



Міністерство освіти і науки України

**ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет енергетики, робототехніки та
комп'ютерних технологій**

**Кафедра електромеханіки, робототехніки,
біомедичної інженерії та електротехніки**

МІКРОХІРУРГІЯ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН.

КЛОНУВАННЯ, ХИМЕРИЗАЦІЯ

**Методичні вказівки
до виконання практичної роботи**

**для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної та
(заочної) форми навчання, спеціальності
163 «Біомедична інженерія»**

**Харків
2023**

Міністерство освіти і науки України
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет енергетики, робототехніки та комп'ютерних технологій
Кафедра електромеханіки, робототехніки, біомедичної інженерії та
електротехніки

МІКРОХІРУРГІЯ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН.

КЛОНУВАННЯ, ХИМЕРИЗАЦІЯ

Методичні вказівки
до виконання практичної роботи

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної та
(заочної) форми навчання, спеціальності
163 «Біомедична інженерія»

Затверджено
рішенням науково-методичної
ради факультету ЕРКТ
Протокол № 3 від 22 лютого 2023 р.

Харків
2023

УДК 612.089:591.089:591.39

Схвалено
на засіданні кафедри електромеханіки, робототехніки, біомедичної інженерії
та електротехніки
протокол № 1
від 31 серпня 2022 р.

Рецензент:

О.М. Мороз, д-р тех. наук, проф. кафедри електропостачання та енергетичного менеджменту, Державний біотехнологічний університет.

Мікрохірургія ембріональних клітин. Клонування, химеризація : метод. вказівки до виконання практ. роботи для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної (заочної) форми навч., спец. 163 «Біомедична інженерія» / Державний біотехнологічний університет ; уклад.: В. О. Шигимага. – Харків : [б. в.], 2023.– 31 с.

Методичні вказівки включають практичну роботу та список літератури. Матеріал розкриває технічну сутність мікрохірургічних методів, застосовуваних в різних клітинних технологіях для отримання монозиготних близнюків, клонів, химер та ін., напрямки і перспективи їх застосування в тваринництві, біомедицині та ін.

Видання призначене здобувачам першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної форми навчання спеціальності 163 Біомедична інженерія.

Відповідальний за випуск: В.О. Шигимага, д. т. н., проф.

© Шигимага В.О., 2023

© ДБТУ, 2023

Практична робота № 2

Мікрохірургія ембріональних клітин.

Клонування, химеризація

1. Мета роботи: Ознайомити студентів з основними мікрохірургічними методами отримання поділених, клонованих та химерних ембріонів тварин; розглянути основні мікроінструменти, що використовуються для виконання мікрохірургічних операцій; розглянути деякі перспективи використання клонованих та химерних тварин, отриманих з прооперованих ембріонів.

2. Введення.

Останнім часом активно розвивається один з найважливіших напрямків біоінженерії – клітинна інженерія. Роботи в цьому напрямку забезпечуються методами і інструментами для мікроманіпуляцій як з цілими клітинами, так і з їх частинами, а також методами реконструкції клітин з цих частин.

Методи мікрохірургії широко використовуються для вирішення безлічі найважливіших біоінженерних завдань, наприклад, реконструкції ембріональних клітин, які формуються з ядра і цитоплазми різного походження (навіть від різних видів тварин).

Реконструкція ембріональних клітин по суті дає можливість вивчати таку важливу проблему біології розвитку, як механізми реалізації генетичної інформації. Цей напрямок покликаний вирішити такі завдання, як дослідження здатності до розвитку клітин різного рівня диференціювання, здатність геномів до репрограмування, дослідження підходів до отримання батьківських і материнських копій або клонування, отримання гібридних тварин і міжвидових химер шляхом штучного злиття геномів і створення реконструйованих зигот і ранніх ембріонів. Реконструкція ембріональних клітин дозволяє предметно поглянути на взаємодію ядра і цитоплазми, рецепторних структур мембрани і

геному. Реконструкція ембріональних клітин також відкриває можливість для вивчення ролі позаядерної спадковості в розвитку ембріону.

Існуючі методи заморожування-відтавання різних клітинних структур (гамети, гонади, ембріони) в 30-50% випадків призводять до пошкодження цитоплазматичної мембрани. Цитоплазматична мембрана може також порушуватися при перекисному окисленні мембранних ліпідів. Разом з тим неодноразово зазначалося, що хромосоми набагато стійкіші до процесів заморожування-відтавання. У зв'язку з цим дуже істотна проблема заміни пошкодженої клітинної оболонки на клітинну оболонку зиготи від іншого, але близького виду. У ряді випадків суттєва можливість пересадки окремих хромосом, наприклад при необхідності перевизначення статі. Подібні ж проблеми постають при вирішенні завдання про роль материнської цитоплазми для організмів, що розвиваються. Тут цікаві розробки методичних прийомів по заміні цитоплазми в цілому і її окремих елементів. Особливо цікаві зазначені завдання у зв'язку з реалізацією генетичної інформації кріоконсервованих геномів при міжвидових пересадках ядер. Також важливі завдання з отримання міжлінійних і міжвидових химер шляхом заміни одного ядра в одній з клітин на стадії двох бластомерів. Отримання подібних химер може сприяти подоланню несумісності реципієнта і донора при міжвидовій пересадці ембріонів.

Для вирішення різних завдань фізіології клітини важливо отримання химер на клітинному рівні, коли штучно створюються клітини з таким поєднанням властивостей, яке не зустрічається в природних умовах. Наприклад, поєднання великих розмірів клітини, що створює хороші умови для фізіологічного аналізу, з синтезом мембранних рецепторів, іонних каналів і т.д., наявність яких характерна лише для дрібних клітин, важкодоступних для фізіологічного аналізу. Крім того, ці можливості при використанні реконструйованих клітин, зокрема зигот тварин, дозволяють підійти до клонування цінних для сільського господарства особин.

Багато з зазначених вище проблем і завдань можуть бути вирішені практично за допомогою мікрохірургії клітин.

3. Визначення мікрохірургії. Загальні відомості.

Мікрохірургія (грец., μικρός – малий, χειρουργική – рука + робота) – напрямок в хірургії, що поєднує звичайні хірургічні прийоми і техніку операцій під мікроскопом з використанням спеціальних мініатюрних скляних інструментів і найтонших травматичних голок з впаяними в них нитками. Ці **мікроінструменти** мають певну форму робочих кінців і поверхонь для виконання різних видів мікрохірургічних операцій:

- проникнення в клітину, вилучення ядра (**енуклеація**);
- введення ядра в іншу клітину, попередньо позбавлену власного ядра (пересадка або **трансплантація** ядра при клонуванні);
- поділ ембріонів на частини (**монозиготні близнюкі**);
- об'єднання ембріонів тварин різних видів (**химеризація**);
- інші види мікрохірургічних операцій на клітині, необхідних для вилучення, розрізів, проколювання, об'єднання частин і т. п.

Перші мікрооперації проводилися вже в другій половині XIX століття на порівняно великих об'єктах, наприклад, ембріонах різних тварин, що розвиваються, без використання будь-яких спеціальних пристосувань і при невеликих збільшеннях лупи або препарувального мікроскопа. Мікрооперації на окремих клітинах дрібних розмірів стали проводити тільки на початку XX століття, коли був сконструйований прилад, званий мікроманіпулятором. З його допомогою можна проводити переміщення затиснутого в фіксаторі мікроінструменту в трьох взаємно-перпендикулярних площинах з точністю до 1 мкм.

Існують два основні різновиди маніпуляторів: механічний і моторизований, рис. 1.

Є й інші види, наприклад, пневматичний, п'єзоелектричний. Мікроманіпулятори дозволяють проводити дуже тонкі операції з клітиною і її органами.



Рис. 1. Мікроманіпулятори: механічний з затискачем і мікроінструментом (зліва); з електропроводом (моторизований, праворуч).

Для цих мікрооперацій потрібні великі збільшення мікроскопа і спеціальні мікроінструменти, які найчастіше виготовляються самим експериментатором на відповідному приладі (мікрокузні) з тонких скляних трубок, ниток або стрижнів, рис. 2.

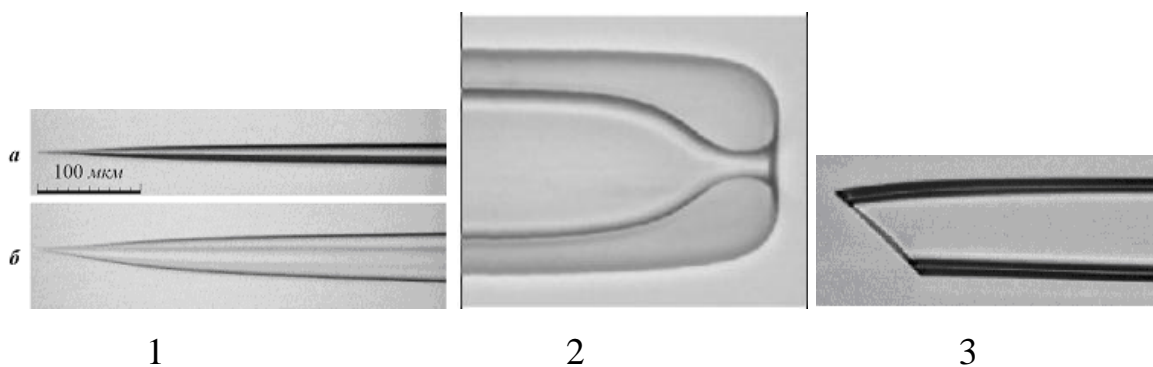


Рис. 2. Робочі кінці деяких видів мікроінструментів: 1 – мікроігла-ніж; 2 – утримуюча мікропіпетка (присоска); 3 – ін'єкційна мікропіпетка.

Мікроінструменти затискаються в спеціальних тримачах, закріплених на

маніпуляторах, які встановлюються з боків столика мікроскопа для виконання мікрооперацій, рис. 3.

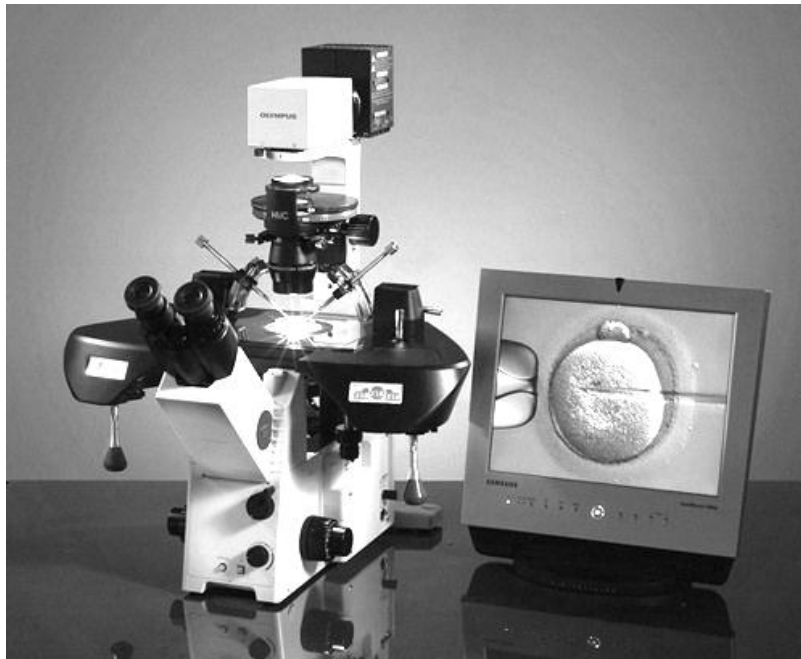


Рис. 3. Мікрохірургічний комплекс: мікроскоп з маніпуляторами і мікроінструментом; відеосистема для спостереження і запису мікрооперації. На моніторі - зліва утримуюча мікропіпетка, праворуч - проколююча мікропіпетка для вилучення (введення), наприклад, ядра клітини.

Методи мікрохірургії широко застосовуються і для виділення тканинних клітин або одиночних клітин при перенесенні їх в нове середовище для культивування або в організм тварини. Нарешті, до числа складних мікрохірургічних операцій, які почали застосовуватися порівняно недавно, відносяться витяг і пересадка ядер, ядерець та інших органодів клітини, рис. 3. Для цих операцій придатні головним чином великі клітини найпростіших і інших одноклітинних організмів, а також і великі клітини деяких багатоклітинних тварин, наприклад амфібій, ембріональні і статеві клітини ссавців.

Мікрохірургічні операції з пересадки ядер дають можливість вивчити

роль ядра і цитоплазми в житті клітин, вивчити зміни, що відбуваються в без'ядерних клітинах, з'ясувати участь ядра і цитоплазми в передачі у спадок тих чи інших ознак.

4. Мікрохірургія ембріональних клітин. Методи отримання клонованих і химерних ембріонів тварин.

Методи отримання клонованих ембріонів тварин.

Клон – це група генетично ідентичних клітин або організмів, які отримані в результаті поділу однієї клітини-попередника. **Клонування** тварин можливе за допомогою експериментальних мікроманіпуляцій з яйцеклітинами і ядрами соматичних або ембріональних клітин тварин, подібно до того, як в природі з'являються однойцеві близнюки. **Клонування** тварин є результатом **трансплантації** (пересадки) чужого ядра в яйцеклітину, у якої попередньо видалено власне ядро з подальшою пересадкою реконструйованої яйцеклітини в яйцепровід прийомної матері. Однак довгий час всі спроби застосувати цей метод для клонування ссавців були безуспішними.

Всі клітини організму тварин несуть однакову генетичну інформацію. У процесі морфогенезу соматичні клітини диференціюються, в результаті чого частина генома репресується (пригнічується). Чим вище рівень спеціалізації клітин, тим менше їх **тотіпотентність**, тобто здатність клітини шляхом ділення дати початок будь-якому клітинному типу організму. Ця закономірність була встановлена в експериментах з пересадки ядер. Генетичний механізм репресії генома диференційованих клітин поки не з'ясований, методи відновлення тотіпотентності в стадії розробки, тому в основному ведеться клонування шляхом трансплантації ядер ембріональних клітин.

Вперше трансплантацію ядер ембріональних клітин в енуклеовані яйцеклітини жаби здійснили американські дослідники Р. Бріггс і Т. Кінг в 1952 р. за допомогою мікрохірургічної операції із застосуванням мікропіпетки були видалені ядра з яйцеклітин шпорцевої жаби, а замість них пересаджені ядра

клітин ембріонів, що знаходяться на різних стадіях розвитку. Проведені дослідження показали, що ядра ранніх ембріонів в стадії пізньої бластули і навіть ранньої гаструли мають тотипотентність і забезпечують нормальний розвиток ембріонів.

Пересадки ядер у ссавців почалися пізніше, в 80-х роках. Це було пов'язано з технічними труднощами, так як зигота ссавців має невеликі розміри. Наприклад, діаметр зиготи миші приблизно 80 мкм, а діаметр яйцеклітини жаби близько 1200 мкм, тобто в 15 разів більше. Зигота корови в 2 рази більша, ніж зигота миші, діаметр її 160 мкм, але пронуклеуси приховані яєчним жовтком, тому перед мікроманіпуляціями необхідна спеціальна обробка зигот.

Незважаючи на деякі труднощі, перші повідомлення про отримання клонів мишей, ідентичних донору, з'явилися вже в 1981р. в якості донора були використані ембріональні клітини однієї з ліній мишей, взяті на стадії бластоцисти. Було показано, що ядра 8-клітинних зародків і клітин внутрішньої клітинної маси бластоцисти не забезпечують розвиток *in vitro* реконструйованих яйцеклітин навіть до стадії морули, яка передує стадії бластоцисти. Невелика частина (5%) ядер 4-клітинних зародків дає можливість розвиватися тільки до стадії морули. Ці та багато інших даних показують, що в ембріогенезі у мишей клітинні ядра рано втрачають тотипотентність, що пов'язано, очевидно, з дуже ранньою активацією генома зародка - вже на стадії 2-х клітин. У інших ссавців, зокрема, у кроликів, овець і великої рогатої худоби, активація першої групи генів в ембріогенезі відбувається пізніше, на 8-16-клітинній стадії. Можливо тому перші значні успіхи в клонуванні ембріонів були досягнуті на інших видах ссавців, а не на мишах. Проте, роботи з мишами, незважаючи на їх непросту долю, значно розширили уявлення про методологію клонування ссавців.

Вперше клонування сільськогосподарської тварини вдалося здійснити в 1997р. (Я. Вілмут і співр., Шотландія). Для цього були взяті клітини молочної залози вагітної вівці і трансплантовані в попередньо позбавлену ядра яйцеклітину, далі реконструйована клітина була прокультивована до стадії

раннього ембріона і пересаджена прийомної матері. Таким чином, була отримана генетично точна копія вівці-донора, тобто реалізовано соматичне клонування, рис. 4.

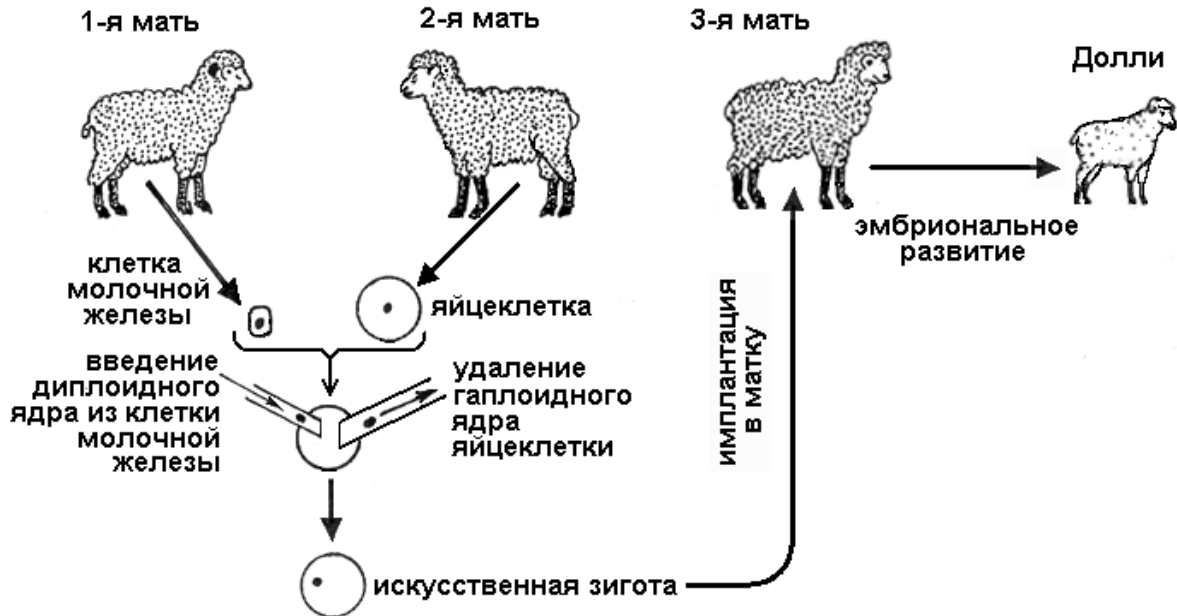


Рис. 4. Схема соматичного клонування вівці Доллі.

Клонована вівця на прізвисько Доллі нормально розвивалася і народила на світ спочатку одного, а потім ще трьох нормальних ягнят.

Слідом за цим з'явився ряд нових повідомлень про клонування корів, мишей, кіз, свиней з соматичних клітин цих тварин. У приматів та інших тварин також вдалося отримати клони. До теперішнього часу вже клоновано більше 25 видів ссавців, включаючи домашніх, диких і сільськогосподарських тварин.

Однак, незважаючи на ці успіхи, розроблені методи клонування тварин поки ще не досконалі. У процесі експериментів спостерігається висока смертність плодів і новонароджених. Так, наприклад, при клонуванні вівці Доллі лише 1 ембріон з 277 реконструйованих розвинувся до повноцінної тварини. Ще багато не ясного в теоретичному питанні клонування тварин з окремої соматичної клітини.

Тим не менш, успіх, досягнутий в клонуванні вівці, мавп, домашніх і

сільськогосподарських тварин показав практичну можливість створення генетичних копій у досить великій кількості.

Таким чином, в основі всіх відомих методів клонування лежить мікрохірургічна техніка трансплантації ядер або ембріональних, або соматичних клітин. Тому доцільно розглядати клонування саме як процес трансплантації ядер, що реалізується за допомогою різних методів.

Методи трансплантації ядер

Метод атравматичного переносу ядер за допомогою мікрomanipуляцій (Б.В. Конюхов, Е.С. Платонов, 1985 г.).

Він реалізується в два етапи: спочатку тонкою мікропіпеткою (2-5 мкм) проколюють зону пеллюциду і плазматичну мембрану, витягують пронуклеуси, а потім іншою мікропіпеткою, більшого діаметру (12 мкм) в той же отвір вводять диплоїдне ядро донора. У цьому випадку менше травмується цитоплазма зиготи і трансплантоване ядро донора.

Метод трансплантації ядер з використанням цитохалазинів (речовини, що синтезуються грибами).

Цитохалазин Б оборотно руйнує структуру мікрофіламентів (цитоскелет клітини) під мембраною і сприяє вилученню ядра. Ядро залишається сполученим з клітиною тонкою стеблинкою цитоплазми. При центрифугуванні цей місток розривається, утворюються без'ядерні клітини (цитопласти) і каріопласти, що представляють собою ядра, оточені тонким шаром цитоплазми і цитоплазматичною мембраною. Цитопласти містять всі види органел, властиві нормальній клітині, зберігають здатність прикріплюватися до субстрату, утворювати складчасту мембрану, пересуватися, здійснювати піноцитоз. Каріопласти оточені тонким шаром цитоплазми (близько 10% від усієї клітинної цитоплазми), містять компактний ендоплазматичний ретикулум, кілька мітохондрій і рибосом. У деяких клітинних ліній 1/10 каріопластів здатна відновити весь втрачений обсяг цитоплазми і відновитися в життєздатні клітини.

Метод генетичного перепрограмування клітин шкіри.

Розроблено новий метод клонування, що менш трудомісткий, ніж метод, завдяки якому була отримана вівця Доллі. Для клонування мишей вводилися клітини шкіри, взяті у дорослої особини, в ембріон на ранній стадії розвитку, отриманий шляхом штучного запліднення. Деякі з мишей виявилися частковими клонами особин-донорів, а деякі, як і Доллі, стовідсотковими.

Метод передбачає генетичне перепрограмування клітин шкіри, в результаті якого вони повертаються в квазі-ембріональний стан. Завдяки цьому методу з використанням клітин шкіри дорослих мишей було виявлено, що така технологія набагато ефективніша, ніж метод отримання Доллі, а побічних ефектів у неї менше – отже, вона краще підходить для цілей клонування.

Однак той же метод вже використовується в інших цілях – для відтворення потомства лабораторних мишей, яке є або стовідсотковими клонами, або генетичними химерами дорослих мишей, клітини шкіри яких піддалися перепрограмуванню.

Експерименти на мишах показали, що в принципі тепер можливо взяти клітину шкіри людини, перепрограмувати її для повернення в ембріональний стан, а потім ввести її в ембріон людини на ранній стадії. В результаті вийде дитина, що володіє деякими загальними генами не тільки з батьками ембріона, але і з людиною, у якої були взяті клітини шкіри. Така дитина буде химерою – генетичною поміссю двох або більшого числа особин, так як деякі з її клітин походять від ембріона, а інші від клітини шкіри. Фактично у такої дитини буде три біологічних батька. До речі, відомі химери людини, що виникають в природних умовах – коли в матці з'єднуються два ембріона.

Ці експерименти показали, що можливо створювати повні клони-дитинчат, які на 100% ідентичні дорослій особині в генетичному плані. Цього вдалося досягти, використовуючи різновид дефективних ембріонів мишей з чотирма наборами хромосом замість нормального числа – двох. Цей тетраплоїдний ембріон, розвиваючись, перетворювався виключно в плаценту плода; коли ж в нього ввели перепрограмовану клітину шкіри, інша частина

плода розвинулася з цієї єдиної клітини і стала стовідсотковим клоном дорослої особини, шкіра якої використовувалася.

Методи отримання химерних ембріонів тварин.

Химера (др.-грец. *Χίμαιρα*) – організм, що складається з генетично різнорідних клітин. У тварин химерами називають організми, клітини яких походять від двох і більше зигот. Тварини-химери несуть в одному організмі різні генотипи. У тваринництві відомі штучні химери, як внутрішньовидові, так і міжвидові.

Існують два методи химеризації : агрегаційний та ін'єкційний.

Агрегаційний метод химеризації – був запропонований практично одночасно і незалежно один від одного Тарковським (Польща) і Мінц (США) (1961-1962 рр.).

З матки вагітних самок-докторів вилучають зародки, які досягли стадії 8 бластомерів. Бластомери, отримані від двох тварин з різними генотипами (наприклад, від мишей з білим і чорним забарвленням вовни) поміщають в умови, що сприяють їх агрегації і утворення 16-ти клітинного зародка. Такі складові зародки розвиваються *in vitro* до стадії бластоцисти, після чого їх вводять в матку прийомної матері, у якої попередньо викликають несправжню вагітність шляхом введення відповідних гормонів. В результаті виходять химерні мишенята. Коли у мишеняти з'являється шерсть, забарвлення у неї виявляється не білим або чорним, як у батьків, а змішаним, з чергуванням чорних і білих плям або смуг. Це доводить, що тканини тварин-химер мозаїчні, тобто складаються з "білих" і "чорних" клітин.

При проведенні подібних експериментів отримують так званих химерних або алофенних мишей - тварин, в тканинах яких містяться клітини різних генотипів, рис. 5.

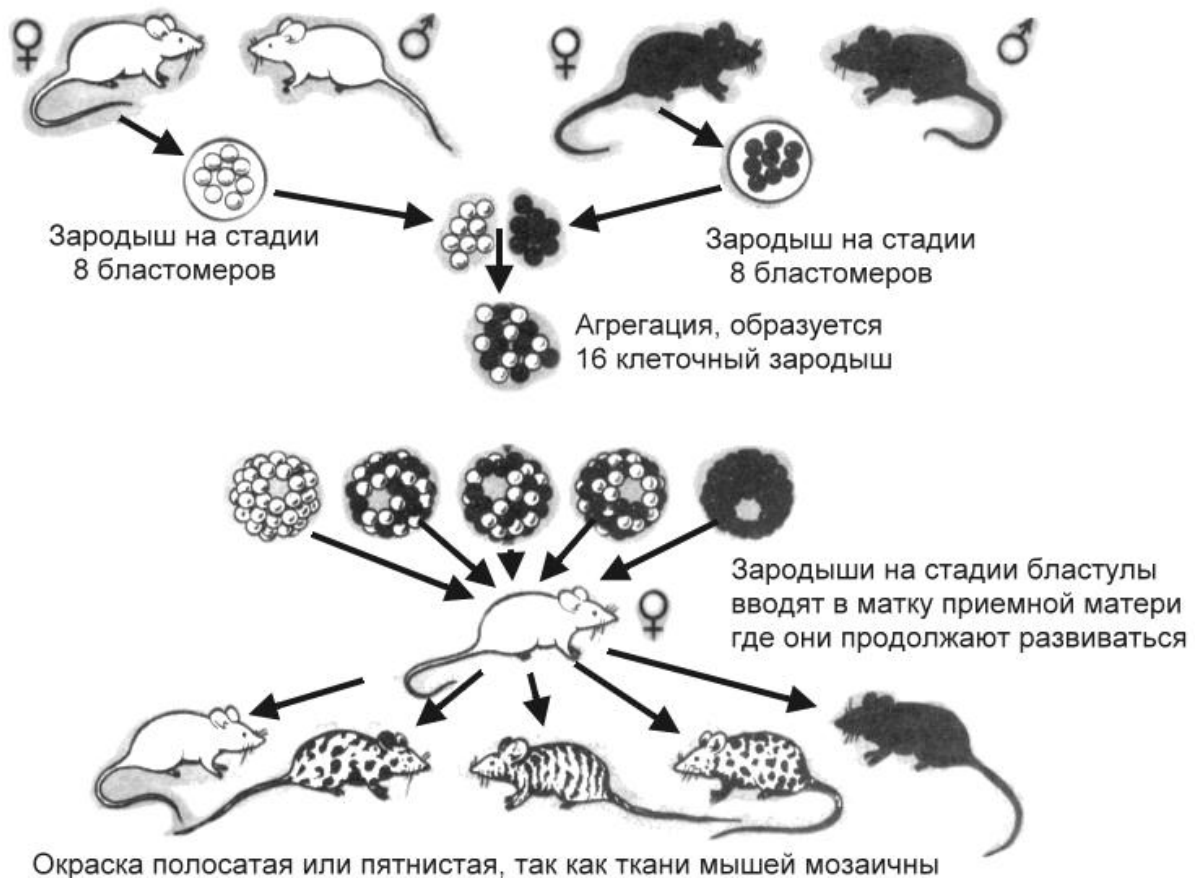


Рис. 5. Отримання химерних мишей шляхом агрегації ембріонів.

Таким чином, процес отримання химерних мишей шляхом агрегації включає два етапи: химеризация ембріонів поза організмом (*in vitro*) і розвиток сконструйованого химерного ембріона в організмі прийомної матері (*in vivo*), рис. 6.

Внутрішні тканини таких тварин, природно, також мозаїчні, хоча це проявляється не так очевидно, як у випадку забарвлення шерсті. Відмінності можуть стосуватися білків, що виконують ферментативну функцію: вони можуть каталізувати одні і ті ж реакції у мишей-батьків, але при цьому бути не ідентичними, хоча і подібними. Такі білки називаються ізоферментами, і їх можна розділити за допомогою електрофорезу.

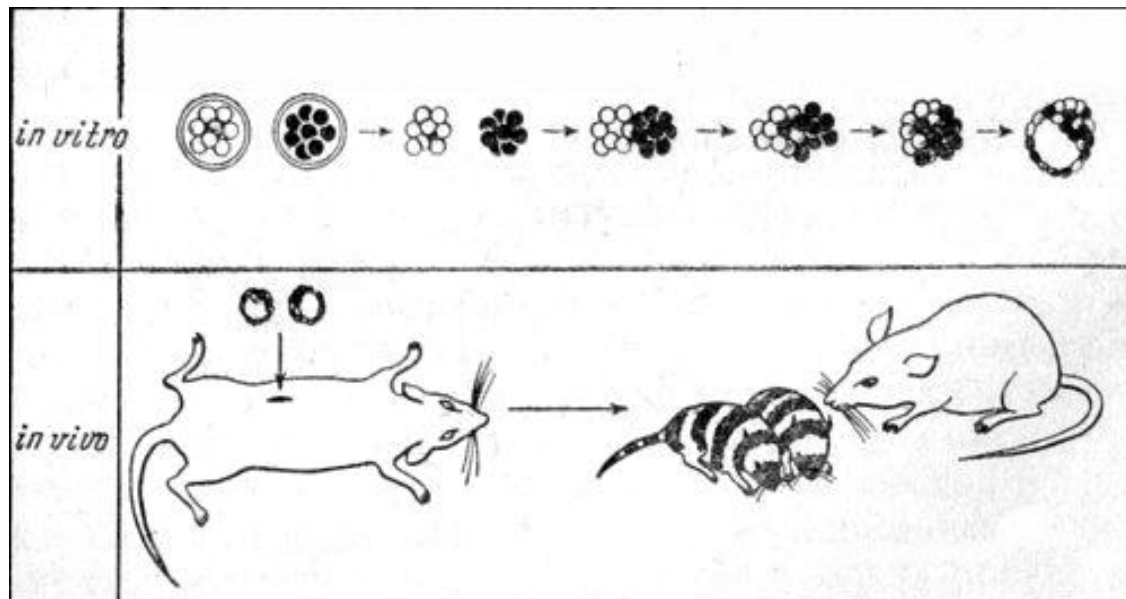


Рис. 6. Два етапи отримання химерних мишей: *in vitro* та *in vivo*.

Міжвидові химерні ембріони між мишею і щуром шляхом агрегації були отримані тільки в 70-х роках. Перші химерні тварини були отримані тільки в 1973 р. Р. Гарднером і М. Джонсоном.

Агрегаційні химери можна отримувати не тільки з двома ембріонами, але і з різним числом ізольованих бластомерів або окремими частинами ембріонів. Маса химерних ембріонів не більше звичайної і схильна до дії механізмів ембріональної регуляції. Перевага методу - не вимагає великої кількості мікрохірургічних операцій, тому широко використовується в ембріогенетиці.

Химеризація успішно застосовується в тваринництві. Отримано агрегаційні химерні тварини після з'єднання половинок 5-6 денних ембріонів від корів-донорів швицької та голштинської порід великої рогатої худоби. Вони поєднували в своєму фенотипі характерну масть двох вихідних порід – буру і чорно-строкату. Також отримані химери вівці порід рамбульє і фінський ландрас. Прикладом міжвидових химер в тваринництві служать вівці-кози, що поєднують ознаки вівці і кози, які були отримані в 1994р.

Ін'єкційний метод химеризації – був розроблений Р. Гарднером в 1968р.

Використовуються ембріони на стадії бластоцисти. Бластоцисту фіксують

і, використовуючи мікроманіпулятори, вводять мікропіпеткою шляхом ін'єкції клітини внутрішньоклітинної маси бластоцисти донорів в бластоцель ембріона-рецепієнта. Цим методом можна ін'єктувати не тільки внутрішньоклітинну масу ранніх ембріонів, але і більш диференційовані клітини.

Ін'єкційний метод знайшов застосування при отриманні міжвидових химер. Перші міжвидові химери були отримані між двома найближчими видами мишей, які зазвичай не схрещуються: *M. musculus* і *M. caroli*. Причому було відзначено, що химерні ембріони, отримані ін'єкційним методом, нормально розвивалися тільки при пересадці їх в матку того виду, чия бластоциста була використана в якості рецепієнта. Наприклад, в бластоцисту *M. musculus* вводили внутрішньоклітинну масу ембріона *M. caroli*. Отримані химери імплантувалися в матку *M. musculus* і благополучно розвивалися там, а в організмі *M. caroli* гинули через два тижні.

Успіх цих експериментів дозволив приступити в 80-х роках до створення химерних сільськогосподарських тварин. З'ясувалося, що агрегаційний метод не дуже прийнятний для отримання химер великої рогатої худоби. Химер телят *Bos indicus* + *Bos taurus* вдалося отримати тільки ін'єкційним методом. У 1984р. були отримані міжвидові химери між вівцею і козою – вівце-кози, причому практично одночасно в Англії і ФРН. Використовувалися обидва методи. Статевим шляхом вівці і кози не схрещуються, так як мають різний набір хромосом: коза $2n = 60$, вівця $2n = 54$. У ФРН у 1985р. були отримані химерні телята після агрегації половинок 32-клітинних ембріонів від корів швицької (бурої) і голштино-фризької порід. У фенотипі химер поєднувалися обидві масті-бура і чорно-строката.

При вивченні міжвидових химерних клітин, здатних до проліферації були зроблені два важливих спостереження:

1. У гібридах можуть проявитися обидва генома;
2. У довгоживучих міжвидових гібридах елімінуються (випадають) хромосоми одного виду.

Химерні тварини не передають нащадкам генетичну мозаїчність. У них

відбувається розщеплення, як у гетерозигот, тому цінні генетичні комбінації порушуються. Але протягом 1-го покоління господарсько- цінні ознаки підтримуються, тому можна, наприклад, поєднувати як молочну, так і м'ясну продуктивність.

Таким чином, клонування і химеризація ембріонів є досить трудомісткими, але перспективними методами отримання тварин з цінними господарсько-корисними ознаками.

5. Мікрохірургічні методи отримання монозиготних близнюків

Виникнення в природних умовах монозиготних близнюків явище рідкісне і не перевищує 0,01%. Оскільки причини спонтанного поділу ембріонів до теперішнього часу не з'ясовані, для підвищення багатоплідності у одноплідних сільськогосподарських тварин визначився новий напрямок в біотехнології – штучне отримання ідентичних близнюків за допомогою мікрохірургічних методів, що також є різновидом ембріонального клонування.

На сьогоднішній день проведення мікрохірургічних маніпуляцій з ранніми ембріонами ссавців є одним з найбільш перспективних біотехнологічних методів. Його застосування дозволяє збільшити кількість ембріоматеріалу для трансплантації і, відповідно, можливе число генетичних нащадків від найбільш цінних племінних тварин.

В основу розробки методу поділу ранніх ембріонів ссавців на дві частини і більше шляхом мікрохірургії лягло явище тотіпотентності окремих бластомерів, тобто їх здатність розвиватися в повноцінний організм в процесі всього онтогенезу.

Тотіпотентність ізольованих бластомерів ссавців була вперше доведена в роботах з мікроманіпуляції ембріонів мишей. У 1978р. в експерименті з пересадки 80 напів-ембріонів, отриманих в результаті поділу ембріонів мишей на 8-16-клітинної стадії розвитку, було отримано 30 мишенят, з яких ідентичні близнюки склали 40%. У цьому експерименті зони пеллюциду видалялися шляхом розрізання мікроножем або за допомогою ферменту пронази.

Звільнений зародковий комплекс поділяли мікроголкою в мікроманіпуляторі, а отримані половинки вносили мікропіпеткою в заздалегідь приготовані (також за допомогою мікрохірургії) вільні зони пеллюциду.

У наступних дослідженнях подібна методика використовувалась при поділі ембріонів інших видів ссавців. У 1981р. Вілладсеном були отримані перші монозиготні близнюки у великої рогатої худоби. Рівень приживлюваності склав 75%: з 28 напів-ембріонів, пересаджених реципієнтам-коровам, народилося 21 теля. Але методика залишалася занадто складною. Зародкові комплекси 5-6-денних морул поділяли після вилучення із зони пеллюциду, а отримані половинки вводили в порожні зони ооцитів і в агарових циліндрах культивували в яйцеводах овець. Надалі вдалося відмовитися від культивування напів-ембріонів в яйцеводах тварин - проміжних реципієнтів і проводити мікроманіпуляції на 6-8-добових ембріонах. Але при цьому метод залишався досить складним для широкого використання на практиці.

У цьому методі необхідне застосування спеціального мікроманіпулятора, що забезпечує незалежний контроль 5 мікроінструментів: мікроприсоски для утримання ембріона, двох інструментів для розтину зони пеллюциду і двох для перенесення отриманих половинок у вільні зони від ооцитів.

У дослідженнях вчених Німеччини була показана можливість трансплантації половинок ембріонів без розміщення у вільні зони пеллюциду. Для поділу досить одного мікроножа, за допомогою якого ембріон поділяють навпіл, і після культивування компактні половинки пересаджують реципієнтам. Повідомлено про 75% стельності, отриманої після пересадки реципієнтам по 2 половинки.

В даний час мікрохірургія ранніх ембріонів вступила в фазу використання в практичних програмах по відтворенню і селекції великої рогатої худоби.

В умовах, наближених до виробництва для поділу ембріонів на дві частини (**дисекція**) використовують два способи.

Першим способом дисекцію здійснюють за допомогою єдиного інструменту – мікроножа, закріпленого в тримачі мікроманіпулятора. Ніж

контрольовано переміщується в горизонтальній і вертикальній площинах, рис. 7, 8.



Рис. 7. Поділ ембріонів мікроножем з використанням мікроманіпулятора.

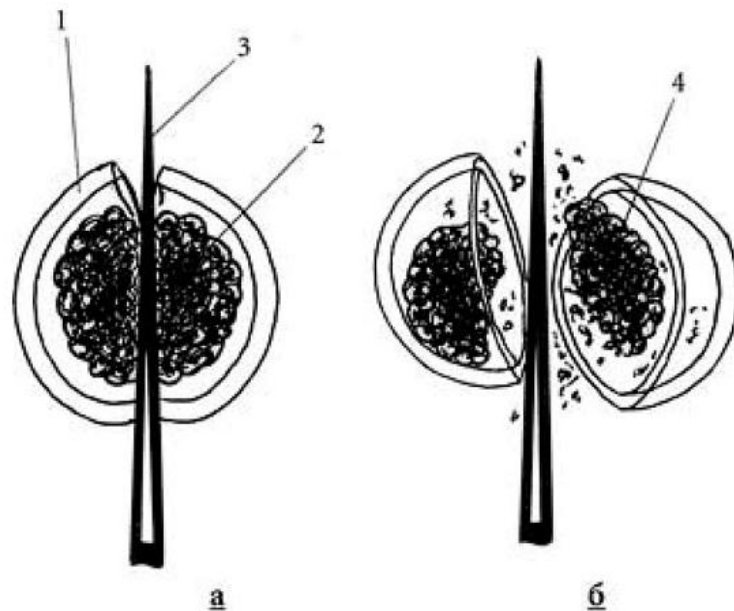


Рис. 8. Дисекція ембріонів з використанням мікроножа:

а – початок поділу; б-завершення. 1 – зона пеллюцида, 2 – зародковий комплекс, 3 – мікроніж, 4 – напів-ембріон.

Процес поділу здійснюють наступним чином. Ембріони поміщають в чашку Петрі і кромкою леза поділяють у вертикальній площині через зону пеллюциду строго навпіл, рис. 8. Отримані напів-ембріони без розміщення у вільні зони пеллюциду короткочасно культивують, а потім пересаджують телицям-реципієнтам.

Для реалізації другого способу було сконструйовано спеціальний пристрій, рис. 9.

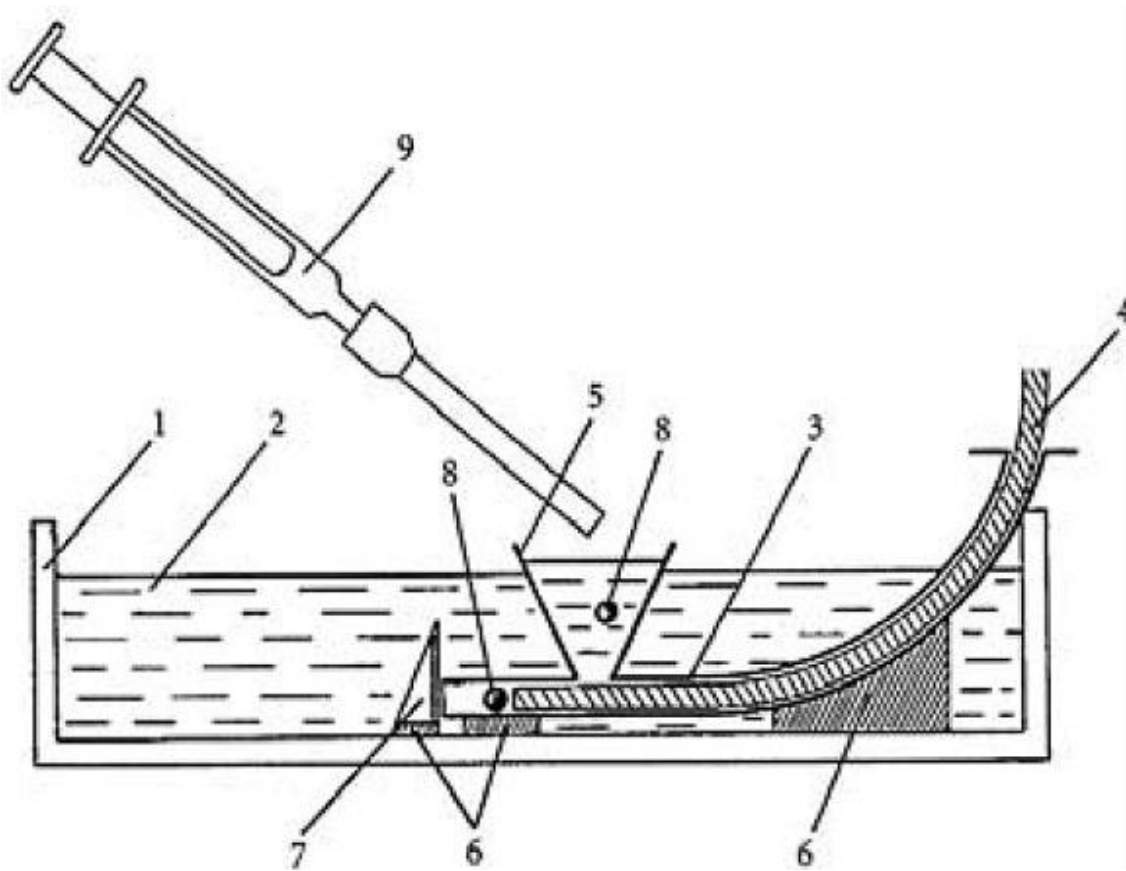


Рис. 9. Пристрій для мікросірургічної дисекції ембріонів:

1-чашка Петрі, 2 – середовище для культивування, 3 – прозорий капіляр, 4 – пружний штовхач, 5 - напрямна воронка, 6 – кріплення, 7 – мікроніж, 8 – ембріон, 9-шприц з живильним середовищем і ембріоном.

Пристрій монтується в чашці Петрі і являє собою вигнутий скляний капіляр з розширеним до 3 мм вхідним і звуженим до 150-170 мкм вихідним

отворами. Впритул до вихідного отвору строго по центру у вертикальному положенні закріплюється мікроніж (сегмент леза безпечної бритви). Капіляр і мікроніж жорстко кріпляться на дні чашки Петрі, куди наливається середовище для культивування.

Ембріон для поділу переноситься у вхідний отвір капіляра, вільно опускається в його звужену частину, а потім за допомогою тонкої скляної нитки, що виконує роль поршня, проштовхується до вихідного отвору і простим натисканням безпосередньо через зону пеллюціда розсікається навпіл, утворюючи однакові половинки, рис. 10.

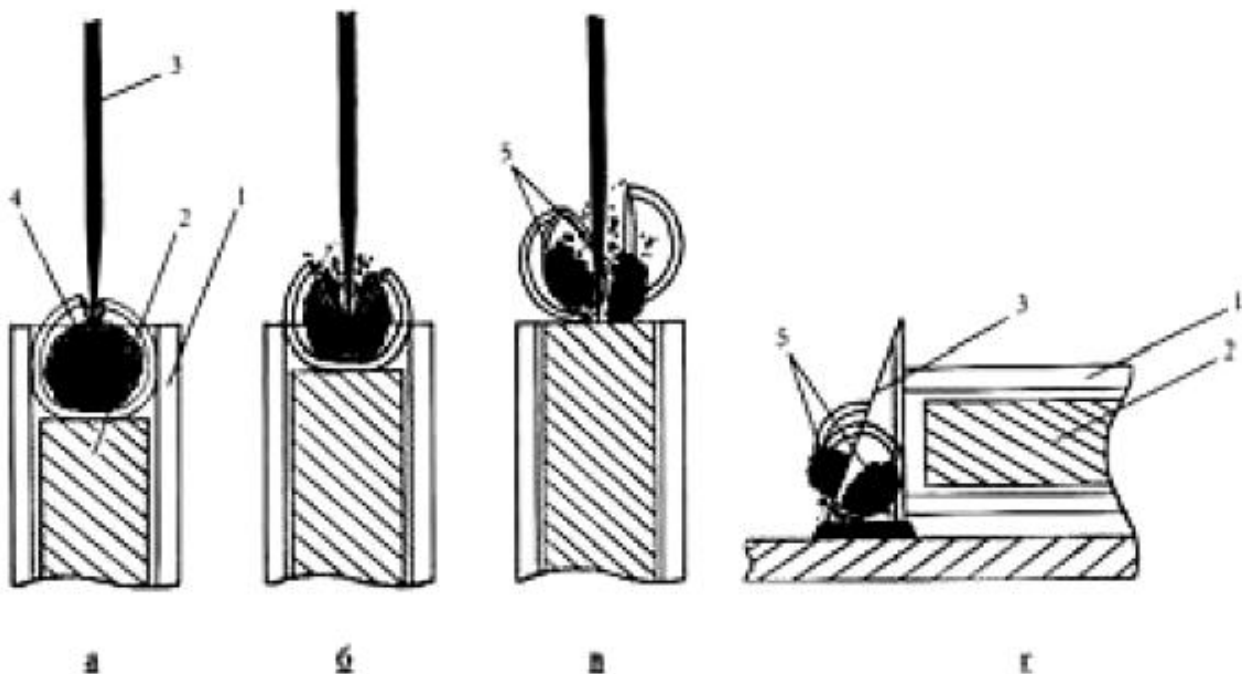


Рис. 10. Дисекція ембріона з використанням пристрою: а, б, в – вид зверху: етапи поділу; г – вид збоку: 1 – капіляр, 2 – поршень, 3 – мікронож, 4 – клітинна маса, 5-напів-ембріони.

Отримані половинки можуть бути негайно відібрані для короткочасного культивування і пересадки. На процедуру дисекції витрачається не більше трьох хвилин.

Ефективність дисекції ембріонів при використанні першого способу

склала 86,1%: з 122 максимально можливих було отримано 105 придатних для трансплантації напів-ембріонів. За допомогою розробленого пристрою розділено 22 ембріони, отримано 43 половинки (97,7%), після культивування яких 42 були придатними для трансплантації. Ефективність поділу ембріонів за другим способом склала 95,4% (з 44 можливих отримано 42 придатних напів-ембріона), що було вище в порівнянні з першим способом на 9,3% при статистично достовірній різниці ($p < 0,05$). Отримані напів-ембріони по одному або по два пересаджені телицям-реципієнтам.

При пересадці реципієнтам по одному напів-ембріону приживлюваність практично не змінювалася в порівнянні з пересадкою одного інтактного ембріона – 52,2% проти 54,4%. Аналогічний результат був отриманий після пересадки двох напів-ембріонів: за першим способом з 41 реципієнта стельність була у 27 голів (65,8%), а за другим способом у 13 з 21 (61,9%), що також не поступалося пересадці двох інтактних ембріонів (61,5%) – різниця достовірна при $P < 0,05$. Ймовірно, процедура поділу ембріонів на ранніх стадіях розвитку і екстремальні умови *in vitro* певною мірою підвищують резистентність і потенції подальшого розвитку напів-ембріонів.

Отримані результати свідчать, що мікрохірургічна дисекція ранніх ембріонів не робить згубного впливу на розвиток напів-ембріонів, а деякі відхилення від максимально можливого результату в дослідженнях ряду авторів пов'язані скоріше з похибками у виконанні операції.

В результаті експериментів з поділу ранніх свіжо-отриманих ембріонів було отримано 50 телят, у тому числі 8 пар монозиготних близнюків, рис. 11.



Рис. 11. Монозиготні бички голштинської породи, отримані в результаті дисекції бластоцисти.

Таким чином, поділ ембріонів великої рогатої худоби у віці до 7-8 днів на рівні частини (2-4) з подальшою трансплантацією їх реципієнту поряд з пересадкою ядра соматичної або ембріональної клітини в яйцеклітину, з якої видалено власне ядро, є методами отримання клонованих тварин.

Питання для самоконтролю:

1. Як можна довести тотипотентність ізольованих клітин?
2. Які існують способи поділу ембріонів?
3. Що таке мікрохірургія?
4. Що являє собою ранній ембріон?
5. Що таке енуклеація?
6. Як виконується клонування ембріонів?
7. Які існують методи клонування?
8. Що таке химеризація ембріонів?

9. Які існують методи химеризації?
10. Що таке тотипотентність клітини?
11. Як виконується трансплантація ядер в ембріони?
12. Чим відрізняється клонування від химеризації?

Завдання для самоконтролю:

1. Дати визначення поняттям "клон", "клонування", "тотипотентність".
2. Назвати етапи клонування ембріонів.
3. Описати процес отримання клонованих тварин.
4. Перспективи використання клонованих тварин.
5. Дати визначення поняттям "химера", "химеризація".
6. Етапи отримання химерних ембріонів.
7. Дисекція ембріонів. Застосування в тваринництві.
8. Описати процес отримання химерних тварин.
9. Перспективи використання химерних тварин.
10. Назвати основні види мікроінструментів і мікрооперацій.
11. Дати визначення поняттям "мікрохірургія", "мікроінструмент".
12. Методи отримання внутрішньовидових і міжвидових тварин-химер.

Для контролю засвоєного матеріалу пропонується виконати 2 завдання:

Завдання 1. На основі рисунка 1 записати етапи і дати пояснення процесу отримання клонованих тварин (на прикладі вівці Доллі):

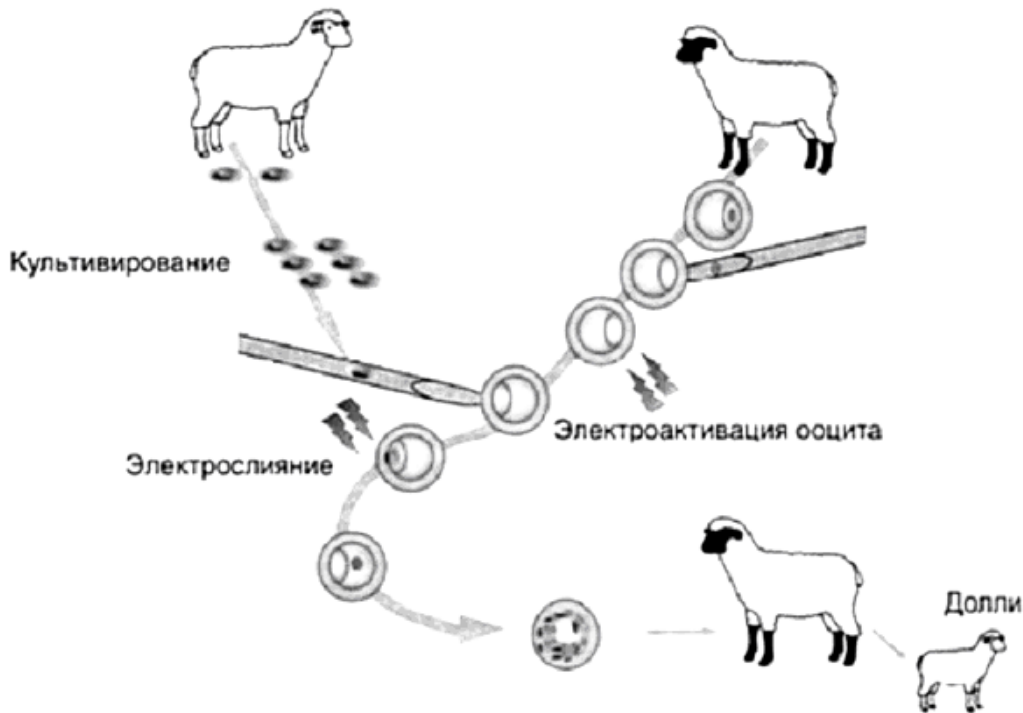


Рис. 1. Схема отримання клонованої вівці Доллі.

Завдання 2. На основі рисунка 2 записати етапи і дати пояснення процесу отримання агрегаційних химер (на прикладі мишей):

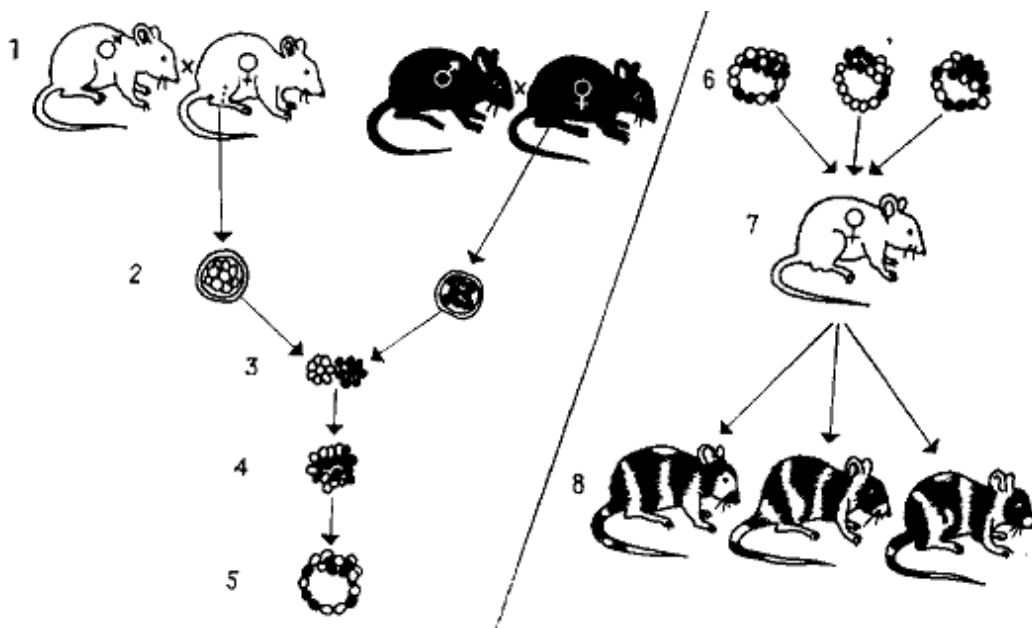


Рис. 2. Схема отримання химерних мишей.

Рекомендована література

1. Никитин В.А. Микрохирургия, микроинъекция, клонирование. Инструментальные методы клеточной инженерии : уч. пособ. ; РАН, Институт биофизики клетки. – М.: Перо, 2018. - 439 с.
2. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 255 с.
3. Герасименко, В.Г. Биотехнология. – Киев: Вища школа, 1989. – 324 с.
4. Клецко Н.Г., Мадич А.В. Основы микроманипуляции с эмбрионами животных. // Бюл. науч. работ ВИЖа, 1988. – вып. 89. – С. 44-48.
5. А.с. 1727819 СССР, МКИ5 А 61 D 19/02. Устройство для разделения эмбрионов животных / Бабенков В.Ю., Бабенкова Л.В. – № 4807032/15 (19975); Заявл. 15.02.90; Опубл. 23.04.92, Бюл. № 15 // Открытия. Изобретения. – 1992. – №15.
6. Бабенков В.Ю., Кыса И.С. Микрохирургическое разделение криоконсервированных эмбрионов // Новые методы селекции и разведения высокопродуктивных пород и типов животных: Матер. науч.-практ. конф. – Киев, 1996. – С. 305.
7. Кыса И.С., Бабенков В.Ю., Бабенкова Л.В., Сивая Н.Н., Вестфаль Я., Рошлау К. Практическое применение метода дисекции ранних эмбрионов. // Матер. междунауч. науч.-практ. конф. «Использование трансплантации эмбрионов в селекции и разведении сельскохозяйственных животных». – Киев, Аскания-Нова, 1997. – С. 36-37.
8. Бутенко Р.Г. и др. Клеточная инженерия. - М.: Высшая школа, 1987.
9. Willadsen S.M., Lehn-Jensen H., Fehilly C.G., and Newcomb R. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. // Theriogenology. -1981. -15. -P.23-29.
10. Спир Р.Е., Адамс Г.Д., Гриффитс Дж.Б. и др. Биотехнология клеток животных. М.: Агропромиздат, 1989. Т. 1, 2.
11. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. - М.: Мир, 1989. - 318 с.

12. Антипова Л.В., Глотова И.А., Жаринов А.И. Прикладная биотехнология: учебное пособие. – Воронеж: ВГТА, 2000. – 332 с.
13. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Мн.: БГУ, 2002. – 105 с.
14. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 208 с.

Додаткові джерела

1. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высш. школа, 2003. – 469 с.
2. Дуванов А.В. Технология получения качественных эмбрионов и пересадки полуэмбрионов. // Генет.-селекц. и технологич. пробл. развед. с.-х. жив-х: Тез. докл. науч.-практ. конф., Киев, 1994. – С. 79.
3. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др. ; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009.
4. Никитин В.А. Методы введения веществ и органелл в клетку в технологиях клеточной инженерии // Цитология. – 2007. – Т. 49. – № 8. – С. 631–641.
5. Бекер М. Е., Лиепиньш Г. К., Райпулис Е. П. Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990. 334 с.
6. Іншина Н.М. Біотехнологія. Навч. посібн. - Суми: Видавництво СумДПУ ім. А.С.Макаренка, 2009. - 172 с.
7. Тартаковский А.Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. - С. 44 - 63.
8. Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве // М. РАСХН. - 1995. - 326 с.
9. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКОС»,

2006. — 647 с.

10. <https://ppt-online.org/480101>
11. <https://helpiks.org/1-127497.html>
12. <https://rutvet.ru/in-razvitie-i-metody-biotehnologii-v-zhivotnovodstve-8695.html>
13. <https://infopedia.su/15xe5aa.html>
14. <http://900igr.net/prezentatsii/biologija/Biotekhnologija/008-Biotekhnologii-v-zhivotnovodstve.html>
15. https://studopedia.net/1_56600_kletochnaya-biotekhnologiya-v-zhivotnovodstve-osnovnie-napravleniya.html

МІКРОХІРУРГІЯ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН.

КЛОНУВАННЯ, ХИМЕРИЗАЦІЯ

**Методичні вказівки
до виконання практичної роботи**

ШИГИМАГА Віктор Олександрович

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.

Ум. друк. арк. 1,56

Наклад 100 пр.

Державний біотехнологічний університет
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44