

Original Article

Study of Effects of Cyclic Tensile Loading on Morphology of Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line in Culture Medium

N. Haghighi Pour, M.Sc.¹, M. Tafazoli Shadpour, Ph.D.^{1‡}
M.A. Shokr Gozar, Ph.D.², S. Amini, M.Sc.¹

1. Biomechanic Department, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology (Tehran Polytechnic)

2. National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran

‡ Corresponding Address: P.O.Box: 15875-4413, Biomechanic Department, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology (Tehran Polytechnic), Tehran, Iran
Email: tafazoli@aut.ac.ir

Abstract

Received: 30/Apr/2007, Accepted: 21/Jul/2007

Objective: Endothelial cells are subjected to mechanical forces caused by pulsatile flow and pressure leading to hemodynamic shear stress and circumferential stress on endothelial layer. The study aimed at a quantitative evaluation of endothelial cell morphology by application of cyclic loading. Endothelial cells respond to applied loads with adaptation and remodeling. Such mechanisms are major determinants of the function of cardiovascular system.

Materials and Methods: A cyclic loading test device for cellular engineering was designed and manufactured to operate in wide ranges of applied strains, load frequencies and amplitudes, and stretch to release ratio. Human umbilical vein endothelial cells were cultured on a medical grade silicon membrane and the membrane was stretched inside an incubator with strain amplitudes of 10%-25% and test durations of 4-10 hours. Quantitative cellular morphological changes by cyclic loading were analyzed using designed image processing software.

Results: The results indicated marked changes in orientation of cells, from a random orientation to 70-80 degree alignments after loading. Endothelial cells elongated due to loading and the shape index (SI) decreased significantly.

Conclusion: It was concluded that morphology of endothelial cells is altered by cyclic loading: load amplitude and number of load cycles. The results may have applications in pathology of endothelial cells due to hypertension and in vascular remodeling following the effects of different loads on endothelial cells.

Keywords: Endothelial Cells, Cyclic Strain, Morphology, Orientation, Remodeling.

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages: 111-118

بررسی تاثیر بارگذاری کششی سیکلی بر مورفولوژی رده سلول‌های اندوتلیال ورید بندناف انسان در محیط کشت

نوشین حقیقی پور ¹M.Sc.، محمد تفضلی شادپور ²Ph.D.، محمدعلی شکرعزاز ³Ph.D.، سمیرا امینی ⁴M.Sc.

۱. دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومکانیک
۲. انیستیتو پاستور ایران، بانک سلول

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومکانیک

پست الکترونیک: [Email: tafazoli@aut.ac.ir](mailto:tafazoli@aut.ac.ir)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۲/۱۰، پذیرش مقاله: ۸۶/۴/۳۰

*** هدف:** ارزیابی کمی اثر بارگذاری سیکلی بر مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده
*** مواد و روش‌ها:** دستگاه تست بارگذاری سیکلی برای کاربردهای مهندسی سلولی و با قابلیت‌های تغییر در کرنش، فرکانس و تعداد سیکل بارگذاری و نسبت سرعت کشش به رهاسازی طراحی و ساخته شد. سلول‌های اندوتلیال ورید بندناف انسان بر روی غشای الاستیک سیلیکن گرید پزشکی کشت داده شده و در داخل انکوباتور توسط دستگاه فوق تحت بارگذاری قرار گرفتند. تغییرات کمی مورفولوژیکی سلول‌ها قبل و بعد از اعمال کرنش سیکلی با دامنه ۲۵-۱۰ درصد و زمان بارگذاری ۱۰-۴ ساعت از طریق نرم افزار طراحی شده پردازش تصویر مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفت.
*** یافته‌ها:** مشاهده شد که آرایش تصادفی سلول‌های اندوتلیال پس از اعمال بار سیکلی تغییر کرده و در جهت حداقل تغییر شکل ساختار سلول جهت گیری کرده‌اند که در محدوده بارگذاری این مطالعه، ۸۰-۷۰ درجه نسبت به راستای بارگذاری است. سلول‌های اندوتلیال پس از بارگذاری کشیده می‌شوند و در نتیجه شاخص شکل (SI) که معیاری برای کشیدگی است، کاهش می‌یابد.
*** نتیجه‌گیری:** مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال تحت بارگذاری سیکلی تغییر می‌کند به گونه‌ای که این تغییرات به صورت کمی وابسته به پارامترهای بارگذاری از جمله دامنه و زمان بارگذاری هستند. نتایج این بررسی در آسیب شناسی سلول‌های اندوتلیال ناشی از فشار خون بالا و در بازسازی عروقی ناشی از تغییرات بارگذاری‌های متفاوت بر سلول‌های اندوتلیال به دلیل موج‌های فشار خون متفاوت اهمیت می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: سلول اندوتلیال، کرنش سیکلی، مورفولوژی، جهت گیری، بازسازی

فصلنامه پزشکی پاکه، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات ۱۱۸-۱۱۹

مقدمه

سیکلی محیطی بر اثر پالس فشار خون و تنش برشی حاصل از جریان خون (۴-۶)۱. برای بررسی تأثیرات نیروهای مکانیکی بر سلول‌های اندوتلیال شریانی می‌توان آزمایش‌هایی را بر روی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده انجام داد. از جمله این آزمایش‌ها ایجاد کشش سیکلی بر روی سلول‌های کشت داده شده است. در سال‌های اخیر دستگاه‌های مختلفی برای آماده‌سازی محیط مکانیکی مشابه شرایط داخل بدن طراحی و ساخته شده‌اند و آزمایش‌های متفاوتی بر روی سلول‌های استخوانی و غضروفی علاوه بر سلول‌های اندوتلیال صورت گرفته است (۷-۱۰). تحقیقات نشان داده‌اند که با اعمال نیروهای مکانیکی، سلول‌های اندوتلیال همانند یک حسگر مکانیکی عمل می‌کند و متغیرهایی که در ارتباط با عملکرد سلولی هستند، تغییر می‌یابند. این متغیرهای سلولی عبارتند از: مورفولوژی و آرایش سلول، ساختار درونی سلول، خواص مکانیکی سلول، میزان و عملکرد ترکیبات پروتئینی سلول، تکثیر سلولی، خاصیت رنگ‌زایی، تنظیم قطر رگ، فعالیت کانال‌های یونی، مهاجرت سلولی، چسبندگی مواد به سلول‌ها و چسبندگی سلول‌ها به ماده زمینه‌ای (۱۱-۱۵)۱. شایان ذکر است که متغیرهای فوق مستقل

سلول‌های بدن به تحریکات مکانیکی تحت شرایط فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی پاسخ می‌دهند. بررسی اثرات محیط فیزیکی و نیروهای مکانیکی بر عملکرد سلولی یکی از شاخه‌های مهم مهندسی بافت است. سلول‌های اندوتلیال، داخلی‌ترین لایه عروق را تشکیل داده و در مجاورت خون تحت تاثیر نیروهای مکانیکی حاصل از جریان خون و پالس فشار خون قرار دارند. لایه سلولی اندوتلیال سدی طبیعی در برابر فاکتورهای خونی است. یک غشای نفوذی انتخابی برای انتقال مواد غذایی و سایر اجزای حیاتی به دیواره شریان نیز به حساب می‌آید. اگرچه این سلول‌ها نقش مستقیم در خواص مکانیکی دیواره شریان‌ها ندارند، ولی نیروهای مکانیکی حاصل از جریان خون و پالس فشار خون می‌توانند به این سلول‌ها آسیب برسانند و در نتیجه باعث ورود فاکتورهای خونی ناخواسته، تغییر هندسی و الاستیسیته دیواره شریان و نتایج بالینی از قبیل ضایعات و پلاک‌های آترواسکلوئوسیس شوند که در دراز مدت به گرفتگی شریانی، شکست پلاک و تبعات وخیم کلینیکی از جمله ایست قلبی می‌انجامد که بالاترین عامل مرگ و میر در جهان است (۱-۳)۱. محیط مکانیکی سلول‌های اندوتلیال عبارت است از: تنش

کشش سیکلی بر مورفولوژی سلول های اندوتلیال

این دستگاه قابلیت اعمال کرنش محوری همگن و یکنواخت در شرایط استاتیکی و دینامیکی به سلول های رشد داده شده بر غشای مناسب الاستیک و همچنین بافت نرم را دارا است. دستگاه تست، قادر به تغییر فرکانس بارگذاری، دامنه کشش و نسبت سرعت کشش به سرعت رهاسازی غشا در محدوده وسیعی است. طراحی ساختاری دستگاه به گونه ای بوده است که اجازه عملکرد آن را در آنکوباتور می دهد تا همواره شرایط محیطی لازم برای بقای سلول ها (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، CO₂ ۵ درصد و رطوبت کافی) مهیا باشد. غشا در حین تست حرکت عمودی ندارد و در نتیجه مشاهده میکروسکوپی آن در حین کشش دینامیکی امکان پذیر است. تنش برشی حاصل از حرکت سیال بر سطح سلول ها بسیار کم تخمین زده شده و بار اعمالی با تخمین مناسبی کشش کامل در جهات اصلی است (۹، ۱۷).

دستگاه تست کرنش سیکلی در شکل ۱ نشان داده شده است. دستگاه شامل سه قسمت اساسی است: واحد الکترونیک، قسمت متحرک و قسمت ثابت.

واحد الکترونیک شامل

Stepper Motor Driver (Autonix)، PLC+HMI (LG Industrial System) منبع تغذیه [Power Supply (Siemens)] است. دستگاه، توانایی اتصال به کامپیوتر و ثبت پارامترها را در حین تست از طریق طراحی برنامه خاصی در نرم افزار لب ویو (Labview) دارا است.

قسمت متحرک شامل استپر موتور (Stepper Motor (Autonix)، پیچ بالاسکرو (Ball screw (TBI))، انکودر (encoder (Autonix))، میله رابط و فک متحرک است. قسمت ثابت، گیره ای آلومینیومی است که در تانک دستگاه تست ثابت شده است. این فک یک طرف غشا را به صورت ثابت می گیرد به گونه ای که طرف دیگر غشا توسط فک متحرک کشیده می شود.

استپر موتور، پیچ بالاسکرو را حرکت می دهد و متعاقباً میله رابط و فک متحرک حرکت داده می شوند. هنگامی که گیره متحرک به راست و چپ حرکت کند، غشا و سلول های کشت داده شده بر آن کشیده و رها می شوند و در نتیجه کرنش سیکلی بر آنها اعمال می شود. حرکت توسط دو بلبرینگ خطی هدایت می شود و با در نظر گرفتن گام پیچ بالاسکرو، انکودر کورس حرکت را اندازه گیری و کنترل می کند. استفاده از استپر موتور، پیچ بالاسکرو و انکودر به عنوان مولد حرکت، عامل انتقال حرکت و کنترل کننده حرکت، دقت دستگاه را در اعمال میزان کرنش مورد نظر به ۰/۰۱ میلی متر می رساند. تانک دستگاه از جنس پلکسی گلس (Plexiglas) است که مشاهده نمونه را در حین تست آسان می سازد.

کشت سلولی

سلول های اندوتلیال ورید بندناف انسان (HUVEC) از بانک سلولی ایران (NCBI-C554) تهیه شده اند. این سلول ها در محیط DMEM/Ham's F12 (Gibco) با ۲۰ درصد سرم جنین گاو (Seromed)، ۲ میلی مولار ال-گلوتامین (Gibco)، ۵۰ میکروگرم بر

از یکدیگر نیستند و اثر متقابل آنها قابل بررسی است.

تحقیقات نشان می دهند پس از اعمال بارگذاری مکانیکی، مورفولوژی و آرایش سلول های اندوتلیال تغییر می کنند (۱۲، ۱۵، ۱۶). سلول ها پس از بارگذاری نسبت به حالت بدون بار کشیده شده و مساحت آنها کاهش و محیطشان افزایش می یابد (۲۰-۱۵). سلول ها مجدداً جهت گیری و زاویه ای در حدود ۷۰ الی ۸۰ درجه نسبت به راستای بارگذاری پیدا می کنند. آرایش سلول ها در راستای کمترین میزان تغییر شکل غشای زمینه ای است (۲۳-۲۱). از تحقیقات صورت گرفته می توان به آزمایش های مورتمی و همکارانش بر سلول های اندوتلیال بندناف کشت داده شده بر غشای سیلیکنی اصلاح شده توسط پلازما اشاره نمود (۲۴). نتایج موید تغییرات محیط سلول ها و زاویه جهت گیری سلول ها بعد از اعمال بار سیکلی در مدت زمان چهار ساعت، فرکانس بارگذاری یک هرتز با دامنه کشش ده درصد هستند. پس از بارگذاری محیط سلول ها افزایش یافته است و درصد آرایش سلول های باقی مانده بر روی غشا پس از تست نیز نشان می دهد که سلول ها تمایل به جهت گیری نزدیک به ۹۰ درجه نسبت به راستای بارگذاری دارند. شایان ذکر است که تحقیق اشاره شده فقط بر روی یک میزان دامنه کرنش، فرکانس و زمان بارگذاری انجام گرفته و محدوده ای از متغیرهای مذکور مدنظر نبوده و هدف نویسندگان تایید روش اصلاح سطح غشا توسط پلازما بوده است.

هدف این تحقیق اعمال کرنش سیکلی کششی در محدوده وسیعی از متغیرهای مکانیکی و بررسی نحوه پاسخ گویی سلول های اندوتلیال به این نیروهای مکانیکی است. با طراحی مناسب و ساخت دستگاه اعمال کرنش سیکلی بر سلول های کشت داده شده بر روی غشای الاستیک گرید پزشکی، می توان کشش سیکلی در گستره وسیعی از دامنه و تعداد سیکل ها در حیطه وسیعی در محیط فیزیولوژیک مناسب به سلول ها اعمال کرد و محدودیت های تحقیقات پیشین را پشت سر نهاد. این مطالعه ارزیابی کمی دقیق تری از تاثیر پارامترهای مکانیکی بر مورفولوژی سلولی به لحاظ اعمال تعداد نقاط بیشتری از پارامترهای مستقل و طراحی نرم افزار پردازش تصویر مناسب جهت کاهش نویز تصاویر و برآورد دقیق تر پارامترهای توپولوژی سلولی دارد. پاسخ سلول های اندوتلیال در تغییرات مورفولوژیکی پس از بارگذاری ثابت و مورد تحلیل قرار می گیرند. کاربرد این تحقیق، برآورد تغییرات مورفولوژی سلول های اندوتلیال تحت تاثیر بارگذاری سیکلی و متغیرهای مکانیکی یاد شده است. نتایج می توانند در بررسی تطبیق کارکردی سلول ها با محیط فیزیکی مکانیکی و بازسازی (Remodeling) سلولی استفاده شوند و حد آستانه ای را برای آسیب سلول ها ارائه دهند که در مطالعات پیشین به علت محدودیت حیطه پارامترهای مکانیکی قابل دست یابی نبوده است. نتایج این تحقیق در نهایت منجر به ارزیابی نحوه آسیب شناسی سلول های اندوتلیال و آستانه این فرآیند در بیماری های قلبی عروقی می شود.

مواد و روش ها

طراحی دستگاه تست کرنش سیکلی

استفاده از نرم افزار پردازش تصویر طراحی شده محاسبه می شوند. میزان کشیدگی سلول‌ها با پارامتر (Shape Index: SI) مشخص می شود و این گونه برآورد می شود (۲۰-۱۸): $SI = (4PIA)/P^2$ که A مساحت سلول و P محیط سلول هستند. این شاخص برای دایره برابر عدد یک و برای اشکال کشیده به سمت صفر میل می کند. با مقایسه نتایج حاصل از پردازش تصاویر قبل و بعد از تست می توان تاثیر بارگذاری کششی سیکی را بر سلول‌های اندوتلیال به دست آورد. زاویه آرایش سلول‌ها، متوسط زاویه جهت گیری سلول‌های درون هر تصویر نسبت به محور بارگذاری است که توسط نرم افزار طراحی شده برآورد می شود.

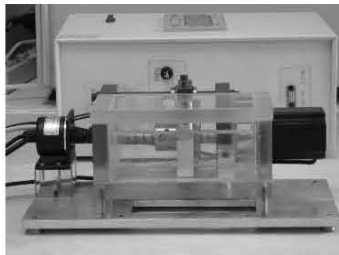
تحلیل آماری

نتایج تغییرات مورفولوژی سلول‌ها به ازای مقادیر متفاوت سیکل‌های بارگذاری و دامنه کرنش مبتنی بر انجام چهار آزمایش برای هر پارامتر است. پس از ثبت مقادیر SI و θ به ازای هر آزمایش مقادیر میانگین و انحراف معیار پارامترهای مذکور به ازای هر متغیر مستقل محاسبه می شود. به منظور بررسی تاثیر متغیرهای مکانیکی بر مقادیر SI و θ آزمون آماری میانگین T-Test انجام و مقادیر احتمال P برای فرض تفاوت میانگین ارائه می شود. همچنین مقادیر همبستگی آماری بین دو متغیر وابسته تحقیق (SI و θ) در آزمون متغیرهای مستقل محاسبه می شود.

یافته‌ها

نتایج، مبین توانایی دستگاه در اعمال کرنش سیکی به سلول‌های کشت داده شده بر غشا الاستیک با توجه به معیارهای طراحی بوده است. از مزایای این دستگاه، نسبت به طراحی‌های قبلی، می توان به توانایی تغییر دامنه کرنش، فرکانس بارگذاری، نسبت سرعت کشش به رهاسازی نمونه و تعداد سیکل‌های بارگذاری در محدوده وسیعی اشاره کرد. دقت در طراحی و ساخت دستگاه و قابلیت‌های مختلف در حیطه اعمال بار مکانیکی و آزمایش نمونه در محیط فیزیولوژیکی، بر حساسیت دستگاه می افزاید و این وسیله را برای کاربردهای بیومدیkalی و به خصوص مکانیک بافت نرم مناسب می سازد.

سلول‌های اندوتلیال پس از انتقال به غشا سیلیکنی با پوشش کلاژن و چسبیدن به آن با تغییر متغیرهای مستقل تحقیق از جمله تعداد سیکل‌های بارگذاری (مدت زمان اعمال بار متفاوت) و میزان کرنش تحت بارگذاری قرار گرفتند. تحلیل تصاویر قبل و بعد از تست موید تغییرات مورفولوژیک سلول‌های اندوتلیال بود (جدول ۱).



شکل ۱: دستگاه تست کرنش سیکی سلول‌های کشت داده شده بر غشای مناسب و بافت نرم

میلی لیتر هپارین، ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر ECGS و ۱ درصد پنسیلین/استپتومایسین (Sigma) در داخل انکوباتور با شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری می شوند. سلول‌های استفاده شده در این مطالعه بین پاساژهای ۷-۳ بوده اند. غشای الاستیک سیلیکن گرید پزشکی برای کشت سلولی استفاده شده است. در ابتدا غشا با کلاژن نوع I (Sigma) برای چسبندگی بهتر سلول‌ها به غشاء پوشش داده شده (۱۴، ۱۷) و سپس سلول‌ها بر روی آن منتقل می شوند. شکل ۲ سلول‌ها را بر روی غشای سیلیکنی با پوشش کلاژن قبل از چسبندگی سلول‌ها نشان می دهد.

بارگذاری سیکی سلولی

قبل و بعد از تست، از سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس (ZEISS ID03) و دوربین دیجیتال (SONY DSC-W7) در نواحی مشخص شده، عکس گرفته می شود. بعد از اتصال غشا به فک‌های دستگاه، فرکانس بارگذاری، درصد کرنش غشا، طول اولیه غشا، تعداد سیکل‌ها و نسبت سرعت کشش به رهاسازی نمونه به نرم افزار دستگاه وارد می شود. تانک دستگاه از محیط کشت پر می شود و وسیله در انکوباتور قرار داده می شود.

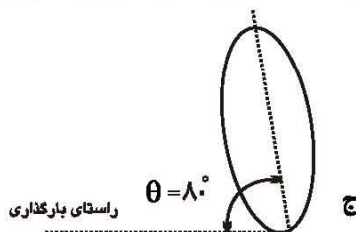
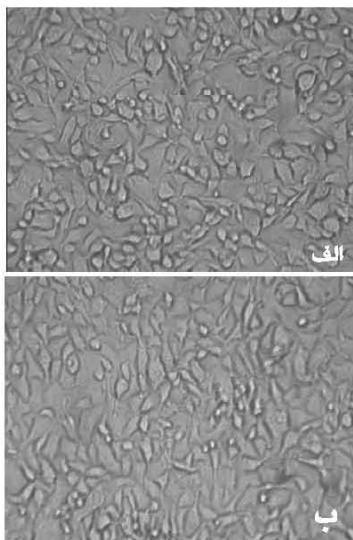
به منظور بررسی اثر بارگذاری مکانیکی بر مورفولوژی سلول‌ها، دو پارامتر مهم عبارت‌اند از تعداد سیکل‌های بارگذاری (مدت زمان بارگذاری) و میزان دامنه کرنش (میزان افزایش طول بر طول اولیه نمونه تست). با تغییر این دو پارامتر پاسخ سلول‌های اندوتلیال در تغییر مورفولوژی و آرایش سلولی با استفاده از تصاویر قبل و بعد از تست ثبت و بررسی می شوند. به منظور انجام تحلیل آماری به ازای هر متغیر مستقل طرح، چهار آزمایش انجام گرفته و مقادیر جهت گیری سلول‌ها و میزان کشیدگی آنها به ازای هر آزمایش ثبت می شود.

پردازش تصاویر

به منظور پردازش تصویر (Image Processing) از نرم افزار MATLAB (Version 7.4) به عنوان نرم افزار مادر استفاده شد و سپس نرم افزاری به منظور برآورد میزان جهت گیری و کشیدگی سلول‌ها به صورت اختصاصی در محیط نرم افزار مادر طراحی شد. در این نرم افزار تصاویر دیجیتالی سلول‌ها که با فرمت RGB توسط دوربین گرفته می شوند در قدم اول به تصاویری با فرمت Grayscale تبدیل می شوند. سپس برای وضوح بیشتر و کاهش نویز در تمایز تصاویر سلولی از زمینه، یک فیلتر مناسب به تصویر اعمال می شود. در مرحله بعد تصویر به فرمت دودویی تبدیل می شود. این نوع تصویر از دو نوع پیکسل با مقادیر صفر (رنگ سیاه) و یک (رنگ سفید) تشکیل شده است. در تصاویر به دست آمده رنگ سلول‌ها سیاه و رنگ زمینه سفید است. در این تبدیل از روش اوتسو استفاده می شود که در آن از یک حد آستانه محلی جهت تبدیل استفاده شده است و کمترین خطا را در تشخیص و تمایز سلول‌ها دارد. با استفاده از تصویر دودویی می توان مشخصات هندسی سلول‌های تصویر را به دست آورد. در هر عکس چهار ناحیه مشخص بررسی می شود و زاویه آرایش سلول‌ها نسبت به راستای بارگذاری (θ) و میزان کشیدگی سلول‌ها (SI) پس از تست با

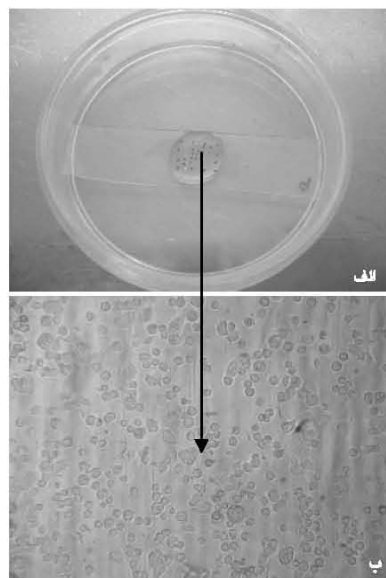
کشش سیکنی بر مورفولوژی سلول های اندوتلیال

افزایش در زاویه جهت گیری با اعمال بار است. پس از اعمال بار، نه تنها جهت گیری سلول های اندوتلیال تغییر می یابد بلکه مورفولوژی آنها نیز متفاوت می شود. تحلیل تصاویر با استفاده از نرم افزار طراحی شده نشان می دهند که پس از بارگذاری سلول ها کشیده شده اند و در نتیجه مساحت آنها کاهش و محیط آنها افزایش یافته است. با توجه به تعریفی که از شاخص شکل سلولی (SI) شده است، مقدار SI با بارگذاری کاهش می یابد. برای سلول های اندوتلیال کشت داده شده قبل از تست، این شاخص برابر ۰/۷۶۵ است. پس از تست، کاهش مشهودی در این پارامتر دیده می شود. شکل ۵ تاثیر تعداد سیکل های بارگذاری (مدت تست) را بر مورفولوژی سلولی با استفاده از پارامتر SI نشان می دهد. پس از مدت زمان ۱۰ ساعت، مقدار SI با کاهشی حدود ۴۶ درصد به میزان ۰/۴۱۵ کاهش می یابد که به مفهوم کشیدگی سلول است. آزمون میانگین T-Test متغیرها مبین تغییر با اهمیت آماری در کمیت های SI و θ به ازای مقادیر مختلف تعداد سیکل های بارگذاری با مقدار احتمال $P < 0/01$ است. همچنین تحلیل همبستگی آماری بین متغیرهای SI و θ به ازای مقادیر مختلف سیکل های بارگذاری نشان دهنده همبستگی بالا (۹۷ درصد) است. این همبستگی بیانگر روایی و پایایی بالای متغیرهای فوق در برآورد تغییرات مورفولوژی سلولی است.



شکل ۳: آرایش سلول های اندوتلیال (الف) قبل و (ب) بعد از اعمال کرنش سیکنی تحت کرنش ۱۰ درصد، فرکانس بارگذاری ۱ هرتز و مدت زمان ۱۰ ساعت. (ج) θ بیانگر میانگین راستای جهت گیری سلول ها در تصویر نسبت به راستای بارگذاری است.

شکل ۳ آرایش سلول ها را قبل و بعد از بارگذاری نشان می دهد. شرایط تست تعداد سیکل ۳۶۰۰۰ (۱۰ ساعت)، فرکانس بارگذاری HZ ۱، کرنش ۱۰ درصد و نسبت سرعت کشش به رهاسازی نمونه برابر یک بوده است. مقایسه شکل الف ۳ (قبل از تست) و شکل ب ۳ (پس از تست) با استفاده از پردازش تصاویر موید آن است که آرایش تصادفی سلول ها بعد از تست تغییر کرده است و سلول ها در زاویه ای در حدود ۸۰ درجه پس از بارگذاری جهت گیری کرده اند. تحلیل تنش مکانیکی بارگذاری فوق بر روی غشا نشان داده است که راستای زوایای ۸۰-۷۰ درجه، جهتی است که حداقل تغییر شکل در غشا به ازای این بارگذاری محوری حاصل می شود (۲۳-۲۱، ۱۹). این گستره زاویه جهتی است که در آن کمترین میزان تغییر شکل در ماده زمینه ای کشت سلولی به ازای این بارگذاری پدید می آید. در نتیجه می توان گفت که جهت گیری مجدد سلول ها در این راستا به منظور کاهش انرژی کرنشی سلول ها و حداقل کردن کشش ساختار اسکلتی سلول است. فیبرهای تنش درون سلولی تمایل به کمترین میزان تغییر طول دارند و در حقیقت سلول در جهتی آرایش مجدد می یابد که حداقل تحریک به آن وارد شود.



شکل ۲: انتقال سلول ها بر روی غشای سیلیکن با پوشش کلاژن. (ب) سلول ها قبل از چسبیدن سلول ها به غشا

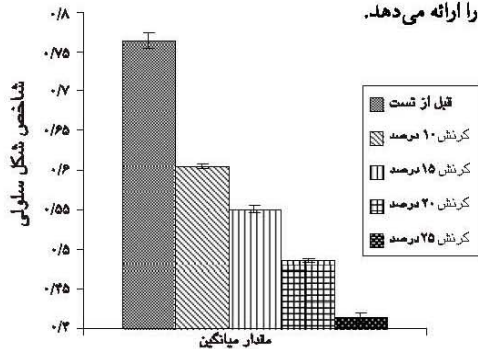
تاثیر تعداد سیکل های بارگذاری بر مورفولوژی سلول های اندوتلیال

شکل ۴ نمودار تغییرات میانگین زاویه سلول ها با راستای بارگذاری را پس از اعمال نیرو به ازای زمان های مختلف بارگذاری نشان می دهد. درحالی که قبل از اعمال بارگذاری برآیند جهت گیری های سلولی در حدود ۴۷ درجه بوده است، با انجام آزمایش سلول ها با روند غیرخطی جهت گیری می کنند. با افزایش تعداد سیکل های بارگذاری آرایش سلولی با زاویه ای بیشتر نسبت به محور بارگذاری تا میزان ۸۰ درجه برای ۱۰ ساعت بارگذاری جهت گیری می کند نتایج، مبین حداکثر ۷۰ درصد

جدول ۱: تغییرات مورفولوژیک سلول‌های اندوتلیال به ازای مدت زمان اعمال بار و درصد دامنه کرنش متفاوت

پارامترهای مورفولوژیکی	دامنه کرنش (Hz, %)					مدت زمان تست (۱۰ درصد)				
	۰ درصد	۱۰ درصد	۱۵ درصد	۲۰ درصد	۲۵ درصد	۰ ساعت	۲ ساعت	۶ ساعت	۸ ساعت	۱۰ ساعت
SI	۰/۷۶۵ (Std--۰/۰۱)	۰/۵۵ (Std--۰/۰۰۵)	۰/۵۲۳ (Std--۰/۰۰۵)	۰/۴۸۵ (Std--۰/۰۰۲)	۰/۴۰۸ (Std--۰/۰۰۵)	۰/۷۶۵ (Std--۰/۰۱)	۰/۶۰۵ (Std--۰/۰۰۳)	۰/۵۵ (Std--۰/۰۰۵)	۰/۳۸۶ (Std--۰/۰۰۲)	۰/۳۱۵ (Std--۰/۰۰۶)
θ	۲۷/۱ (Std--۲/۶)	۶۵ (Std--۲/۳)	۷۰/۷ (Std--۲/۱)	۷۲/۲ (Std--۲/۳)	۸۰/۱۵ (Std--۲/۱)	۲۷/۱ (Std--۲/۶)	۵۲/۸ (Std--۲)	۶۵ (Std--۲/۳)	۷۱/۳ (Std--۱/۷)	۷۹/۶ (Std--۲/۳)

در نمودار ۷ نیز تاثیر مقدار کرنش بر میزان کشیدگی سلول‌های اندوتلیال پس از بارگذاری ارائه شده است. با افزایش کرنش وارده، سلول‌ها کشیده شده و در نتیجه میزان شاخص SI کاهش داشته است. کرنش ۲۰ درصد، کاهش معادل ۳۷ درصد در شاخص شکل سلولی پس از مدت زمان ۶ ساعت از بارگذاری پدید آورده است. آزمون میانگین T-Test متغیرها نشان دهنده تغییر با اهمیت آماری در کمیت‌های SI و θ به ازای مقادیر مختلف دامنه کرنش با مقدار احتمال $p < 0.01$ است. تحلیل همبستگی آماری بین متغیرهای فوق نیز به ازای مقادیر مختلف دامنه کرنش همبستگی بالایی (۹۹ درصد) نشان می‌دهد. این همبستگی روایی و پایایی بالای متغیرهای SI و θ در برآورد تغییرات مورفولوژی سلولی را ارائه می‌دهد.

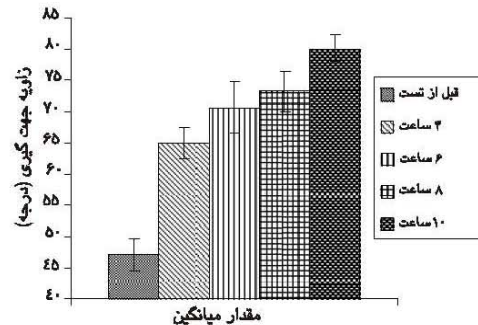


شکل ۷: تغییرات شاخص شکل سلول‌های (SI) پس اعمال نیرو به ازای کرنش‌هایی مختلف بارگذاری فرکانس ۱ هرتز و مدت زمان ۶ ساعت

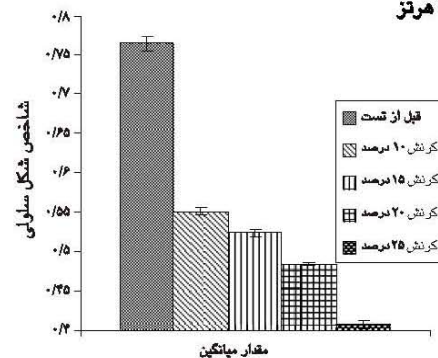
بحث

نتایج تحقیق حاضر مبین تغییر مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال در محیط کشت با بارگذاری سیکلی است. این بررسی به صورت نوین گستره وسیعی از متغیرهای بارگذاری شامل دامنه و زمان بارگذاری را به صورت هم‌زمان با طراحی بهبود یافته دستگاه اعمال کرنش سیکلی مورد ارزیابی قرار داده است.

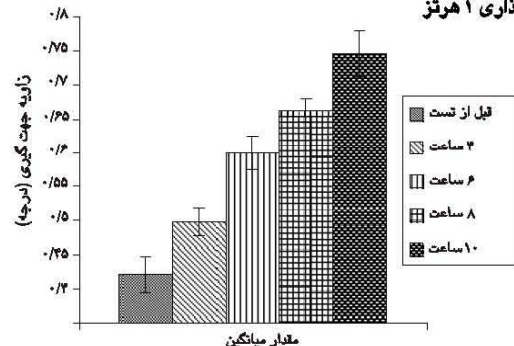
تاکنون طراحی‌های مختلفی برای اعمال کرنش سیکلی بر سلول‌های کشت داده شده بر غشای مناسب و شبیه‌سازی محیط مکانیکی داخل بدن صورت گرفته است ولی هر طرحی محدودیت‌های خاص خود را دارا است. در تحقیق حاضر، دستگاه طراحی شده که برای استفاده در محیط انکوباتور به کار می‌رود، دارای مزیت کار در گستره وسیعی از دامنه‌های کرنش، فرکانس‌های بارگذاری، تعداد سیکل‌ها و نسبت



شکل ۴: تغییرات میانگین زاویه سلول‌ها با راستای بارگذاری پس از اعمال نیرو به ازای زمان‌های مختلف بارگذاری، کرنش ۱۰ درصد و فرکانس بارگذاری ۱ هرتز



شکل ۵: تغییرات میانگین شاخص شکل سلول‌های اندوتلیال (SI) پس از اعمال نیرو به ازای زمان‌های مختلف بارگذاری، کرنش ۱۰ درصد و فرکانس بارگذاری ۱ هرتز



شکل ۶: تغییرات میانگین زاویه سلول‌ها با راستای بارگذاری پس از اعمال نیرو به ازای کرنش‌های مختلف بارگذاری، فرکانس ۱ هرتز و مدت زمان ۶ ساعت

کشش سیکی بر مورفولوژی سلول های اندوتلیال

می‌یابد. کشیدگی سلولی که به کاهش سطح سلول و افزایش محیط سلول می‌انجامد، طول مرزهای سلول را با سلول‌های مجاور افزایش می‌دهد که این امر به تغییر کشش‌های سلول-سلول می‌انجامد. تغییرات یاد شده بر کارکرد سلولی تاثیر دارد و بخشی از فرایند انطباق و بازسازی سلولی در پاسخ به محرک‌های خارجی است که کمترین سطح آسیب را به دنبال داشته باشد. افزایش تعداد سیکل‌های بارگذاری و کرنش، کشیدگی بیشتر سلول‌ها و کاهش بیشتر شاخص شکل سلولی را در پی دارند. افزایش دامنه کرنش معادل افزایش دامنه بار بر سلول‌ها است که در حالت فیزیولوژیک به معنای افزایش فشار خون است. افزایش زمان بارگذاری در حالت فیزیولوژیک معادل پدیده پیری است. با تعمیم نتایج این تحقیق به حالت فیزیولوژیک می‌توان به بررسی پدیده بازسازی شریانی (Remodeling) و مدل‌های انطباق شریانی با تغییرات محیطی پرداخت. سلول‌های اندوتلیال با تغییر مورفولوژیک در پاسخ به محرک‌های مکانیکی از طریق مکانیزم کنترلی حیاتی به کمینه‌سازی آسیب‌های احتمالی می‌پردازد. در صورتی که میزان محرک‌های مکانیکی از سطح بحرانی افزایش یابد کارایی مکانیزم‌های انطباق و بازسازی کاهش می‌یابد. به گونه‌ای که با آسیب به لایه اندوتلیال فاکتورهای ناخواسته خونی وارد دیواره شریان شده و با تجمع به تشکیل آتروما می‌پردازند و در نهایت پلاک‌های آترواسکلروسیس حاصل می‌شود که در مرحله وخیم کلینیکی عامل اول مرگ و میر جهانی است. شایان ذکر است که در ادامه این تحقیق تاثیر تغییر پارامترهای مکانیکی بارگذاری دیگر مانند فرکانس بارگذاری و نسبت سرعت کشش به رهاسازی نمونه بر روی نحوه پاسخ‌گویی سلول‌های اندوتلیال شریانی بررسی خواهد شد. همچنین می‌توان تغییر در ساختار اسکلتی سلول و رشته‌های اکتین و تغییر در تکثیر سلولی را نیز با اعمال بارگذاری بررسی کرد. نوع سلول، محل آناتومیکی سلول، عمر سلول، میزان تراکم سلولی و نوع ماده داربست زمینه‌ای از دیگر مواردی هستند که در نحوه پاسخ‌گویی سلول به بارگذاری موثر می‌باشند و در تحقیقات آتی مدنظر قرار خواهند گرفت.

نتیجه‌گیری

سلول‌های اندوتلیال به صورت طبیعی تحت بارگذاری کششی سیکی ناشی از فشار خون هستند. اعمال بارگذاری سیکی کششی بر سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده در گستره‌ای از دامنه و زمان بارگذاری مبین تغییر کمی در مورفولوژی و جهت‌گیری سلول‌هاست. این تاثیر با افزایش دامنه و زمان بارگذاری اهمیت بیشتری می‌یابد. ارزیابی کمی مورفولوژی و جهت‌گیری سلول‌های اندوتلیال ناشی از کارکرد طبیعی در محیط اعمال بار، نقش مهمی در بررسی کارکردی و آسیب‌شناسی این سلول‌ها در سیستم قلبی - عروقی دارد. چنین آسیب‌شناسی ناشی از افزایش فشار خون و پیری است که در آنها دامنه و زمان بارگذاری افزایش می‌یابد. در چنین حالتی تاثیر تخریبی مذکور از طریق مکانیزم بازسازی حداقل می‌گردد.

References

1. Samet MM, Lelkes PI. The Hemodynamics

سرعت کشش به رهاسازی نمونه است. دقت و توانایی‌های این دستگاه، آن را برای استفاده در حیطه مکانیک بافت نرم مناسب می‌سازد. از آنجا که در طراحی‌های دستگاه کشش مرتبط با تحقیقات قبلی محدودیت‌های مکانیکی طراحی دستگاه، حیطه بررسی پارامترها را محدود می‌ساخت، در این تحقیق تاثیر پارامترهای تعداد سیکل‌های بارگذاری و میزان دامنه کرنش اعمالی بر سلول‌های اندوتلیال در محدوده وسیع‌تری بررسی شده است. همچنین روش به کار رفته در تحلیل تصاویر با استفاده از کد نوشته شده، نتایج دقیق‌تری از تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها قبل و بعد از بارگذاری در اختیار می‌گذارد.

نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهند که سلول‌های اندوتلیال در پاسخ به بارگذاری محوری سیکی تغییر آرایش قابل ملاحظه‌ای را از خود نشان می‌دهند. جهت‌گیری تصادفی سلول‌ها پس از کشت بر روی غشای سیلیکونی، در جهت حداقل تغییر شکل با توجه به نوع و راستای بارگذاری تغییر می‌کند. افزایش کرنش و مدت زمان بارگذاری جهت‌گیری سلولی و تجدید آرایش آنها را مشهودتر می‌سازند. نتایج به دست آمده به لحاظ کیفی با تحقیقات پیشین هم‌خوانی دارند، البته در این تحقیق دامنه وسیع‌تری از نتایج کمی ارائه شده است (۱۲، ۱۶، ۱۸). به عنوان نمونه، مورتنی و همکارانش گزارش کرده‌اند پس از بارگذاری چهار ساعته با فرکانس یک هرتز و میزان کشش ده درصد، درصد آرایش سلولی به جهت‌گیری ۹۰ درجه نسبت به راستای بارگذاری متماثل می‌شود. بررسی محیط سلول‌ها نیز افزایش محیط سلول‌های اندوتلیال را بعد از بارگذاری ارائه داده است (۲۴). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که زاویه آرایش سلولی برای محدوده دامنه کرنش (۲۵-۰ درصد) و محدوده زمان بارگذاری (۱۰-۰) ساعت، در حدود ۸۰ درجه نسبت به راستای بارگذاری است و کاهش شاخص شکل سلولی در حدود ۴۶ درصد در حیطه متغیرهای فوق نیز موید کشیدگی سلول‌ها پس از بارگذاری سیکی است.

نتایج اعمال بارگذاری سیکی در محدوده وسیعی از پارامترهای تعداد سیکل‌های بارگذاری و دامنه کرنش نشان می‌دهند که در شش ساعت اولیه بارگذاری تاثیر افزایش دامنه کرنش بر جهت‌گیری مجدد سلول‌ها و میزان کشیدگی آنها بیش از تاثیر تعداد سیکل‌های بارگذاری است. ادامه بارگذاری نشان می‌دهد که تغییر آرایش سلولی به ازای مقادیر متفاوت پارامترهای تحت بررسی نسبت به میزان کشیدگی سلولی بیشتر بوده است. محدودیت تغییر میزان شاخص SI بدین معنی است که میزان تغییر مورفولوژی و کشیدگی سلولی دارای محدوده‌ای به ازای پارامترهای مختلف بارگذاری است که اگر بیش از آن نیروی مکانیکی به سلول اعمال شود دیگر سلول قادر به تطابق سازی (Adaptation) نخواهد بود و آسیب سلولی و بیماری عروقی را در پی خواهد داشت. این محدودیت در نحوه مجانب شدن منحنی تغییرات پارامترها در اشکال ۴ تا ۷ مشخص است. در تحقیقات قبلی این مساله به دلیل تعداد محدود نقاط متغیرهای مستقل قلیل بررسی نبوده است.

پس از اعمال کشش سیکی، سلول‌ها کشیدگی پیدا می‌کنند و شاخص شکل سلولی که بیانگر میزان این تغییر شکل است، کاهش

Environment of Endothelium In Vitro and its Simulation

- In Vitro. In: Leikes P I, edotir. *Mechanical Forces and the Endothelium*. New York: Harwood Academic Publishers, 1999; 1-33
2. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile Flow and Atherosclerosis in the Human Carotid Bifurcation: Positive Correlation Between Plaque Location and Low-Oscillating Shear Stress. *Arteriosclerosis*, 1985; 5: 293-302
 3. Moore Jr. JE, Xu C, Glagov S, Zarins C K, Ku DN. Fluid Wall Shear Stress Measurements in a Model of the Human Abdominal Aorta: Oscillatory Behavior and Relationship to Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1994; 110: 225-240
 4. Qiu Y, Tarbell JM. Interaction Between Wall Shear Stress and Circumferential Strain Affects Endothelial Cell Biochemical Production. *J Vasc Res*, 1999; 1-11
 5. Brown TD. Techniques for Mechanical Stimulation of Cells in Vitro: a Review. *J Biomech*, 2000; 33: 3-14
 6. Krizanac-Benjies L, Kapural M, Parkinson F, Cucullo L, Hossain M, Mayberg MR, Janigro D. Effects of Transient Loss of Shear Stress on Blood-Brain Barrier Endothelium: Role of Nitric Oxide and IL-6. *Brain Res*, 2003; 977: 239-246
 7. Hasel C, Durr S, Bruderlein S, Melzner I, Moller P. A Cell-Culture System For Long Term Maintenance of Elevated Hydrostatic Pressure with the Option of Additional Tension. *J Biomech*, 2002; 35: 579-584
 8. Sotoudeh M, Jalali S, Usami Sh, Shyy JYJ, Chien SH. A Strain Device Imposing Dynamic and Uniform Equi-Biaxial Strain to Cultured Cells. *Ann Biomed Eng*, 1998; 26: 181-189
 9. Waters CHM, Glucksberg MR, Lautenschlager EP, Lee CH, Van Matre R, Warp RJ, Savia U, Healy KE, Moran B, Castner DG, Bearinger JP. A System to Impose Prescribed Homogenous Strains on Cultured Cells. *J Appl Physiol*, 2001; 91: 1600-1610
 10. Sweeney NVO, Cummins PM, Cotter EJ, Fitzpatrick PA, Birney YA, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic Strain-Mediated Regulation of Vascular Endothelial Cell Migration and Tube Formation. *Biochem Biophys Res Com*, 2005; 329, 573-582
 11. Stamenovic D, Wang N. Cellular Responses to Mechanical Stress Invited Review: Engineering Approaches to Cytoskeletal Mechanics. *J Appl Physiol*, 2000; 89: 2085-2090
 12. Moore MM, Goldman J, Patel AR, Chein S, Liu Q. Role of Tensile Stress and Strain in the Induction of Cell Death in Experimental Vein Grafts. *J Biomech*, 2001; 34: 289-297
 13. Yamada H, Morita D, Mutsumura J. Orientation of Stress Fibers in a Cultured Endothelial Cell Under Cyclic Deformation Taking Account of Its Nonuniform Deformation: Strain Limit Hypothesis and Numerical Simulations. *Summer Bioengineering Conference*, 2003; 25-29
 14. Petersen W, Varoga D, Zantop T, Hassenpflug J, Mentlein R, Pufe T. Cyclic Strain Influences the Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and the Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF-1a) in Tendon Fibroblasts. *J Orth Res*, 2004; 22: 847-853
 15. Sipkema P, Linden PJW, Westerhof N, Yin FCP. Effect of Cyclic Axial Stretch of Rat Arteries on Endothelial Cytoskeletal Morphology and Vascular Reactivity. *J Biomech*, 2003; 36: 653-659
 16. Takemasa T, Sugimoto K, Yamashita K. Amplitude Dependent Stress Fiber Reorientation in Early Response to Cyclic Strain. *Exp Cell Res*, 1997; 230: 407-410
 17. Joung IS, Iwamoto MN, Shiu YT, Quam CT. Cyclic Strain Modulates Tubulogenesis of Endothelial Cells in a 3D Tissue Culture Model. *Microvasc Res*, 2006; 71(1), 1-11
 18. Owatverot TB, Oswald SJ, Chen Y, Wille JJ, Yin FCP. Effect of Combined Cyclic Stretch and Fluid Shear Stress on Endothelial Cell Morphological Responses. *J Biomech Eng*, 2005; 127: 374-382
 19. Yamaguchi T, Yamamoto Y, Liu H. Computational Mechanical Model Studies on the Spontaneous Emergent Morphogenesis of the Cultured Endothelial Cells. *J Biomech*, 2000; 33: 115-126
 20. Dieterich P, Odenthal-Schnittler M, Mrowietz C, Kramer M, Sasse L, Oberleithner H, Schnittler H-J. Quantitative Morphology of Endothelial Cells Within Confluent Cultures in Response to Fluid Shear Stress. *Biophys J*, 2000; 79: 1285-1297
 21. Wang HC. Substrate Deformation Determines Actin Cytoskeleton Reorganization: A Mathematical Modeling and Experimental Study. *J Theor Biol*, 2000; 202: 33-41
 22. Yamada H, Takemasa T, Yamaguchi T. Theoretical Study of Intracellular Stress Fiber Orientation Under Cyclic Deformation. *J Biomech*, 2000; 33: 1501-1505
 23. Wang JHC, Goldschmidt-Clermont P, Wille J, Yin FCP. Specificity of Endothelial Cell Reorientation in Response to Cyclic Mechanical Stretching. *J Biomech*, 2001; 34: 1563-1572
 24. Moretti M, Prina-Mello A, Reid AJ, Barron V, Prendergast PJ. Endothelial Cell Alignment on Cyclically-Stretched Silicone Surface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004; 15: 1159-1164