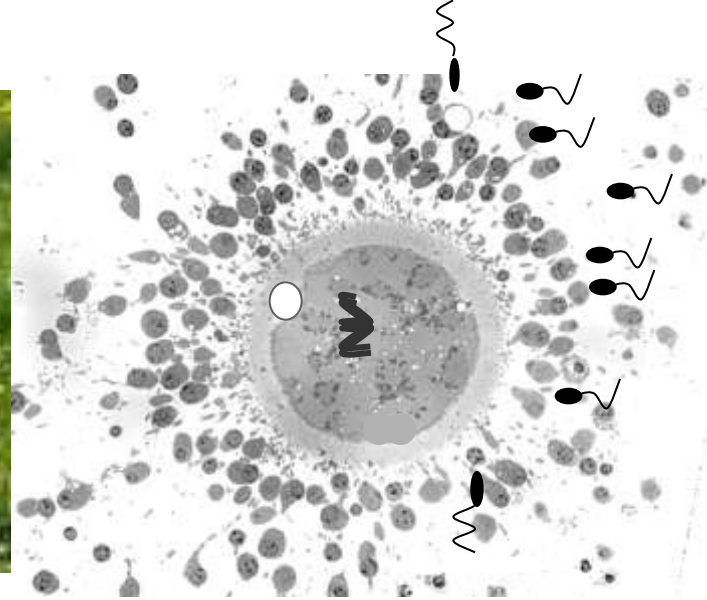
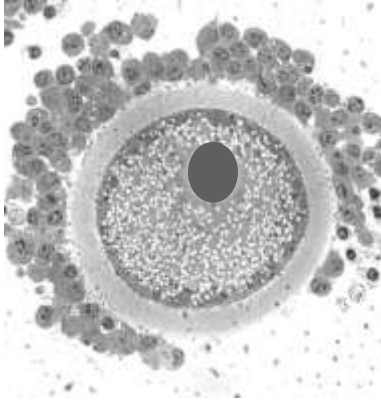
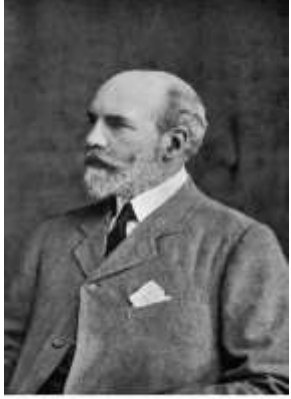


تقنية إنتاج الأجنة عند الأبقار



د. محمد سلهب - البحوث العلمية الزراعية - دائرة الثروة الحيوانية - اللاذقية

تاريخ إنتاج الاجنة



1890: أول عملية نقل وزراعة جنين عند الأرانب (Walter Heape)

1950 : تم الحصول على مواليد باستخدام تقنية نقل وزراعة الاجنة جراحيا عند الخنازير (Kvasnitski)

1951 : تم الحصول على أول مولود باستخدام تقنية نقل وزراعة الاجنة جراحيا عند الابقار (Willet)

1964 : تم الحصول على أول مولود باستخدام تقنية نقل وزراعة الاجنة لاجراحيا عند الابقار (Mutter)

1977 : تم استخلاص جنين بعد عملية تلقيح صناعي وزراعته في رحم امرأة أخرى (Robert Edwards) و
(Patrik Steptoe)

1978 : ولادة أول طفل أنبوب فب بريطانيا اسمه (Louis Brown)

1982 : بنك السائل المنوي في كاليفورنيا في خدمة العازبات

1984 : ولادة أول طفل اعتبارا من جنين مجمد

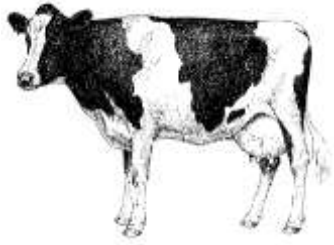
1992 : حصول أول حمل باستخدام تقنية الحقن المجهري للنفط داخل سيتوبلازم البويضة

1996 : ولادة النعجة دوللي (أول حيوان مستنسخ)

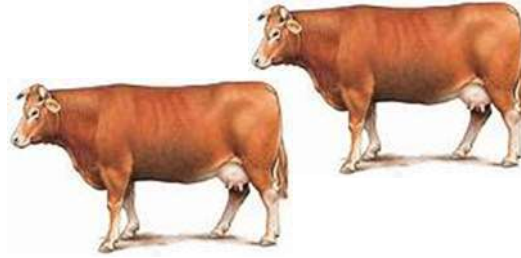
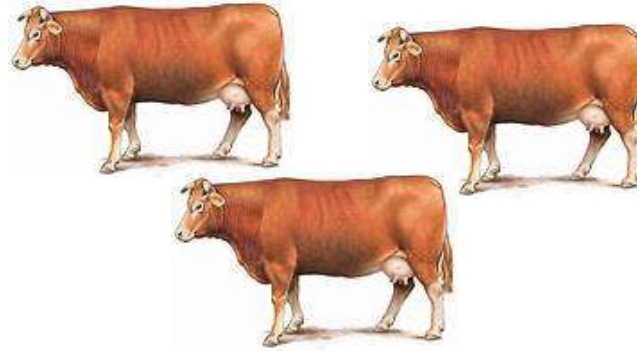
2004 : انتاج الفأرة كاجيوا في اليابان باستخدام تقانة التوالد البكري (بدون الحاجة للحيوانات المنوية)

مزايا تقانة إنتاج الأجنة

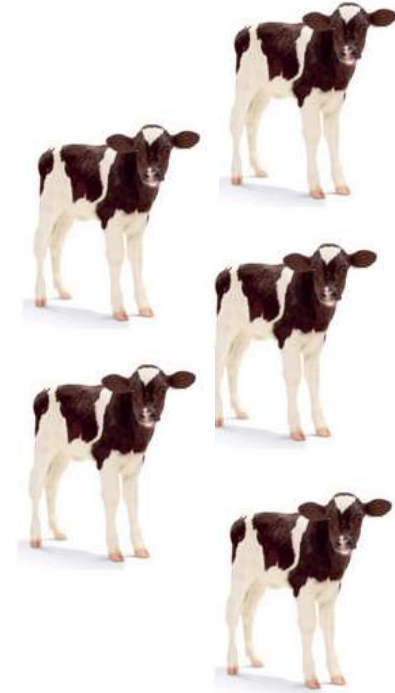
انتاج الاجنة



إنتاج أجنة مخبريا
بأعداد كبيرة



أبقار مستقبلية (حاضنة)



مواليد

■ النشر الفعال للمادة الوراثية

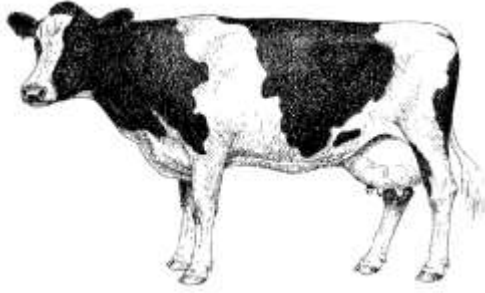
■ زيادة فعالية الانتخاب وعمليات التحسين الوراثي

■ تطوير تقانات بيولوجية حديثة (الاستنساخ ، تجنيس الاجنة، انتاج حيوانات معدلة وراثياً، حفظ البويضات بدرجات حرارة منخفضة،.....)

انتاج الاجنة

% ٦٠

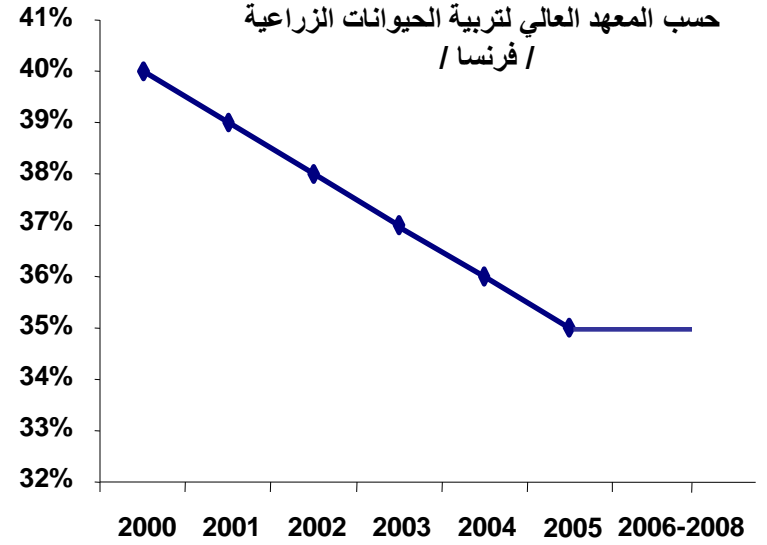
معدل الإخصابية (١٩٨٠)



% ٤٠

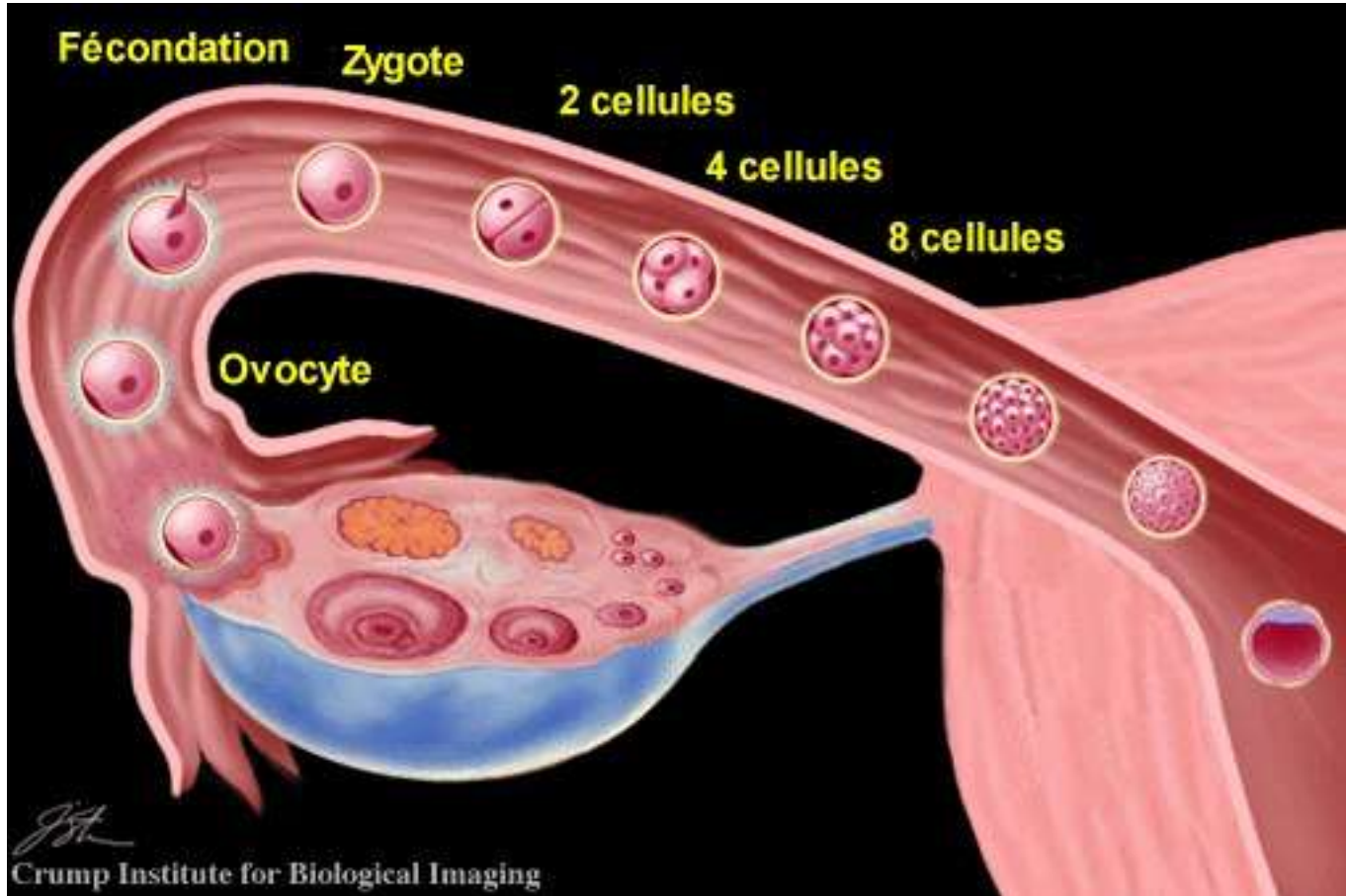
معدل الإخصابية (٢٠٠٠)

معدل الاخصاب بعد أول عملية إلقاح صناعي



■ حلا لانخفاض الخصوبة

انتاج الاجنة



■ مقارنة و تكهنات لما يجري في الظروف الفيزيولوجية الحقيقية داخل جسم الحيوان الحي

انتاج الاجنة

بقرة مريضة



بقرة نافقة



سلالة مميزة



بقرة ذات مواصفات انتاجية عالية



↓
إنتاج أجنة

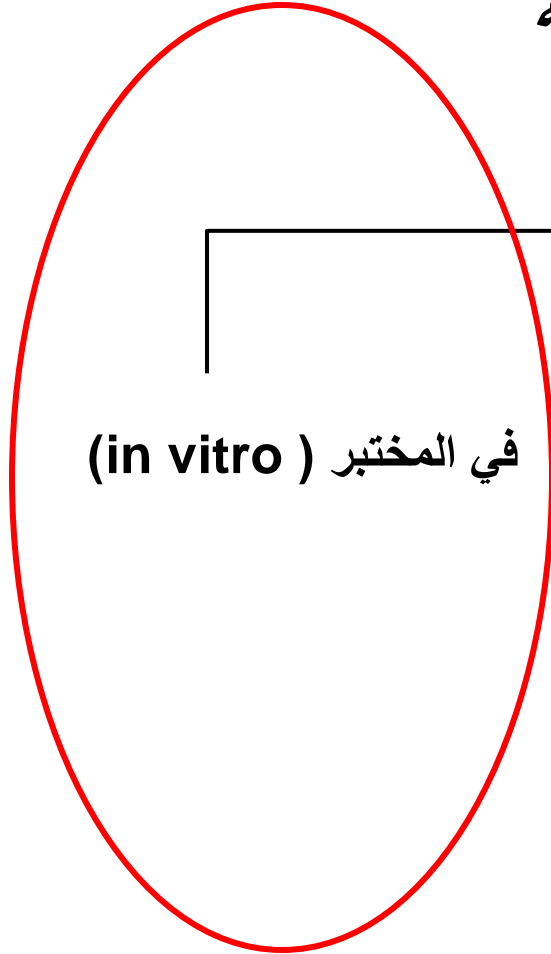
↓
حفظ الاجنة لعشرات السنين

▪ بنك وراثي لحيوانات أو سلالات ذات مواصفات مميزة

▪ استمرار لنسل الابقار النافقة

▪ تجديد القطيع (أمراض او أوبئة)

انتاج الاجنة

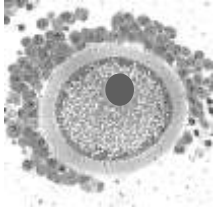


في المختبر (in vitro)

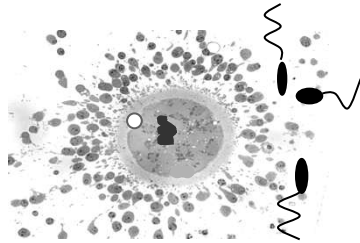
داخل جسم الحيوان الحي (in vivo)

انتاج الاجنة مخبريا (in vitro)

بويضة غير ناضجة



بويضة ناضجة



بويضة مخصبة



بويضة متفأجة



أرومة



مولود



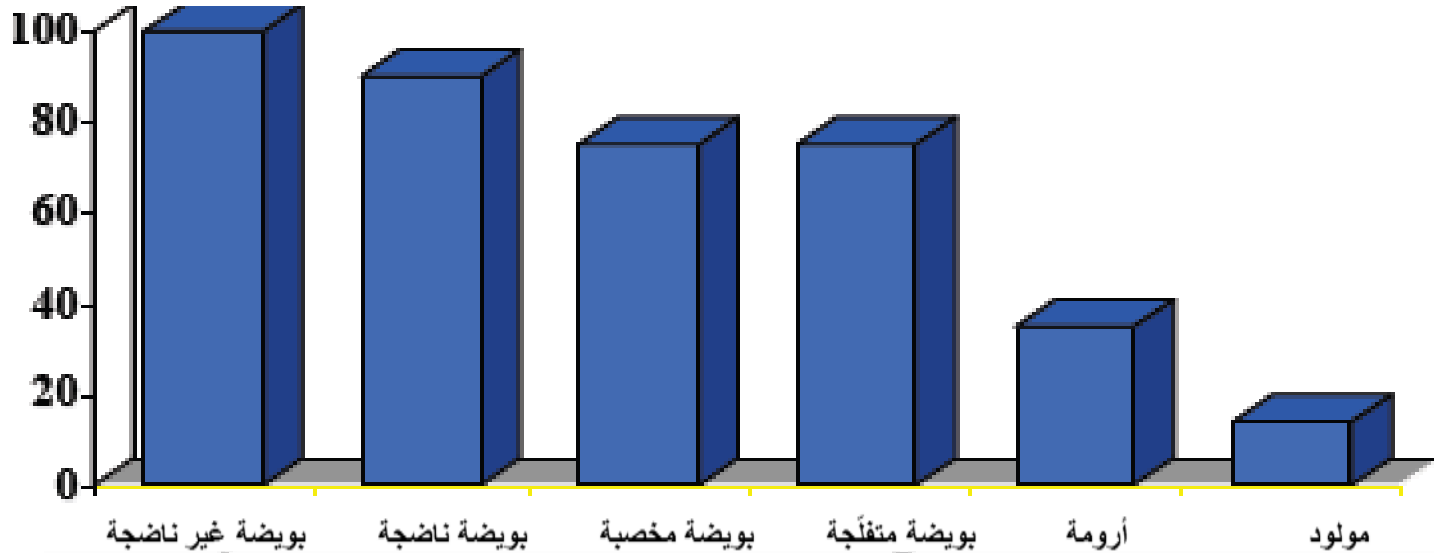
إنضاج مخبري
24 h

إخصاب مخبري
18h

تطور مخبري
7 day

نقل وزراعة الجنين
أو
حفظ بالتجميد

نسبة النجاح



انتاج الاجنة مخبريا

(١) جمع البويضات وإنضاجها مخبريا

(المسالخ)

سيروم ملحي
(NaCl ٠.٩%)
درجة حرارته ٢٥-٣٠ م



شفط البويضات
(2-6 mm
جريبات)



١- جيدة متراكمة الطبقات Compact cumulus cells تحتوي على أكثر من خمس طبقات من الخلايا الركامية.



٢- متوسطة منزوعة الطبقات جزئيا Partially denuded oocytes : تحتوي من ٣-٥ طبقات من الخلايا الركامية.



٣- سيئة متمددة الطبقات Expanded cumulus oocytes: تحتوي من ١-٣ طبقة من الخلايا الركامية.

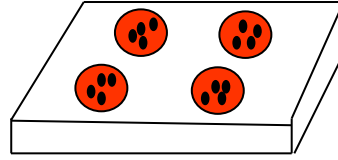


٤- سيئة لا تمتلك خلايا ركامية حول الغلاف الشفاف Completely denuded oocytes



انتاج الاجنة مخبريا

(١) جمع البويضات وإنتاجها مخبريا



حاضنة : (٣٨,٣ درجة مئوية) وهواء رطب
بنسبة ٥ % من CO_2 .

٢٤ ساعة

199 TCM

(Blastocyste 14%)

199 TCM + EGF

(Blastocyste 32%)

199 TCM + FBS

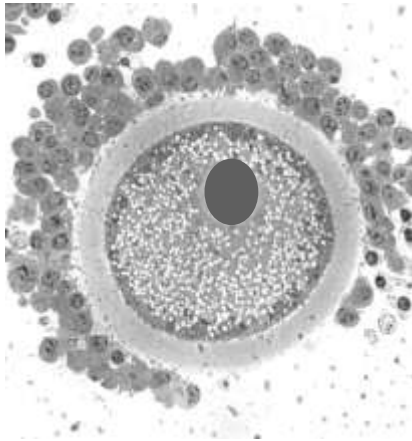
(Blastocyste 31%)

199 TCM + EGF + MIX

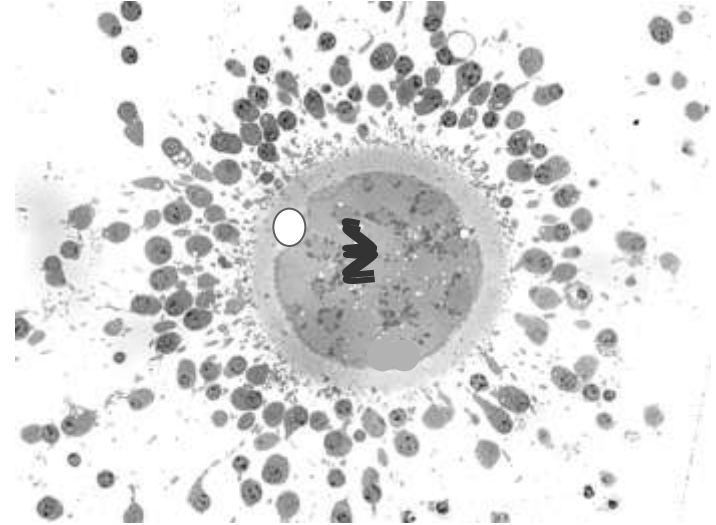
(Blastocyste 39%)

انتاج الاجنة مخبريا

(١) جمع البويضات وإنضاجها مخبريا



→
إنضاج مخبري
24 h

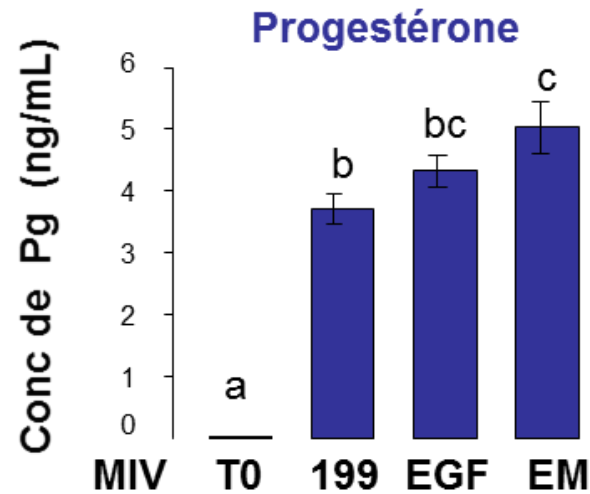
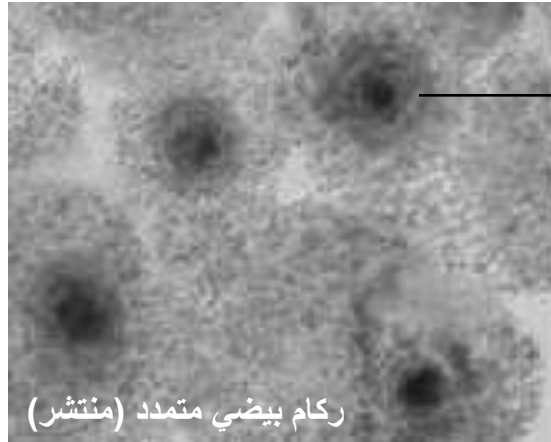


- انضاج نووي : تستكمل البويضة لانقسامها الميوزي من مرحلة الحويصلة الجرثومية (VG) الى مرحلة الميتافاز من الانقسام الميوزي الثاني (MII)
- انضاج سيتوبلازمي : تراكم للبروتينات ، اللبيدات ، RNA ،

انتاج الاجنة مخبريا

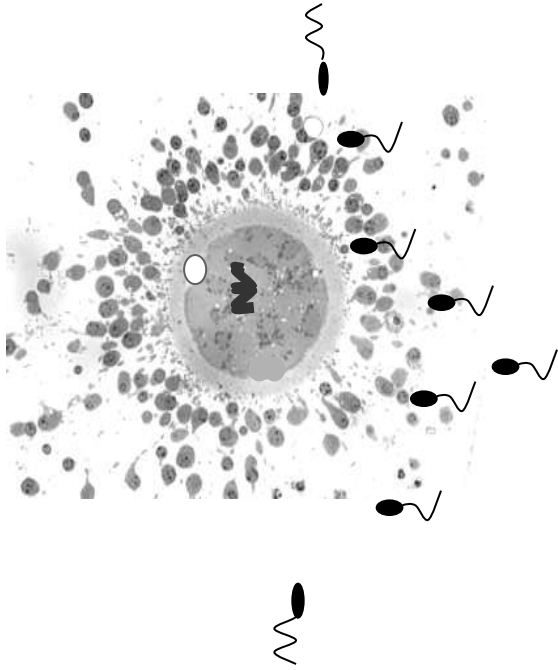
(١) جمع البويضات وإيضاجها مخبريا

نسبة الانضاج : 90%



انتاج الاجنة مخبريا

(٢) الاخصاب المخبري للبويضات الناضجة



- فصل النطف ذات النوعية الجيدة

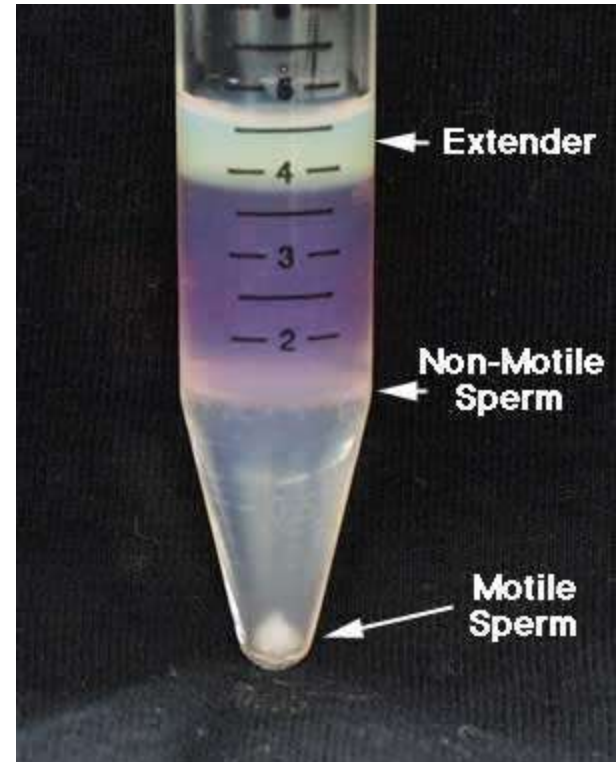
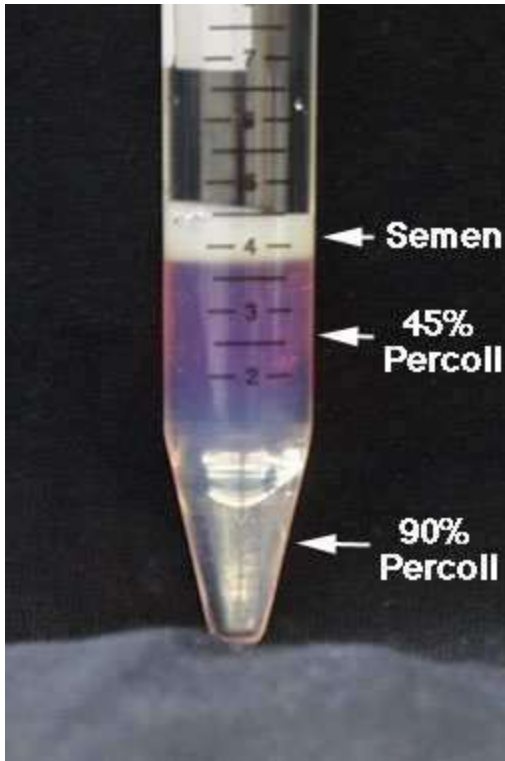
- إعطاء المقدرة الاخصائية للنطف **Capacitation**

- تحضين النطف مع البويضات الناضجة (١٨ ساعة)

انتاج الاجنة مخبريا

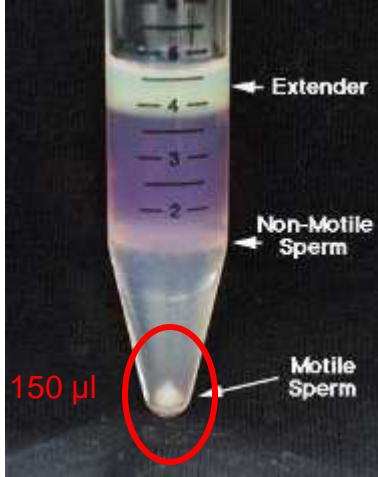
(٢) الاخصاب المخبري للبويضات الناضجة

- فصل النطاف ذات النوعية الجيدة



انتاج الاجنة مخبريا

(٢) الاخصاب المخبري للبويضات الناضجة



- إعطاء المقدرة الاخصابية للنطاف **Capacitation**

TALP (Tyrode Albomine Lactate Pyruvate)

+

Heparine

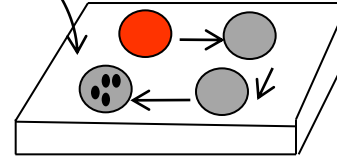
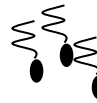
تركيز النطاف : 2.000.000 /ml

انتاج الاجنة مخبريا

(٢) الاخصاب المخبري للبويضات الناضجة

- تحضين البويضات الناضجة مع النطف

النطف



حاضنة : (٣٨,٣ درجة مئوية) وهواء رطب
بنسبة ٥ % من CO_2 .

١٨ ساعة



انتاج الاجنة مخبريا



(٣) التطور المخبري للبويضات المخصبة

SOF (synthetic oviduct fluid)

+

5% (FCS)

+

الزيت المعدني

حاضنة : (٣٨,٣ درجة مئوية) وهواء رطب

بنسبة ٥ % من CO_2

٥ % O_2



الجسم التوتوي



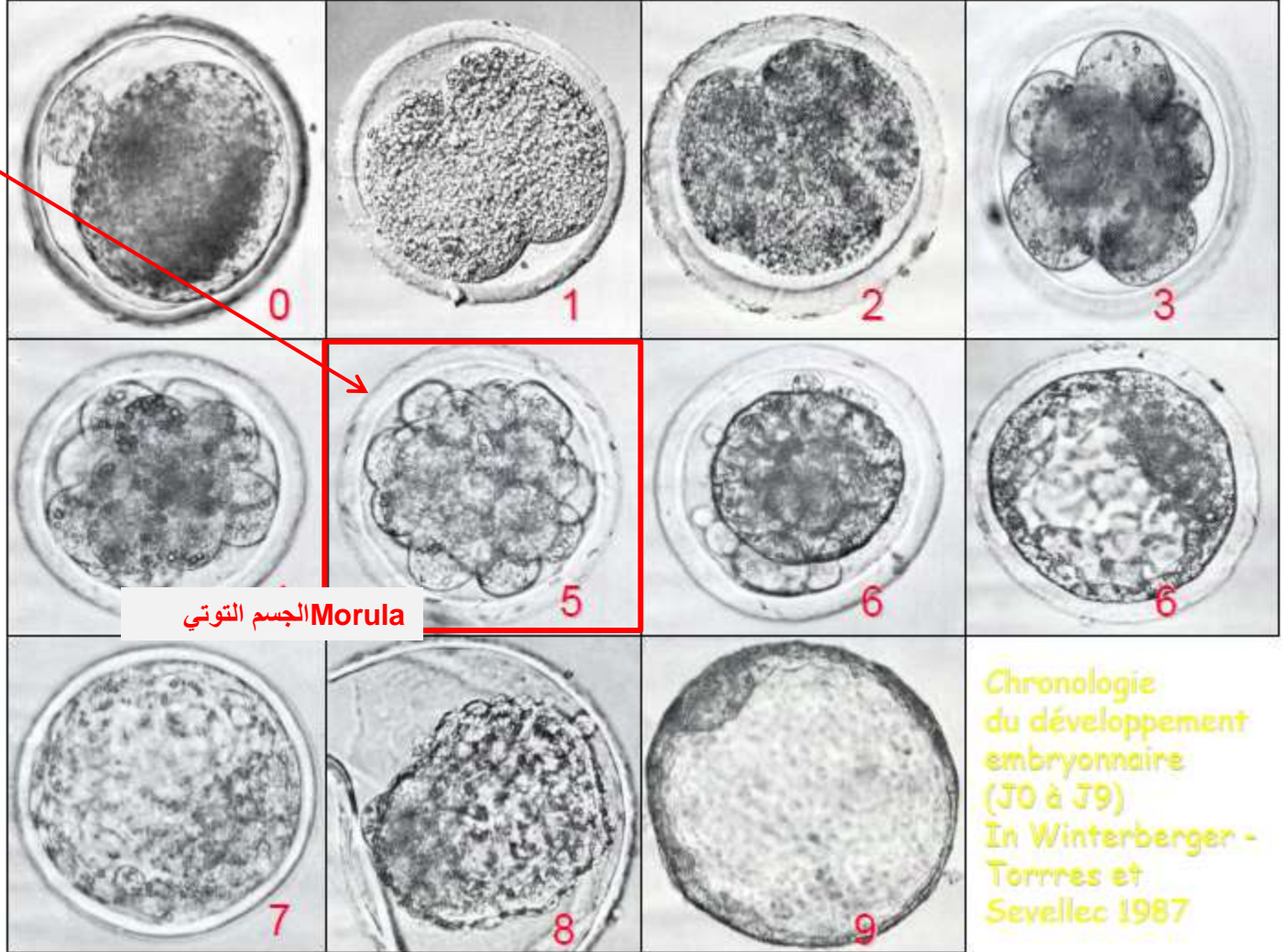
أرومة (الكيس الاصلي)

تقييم الأجنة

- مستديرة

- المنطقة الشفافة سليمة

- التفلجات منتظمة



حفظ الأجنة

فترة طويلة (سنوات)

- ١٩٦ درجة مئوية

فترة قصيرة (٥ أيام)

٤ درجة مئوية

- البومين سيروم الدم

- محلول فوسفاتي واقى (PBS)

- مضادات حيوية

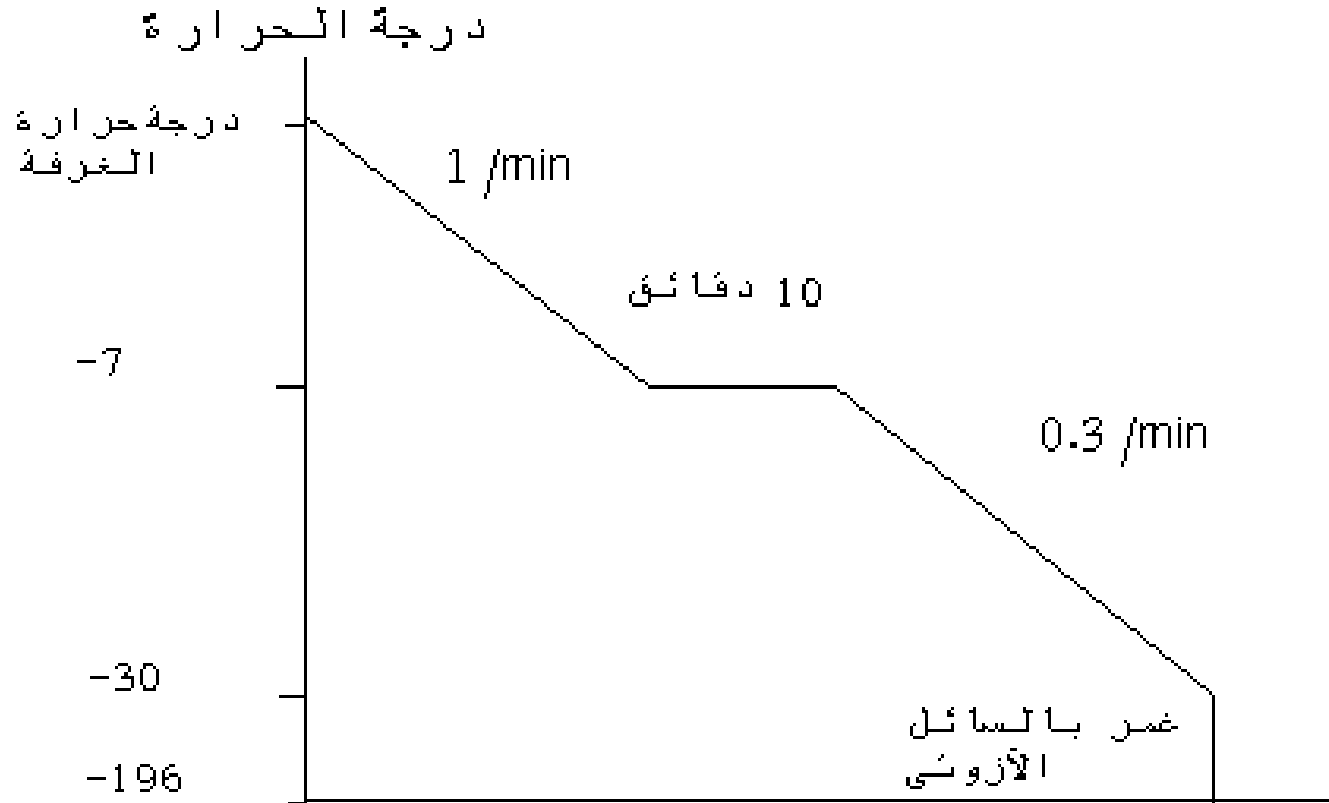
- موانع تجميد : (غليسرول - بروباندول - DMSO)

- البومين سيروم الدم

- محلول فوسفاتي واقى (PBS)

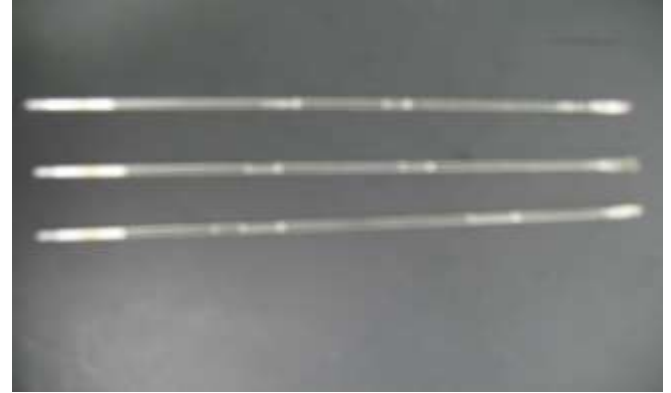
- مضادات حيوية

منحنى تجميد الأجنة





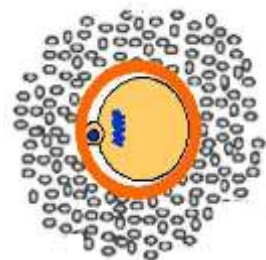
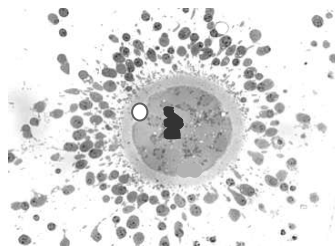
جهاز تجميد الأجنة



الأجنة في القشات



بويضة منضجة مخبريا
in vitro



بويضة منضجة داخل جسم
in vivo الحيوان الحي

إخصاب و تطور مخبري (٧ أيام)

~35%



Blastocyste



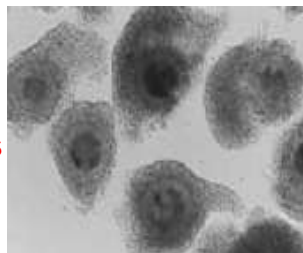
~70%

مقدرة البويضة على التطور

IN VITRO < IN VIVO



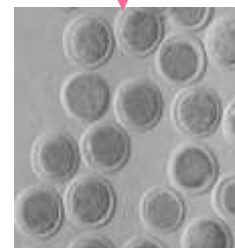
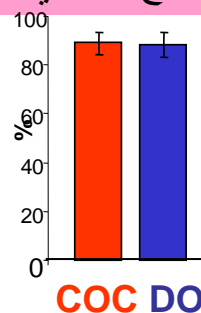
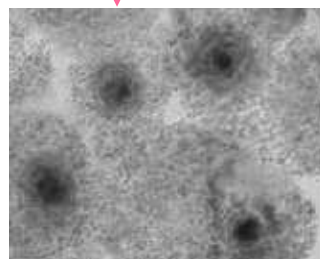
بويضات محاطة بخلايا الركام البيضي
Cumulus oocyte complexes (COC)



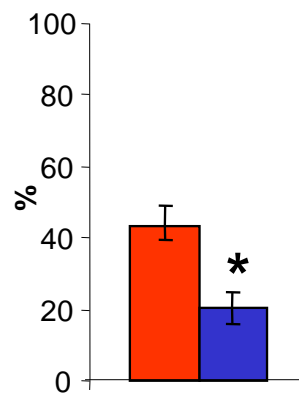
بويضات عارية من خلايا الركام البيضي
Denuded oocyte (DO)



انضاج مخبري ٢٤ ساعة



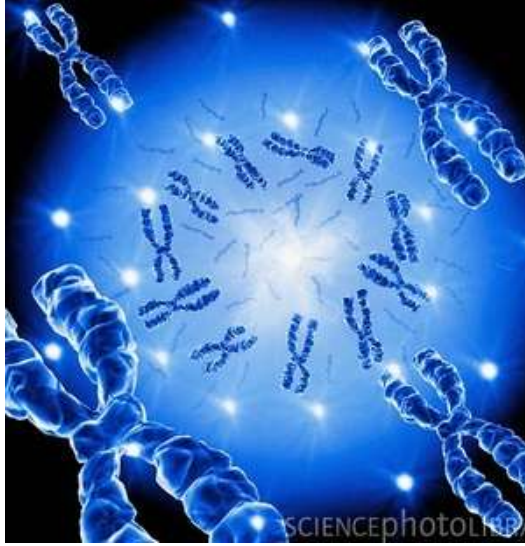
إخصاب و تطور مخبري



مقدرة البويضة على التطور

COC > DO

Blastocyste



جينات الركام البيضي

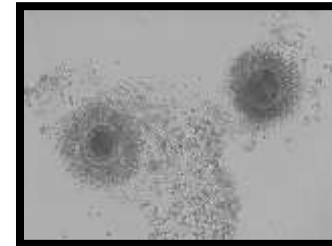
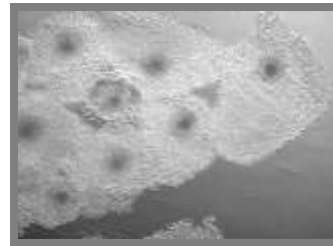


مقدرة البويضة على
التطور بعد الاخصاب
المخبري

- الكشف عن مؤشرات جينية في خلايا الركام البيضي خلال الانضاج و التي تعكس مقدرة البويضة على التطور بعد الاخصاب المخبري

Modèle de la qualité de l'ovocyte :
Cumulus pré-pubères / adultes

مصدر خلايا الركام البيضي



عجلة بعمر (٥-٦ أشهر)

بقرة

بقرة

(% blastocysts) 20 %

40 %

70 %



IN VITRO : إنضاج

IN VITRO

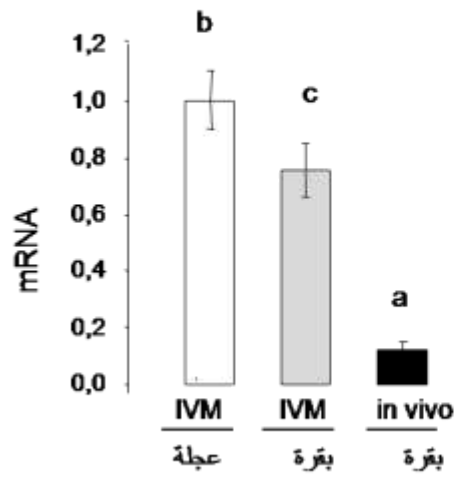
IN VIVO

مبايض من المسلخ

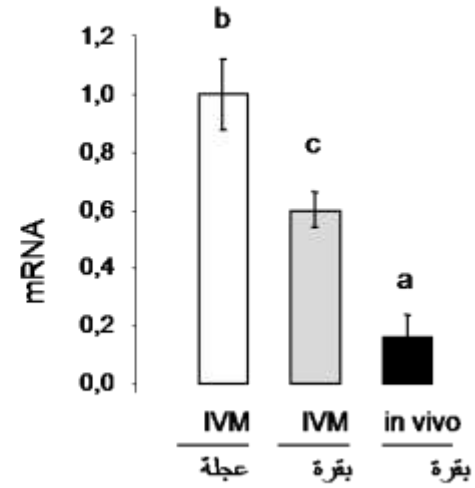
مبايض من المسلخ

تحريض إباضة (OPU)

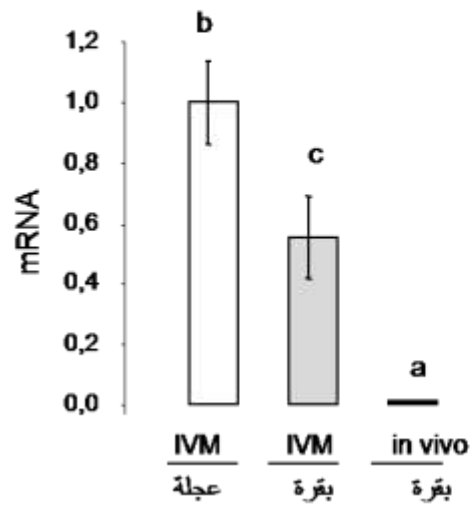
SDC2



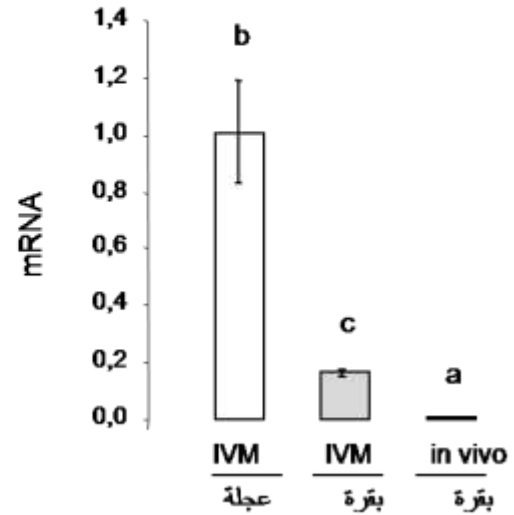
CAPG

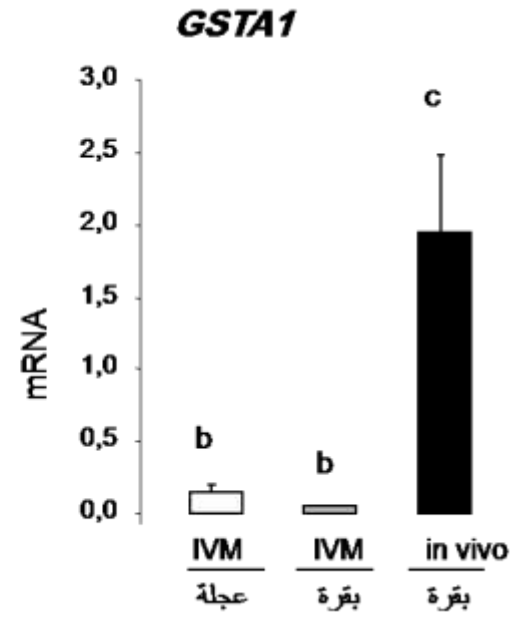
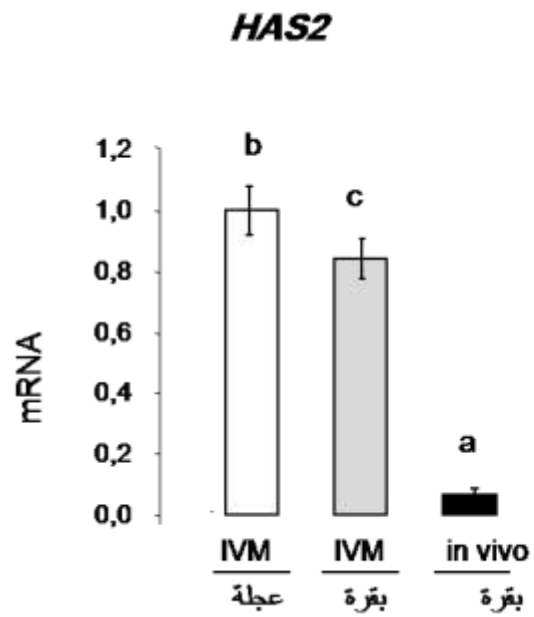


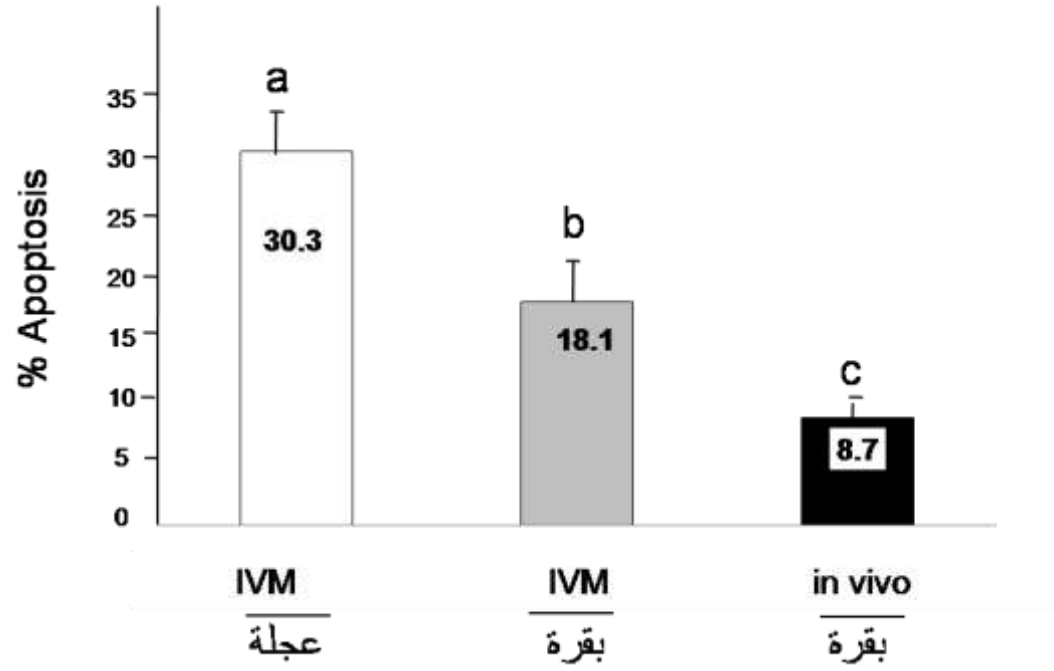
SERPINA5



MMP9





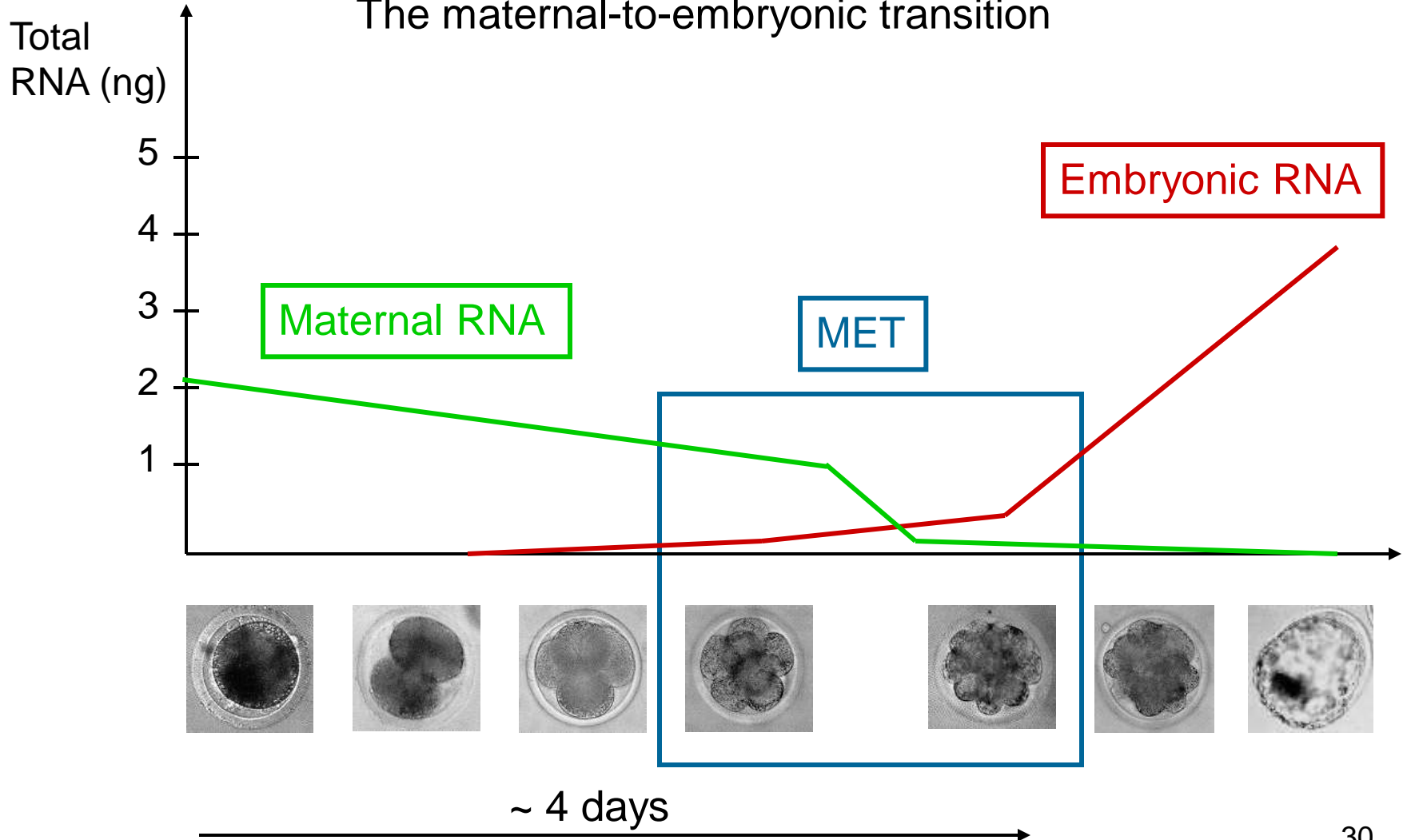


(سلهب وزملاؤه، ٢٠١٥)

الانضاج المخبري

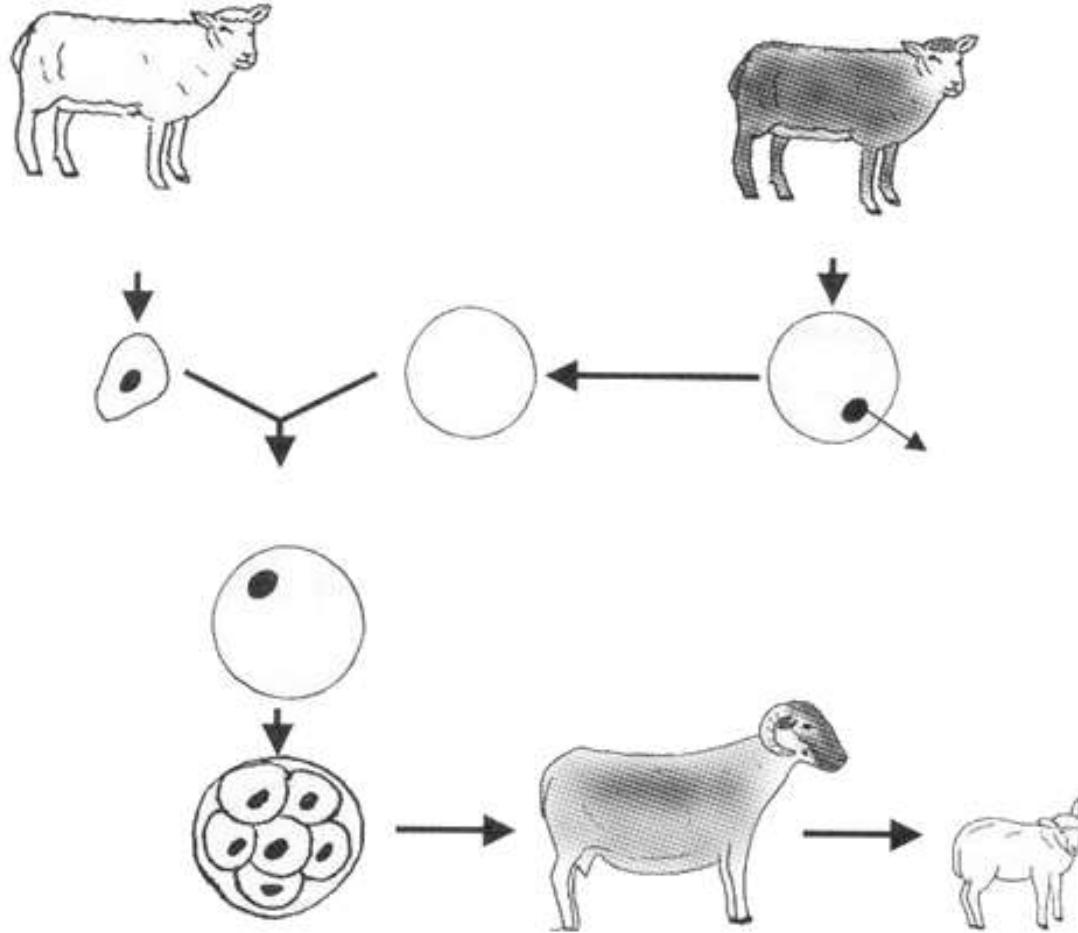
اهمية الانضاج المخبري ؟

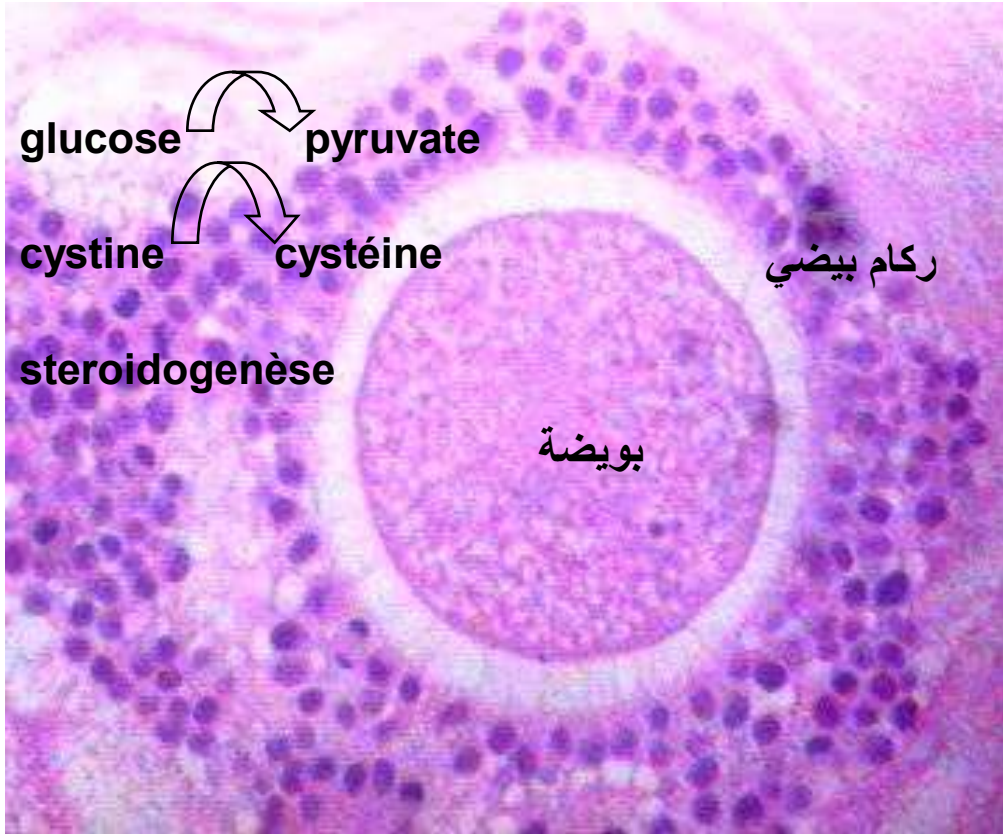
The maternal-to-embryonic transition



الانضاج المخبري

اهمية الانضاج المخبري؟





الركام البيضي :

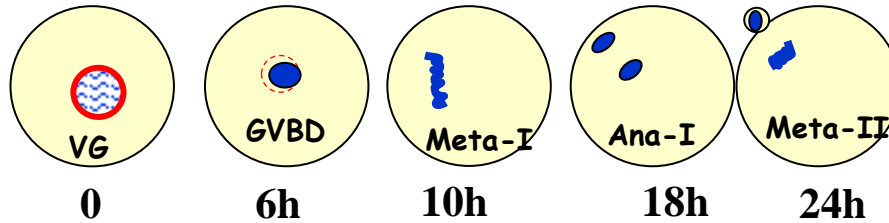
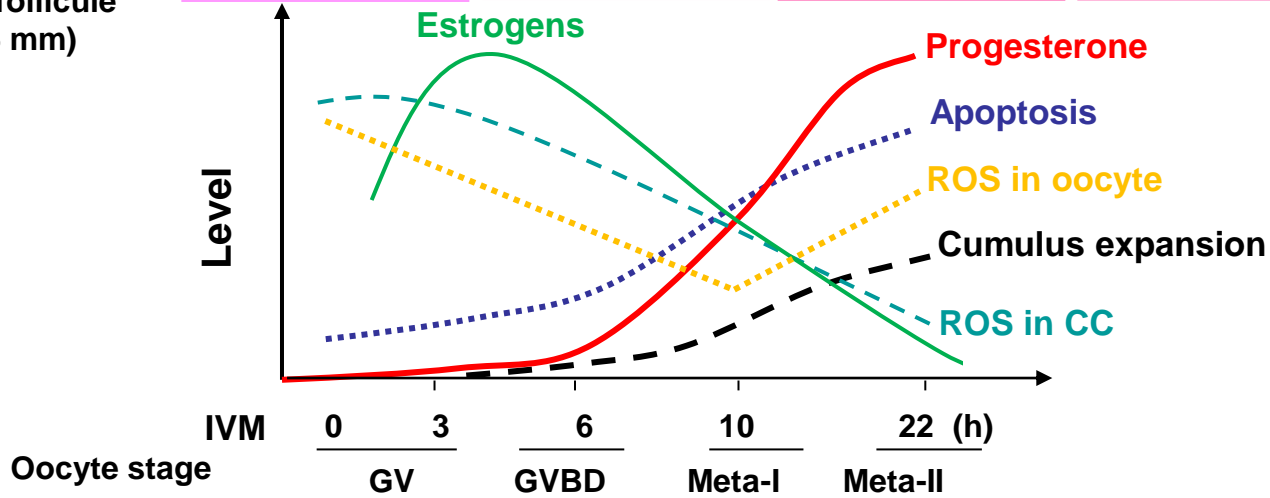
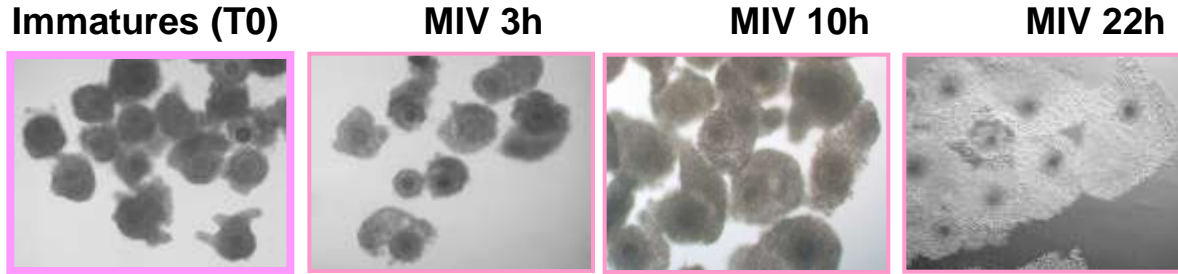
- مصدر هام للطاقة
- حماية البويضة من الاجهاد التأكسدي
- إنتاج الهرمونات الستيروئيدية

حركية الانضاج المخبري

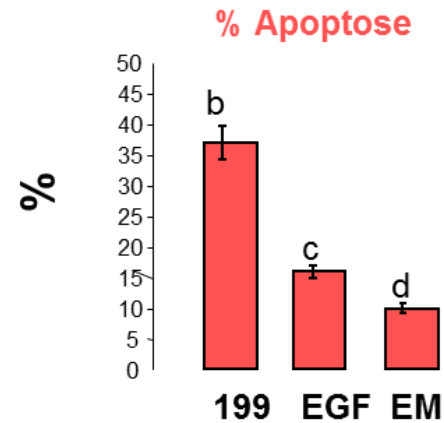
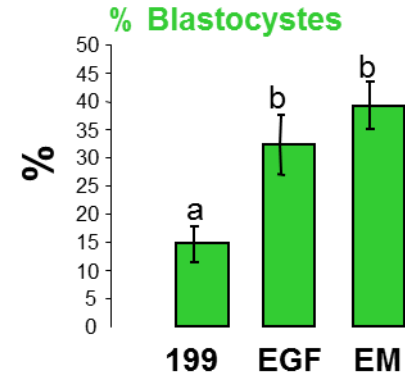


Ovaire

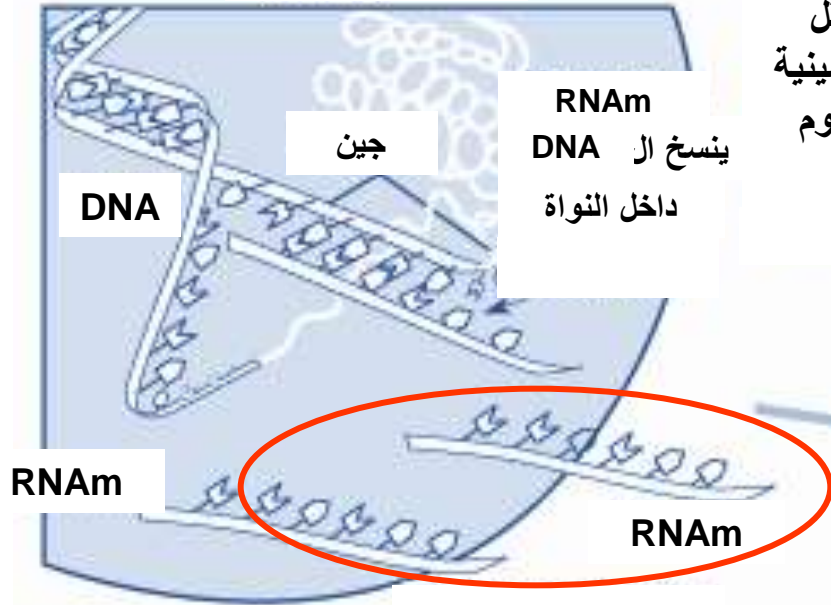
COC de follicule de 3-6 mm)



كما أن معدل الابوتوز العالي في خلايا الركام البيضي له تأثير سلبي على قدرة البويضة على التطور بعد الاخصاب نتيجة حرمان البويضة من الدور الفعال الذي تمارسه خلايا الركام البيضي في تحقيق إنضاجها الأمثل و إعطائها المقدرة العالية على التطور.



نواة



RNAm
ينسخ ال DNA
داخل النواة

RNA الناقل ينقل
الاحماض الامينية
الى الريبوزوم



تركيب السلسلة البروتينية



يستخدم الريبوزوم
الاحماض الامينية من أجل
تركيب السلسلة البروتينية

سيتوبلازم

Données expérimentales

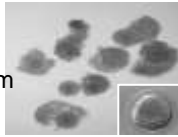
2) Analyse transcriptomique comparative du cumulus après maturation in vitro et in vivo

Vache adulte

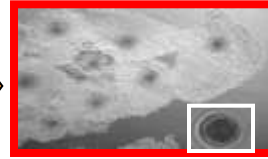
COC immature : cumulus compact (ovocyte en prophase-I)

COC mature : cumulus expansé (ovocyte en Métaphase-II)

ovaire
Ponction post-mortem (follicules 3-8 mm)



MIV 24 h



Séparation de CC

Cumulus/ vache
IN VITRO

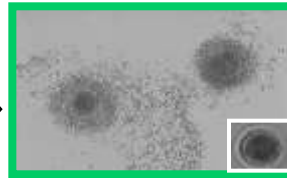


Vache adulte



Superovulation par FSH / LH

Ponction (follicules > 8 mm)



Séparation des CC

Cumulus/ vache
IN VIVO



Extraction des ARN totaux à partir de cellules de cumulus,

Synthèse ADNc

Marquage **Cy3/Cy5**

8 Hybridations en "dye-swap" (microarray 22K oligo bovin, CRB-GADIE) (80 ng d'ARNc marqué)

Quantification signaux (GenePix) & analyses statistiques (Anapuce, R)

Liste de gènes différentiels

