

# بررسی ارتباط اتصالات میواندوتیال، میان سلول‌های آندوتیال و نظم مارپیچی سلول‌های عضلانی صاف جدار شرایین توزیع کننده [عضلانی]

\*\*\* (Ph.D.) جوماریا گونزالس

\*\* (Ph.D.) جان بی مک گراس

+ مجید ملک زاده شفارودی

\*\*\*\*\* (Ph.D.) کرگ دلی

\*\*\*\* (Ph.D.) سیلویاماریا آربیاس

## چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** تعداد دوازده موش وحشی (Wild Type-WT) تحت آزمایشات قرار گرفتند. پس از بیهوش کردن حیوان با  $\text{CO}_2$  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 دی‌اکسید کربن (95/5%) در محلول کربس، توسط LSCM با استفاده از رنگ آمیزی فلورورست هسته‌ای (Syto13) / تحت موج لیزر آرگون یونیزه (488nm و DIO 543nm/580nm) لیپوفیلیک / تحت موج لیزر آرگون یونیزه 484nm/501nm برای کانال سبز و موج لیزر آرگون - هلیوم 543nm/580nm برای کانال قرمز مورد مطالعه قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** تصاویر کامپیوتربی سه بعدی تهیه شده از لایه‌های مختلف جدار شرایین با کمک لیزر، مؤید نظم مارپیچی (Helical) عضلات صاف در ارتباط با سلول‌های آندوتیال بودند. تصاویر تهیه شده از سلول‌های آندوتیال و عضلات صاف در طرفین تیغه ارتجاعی داخلی (IEM) موید وجود اتصالات سلولی Myoendothelial Connections ماین این سلول‌ها بود که از نظم مارپیچی سلول‌های عضلانی صاف در رابطه با آندوتیلیوم متابعت می‌کرد.

**استنتاج:** اهمیت حفظ اتصالات محکم بین سلولی نظیر اتصالات میان آندوتیال هنگام انقباض و یا انبساط عروقی و شکل‌گیری دوباره آنها طی فرآیند بازسازی مخصوص در فشارخون بالا که ممکن است نسبت ایجاد گسترشی‌هایی در این نوع از اتصالات گردد؛ در ک جدیدی از مدل فیزیولوژیکی و دینامیک طبیعی عروق خونی در یک مدل سه بعدی (3D) ارائه می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** اتصالات میان آندوتیال، بازسازی عروقی، شریان مزانتریک، تیغه ارتجاعی داخلی، رنگ آمیزی فلورورست

E-mail: Malek1344@gmail.com

+ مولف مسئول: دکتر مجید ملک زاده شفارودی- ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی

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

\*\*\* پروفسور فیزیولوژی اتونومیک، دانشگاه استکهلم سوئد

\*\* پروفسور فیزیولوژی اتونومیک، دانشگاه گلاسکو- انگلستان

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

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

\*\*\*\* تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۱/۱۹ تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۲۲

## مقدمه

حالت هر سلول عضلانی صاف زاویه‌ای معادل  $\pm 10^\circ$  در این سازماندهی مارپیچی را با استفاده از دستگاه سلول‌های عضلانی به نمایش می‌گذارد(۷،۵). عملاین 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 آرتربیول‌ها، طول یک‌صد و پنجاه میکرونی هر فیبر عضله صاف به همراه قطر کوچک آرتربیول 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،۱۰).

دانش ما در زمینه شناخت ساختار عروقی به طور بنیادی بر تصاویر دو بعدی بافت شناسی 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 (ناظیر GPS در مکان‌یابی زمینی از طریق کاربرد ماهواره‌های فضایی) وجود نداشت. امروزه، پیشرفت فن آوری (technology) و بکارگیری روش‌های جدید تصویربرداری سه بعدی به کمک اسکن لیزری

عروق خونی شامل شرایین و وریدهای، از دیدگاه بافت‌شناسی ساختاری سه لایه دارند که از داخل به خارج لایه انتیما (Intima)، شامل ردیفی از سلول‌های آندوتیلیوم که داخلی‌ترین سطح عروق را به صورت سنگفرشی پوشش داده و توسط بافت‌همبند 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 هرچه از قلب فاصله می‌گیرند، عضلات صاف بیشتر و از طبقات الاستیکی کاسته می‌گردد و آدواتیس (Adventitia) خارجی ترین 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 غیرمنتظره‌ای با افزایش دانسیته سلول‌های آدواتیسی و کاهش دانسیته سلول‌های عضلانی صاف در دیواره عروقی روبرو هستیم(۱۴). این اطلاعات نقش هدایت کنندگی سلول‌های آدواتیسی رگ خونی را در بازسازی عروقی و دیگر تغییرات همراه آن آشکار می‌نماید(۶،۵).

در شرایین توزیع کننده عضلانی (resistance or distributing arteries) لایه سلول عضلانی به دور لومن وسیع تری

(intact vessels) را در حالت زنده تهیه نمود. در این صورت با انتقال اطلاعات دیجیتالی فراهم شده به محیط یک نرم افزار کامپیوتربی مخصوص آنالیز تصاویر سه بعدی (image analysis software) نظری Imaris, Metamorph or Amira قادر به ایجاد تصاویر سه بعدی با کمک مشخصه‌های رسپتوری 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 نظری دانسته رسپتورهای سلولی کسب نمود. همچنین مقایسه‌های کمی (quantitative comparison) در مقایسه با عروق شاهد با احتساب تعداد و دانسته 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 جهت گیری سلول‌ها به سادگی از طریق مشاهده هسته‌های آنها در جدار شرایین قابل محاسبه است. علاوه بر نظم ترتیب سلولی مقایسه میان عروق سالم و پیمار نیز امکان پذیر است (۱۹، ۱۸، ۶).

#### تصویربرداری لیزری:

جهت تصویربرداری لایه لایه از کونفوکال میکروسکوپ Biorad 1024 & Radiance 2100 X40 oil immersion استفاده شد. بزرگنمایی objective lens ۱.۵ و روزنہ معادل ۱.۵ pixels = ۵۱۲\*۵۱۲ با Pinhole setting = ۱.۵

کونفوکال میکروسکوپی و استفاده از نرم افزارهای پیشرفته پرورش تصاویر خام لیزری که از ۱۹۹۸ میلادی در تکامل تدریجی آنها پژوهش‌های علمی بسیاری به انجام رسیده است بر نقش آفرینی‌های تازه برای سلول‌های آدوانسیسی (adventitial cells) و سلول‌های آندوتیال (endothelial cells) در حفظ، رشد، ترمیم و بازسازی عروق تاکید دارد (۱۳۱۱، ۹، ۸، ۱).

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 شرایین و تنوع (cellular heterogeneity) و نظم انواع سلول‌های موجود اندامه و چگونگی ارتباط میان آنها در لایه‌های مختلف جدار شرایین 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 کامپیوتربی در دهه هفتاد میلادی و تکامل آن طی سه دهه، در کنار ابداع شیوه کونفوکال در مطالعات میکروسکوپی منجر به تلفیق تکنیک‌های تولید لیزرهای ویژه، کنترل اسکینینگ لیزری و کونفوکال همراه با تولید نرم افزارهای ویژه قابل انطباق با مایکروسافت ویندوز و یا لینوکس Laser Sharp, Metamorph, Imaris, Amira: نظری: امکان ابداع تکنیک لیزر اسکینینگ کونفوکال میکروسکوپی (Laser Scanning Confocal Microscopy- LSCM) را فراهم آورد.

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

دادن رگخونی منطبق بر شرایط نرمال در دامنه تغیرات طبیعی فشار خون می‌توان سود جست. از جدیدترین روش‌های مطالعه ساختار مورفولوژیکی عروق استفاده همزمان میوگرافی تحت فشار و میکروسکوپی لیزری لایه لایه موسم به LSCM می‌باشد. در این روش حتی جزئیات سلولی (ممبران و اورگانل‌ها) در کنار مکان‌یابی نیز قابل روئیت 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 کشن 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 (۱۵تا ۱۳).

#### آماده سازی باقمی:

پس از بیهوش کردن حیوان با  $\text{CO}_2$  قطعات دو تا سه میلی‌متری از رگخونی زنده (شرایین مزانتریک) در دمای آزمایشگاهی (۲۲ درجه سانتیگراد) از جدار شرایین جدا و از بافت چربی پاکسازی گردیده و در دستگاه perfusion myograph مخلوطی از اکسیژن و دی‌اکسید کربن (95/5%) در محلول کربس، توسط LSCM با استفاده از رنگ آمیزی فلوئورستن هسته‌ای (Syto13-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) و (DIO 1 $\mu\text{M}$ ) فرآوری شده در مدت زمان معین آغشته می‌شوند و لیپوفیلیک در حسب نوع ترکیبات فلورستن بدون شستشو و یا پس از شستشوی تحت موج لیزر ارگون یونیزه (488nm/515nm) برای کanal آبی / تحت موج لیزر آرگون یونیزه (484nm/501nm) برای کanal سبز و موج لیزر آرگون-هیلیوم (543nm/580nm) برای کanal قرمز مورد مطالعه قرار گرفتند. اسکن‌های با ضخامت ۰.۳ $\mu\text{m}$  از رگ‌های خونی مورد مطالعه به تعداد ۶۴ برش از سه

مربعی به ابعاد ۲۸۹ $\mu\text{m} \times 289\mu\text{m}$  پوشش می‌داد، استفاده گردید.

به طور کلی دو روش بررسی اسکن‌های کونفوکال لیزری معمول است.

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

میکروسکوپی لیزری با دهانه روزنی‌ای شکل (Pinhole LSCM) که تصاویری واضح‌تر با رزوولشن بالاتر و حدود مشخص‌تر پدید می‌آورد که نیاز به اصلاحات کامپیوتوی کمتری دارد و در آن جزئیات مکانی ترکیبات فلوئورستن مشخص‌تر می‌باشد (۱۶، ۱۷، ۱۹، ۲۰).

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

در این شیوه از مطالعه عروقی با استقرار رگخونی در حوضچه‌های ۵-۵ میلی‌لیتری مجهر به دمنده‌های اکسیژن و دی‌اکسید کربن به نسبت ۹۵ به ۵ درصد و ایجاد کشش اولیه منطبق با قطر لومن رگخونی در حالی که یکی از محورهای کششی ثابت و دیگری به یک ترانسدیوس (Transducer) متصل به کامپیوتوی مجهر 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

## یافته ها

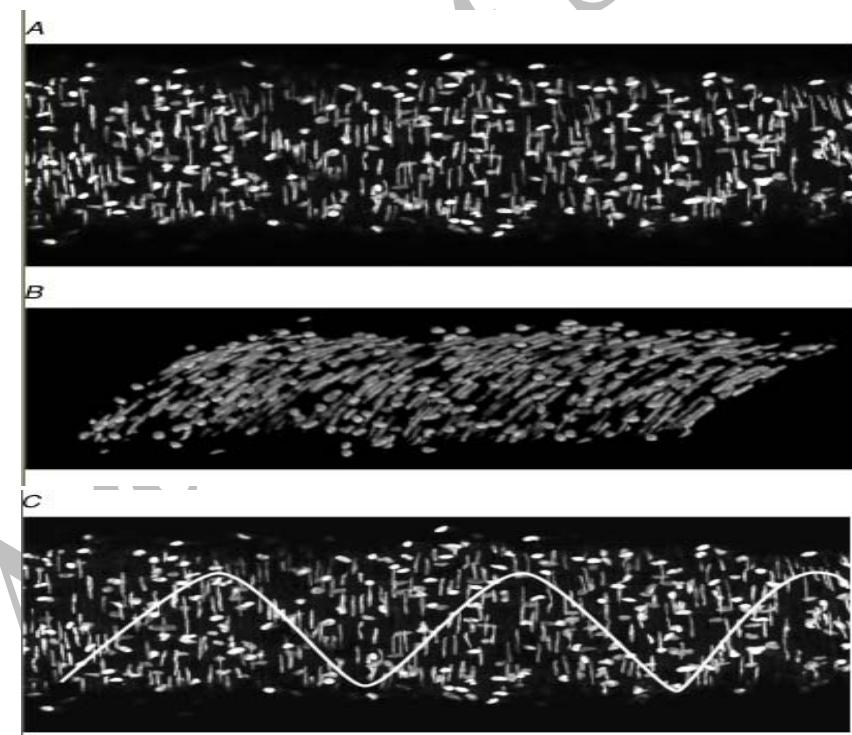
با استفاده از متدهای تحلیل اطلاعات تصویری (Image Analysis Methods-IAM) در مطالعه بر روی شرایین مزانتریک می‌توان به اطلاعات زیر بر روی تصاویر حاصله دست یافت:

۱- هسته‌های سیگاری شکل سلول‌های عضلانی صاف عمود بر محور جریان خون بگونه‌ای دیده می‌شوند که سلول‌های هر لایه عضلانی با سلول‌های هر لایه مجاور در عین همپوشانی زاویه ۱۰ درجه را نسبت به محور جریان خون پدید می‌آورند (تصویر شماره ۱).

لایه آدانسیس، مدیا و انتیما بدقت اندازه‌گیری و مکان سلول‌های هر لایه و جهت‌گیری محور طولی سلول‌ها مشخص شد (۲۰ تا ۷۷ تا ۱۸۵).<sup>۱</sup>

### تحلیل و تفسیر تصاویر حاصل از LSCM

حجم سه بعدی از تصاویر کسب شده در محیط نرم‌افزار Metamorph (version 4.2) به صورت فایل‌های Tiff به نرم‌افزارهای Imaris (version 3.2) و Amira (TGS, version 3.2) 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 فلئورستن هسته‌ای (Syto13; 1µg/ml)<sup>۱</sup> با لیزر آرگون در طول موج 488nm تهییج شده است. درین حالت هسته‌های هر سه نوع سلول موجود در جدار عروق خونی قابل روئیت هستند. هسته دوکی شکل سلول‌های عضلانی صاف به طور عمودی و هسته سلول‌های آدانسیسی کروی با حدود نامنظم و روشن و هسته آندوتیال کمی درشت تر و روشن و عمدتاً محور طولی آنها در جهت جریان خون و به موازات محور طولی رگ خونی دیده می‌شوند. A- هر سه نوع سلول در کنار یکدیگر. B- تصویر حجمی سه بعدی طبیعی از میکروسکوپی کونفوکال که احنای شریان را نشان می‌دهد. C- تصویری که ماهیت مارپیچ طبیعی نظم سلول‌های عضلانی در رابطه با سلول‌های آندوتیال را مجسم می‌نماید.

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

۲- هسته‌های بیضوی روش سلول‌های آندوتیال کمی درشت‌تر و عمدتاً در جهت محور طولی رگ خونی و هم جهت با جریان خون نظم یافته‌اند (تصویر شماره ۱).

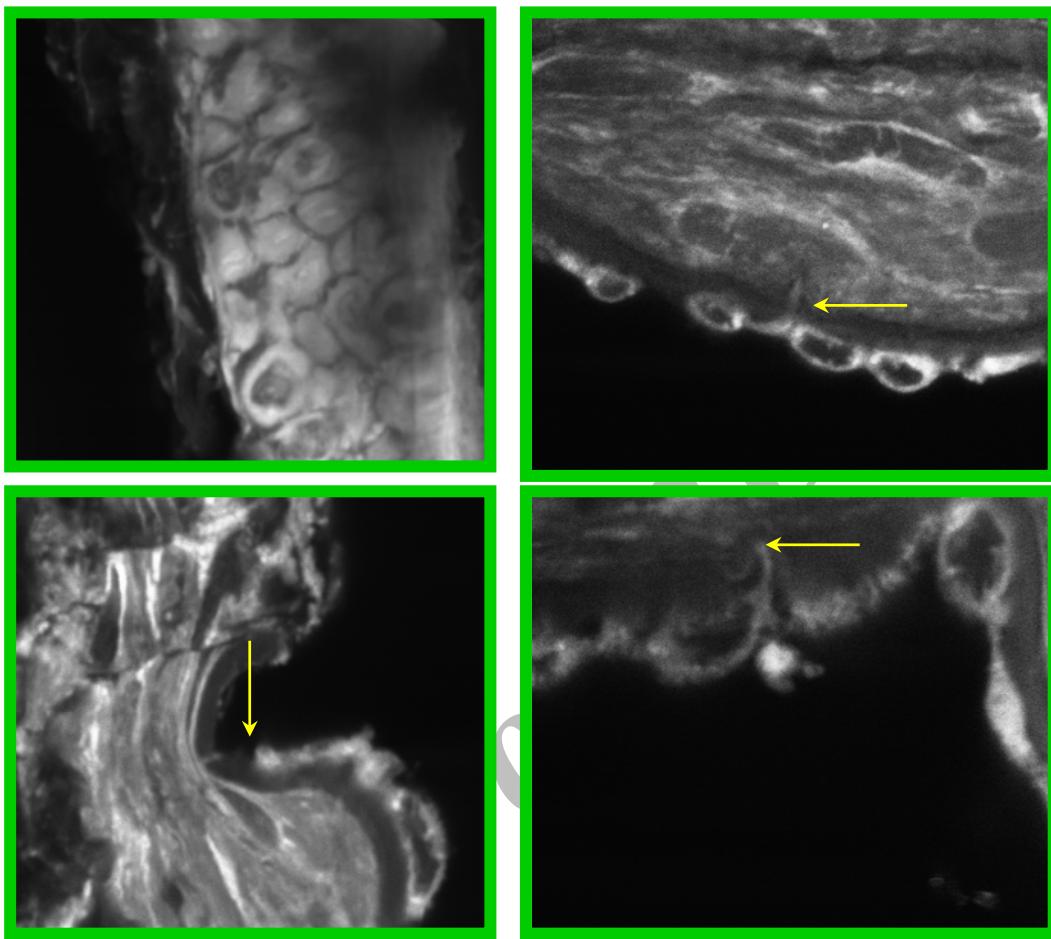
۳- هم‌مکانی هسته‌های سلول‌های آندوتیال و هسته‌های سلول‌های عضلانی صاف (Co-location or Overlapping) نشان داده شده است که ماهیت مارپیچ طبیعی نظم سلول‌های عضلانی در رابطه با سلول‌های آندوتیال را مجسم می‌نماید (تصویر شماره ۱-C).

۴- وجود تیغه ارجاعی داخلی (IEL) چین خورده در جدار شریان مزانتریک موش که بسیار ضخیم‌تر از تیغه ارجاعی خارجی (EEL) است و لایه‌مدیابی عضلانی را از انتیمال آندوتیالی جدامی نماید با کمک رنگ‌آمیزی فلوئورسنت مشخص شده است (تصویر شماره ۲).

۵- همچنین وجود ارتباط میان سلول‌های آندوتیال تشکیل‌دهنده رگ‌های خونی نرمال و سلول‌های عضلانی



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



تصویر شماره ۳: اتصالات میوآندولیال از طریق منفذ تیغه ارتجاعی داخلی میان سلول‌های آندولیال و سلول‌های عضلانی صاف در شریان مزانتریک بیل زده اند. نمونه‌های بافتی با DIOC<sub>18</sub> (1μM) برای مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد رنگ آمیزی شده اند و سپس با عدسی ابجکتیو Oil 40x با دقت تصویری 0.02-0.04 μ / Pixel 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 آندولیالی که نقش تعذیه‌ای و کنترل کننده بر روی فیبرهای عضلانی صاف لایه‌های زیرین دارند نیز از طریق این اتصالات اجتناب ناپذیر است. تیغه ارتجاعی داخلی نه تنها سلول‌های آندولیال را از سلول‌های عضلانی صاف جدا می‌نماید بلکه به عنوان یک ساختار متغیر (Changeable) و غیر ثابت

انطباق تصاویر سه بعدی سلول‌های آندولیال استطلاع‌دار انتیما، اتصال یافته به سلول‌های عضلانی صاف لایه مدبایی زیرین از طریق عبور از تیغه ارتجاعی داخلی، تبعیت اتصالات میوآندولیال را از سازماندهی مارپیچی سلول‌های عضلانی صاف مدبای آشکار می‌نماید. از مشاهدات سه بعدی این تحقیق اینچنان به نظر می‌رسد که ارتباطات میان سلول‌های آندولیال و سلول‌های عضلانی صاف از طریق اتصالات میوآندولیال و الگوی قرارگرفتن سلول‌های آندولیال نوعی موzaic می‌باشد.

نمی‌دانیم که چه تعداد از سلول‌های عضلانی صاف در جدار شرایین به طور تصادفی جهت‌گیری و چه تعداد از نظم مارپیچی ۱۰ درجه تعیت 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 (فسار خون، سن، بیماری‌ها، نحوه تغذیه و استرس) نظیر دیگر بافت‌های بدن دائماً در جریان است. اتصالات محکم بین سلولی هنگام remodelling عروقی می‌باشد گسته 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 ارگانیسم به مقدار کافی با شرایط تغییر یافته تطابق نمی‌یابد. در این حالت ممکن است گستستگی‌ها در انواع اتصالات بین سلولی و منجمله میوآندوتیال رخ دهد که خود عواقبی را به دنبال دارد. این موضوعات در کتاب 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 ارجاعی داخلی سلول‌های آندوتیال 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 میوآندوتیال هدایت نموده و نهایتاً عمل رگ خونی را کنترل می‌نمایند.

در طی فرآیند عروق‌زایی (angiogenesis or vasculogenesis) اجداد سلول‌های آندوتیال موسوم به angioblast ابتدا مکان‌هایی را جهت پیدایش لوله‌های آندوتیال (endothelial tubes) فراهم می‌نمایند. سپس myoblasts اجداد سلول‌های صاف موسوم به میوبلاست‌ها تمایل می‌باشد تا بدور این لوله‌های آندوتیالی خویش را پهنه نمایند. به همین جهت از مراحل ابتدایی شکل‌گیری رگ خونی، ارتباط فیزیکی در جهت ایجاد کنش (physical interactions) متقابل بین دو نوع سلول 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 میوآندوتیال را به صورت موضوعی جذاب در محور مطالعات دانشمندان هیستوفیزیولوژیست قرار داده است.

مطالعات کاملتر با تحلیل‌های تصویری پیشرفته (advance image analysis) و متدی‌های 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 اثربخشی آنژیم 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 آندوتیال 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.

عمل سلول‌های آندوتیال (endothelial dysfunctions) را دربی داشته باشد(۱۲).

از مدت‌ها پیش مشخص شده است که سلول‌های آندوتیال (انتیما) و سلول‌های عضلانی صاف به واسطه یک لوله مواج 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 می‌توانند از طریق روزنه‌های کوچک تعییه 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

## References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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)

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, Faggin 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. Guterman DD. Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Phys* 1999; 277, H1265-H1272.
17. Kantachuvesiri 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 a2A-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. Pediani JD, Colston JF, Caldwell D, Milligan G, Daly CJ & McGrath JC.  $\beta$ -arrestin dependent spontaneous  $\alpha_{1\alpha}$ -adrenoceptor endocytosis causes intracellular transportation of  $\alpha$ -blockers via recycling compartments. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 992-1004.

Archive of SID