مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، سال هجدهم،
شماره ۶، صفحه ۳۹۰-۳۸۳، ۱۳۸۴
ISSN : 1016-3255

# اثر محیط فیزیکی بر سلولهای کندروسیت کاشته شده روی داربست زیست تخریب پذیر پلی یورتان قابل استفاده در مهندسی بافت غضروف مفصلی

# Effect of Physical Environment on Chondrocytes Seeded onto a Biodegradable Polyurethane Scaffold for Articular Cartilage Tissue Engineering

سعید کرباسی[۱]، حمید میرزاده[۱،۲]*، فریبا اورنگ[۱]
۱ - تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، بخش زیست مواد، صندوق پستی ۱۵۸۵۷/۴۴۱۳
۲ - تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، پژوهشکده علوم، گروه پلیمرهای زیست سازگار، صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۱۵

دریافت: ۸۴/۲/۲۵، پذیرش: ۸۴/۵/۲۵

## چکیده

در مهندسی بافت، با تغییر عوامل فیزیکی همچون pH، فشار جزئی اکسیژن، قابلیت نفوذ یونی و فشار هیدروستاتیک، متابولیسم سلولی روی داربستی مناسب کنترل می‌شود. با توجه به این که پلی‌یورتانها دارای خواص مکانیکی مناسب و قابلیت تنوع رفتار هستند، در این پژوهش، اثر عوامل فیزیکی ذکر شده روی داربست Degrapol®، به عنوان داربست پلی‌یورتانی زیست تخریب‌پذیر تجاری، بررسی شد. با بررسیهای به عمل آمده در شرایط pH برابر ۶/۵ و ۷/۴، مقدار اکسیژن برابر ۱، ۵ و ۲۱ درصد، قابلیت نفوذ یونی برابر ۳۸۰،۲۸۰ و ۴۸۰ osm/L و فشار هیدروستاتیک معادل ۴ MPa مشاهده شد که رفتار متابولیسم سلولهای کندروسیت، سلولهای غضروف مفصلی پای گوساله، به شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نتایج بدست آمده از مجموع آزمایشها نشان می‌دهد که افزایش زمان کشت سلولی روی این داربستها، موجب بهبود متابولیسم سلولی می‌شود. همچنین، مشاهده شد که در شرایط فیزیکی pH برابر ۷/۴، مقدار اکسیژن ۵ درصد، و قابلیت نفوذ یونی معادل ۳۸۰ osm/L، بهترین شرایط متابولیسم برای سلولهای کندروسیت فراهم می‌شود. معیار اندازه‌گیری متابولیسم سلولهای کندروسیت در تمامی آزمایشها، میزان چسبندگی سلولی، چگالی سلولی، لاکتات تولید شده و تولید گلیکوزآمینوگلیکان بود. جمع‌بندی نتایج نیز نشان می‌دهد که Degrapol® داربست مناسبی برای مهندسی بافت غضروف مفصلی است.

**واژه‌های کلیدی**
محیط فیزیکی، زیست تخریب‌پذیر، پلی‌یورتان، غضروف مفصلی، مهندسی بافت

**Key Words**
physical environment, biodegradable, polyurethane, articular cartilage, tissue engineering

## مقدمه

مهندسی بافت یکی از جدیدترین روشهای مورد استفاده در ترمیم بافتهای آسیب دیده بدن است. در این روش با استفاده از داربست زیست تخریب پذیر متخلخل و همچنین انتخاب مناسب شرایط متابولیسمی، ترمیم بافت مورد نظر انجام می‌شود [۱]. یکی از بافتهایی که پژوهش در مورد آن اهمیت و گستردگی فراوانی دارد، غضروف است که در این میان غضروف مفصلی اهمیت بیشتری دارد. غضروف مفصلی یکی از بافتهایی است که روند ترمیم و بازسازی آن بسیار کند است. این موضوع به ماهیت ساختار آن

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار : h.mirzadeh@ippi.ac.ir

مرتبط است [۲]. عواملی که می‌تواند بر سرعت ترمیم بافت و متابولیسم سلولی کندروسیتها مؤثر باشد، عوامل فیزیکی همچون pH، قابلیت نفوذ یونی (osmolarity)، فشار جزئی اکسیژن (oxygen tension) و فشار هیدروستاتیک است. هر یک از این عوامل به تنهایی و در کنار همدیگر قابلیت تغییر متابولیسم سلولی را دارند. در این زمینه پژوهشهای گسترده‌ای انجام شده که نتایج قابل توجهی را نشان داده‌اند. در تمام مطالعات انجام شده نکته قابل توجه این است که نتایج برای داربستهای مختلف متفاوت است[۵-۳]. این موضوع نشان می‌دهد که در مهندسی بافت غضروف مفصلی، نه تنها نقش عوامل فیزیکی مهم است بلکه نوع داربست مورد استفاده نیز در نتایج نهایی اثر بسزایی دارد. یکی از انواع داربستهای مورد استفاده در مهندسی بافت غضروف مفصلی، پلی‌یورتانهای زیست تخریب پذیرند [۹-۶]. این دسته از پلیمرها متشکل از دو جزء نرم و سخت هستند که با انتخاب مناسب این دو جزء می‌توان پلی‌یورتان مورد نظر را بدست آورد. ویژگی این پلیمرها محدوده وسیع خواص آنهاست، این مسأله موجب می‌شود که بتوان از این مواد در جایگزینی بسیاری از بافتها استفاده کرد. یکی از جدیدترین پلی‌یورتانهای مورد استفاده در مهندسی بافت غضروف مفصلی، پلی‌یورتان تجاری با نام Degrapol® است [۸]. Degrapol ماده‌ای سنتزی، کشسان، بسیار زیست‌سازگار و زیست تخریب‌پذیر است که برای کاربردهای پزشکی و مهندسی بافت طراحی شده است. این ماده کوپلی‌استری بر پایه هیدروکسی آلکانوات (۹۳درصد وزنی) با تعدادی واحد یورتان پیوند خورده (۷ درصد وزنی) است. زمان تخریب این پلیمر می‌تواند با تغییر ترکیب شیمیایی آن بین یک هفته تا چند سال کنترل و تنظیم شود. همچنین، خواص مکانیکی آن می‌تواند از حالت بسیار کشسان تا سخت و شکننده متغیر باشد. به عنوان مثال، می‌توان این ماده را با مدول کشسان بین MPa ۸۰۰-۲۰ تهیه کرد [۸]. مطالعات انجام شده روی این داربست همگی حاکی از قابلیت این داربست در متابولیسم سلولهای کندروسیت است [۸]. با توجه به این که بررسی اثر عوامل فیزیکی روی این داربست تا به حال انجام نشده است و بطور طبیعی اثر این عوامل روی داربستهای مختلف متفاوت است، بنابراین در این پژوهش، نحوه و میزان چسبندگی و رشد سلولها، مقدار لاکتات (lactate) تولید شده و همچنین مقدار گلیکوزآمینوگلیکان (glycosaminoglycan, GAG) تولید شده روی داربست Degrapol در شرایط فیزیکی مختلف همچون فشار جزئی اکسیژن، pH، قابلیت نفوذ یونی و بارگذاری هیدروستاتیک بررسی و با هم مقایسه شده است.

## تجربی

### مواد

در این پژوهش از محیط کشت تغذیه شامل ترکیبات

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL)

FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco BRL)

AA (Antibiotic-Antimycotic (Penicilin/Streptomycin), Gibco BRL)

Collagenase (Gibco BRL)

داربست Degrapol® تهیه شده از دانشگاه زوریخ سوئیس (مرکز تحقیقات پلیمر) با ساختار شیمیایی ارائه شده در طرح ۱، MTT تهیه شده از شرکت Sigma برای بررسی درصد سلولهای چسبیده به سطح داربست و فیلمهای کشسان Opsite (Smith Nephew) ساخت انگلستان برای درزبندی درب لوله‌های سانتریفوژ استفاده شد.

### دستگاهها

در این پژوهش دستگاه Instron, High Wycombe مدل ۸۵۰۰ ساخت انگلستان برای اعمال فشار هیدروستاتیک روی نمونه‌ها بکار گرفته شد.

### روشها

#### استخراج سلولهای کندروسیت

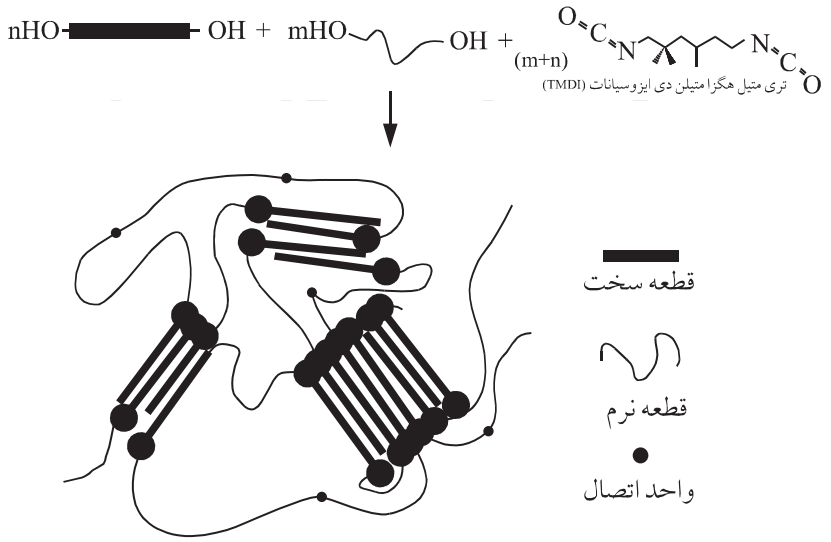
جداسازی سلولهای کندروسیت از مفصل Metacarpophalangeal پای گوساله‌های ۹-۶ ماهه انجام شد. روش کار بدین ترتیب بود که پس از بریدن پای حیوان و ضدعفونی کردن آن، بافت غضروفی از محل مفصلی جدا و در محیط تغذیه ریخته شد و به مدت ۲۴ h داخل انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار داده شد، تا بافت تغذیه و سلولها جداسازی شوند. محیط کشت تغذیه شامل DMEM، ۶ درصد حجمی FBS، ۱ درصد حجمی AA و ۰/۶ mg/mL کلاژن بود.

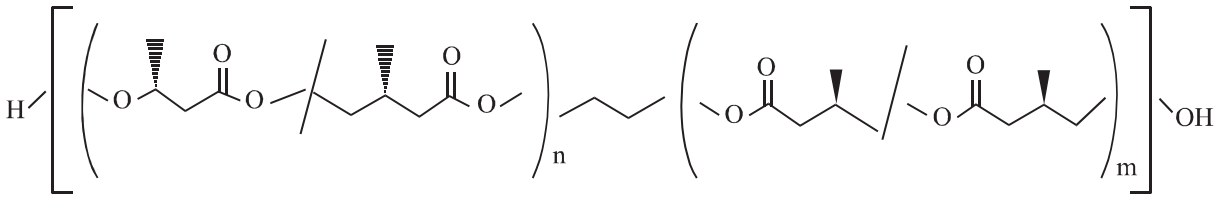
پس از جداسازی سلولهای کندروسیت به وسیله صافیهای بافتی (tissue filters) و سانتریفوژ کردن آنها در دور و زمان مشخص، سلولها برای کشت سلولی آماده شدند. برای انجام کشت سلولی ابتدا لازم بود که داربستهای Degrapol آماده سازی شوند. این داربستها با قطر ۱۵ mm و ضخامت ۱ mm به طور آماده خریداری و استریل شدند. برای استریل این نمونه‌ها از روش اتیلن اکسید استفاده شد [۸]. شایان ذکر است که ۴۸ h قبل از کشت سلولی، نمونه‌ها در آب مقطر و سپس در محیط کشت غوطه‌ور شده و در شرایط خلأ قرار گرفتند تا اتیلن اکسید محبوس در داخل نمونه‌ها به طور کامل خارج شود.

**کشت سلولی**

پس از آماده‌سازی و استریل داربستها، کشت سلولی انجام شد. برای کشت سلولی سلولهای کندروسیت روی داربستهای Degrapol، از سلولهایی که قبلاً به روش اشاره شده تهیه شدند، استفاده شد. بدین ترتیب که ۰/۱ mL از تعلیق (suspension) سلولی با غلظت $4\times10^6$ cell/mL روی سطح هر نمونه Degrapol که در داخل ظرف ۲۴ تایی (well-plate ۲۴) کشت سلولی قرار داده شده بودند، اضافه شد.

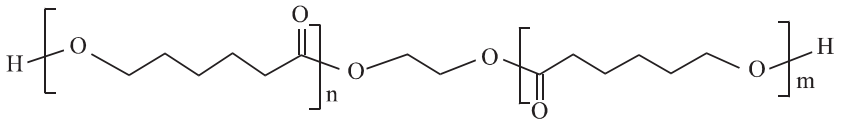
این کار به منظور مطالعه روند چسبندگی کندروسیتها روی داربستهای Degrapol و بررسی سلول سازگاری آنها انجام شد. پس از ۲ h کشت، در دمای ۳۷°C ومقدار $CO_2$ برابر ۵ درصد داخل انکوباتور، محیط کشت تعویض و ۲ mL محیط کشت جدید به نمونه‌ها اضافه شد، دوباره نمونه‌ها در شرایط قبلی داخل انکوباتور قرار داده شدند. لازم به ذکر است که محیط کشت مورد استفاده در تمام آزمایشهای کشت سلولی شامل DMEM، ۶ درصد حجمی FBS و ۱ درصدحجمی AA بود. در



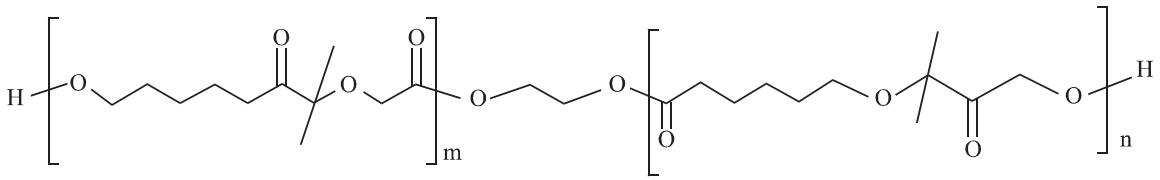
**قطعه سخت**

کوپلیمر دسته‌ای α، w-دی هیدروکسی - اولیگو [((R)-۳-هیدروکسی بوتیرات - (R)-۳ - هیدروکسی والرات) - اتیلن گلیکول]



پلی (کاپرولاکتون) دیول

**قطعه نـرم**



کوپلیمر پلی (کاپرولاکتون - گلیکولید) دیول

طرح ۱ ساختار شیمیایی داربست Degrapol استفاده شده در این پژوهش.

ضمن، برای کنترل نیز از نمونه های بدون سلول و نمونه های با سلولهای مرده استفاده شد.

### بررسی اثر عوامل فیزیکی مختلف روی داربست

#### اثر pH

برای بررسی اثر pH، محیط کشت سلولی با دو pH برابر ۶/۵ و ۷/۴ آماده شد، سپس به نمونه‌های داربست - سلول افزوده و داخل انکوباتور قرار داده شد. این کار در ظرف کشت ۶ تایی انجام شد. در نهایت میزان چسبندگی سلولها به سطح داربست Degrapol پس از ۲ h، میزان چگالی سلولی پس از سه روز، مقدار لاکتات تولید شده در روزهای اول، دوم و سوم و GAG تولید شده در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم محاسبه و اندازه‌گیری شد.

#### اثر قابلیت نفوذ یونی

برای بررسی اثر قابلیت نفوذ یونی، محیط کشت سلولی با مقادیر قابلیت نفوذ یونی برابر ۲۸۰، ۳۸۰ و ۴۸۰ osm/L آماده‌سازی شد. این کار با افزودن محلول KCl و NaCl با درصد مشخص به محیط کشت انجام شد. سپس، محیط کشت به نمونه‌های داربست - سلول افزوده و داخل انکوباتور قرار داده شد. این مرحله در ظرف کشت ۱۲ تایی انجام شد. درنهایت مقدار چسبندگی سلولها به سطح داربست Degrapol پس از ۲ h، مقدار چگالی سلولی پس از سه روز، مقدار لاکتات تولید شده در روزهای اول، دوم و سوم و مقدار GAG تولید شده در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم محاسبه واندازه‌گیری شد.

#### اثر فشار جزئی اکسیژن

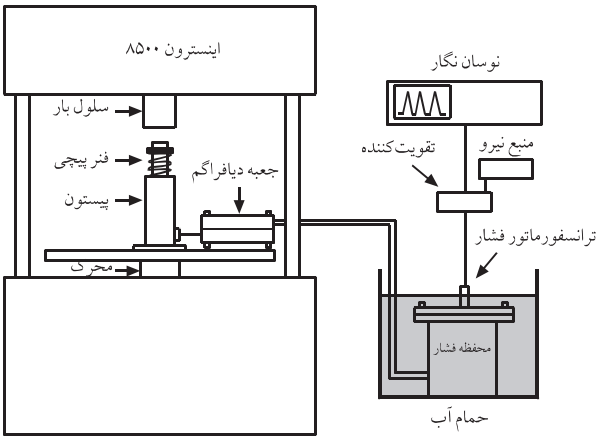
برای بررسی اثر فشار جزئی اکسیژن، پس از افزودن محیط کشت سلولی به نمونه‌های داربست - سلول، سه مجموعه ظرف کشت سلولی ۶ تایی آماده و داخل محفظه‌های اکسیژن قرار داده شدند. سپس، به هر یک از محفظه‌ها به وسیله کپسولهای اکسیژن به ترتیب مقادیر اکسیژن برابر ۱، ۵ و ۲۱درصد دمیده شد تا فشار اکسیژن داخل محفظه به مقدار مورد نظر برسد. سپس، محفظه‌های اکسیژن به همراه ظرفهای شامل داربست - سلول داخل انکوباتور قرار داده شدند. در نهایت مقدار چسبندگی سلولها به سطح داربست Degrapol پس از ۲ h، میزان چگالی سلولی پس از سه روز، میزان لاکتات تولید شده در روزهای اول، دوم و سوم و میزان GAG تولید شده در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم محاسبه و اندازه‌گیری شد.

#### اثر فشار هیدروستاتیک

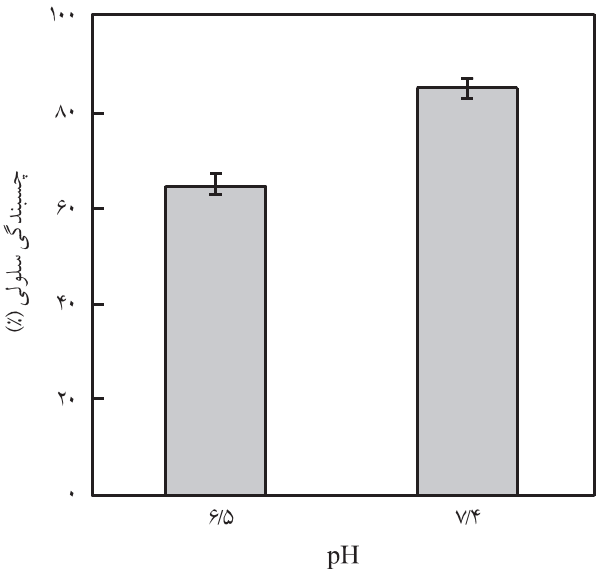
برای اعمال فشار هیدروستاتیک روی نمونه‌های داربست - سلول از دستگاه جداگانه‌ای استفاده شد. این دستگاه از ماشین اینسترون، پیستون، جعبه دیافراگم و محفظه فشار تشکیل شده بود (شکل ۱). در این مرحله از آزمایشها، نمونه‌های Degrapol به همراه سلول، ۲ روز پس از کشت اولیه، داخل لوله‌های سانتریفوژ (Eppendorff) دومیلی لیتری قرار داده شدند و محیط کشت نیز به آنها افزوده شد. سپس، درب این لوله‌ها با فیلمهای کشسان Opsite درزبندی شد. سوراخی ۵ میلی‌متری در بالای درپوش هر لوله ایجاد شد تا فشار هیدروستاتیک به طور مستقیم به ماده و در محیط کشت منتقل شود. سپس، هر لوله داخل حمام آب ۳۷°C قرار داده شد و فشار ۴ MPa به مدت ۴ h به طور چرخه‌ای (سینوسی، ۱ HZ) به نمونه‌ها اعمال شد. به عبارت دیگر، نمونه‌ها ۰/۵ s تحت بار و ۰/۵ s بدون بار بودند. در این مرحله از آزمایشها، مقادیر pH، درصد اکسیژن و قابلیت نفوذ یونی ثابت نگه داشته شدند (pH = ۷/۴، مقدار اکسیژن برابر ۲۱ درصد و قابلیت نفوذ یونی معادل ۳۸۰ osm/L) در نهایت مقدار لاکتات تولید شده در روزهای اول، دوم و سوم و مقدار GAG تولید شده در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم محاسبه و اندازه‌گیری شد. شایان ذکر است که در تمامی آزمایشها، تکرارپذیری نتایج ارزیابی شد. به عبارت دیگر، هر آزمایش کشت سلولی به ازای سه نمونه یکسان، سه مرتبه تکرار شد. در ضمن، بررسی آماری نتایج به وسیله تحلیل واریانس ANOVA وآزمون t- (t-test) انجام شد.

## نتایج و بحث

برای مطالعه چسبندگی سلولی روی داربستهای Degrapol، پس از ۲ h کشت سلولی در دمای ۳۷°C و شرایط فیزیکی مختلف pH، فشار جزئی اکسیژن و قابلیت نفوذ یونی، درصد سلولهای چسبیده به سطح داربستها به روش MTT محاسبه شد. MTT اختصار مربوط به ترکیب 3-[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-diphenylter-tetrazolium bromide

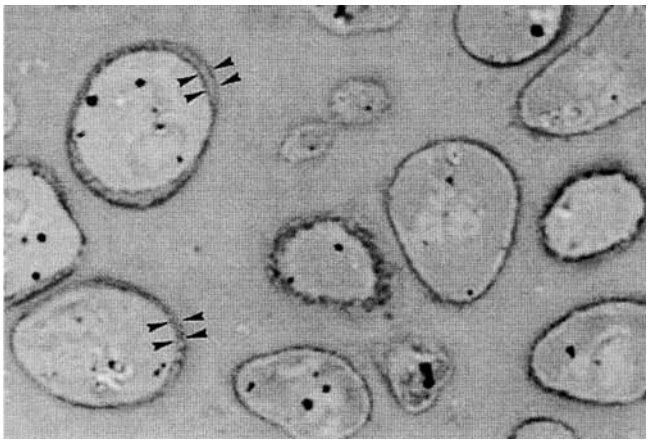



شکل ۱ نمای کلی دستگاه اعمال فشار هیدروستاتیک.



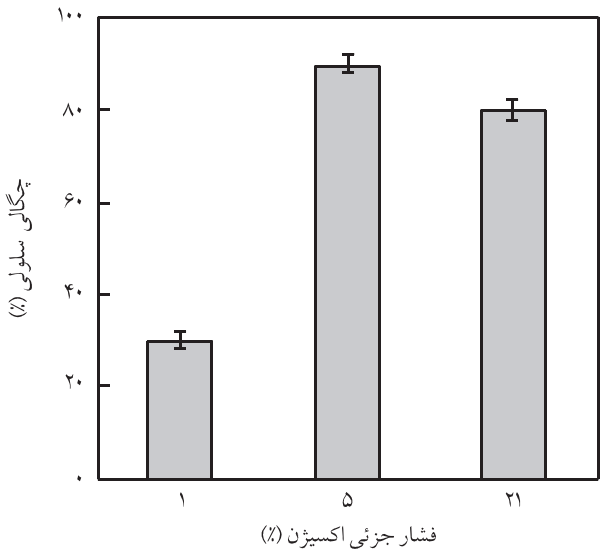

شکل ۲ اثر pH بر چسبندگی کندروسیتها روی داربست Degrapol در شرایط ثابت ۲۱ درصد فشار جزئی اکسیژن و قابلیت نفوذ یونی معادل ۳۸۰ osm/L پس از ۲ h کشت سلولی (n=۹ , mean±Sd, p<۰/۰۰۱).

است [۱۰]. نتایج نشان می‌دهد که در شرایط کشت سلولی در دو pH برابر ۶/۵ و ۷/۴، فشار جزئی اکسیژن ۲۱ درصد و قابلیت نفوذ یونی معادل ۳۸۰ osm/L، بیشترین مقدار چسبندگی سلولی در pH برابر ۷/۴ مشاهده شد و حدود ۸۵ درصد کل سلولهای کشت داده شده‌اند (شکل ۲). نتایج نشان می‌دهد که کاهش pH، اثر قابل ملاحظه‌ای در چسبندگی سلولها روی سطح Degrapol دارد. در واقع می‌توان گفت که pH برابر ۷/۴ یک

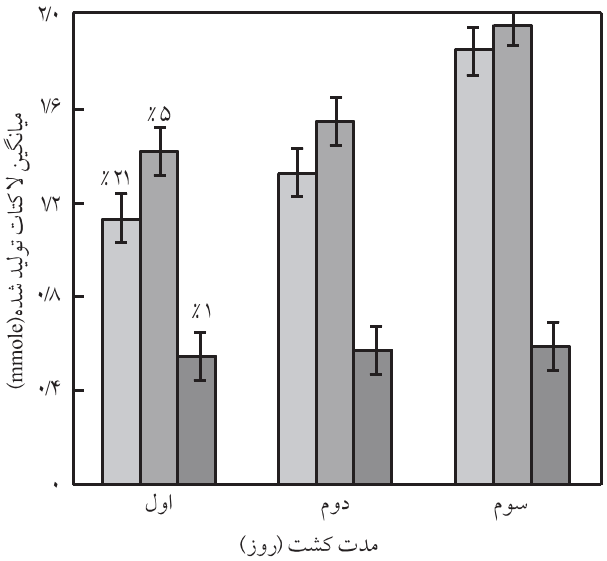


شکل ۳ نحوه چسبندگی و توزیع سلولهای کندروسیت روی داربست Degrapol در pH = ۷/۴، ۲۱ درصد فشار اکسیژن و قابلیت نفوذ یونی برابر ۳۸۰ osm/L پس از ۲ h کشت سلولی. فلشهای نشان داده شده در شکل محل تشکیل ماتریس خارج سلولی را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۱۶۵۰).

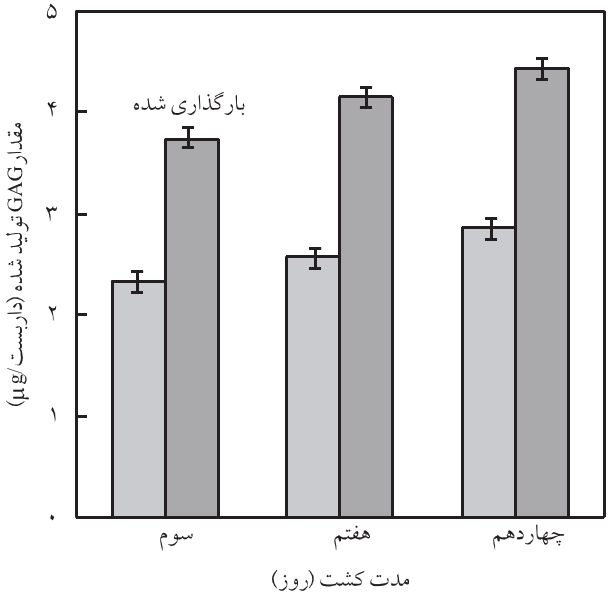
pH فیزیولوژیکی برای فعالیت سلولهای کندروسیت است، چرا که pH فیزیولوژیکی برای سلولهای مختلف متفاوت است. مشاهدات میکروسکوپی از سطح داربست، در شرایط گفته شده نیز نشان می‌دهد که سلولها توزیعی تقریباً یکنواخت روی سطح Degrapol دارند و حالت پهن شدگی (flattening) در آنها قابل مشاهده است. این حالت پهن شدگی سلولی نشان‌دهنده آن است که سلولها بستر مناسبی برای رشد و متابولیسم دارند. به عبارت دیگر، این موضوع را می‌توان به سلول سازگاری سطح این داربستها نسبت داد. همچنین، تشکیل ماتریس خارج سلولی (extra cellular matrix, ECM) در اطراف این سلولها در مدت کوتاه کشت سلولی کاملاً مشهود است (شکل ۳). نتایج دیگر بررسیها نیز، مشابه آنچه که بدان اشاره شد، نشان می‌دهد که بهترین شرایط چسبندگی سلولی در ۵ درصد اکسیژن، قابلیت نفوذ یونی معادل ۳۸۰ osm/L و pH برابر ۷/۴ حاصل می‌شود. نتایج مطالعات چگالی سلولی، مقدار و سرعت لاکتات تولید شده و مقدار GAG به دست آمده نیز همین نتیجه را می‌دهد. به عبارت دیگر، درشرایط فیزیکی ذکر شده بهترین شرایط متابولیسمی حاصل شد. البته در همه موارد با افزایش زمان کشت سلولی نیز، مقدارمتابولیسم افزایش می‌یابد که در شکلهای ۴ تا ۸ کاملاً مشهود است. اطلاعات آماری در هر یک از شکلها نشان می‌دهد که مقدارچگالی سلولی، لاکتات و GAG تولید شده به شدت به شرایط فیزیکی محیط کشت وابسته است، بهترین شرایط مربوط به ۵ درصد اکسیژن، قابلیت نفوذ یونی ۳۸۰ osm/L، pH برابر ۷/۴ و فشار




شکل ۴ اثر فشار جزئی اکسیژن بر چگالی سلولی کندروسیتها روی داربست Degrapol در شرایط ثابت pH (۷/۴) و قابلیت نفوذ یونی (۳۸۰ osm/L) پس از سه روز کشت سلولی (n=۹ , mean±Sd, p<۰/۰۰۱).



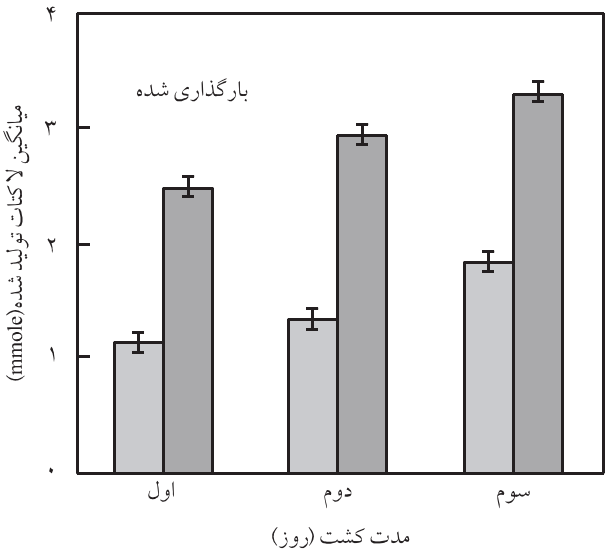

شکل ۵ اثر فشار جزئی اکسیژن بر تولید لاکتات روی داربست Degrapol در شرایط ثابت قابلیت نفوذ یونی برابر ۳۸۰ osm/L و pH معادل ۷/۴ (n=۹ , mean±Sd, p<۰/۰۰۱).



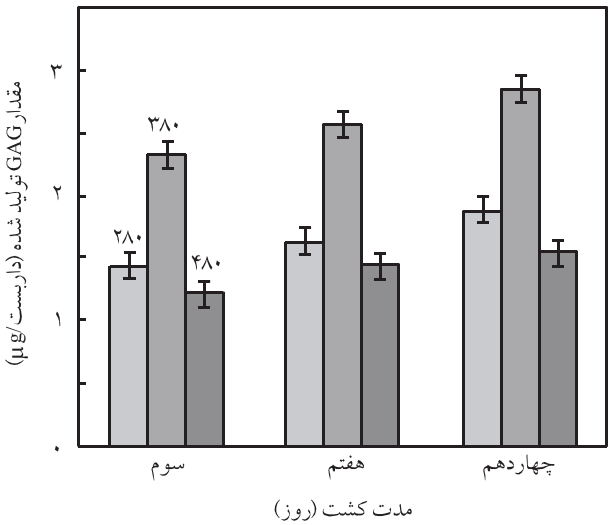

شکل ۷ اثر فشار هیدروستاتیک بر تولید GAG روی داربست Degrapol در شرایط ثابت قابلیت نفوذ یونی (۳۸۰ osm/L)، pH (۷/۴) و فشار جزئی اکسیژن (۲۱ درصد) (n=۹ , mean±Sd, p<۰/۰۰۱).

هیدروستاتیک است.

روند تغذیه در سلولهای کندروسیت به غلظت اکسیژن، گلوکوز و دیگر عوامل رشد در اطراف و داخل این سلولها بستگی دارد، روند روبه رشد این تغذیه و در نتیجه رشد و تکثیر کندروسیتها به مقدار لاکتات تولید شده در غضروف وابسته است. هر چه تولید لاکتات بیشتر باشد، متابولیسم این سلولها بهتر انجام خواهد شد [۱۱]. بنابراین، اصلی‌ترین




شکل ۶ اثر فشار هیدروستاتیک بر تولید لاکتات روی داربست Degrapol در شرایط ثابت pH (۷/۴)، قابلیت نفوذ یونی (۳۸۰ osm/L) و فشار اکسیژن (۲۱ درصد) (n=۹ , mean±Sd, p<۰/۰۰۱).




شکل ۸ اثر قابلیت نفوذ یونی بر تولید GAG روی داربست Degrapol در مقادیر ثابت فشار جزئی اکسیژن (۲۱ درصد) و pH (۷/۴) (n=۹ , mean±Sd, p<۰/۰۰۱).

معیار متابولیسم کندروسیتها، تولید لاکتات به وسیله سلولهاست.

سازوکار حساسیت کندروسیتها و پاسخ آنها به تغییرات فیزیکی - شیمیایی در محیط فعالیت، هنوز ناشناخته است [۱۲]. اما، بر اساس مدلهای شناخته شده، این تغییرات موجب تغییر در سنتز زمینه، افزایش فشار هیدروستاتیک و تغییر شکل کندروسیتها می‌شود. این نکته نشان می‌دهد که حرکت آب و سیالات در کندروسیتها بسیار سریع است، کاهش یا افزایش در قابلیت نفوذ یونی ماتریس خارج سلولی باعث کاهش یا افزایش سریع حجم سلول می‌شود[۱۲].

بر اساس آنچه که گفته شد، تغییرات هر یک از عوامل ذکر شده می‌تواند باعث تغییر در متابولیسم رشد و فعالیت سلولهای کندروسیت شود. در این پژوهش، مجموع نتایج حاصل از بررسی اثر اکسیژن بر روند فعالیت سلولهای کندروسیت نشان می‌دهد که بهترین شرایط چگالی سلولی، تولید لاکتات و GAG در مقدار بهینه اکسیژن و در ۵ درصد حاصل می‌شود. این مسأله نشان می‌دهد که در مقدار اکسیژن برابر ۵ درصد، تغذیه و انتقال یونها از راه مجاری سطحی بهتر و عملاً سلول روند طبیعی فعالیت را در پیش می‌گیرد، اما در درصدهای کم یا زیاد اکسیژن، عملا حجم سلول تغییر می‌کند و تغذیه دچار اختلال شده، تعدادی از سلولها می‌میرند که این مسأله باعث کاهش چگالی سلولها روی دو داربست، کاهش تولید لاکتات و در نتیجه کاهش تولید GAG و تشکیل بافت جدید می‌شود.

از بررسی نتایج اثر pH بر روند فعالیت سلولهای کندروسیت روی داربست Degrapol مشخص شد که بهترین شرایط برای چگالی سلولی، تولید لاکتات و GAG در pH برابر ۷/۴ حاصل می‌شود. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، کاهش pH باعث کاهش حجم سلول می‌شود، این کاهش حجم باعث اختلال در انتقال یونهای تغذیه به داخل و خارج سلول می‌شود [۱۲]. بنابراین، در pH برابر ۶/۵، حجم سلولها کاهش می‌یابد، تغذیه مختل می‌شود و بسیاری از سلولها به دلیل عدم تغذیه مناسب می‌میرند و چگالی سلولها، تولید لاکتات و GAG روی هر دو داربست به شدت کاهش می‌یابد. البته پر واضح است که افزایش بیش از اندازه pH نیز(بیش از ۷/۴) می‌تواند این اختلال را در روند متابولیسم کندروسیتها ایجاد کند. بنابراین، بهترین شرایط متابولیسم، در pH برابر ۷/۴ که pH فیزیولوژیکی نیز است، حاصل می‌شود.

بررسی نتایج اثر قابلیت نفوذ یونی بر روند متابولیسم سلولهای کندروسیت روی داربست Degrapol نشان می‌دهد که باز هم بهترین شرایط، در مقداری بهینه قابلیت نفوذ یونی برابر ۳۸۰ osm/L بدست می‌آید. همان طور که قبلا نیز اشاره شد، کنترل قابلیت نفوذ یونی محیط کشت با یونهای کلسیم و سدیم که نقش مؤثری در تغذیه کندروسیتها دارند، انجام می‌گیرد. به عبارت دیگر، این یونها باعث بهبود روند تغذیه در سلولهای کندروسیت می‌شوند [۱۲، ۱۱]. بنابراین، افزایش یا کاهش بیش از حد قابلیت نفوذ یونی، باعث اختلال در روند متابولیسم سلولهای کندروسیت می‌شود. افزایش بیش از حد قابلیت نفوذ یونی از مقدار بهینه، باعث کاهش حجم سلول و در نتیجه اختلال در حرکت سیالات و تغذیه سلولهای کندروسیت می‌شود، موجب از بین رفتن بسیاری از سلولها و در نتیجه کاهش چگالی سلولی، کاهش تولید لاکتات و کاهش تولید GAG می‌شود. کاهش قابلیت نفوذ یونی نیز باعث افزایش حجم سلولها شده، باز هم در حرکت سیالات در سلول و تغذیه در آن ایجاد اختلال می‌کند. اما، بر اساس نتایج حاصل از این آزمایشها، درقابلیت نفوذ یونی برابر ۳۸۰ osm/L که مقداری فیزیولوژیک است، حجم سلول در شرایط عادی بوده و حرکت سیالات به سرعت و در نتیجه تغذیه سلولی بخوبی انجام می‌شود، چگالی سلولها، تولید لاکتات و GAG افزایش می‌یابد.

نتایج حاصل از بررسی اثر فشار هیدروستاتیک نیز نشان می‌دهد که اعمال فشار می‌تواند روند متابولیسم کندروسیتها را به شدت تسریع کند. البته، بطور قطع مقدار نیروی اعمالی و مدت زمان آن نیز می‌تواند در این مسأله اثرگذار باشد [۴]. در مجموع نکته مهم آن است که غضروف مفصلی با توجه به متورم بودن ساختار آن، بطور عملی تحت فشار هیدروستاتیک است، نه تحت بارهای ایستا یا پویای دیگر. پس این نوع اعمال فشار می‌تواند در متابولیسم سلولهای کندروسیت نقش مؤثری داشته باشد. علت افزایش چشمگیر در تولید لاکتات و GAG را بر اثر فشار هیدروستاتیک می‌توان این طور توجیه کرد که با اعمال فشار هیدروستاتیک، سیال(محیط کشت) با سرعت زیادی از سلول خارج می‌شود و با برداشتن فشار، در مدت زمانی کوتاه، سیال به سرعت وارد سلول می‌شود. این سرعت زیاد ورود و خروج محیط کشت باعث می‌شود که تغذیه سلولی و درنتیجه متابولیسم کندروسیتها تسریع شود. مقدار تولید لاکتات و GAG به شدت افزایش یابد که البته این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده افزایش چگالی سلولی نیز باشد.

از مجموع کل نتایج بدست آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بهترین شرایط متابولیسم کندروسیتها، برای داربست Degrapol در pH برابر ۷/۴، قابلیت نفوذ یونی برابر ۳۸۰ osm/L، مقدار اکسیژن معادل ۵ درصد و بارگذاری هیدروستاتیک است. البته لازم به ذکر است که در تمام آزمایشهای انجام شده در این پژوهش، نتایج در روزهای مختلف کشت سلولی مشابه بود و گذشت زمان کشت، روند افزایشی در مقادیر بدست آمده داشت که این امر نشان از تغذیه مناسب و عدم سمیت سلولی برای کندروسیتها روی داربست دارد. در شرایط فیزیکی دیگر نیز در بعضی موارد با گذشت زمان کشت، متابولیسم بهتر می‌شد، اما روند افزایشی آن بسیار کند بود. در بعضی شرایط فیزیکی نامناسب نیز، مثل pH

برابر ۶/۵، قابلیت نفوذ یونی معادل ۴۸۰ osm/L یا مقدار اکسیژن برابر ۱ درصد، تقریبا گذشت زمان کشت سلولی، اثری بر بهبود متابولیسم کندروسیتها نداشت، که این موضوع نشان می دهد که اگر مدت زمان کشت بیش از آنچه که در این پژوهش استفاده شد، باشد حتی کاهش در مقادیر بدست آمده نیز حاصل می شود، چرا که بنابر آنچه که قبلا نیز اشاره شد، این شرایط فیزیکی باعث اختلال در متابولیسم و از بین رفتن سلولها می شوند.

پس می‌توان چنین گفت که ممکن است در شرایط فیزیکی مختلف، متابولیسم سلولی وجود داشته باشد و این متابولیسم با گذشت زمان روند افزایشی نیز داشته باشد. اما، این متابولیسم در شرایط فیزیکی خاصی بهترین مقدار و سریع ترین افزایش را دارد که در مهندسی بافت باید مورد توجه قرار گیرد. در بافتهایی همچون غضروف که روند رشد و تکثیر کندروسیتها و همچنین تولید کلاژن بسیار آرام است، مهمترین مسأله حصول شرایط فیزیکی مناسب برای تسریع در متابولیسم این سلولها و در نتیجه تشکیل بافت جدید است. از این رو، رسیدن به شرایط فیزیکی بهینه اهمیت دارد.

مجموع نتایج نیز نشان می دهد که با توجه به عدم ایجاد سمیت سلولی و همچنین افزایش متابولیسم سلولی در شرایط مختلف و با گذشت زمان، Degrapol می‌تواند بستر بسیار مناسبی برای رشد و متابولیسم سلولهای کندروسیت به منظور مهندسی بافت غضروف مفصلی باشد.

## نتیجه گیری

در این مطالعه مشاهده شد که در pH برابر ۷/۴، مقدار ۵ درصد اکسیژن، قابلیت نفوذ یونی معادل ۳۸۰ osm/L و فشار هیدروستاتیک، بهترین شرایط برای متابولیسم کندروسیتها روی داربست Degrapol حاصل می‌شود. همچنین، با توجه به عدم ایجاد سمیت سلولی و همچنین افزایش متابولیسم سلولی در شرایط فیزیکی مختلف و با گذشت زمان، Degrapol می‌تواند بستر بسیار مناسبی برای رشد و متابولیسم سلولهای کندروسیت به منظور مهندسی بافت غضروف مفصلی باشد.

**قدردانی**

نویسندگان این مقاله از حمایتهای دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در خصوص انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می کنند.

## مراجع

1. Hardingham T., Tew S. and Murdoch A., Tissue Engineering: Chondrocytes and Cartilage, *Arthritis Res.,* **4**, 63-68, 2002.
2. Tabata Y., Recent Progress in Tissue Engineering, *Drug Discovery Today (DDT),* **6**, 483-487, 2001.
3. Ishihara H. and Urban J.P.G., Effects of Low Oxygen Concentrations and Metabolic Inhibitors on Proteoglycan and Protein Synthesis Rates in the Intervebral Disc, *J. Orthop. Res.,* **17**, 829-835, 1999.
4. Hansen U., Schunke M., Domm C., Ioannidis N., Hassenpflug J. and Kurz B., Combination of Reduced Oxygen Tension and Intermittent Hydrostatic Pressure: A Useful Tool in Articular Cartilage Tissue Engineering, *J. Biomech.,* **34**, 941-949, 2001.
5. Freyria A.M., Cortial D., Ronziere M.C., Guerret S. and Herbage D., Influence of Medium Composition, Static and Stirred Conditions on the Proliferation of and Matrix Protein Expression of Bovine Articular Chondrocytes Cultured in a 3-D Collagen Scaffold, *Biomaterials,* **25**, 687-697, 2004.
6. Spaans C.J., Groot J.H.D., Dekens F.G., Veth R.P.H. and Pennings A.J., Development of New Polyurethanes for Repair and Replacement of the Knee Joint Meniscus, *Polym. Prepr.,* **40**, 589-590, 1999.
7. Saad B., Neuenschwander P., Uhlschmid G.K. and Suter U.W., New Versatile, Elastomeric, Degradable Polymeric Materials for Medicine, *Int. J. Biolog. Macromol.,* **25**, 293-301, 1999.
8. Yang L., Korom S., Welti M., Hoerstrup S.P., Zünd G., Jung F.J., Neuenschwander P. and Weder W., Tissue-Engineered Cartilage Generated from Human Trachea Using Degrapol Scaffold, *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.,* **24**, 201-207, 2003.
9. Mirzadeh H., Mohagheghi M.A., Ahmadi H., Mirkhani H., Amanpour S. and Salehian P., Cartilage Tissue Engineering for Ear as in Rabbit Model with Perforated Polyurethane Prosthesis: *In-vivio* Assay, *Iran. Polym. J.,* **9**, 73-80, 2000.
10. Zhang X., Pennec G.L., Steffen R., Muller W.E.G. and Zhang W., Application of a MTT Assay for Screening Nutritional Factors in Growth Media of Primary Sponge Cell Culture, *Biotechnol. Prog.,* **20**, 151-155, 2004.
11. Bibby S.R., Jones D.A., Lee R.B. and Urban J.P.G., The Pathophysiology of the Intervebral Disc, *Joint Bone Spine,* **68**, 537-542, 2001.
12. Urban J.P.G., Hall A.C. and Gehl K.A., Regulation of Matrix Synthesis Rates by the Ionic and Osmotic Environement of Articular Chondrocytes, *J. Cell. Physiol.,* **154**, 262-270, 1993.