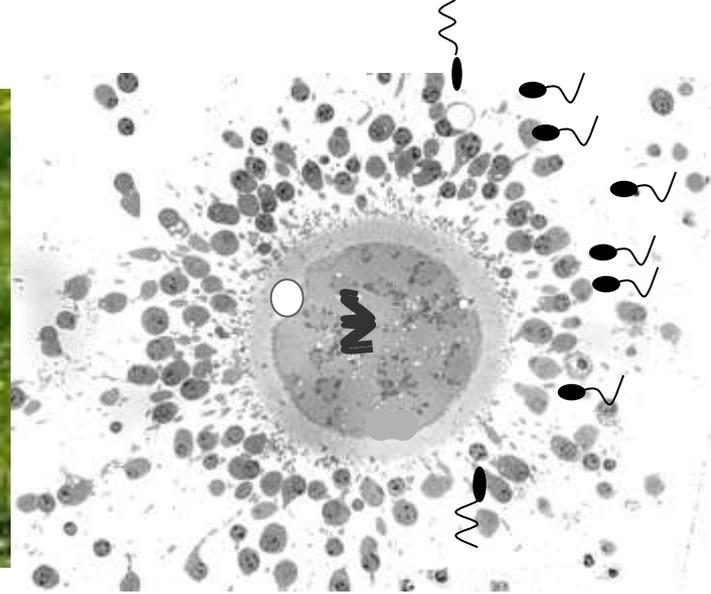
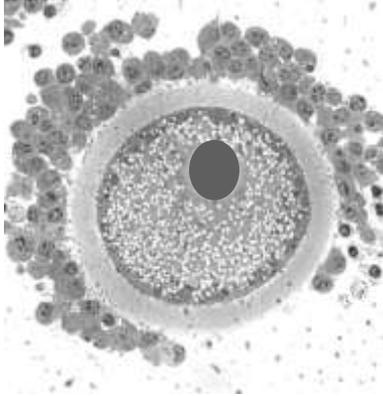


# تقنية إنتاج الأجنة عند الأبقار



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

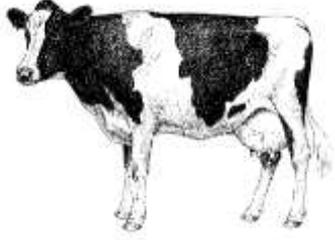
1992 : حصول أول حمل باستخدام تقنية الحقن المجهري للنفط داخل سيتوبلازم البويضة

1996 : ولادة النعجة دوللي ( أول حيوان مستنسخ)

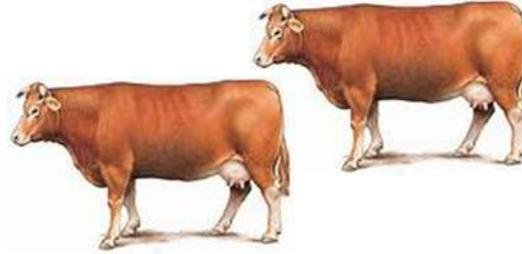
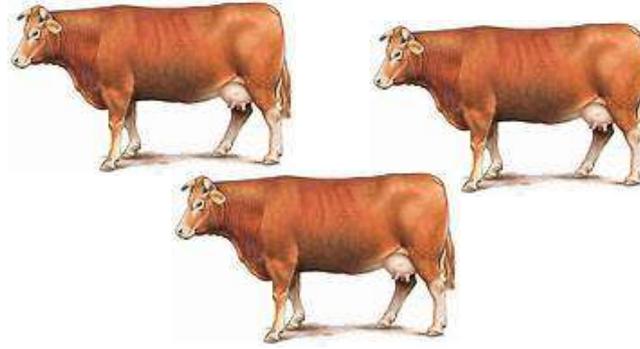
2004 : انتاج الفأرة كاجيوا في اليابان باستخدام تقانة التوالد البكري ( بدون الحاجة للحيوانات المنوية)

مزايا تقانة إنتاج الأجنة

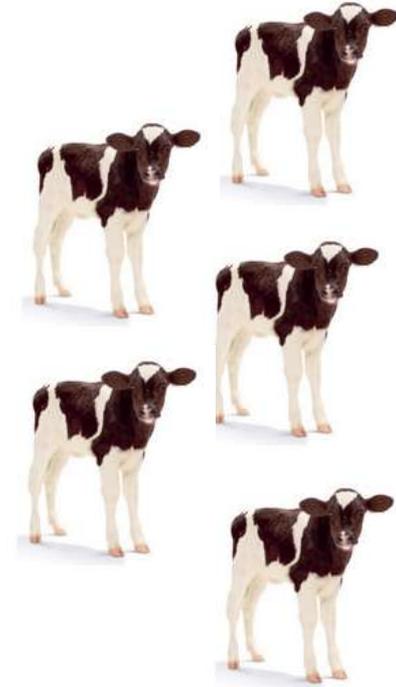
# انتاج الاجنة



إنتاج أجنة مخبريا  
بأعداد كبيرة



أبقار مستقبلة (حاضنة)



مواليد

■ النشر الفعال للمادة الوراثية

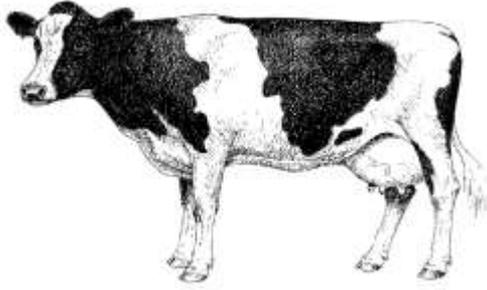
■ زيادة فعالية الانتخاب وعمليات التحسين الوراثي

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

# انتاج الاجنة

% ٦٠

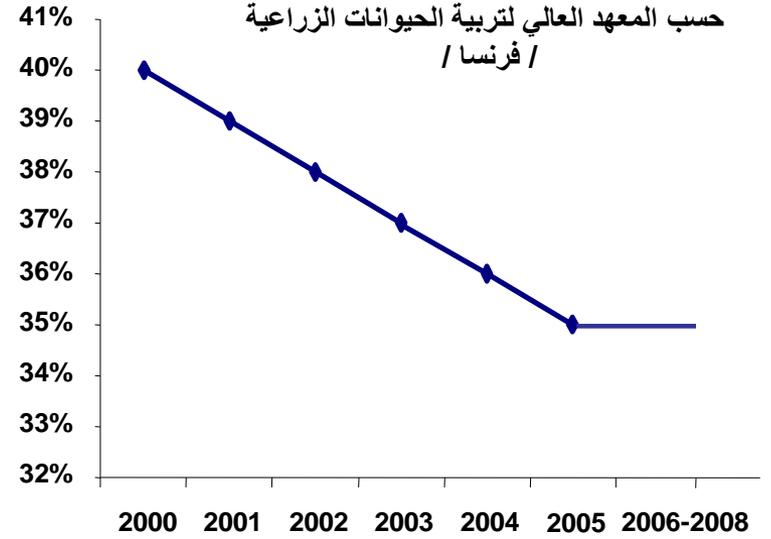
معدل الإخصابية (١٩٨٠)



% ٤٠

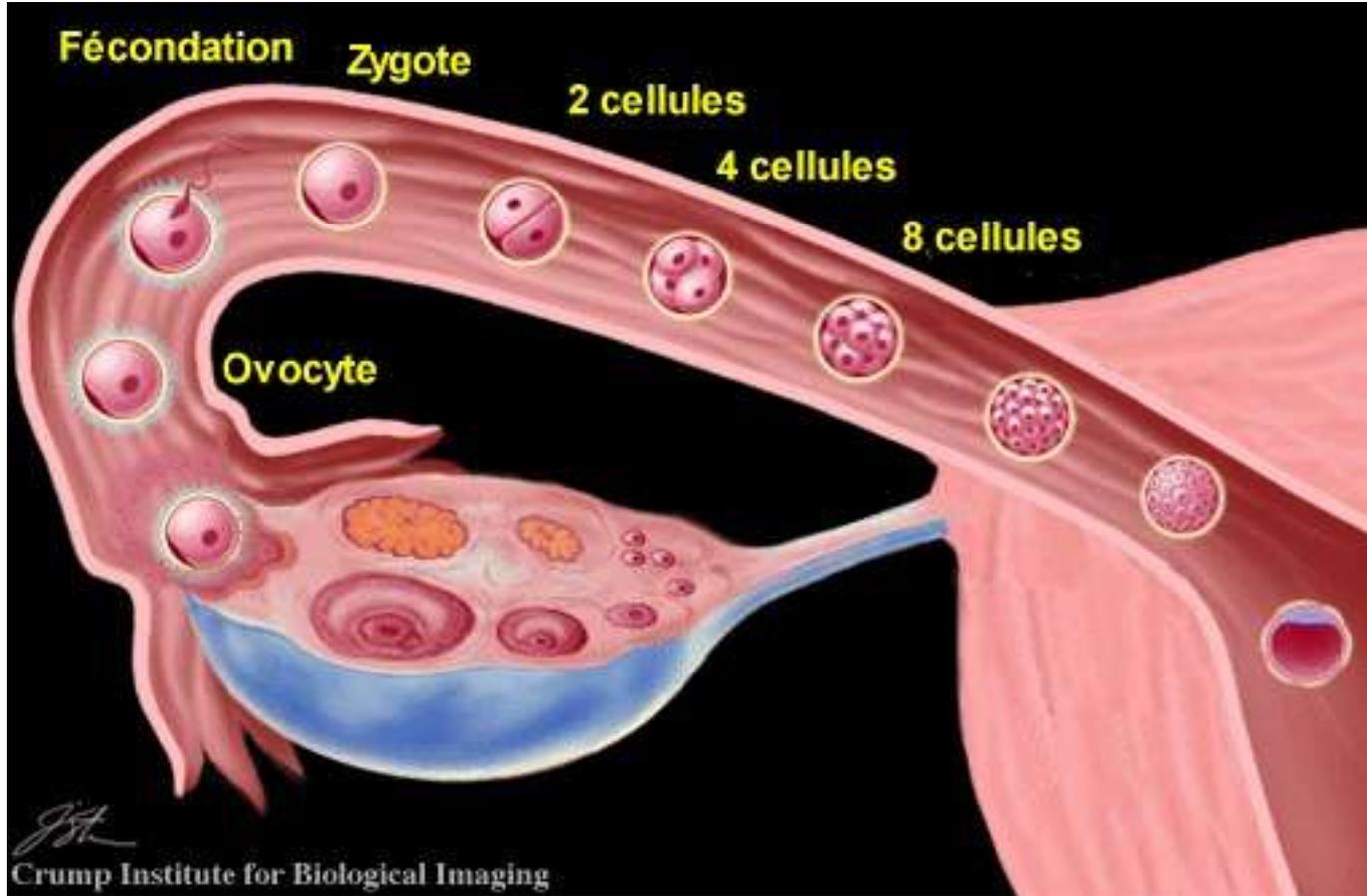
معدل الإخصابية (٢٠٠٠)

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

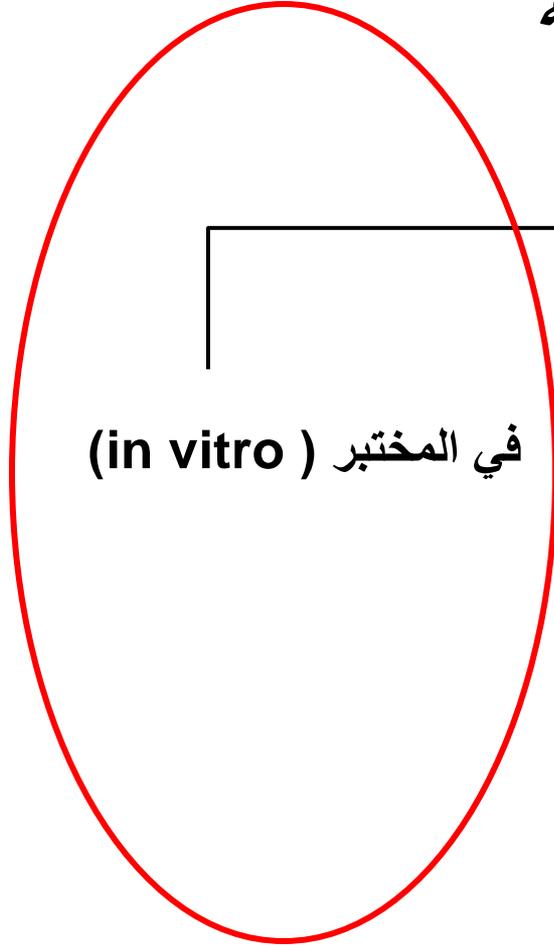
↓  
حفظ الاجنة لعشرات السنين

▪ بنك وراثي لحيوانات أو سلالات ذات مواصفات مميزة

▪ استمرار لنسل الابقار النافقة

▪ تجديد القطيع ( أمراض او أوبئة )

انتاج الاجنة

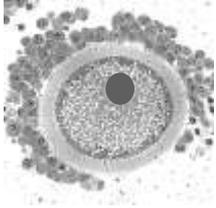


في المختبر (in vitro)

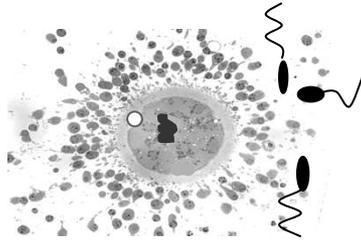
داخل جسم الحيوان الحي (in vivo)

# انتاج الاجنة مخبريا ( in vitro )

بويضة غير ناضجة



بويضة ناضجة



بويضة مخصبة



بويضة متفأجة



أرومة



مولود



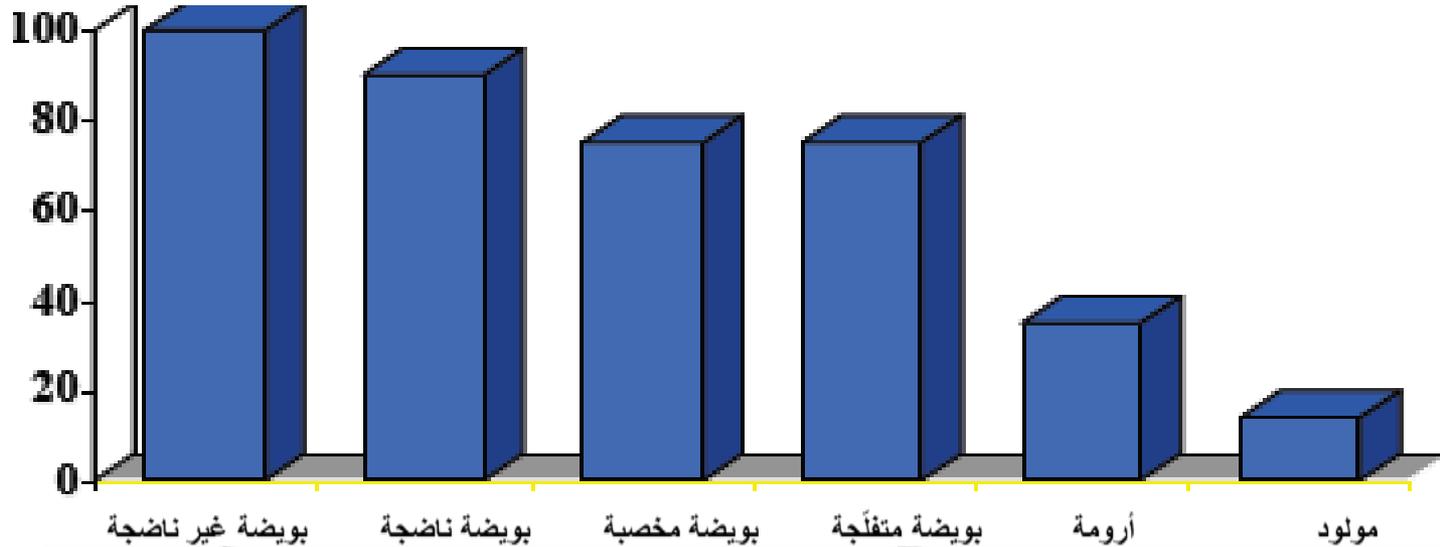
إنضاج مخبري  
24 h

إخصاب مخبري  
18h

تطور مخبري  
7 day

نقل وزراعة الجنين  
أو  
حفظ بالتجميد

نسبة النجاح



# انتاج الاجنة مخبريا

## (١) جمع البويضات وإنضاجها مخبريا

### (المسالخ)

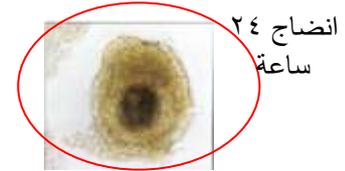
سيروم ملحي  
(NaCl ٠.٩%)  
درجة حرارته ٢٥-٣٠ م



شفط البويضات  
(2-6 mm  
جريبات)

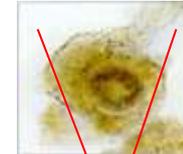


١- جيدة متراكمة الطبقات Compact cumulus cells تحتوي على أكثر من خمس طبقات من الخلايا الركامية.



انضاج ٢٤ ساعة

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.

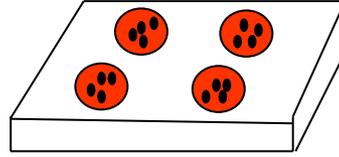


٤- سيئة لا تمتلك خلايا ركامية حول الغلاف الشفاف Completely denuded oocytes



# 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**

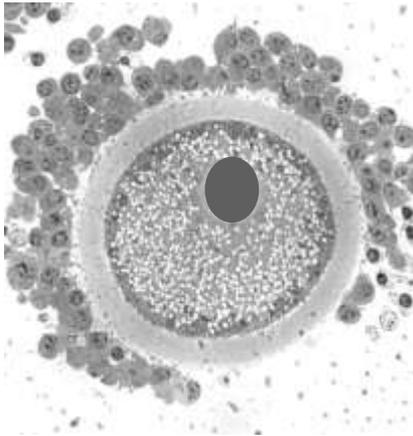
(Blastocyste 31%)

**199 TCM + EGF + MIX**

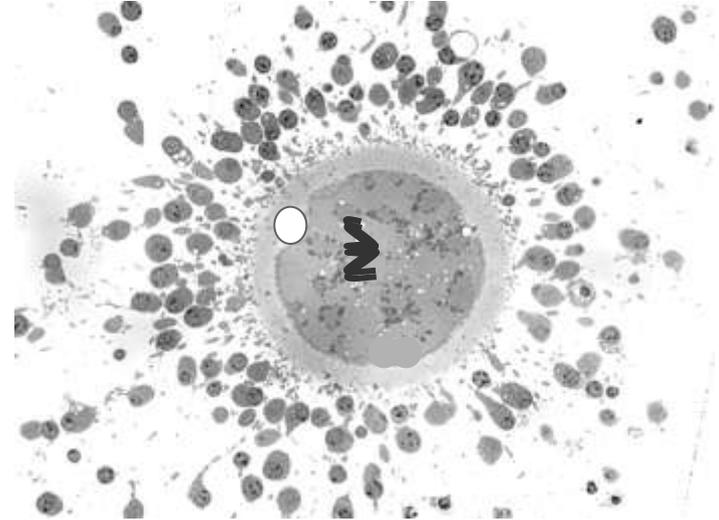
(Blastocyste 39%)

# انتاج الاجنة مخبريا

## ( ١ ) جمع البويضات وانشاجها مخبريا



→  
انشاج مخبري  
24 h

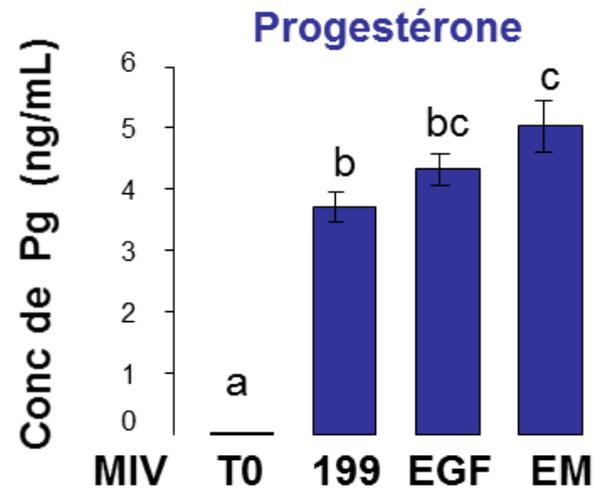
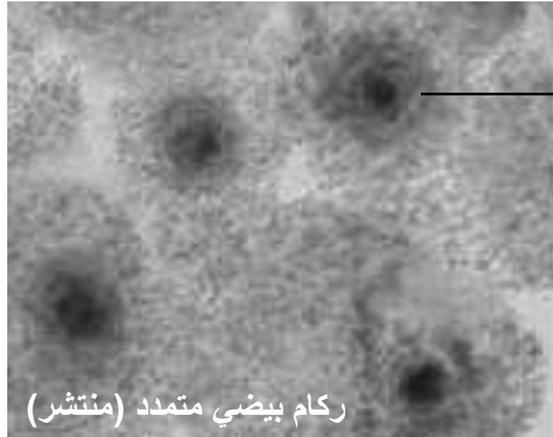


- انشاج نووي : تستكمل البويضة لانقسامها الميوزي من مرحلة الحويصلة الجرثومية ( VG ) الى مرحلة الميتافاز من الانقسام الميوزي الثاني (MII)
- انشاج سيتوبلازمي : تراكم للبروتينات ، اللبيدات ، RNA ، .....

# انتاج الاجنة مخبريا

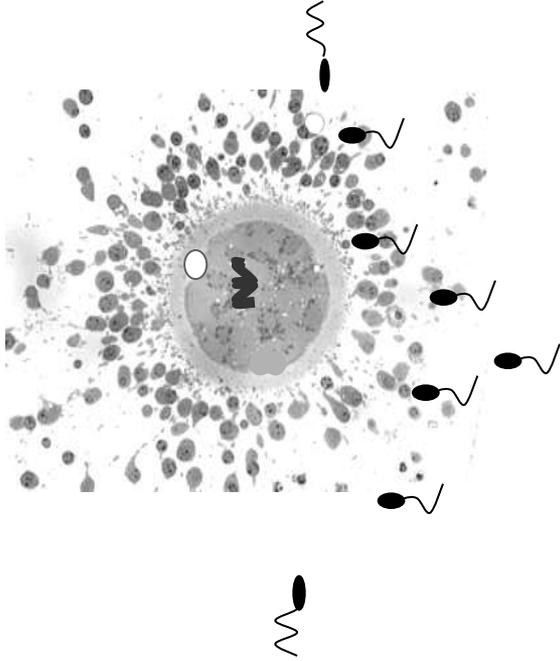
## (١) جمع البويضات وإيضاجها مخبريا

نسبة الانضاج : 90%



# انتاج الاجنة مخبريا

## (٢) الاخصاب المخبري للبويضات الناضجة



- فصل النطف ذات النوعية الجيدة

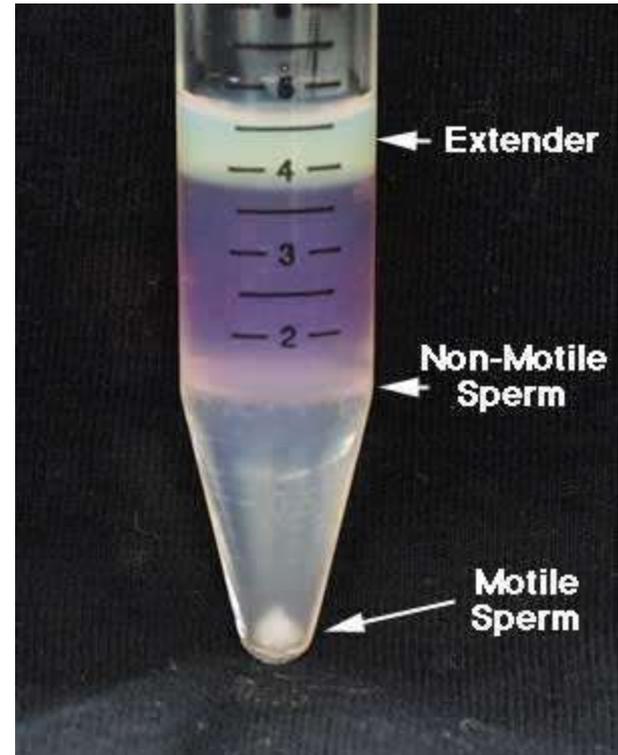
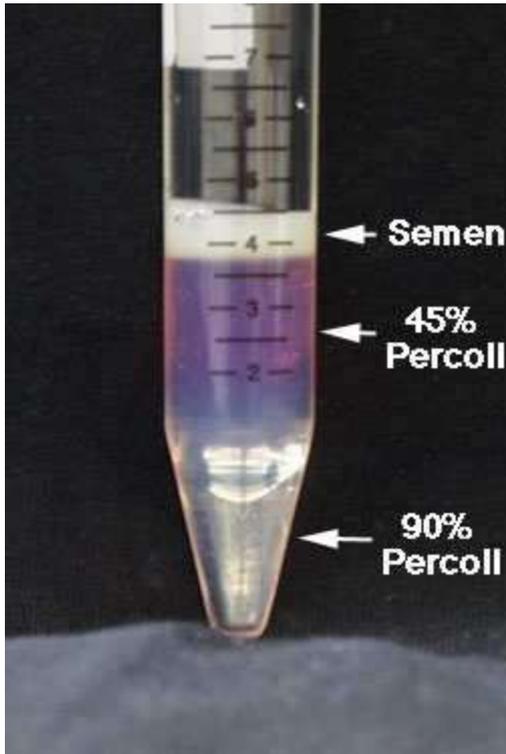
- إعطاء المقدرة الاخصابية للنطف **Capacitation**

- تحضين النطف مع البويضات الناضجة (١٨ ساعة)

# انتاج الاجنة مخبريا

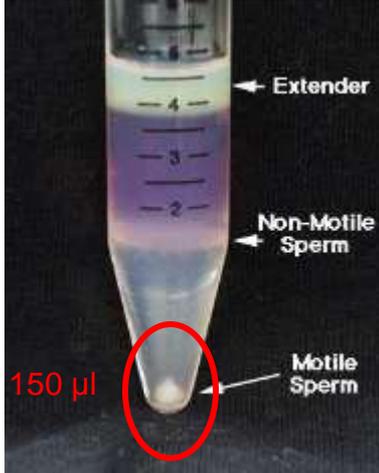
## (٢) الاخصاب المخبري للبويضات الناضجة

- فصل النطاف ذات النوعية الجيدة



# انتاج الاجنة مخبريا

## (٢) الاخصاب المخبري للبويضات الناضجة



- إعطاء المقدرة الاخصابية للنطاف **Capacitation**

TALP (Tyrode Albomine Lactate Pyruvate)

+

Heparine

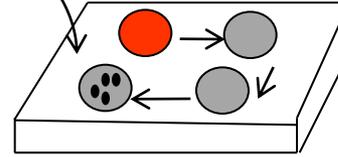
تركيز النطاف : 2.000.000 /ml

# 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 التوتي



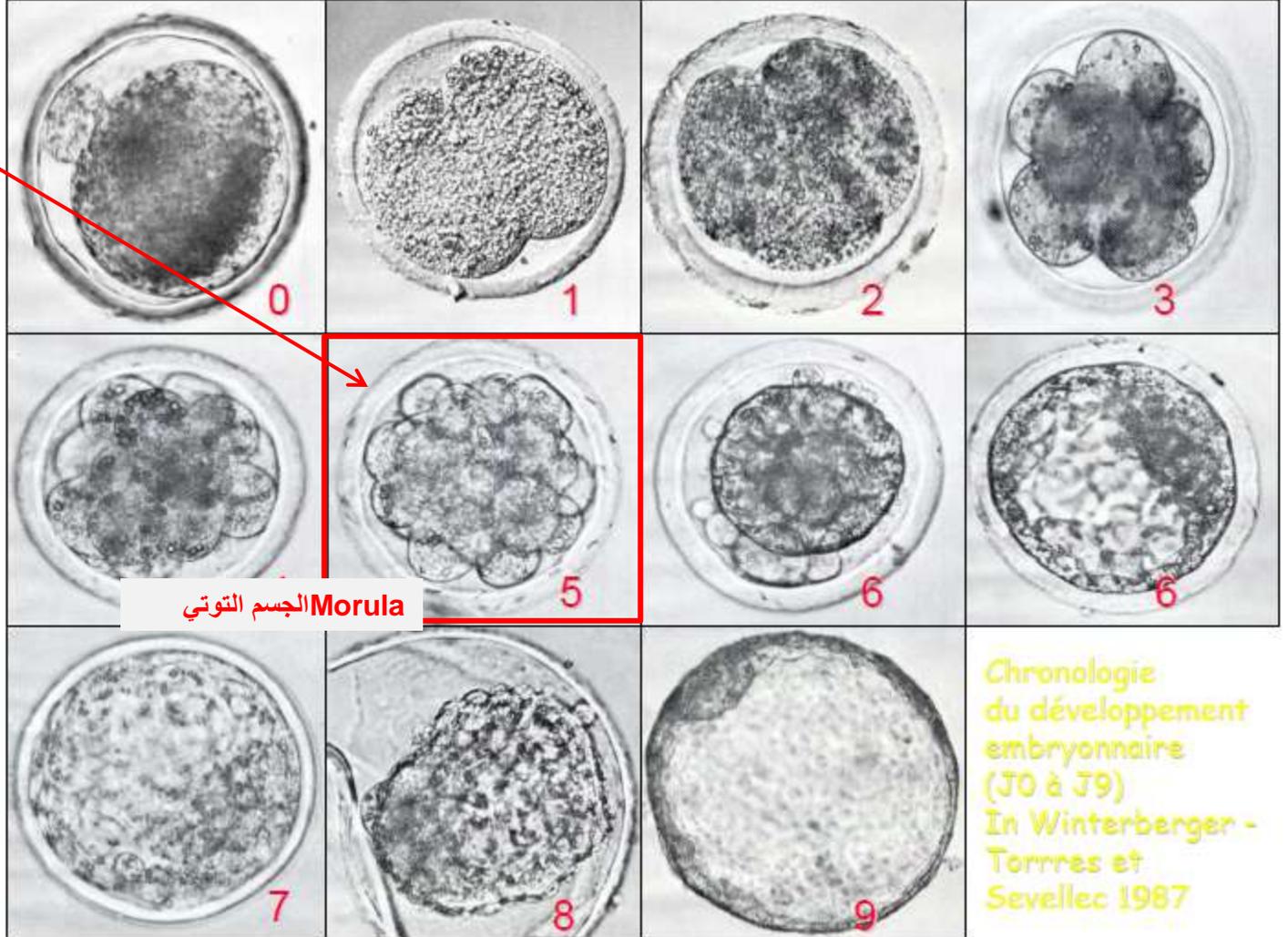
أرومة (الكيس الاصلي)

# 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

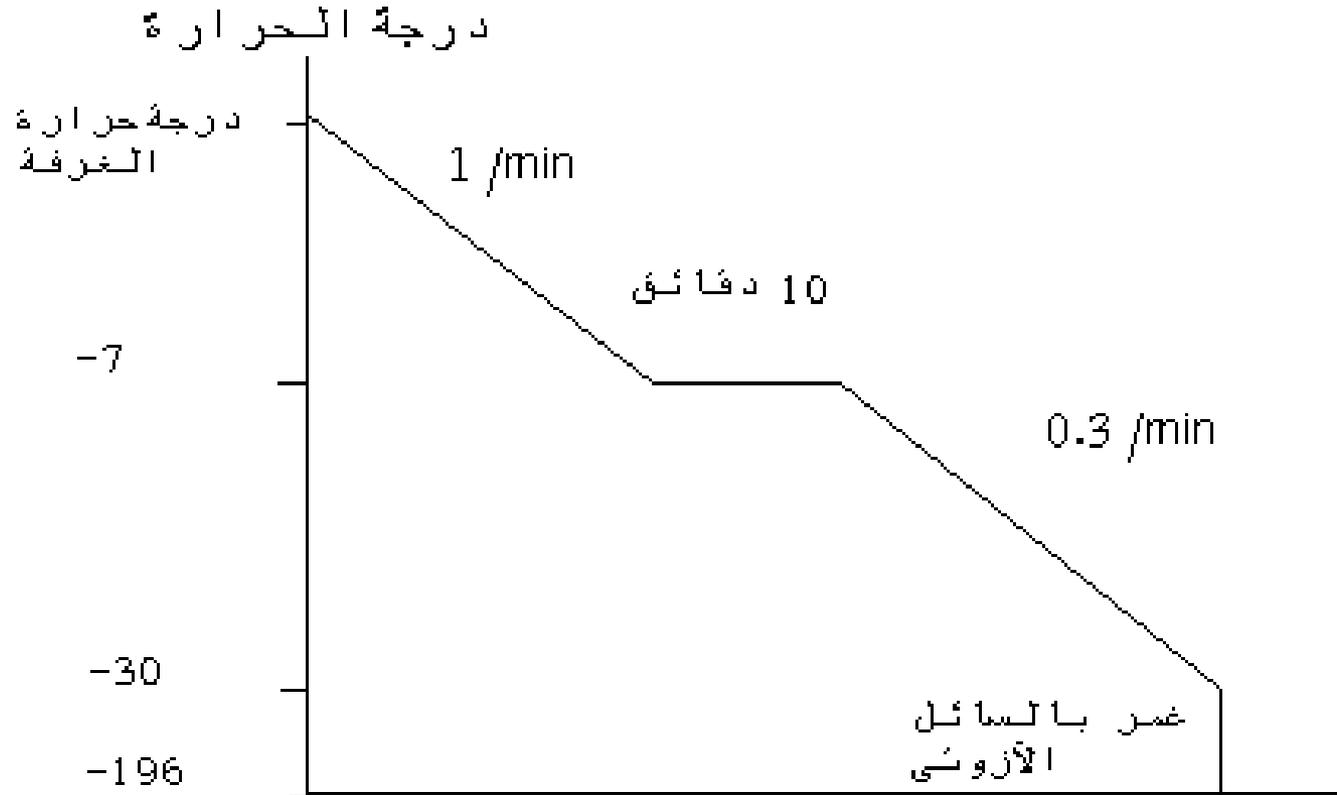
- موانع تجميد : (غليسرول - بروباندول - DMSO)

- البومين سيروم الدم

- محلول فوسفاتي واقى (PBS)

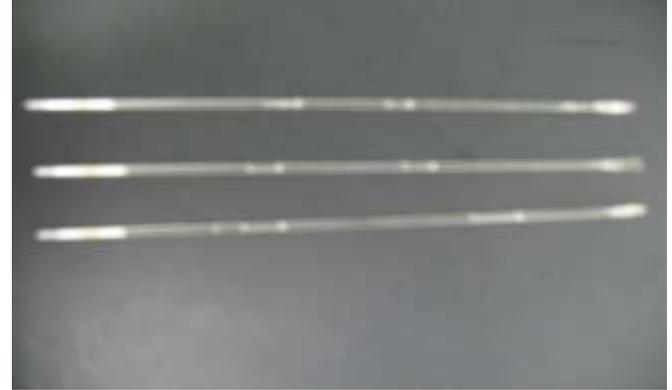
- مضادات حيوية

# منحنى تجميد الأجنة





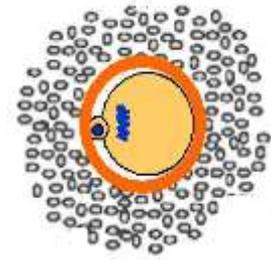
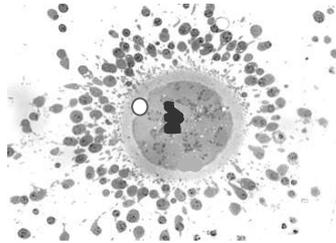
جهاز تجميد الأجنة



الأجنة في القشات



بويضة منضجة مخبريا  
in vitro



بويضة منضجة داخل جسم  
in vivo الحيوان الحي

إخصاب و تطور مخبري (٧ أيام)



~35%



Blastocyste



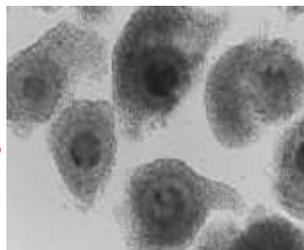
~70%

مقدرة البويضة على التطور

IN VITRO < IN VIVO



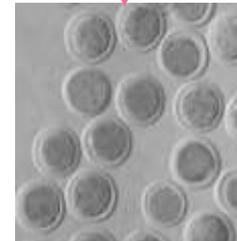
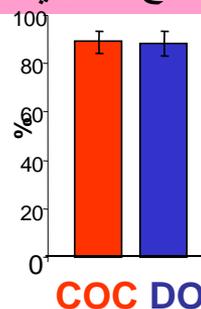
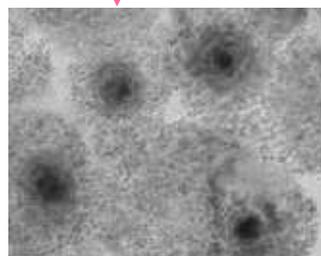
بويضات محاطة بخلايا الركام البيضي  
**Cumulus oocyte complexes (COC)**



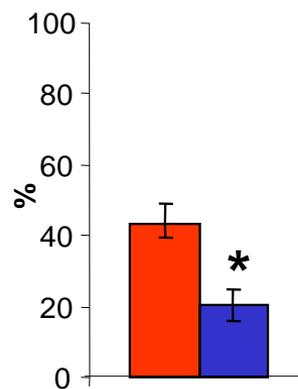
بويضات عارية من خلايا الركام البيضي  
**Denuded oocyte (DO)**



انضاج مخبري ٢٤ ساعة



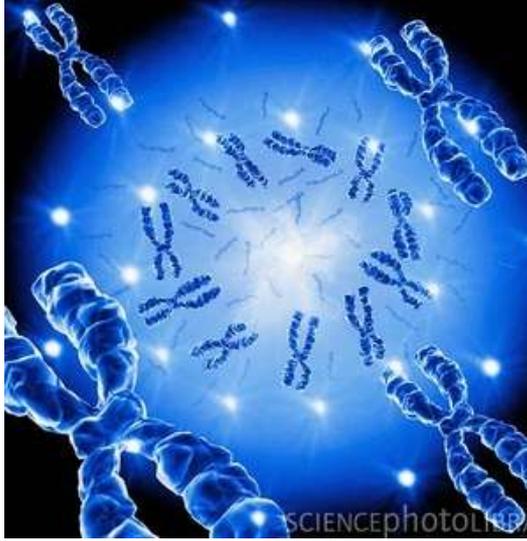
إخصاب و تطور مخبري



مقدرة البويضة على التطور

**COC > DO**

Blastocyste



جينات الركام البيضي

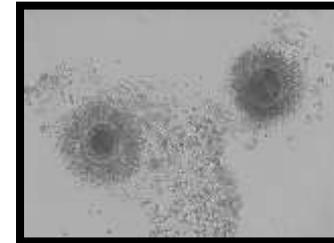
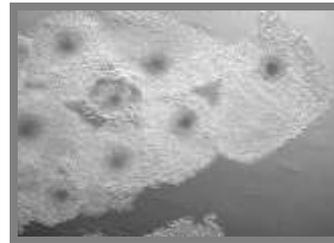


مقدرة البويضة على  
التطور بعد الاخصاب  
المخبري

- 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 ( ٦-٥ أشهر )

(% blastocysts) 20 %



IN VITRO : إنضاج

مبايض من المسلخ

بقرة

40 %



IN VITRO

مبايض من المسلخ

بقرة

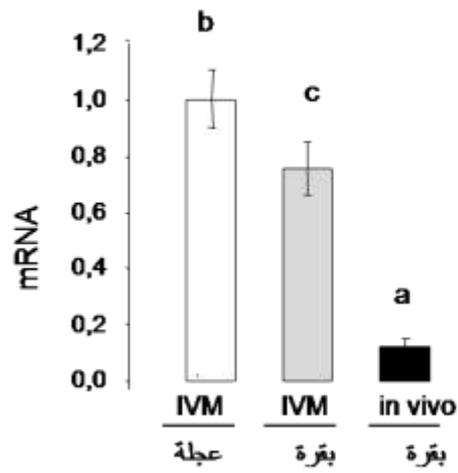
70 %



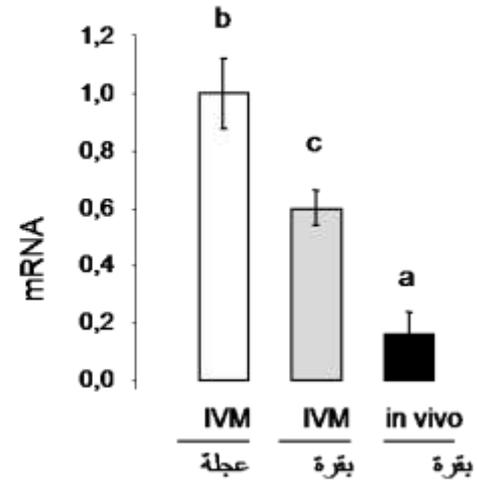
IN VIVO

تحريض إباضة (OPU)

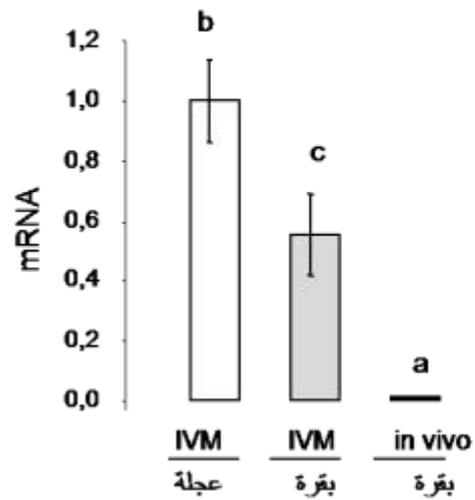
### *SDC2*



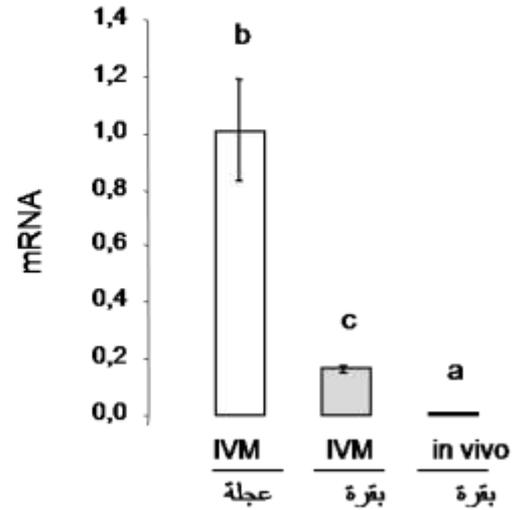
### *CAPG*

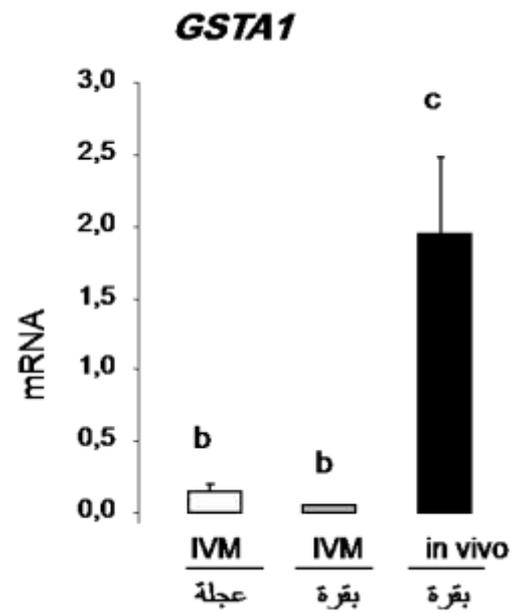
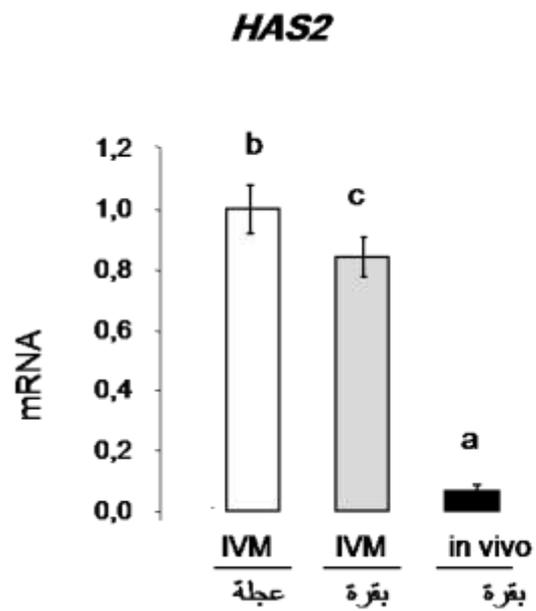


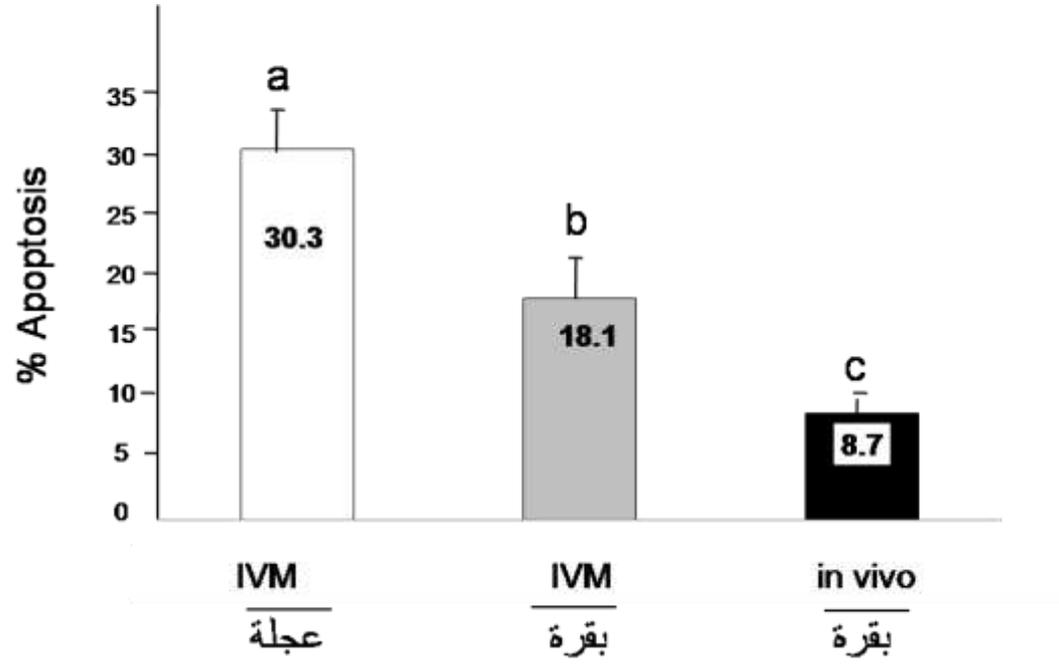
### *SERPINA5*



### *MMP9*





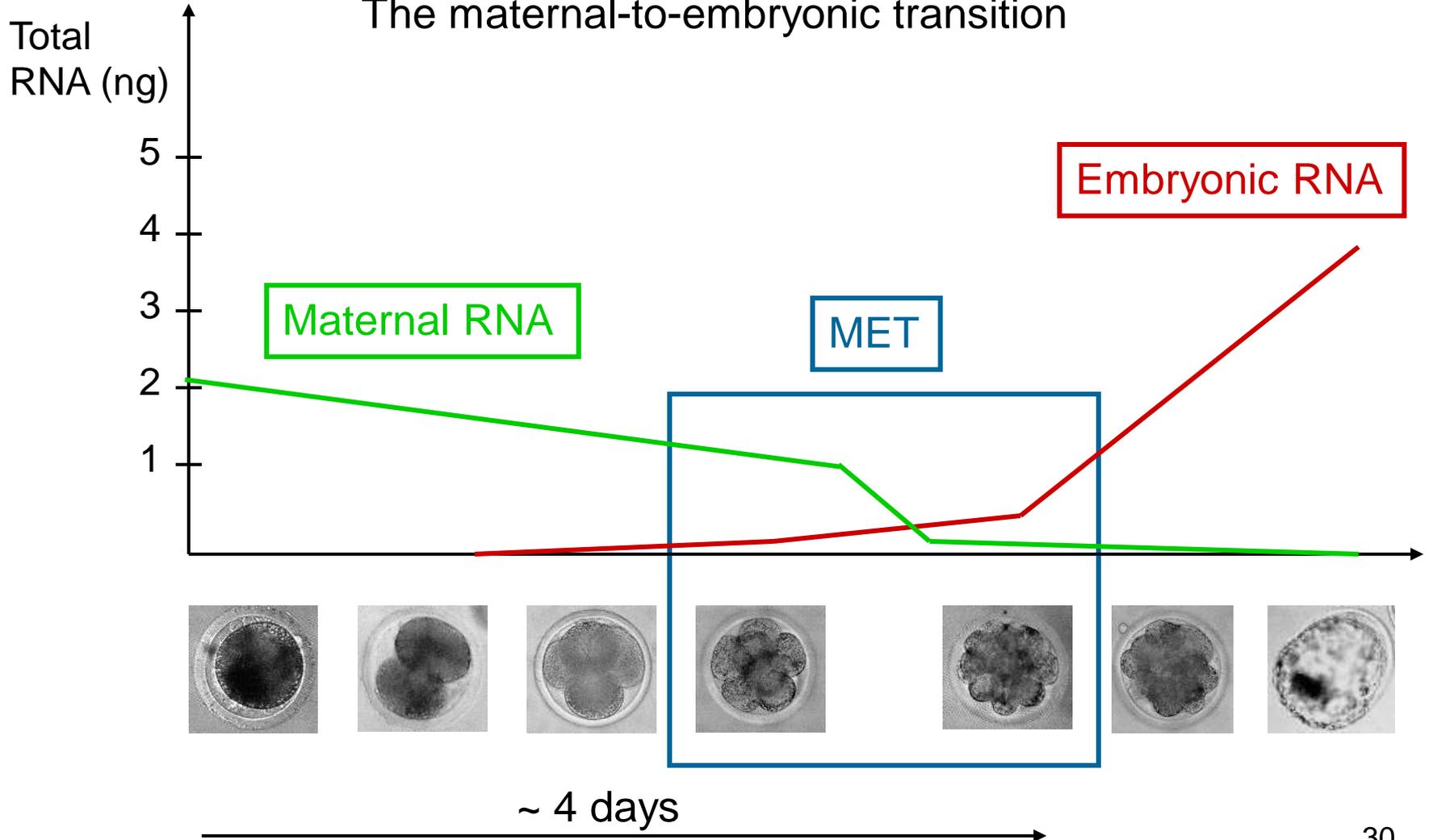


(سلهه و زملاؤه، ٢٠١٥)

# الانضاج المخبري

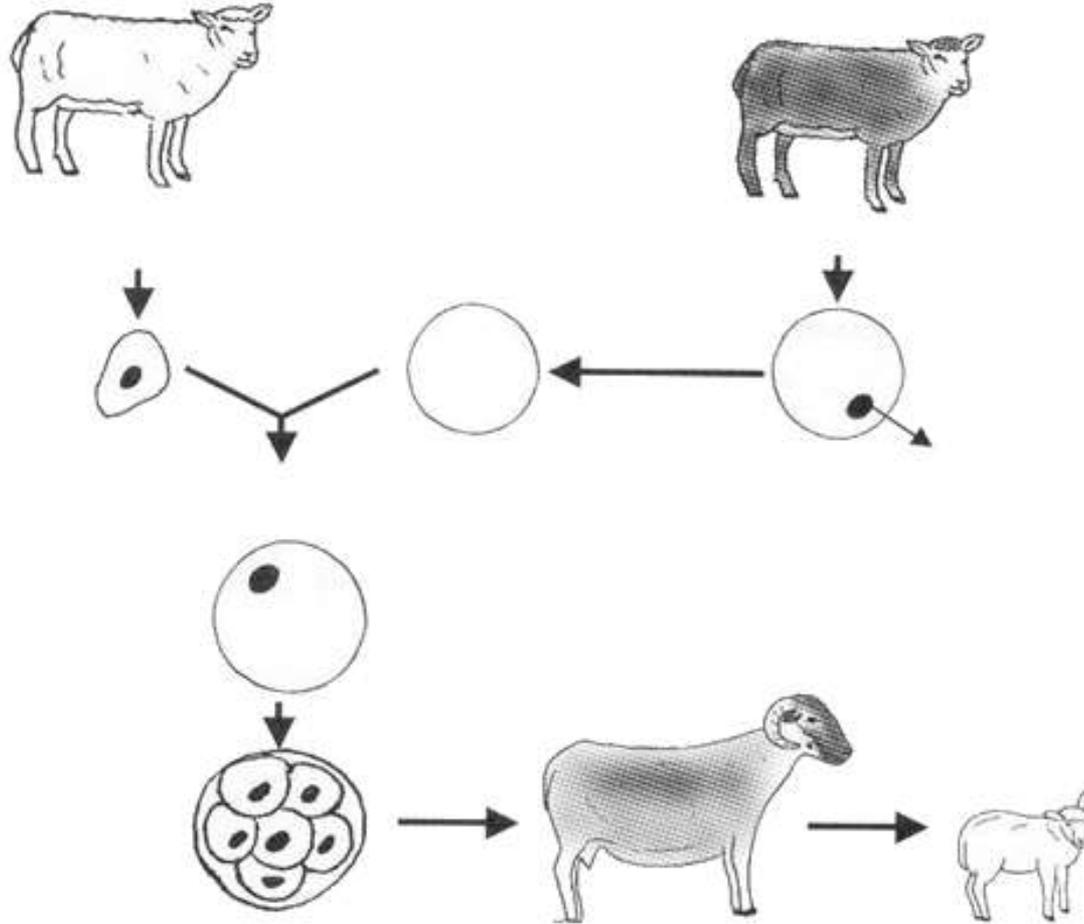
اهمية الانضاج المخبري ؟

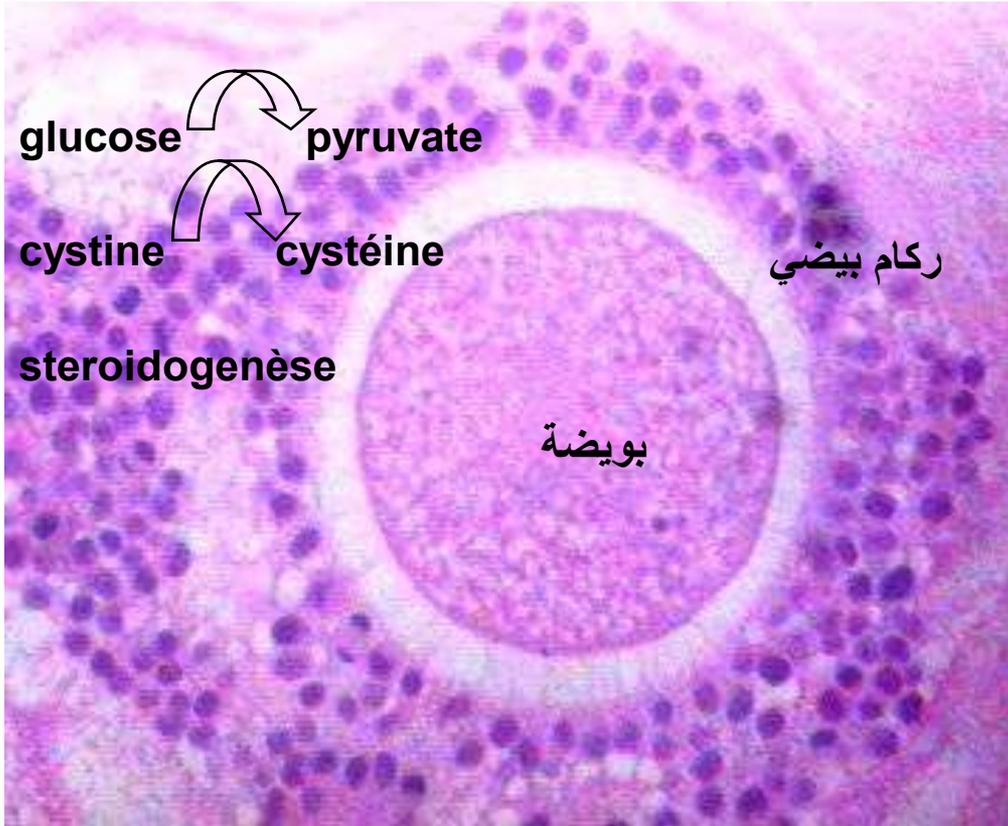
## The maternal-to-embryonic transition



# الانضاج المخبري

## اهمية الانضاج المخبري؟





## الركام البيضي :

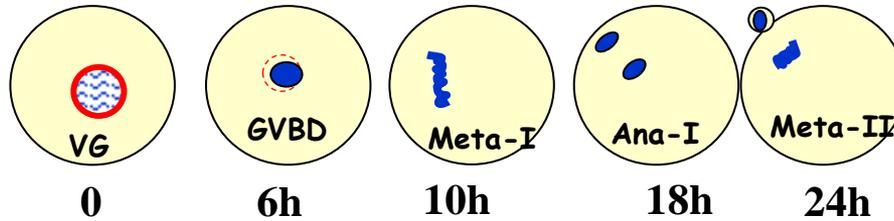
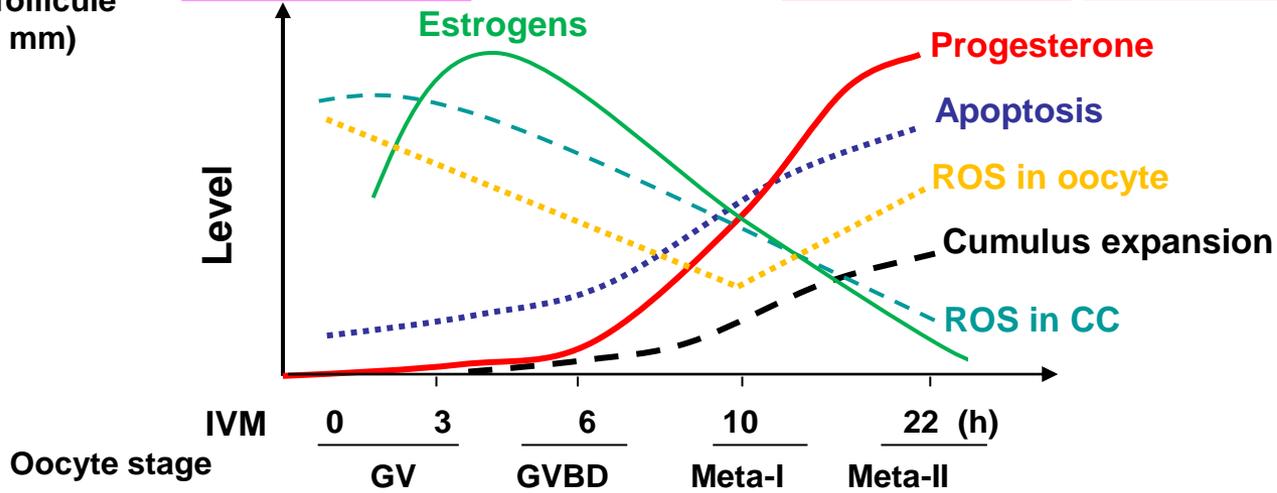
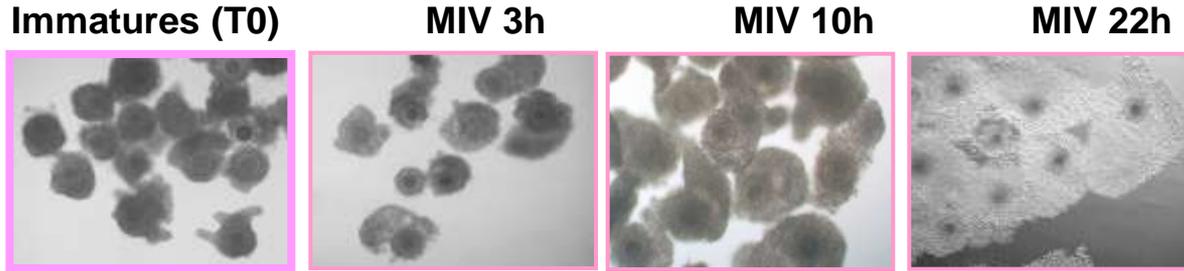
- مصدر هام للطاقة
- حماية البويضة من الاجهاد التأكسدي
- إنتاج الهرمونات الستيرويدية

# حركية الانضاج المخبري

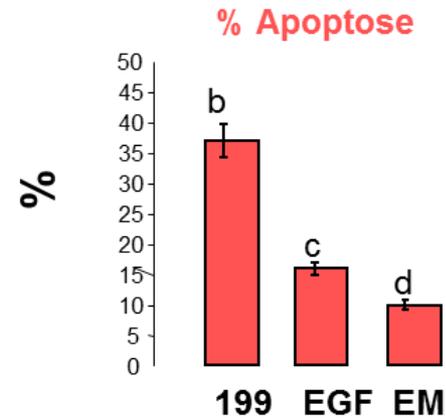
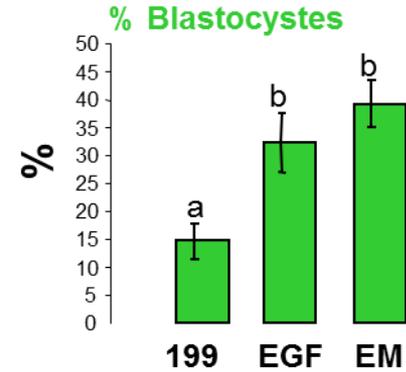


Ovaire

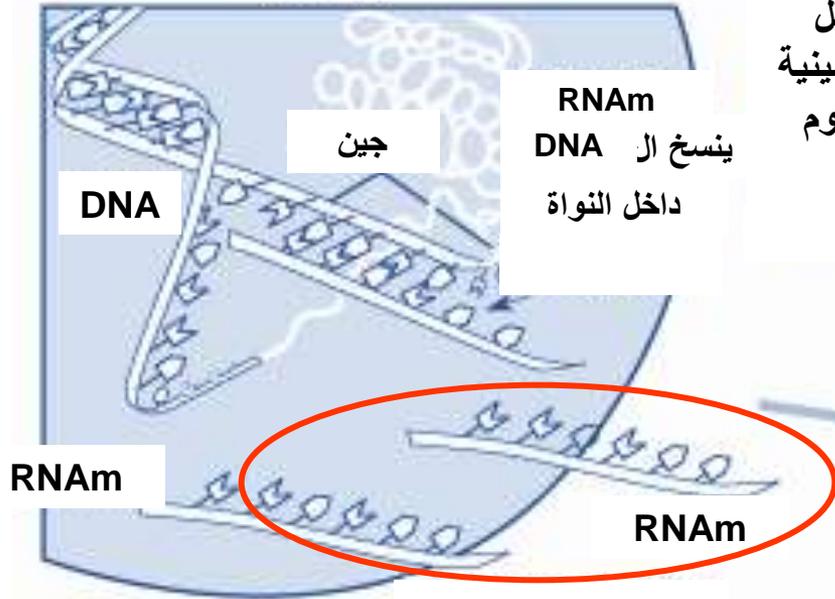
COC de follicule de 3-6 mm)



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



RNA الناقل ينقل  
الاحماض الامينية  
الى الريبوزوم



تركيب السلسلة البروتينية



يستخدم الريبوزوم  
الاحماض الامينية من أجل  
تركيب السلسلة البروتينية

سيتوبلازم

# Données expérimentales

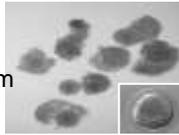
## 2) Analyse transcriptomique comparative du cumulus après maturation in vitro et in vivo

Vache adulte

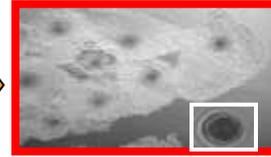
**COC immature** : cumulus compact (ovocyte en prophase-I)

**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**

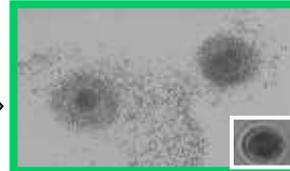


Vache adulte



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**

