

بررسی ارتباطات میوآندوتلیال، میان سلول های آندوتلیال و نظم مارپیچی سلولهای عضلانی صاف جدار شرایین توزیع کننده (عضلانی)

مجید ملک زاده شفارودی⁺ (Ph.D.) * جان بی مک گراس^{**} (Ph.D.) جوماریا گونزالس^{***} (Ph.D.)
سیلویاماریا آریباس^{****} (Ph.D.) کرگ دلی^{*****} (Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف: نظم مهندسی جدار شرایین براساس ترتیب قرار گرفتن سلول های آندوتلیال، عضلانی صاف و آدوانتیس در طرفین تیغه ارتجاعی داخلی می باشد. پژوهش های اخیر بر نقش مهم سلول های آدوانتیس و آندوتلیال 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 سلول ها 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 سلول های آندوتلیال با خون در جریان بستگی دارد. تحقیقات اخیر ارائه شده در این مقاله سعی در پاسخگویی به سوالات بنیادی درباره تنوع و نظم انواع سلول های 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 CO₂ قطعاتی زنده از جدار شرایین مزانتربیک 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 کربس، توسط LSCM با استفاده از رنگ آمیزی فلوئورسنت هسته ای (Syto13) / تحت موج لیزر آرگون یونیزه 488nm و DIO لیپوفلیک / 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 سلول های آندوتلیال بودند. تصاویر تهیه شده از سلول های آندوتلیال و عضلات صاف در طرفین تیغه ارتجاعی داخلی (IEM) موید وجود ارتباطات سلولی Myoendothelial Connections مابین این سلول ها بود که از نظم مارپیچی سلول های عضلانی صاف در رابطه با آندوتلیوم متابعت می کرد.

استنتاج: اهمیت حفظ ارتباطات محکم بین سلولی نظیر ارتباطات میوآندوتلیال 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 میوآندوتلیال، بازسازی عروقی، شریان مزانتربیک، تیغه ارتجاعی داخلی، رنگ آمیزی فلوئورسنت

E-mail: Malek1344@gmail.com

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

* دکترای تخصصی بافت شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران

***پروفسور فیزیولوژی، دانشگاه استکهلم سوئد

**پروفسور فیزیولوژی اتونومیک، دانشگاه گلاسگو - انگلستان

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

***دکترای تخصصی، پژوهشگر دانشگاه گلاسگو - انگلستان

تاریخ تصویب: ۸۶/۳/۲۲

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۱

مقدمه

عروق خونی شامل شراین 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 هرچه 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 ۱۴). این اطلاعات نقش هدایت‌کنندگی سلول‌های آدوانتیزی رگ خونی را در بازسازی عروقی و دیگر تغییرات همراه آن آشکار می‌نماید (۵ تا ۶).

در شراین 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 شراین 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 ۷).

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

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

ارتباطات میان انواع سلول های 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 روش های مدرن نگاهی دوباره به ساختمان شرایین و تنوع (cellular heterogeneity) و نظم انواع سلول های موجود انداخته و چگونگی ارتباط میان آنها در لایه های مختلف جدار شرایین را مورد بررسی دقیق قرار دهد.

مواد و روش ها

لیزر میکروسکوپی:

استفاده از نور پلاریزه (لیزر) با شدت های 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 تکنیک های تولید لیزرهای ویژه، کنترل اسکنینگ 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 اسکنینگ کونفو کال میکروسکوپی (Laser Scanning Confocal Microscopy- LSCM) را فراهم آورد.

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

(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 مشخصه های رستوری سلول های تشکیل دهنده ساختار رگ خونی هستیم که در آن موقعیت هر نوع سلول را به طور اتوماتیک می توان ردیابی و به صورت Isosurface نمایان کرد. اطلاعات بیشتری را نیز می توان با کمک مکان (position) ابعاد (dimensions) و مشخصات (characteristics) وابسته به شدت سیگنال های دریافتی نظیر دانسیته رستورهای سلولی کسب نمود. همچنین مقایسه های کمی (quantitative comparison) در مقایسه با عروق شاهد با احتساب تعداد و دانسیته سیگنال ها می تواند تحقق یابد. یک روش خوب و ساده برای تفکیک انواع سلول های جدار رگ خونی مطالعه هسته های سلولی است که به راحتی از یکدیگر قابل تفکیک بوده و ارتباط تنگاتنگی با شکل سلول ها دارند. لذا رنگ آمیزی هسته های سلولی به ما اجازه آنالیز جداگانه انواع سلول های حاضر در جدار رگ را می دهد. به طوری که تعداد، مکان و جهت گیری سلول ها به سادگی از طریق مشاهده هسته های آنها در جدار شرایین قابل محاسبه است. علاوه بر نظم ترتیب سلولی مقایسه میان عروق سالم و بیمار نیز امکان پذیر است (۵،۶،۱۸،۱۹).

تصویر برداری لیزری:

جهت تصویربرداری لایه لایه از کونفو کال میکروسکوپ Biorad 1024 & Radiance 2100 استفاده شد. بزرگنمایی X40 oil immersion objective lens همراه با NA= 1 و روزنه معادل 1.5 (Pinhole setting= 1.5) با 512×512 Pixels که

مربعی به ابعاد $289\mu\text{m} \times 289\mu\text{m}$ 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 (۱۶، ۱۷، ۱۹، ۲۰).

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 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 CO_2 قطعات دو تا سه میلی‌متری از رگ‌خونی زنده (شرابین مزاتریک) در دمای آزمایشگاهی (۲۲ درجه سانتیگراد) از جدار شرابین 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 (Syto13-1μg/ml) و (DIO 1μM) لیپوفیلک 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

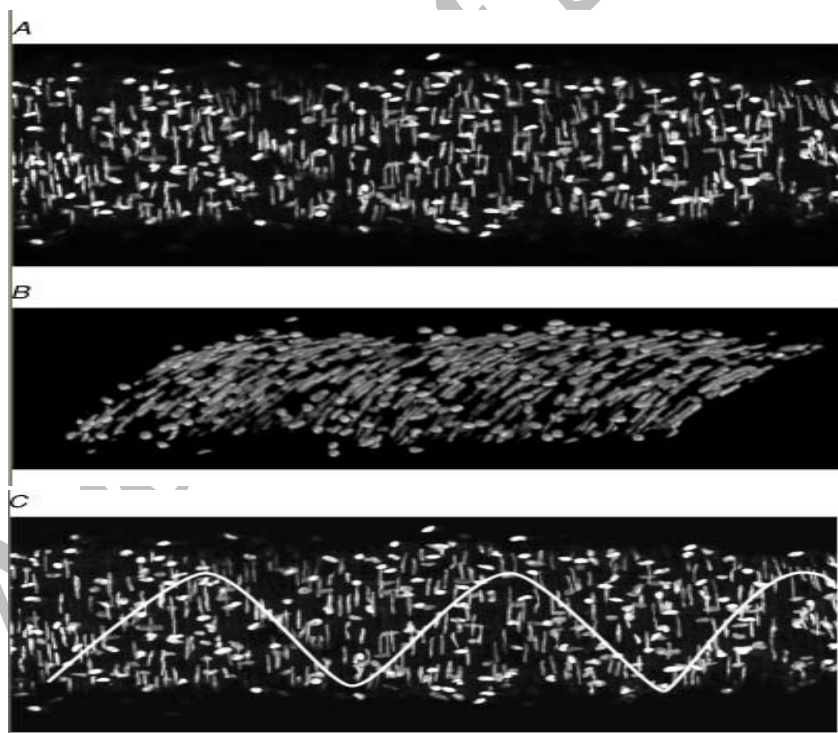
با استفاده از متدهای تحلیل اطلاعات تصویری (Image Analysis Methods-IAM) در مطالعه بر روی شرابین مزانتریک می توان به اطلاعات زیر بر روی تصاویر حاصله دست یافت:

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 (۱۸،۷ تا ۲۰).

تحلیل و تفسیر تصاویر حاصل از LSCM:

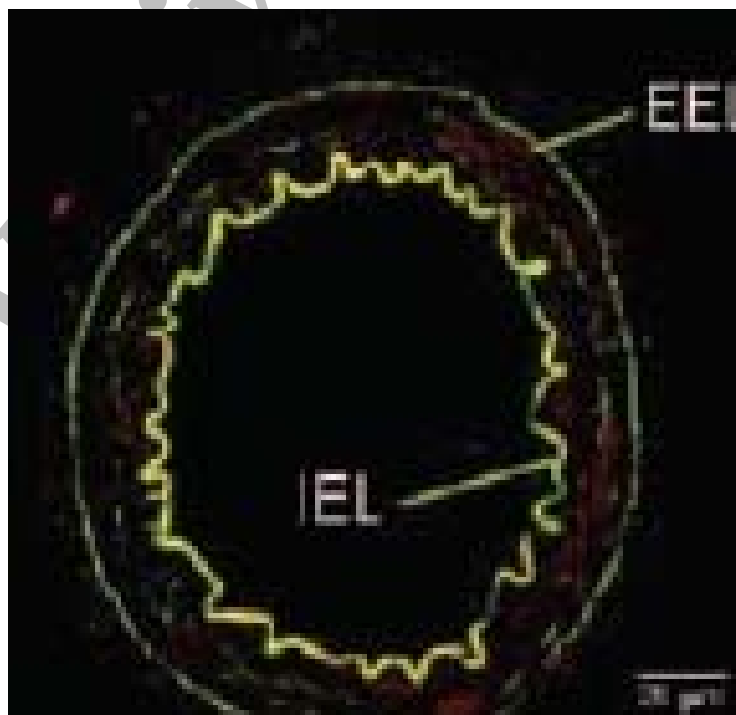
حجم سه بعدی از تصاویر کسب شده در محیط نرم افزار (version 4.2) Metamorph به صورت فایل های Tiff به نرم افزارهای (version 3.2) Imaris و (version 3.2) Amira (TGS) انتقال یافته و در محورهای XY, XZ & YZ مورد بررسی قرار گرفت.



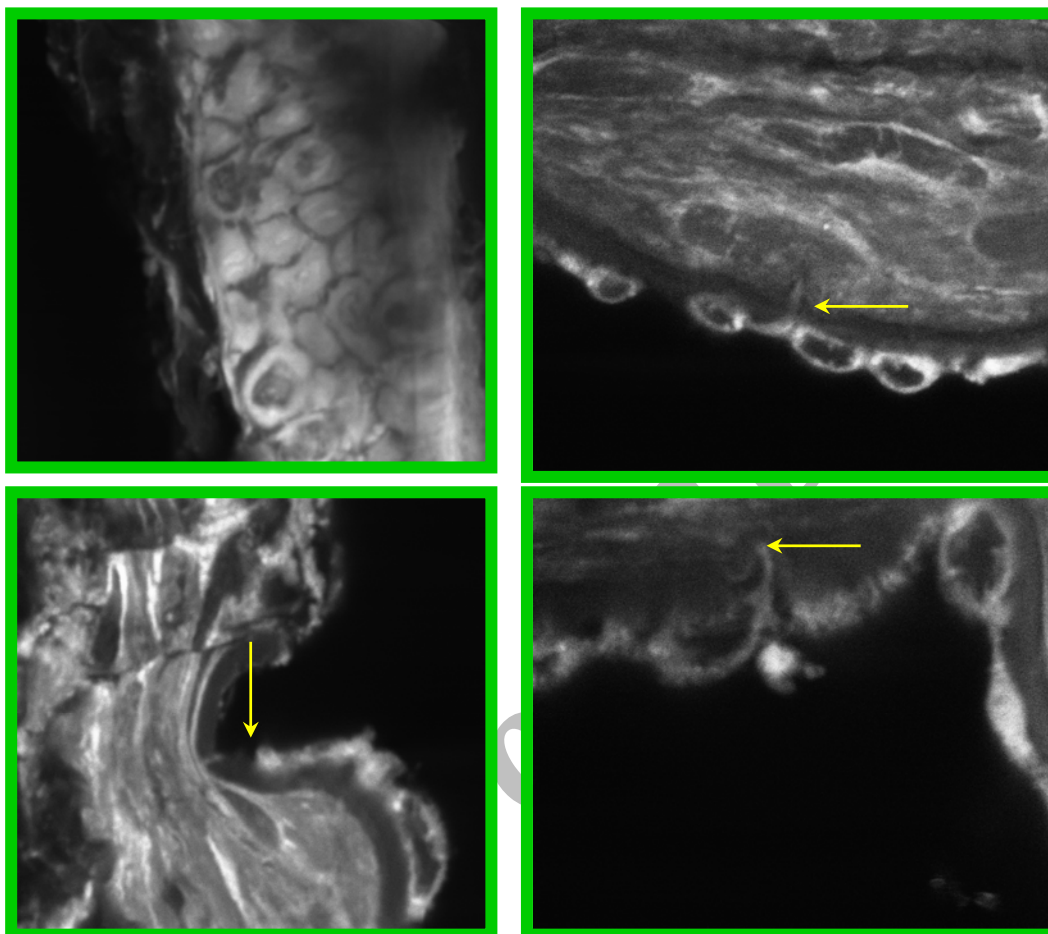
تصویر شماره ۱: رنگ آمیزی هسته در شرابین مزانتریک موش - تکه کاملی از رگ خونی در دستگاه میوگرافی تحت فشار 70mmHg تعبیه گردیده است. رنگ آمیزی فلوئورسنت هسته ای (Syto13; $1\mu\text{g/ml}^{-1}$) با لیزر آرگون در طول موج 488nm تهییج شده است. در این حالت هسته های هر سه نوع سلول موجود در جدار عروق خونی قابل 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 انحنا ی شرابین 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 فلوئورسنت 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 عمده‌تر 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 فلوئورسنت 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 مزانتريک پل زده اند. نمونه های بافتی با DIOC_{18} (1 μM) Excitation/Emission 484nm/501nm برای مدت دوساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد رنگ آمیزی شده اند و سپس با عدسی ابجکتیو x40 Oil با دقت تصویری $0.02\text{--}0.04 \mu / \text{Pixel}$ 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 انتمیاء، 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 قرار گرفتن سلول‌های آندوتلیال نوعی موزایسم

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

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 ارتباطات 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 شرابین طبیعی (Normotensive) و شرابین 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

نمی‌دانیم که چه تعداد از سلول‌های عضلانی صاف در جدار شرابین به طور تصادفی جهت‌گیری و چه تعداد از نظم مارپیچی 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 شرابین با توجه به تغییرات فیزیولوژیکی بدن موجود زنده (فشار خون، سن، بیماری‌ها، نحوه تغذیه و استرس) نظیر دیگر بافت‌های بدن دائماً در جریان است. ارتباطات محکم بین سلولی هنگام remodelling 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 ارتباطات 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

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

از مدت‌ها پیش مشخص شده است که سلول‌های آندوتلیال (انثیما) و سلول‌های عضلانی صاف به واسطه یک لوله موج و محکم بنام تیغه ارتجاعی داخلی از یکدیگر جدا شده‌اند. سلول‌های دو لایه انثیما 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

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 آنزیم الاستاز به‌خصوص 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 21st 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, 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. α_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. 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 α_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. β -arrestin dependent spontaneous α_{1a} -adrenoceptor endocytosis causes intracellular transportation of α -blockers via recycling compartments. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 992-1004.

Archive of SID