كراسات « علمية »

سلسلة غير دورية تصدرها المكتبة الأكاديمية

تعنى بتقديم الاجتهادات العلمية الحديثة

رئيس التحرير أ.د. أحمد شوقى　　مدير التحرير أ. أحمد أمين

المراسلات :

المكتبة الأكاديمية

شركة مساهمة مصرية

رأس المال المصدر والمدفوع ٩,٩٧٣,٨٠٠ جنيه مصرى

١٢١ شارع التحرير – الدقى – الجيزة

القاهرة - جمهورية مصر العربية

تليفون : ٧٤٨٥٢٨٢ - ٣٣٦٨٢٨٨ (٢٠٢)

فاكس : ٧٤٩١٨٩٠ (٢٠٢)

المكتبة الأكاديمية

شركة مساهمة مصرية

الحاصلة على شهادة الجودة

ISO 9002

Certificate No.: 82210

03/05/2001

UKAS QUALITY MANAGEMENT

الهندسة الوراثية فى الحيوان

obeikandl.com

obeikandl.com

الهندسة الوراثية في الحيوان

دكتورة/ وفاء عبدالنبي محمد

أستاذ الوراثة المساعد

كلية الزراعة – جامعة عين شمس

الناشر

المكتبة الأكاديمية

شركة مساهمة مصرية

٢٠٠٢

obeikandl.com

obeikandl.com

حقوق النشر

الطبعة الأولى ٢٠٠٢م - ١٤٢٢هـ

حقوق الطبع والنشر © جميع الحقوق محفوظة للناشر :

المكتبة الأكاديمية
شركة مساهمة مصرية
رأس المال المصدر والمدفوع ٩,٩٧٣,٨٠٠ جنيه مصرى
١٢١ شارع التحرير - الدقى - الجيزة
القاهرة - جمهورية مصر العربية
تليفون : ٧٤٨٥٢٨٢ - ٣٣٦٨٢٨٨ (٢٠٢)
فاكس : ٧٤٩١٨٩٠ (٢٠٢)

لا يجوز استنساخ أى جزء من هذا الكتاب بأى طريقة
كانت إلا بعد الحصول على تصريح كتابى من الناشر .

إهداء

إلى زوجي الحبيب حمدي

وفـاء

obeikandl.com

obeikandl.com

هذه السلسلة

تعد استجابة منطقية لما لقيته شقيقتها الكبرى « كراسات مستقبلية » التى بدأ ظهور أعدادها الأولى عام ١٩٩٧ ، من الترحاب والتشجيع ، المقرونين بالدعوة إلى زيادة مساحة العلم فى إصدارات السلسلة إلى أقصى حد ممكن .

لقد دفعتنا هذه الدعوة إلى التفكير فى أن نفرد للموضوعات العلمية سلسلة خاصة ، تستحقها ، فكانت هذه السلسلة ، التى تمثل تطويراً وتوسعاً فى أحد محاور «كراسات مستقبلية» ، حيث ذكر فى مقدمتها ما نصه :

« الإلمام بمنجزات الثورة العلمية والتكنولوجية ، التى تعد قوة الدفع الرئيسية فى تشكيل العالم ، مع استيعاب تفاعلها مع الجديد فى العلوم الاجتماعية والإنسانية ، من منطلق الإيمان بوحدة المعرفة » .

ومن ملامح هذه السلسلة :

* المحافظة – على شكل المقال التفصيلى الطويل (Monograph) الذى تتميز به الكراسات عادة .
* الحرص على تقديم الاتجاهات والأفكار العلمية الجديدة ، بجانب تقديم المعارف الخاصة بمختلف المجالات الحديثة ، بشكل يسمح للقارئ « المتعلم غير المتخصص » ، الذى يمثل القارئ المستهدف للكراسات ، بالقدر الكافى من الإلمام والقدرة على المتابعة .
* وفى تقديمها للاتجاهات والمعارف العلمية الحديثة ، لن تتبنى الكراسات الشكل النمطى لتبسيط العلوم ، الذى يستهدف النجاح فى إضافة كمية – قلت أو كثرت – لبعض المعارف العلمية إلى ثقافة المتلقى . إننا لا نتعامل هذا مع العلم كإضافة ، ولكن كمكون عضوى أصيل للثقافة المعاصرة ، وهو مكون نرى، يتضمن المناهج والمعلومات والأفكار والاتجاهات .
* وتأكيداً لعدم النمطية ، ستتسع السلسلة للتأليف والترجمة والعرض ، وتتضمن اجتهادات التبسيط والتنظير والاستشراف ، وستنطلق من أهمية تضامن المعرفة والحكمة وارتباط العلم الحديث بالتكنولوجيا technoscience ، مع التركيز على أهمية ارتباطهما معا بالأخلاق .

وبعد ، فإننى أتقدم بالشكر إلى كل الزملاء الذين تحمسوا للفكرة ، وساهموا فى تقديم المادة العلمية للسلسلة . وباسمهم وباسمى أشكر الصديق العزيز الأستاذ العزيز الأستاذ أحمد أمين ، الناشر المثقف الذى احتفى من قبل بسلسلة « كراسات مستقبلية » ، وشجعنا على إصدار هذه السلسلة الجديدة . والله الموفق .

obeikandl.com

هذه الكراسة

هى العمل الأول للدكتورة وفاء عبد النبى ، أستاذ الوراثة المساعد بجامعة عين شمس . وهى كراسة معلوماتية مباشرة تتعرض لموضوع الهندسة الوراثية فى الحيوان، تستعرض طرقها وتطبيقاتها فى نقاط محددة ، وتوضح أهميتها لعلوم البيولوجيا والانتاج الحيوانى والصحة . ولا تنسى ، فى معرض ذلك ، التطرق إلى الاعتبارات الأخلاقية والبيئية ومتطلبات الأمان الحيوى . ومثل هذه الكراسات المعلوماتية المباشرة مرشحة بشدة لإثراء العملية التعليمية من ناحية ، ولتقديم مادة خصبة للثقافة العملية من ناحية أخرى . ولها بالنسبة لمشروع الكراسات مذاق خاص ، لأنها توسع مساهمة الشباب فى هذا المشروع الهام ، الذى يمثل ساحة ومنبراً لرواد وطلائع العلم والمستقبل فى مجتمعنا على حد سواء . لذلك يسعدنا تقديم هذا العمل للقارئ الذى نتوقع تشجيعه ودعمه لهذه الأعمال الأولى لأبنائنا ، وننتظر منها ومن شباب الباحثين والعلماء المزيد بإذن الله .

أحمد شوقى

يناير ٢٠٠٢

obeikandl.com

المحتـــويـــات

الصفحة

مقدمة ١١
إنتاج الحيوانات المعدلة وراثيًا ١٢
خطوات إنتاج حيوانات معدلة وراثيًا ١٢
طرق لإنتاج حيوانات محورة وراثيًا عن طريق إدخال DNA الهدف (المرغوب) فى جينوم الثدييات ١٣
بعض الحيوانات الأخرى المعدلة وراثيًا ٢٥
المشاكل التى تعترض إنتاج حيوانات المزرعة المعدلة وراثيًا ٢٥
عواقب التقنيات المستخدمة فى الحيوانات المعدلة ٢٧
التطبيقات الواردة بالنسبة لإنتاج الحيوانات المعدلة وراثيًا ٢٧
الفئران المعدلة وراثيًا كنماذج لدراسة الأمراض ٢٨
استخدام نماذج الحيوانات المعدلة وراثيًا فى علم السمية والسمية الوراثية ٢٨
الحيوانات المعدلة وراثيًا المستخدمة لاختبارات السرطان ٢٩
حيوانات المزرعة المعدلة وراثيًا ٣٠
الحيوانات المعدلة وراثيًا . لماذا؟ ٣١
التطبيقات المستخدمة لهذه الحيوانات ٣١
نتائج التعديل الجينى بالنسبة للرفاهية الحيوانية والأخلاق ٣٤
الاعتبارات الأخلاقية المتعلقة بالإنسان والأمان الحيوى والبيئى ٣٩
موافقة الرأى العام وقواعد التحليل الأخلاقى ٤٠
الدليل الإرشادى لإنتاج واستخدام الحيوانات المعدلة وراثيًا ٤١
تاريخ الاستنساخ الحيوانى والنقل الجينى ٤٢
المراجع ٤٥

obeikandl.com

obeikandl.com

مقـــــدمة ...

الهندسة الوراثية للكائنات الحية

0 0 0

الكائنات المعدلة وراثياً سواء أكانت نباتات ، حيوانات أو كائنات دقيقة هي التي تحور لتحتوى علي جينات داخل جيناتها من أنواع مختلفة لكى ندخل أو نحذف صفات خاصة فى الكائن . ويتم النقل الجينى عن طريق حقن الجين الغريب فى البويضات المخصبة أو خلايا الأجنة . والجين المنقول يصبح جزءاً من DNA العائل ويتوارث معه فى كل الخلايا أثناء تطور الجنين – ثم يتم توارثه من خلال الخلايا الجنسية أثناء دورة حياة الكائن . هذه التقنية من الممكن أن تستخدم لانتاج نباتات أو حيوانات تعبر عن جيناتها الممنوحة مثل زيادة انتاج اللحم ، أو مقاومة الأمراض . وأيضاً تستخدم لانتاج كائنات تعمل كمصانع حيوية لتخليق الهرمونات والأدوية والمكونات الحيوية الأخرى التى تستخدم كعلاج للإنسان مثل استخدام النواقل البكتيرية فى انتاج هرمون الأنسولين من البكتيريا الذى يستخدم فى علاج مرض السكر وهذا ما يسمى فى مجمله بالهندسة الوراثية .

ومن الضرورى لنجاح نقل الجين أن يكون نشطاً يستطيع التعبير عن نفسه حيث نرى فى بعض الحالات أن نقل الجين يتم ولكن لا يستطيع التعبير عن نفسه.

والكائنات المعدلة وراثياً أثبتت أهمية كبيرة فى تحليل وظائف الجينات من خلال دراسة تعبير الجين وتأثيره أثناء العمليات التكوينية ومن ثم فإن وظيفته من الممكن أن تعرف وتراقب . أيضاً تستخدم تقنية الهندسة الوراثية لانتاج حيوانات بها جينات تمت إعاقة تنشيطها فى جميع الخلايا والتى تسمى Knock out ، بغرض دراسة بعض الأمرض الوراثية التي تصيب الإنسان والتى من المكن دراستها على حيوانات التجارب مثل الفيران ودراسة الأعراض المرتبطة والتى تشابه الأعراض المرضية للإنسان ومثال ذلك المرض الذى يصيب المخ فى الأغنام وعلاقة ذلك بحالة جاكوب فى الإنسان والتى تم دراستها بهذه الطريقة .

وفى السنوات الأخيرة تم تحسين تقنيات الهندسة الوراثية لانتاج كائنات محورة وراثياً مثل البكتيريا . وانتجت حيوانات ثديية معدلة وراثياً مثل الأرانب – الخنازير – الأغنام ومنذ ذلك الوقت يتم إضافة كائنات أخرى إلى القائمة من الثدييات والأسماك ونماذج من الطيور والآن ، اتضحت الأهداف الاستراتيجية لانتاج ماشية لها ألبان بمواصفات دوائية تستخدم فى أغراض العلاج وأيضاً خنازير معدلة وراثياً تستخدم فى زراعة الأعضاء للإنسان . ويتم التركيز أيضاً على الصفات الانتاجية لتحسين الكفاءة الانتاجية لحيوانات المزرعة مثل انتاج اللحم والألبان . كما تمثل الحيوانات المعدلة وراثياً أهمية كبيرة كأداة فعالة للبحث فى العلوم البيولوجية والتطبيقية فى مجالات الإنتاج الحيوانى والغذاء والصحة

وقد أعلن عن أول الحيوانات المحورة وراثياً عام ١٩٨٠ (الفئران) لكن ظهور أول حيوان محور وراثياً من حيوانات المزرعة كان عام ١٩٨٥ ويتم تحوير التركيب الوراثى من خلال إدخال تتابعات من Cloned DNA والذى يسمى (Transgene) وهذا الجين الغريب من الممكن أن يأخذ من الكائن المعطى أو يصنع فى المعمل أو كلاهما وذلك لإضافة بعض الصفات المرغوبة الناقصة فى الكائن أو تغييرها . والكائنات التى تحتوى علي DNA مستنسخ (Cloned DNA) والذي به تحور وراثى لابد من استخدام تقنيات الهندسة الوراثية (لاستبدال الجين وإدخاله) . كذلك لابد من عمل بناء للجين Gene Construction بحيث يحتوى عادة بالإضافة إلى الجين المنقول (Transgene) على تتابعات من :

- الناقل DNA (Vector) غالباً ما يكون قادراً على إدخال المادة الوراثية داخل العائل Host .
- المستبدئ (Promoter) وتتابعات لـ DNA المعزز (Enhancer) تدخل مع الجين لكى يستطيع الجين أن يعبر عن نفسه .
- تتابعات المنهى Terminutor والذى يحدد نهاية نسخ الجين أو تعبير الجين كذلك جينات تستخدم كدلالات وراثية Genetic marker .

إنتاج الحيوانات المعدلة وراثيا
The production of transgenic Animals

تزداد الحيوانات المعدلة وراثياً فى مجال Biotechnology حيث أن التكنولوجى يتقدم ويتطور خصوصاً فى تحسين الصفات الانتاجية – وصحة الحيوان وانتاج منتجات طبية هامة والصناعات الدوائية – والعلاج بالجينات للإنسان ، ومن أمثلة الحيوانات المعدلة وراثياً والتى يتحور التركيب الوراثى لها لتحتوى على صفات مرغوبة وتستخدم طرق لنقل الصفات من الأنواع المرغوبة لغيرها ، منها الفيران المعدلة وراثياً وحيوانات المزرعة والماشية المحورة وراثياً (١٩٩١) والخنازير (١٩٩٨ ، ٢٠٠٠) كذلك القرود (٢٠٠١) .

خطوات إنتاج حيوانات معدلة وراثيا
Stps in Production a Transgenic Animals

١ – مصادر الخلايا والتبويض الفائق من الحيوانات الواهبة .
Superovulation of Donner animal.

٢ – الأخصاب (فى الكائن الحى أو فى المعمل) وتجميع البويضات والأجنة .
Fertiliztion in vitro in vivo.

٣ – إدخال DNA فى الأجنة .
Insertion Recombinant DNA into Embryo.

والذى يتم باستخدام طرق مختلفة سوف يتم سردها .

٥ – نقل الأجنة المحورة إلى الحيوانات المتلقية .
Embryo Transfer to Recipient animals.

٦ – الحمل والولادة .

٧ – تحليل المادة الوراثية للنسل الناتج للحكم على إتمام عملية التحور الوراثى :

Analyzing the DNA from off spring for presence of transgene

عن طريق :

أ – عزل DNA .

ب – استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لو تطلب ذلك لإكثار مادة الوراثة بشكل يسمح بالتحليل .

جـ – عمل بصمة وراثية Fingerprinting لتحليل DNA .

٨ – التأكد من وجود الجين المنقول وعمل سلالة محورة Transgenic line عن طريق التزاوج بين أفراد محورة وراثياً وأخرى غير محورة وراثياً . ويتم من خلال معرفة :

أ – هل عبر الجين المنقول عن نفسه فى الخلايا .

ب – هل يتوارث الجين المنقول بطريقة مندلية .

جـ – نسبة وجود الجين المنقول فى الأجيال المندلية .

طرق لإنتاج حيوانات محورة وراثيا عن طريق إدخال DNA الهدف (المرغوب) فى جينوم الثدييات

Methods for Producing transgenic Animals by Introducing foreign DNA into the Mammlian Genome

يوجد العديد من الطرق لانتاج حيوانات محورة وراثياً – للحصول منها على نسل من هذه الأجيال محور وراثياً به جينات مرغوبة .

من هذه الطرق والتى سيتم شرحها وتوضيحها بالرسم .

١ – حقن DNA داخل النواة فى الخلية الجينية أو الزيجوتية .

٢ – استخدام الفيروسات الإرتجاعية Retroviruses كناقل .

٣ – استخدام الخلايا الأساسية الأمية (ES) المعروفة بخلايا الجذع .

٤ – استخدام الأسبرم كناقل .

٥ – حقن السيتوبلازم .

٦ – نقل النواة (الاستنساخ) .

٧ – الاستهداف الجيني (Gene-targeting) .

٨ – تقنية Cro - lox .

٩ – النقل عن طريق الأسبرماتوجنيا . Spermatogonl Transfer

obeikandl.com

(١) حقن DNA (الحقن المجهرى داخل النواة فى الخلية الجينية أو الزيجوتية (قبل مرحلة الزيجوت أو فى مرحلة الزيجوت) .

١ – تعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق نجاحاً فى حيوانات المزرعة بالرغم من أن كفاءتها قليلة حيث تصل نسبة نجاحها إلى ١ – ٤ ٪ .

٢ – سهولة التقنية المستخدمة .

٣ – تستخدم لأنواع مختلفة .

٤ – تستخدم على مدى واسع .

٥ – تأثيراتها عشوائية لاندماج الجين المنقول بصورة عشوائية .

٦ – تستغرق وقت طويل وشديدة التكاليف خاصة بالنسبة لحيوانات المزرعة .

٧ – تعطى الشكل الموزايكى المختلط للأنسجة بنسب معقولة .

٨ – يعمل المستبدئ Promoter فى النسيج المحدد أفضل .

٩ – المستبدئ المستحدث (inducible promtor) يعطى إهتماماً أكبر (الطريقة موضحة بالرسم) .

(٢) استخدام Retroviral vectors الفيروسات الإرتجاعية كنواقل

١ – استخدام الفيروسات لإحداث عدوى مبكرة فى طور الأنقسام للأجنة .

٢ – يتم التخلص من الجينات المرضية للفيروس .

٣ – أكثر كفاءة عن الطريقة الأولى بالنسبة لعدد الأجنة المحورة وراثياً أى بالنسبة للأجنة الكلية المستزرعة .

٤ – DNA المنقول أكثر من 8 Kb .

٥ – محددة جداً بالنسبة للأنواع الداجنة .

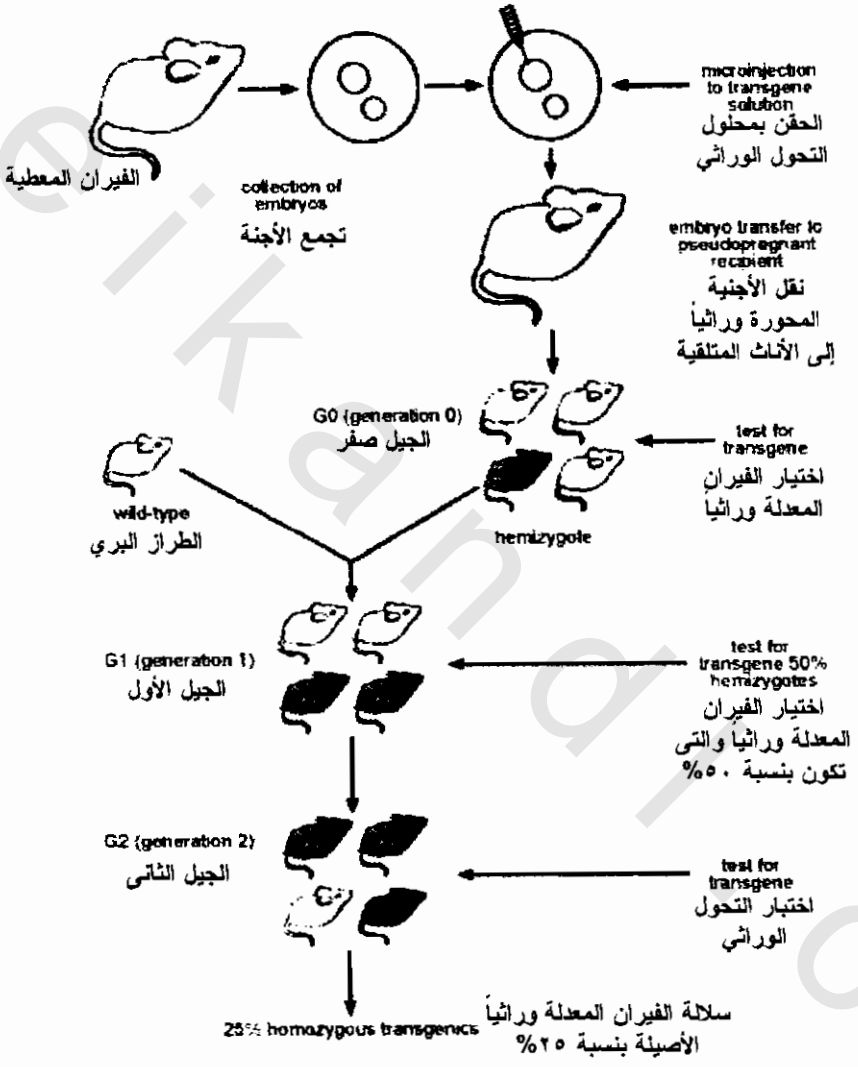
٦ – تؤدى إلى الموزايك نتيجة لاندماج الجين فى مواقع عديدة (الطريقة موضحة بالرسم) .

(٣) استخدام الخلايا الأمية الأساسية (خلايا الجذع)

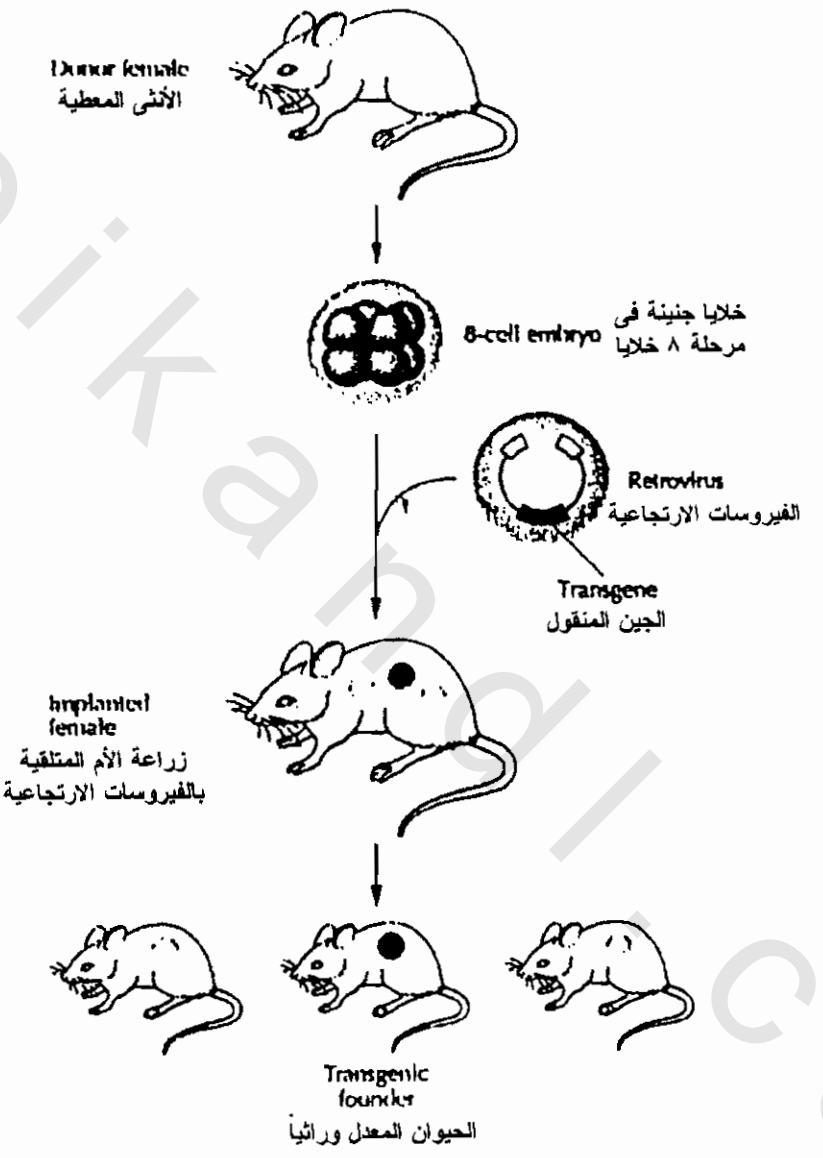
Embryonic Stem (ES) Cells

تعتبر هذه الطريقة أحسن وأفضل من الطرق السابقة (من عملية العدوى أو الحقن) حيث من الممكن أن تحل جين يعمل بأخر لا يعمل كطريقة أو العكس حيث تستخدم مع طريقة الاستهداف الجينى ، بمعنى أدخال الجين

obeikandl.com



الحقن المجهرى للنواة الأولية



انتاج فئران محولة وراثياً عن طريق الفيروسات الإرتجاعية كنواقل

obeikandl.com

فى موقع محدد ومن. **مميزاتها** :

١ – تنمو الخلايا الأمية الأساسية (ES) فى المزرعة .

٢ – يمكن انتخاب الخلايا المحورة (Clonal cell line) بسهولة .

٣ – يمكن حقنها (الخلايا المحورة) فى كتل خلايا البلاستوسيت blastocyte .

٤ – الأجيال الناتجة بها خاصية الشكل الكايميري الخليط Chimerie offspring .

ومن عيوبها :

قلة عدد الخلايا بالنسبة للثدييات . ولكن حديثا طورت خلايا الجذع (ES) للخنزير واستخدمت بنجاح وهى الخلايا التى تستطيع أن تنتج أى نوع من الخلايا بما فيها مكونات الخلايا الجنسية . ووجد أنواع أخرى مشابهة وبديلة لخلايا الجذع تستخدم كحوامل ES - like cells ، EG ، PGC وهى الخلايا الجرثومية والخلايا الجرثومية الجذعية .

(الطريقة موضحة بالرسم) .

(٤) استخدام الأسبرم كناقل

Sperm has also been proposed as a vector

١ – حدثت محاولة فى الفئران والخنازير ولم تكرر .

٢ – العديد من الجينات نقل فى الأسماك – والألبينو اليابانى – وقنفذ البحر والضفادع .

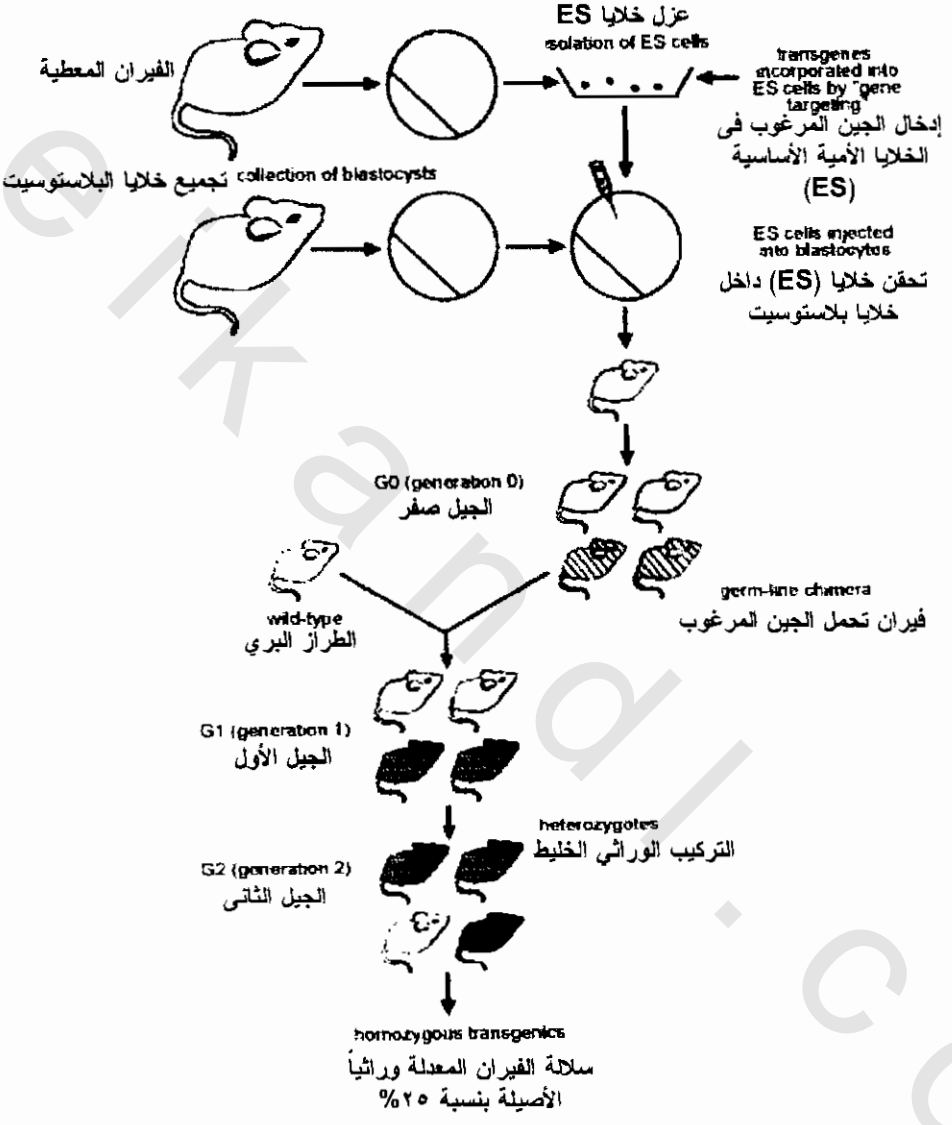
٣ – وفيه يتم ارتباط DNA بالاسبرم بعد عملية التحضين له .

٤ – يمكن زيادة كفاءة عملية الارتباط بالنسبة للاسبرم عن طريق النفاذية الكهـــربية Electroporation والليبوسوم Liposomes الذى يحتوى على DNA .

٦ – ثم تنقل للبويضات .

٧ – يستخدم Betaglactosidase كدلالة وراثية تسمى بـ Reporter gene وكذلك DNA خارجى يشفر لمادة GFP (Green Florocent prtion) وهـى مـادة تعطـى لونًا فلورنسيًا أخضر للدلالة على أن الجين المرغوب تم نقله وكل ذلك لزيادة كفاءة التأكـــد مـن النقل الجينى والتحوير لوراثى .

openkandil.com



طريقة استخدام الخلايا الأساسية الأمية المعروفة بخلايا الجذع أو المنشأ

(٥) **حقن السيتوبلازم** Cytoplasmic imjection

وهى أقل كفاءة من طريقة الحقن المجهرى (microinjection) .

(٦) **نقل النواة أو الاستنساخ** Nucleare Transfer / Cloning

تسمى تكنولوجيا المستقبل – وهى طريقة متقدمة أحدثت ثورة كبيرة فى كفاءة استنساخها الحيوانات المعدلة وراثياً . وأول ما جربت طريقة الاستنساخ بواسطة ويلموت كانت فى إنتاج النعجة دوللى Dolly (التى أعلن عن ميلادها عام ١٩٩٧) ولكن لم تكن محورة وراثياً وأنتجت بطريقة الاستنساخ أو نقل الأنوية ولكن تم بعد ذلك انتاج بوللى وبونى عام ٩٧ ، ١٩٩٨ وكانتا محوزتان وراثياً – أيضاً استخدمت بنجاح فى إنتاج الأبقار والخنازير عام ٩٩ ، ٢٠٠٠ بواسطة عدد من العلماء وجاء هذا التقدم كما ذكرنا على أيدى ويلموت عام ١٩٩٧ والذى نجح فى إثبات أن الأنوية سواء كانت من الأجنة أو الحلايا البالغة تستطيع أن تتطور وتنمو طبيعياً لتعطى كائناً كاملاً فى الأغنام . وهى تتضمن أدخال النواة من الخلايا المعطية فى البيضة المنزوعة النواة والجنين الناتج ينقل إلى أم بديلة Surrogate mather لينمو إلى كائن كامل . وادمج مع ذلك عمل تحور وراثى للنواة لينتج حيوانات معدلة وراثياً عن طريق الاستنساخ ويتوقع لهذه التقنية :

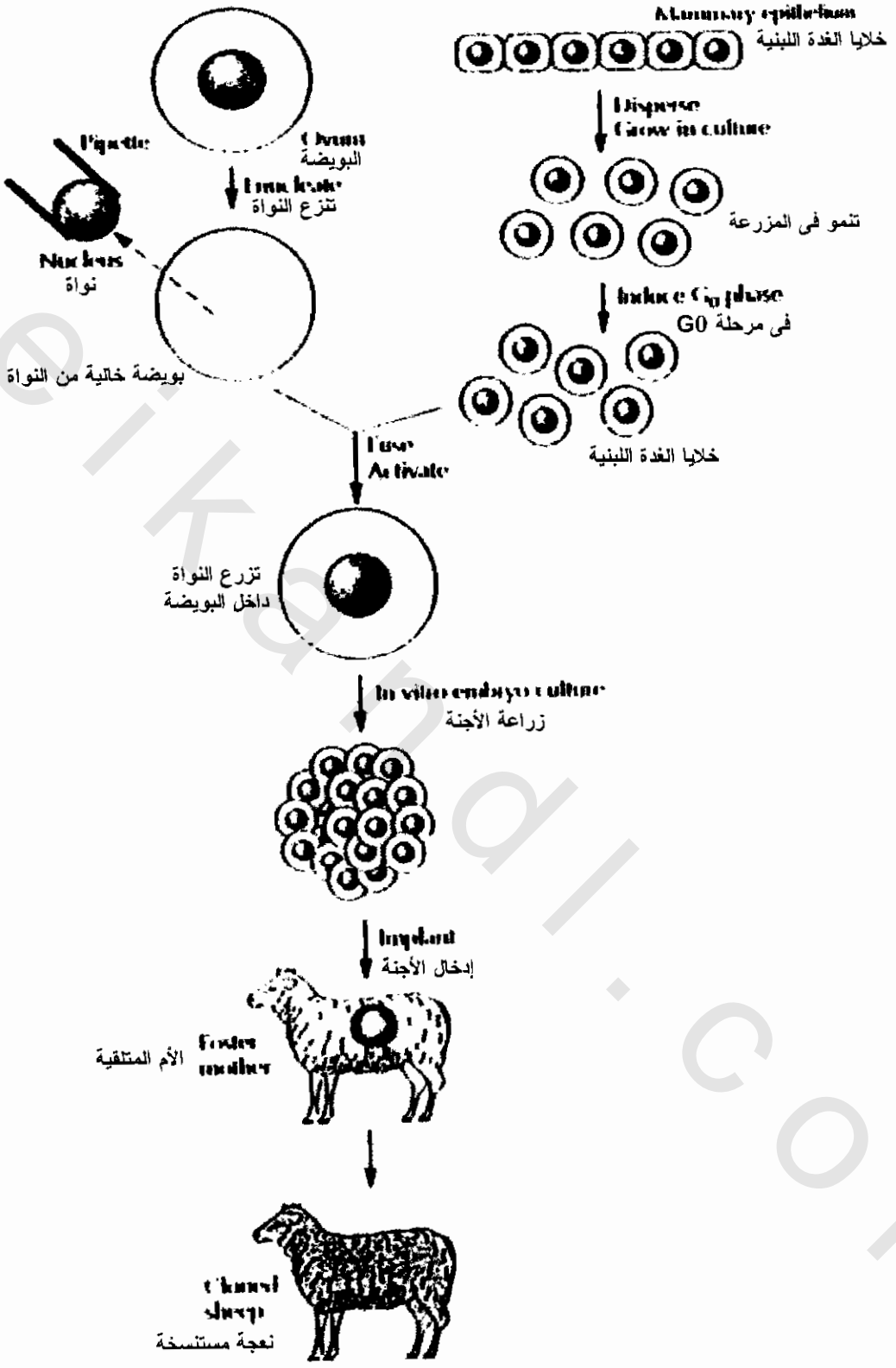
- أن تستخدم على مستوى واسع بالنسبة للكائنات الحية المحورة وراثياً .
- أن تستهلك وقتاً وتكلفة أقل .
- أن تشمل حدوث تحول وراثى للخلايا الأولية .

ويوضح الرسم الطريقة التي استخدمت لاستنساخ النعجة دوللى وكذلك استنساخ أبقار معدلة وراثياً .

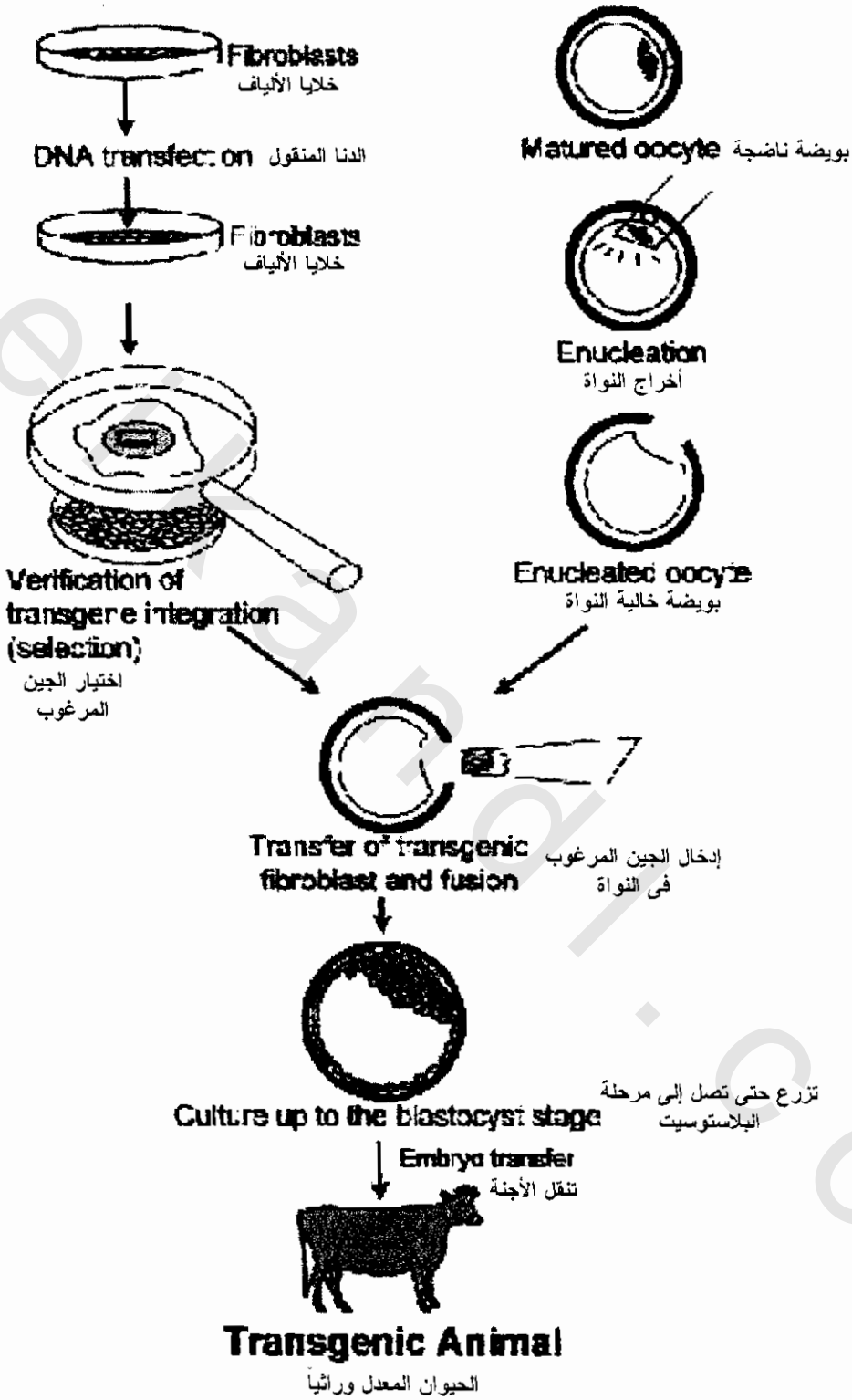
(٧) **الاستهداف الجينى** Gene - Targeting

ومن مميزاتها :

١ – يتم اندماج الجين فى موقع معين معروف عن طرق ناقل مصمم بطريقة خاصة بحيث إذا عرفنا التتابعات المجاورة للجين المستهدف ، من الممكن تصميم ناقل ليحل هذا الجين بآخر فى المكان الخاص به عن طريق معرفة التتابعات الحدودية لهذا الجين – وتشمل الكروموسوم الهدف والذى يتم فيه إندماج الجين عن طريق DNA recombinase مثل FLP أو Cre تتابعات متجانسة من الدنا DNA homologous recombination ويمكن للجين المنقول أن يعمل على :



استنساخ نعاج عن طريق نقل الأنوية الجسمية



استنساخ ماشية محولة وراثياً

١ – إعادة وظيفة الطفرة .

٢ – تعطيل وظيفة جين محدد وجعله غير نشط .

knocks out the function of a particular locus

وهى عكس الطريقة العشوائية لأدخال الجين ويتطلب إدخال الجين المستهدف فى كلا الحالتين .

١ – الجين المرغوب ووجود أثنين من العلامات الوراثية .

(أ) (neo^r) وهى جينات تشفر لأنزيمات تقاوم المضاد الحيوى Neomycin .

(ب) (Tk) عبارة عن جين يشفر للثايميدين Thymidinre kinase الذى يعمل على أضافة مجموعة فوسفور إلى النيوكلوتيدات .

(وهذه الطريقة موضحة بالرسم) .

(٨) **تقنية** Cre - Loxp

ومن مميزاتها :

١ – تفضل هذه الطريقة فى التحكم العالى بالنسبة للشكل المظهرى .

٢ – تستغرق وقتاً أقل (وهى موضحة فى الرسم) .

(٩) **النقل عن طريق الأسبرماتوجونيا** Speromtogonal Transfer

أولاً : فى المعمل In vitro

١ – عدوى الحيوان المنوى بـ DNA المولف Recombinant .

٢ – الحقن فى الخصية .

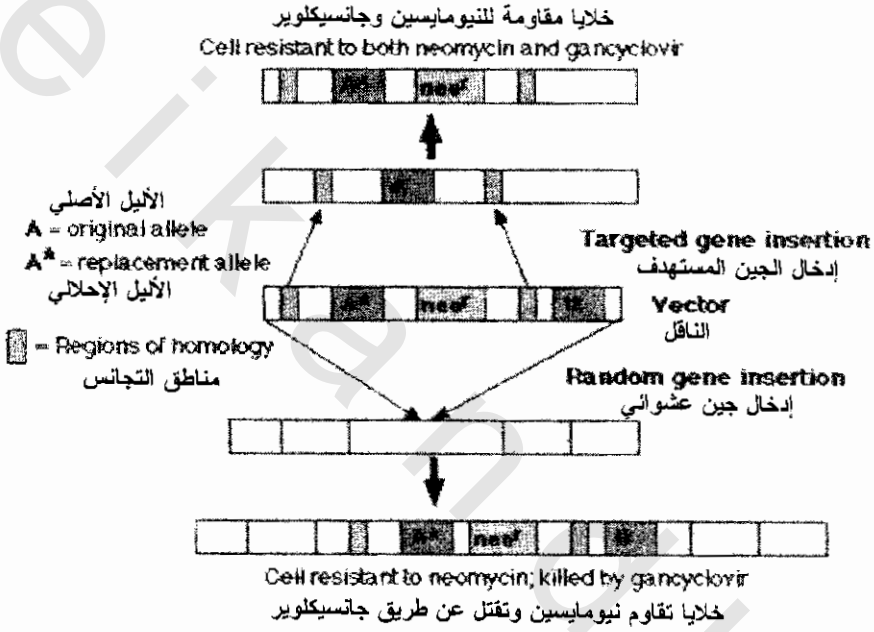
٣ – تنتج الخلايا الجرثومية germ cells فى شكل الكايميرا (الخليط)

ثانياً : فى الكائن الحى In vivo

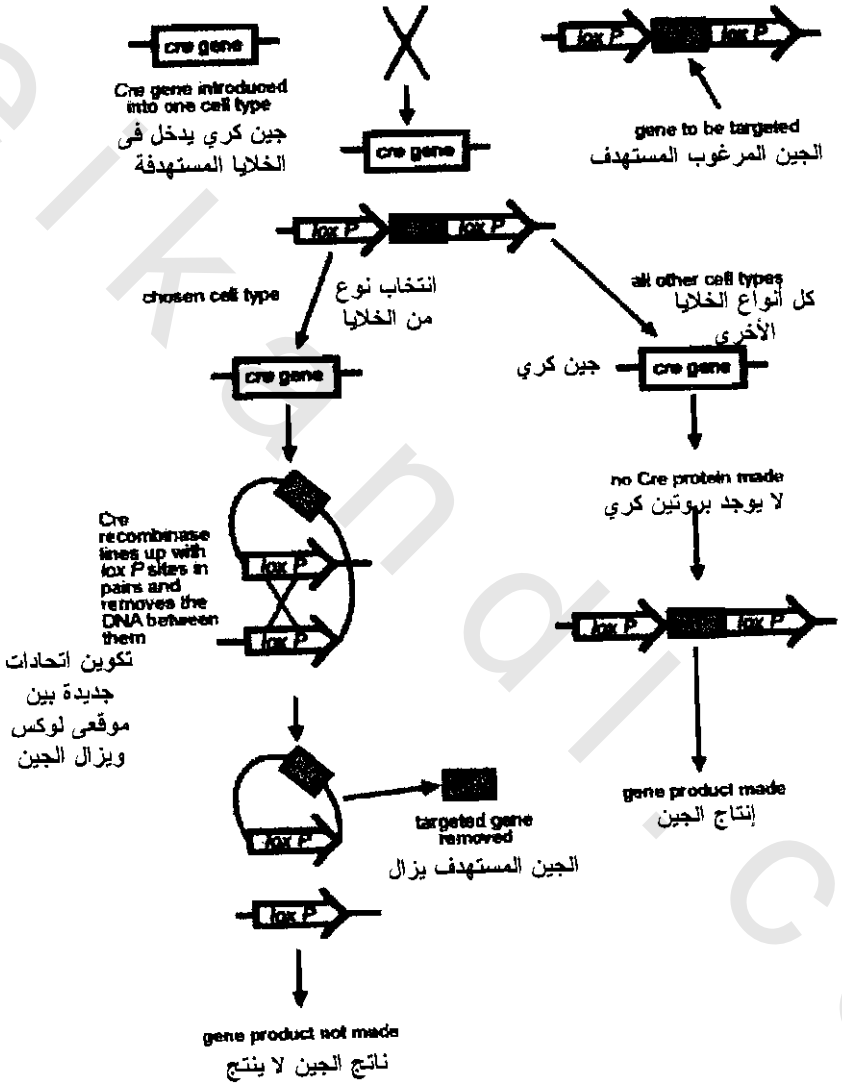
أشارت الأبحاث إلى امكانية استخدام هذه الطريقة كطريقة بسيطة وبديلة لإنتاج حيوانات معدلة وراثياً والتى ولا يمكن انتاجها عن طريق الحقن المجهرى microinjection وفيها :

- يتم حقن الوعاء المنوى بالبلازميد المحتوى على جين GEP بالإضافة إلى الجين المرغوب Transgene .
- بعد الحقن تزوج الذكور بإناث طبيعية ويحلل النسل الناتج . ويكشف عن جين GEP وهو جين يعطى بروتيناً فلورنسياً كما هو الحال فى الفئران بما يعنى حدوث نقل وراثى ويتم التأكد أكثر عن طريق PCR .

obeikandl.com



طريقة الأدخال المستهدف للجين (أدخال الجين فى موقع محدد)



تقنية كرى لوكس للنقل الجينى المستهدف فى نسيج خاص

بعض الحيوانات الأخري المعدلة وراثيا

Other Transenic Animals

١ - الطيور والبيض المعدلان وراثياً:

أ – البيض له نفس المميزات المشابهة للألبان في أحتوائه على البروتينيات التى تستخدم كعقاقير .

ب – استخدم البيض بالفعل لانتاج المضادات الحيوية .

جـ – طريقة الحقن المجهرى فى النواة غير ممكنة وذلك لعدة أسباب منها أن النواة الأولية غير معروفة كما أن طريقة الحقن للستيوبلازم غير مستخدمة ، مع ملاحظة أن البيضة المخصبة لها عديد من الأغشية .

د – تستخدم طريقة النقل عن طريق عدوى البلاستودرم .

هـ – خلايا البلاستودرم تعدى بالليبوسوم المحتوى على الجين المنقول .

و – البلاستودرم الواهب يحقن داخل فراغ الخلايا الجرثومية للمتلقى .

(والطريقة موضحة بالرسم) .

٢ - الأسماك المعدلة وراثياً:

الكفاءة أعلى بطريقة الحقن المجهرى microinjection عن الثدييات .

- نسبة نجاح الحقن المجهرى للنواة يصل إلى ٣٥ – ٨٠ ٪ .
- انتاج الأسماك المعدلة وراثياً (Transgenic) يصل إلى ١٠ – ٧٠ ٪ .
- يتم بالفعل بنجاح نقل جين هرمون النمو (GH) بالأسماك المعدلة وراثياً .
- تطور ونمو الجنين يحدث فى البيئة الخارجية .

٣ - الزواحف والضفادع المعدلة وراثياً:

- الضفادع ناجحة فى استخداماتها فى أبحاث مماثلة للفئران .

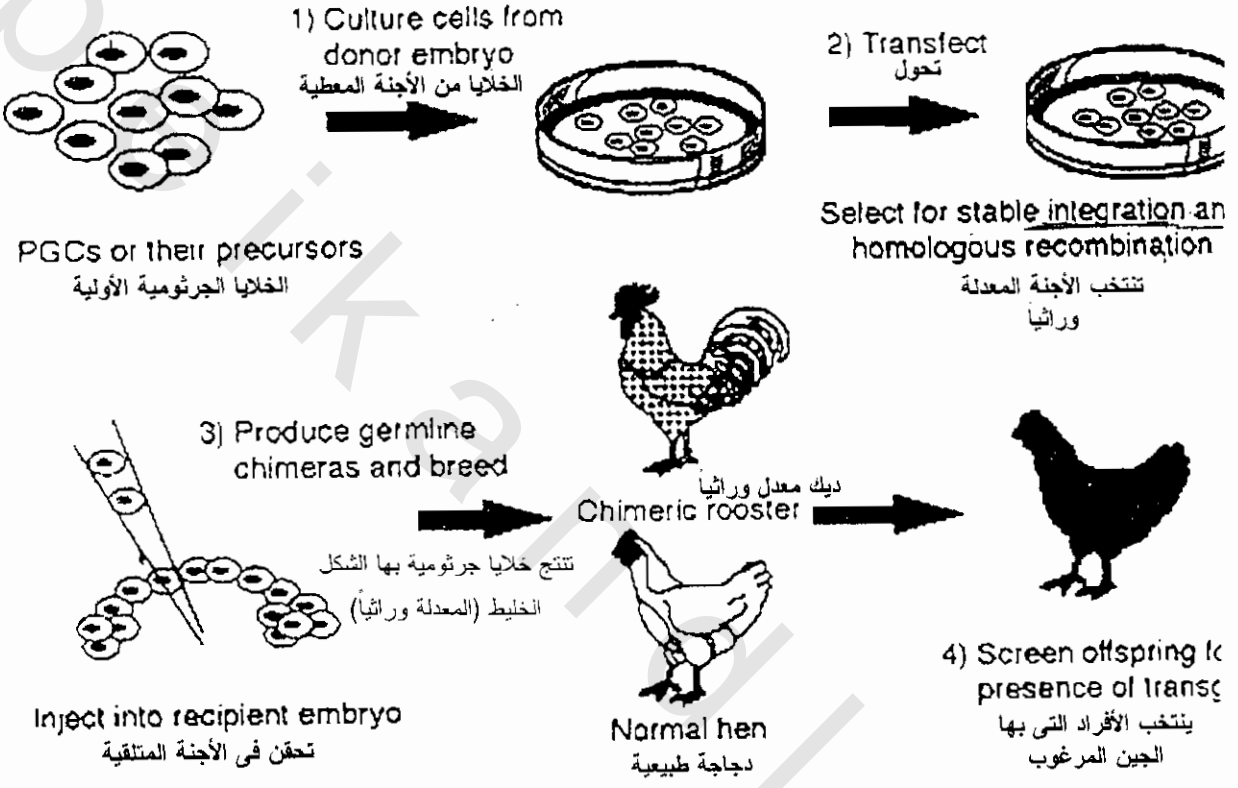
المشاكل التى تعترض انتاج حيوانات المزرعة المعدلة وراثياً:

١ – الكفاءة القليلة جداً (أقل من ١ ٪) .

٢ – لا تستطيع أن ترى النواة الأولية بالبويضة واستخدام الطرد المركزى يساعد ولكن من الممكن أن يسبب تحطماً بها .

٣ – طول فترة الجيل : وهناك مشاكل أخرى خاصة بموافقة هـــيئة الصحة والأدوية FDA .

obeikandi.com



إنتاج طيور محورة وراثياً من الخلايا الجرثومية الأولية

عواقب التقنيات المستخدمة فى الحيوانات المعدلة وراثيا

Consequences of techniques used in Transgensis

١ – أضافة جينات : يحدث بواسطة كل الطرق .

٢ – أعاقة جينات : عدم تنشيط مستهدف لجين معين للعائل عن طريق طريقة خلايا الجذع . (أحلال للجين بنسخة طافرة) .

٣ – أدخال عشوائى للطفرات : يحدث بواسطة كل الطرق .

٤ – منع تعبير الجين : على سبيل المثال .. يمنع الترجمة عن طريق التهجين بين RNA المضاد المعنى Antisense مع mRNA .

التطبيقات الواردة بالنسبة لإنتاج الحيوانات المعدلة وراثيا

The appication of transgenic Animals

هناك عديد من التطبيقات الفعالة والمحتملة الامكانية والخطيرة للحيوانات المعدلة وراثياً منها :

١ – فى البحوث الأساسية Basic Research

٢ – كمصدر للأعضاء فى حالة زراعة الأعضاء للإنسان Xnotransplantation

٣ – نماذج لدراسة الأمراض Disease models

٤ – فى الانتاج الحيوانى لتحسين الصفات الانتاجية

٥ – فى اختبارات الفاكسينات .

٦ – فى اختبارات الطفور والسمية الوراثية .

٧ – فى انتاج البروتينات التى تعمل عقاقير علاجية حيث تستخدم الحيوانات كمفاعلات حيوية bioreactors .

٨ – فى هندسة الأنسجة (Tissue engineering) وهذا المجال يمثل اتجاهاً حديثاً لعلاج الأمراض الوراثية وتعويض الأنسجة (والأعضاء) التالفة .

obeikandl.com

الفئران المعدلة وراثياً كنماذج لدراسة الأمراض

Transgenic animals Disease Models

هناك أكثر من ٣٠٠ مرض وراثي معروف من الشيق جداً ومن المهم دراسة الأسباب الأساسية لهذه الأمراض وبناءاً عليه أيضاً من الممكن أن تستنبط المعاملة والمعالجة الفعالة لها كذلك المعالجة بالجينات Gene therapy . ويستخدم لهذا الغرض سلالات خاصة من الفئران تورث شكلاً مظهرياً خاصاً يحدث بها المرض وتمدنا بنماذج هامة لدراسة المسببات المرضية التي تصيب الإنسان . وهناك في الحقبة الأخيرة عديد من سلالات الفئران المعدلة وراثياً والطافرة والتي حدث لجيناتها عدم تنشيط وأنتجت كنماذج لدراسة الأمراض. وهذه النماذج موجودة لكثير من الأمراض مثل أمراض المخ والقلب والأعصاب وأمراض الشيخوخة والسرطان والحساسية والمناعة وكذلك التكاثر والنمو وغيرها . ولكن هناك بعض المشاكل التي تتعلق بالفرق بين تعريف مظاهر بعض الأمراض الوراثية في كل من الإنسان والحيوان . وهذه السلالات موجودة في بنوك المعلومات الأساسية للتحول الوراثي مثل TBSE أو IMR

(Induced Mutant Research)

وإلى الآن تمت دراسة الأمراض الناتجة من جين مفرد Single gene ، لكن الاستخدام الأهم للفئران المعدلة وراثياً يتمثل في تحليل الأمراض الناجمة عن عديد من الجينات Polygenic diseases . والمشكلة الأساسية تتعلق بالخلفية الوراثية Genetic background للحيوانات لانتخاب خلفية وراثية وطفرات صحيحة لعمل نموذج أمثل للأمراض . وعلى الرغم من أن نماذج الأمراض للحيوانات المعدلة وراثياً لها منافع وأهمية شديدة خاصة للعلاج بالجينات فإن العلاج بالجينات مازال مراوغاً ومستبعداً من حيث امكانية الاستخدام الروتيني الواسع في المستقبل القريب . ولكن من الواضح دراسة امكانية دراسة الأسس الجزيئية للأمراض الوراثية على المستوى الخلوي لمعرفة الأسس الميكانيكية للأمراض ولتحسين الأشكال المختلفة من العلاج .

استخدام نماذج الحيوانات المعدلة وراثياً في علم السمية والسمية الوراثية

Transgenic animals Modeles in toxicology and genetic toxicology

تستخدم النسبة الكبيرة من الحيوانات المعدلة وراثياً في علم السمية لدراسة واختبار السمية الوراثية والتسرطن . حيث أن أهميتها ترجع إلى أن الاختبارات الحديثة لتحديد الطفور والطفرات محدودة فقط في الدراسة في المعمل In vivtro وحتى على مستوى الدراسة «في الحي» In vivo فإنه يشتمل على تحليل الشذوذات الكروموسومية في نسيج مفرد معين لمعرفة التأثير الوراثي السمي أو التأثير الطفري . ومن هنا تكون استخداماته محدودة وخاصة عندما يكون موضوع الاهتمام هو دراسة أنواع أخرى من الأنسجة . أن الأساس في استخدام الحيوانات المعدلة وراثياً في

السمية الوراثية كان لتحسين وايجاد طريقة سهلة لتحديد المطفرات أو مسببات السمية الوراثية فى الحالة In vivo على مستوى ونطاق واسع من الأنسجة بما فيها الخلايا الجنسية . وعلى المستوى التجارى يتوفر نماذج لفئران التجارب المعدلة وراثياً تشمل "Mutamouse" ، Big Blue والتى تحتوى على أوبرون lac_2 من بكتريا E.coli وكذلك lac I للجين المنقول Transgene على التتابع وينقل الجين المستنسخ عن طريق ناقل البكتريوفاج لامدا والذى يستطيع الإندماج فى جينوم الحيوان . وبعد المعاملة للفئران المعدلة وراثياً بالمادة المطفرة المراد أختبارها فإن البكتريوفاج يحرر من الجينوم الكلى DNA فى المعمل بواسطة In vitro packaging (وهى أنظمة لاستخلاص DNA الفاج بواسطة العائل البكترى فى المعمل) . ويتم التعرف على وجود جسيمات الفاج الطافر المحتوى على جينات lac المعطل بقدرتها على النمو على سلالة حساسة من بكتريا E.coli العائل وأيضاً من لون بقع العدوى للفج Plaques .

وكثير من المطفرات القوية أمكن تحديدها بدرجة عالية من الدقة بهذا الاختيار وقدرته على تحديد المواد الغير مطفرة يحتاج لدراسة أكثر من ذلك . وهناك مشكلة أخرى فى الاختبار وهو عدم مقدرته على تحديد الفقد deletion وكذلك الزيادة Inserson الكبيرة وذلك يرجع لعملية التعبئة للفيروس تكون بكفاءة لقطع خاصة من DNA ولهذا فمن المحتمل عدم تحديد الفقد والزيادة الكبيرة وللتغلب على هذا فإنه ينتج فئران معدلة وراثياً والتى تحتوى على بلازميد Plasmid - based lacZ system والتى من الممكن باستخدامها اكتشاف وتحديد الفقد الكبير .

الحيوانات المعدلة وراثياً المستخدمة لاختبارات السرطان Carcinogencity testing

الجرعة المزمنة فى اختبارات القوارض للتسرطن تحتاج إلى عدد كبير من الحيوانات وكذلك تفشل فى حالة استخدام مستوى جرعات عالية . والأساس فى استخدام الحيوانات المعدلة وراثياً فى اختبارات التسرطن يعتمد على ايجاد جين منقول مناسب Transgene والذى لا يثير تكون الورم مباشرة بل ينشئ ميلاً ونزوعاً عالياً لحدوث التسرطن . ولان هذا الجين المسرطن المنشط المنقول activated oncogene لا يحتاج تغيرات وراثية أضافية فى الخلية المتأثرة فإن الوقت المحتاج لظهور الأعراض السرطانية والتأثير السرطانى يكون قصيراً . وهذا الميل لاستحداث التسرطن بواسطة المادة المسرطنة لا يقتصر تأثيره على قصر الوقت بل أيضاً يختزل بدرجة كبيرة عدد الحيوانات التى تحتاجها الطرق التقليدية لاختبارات التسرطن .

وهناك سلالات مختلفة الطراز للفئران المعدلة وراثياً المستخدمة فى اختبار التسرطن منها :

١ – Eu - Pim-1 : وهى سلالة من الفئران المعدلة وراثياً المحتوية على جين مسرطن

obeikandl.com

نشط activaed Pim-1 oncogenes والذى يقلل معدل التسرطن التلقائى وحساس جداً فى استحداث السرطان بواسطة المواد المسرطنة التى تستحدث السرطان خاصة فى الغدد الليمفاوية .

٢ – فئران تحتوى على جينات مسرطنة منشطة للسرطان v - H - ، c - H - ras ras أو التى تحتوى على الجينات المثبطة للسرطان (P53) وأيضاً فئران تحتوى على جينات نظام الاصلاح غير منشطة .Inactivated DNA Repair gene (XPA) ولكن الحيوانات المعدلة وراثياً تحمل طفرات مفردة مرتبطة بالسرطان وهى التى من الممكن أن تؤدى إلى معلومات مضللة حيث أن الطفرات المفردة Single mutation فى خلايا القوارض من الممكن أن تؤدى إلى شكل مظهرى متحول ولكنها غير كافية لتسبب التحول Transformation للخلايا الأدمية . كذلك فإن نماذج التسرطن للحيوانات المعدلة جينياً تكون حساسة جداً بدرجة كبيرة للمواد المسرطنة عند التعرض لها ومن ثم تكون حساسة جداً بالنسبة لقياس مقارنة الخطورة للإنسان فى اختبارات التسرطن .

وتبقى مشكلة كبيرة خاصة بنماذج التسرطن للحيوانات المعدلة وراثياً وهى أن تأثير الطفرات فى عدد من الجينات بما فيها جينات التسرطن والمثبطة للسرطان من الممكن أن تتأثر باختلاف الأنواع بمعنى أن الفأر الذى يحمل طفرة خاصة بجينات التسرطن Oncogenes mutation لا يكون من الضرورى حساساً لنفس الأحداث الثانوية كما يظهر فى التسرطن للإنسان .

حيوانات المزرعة المعدلة وراثيا
Transgenic Farm animls

بصورة عامة يعد الحقن هو الطريقة الأكثر شيوعاً التى يمكن استعمالها لانتاج حيوانات المزرعة المعدلة وراثياً . إن التقارير والأبحاث الحديثة عن الجينات المعدلة فى الأغنام والماشية وفى الخنازير فى اتجاه النقل النووى الجسمى (Somatic nuclear) أدت إلى توقعات كثيرة عن هذه الطريقة الرائعة لتحسين نسل حيوانات المزرعة المعدلة وراثياً .

openkandil.com

الحيوانات المعدلة وراثياً . لماذا ؟

إن الاهتمام بالحيوانات المعدلة وراثياً يقع فى مجالين كبيرين هما :

١ – زيادة الكفاءة الانتاجية لحيوانات المزرعة : وهو المجال الأساسى للاهتمام بالنسبة للباحثين (Production efficiency) .

٢ – Molecular Farming الصيدلة الجزئية أو إنتاج الجزيئات الهامة باستخدام حيوانات المزرعة

حيث تستخدم حيوانات المزرعة لانتاج الأدوية والمنتجات ذو الأهمية الطبية nutraceuticals وهندسة الأنسجة لنقل الأعضاء إلى الإنسان .

التطبيقات المستخدمة لهذه الحيوانات

١ – كمفاعلات حيوية . As bioreactor

٢ – نقل الأعضاء للإنسان . For xenografts

٣ – فى الانتاج الحيوانى . In animal Production

١ - المفاعلات الحيوية Bioreactors

توجد طريقتين لإنتاج هذه المفاعلات الحيوية حيث تعرف هنا على أنها حيوانات معدلة وراثياً لانتاج بروتينات تعمل كأدوية Pharmaceutcal proteins والطريقة الأكثر فعالية هى التى تعبر عن البروتين فى الغدة الثديية باستعمال المستبدئ Promoter من جين البروتين اللبنى للتعبير المباشر .

ومثال ذلك أنتاج مستبدئ B. lactoglobulin فى الأغنام لاستخدامه فى التعبير عن عدد من البروتينات البشرية ذات الاستخدامات الطبية (وذلك بأضافة الجينات البشرية Human genes بالأضافة إلى المستبدئ من جين البروتين اللبنى) ذلك فى الجين المؤلف recombinant DNA مثل ATT (a-l-antitrypsin) لهذا فأن التعبير يوجه إلى الغدة الثديية اللبنية وغالباً الأغنام ، الأبقار والماعز والخنزير والبروتين البشرى يفرز مباشرة فى اللبن .

أما فى الطريقة الثانية فإن البروتين العلاجى المرغوب طبياً ينتج فى سوائل غير لبنية مثل الدم . وإلى هذه اللحظة فهذه الطريقة تستخدم فقط فى الخنازير لانتاج الهيموجلوبين .

أ – اللبن المعدل جينياً Transgenic milk

I – يجمع اللبن ويتاح بكميات كبيرة منه .

II – تركيب البروتين يكون بسيطاً ونوعياً(الكازين وبروتينات فصل اللبن)

III – يمكن للغدة الثديية أن تنفذ تحويرات ما بعد الترجمة والتى لا تستطيع أن تقوم بها الأنظمة الميكروبية .

obeikandl.com

ب – **صيدلية الألبان** : (Dairy Farming) وتعنى الحصول على المنتجات ذات الأهمية الطبية فى اللبن مثل :

I – عوامل الدم (blood factor) : عامل IX لعلاج الهيموفيليا (hemophilia) – الهيموجلوبين (الدم الصناعى) – بروتين Therombosis C – منشط نسيج البلازمينوجين Tissue plasminogen Activator (للأزمات القلبية) .

II – الأنتيربسين – ا – الفا البشرى Alpha - 1 - antitrypsin (لعلاج الرئة) .

III – هرمونات الببتيدات وعوامل النمو Peptide Hormones and Growth Fnctors .

جـ – معالجة المكونات الموجودة داخل اللبن بالفعل :

I – محاكاة لبن الثدى البشرى (المعاملة الطبيعية للبن) .

II – إزالة اللاكتوز (الحساسية المفرطة للاكتوز) .

III – الكازين المعدل لإنتاج الجبن .

٢ - زراعة الأعضاء الحيوانية فى الإنسان

Xenotransplantation

يستهدف إنتاج حيوانات المزرعة المعدلة جينياً لتزويدنا بالأعضاء لزراعتها داخل البشر المرضى مما يمنع طرد العضو المزروع من خلال تنشيط عوامل المجموعة المتكاملة الخاصة بجهاز مناعة الإنسان . هذا الهدف يتم على سبيل المثال بواسطة أنتاج خنازير معدلة وراثياً اعتماداً علي أن إدماج الجينات البشرية داخل جينوم الخنزير لاستخدام أعضائه في المرضى يتوافق مع كون :

أ – أعضاء الخنزير مشابهة فى الحجم للإنسان .

ب – إدماج هذه الجينات البشرية يقلل من الرفض .

جـ – تشير الدراسة أن نقل القلب والكبد والرئتين يحتل قمة الترشيحات الجاهزة للتطبيق في المستقبل القريب .

وقد شهد يناير ٢٠٠٢ الإعلان عن استنساخ خنازير مولفة جينياً تصلح لهذا الغرض .

٣ - الصفات الانتاجية الحيوانية المستهدفة في التحوير الجيني:

الصفات الانتاجية الحيوانية التالية تعرضت باستمرار للمعالجة بواسطة التعديل الجينى ومنها صفات النمو وتركيب الجسم :

obeikandl.com

١ – هرمون النمو (Somatotropin)

أ – يزيد كفاءة التغذية .

ب – يزيد أنتاج اللبن .

جـ – تحسين نسب الدهن .

د – ومع ذلك يلاحظ أن الحيوانات المعدلة وراثياً وخاصة بجين هرمون النمو تتعرض لمشاكل مثل :

- التهاب المفاصل .
- قلة الخصوبة .

٢ – حث النحو العضلى : جين C - SKI

٣ – إنتاج الصوف : (تحسين الاستخدام للـ Cysteine) .

(يعتبر Cysteine هو الحمض الأمينى المحدد لانتاج الصوف) .

٤ – زيادة مقاومة الأمراض :

- دمج الجينات المقاومة للأمراض :
- التكوين المسبق للأجسام المضادة : Preformed antibodies

تعتمد على المعرفة الوراثية (الجينية) لانتاج الأجسام المضادة .

- الأنترفيرون : Interferon

مضاد الفيروسات وعامل مضاد للسرطان

obeikandl.com

نتائج التعديل الجينى بالنسبة للرفاهية الحيوانية والاخلاق

Consequences of transgenesis for Animal Welfare and Ethics

على الرغم من التركيز الحالى على البحث العلمى فإن مفهوم الرفاهية الحيوانية صعب التعريف خاصة عندما يراد أمتداده فيما وراء صحة الحيوان . ماذا يعنى بالرفاهية وكيف يمكن قياسها ؟ عادة تشمل الرفاهية للحيوان كل من الصحة الجسمية . والسلوك ويتم تقييمها بالنظر إلى الحيوان نفسه وكيف يتغلب على صعوبات بيئته التى يعيش فيها .

وهناك ثلاثة عوامل تؤثر سلبياً على صحة ورفاهية الحيوانات المعدلة وراثياً :

١ – التكاثر . ٢ – الطفرات .

٣ – تعبير الجين المنقول Transsgene

١ - التكاثر ومشاكل اخرى متعلقة بالتكنولوجية الحيوية وايضا بهدف التربية

هناك أعتبارات أخلاقية متعلقة بصحة الحيوان فى الغالب مرتبطة بالمراحل التالية لتكاثر الحيوان المعدل وراثياً ، على سبيل المثال فإن الزيادة فى أنتاج اللبن فى معظم الأحيان تسبب نسبة عالية من حدوث الطفرات فى الأبقار وكذلك هناك مشاكل كثيرة وخطورة تعترض رفاهية الحيوانات المعدلة وراثياً وذلك من خلال التقنيات المستخدمة فى التكاثر مثل أخذ البويضات والتلقح الصناعى ونقل الأجنة . كل هذه العوامل تسبب ضغوطاً وخطورة لرفاهية الحيوان وأكثر من ذلك فى بعض الحيوانات الأصغر مثل الأغنام والخنزير فإن نقل الأجنة يحتاج إلى جراحة وأيضاً أثناء هندستها الوراثية فى المعمل وهذا يؤدى إلى أن الأجنة الناتجة تعانى من مشاكل عديدة تتعلق بالولادة بالعمليات القيصرية وزيادة معدل التشوهات الخلقية . وهناك عدد كبير من المؤلفين يعتقدون أن استخدامات البيوتكنولوجيا فى معظم الأحيان تسبب معاناة للحيوان وواحدة من أولى الحالات المتعلقة بالمشاكل الخاصة برفاهية الحيوان هى حالة الخنزير الكبير Beltsvile pigs وهذا الخنزير يحتوى على جينات هرمون النمو البشرية لزيادة سرعة نموه ولكنه يعانى من مشاكل صحية عديدة مثل أمراض القرحة والقلب ومشاكل فى التكاثر والحركة . ومن هنا فإن التقنيات المتبعة تنتج استعمالات عظيمة وكثيرة ولكنها فى الوقت نفسه تزيد من أحتمالية معاناة الحيوان .

هناك أيضاً مشاكل لرفاهية الحيوان متعلقة بهدف التربية ومثال ذلك يوجد الآن دجاج "Broilers chicken" ينمو بوزن يقارب ٢ كيلو فى مدة ٤٠ يوماً ولكنه بالرغم من أن العضلات تنمو سريعاً إلا أن جهاز الأوعية الدموية والقلب والجهاز الهيكلى لا يتابع هذه الزيادة فى النمو بنفس السرعة ويؤدى إلى مشاكل عديدة وسكتة قلبية وأيضاً الدجاج الرومى "Turkeys" تم تربيته وإنتخابه لنموه العضلى فإن ذكورها عندها مشاكل خاصة بالتزاوج مع الآناث لهذا فهى تحتاج إلى تلقيح صناعى للتكاثر وأيضاً تعانى من مشاكل صحية عديدة مثل مشاكل فى تركيب العظم الذى لا يتحمل الوزن .

وكل من دجاج Broiless ، والدجاج الرومى تعانى من نقص فى الجهاز المناعى واستجابتها المناعية مما يجعلها عرضة أكثر للاصابة بالأمراض .

وفى الحيوانات المعدلة وراثياً والتى تشفر للجينات المقاومة للأمراض فتظهر حالة واحدة لارتباط ذلك بظهور بعض الأمراض . مثل مقاومة الأمراض الفيروسية فى الدجاج Avian leukosis virus وأيضاً فى حالة مقاومة الأمراض يرتبط ذلك فى الغالب ببعض الأمراض مثل التهاب الثدى .

٢ - تأثير الطفرات

Mutation effects

يتبع الحقن المجهرى لـ DNA غريب فى الغالب الإندماج بالقرب أو داخل الجينات الأصلية للعائل endogenous genes وهذه العملية ينتج عنها طفرات داخلية "Insertional mutation" ويسبب ذلك فقد لوظيفة هذه الجينات . ويرتبط هذا الأندماج التالى للحقن المجهرى فى بعض الأحيان بانتقالات كروموسومية وكذلك أعادة ترتيب Rearragment للجينات مؤدية إلى خلل أثناء النمو . وهذه الطفرات الإندماجية ممكن أن تكون سائدة أو متنحية وتؤدى إلى الموت فى المراحل الأولى لذلك لا يمكن معرفتها وتحديدها . ولكن هذه المشكلة من الممكن أن تقل ونتغلب عليها وذلك باستخدام الخلايا الأمية الأساسية ES فى الجين المستهدف فى هندسة الكائن الوراثية بواسطة الإندماج المباشر لموقع خاص معين .

٣ - تعبير الجين المنقول

expression of transgene

يأتى التعبير الضار للجينات للحيوانات المعدلة وراثياً من التعرض لبروتين غريب وأيضاً فإن تعبير الجينات المنقولة يعتمد على العوامل المرتبطة الآتية :

١ – الأعراض البيولوجية للبروتين الناتج .

٢ – الأنسجة التى يتم فيها التعبير لهذه الجينات .

٣ – النمط الأفرازى لناتج الجين .

٤ – مستوى التعبير للجين المنقول .

ولهذا تعتمد الخطورة فى أى نموذج لحيوان معدل وراثياً على ظروف تخليق هذا البروتين الداخلى ، هل بمستوى قليل فى عدد محدود من الأنسجة الخاصة فى معزل عن تيار الدم أم الحالة الشديدة التى ينتج فيها البروتين المخلق النشط يتم بكميات كبيرة فى أنسجة كثيرة مع زيادة إحتمال وصوله لتيار الدم .

يعد الخنزير Beltsville المشهور مثالاً لهذه الحالة الأخيرة والذى يعانى من عدد من حالات المسببات المرضية ومشاكل أخرى متسببة عن الخطأ أو التعبير الغير متوقع للجين المنقول راجع إلى التأثيرات العديدة Pleiotrophic effects للجين نفسه والتى من الممكن أن يأتى من تفاعله مع الجينات الداخلية ونواتجها . وأيضاً موقع الجين المنقول على الكروموسوم (والذى يسمى بتأثير الموقع) من الممكن أن يؤثر على تعبير

الجين خاصة إذا أندمج بالقرب من منطقة DNA المنظمة أو المحكمة (contrl DNA region) مثل المعزز enhancer من الممكن أن ينتج عنه عدم تعبير للجين أو تعبير فى خلايا أو أنسجة غير مناسبة .

ولقد طورت استراتيجيات عديدة لتحسين التحكم فى تعبير الجين المنقول ولهذا فمن الممكن أن يزال تأثير الموقع ويمنع تأثير تداخل الجين المنقول مع الجينات الداخلية وذلك باستخدام Insulators (مانع) وهو مساحة من DNA تعمل كحد boundary . أكثر من ذلك فإن استخدام مستبدئ كامل Complete promoters أو وجود منطقة منظمة control region داخل الأنترون (وهى منطقة من DNA غير نشطة) أو أى مناطق أخرى غير مترجمة (untranslated) ، من الممكن أن يحسن من التحكم فى التعبير الجينى للجين المنقول .

كما أن المستبدئ المستحدث Inducible promoter يستطيع أن يتحكم فى التعبير حيث يكون تعبير الجين المنقول محدداً لتلك الخلايا التى تحتوى على جزئ البادئ inducer أو مادة التفاعل وهذا المستبدئ طور واستخدم للتحكم فى التعبير الجينى .

وهناك استراتيجية أخرى لتحديد تعبير الجين المنقول من جزء خاص من الحيوان ومثال لها استخدام هرمون الأنسولين الذى ينظم عوامل النمو Insulin-Like growth foctor . حيث يتم تعبيره فى الجلد فقط ليحفز إنتاج الصوف بدون أى مشاكل لصحة ورفاهية الحيوان من جراء ذلك التحوير .

نظام Cre - lox يتبعه أيضاً تعبير للجين المنقول فى نسيج خاص معين ، ولا يتم تعبيره فى جميع الأنسجة ، حيث يتم تعبيره فى طراز معين من الخلايا ويتم إزالته من الأنسجة الأخري التى لا يراد حدوث تعبير للجين المنقول بها . ويعتمد ذلك على استخدام الناقل البكتريوفاجى وأنزيم recombinase الفاجى الذى يشفر له بواسطة جينات Cre ويتم إدخاله فى نسيج معين خاص . هذا الأنزيم له مواقع تعريف Recogenation sites خاصة يتم التعرف عليها بواسطة الأنزيم وهذه التتابعات الخاصة به وتعرف بـ loxp والتى تعمل بنشاط فى الكائنات حقيقة الأنوية عند إدخالها بالرغم من عدم وجودها بها بصورة طبيعية . ولهذا تعتمد التقنية على عمل بناء للجين المراد نقله (Gene Construct) بحيث يكون هذا الجين المنقول داخل التتابعات المتجانسة من loxp والمجاورة له . ويتم إدخال ذلك إلى الخلايا الأمية الأساسية ES ليتم فيها النقل المستهدف للجين حيث يحل الجين محل النسخة المحورة للعائل ، لتنتج سلالة من الفئران محورة وراثياً . وتستخدم فى هذه التقنية سلالة أخرى محورة وراثياً وتحتوى على جين Cre الذى يشفر لانزيم

recombinase فى نوعية خاصة من الأنسجة وليس فى كل الأنسجة حيث يتم إدخال هذا الجين إلى هذا النوع الذى يختار من الأنسجة فى مرحلة متأخرة ومبكرة فى الحيوان البالغ ويتم التهجين بين هاتين السلالتين التى تحتوى على التتابعات المتجانسة وبداخلها الجين المنقول المستهدف والأخرى التى بها تشفير لأنزيم recombinase فى نوع من خلاياها وينتج عنه إزالة للجين المنقول لإحلال جين العائل فى الهجين الناتج . أما باقى الخلايا التى لا يحدث تعبير للإنزيم لعدم إدخال تتابعات الجين Cre المشفر بها لا يتم حدوث هذا الإحلال بها . ومن هنا فإنه يحدث تعبير لهذا الجين المنقول فى هذه الأنسجة وفى نفس الوقت لا يحدث له تعبير فى النسيج الخاص الأخر فى الهجين الناتج .

تأثيرات نظامية

Systematics effect

بالإضافة إلى مسألة علاقة الحيوان المعدل وراثياً ورفاهيته المتعلقة بتحوره وما يحدث له من جرائه فهناك تأثيرات لاحقة تشتمل عل نظام رعايته Housing husbandry وتكاثره (والتى تسمى بالتأثيرات النظامية) من الممكن أن تؤثر على رفاهية الحيوان المعدل وراثياً . على سبيل المثال فالخنازير التى أنتجت لتكون مصدراً لنقل الأعضاء للإنسان وكذلك الأبقار التى أنتجت لتكون مصدر لانتاج بروتينات دوائية علاجية phanmaceuticals من ألبانها سوف تحتاج المحافظة عليها تحت ظروف صحية شديدة الصرامة . هذه من الممكن أن تزيد الخطورة حيث أن الحيوانات المعدلة تجرد من بعض الظروف البيئية الضرورية فى بيئتها الطبيعية ولهذا من الممكن أن ينقص وزن الحيوان المعدل وراثياً لكن الرعاية المثلى والتى تأخذ باعتبارات كافية بالنسبة للسلوكيات التى تحتاجها الحيوانات المعدلة وراثياً من الممكن عموماً أن تحسن صحتها ورفاهيتها .

تضمين الحيوانات المعدلة وراثياً فى نماذج الأمراض وعلاقته برفاهيتها

Welfare implication of disease models

إن الحيوانات التى تنتج لهذا الغرض تعمل على زيادة الأمراض الوراثية بتلك الحيوانات وهى مسألة هامة بالنسبة لرفاهية الحيوان ، حيث أن هذه الحيوانات أنتجت لتعانى . وأختزال عدد الحيوانات التى ستتعرض لذلك بما قد يؤدى إلى موتها هى قضية جوهرية لتلك الحيوانات مرتبطة بتحقيق الهدف الخاص بالتوازن بين الأهداف البحثية والرفاهية الحيوانية .

تضمين الحيوانات المعدلة وراثياً فى اختبارات الطفور والتسرطن وعلاقته برفاهيتها

Welfare implication of mutagenicity and carcinogsnicity testing

يلاحظ أن استخدام الحيوانات المعدلة وراثيًا فى اختبارات الطفور والتسرطن يتضمن استخدام عدد أقل من الحيوانات فى هذه التجاربة بالمقارنة مع استخدام عدد كبير من الحيوانات التى تحتاجها التجارب التقليدية وأيضاً إلى تقليل مدة المعاملة حيث أن تطور الطفور والتسرطن يحدث بسرعة فى هذه الحيوانات المعدلة لذلك الغرض ، ومن هنا تقليل المعاناة للحيوانات بالمقارنة بالتجارب التقليدية ، ومع ذلك فإن هناك تأثيرات ضارة تتعرض لها تلك السلالات من الحيوانات المعدلة وراثياً ، التى تستخدم لهذا الغرض مثل V-H-rasc-myc e-neu والتى ترتبط بتطور الورم الذى يتبع التشوهات والتغيرات التى تحدث للجلد هذه التأثيرات تنتج من خلال المعاملة المباشرة المتبعة فى التقنية نفسها .

تضمين الحيوانات المعدلة وراثياً فى تجارب المفاعلات الحيوية وعلاقتها برفاهيتها

Welfare implication for bioreactors

إن النتائج المعروفة بالنسبة لحيوانات المزرعة المعدلة وراثياً التى تستخدم فى انتاج الأدوية والبروتينات الهامة من الناحية الطبية تشير إلى عديد من المشاكل لرفاهية الحيوان والتى تتعلق بالتأثير البيولوجى للبروتينات المعبر عنها فى هذه الحيوانات . على سبيل المثال ، التعبير العالى الخاص فى الغدد الثديية mammary - specific expression والذى يظهر فى الأرانب التى تحمل الجينات البشرية الأرسروبوتين erythropioetin (HEPO) . أيضاً الأغنام التى تحمل الجينات البشرية AAT genes التى تحمل جينات هرمون النمو (hGH) ينتج عنه العديد من المشاكل الصحية . علاوة على ذلك فإن زيادة التعبير حتى للبروتينات الغير محددة - non detrimented protein مثل mouse whey acidic protein ectopic expression من الممكن أن ترتبط بزيادة فى معدل الأمراض . بالإضافة إلى أن هذا التعبير العالى من الممكن أن يؤدى إلى ارتشاح تلك البروتينات من اللبن داخل تيار الدم وفى بعض الحالات يحدث بعض التأثيرات المحددة الموضعية فى الغدد اللبنية والتهاب الثدى .

تضمين الحيوانات المعدلة وراثياً فى تجارب نقل الأعضاء للإنسان وعلاقته برفاهيتها

Welfare implication for xenotransplantion

تشير النتائج المنشورة إلى أن استخدام الخنازير المعدلة وراثياً لاستخدامها فى نقل الأعضاء للإنسان يرتبط بالأساس بالعناية الصحية لمثل هذه الحيوانات حيث أن تلك

الخنازير يحافظ عليها تحت ظروف صارمة لحمياتها من الإصابة بالأمراض وذلك لتجنب إنتقال هذه الأمراض إلى من ستنتقل إليهم الأعضاء الحيوانية .

قياس الرفاهية والصحة للحيوانات المعدلة وراثياً

Monitoring welfare

تدل الاعتبارات المتعلقة بصحة ورفاهية الحيوان على أهمية وجود جهود إضافية لمراقبة وقياس الرفاهية والصحة للحيوانات المعدلة وراثياً فى نمط نظامى معين . كذلك فإن الخطورة التى يمكن أن تتعرض لها الحيوانات المعدلة وراثياً من الممكن أن تكون ميزة فى قياس التباين على مستوى البيولوجيا الجزئية . على سبيل المثال بقياس ناتج الجين المنقول ، RNA فى مختلف الأنسجة .

وتشير الاستراتيجيات المستقبلية لتجنب النتائج الضارة المتعلقة بالحيوانات المعدلة وراثياً إلى ضرورة مراقبة ومتابعة كل ما يتعلق بصحة ورفاهية الحيوان منها عدم الاحتفاظ بالحيوانات فى الحالة النقية ، الأفراز الزائد عن المستوى ، كذلك مقدرة تقنية ES لزيادة الأغراض والتطبيقات الهامة للحيوانات المعدلة وراثياً مع نقص وأختزال الخطورة على صحة ورفاهية الحيوان .

الاعتبارات الاخلاقية المتعلقة بالإنسان والامان الحيوى والبيئى

Bioethics, Biosafty and Environment

بالإضافة إلى الاعتبارات المتعلقة بالحيوان فإن استخدام البيوتكنولوجيا نشأ عنها اعتبارات إضافية ولكنها أساسية وجوهرية متعلقة بالإنسان وأيضاً بمسألة الأمان الحيوى والبيئى .

وواحد من هذه الاعتبارات الأخلاقية الجوهرية يتعلق بانتقال الجينات بين الأنواع وخاصة عندما تكون الجينات البشرية متضمنة لنقلها المكثف إلى حيوانات التجارب . وأيضاً عند استخدام الأعضاء الحيوانية لمعالجة الإنسان فى هذا الخصوص فإن الهيئة الخاصة بالاعتبارات الأخلاقية للتكنولوجيا الحيوية .

Ethical Implication Biotechnology

نشرت رأيها فى التحورات التى تحدث للحيوانات وخلاصة الرأى أنه عندما تكون التحورات التى تحدث للحيوانات من الممكن أن تساهم فى السعادة والخير للإنسان وتحقيق الرفاهية له Human well - being تكون مقبولة ، حيث يكون الهدف أخلاقى مبرر وعندما تنفذ الخطة البحثية تحت ظروف أخلاقية Ethical conditions .

ومن الاعتبارات الأخلاقية الرئيسية بالنسبة للإنسان الخلاف حول الخوف من أن الذى يحدث على الحيوان من الممكن أيضاً أن يحدث على الإنسان على سبيل المثال تقنية الاستنساخ للخلايا الجسمية cloning التى طورت وتم تطبيقها على

obeikandl.com

الحيوانات فبالرغم من المعارضة الشديدة لتطبيقها على الإنسان ، نذكر ما حدث مؤخراً فى الأشهر الأخيرة من العام ٢٠٠١ ، حيث تم الإعلان عن استنساخ جنين بشرى فى المراحل الأولى ولكنه فشل فى مواصلة الانقسام إلى مراحل متقدمة . وهناك اعتبار آخر متعلق بالأمان الحيوى وعلاقته بصحة ورفاهية الإنسان . مثال على التساؤل عما إذا كانت هناك خطورة على الإنسان من أكل الحيوانات المهندسة وراثياً فبجانب التخوف هناك رأى آخر يعتقد أن هذه التقنية تأتينا بلحوم صحية أكثر (وبها دهن أقل ولبن أسرع فى الهضم) .

كذلك يتضح الخلاف على أن هناك خطورة على الإنسان إما مباشرة عن طريق متبقيات المضادات الحيوية فى اللحم أو من خلال إيجاد وتطور مسببات مرضية مقاومة للمضاد الحيوى عن طريق العلاج الدوائى المستخدم للتغلب على المشاكل الصحية للحيوانات المعدلة وراثياً .

ويرى البعض أن الإعتراضات السابقة قد تكون من باب الترف الذى تطبقه الدول المتقدمة ، أما الدول النامية فهى تحتاج إلى مثل هذا التوظيف للتكنولوجيا الحديثة لإنتاج غذاء أو فرد أقل سعراً .

ويبقى هناك اعتبار أخلاقى يتمثل فى الخطورة العسكرية لاستخدام الحيوانات المنتجة بطرق التكنولوجية الحديثة بحيث تحمل مسببات مرضية .

هذا بالإضافة إلى الاعتبارات الأخلاقية والأمان الحيوى فهناك مسألة أخرى خاصة بالخطورة على البيئة من تحرير منظم دولياً أو محلياً للحيوانات المعدلة وراثياً . ومثال على ذلك الخطورة الكبيرة المذكورة للأسماك المعدلة وراثياً ، والتى تهدد الأشكال البرية وتسبب تأثيرات ضارة للبيئة . وكذلك إمكانية الخطورة على البيئة عند التأثير على التزاوج وكفاءته والإضرار بالتنوع البيولوچى بما يؤدى إلى الإقلال منه .

موافقة الرأي العام وقواعد التحليل الأخلاقي :

Public Acceptability and the Role of Ethical Analysis

من الملاحظ وجود تردد بالنسبة لدعم وتشجيع التحوير الوراثى للحيوانات . على سبيل المثال فى أوربا فهناك تقرير على أن ٥٠ ٪ من الأوربيين لا يبدون موافقتهم على إنتاج واستخدامات العديد من أشكال الحيوانات المعدلة وراثياً . أكثر من ذلك فإن الأغلبية ضد انتاج حيوانات مزرعة معدلة وراثياً . وهناك تصور أيضاً بأن الاعتبارات داخل المجتمع العالمى تتأثر بدرجة كبيرة بالاهتمامات الشخصية والولاء المهنى والاعتبارات للرأى العام . تذهب أبعد من مسألة معاناة الحيوان أو رفاهيته حيث أن هناك معايير عديدة تحدد قبول الرأى العام للتحوير الوراثى للحيوانات أولها : أن هناك الحاجة لمجتمع علمى ليفحص الوسائل المستخدمة ، ويمزجها بالشرعية

القصوى والحساسية مع المسئولية والمحاسبة التامة لتصميم العمل العلمى لإنجاز أهداف معنية .

المعيار الثانى هو الحاجة إلى إحترام الحيوان ، الظروف المعيشية له والتعامل معه وتداوله على ألا يطغي الهدف التجارى على هذه الاعتبارات .

وهناك مفهوم أخلاقى لا يتفق عليه كل من الرأى العام والعلماء وهو مدى الاقتناع بالصلة بين الحيوان والإنسان . فالرأى العام يكون أحياناً أكثر إقتناعاً بهذه الصلة التى يغفلها البحث العلمى كتبعاً للهدف من تسخير الحيوانات فى التجارب التى يرى العلماء أهميتها لحل مشاكل الإنسان .

وهناك معيار أخر لموافقة الرأى العام يرجع إلى التخوف من التأثيرات المعاكسة للتحورات التى تحدث للحيوانات على الأجيال الناتجة من هذه الحيوانات والبيئة .

أما المعيار الأخير لاهتمام الرأى العام فيتعلق بطريقة الحياة lifestyle والثقافة والتوجه الدينى (religious orientation) الذى يطالب البعض بوضع علامات labeling فى حالة المنتجات المهندسة وراثياً مثل الغذاء أو الأدوية وغير ذلك .

ويقترح الكثير من البرامج لتحقيق الشروط اللازمة لإرضاء الرأى العام من ناحية وعدم إعاقة التقدم العلمى من ناحية أخرى . ويحتاج الأمر إلى توعية واسعة وأسلوب ديمقراطى لمشاركة المجتمع فى التوصل إلى أفضل توظيف ممكن للإمكانيات العلمية والتكنولوجية التى تقدمها الهندسة الوراثية للحيوان .

الدليل الإرشادي لإنتاج وإستخدام الحيوانات المعدلة وراثياً

The giudline of producing and using transgenic animals

١ – يجب حصر التقنيات التى يمكن استخدامها لإنتاج الحيوانات المعدلة وراثياً والتى رغم إمكانية تنفيذها لا تكون مقبولة أخلاقياً تحت أى ظرف من الظروف.

٢ – يجب أن يكون هناك إطار أخلاقى يقيم كل الاقتراحات Propasal المتضمنة فى العمل على إنتاج الحيوانات المعدلة وراثياً والتى لا تستثنى من التطبيق بالنسبة للتصوية رقم (١) .

٣ – عندما تكون هنالك طرق بديلة متاحة لا تتضمن التحوير الوراثى لتحقيق الأهداف ، مثل إستخدام مزارع الخلايا ، فيجب أن تؤخذ فى الاعتبار كبديل لتقنية التحوير .

٤ – الموافقة القانونية لأى بحوث على التعديل الوراثى للحيوانات يجب أن تشير إلى صلتها بما سوف يتم من تقييم مستمر للتأثير على صحة ورفاهية الحيوان والمنافع التى تنشأ من النتائج المتاحة ومثل هذه المعلومات يجب أن تسجل فى

قاعدة بيانات database والتى من الممكن الاستعانة بها واستخدامها فى أبحاث أخرى تالية .

٥ – لتعظيم الاستفادة العلمية ورفاهية الحيوان يجب أن تبحث كل الدراسات المتدرجة على الحيوانات المعدلة وراثياً بواسطة فريق عمل يغطى المدى الكامل للتخصصات اللازمة كالبيولوچيا الجزيئية ، الوراثة ، علم الباثولوچى ، بيولوچيا الخلية والعناية بالحيوان والرفاهية .

٦ – ضرورة إنتظام الأفراد المشاركين فى هذه الدراسات فى دورات تدريبية ترفع كفاءتهم فى مختلف النواحى المطلوبة .

٧ – الموافقة على أى إفتراض بحثى يتضمن نماذج حيوانات معدلة وراثياً لدراسة الأمراض الوراثية فى الإنسان يجب أن يعتمد أساساً على الاشتراطات اللازمة لضمان ملائمة النموذج ، حتى تتفادى أن يكون التشابه سطحياً أو غير بعيد .

٨ – أثناء إنتاج نموذج جديد لدراسة مرض للإنسان . فإن الجهود يجب أن تتجه مباشرة نحو دراسة النموذج فى المرحلة المبكرة من المرض حتى تسنح بتحقيق الهدف من النموذج .

٩ – عندما تطلق الحيوانات المعدلة وراثياً من المعامل للبيئة يجب أن يصاحب ذلك معرفة كافية بالظروف الملائمة لتربيتها والتعامل معها .

١٠– عند التطبيقات الطبية لاستخدامات حيوانات المزرعة المعدلة وراثياً والتى تحتاج حمايتها حتى تظل خالية من مسببات الأمراض ، فإن هذه الحيوانات يجب أن تكفل الظروف الملائمة لذلك فى ضوء احتياجاتها السلوكية والمعيشية .

١١– بينما يمثل استخدام الحيوانات المعدلة وراثياً كمفاعلات حيوية ومصدر لنقل الأعضاء أهمية طبية نافعة للمجتمع ، فإن إحتمال إنتاج بروتينات غريبة يجب أن تؤخذ فى الاعتبار ويستلزم الفحص المستمر تأكيداً لرفاهية الحيوان والهدف من التقنية بالنسبة للإنسان فى آن واحد .

تاريخ الاستنساخ الحيواني والنقل الجيني

Timeline of A nimal cloning and Gene transfere

1980-81 أول تقرير لفأر معدل وراثياً .

1981 أول نقل لخلايا ES الناشئة من أجنة الفئران .

1982 الفئران المعدلة وراثياً ووضوح الشكل المظهرى لهرمون النمو .

1983 التعبير الجينى فى أنسجة خاصة فى الفئران .

1985 أول انتاج للحيوانات المزرعة المعدلة وراثياً .

1985 وصف فئران معدلة والتى بها جينات عدم التنشيط Knockout chimeric

1987 استخدام الفيروسات الإرتجاعية فى الدجاج .

1989 Targated DNA الاندماج لـ DNA المستهدف فى مواقع خاصة والكايميرا (الخليط) فى الخلايا

1989 استخدام الحقن المجهرى لانتاج الأبقار المعدلة وراثياً .

1989 أول نقل عن طريق الأسبرم فى حيوانات المزرعة .

1991 أول تقرير لاستخدام الحقن المجهرى فى الماعز .

1993 فتران بها كايميرا (خليطة) فى الخلايا الجنسية عن طريق Co-Culture .

1996 استخدام الخلايا الأمية الأساسية ES (خلايا الجذع) لنقل الأنوية (الاستنساخ) فى الأغنام .

1997 خلايا جسمية بالغة فى الأغنام استخدمت للاستنساخ بواسطة النقل النووى (Dolly) .

1998 نقل نووى باستخدام ES لانتاج أغنام معدلة وراثياً (Polly) .

2000 نقل نووى باستخدام الخلايا الجسمية لانتاج أبقار معدلة وراثياً .

2000 نقل نووى باستخدام الخلايا الجسمية لانتاج خنازير معدلة وراثياً .

2001 استنساخ قرود معدلة وراثياً .

2001 أول إعلان عن استنساخ لأجنة بشرية ولكن لم يستمر لمراحل إنقسامية متأخرة .

obeikandl.com

obeikandl.com

REFERENCES

Alestroem, P., 1995. Ethical aspects of modern biotechnology-transgenic fish. In: Kaiser, M., Welin, S. (Eds.) Ethical Aspects of Modern Biotechnology. Proceedings from a conference 10–11 November 1993.Centrum foer Forskningsetik, Goetteborg.

Anderson, G.B. (1999) Embryonic stem cells in agricultural species. In: Murray, J.D., Anderson, G.B., Oberbauer, A.M., McGloughlin, M.M. Eds. , Transgenic Animals in Agriculture. CABI Publ., New York,USA, pp. 57–66.

Appleby, M.C. (1988) genetic engineering , welfare and accountability. Journal of Applied Animal welfare Science 1, 255-275.

Arezzo, E. (1989) Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. *Cell Biology International Reports* 13, 391-404.

Asamoto M., Ochiya T., Toriyama-Baba H., Ota T., Sekiya T., Terada M and Tsuda H (2000) Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to N-methyl-N-nitrosourea mammary carcinogenesis. Carcinogenesis Feb;21(2):243-9.

Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A.,Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W. and Echelard, Y. (1999) Production of goats by ¨somatic cell nuclear transfer. Nat. Biotechnol. 17, 456–461.

Beardmore, J.A. (1997). Transgenics, autotransgenics, and allotransgenics. *Transgenics Research* **6**: 107-108.

Beauchamp, T.L. and Childress, J.F. (1994). *Principles of Biomedical Ethics,* 560 pp. New York: Oxford University Press.

Bedell, M.A., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (1997). Mouse models of human disease. II. Recent progress and future directions. *Genes and Development* **11**: 11-43.

Bleck, G.T., White, B.R., Miller, D.J., Wheeler, M.B. (1998). Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. J Anim Sci Dec; 76 (12) : 3072-8.

Brink, M.F., Bishop, M.D. and Pieper, F.R. (2000) Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. Theriogenology Jan 1;53(1):139-48.

Brom, F.W.A. and Schroten, E. (1993) Ethical questions around animal biotechnology: the Dutch approach. Livest. Prod. Sci. 361 , 99–107.

Broom, D.M. (1998) The effects of biotechnology on animal welfare. In: Holland, A., Johnson, A. (Eds.) Animal Biotechnology and Ethics. Chapman and Hall, London, pp. 69–82.

Brusa, R. (1999) Genetically modified mice in neuropharmacology. Pharmacol Res Jun;39(6):405-19.

Campbeli, K.H., McWhir J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature, 380: 64-66.

Capecchi, M.R. (1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. Trends Genet. 5,70–76.

Chan A.W.S. (1999) Transgenic animals: Current and alternative strategies. Cloning,1 :25-46.

Christiansen, S.B. and P. Sand´oe (2000) Bioethics: limits to the interference with life Animal Reproduction Science 60–61, 15–29.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.L., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. (1998a) Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem like cells. Nat. Biotechnol. 16, 642–646.

Co, D.O., Borowski, A.H., Leung, J.D., van der Kaa, J., Hengst, S., Platenburg, G.J., Pieper, F.R., Perez, C.F., Jirik, F.R. and Drayer, J.I. (2000) Generation of transgenic mice and germline transmission of a mammalian artificial chromosome introduced into embryos by pronuclear microinjection. Chromosome Res;8(3):183-91.

Obeikandl.com

Colman, A. (1999) Dolly, Polly and other 'ollys': likely impact of cloning technology on biomedical uses of livestock. Genet Anal Nov;15(3-5):167-73.

Cozzi, E. and White, D.J.G. (1995) The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. Nat. Med. 1, 964–966.

Damak, S., Jay, N.P., Barrell, G.K. and Bullock, D.W. (1996 b) Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep. Biotechnology (N Y);14(2):181-184.

Damak, S., Su, H.Y., Jay, N.P. and Bullock, D.W. (1996). Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *BioTechnology* **14**: 185-188.

Davisson, M.T. (1997) Rules and guidelines for genetic nomenclature in mice: excerpted version. Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Transgenic Res Sep;6(5):309-19.

De Cock Buning, T. and Theune, E.P. (1994). A comparison of three models for ethical evaluation of proposed animal experiments. *Animal Welfare* **3**: 107-128.

Deatly, A.M., Taffs, R.E., McAuliffe, J.M., Nawoschik, S.P., Coleman, J.W., McMullen, G., Weeks-Levy, C., Johnson, A.J. and Racaniello, V.R. (1998) Characterization of mouse lines transgenic with the human poliovirus receptor gene. Microb Pathog Jul;25(1):43-54.

Delhaise, F., Ectors, F.J., De Roover, R., Ectors, F. and Dessy, F. (1995) Nuclear transplantation using bovine primordial germ cells from male fetuses. Reprod Eertil Dev 7:1217-1219.

Ebert, K.M. (1998) The use of transgenic animals in biotechnology. Int J Dev Biol;42(7 Spec No):1003-8.

Gandolfi, E., Lavitrano, M., Gamaioni, A., Spadafora. C., Siracusa. G. and Lauria, A. (1989) The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* 4, 10.

Gandolfi, F. (1998) Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. Transgenic Res. 7, 147–155.

Gavora, J.S., Benkel, B., Spencer, J.L., Gagnon, C. and Crittenden, L.B. (1995) Influence of the *alv 6* recombinant avian leukosis virus transgene on production traits and infection with avian tumor viruses in chickens. *Poultry Science* **74**: 852-863.

Gerfen, R.W. and Wheeler, M.B. (1995) Isolation of embryonic cell-lines from porcine blastocysts. Anim Biotech;6(1):1-14.

Gordon, J.W. (1989) Transgenic animals. *International Reviews of Cytology* **115**: 171-229.

Gordon, J.W. (1996) Transgenic technology and its impact on laboratory animal science. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 23: 235-249.

Gordon, J.W. and Ruddle, F.H. (1981) Integration and stable germline transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214, 1244—1246.

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.I., Barbosa, J.A. and Ruddle, R.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77, 7380-7384.

Gorelick, N.J. (1995) Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing. Environmental and Molecular Mutagenesis 25: 218-230.

Gossen, J.A., Martus, H.J., Wei, J.Y. and Vijg. J. (1995) Spontaneous and X-ray induced deletion mutations in a *lac Z* plasmid-based transgenic mouse model. Mutation Research 331: 89-97.

Hahn, J. (1996) Biotechniques and ethics in livestock breeding. Can differences in opinion be attenuated? Landbauforschung Voelkenrode. Sonderheft 164, 57–61.

Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E. Jr Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature, 315: 680-683.

Haseman, J.K. and Lockhardt, A. (1994) The relationship between the use of the maximum tolerated dose and study sensitivity for detecting rodent carcinogenicity. Fundamental and Applied Toxicology 22: 382-391.

Haskell, R.E. and Bowen, R.A. (1995) Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. Mol. Reprod. Dev. 40, 386–390.

Hoban, T.J. and Kendall, P.A. (1993) Consumer attitudes about food biotechnology . North Carolina Cooperative Extention Services Report, Raleigh North Carolina.

Houdebine, L.M. (2000) Impact of transgenes and cloning on xenografts. Pathol Biol (Paris) May;48(4):383-6.

Houdebine, L.M. (1994) Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *Journal of Biotechnology* **34**: 269-287.

Hubrecht, R. (1995). Genetically modified animals, welfare, and UK legislation. *Animal Welfare* **4**: 163-170.

Hughes, B.O., Hughes, G.S., Waddington, D. and Appleby, M.C. (1996). Behavioural comparison of transgenic and control sheep: movement order behaviours on pasture and in covered pens. *Animal Science* **63**: 91-101.

Huguet, E. and Esponda, P. (2000) Generation of genetically modified mice by spermatozoa transfection in vivo: preliminary results.Mol Reprod Dev 2000 Jun; 56 (2 Suppl) : 243-7.

Huxley, C. (1998) Exploring gene function: use of yeast artificial chromosome transgenesis. Methods Feb;14(2):199-210.

Iannicola, C., Moreno, S., Oliverio, S., Nardacci, R., Ciofi-Luzzatto, A. and Piacentini, M. (2000) Early alterations in gene expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease. J Neurochem Aug;75(2):830-9.

Kato, M., Yamanouchi, K., Ikawa, M., Okabe, M., Naito K and Tojo, H., (1999) Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. Mol Reprod Dev Sep;54(1):43-8

Kilby, N.J., Snaith, M.R. and Murray, J.A.H. (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering.Trends Genet. 9, 413–421.

King, D. (1996) Animal biotechnology. New Farm. Grow. 49, 18–19.

Kroese, E.D., van Steeg, H., van Oostrom, C.T., Dortant, P.M., Wester, P., van Kranen, H J., de Aries, A. and van Kreijl, C. F. (1997). Use of E-*pim* transgenic mice for short-term *in vivo* carcinogenicity testing: Iymphoma induction by benzo [a] pyrene but not TPA. *Carcinogenesis* 19: 975-908.

Kuhholzer, B. and Prather, R.S. (2000) Advances in livestock nuclear transfer. Proc Soc Exp Biol Med Sep;224(4):240-5.

Kuhholzer, B., Tao, T, Machaty, Z., Hawley, R.J., Greenstein, J.L., Day, B.N., Prather, R.S. (2000) Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer.Mol Reprod Dev Jun;56(2):145-148.

Lavitrano, M., Camaioni, A. Palo, V.M., Doici, S., Parace, M.G. and Spadafora, C. (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *cell* 57, 717-723.

Leder, A., Kuo, A., Cardiff, R.D., Sinn, E. and Leder, P. (1990) v-H-*ras* transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**: 9178-9182.

Liss Tsai, H.J. (2000) Transfer of foreign gene to giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii) by spermatophore-microinjection. Mol Reprod Dev Jun;56(2):149-54.

Linney, E., Hardison, N.L., Lonze, B.E., Lyons, S. and DiNapoli, L. (1999) Transgene expression in zebrafish: A comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches. Dev Biol Sep 1;213(1):207-16.

Brink, M.F., Bishop, M.D. and Piepcr, P.R. (2000) Devloping efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmacuticals in milk. Theriogenology, 53:139-148.

Maclean, N. ed. (1995). *Animals With Novel Genes,* 282 pp. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

obeikandl.com

Massoud, M., Attal, J., Thépot, D., Pointu, H., Stinnakre, M.G., Théron, M.C., Lopez, C. and Houdebine, L.M. (1996). The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction, Nutrition, and Development* **36**: 555-563.

Mepham, B., (1995) Ethical aspects of animal biotechnology. J. Agric. Soc. Univ. Wales 75, 3–21.

Mepham, T.B. (1996). Ethical analysis of food biotechnologies: an evaluative framework. *Food Ethics* (ed. T.B. Mepham), pp. 101-119. London: Routledge.

Mepham, T.B., Moore, C.J. and Crilly, R.E. (1996) An ethical analysis of the use of xenografts in human transplant surgery. *Bulletin of Medical Ethics* **116**: 13-18.

Moore, C.J. and Mepham, T. B. (1995). Transgenesis and animal welfare. *ATLA* **23**: 380-397.

Muller, M. and Brem, G. (1994) Transgenic strategies to increase disease resistance in livestock. Reprod. Fertil. Dev. 6, 605–613.

Murakami, M., Fahrudin, M., Varisanga, M.D. and Suzuki, T. (1999) Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. J Vet Med Sci Jul;61(7):843-7.

Murry, J.D., Anderson, G.B., Oberbauer, A.M. and McGloughlin, M.M. (1999) Transgenic Animals In Agriculture. CABI Puplishing, Campridge Press University, UK, pp 290.

Niemann, H. (1998) Transgenic pigs for xenotransplants for humans. Zentralbl Chir;123(7):781-4.

Nottle, M.B., Nagashima, H., Verma, P.J., Du, Z.T., Grupen, C.G., McIlfatrick, S.M., Ashman, R.J., Harding, M.P., Giannakis, C., Wigley, P.L., Lyons, I.G., Harrison, D.T., Luxford, B.G., Campbell, R.G., Crawford, R.J. and Robins, A.J. (1999) Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In: Murray, J.D., Anderson, G.B., Oberbauer, A.M., McGloughlin, M.M. (Eds.) , Transgenic Animals in Agriculture. CABI Publ., New York USA, pp. 145–156.

Obeikandl.com

O'Riordan, T. and Jordan, A. (1995). The precautionary principle in contemporary environmental politics. *Environmental Values* **4**: 191-212.

Pain. B., Chenevier, P. and Samarut. J. (1999) Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies .Cells Tissues Organs;165(3-4):212-9.

Patil, J.G. and Khoo, H.W. (1996) Nuclear internalization of foreign DNA by zehrafish 'K spermatozoa and its enhancement by electroporation. *Journal of Experimental Zoology* 274, 121-129.

Perry, A.C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. (1999) Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science, 14;284(5417):1180-3.

Peterson, K.R. (1999) Use of yeast artificial chromosomes to express genes in transgenic mice. Methods Enzymol;306:186-203.

Piedrahita, J.A., Dunne, F., Lee, C.K., Moore, K., Rucker, E., Vazquez, J.C. (1999) Towards targeted modification of the domestic animal genome. Cloning, in press.

Piedrahita, J.A., Moore, K., Oetama, B., Lee, C.K., Scales, N., Ramsoondar, J., Dazer, F. and Ott, T. (1998) Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell (PGC)-derived colonies. Biol Reprod; 58, 1321-1329.

Piedrahita, l.A. (2000) Targeted modification of the domestic animal genome. Theriogenology, 53:105-116.

Pinkert, CA. (1997) The history and theory of transgenic animals. *Laboratory Animal* 26, 29-34.

Pinkert, C.A., Irwin, M.H. and Moffatt, R.j. (1997) Transgenic animal modeling. In:

Pintado, B. and Gutierrez-Adan, A. (1999) Transgenesis in large domestic species: future development for milk modification. Reprod Nutr Dev Sep-Dec; 39 (5-6):535-44.

Platt, J.L. and Lin, S.S. (1998) The future promises of xenotransplantation. In: Fishman, J., Sachs, D., Shaikh, R., (Eds.), Xenotransplantation - Scientific Frontiers and Public Policy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 862, 5–18.

Polejaeva, I and Campbell, K.H.S. (2000) New advances in somatic cell nuclear transfer: Application in transgenesis. Theriogenology, 53:1, 17-126.

Poole, T. (1997) Transgenic animals: an alternative? Opponent's statement. *Developments in Animal and Veterinary Sciences, Vol. 27, Animal Alternatives, Welfare and Ethics* (ed. L.F.M. van Zutphen and M. Balls), pp. 267-272. Amsterdam: Elsevier.

Powell, B.C., Walker, S.K., Bawden, C.S., Sivaprasad, A.V. and Rogers, G.E. (1994). Transgenic sheep and wool growth: possibilities and current status. *Reproduction, Fertility, and Development* **6**: 615-623.

Pursel, V.G., Pinkert, C.A., Miller, K.F., Bolt, D.J., Campbell, R.G., Palmiter, R.D., Brinster, R.D. and Hammer, R.E. (1989). Genetic engineering of livestock. *Science* **254**: 1281-1288.

Rauw, W.M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E.N. and Grommers, F.J. (1998) Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. Livest. Prod. Sci. 56, 15–33.

Rexroad, C.E. (1994) Transgenic farm animals. *ILAR News* 36:5-9.

Rollin, B.E. (1994) Ethical considerations for livestock breeding and biotechnology. J. Dairy Sci. 77 Suppl.1 , 247.

Rollin, B.E. (1996) Bad ethics, good ethics and the genetic engineering of animals in agriculture. J. Anim. Sci., 74 3 , 535–541.

Ronchi, E. (1996). *Advances in Transplantation Biotechnology: Animal to Human Organ Transplants, Xenotransplantation, OECD GD 96/167/28,* pp. Paris: OECD.

Rosengard, A.M., Cary, N.R.B., Langford, G.A., Tucker, A.W., Wallwork, J. and White, D.J.G. (1995). Tissue expression of human complement inhibitor decay-accelerating factor in transgenic pigs. *Transplantation* **59**: 1325-1333.

Sandoe, P., Forsman, B. and Hansen, A.K. (1996). Transgenic animals: the need for ethical dialogue. *Scandanavian Journal of Laboratory Animal Science* **23**: 279-285.

obeikandl.com

Sandøe, P., Giersing, M.H. and Jeppesen, L.L. (1996) Concluding remarks and perspectives. Acta Agric. Scand., Sect. A: Anim. Sci. Suppl. 27, 109–115.

Sandøe, P., Nielsen, B.L., Christensen, L.G. and Sørensen, P. (1999) Staying good while playing God — the ethics of breeding farm animals. Anim. Welf. 8, 313–328.

Sato, M., Yasuoka, Y., Kodama, H., Watanabe. T., Miyazaki, J.I., Kimura, M. (2000) New approach to cell lineage analysis in mammals using the Cre-loxP system. Mol Reprod Dev May;56(1):34-44.

Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. and Campbell, K.H.S. (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science 278, 2130–2133.

Shamay, A., Pursel, V.G., Wilkinson, F., Wall, R.J. and Hennighausen, L. (1992). Expression of the whey acidic protein in transgenic pigs impairs mammary development. *Transgenic Research* **1**: 124-132.

Smith, J.A. and Boyd, K.M. (1991). *Lives in the Balance: the Ethics of Using Animals in Biomedical Research*, 352 pp. Oxford: Oxford University Press.

Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T. and Myhr B.C. (1993). The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C *in vivo* using *lac Z* transgenic mice. *Mutation Research* **285**: 219-224.

Takada, T. and Tsujimoto, G. (1998) Application of genetically engineered animals in pharmacology: the use of green fluorescent protein for selective production of transgenic animals. Nippon Yakurigaku Zasshi Jun;111(6):357-62.

Taningher, M., Malacarne, D., Mancuso, T., Peluso, M., Pescarolo MP and Parodi S (1997) Methods for predicting carcinogenic hazards: new opportunities coming from recent developments in molecular oncology and SAR studies. Mutat Res Jun 13;391(1-2):3-32.

obeikandl.com

Tennant, R.W., French, J.E. and Spalding, J.W. (1995) Identifying chemical carcinogens and 42 assessing potential risks in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environmental Health Perspectives* **103**: 942-950.

Van Reenen, C.G. and Blockbuis, H.J. (1997) Evaluation of welfare of transgenic farm animals: lessons from a case study in cattle. *Journal of the Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry* **136**: 99-105.

Verhoog, H. (1992) The concept of intrinsic value and transgenic animals. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **5**: 147-160.

Verhoog, H. (1996) Genetic modification of animals: should science and ethics be integrated? *The Monist* **79**: 247-263.

Viville, S. (1997). Mouse genetic manipulation via homologous recombination. *Transgenic Animals: Generation and Use* (ed. L.M. Houdebine), pp. 307-322. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

Wall, R.J. (1996a) Transgenic livestock: progress and prospects for the future. Theriogenology 45, 57–68.

Wall, R.J. (1996b). Modification of milk composition in transgenic animals. *Biotechnology's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals* (ed. R.H. Miller, V.G. Pursell and H.D. Norman) pp. 165-188. Savoy, IL: The American Society of Animal Science.

Weiss, W.A., Godfrey, T., Francisco, C. and Bishop, J.M. (2000) Genome-wide screen for allelic imbalance in a mouse model for neuroblastoma. Cancer Res May 1;60(9):2483-7.

Whitehead, R.H. and Joseph, J.L. (1994) Derivation of conditionally immortalized cell lines containing Min mutation from the normal colonic mucosa and other tissue of an 'Immortomouse'/Min hybrid. *Epithelial Cell Biology* **3**: 119-125.

Wilmut, I., Schnieke, A.F., McWhir, J., Kind, Aj. and Campbell, K.H. (1997) Viahle offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

Wolf, E., Schernthaner, W., Muller, S. and Brem, G. (1999) Xenotransplantation. Possibilities of animal breeding. Zentralbl Chir; 124(7):585-90.

obeikandl.com

Wolf, E., Kahnt, E., Ehrlein, J., Hermanns, W., Brem, G. and Wanke, R. (1993) Effects of long term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mechanisms of Ageing and Development* 68: 71-87.

Woychick, R.P., Wassom, J.S. and Kingsbury, D. (1993) TBASE: a computerized database for transgenic animals and targeted mutations. *Nature* 363: 373-376.

Yamamoto, S. (1996) Rapid induction of more than 43 malignant tumours by various genotoxic carcinogens in transgenic mice harboring human prototype c-H-*ras* gene than in control non-transgenic mice. *Carcinogenesis* 17: 2455-2461.

Ziomek, C.A. (1998) Commercialization of proteins produced in the mammary gland. Theriogenology 49, 139–144.

رقم الإيداع : ٢٠٠٢/٢٠٦١

ISBN : 977-281-192-8

مطابع الدار الهندسية

تليفون/فاكس : ٥٤٠٢٥٩٨

openkandl.com