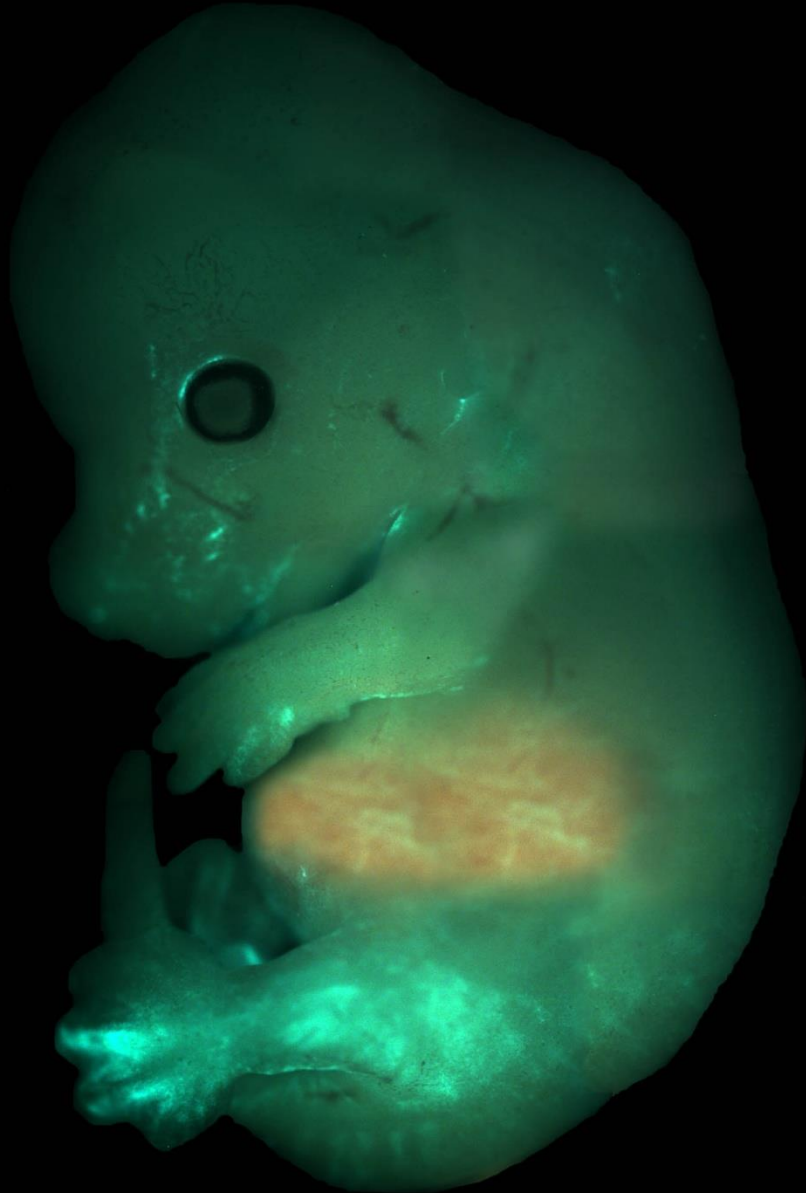


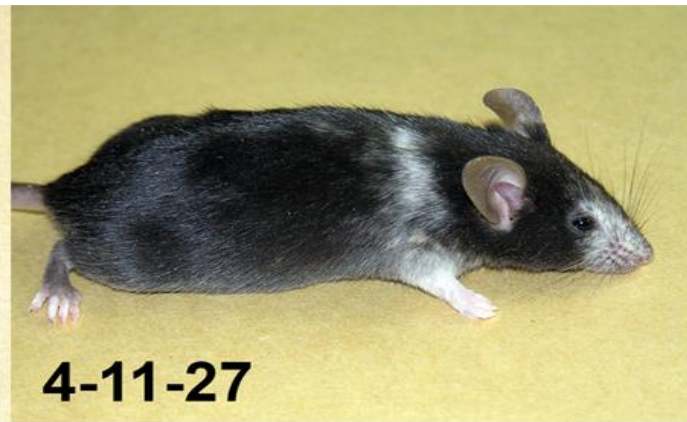
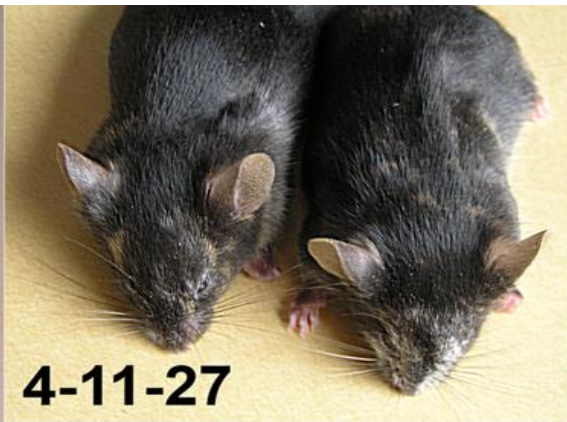
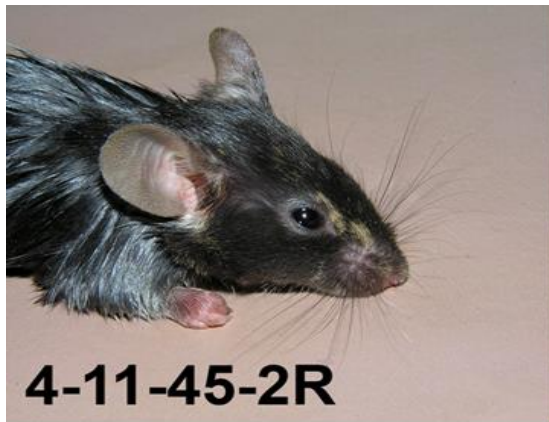


РЕАЛЬНОСТЬ ХИМЕРЫ

ОТКРЫТИЕ, ИЗУЧЕНИЕ И ПРАКТИКА ПРИМЕНЕНИЯ ФЕНОМЕНА ХИМЕРИЗМА У ЖИВОТНЫХ

- 1. Почему и каким образом люди узнают феномен «в лицо»?**
- 2. Что такое «химеризм»? Границы определений и таксономическая специфичность. Виды химеризма.**
- 3. Механизмы первичного (эмбрионального) химеризма млекопитающих.**
- 4. Основные области применения феномена.**
- 5. Этическая сторона исследований химеризма.**

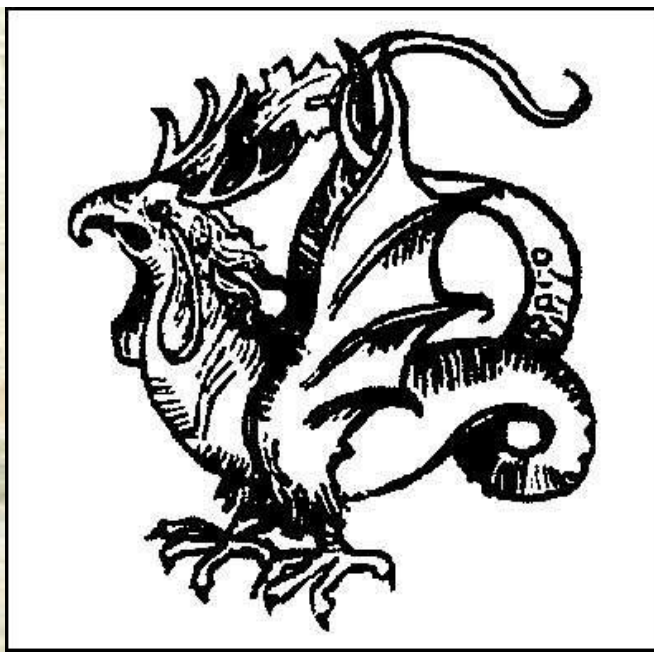








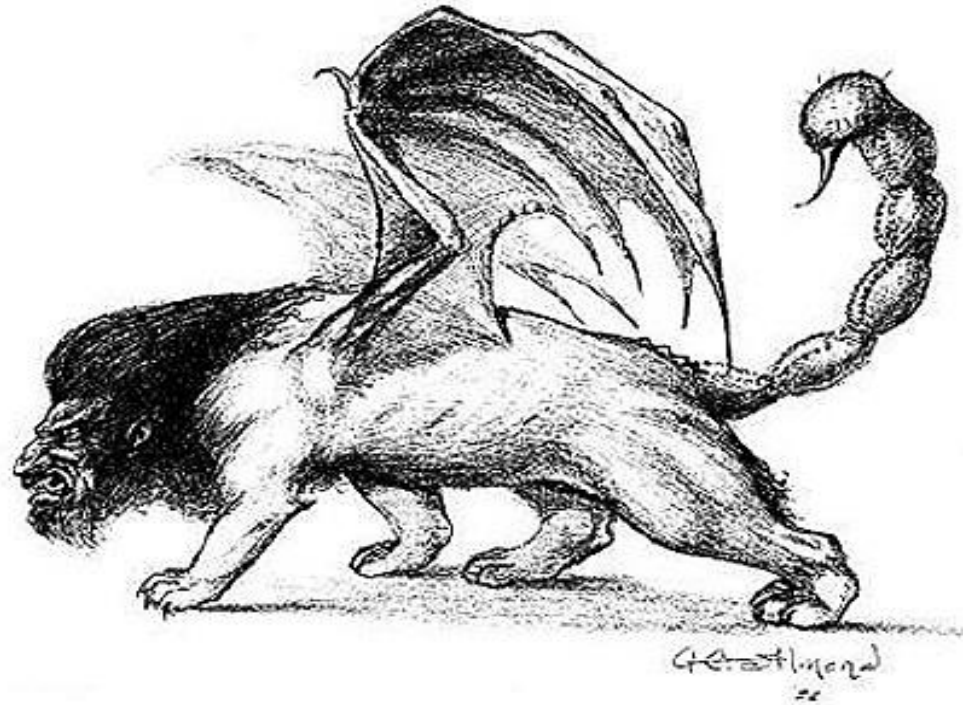
Есть ли что-то общее в многообразии ВСЕХ этих несуществующих форм?

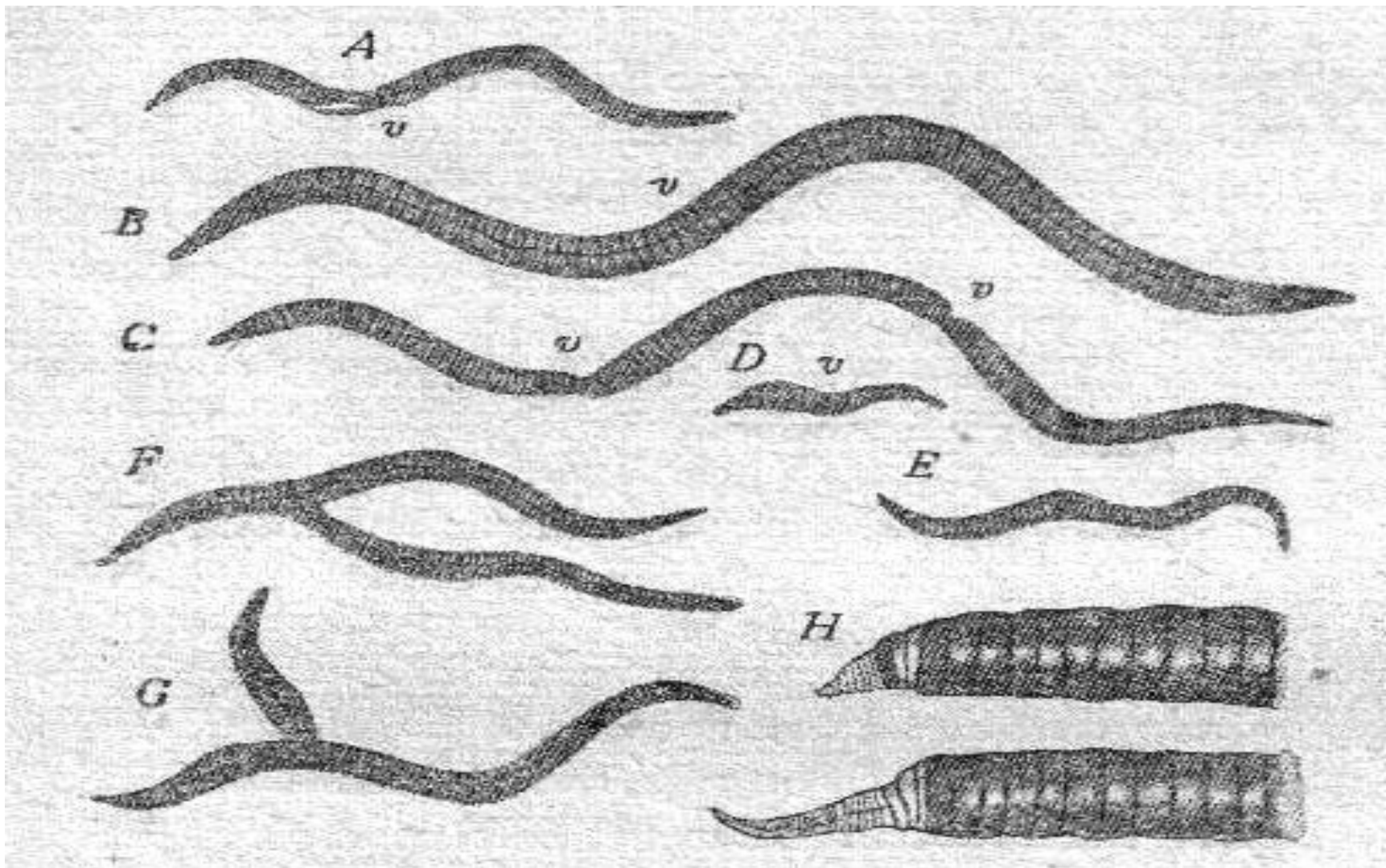


**Феномен химеризма может
быть рассмотрен в двух
качествах – существование
«оформленной» взрослой
химеры и сам по себе процесс
становление химерного
паттерна организации тела.**

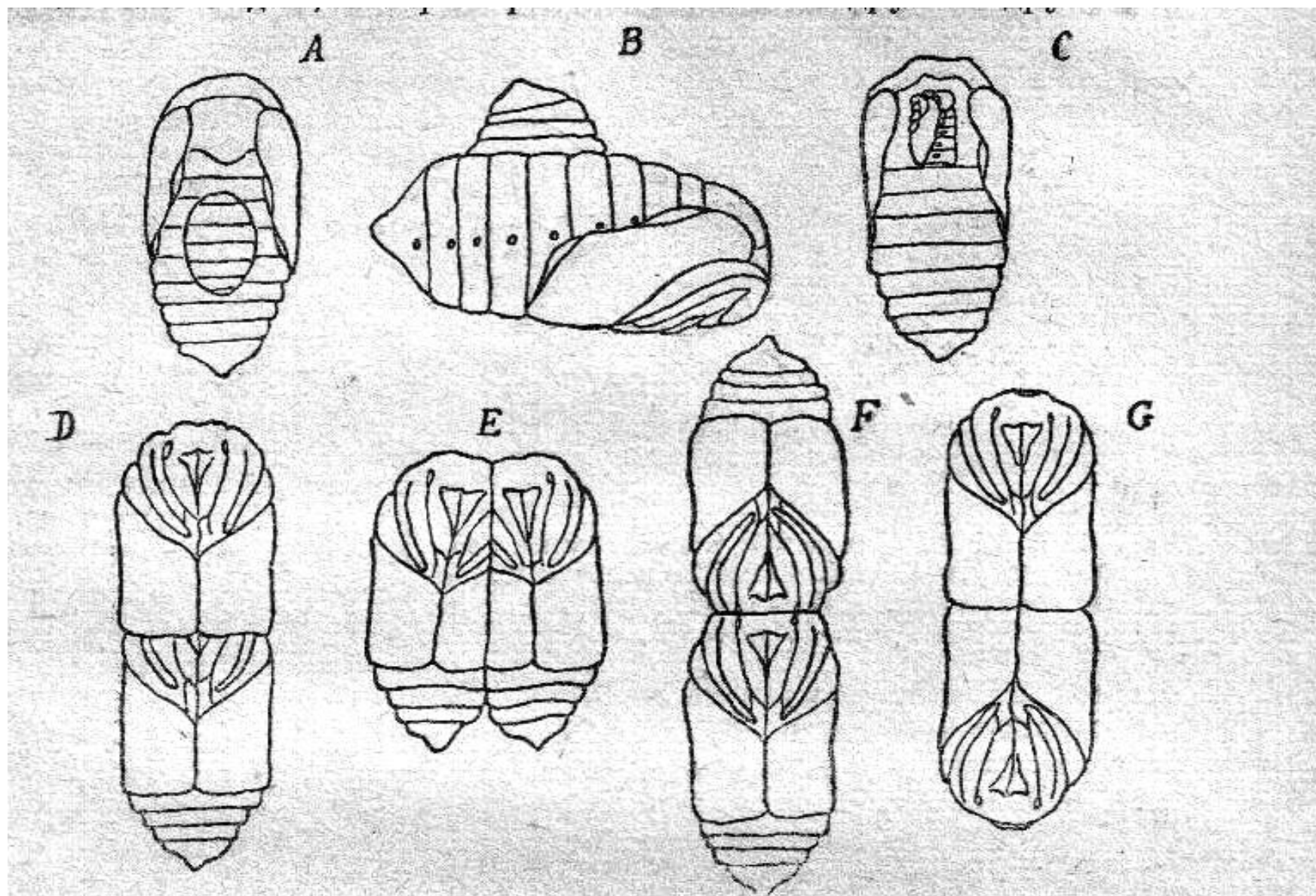
Развитие единого организма при условии присутствия в нём частей от разных (других) организмов

- ? размерность части
- ? сила взаимовлияния и регуляции
- ? устойчивость целого

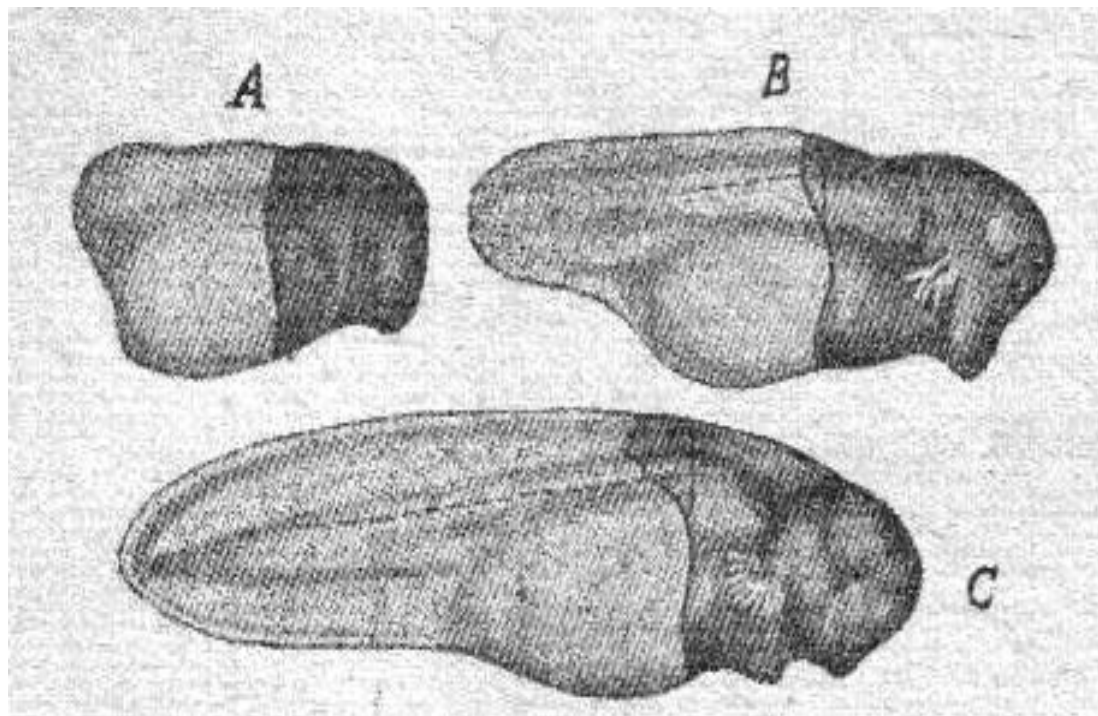




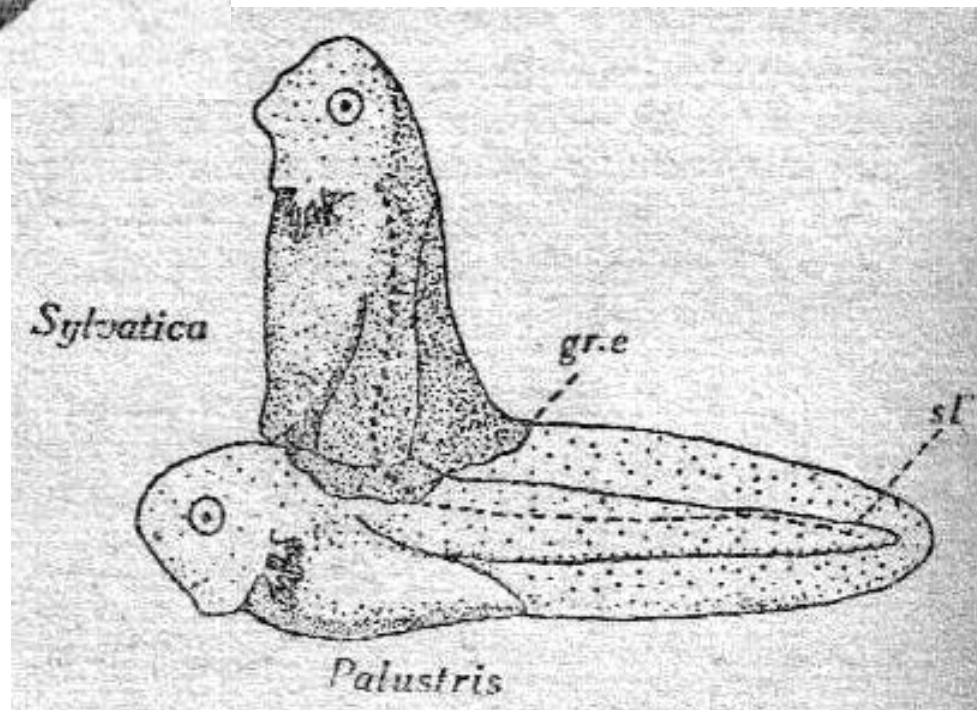
Анализ множественных ауто- и гомотипических пересадок у *Lumbricidae*



Гомотипическая трансплантация, выполненная на куколках *Bombyx mori*



**Головастики, полученные
в результате контакта частей
эмбрионов *Rana sylvatica* (т)
и *R. palustris* (св)**



Гаррисон, Морган и мн. др. 1904-1913 гг

Открытие химер млекопитающих – личная заслуга этих людей



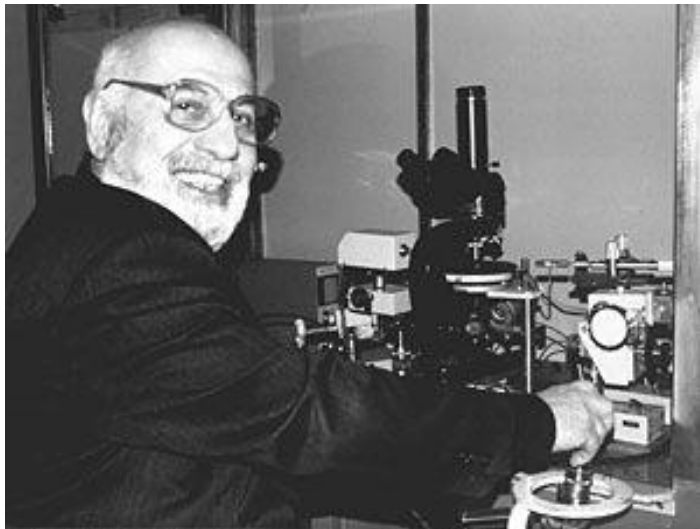
Dr. Beatrice Mintz



Dr. Andrzej K. Tarkowski



Dr. Zsolt Peter Nagy



Dr. Levon Chailahyan

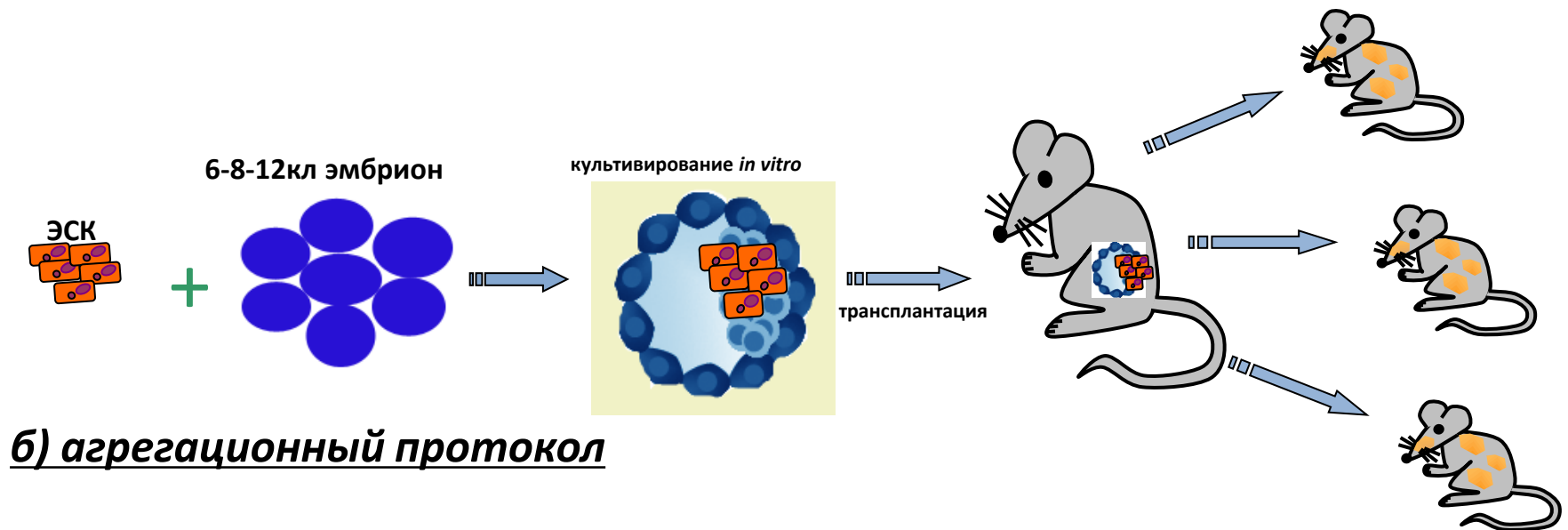
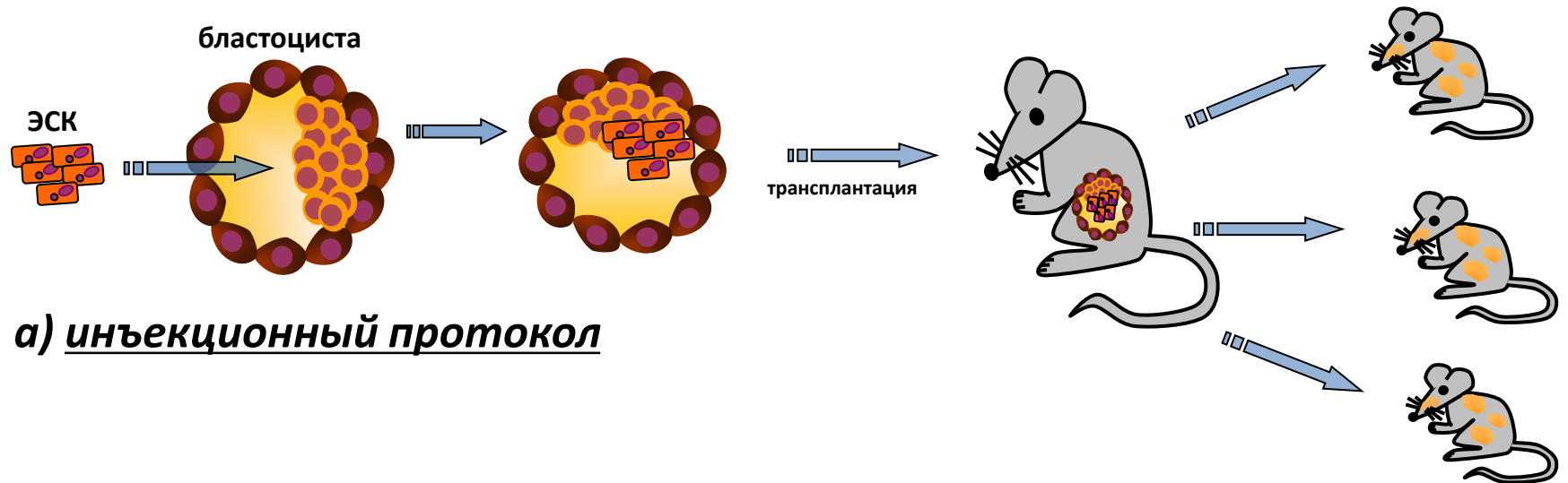


**Dr. Shoukhrat
Mitalipov**



Dr. Anne McLaren

Стратегии получения химер у лабораторных грызунов



Все методы получения экспериментальных эмбриональных химер построены на агрегации эмбриональных клеток (или СК) с автономным эмбрионом или на инъекции эмбриональных клеток в автономный эмбрион

Prather et al., 1989;

Surani et al., 1989;

Prell et al., 2002;

Tam, Rossant 2003;

Морозова и Соломко 2003;

Eakin, Hadjantonakis 2006;

Tanaka et al., 2009;

Eckardt et al., 2011

Химеры – это организмы, состоящие из тканей различного генетического происхождения, причём эти компоненты не оказывают друг на друга никакого влияния. Образующиеся у химер половые клетки сохраняют генотипическую чистоту каждого вида.

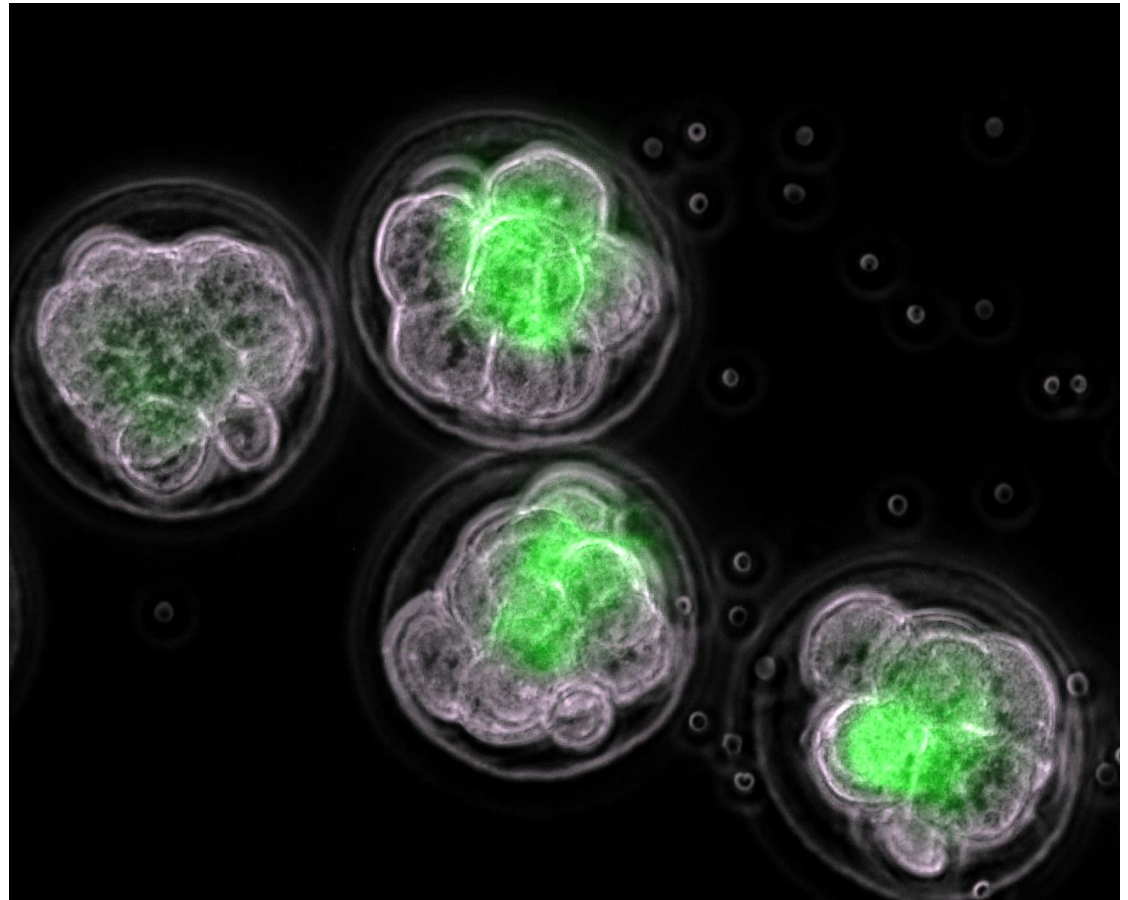
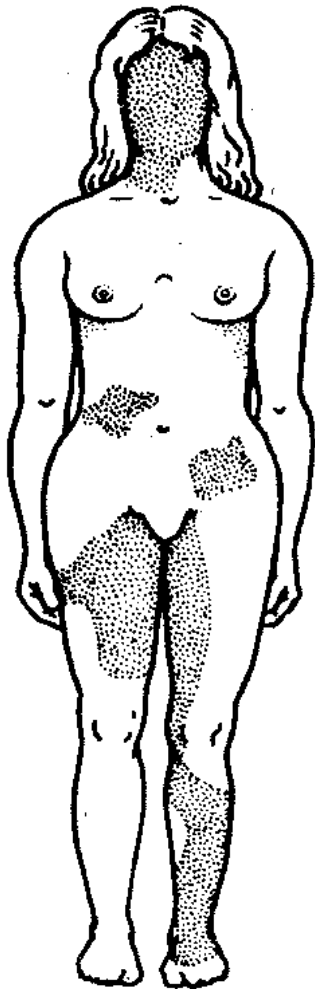
Ю.А. Филипченко «Экспериментальная зоология», 1932»

Химера (млекопитающих) - скомбинированный организм, который происходит более чем из одной зиготы. Различия в клеточных популяциях, слагающих тело химеры, во многом обусловлены изначальными генотипическими различиями партнеров ... Гаметы у химеры всегда образуются автономно.

Анна МакЛарен «Химеры млекопитающих», 1979

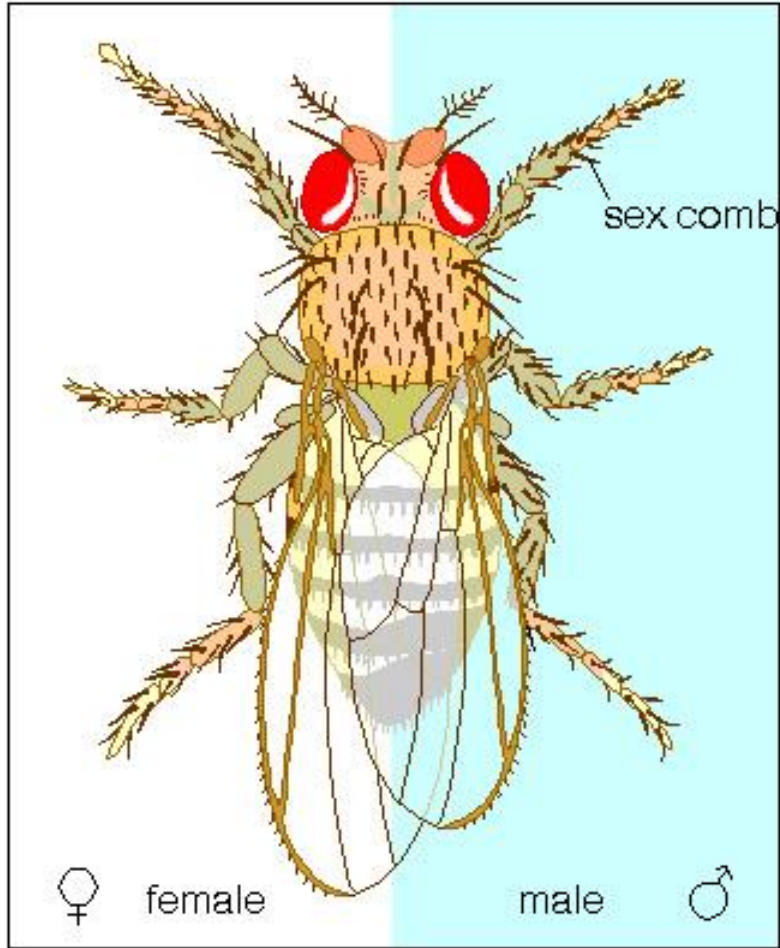
Кто похож на химеру, но химерой не является?

1. Гибриды (генетические и соматические)
2. Мозаики (хромосомные, генетические, эпигенетические)



Кто похож на химеру, но химерой не является?

1. Гинандроморфы



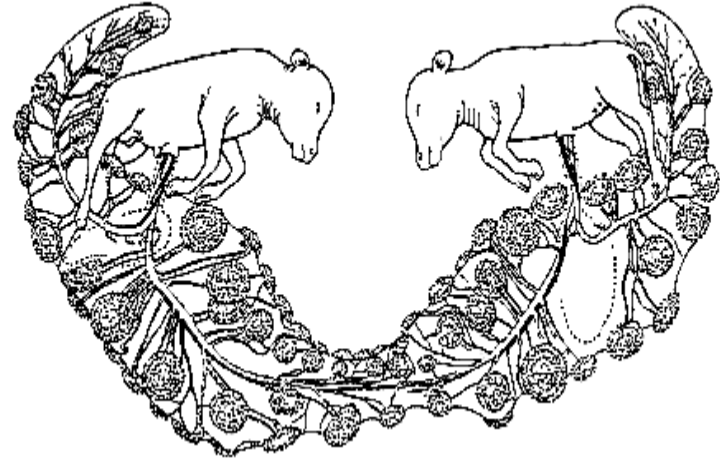
Кто похож на химеру, но химерой не является?

3. Тератогенные эффекты разной степени тяжести, которые вызваны «сбоем» работы генов, управляющих основными процессами развития (Нох и т.п.)



Естественные (т.е. не экспериментальные) ситуации, которые могут сопровождаться химеризмом. А могут и не сопровождаться...

1. Фримартины (?)



- 2. Ложный гермафродитизм и др.
тяжёлые врождённые аномалии гениталий (?)
- 3. Подлинный гермафродитизм (?)
- 4. Овотестис (*Ovotestis*) (?)

4. Аномальная близнецовость («сросшиеся близнецы»)



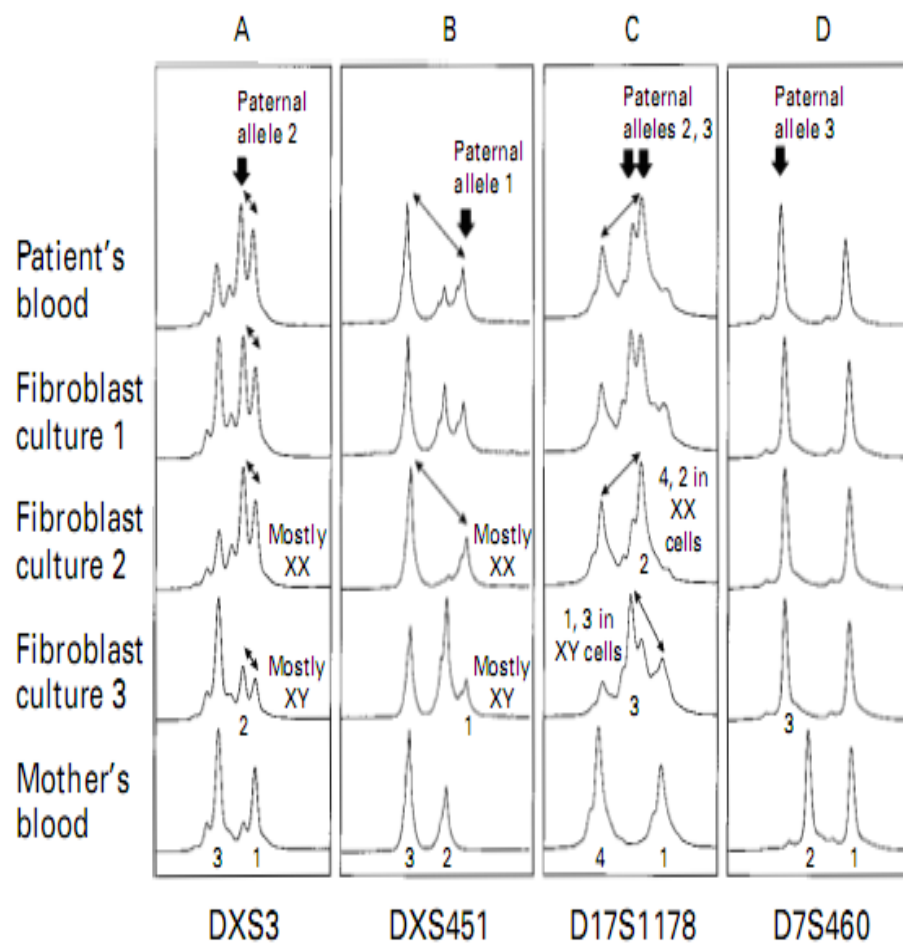


Figure 1. Demonstration of Chimerism through the Use of DNA Polymorphisms.

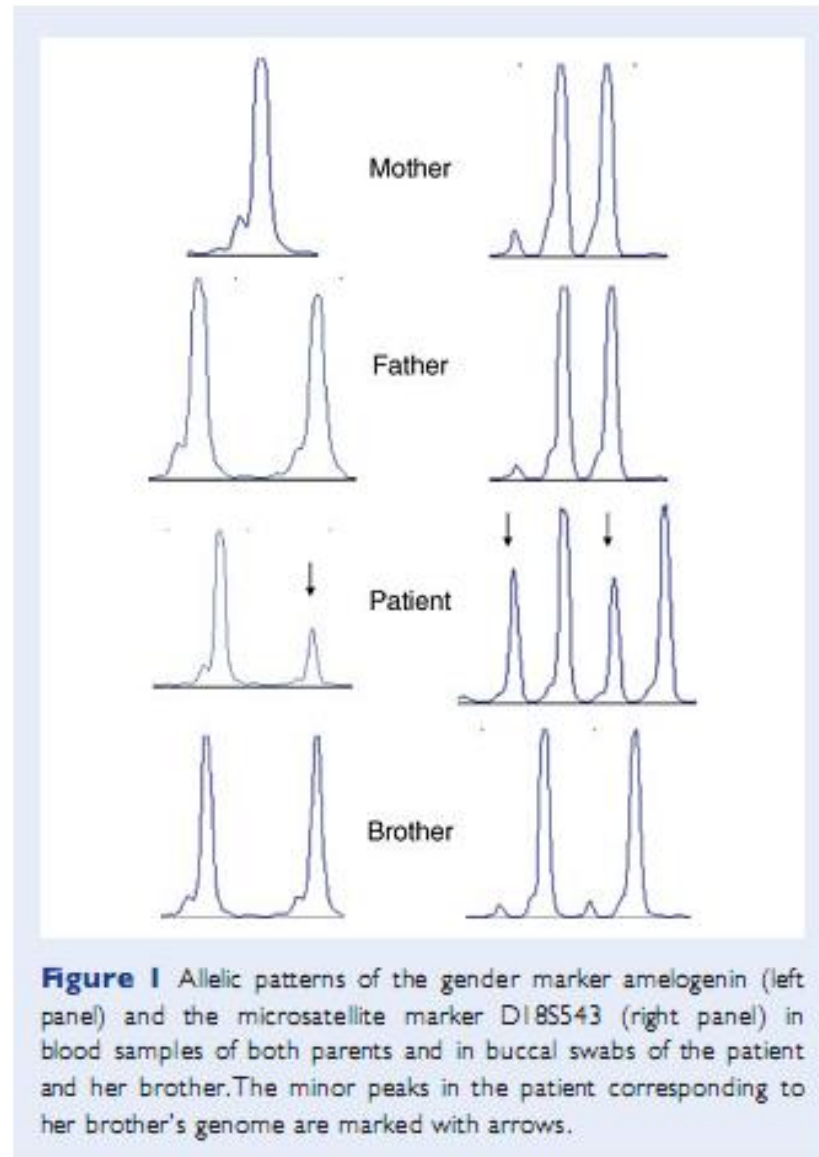


Figure 1 Allelic patterns of the gender marker amelogenin (left panel) and the microsatellite marker D18S543 (right panel) in blood samples of both parents and in buccal swabs of the patient and her brother. The minor peaks in the patient corresponding to her brother's genome are marked with arrows.

По началу контакта партнёров

1. Трансплантационные (ятрогенные) химеры

2. ВТОРИЧНЫЙ ХИМЕРИЗМ

Фето-фетальные химеры («плод-плод»)

Химеры по типу «мать-плод»

Химеры по типу «плод-мать»

3. ПЕРВИЧНЫЙ ХИМЕРИЗМ

Эмбриональные химеры

Неопределённые (*imperfecti*) химеры

По происхождению партнёров

- Эмбрионы и отдельные бластомеры, взятые с разных стадий дробления
- Линии стволовых клеток
- Партнёры разной ploидности
- Гино-, андро- и партеногенетические партнёры
- Партнёры после IVF-, ICSI-, IMSI-, NT- и ZR-манипуляций
- Партнёры после криоконсервации

и так далее.....

Внутривидовые и межвидовые химеры

Классификация химер у плацентарных млекопитающих:

По механизму образования:

- Спонтанные

- Индуцированные
(например, процедурами ВРТ)

- Экспериментальные

По балансу клеточных популяций:

- следовые, слабые, сильные, сбалансированные

- химеры с преимущественным заселением
какой-либо закладки (+криптохимеры)

По эмбриональной, тканевой
и/или системной клеточной нише,
которую предоставляет организующий партнёр

empty developmental (tissue) niche

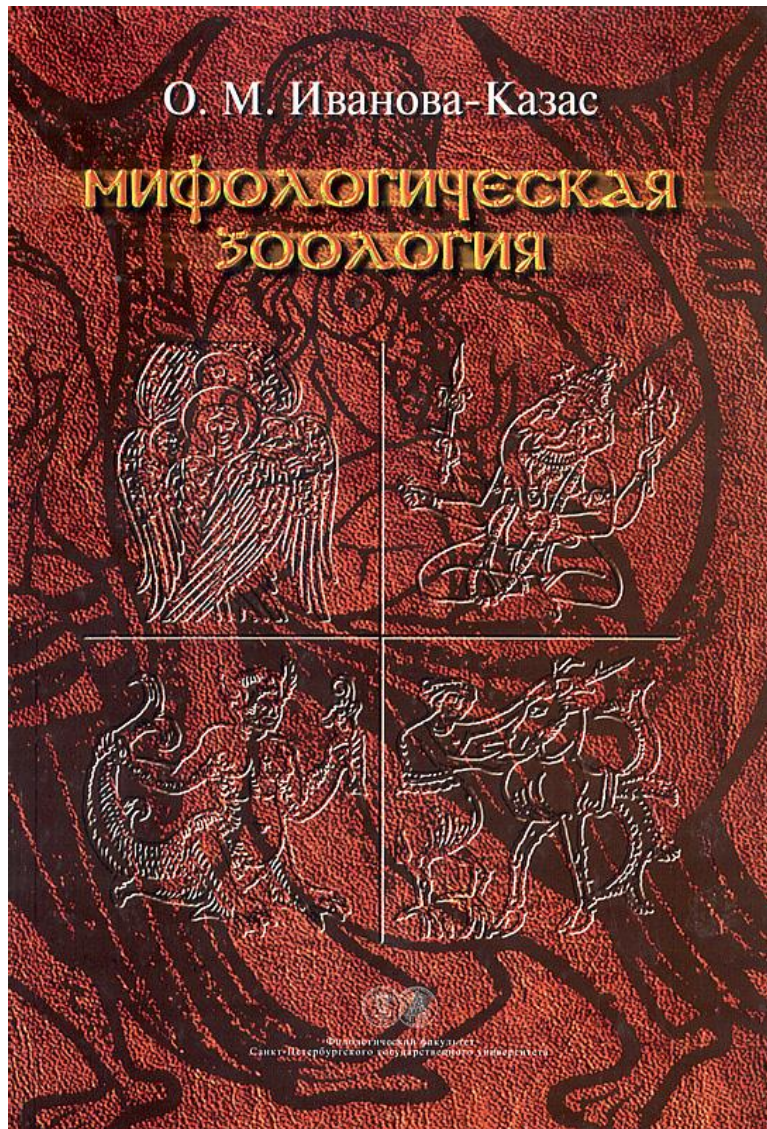
TEC (*Tetraploid Embryo Complementation*)

ATC (*Addult Tissue Complementation*)

DM (*designer mice*)

HM (*humanized mice*)

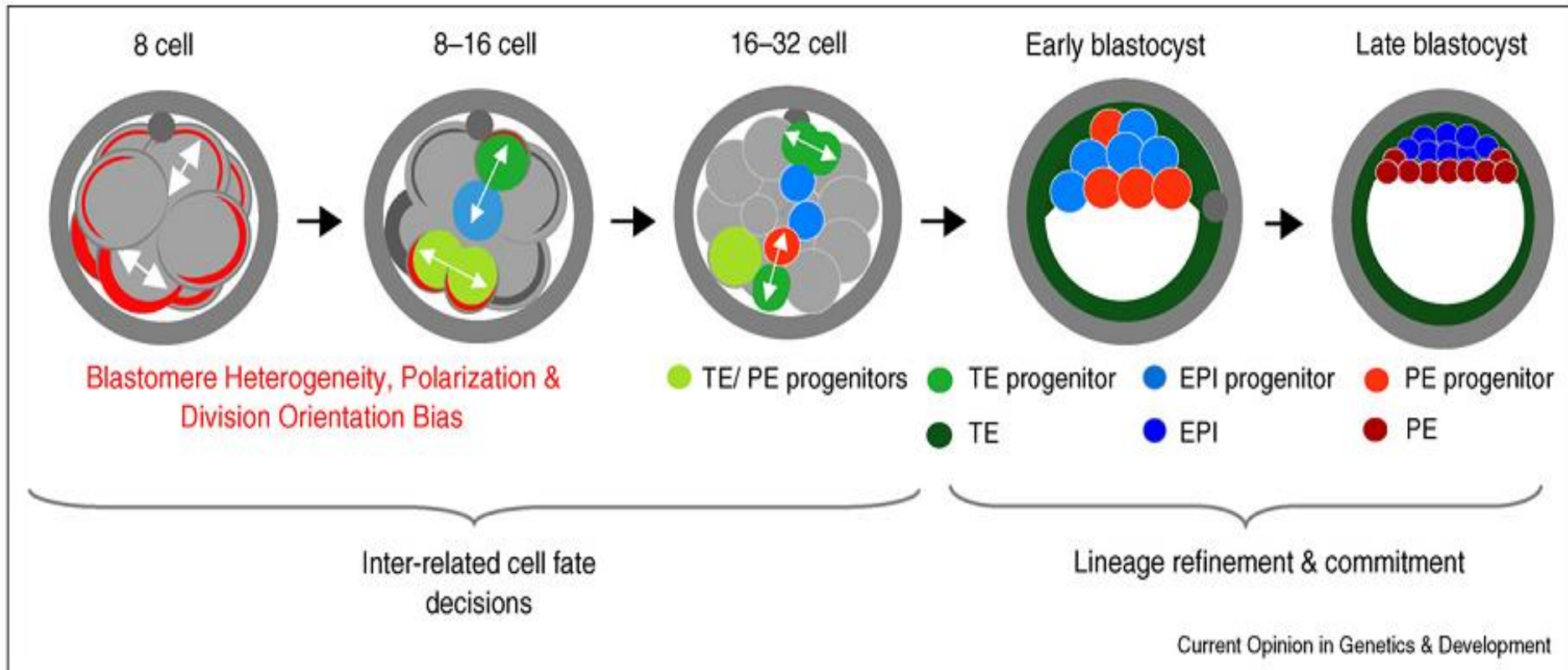
Наиболее Общей Теории Химер пока не существует



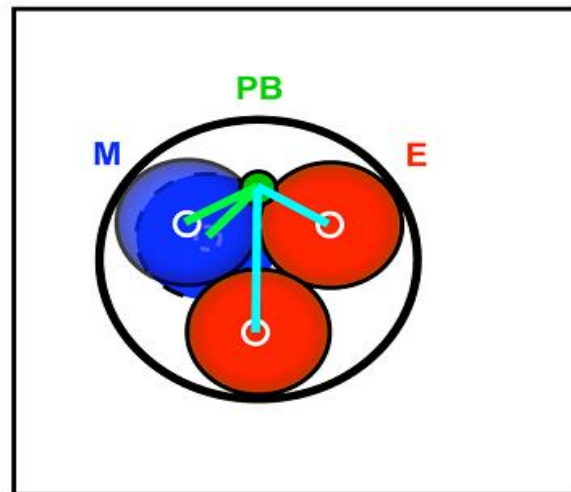
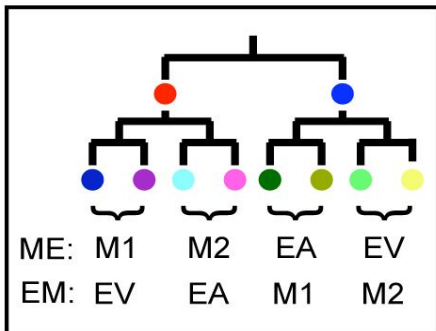
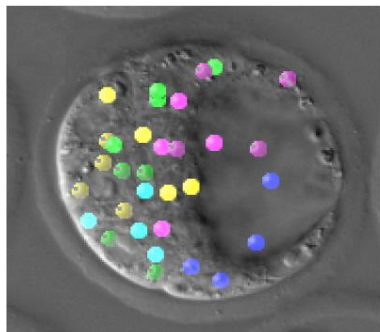
Особенности раннего развития млекопитающих

1. В целом, высокая эмбрионизация развития
2. Слабость яйцевых оболочек
3. Относительная автономность ранних стадий
4. «Гибкое» отделение первых клеточных линий (cell lineage),
5. Существование плюрипотентных клеточных линий (cell lines),
6. Компетенция дробящихся эмбрионов и бластоцист
7. Эквивифинальность развития
8. Фактическое отсутствие презумптивной карты при достаточно ранней спецификации пространственной разметки эмбриона
9. Сильная структурно-функциональная связь с материнским организмом после имплантации
10. Продолжительная беременность
11. Облигатное малоплодие (у крупных животных и человека)
12. Особенности имплантации и плацентации(у приматов и человека)
13. DZ-MCDAP

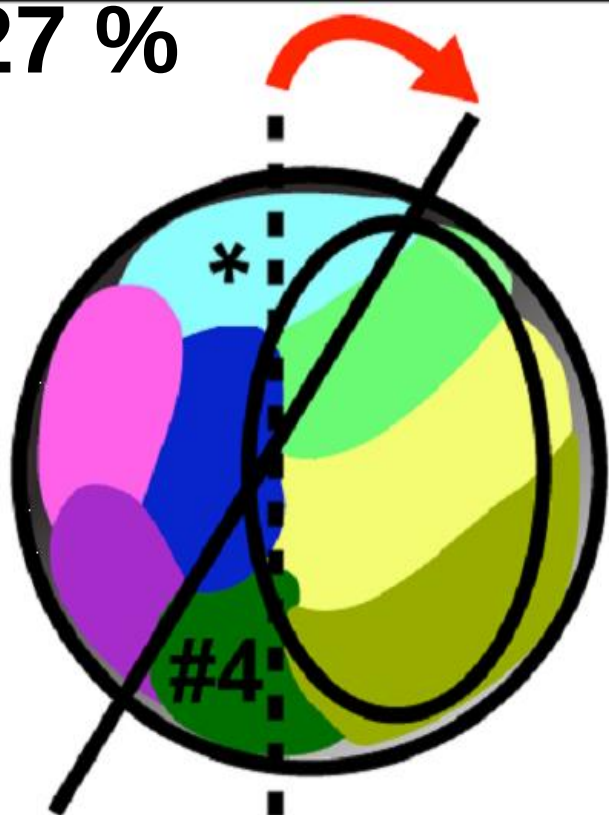
Становление пространственной неоднородности и отделение первых клеточных линий



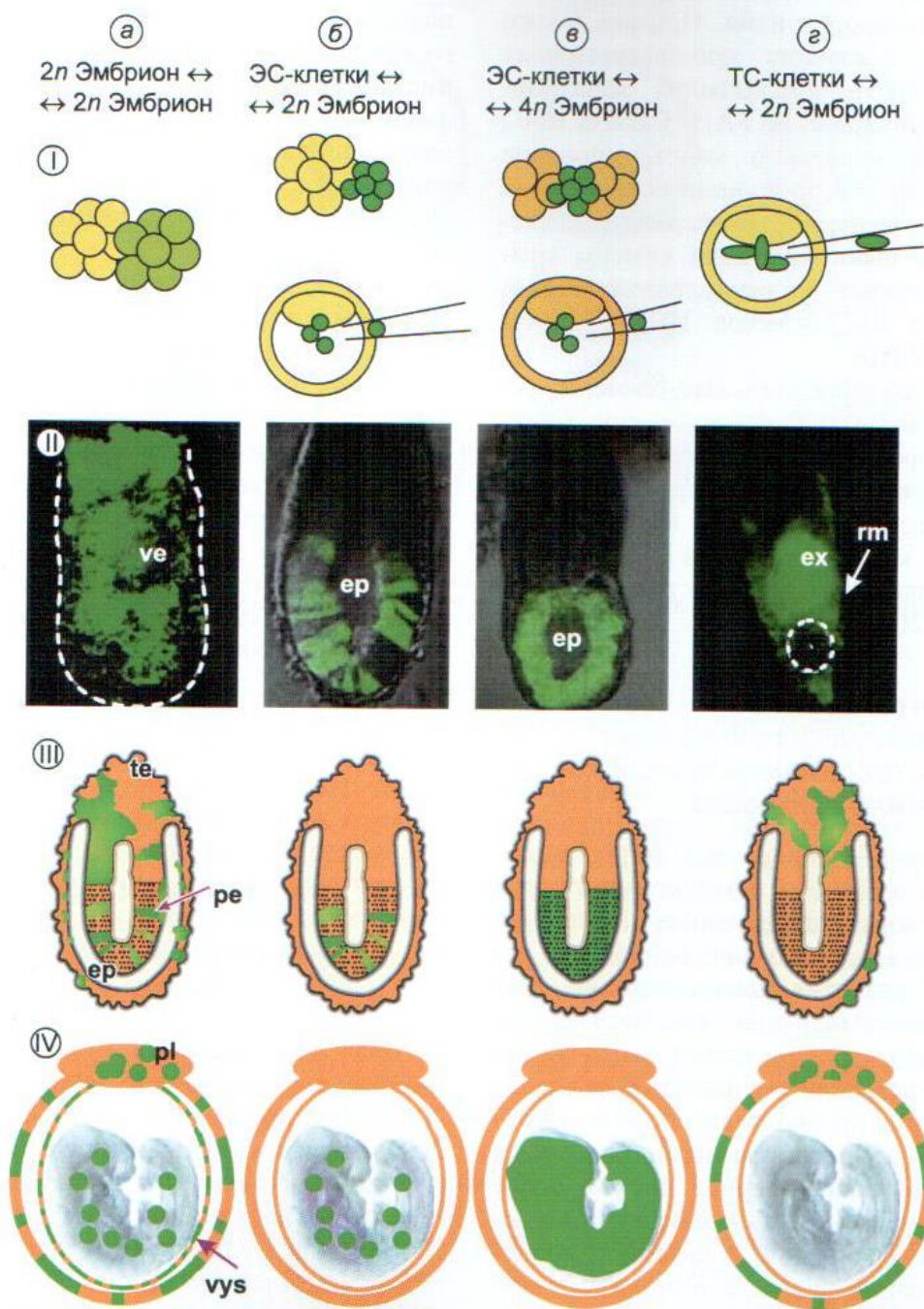
Становление и поддержание клональной структуры бластоцисты



27 %



1. Внутренняя клеточная масса (ВКМ) имеет поликлональное происхождение.
2. Клоны ведут начало со стадии двух бластомеров (2-cell).
3. Оси устанавливаются довольно рано.
4. Везде работает принцип эквивиальности



Заселение эмбриональных и экстраэмбриональных линий потомками GFP-маркированных стволовых клеток при разных методах конструирования химер (по Tam & Rossant 2003)

Видоспецифичность

феномена первичного химеризма

у плацентарных млекопитающих

Грызуны

Границы компетенции эмбрионов очень широки!

Пример №1 :

Эмбрионы, витрифицированные на разных стадиях развития, практически не теряют своей компетенции и способны давать агрегационных и инъекционных химер [Kito et al., 2003].

Пример №2:

ЭСК, выделенные из бластоцист, которые были получены с помощью NT-технологии из замороженных-высушенных ЭСК и кумулюсных клеток оказались способны интегрироваться в развивающийся эмбрион и впоследствии обширно заселять практически все органы и ткани [Ono et al., 2008].

Gonosomal constellation	Currently used nomenclature	Proposed nomenclature	Genital tract abnormalities	Affected dog breeds
(D) Chimeraism and mosaicism				
78,XX/77,X0	XX/X0 C or M	78,XX/77,X0 C or M	O, PD, I	Bearded Collie, Munsterlander, Toy Poodle (Mayenco-Aguirre et al., 1999; Switonski et al., 2003) ^b
78,XX/78,XY	XX/XY C or M, TH, THC	78,XX/78,XY ovotesticular C or M	OT, OT+T, MD, (PD), AG	American Eskimo, Pug, Schipperke (Hare, 1976 ^d ; Bosu et al., 1978; Johnston, 1989) ^b
	XX/XY C or M with testes, male PH	78,XX/78,XY testicular C or M	T, (CO), (MD), (PD), (H), AG, (I)	Belgium Shepherd, German Shepherd, Old English Sheepdog (Chaffaux et al., 1980; Meyers-Wallen and Patterson, 1986; Genero et al., 1998) ^b
	XX/XY C or M, female PH XX/XY C or M	78,XX/78,XY ovarian C or M – ^c	O, PD, AG, (I) ?; AG	Dachshund, Toy Spaniel (Weaver et al., 1979; Chaffaux et al., 1980) ^b Border Terrier, Fila Brasileiro (Meyers-Wallen et al., 1999; Kuiper and Distl, 2004) ^b
78,XX/79,XXY	XX/XXY C or M	78,XX/79,XXY ovotesticular C or M	OT, PD, AG	Irish Red Setter (Dain and Walker, 1979) ^b
	XX/XXY C or M, male PH	78,XX/79,XXY testicular C or M	T, CO, MD, PD, AG, (I)	Labrador-Setter-crossbreed, Cocker Spaniel (Dain and Walker, 1979; Allen et al., 1981) ^b



Спонтанный химеризм у собак

Poth et al., 2010

Dreger and Schmutz, 2012

Table 1. The number of *Callithrix kuhlii* individuals chimeric for each tissue type

Tissue	Tissue type	Genotyped, no.	Chimeric, no.	Chimeric, %
Samples from deceased animals				
Placenta	H	7	7	100.0
Blood	H	2	2	100.0
Spleen	H	28	14	50.0
Liver	H	39	15	38.5
Heart	S	30	7	23.3
Hair	S	35	6	17.1
Lung	S	30	4	13.3
Kidney	S	33	4	12.1
Gonad	G	21	2	9.5
Skin	S	36	2	5.6
Brain	S	31	1	3.2
Muscle	S	34	1	2.9
Samples from living animals				
Sperm	G	7	4	57.1
Saliva	S	31	16	51.6
Blood	H	45	22	48.9
Hair	S	50	13	26.0
Fecal	S	22	2	9.09

H, hematopoietic; S, other somatic; G, germ line.



Callithrix kuhlii)

dZ MCDAP 19-29 dpc

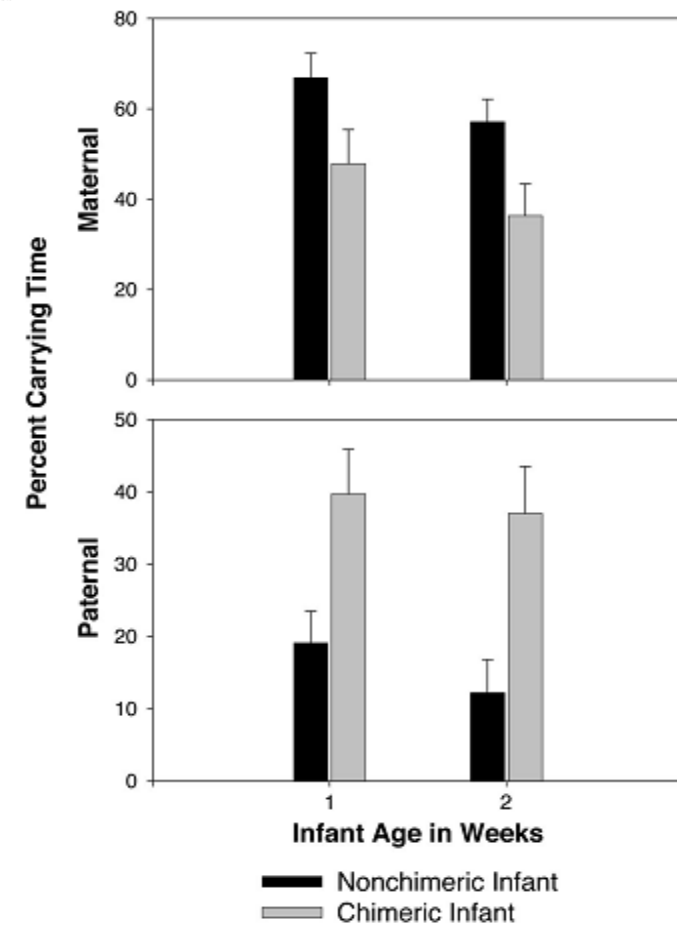
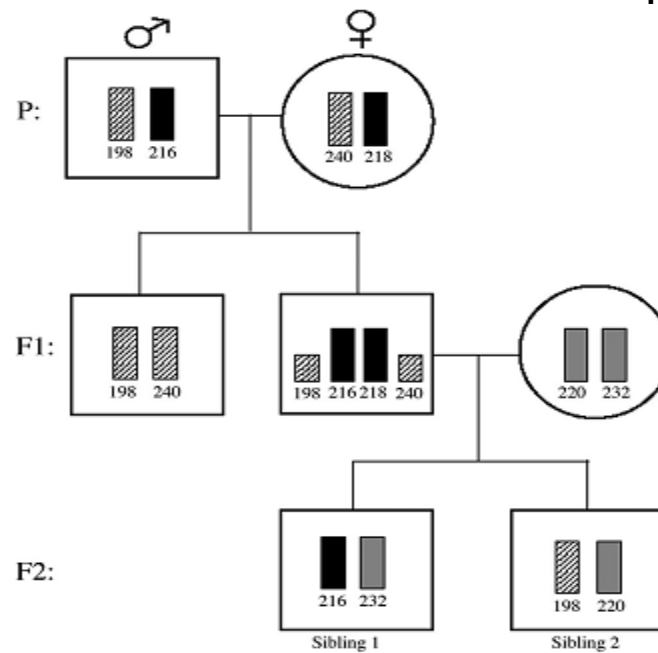
дизиготические двойни

95% - химеры по крови

72% - химеры по всем тканям и всем органам

57% - химеры по гаметам

Ross et al., 2007 Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*) // PNAS vol. 104, #15 6278–6282



Каждое животное получено агрегацией **6 эмбрионов**

Chimeric Infants Generated by Whole-Embryo Aggregation

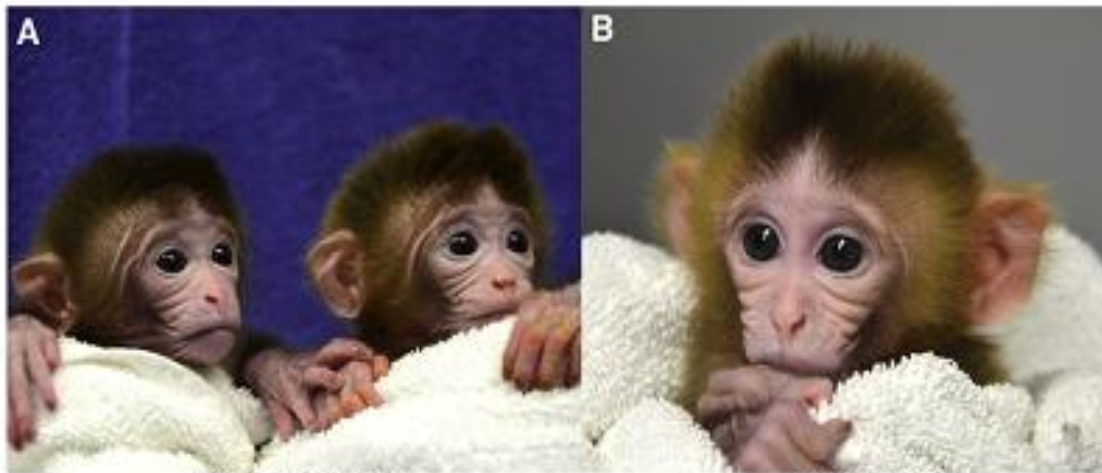
(C and D) Genetic analysis of blood and extraembryonic tissues based on microsatellite examination demonstrating presence of more than two alleles for each locus.

химеризм по всем органам и тканям, включая гонады

Фенотипически все трое - самцы, конгенитальных аномалий нет

Roku XY ---- XX

Tachibana et al., 2012



Roku & Hex

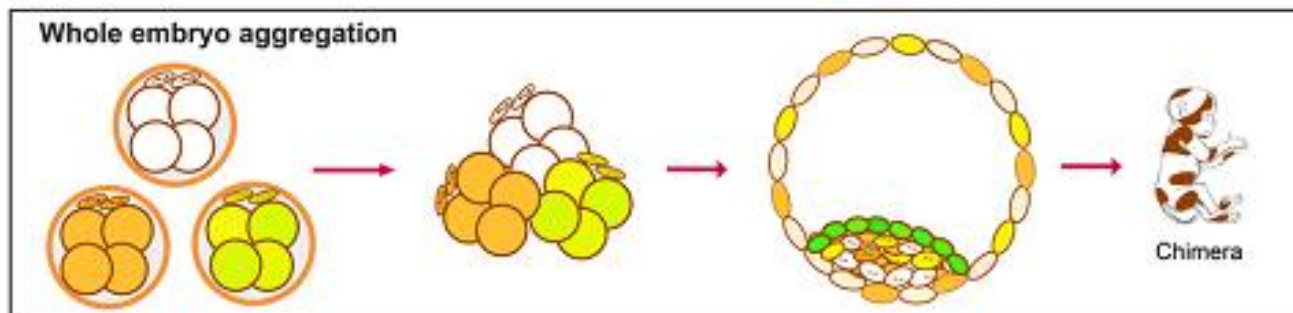
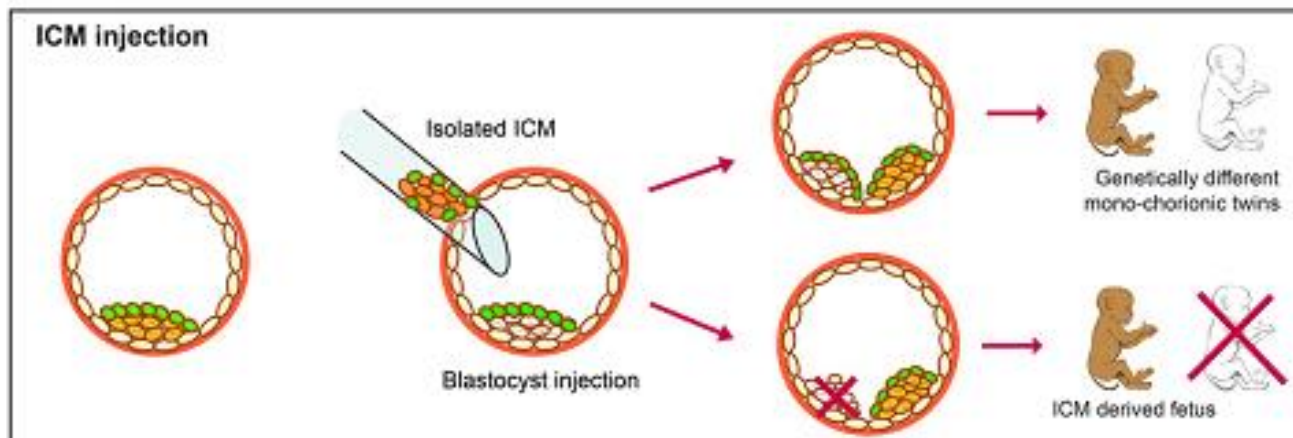
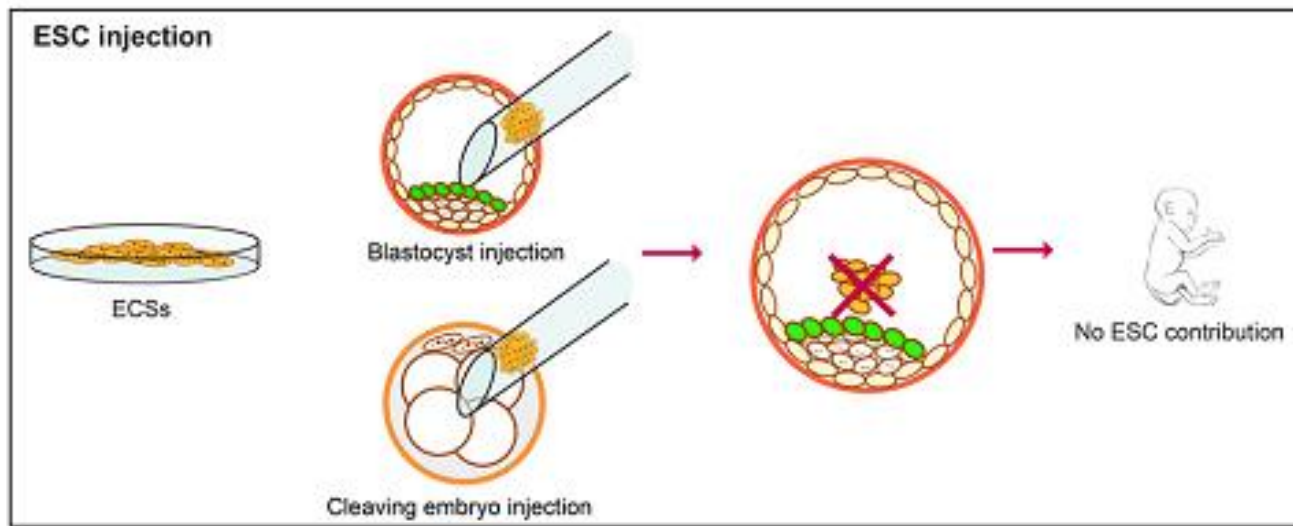
Chimero

C

Animal	DNA origin	AME	D22S685	162B17B
Sperm donor male #6	blood	XY	315/327	295/309
Egg donor Female #15	blood	XX	311/319	309/317
Egg donor Female #18	blood	XX	287/359	289/315
Recipient #25	blood	XX	323/331	293/309
EA-f8 (ROKU)	cord blood	XY	287/315	289/295/309/315
EA-f8 (ROKU)	cord	XY	287/315	289/295/309/315
EA-f8 (ROKU)	Membrane	XY	287/315/323/331	289/293/295/309
EA-f8 (ROKU)	Placental body	XY	287/315/323/331	289/295/309/315
EA-f9 (HEX)	cord blood	XY	287/327	309/315
EA-f9 (HEX)	cord	XY	287/319/327	309/315/317
EA-f8 (HEX)	Membrane	XY	287/319/323/327/331	293/309/315/317
EA-f8 (HEX)	Placental body	XY	287/311/315/319/327	309/315

D

Animal	DNA origin	AME	D7S513	D9S921
Sperm donor Male #1	blood	XY	197/201	167/199
Egg donor Female #17	blood	XX	189/205	179/195
Egg donor Female #18	blood	XX	191/235	187/195
Recipient #27	blood	XX	199/215	195/207
EA-f10 (CHIMERO)	cord blood	XY	191/197/201/235	167/187/195/199
EA-f10 (CHIMERO)	cord	XY	191/197/201/235	167/187/195/199
EA-f10 (CHIMERO)	Membrane	XY	191/197/201/235	167/187/195/199
EA-f10 (CHIMERO)	Placental body	XY	191/199/201/215/235	195/199/207



Когда в развитии человека происходят события, приводящие к спонтанному (или индуцированному ВРТ) образованию химер?

dZ MCDAP

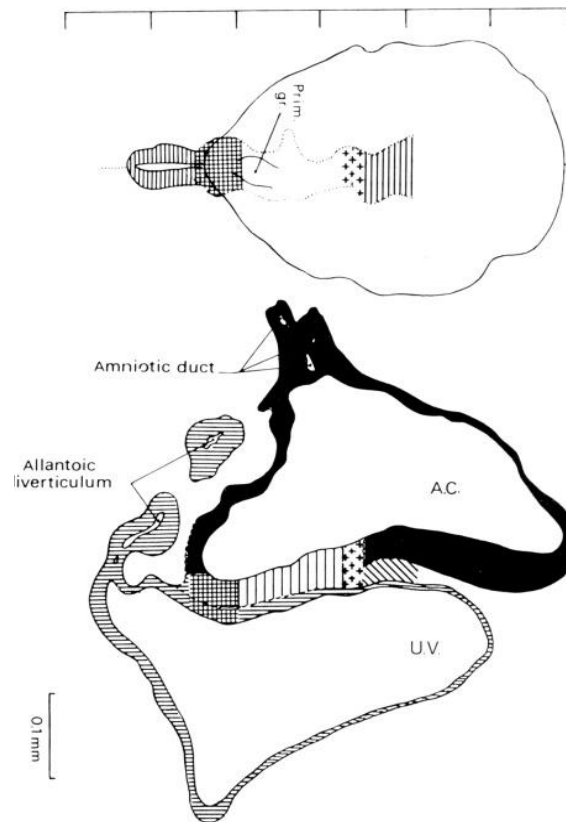
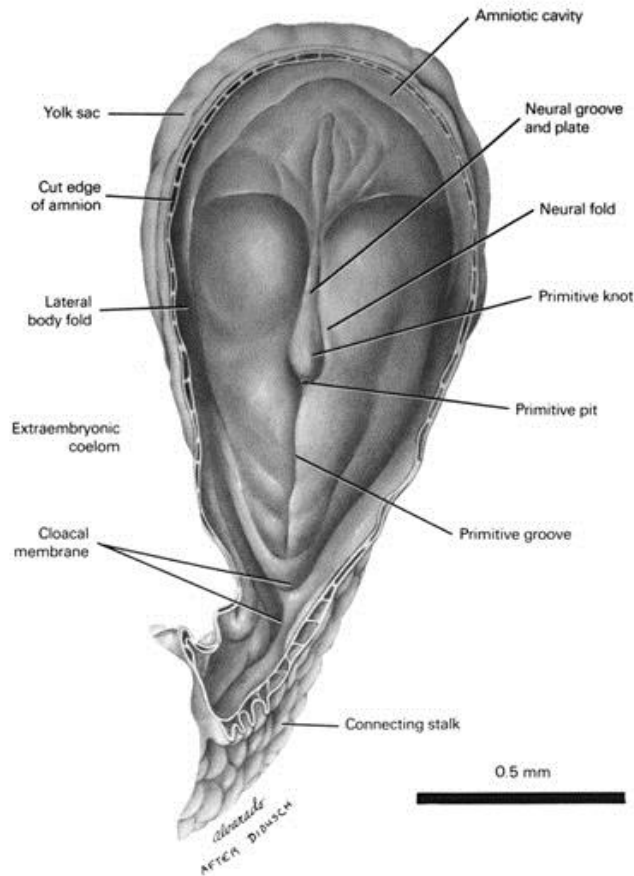
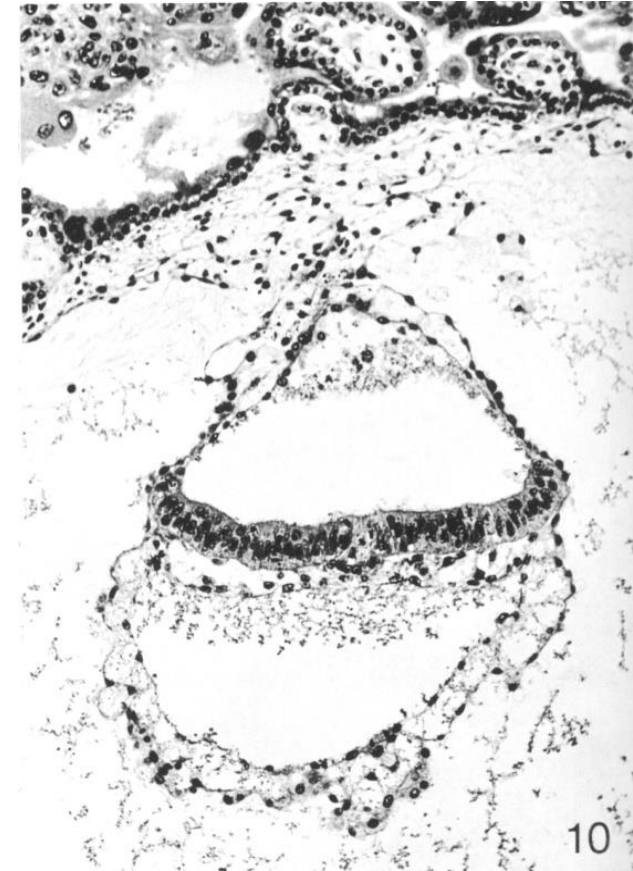


Fig. 30 29 28 27 26 25 24 23 17 22

Slide

41	42	43	44	45	46
----	----	----	----	----	----



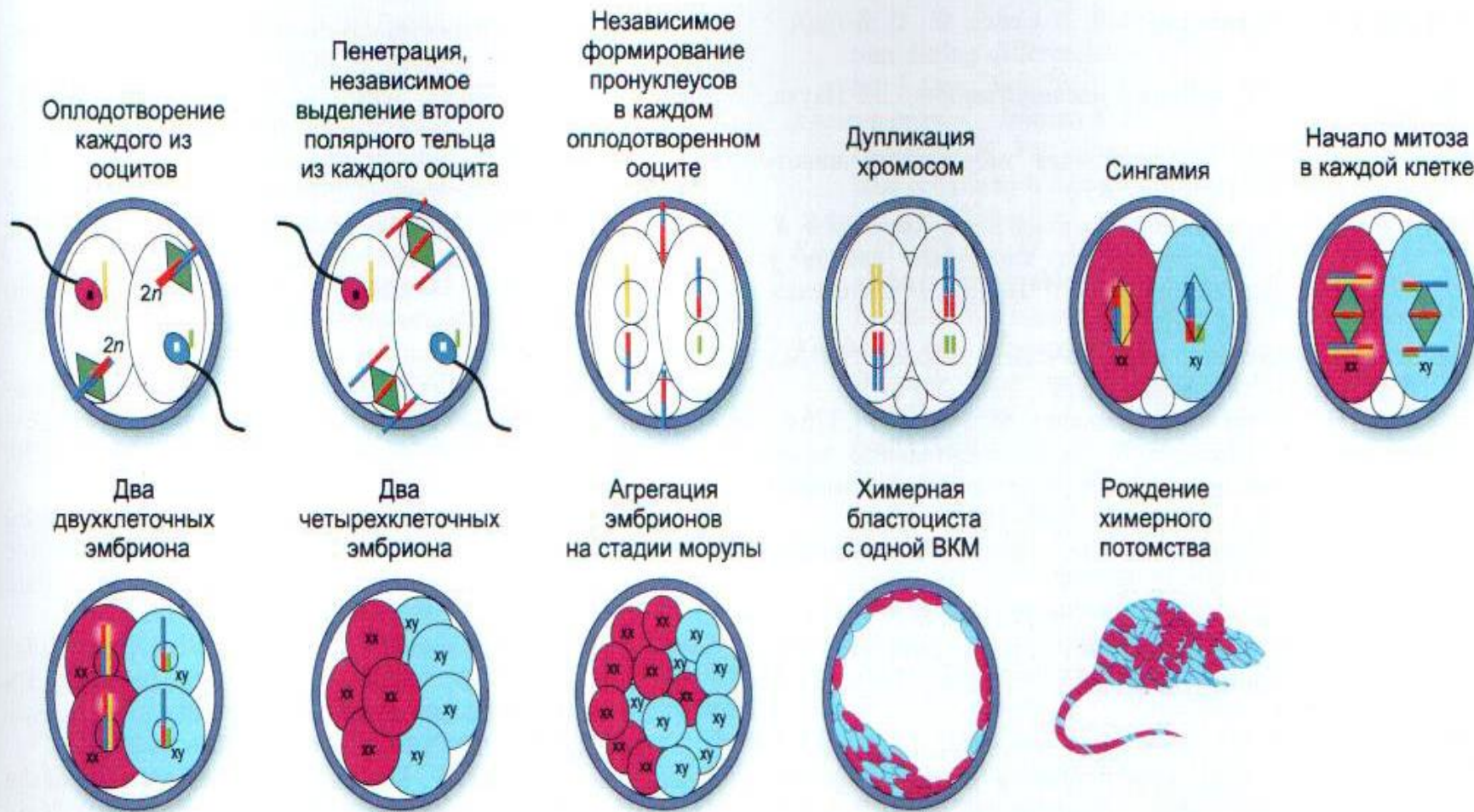


Рис. 13.3. Гипотеза спонтанной первичной химеризации у млекопитающих на основе полигаметного оплодотворения [Otsuki et al., 2012].

- 1. Классическая (описательная) эмбриология**
- 2. Экспериментальная эмбриология**
- 3. Сравнительная (эволюционная) эмбриология**

Научные школы России, Германии и Австро-Венгрии

4. Тератология животных

Научные школы Франции

5. Частная эмбриология и генетика развития млекопитающих

Крупные университеты и исследовательские центры Великобритании и США

6. “Как это можно использовать?”

Современные биотехнологии и медицинские технологии

Где интенсивно используются химеры?

Традиционные задачи:

1. клональный (и многие другие) анализ органов и тканей
2. тестирование плюрипотентности ЭС клеток *in vivo*,
т.е. в условиях естественного гуморального и тканевого окружения
3. получение взрослых животных непосредственно из ЭСК желаемых генотипов

что такое здесь «желаемые»?

- разным образом трансформированные, в т.ч. нокаутированные линии ЭСК,
 - маркированные линии ЭСК и СК,
 - гибридные линии ЭСК и СК,
 - линии ЭСК и СК с измененной ploидностью,
 - линии с измененным эпигенетическим статусом,
т.е. iPSC и подобные им
4. получение живого потомства в случаях мутаций, приводящих к эмбриональным летальям из-за отсутствия имплантации вообще (1) ,
а также по причине аномального формирования плаценты (2)
и/или экстраэмбриональных оболочек
 5. преодоление межвидового барьера имплантации при ВРТ-стратегии сохранения редких и исчезающих видов

Этическая сторона биологической проблемы:

«хорошо или плохо?»

«допустимо или недопустимо?»

Crossing Species Boundaries Is Even More Controversial than You Think

Paul B. Thompson

The science and ethics of making part-human animals
in stem cell biology

Jason Scott Robert¹

Crossing Species Boundaries

Jason Scott Robert & Françoise Baylis

Interspecies Crosses: Aspects of Animal Protection

A position statement of the Ethics Committee for Animal Studies¹ of the Swiss Academy of Medical Sciences (SAMS) and the Swiss Academy of Sciences (SCNAT)

