

## بررسی ارتباطات میواندوتلیال، میان سلول های اندوتلیال و نظم مارپیچی سلولهای عضلانی صاف جدار شرایین توزیع کننده (عضلانی)

مجید ملک زاده شفاوردی (Ph.D.)<sup>+</sup>    جان بی مک گراس (Ph.D.)<sup>\*\*</sup>    جوماریا گونزالس (Ph.D.)<sup>\*\*\*</sup>  
سیلویاماریا آریباس (Ph.D.)<sup>\*\*\*\*</sup>    کرگ دلی (Ph.D.)<sup>\*\*\*\*\*</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** نظم مهندسی جدار شرایین براساس ترتیب قرار گرفتن سلولهای اندوتلیال، عضلانی صاف و آدوانتیس در طرفین تیغه ارتجاعی داخلی می باشد. پژوهش های اخیر بر نقش مهم سلولهای آدوانتیس و اندوتلیال در رشد و ترمیم عروقی تاکید می نمایند. در دیدگاه جدید دینامیکی، عروق خونی همواره حالت پایداری را از نظر ساختار مهندسی و نظم به کارگیری سلولها در جدار خود فراهم می نمایند که به مؤلفه های نظیر فشار خون، ضخامت لایه عضلانی، نظم موجود در انقباض عضلات صاف جدار عروقی و تعداد و وسعت سطح تماس سلولهای اندوتلیال با خون در جریان بستگی دارد. تحقیقات اخیر ارائه شده در این مقاله سعی در پاسخگویی به سوالات بنیادی درباره تنوع و نظم انواع سلولهای موجود در جدار شرایین (cellular heterogeneity) هنگام بازسازی (remodelling) در شرایط نرمال و پاتولوژیک را دارد.

**مواد و روش ها:** تعداد دوازده موش وحشی (Wild Type-WT) تحت آزمایشات قرار گرفتند. پس از بیهوش کردن حیوان با CO<sub>2</sub> قطعاتی زنده از جدار شرایین مزانتریک جدا و از بافت چربی پاکسازی گردیده و در دستگاه perfusion myograph تحت فشار طبیعی 70mmHg بامخلوطی از اکسیژن و دی اکسید کربن (95/5%) در محلول کریس، توسط LSCM با استفاده از رنگ آمیزی فلوروسنت هسته ای (Syto13) / تحت موج لیزر آرگون یونیزه 488nm و DIO لیپوفیلک / تحت موج لیزر آرگون یونیزه 484nm/501nm برای کانال سبز و موج لیزر آرگون - هلیوم 543nm/580nm برای کانال قرمز مورد مطالعه قرار گرفتند.

**یافته ها:** تصاویر کامپیوتری سه بعدی تهیه شده از لایه های مختلف جدار شرایین با کمک لیزر، مؤید نظم مارپیچی (Helical) عضلات صاف در ارتباط با سلولهای اندوتلیال بودند. تصاویر تهیه شده از سلولهای اندوتلیال و عضلات صاف در طرفین تیغه ارتجاعی داخلی (IEM) موید وجود ارتباطات سلولی Myoendothelial Connections مابین این سلولها بود که از نظم مارپیچی سلولهای عضلانی صاف در رابطه با آندوتلیوم متابعت می کرد.

**استنتاج:** اهمیت حفظ ارتباطات محکم بین سلولی نظیر ارتباطات میواندوتلیال هنگام انقباض و یا انبساط عروقی و شکل گیری دوباره آنها طی فرآیند بازسازی مخصوص در فشارخون بالا که ممکن است نسبت ایجاد گسستگی هایی در این نوع از ارتباطات گردد؛ درک جدیدی از مدل فیزیولوژیکی و دینامیک طبیعی عروق خونی در یک مدل سه بعدی (3D) ارائه می نماید.

**واژه های کلیدی:** ارتباطات میواندوتلیال، بازسازی عروقی، شریان مزانتریک، تیغه ارتجاعی داخلی، رنگ آمیزی فلوروسنت

E-mail: Malek1344@gmail.com

<sup>+</sup>مؤلف مسئول: دکتر مجید ملک زاده شفاوردی - ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی

\* دکترای تخصصی بافت شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران

\*\* پروفیسور فیزیولوژی اتونومیک، دانشگاه گلاسگو - انگلستان

\*\*\* دکترای تخصصی، پژوهشگر دانشگاه گلاسگو - انگلستان

\*\*\*\* دانشیار فیزیولوژی اتونومیک، دانشگاه گلاسگو - انگلستان

\*\*\*\*\* تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۲۲

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۱

## مقدمه

عروق خونی شامل شرایین و وریدها، از دیدگاه بافت‌شناسی ساختاری سه لایه دارند که از داخل به خارج لایه انتیما (Intima)، شامل ردیفی از سلول‌های آندوتلیوم که داخلی‌ترین سطح عروق را به صورت سنگفرشی پوشش داده و توسط بافت همبند سست و نازکی پشتیبانی و از تیغه ارتجاعی داخلی که مرز میان دو لایه انتیما و مدیا را تشکیل می‌دهد، فاصله می‌گیرند. انتیما به عنوان یک لایه پهن شده بر روی تیغه ارتجاعی داخلی (Internal Elastic Lamina-IEL) قرار دارد. در منظر سه بعدی این تیغه موج دار است و در شرایطی که تحت فشار فیزیولوژیکی خاص قرار بگیرد تیغه‌های طولی چین خورده با خاصیت ارتجاعی سبب افزایش طول شریان تا رسیدن به نهایت دامنه فیزیولوژیکی آن می‌شوند. لایه مدیا، شامل یک تا چندین طبقه سلول‌های عضلانی صاف همراه با طبقاتی از رشته‌های الاستیک که هر چه از قلب فاصله می‌گیرند، عضلات صاف بیشتر و از طبقات الاستیکی کاسته می‌گردد و آدوانتیس (Adventitia) خارجی‌ترین لایه رگ خونی محسوب می‌گردد که وظیفه پشتیبانی تغذیه‌ای و عصبی عروق خونی را بر عهده دارد. این لایه نقش مهمی در بیماری‌زایی سیستم عروقی در رابطه با بیماری‌های قلبی-عروقی ایفا می‌نماید. مشخص گردیده است که در عروق با فشارخون بالا به طور غیر منتظره‌ای با افزایش دانسیته سلول‌های آدوانتیزی و کاهش دانسیته سلول‌های عضلانی صاف در دیواره عروقی روبرو هستیم (۴ تا ۱). این اطلاعات نقش هدایت‌کنندگی سلول‌های آدوانتیزی رگ خونی را در بازسازی عروقی و دیگر تغییرات همراه آن آشکار می‌نماید (۵ تا ۶).

در شرایین توزیع‌کننده عضلانی (resistance or distributing arteries) بیش از یک لایه سلول عضلانی به دور لومن وسیع‌تری

(Lumen diameter  $\geq 500\mu\text{m}$ ) حلقه می‌زنند. در این حالت هر سلول عضلانی صاف زاویه‌ای معادل  $\pm 10\text{ deg}$  با محور جریان خون پدید می‌آورد که الگویی از سازماندهی مارپیچی را با استفاده از دستجات سلول‌های عضلانی به نمایش می‌گذارد (۵ تا ۷). عملاً این سازماندهی مارپیچی (spring like organization) سبب فراهم آوردن امکان افزایش طول برای شرایین به هنگام افزایش فشار خون (systolic blood pressure) می‌گردد که مکانیسم جریان نبض را در طول شریان شکل می‌دهد و قلب را از برگشت موج القایی فشار خون حفاظت می‌نماید.

در آرتریول‌ها، طول یک‌صد و پنجاه میکرونی هر فیبر عضله صاف به همراه قطر کوچک آرتریول (Lumen diameter  $\leq 300\mu\text{m}$ ) امکان این را به سلول عضلانی می‌دهد که حلقه کاملی را به دور لومن ایجاد نماید. با این وجود، به منظور جلوگیری از روی هم افتادگی سلولی (over lapping)، سلول‌های عضلانی صاف با اندکی چرخش زاویه‌ای یک مارپیچ جانبی (diagonal helix) را ایجاد می‌نمایند. هر سلول عضلانی صاف بخشی از مارپیچ را کامل می‌نماید و لذا یک سازماندهی مارپیچی با ظاهری حلقوی را پدید می‌آورد (۵ تا ۱۰).

دانش ما در زمینه شناخت ساختار عروقی به طور بنیادی بر تصاویر دو بعدی بافت‌شناسی از جدار عروق خونی و لنفی که به طور عمده شامل سلول‌های عضلانی صاف و ماتریکس خارج سلولی آنها است استوار می‌باشد. در این تکنیک‌های قدیمی، امکان مکان‌یابی سلولی (نظیر GPS در مکان‌یابی زمینی از طریق کاربرد ماهواره‌های فضایی) وجود نداشت. امروزه، پیشرفت فن‌آوری (technology) و بکارگیری روش‌های جدید تصویربرداری سه بعدی به کمک اسکن لیزری

(intact vessels) را در حالت زنده تهیه نمود. در این صورت با انتقال اطلاعات دیجیتالی فراهم شده به محیط یک نرم افزار کامپیوتری مخصوص آنالیز تصاویر سه بعدی (image analysis software) نظیر Imaris, Metamorph or Amira قادر به ایجاد تصاویر سه بعدی با کمک مشخصه‌های رستوری سلول‌های تشکیل دهنده ساختار رگ خونی هستیم که در آن موقعیت هر نوع سلول را به طور اتوماتیک می‌توان ردیابی و به صورت Isosurface نمایان کرد. اطلاعات بیشتری را نیز می‌توان با کمک مکان (position) ابعاد (dimensions) و مشخصات (characteristics) وابسته به شدت سیگنال‌های دریافتی نظیر دانسیته رستورهای سلولی کسب نمود. همچنین مقایسه‌های کمی (quantitative comparison) در مقایسه با عروق شاهد با احتساب تعداد و دانسیته سیگنال‌ها می‌تواند تحقق یابد. یک روش خوب و ساده برای تفکیک انواع سلول‌های جدار رگ خونی مطالعه هسته‌های سلولی است که به راحتی از یکدیگر قابل تفکیک بوده و ارتباط تنگاتنگی با شکل سلول‌ها دارند. لذا رنگ آمیزی هسته‌های سلولی به ما اجازه آنالیز جداگانه انواع سلول‌های حاضر در جدار رگ را می‌دهد. به طوری که تعداد، مکان و جهت‌گیری سلول‌ها به سادگی از طریق مشاهده هسته‌های آنها در جدار شراین قابل محاسبه است. علاوه بر نظم ترتیب سلولی مقایسه میان عروق سالم و بیمار نیز امکان پذیر است (۱۹،۱۸،۶،۵).

#### تصویر برداری لیزری:

جهت تصویربرداری لایه لایه از کونفوکال میکروسکوپ Biorad 1024 & Radianc 2100 استفاده شد. بزرگنمایی X40 oil immersion objective lens همراه با  $NA=1$  و روزنه معادل 1.5 (Pinhole setting= 1.5) با  $512 \times 512$  Pixels که

کونفو کال میکروسکوپی و استفاده از نرم‌افزارهای پیشرفته پرورش تصاویر خام لیزری که از ۱۹۹۸ میلادی در تکامل تدریجی آنها پروژه‌های علمی بسیاری به انجام رسیده است بر نقش آفرینی‌های تازه برای سلول‌های آدوانتیسی (adventitial cells) و سلول‌های آندوتلیال (endothelial cells) در حفظ، رشد، ترمیم و بازسازی عروق تاکید دارد (۱،۹،۸،۱۱ تا ۱۳).

ارتباطات میان انواع سلول‌های شرکت کننده در جدار عروق خونی در تشکیل یک ساختار پایدار از دیواره عروقی نقش اساسی را بر عهده دارد. این تحقیق سعی دارد با استفاده از ابزار و روش‌های مدرن نگاهی دوباره به ساختمان شراین و تنوع (cellular heterogeneity) و نظم انواع سلول‌های موجود انداخته و چگونگی ارتباط میان آنها در لایه‌های مختلف جدار شراین را مورد بررسی دقیق قرار دهد.

## مواد و روش‌ها

### لیزر میکروسکوپی:

استفاده از نور پلاریزه (لیزر) با شدت‌های تابش متوسط و بالا از دهه ۱۹۶۰ میلادی جهت تصویربرداری ماکروسکوپی به خصوص در صنایع نظامی با اختراع کامپیوتر در دهه هفتاد میلادی و تکامل آن طی سه دهه، در کنار ابداع شیوه کونفو کال در مطالعات میکروسکوپی منجر به تلفیق تکنیک‌های تولید لیزرهای ویژه، کنترل اسکینینگ لیزری و کونفو کال همراه با تولید نرم افزارهای ویژه قابل انطباق با مایکروسافت ویندوز و یا لینوکس نظیر: Laser Sharp, Metamorph, Imaris, Amira امکان ابداع تکنیک لیزر اسکیننگ کونفو کال میکروسکوپی (Laser Scanning Confocal Microscopy- LSCM) را فراهم آورد.

با استفاده از فناوری نوین می‌توان تصاویر سه بعدی (3-dimension) از جدار شراین کوچک کامل

مربعی به ابعاد  $289\mu\text{m} * 289\mu\text{m}$  پوشش می‌داد، استفاده گردید.

به طور کلی دو روش بررسی اسکن‌های کونفو کال لیزری معمول است.

میکروسکوپی لیزری با دهانه باز مستطیل شکل (Slit LSCM) که برای اندازه‌گیری‌های کمی با کمک ترکیبات فلئورسنت مناسب تر است. به طوری که قادر به جمع‌آوری تشعشعات بیشتری از نمونه مورد مطالعه همراه با دقت کمتری در وضوح ترکیب فلورسنت و بالطبع مکان‌یابی است. مسلماً این گونه تصاویر نیاز به دکانولوشن کامپیوتری (Computer Deconvolution) کمتر و پایین‌تری دارند.

میکروسکوپی لیزری با دهانه روزنه‌ای شکل (Pinhole LSCM): که تصاویری واضح‌تر با رزولوشن بالاتر و حدود مشخص‌تر پدید می‌آورد که نیاز به اصلاحات کامپیوتری کمتری دارد و در آن جزئیات مکانی ترکیبات فلئورسنت مشخص‌تر می‌باشد (۲۰،۱۹،۱۷،۱۶).

#### میوگرافی (Myography) و میوگرافی تحت فشار (Perfusion Pressure Myography):

در این شیوه از مطالعه عروقی با استقرار رگ خونی در حوضچه‌های ۵-۲۵ میلی لیتری مجهز به دمنده‌های اکسیژن و دی اکسید کربن به نسبت ۹۵ به ۵ درصد و ایجاد کشش اولیه منطبق با قطر لومن رگ خونی در حالی که یکی از محورهای کششی ثابت و دیگری به یک ترانسدوسر (Transducer) متصل به کامپیوتر مجهز به نرم‌افزار مناسب اتصال یافته است می‌توان تغییرات ایزومتریک نیروی انقباضی رگ‌خونی زنده را نسبت به مداخله‌گرهای مختلف محاسبه و ثبت کرد (۱۴۱۳).

در میوگرافی تحت فشار علاوه بر تمامی مشخصه‌های ذکر شده از کانول‌های شیشه‌ای متصل به ستون‌هایی از محلول کربس جت ایجاد فشار و تحت کشش قرار

دادن رگ‌خونی منطبق بر شرایط نرمال در دامنه تغییرات طبیعی فشار خون می‌توان سود جست. از جدیدترین روش‌های مطالعه ساختار مورفولوژیکی عروق استفاده همزمان میوگرافی تحت فشار و میکروسکوپی لیزری لایه لایه موسوم به LSCM می‌باشد. در این روش حتی جزئیات سلولی (ممبران و اورگانل‌ها) در کنار مکان‌یابی نیز قابل رؤیت و مطالعه هستند.

#### حیوانات مورد مطالعه:

تعداد دوازده موش وحشی نر (Wild Type- WT) تحت آزمایشات قرار گرفتند. که از نظر وزن، تغذیه و شیوه کشتن حیوان براساس استانداردهای جهانی با کمک  $\text{CO}_2$  بدون صدمه رسیدن به بافت عروقی در کوتاه‌ترین زمان ممکن از بدن جانور خارج و در محلول کربس اکسیژنه بصورت بافت زنده مستقر گردیدند (۱۳ تا ۱۵).

#### آماده سازی بافتی:

پس از بیهوش کردن حیوان با  $\text{CO}_2$  قطعات دو تا سه میلی متری از رگ‌خونی زنده (شرایین مزاتریک) در دمای آزمایشگاهی (۲۲ درجه سانتیگراد) از جدار شرایین جدا و از بافت چربی پاکسازی گردیده و در دستگاه perfusion myograph تحت فشار طبیعی 70mmHg با مخلوطی از اکسیژن و دی اکسید کربن (95/5%) در محلول کربس، توسط LSCM با استفاده از رنگ آمیزی فلئورسنت هسته‌ای (Syto13-1 $\mu\text{g/ml}$ ) و (DIO 1 $\mu\text{M}$ ) لیسوفیلیک در مدت زمان معین آغشته می‌شوند و بر حسب نوع ترکیبات فلورسنت بدون شستشو و یا پس از شستشوی/ تحت موج لیزر آرگون یونیزه (488nm/515nm) برای کانال آبی/ تحت موج لیزر آرگون یونیزه 484nm/501nm برای کانال سبز و موج لیزر آرگون- هلیوم 543nm/580nm برای کانال قرمز مورد مطالعه قرار گرفتند. اسکن‌های با ضخامت 0.3 $\mu\text{m}$  از رگ‌های خونی مورد مطالعه به تعداد ۶۴ برش از سه

## یافته ها

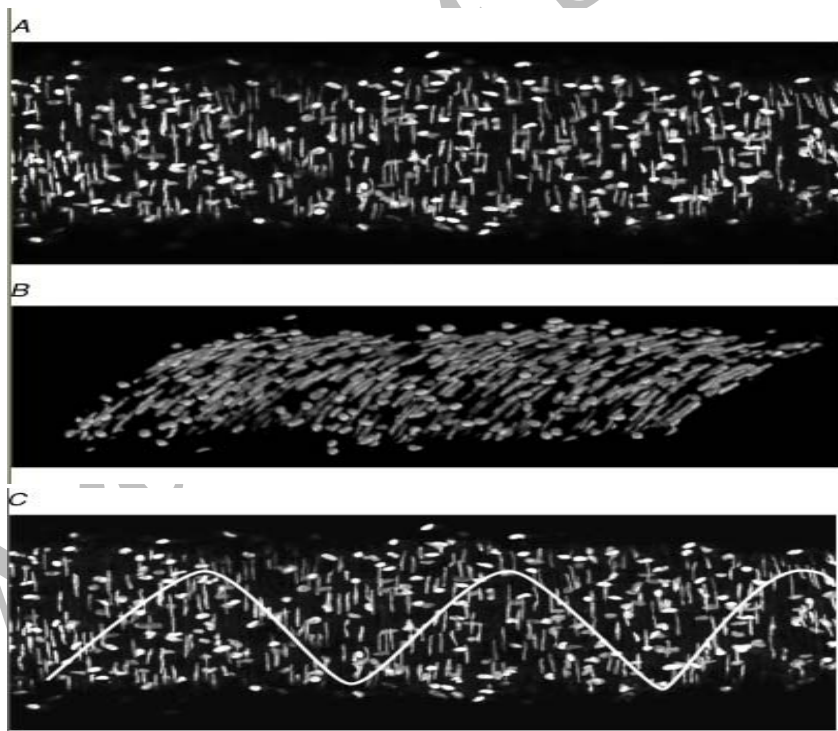
با استفاده از متدهای تحلیل اطلاعات تصویری (Image Analysis Methods-IAM) در مطالعه بر روی شرایین مزانتریک می توان به اطلاعات زیر بر روی تصاویر حاصله دست یافت:

۱- هسته های سیگاری شکل سلول های عضلانی صاف عمود بر محور جریان خون بگونه ای دیده می شوند که سلول های هر لایه عضلانی با سلول های لایه مجاور در عین همپوشانی زاویه 10 درجه را نسبت به محور جریان خون پدید می آورند (تصویر شماره ۱).

لایه آدوانتیس، مدیا و انتیما بدقت اندازه گیری و مکان سلول های هر لایه و جهت گیری محور طولی سلول ها مشخص شد (۲۰ تا ۱۸۰، ۷ تا ۵).

تحلیل و تفسیر تصاویر حاصل از LSCM:

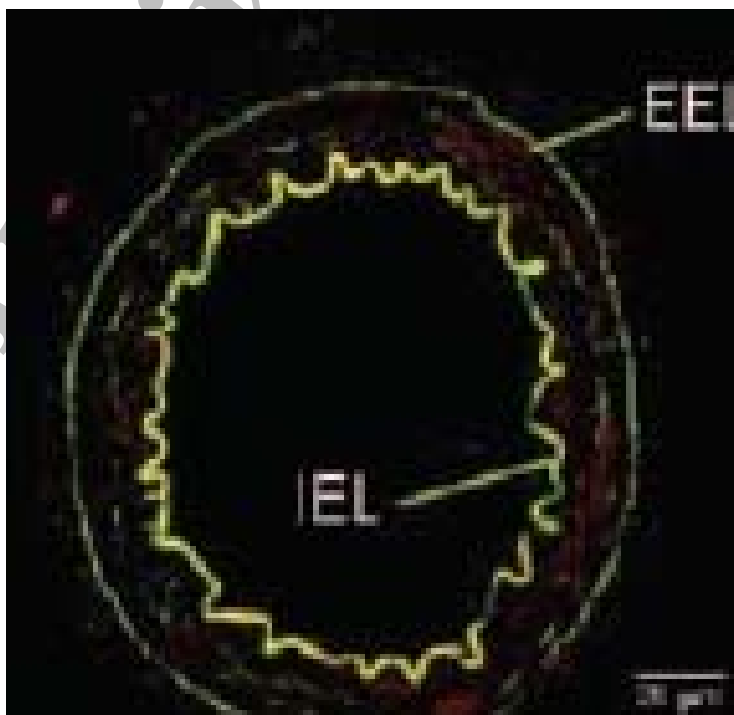
حجم سه بعدی از تصاویر کسب شده در محیط نرم افزار (version 4.2) Metamorph به صورت فایل های Tiff به نرم افزارهای (version 3.2) Imaris و (version 3.2) Amira (TGS) انتقال یافته و در محورهای XY, XZ & YZ مورد بررسی قرار گرفت.



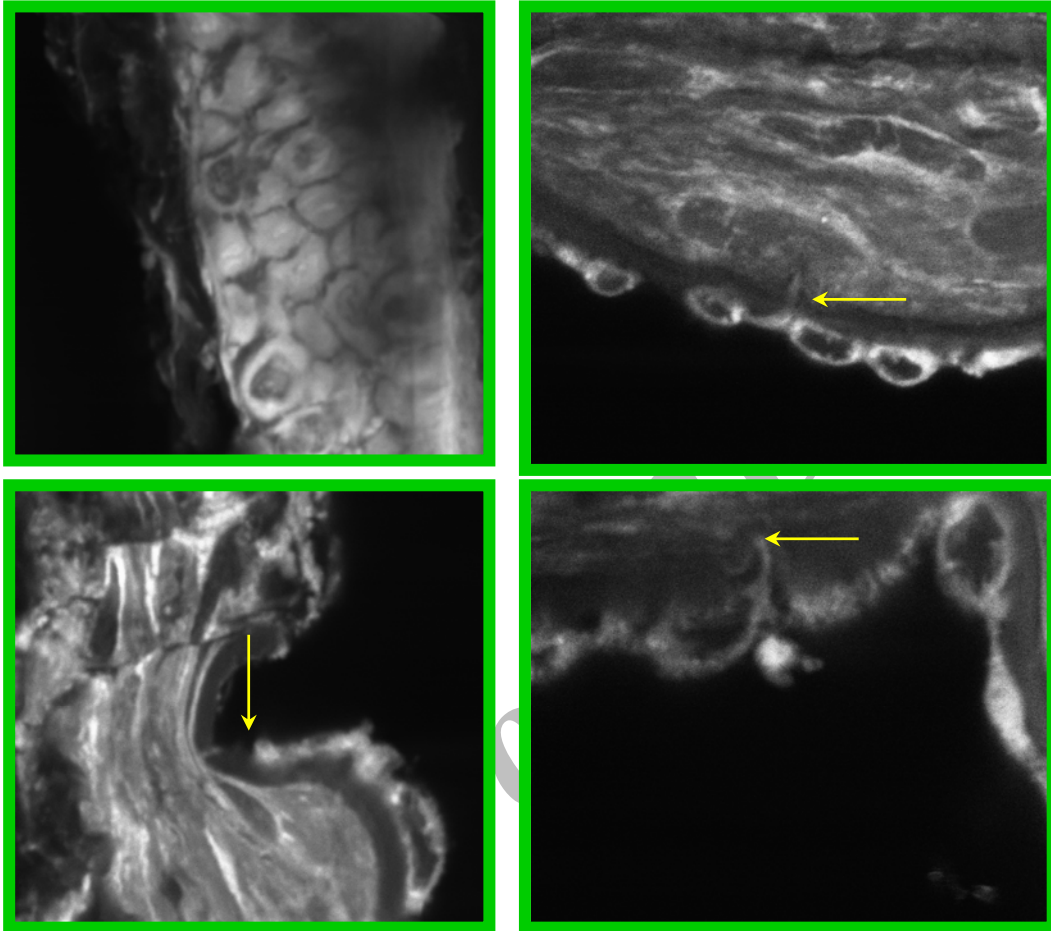
تصویر شماره ۱: رنگ آمیزی هسته در شریان مزانتریک موش - تکه کاملی از رگ خونی در دستگاه میوگرافی تحت فشار 70mmHg تعبیه گردیده است. رنگ آمیزی فلئوئورسنت هسته ای (Syto13; 1µg/ml<sup>-1</sup>) با لیزر آرگون در طول موج 488nm تهییج شده است. در این حالت هسته های هر سه نوع سلول موجود در جدار عروق خونی قابل رویت هستند. هسته دوکی شکل سلول های عضلانی صاف به طور عمودی و هسته سلول های آدوانتیزی کروی با حدود نامنظم و روشن و هسته آندوتلیال کمی درشت تر و روشن و عمدتاً محور طولی آنها در جهت جریان خون و به موازات محور طولی رگ خونی دیده می شوند. A- هر سه نوع سلول در کنار یکدیگر. B- تصویر حجمی سه بعدی طبیعی از میکروسکوپی کونفوکال که انحنای شریان را نشان می دهد. C- تصویری که ماهیت مارپیچ طبیعی نظم سلول های عضلانی در رابطه با سلول های آندوتلیال را مجسم می نماید.

بنام اتصالات میوآندوتلیال در طرفین تیغه ارتجاعی داخلی (IEM) در تصاویر کونفوکال میکروسکوپی با استفاده از ترکیبات فلئورسنت بر روی خط فرضی ترسیمی انطباقی از تصویر شماره ۱ به وضوح مشاهده می‌گردد (فلش‌ها). اتصالات میوآندوتلیال از طریق منافذ تیغه ارتجاعی داخلی میان سلول‌های آندوتلیال و سلول‌های عضلانی صاف زیرین در شریان مزانتریک پل زده‌اند (فلش‌ها- تصاویر چهارگانه شماره ۳). این ارتباطات میوآندوتلیال از نظم مارپیچی قرار سلول‌های آندوتلیال که در تصویر شماره یک (پایین-C) نشان داده شده است تبعیت می‌نمایند. تصاویر لیزری ضخیم‌شدگی غشایی را در محل اتصالات به‌خوبی نشان می‌دهد که حاکی از آن است که این اتصالات از نوع محکم Tight Junction می‌باشند.

۲- هسته‌های بیضوی روشن سلول‌های آندوتلیال کمی درشت‌تر و عمدتاً در جهت محور طولی رگ خونی و هم جهت با جریان خون نظم یافته‌اند (تصویر شماره ۱).  
 ۳- هم‌مکانی هسته‌های سلول‌های آندوتلیال و هسته‌های سلول‌های عضلانی صاف (Co-location or Overlapping) نشان داده شده است که ماهیت مارپیچ طبیعی نظم سلول‌های عضلانی در رابطه با سلول‌های آندوتلیال را مجسم می‌نماید (تصویر شماره ۱-C).  
 ۴- وجود تیغه ارتجاعی داخلی (IEL) چین خورده در جدار شریان مزانتریک موش که بسیار ضخیم‌تر از تیغه ارتجاعی خارجی (EEL) است و لایه‌مدیای عضلانی را از انتیما آندوتلیالی جدای می‌نماید با کمک رنگ آمیزی فلئورسنت مشخص شده است (تصویر شماره ۲).  
 ۵- همچنین وجود ارتباط میان سلول‌های آندوتلیال تشکیل‌دهنده رگ‌های خونی نرمال و سلول‌های عضلانی



تصویر شماره ۲: جایگاه تیغه‌های ارتجاعی داخلی و خارجی در شریان مزانتریک موش



تصویر شماره ۳: اتصالات میوآندوتلیال از طریق منافذ تیغه ارتجاعی داخلی میان سلول‌های آندوتلیال و سلول‌های عضلانی صاف در شریان مزانتربیک پل زده اند. نمونه های بافتی با  $DIOC_{18}$  (1 $\mu$ M) Excitation/Emission 484nm/501nm برای مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد رنگ آمیزی شده اند و سپس با عدسی ابجکتیو x40 Oil با دقت تصویری  $0.02-0.04 \mu / \text{Pixel}$  با کمک LSCM اسکن و عکس برداری شده اند.

## بحث

را در این لایه پوشاننده منعکس می‌نماید این اتصالات از نوع محکم Tight Junction می‌باشند با این حال، به دلیل احتمال قرارگیری Gap Junctions به همراه این اتصالات، مبادله فاکتورهای آندوتلیالی که نقش تغذیه‌ای و کنترل‌کننده بر روی فیبرهای عضلانی صاف لایه‌های زیرین دارند نیز از طریق این اتصالات اجتناب ناپذیر است. تیغه ارتجاعی داخلی نه تنها سلول‌های آندوتلیال را از سلول‌های عضلانی صاف جدا می‌نماید بلکه به عنوان یک ساختار متغیر (Changeable) و غیر ثابت

انطباق تصاویر سه بعدی سلول‌های آندوتلیال استپاله‌دار انیتما، اتصال یافته به سلول‌های عضلانی صاف لایه مدیای زیرین از طریق عبور از تیغه ارتجاعی داخلی، تبعیت اتصالات میوآندوتلیال را از سازماندهی مارپیچی سلول‌های عضلانی صاف مدیا آشکار می‌نماید. از مشاهدات سه بعدی این تحقیق اینچنین به نظر می‌رسد که ارتباطات میان سلول‌های آندوتلیال و سلول‌های عضلانی صاف از طریق اتصالات میوآندوتلیال و الگوی قرارگرفتن سلول‌های آندوتلیال نوعی موزایسم

نمی‌دانیم که چه تعداد از سلول‌های عضلانی صاف در جدار شرایین به طور تصادفی جهت‌گیری و چه تعداد از نظم ماریچی ۱۰ درجه تبعیت می‌نمایند و چه تعداد از آنها مکانشان دقیقاً با دیگر انواع سلول‌های عروقی و ساختار آن هماهنگ و وابسته است. بدین جهت ما نیازمندیم تا دانش خویش را در رابطه با ساختارهای سه بعدی و مدل‌های سازماندهی سلولی قبل از هر نوع قضاوتی درباره بازسازی عروقی در شرایط مختلف فیزیولوژیکی افزایش دهیم. در این راستا کاربرد میکروسکوپ لیزری کونفوکال (LSCM) کمک بزرگی به ایجاد و درک مدل‌های سه بعدی می‌نماید.

باز سازی و تجدید آرایش سلولی (remodeling) در شرایین با توجه به تغییرات فیزیولوژیکی بدن موجود زنده (فشار خون، سن، بیماری‌ها، نحوه تغذیه و استرس) نظیر دیگر بافت‌های بدن دائماً در جریان است. اتصالات محکم بین سلولی هنگام remodeling عروقی می‌بایست گسسته و از نو شکل بگیرند. این موضوع کنترل دقیق آرایش سلولی و ارتباطات میان این سلول‌ها را طی فشارهای حاد ناشی از استرس و فشارخون مزمن با شرایط بیوفیزیکی جدید را می‌رساند. با این حال به نظر می‌رسد فشار خون بالا یک مرحله پاتولوژیکی است که در آن ارگانسیم به مقدار کافی با شرایط تغییر یافته تطابق نمی‌یابد. در این حالت ممکن است گسستگی‌ها در انواع اتصالات بین سلولی و منجمله میوآندوتلیال رخ دهد که خود عواقبی را به دنبال دارد. این موضوعات در کنار یکدیگر مرحله جدیدی در درک مدل فیزیولوژیکی و دینامیک طبیعی دیواره عروق خونی ارائه می‌نماید. گرین اسمیت و دالینگ این حقیقت را نمایان ساختند که در شرایط افزایش فشارخون علاوه بر سلول‌های عضلانی در سمت دیگر تیغه ارتجاعی داخلی سلول‌های آندوتلیال نیز فشارهای جدی را تحمل می‌نمایند. این موضوع در شرایط افزایش مزمن فشار خون می‌تواند اختلال در

(Non-static) می‌تواند تغییرات بارزی را در ارتباطات متقابل میوآندوتلیال هدایت نموده و نهایتاً عمل رگ خونی را کنترل می‌نمایند.

در طی فرآیند عروق‌زایی (angiogenesis or vasculogenesis) اجداد سلول‌های آندوتلیال موسوم به angioblast ابتدا مکان‌هایی را جهت پیدایش لوله‌های آندوتلیال (endothelial tubes) فراهم می‌نمایند. سپس اجداد سلول‌های صاف موسوم به میوبلاست‌ها myoblasts تمایل می‌یابند تا بدور این لوله‌های آندوتلیالی خویش را پهن نمایند. به همین جهت از مراحل ابتدایی شکل‌گیری رگ خونی، ارتباط فیزیکی در جهت ایجاد کنش متقابل بین دو نوع سلول (physical interactions) شکل می‌گیرد و موقعیت مکانی آنها به یکدیگر مرتبط (intimately link) می‌گردد (۹،۵،۴). توسعه فناوری و کاربرد نرم‌افزارهای سه بعدی در جهت مشاهده سلول‌های تشکیل‌دهنده جدار عروق، ارتباطات بین سلولی و به ویژه اتصالات میوآندوتلیال را به صورت موضوعی جذاب در محور مطالعات دانشمندان هیستوفیزیولوژیست قرار داده است.

مطالعات کاملتر با تحلیل‌های تصویری پیشرفته (advance image analysis) و متدهای میکروسکوپی ما را قادر می‌سازند تا در آینده به تعداد سلول‌ها، سازماندهی، مکان‌ها و امکانات تغییرات (viability) دست یابیم. جزئیات مقایسه‌های سه بعدی میان شرایین طبیعی (Normotensive) و شرایین تحت فشارخون مزمن (Hypertensive) می‌تواند دیدگاه‌هایی در رابطه با تاثیر ساختار و عمل بر روی یکدیگر فراهم نماید. اطلاعات حاصل تصاویر LSCM می‌تواند برای بیان مدل نویسی ساختار عروقی به کار رود. مسلماً هدف نهایی از پیدایش و استفاده از این مدل‌ها و فرمول‌های ریاضی، توصیف نحوه قرار گرفتن سلول‌های عضلانی صاف در ساختار عروقی می‌باشد. در حال حاضر ما



در عین طبیعی بودن تراکم و تعداد این دریچه‌ها آشکار ساخت (۳).

این مطالعه همچنین وجود دیواره‌های ضخیمتر با خاصیت ارتجاعی اندک را در موش‌های با فشارخون بالا در مقایسه با موش‌های نرمال نشان داد که در برابر فشارخون بسختی متسع گردیده و خود کاهش بارز رشته‌های الاستیک دیواره رگ‌خونی را با روش اثر تخریبی آنزیم الاستاز به خصوص در ساختار تیغه ارتجاعی داخلی موش‌های با فشارخون بالا نمایان می‌سازد (۳).

این موضوعات موید نقش محوری تیغه ارتجاعی داخلی در تهیه ساختار مهندسی شرایین مقاوم محیطی (Peripheral Resistance Arteries) و بالطبع آن اتصالات سلول‌های عضلانی صاف به یکدیگر و به سلول‌های آندوتلیال در طرفین این تیغه و مکان‌یابی (geometry) و در نهایت تعیین حجم لومن و میزان انقباض شریان در مقابله با شرایط استرس و افزایش فشارخون است.

## References

1. Barker SGE, Tilling LC, Miller GC, Beesley JE, Fleetwood G, Stavri GT, Baskerville PA & Martin JF. The adventitia and atherogenesis: removal initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of a 'neoadventitia'. *Atherosclerosis* 1994; 105: 131-144.
2. Arribas SM, Hillier C, Gonzalez C, McGrory S, Dominiczak AF & McGrath JC. Cellular aspects of vascular remodelling in hypertension revealed by confocal microscopy. *Hypertension* 1997; 30: 1455-1464.
3. Briones AM, Gonzales JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, Gonzalez MC, McGrath JC & Arribas SM. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol* 2003; 552: 185-195.
4. Hungerford JE & Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell; building the multi-layered vessel wall. *J Vasc Res* 1999; 36: 2-27.
5. McGrath JC & Daly CJ. Imaging adrenergic receptors and their function. the use of fluorescent ligands and receptors to visualize adrenergic receptors. In *The Adrenergic Receptors in the 21<sup>st</sup> Century*. ed. Perez DM, Humana Press, NJ. (2005)

عمل سلول‌های آندوتلیال (endothelial dysfunctions) را در پی داشته باشد (۱۲).

از مدت‌ها پیش مشخص شده است که سلول‌های آندوتلیال (انتیما) و سلول‌های عضلانی صاف به واسطه یک لوله موج و محکم بنام تیغه ارتجاعی داخلی از یکدیگر جدا شده‌اند. سلول‌های دو لایه انتیما و مدیا در طرفین تیغه ارتجاعی داخلی چسبیده‌اند و تنها ارتباطات می‌تواند از طریق روزنه‌های کوچک تعبیه شده در این تیغه صورت پذیرد. با این وجود، اهمیت نقش ساختاری تیغه ارتجاعی داخلی تا زمانی که مشاهدات سه بعدی میکروسکوپ‌های کونفوکال، خصوصیات بیوفیزیکی این تیغه را نمایان ساخت پوشیده ماند. در این رابطه مقایسه موش‌های دستکاری ژنتیکی شده با فشارخون مزمن بالا با موش‌های نرمال، وسعت کمتر پنجره‌های تیغه ارتجاعی داخلی (حدود یک سوم حالت نرمال) را

6. Miquel MR, Segura V, Ali Z, D'Ocon MP, McGrath JC & Daly CJ. 3D image analysis of fluorescent drug binding. *Mol Imaging* (in press) 2004.
7. Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S & Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodelling. From innocent bystander to active participant. *Circ Res* 2001; 89: 1111-1121.
8. Carmeliet P & Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
9. Daly CJ, McGee A, Vila E, Briones A, Arribas SM, Pagakis S, Adler J, Merle A, Maddison J, Pedersen J & McGrath JC. Analysing the 3D structure of blood vessels using confocal microscopy. *Micros Anal (UK)* 2002; 92: 5-8.
10. Daly CJ & McGrath JC. Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacol Therapeut* 2003; 100: 101-118.
11. Erami C, Zhang H, Ho JG, French DM & Faber JE.  $\alpha_1$ -Adrenoceptor stimulation directly induces growth of the injured vascular wall in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1577-H1587.
12. Greensmith JE & Duling BR. Morphology of the constricted arteriolar wall: physiological implications. *Am J Phys* 1984; 247: H687-H698.
13. Mulvany MJ, Halpern W. "Mechanical properties of vascular smooth muscle in situ." *J Hypertens* 1976; 260: 617-619.
14. Mulvany MJ, Halpern W. "Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats." *Circ Res* 1977; 41: 19-25.
15. Daly CJ, Vila E, Arribas SM, Pagakis S, Thébault B, Maddison J, Pederson J & McGrath JC. 3-dimensional analysis of vascular structure, function & receptor distribution using confocal laser scanning microscopy. *Pharmacol Toxicol* 2000; 87 (suppl II): 10.
16. Gutterman DD. Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Phys* 1999; 277, H1265-H1272.
17. Kantachvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath JC, Kotelevtsev Y & Mullins JJ. Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals (2001). Differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem* 2001; 28(276)(39): 36727-36733.
18. Majid Malekzadeh Shafaroudi, Melissa McBride, Clare Deighan, Alexis Wokoma, Joyce Macmillan, Craig J. Daly, and Ian C McGrath; Two "knockout" mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via  $\alpha_2A$ -adrenoceptors located on the endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 804-810.

19. John C. McGrath, Clare Deighan, Ana M. Briones, Majid Malekzadeh Shafaroudi, Melissa McBride, Jeremy Adler, Silvia M. Arribas, Elisabet Vila and Craig J. Daly New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol* 2005; 90(4): 469-475.
20. Padiani JD, Colston JF, Caldwell D, Milligan G, Daly CJ & McGrath JC.  $\beta$ -arrestin dependent spontaneous  $\alpha_{1a}$ -adrenoceptor endocytosis causes intracellular transportation of  $\alpha$ -blockers via recycling compartments. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 992-1004.

Archive of SID