

## ارزیابی تأثیرات بارگذاری چرخه‌ای بر خواص ساختاری سلول‌های پوششی کشت داده شده

جواد حاتمی<sup>۱</sup>، محسن جانملکی<sup>۲</sup>، محمد تفضلی شادپور<sup>۳\*</sup>، محمدعلی شکرگزار<sup>۴</sup>، نوشین حقیقی پور<sup>۵</sup>

- ۱- کارشناس ارشد، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
- ۲- مربی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دکتری تخصصی، بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۲۶

دریافت مقاله: ۸۸/۰۸/۲۳

### چکیده

**هدف:** اندوتلیوم غشا، نفوذی انتخابی برای انتقال مواد غذایی و سایر اجزای حیاتی به دیواره شریان به حساب می‌آید. آسیب به این غشا می‌تواند باعث تغییر در عملکرد زیستی بافت پوششی و در نتیجه عوارض بالینی همانند آترواسکلوzeosis شود. پالس فشار خون همواره کشش محیطی بر دیواره عروق اعمال می‌نماید و در نتیجه کشش چرخه‌ای در کنار سایر نیروها نقش مهمی را در خواص و عملکرد سلول‌های پوششی ایفا می‌کند. مطالعات قبلی مؤید تأثیر بارگذاری چرخه‌ای بر فرایند انطباق و بازسازی بافت پوششی بوده‌اند. این تحقیق به بررسی خواص ساختاری سلول‌های پوششی کشت داده شده تحت بارگذاری کششی تک محوره می‌پردازد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های پوششی وریدی بند ناف انسان تهیه شده از بانک سلولی ایران (NCBI-C554) روی غشای سیلیکونی کشت داده شده و در دستگاه کشش چرخه‌ای در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت با دامنه ۱۰ درصد و فرکانس ۱ هرتز بارگذاری و سپس خواص ویسکوالاستیک سلول‌های پوششی با استفاده از روش میکروپیپت آزمایش شدند.

**نتایج:** نتایج نشان‌دهنده افزایش در بخش الاستیک سلول‌ها (E) در اثر بارگذاری چرخه‌ای کششی است که به سخت شدن سلول می‌انجامد. همچنین نتایج نشان‌دهنده افزایش اولیه در ضریب ویسکوزیته و سپس کاهش این پارامتر در ساعات بعدی بارگذاری است.

**نتیجه‌گیری:** مطالعات قبلی بیانگر ایجاد فیبرهای تنش در اثر تجمع و افزایش رشته‌های اکتین در سلول‌های پوششی پس از بارگذاری کششی چرخه‌ای هستند. از آن‌جا که خواص ساختاری و مکانیکی سلول‌های پوششی وابسته به رشته‌های اکتین است، نتایج این تحقیق نشان‌دهنده افزایش سفتی مکانیکی در سلول‌های پوششی در اثر بارگذاری چرخه‌ای از طریق ایجاد فیبرهای تنش است.

**کلیدواژگان:** خواص مکانیکی، سلول پوششی، بارگذاری چرخه‌ای کششی

### ۱- مقدمه

آترواسکلوzeosis (Atherosclerosis) یکی از بیماری‌های دستگاه قلبی-عروقی است که ناشی از آسیب به سلول‌های

\*نشانی مکاتبه: تهران، خیابان حافظ، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، کدپستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱

پوششی (Endothelial cells) شریانی است. این سلول‌ها داخلی‌ترین لایه شریان‌ها را در مجاورت جریان خون تشکیل می‌دهند. این بیماری که با انسداد و گرفتگی شریان و در نتیجه نرسیدن خون به پایین دست همراه است از جمله بیماری‌های مهم دستگاه قلبی - عروقی است که سالیانه باعث سکت قلبی و مرگ هزاران نفر در جوامع پیشرفته می‌شود [۱]. از زمینه‌های این بیماری، نفوذ لپیدها و پروتئین‌های بزرگ از بین سلول‌های پوششی و تجمع و ایجاد توده لپیدی در دیواره شریان است که اختلال فعالیت‌های فیزیولوژیکی سلول‌های پوششی را به همراه دارد [۱]. فعالیت‌های حیاتی بافت پوششی (Endothelium) به وسیله محیط اطراف از جمله تنظیم‌کننده‌های شیمیایی و ماتریس خارج سلولی و محرک‌های محیطی مانند تنش‌های مکانیکی ناشی از جریان و فشار خون تنظیم می‌شود [۲-۴]. همچنین سلول‌های پوششی پاسخ‌های بیوستیزی به تنش‌های مکانیکی می‌دهند. از این رو بررسی مکانیسم‌های پاسخ سلول‌های پوششی به نیروهای بیومکانیکی از طریق آزمایش‌های درون‌آزمایشگاهی (In vitro) که بتواند شرایط محیطی سلول‌های پوششی را شبیه‌سازی کند، مورد توجه بوده است [۲-۴].

محیط مکانیکی سلول‌های پوششی شامل نیروها و تنش‌های مختلفی است. این سلول‌ها همواره تحت تنش برشی ناشی از جریان خون، فشار هیدروستاتیکی و کرنش چرخه‌ای ناشی از پالس فشار خون هستند. در شرایط بحرانی تنش‌های مکانیکی عامل مؤثری در ایجاد و گسترش فرایندهای پاتولوژیک مانند آترواسکلروسیس و هایپرپلازیا ایتیمیا (Intimal hyperplasia) هستند [۵]؛ اگرچه تاکنون مکانیسمی که سلول پوششی محرک‌های مکانیکی را به پاسخ‌های بیوشیمیایی بین سلولی تبدیل می‌کند به خوبی تبیین نشده است [۶].

تحقیقات نشان داده‌اند که با اعمال محرک‌های مکانیکی مانند تنش برشی، فشار هیدروستاتیکی و کرنش چرخه‌ای، متغیرهای سلولی از جمله ریخت‌شناسی و آرایش سلول، ساختار درونی سلول، خواص مکانیکی سلول، میزان و عملکرد ترکیبات پروتئینی سلول، تکثیر سلول، خاصیت رگ‌زایی، تنظیم

قطر رگ، فعالیت کانال‌های یونی، مهاجرت سلولی، چسبندگی سلولی، بیان ژنی، علائم بین سلولی تغییر پیدا می‌کنند [۶-۱۲]. بسته به جهت و مقدار محرک‌های مکانیکی، سلول‌ها به روش‌های مختلفی پاسخ می‌دهند. به‌عنوان مثال جریان خون و ایجاد تنش برشی روی بافت پوششی باعث آزاد شدن بعضی از هورمون‌ها، تولید علائم بین سلولی و همچنین سفت‌تر شدن سلول‌های پوششی از طریق بازآرایی ساختار اسکلتی می‌شود. تاکنون آزمایش‌های بسیاری برای بررسی تأثیر نیروهای مکانیکی بر سلول‌های پوششی طراحی و انجام شده است [۵، ۶، ۱۳-۱۷]. از جمله این آزمایش‌ها بررسی تأثیر کرنش چرخه‌ای محیطی بر سلول‌های پوششی است [۱۰، ۱۸-۲۰]. کرنش چرخه‌ای به‌همراه دیگر نیروها نقش مهمی در تنظیم میزان تنش رگی، بازسازی و تولید آترواسکلروسیس در شرایط درون بدنی (In vivo) دارد [۲۱].

روش میکروپیپت از جمله روش‌های آزمایشگاهی است که به‌وسیله آن می‌توان خواص ساختاری و مکانیکی سلول‌ها را بررسی کرد [۲۲-۲۴]. این روش در ابتدا برای بررسی خواص مکانیکی غشای سلول‌های خونی مانند گلبول قرمز و نوتروفیل‌ها استفاده شد [۲۲، ۲۵]. سپس به‌طور گسترده‌ای توسط محققان بسیاری برای برآورد خواص مکانیکی سلول استفاده شد [۲۶-۲۸]. از این روش برای برآورد بخش (Module) الاستیک سلول و همچنین برای برآورد خواص ویسکوالاستیک (Viscoelastic) سلول‌ها نیز استفاده شده است [۲۹-۳۳].

خواص مکانیکی سلول‌های پوششی به روش‌های مختلفی ارزیابی شده است. در یکی از این تحقیقات اثر کلسترول بر سفتی غشای سلول‌های پوششی آنورتی به روش میکروپیپت بررسی شد. در این تحقیق نشان داده شد که در اثر افزایش کلسترول تغییر شکل‌پذیری غشا کمتر شده در حالی که بخش الاستیک سلول به دلیل تغییر در خواص رشته‌های اکتین افزایش می‌یابد [۳۴]. در تحقیق دیگری به بررسی اثر ریزرشته‌های (Filaments) اکتین و ریزلوله‌ها (Microtubules) بر خواص ویسکوالاستیک سلول‌های پوششی خوک با استفاده از روش میکروپیپت پرداخته شد و مشاهده شد که ریزرشته‌های اکتین نقش اصلی را در پاسخ

ویسکوالاستیک سلول‌های پوششی دارند [۲]. در تحقیق جداگانه دیگری بررسی بخش الاستیک و رفتار ویسکوز (Viscose) سلول‌های پوششی به وسیله میکروسکوپ روبشی اتمی، نشان داد که بخش الاستیک سلول‌های پوششی بین ۱/۴ تا ۶/۸ کیلوپاسکال بسته به محلی از سلول که پروب (Probe) میکروسکوپ آن را اسکن می‌کند متغیر است [۳۵]. در مطالعه دیگری اثر تنش برشی بر خواص ویسکوالاستیک سلول‌های پوششی خوکی با استفاده از روش میکروپیت بررسی شد. در تحقیق یاد شده سلول پوششی به صورت یک ماده همگن، غیرقابل تراکم و ویسکوالاستیک مدل شد و مشاهده شد که بر اثر تنش برشی ضریب الاستیک سلول افزایش می‌یابد [۳۰].

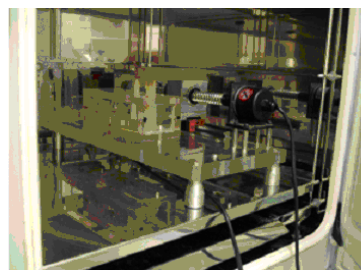
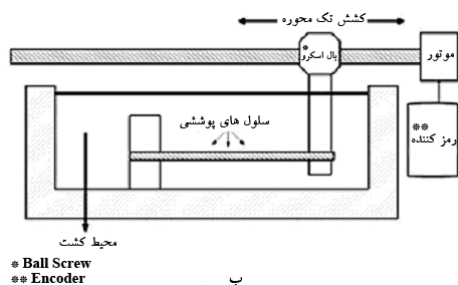
در این تحقیق سلول‌های پوششی ورید بند ناف انسان که روی غشای سیلیکونی کشت داده شده‌اند، در ابتدا تحت بارگذاری کششی چرخه‌ای در زمان‌های متفاوت و تحت کرنش‌های مختلف قرار می‌گیرند و سپس خواص مکانیکی سلول‌ها به روش میکروپیت به دست می‌آیند. هدف این تحقیق به دست آوردن خواص ویسکوالاستیک سلول‌های پوششی کشت داده شده تحت بارگذاری چرخه‌ای کششی به روش میکروپیت است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- کشت سلولی و بارگذاری دینامیکی

سلول‌های پوششی ورید بند ناف انسان (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) که از بانک سلولی ایران (NCBI-C554) تهیه و در محیط

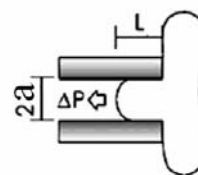
دستگاه بارگذاری دینامیکی از قسمت‌های مکانیکی (موتور مرحله‌ای (Stepper motor)، محور انتقال نیرو، فک ثابت و متحرک و ...) و قسمت‌های الکترونیکی (PLC، منبع تغذیه، مسیر انتقال فرمان و ...) تشکیل شده است (شکل ۱) [۱۹]. خروجی این دستگاه، کرنش چرخه‌ای با شکل موج، دامنه و فرکانس‌های متفاوت است که توسط فک متحرک متصل شده به غشای سیلیکونی اعمال می‌شود.



شکل ۱ الف) دستگاه بارگذاری دینامیکی درون انکوباتور، ب) شکل شماتیک دستگاه بارگذاری دینامیکی

## ۲-۲- آزمایش مکش به درون میکروپیپت

بعد از بارگذاری دینامیکی، سلول‌های پوششی به‌وسیله تریپسین ۰/۲۵ درصد از غشا جدا شده و به‌وسیله آزمایش میکروپیپت مطالعه شدند (شکل ۲). مکش به درون میکروپیپت مشابه دستورات عمل‌های گزارش شده است [۲، ۲۹، ۳۰، ۳۲، ۳۸].



شکل ۲ طرح شماتیک مکش سلول به درون میکروپیپت

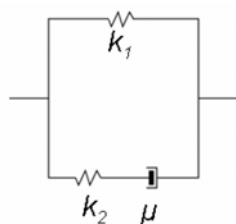
به‌منظور جلوگیری از چسبیدن سلول به دیواره داخلی میکروپیپت، جداره میکروپیپت با ماده سیگماکوت (Sigma Aldrich, Germany) پوشش داده می‌شود [۲۹، ۳۹، ۴۰]. میکروپیپت به‌وسیله لوله‌های رابط و یک شیر سه طرفه به پمپ دستی (Transfer Man Nk2, Eppendorf, Germany) متصل می‌شود. انتقال‌دهنده (Transmitter) فشار (Deltabar S PMD 235, Endress+Hauser, Germany) نیز توسط شیر سه طرفه به میکروپیپت متصل شده و فشار را در هر لحظه به‌صورت بر خط (Online) نشان می‌دهد. با استفاده از پمپ دستی می‌توان در دهانه میکروپیپت اعمال فشار یا مکش انجام داد. مقادیر فشار مکش حداکثر بین ۵۰ تا ۲۵۰ پاسکال است.

سلول‌های پوششی جدا شده از غشای سیلیکونی به‌همراه محیط کشت به دیش پلاستیکی منتقل شدند. دمای دیش به‌وسیله گرم‌کننده الکتریکی که روی میکروسکوپ نصب شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثابت نگاه‌داشته شد. در حین اعمال مکش، فیلم‌برداری به‌وسیله دوربین دیجیتال (Sony SSC-DC 80) انجام شد و در همان حال برای تجزیه و تحلیل بعدی توسط کابل رابط به کامپیوتر منتقل شد. تصاویر در زمان‌های متوالی با همان قدرت تفکیک‌پذیری اصلی از فیلم استخراج و ذخیره شدند.

اندازه مقداری از سلول که به داخل میکروپیپت کشیده شده [L(t)] توسط نرم افزار تحلیل تصاویر (Image Processing) Axiovision LE. به دست آمده و سپس در نرم افزار MATLAB توسط جعبه ابزار برازش منحنی (Curve fitting Toolbox) تحلیل شدند. مقدار تغییر شکل سلول‌ها قبل و بعد از بارگذاری از طریق تئوری‌های مکانیکی بیانگر خاصیت ویسکوالاستیک سلول‌ها است.

## ۲-۳- تحلیل تغییر شکل

در این تحقیق از مدل استاندارد خطی ویسکوالاستیک استفاده شده که به‌طور گسترده در آزمایش میکروپیپت روی سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های پوششی پیشنهاد داده شد است [۲۹، ۳۰، ۳۸، ۴۱]. در این مدل سلول به‌صورت یک ماده همگن، غیرقابل تراکم و ویسکوالاستیک فرض شده است. این مدل شامل یک فنر (با بخش سفتی  $K_1$ ) و میرا کننده (Damper) (با بخش ویسکوز  $\mu$ ) که با یکدیگر به‌طور سری و هر دو آن‌ها به‌طور موازی با یک فنر دیگر (با بخش سفتی  $K_2$ ) قرار گرفته‌اند، است (شکل ۳). مقادیر این ضرایب ثابت در نظر گرفته می‌شوند [۲۹، ۳۰، ۴۱].



شکل ۳ مدل استاندارد ویسکوالاستیک سه پارامتره

با حل کردن رابطه بین فشار مکش اعمالی - تغییر شکل سلول، رابطه زیر بین پارامترهای این مدل و طولی از سلول که مکش یافته به‌دست می‌آید [۲۹، ۳۸، ۴۱]:

$$L(t) = \frac{2a\Delta P}{\pi k_1} \left[ 1 + \left( \frac{k_1}{k_1 + k_2} - 1 \right) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] h(t) \quad (1)$$

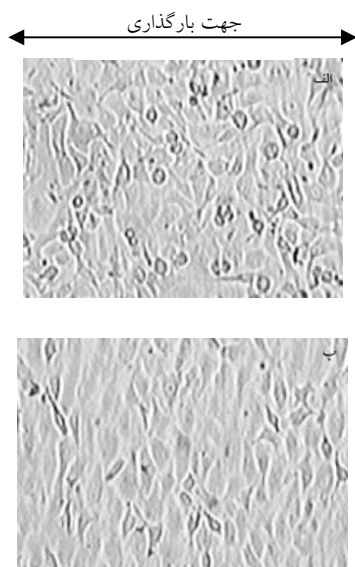
$$\tau = \frac{\mu}{k_1} \left( 1 + \frac{k_1}{k_2} \right) \quad (2)$$

آزمایش وارد محاسبات نشد. نتایج توسط آنالیز آنووا (ANOVA) تحلیل شدند.

### ۳- نتایج

#### ۳-۱- ریخت‌شناسی سلول

مطالعات انجام شده تأیید کننده تغییر ریخت‌شناسی سلول‌های پوششی تحت تأثیر بارگذاری دینامیکی کششی است [۱۶، ۱۸، ۴۲]. شکل ۴ تصویر سلول‌های پوششی روی غشای سیلیکونی را قبل از بارگذاری و پس از ۶ ساعت بارگذاری دینامیکی، ۱۰ درصد کرنش و فرکانس ۱ هرتز نشان می‌دهد. سلول‌ها تمایل دارند تا در جهتی تغییر شکل یابند که کمترین انرژی کرنشی به آن‌ها وارد شود تا کمترین نیروی وارده بر ساختار اسکلتی آن وارد شود [۱۸، ۴۳، ۴۴]. با توجه به بارگذاری تک محوره بر غشا، راستای عمود بر بارگذاری جهتی است که کمترین مقدار تغییر شکل به غشا وارد می‌شود. بنابراین سلول‌ها در جهتی تغییر شکل می‌یابند که کمترین تغییر انرژی کرنشی موجود باشد.



شکل ۴ الف) سلول‌های پوششی را قبل از بارگذاری و ب) همان سلول‌ها را بعد از ۶ ساعت بارگذاری، فرکانس ۱ هرتز و کرنش ۱۰ درصد نشان می‌دهد. بزرگنمایی:  $400 \times$

در رابطه بالا  $L(t)$  طول مکش‌یافته سلول،  $a$  شعاع میکروپیپت،  $\Delta P$  فشار مکش،  $\tau$  ثابت زمانی و  $h(t)$  تابع واحد پله‌ای است.

مقادیر تغییر شکل سلولی به صورت پارامتر بی‌بعد  $L/a$  در حین مکش سلول و تا رسیدن به زمان پایدار ثبت می‌شوند، سپس ضرایب مدل ویسکوالاستیک شامل  $K_1$ ،  $K_2$ ،  $\mu$  و  $\tau$  به وسیله نرم افزار MATLAB به دست می‌آیند. این خواص مکانیکی با اعمال بارگذاری در گستره زمان و دامنه بارگذاری معرف تغییرات ساختار سلول پوششی بر اثر اعمال کشش چرخه‌ای هستند.

#### ۲-۴- برنامه انجام آزمایش‌ها

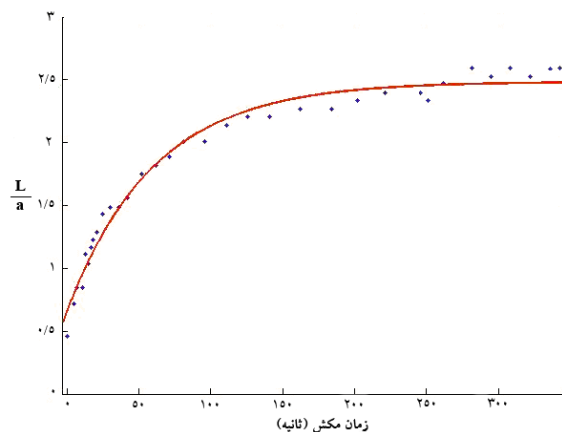
سلول‌های پوششی ورید بند ناف انسان از انستیتو پاستور ایران تهیه و سپس کشت داده شدند. غشای سیلیکونی علامت‌گذاری و با کلاژن نوع I پوشش داده شد. بعد از رسیدن به تراکم مناسب سلول‌ها روی غشای سیلیکونی کشت داده شدند. سپس بارگذاری چرخه‌ای کششی به ازای مدت زمان‌های بارگذاری متفاوت (۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت) و میزان کرنش ۱۰ درصد انجام می‌گیرد؛ در حالی که در هر آزمایش از نمونه کنترل استفاده می‌شود. مراحل بعد جدا کردن سلول از غشای سیلیکونی به وسیله تریپسین، اعمال فشار منفی به وسیله میکروپیپت، ثبت تغییر شکل سلولی به وسیله دوربین دیجیتال و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MATLAB است. در پایان جمع‌بندی نتایج و تحلیل آماری داده‌ها به ازای متغیرهای مکانیکی بارگذاری انجام شد.

#### ۲-۵- تحلیل آماری

هر آزمایش بارگذاری دینامیکی به ازای زمان مربوط، حداقل ۳ بار انجام می‌شود و در هر آزمایش بین ۳ تا ۵ سلول مورد آزمایش میکروپیپت قرار گرفتند. سلول‌ها بعد از برداشتن فشار مکش به حالت اول برگشتند، در غیر این صورت نتیجه

## ۳-۲- رفتار ویسکوالاستیک سلول‌های پوششی

مطالعات قبلی به‌وسیله میکروپیپیت نشان‌دهنده رفتار ویسکوالاستیک سلول‌های پوششی تحت مکش به درون میکروپیپیت است [۲، ۳۰]. یکی از خصوصیات مواد ویسکوالاستیک، تغییر طول ماده است در حالی که تحت تنش ثابت قرار گرفته است که از آن به‌عنوان «خزش» یاد می‌شود. شکل ۵ نشان‌دهنده رفتار متوسط خزشی سلول‌های پوششی تحت فشار ثابت و با گذشت زمان است. این نمونه‌های آزمایش شده تحت بارگذاری کششی قرار نگرفته‌اند. همان‌طور که در نمودار ۱ ملاحظه می‌شود بعد از گذشت حدود ۳۰۰ ثانیه، سلول پوششی که تحت فشار مکش ثابت قرار گرفته، افزایش طول تقریباً ثابتی پیدا می‌کند. این مقادیر با نتایج ارائه شده در مورد سلول‌های پوششی قابل مقایسه هستند [۳۰]. به‌عنوان مثال ساتو (Sato) و همکاران (۱۹۹۶) در پژوهشی دیگر به بررسی خواص مکانیکی سلول‌های پوششی با روش میکروپیپیت پرداختند. آن‌ها دریافتند که سلول‌های پوششی رفتار ویسکوالاستیک از خود نشان داده و بعد از حدود ۳۰۰ ثانیه افزایش طول ثابتی پیدا می‌کنند [۳۰].



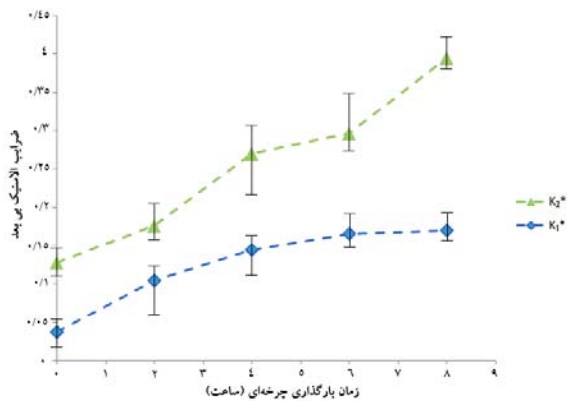
نمودار ۱ رفتار خزش سلول پوششی تحت مکش میکروپیپیت (تحت بارگذاری قرار نگرفته است).

## ۳-۳- تأثیر زمان بارگذاری بر ضرایب

## ویسکوالاستیک

نمودار ۲ تأثیر زمان بارگذاری را بر ضرایب ویسکوالاستیک بی‌بعد شده  $K_1^*$  و  $K_2^*$  نشان می‌دهد (به ترتیب  $P < 0.03$  و  $P < 0.04$ ). نمونه‌ها تحت فشار مکش ثابت میکروپیپیت قرار گرفته‌اند و ضرایب مذکور از تقسیم کردن ضرایب الاستیک  $K_1$  و  $K_2$  بر فشار مکش به‌دست می‌آیند. با در نظر گرفتن این‌که  $E$  (بخش الاستیک) مربوط به حالت تعادل پایدار در آزمایش میکروپیپیت است و از معادله ۱ داریم:  $E = (3K_1)/2$ ، بنابراین افزایش در مقدار  $K_1$  منجر به افزایش  $E$  سلول و در واقع سفت‌تر شدن سلول می‌شود.

مطالعات روی نمونه‌های کنترل، نمایانگر عدم تغییر قابل توجه خواص مکانیکی با گذشت زمان است. بدین ترتیب مشخص می‌شود که اعمال بارگذاری چرخه‌ای بر سلول‌های پوششی باعث سخت‌تر شدن این سلول‌ها می‌شود.



نمودار ۲ تأثیر زمان بارگذاری بر ضرایب الاستیک بی‌بعد  $K_1^*$  و  $K_2^*$  (به ترتیب  $P < 0.03$  و  $P < 0.04$ )

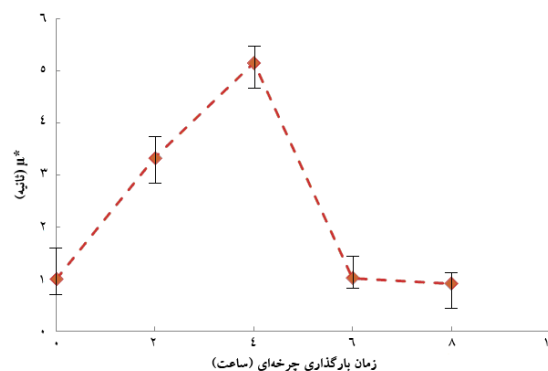
نمودار ۳ تغییرات  $\mu^*$  را برحسب زمان تحت کرنش چرخه‌ای نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).  $\mu^*$  از تقسیم کردن ضریب ویسکوز ( $\mu$ ) بر فشار مکش به‌دست می‌آید. نتایج بیانگر افزایش در ساعات اولیه و سپس کاهش بعدی است.

ترکیبات شیمیایی و تعبیر ریخت‌شناسی سلولی ما را به فهم بهتر عملکرد سلول رهنمون می‌سازد. چنین مطالعاتی برای به‌کارگیری در شرایط آزمایشگاهی سلول‌ها در مهندسی بافت ضروری است.

سلول‌های پوششی علاوه بر تنش برشی ناشی از جریان خون، در معرض کشش ناشی از فشار چرخه‌ای شریانی هستند. سلول‌های کشت داده شده برای کاربرد در مهندسی بافت بایستی خواص مشابهی داشته باشند. نتایج این تحقیق بیانگر آن بوده است که خواص ساختاری سلول‌های پوششی کشت داده شده در اثر بارگذاری کششی چرخه‌ای تغییر می‌یابد. بنابراین توصیه می‌شود برای کارهای آزمایشگاهی سلول‌های پوششی در مهندسی بافت، مانند بازسازی شریانی، محیط مکانیکی این سلول‌ها مانند کشش چرخه‌ای و تنش برشی در فرآوری این سلول‌ها توجه شود.

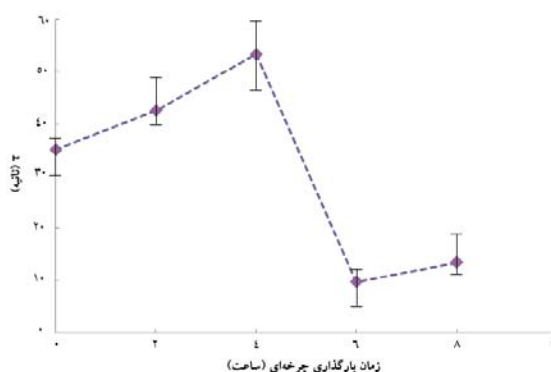
نتایج تحقیقات گذشته و تحقیق حاضر بیانگر تغییر در ریخت‌شناسی و خواص ساختاری سلول‌های پوششی بر اثر اعمال نیروی چرخه‌ای است. ریخت‌شناسی سلولی به‌گونه‌ای تغییر پیدا می‌کند که سلول در جهت کمترین مقدار تغییر شکل غشا جهت‌گیری پیدا می‌کند [۴۴]. در واقع همراه با جهت‌گیری سلولی، ساختار سلولی به‌گونه‌ای تغییر پیدا می‌کند که بخش الاستیک افزایش می‌یابد. مطالعات قبلی نشان‌دهنده تراکم و جهت‌گیری فیبرهای اکتین در داخل سلول همراه با بارگذاری چرخه‌ای است [۱۶، ۱۸، ۱۹، ۴۳، ۴۵]. جهت‌گیری ریخت‌شناختی سلول نیز به دلیل چنین تغییر ساختاری است. در واقع افزایش ضخامت، متراکم شدن و جهت‌گیری فیبرهای اکتین، همزمان باعث افزایش سفتی سلول می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که ساختار اسکلتی سلول و به‌ویژه اکتین تنش را به سلول منتقل کرده و در نگهداری شکل سلول و خواص مکانیک آن نقش ویژه‌ای دارد [۲].

مطالعات روی تأثیر نیروهای چرخه‌ای بر ساختار اسکلتی سلول بیانگر نقش مهم و ساختاری رشته‌های اکتین در بازسازی ساختار سلولی است. نتایج بیانگر این بوده‌اند که بعد از



نمودار ۳ تأثیر زمان بارگذاری بر  $\mu^*$  (P < ۰/۴۵)

نمودار ۴ تأثیر زمان بارگذاری بر ثابت زمانی ( $\tau$ ) را نشان می‌دهد (P < ۰/۴۷۵). ثابت زمانی نیز که از مشخصه‌های مواد ویسکوالاستیک است، در ساعات اولیه بارگذاری افزایش یافته و سپس در ساعت‌های بعدی کاهش می‌یابد.



نمودار ۴ تأثیر زمان بارگذاری بر ثابت زمانی ( $\tau$ ) (P < ۰/۴۷۵)

## ۴- بحث

سلول‌های بدن انسان همواره در معرض تنش‌های مختلفی قرار دارند و به تحریکات مکانیکی پاسخ مناسب می‌دهند. سلول‌های پوششی نیروهای وارده بر آن را مانند یک حسگر مکانیکی حس کرده و به آن پاسخ می‌دهد. بررسی نیروهای وارده بر سلول‌های پوششی و پاسخ آن در برابر این نیروها و همچنین تغییرات خواص مکانیکی و فیزیکی سلول، تغییر

۳ ساعت بارگذاری تک محوره، رشته‌های اکتین با ایجاد فیبرهای تنش در راستای حداقل تغییر شکل غشا، جهت‌گیری پیدا می‌کنند [۱۸].

مطالعات قبلی نشان‌دهنده نقش مهم رشته‌های اکتین از نظر پاسخ‌های سلول‌های پوششی به تحریکات مکانیکی است [۴۶]. این نتایج با این دیدگاه که ساختار اسکلتی سلول نقش مهمی در دریافت نیروهای مکانیکی و پاسخ از طریق تغییر ریخت‌شناسی سلولی دارد، هم‌خوانی دارد. به این دلیل خواص مکانیکی سلول‌های پوششی جزء مهمی از تحلیل پاسخ سلول‌های پوششی به تحریکات مکانیکی است.

به نظر می‌رسد خواص ویسکوالاستیک به دست آمده در این تحقیق نمایانگر نقش رشته‌های اکتین و تغییرات ساختاری مرتبط با آن باشد. با توجه به نمودار ۲ دیده می‌شود که افزایش زمان بارگذاری منجر به سفت‌تر شدن سلول و در نتیجه افزایش مقدار  $E$  و  $K_1^*$  می‌شود. در واقع با افزایش زمان بارگذاری رشته‌های اکتین شروع به پلیمر شدن کرده، افزایش یافته و کم کم دسته شدن و تشکیل فیبرهای تنش را شروع می‌کنند [۴۷-۴۹]. تحقیقات انجام شده درباره تأثیر تنش برشی بر سلول‌های پوششی بیانگر این بوده است که با افزایش زمان، سلول‌های پوششی تحت تأثیر تنش برشی سفت‌تر شده و مقدار بخش الاستیک سلول افزایش می‌یابد [۳۰].

ضریب  $K_2^*$  نشان‌دهنده ضریب الاستیک اولیه سلول است. به محض مکش سلول به درون میکروپیپت، سلول تا مقداری که بستگی به  $K_2^*$  دارد وارد میکروپیپت می‌شود و سلول تا این اندازه، رفتار الاستیک دارد. یعنی اگر تا این طول سلول کشیده شود و بعد رها شود، به حالت اولیه خود برمی‌گردد. با افزایش زمان بارگذاری مقدار  $K_2^*$  افزایش می‌یابد. نتایج آزمایش‌های حاضر نشان می‌دهد که خواص مکانیکی سلول در ۲ ساعت بعد از بارگذاری، تغییر قابل ملاحظه‌ای پیدا کردند. ضریب ویسکوزیته (Viscosity) سلول تا ۴ ساعت پس از بارگذاری، افزایش و سپس کاهش یافته است. چنین مسئله‌ای می‌تواند به این دلیل باشد که در ۴ ساعت اول، سلول شروع به ایجاد و

افزایش رشته‌های اکتین می‌کند، در حالی که در این زمان رشته‌ها به صورت دسته‌ای در نیامده‌اند؛ بنابراین می‌توانند به راحتی روی هم بلغزند که این امر افزایش ضریب ویسکوزیته را به همراه دارد. با تجمع و دسته‌بندی رشته‌های منفرد اکتین پس از چهار ساعت، فیبرهای ضخیم اکتین تشکیل می‌شوند که باعث کاهش ضریب ویسکوز می‌شود.

مقدار ثابت زمانی مدل ویسکوالاستیک متأثر از  $\mu^*$  و  $K_2^*$  است؛ بنابراین طبیعی است که آثار همزمان  $\mu^*$  و  $K_2^*$  بر این ثابت زمانی تأثیر بگذارد.

در تحقیق حاضر به مطالعه پارامتر تعداد چرخه‌های بارگذاری پرداخته شده است. با به‌کارگیری نتایج این تحقیق در حالت فیزیولوژیک می‌توان به بررسی پدیده بازسازی سلول‌های پوششی شریانی و پاسخ سلول به محرک‌های مکانیک محیطی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک پرداخت. سلول‌های پوششی با تغییر ریخت‌شناسی و ساختار در پاسخ به محرک‌های مکانیکی از طریق مکانیسم کنترلی حیاتی به کاهش آسیب‌های احتمالی می‌پردازد. در صورتی که میزان محرک‌های مکانیکی از سطح بحرانی افزایش یابد، کارایی مکانیسم‌های انطباق و بازسازی کاهش یافته به‌گونه‌ای که با آسیب به لایه سلول‌های پوششی عوامل ناخواسته خونی وارد دیواره شریان شده و با تجمع به تشکیل آتروما (Atheroma) پرداخته و در نهایت پلاک‌های آترواسکلروسیس حاصل می‌شوند.

در این تحقیق خواص مکانیکی دسته‌ای از سلول‌های پوششی تحت شرایط متفاوت بارگذاری مکانیکی به دست آمد. در حوزه مهندسی بافت برای جایگزینی بافت آسیب دیده توسط شریان مصنوعی تنها نباید به استفاده از سلول‌های کشت داده شده اکتفا نمود بلکه باید سلولی را برای کشت برگزید که مشابه‌ترین عملکرد را با شرایط درون‌بدن داشته باشد. نتایج حاصل از اعمال شرایط مختلف بارگذاری بر سلول‌های پوششی به منظور تولید شریان‌های مصنوعی نشان می‌دهد که استفاده از سلول‌های مهندسی شده در حوزه مهندسی بافت اجتناب‌ناپذیر است.



## ۵- تشکر و قدردانی

علوم پزشکی شهید بهشتی در فراهم‌آوری امکانات آزمایشگاهی میکروپپتینگ (Micropepting)، و انستیتو پاستور ایران در فراهم‌آوری سلول‌های حیاتی صمیمانه قدردانی می‌شود.

از همکاری‌های مؤثر دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه صنعتی امیرکبیر در فراهم‌آوری امکانات سخت‌افزاری، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی در پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه

## ۶- منابع

- [1] Khan MIG. Encyclopedia of heart diseases: Academic Press, New York, 2006; p: 118.
- [2] Sato M, Theret DP, Wheeler LT, Ohshima N, Nerem RM. Application of the micropipette technique to the measurement of cultured porcine aortic endothelial cell viscoelastic properties. *J Biomech Eng* 1990; 112(3): 263-8.
- [3] Kuchan MJ, Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; 264(1 Pt 2): H150-6.
- [4] Jen CJ, Jhiang SJ, Chen HI. Invited review: effects of flow on vascular endothelial intracellular calcium signaling of rat aortas ex vivo. *J Appl Physiol* 2000; 89(4): 1657-62.
- [5] Punchard MA, Stenson-Cox C, O'cearbhaill ED, Lyons E, Gundy S, Murphy L, Pandit A, McHugh PE, Barron V. Endothelial cell response to biomechanical forces under simulated vascular loading conditions. *J Biomech* 2007; 40(14): 3146-54.
- [6] Azuma N, Duzgun SA, Ikeda M, Kito H, Akasaka N, Sasajima T, Sumpio BE. Endothelial cell response to different mechanical forces. *J Vasc Surg* 2000; 32(4): 789-94.
- [7] Stamenović D, Wang N. I Invited review: engineering approaches to cytoskeletal mechanics. *J Appl Physiol* 2000; 89(5): 2085-90.
- [8] Moore MM, Goldman J, Patel AR, Chien S, Liu SQ. Role of tensile stress and strain in the induction of cell death in experimental vein grafts. *J Biomech* 2001; 34(3): 289-97.
- [9] Yamada H, Ando H. Orientation of apical and basal actin stress fibers in isolated and subconfluent endothelial cells as an early response to cyclic stretching. *Mol Cell Biomech* 2007; 4(1): 1-12.
- [10] 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-1alpha) in tendon fibroblasts. *J Orthop Res* 2004; 22(4): 847-53.
- [11] Doyle AM, Nerem RM, Ahsan T. Human mesenchymal stem cells form multicellular structures in response to applied cyclic strain. *Ann of Biomed Eng* 2009; 37(4): 783-93.
- [12] Yee A, Bosworth KA, Conway DE, Eskin SG, McIntire LV. Gene expression of endothelial cells under pulsatile non-reversing vs. steady shear stress; comparison of nitric oxide production. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(4): 571-9.
- [13] Sato M, Ohashi T. Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli. *Biorheology* 2005; 42(6): 421-41.

- [14] Deguchi S, Maeda K, Ohashi T, Sato M. Flow-induced hardening of endothelial nucleus as an intracellular stress-bearing organelle. *J Biomech* 2005; 38(9): 1751-9.
- [15] Ethier CR, Read AT, Chan D. Biomechanics of Schlemm's canal endothelial cells: influence on F-actin architecture. *Biophys J* 2004; 87(4): 2828-37.
- [16] Sipkema P, van der Linden PJ, Westerhof N, Yin FC. Effect of cyclic axial stretch of rat arteries on endothelial cytoskeletal morphology and vascular reactivity. *J Biomech* 2003; 36(5): 653-9.
- [17] Dangaria JH, Butler PJ. Macrorheology and adaptive microrheology of endothelial cells subjected to fluid shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(5): 1568-75.
- [18] Wang JH, Goldschmidt-Clermont P, Wille J, Yin FC. Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching. *J Biomech* 2001; 34(12): 1563-72.
- [19] Haghhighipour N, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Amini S, Amanzadeh A, Khorasani MT. Topological remodeling of cultured endothelial cells by characterized cyclic strains. *Mol Cell Biomech* 2007; 4(4): 189-99.
- [20] Von Offenbergsweeney N, 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 Commun* 2005; 329: 573-82.
- [21] Thubrikar MJ, Robicsek F. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg* 1995; 59(6): 1594-603.
- [22] Chen PY, Lin AY, Lin YS, Seki Y, Stokes AG, Peyras J, Olevsky EA, Meyers MA, McKittrick J. Structure and mechanical properties of selected biological materials. *J Mech Behav Biomed Mater* 2008; 1(3): 208-26.
- [23] Van Vliet KJ, Bao G, Suresh S. The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules. *Acta Materialia* 2003; 51(19): 5881-905.
- [24] Mofrad MRK, Kamm RD. *Cytoskeletal Mechanics: Models and Measurements*: Cambridge University Press, New York, 2006; p: 26.
- [25] Bao G, Suresh S. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nat Mater* 2003; 2(11): 715-25.
- [26] Evans EA. New membrane concept applied to the analysis of fluid shear- and micropipette-deformed red blood cells. *Biophys J* 1973; 13(9): 941-54.
- [27] Needham D, Hochmuth RM. A sensitive measure of surface stress in the resting neutrophil. *Biophys J* 1992; 61(6): 1664-70.
- [28] Evans E, Yeung A. Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophys J* 1989; 56(1): 151-60.
- [29] Tan SC, Pan WX, Ma G, Cai N, Leong KW, Liao K. Viscoelastic behaviour of human mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol* 2008; 9: 40.
- [30] Sato M, Ohshima N, Nerem RM. Viscoelastic properties of cultured porcine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *J Biomech* 1996; 29(4): 461-7.
- [31] Merryman WD, Bieniek PD, Guilak F, Sacks MS. Viscoelastic properties of the aortic valve

- interstitial cell. *J Biomech Eng* 2009; 131(4): 041005.
- [32] Sato M, Levesque MJ, Nerem RM. Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis* 1987; 7(3): 276-86.
- [33] Hatami J, Tafazzoli-Shadpour M, Haghhighipour N, Mohammad Ali Shokrgozar, Janmaleki M. Characterization of alterations in elastic modulus of cultured human umbilical vein endothelial cells subjected to cyclic tension. XXII Congress of the International Society of Biomechanics; Cape Town, South Africa; 2009.
- [34] Byfield FJ, Aranda-Espinoza H, Romanenko VG, Rothblat GH, Levitan I. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys J* 2004; 87(5): 3336-43.
- [35] Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech* 2001; 34(12): 1545-53.
- [36] Friedl P, Tatje D, Czpl R. An optimized culture medium for human vascular endothelial cells from umbilical cord veins. *Cytotech* 1989; 2(3): 171-9.
- [37] Hsu SH, Tsai IJ, Lin DJ, Chen DC. The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts. *Med Eng Phys* 2005; 27(3): 267-72.
- [38] Trickey WR, Lee GM, Guilak F. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage. *J Orthop Res* 2000; 18(6): 891-8.
- [39] Trickey WR, Baaijens FP, Laursen TA, Alexopoulos LG, Guilak F. Determination of the Poisson's ratio of the cell: Recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration. *J Biomech* 2006; 39(1): 78-87.
- [40] Trickey WR, Vail TP, Guilak F. The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2004; 22(1): 131-9.
- [41] Guilak F, Tedrow JR, Burgkart R. Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269(3): 781-6.
- [42] Barron V, Brougham C, Coghlan K, McLucas E, O'Mahoney D, Stenson-Cox C, McHugh PE. The effect of physiological cyclic stretch on the cell morphology, cell orientation and protein expression of endothelial cells. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(10): 1973-81.
- [43] Wang JH. Substrate deformation determines actin cytoskeleton reorganization: A mathematical modeling and experimental study. *J Theor Biol* 2000; 202(1): 33-41.
- [44] Yamada H, Takemasa T, Yamaguchi T. Theoretical study of intracellular stress fiber orientation under cyclic deformation. *J Biomech* 2000; 33(11): 1501-5.
- [45] Wang JH, Goldschmidt-Clermont P, Yin FC. Contractility affects stress fiber remodeling and reorientation of endothelial cells subjected to cyclic mechanical stretching. *Ann Biomed Eng* 2000; 28(10): 1165-71.

- [46] Ngu H, Lu L, Oswald SJ, Davis S, Nag S, Yin FC. Strain-induced orientation response of endothelial cells: effect of substratum adhesiveness and actin-myosin contractile level. *Mol Cell Biomech* 2008; 5(1): 69-81.
- [47] Dartsch PC, Betz E. Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation. *Basic Res Cardiol* 1989; 84(3): 268-81.
- [48] Iba T, Sumpio BE. Morphological response of human endothelial cells subjected to cyclic strain in vitro. *Microvasc Res* 1991; 42(3): 245-54.
- [49] Takemasa T, Sugimoto K, Yamashita K. Amplitude-dependent stress fiber reorientation in early response to cyclic strain. *Exp Cell Res* 1997; 230(2): 407-10.