

ارزیابی مقایسه‌ای متابولیسم کندروسیت‌های مفصلی، تحت شرایط مختلف فشار جزئی اکسیژن و pH بر روی دو داربست زیست تخریب‌پذیر پلی‌یورتان و آلژینات

دکتر سعید کرباسی*

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۰

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۸

* استادیار گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

مقدمه: غضروف بافتی بدون رگ است که توانایی پایینی در خودترمیمی دارد و یکی از روش‌های ترمیم آن، بهینه کردن عوامل فیزیکیوشیمیایی مؤثر بر روی سیستم داربست سلول می‌باشد. سیستم داربست سلول، سیستم مهندسی شده‌ای است که می‌تواند با کنترل عوامل مختلف فیزیکی و بیوشیمیایی در عملکرد سلول و رشد بافت جدید تأثیر بگذارد؛ علاوه بر آن که انتخاب نوع داربست نیز می‌تواند در فرآیند متابولیسم سلولی و تشکیل بافت جدید تأثیرگذار باشد.

روش‌ها: در این تحقیق، پس از جداسازی کندروسیت‌های مفصلی از مفصل پای گوساله‌های ۹-۶ ماهه، تأثیر دو عامل فیزیکیوشیمیایی یعنی فشار جزئی اکسیژن و pH بر میزان تولید و نرخ تولید لاکتیت بعد از ۱، ۲ و ۳ روز کشت سلولی و تولید گلایکوسامینوگلیکن (glycosaminoglycan یا GAG) بعد از ۳، ۷ و ۱۴ روز کشت سلولی کندروسیت‌ها بر روی داربست زیست تخریب‌پذیر پلی‌یورتان (BPUS) و آلژینات بررسی و مقایسه شد. یافته‌ها: تغییر فشار جزئی اکسیژن و pH، بدون توجه به نوع داربست، می‌تواند باعث تغییر میزان لاکتیت و GAG تولید شده و در نتیجه تغییر متابولیسم کندروسیت‌ها شود. بهترین شرایط متابولیسم بر روی هر دو داربست در فشار جزئی ۵٪ اکسیژن و pH=۷/۴ حاصل شد ($P < 0/001$). مقایسه‌ی نتایج بین داربست BPUS و آلژینات نشان داد که متابولیسم سلولی تحت شرایط بهینه، بر روی داربست آلژینات بهتر از BPUS می‌باشد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: تغییرات فشار جزئی اکسیژن و pH، می‌تواند باعث تغییر حجم سلول و در نتیجه تغییر در مکانیزم انتقال مواد مغذی به داخل و خارج از سلول گردد. بنابراین، بهینه‌سازی شرایط فشار جزئی اکسیژن و pH می‌تواند باعث بهینه شدن فرآیند glycolysis در غضروف شود. از طرف دیگر، آبدوستی بیشتر آلژینات نسبت به BPUS می‌تواند سبب توزیع بهتر و تغذیه‌ی مناسب‌تر سلول‌ها در شرایط مختلف فیزیکیوشیمیایی شود؛ چرا که این آبدوستی موجب انتقال بهتر مواد مغذی به سلول‌ها شده، عاملی برای بهتر بودن متابولیسم سلول‌ها بر روی آلژینات می‌گردد.

واژگان کلیدی: کندروسیت‌ها، عوامل فیزیکیوشیمیایی، پلی‌استر یورتان، آلژینات، مهندسی بافت

تعداد صفحات: ۱۵
تعداد جدول‌ها: -
تعداد نمودارها: ۱۶
تعداد منابع: ۳۱

آدرس نویسنده مسئول: دکتر سعید کرباسی، استادیار گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
E-mail: karbasi@med.mui.ac.ir

مقدمه

غضروف مفصلی بافتی بدون رگ است که از طریق نفوذ مواد مغذی از عروق خونی موجود در استخوان و انتقال آن توسط سیال سینویال تغذیه می‌شود (۱). به دلیل وجود فرآیند تغذیه‌ای آهسته، نقش گلوکز و به خصوص اکسیژن، در متابولیسم غضروف بسیار حساس است.

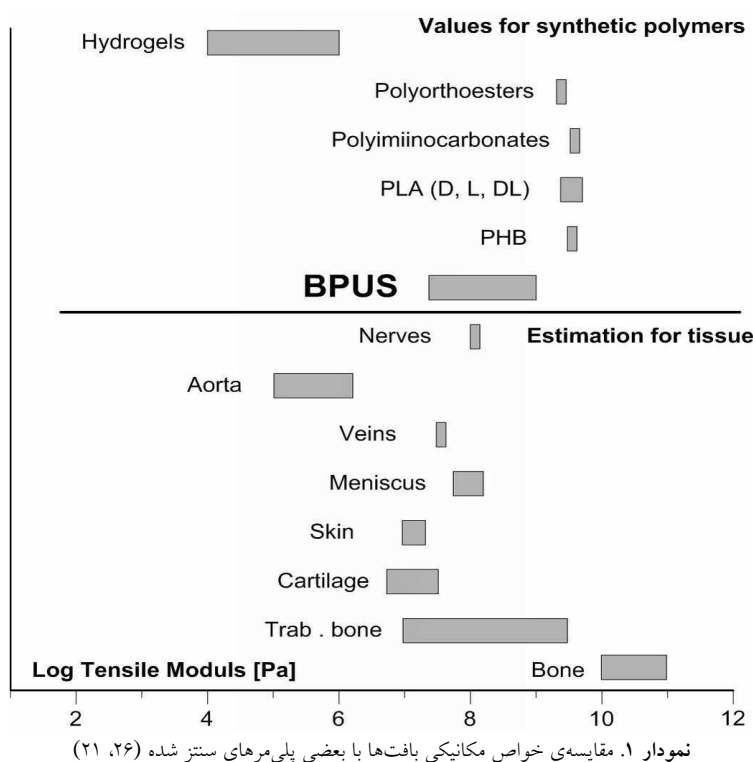
کندروسیت‌های غضروف مفصلی در مقایسه با دیگر سلول‌ها، از اکسیژن کمی برای تغذیه‌ی خود استفاده می‌کنند (۲). بر اساس مطالعات انجام گرفته، غضروف مفصلی تنها ۵-۲٪ اکسیژن به ازای هر سلول مصرف می‌کند (۳). در واقع سلول‌های کندروسیت، از طریق فرآیند glycolysis و در یک پروسه‌ی غیرهوازی، گلوکز را مصرف و لاکتیت را تولید می‌کنند و در نتیجه موجب تولید ATP (adenosine-tri-phosphate) می‌شوند (۴-۵). بازده فرآیند غیرهوازی glycolysis (۲ مول ATP به ازای یک مول گلوکز) بسیار کمتر از فرآیند هوازی glycolysis (۳۶ مول ATP به ازای یک مول گلوکز) می‌باشد (۴-۶). بنابراین می‌توان گفت که احتمال دارد شرایط عمومی کشت سلولی (۲۱٪ فشار جزئی اکسیژن)، متابولیسم مناسبی برای سلول‌های کندروسیت فراهم نکند.

از طرف دیگر، نقش اکسیژن در فیزیولوژی سلول‌های کندروسیت به طور کامل شناخته نشده است. غلظت اکسیژن می‌تواند در تخریب و آسیب غضروفی نقش مهمی داشته باشد (۷). تا کنون مطالعات بسیار زیادی در خصوص نقش اکسیژن پیرامون غضروف مفصلی انجام گرفته است (۱۲-۸، ۲-۱). اما نکته‌ی قابل توجه آن است که بتوان با کنترل عوامل فیزیکوشیمیایی مثل فشار جزئی اکسیژن و pH، سرعت

فرآیند glycolysis و در نتیجه متابولیسم سلول‌های کندروسیت را افزایش داد. مشاهدات نشان داده است که میزان غلظت اکسیژن موجود در سطح غضروف ۵۷-۴۵ میلی‌متر جیوه و در عمق آن کم‌تر از ۷/۶ میلی‌متر جیوه می‌باشد. در حالی که pH خارج سلولی بین ۶/۸ تا ۷/۱ قرار دارد (۱۳-۱۴). تحت چنین شرایط فیزیولوژیکی، غضروف توانایی پایینی در ترمیم خود دارد (۱۵). یکی از روش‌های مناسب برای بازسازی آسیب‌های غضروفی، استفاده از داربست سه بعدی، به عنوان بستری برای متابولیسم سلول‌های کندروسیت می‌باشد (۲۰-۱۶). مطالعات انجام شده بر روی داربست‌های مختلف، تحت شرایط فیزیولوژیک یکسان، نشان داده است که متابولیسم کندروسیت‌ها بر روی هر داربست متفاوت است (۲۱). این به آن معنی است که نوع داربست، به عنوان یکی از عوامل اصلی در مهندسی بافت، می‌تواند متابولیسم سلولی را تحت تأثیر قرار دهد. یکی از انواع داربست‌هایی که به تازگی در مهندسی بافت غضروف مفصلی کاربرد پیدا کرده است، پلی‌مری با نام تجاری DegraPol®، یک داربست پلی‌یورتانی زیست تخریب‌پذیر (BPUS) می‌باشد (۲۴-۲۲). BPUS یک پلی‌مر الاستیک، زیست تخریب‌پذیر و بسیار زیست سازگار است (۲۵). این پلی‌مر، یک کوپلی‌استر بلوکی بر پایه‌ی هیدروکسی بوتیرات و هیدروکسی آلکانوات (۹۳٪ وزنی) است که متصل به واحدهای تری‌متیل‌هگزامتیلن‌دی‌ایزوسیانات (TMDI) (۷٪ وزنی) می‌باشد (۲۶). نرخ تخریب BPUS متناسب با انتخاب ترکیب شیمیایی، می‌تواند بین چند هفته تا چند سال تنظیم شود. همچنین این پلی‌مر می‌تواند محدوده‌ی خواصی از بسیار الاستیک تا سفت و شکننده داشته باشد. اندازه‌ی تخلخل‌ها در این

روی دو داربست BPUS و آلژینات (به عنوان ماده‌ای معروف برای مطالعه‌ی متابولیسم کندروسیت‌ها)، در شرایط مختلف فشار جزئی اکسیژن و pH، آرایه نموده است (۲۷). در این مطالعه نشان داده شد که زیست‌پذیری سلولی بر روی بسترهای آلژینات، در همه‌ی شرایط فیزیوکوشیمیایی و بعد از سه روز کشت سلولی، بهتر از BPUS می‌باشد. در مطالعه‌ی مزبور، بهترین شرایط فیزیوکوشیمیایی برای متابولیسم کندروسیت‌ها، برای هر دو داربست، فشار جزئی ۵٪ اکسیژن و $pH = 7.4$ بود. اما با توجه به آن که نتایج فوق تحت شرایط مختلف و با بررسی متابولیسم سلولی در فواصل زمانی طولانی‌تر باید به اثبات برسد، در این تحقیق به ارزیابی مقایسه‌ای متابولیسم سلول‌های کندروسیت مفصلی بر روی دو داربست BPUS و آلژینات تحت شرایط مختلف فشار جزئی اکسیژن و pH پرداخته شده است.

پلی‌مر در حدود ۳۰۰-۵۰ میکرومتر و حجم تخلخل‌ها در حدود ۹۵٪ می‌باشد. شکل ۱، نمودار مقایسه‌ای از خواص بافت‌ها و بعضی پلی‌مرهای سنتزی را نشان می‌دهد. در این شکل مشخص است که BPUS در مقایسه با سایر پلی‌مرهای پزشکی، محدوده‌ی وسیعی از خواص مکانیکی را دارا است، به طوری که این خواص، به خواص مکانیکی غضروف نیز شبیه است. این مسأله می‌تواند به تنهایی یکی از دلایل برتری BPUS نسبت به سایر پلی‌مرها، در مهندسی بافت غضروف مفصلی باشد. با بررسی مطالعات قبلی، هیچ گزارشی مبنی بر مطالعه‌ی اثر پارامترهای فیزیوکوشیمیایی، مثل فشار جزئی اکسیژن و pH، بر متابولیسم کندروسیت‌های مفصلی بر روی داربست BPUS مشاهده نشد. لازم به ذکر است که گروه تحقیقاتی ما به تازگی مطالعه‌ای مقایسه‌ای بین زیست‌پذیری سلولی (cell viability) کندروسیت‌ها بر



روش‌ها

۱. جداسازی سلول‌های کندروسیت:

جداسازی سلول‌های کندروسیت از مفصل Metacarpophalangeal پای گوساله‌های ۹-۶ ماهه انجام گرفت (۲۳، ۲). روش کار به این ترتیب بود که پس از بریدن پای حیوان و ضدعفونی کردن آن، بافت غضروفی از محل مفصلی جدا و در محیط تغذیه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا بافت تغذیه و سلول‌ها جداسازی شود. محیط کشت تغذیه شامل ترکیبات زیر بود:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL)
6% v/v FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco BRL)
1% v/v AA (Antibiotic-Antimycotic (Penicilin/Streptomycin), Gibco BRL)
0.6 mg/mL collagenase (Gibco BRL)

پس از جداسازی سلول‌های کندروسیت توسط فیلترهای بافتی (tissue filters) و سانتریفوژ کردن آن‌ها در دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، سلول‌ها برای کشت سلولی آماده شد.

۲. آماده سازی نمونه‌ها:

قبل از انجام کشت سلولی، ابتدا دو داربست BPUS و آلژینات آماده‌سازی و استریل شد. داربست‌های BPUS، با قطر ۱۵ و ضخامت ۱ میلی‌متر از مرکز تحقیقات پلی‌مر دانشگاه زوریخ سوییس خریداری شدند. مقدار تخلخل در این نمونه‌ها در حدود ۹۵٪ و اندازه‌ی آن‌ها ۳۰۰-۵۰ میکرومتر بود. مدول الاستیک این داربست نیز در حدود ۴۰ MPa بود. برای استریل نمودن این نمونه‌ها از روش گاز اتیلن‌اکساید (ethylene oxide) استفاده شد (۲۳، ۲۵-۲۶). به این ترتیب که پس از قراردادن نمونه‌ها تحت گاز اتیلن‌اکساید، نمونه‌ها به

مدت یک شب در آب مقطر غوطه‌ور شده، سپس تحت خلأ قرار گرفتند تا کل گاز از داخل نمونه‌ها خارج شود. البته قبل از شروع کشت سلولی نیز، نمونه‌ها به مدت یک شب در محیط کشت غوطه‌ور شدند تا به طور کامل عاری از گاز اتیلن‌اکساید گردند.

برای تهیه‌ی بسترهای آلژینات (alginate beads) به عنوان داربست کشت کندروسیت‌ها، ابتدا محلول آلژینات ۱/۲٪ (Fluka, Biochemica) در محلول ۰/۹٪ NaCl با هم‌زدن در دمای بالای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد آماده‌سازی شد (۲۰). این هم‌زدن توسط هم‌زن مغناطیسی و به مدت ۱-۲ ساعت انجام گرفت تا ذرات آلژینات به خوبی در محلول NaCl حل شوند. برای استریل کردن محلول آلژینات، از فیلترهای استریل ۰/۲۲ میکرومتر در زیر هود استریل، استفاده شد.

۳. کشت سلولی:

برای کشت سلولی دو داربست، از دو روش مختلف استفاده شد. برای کشت سلولی سلول‌های کندروسیت بر روی داربست‌های BPUS، ابتدا نمونه‌ها در کف پلیت‌های کشت سلولی و سپس به منظور ایجاد چسبندگی، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت $10^6 \times 4$ سلول در میلی‌لیتر بر روی سطح هر نمونه BPUS قرار داده شد (۲۲). پس از ۲ ساعت کشت، تحت شرایط مختلف فیزیوشیمیایی، محیط کشت تعویض و ۲ میلی‌لیتر محیط کشت جدید به نمونه‌ها اضافه شد و دوباره نمونه‌ها تحت شرایط قبلی در داخل انکوباتور قرار گرفت. لازم به ذکر است که محیط کشت مورد استفاده در تمام آزمایش‌های کشت سلولی شامل DMEM، ۶٪ v/v FBS و ۱٪ v/v AA بود.

برای کشت سلول‌های کندروسیت بر روی

بود. برای محاسبه‌ی مقدار لاکتیت تولید شده، پس از یک روز کشت سلولی تحت شرایط مورد نظر (شرایط فیزیکی مشخص)، محیط کشت تعویض و مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر محیط جدید، به ازای هر نمونه‌ی موجود در هر خانه، جایگزین محیط کشت قبلی شد و پس از ۴ ساعت کشت سلولی تحت شرایط مورد نظر، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت، از هر خانه جدا و در داخل اپندورف (Eppendorf) ریخته شد و سپس ۲ میلی‌لیتر محیط کشت جدید به هر خانه افزوده گردید. این کار در روزهای دوم و سوم کشت سلولی نیز تکرار شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت موجود در هر اپندورف به ازای هر نمونه، به خانه‌های پلیت‌های ۹۶ تایی منتقل و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر *lactate reagent* (Sigma) نیز به هر خانه افزوده شد و سپس شدت جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه ELIZA (JENCONS, UK) اندازه‌گیری شد. در این قسمت برای محاسبه‌ی مقدار لاکتیت، نیاز به منحنی استاندارد بود. لذا محلول‌های لاکتیت خالص با درصدهای ۰/۱، ۱/۵، ۲، ۳، ۴ و ۵ mM در محیط کشت آماده شد. سپس مشابه آنچه که در بالا به آن اشاره شد، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به خانه‌های پلیت‌های ۹۶ تایی منتقل و سپس ۱۰۰ میکرولیتر *lactate reagent* نیز به هر کدام از این نمونه‌ها افزوده و شدت جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت منحنی شدت جذب بر حسب مقدار لاکتیت هر نمونه رسم و از معادله‌ی خط هم‌تراز شده بر این منحنی، مقادیر لاکتیت تولید شده در نمونه‌های اصلی محاسبه شد. لازم به ذکر است که در این آزمایش‌ها از نمونه‌های بدون لاکتیت (با سلول‌های مرده و بدون سلول) نیز به‌عنوان کنترل استفاده شد و تکرار پذیری

داربست‌های آلژینات، ابتدا محلول سوسپانسیون سلول آلژینات با غلظت سلولی 4×10^6 cell/ml آماده سازی شد (۲۰). سپس این سوسپانسیون به یک سرنگ با سرسوزن ۲۲ منتقل و در محلول استریل ۱۰۲ mM کلرید کلسیم چکانده شد تا بسترهای آلژینات حاصل شوند. سپس محلول کلرید کلسیم از بسترهای تشکیل شده جدا و ۳-۴ بار توسط کلرید سدیم ۰/۹٪ استریل و DMEM شستشو شد. در نهایت بسترهای آلژینات سلول به تعداد مساوی بین خانه‌های پلیت‌های کشت سلولی تقسیم و ۲ میلی‌لیتر محیط کشت به آن‌ها اضافه شد و در انکوباتور تحت شرایط مختلف فیزیکی‌شیمیایی قرار گرفت.

۴. اثر فشار جزئی اکسیژن و pH:

آزمایش‌ها در سه فشار جزئی اکسیژن ۰/۲۱٪، ۰/۵٪ و ۰/۱٪ انجام گرفت. به‌طور خلاصه، نمونه‌های BPUS و آلژینات بین سه پلیت کشت ۶ خانه تقسیم شدند. در یک ستون از پلیت، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت با $pH=7/4$ و در ستون دیگر ۲ میلی‌لیتر محیط کشت با $pH = 6/5$ افزوده شد. سپس پلیت‌ها در محفظه‌ی اکسیژن قرار گرفت و به هر یک از آن‌ها فشار جزئی مورد نظر، با کنترل میزان ورود اکسیژن، اعمال شد. در نهایت، هر یک از محفظه‌ها به همراه پلیت موجود در آن در داخل انکوباتور قرار داده شدند. لازم به ذکر است، که محیط کشت هر روز تحت شرایط فوق با محیط کشت جدید جایگزین می‌شد.

۵. اندازه‌گیری لاکتیت و نرخ تولید آن:

برای محاسبه‌ی مقدار لاکتیت تولید شده توسط سلول‌های کندروسیت در فواصل زمانی مختلف، از روش *lactate assay* استفاده شد (۱۳). روش کار برای داربست‌های BPUS و آلژینات یکسان و به شرح زیر

از نمونه‌های تغذیه شده به لوله‌های مخصوص (cuvette) اسپکتروفتومتر منتقل و به ازای هر نمونه مقدار ۱ میلی‌لیتر رنگ DMMB به آن‌ها اضافه گردید و شدت جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد نیز به روش مشابه به دست آمد و در نهایت مقدار GAG تولید شده بر روی هر داربست محاسبه گردید. لازم به ذکر است، که در این آزمایش‌ها از نمونه‌های بدون GAG (با سلول‌های مرده و بدون سلول) نیز به‌عنوان کنترل استفاده شد و تکرارپذیری تمام آزمایش‌ها در هر مرحله با ۹ آزمایش بر روی هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

۷. آنالیز آماری:

محاسبات آماری با آزمون‌های آماری ANOVA و student t-test و توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۰ (version 10; SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت. در این محاسبات، سطح معنی‌داری آزمون‌ها، p-value کمتر از ۰/۰۵، در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۱. لاکتیت و نرخ تولید لاکتیت

معادلات به دست آمده از منحنی استاندارد لاکتیت، برای BPUS و آلژینات متفاوت بود. این معادلات برای محاسبه‌ی مقدار لاکتیت تولید شده و با توجه به شدت جذب حاصله توسط دستگاه ELIZA به کار می‌رود. در این معادلات، یک رابطه‌ی خطی بین تولید لاکتیت و شدت جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر وجود داشت.

$$Y=0.1913X+0.0361 \quad (۲) \quad \text{برای BPUS}$$

$$Y=0.2995X+0.3441 \quad (۳) \quad \text{برای آلژینات}$$

همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است، اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین مقدار لاکتیت تولید شده در $pH = 6/5$ و $pH = 7/4$ برای هر دو داربست

تمام آزمایش‌ها در هر مرحله با ۹ آزمایش بر روی هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای بررسی نرخ تولید لاکتیت نیز، برای هر دو داربست BPUS و آلژینات، از فرمول ۱ استفاده شد.

$$= \text{Rate of lactate production} \frac{L \times V}{C \times t}$$

در این رابطه L مقدار میانگین لاکتیت تولید شده به ازای هر نمونه (mmole)، V حجم محیط کشت در هر خانه‌ی پلیت کشت سلولی (میلی‌لیتر)، C دانسیته‌ی سلولی به ازای هر نمونه ($\times 10^6$) و t زمان کشت سلولی برای اندازه‌گیری مقدار لاکتیت (ساعت) بود.

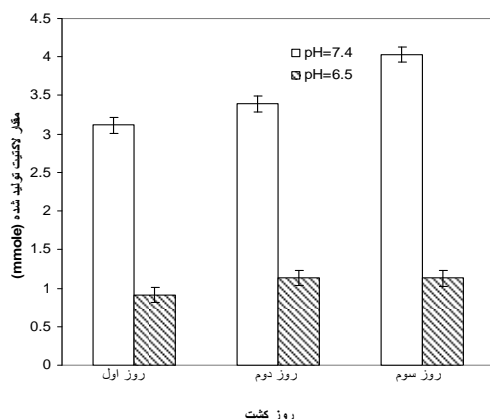
۶. اندازه‌گیری مقدار گلایکوسامینوگلاکین (GAG):

مقدار GAG تشکیل شده بر روی هر دو نوع داربست، به روش DMMB assay اندازه‌گیری شد (۲۸). رنگ DMMB یک رنگ به شدت متاکروماتیک می‌باشد که روش دقیق و تکرارپذیری برای محاسبه‌ی هیستوشیمیایی GAG در غضروف می‌باشد. برای محاسبه‌ی GAG به این روش، ابتدا رنگ DMMB (dimethylmethylene blue, ALDRICH) تهیه و سپس تغذیه‌ی نمونه‌ها در محلول papain انجام شد؛ در نهایت استانداردسازی و اندازه‌گیری GAG توسط اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

برای اندازه‌گیری مقدار GAG تولید شده در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم کشت سلولی در شرایط مختلف فشار جزئی اکسیژن و pH، داربست‌ها به طور جداگانه و به مدت یک شب در محلول papain در دمای ۶۵-۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. محلول papain با مخلوط کردن ۲۰ mM $pH=6.8$ ، EDTA (Sigma) ۱ mM، PBS و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر papain و ۱۰ mM Cysteine تهیه شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر

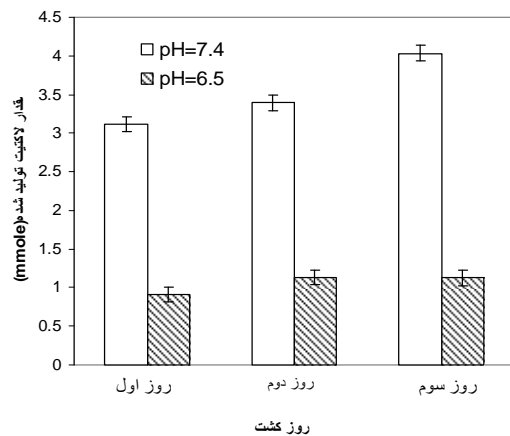
به آن معنی است که بیشترین مقدار لاکتیت تولید شده مربوط به شرایط بهینه‌ی فشار جزئی اکسیژن می‌باشد که با گذشت زمان افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، تغییر در فشار جزئی اکسیژن باعث تغییر حجم سلول و در نتیجه تغییر متابولیسم سلولی می‌گردد (۹-۱۱).

نرخ تولید لاکتیت، با داشتن مقدار لاکتیت تولید شده، از معادله‌ی (۱) قابل محاسبه می‌باشد. نتایج نشان داد که بیشترین نرخ لاکتیت در $pH = 7.4$ و 5% اکسیژن می‌باشد. نمودارهای ۶ و ۷ نشان می‌دهد که نرخ تولید لاکتیت برای هر دو داربست و در $pH = 7.4$ با گذشت زمان افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد (۰/۰۱ < P). هم‌چنین نمودارهای ۸ و ۹ نشان می‌دهد که فشار جزئی 5% اکسیژن، بهترین شرایط متابولیسم برای هر دو داربست را فراهم می‌کند (۰/۰۵ < P). در این نمودارها مشخص است که در فشار جزئی 21% اکسیژن، نرخ تولید لاکتیت قابل مقایسه با فشار 5% نیست. از طرف دیگر در شرایط 1% اکسیژن، نرخ تولید لاکتیت برای هر دو داربست و بعد از سه روز کشت سلولی، افزایش نمی‌یابد که این مسأله نشان از عدم شرایط فیزیولوژیک مناسب برای متابولیسم سلولی دارد.



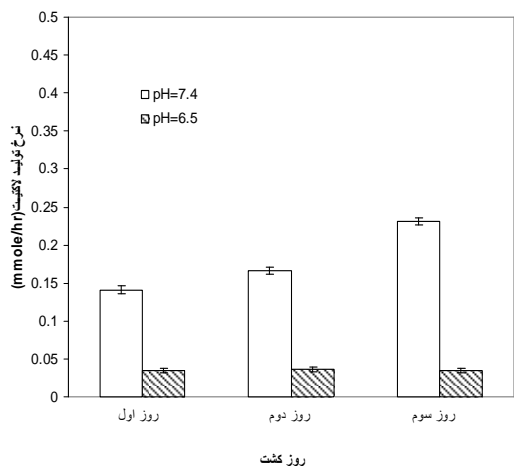
نمودار ۳. اثر pH بر تولید لاکتیت برای داربست BPUS در درصد اکسیژن ثابت (osmolarity = ۳۸۰) و O_2 (۲۱٪) (n = ۹, P < ۰/۰۰۱, SD ± mean)

مشاهده می‌شود (P < ۰/۰۰۱). این به آن معنی است که $pH = 7.4$ ، شرایطی فیزیولوژیک را برای متابولیسم سلولی بر روی هر دو داربست فراهم می‌کند. به عبارت دیگر، سلول‌های کندروسیت در این شرایط ATP بیشتری تولید کرده، موجب تکثیر سلولی سریع‌تر می‌شوند. از طرف دیگر، در نمودارهای ۲ و ۳ مشاهده می‌شود که با گذشت زمان، میزان تولید لاکتیت در $pH = 7.4$ افزایش می‌یابد. در حالی که در $pH = 6.5$ نه تنها مقدار لاکتیت تولید شده با گذشت زمان افزایش نمی‌یابد، بلکه کاهش نیز پیدا می‌کند. به طور کلی، کاهش pH موجب کاهش حجم سلول و در نتیجه اختلال در متابولیسم طبیعی سلول و انتقال نامناسب یون‌هایی مثل گلوکز به سلول شده، مقدار لاکتیت تولید شده را کاهش می‌دهد (۱۳).

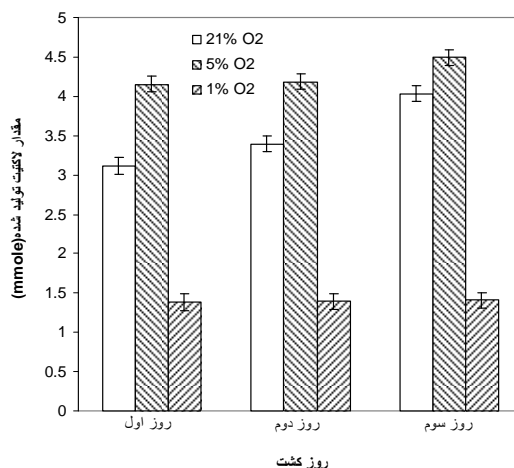


نمودار ۲. اثر pH بر تولید لاکتیت برای داربست آلژینات در درصد اکسیژن ثابت (osmolarity = ۳۸۰) و O_2 (۲۱٪) (n = ۹, P < ۰/۰۰۱, SD ± mean)

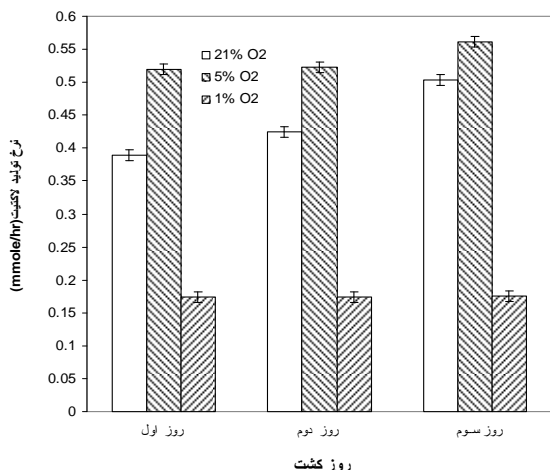
در نمودارهای ۴ و ۵، اثر فشار جزئی اکسیژن بر مقدار لاکتیت تولید شده بر روی دو داربست نشان داده شده است. در این نمودارها، بیشترین مقدار لاکتیت تولید شده مربوط به 5% اکسیژن می‌باشد، که اختلاف قابل ملاحظه‌ای با دیگر شرایط دارد (P < ۰/۰۰۱). این



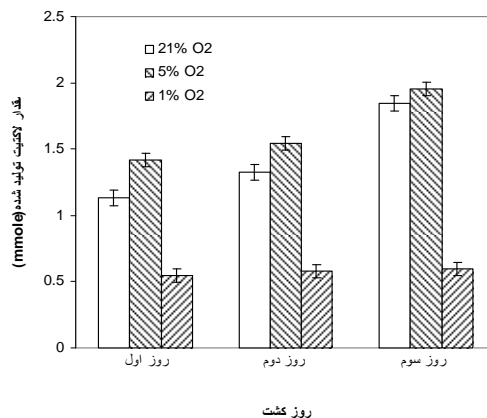
نمودار ۳. اثر pH بر نرخ تولید لاکتیت برای داربست BPUS در شرایط درصد اکسیژن و osmolarity ثابت (O₂ ۲۱٪ و osmolarity = ۳۸۰) (n = ۹, P < ۰/۰۱, SD ± mean)



نمودار ۴. اثر فشار جزئی اکسیژن (oxygen tension) بر تولید لاکتیت برای داربست آلژینات در pH و osmolarity ثابت (osmolarity = ۳۸۰ و pH = ۷/۴) (n = ۹, P < ۰/۰۱, SD ± mean)



نمودار ۵. اثر فشار جزئی اکسیژن (oxygen tension) بر نرخ تولید لاکتیت برای داربست BPUS در pH و osmolarity ثابت (osmolarity = ۳۸۰ و pH = ۷/۴) (n = ۹, P < ۰/۰۵, SD ± mean)

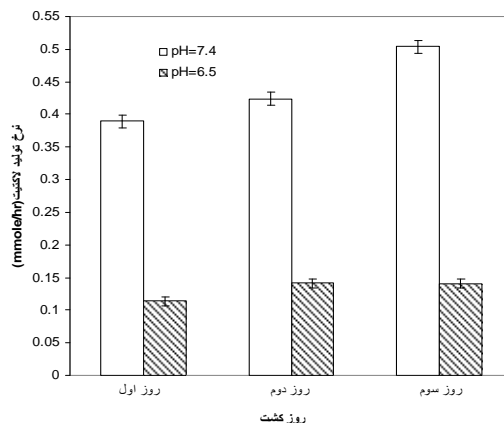


نمودار ۶. اثر pH بر نرخ تولید لاکتیت برای داربست آلژینات در شرایط درصد اکسیژن و osmolarity ثابت (O₂ ۲۱٪ و osmolarity = ۳۸۰) (n = ۹, P < ۰/۰۱, SD ± mean)

۲. مقدار گلایکوسامینوگلايکن (GAG) تولید شده:

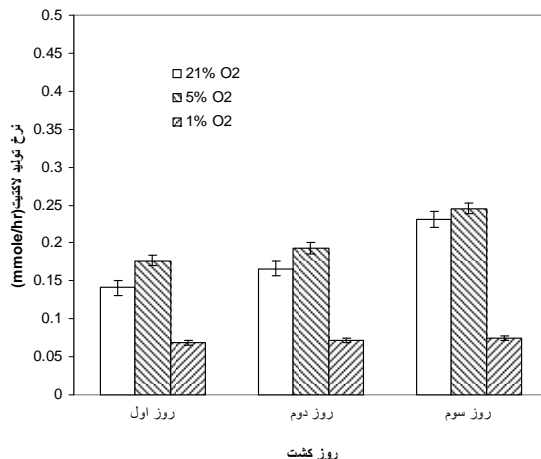
در این تحقیق، معادله‌ی به‌دست آمده از منحنی استاندارد GAG برای محاسبه‌ی مقدار GAG تولید شده برای هر دو داربست، یکسان بود. در این معادله، بین مقدار کندروایتین سولفات (CS) و شدت جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر رابطه‌ی خطی وجود دارد.

$$Y = 0.0056X + 0.3318 \quad (۴)$$



نمودار ۷. اثر pH بر نرخ تولید لاکتیت برای داربست آلژینات در شرایط درصد اکسیژن و osmolarity ثابت (O₂ ۲۱٪ و osmolarity = ۳۸۰) (n = ۹, P < ۰/۰۱, SD ± mean)

می‌باشد. در نمودارهای ۱۲ و ۱۳ نیز، در شرایط ۵٪ اکسیژن و با گذشت زمان کشت سلولی، مقدار GAG تولید شده بر روی هر دو داربست افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا می‌کند ($P < 0.05$). این نتایج حاکی از آن است که تغییر pH و فشار جزئی اکسیژن، باعث تغییر حجم سلول و در نتیجه، متابولیسم سلولی بر روی دو داربست می‌گردد که البته بهترین شرایط متابولیسم مربوط به $pH = 7.4$ و فشار جزئی ۵٪ اکسیژن می‌باشد.

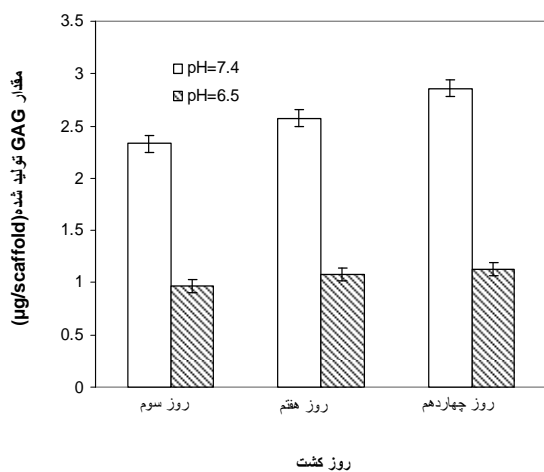


نمودار ۹. اثر فشار جزئی اکسیژن (oxygen tension) بر نرخ تولید لاکتیت

برای داربست BPUS در شرایط osmolarity و pH ثابت

($pH = 7.4$, osmolarity = 380)

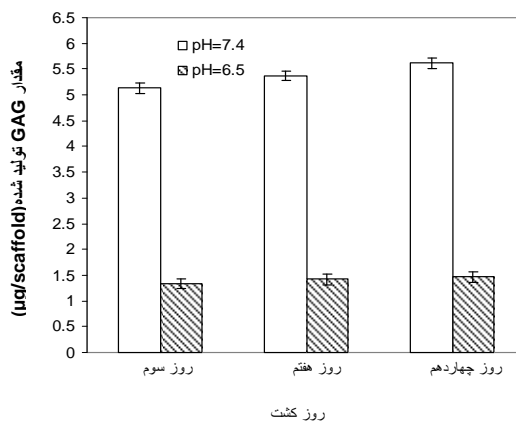
($n = 9$, $P < 0.05$, $SD \pm mean$)



نمودار ۱۱. اثر pH بر تولید GAG برای داربست BPUS در شرایط درصد

اکسیژن و osmolarity ثابت (21% O₂ و osmolarity=380)

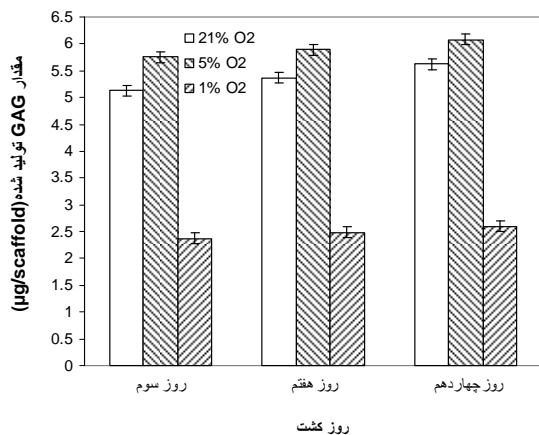
($n = 9$, $P < 0.05$, $SD \pm mean$)



نمودار ۱۰. اثر pH بر تولید GAG برای داربست آلژینات در شرایط درصد

اکسیژن و osmolarity ثابت (21% O₂ و osmolarity = 380)

($n = 9$, $P < 0.05$, $SD \pm mean$)



نمودار ۱۲. اثر فشار جزئی اکسیژن (oxygen tension) بر تولید GAG برای

داربست آلژینات در شرایط osmolarity و pH ثابت

($pH = 7.4$ و osmolarity = 380)

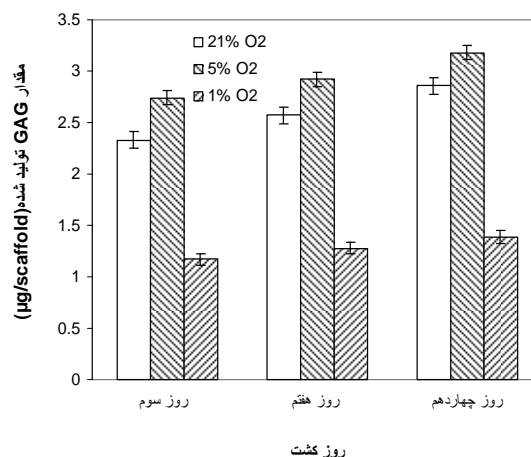
($n = 9$, $P < 0.05$, $SD \pm mean$)

در این بخش نیز، نتایج حاکی از آن بود که بیشترین مقدار GAG تولید شده برای هر دو داربست، در زمان‌های مختلف کشت سلولی، مربوط به $pH = 7.4$ و فشار جزئی ۵٪ اکسیژن می‌باشد. نمودارهای ۱۰ و ۱۱ نشان می‌دهند که مقدار GAG تولید شده بر روی هر دو داربست و با گذشت زمان، در $pH = 7.4$ افزایش می‌یابد ($P < 0.05$). البته هر چند که این افزایش بر روی نمودار چندان زیاد نیست، اما نشان دهنده‌ی افزایش یکنواخت متابولیسم سلولی با گذشت زمان

سلولی و در نتیجه تغییر مکانیزم انتقال یون‌های تغذیه‌ای به داخل سلول و برعکس شده، در متابولیسم سلولی تأثیر بگذارد (۲۸). لذا در pH پایین و فشار اکسیژن غیرفیزیولوژیک، تغذیه‌ی سلول مختل و متابولیسم کم‌تر می‌شود و در نتیجه تولید لاکتیت و GAG کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از کشت سلولی دو بعدی (monolayer) نیز نتایج این تحقیق را تأیید می‌کند (۲۹). مطالعات بر روی داربست پلی‌گلایکولیک اسید (PGA) نیز نشان داد که تا ۲۱ روز کشت سلولی و بدون کنترل دقیق pH، بهترین شرایط متابولیسم کندروسیت‌ها در ۵٪ اکسیژن حاصل می‌شود (۳۰). البته لازم به ذکر است که بررسی اثر متقابل فشار جزئی اکسیژن و pH بر روی متابولیسم کندروسیت‌ها در هیچ مقاله‌ای مورد بررسی قرار نگرفته است و تحقیق حاضر، از این لحاظ دارای نوآوری می‌باشد.

از طرف دیگر، امروزه در مهندسی بافت غضروف، برای بازسازی بافت آسیب دیده، از داربست‌های سه بعدی بر پایه‌ی پلی‌مر استفاده می‌شود تا سلول بر روی آن متابولیسم انجام داد، بافت جدید تشکیل دهد (۳۱). در این سیستم سلول پلی‌مر، با کنترل عوامل فیزیکی و بیوشیمیایی مختلف که بر عملکرد سلول و رشد بافت جدید تأثیرگذار هستند، شرایط بهینه‌ای برای مهندسی بافت مورد نظر فراهم می‌شود. لذا در این مطالعه، مقایسه‌ای بین دو داربست BPUS و آلژینات در میزان تأثیرگذاری بر متابولیسم کندروسیت‌ها انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که متابولیسم سلولی در همه‌ی شرایط، بر روی داربست آلژینات بهتر از داربست BPUS است. نمودار ۱۴ نشان می‌دهد که مقدار لاکتیت تولید شده در شرایط یکسان pH و فشار جزئی اکسیژن، برای داربست آلژینات بیشتر

از مجموع نتایج به دست آمده چنین بر می‌آید که بهترین شرایط متابولیسم در هر pH و فشار جزئی اکسیژن، مربوط به آلژینات است که این مسأله به ماهیت خواص فیزیکی ماده بر می‌گردد که در بخش بحث به آن پرداخته خواهد شد.

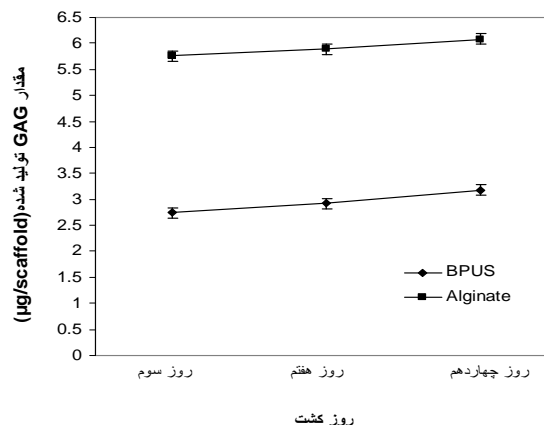


شکل ۱۳. اثر فشار جزئی اکسیژن (oxygen tension) بر تولید GAG برای داربست BPUS در شرایط osmolarity و pH ثابت (pH = ۷/۴ و osmolarity = ۳۸۰) (n = ۹, P < ۰/۰۵, SD ± mean)

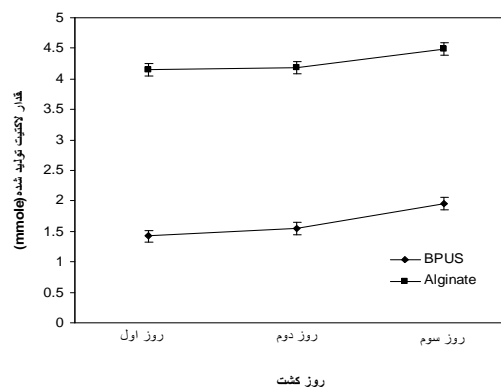
بحث

یکی از عوامل فیزیوشیمیایی بسیار تأثیرگذار در متابولیسم سلول‌های کندروسیت، اکسیژن می‌باشد (۲۸). در این تحقیق، نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که عوامل فیزیوشیمیایی مثل فشار جزئی اکسیژن و pH، به طور هم‌زمان، می‌توانند متابولیسم سلولی را تغییر دهند. در واقع، عوامل فیزیوشیمیایی می‌توانند مقدار تولید لاکتیت و GAG توسط سلول‌های کندروسیت را، بدون وابسته بودن به نوع داربست، تغییر دهند. در این تحقیق مشخص شد که بهترین شرایط برای متابولیسم کندروسیت‌های مفصلی در pH=۷/۴ و ۵٪ اکسیژن می‌باشد. به نظر می‌رسد که تغییر در pH و مقدار اکسیژن محیط کشت، می‌تواند موجب تغییر در حجم

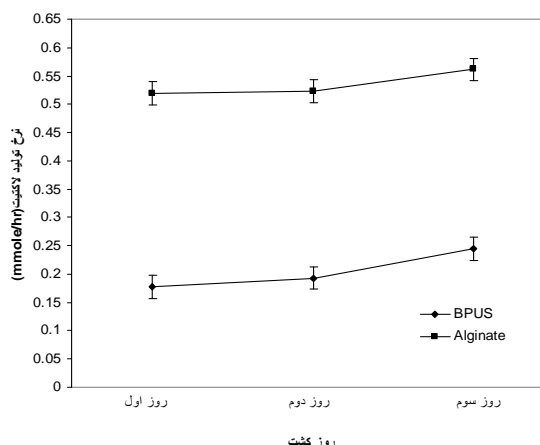
است ($P < 0/001$). برای نرخ تولید لاکتیت و میزان GAG تولید شده بر روی دو داربست نیز، همین نتیجه حاصل شد (نمودارهای ۱۵ و ۱۶) ($P < 0/001$). این نتایج حاکی از آن است که عواملی، موجب این اختلاف متابولیسم بر روی داربست آلژینات نسبت به BPUS گردیده است. یکی از این عوامل، آبدوستی بسیار خوب آلژینات است. این خاصیت موجب توزیع و تغذیه‌ی مناسب سلول‌ها می‌گردد، چرا که سلول‌ها تحت این شرایط، قابلیت انتقال یون‌ها و سایر مواد مغذی را به محیط کشت دارند (۲۸). اما BPUS آبدوست نیست، بلکه شامل تخلخل‌های به هم پیوسته می‌باشد که می‌تواند به متابولیسم و تغذیه‌ی سلولی کمک کند. در شرایط کشت سلولی استاتیک، سلول‌ها تنها بر روی سطح داربست نشاند می‌شوند. بنابراین در داربست‌هایی نظیر BPUS که آبدوست نبوده، تنها متخلخل هستند، سلول‌ها نمی‌توانند به صورت یکنواخت در همه جای داربست و از جمله داخل آن توزیع شوند. همچنین بعضی از سلول‌ها به آرامی به داخل تخلخل‌ها وارد می‌شوند، اما به دلیل شرایط موجود در کشت سلولی استاتیک، اجزای محیط کشت نمی‌توانند در تغذیه‌ی سلول‌های وارد شده به درون تخلخل‌ها، نقش خود را به خوبی ایفا کنند و در نتیجه این سلول‌ها می‌میرند. بنابراین در داربست‌های سختی مثل BPUS که آبدوست نبوده، فقط متخلخل می‌باشند، بهترین روش برای افزایش متابولیسم سلولی، استفاده از روش‌هایی است که بتواند سلول‌ها را در همه جای داربست توزیع و تغذیه نماید. یکی از این روش‌ها، کشت سلولی نفوذی است (Perfusion Culture). در این روش کشت سلولی، سلول‌ها به همراه محیط کشت و به آرامی به داخل تخلخل‌ها نفوذ



نمودار ۱۶. مقایسه‌ی مقدار GAG تولید شده برای دو داربست آلژینات و BPUS در شرایط یکنواخت و ثابت ($21\% O_2$, osmolarity = 380 , pH = $7/4$) ($n = 9$, $P < 0/05$, SD \pm mean)



نمودار ۱۴. مقایسه‌ی مقدار لاکتیت تولید شده برای دو داربست آلژینات و BPUS در شرایط یکنواخت و ثابت ($21\% O_2$, osmolarity = 380 , pH = $7/4$) ($n = 9$, $P < 0/05$, SD \pm mean)



نمودار ۱۵. مقایسه‌ی نرخ لاکتیت تولید شده برای دو داربست آلژینات و BPUS در شرایط یکنواخت و ثابت ($21\% O_2$, osmolarity = 380 , pH = $7/4$) ($n = 9$, $P < 0/05$, SD \pm mean)

داده شده، غضروف طی یک سیکل چرخشی تغذیه می‌شود (۳۱). به نظر می‌رسد که این روش بتواند نتایج حاصل در مورد BPUS را بهبود ببخشد که به عنوان پیشنهادی برای ادامه‌ی این تحقیق مطرح می‌شود. البته لازم به ذکر است که در یکی از تحقیقات اخیر ما، با بررسی اثر فشار هیدرواستاتیک بر متابولیسم سلول‌های کندروسیت بر روی دو داربست BPUS و آلژینات مشاهده شد که با افزایش زمان کشت سلولی، روند متابولیسم بر روی داربست BPUS نسبت به آلژینات به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (۳۲). این یافته نشان می‌دهد که خواص مکانیکی بالاتر BPUS باعث تأثیر بیشتر بر متابولیسم کندروسیت‌ها تحت فشار هیدرواستاتیک می‌شود. لذا ادامه‌ی مطالعات بر روی این داربست می‌تواند منجر به کسب نتایج جالب توجه و کاربردی شود.

در این تحقیق مشخص شد که تغییرات فشار جزئی اکسیژن و pH، می‌تواند باعث تغییر حجم سلول و در نتیجه تغییر در مکانیزم انتقال مواد مغذی به داخل

و خارج از سلول گردد. بنابراین، بهینه‌سازی شرایط فشار جزئی اکسیژن و pH می‌تواند باعث بهینه شدن فرآیند glycolysis در غضروف شود. بهترین شرایط برای متابولیسم سلول‌های کندروسیت مفصلی در فشار جزئی ۵٪ اکسیژن و $pH = 7.4$ به دست آمد. از طرف دیگر مشخص شد که آب‌دوستی بیشتر آلژینات نسبت به BPUS می‌تواند باعث توزیع بهتر و تغذیه‌ی مناسب‌تر سلول‌ها در شرایط مختلف فیزیوشیمیایی شود؛ چرا که این آب‌دوستی موجب انتقال بهتر مواد مغذی به سلول‌ها شده، عاملی برای بهتر بودن متابولیسم سلول‌ها بر روی آلژینات می‌باشد. اما با توجه به خواص مکانیکی نزدیک BPUS به غضروف مفصلی، انتخاب روش‌های دیگر کشت مثل کشت نفوذی (Perfusion Culture)، به منظور افزایش سرعت و میزان متابولیسم کندروسیت‌ها بر روی این داربست، می‌تواند در کارایی این داربست در مهندسی بافت غضروف مفصلی مؤثر باشد.

References

1. Lee RB, Urban JP. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J* 1997; 321(Pt1): 95-102.
2. Lee RB, Urban JP. Functional replacement of oxygen by other oxidants in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2002; 46(12): 3190-200.
3. Stockwell RA. Metabolism of Cartilage. In: Hall BK, Editor. *Cartilage: Structure, function, and biochemistry*. London: Academic Press; 1983: 253-62.
4. Shapiro IM, Tokuoka T, Silverton SF. Energy metabolism in cartilage. In: Hall BK, Newman SA, Editors. *Cartilage molecular aspects*. New York: CRC Press; 1991. p. 97-130.
5. Lee RB, Wilkins RJ, Razaq S, Urban JP. The effect of mechanical stress on cartilage energy metabolism. *Biorheology* 2002; 39(1-2): 133-43.
6. Pullens RAA. Mechanical loading regimes affect glucose and lactate metabolism of chondrocytes. Part 2 of MSc Thesis. Eindhoven University of Technology, Faculty of Biomedical Engineering. 2004. p. 6-13.
7. Cernanec J, Guilak F, Weinberg JB, Pisetsky DS, Fermor B. Influence of hypoxia and reoxygenation on cytokine-induced production of proinflammatory mediators in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2002; 46(4): 968-75.
8. Brighton CT, Lane JM, Koh JK. In vitro rabbit articular cartilage organ model. II. 35S incorporation in various oxygen tensions. *Arthritis Rheum* 1974; 17(3): 245-52.
9. Henderson GE, Mason RM. Effect of oxygen tension on 35S-glycosaminoglycan synthesis and UDP-sugar pool size in articular cartilage. *Biochem Soc Trans* 1991; 19(4): 364S.
10. Ysart GE, Mason RM. Responses of articular cartilage explant cultures to different oxygen tensions. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1221(1): 15-20.
11. Clark CC, Tolin BS, Brighton CT. The effect of

- oxygen tension on proteoglycan synthesis and aggregation in mammalian growth plate chondrocytes. *J Orthop Res* 1991; 9(4): 477-84.
12. Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM, Portner R. Cultivation of three-dimensional cartilage-carrier-constructs under reduced oxygen tension. *J Biotechnol* 2006; 121(4): 486-97.
 13. Urban JP. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 1994; 33(10): 901-8.
 14. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998; 47: 477-86.
 15. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 1998; 240(1): 58-65.
 16. Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng* 1999; 63(2): 197-205.
 17. Malda J, Woodfield TB, van d, V, Kooy FK, Martens DE, Tramper J, et al. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs. *Biomaterials* 2004; 25(26): 5773-80.
 18. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 1992; 10(6): 745-58.
 19. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107(Pt1): 17-27.
 20. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4(Suppl 3): S63-S68.
 21. Yang L, Korom S, Welti M, Hoerstrup SP, Zund G, Jung FJ, et al. Tissue engineered cartilage generated from human trachea using DegraPol scaffold. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 24(2): 201-7.
 22. Saad B, Moro M, Tun-Kyi A, Welti M, Schmutz P, Uhlschmid GK, et al. Chondrocyte-biocompatibility of DegraPol-foam: in vitro evaluations. *J Biomater Sci Polym Ed* 1999; 10(11): 1107-19.
 23. Raimondi MT, Falcone L, Colombo M, Remuzzi A, Marinoni E, Marazzi M, et al. A comparative evaluation of chondrocyte/scaffold constructs for cartilage tissue engineering. *J Applied Biomat & Biomech* 2004; 1(2): 55-64.
 24. Saad B, Neuenschwander P, Uhlschmid GK, Suter UW. New versatile, elastomeric, degradable polymeric materials for medicine. *Int J Biol Macromol* 1999; 25(1-3): 293-301.
 25. Saad B, Keiser OM, Welti M, Uhlschmid GK, Neuenschwander P, Suter UW. Multiblock copolyesters as biomaterials: in vitro biocompatibility testing. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8(8): 497-505.
 26. Karbasi S, Mirzadeh H, Orang F, Urban JPG. A comparison between cell viability of chondrocytes on a biodegradable polyesterurethane scaffold and alginate beads in different oxygen tension and pH. *Iranian Polym J* 2005; 14(9): 823-30.
 27. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883(2): 173-7.
 28. Urban JP, Hall AC, Gehl KA. Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 1993; 154(2): 262-70.
 29. Hansen U, Schunke M, Domm C, Ioannidis N, Hassenpflug J, Gehrke T, et al. Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *J Biomech* 2001; 34(7): 941-9.
 30. Kellner K, Liebsch G, Klimant I, Wolfbeis OS, Blunk T, Schulz MB, et al. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(1): 73-83.
 31. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog* 1998; 14(2): 193-202.
 32. Karbasi S. Evaluation of the effects of hydrostatic pressure on metabolism of the articular chondrocytes seeded on biodegradable polyurethane as tissue engineering scaffold. *Journal of Isfahan Medical School* 2007; 25(8): 15-22.

Received: 2008.8.31
Accepted: 2009.3.8

A Comparative Study of Articular Chondrocytes Metabolism on a Biodegradable Polyesterurethane Scaffold and Alginate Beads in Different Oxygen Tension and pH

Saeed Karbasi PhD*

* Assistant Professor of Medical Physics and Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Background:	Abstract Cartilage is a tissue with a low potency of self-repairing. One of the methods in increasing of regeneration and metabolism in cartilage, is stimulating physicochemical parameters on cell-polymer systems, as cartilage based cells. The cell-polymer system can be used to identify and control various biochemical and physical factors expected to influence cell function and tissue growth.
Methods:	Two physicochemical parameters, oxygen tension and pH, was changed to measure the lactate and rate of lactate production after 1, 2 and 3 days culture and GAG (glycosaminoglycan) production after 3, 7 and 14 days culture of chondrocytes on DegraPol®, as a biodegradable polyurethane scaffold (BPUS), and alginate scaffolds. The results finally were compared on both scaffolds.
Findings:	Physicochemical parameters like oxygen tension and pH could change cell metabolism. In fact, the physicochemical parameters could affect lactate production and GAG content of chondrocyte cells and it does not depend on the type of scaffold. The best condition of the articular chondrocytes metabolism was for 5% O ₂ and pH = 7.4 (P < 0.001). The comparison between BPUS and alginate scaffold is showing that the results are better for alginate beads (P < 0.001).
Conclusion:	Oxygen and pH alterations could change the cell volume that cause changing of normal mechanism of transferring ions and other digesting solutes into the cells. Therefore, optimization of oxygen tension and pH could optimize glycolysis process in cartilage. Also, hydrophilicity of alginate causes better cell distribution and nutrition than BPUS.
Key words:	Chondrocyte, Physicochemical parameters, Polyesterurethane, Alginate, Tissue engineering.
Page count:	15
Tables:	-
Figures:	16
References:	31
Address of Correspondence:	Saeed Karbasi, Assistant Professor of Medical Physics and Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran. E-mail: karbasi@med.mui.ac.ir