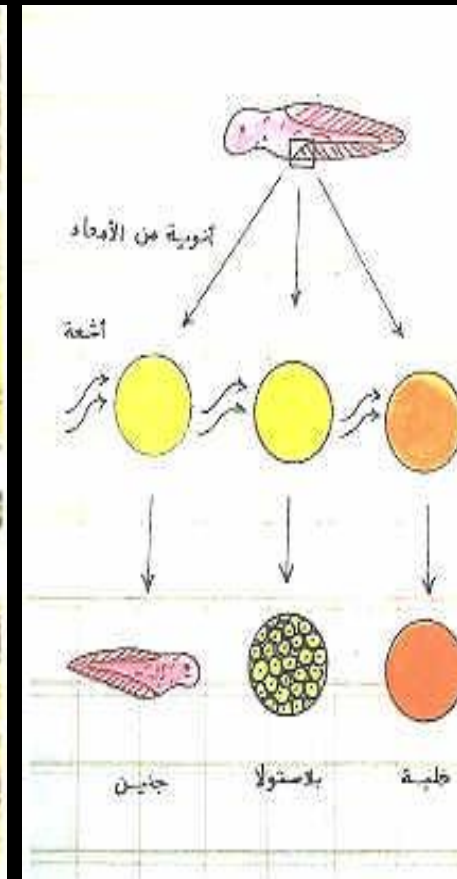
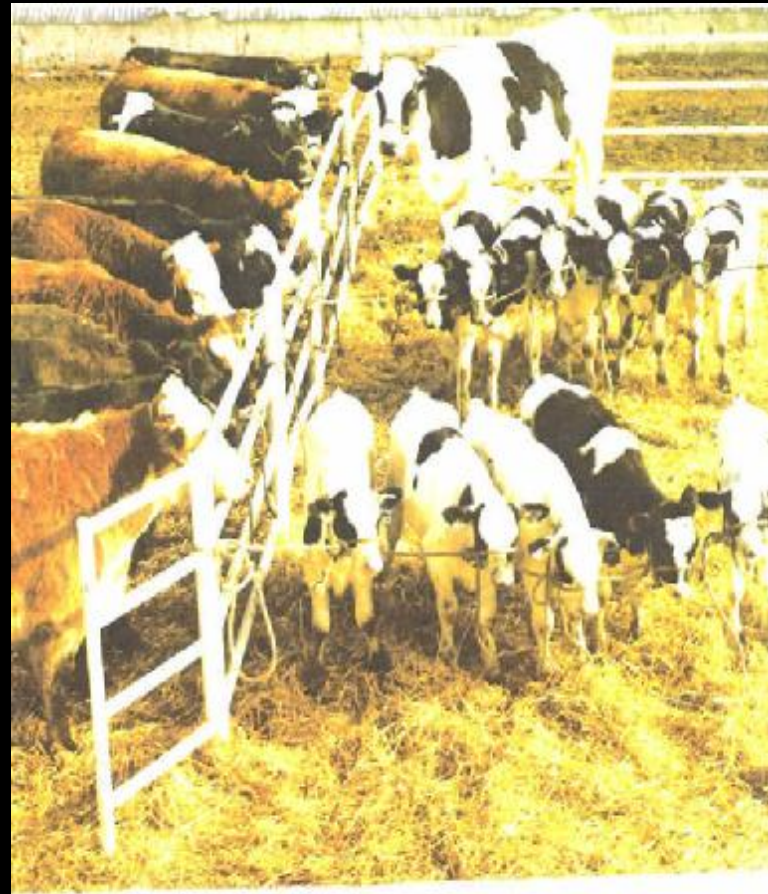
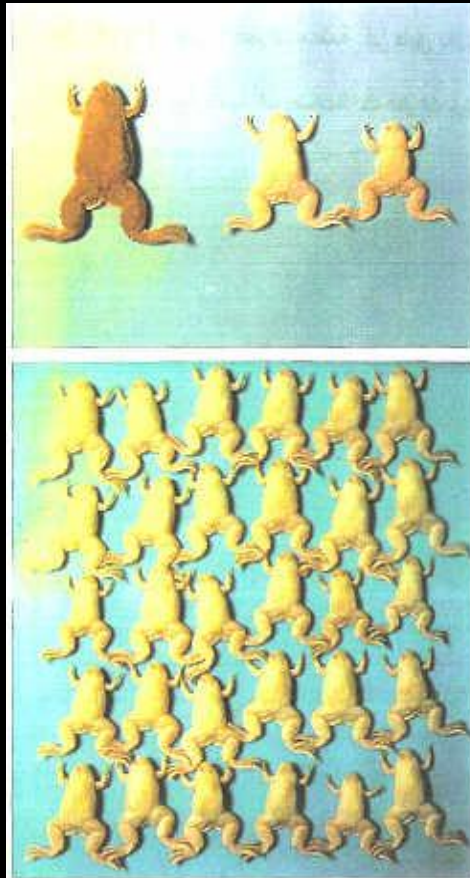




انتاج التوائم والاستنساخ

Identical twinning and cloning



الخلفية التاريخية لتجارب الإستنساخ:

في عام ١٩٥٢ استطاع كل من بيرق وكنج (Birggs & King) ان ينقلا نواة من طور المفلجة أو البلاستوله للصفدة إلى بويضة تم التخلص من نواتها فأعطت اجنة.

في حين انها لم تنجح عندما نقلنا انوية من خلايا أكتوديرمية او ميزوديرمية من طور المبطنة او الجاسترولة عام ١٩٥٥م.

كما جربا ذلك على اجنة اخري خلال ٥٦-١٩٦٠م ولم تنجح ايضا مما ادى بهم الى استنتاج ان النواة بعد مرحلة التفلج المتميزة لا يمكن ان تعاد برمجت جيناتها في سيتوبلازم البويضة .

كما استطاع تينق (Tung) عمل الإستنساخ في الأسماك عام ١٩٦٣ م

وفي عام ١٩٦٦م استطاع قاردرن ان يستنسخ ضفادع من أنوية خلايا مأخوذة من أمعاء طور ابوذنيبه ونقلها لبويضات تم التخلص من نواتها

وفي عام ١٩٨٤م تم عمل الإستنساخ من خلايا أنوية خلايا جنين الثدييات

إنتاج التوائم والاستنساخ: Identical twinning and cloning

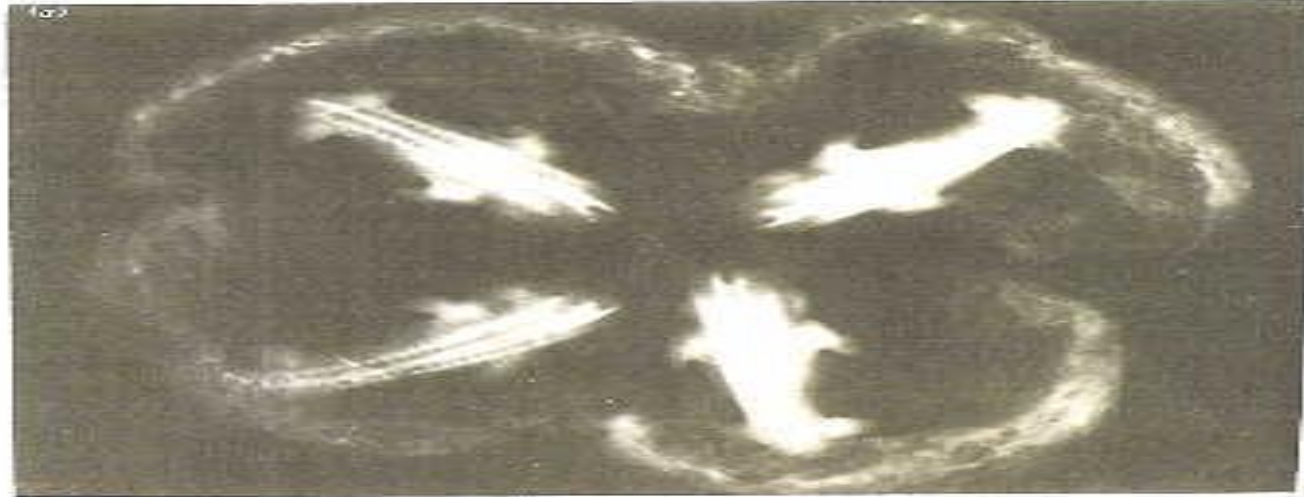
n مقدمة وتعريف:

n إن إنتاج التوائم تجريبيًا يعني إنتاج أكثر من جنين مستمد من جنين واحد حيث يتم تقسيم الجنين في مراحل التفلج إلى عدة فُلجات لتكوين عدد من الأجنة. وهي عملية تحدث في معظم الكائنات الحية أن ينتج أكثر من جنين من بويضة واحدة أخصبت بحيوان منوي واحد.

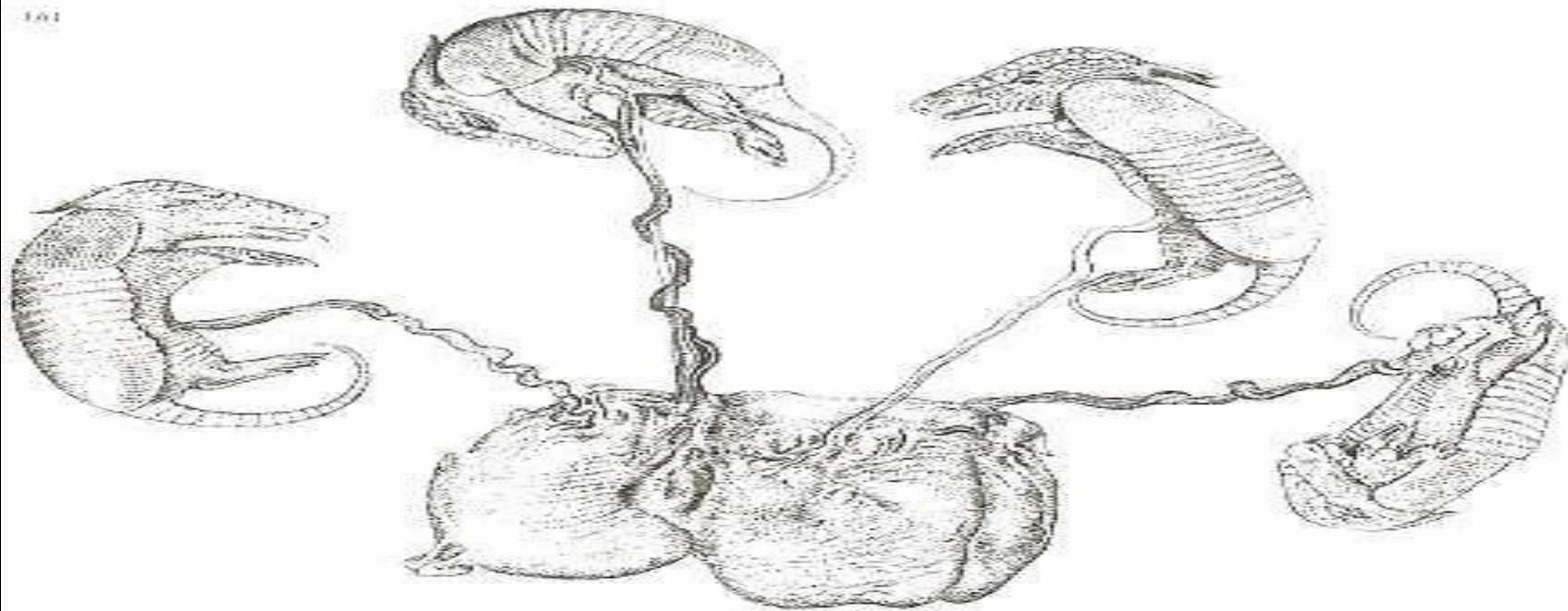
n كمثال فإن حيوان المدرع ذو التسع خطوط (Armadillo) ينتج أربع توائم متشابهة غالبًا بينما المدرع ذو الأحد عشر خطًا فإنه ينتج عشرة توائم متشابهة لكل فترة حمل.

n وإنتاج التوائم المتشابهة في الإنسان تحدث بنسبة واحد من كل ألف مرة حمل (١/١٠٠٠).

Fig. 1.9: (a) Early pregnancy in a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*), showing the four identical embryos derived from a single fertilized egg. The chorionic sac has been opened and the embryos are viewed from the dorsal position, each lying within its own chorionic sac. (From K. Benirschke *Fetal Monochorials*, ed. R. M. Wynn, N.Y. Acad. Sci. 1 237 (1965)) (b) A later stage of pregnancy in the nine-banded armadillo, showing the identical quadruplet fetuses, each attached to its own discrete placenta. (Courtesy of K. Benirschke.)



101



إنتاج التوائم والاستنساخ **Identical twinning and cloning**

n وقد يعني إنتاج التوائم أحيانا هو إنتاج أكثر من جنين من الإناث التي في الغالب لا تعطي إلا حمل واحد لكل فترة حمل مثل الأبقار أو الخيل وفي هذه الحالة يتم تحفيز الأنثى المرغوب إنتاج الأجنة منها بواسطة الهرمونات لكي تنزل أكثر من بويضة ويتم تلقيحها أو إخصابها داخليا أو خارجيا ثم تجمع الأجنة وتنقل إلى إناث أخرى ولكن هذه الأجنة قد تكون غير متشابهة

n بينما في الأستنساخ فإنه يتم إنتاج الجنين من نواة أحد الخلايا تحقن داخل سيتوبلازم البويضة المزالة عنها نواتها وبدون مشاركة الحيوان المنوي في عملية الإخصاب أو التكوين ولذلك فإن الجنين الناتج يكون نسخة من الفرد الذي تم اخذ النواة منه.

إنتاج التوائم والاستنساخ Identical twinning and cloning

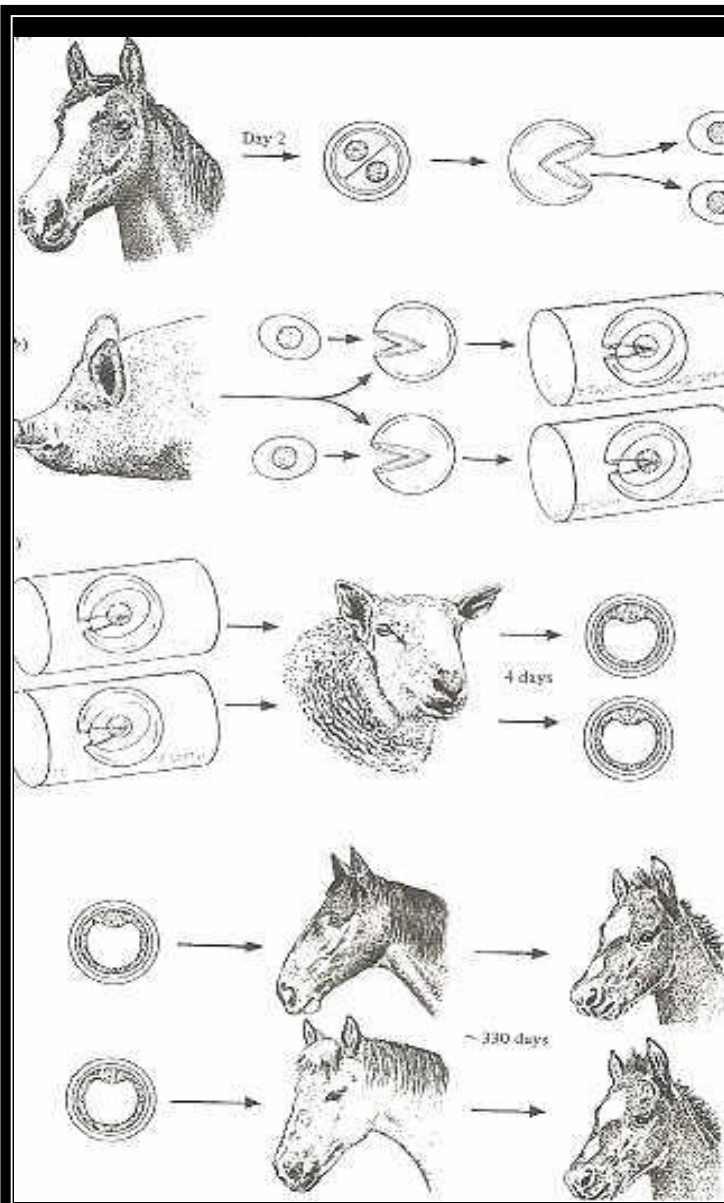
الإختلاف بين إنتاج التوائم والإستنساخ

إنتاج التوائم:

هو تقسيم الجنين في مراحل التفلج للإنتاج أجنة من جنين واحد فهو عمل نسخ (Cloning) من الجنين نفسه.

أما الاستنساخ:

فهو يسمى بالنقل النووي (Nuclear transplantation) حيث يتم نقل نواة من خلية جسدية إلى بويضة (غير مخصبة) ثم التخلص من نواتها لتكون جنين (من دون مشاركة الحيوان المنوي أو نواة البويضة فقط سيتوبلازمها). لعمل نسخة من الكائن الحي الذي أخذت منه نواة الخلية الجسدية.



انتاج التوائم

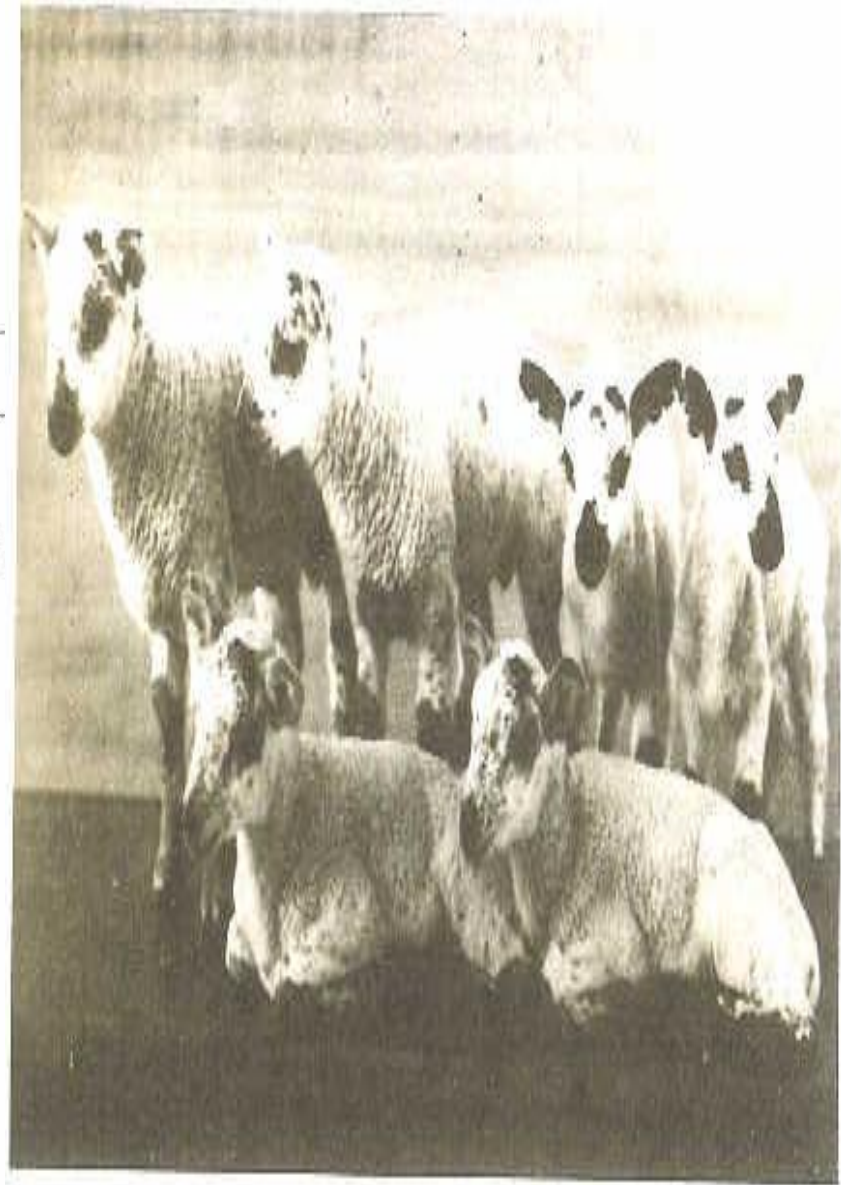
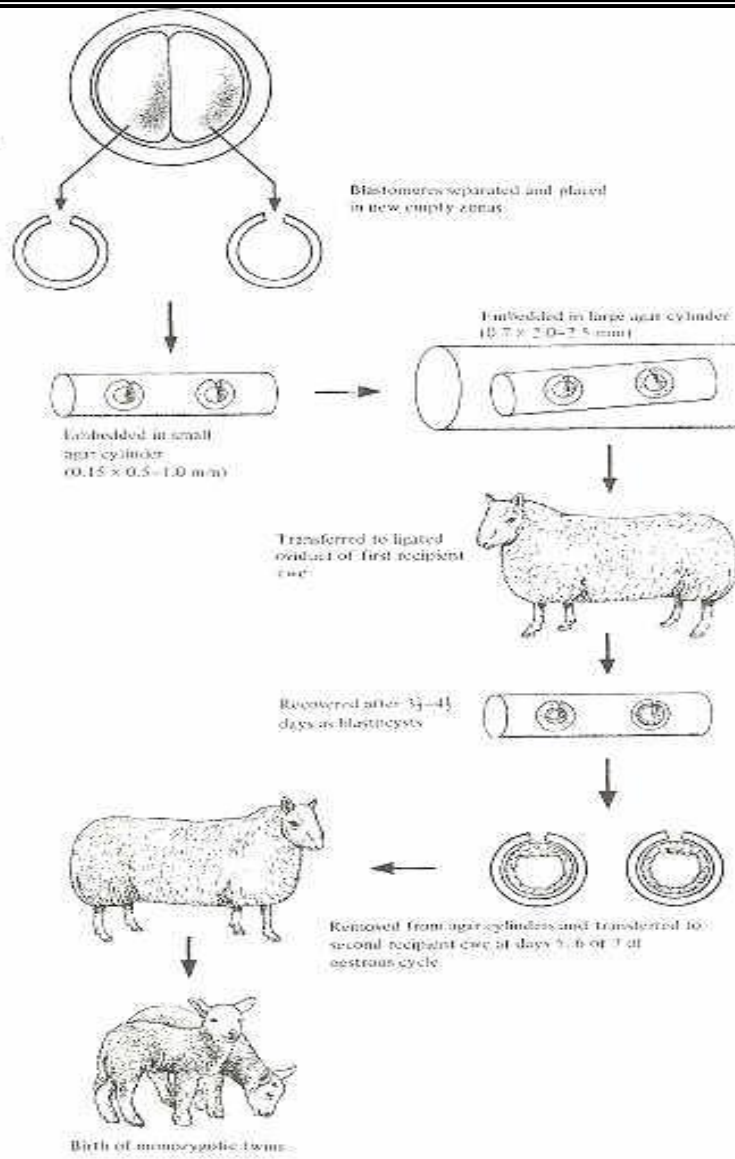
لقد نبعت فكرة انتاج نسخ التوائم من عملية التوائم المتشابهة وهي الأجنة الناتجة من بويضة اخصبت بحيوان

منوي واحد . ويتم انتاج التوائم تجريبيا بالطرق التالية:

أولاً: انتاج التوائم المتشابهة آليا :

حيث يتم فصل فلجات الجنين بواسطة ابرة تشريحية (مثل تجارب وليم روكس) أو تحت المجهر وازالة الغشاء الشفاف من حولها (مليار ١٩٧٠م) ثم تنقل الفلجات الى ام مستقبلية أو توضع في ام حاضنة قبل ان تنقل للأم المستقبلية.

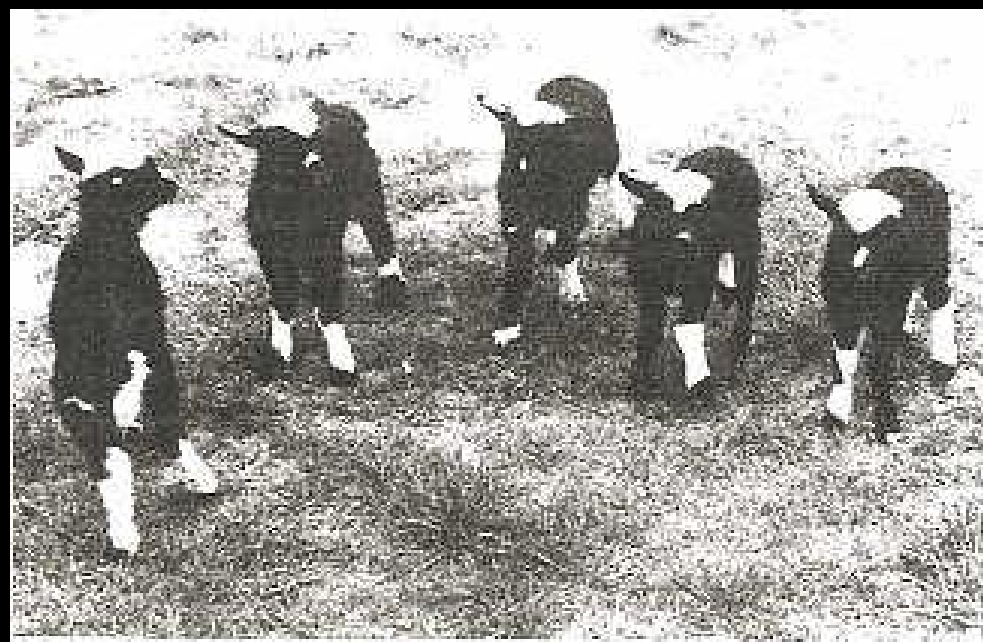
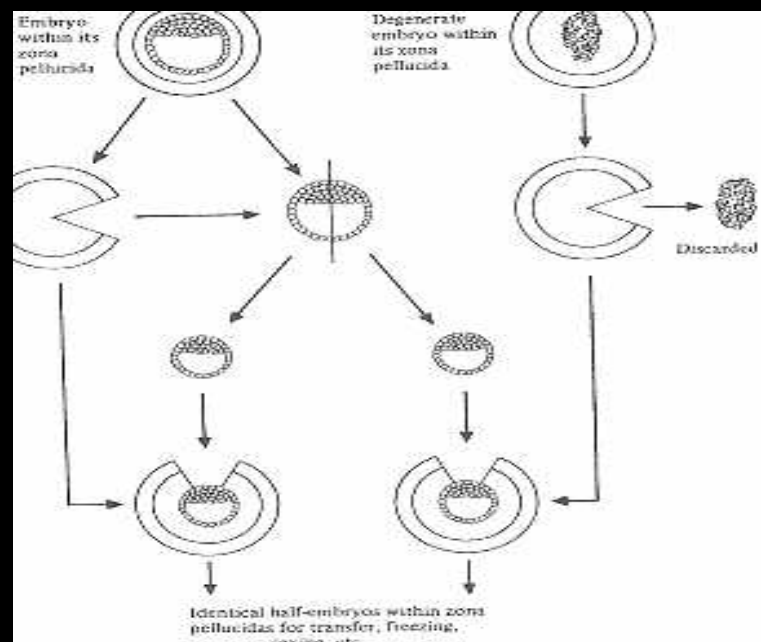
1.5: Technique for using identical twins, its or quadruplets by using the blastomeres (by cleaving eggs, ferring each blasto-back into an empty pellucida, and adding it in agar before fer back into the set of a recipient. embryos are recovered e blastocyst stage, used from the agar ders and transferred to terus of a second iont for further lopment.
 in Willadsen, 1979 - sgested Further- ing) (Opposite page). e sets of twin lambs used by this method to by courtesy of Willadsen).



٢- إنتاج التوائم كيميائياً

وذلك بفصل الفلجات بواسطة مواد كيميائية (مثل قنذ البحر في محلول ملحي منخفض التوتر) أو بواسطة بعض الأنزيمات تحلل الغشاء من حول

الفلجات لتتفكك عن بعض وكل فلجة تكون جنين. ينقل للأم مستقبلة.



إنتاج الأجنة المتشابهة بفصل الجنين في مراحل التفليج

صورة لخمس مواليد متشابهة من الخراف أنتجت من جنين واحد تم تقسيمه في طور ثمان فلجات ونقلت كل فلجة للأم مستقبلة.

n إنتاج التوائم غير المتشابهة:

n ويقصد به هو إنتاج اكثر من جنين من الإناث التي غالبا تحمل جنين واحد لكل فترة حمل (مثل الإنسان الأبقار الخيل) في فترة حمل واحدة

n ويتم ذلك بتحفيز الأنثى خلال موسمها التزاوجي بواسطة الهرمونات التناسلية (FSH or PMSG & LH) لكي تعطي اكثر من بويضة.

n ثم تلقح هذه الأنثى طبيعيا أو بواسطة تلقيح صناعي داخلي

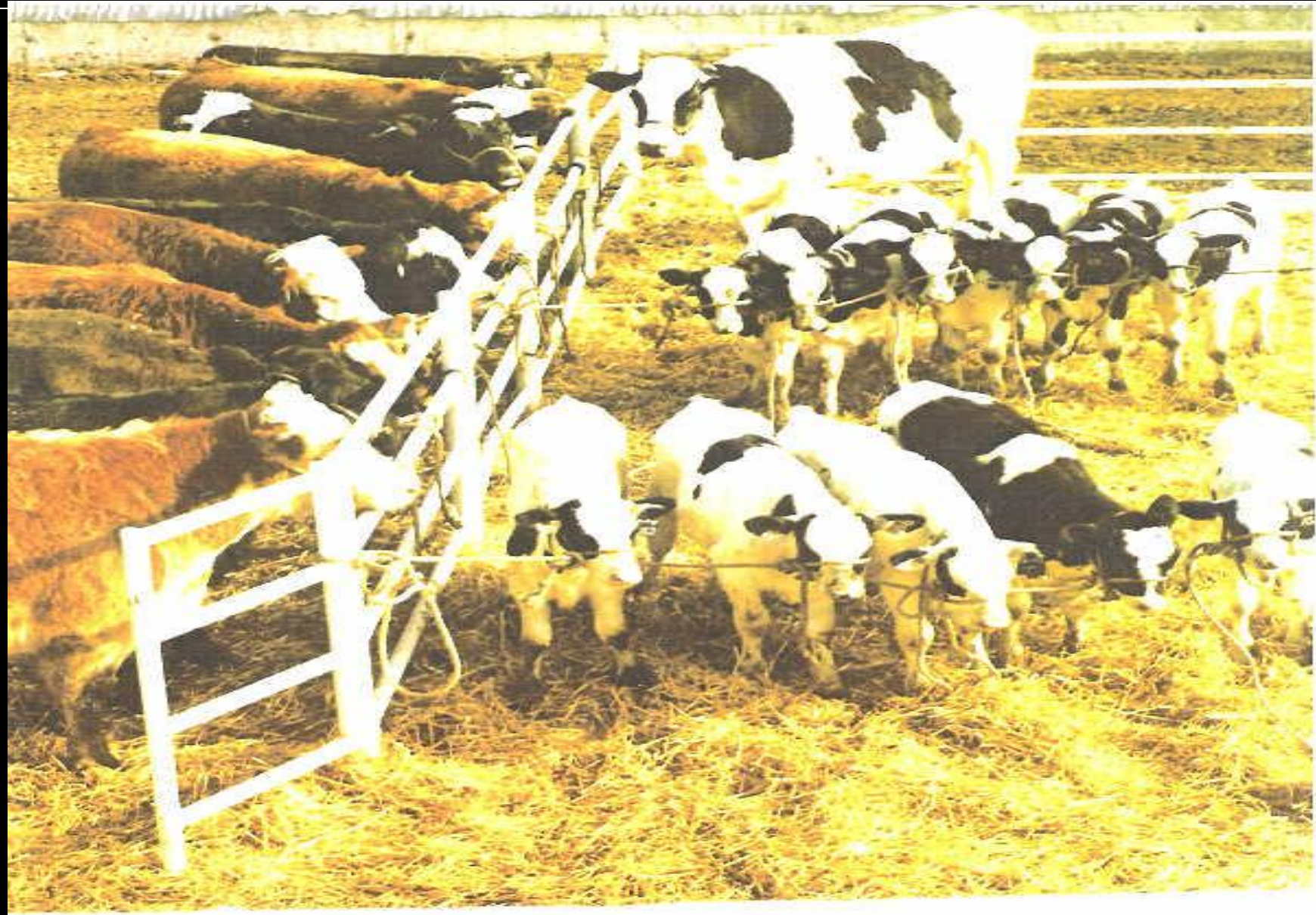
n ثم تجمع الأجنة من الرحم (غسيل رحم)

n وتنقل بعد ذلك الأجنة الى امهات مستقبلة حسب عدد الأجنة الناتجة.

n أو ان تجمع البويضات من الأم المانحة ثم تخصب البويضات خارجيا وتنقل الأجنة النامية الى امهات مستقبلة.

n وبذلك يمكن إنتاج قطع خلال فترة زمنية قصيرة

n هذه الأجنة الناتجة لا تكون متشابهة.



فوائد انتاج التوائم تجريبيا:

١- يمكن لمنتجي الماشية ان ينتجوا قطع كامل من سلالات معينة خلال فترة زمنية قصيرة.

٢- انتاج التوائم يعطي مادة وراثية متماثلة جيدة للدراسات الوراثية الخلوية وتطبيقاتها.

٣- تفيد التوائم المتشابهة في تجارب عمليات نقل وزراعة الأنسجة والأعضاء.

٤- تساهم في حل مشكلة العقم للإنسان.

٥- مفيدة من الناحية الاقتصادية.

٦- اختيار جنس الجنين وإكثاره.

٧- مع التقدم في تقنية التجميد يمكن تقسيم الجنين ونقل أجزائه وحفظ الفلجات الأخرى من نفس الجنين.

٨- تساهم العملية في الحفاظ على الحيوانات المهددة بالانقراض.

٩- كما تفيد في تجارب الهندسة الوراثية وحقن الجينات.

الاستنساخ (Nuclear Transplantation)

الاستنساخ:

هو عمل نسخة من الكائن الحي وذلك بواسطة نقل نواة خلية جسدية من الكائن الحي المرغوب عمل النسخة منه وإحلالها مكان نواة البويضة دون ان تخصب.

طرق عمل الاستنساخ:

أولاً- استنساخ الأجنة: النقل النووي من خلايا أجنة:

أ- طريقة الإستنساخ من خلايا أجنة مبكرة في مرحلة التفلج

حيث تم نقل أنوية من أجنة في مرحلة التفلج وزراعتها في بويضات تم التخلص من أنويتها كونت أطوار يرقية ثم وتكرار ذلك في الأجنة المتفلجة ونقل أنويتها إلى بويضات أخرى فأنتجت أجنة وهكذا.

طرق الاستنساخ أو النقل النووي من خلايا أجنة الفأر:

حيث تم نقل الأنوية من جنين فأر (لونه اسود) في مراحل مختلفة من التفلج (من طور الخليتين إلى مرحلة الأنغراس المبكرة) وذلك إلى بويضات فأر لونه أبيض [كانت نواة هذه البويضات في مرحلة تكسر الحويصلة الجرثومية (Germinal vesicles Gv) أو الطور النهائي للإنقسام الإختزالي الأول أو الطور الإستوائي للإنقسام الإختزالي الثاني (Metaphase of Meiosis II) أو بعد الإخصاب طور اللاقحة (الزيجوت) أو أثناء مرحلة التفلج طور الخليتين]

ثم تم التخلص من أنوية هذه البويضات ونقل أنوية من جنين الفأر الأسود فكانت تعطي أجنة مستنسخة.

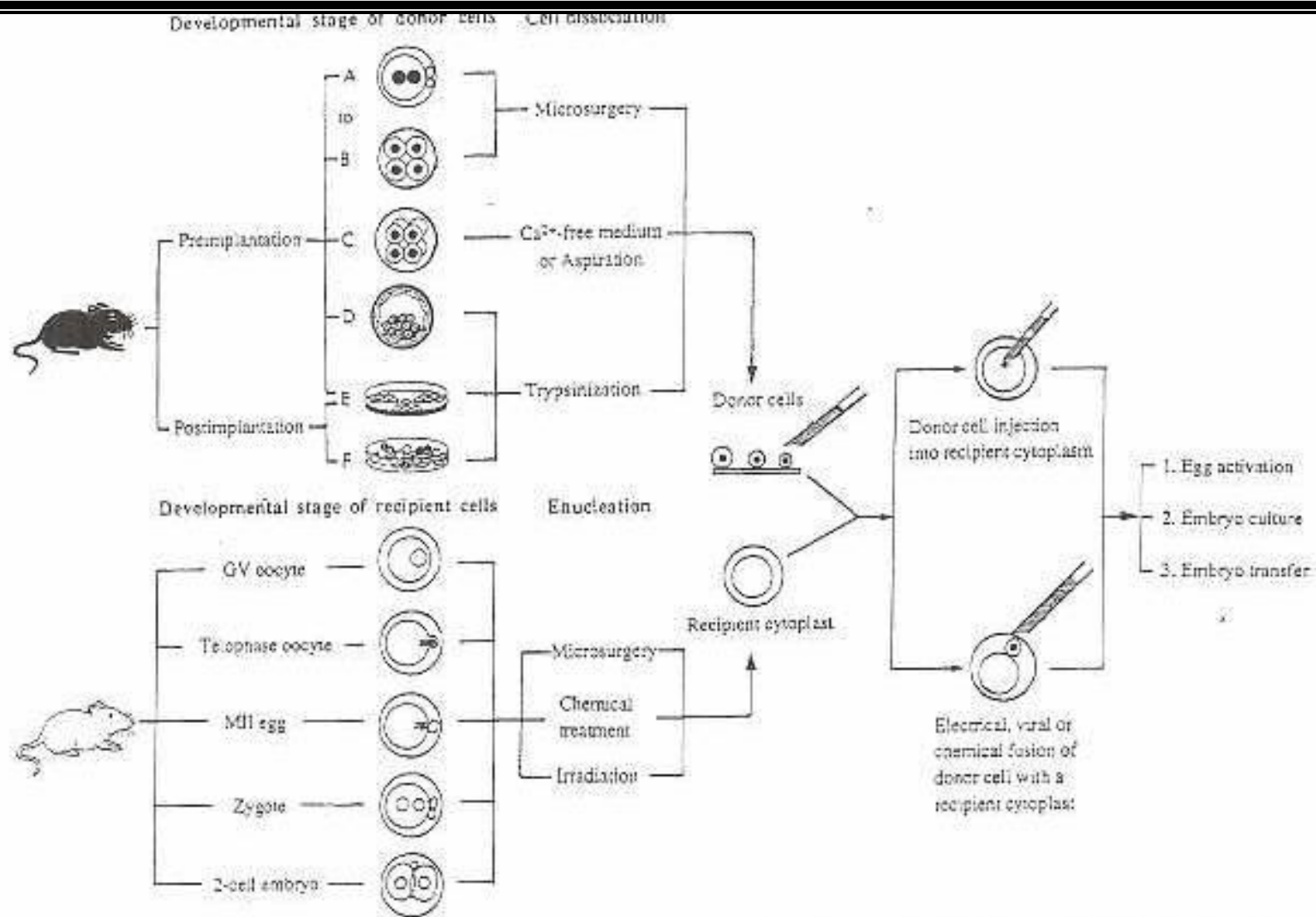


Fig. 1 Illustration of various technical procedures used for nuclear transplantation in mammals: (A) Zygote; (B) 2- to 4-cell embryos; (C) morula; (D) blastocyst; (E) stem cells (including embryonic stem cells and primordial germ cells); (F) somatic cells.

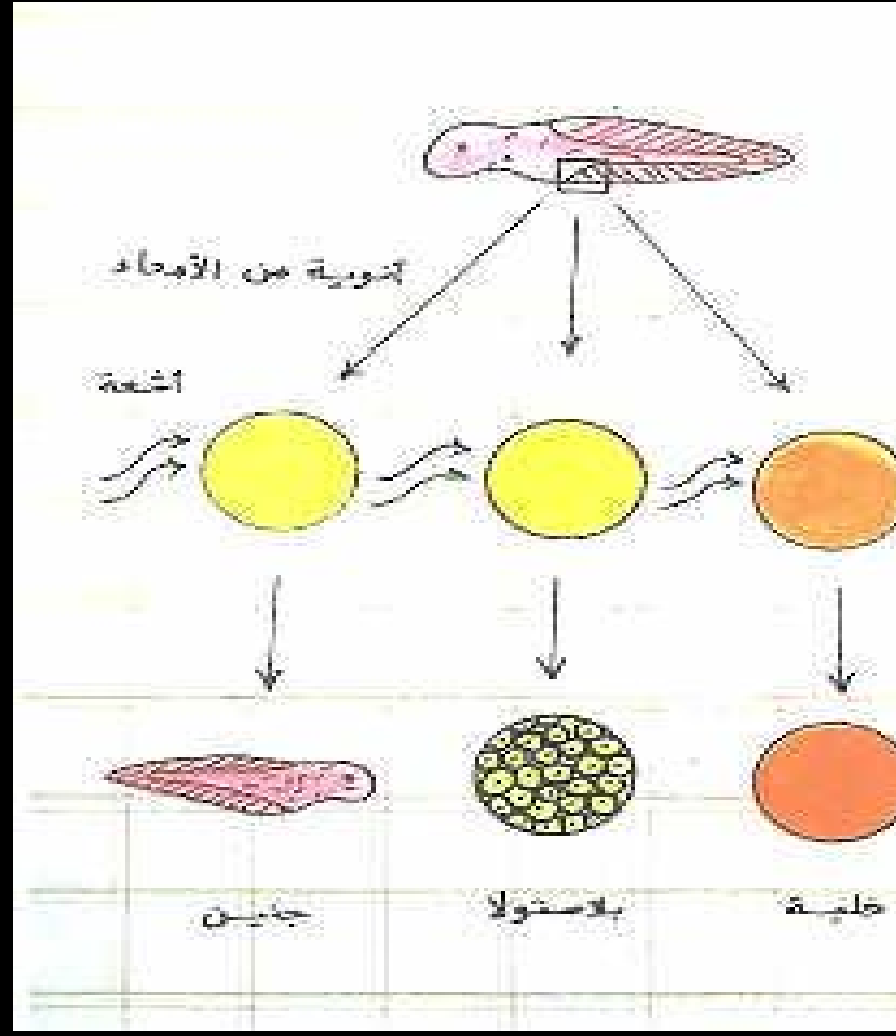
Table I Developmental Capacity of Transcriptionally Active Donor Nuclei after Transplantation to Recipient Cytoplasts

Species	Maternal-embryonic transition	Type of recipient cytoplast	Donor nuclear stage	Nuclear totipotency confirmed	Reference
Mouse	2-cell	Zygote	4-cell	No	McGrath and Solter (1984b); Tsunoda <i>et al.</i> (1987)
		Zygote	8-cell	No	McGrath and Solter (1984b); Tsunoda <i>et al.</i> (1987)
		Zygote	ICM	No	McGrath and Solter (1984b)
		Zygote	ICM	Yes	Illmensee and Hoppe (1981)
		2-cell embryo	4-cell	Yes	Tsunoda <i>et al.</i> (1987)
		2-cell embryo	8-cell	Yes	Tsunoda <i>et al.</i> (1987)
		MII egg	4-cell	Yes	Cheong <i>et al.</i> (1993)
Sheep	8-cell	MII egg	8-cell	Yes	Cheong <i>et al.</i> (1993)
		MII egg	16-cell	Yes	Smith and Wilmut (1989)
		MII egg	32/64-cell	Yes	Sun <i>et al.</i> (1989)
Cattle	8-cell	MII egg	ICM	Yes	Smith and Wilmut (1989)
		MII egg	24/48-cell	Yes	Bondioli <i>et al.</i> (1990)
Rabbit	8-cell	MII egg	Cultured ICM	Yes	Sims and First (1994)
			16-cell	Yes	Collas and Robl (1990)

Table II Development of Mouse 8-Cell Nuclei after Transplantation to Recipient Cytoplasts Derived from Mouse Zygotes, 2-Cell Embryos, and MII Eggs

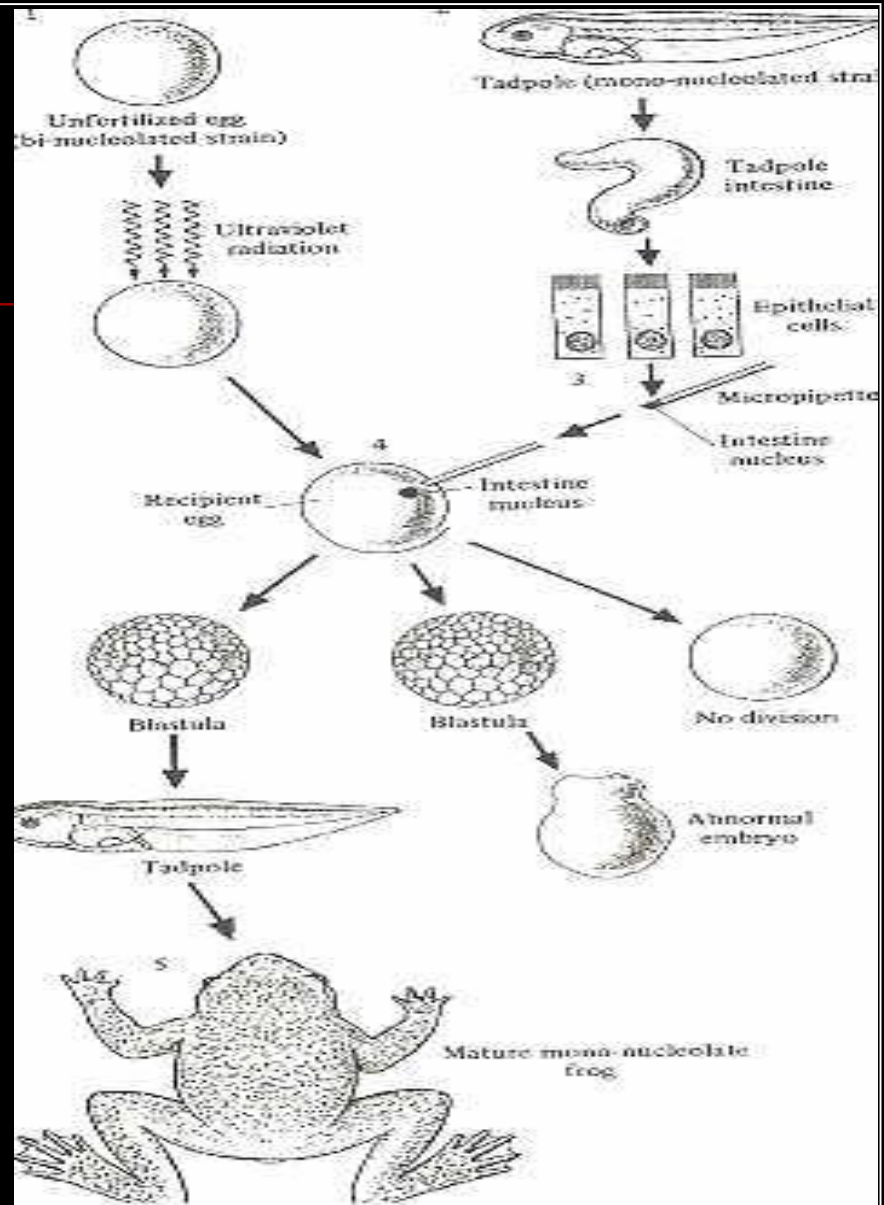
Type of recipient cytoplast	Number of embryos examined	Number (%) of embryos developed		Reference
		2-cell	Blastocyst	
Zygote	54	22 (44%)	0	Tsunoda <i>et al.</i> (1987)
2-cell embryo	139	—	49 (35%)	Tsunoda <i>et al.</i> (1987)
MII egg	39	36 (92%)	18 (46%)	Cheong <i>et al.</i> (1993)

الاستنساخ: (Cloning (Nuclear Transplantation)) ب- الاستنساخ من خلايا متمايزه: أجنة في طور اليرقي

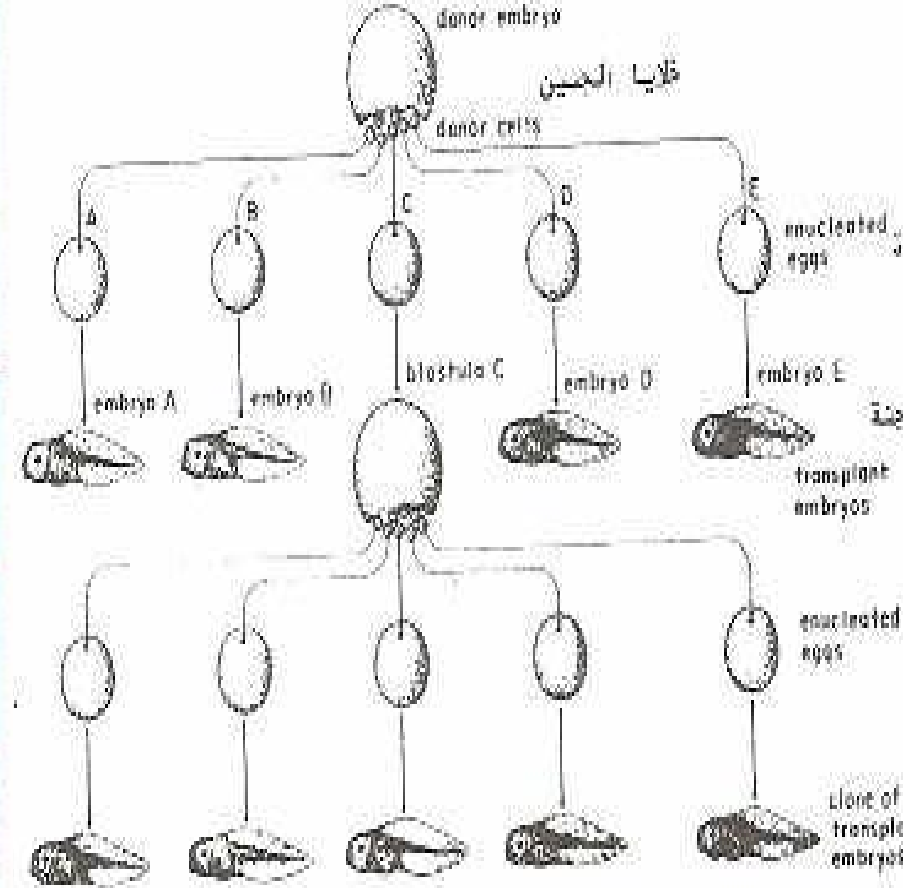
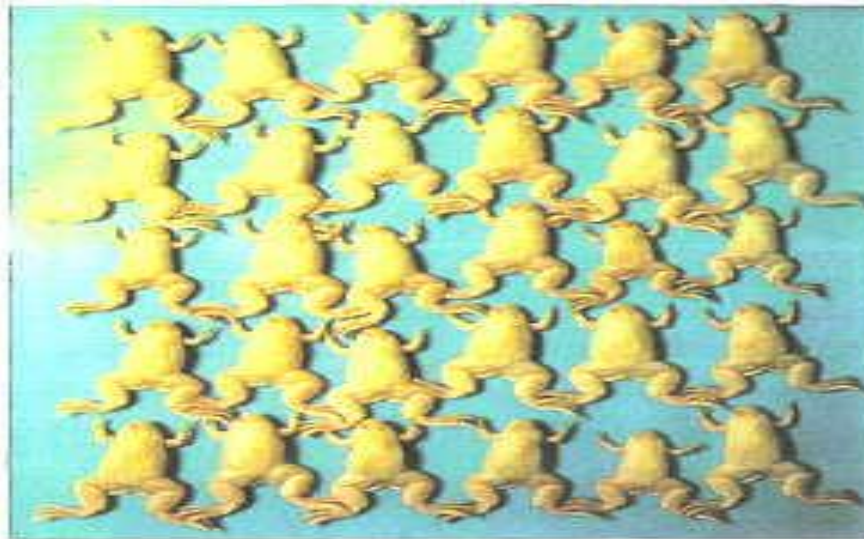
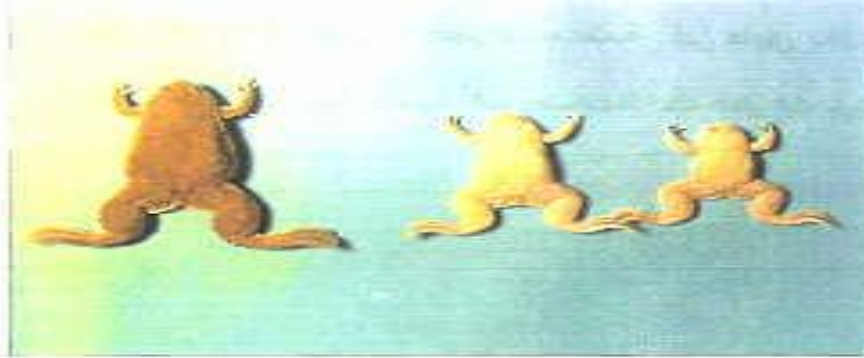


حيث تم نقل أنوية من منطقة الأمعاء لطور أبو ذنبية للضفدعة وزراعتها في بويضات تم التخلص من أنويتها . بعضها نمت وكون الطور اليرقي وبعضها تفلج فقط ثم توقف والبعض الآخر لم تنمو .

لقد قام كل من كنج وبيرق
 وزراعة أنوية خلايا أمعاء
 مأخوذة من جنيني الضفدعة
 طور أبو ذنبيه وزعت في
 بويضات تم التخلص من
 أنويتها (بدميرها بواسطة
 الأشعة) فأعطت بعض هذه
 البويضات أجنة كاملة التكوين
 والبعض الآخر وصلت إلى
 مرحلة البلاستولا أو المفلجة ثم
 توقفت عن النمو ، في حين
 بقيت مجموعة من البويضات
 لم تنمو مطلقا



• صور الضفدعة التي تم استنساخها عن طريق نقل أنويه من خلايا اجنة
 عديمة الصبغة (ذات اللون الأبيض) وحقتها في بويضات ضفدعة ذات
 صبغيات (داكنة) تم التخلص من أنويتها بواسطة الأشعة .



ثانيا :الاستنساخ من خلايا جسدية للأنسجة كائن بالغ

n فهي كالسابقة ولكن هنا يتم نقل نواة (خلية جسدية) لخلية من جسد لكائن حي بالغ (مثل الضرع) إلى بويضة تم التخلص من نواتها (خلية جنسية).مثل هذه التجارب لم تكن تتجح خاصة بالنسبة للثدييات حتى عام ١٩٩٧م عندما تمكن كل من الباحث ويلمت ومساعدته كيث كامبل من معهد روزلين بإسكتلندا بإنتاج النعجة (دولي) والتي عمل لها استنساخ من خلية الضرع .

طريقة عمل الأستنساخ من الخلايا الجسدية المتميزة بالأتي :

- ١- لقد تم أخذ عينة من نسيج ضرع النعجة ووضعت في محلول بيئة لكي تتكاثر الخلايا.
- ٢- ثم أخذت مجموعة الخلايا ووضعت في محلول بيئة بسيط لا يسمح لها بالانقسام (تجويع).

تابع: الاستنساخ من خلايا جسدية للأنسجة كائن

٣- بعدها تم الحصول على بويضات ناضجة من النعجة ثم تم التخلص من نواتها.

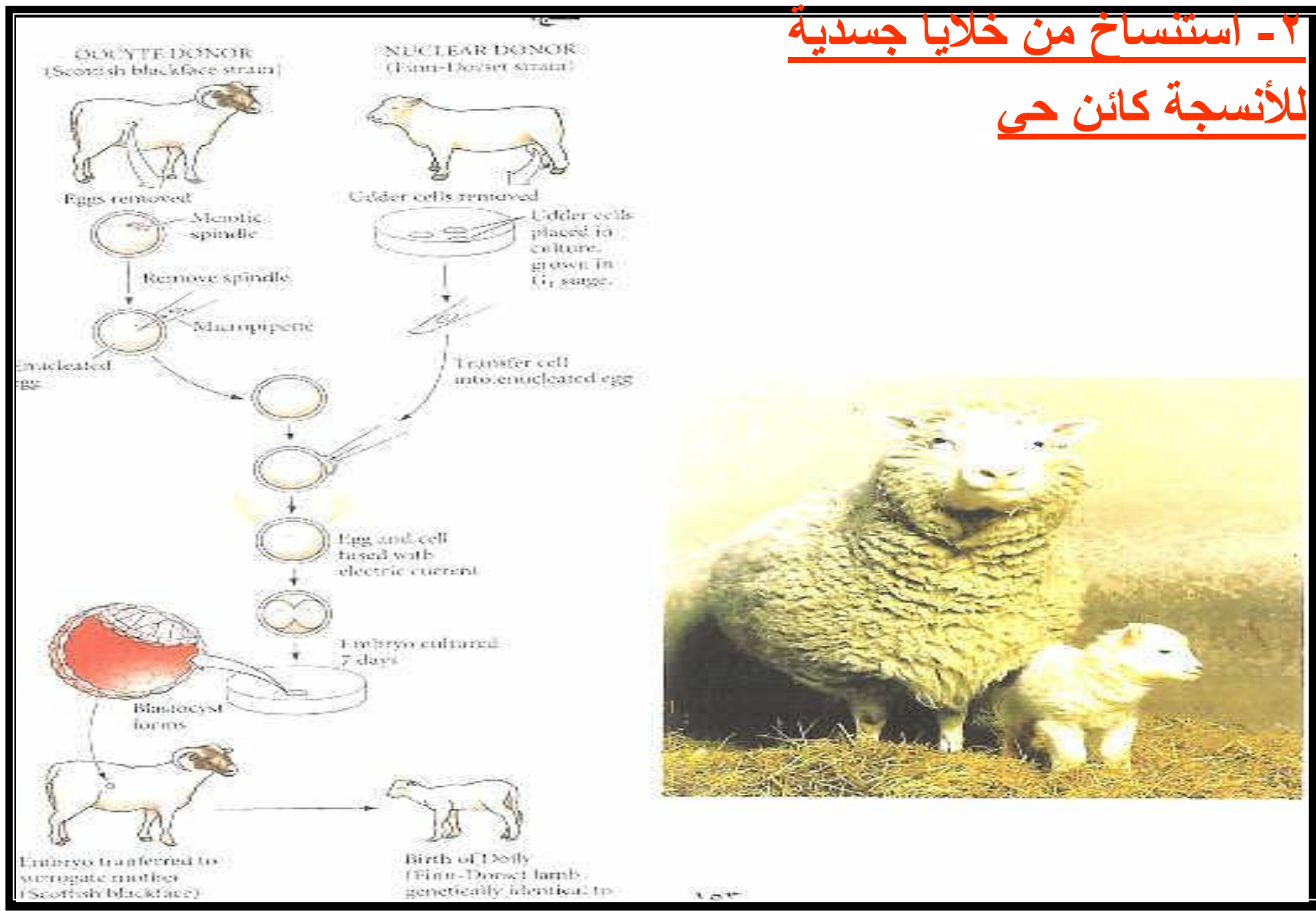
٤- تم دمج إحدى الخلايا من الضرع الجسدية (في المرحلة Go) مع البويضة وذلك باستخدام تيار كهربائي بسيط لدمج الخليتين خلية الصغيرة من الضرع والبويضة.

٥- ثم تمت تنمية البويضات التي تم دمجها في الطبق لكي تتفلق.

٦- تم نقل الأجنة المتفلجة إلى رحم نعجة مهيئة فسيولوجيا

٧- متابعة الحمل والولادة بعد ست أشهر تقريبا.

٢ - استنساخ من خلايا جسدية للأنسجة كائن حي



تفسير عملية الاستنساخ:

لماذا عند عمل الاستنساخ من خلايا جنينية ونقل نواة من الأجنة في مرحلة التفلج إلى البويضات كانت تتجح وتنتج أجنة .
في حين أنه عندما يتم الاستنساخ من خلايا أكبر في العمر مثل طور أبو ذنبية تتكون بعض الأجنة والبعض الآخر يتوقف و أن بعضها لا ينمو أساسا !

أيضا لماذا لم تكن تتجح كل المحاولات السابقة في عمل الاستنساخ من خلايا الكائن كامل التكوين (الخلايا الجسدية)؟
إن عمل الاستنساخ من الخلايا الجنينية وهي في مرحلة التفلج تكون الخلايا غير متميزه بالتالي فإن جيناتها لم يحصل لها برمجة أي لا زالت خام مثلها مثل نواة البويضة المخصبة وبالتالي فإن نقلها إلى ستيوبلازم بويضة عديمة النواة كآنة فقط أخذت نواة ووضعت نواة مماثلة من حيث التركيب الجزيئي.

- وكما هو معلوم فإن دورة الخلية في الأجنة أثناء مرحلة التفلج تتكون من مرحلتين فقط مرحلة تصنيع للمادة الوراثية (DNA Synthesis -S phase) ثم مرحلة الانقسام الخلوي غير المباشر (M- phase) فخلايا الجنين في مرحلة التفلج المبكر لا تمر في مرحلة نمو أولى أو ثانية (G1,G2) نظرا لأن سيتوبلازم البويضة مخزن فيه معظم المواد الأولية فلا يحتاج لهذه المرحلتين .
- أن دورة الخلية العادية والتي تتكون من مرحلة نمو أولى (G1) ثم مرحلة تصنيع للمادة الوراثية (S- phase) ثم مرحلة نمو ثانية (G2) ثم مرحلة الإنقسام الخلوي (M- phase) .
- في حين أن النواة من الأطوار الجنينية الأكبر عمرا كطور أبو ذنبية أو الخلايا الجسدية تكون متميزة أي أن جيناتها حصل لها برمجة
- لكن لماذا ينجح الاستنساخ في بعض الخلايا المأخوذة من أمعاء طور أبو ذنبية ولم ينجح في البقية، وكذلك لماذا فشلت جميع التجارب السابقة في عمل الاستنساخ من الكائن الحي البالغ ولتفسير ذلك لا بد من معرفة العوامل التي أدت إلى نجاح إنتاج دولي.

الإختلاف بين دورة الخلية اثناء مرحلة التفلج في الأجنة ودورة الخلية العادية

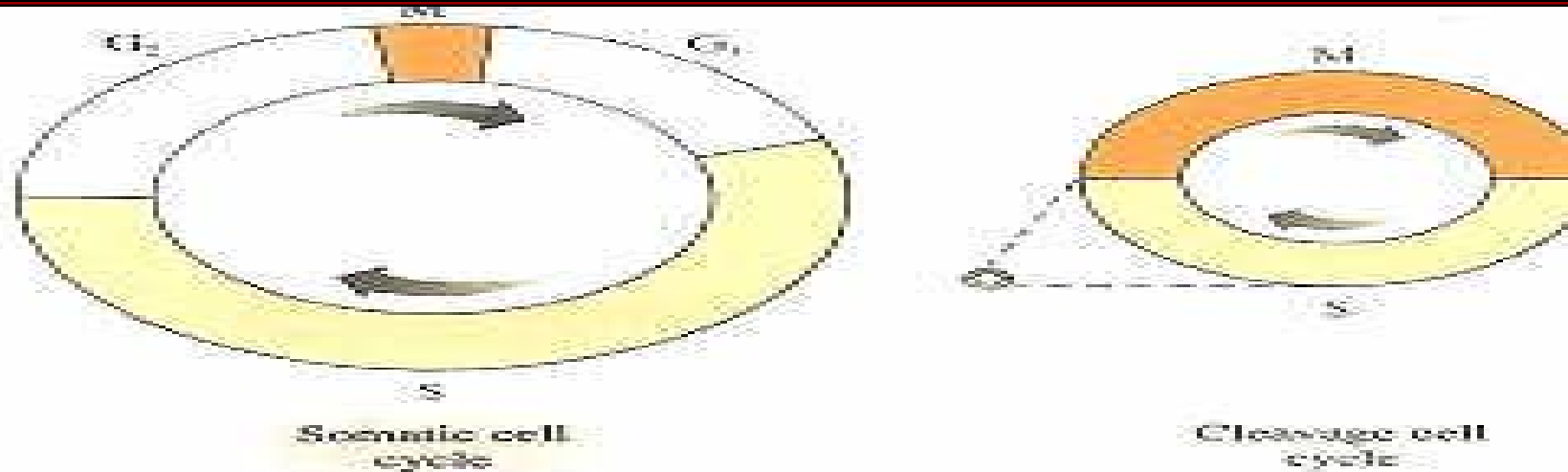


Figure 5.1

A comparison of the cell cycles of a somatic cell and a blastomere from a cleaving embryo. The drawing on the left represents the somatic cell cycle of a HeLa (human) cell showing M, G₁, S, and G₂ phases. The drawing on the right represents an enlarged version of the cleavage cell cycle of a sand dollar embryo showing only M and S phases. The very small circle from which the cleavage cell cycle is enlarged represents the sand dollar embryo cell cycle on the same scale as the HeLa cell cycle.

العوامل التي تتحكم في عملية الاستنساخ:

١- عمر الخلية المانحة كلما كانت صغيرة في العمر تعطي نتائج أفضل. n

٢- السيتوبلازم للبويضة المستقبلية لابد وان يكون في المرحلة الاستوائية من الانقسام الأخرالى الثاني. (M-phase M-II, (Metaphase of Meiosis II) . n

٣- دورة الخلية لنواة الخلية المانحة، لابد وان تكون النواة الجسدية في المرحلة الساكنة (تجويح) (G0). n

٤- التثبيح الميكانيكي أو الكيميائي لغشاء البويضة المستقبلية بعد عملية الدمج (تيار كهربائي خفيف) كما لو كانت قد أخصبت بحيوان منوي. n

تفسير عدم نجاح بعض تجارب الإستنساخ

n وهذا ما يفسر لنا عدم نجاح معظم تجارب الاستنساخ السابقة مثل نقل أنوية خلايا متميزة كخلايا الجسدية للكائن الحي البالغ وكذلك المنقولة من خلايا أمعاء أبو ذئبة.

n ١- وذلك إما أن الأنوية التي نقلت أو الخلايا الجسدية التي دمجت مع البويضات لم تكن في مرحلة السكون (G0)

n ٢- أو أن سيتوبلازم البويضات المنقول إليها الأنوية لم تكن في مرحلة الطور الإستوائي من الإنقسام الإختزالي الثاني (Metaphase of Meiosis II).

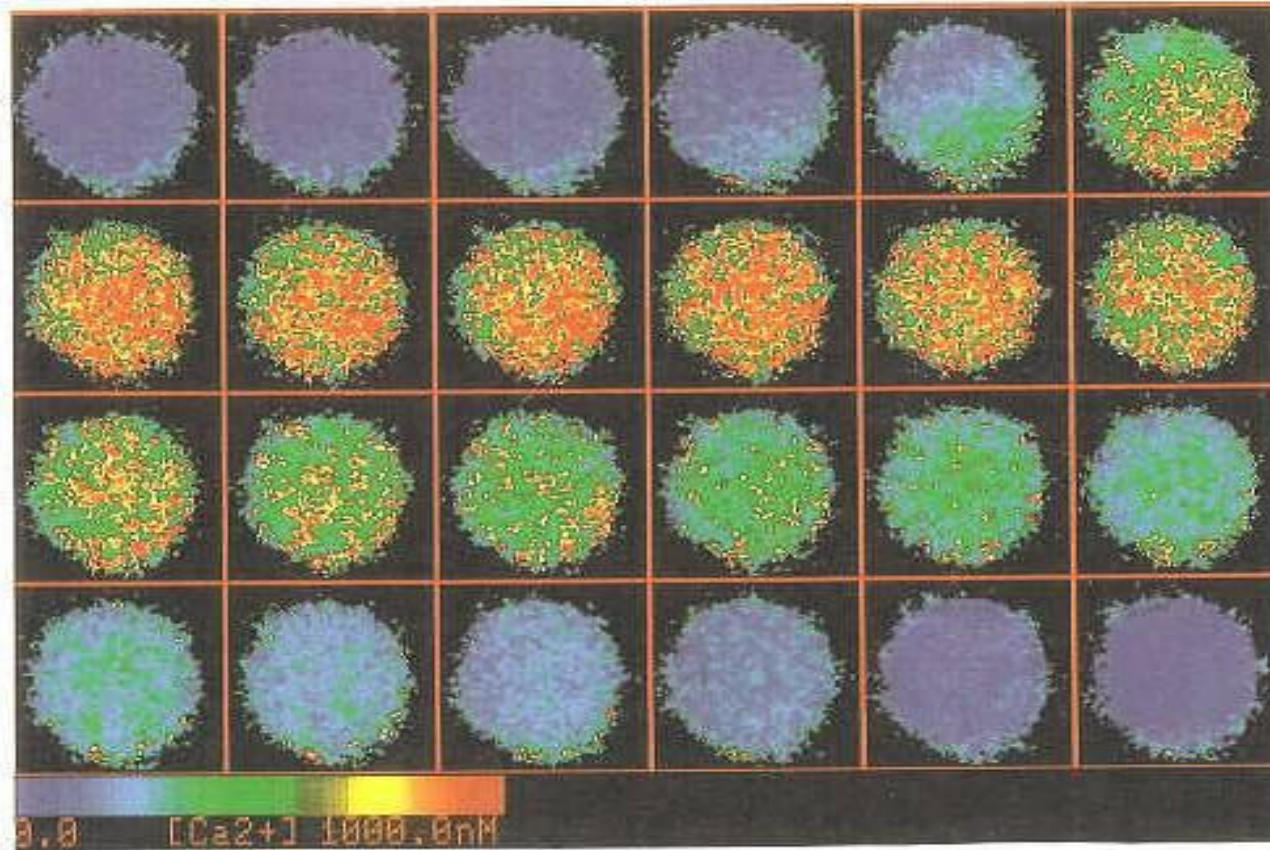


Fig. 3 Pseudo-colored Ca^{2+} images showing the transient Ca^{2+} rise in a bovine egg following sperm-egg membrane fusion. The transient rise is initiated at a single site within the egg and then propagated throughout the cell in the form of a wave. Frame interval: 2.4 sec. (F. Z. Sun, J. P. Bradshaw, C. Galli, and R. M. Moor, unpublished observation).

الإستتساخ أمال وألام

بعض فوائد الأستتساخ: n بعض مضار الإستتساخ:

- 1- تحسين الإنتاج الحيواني n
- 2- علاج بعض الأمراض الوراثية مثل مرض تليف العضلات. n
- 3- حل بعض مشاكل العقم. n
- 4- في مجال التقنيات الحيوية إنتاج بعض المضادات أو المعالجات الدقيقة. n
- 5- في مجال الأبحاث الجزيئية والهندسة الوراثية. n
- 6- المحافظة على الحيوانات المهددة بالانقراض n
- 1- ظهور بعض المشاكل الشرعية والأخلاقية n
- 2- اختلاط الأنساب n
- 3- استغلال مثل هذه التقنية وعمل أجنة كقطع غيار. n
- 4- اختلال في التركيبة السكانية حيث يكون معلوم جنس الجنين n
- 5- انحسار بعض السلالات نتيجة لتبني سلالات معينة n
- 6- لخوف من استحداث كائنات حية دقيقة فتاكة تهدد صحة الإنسان والحيوان والنبات او لا تسهل السيطرة عليها.. n