز نقش دارد (۲۸-۲۶).

هاشمی بنی و همکاران گزارش کردند که داربست آلژینات سبب رشد و تکثیر استئوبلاست‌های مشتق از کالواریا نیز می‌گردد. آن‌ها همچنین نشان دادند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی تحت تأثیر فاکتور رشد BMP-6 در داربست آلژینات به کندروسیت تبدیل

عرضی که از این داربست تهیه شد، مشاهده گردید که در عمق داربست کیتوسان-ژلاتین اندازه‌ی منافذ به ۱ میلی‌متر هم رسید.

بعد از کشت سلول‌های NP در داربست کیتوسان-ژلاتین، عکس‌های SEM نشان داد که در روز اول کشت سلول‌ها به سطوح داربست چسبیدند و توزیع شدند و از نظر مورفولوژی گرد بودند. سپس زواید درازی پیدا کردند، فیروبلاستی شکل شدند و محکم به داربست چسبیدند. نتایج SEM همچنین نشان داد که مورفولوژی سلول‌های NP کشت داده شده در داربست کیتوسان-ژلاتین مشابه مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده در فلاسک‌ها بود.

نتایج MTT و تریپان بلو در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین نشان داد که میزان رشد و تکثیر و همچنین درصد سلول‌های زنده در داربست‌های آلژینات و کیتوسان-ژلاتین در روز سوم به صورت معنی‌داری بیشتر از روز اول کشت بود و از روز ۳ تا ۲۱ این میزان به صورت معنی‌داری در هر دو داربست کاهش یافت. این نتایج شبیه گزارش‌های Mao و همکاران بود که بعد از کشت فیروبلاست‌ها روی داربست کیتوسان-ژلاتین مشاهده کردند که تعداد فیروبلاست‌ها از روز ۷ به بعد کاهش یافتند. آن‌ها دلیل این کاهش را محدودیت تبادلات مواد غذایی در اثر رشد سلول‌ها می‌دانستند (۴۰).

Bertolo و همکاران با کشت سلول‌های MSC روی داربست آلژینات و کیتوسان و تمایز آن‌ها به سلول‌های NP گزارش کردند که سلول‌های NP به دست آمده در همان هفته‌های اول شروع به ترشح ماتریکس خارج سلولی می‌کنند؛ به طوری که در هفته‌ی ۵ کشت این مقدار بسیار زیاد می‌باشد. این در

بهبود خواص ذکر شده برای داربست کیتوسان از ژلاتین استفاده کردیم و برای ایجاد باند بین کیتوسان و ژلاتین، گلوآرآلدئید به کار بردیم.

در مهندسی بافت از روش‌های متعددی مانند Salt leaching و Gas foaming برای ایجاد تخلخل استفاده می‌شود. یکی از روش‌هایی هم که برای ایجاد ساختار اسفنجی و پرتخلخل استفاده می‌گردد، روش Freeze-drying می‌باشد (۴۹). ما هم برای ایجاد ساختار متخلخل از این روش استفاده نمودیم. نتایج SEM این مطالعه نشان داد که داربست کیتوسان-ژلاتین دارای ساختاری متخلخل و اسفنجی بود و منافذ با هم ارتباط داشتند. در مهندسی بافت وجود تخلخل و Porosity مناسب نقش مؤثری در رشد و انتشار مواد غذایی دارد (۵۰). لازم به ذکر است که اندازه‌ی منافذ به دمای فریز قبل از Freeze drying بستگی دارد. هر چه دمای فریز کمتر باشد، تعداد کریستال‌های یخ بیشتر و بنابراین اندازه‌ی سوراخ‌های داربست کوچک‌تر می‌باشد (۳۹).

وجود منافذ با اندازه‌ی کوچک سبب افزایش قدرت ساختار بیومکانیکی داربست می‌شود (۵۰) و هر چه اندازه‌ی منافذ داربست بزرگ‌تر باشد، سبب تغذیه‌ی بهتر، تکثیر بیشتر سلول‌ها و ترشح ECM می‌شود (۵۰). Hsieh و همکاران گزارش کردند که مناسب‌ترین دمای فریز برای ساخت داربست کیتوسان متخلخل و پایدار و بادوام دمای فریز ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد است (۵۱). بدین سبب در این مطالعه نیز فرایند فریز کردن در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

تصاویر SEM از سطوح داربست کیتوسان-ژلاتین نشان داد که اندازه‌ی منافذ داربست بین ۲۵۰-۵۰ میکرومتر (میانگین ۱۲۵ میکرومتر) بود و در مقاطع

داربست، سبب مسدود شدن سوراخ‌های سطحی و در نتیجه کاهش ظرفیت داربست برای تکثیر بیشتر سلول‌های NP و نگهداری اگرکان تولیدی توسط این سلول‌ها می‌شود. مسدود شدن منافذ سطحی همچنین سبب کاهش انتقال مواد غذایی به سلول‌های عمقی می‌گردد و در نتیجه سبب مردن یا کاهش تکثیر این سلول‌ها می‌شود. Griffon و همکاران سلول‌های کندروسیت را در داربست کیتوسان کشت دادند و گزارش کردند که وقتی اندازه‌ی سوراخ‌های سطحی داربست کوچک باشد، ماتریکس خارج سلولی تولیدی توسط کندروسیت‌های چسبیده به سطح داربست به مرور زمان سبب کاهش تغذیه و تبادلات مواد غذایی به سلول‌های عمقی‌تر و در نتیجه مرگ و دژنره شدن آن‌ها می‌گردد (۵۰).

هیدروژل بودن آلژینات سبب می‌شود که سلول‌ها بتوانند ارتباط بیشتری با هم برقرار کنند و تبادلات مواد غذایی و اکسیژن مناسب‌تر صورت گیرد (۴۸). Li و Zhang گزارش کردند که داربست کیتوسان مخلوط شده با آلژینات نسبت به کیتوسان خالص سبب افزایش تکثیر کندروسیت‌های کشت شده روی آن‌ها با حفظ مورفولوژی و افزایش ترشح ماتریکس خارج سلولی از روزهای اول کشت تا روز ۲۱ می‌گردد (۵۳). این نتایج خود دلیلی بر مناسب‌تر بودن آلژینات نسبت به کیتوسان می‌باشد، بنابراین می‌توان به جای استفاده از ژلاتین از آلژینات استفاده کرد.

Roughley و همکاران سلول‌های NP دیسک بین مهره‌ای Bovine را در ژل کیتوسان جنین کشت دادند و بیان کردند که هیدروژل‌های کیتوسان قادر هستند سبب حفظ و نگهداری ماتریکس خارج سلولی تولید شده توسط سلول‌های NP و مانع آزاد شدن آن به مدیوم

حالی بود که تعداد سلول‌ها در این زمان بسیار کمتر از روزهای اول بود. این نتایج حاکی از آن است که سلول‌ها فقط در روزهای اول کشت تکثیر می‌کنند و بعد از آن به جای تکثیر شروع به ترشح ماتریکس خارج سلولی می‌کنند (۴۸).

نتایج تحقیقات Miranda و همکاران نیز نشان داد که تعداد سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان از روز ۳ به بعد پس از کشت بر روی داربست کیتوسان-ژلاتین کاهش می‌یابد، بنابراین پیشنهاد گردید که روز سوم کشت سلول زمان مناسبی برای Transplantation سلول‌ها در vivo است (۵۲).

مقایسه‌ی نتایج MTT و تریپان بلو در دو داربست آلژینات و کیتوسان-ژلاتین نشان داد که میزان تکثیر و بقای سلول‌ها در داربست آلژینات به صورت معنی‌داری بیشتر از داربست کیتوسان-ژلاتین می‌باشد. متفاوت بودن میزان تکثیر و بقای سلول‌ها در دو داربست علل متفاوتی دارد. یکی از این علل این است که گلو تار آلدیدی که در ساخت داربست کیتوسان-ژلاتین استفاده گردید، ماده‌ای است که برای برقراری ارتباط بین کیتوسان و ژلاتین استفاده می‌شود (۳۷).

به نظر می‌رسد که این ماده به مرور زمان از داربست خارج می‌شود و سبب می‌گردد که داربست استحکام خود را از دست دهد و متلاشی گردد (تغییر رنگ مدیوم و متلاشی شدن داربست شاهد این قضیه می‌باشد) و در نتیجه این ماده سبب کاهش رشد و تکثیر سلول‌های NP می‌گردد (۳۷).

علت دیگر کوچک بودن اندازه‌ی منافذ سطحی در برخی نواحی داربست کیتوسان-ژلاتین است. بعد از چند روز کشت سلول NP در این داربست، افزایش تعداد سلول‌ها در اثر تکثیر و ترشح اگرکان روی سطح

می‌شود که از این داربست در مهندسی بافت و درمان دژنره شدن دیسک بین مهره‌ای انسانی در *in vivo* نیز استفاده شود.

### پیشنهادها

اثرات داربست کیتوسان-ژلاتین و آلژینات در تکثیر و میزان بقای سلول‌های NP در این مطالعه بررسی شد و لازم است طی مطالعات بیشتر اثر این داربست‌ها در تولید و ترشح ماتریکس خارج سلولی و همچنین تأثیرات این داربست‌ها در مدل حیوانی نیز بررسی شود.

### References

1. Waddell G. Low back pain: a twentieth century health care enigma. *Spine (Phila Pa 1976)* 1996; 21(24): 2820-5.
2. Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Interleukin-1 receptor antagonist delivered directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human intervertebral disc: an in situ zymographic and gene therapy study. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(4): R83.
3. Mauth C, Bono E, Haas S, Paesold G, Wiese H, Maier G, et al. Cell-seeded polyurethane-fibrin structures--a possible system for intervertebral disc regeneration. *Eur Cell Mater* 2009; 18: 27-38.
4. Boos N, Rieder R, Schade V, Spratt KF, Semmer N, Aebi M. 1995 Volvo Award in clinical sciences. The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging, work perception, and psychosocial factors in identifying symptomatic disc herniations. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995; 20(24): 2613-25.
5. Oegema TR, Jr. The role of disc cell heterogeneity in determining disc biochemistry: a speculation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6): 839-44.
6. 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.
7. 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.
8. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration.

شوند. علاوه بر این هیدروژل کیتوسان سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها نیز می‌گردد (۳۵).

با این وجود می‌توان ادعا کرد که هیدروژل‌ها نسبت به داربست‌های غیر هیدروژلی برای رشد و تکثیر و حتی ترشح ماتریکس خارج سلولی مناسب‌تر می‌باشند.

### نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه داربست آلژینات نسبت به داربست کیتوسان-ژلاتین جهت تکثیر و میزان بقای سلول‌های NP انسانی در *in vitro* مناسب‌تر است. بنابراین پیشنهاد

- Spine J 2008; 8(6): 888-96.
9. Tabata Y. Recent progress in tissue engineering. *Drug Discov Today* 2001; 6(9): 483-7.
10. Nishida K, Suzuki T, Kakutani K, Yurube T, Maeno K, Kurosaka M, et al. Gene therapy approach for disc degeneration and associated spinal disorders. *Eur Spine J* 2008; 17(Suppl 4): 459-66.
11. 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.
12. Goupille P, Jayson MI, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? *Spine (Phila Pa 1976)* 1998; 23(14): 1612-26.
13. Sobajima S, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Gene therapy for degenerative disc disease. *Gene Ther* 2004; 11(4): 390-401.
14. 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.
15. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
16. Schantz JT, Hutmacher DW, Lam CX, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC, et al. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng* 2003; 9(Suppl 1): S127-S139.
17. Tsuchiya K, Chen G, Matsuno T. The effect of

- coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Mat Sci Eng C-Bio S* 2004; 24: 391-6.
18. Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)* 1998; 23(14): 1531-8.
  19. Okuma M, Mochida J, Nishimura K, Sakabe K, Seiki K. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study. *J Orthop Res* 2000; 18(6): 988-97.
  20. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, Nakai T, Nishimura K, Kawada H, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004; 29(14): 1508-14.
  21. Bronzino JD. *The Biomedical Engineering Handbook*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Taylor & Francis; 2006.
  22. Vunjak-Novakovic G, Freshney RI. *Culture of Cells For Tissue Engineering*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2006.
  23. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4(Suppl 3): S63-S68.
  24. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2529-43.
  25. 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.
  26. 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.
  27. 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.
  28. Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, Oegema TR, Jr. Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anat* 1995; 186(Pt 1): 43-53.
  29. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2589-98.
  30. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2339-49.
  31. 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.
  32. Elder SH, Nettles DL, Bumgardner JD. Synthesis and characterization of chitosan scaffolds for cartilage-tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2004; 238: 41-8.
  33. 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.
  34. 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.
  35. 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.
  36. 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 disk cells. *Biomaterials* 2006; 27(3): 406-18.
  37. Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(36): 7616-27.
  38. 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.
  39. Mao J, Zhao L, De YK, 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.
  40. Mao JS, Zhao LG, Yin YJ, Yao KD. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2003; 24(6): 1067-74.
  41. Chen T, Embree HD, Brown EM, Taylor MM, Payne GF. Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. *Biomaterials* 2003; 24(17): 2831-41.
  42. Xia W, Liu W, Cui L, Liu Y, Zhong W, Liu D, et al. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 71(2): 373-80.
  43. Yin Y, Ye F, Cui J, Zhang F, Li X, Yao K. Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67(3): 844-55.
  44. 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.
45. 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.
46. Sakai D, Nakai T, Mochida J, Alini M, Grad S. Differential phenotype of intervertebral disc cells: microarray and immunohistochemical analysis of canine nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009; 34(14): 1448-56.
47. 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.
48. 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* 2011.
49. Jiankang H, Dichen L, Yaxiong L, Bo Y, Hanxiang Z, Qin L, et al. Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomater* 2009; 5(1): 453-61.
50. Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, Eurell JA, Johnson AL. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater* 2006; 2(3): 313-20.
51. Hsieh CY, Tsai SP, Ho MH, Wang DM, Liu CE, Hsieh CH, et al. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds. *Carbohydrate Polymers* 2007; 67(1): 124-32.
52. 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.
53. Li Z, Zhang M. Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75(2): 485-93.

## 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

Masoud Ghorbani MSc<sup>1</sup>, Batool Hashemibani PhD<sup>2</sup>, Hamid Bahramian PhD<sup>2</sup>, Zeinab Karimi<sup>3</sup>, Saeed Zamani<sup>4</sup>, Seyyed Ahmad Mirhosseini MD<sup>5</sup>, Seyyed Hamid Zarkesh Isfahani MD<sup>6</sup>

### Abstract

**Background:** Low back pain is a major economical and social problem nowadays. Intervertebral disc herniation and central degeneration of disc are two major reasons of low back pain that occur because of structural impairment of discs. Intervertebral disc includes the annulus fibrosus, transitional region, and nucleus pulposus (NP). NP forms the central nucleus of the disc. Reduction of cell count and extracellular matrix, especially in NP, causes disc degeneration. Different scaffolds (natural and synthetic) have been used for tissue repairing and regeneration of intervertebral disc in tissue engineering. Most scaffolds have biodegradable and biocompatible characteristics and also prepare a fine condition for proliferation and migration of cells. Although no specific marker or method has been suggested for recognition of NP cells, some studies have used real time and immunocytochemical methods and reported high expression of cytokeratin 19, 18, 8, and others as markers for NP cells. This study aimed to recognize NP cells of human intervertebral disc by flow cytometry of cytokeratin 18 marker. It also compared the proliferation and morphology of these cells in chitosan-gelatin scaffold and alginate scaffold.

**Methods:** NP cells were derived by enzymatic hydrolysis of collagenase from NP tissue of patients undergoing open surgery for discectomy in Alzahra Hospital (Isfahan, Iran). Chitosan was blended with gelatin and glutaraldehyde was used for cross linking of the two polymers. Then, alginate scaffold was prepared. After approving the NP cells by flow cytometry of cytokeratin 18 marker, a cellular suspension with  $4 \times 10^5$  cells was transferred to each scaffold and cultured for 21 days. Cell viability and proliferation were investigated by trypan blue and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. A scanning electron microscope (SEM) was used to assert the porosity and to survey the structures of the scaffolds.

**Findings:** We can use flow cytometry of cytokeratin 18 markers for recognition of NP cells. MTT assay demonstrated that cell viability on the third day had significant difference with the first day in both scaffolds. There was also a significant reduction in cellular viability from day 3 to day 21. Results of cell count showed that mean difference between cell counts in alginate scaffold was significantly more than chitosan-gelatin scaffold ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** Flow cytometry of cytokeratin 18 can be used as a method for recognition of NP cells. Compared to chitosan-gelatin scaffold, alginate scaffold prepared a better condition for proliferation of NP cells. The results of this study suggested that alginate scaffold could be useful in in-vivo studies and treatment.

**Keywords:** Intervertebral disc, Tissue engineering, Degeneration, Scaffold, Chitosan, Gelatin, Alginate, Cytokeratin 18

<sup>1</sup> PhD Student, Department of Tissue Engineering, School of Modern Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>3</sup> Student of Medicine, School of Medicine And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>4</sup> PhD Student, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>5</sup> Professor, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>6</sup> Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Batool Hashemibani, PhD, Email: hashemibani@med.mui.ac.ir