

دراسة مساهمة في تحديد دور عامل الاستجابة المصلي SRF في تطور أوعية الأطراف الأمامية عند أجنة الفئران الطافرة

بشير الزالق

قسم البيولوجيا الحيوانية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

تاريخ الإيداع 2007/09/12

قبل للنشر في 2008/07/15

الملخص

يعدُّ عامل الاستجابة المصلي SRF بروتيناً منظماً وناسخاً للعديد من المورثات الأخرى، وهو ينظم بشكل خاص عمل المورثات المنظمة لتطور الجملّة القلبية الوعائية Cardiovascular System .

استندت هذه الدراسة إلى تقانة الكيمياء النسيجية المناعية Immunohistochemistry التي أظهرت أن العامل SRF يؤثر في تطور أوعية الدماغ والأطراف الأمامية عند أجنة الفئران.

إن الدور المؤكد للعامل SRF يكمن في عملية تكوّن الأوعية الدموية Angiogenesis عند أجنة الفئران بعمر 12.5 و13.5 يوماً. وقد أظهرت نتائج الدراسة بالمجهر الإلكتروني أن هذا العامل يؤثر في تطور الخلايا البطانية الوعائية Endothelial Cells (E.C) الخاصة بالشعيرات الدموية، فهو يقوم بتنظيم وضبط معقدات الاتصال الموثقة Tight Junction بين الأغشية الخلوية لهذه الخلايا، مما يمنع عادة التسرب الدموي Extravasations والنزف Hemorrhage.

أما دور العامل SRF الطافر (غير الفعال Inactive) (والذي تعطلت فعاليته سابقاً باستخدام الجملّة الوراثية Cre-LoxP فيسبب إحداث خلل وظيفي في الأغشية الخلوية ذات الاتصال المحكم، مما يؤدي إلى حدوث ارتباطات ضعيفة تفقد إلى زيادة نفوذية الشعيرات الدموية ومن ثم خروج عدد كبير من الكريات الدموية الحمراء. تسبب هذه الأحداث نزفاً دمويًا مميتاً للأجنة في اليوم الرابع عشر من التشكل الجنيني.

علاوة على ذلك فإن الخلايا البطانية الوعائية E.C. السوية تحاول إعادة بناء معقدات الاتصال الموثقة في حالة النزف الدموي، وبالمقابل فإن مثل هذه الخلايا تكون غير قادرة على إعادة بناء هذه المعقدات بوجود الشكل الطافر للعامل SRF فيصبح من العسير عليها إعادة قولبتها Remodeling، فعوضاً عن توطيد المعقدات بعد النزف نجد أن الخلايا الوعائية البطانية الطافرة تظهر اتصالات غير منتظمة عشوائية ليس لها القدرة على منع النزف أو الحد منه.

الكلمات المفتاحية: عامل الاستجابة المصلي، أوعية الأطراف، تكوّن الأوعية الدموية.

A Contributory Study in the Determing Role of the Serum Response Factor in the Limb Vasculature Development in Embryonic Mutant Mice

Bashir AL-Zalek

Department of animal Biology, Faculty of sciences, Damascus University, Syria

Received 12/09/2007

Accepted 15/07/2008

ABSTRACT

Serum response factor (SRF) is a protein that regulates the transcription of several other genes. It regulates especially cardiovascular system developmental regulatory genes.

This study which was based on the immunohistochemistry showed that SRF influence the brain and limb vasculature development in the mice embryo.

SRF has a crucial role in angiogenesis in mice embryo aged 12.5 to 13.5 days. Electronic microscope findings showed that SRF influence the development of the endothelial cells (E.C.) of the capillaries. SRF regulates and control the cellular membrane tight junctions which usually prevents the red blood cells extravasations preventing hemorrhages.

SRF inactivation was achieved using Cre-loxP system. Mutant (Inactive) SRF caused cellular membrane tight junctions dysfunction leading to weak cellular junctions causing increased permeability of the capillaries. This process caused lethal hemorrhages at the age of 14 days of the embryonic development

Furthermore, normal E. C. try to re-establish the tight junctions in case of hemorrhage. However, in mutant SRF E. C. are not able to re-establish the junctions and fail to remodel. Instead of re-establishing the tight junctions post-hemorrhage mutant E. C. show random irregular weak junctions that are unable to prevent further hemorrhage.

Key Words: Serum Response Factor, Limb Vasculature, Angiogenesis.

المقدمة

تتمحور البحوث البيولوجية الحديثة اليوم حول مسألة عزل المورثات النوعية والتعرف على وظائفها، وذلك من خلال عمليات التحوير الوراثي Transgenic حيوانات التجربة، أو إحلال جينات محل أخرى في الجينوم الحيواني. تقدم مثل هذه التقانات معلومات مهمة عن وظيفة الجينوم الحيواني والآليات التي تنظم الوظائف الحيوية لجسم الكائن الحي.

اعتمد الباحثون مثل هذه التقانات الحيوية لتحقيق أهداف علمية مهمة يكون لها صدى كبير في مكافحة الأمراض البشرية وإنتاج الأدوية واللقاحات، وكذلك إنتاج البروتينات الغذائية وتحسين الإنتاج الحيواني (عمليات التحسين الوراثي) (1).

تعدُّ فئران التجارب من أكثر الحيوانات الثديية نجاحاً في عمليات التحوير الوراثي نظراً لقربها الوراثية من الجنس البشري. تعتمد الطريقة العملية في إحداث مثل هذا التحوير الوراثي على عملية التآشير Recombination أي ربط جزء من الحمض الريبي النووي المنقوص الأوكسجين الـ DNA الخاص بالجينوم البشري (وهو الجزء الطافر الحامل لمرض معين) إلى الجينوم الحيواني الموجود في البويضة المخصبة للفأرة بالحقن المجهرى Microinjection عندئذ يكون المولود الجديد للفأرة حاملاً للـ DNA الغريب الناقل للمرض البشري، وبذلك يمكن التحري عن المرض عند الفئران والتعرف على أعراضه، كما يمكن حقن جزء من الـ DNA البشري (الحامل لمورثة طافرة) في الخلايا الجنينية (مثل الخلايا الأرومية الليفية Fibroblastes) وذلك بهدف التحري عن وظيفة تلك الجين الطافرة المنقولة للخلية المضيفة (2). تشير البحوث إلى أن تشكل الأعضاء يخضع للتأثير المباشر لعمل المورثات المعبرة والمنظمة للنمو، حيث وجد أن المورثة التي يرمز لها بـ NKx 2.5 تؤدي دوراً مهماً في تشكيل الحواجز القلبية في عضلة القلب، وكذلك في تكوّن الأوعية التابعة للقلب عند جنين الإنسان. تحمل هذه المورثة على الصبغي (5q35) وفي حال طفرتها تحدث عيوب واضحة في الحاجز الأذيني في قلب الجنين (3).

يتكون عامل الاستجابة المصلي Serum Response Factor (=SRF) من بروتين ذي وزن جزيئي يقدر بـ 67 كيلو دالتون ويعمل بشكله الفعال على تطوير العضلة القلبية عند الجنين والكائن البالغ، يرمز لهذا البروتين المورثة SRE/ CArG ذات التعاقب [CC(AT)6GG] (4).

يتمثل دور العامل SRF بالإشراف على النمو والتمايز العضلي، وله دور فعال في تطور الجملة القلبية الوعائية Cardiovascular System، وبإمكان هذا العامل أن ينظم

عمل أكثر من 50 جينة (تعمل في مستوى ثلاث سلالات عضلية)، كما وجد أن هذا العامل يوجد بنسبة 50% في الألياف العضلية الملساء الخاصة بالأوعية الدموية (5).

تمكن الباحثون من إجراء تحوير وراثي على المورثة الخاصة بالعامل SRF، وذلك بإدخال جزء من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الـ DNA الطافر والحامل للتعاقب (Cre-LoxP) بين أكسونات مورثة العامل SRF؛ بهدف التعرف على الدور الحقيقي لهذا العامل ولاسيما دوره في تطور الأوعية الدموية (شرايين وأوردة) والجملة القلبية الوعائية عند الفئران البالغة وأجنيتها في مرحلة ما بعد الولادة Postnatal، وقد تبين أن هذا العامل يحدث عندما يكون طافراً خلافاً في سعة حجرات القلب وتموتاً في العضلة القلبية (4 و6). يرى آخرون أن الشكل الطافر للعامل SRF يعمل على خفض عدد الألياف العضلية الملساء الخاصة بالشريان الأبهرى الظهري Dorsal Aorta عند الفئران البالغة، ويحدث هذا العامل عند أجنة الفئران بعمر 10.5 يوماً ترققاً في الحواجز القلبية مما يؤدي إلى اتساع حجرات القلب، ومن ثم يظهر خلل في حركته (5).

يقوم العامل SRF على المستوى الخلوي الجزيئي بإحداث خلل في تنظيم عمل الأكتين Actin الموجود في هيولى الألياف العضلية الملساء الخاصة بالأوعية الدموية المتميزة، يتوافق بخلل بنيوي للأوعية الدموية والخلايا العضلية القلبية، عندما يحدث تراجع في التعبير للمورثة الطافرة للعامل SRF. وبناء على هذه النتيجة يرى الباحثون أن لهذا العامل دوراً فعالاً في تنظيم عملية التقلص في الهيكل الخلوي Cytoskeleton للألياف العضلية الملساء في الأوعية الدموية والخلايا العضلية القلبية Cardiomyocytes (7).

تشير البحوث إلى وجود نوع آخر من البروتينات يمكن أن يؤدي عملاً مشابهاً لبروتين العامل SRF هو بروتين الدسمين Desmin الذي تم عزل المورثة المسؤولة عن تركيبه وهي المورثة المحمولة الصبغي 2 (2q35)، تخضع مورثة الدسمين لعمل تنظيمي من قبل العامل SRF وبشكل خاص عندما يعمل الدسمين على تشكيل وتنشيط الليفيات في الألياف العضلية الملساء الخاصة بالشرايين دون الأوردة (8).

يشير باحثون آخرون إلى أن الدسمين الذي يتوضع في أجسام الألياف العضلية الملساء له دور فعال في تنظيم عملها، وينظم أيضاً عمل ألياف العضلة القلبية، وإن عوز هذا البروتين (أو طفور المورثة المسؤولة عن اصطناعه) يكون باعثاً على الاعتلال القلبي Cardiomyopathy، واعتلال العضلات الملساء للأوعية الدموية (9 و10 و11).

يهدف هذا البحث إلى إلقاء الضوء على دور عامل الاستجابة المصلي SRF في تكوّن الأوعية الدموية الخاصة بأوعية الأطراف الأمامية عند أجنة الفئران الطافرة (أو المحورة وراثياً) والمتمثلة بالشعيرات الدموية والخلايا الوعائية البطانية المشكلة لجدرانها.

مواد البحث وطرائقه

1- طريقة الحصول على أجنة الفئران الطافرة (أو المحورة وراثياً):

يجرى التزاوج بين ذكور بالغه ومحورة وراثياً بعامل الاستجابة المصلي SRF مع عدد من الإناث (السوية غير المحورة وراثياً) من السلالة السوداء B.strain والتي يرمز لها بالرمز (C57 Black /6). من أجل الحصول على أجنة طافرة يوضع ذكر واحد (بالغ جنسياً) مع 4 إلى 5 إناث ضمن قفص واحد مفروش بنشارة الخشب مزوداً بالشراب والغذاء المركز، وضعت الأقفاص في حظيرة كلية العلوم التابعة لجامعة باريس 6- (فرنسا)، حيث تتوفر شروط جيدة من النظافة والتكييف.

تفحص الإناث في اليوم التالي للتأكد فيما إذا حدث الحمل أم لا، وذلك بمراقبة ظهور السداة المهبليّة. تعد الأيام لحساب عمر الجنين بدءاً من اليوم الأول الذي تظهر فيه السداة المهبليّة. نضحي بالأنثى الحاملة للأجنة بعمر 0.5 ± 12 يوماً أو بعمر 0.5 ± 13 يوماً وهي الأجنة التي استخدمت بالعمل التجريبي.

نستأصل الأجنة تحت عدسة المكبرة ذات العينيتين (ماركة Olympus) الموصولة إلى آلة تصوير رقمية بعد عملية تشريح الأنثى الحامل. حيث صور عدد من الأجنة العادية (النمط الوحشي) وأخرى من النمط الطافر للتمييز بينهما مورفولوجياً.

حصل الحمل عند أربع إناث في هذا العمل التجريبي، حيث كانت الأنثى الواحدة تحمل بين 6 إلى 8 أجنة (بعض الأجنة من النمط الوحشي وبعضها الآخر من النمط الطافر)، درست أربع سلاسل تجريبية من الأجنة السوية (الأجنة الشاهدة) والأجنة الطافرة الحاملة للعامل SRF الطافر، وقد جرى إحداث الطفرات في العامل SRF بإدخال الجملة الطافرة Cre-LoxP على مورثة هذا العامل وذلك في علبه مادم MADS-box واستخدام التفاعل السلسلي للبوليمراز PCR، وذلك من قبل الباحثين العاملين في مختبر الوراثة والفزيولوجيا المرضية للأنسجة العضلية Génétique et pathophysiologie des tissues musculaire, U. Paris 6 (وهو المختبر الذي أجري فيه جزء من هذا البحث).

تركزت الدراسة على الأطراف الأمامية للأجنة الطافرة والشاهدة (السوية) واستخدمت فيها تقانة المجهر الإلكتروني على نطاق واسع.

2- التقانة الكيميائية النسيجية المناعية المستخدمة في تحديد مكان عمل العامل SRF عند أجنة الفئران:

استخدمت تقانة الكيمياء النسيجية المناعية Immunohistochemistry وتحديد الطرائق المناعية لأنزيم البيروكسيداز Immunoperoxidase للتعرف على مواضع

وجود عامل الاستجابة المصلي SRF، حيث ثبتت أجنة الفئران بعمر 12.5 يوماً بالبارافورم ألدهيد Paraformaldehyde بتركيز 1% وأدمجت الأجنة المثبتة في شمع البرافين، ثم أجريت مقاطع ذات ثخانة 5µm للأجنة المدمجة بالبرافين باستخدام المقطاع المجهرى (أوالمشراح الدقيق) Microtome ووضعت المقاطع على صفائح زجاجية مجهرية.

نزع البرافين من المقاطع باستخدام الاكزيلول، ثم ينزع الاكزيلول من أنسجة الأجنة بواسطة كحولات متناقصة التركيز، كما استخدم الموقى الفوسفاتي (PBS)، واستخدم محلول لحمض الليمون وفي درجة الحموضة PH=6 لإظهار الموقع المستضدي، حيث وضعت الصفائح الزجاجية في هذا المحلول مدة ليلة كاملة، ثم خمد البيروكسيداز بمحلول موقى PBS/ ميثانول وتغسل الصفائح بالمحلول الموقى، ولدعم نفوذية المحلول نستخدم محلول التريبتون Triton بتركيز 10% وأضيف الضد الأولي (دون غسل) وذلك في غرفة رطبة (الثلاجة)، ثم أضيف إلى العينات الضد الثانوي المعلم بأنزيم البيروكسيداز HRP، ثم نظهر موقع المستضد والضد بالإظهار اللوني باستخدام محلول DABs/ GMA والملون الحيوي الهيماتوكسلين Hematoxyline المحلول بالكحول الإيثانولي 70% وحمض كلور الماء 1% والذي يزرق في الموقى PBS. وبعدها أزيل الماء من الأنسجة باستخدام حمامات متزايدة التركيز من الكحول والاكزيلول. ثم سترت الصفائح بساترات زجاجية مستخدمين مادة لاصقة هي مادة Ekit، حتى أصبحت العينات جاهزة للفحص المجهرى.

3- تثبيت أطراف الأجنة الطافرة والسوية وفق تقانات المجهر الالكتروني:

استخدمت الأطراف الأمامية للأجنة بعمر 12.5 و13.5 يوماً كعينات لدراسة شبكة الأوعية الدموية في هذه الأطراف، وهي تشكل جزءاً من الجملة القلبية الوعائية.

استخدم المثبت الأولي الغلوتارألدهيد بتركيز 2% وبدرجة حموضة PH=7,4، مدة 3 ساعات في حرارة المخبر (22 درجة مئوية)، ثم غسلت العينات بالمحلول الموقى لـ كاكوديلا الصوديوم Caccodylate بتركيز 0.2M وPH=7,4. أما المثبت التالي فهو عبارة عن رابع أوكسيد الأوسميوم (OsO4) بتركيز 1% (يجري التثبيت في الظلام وفي حرارة 4 مئوية مدة ساعة واحدة). ثم غسلت العينات بالكاكوديلا 3 حمامات مدة كل منها 10 دقائق، ثم أزيل الماء بشكل تدريجي في الكحولات 30 و 70 بالمئة مع أسيتات اليورانيوم A.U في حرارة المخبر، وذلك في حمامات من كحولات متزايدة التركيز 70، 95، 100°، ثم غمرت العينات في خليط من الكحول 100 مع الإيبون EPON (3 حمامات بمدد زمنية تتراوح بين الساعة وحتى ساعة 12 وبنسب مختلفة لهذه الحمامات)، تلا ذلك غمر العينات بالايون الصافي (3 حمامات). وأخيراً أدمجت العينات ضمن قوالب من الايبون النقي والذي يصلب عادة في محم بدرجة 60 درجة مئوية مدة 48 ساعة.

تقطيع العينات وتلوينها:

أجري نمطان من المقاطع لكل عينة من العينات:

1- المقاطع بثخانة 5µm ولونت بأزرق المتيلين، وهي مقاطع عرضية لراحة اليد لدى أجنة الفئران (السوية والطافرة)، فحصت هذه العينات بالمجهر الضوئي وأخذت لها صور عديدة.

2- المقاطع الخاصة بالمجهر الإلكتروني: كانت بثخانة 700-800 Å أنغستروم، ويتم الحصول عليها باستخدام المقطع المجهرى الفائق Ultramicrotome.

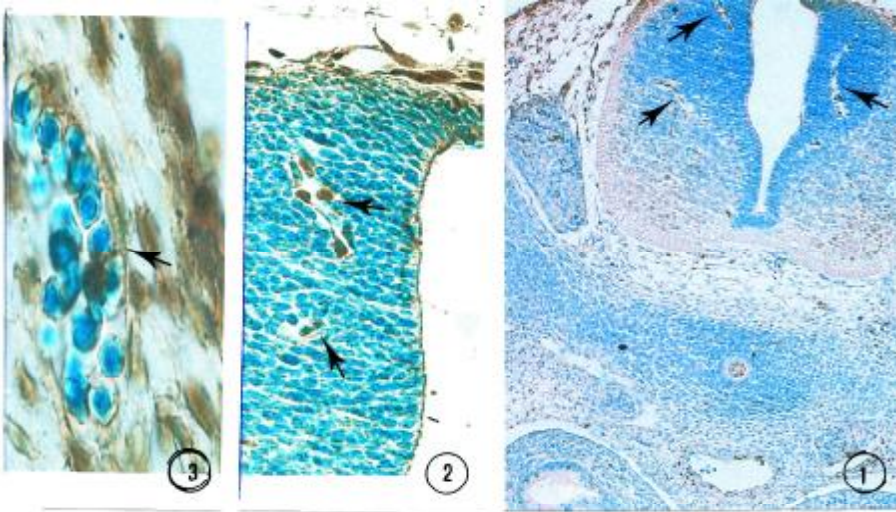
تحمل المقاطع الرقيقة على شبكة نحاسية grid، أما التلوين فيكون باستخدام أسيتات اليورانيل A.U. (2-10 دقيقة) ثم تغسل بالماء المقطر (3 مرات)، ثم يتم التباين اللوني باستخدام سترات الرصاص تلاً ذلك غسل بالماء المقطر ثم التجفيف، توضع العينات الملونة في علب بتري صغيرة وتغلف بورق الألمنيوم لحجب الضوء عن العينات؛ وبذلك تصبح العينات جاهزة للفحص بالمجهر الإلكتروني، وقد استخدم المجهر الإلكتروني ماركة Philips Bio-Twin في مخابر جامعة باريس 7- Université de Paris , Denis Diderot معهد جاك مونو Institut de Jaque Monod.

النتائج**1-تحديد مواضع عمل عامل الاستجابة المصلي SRF :**

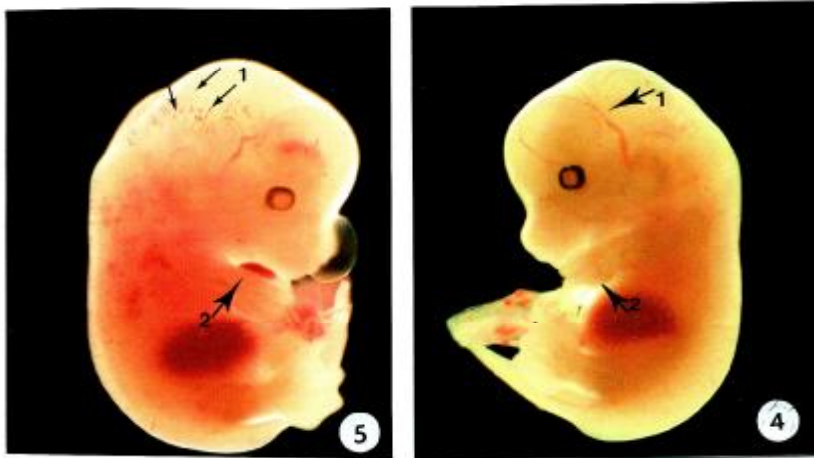
تشير نتائج طريقة الكيمياء الخلوية المناعية (الخاصة بأنزيم البيروكسيداز) والمطبقة على مقاطع كاملة لأجنة الفئران الطبيعية (الشاهدة) إلى وجود مواد معلمة بلون بني تظهر في مستوى الأوعية الدموية للأنبوب العصبي (لوحة 1 شكل 1) وهي تمثل في الواقع أماكن وجود العامل SRF، ومثل هذه المواد المعلمة تظهر أيضاً في مستوى الأوعية الدموية الخاصة بالأطراف الأمامية لأجنة الفئران (لوحة 1 شكل 2). وقد اعتمدت هذه النتائج من أجل التعرف على الأماكن الطبيعية والشاذة في جملة أوعية الأطراف والتي شكلت محور اهتمام هذا البحث.

2-تمييز الأجنة الحاملة للعامل SRF بشكله الطافر (أو المحور وراثياً):

من الملاحظ على الشكل الخارجي للأجنة الحاملة للعامل SRF بشكله الطافر (غير الفعال Inactive) حدوث نزف دموي Hemorrhages يظهر في مستوى الرأس (الدماغ) وفي مستوى الأطراف الأمامية (راحة اليد) (لوحة 1 شكل 3) للأجنة بعمر 12.5 و 13.5 يوماً. لا يلاحظ مثل هذه النزف عند الأجنة العادية (الشاهدة) (لوحة 1 شكل 4) وهي في العمر نفسه من التشكل الجنيني ولدى الأنثى نفسها.



شكل رقم 1- مقطع في جنين فار بعمر 12,5 يوماً (فار شاهد) معالج بطريقة الكيمياء الخلوية المناعية (باستخدام أنزيم البيروكسيداز) ، تشير الأسهم إلى أماكن الأوعية الدموية في مستوى الأنتوب العصبي ، وقد اصطبغت باللون البني وهذا يشير إلى أماكن عمل العامل SRF . X10
شكل رقم 2- تكبير لقطاع من الأنتوب العصبي لإظهار الوعاء الدموي المعلم الخاص بالعامل SRF . X20
شكل رقم 3- مقطع في مستوى الطرف الأمامي للجنين وقد ظهر فيه وعاء دموي معلم باللون البني X100



شكل رقم 4- يمثل الشكل الخارجي لجنين فار بعمر 13,5 يوماً (جنين شاهد) غير طافر ، 1 - تشير الأسهم لدماء الجنين والأوعية الدموية الطبيعية ، 2- الطرف الأمامي مع ظهور براعم الأصابع . X2.5
شكل رقم 5- يمثل الشكل الخارجي لجنين طافر بالعامل SRF وهو بعمر 13,5 يوماً وقد ظهر عليه النزف الدموي في مستوى الدماغ (1) وتشير الأسهم الصغيرة إلى انتشار الأوعية ، كما يلاحظ النزف في مستوى أحد الأصابع الطرف الأمامي (2) . X2.5

اللوحة (1)

3- دراسة توزيع الأوعية الدموية للأطراف الأمامية لأجنة الفئران:

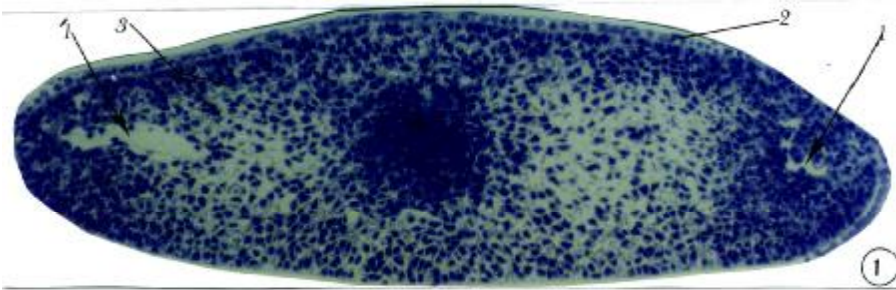
تتطلب الأوعية الدموية للأطراف الأمامية من الشريان المحوري الطرفي وتتوزع بشكل قوس في محيط راحة اليد.

تظهر المقاطع العرضية النسيجية المتسلسلة لراحة اليد (بدءاً من حافتها الأمامية) وجود وعاء دموي مستعرض، وهذا الوعاء يتكون في الواقع من شعيرة دموية بلمعة واسعة يظهر في لمعتها عدد من الكريات الدموية الحمراء، وعلى المقطع العرضي الأكثر عمقاً في راحة اليد تظهر بشكل شعيرتين دمويتين في جانبي المقطع، وهذا يشير إلى امتداد القوس الدموية على جانبي راحة اليد حيث يمر المقطع في مستواها (لوحة 2 شكل 1)، ويتكون جدار الشعيرة من عدد من الخلايا الوعائية البطانية Endothelial Cells ذات الشكل المغزلي تتماسك حافاتها المستدقة وتحفظ الدم ضمنها وتمنعه من الخروج إلى الوسط الخارجي (لوحة 2 شكل 2)، كما تلاحظ شعيرات دموية متفرقة ذات لمعات مختلفة السعة يكون أصغرها بقطر يزيد قليلاً على قطر الكرية الدموية (لوحة 2 شكل 3).

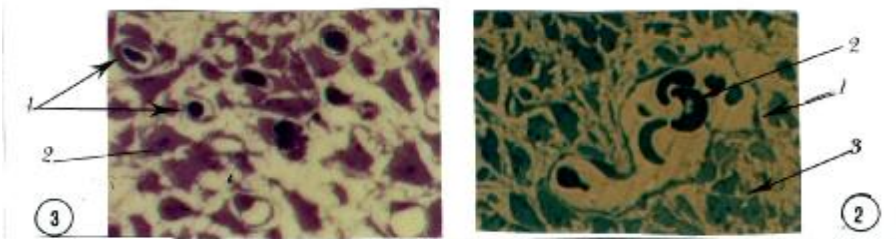
تبدأ براعم الأصابع بالظهور عند الأجنة بعمر 13.5 يوماً، ضمنها نسيج غضروفي مشتق من الخلايا الميزانشيمية Mesenchymes المتوضعة في الوسط المحيط بالشعيرات الدموية. يظهر في محيط كل إصبع عدة شعيرات دموية (لوحة 2 شكل 4)، تسبق في تشكلها تشكل الشرايين والأوردة التي تشاهد عند الفأر البالغ.

أما وضع الشعيرات الدموية في راحة اليد لدى الأجنة الطافرة فقد أظهرت نزفاً دمويًا واضحاً، حيث تبدي الشعيرة الدموية لمعة واسعة وقد امتلأت بالكريات الدموية (لوحة 2 شكل 5).

ومن خلال الدراسة المقارنة للعديد من المقاطع لدى الأجنة الطافرة والأجنة العادية (الشاهدة) تبين أن عدد الشعيرات الدموية لدى النمط الطافر أقل مما عليه لدى النمط السوي.

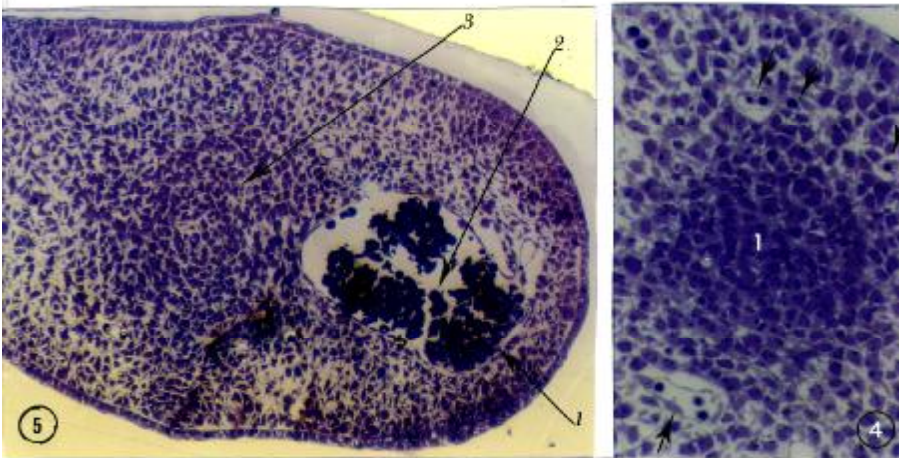


شكل رقم 1: يمثل مقطع عرضي في راحة اليد عند جنين الفأر شاهد بعمر 12,5 يوماً. يظهر شعيرات دموية جانبية (1 و 1') يشاهد في لمعتها بعض الكريات الدموية الحمراء. يحاط المقطع بخلايا ظهارية (2)، كما تشاهد على المقطع العديد من الخلايا الميزانشيمية (أو المتوسطة) (3)، X10.



شكل رقم 2: تكبير إحدى الشعيرات الدموية الكبيرة لإظهار الخلايا الوعائية البطيئة (1) التي تشكل جدار الشعيرة. مع مشاهدة الكريات الدموية الحمراء (2). (3) خلايا ميزانشيمية. X40.

شكل رقم 3: يظهر شعيرات دموية لا يزيد قطرها عن قطر الكرية الحمراء، وتشير الأسهم إليها (1)، (2) الخلايا الميزانشيمية. X40.



شكل رقم 4: مقطع عرضي في مستوى برعم الإصبع المضروب في (1)، وتشير الأسهم إلى أماكن توزيع الشعيرات الدموية المحيطة بالإصبع. X20.

شكل رقم 5: جزء من مقطع عرضي في راحة يد جنين الفأر الطافر بالعمل SRF، يظهر شعيرة دموية في حالة النزف (1)، (2) خزانة والكريات الدموية. (3) بدء ظهور البراعم الإصبعية عند جنين الفأر بعمر 13,5 يوماً، X10.

اللوحة (2)

4- دور عامل الاستجابة المصلي SRF في تطور الأوعية الدموية في أطراف الأجنة:

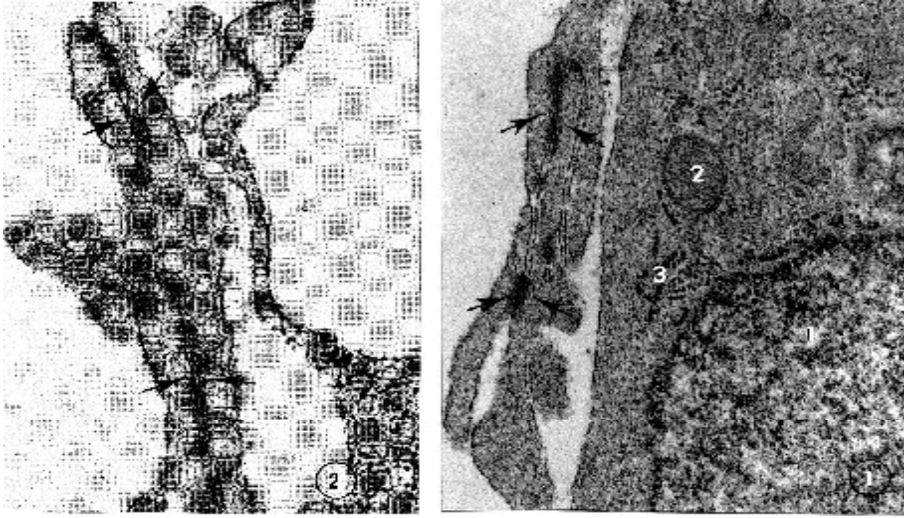
تبين الدراسة بالمجهر الالكتروني النافذ ما يأتي:

– تظهر الخلايا الوعائية البطانية عند الأجنة الشاهدة (النمط الوحشي) والحاملة للعامل SRF بشكله النشط الفعال ارتباطاً من نوع معقدات اتصال موثقة Tight Junction. وهو ارتباط قوي وكثيف الكترونياً (لوحة 3 شكل 1 و2)، وهنا تظهر الخلايا الوعائية وقد أحاطت بالكريات الدموية وجعلتها حبيسة في لمعتها، إن هذا الارتباط المحكم القائم بين الاستطالات الخلوية للخلايا الوعائية البطانية يقف حائلاً دون خروج الكريات الدموية الحمراء (أي أنها تمنعها من الهجرة إلى الوسط الخارجي).

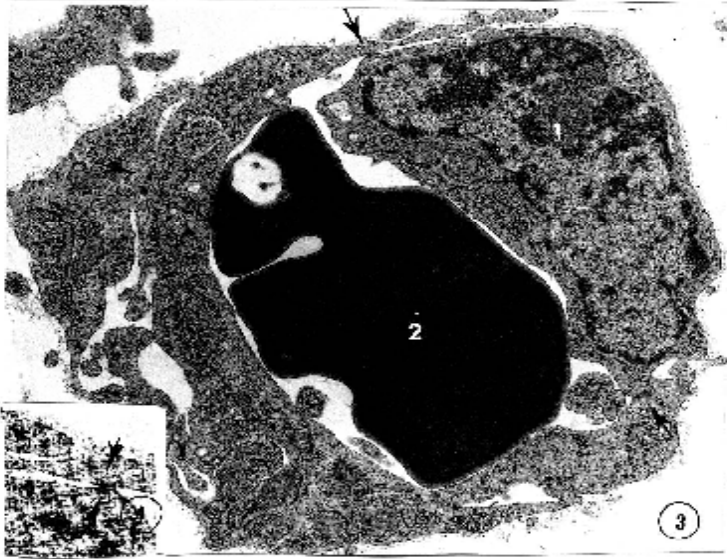
– أما الخلايا الوعائية البطانية عند الأجنة الطافرة الحاملة للعامل SRF بشكله غير الفعال (أو المخمل Inactivated) فقد أظهرت ضعفاً واضحاً في الارتباطات الواقعة فيما بينها (لوحة 3 شكل 3 و4) فالإتصال المحكم هنا غير مشاهد، بل ما نشاهده هو اتصال ضعيف في نقاط محدودة مترافقة مع فصوص تظهر في مستوى الانفتاح الخلوي (لوحة 4 شكل 1 و2)، ومما يؤكد حدوث فك الارتباطات بين الخلايا الوعائية وحدث النزف هو مشاهدة كريات دموية حمراء خارج لمعة الشعيرة وفي محيطها (لوحة 4 شكل 3).

كما يلاحظ على الخلايا الوعائية (للأجنة الطافرة)، بعد عملية الانفتاح وخروج الكريات الحمراء منها محاولة الخلايا العودة للاتحام فيما بينها، ولكن الذي يحدث عدم قدرة تلك الخلايا على استعادة وضعها الطبيعي وبناء معقدات موثقة فتظهر الخلايا عندئذ اتصالات عديدة غير منتظمة وكلها اتصالات ضعيفة وفق ظاهرة إعادة القلوبة Remodeling (لوحة 4 شكل 5).

كما تظهر الخلايا الوعائية في الوقت نفسه بروز كتل سيتوبلاسمية (ذات بنية غشائية) تأخذ اتجاه لمعة الشعيرة غالباً، وأحياناً تأخذ اتجاه الوسط الخارجي (لوحة 4 شكل 6) ينطبق هذا الأمر على ظاهرة الإخراج الخلوي Exocytose. شوهدت هذه التشكلات بكثرة في مستوى الشعيرات الدموية للأجنة الطافرة بالعامل SRF.

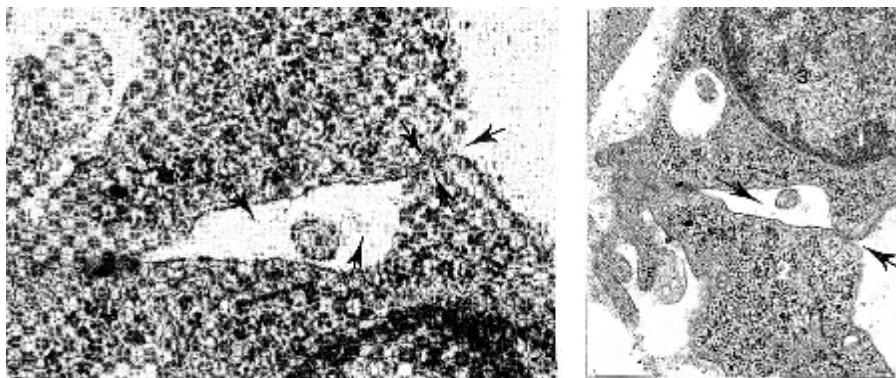


شكل-1- صورة بالمجهر الإلكتروني لتخليا الوعائية البطانية في لوعية الأطراف الأمامية عند جنين الفئران العذية (المشاهدة) بمس 13,5 يوماً وقد أظهرت ارتباطات محكمة بين أغشيتها مع ظهور غشاة إلكترونية (الأسهم) . 1- خواتم-2- جسيمات كوندرية-3- الشبكة الهيولية الداخلية المصبوبة X23000
شكل-2 : مكاني الإرتباط المحكم لأغشية خلايا وعائية أخرى مكرراً (تكبير الأسهم إلى الأغطية المتوازية والشبكة الفيروياً لطبقتين متجاورتين عند الفئران المشاهدة بمس 13,5 يوماً X43000.

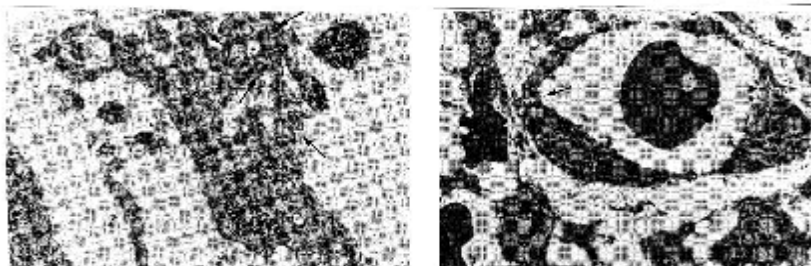


شكل-3- صورة بالمجهر الإلكتروني لشعيرة ناعمة صغيرة في الطرف الأمامي جنين الفئران المشاهدة بالوسائل SRF تظهر الخلايا الوعائية البطانية (جدران الشعيرة الدموية) (1) ، وفي لوعية الشعيرة تساعد القرية المصراة باللون الأسود (2) تشكل استقطالات الخلايا البطانية ارتباطات ضعيفة وفي نقاط محدودة جداً (الأسهم) . X9200
ملحوظة: تظهر مواقع الإرتباط الضعيف بنفس الشعيرة الناعمة (السهم) . X43600.

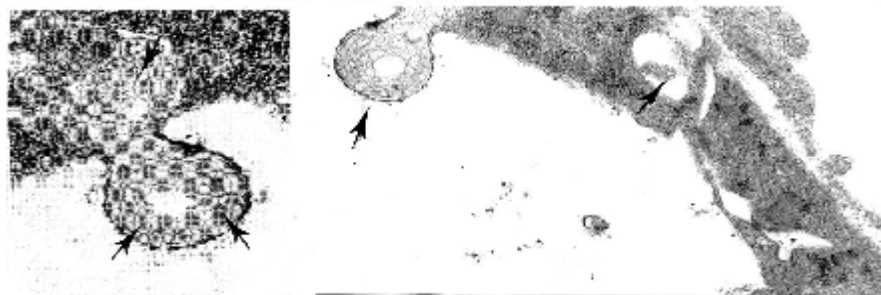
اللوحة (3)



شكل-1 صورة بالمجهر الإلكتروني يظهر لك الارتباط المتحكم وظهور فراغ واسع (السهم) يربط بين الخليتين المتجاورتين (1 و 2) عند أجنة الفئران المتطرفة يعامل SRF يسمح بخروج الفريجات الحمراء من لعمه الشجرة إلى الوسط الخارجي. جزء من نواة الخلية. X13000
شكل-2 صورة مكبرة لمكان الانفتاح تظهر ثقب الإرباط المنضج (الأسهم). X43000.



شكل-3 يظهر شعيرة دموية في الطرف الأمامي لجنين الفئران المتطرفة يعامل SRF. وقد خرجت بعض الفريجات الدموية منها (تات اللون الأسود على يسار الصورة) التي تتوضع في محيط الشعيرة إثر فك الارتباط وحدث النزف. X2550
شكل-4 تعدد الخلايا الوعائية البطانية بعد الانفتاح (أرشادات من جديد ولكن هذه الارتباطات تظهر عديدة (الأسهم) فيخروجية غير منتظمة) وصعيفة الارتباط. X20500.



شكل-5 يظهر خروج كتل سيتوبلازمية من جسم الخلايا الوعائية البطانية (الخامسة بالأسهم) لأجنة الفئران المتطرفة يعامل SRF بكمية امداء الشعيرة الدموية. X13000
شكل-6 يظهر البنية الضخامية للكتلة سيتوبلازمية الخارجة من جسم الخلية (الأسهم). X 43000.

اللوحة (4)

المناقشة

تشكل الشعيرات الدموية في الأطراف أوعية دموية حقيقية تقوم بنقل الدم لتغذية الأطراف، وذلك بفضل اللحمية التي تظهرها الخلايا الوعائية البطانية المشكلة لجدران الشعيرات، وهذا الوضع يشاهد عن الأجنة السوية (غير الطافرة).

تشير بعض البحوث التي تناولت دراسة الأوعية الدموية الجنينية إلى أن أوعية الجنين تظهر بشكل شبكة أوعية بطانية Endothelial Net تتكون من خلايا وعائية بطانية Endothelial Cells تتشكل من الوريقة المتوسطة الجنينية، وهي تمثل المراحل المبكرة من التكوّن الوعائي Angiogenesis قبل تمايز الأوعية الدموية (شرايين وأوردة) تتوزع بعد نضجها بشكل شجرة وعائية (6).

يؤثر عامل الاستجابة المصلي (SRF) بشكل مباشر في تطور جملة الأوعية الدموية القلبية الخاصة بكل من الدماغ والأطراف الأمامية عندما يكون بشكله الفعال في حالة الأجنة الطبيعية.

وعند الأجنة الطافرة فإن العامل SRF، يصبح بشكله الطافر بعد إدخال الجملة الطافرة (Cre-LoxP) المميزة بالتعاقب (5'TTCGGAAGTCCGGCACTAAA-3')، ويؤدي الشكل الطافر لهذا العامل دوراً مشوهاً لتشكل الأوعية الدموية القلبية، كما يشوه تشكل الحواجز التي تقسم عضلة القلب إلى حجراته المعروفة الأمر الذي يؤدي إلى اعتلال العضلة القلبية Cardiomyopathy وهو خلل مميت غالباً (5 و7).

وقد أظهرت هذه الدراسة للحالة الطافرة أن شبكة الشعيرات الدموية في راحة اليد تشبه إلى حد ما الشبكة عند الأجنة السوية (الشاهدة)، إلا أنه يلاحظ نقص في عددها الأمر الذي يمكن أن يعزى إلى الدور السلبي (غير الفعال) للعامل SRF عندما يكون بشكله الطافر حيث يبدي عدم القدرة على تشكيل الأوعية الدموية.

يقترح هذا البحث أن العامل SRF يمكن أن يكون مشاركاً في ظواهر الهجرة الخلوية وفي عملية إعادة القولية Remodeling للخلايا الوعائية البطانية E.C. المشكلة لجدران الشعيرات الدموية الممثلة لأوعية الأطراف في المرحلة الجنينية.

أظهرت الخلايا الوعائية البطانية عند الأجنة الشاهدة وفقاً لمعطيات المجهر الإلكتروني النافذ في هذه الدراسة اتصالات Connexions بين أغشيتها حيث يلاحظ تقارب محكم بين غشائي الخليتين الوعائيتين مع كثافة الكترونية واضحة، وهذا الاتصال المحكم هو الذي يقوم بدور مهم في عملية ضبط الاتصال ومنع خروج الدم وهجرة الخلايا الدموية الحمراء إلى خارج لمعة الأوعية، على ما يبدو فإن العامل SRF هو الذي يضبط تشكل الارتباط بشكله المحكم.

توضح البحوث التي تناولت دراسة بنية ووظائف الخلايا الوعائية البطانية في الحاجز الدماغى الدموى بأن الارتباط بين الأغشية الوعائية هو من نمط الارتباط الموثق Tight Junction وإن مثل هذه الارتباطات لا تسمح حتى بمرور الفيروسات (11).

كما لوحظ أن المواد السامة (مثل النيكوتين) يمكنها أن تعمل على فك مثل هذه الارتباطات المحكمة مما يسهل خروج الجزيئات الكبيرة عبر جدرانها (12).

وتؤكد نتائج المجهر الإلكتروني حدوث انفتاح في مستوى هذه الارتباطات الواقعة بين أغشية الخلايا الوعائية، وامتداده بين الأغشية الخلوية الوعائية. ويمكن أن يعزى الأمر إلى دور العامل SRF الطافر في المساهمة الفعالة في عملية الهجرة الخلوية وحدوث التسرب الدموى Extravasation عند حدوث النزف Hemorrhagy، ويبدو أن العامل SRF يُفضل عملية إعادة القولية Remodeling بين أغشية الخلايا الوعائية عندما يكون بشكله غير الفعال Inactive، مما يؤدي إلى استمرار النزف ومن ثم موت الأجنة في اليوم الرابع عشر من التشكل الجنيني.

وتشير البحوث إلى عملية التحوير الوراثى بالجملة Cre/LoxP تشكل عاملاً كاجماً أساسياً لفعالية البروتين بيتا-كاتينين β -Catenin وهو البروتين الرابط بين الخلايا الوعائية البطانية خلال مراحل تشكل الأوعية الدموية الجنينية، وإن حدوث أي خلل فيه يؤدي إلى إضعاف الارتباط، ومن ثم حدوث انصباب دموى أو تدفق وعائى (13).

ويمكن للعامل SRF الطافر أن يؤدي دوراً سلبياً حيث يضعف فعالية استقلاب خميرة الترومبين Thrombin على أغشية الخلايا الوعائية في أثناء التطور الجنيني مما يؤدي إلى حدوث نزف دموى تكون نتيجته الموت (15).

ويمكن أن تعزى ظاهرة إطراح الخلايا الوعائية Exocytose كتلاً هيولية من جسمها إلى دور العامل SRF المثبط غير الفعال الذي يسبب تراجعاً في الاستقلاب الخلوى، وخاصة استقلاب المواد الليبوبروتينية (البروتينية الشحمية) إذ تخرج هذه المواد على شكل كتل هيولية. في حين تشير البحوث إلى قدرة الخلايا الوعائية على استقلاب مثل هذه المواد بشكل فعال نظراً لكون أغشيتها تحمل مستقبلات خاصة باستقلاب المواد الليبوبروتينية عندما تكون في حالتها الطبيعية (غير الطافرة) (15).

هذا وتؤدي الخلايا الوعائية البطانية دوراً مهماً في تكون الأوعية (مثل الشرايين) فقد وجد أن التغيير في قطر الشريان وفعاليتيه في دفع الدم مرتبط بشكل وثيق مع الوضع البنيوى والوظيفى للخلايا الوعائية البطانية E.C. والمورثات الخاصة ببنيته (16).

REFERENCES

- 1- Houdebine, L-M. (1998). La trançenèse Animale et ses application. INRA Unité de différenciation cellulaire. 78352 jouy-en-josas. cedex. INRA prod.Anim.,11,81-94.
- 2-Mericskay, M., Parlakian, A., Proteu, A., Dandré, F., Bonnet, J., Paulin, D. and Li, Z. (2000). An Overlapping GArG/ Octamer. Element is Required for Regulation of desmin Gene Transcription in Arterial smooth muscle cells. Labo. de Biologie moléculaire de la différenciation, univ. Denis Diderot Paris -7, case 7736 France.
- 3-Sadler, T. W. (2004). Langman's Medical Embryology. Ninth Edition. Lippincotte Williams and wilkins Awolterns Kuwer company philadelphia, New York , U.S.A.
- 4-Parlakian, A. (2004). Rôle du facteur de transcription SRF dan le system cardiovasculaire. These doctorat, Université Paris 7-Denis Diderot. Ecole Doctorale B2M. Paris, France.
- 5- Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J-P., Paulin, D., Li, Z. and Daegelen, D. (2004). Targeted Inactivation of Serum Response Factor in Developing Heart Results in Myocardial Defects and Embryonic Lethality. Molecular and Cellular Biology, june,p.5281-5289.
- 6-Pardanaud, L., Moyon, D., Eichmann, A. (2001). L'embryologie des vaisseaux. Medecine/ Sciences , N.5, 17: 543-51.
- 7- Miano, J. M., Ramanan, N., Georger, M.A., Mesy-Bentely, K. L., Emerson, R.L., Bulza, R. O., Oixiao- Weiler, H., Ginty, D. P. and Misra, R. P. (2004). Restricted inactivation of Serum Response Factor to Cardiovascular system. Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A.,101: 17132-17137.
- 8-Li, Z., Colucci-Guyon, E., Pincon-Rymond, M., Mericskay, M., Pourin, S., Paulin, D., and Bobinet, C. (1996). Cardiovascular lesion and skeletal mypoth in mice lacking Desmin. Devel. Biol. 175,362-366.
- 9- Li, Z., Mericskay, M., Agblute, O., Bultler-Browne, G., Carlsson, L., Thronell, L. E., Bobnet, C. and Paulin, D. (1997). Desmin is essential for the tensile strength and intergrity of myofibrile but not myogenic commitment differentiation and fusion of skelet muscle. J. Cell Biol. 139-144.
- 10-Paulin, D. and Xue, Z. (2005). Desmin and other Intermediat Filament in Normal and Diseased muscle. Intermediate filament Ed.Jesus Paramio © Eurekak. com.,1-10.
- 11-Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C. and Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effect of tissue culture, second messengers and concultrred astrocytes. J.Cell Science,Vol.107, Issue 5 1347-1357.

- 12-McGeachie, J., (1998). More about ...Endothelial cells. Blue Histology Vasculare System. 12:33, Western Australia.
- 13-Cattelino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., Bionco, P., Wolburg, H., Moore, R., Oreda, B., Kemler, R. and Dejana, E. (2003). The conditional inactivation of the β -catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular fragility. J. Cell Biol. Vol.162 N .6 sept. 15, 1111-1122.
- 14-Courtney, T. G., Yoga, S., Yoa-w, Z., Wei, H. and Shaun, R. C. (2001). A Role for Thrombin Receptor Signaling in Endtholial cell during Embryonic Development Cardiovascular. Sciences, Vol. 293, no.5535, pp.1666-1670 .
- 15-Adachi, H. and Tsujimoto, M. (2006). Endothelial scavenger receptors 1: prog.Lipid Res. Apr.19 Elsevier.
- 16-Robert, S. R., Theo, A. and Arnold, P. G. H. (2006). Wall shear stress an important determinant of Endothelial cells Function and structure- in the Arterial system in vivo.Discrepancies with Theory. J. vascular Res., 43: 215-269.P