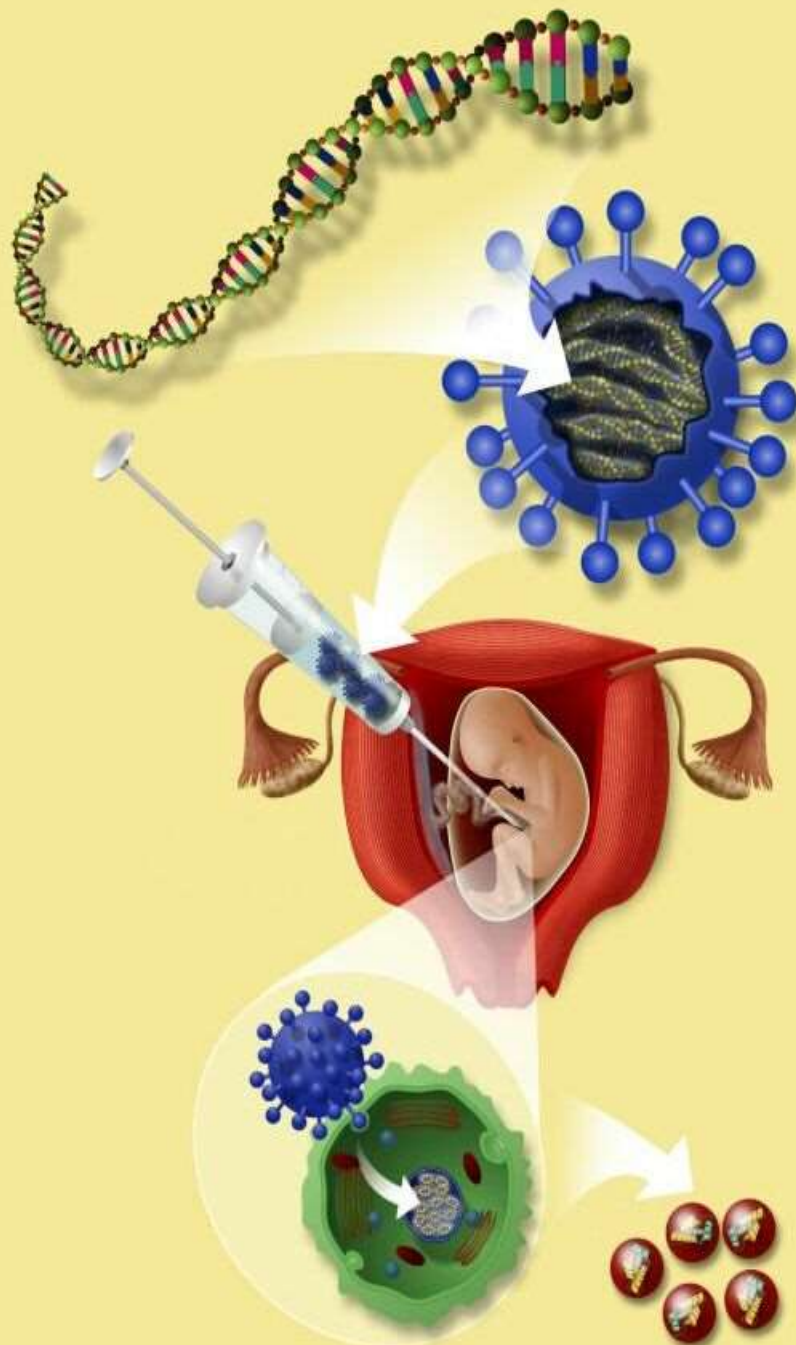


GENSKA DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA



Prof. dr Zoran Stanimirović

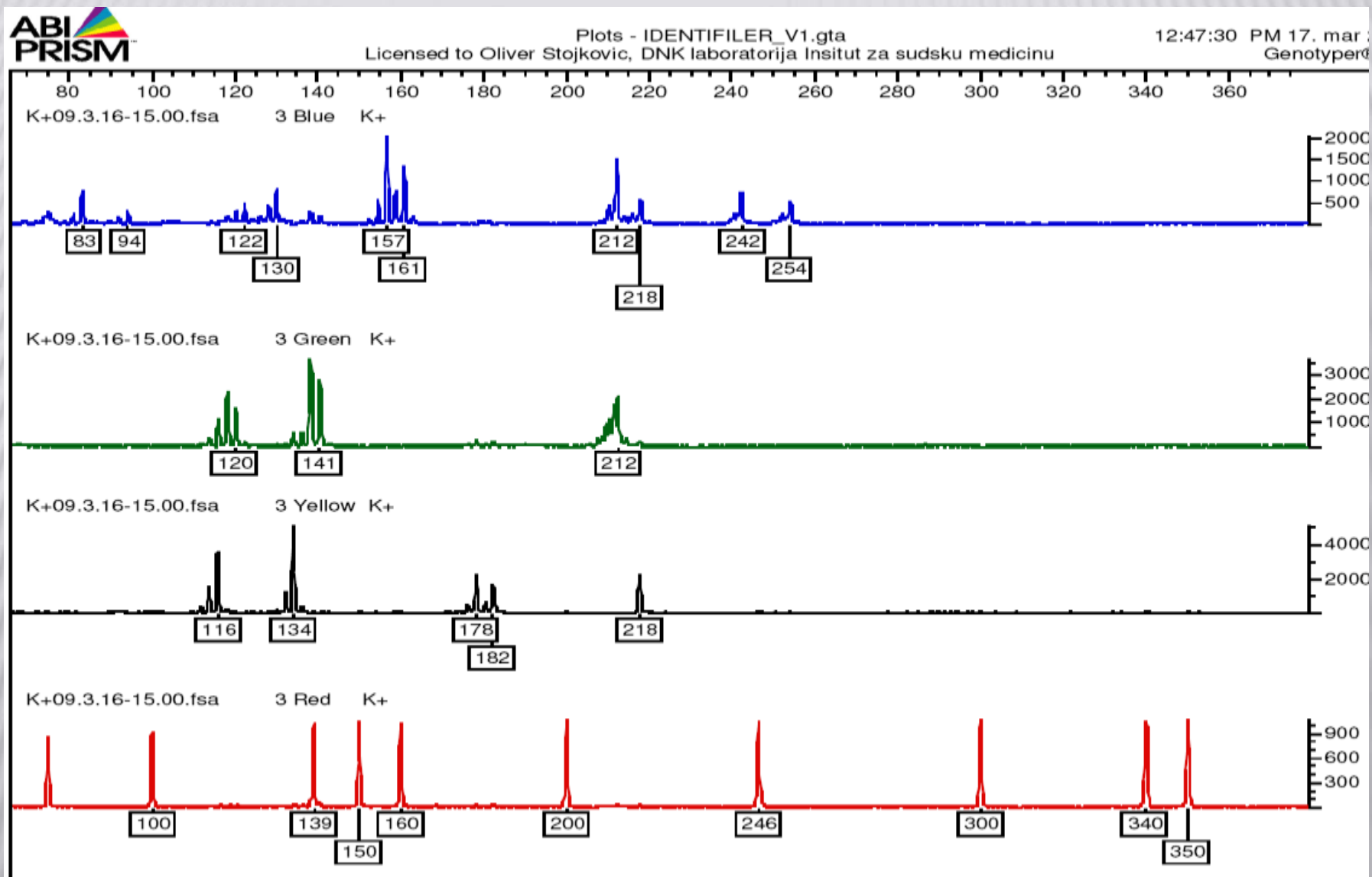
**Katedra za biologiju
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu**



Molekulsko genetska dijagnostike

je našla posebno i značajno mesto u humanoj i animalnoj medicini. U principu bazira se na hibridizaciji NK-nukleinskih kiselina radi dijagnostikovanja nekih naslednih bolesti ili otkrivanja uzročnika infektivnih bolesti. Kod naslednih bolesti moguće je uzeti uzorak horionskih resica iz kojeg se izoluje DNK i zatim se ispituje na prisustvo “bolesnog gena” (prenatalna dijagnostika). U slučaju infektivnih bolesti uzorak tkiva ili periferne krvi ispituje se na prisustvo DNK sekvenci specifičnih za izazivača bolesti (tuberkuloza, AIDS itd.).

Utvrđivanje pedigreea YU simentalskog govečeta



Stevanovic et al. (2010)
Czech J Anim Sci

Određivanje pedigreea analizom mikrosatelita koje preporučuje ISAG kod YU simentalskog govečeta

Table 1. Informativeness of analyzed markers in the Yugoslav Pied cattle population in Serbia

Microsatellite marker	Chromosome	Observed size range (bp)	n_A	FNA	Ho	He	HWE	PIC
TGLA227	18	78–114	11	0.274	0.733	0.851	0.00324*	0.82
BM2113	2	122–142	9	0.333	0.607	0.817	0.01505	0.80
TGLA53	16	150–184	14	0.235	0.656	0.893	0.00000*	0.88
ETH10	5	206–220	7	0.600	0.522	0.557	0.13205	0.58
SPS115	15	242–254	6	0.515	0.719	0.656	0.78688	0.60
TGLA126	20	114–124	6	0.438	0.667	0.654	0.95571	0.59
TGLA122	21	138–162	9	0.424	0.452	0.728	0.00163*	0.70
INRA023	3	198–220	11	0.167	0.774	0.889	0.26167	0.86
ETH3	19	112–124	6	0.288	0.742	0.793	0.29764	0.75
ETH225	9	134–146	6	0.530	0.581	0.645	0.02655	0.62
BM1824	1	176–190	6	0.364	0.710	0.760	0.65137	0.70
Mean			8.273	0.379	0.651	0.750		0.72

n_A = number of alleles

FNA = frequency of the most frequent allele

Ho = observed heterozygosity

He = expected heterozygosity

PIC = polymorphism information content

* $P < 0.05$, significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)

Stevanovic et al. (2010)
Czech J Anim Sci

PEDIGRE ŠAR-PLANINCA koorišćenjem ISAG panela mikrosatelita za pse

Table 1. Characteristics of the investigated microsatellite loci in the Yugoslavian Shepherd Dog

Microsatellite marker	Observed size range (bp)	n_A	FNA	H_o	H_e	HWE	PIC
<i>PEZ01</i>	105–125	6	0.386	0.65347	0.74578	0.29382	0.70
<i>FHC2054</i>	144–176	9	0.471	0.71845	0.72067	0.37251	0.69
<i>FHC2010</i>	219–235	5	0.563	0.51456	0.57248	0.00580	0.50
<i>PEZ05</i>	96–112	5	0.480	0.57426	0.64130	0.02233	0.57
<i>PEZ20</i>	163–191	7	0.426	0.66019	0.72740	0.17231	0.68
<i>PEZ12</i>	261–301	10	0.240	0.73000	0.84000	0.01310	0.82
<i>PEZ03</i>	103–139	12	0.691	0.43299	0.50558	0.08701	0.48
<i>PEZ06</i>	171–219	10	0.275	0.75490	0.81054	0.73371	0.78
<i>PEZ08</i>	218–246	8	0.316	0.76699	0.78049	0.48234	0.74
<i>FHC2079</i>	262–290	6	0.432	0.57282	0.67866	0.00051*	0.63
Mean		7.8	0.428	0.63786	0.70229		0.659

n_A = number of alleles.

FNA = frequency of the most frequent allele.

H_o = observed heterozygosity.

H_e = expected heterozygosity.

PIC = polymorphism information content.

* $P < 0.005$, significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

PEDIGRE MAGARACA

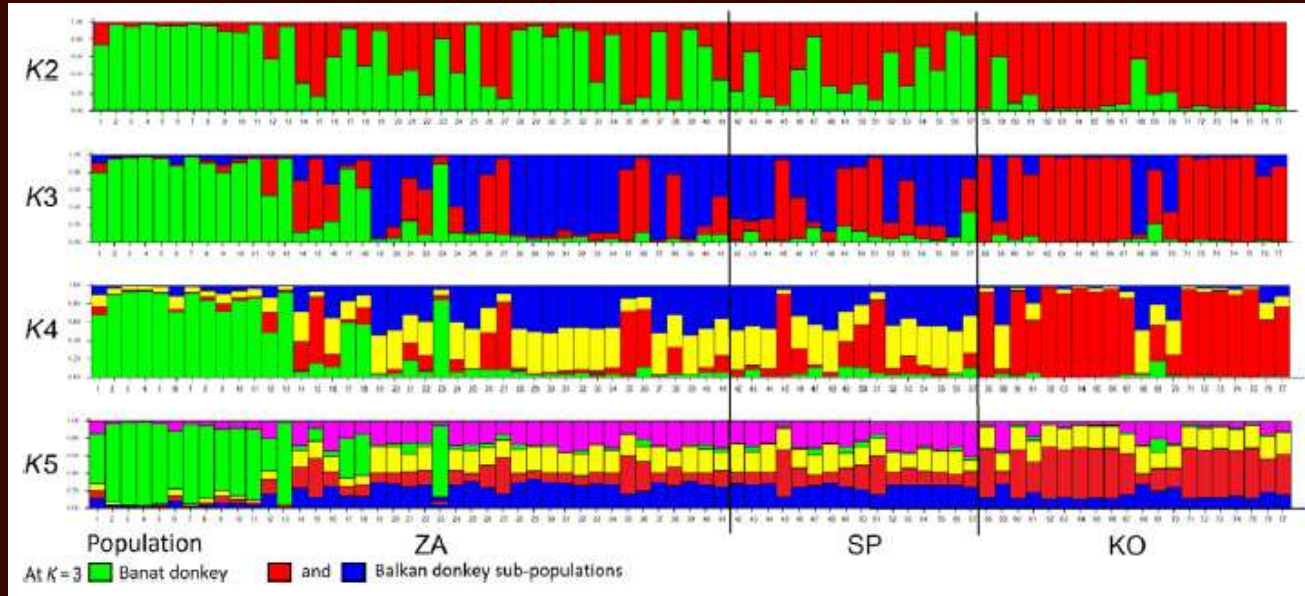
korišćenjem ISAG panela mikrosatelita za ekvide

Table 2. Characteristics of the 14 investigated microsatellite loci in the Domestic Balkan donkey

Locus	n_A	FNA	H_o	H_e	HWE	PIC
VHL20	7	0.532	0.59740	0.63908	0.00000	0.59
HTG4	3	0.534	0.79310	0.53660	0.00007	0.42
AHT4	11	0.230	0.86842	0.84873	0.00000	0.82
HMS7	4	0.961	0.05195	0.07631	0.05908	0.07
HTG6	5	0.466	0.44828	0.60165	0.02038	0.64
AHT5	13	0.337	0.58140	0.84460	0.00000	0.82
HMS6	8	0.455	0.80519	0.72116	0.03293	0.68
ASB23	8	0.286	0.94805	0.81470	0.00000	0.78
HTG10	12	0.253	1.00000	0.83017	0.00000	0.80
HTG7	10	0.313	0.91667	0.83770	0.00000	0.81
HMS3	12	0.243	0.94595	0.86229	0.00000	0.84
HMS2	8	0.440	0.65333	0.67714	0.00737	0.62
LEX3	8	0.649	0.40260	0.54826	0.00000	0.52
CA425	9	0.308	0.95890	0.80576	0.00000	0.77
Mean	8.42	0.429	0.71223	0.68886		0.65

n_A = number of alleles; FNA = frequency of the most frequent allele; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; PIC = polymorphism information content; * $P < 0.005$, significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

Analize porekla, genetičkog statusa i diverziteta balkanskog magarca analizom mikrosatelita i mtDNK



Stanišić *et al.* (2017)
Animal Genetics

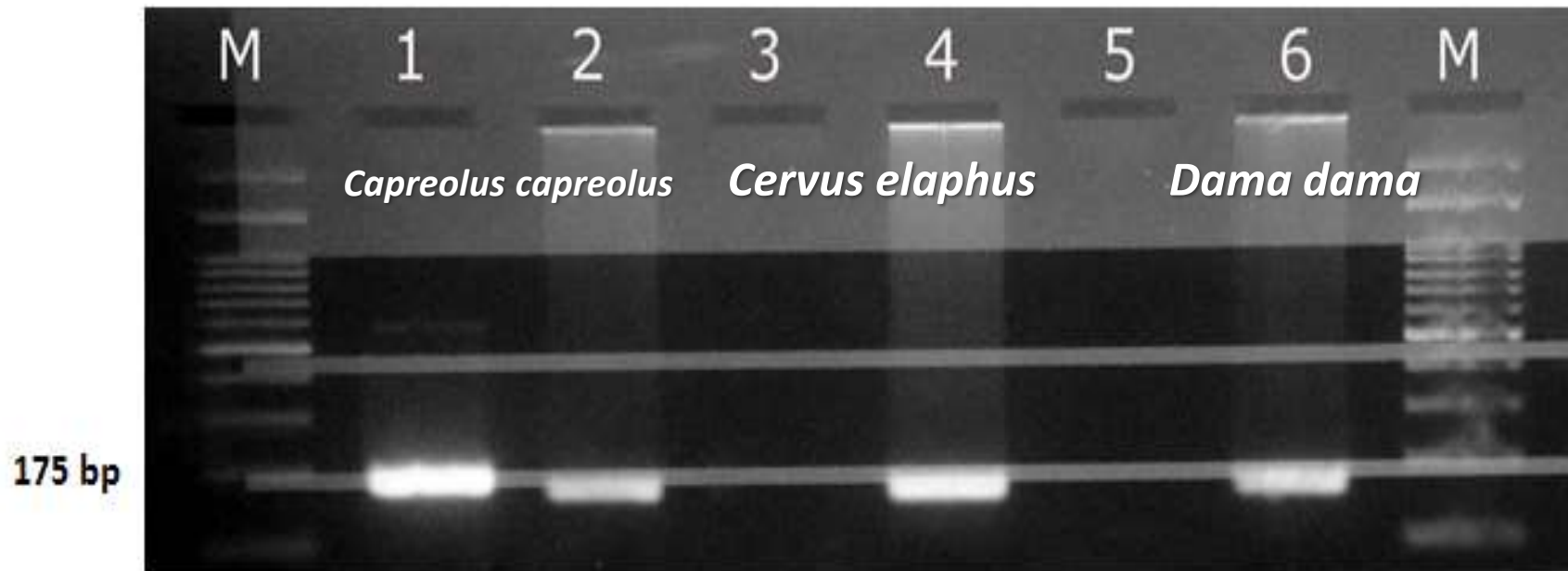


a) Balkanski magarac



b) Banatski magarac

Forenzičke analize specijskog porekla mesa



M, 100 bp marker;

1, uzorak;

2, K+;

3, uzorak

4, K+

M, 100 bp marker

5, uzorak

6, K+

Davitkov et al. (2017)
Acta Vet.



**Rezultati
analize CHD gena u
funkciji određivanja pola
kod ptica**

♂ ♀ ♀ ♀ ♂ ♂ ♀



♀ ♀ ♀ ♀ ♂ ♂ ♀

Vučićević *et al.* (2013) *Zoo Biology*

Prenatalna determinacija pola kod domaćih životinja

Ultrazvučna dijagnostika

Nedostaci:

↑ ***56. do 98. dan graviditeta
uspešnost***

Prednosti:

***Dobijanje rezultata
u toku pregleda***



Ograničenja tehničke prirode:

- *Performanse aparata*
- *Iskustvo pregledača*

Cena pregleda

Neinvazivno?

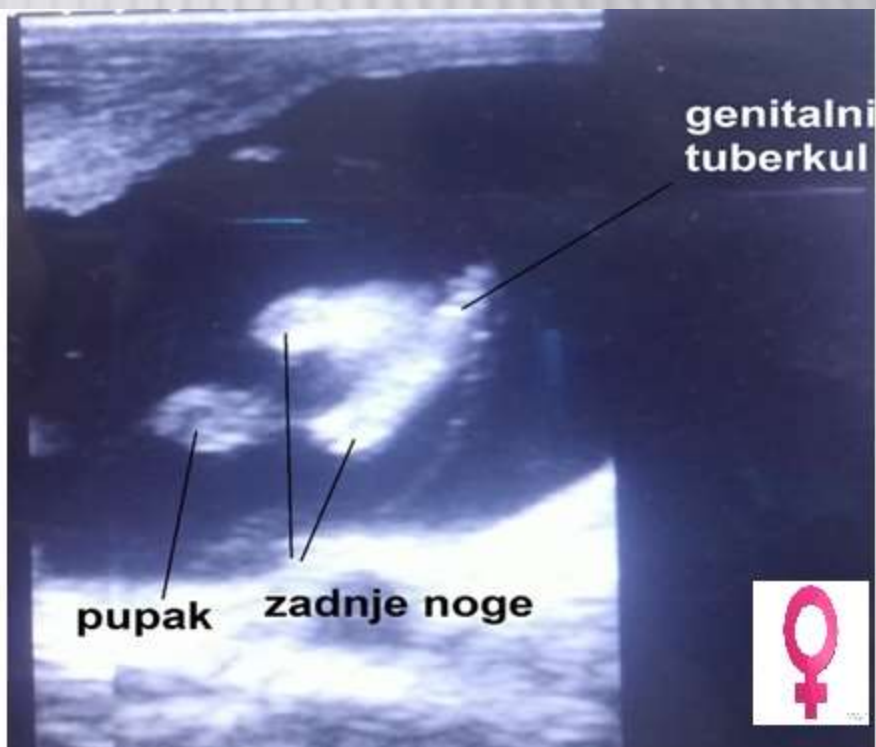
Neinvazivno?

***Tokom negativne faze graviditeta
pol ploda je teško utvrditi***

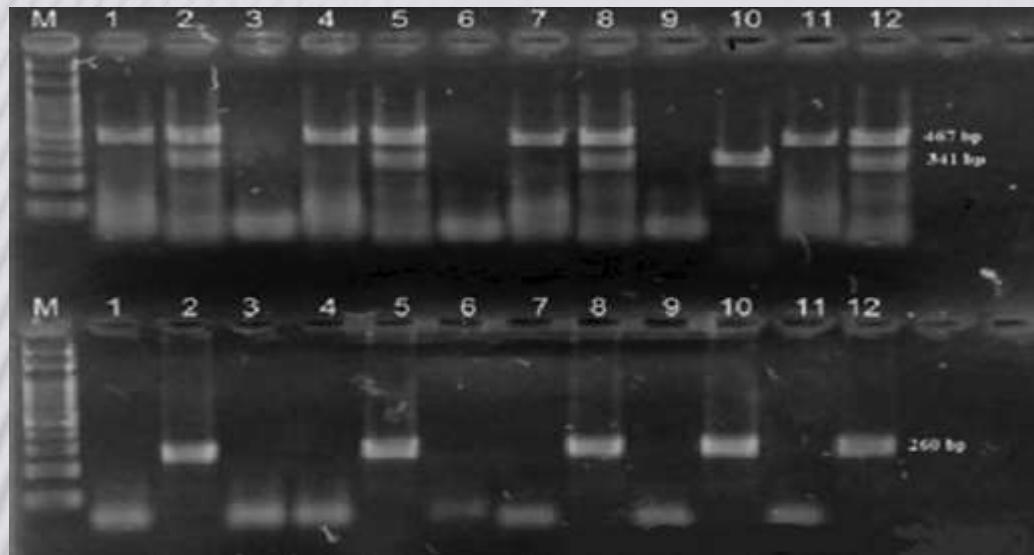
Prenatalna determinacija pola kod domaćih životinja

Ultrazvučna dijagnostika

Genitalni tuberkul!!!

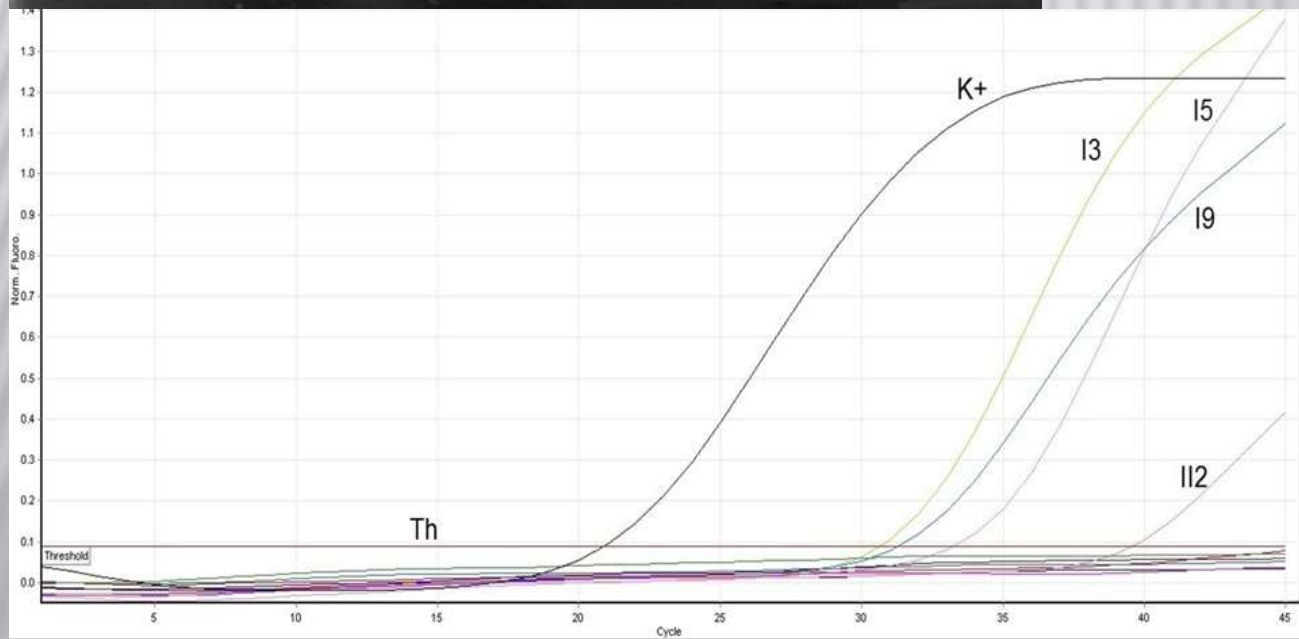


Prenatalna determinacija pola kod domaćih životinja analizom *ccffDNA* (*circulating cell-free fetal DNA*)



Konvencionalnom PCR metodom

Real-time PCR metodom,
(Ristanic et al. 2018;
*Reproduction in Domestic
Animals* 53 (4) 947-954.)





Analiza diverziteta pčela sa šireg područja Balkana

- **Srbija,**
- **Bosna i Hercegovina**
- **Makedonija**



analizom

COI genskog segmenta *mtDNK*
(PCR, sekvencioniranje + **RFLP**
primenom enzima *Nco I* i *Sty I*)

Stevanović *et al.* (2010) *Russ J Genet*

Ispitivanje diverziteta i haplotipizacija pčela sa 4 regiona u Srbiji analizom intergenskog *tRNA^{Leu-cox2}* regiona

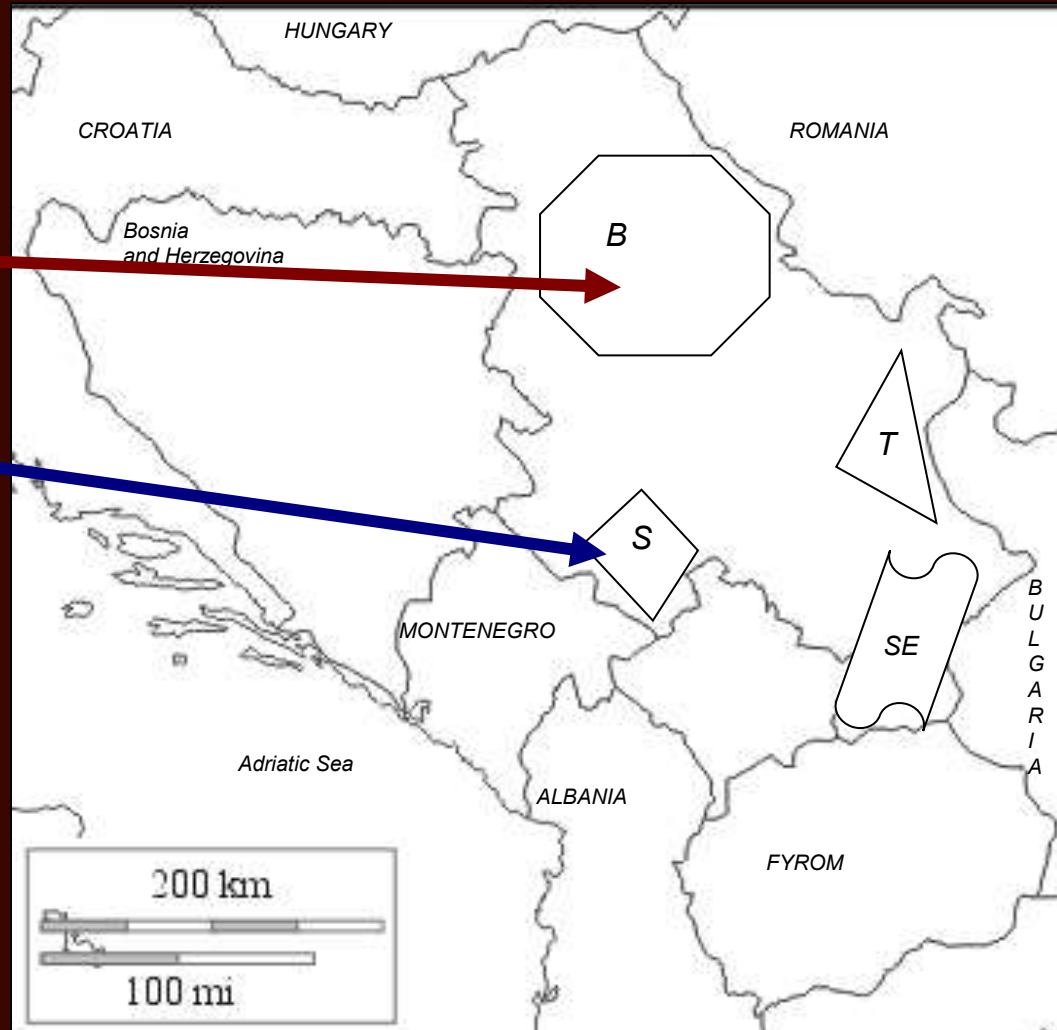
Dva novoopisana haplotipa imaju ograničeno rasprostranjenje i to:

*-**C2o** u Banatskom regionu,*

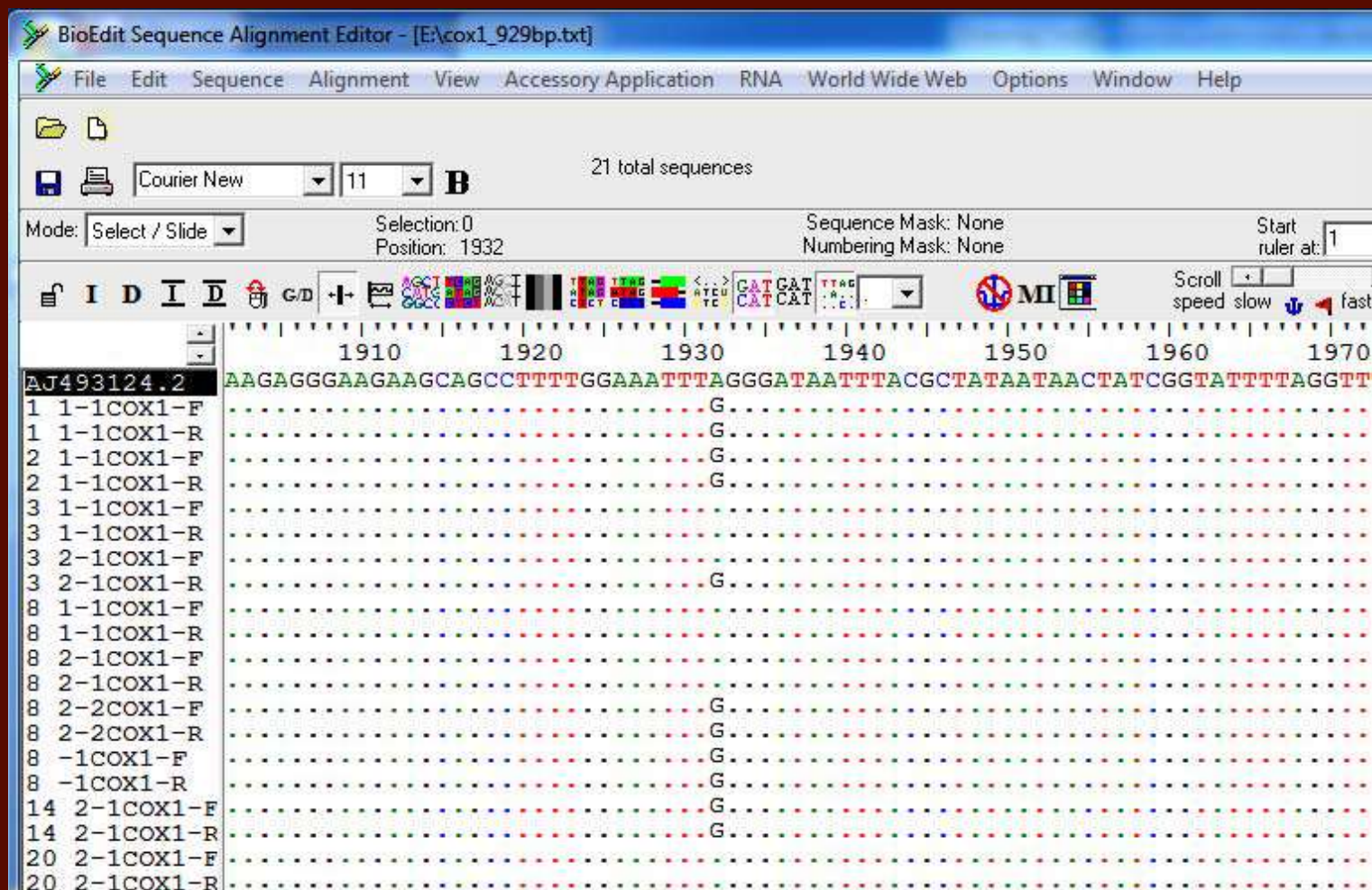
*-**C2p** u Sjeničko-Peštarskom regionu*

odnosno karakteristični su za Banatski i Sjeničko-Peštarski ekotip

Muñoz I, Stevanovic J,
Stanimirovic Z, De la Rúa P
(2012) *J Apic Sci*

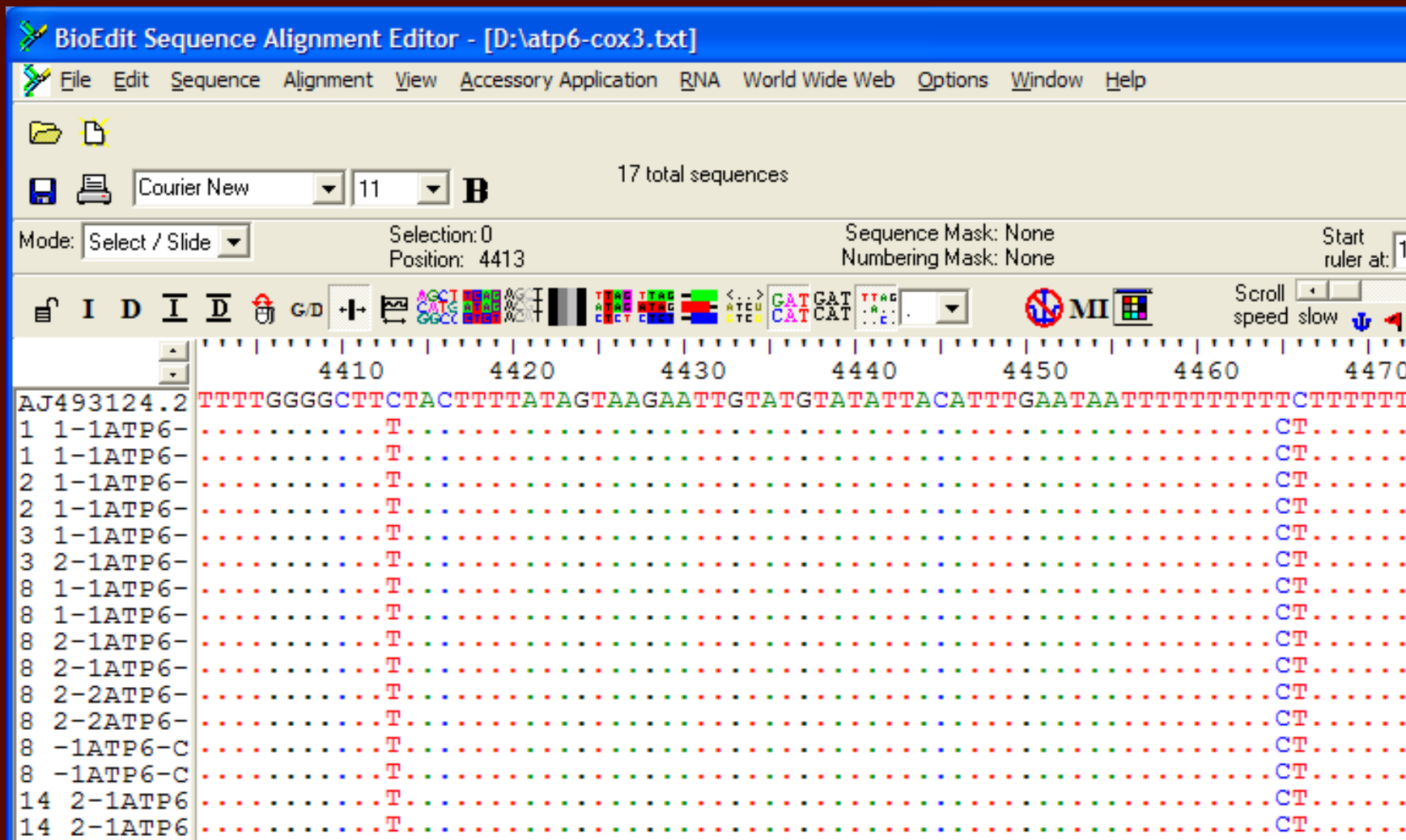


Genotipizacija krpelja *Varroa destructor* analizom visoko konzerviranih sekvenci mtDNK



*Varijabilnost u okviru sekvence **cox1** gena*

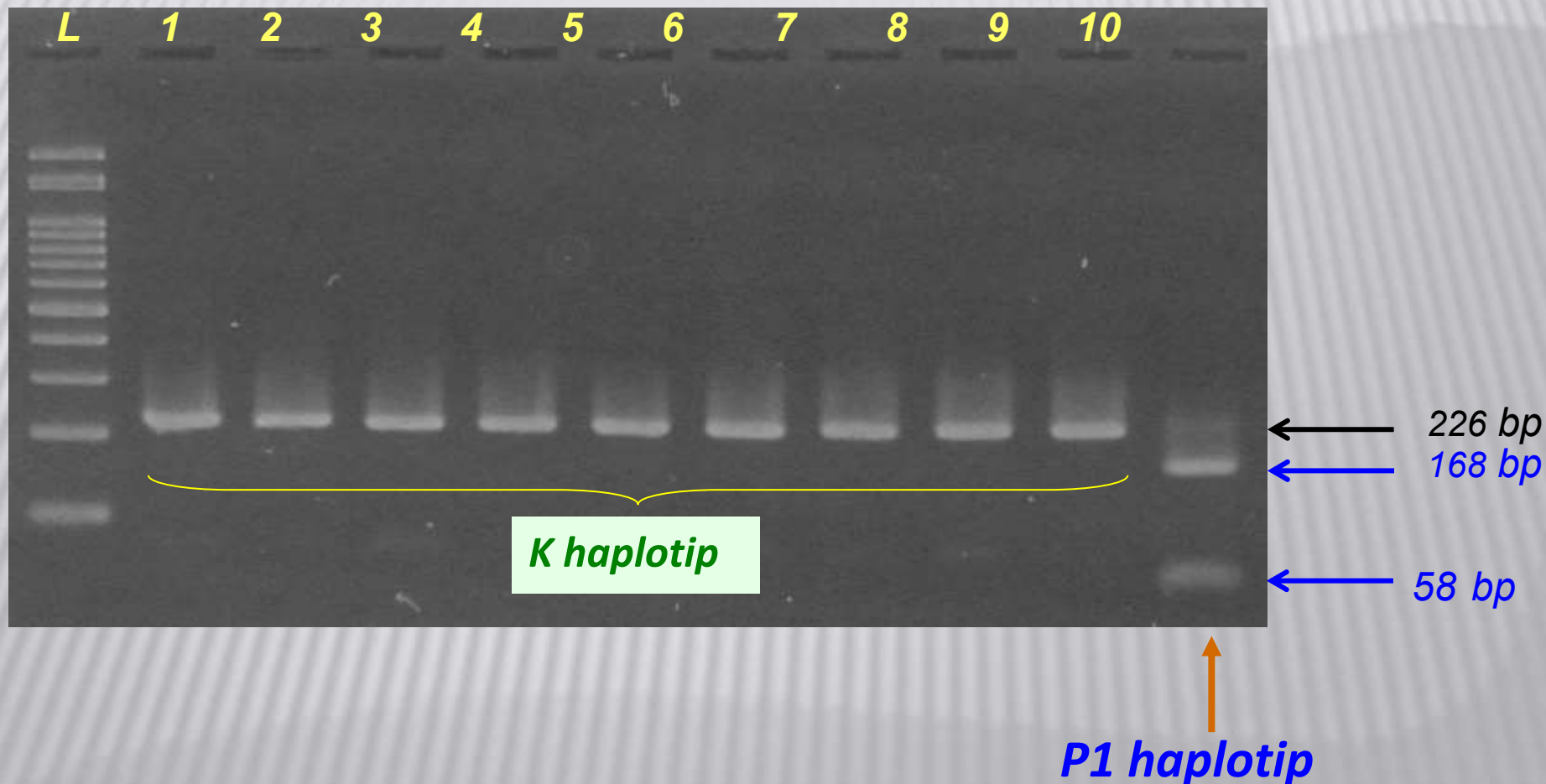
Gajić et al. (2013) *Exp Appl Acarol*



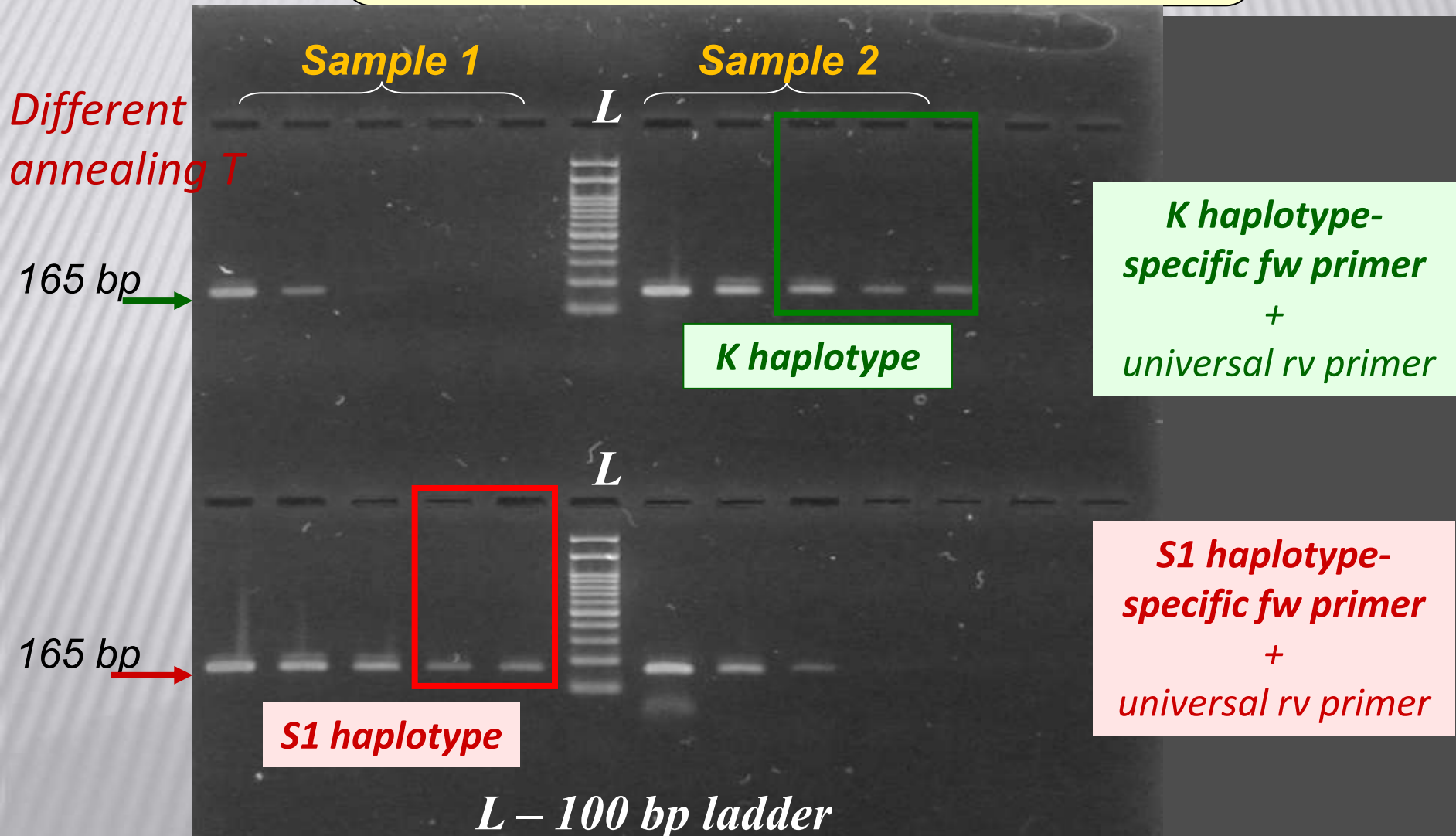
Varijabilnost u okviru sekvence cox3 gena

Gajić et al. (2013) Exp Appl Acarol

Diferencijacija **K** i **P1** haplotipa pomoću **RFLP** metode



*Razlikovanje **K** i **S1** haplotipova
putem ARMS gradient PCR metode*



UTVRĐIVANJE PRISUSTVA I SPECIJSKA IDENTIFIKACIJA *Thelazia callipaeda* – UZROČNIKA TELAZIOZE

Table 2. *T. callipaeda* burden in infected animals of different breed, age, sex and purpose in Serbia

Locality	Species/Breed	Age (year)	Sex (m/f)*	Animal purpose	Parasite localization	Number of parasites	
						Total	m/f*
Umka	cat/domestic	3	f	pet	left eye	7	1/6
Kladuzovo	dog/Samoyed	1.5	m	pet	left eye	91	32/59
Užice	dog/crossbreed	3	m	pet	both eyes	17	5/12
Požega	dog/Epagneul breton	8	m	hunting dog	both eyes	150	42/108
Kruševac	cat/domestic	2	f	pet	left eye	11	3/8
Brvenik	dog/Sharplanina**	3	m	pet	left eye	9	2/7

* m-male; f-female; ** Yugoslavian shepherd dog-Sharplanina



Figure 3. Posterior end of *T. callipaeda* male with unequal spicules; Figure 4. Anterior end of *T. callipaeda* female with vulva (A) and oesophago-intestinal junction (B)



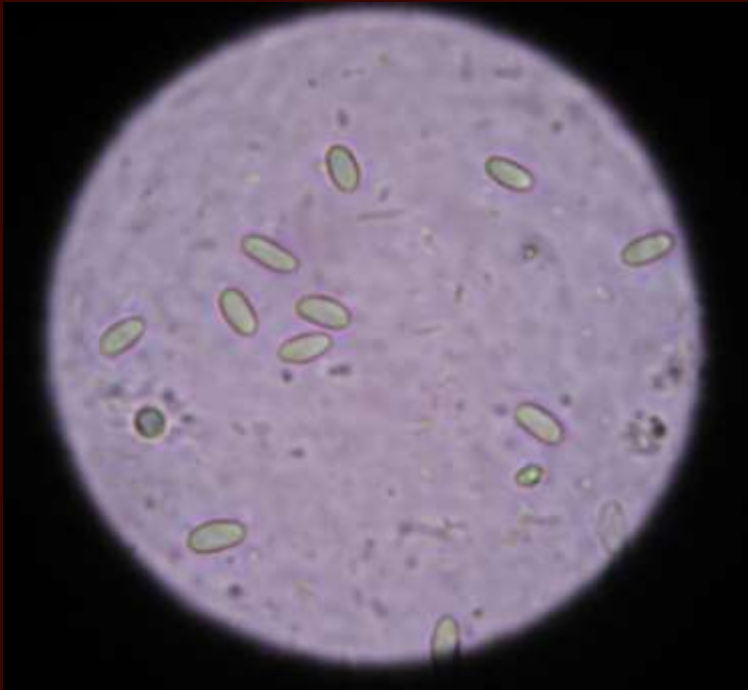
Figure 2. Eye of an infected dog with numerous adults of *T. callipaeda*

Gajić et al. (2014) Acta Vet

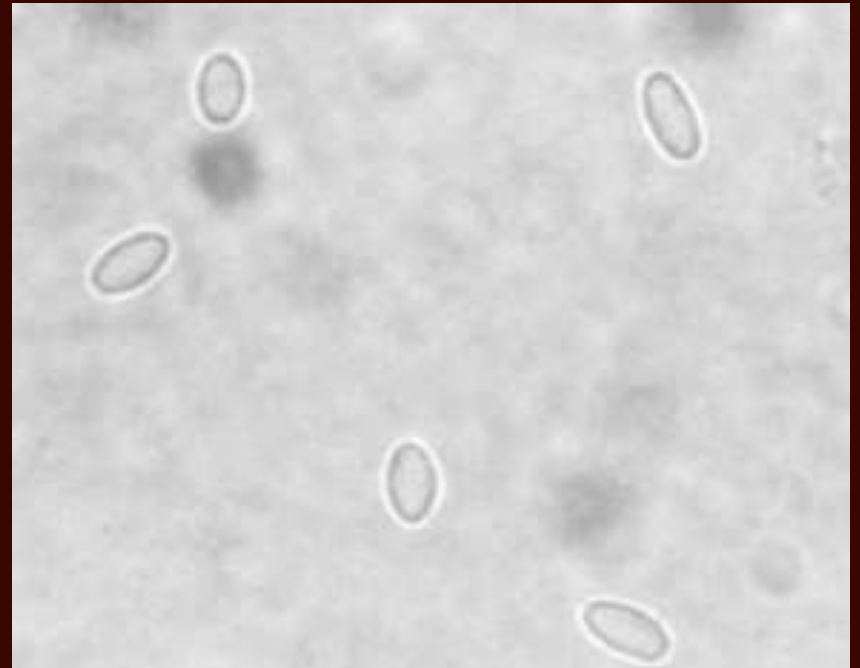
*Analiza pčela na prisustvo nozeme – (mikrosporidija **Nosema sp.**)*

Nativna mikroskopija

Nosema sp.



Stevanović et al. (2013)
Apidologie



Fries et al. (2013)
THE COLLOS BEEBOOK

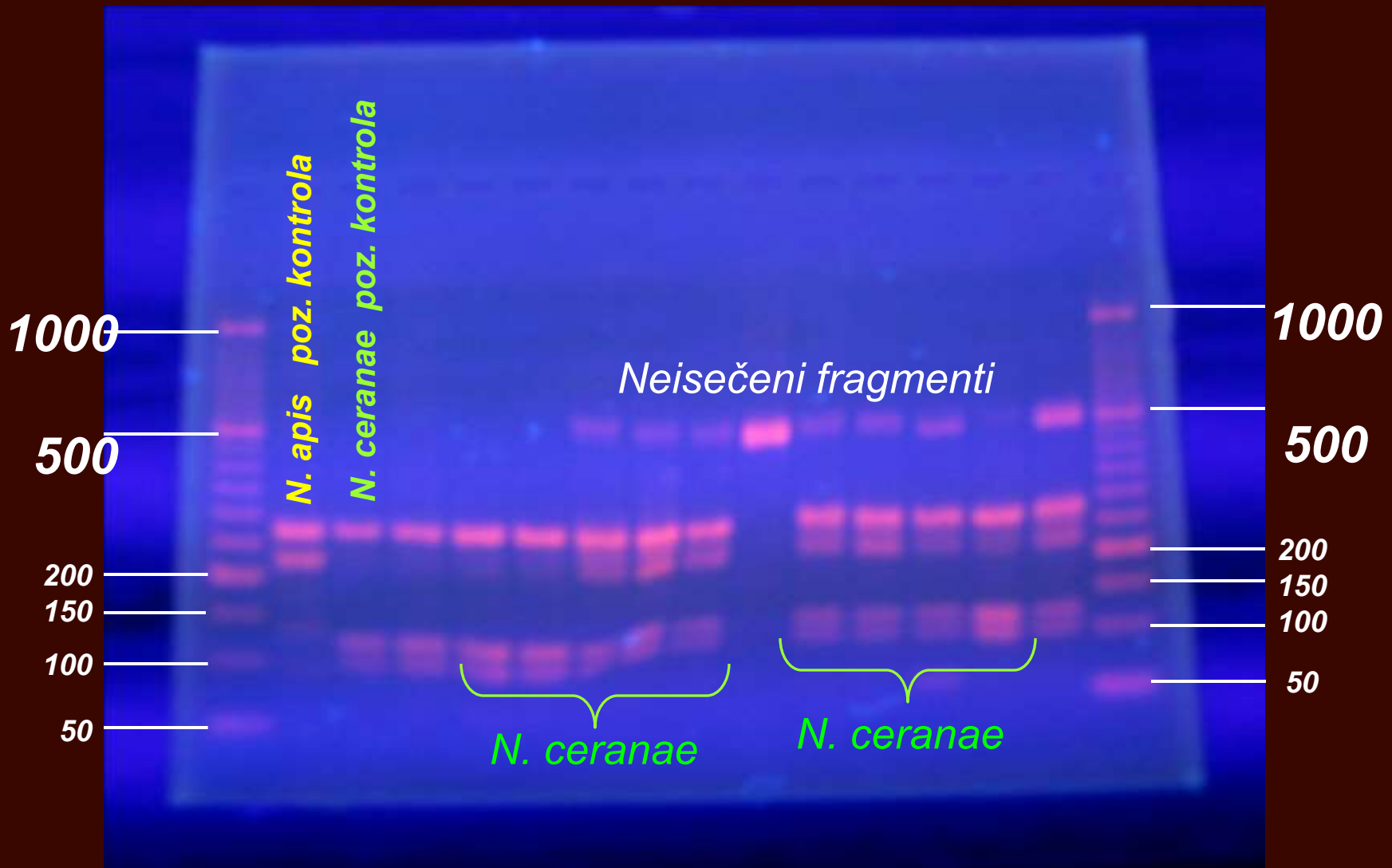
Specijska identifikacija

N. apis – **N. ceranae**

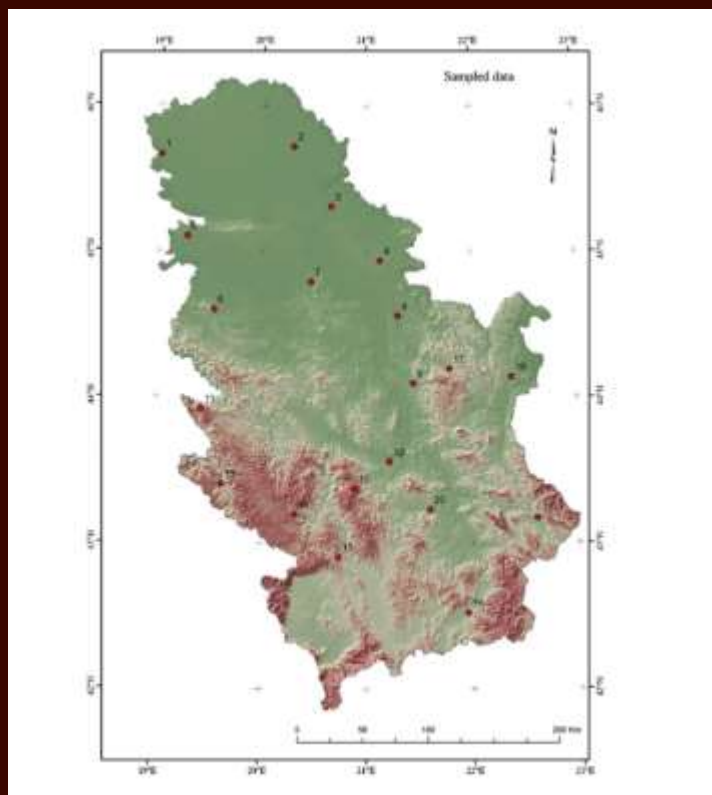
PCR-RFLP

*Stevanović et al. (2011) Apidologie
metodologija uvrštena u*

Fries et al. (2013) COLLOS BEEBOOK



Komparacija i optimizacija metoda dijagnostike nozeme za potrebe analize sezonalnosti i dinamike nozemoze



<i>N. ceranae</i>		2008			2009			2010			2011			2012	
Colonies	incidence	March	June	October	March	June	October	March	June	October	March	June	October	March	June
<i>N. ceranae</i> -positive	Number	188	156	166	190	152	158	196	146	152	192	170	174	192	182
	%	94	78	83	95	76	79	98	73	76	96	85	87	96	91
<i>N. ceranae</i> -negative	Number	12	44	34	10	48	42	4	54	48	8	30	36	8	18
	%	6	22	17	5	24	21	2	27	24	4	15	13	4	9
Total	Number	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

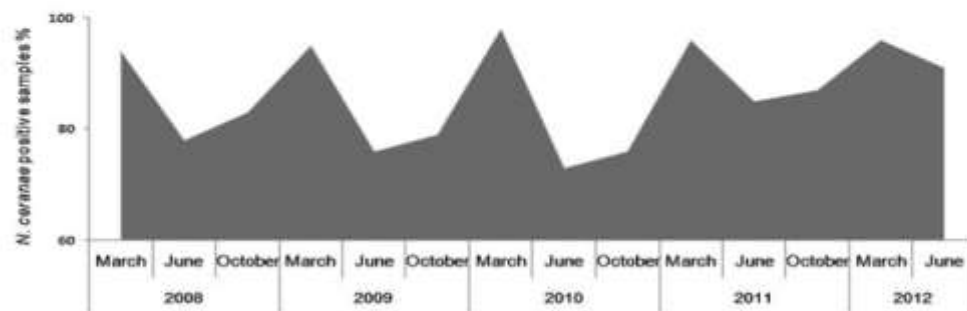
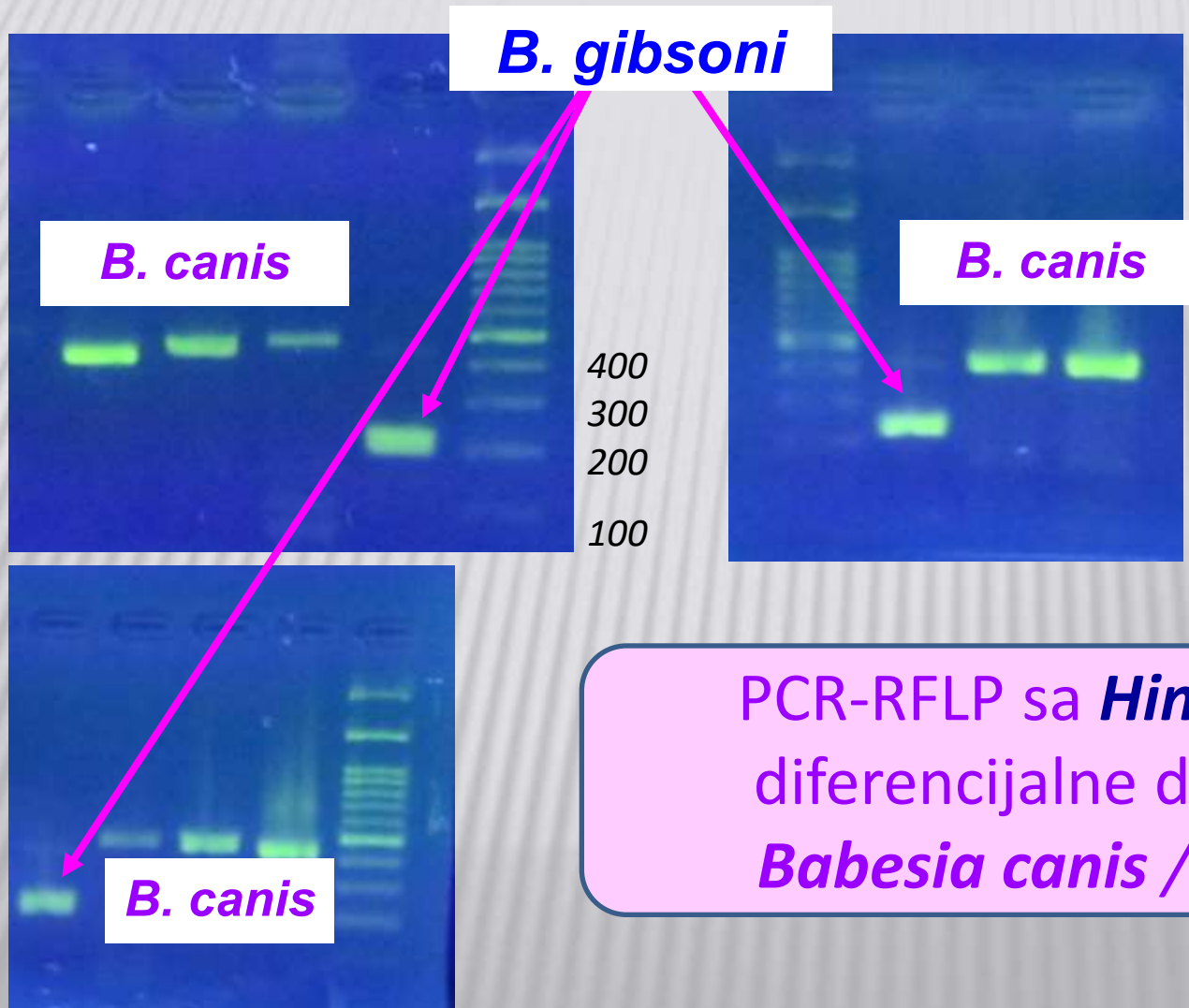


Figure 2. The incidence of *N. ceranae* infected honey bee colonies in Serbia at three sampling months during the period March 2008–June 2012 (based on PCR analyses of live bee samples).

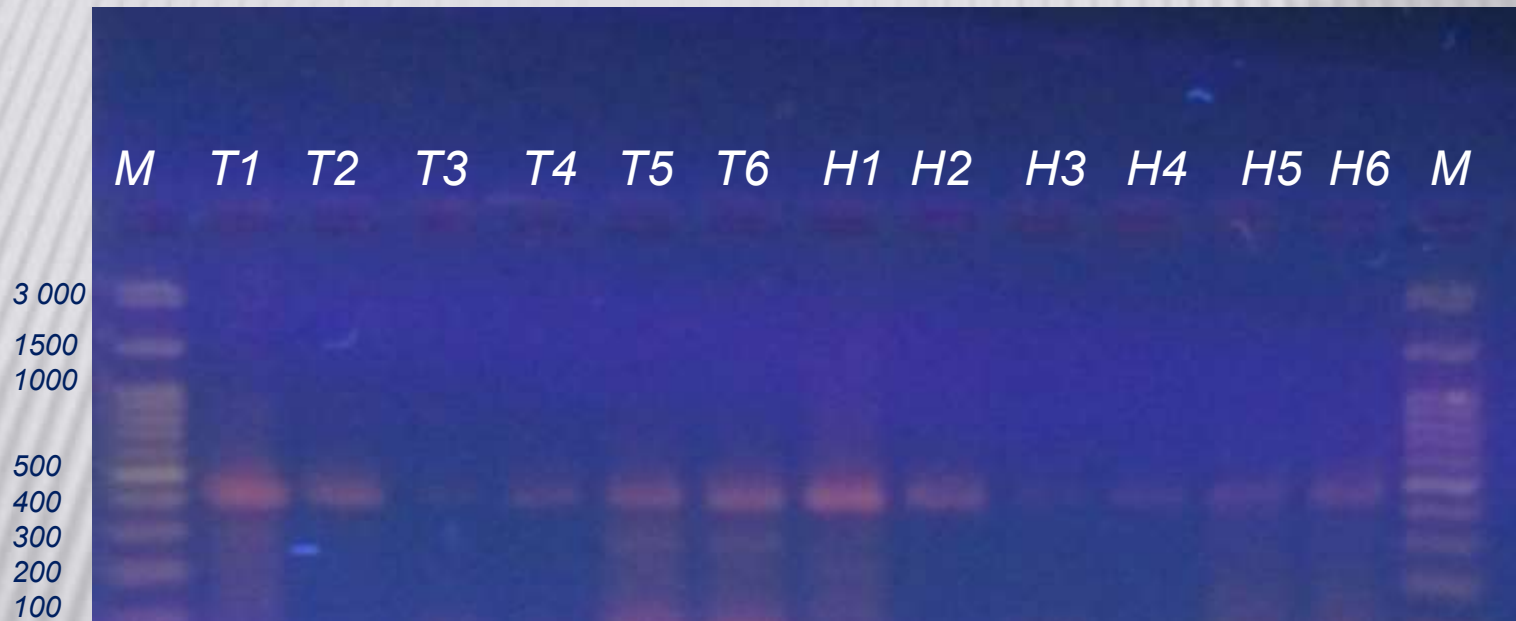
PCR-RFLP sa *TaqI* i *HinfI* radi detekcije i
specijske identifikacije *Babesia sp.*
kod PASA na teritoriji Beograda



PCR-RFLP sa ***HinfI*** u funkciji
diferencijalne dijagnostike
Babesia canis* / *B. gibsoni

PCR-RFLP sa *TaqI* i *HinfI* radi detekcije i specijske identifikacije *Babesia* sp.

T - *TaqI*
H - *HinfI*



Nakon digestije sa oba enzima utvrđeno je
da su svi uzorci inficirani samo vrstom
Babesia canis

Molekularna detekcija i prevalenca *Theileria equi* i *Babesia caballi* kod konja na teritoriji centralnog Balkana

Table II. Prevalence of equine piroplasms (*Theileria equi* and/or *Babesia caballi*) according to possible risk factors

Factor	N	<i>T. equi</i>		<i>B. caballi</i>		<i>T. equi</i> and <i>B. caballi</i>	
		n	%	n	%	n	%
Location							
Dimitrovgrad (Serbia)	26	24	92.3 ^{a,b,c,d,e,f}	0	0	1	3.8
Zobnatica (Serbia)	29	0	0 ^a	0	0	0	0
Belgrade (Serbia)	24	0	0 ^b	0	0	0	0
Sabac (Serbia)	15	2	13.3 ^c	0	0	0	0
Zivinice (BiH)	24	4	16.7 ^d	1	4.2	0	0
Berane (Montenegro)	15	0	0 ^e	2	13.3	0	0
Bijelo polje(Montenegro)	9	2	22.2 ^f	0	0	0	0
Sex							
Male	70	7	7 ^a	2	2.9	0	0
Female	72	25	34.7 ^a	1	1.4	1	1.4
Age							
<5 years old	75	19	25.3	3	4	0	0
>5 years old	67	13	19.4	0	0	1	1.5
Activity							
Farming	103	32	31 ^a	3	2.9	1	1
Racing	38	0	0 ^a	0	0	0	0

N: number of horses tested for infection; n: number of positive horses; %: prevalence of infection; Values significantly different ($p<0.05$) between locations or associated factors are labeled with the same letter (^{a, b, c, d, e or f})

Analiza oksidativnog stresa i oštećenja DNA kod konja prirodno inficiranih sa *Theileria equi*

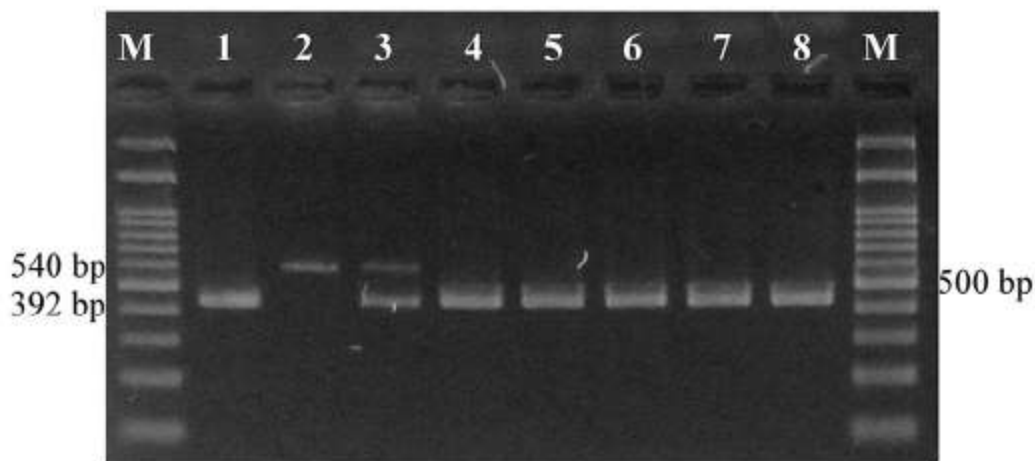
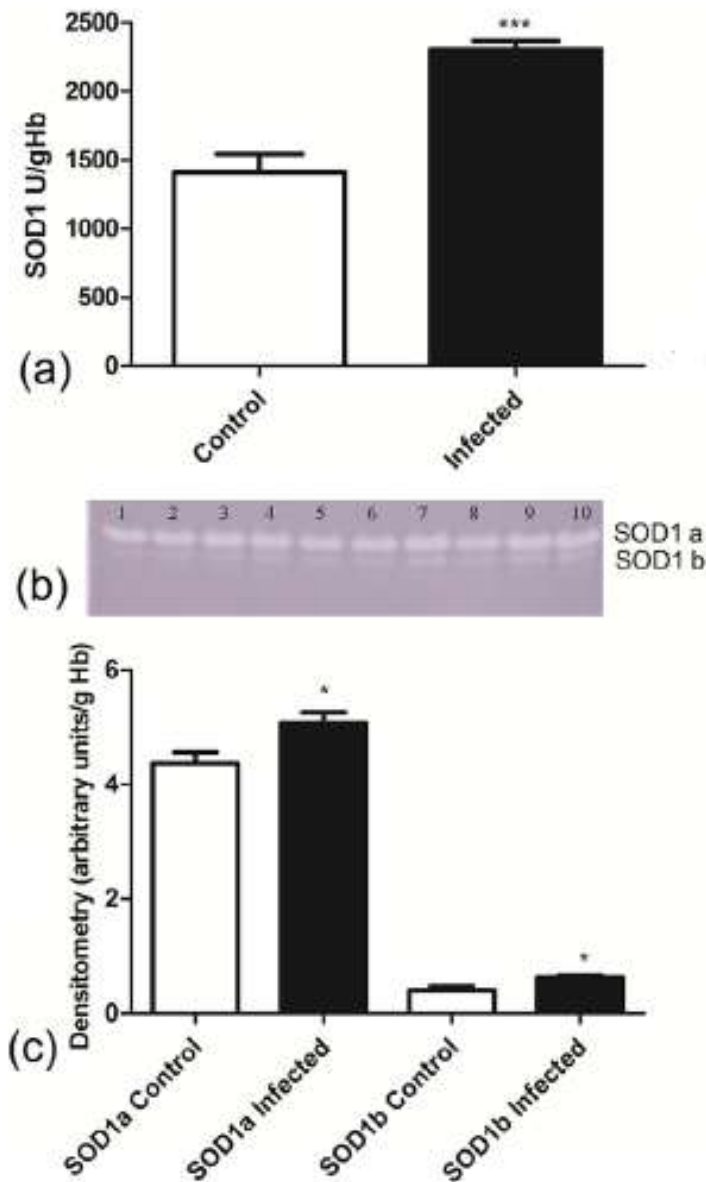


Fig. 1. Duplex PCR detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi*. M, 100 bp ladder DNA marker; lane 1, positive control for *T. equi*; lanes 2, positive control for *B. caballi*; lane 3, positive control for mixed infection; lanes 4–8, specimens infected with *T. equi*. The sizes of the positive bands are indicated on the left.



Molekularne analize prevalence *Theileria equi* i *Babesia caballi* kod balkanskih magaraca

Intra-herd and total prevalence of <i>Theileria equi</i> and <i>Babesia caballi</i> using molecular testing				
Herd	Location	Number of donkeys	PCR prevalence of <i>T. equi</i>	PCR prevalence of <i>B. caballi</i>
1	Zasavica	25	64% (16/25)	0%
2	Stara planina	25	48% (12/25)	0%
3	Kovilj	20	35% (7/20)	0%
Total		70	50% (35/70)	0%

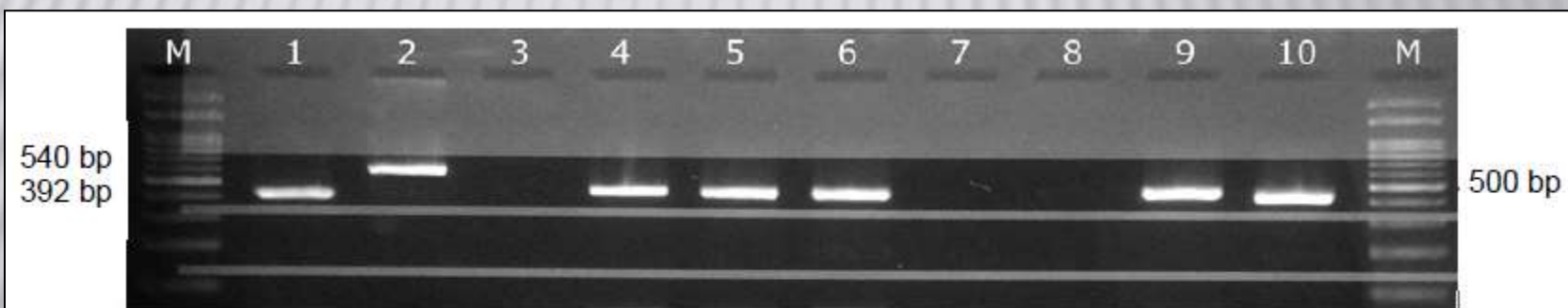


Fig. 2. Multiplex PCR detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi*. M: 100-bp ladder DNA marker; lane 1: positive control for *T. equi*; lane 2: positive control for *B. caballi*; lane 3: negative control; lanes 4, 5, 6, 9 and 10: specimens infected with *T. equi*; lanes 7 and 8: negative specimens. The sizes of the positive bands are indicated on the left

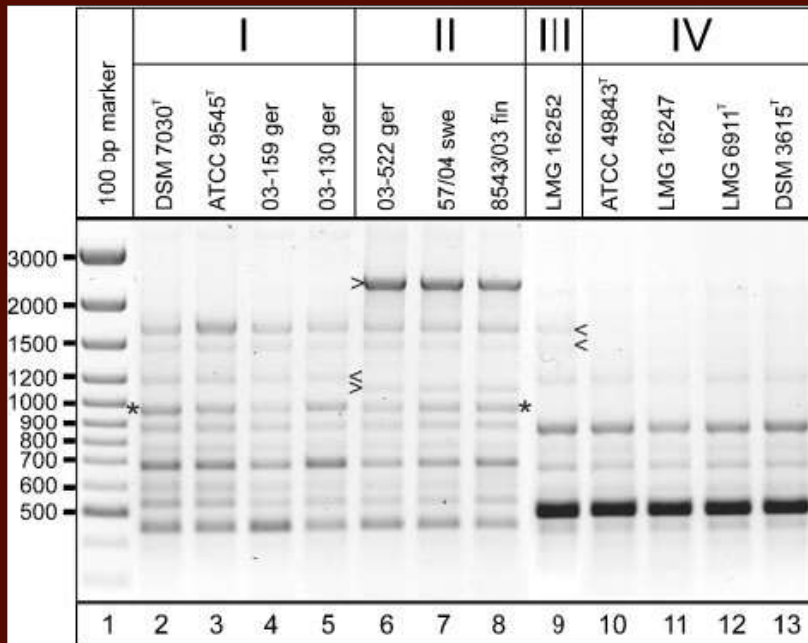
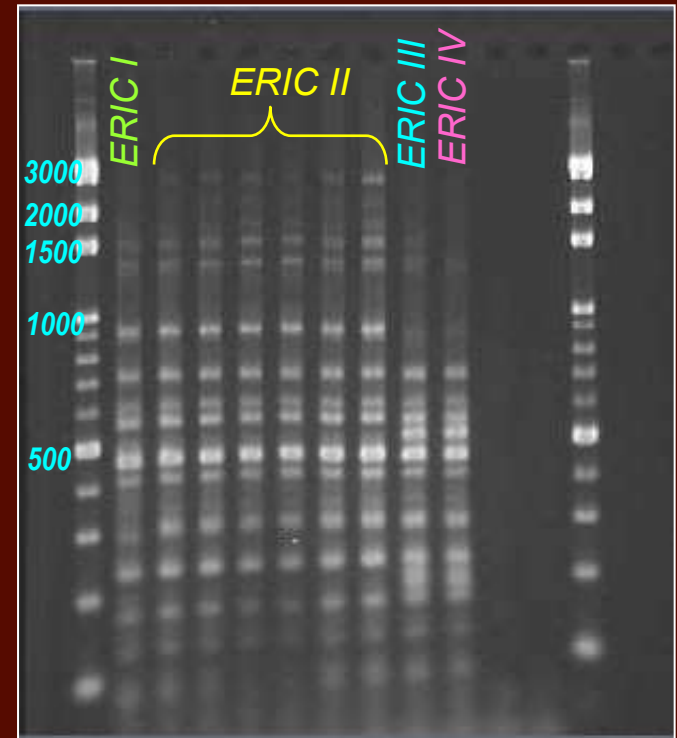
otkriva različite genotipove
bakterije **P. larvae**.

Opisana su 4 različita genotipa

*Ashiralieva and Genersch
(2006) Apidologie*

Identifikacija genotipa P. larvae, je
značajna za procenu patogenosti soja
i prognozu toka bolesti.

Forsgren et al. (2008)
Vet Microbiol



ERIC I

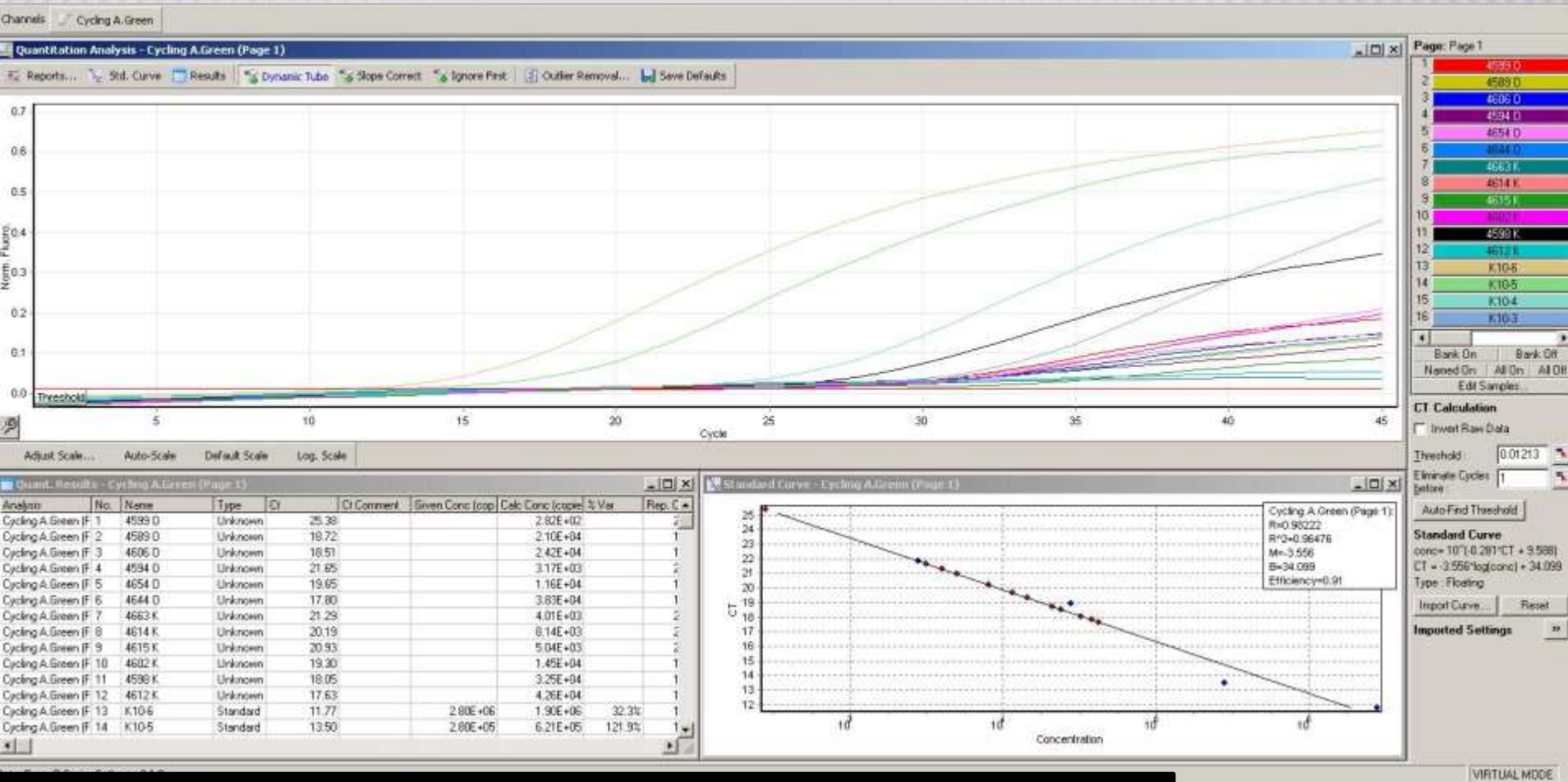
ERIC II

ERIC III

ERIC IV

MOLEKULARNO – GENSKA DETEKCIJA I KVANTIFIKACIJA GEN KOPIJA BAKTERIJE *Lawsonia intracellularis* KOD SVINJA

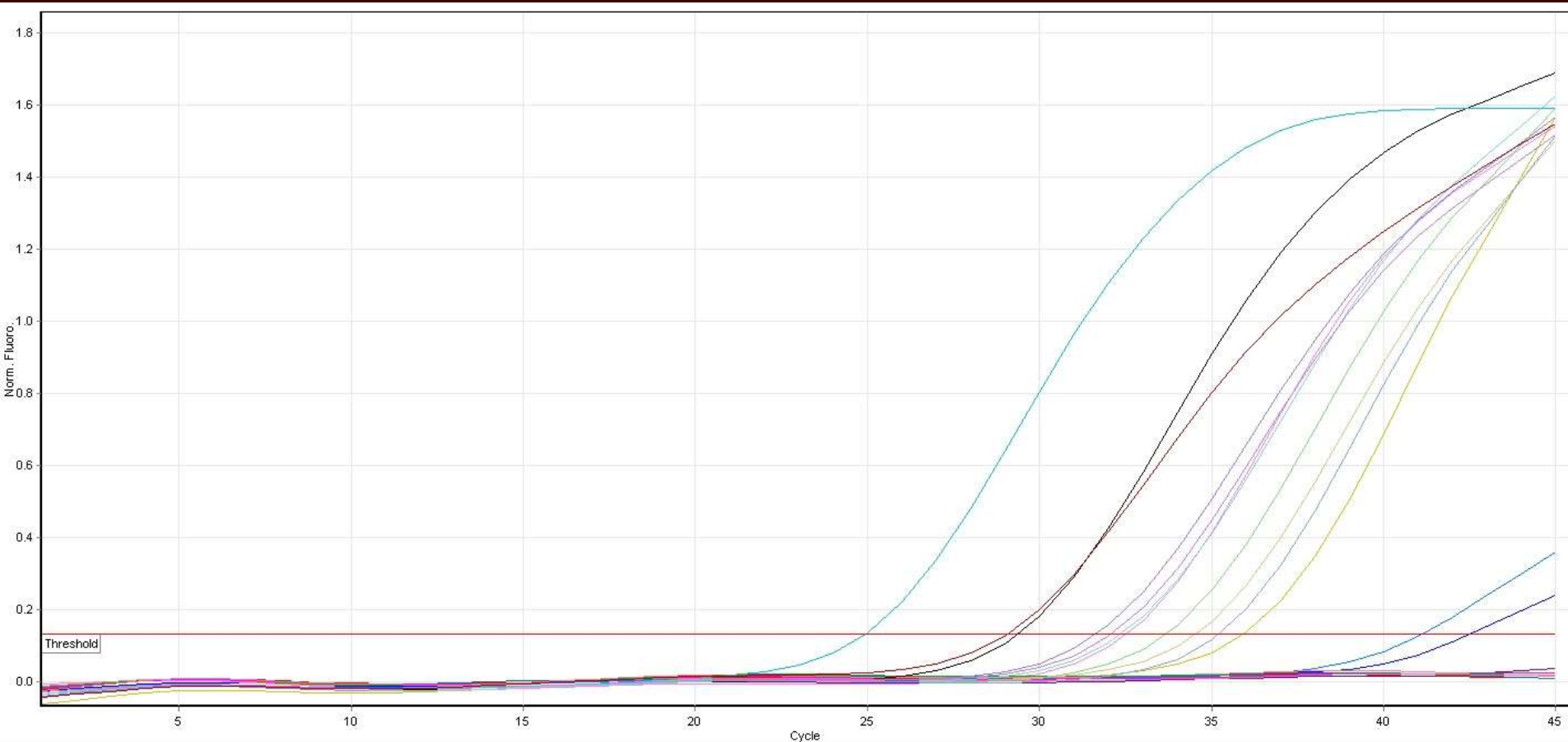
Real-time qPCR



*Prikaz rezultata kvantifikacije gen kopija bakterije *L. intracellularis**

Drašković et al.
2018

MOLEKULARNO – GENSKA DETEKCIJA I KVANTIFIKACIJA GEN KOPIJA BAKTERIJE *Brachyspira hyodysenteriae* KOD SVINJA *Real-time qPCR*

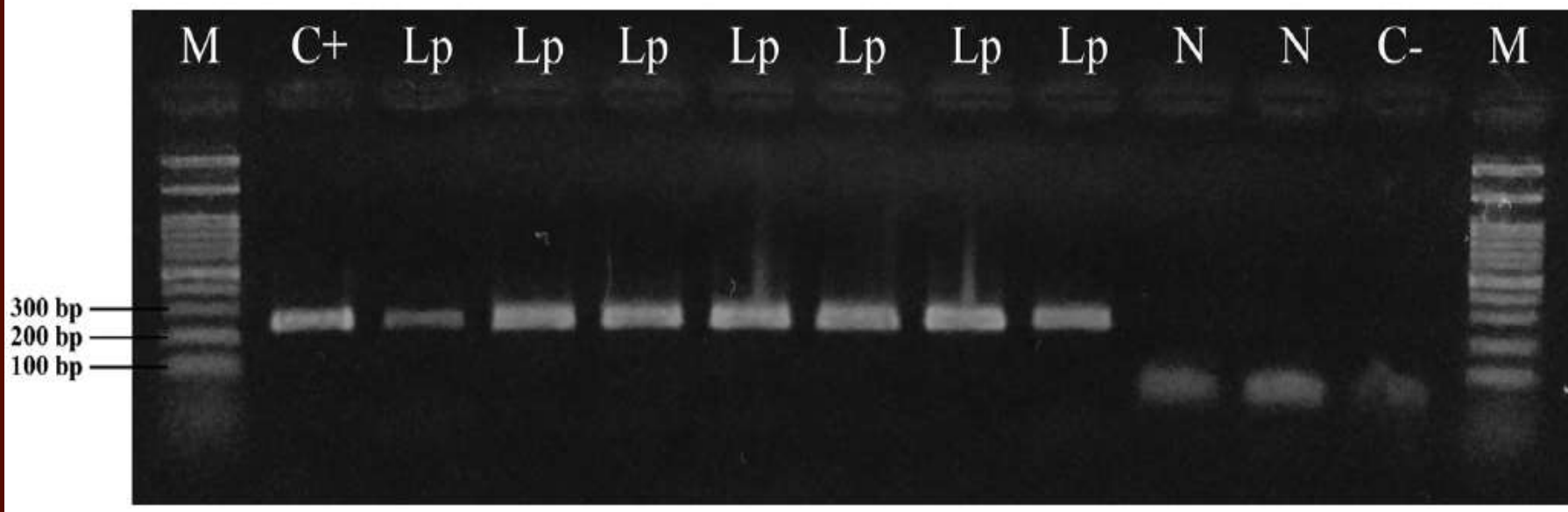


Delić et al. 2018.

Utvrdjivanje vrste protozoe (tripanozome)

***Lotmaria passim** kod pčela*

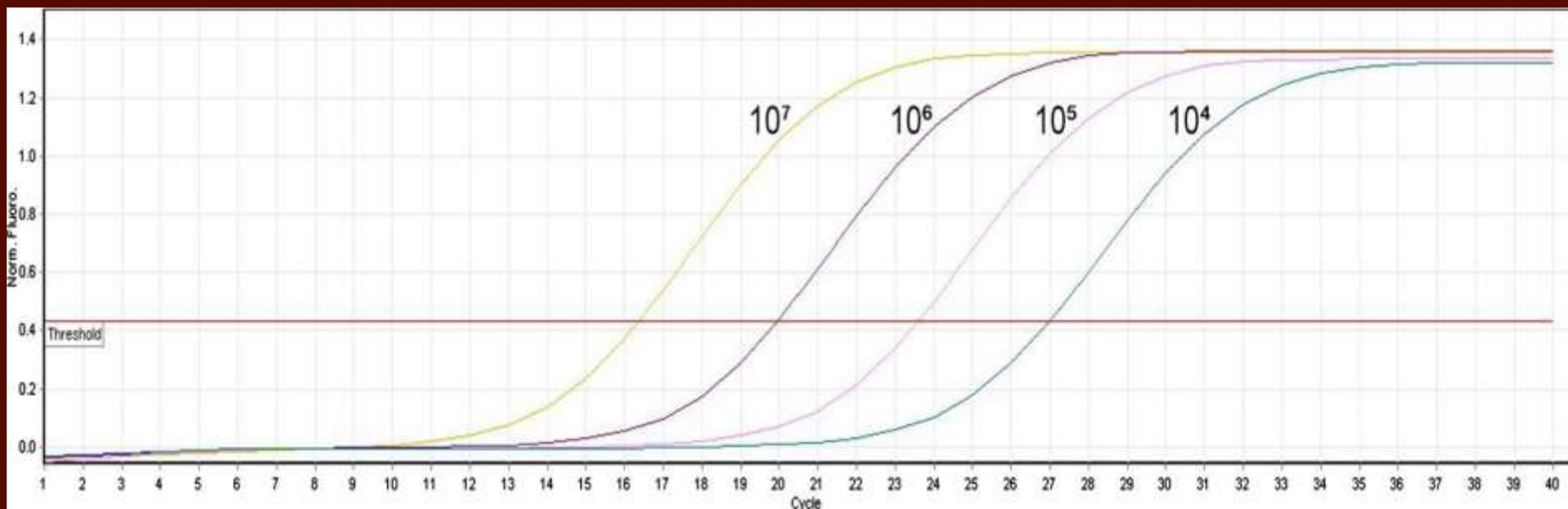
J. Stevanovic et al. / Journal of Invertebrate Pathology 139 (2016) 6–11



*Detekcija **Lotmaria passim** (Lp) u DNK izolatima uzoraka pčela iz Srbije*

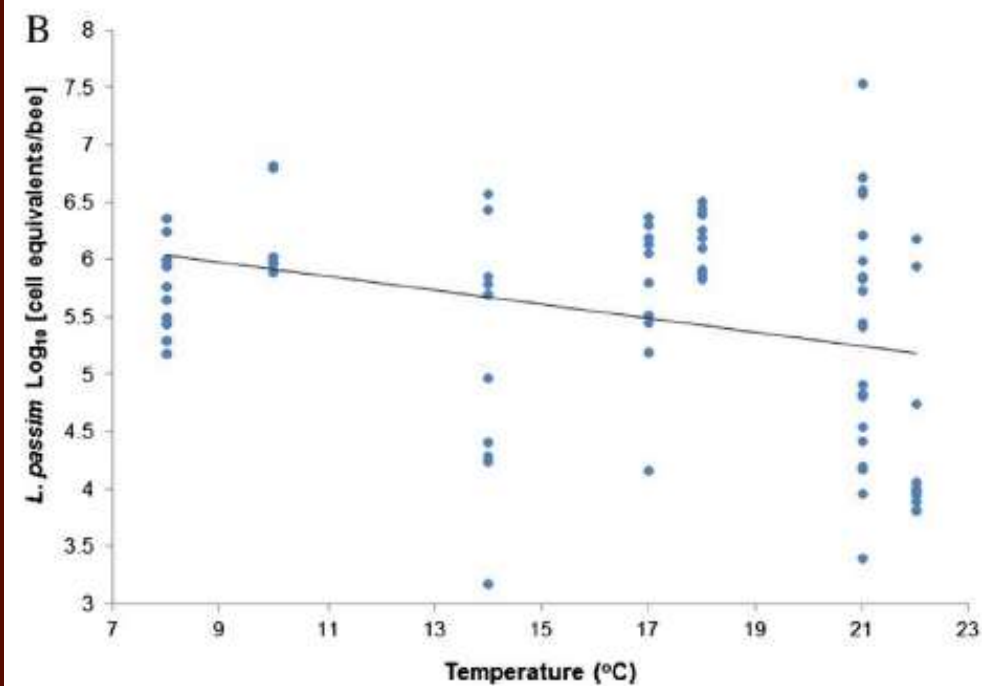
*Kolone: M, 100 bp marker; C+, pozitivna *L. passim* kontrola; 10⁻⁵; C-, negativna kontrola; Lp, PCR produkt uzoraka inficiranih sa *L. passim*; N, PCR produkt uzoraka bez *L. passim*. Gel je agarozni 1.5% i obojen etidijum bromidom.*

Kvantitativno određivanje protozoe *Lotmaria passim* kod pčela



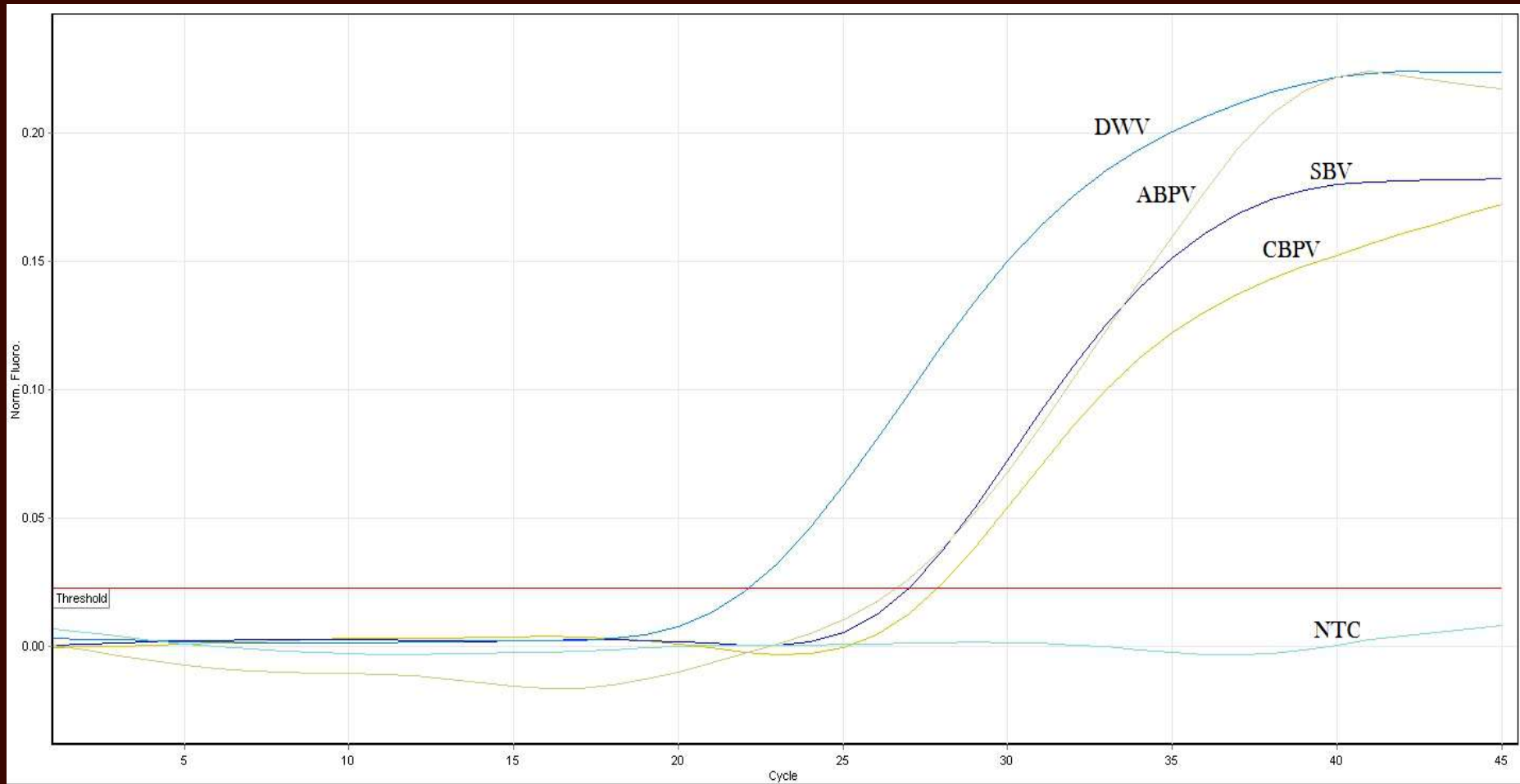
Real-time PCR

Vejnović et al. (2017)
J Invertebr Pathol

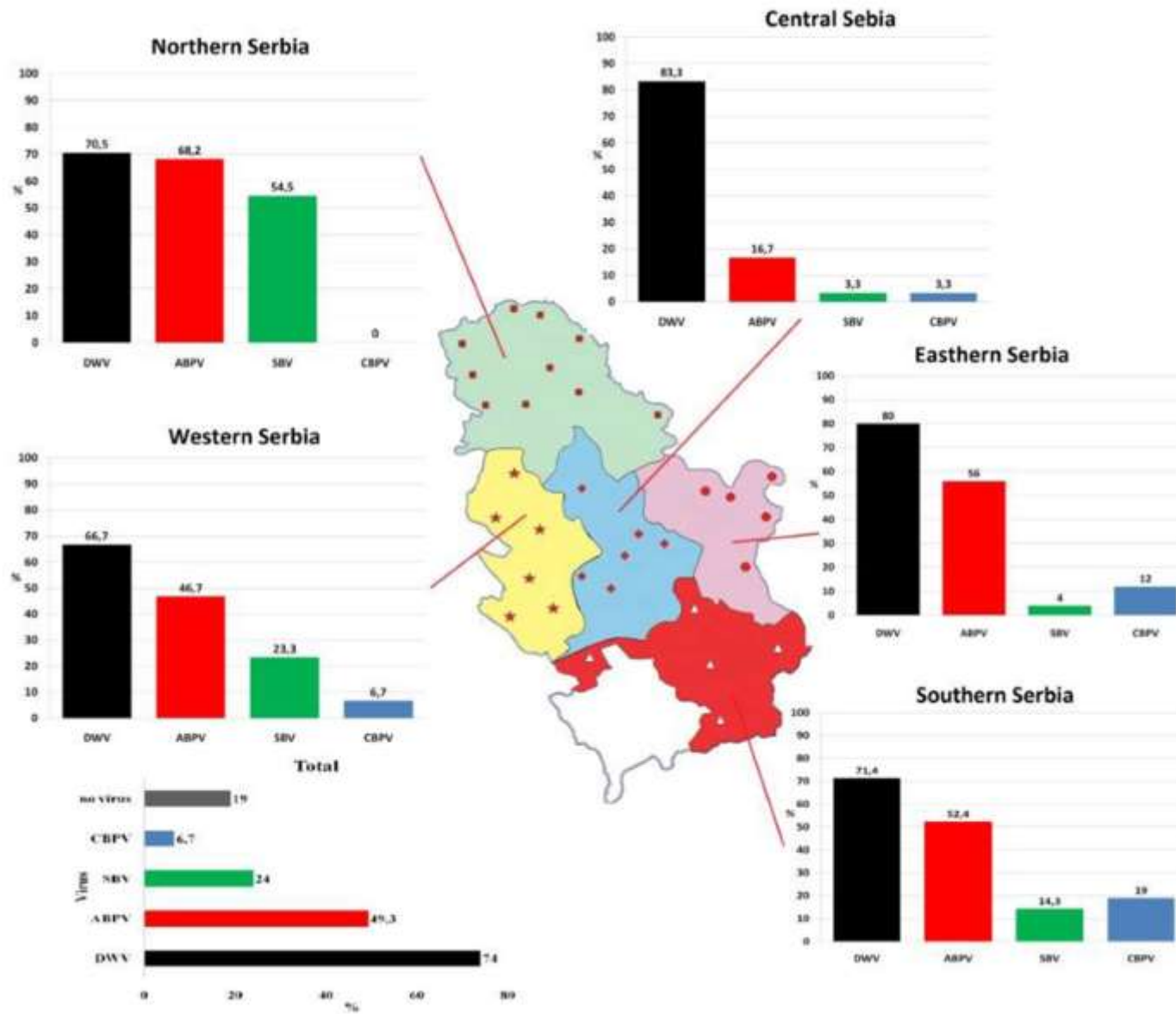


REAL-TIME PCR

Analiza pčela na prisustvo pčelinjih virusa DWV, ABPV, CBPV i SBV u Srbiji



Simeunović et al. (2014) *Acta Vet*;
Ćirković et al. (2018), *PeerJ*



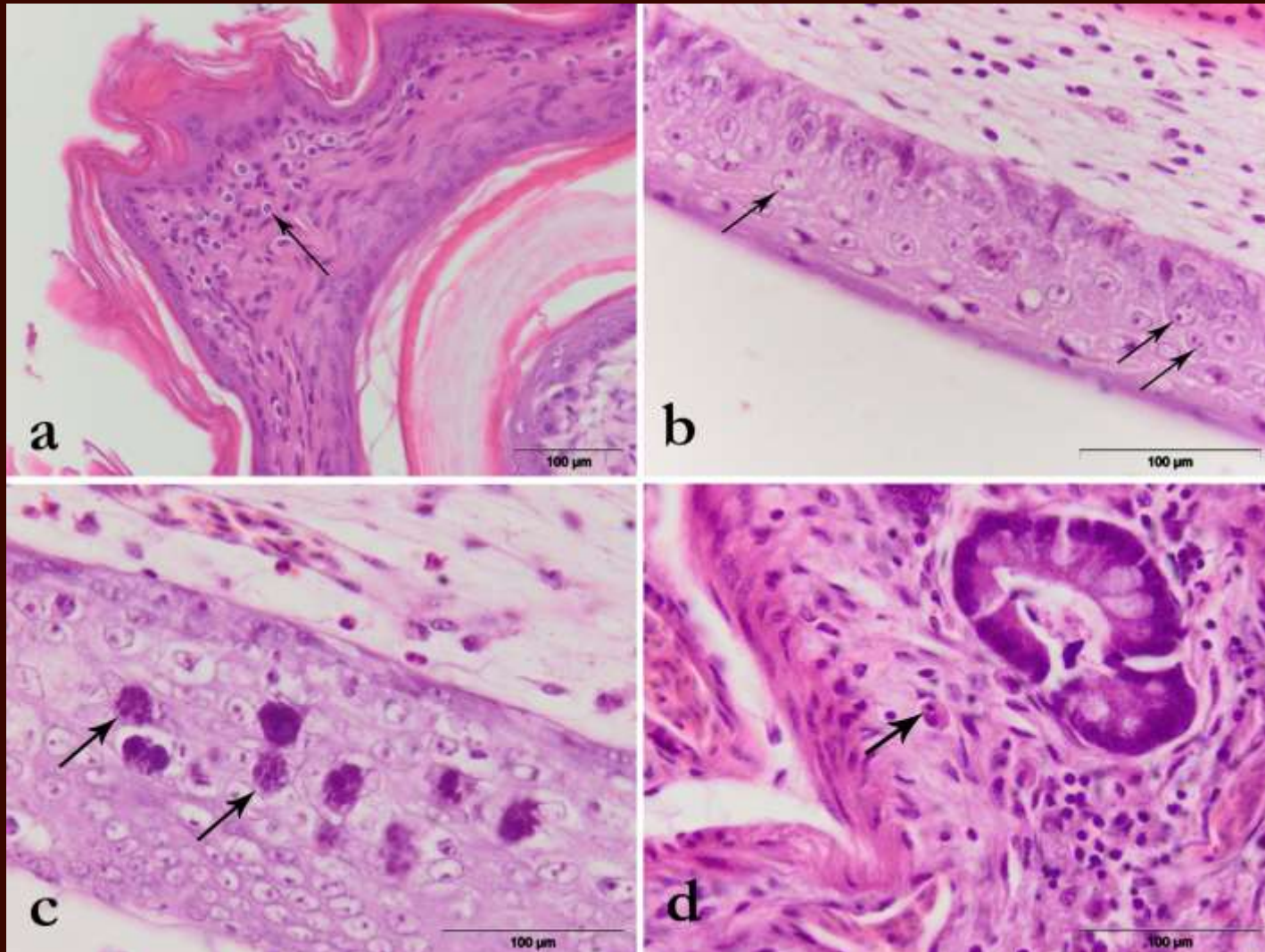
Prevalenca pčelinjih virusa DWV, ABPV, CBPV i SBV u 5 analiziranih regiona Srbije

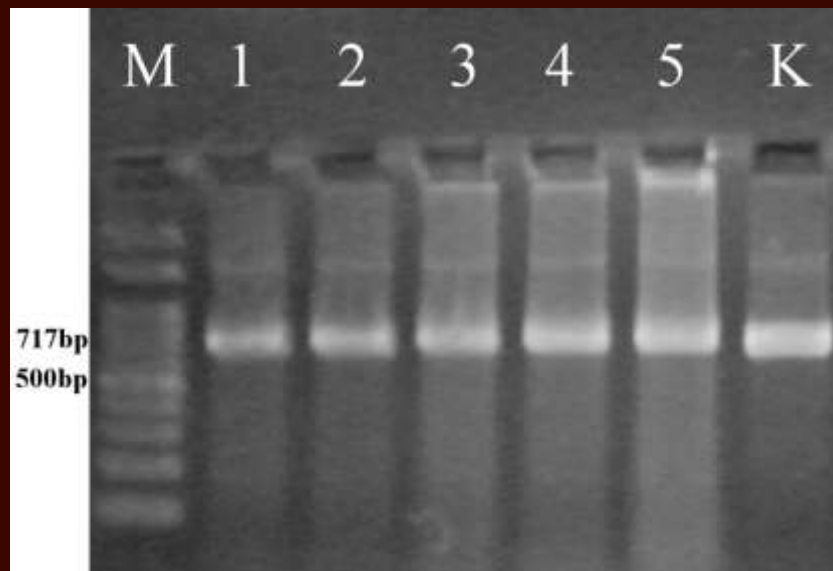
Dijagnostika bolesti kljuna i pera kod ptica (PBFD)



Vučićević *et al.* (2017)
J Hell Vet Med Soc

Dijagnostika bolesti kljuna i pera kod ptica (PBFD) histopatološki nalaz





Dijagnostika bolesti kljuna i pera kod ptica specijska DNK dijagnostika virusa PBFD

```

      1                                2
G  ATTTTAAAAATAAGAAGCGATTGAGCGCGCTTAAGAAAATGCTGCCGCGAGCTCATTTTCGAGCGCGCTAAAGGGAGCGATGCGGATAATG
S  .....C.....T.....

G  AGAAGTATTGCAGTAAAGAGGGGGACGTGATACTTACCCTGGGCATTGTGGCGAGAGACGGTCACCGCGCTTTCGACGGAGCTGTTGCTG
S  .....

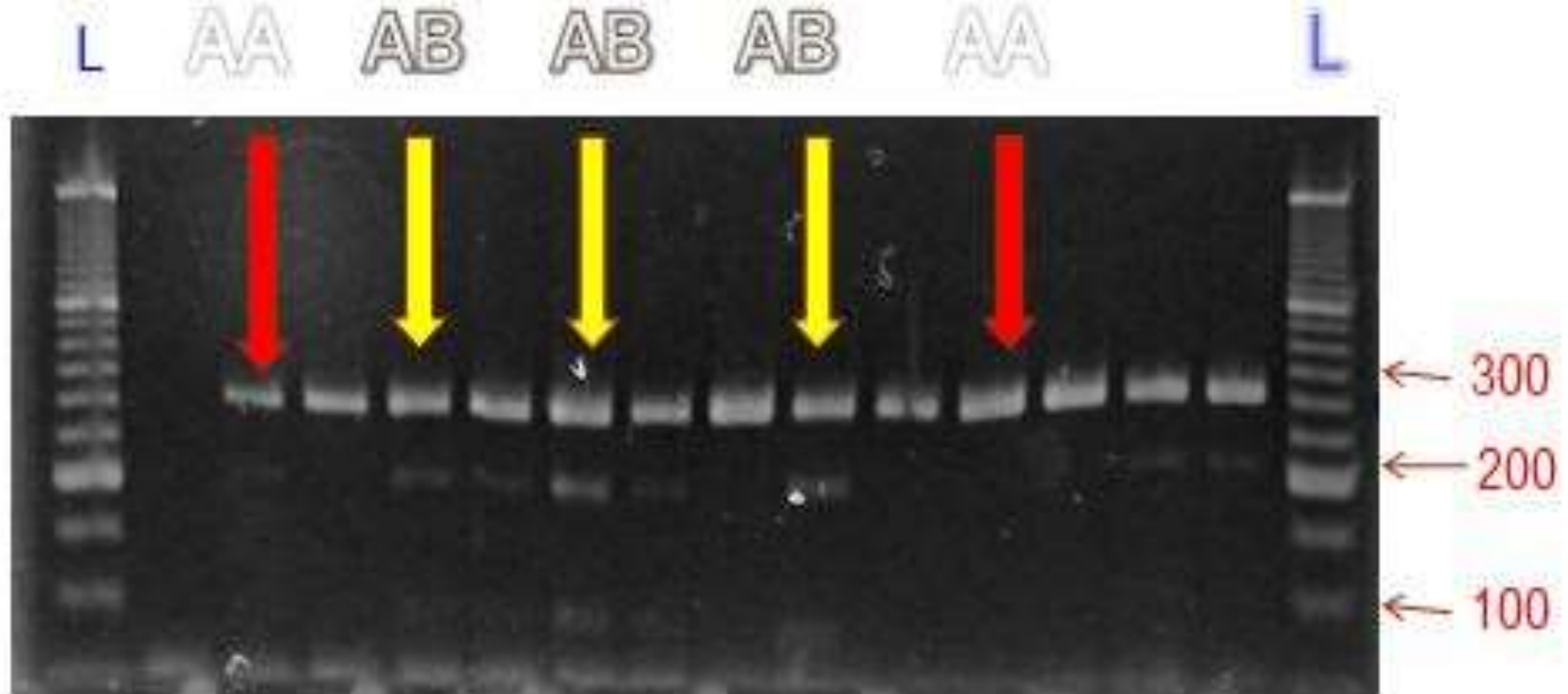
      3
G  CCGTGATGTCCGGACGCAAAATGAAGGAAGTCGCGCGAGAGTTCCCAGATATCTACGTCAGACATGGGCGGGGCTTGCATAACCTCTCGC
S  .....T.....

      4                                5
G  TATTGGTTGGTTCCCGCCACGTGATTTCAAGACGGAGGTTGACGTAATCTACGGGCCACCGGGGTGTGGCAAGAGTAGATGGGCCAATG
S  .....T.....G.....

      6
G  AACAGCCGGGGACTAAATATTATAAAATGCGCGGTGAATGGTGGGATGGGTATGATGGGGAAGATGTCGT
S  .....A.....

```

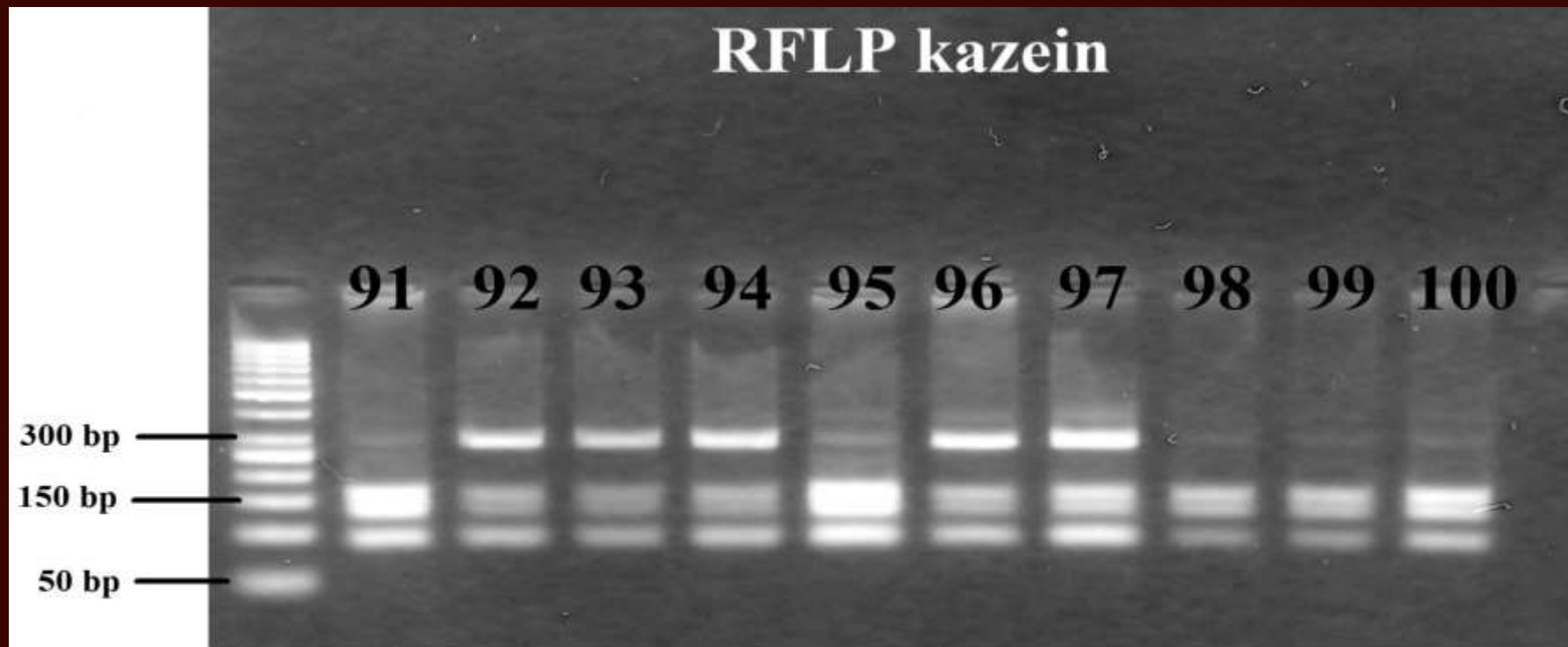
RFLP ANALIZA ALELNOG POLIMORFIZMA ZA LAKTOFERIN GEN



AA	AB	BB
301	301	
	201	201
	100	100

Maletić et al. (2013)

RFLP ANALIZA FREKVENCije ALELA ZA KAZEIN

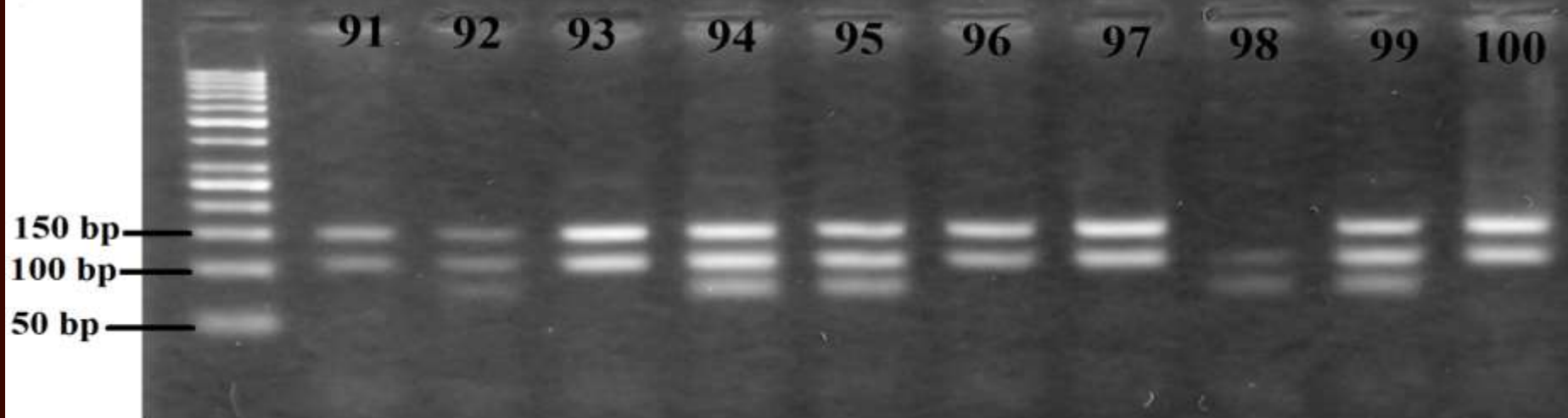


AA	AB	BB
	288	288
156	156	
132	132	
91	91	91

Maletić *et al.* (2016)

RFLP ANALIZA FREKVENCije ALELA ZA LAKTOGLOBULIN GOVEDA

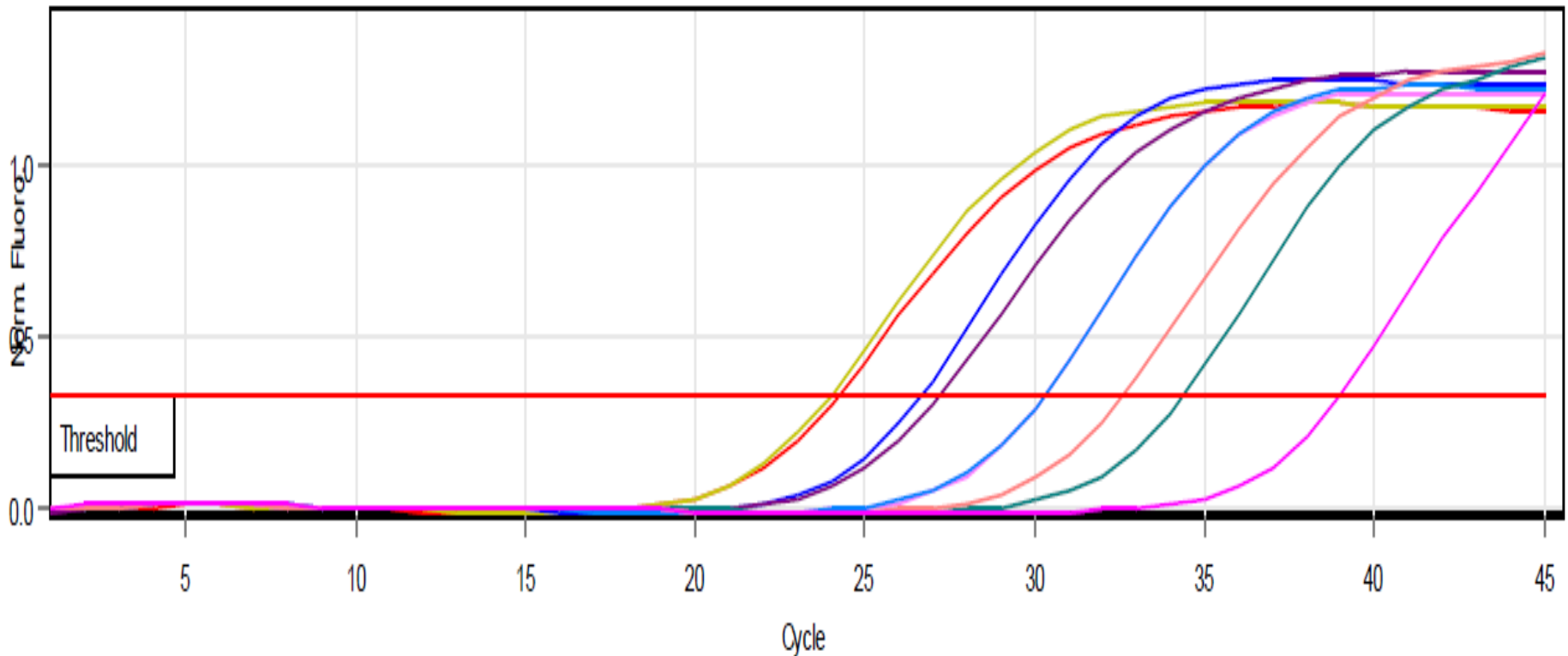
RFLP laktoglobulin



AA	AB	BB
144	144	
108	108	108
	74	74
	70	70

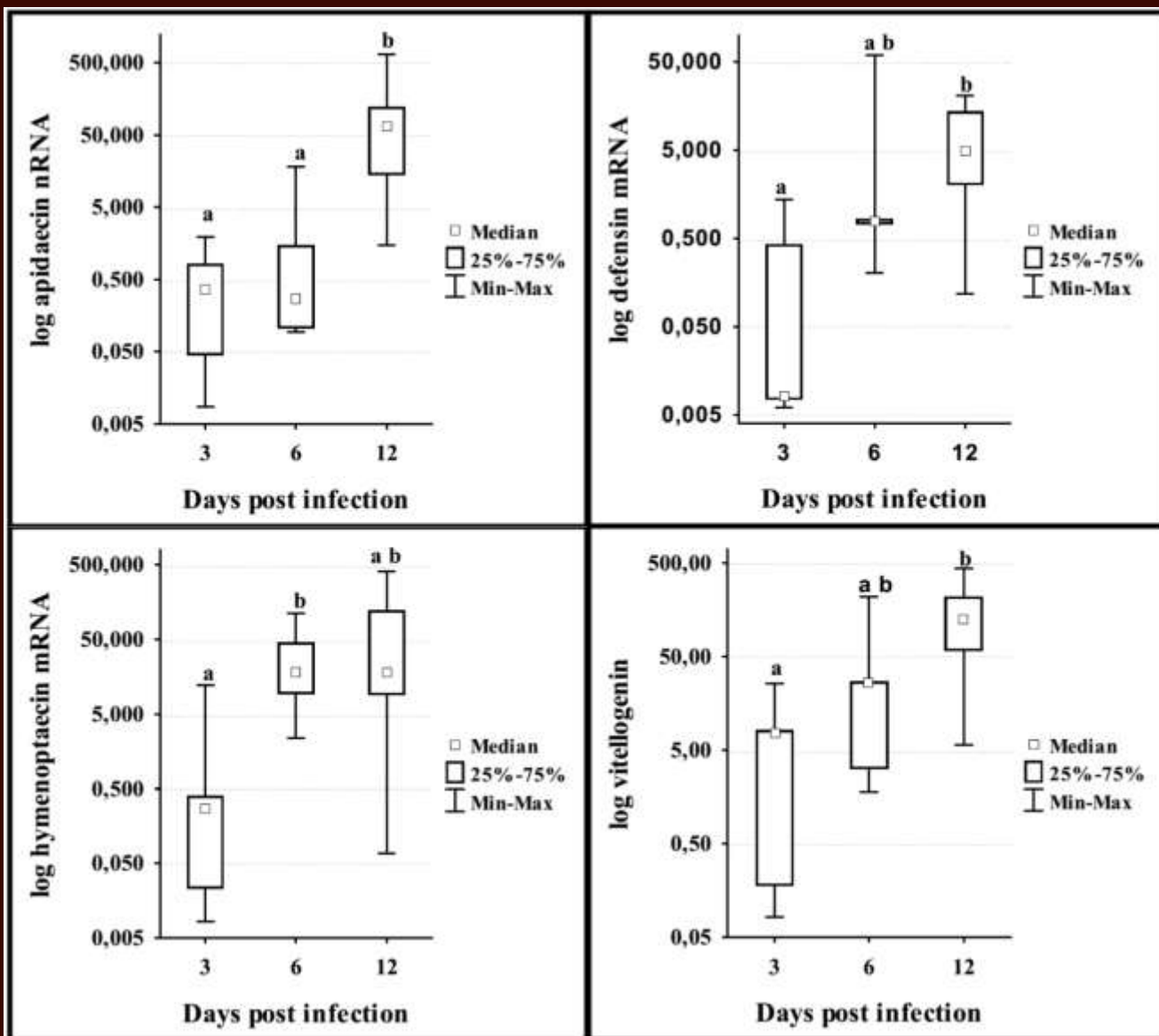
Maletić *et al.* (2016)

ANALIZA EKSPRESIJE GENA ZA IMUNE PEPTIDE INSEKATA



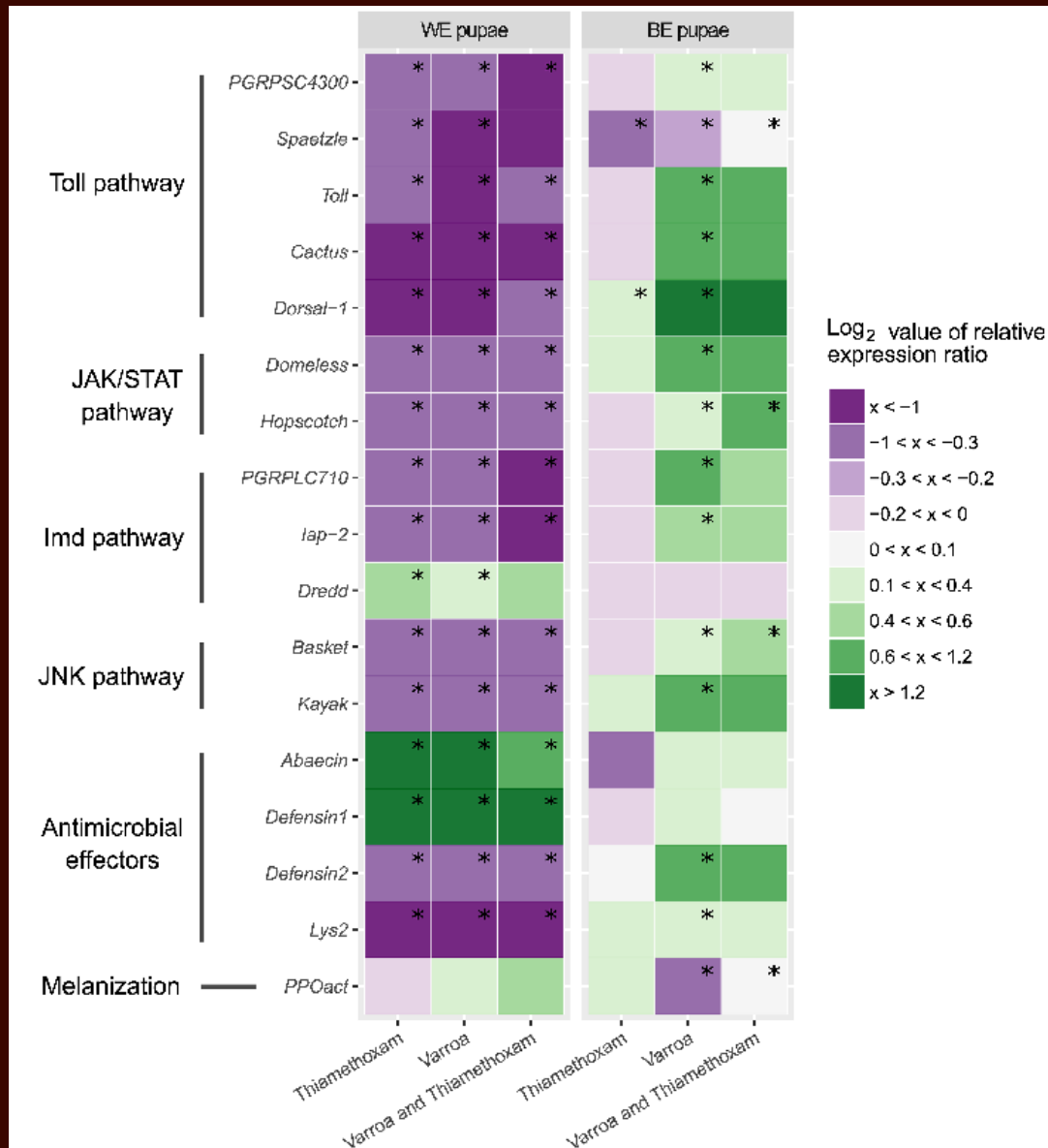
Chaimanee *et al.* (2012); Cizelj *et al.* (2016);
Glavinic *et al.* (2017, 2019); Tesovnik *et al.* (2017)

Efikasnost dijetarnog suplementa u prevenciji imunosupresije pčela utvrđena analizom ekspresije imunogena



Glavinić et al. (2017; 2019)
Plos One

Procena štetnog efekta pesticida i parazita na imunitet pčela analizom ekspresije imunogena

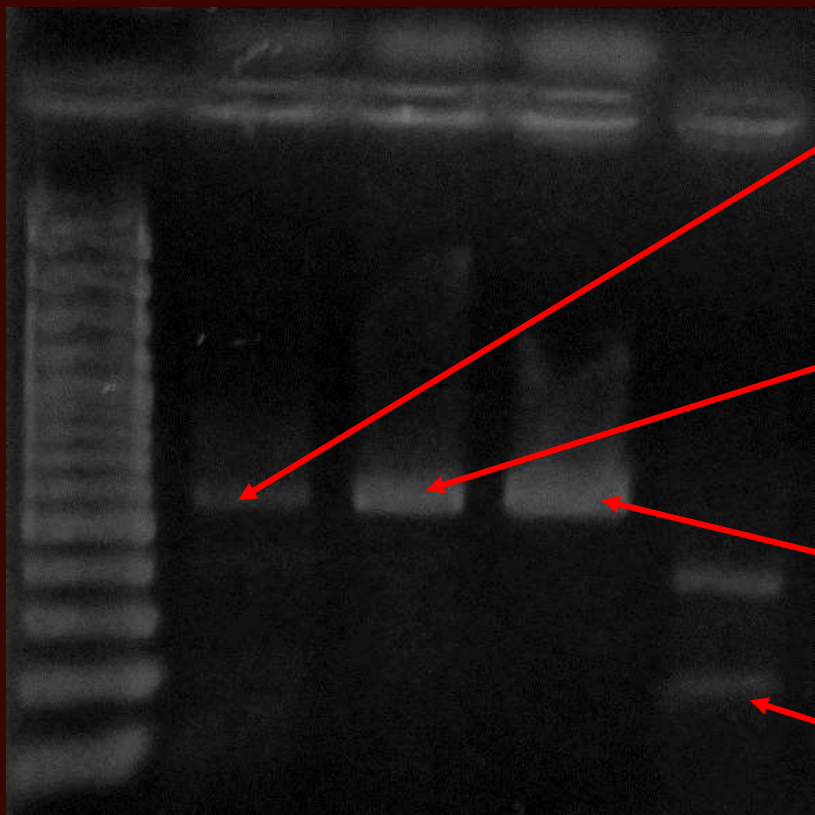


Tesovnik et al. (2017; 2019)
Plos One

Bolest policističnih bubrega

*"Polycystic Kidney Disease
- PKD"*

PKD1F/PKD1R



*Uzorak od zdrave mačke
pre RFLP*

*Uzorak od zdrave mačke
posle RFLP*

*Uzorak od obolele
mačke pre RFLP*

Uzorak od obolele mačke posle RFLP

*Vucicevic et. al. (2016)
Vet Italiana*

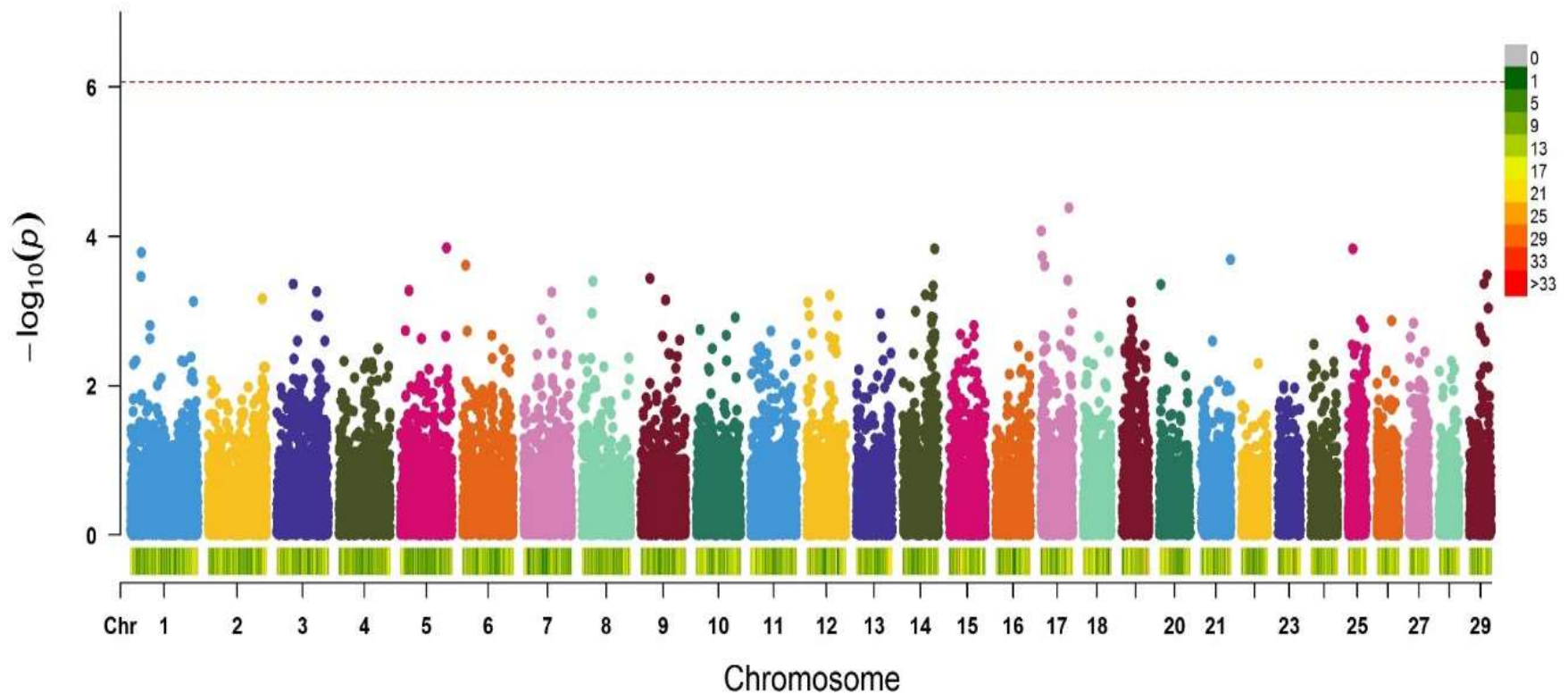
PCR-RFLP

*- odmah po rođenju
- preciznost 100 %*



GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES

- GWAS -



Manhattan plot

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES

- GWAS -

- *Razvojem tehnologije omogućena su sofisticirana istraživanja povezanosti određenih gena sa fenotipskim karakteristikama životinja ili određenih proizvodnih osobina. Jedna od takvih metoda je Genome Wide Association Studies (GWAS - u slobodnom prevodu: sveobuhvatno istraživanje genomske povezanosti sa ispoljavanjem složenih osobina, recimo proizvodno reproduktivnih).*
- *Poslednjih godina, zajedno sa napredovanjem sekvenciranja genoma i tehnologije genotipizacije SNP, GWAS studije su se pokazale izuzetno korisne za istraživanje gena u asocijaciji sa ispoljavanjem složenih osobina.*

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES

- GWAS -

- *U poređenju sa tradicionalnim QTL mapiranjem, GWAS ima prednost kako u moći otkrivanja uzročnih varijacija, tako i u tačnijem određivanju genskih regiona na kojima se nalaze uzročne varijacije.*
- *GWAS je široko prihvaćen kao primarni pristup za pronalaženje gena, te je postignut ogroman uspeh u identifikovanju gena koji kod ljudi mogu predstavljati opasnost za pojavu određenih bolesti. Međutim, samo nekoliko GWAS studija se bavilo identifikovanjem gena koji se asociraju sa proizvodno- reproduktivnim osobinama kod goveda.*

**THIRD RESEARCH
COORDINATION MEETING**
INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA

Coordinated Research Project D3.10.28

- RC 20774 -

**“ANIMAL IDENTIFICATION, PEDIGREE, EXTERIOR AND PERFORMANCE
DATA RECORDING IN SELECTED HOLSTEIN FRIESIAN CATTLE POPULATION
IN SERBIA USED FOR FUTURE GENETIC SELECTION
UNDER AI PROGRAMME ”**

Head Project Staff:

Dr Zoran Stanimirović (CSI)

Marko Ristanić, DVM

Dr Uroš Glavinić

Dr Jevrosima Stevanović

Dr Milan Maletić

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

LABORATORY FOR ANIMAL GENETICS

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES

- GWAS -

- *U okviru navedenog projekta, čiji je integralni deo doktorska disertacija asistenta Marka Ristanića, sakupljeno je preko 500 uzoraka krvi i sperme od Holštajn-frizijskih goveda iz Srbije.*
- *Pored uzoraka, od istih grla su sakupljeni i proizvodno-reproduktivni podaci (dužina laktacije, prinos mleka, prinos proteina, prinos mlečne masti, dužina servis perioda, starost pri prvom parenju itd.)*
- *Iz prikupljenih uzoraka izvršena je ekstrakcija DNK.*

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES

- GWAS -

- *U saradnji sa IAEA i njihovom Laboratorijom za zaštitu zdravlja i animalne produkcije (Animal Production and Health Laboratory, International Atomic Energy Agency - IAEA, Seibersdorf, Vienna, Austria), na istim uzorcima izvršene su analize genotipizacije životinja pomoću Axiom Bovine BovMDv3 SNP microarray-a sa 53 441 predefinisanim lokusom od interesa u genomu Bos taurus.*
- *Rezultati generisani mikroerejem bili su uključeni u GWAS analizom pomoću PLINK V. 1.9 softverskog paketa, što je obuhvatalo: kontrolu kvaliteta genotipizacije na nivou pojedinačnih uzoraka i na nivou pojedinačnih lokusa; određivanje alelskih učestalosti; testiranje Hardy–Weinberg ravnoteže na testiranim lokusima; asocijaciju kvantitavnih osobina sa alelima na testiranim lokusima (QTL).*

GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES - GWAS -

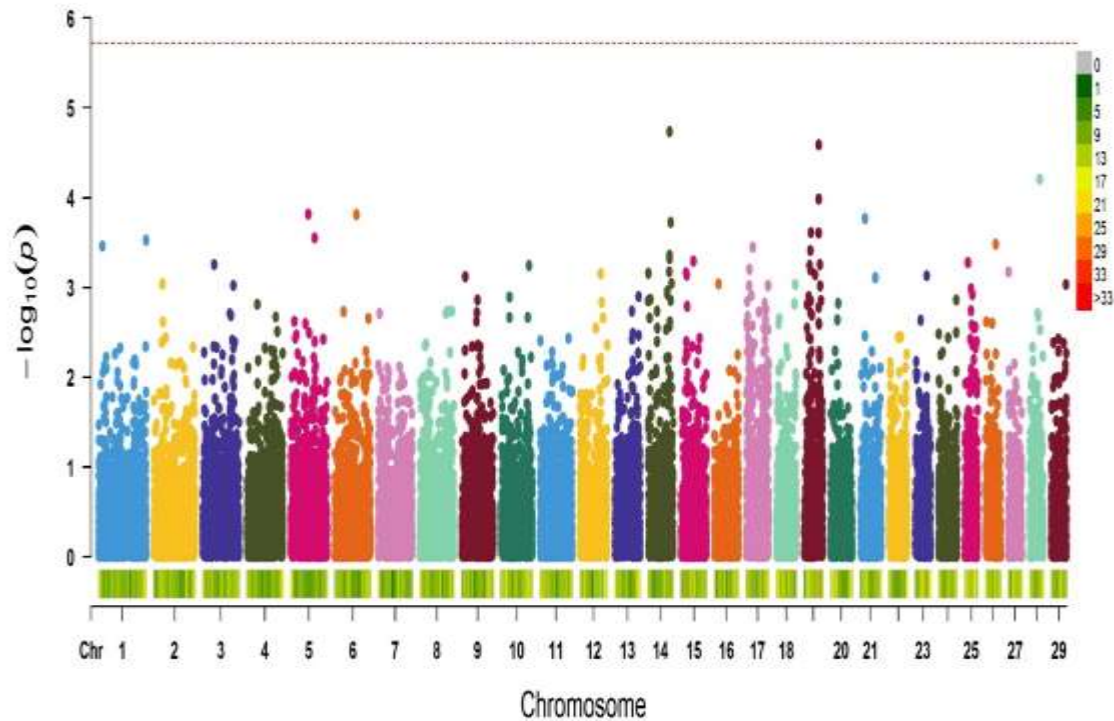
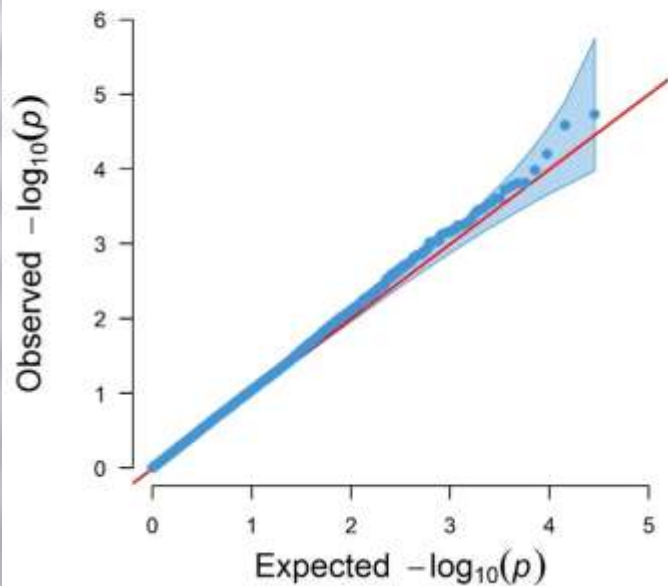


Axiom Bovine BovMDv3 SNP microarray

PRINOS MLEKA U 1. LAKTACIJI SVEDEN NA 305 DANA

LAC1 Yield 305

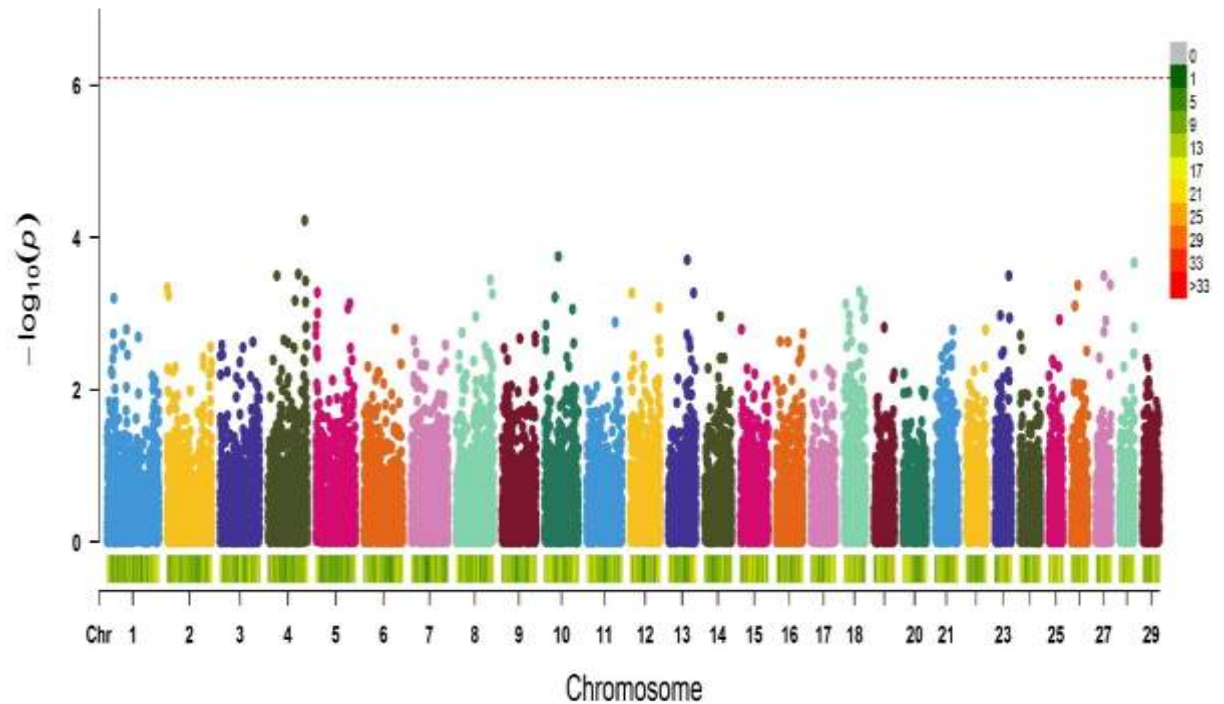
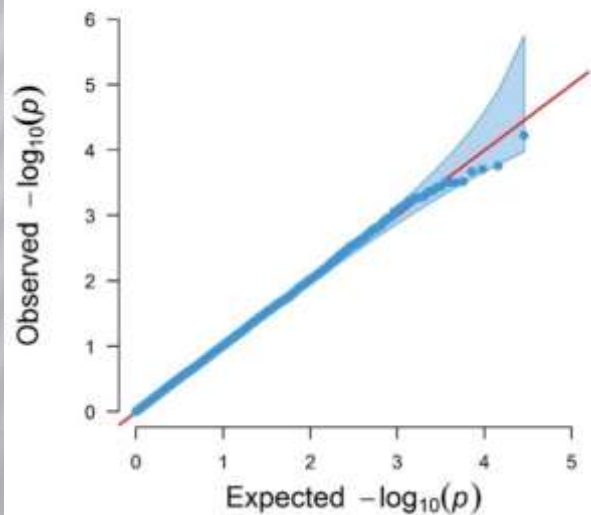
QQplot of lac1_yield305.FarmCPU



PRINOS MLEKA U 2. LAKTACIJI SVEDEN NA 305 DANA

LAC2 Yield 305

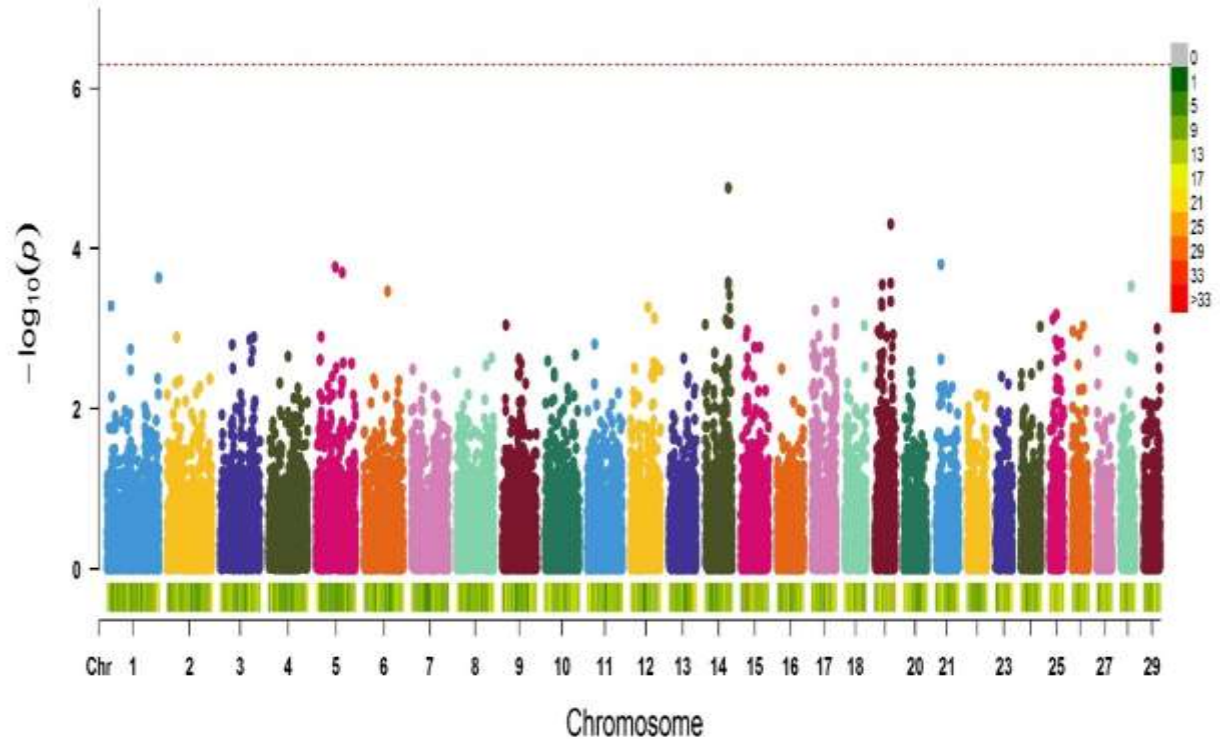
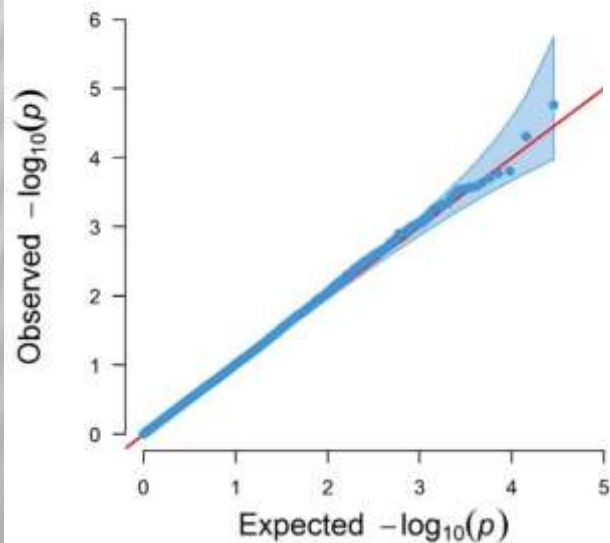
QQplot of lac2_yield305.FarmCPU



PRINOS MLEČNE MASTI U 1. LAKTACIJI SVEDEN NA 305 DANA

LAC1 FAT 305

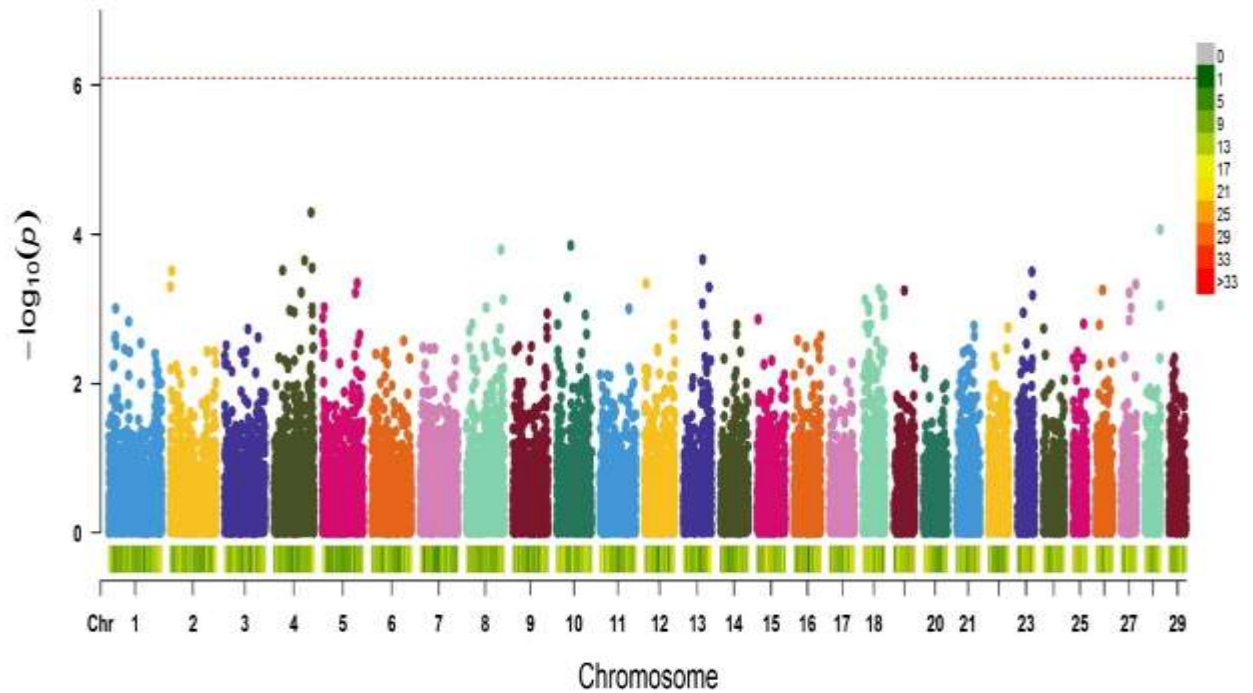
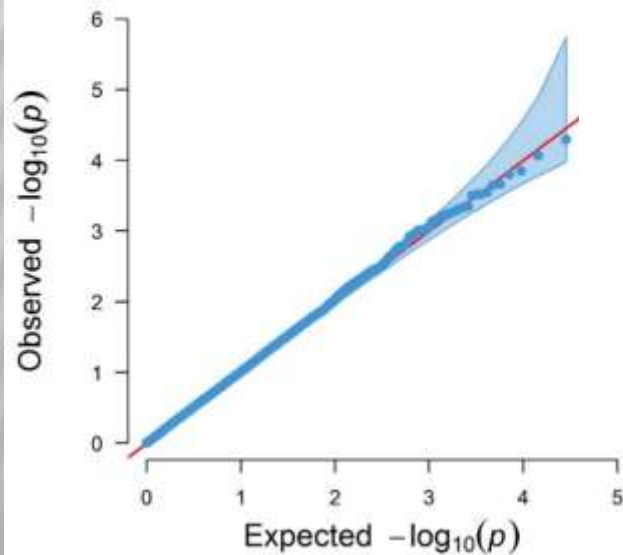
QQplot of lac1_fat305.FarmCPU



PRINOS MLEČNE MASTI U 2. LAKTACIJI SVEDEN NA 305 DANA

LAC2 FAT 305

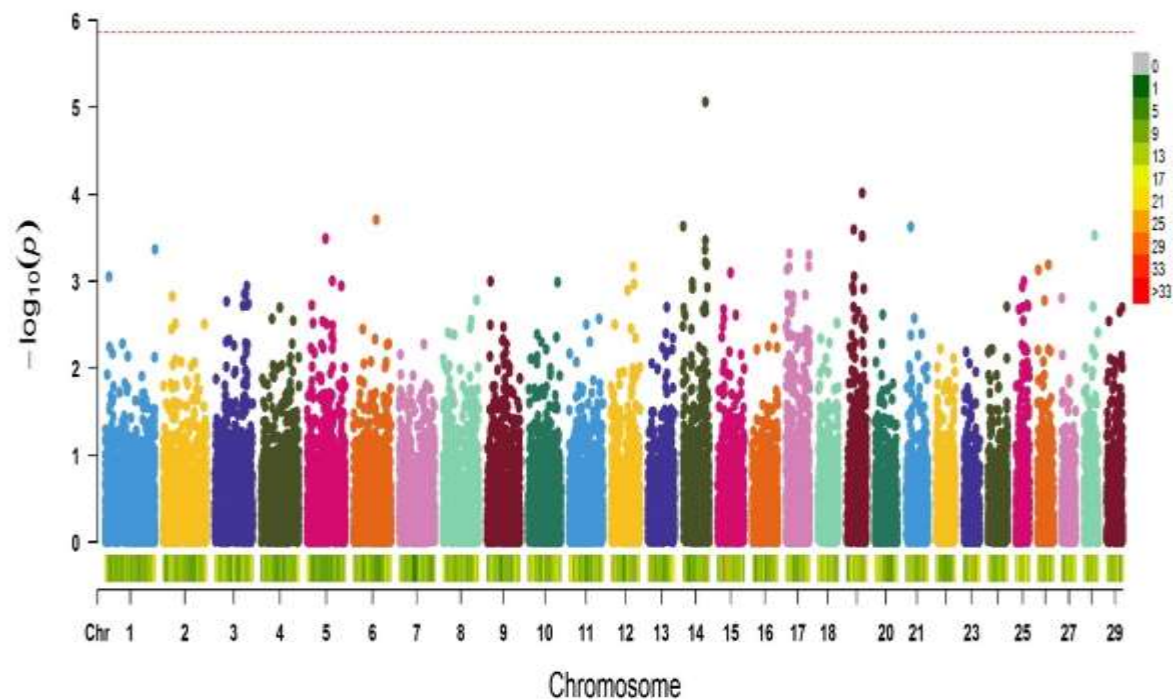
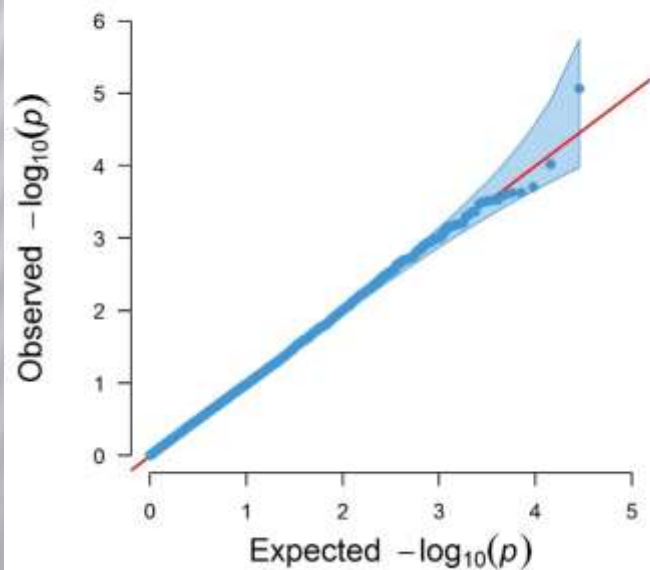
QQplot of lac2_fat305.FarmCPU



PRINOS MLEČNIH PROTEINA U 1. LAKTACIJI SVEDEN NA 305 DANA

LAC1 PROT 305

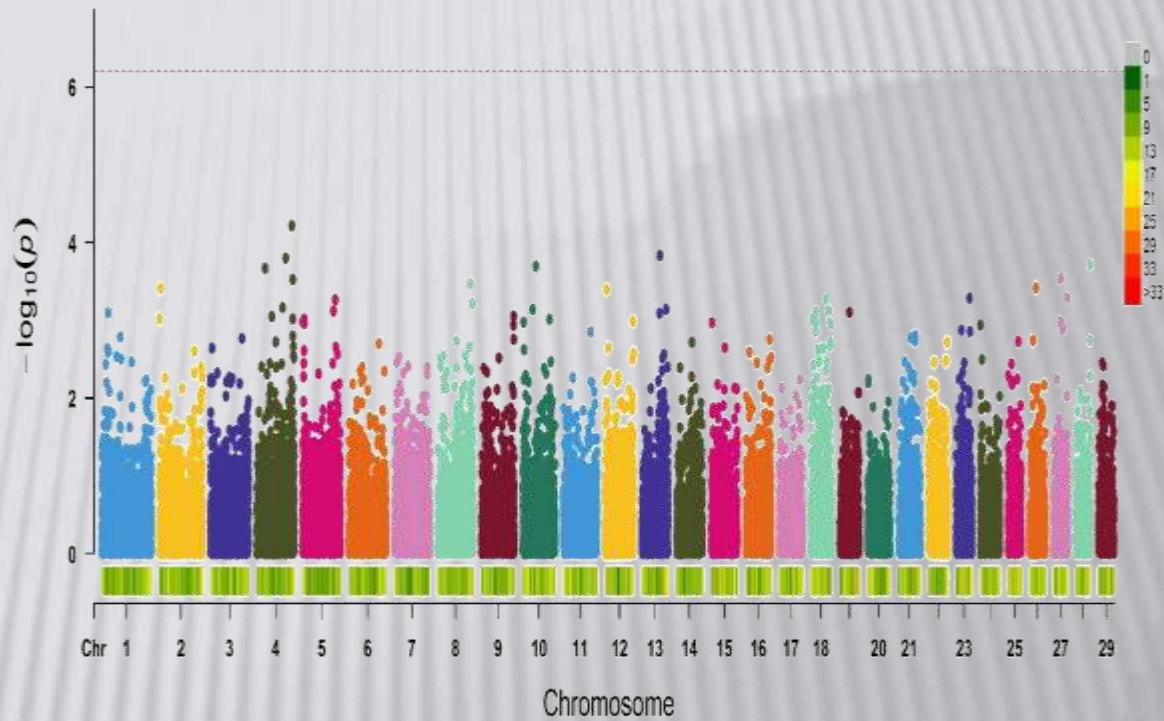
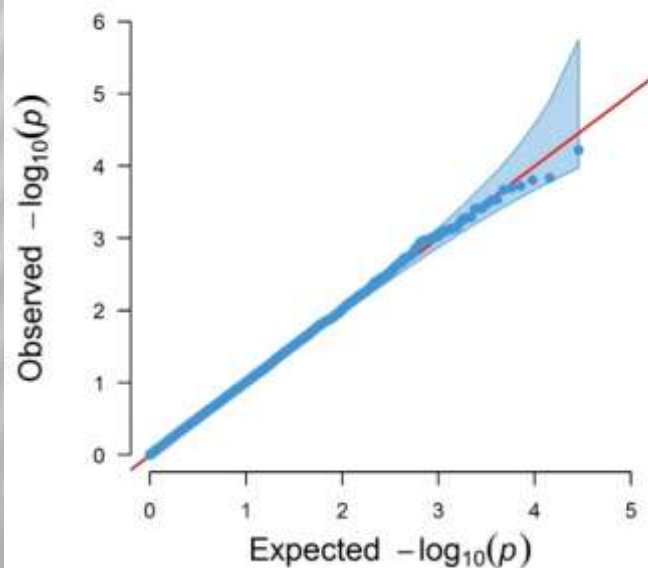
QQplot of lac1_prot305.FarmCPU



PRINOS MLEČNIH PROTEINA U 2. LAKTACIJI SVEDEN NA 305 DANA

LAC2 PROT 305

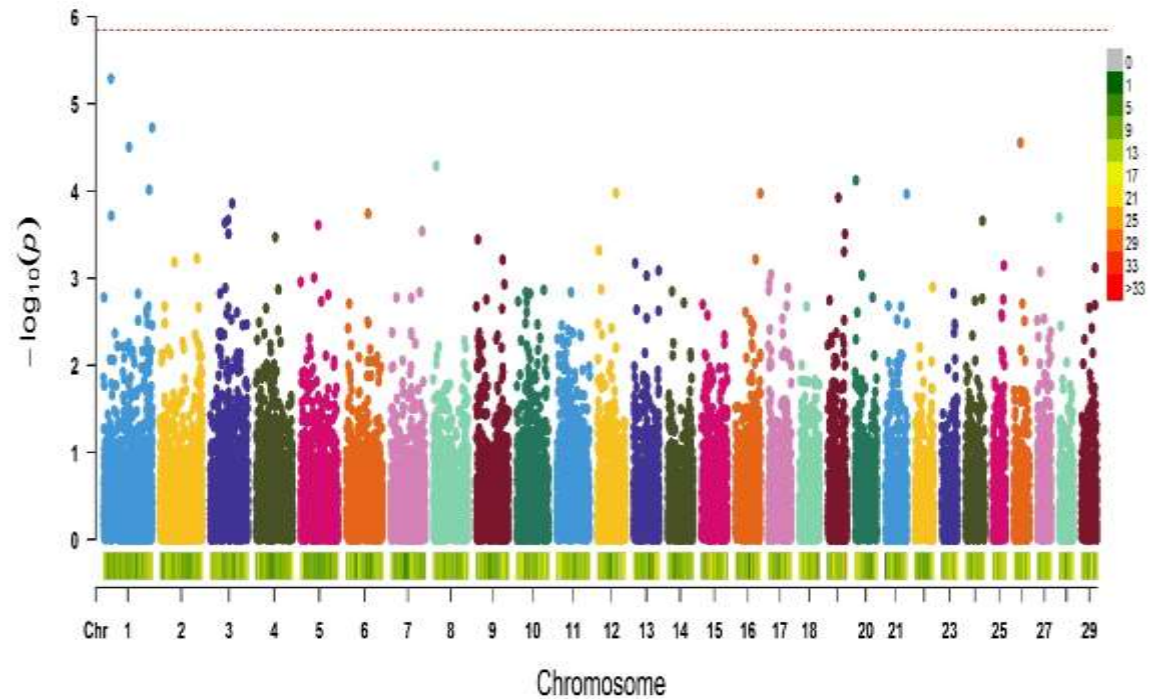
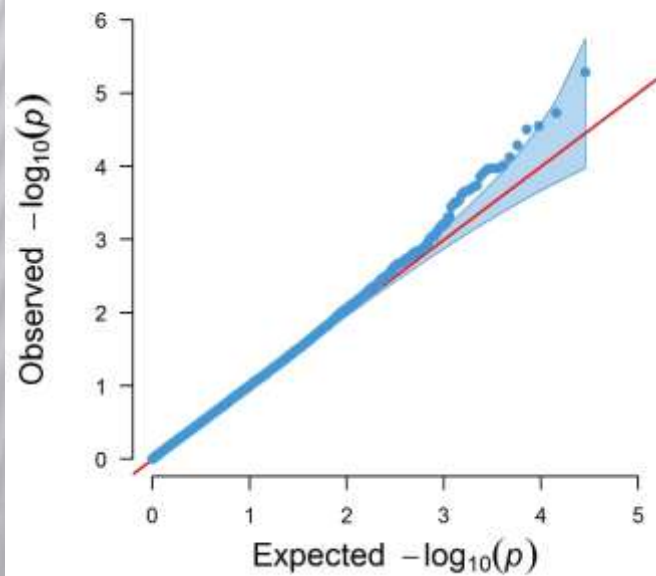
QQplot of lac2_prot305.FarmCPU



PRVI MEĐUTELIDBENI PERIOD

FIRST CALVING INTERVAL

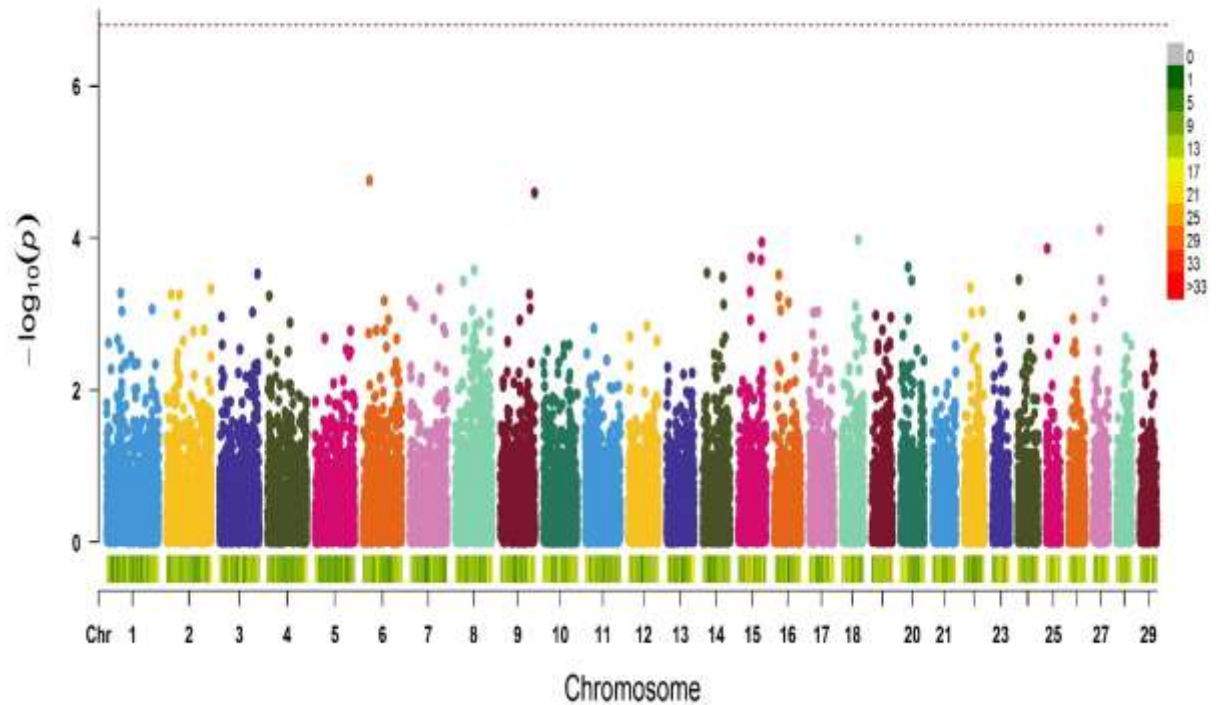
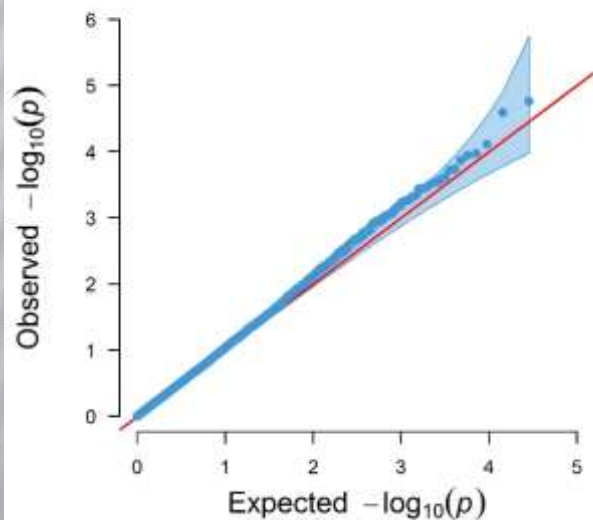
QQplot of first_calving_interval.FarmCPU



PRVI PERIOD ZASUŠENJA

*FIRST DRY
PERIOD*

QQplot of first_dry_period.FarmCPU



CRISPR/CAS9 SISTEM I NJEGOVA PRIMENA U VETERINARSKOJ MEDICINI

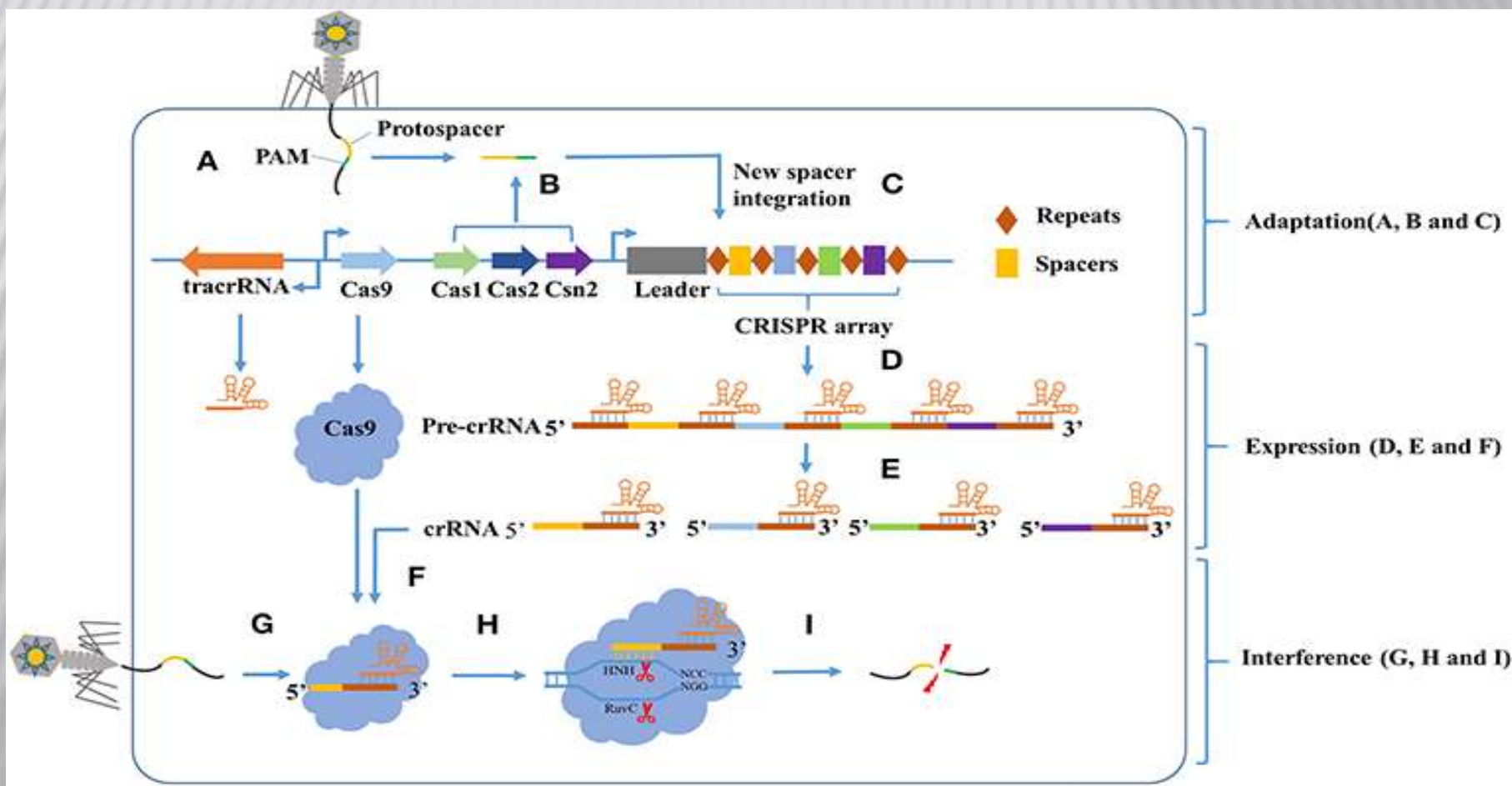
Kosta Stošić, Master Molekularni biolog iz oblasti
Genetičkog inženjerstva i biotehnologije

CRISPR/CAS SISTEM

- × **CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)
predstavlja *deo* imunskog mehanizma koje bakterije koriste za zaštitu od molekula strane DNK
- × *Adaptivna* imunost bakterija prema stranoj DNK
- × **Cas** (eng. CRISPR-as sociated) **protein**
- × **Tri koraka**

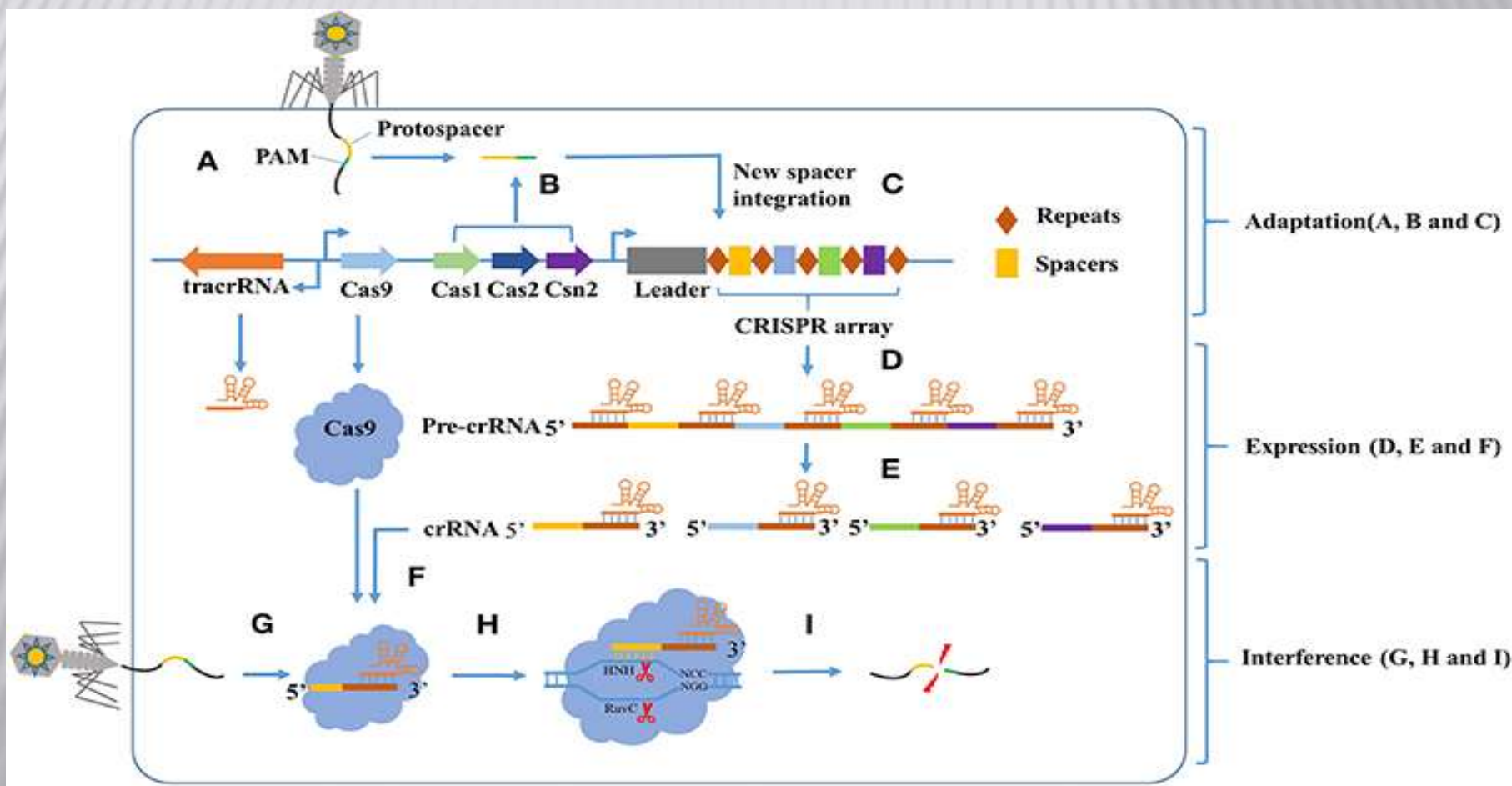
CRISPR/Cas9 sistem za editovanje genoma

- Specifičnost CRISPR/Cas sistema zavisi od jedinstvenosti ciljne sekvence
- *PAM motiv* je DNK sekvenca koja se prostire odmah nizvodno od protograničnika (Slika – A)

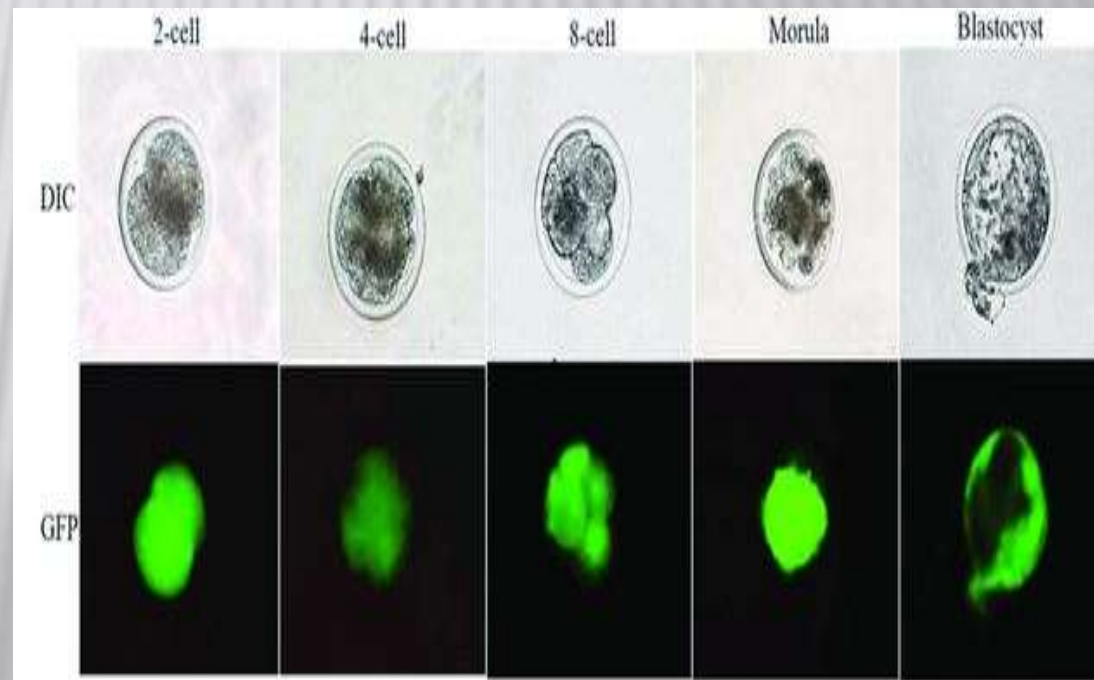
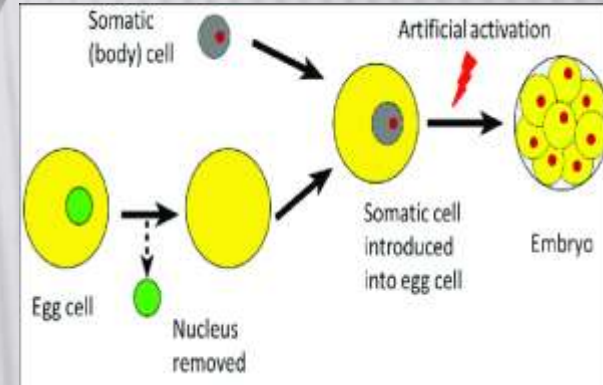


CRISPR/Cas9 sistem za editovanje genoma

- Specifičnost CRISPR/Cas sistema zavisi od jedinstvenosti ciljne sekvence
- *PAM motiv* je DNK sekvenca koja se prostire odmah nizvodno od protograničnika (Slika – A)



PRIMENA CRISPR/CAS SISTEMA U VETERINARSKOJ MEDICINI - POBOLJŠANA PROIZVODNJA (SISARI) -



- ✗ Modifikovano prase kod koga se eksprimira fat-1 gen iz *Caenorhabditis elegans* ima mali odnos ω -6 : ω -3 masnih kiselina
- ✗ Nokaut gena za miostatin kod prasića, goveda, ovaca i koza
- ✗ Modifikovano jagnje postiže veću masu, a zadržava kvalitet vune
- ✗ Nokin gena za eGFP u Y hromozom BFF ćelijskih linija

PRIMENA CRISPR/CAS SISTEMA U VETERINARSKOJ MEDICINI

- POBOLJŠANA PROIZVODNJA MLEKA (SISARI) -

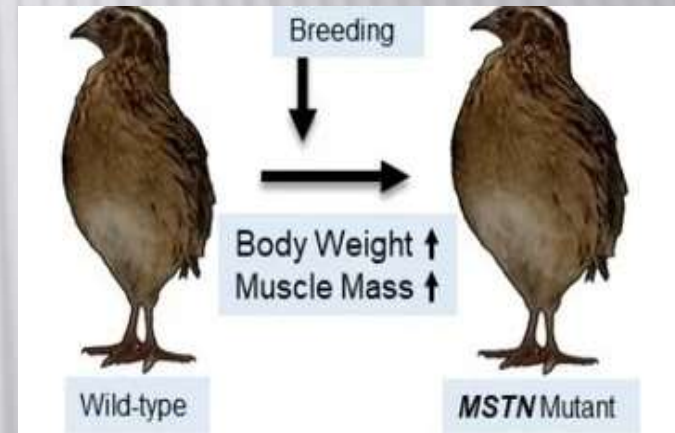
- ✖ Eradikacija alergena
- ✖ Dobijanje mleka sa antibakterijskim svojstvima



PRIMENA CRISPR/CAS SISTEMA U VETERINARSKOJ MEDICINI

- POBOLJŠANA PROIZVODNJA (PTICE) -

- ✗ Nokaut gena za miostatin kod kokoške i prepelice
- ✗ Insercije u polne hromosome
- ✗ Nokin željenih sekvenci u ovalbumin lokus → inkorporacija rekombinantnih proteina u belance
- ✗ Eradikacija alergena



PRIMENA CRISPR/CAS SISTEMA U VETERINARSKOJ MEDICINI

- ŽIVOTINJE OTPORNE NA BOLESTI (SISARI) -

- ✗ Svinje i goveda rezistentna na tuberkulozu
- ✗ Disrupcija gena za protein CD163 → svinje rezistentne na PRRSV (eng. *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus*)
- ✗ Inaktiviranje gena uključenog u replikaciju bakterija roda *Brucella* u ćelijama domaćina → otpornost na brucelozu



PRIMENA CRISPR/CAS SISTEMA U VETERINARSKOJ MEDICINI

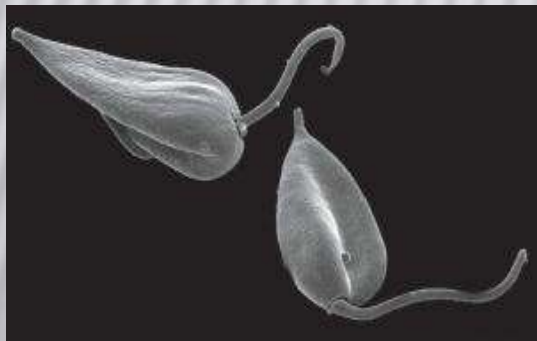
- ŽIVOTINJE OTPORNE NA BOLESTI (PTICE) -

- ✗ Ptice rezistentne na AIV (eng. *Avian Influenza Virus*)
- ✗ Kokoške otporne na ALV (eng. *Avian Leukosis Virus*)



PRIMENA CRISPR/CAS SISTEMA U VETERINARSKOJ MEDICINI - PROUČAVANJE INTERAKCIJA DOMAĆIN-PARAZIT -

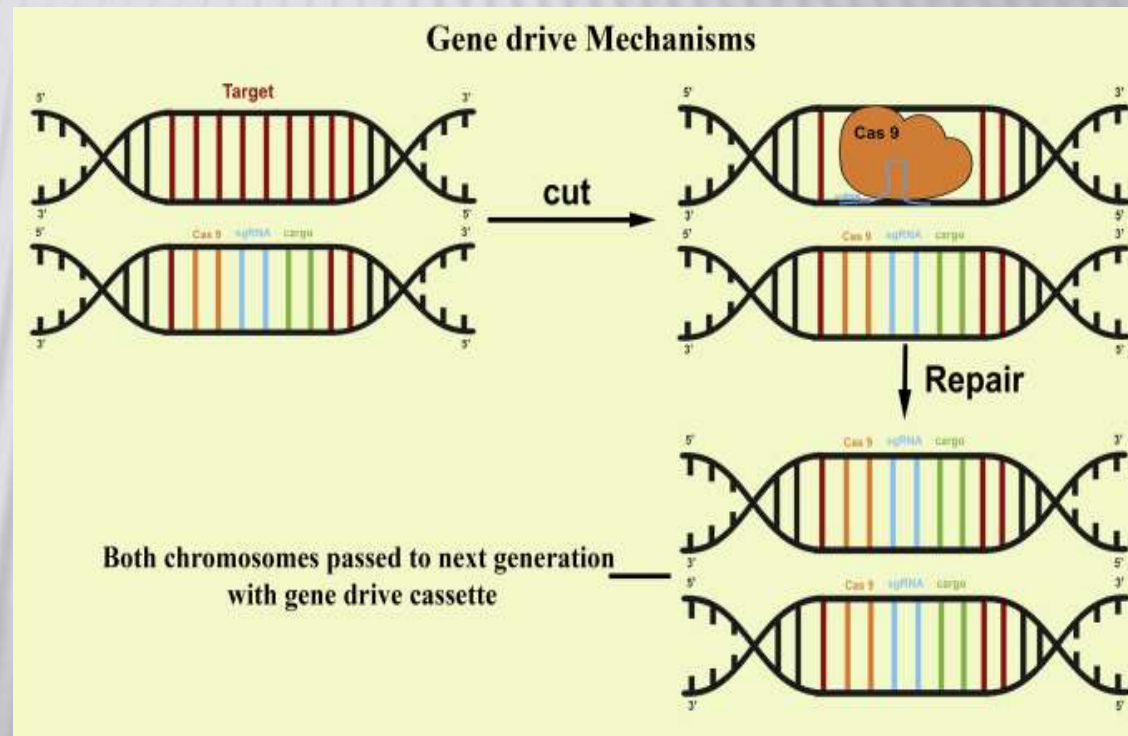
- ✗ Medonosna pčela vs *Lotmaria passim*



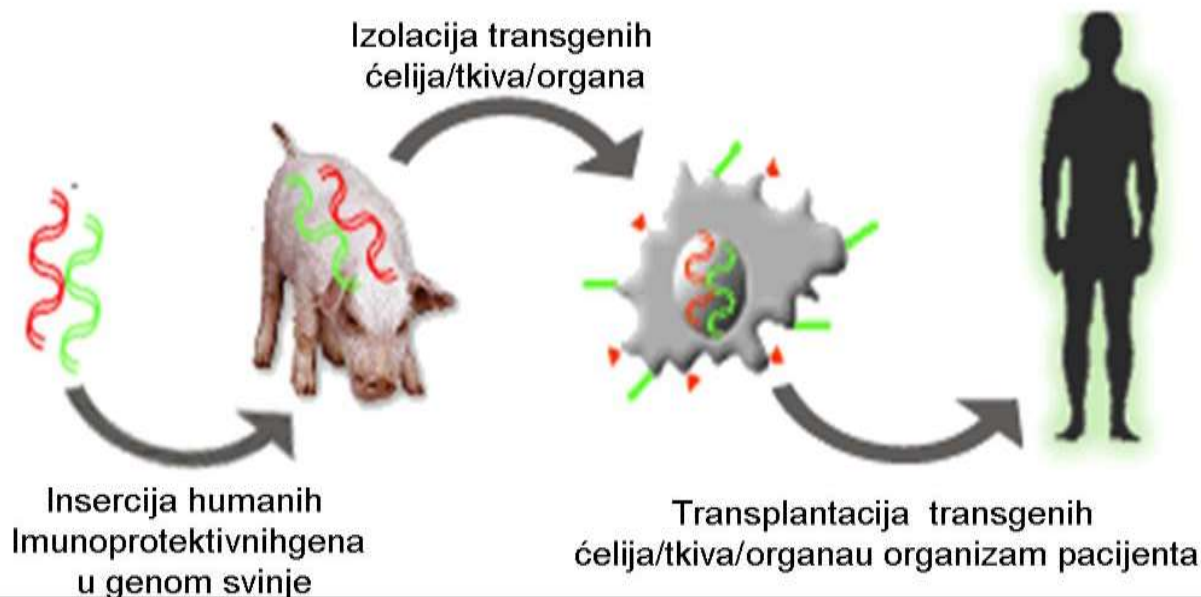
PRIMENA CRISPR/CAS SISTEMA U VETERINARSKOJ MEDICINI

- BORBA PROTIV ŠTETOČINA -

- ✗ Genski pogon omogućava širenje željenih sekvenci kroz čitavu populaciju sa verovatnoćom prenošenja većom od one koja karakteriše nasleđivanje po Mendelu → ovime se omogućava da se varijanta nekog gena brzo proširi kroz populaciju



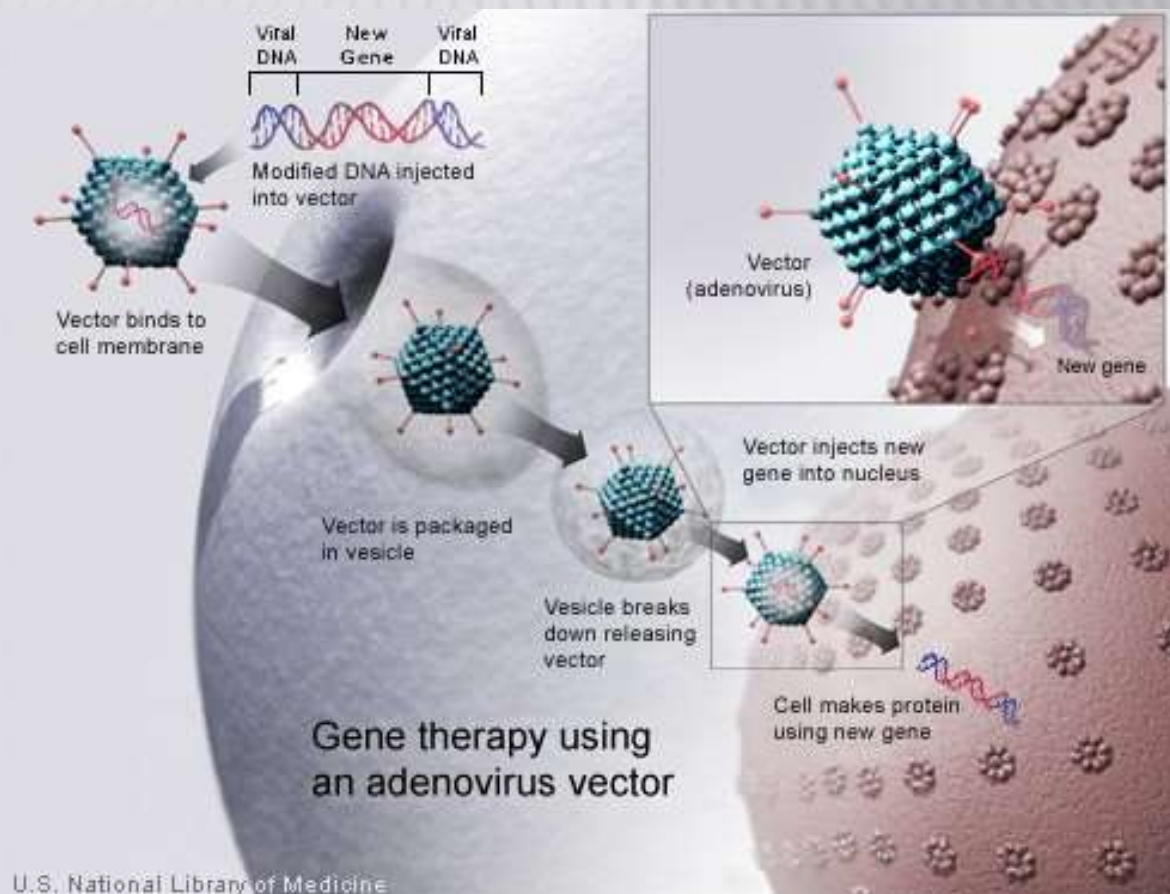
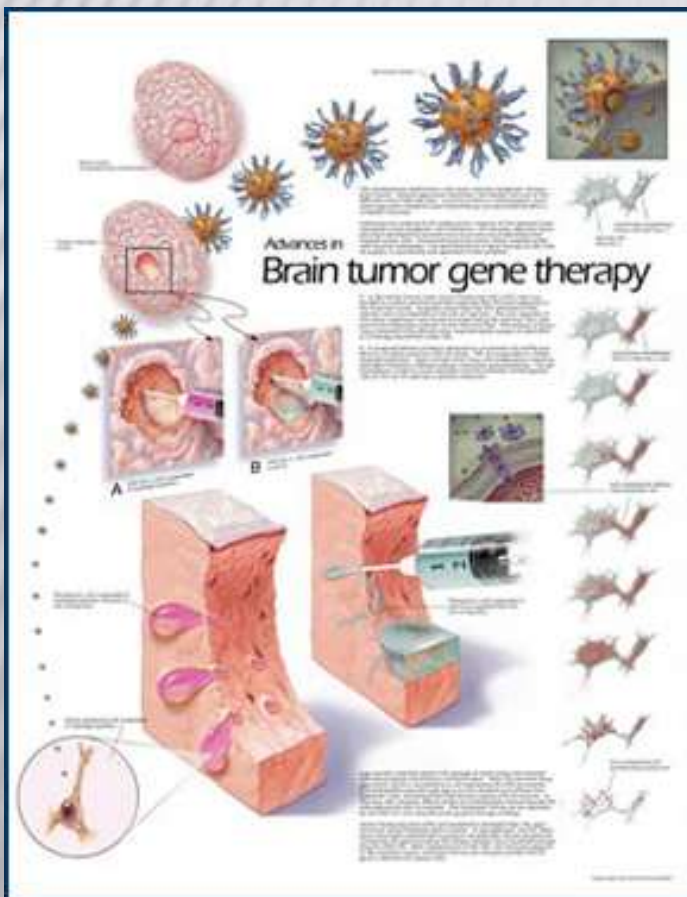
Genska terapija u širem smislu je svaki terapijski postupak pri kojem se manipuliše delovanjem gena. Po takvoj definiciji, u gensku terapiju bi spadali mnogi terapijski postupci koji su već decenijama prisutni u medicini. Takav je primer terapija kortikosteroidima koja deluje na ćelije imunološkog sistema tako što menja izražavanje-ekspresiju određenih gena u njima. Međutim, pojam genske terapije ograničen je na postupke kojima se u ćeliju unosi genski materijal.



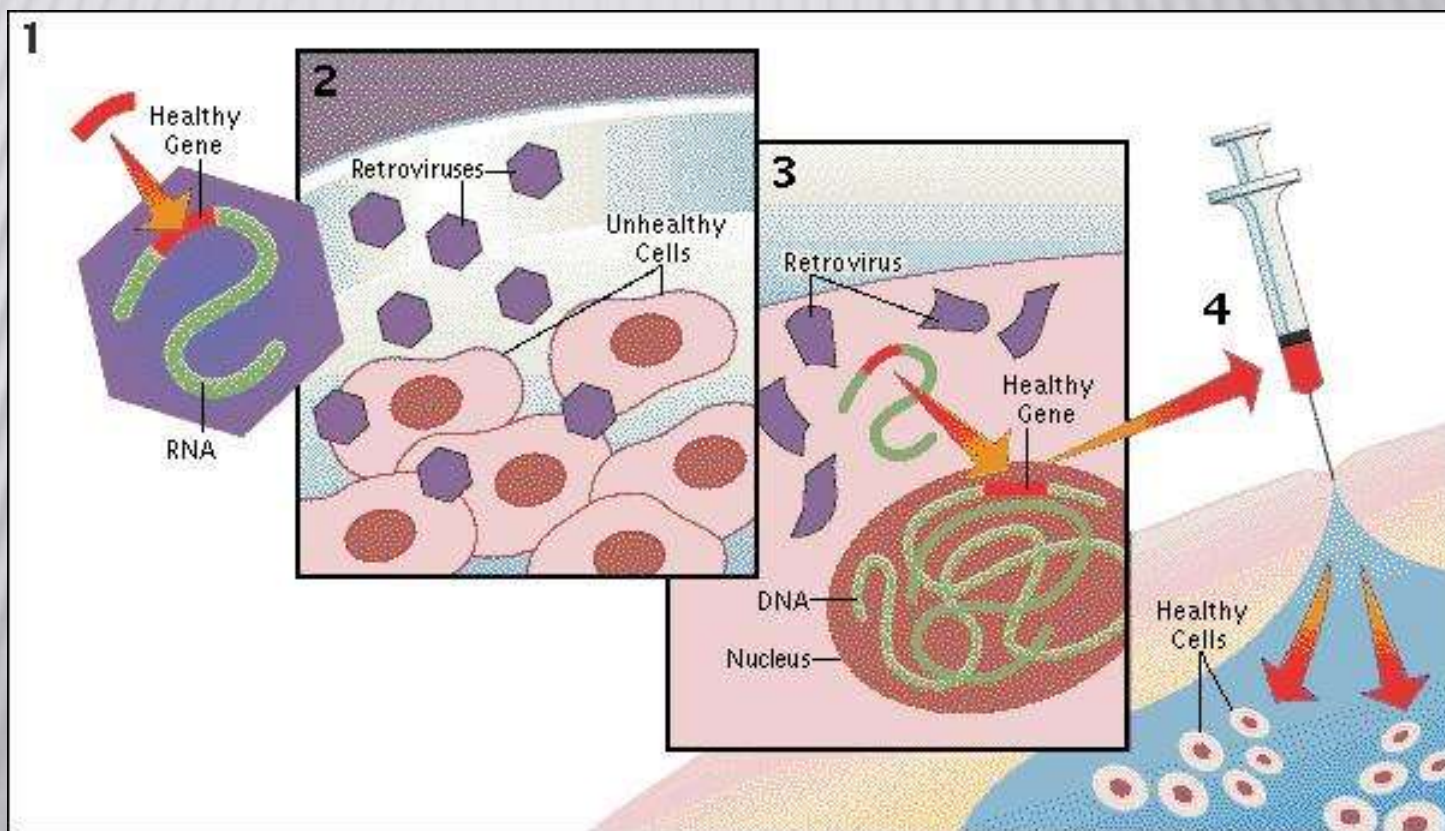
***Genska
terapija***

GENETIČKI INŽINJERING I TRANSGENEZA -

Posebno su interesantna istraživanja u oblasti genske terapije, odnosno zamene bolesnih gena zdravim čime bi se kod monogenских bolesti (prouzrokovanih jednim genom) postiglo trajno izlječenje (*“genska hirurgija”*).



Za sada, genska terapija se uglavnom radi eksperimentalno na životinjama pri čemu se intenzivno ispituje uvođenje molekula DNK u ćelije životinja putem retrovirusa. Najveći problem je u činjenici da se danas raspolaže još uvek primitivnim metodama za nasumično uvođenje DNK u ćeliju, bez mogućnosti usmeravanja prema defektnoj ćeliji i bez mogućnosti odstranjivanja mutirane genetske informacije, kao i bez uspešne metode za korekciju mutacije u oboleloj ćeliji. Sadašnja istraživanja su usmerena na transplantaciju gena humanih ćelija .



Genska terapija

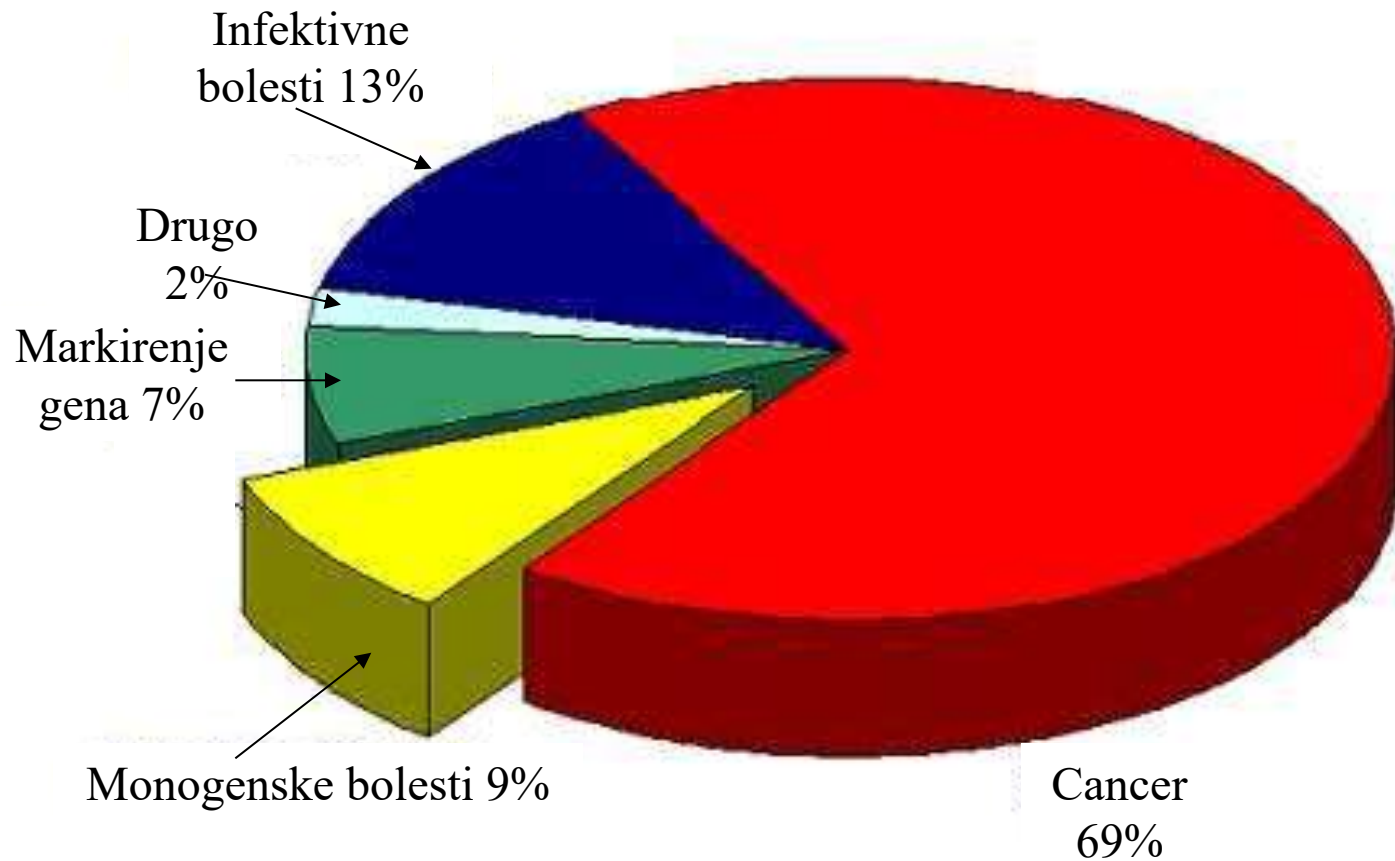
Prenos terapijskog gena u obolelo tkivo može se obavljati iz više razloga:

- Transplantacije gena (kod delecija).
- Korekcija gena (ispravljanje mutacije).
- Povećavanje ekspresije ciljnog gena.
- Ciljano uništenje pojedinih ćelija unosom gena ubice.
- Ciljana inhibicija genske ekspresije.

Bolesti kod kojih se može primeniti genska terapija

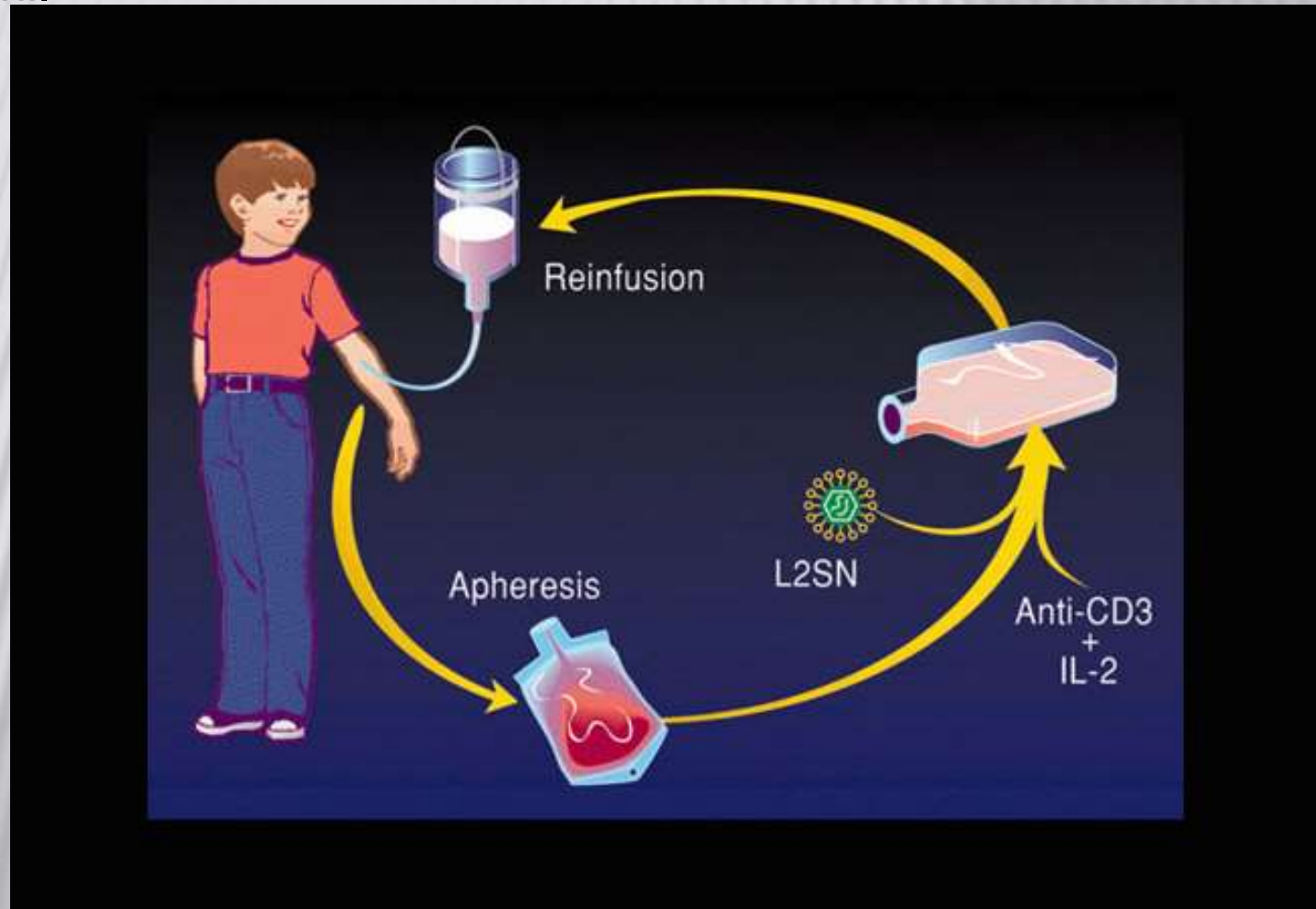
Bolest	Defekt	Ciljana ćelija
Teška kombinovana imunodeficijencija	Adenozin-deaminaza 4	Ćelije koštane srži, T limfociti
Hemofilija	Faktor VIII, IX	Jetra, mišic, fibroblasti
Cisticna fibroza	Gubitak gena CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	Vazdušni mehurići - pluća
Rak	Više uzroka	Više tipova ćelija
Neurološke bolesti	Parkinson, Alzheimer	Direktno u mozak
Kardiovaskularne bolesti	Ateroskleroza	Endotel krvnih sudova
Autoimune bolesti	Dijabetes	MHC, 62-mikroglobulin
Infektivne bolesti.	AIDS, hepatitis B, COVID-19 CORONAVIRUS	T-limfociti, makrofagi.

Primena genske terapije u medicini

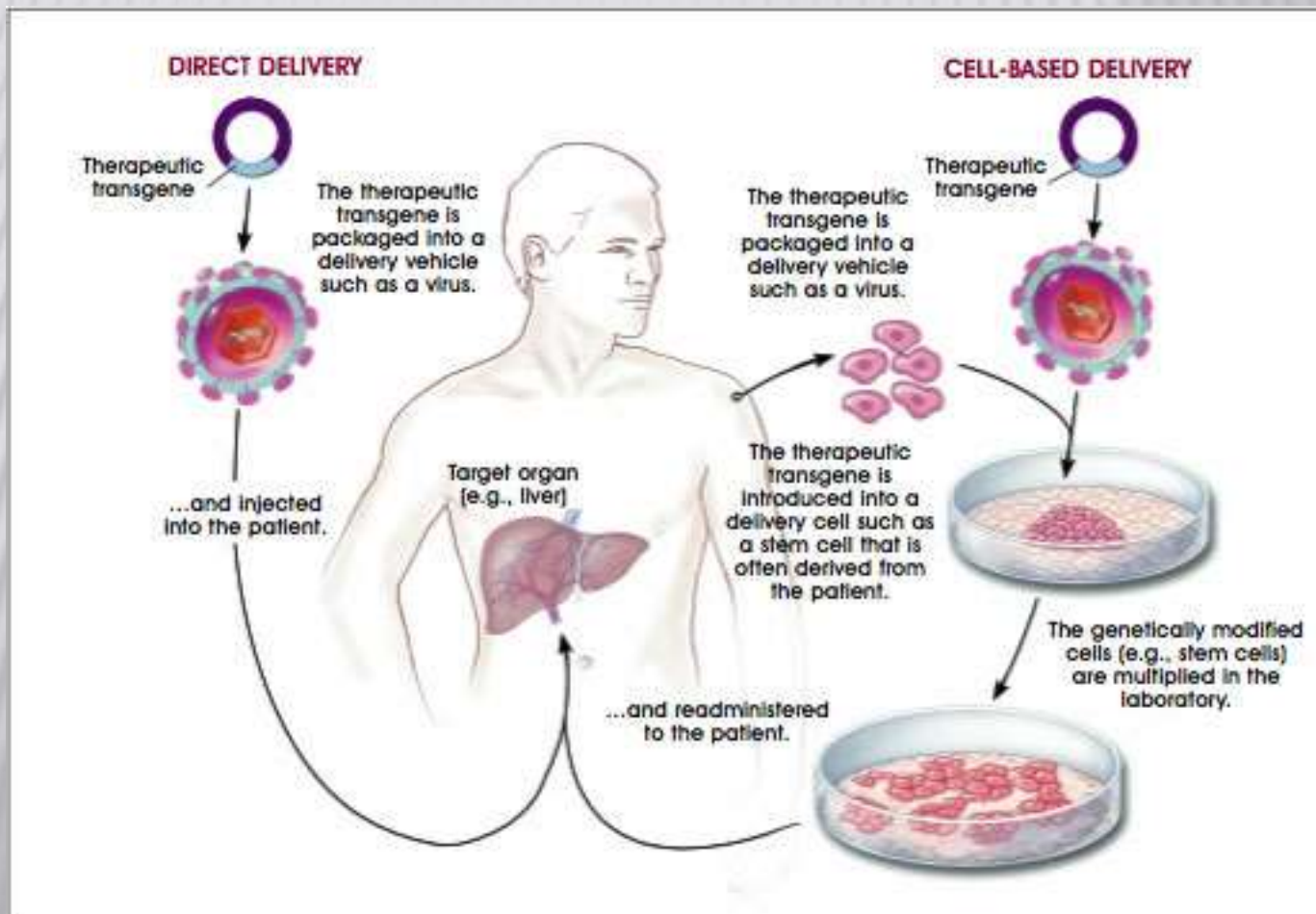


GENETIČKI INŽINJERING I TRANSGENEZA -

Najpogodnije ćelije za ova istraživanja su ćelije kostne srži zbog svoje visoke proliferativne mogućnosti. Punkcijom, kostna srž se izdvaja iz grudne kosti pacijenta obolelog od nekog hematološkog oboljenja i ćelije se stavljaju u medijum (kultura ćelija). U isti medijum se ubacuju retrovirusi kojima su ugrađeni zdravi geni.



Retrovirusi kao vektori, pored svog genoma u ćeliju (limfocit) ugrađuju i zdravi gen. Nakon više mitotskih deoba ovako genetski izmenjene ćelije se vraćaju u organizam obolele osobe. Međutim, ova metoda još uvek nije dovoljno usavršena jer od velikog broja ćelija samo neke od njih su dobile zdravi gen na odgovarajućem mestu genoma.



Problemi s genskom terapijom

- **Kratkotrajna**

Vrlo teško je postići dugotrajan učinak bez integracije u genom, a čak i tada ishod nije izvestan.

- **Imuni odgovor**

Reducira učinak, onemogućava operativnu terapiju.

- **Problemi s virusnim vektorima.**

Toksičnost, imuni i upalni odgovor, mogućnost povratka sposobnosti za izazivanje bolesti.

- **Višegenske bolesti**

Kombinovani učinak više gena – teško lečenje.

Prema ciljnim ćelijama genska terapija može biti:

- somatska genska terapija, gde su ciljne ćelije sve ćelije organizma, osim polnih i
- germinativna genska terapija kod koje se genski materijal unosi u polne ćelije.

Pri somatskoj genskoj terapiji, promene u genomu ostaju ograničene na osobu kod koje je terapija primenjena, i nema uticaja na genom potomstva. A pri germinativnoj genskoj terapiji promena u genomu se prenosi na potomstvo generacijama. Ova podela je za sada uglavnom teoretska, jer ne postoji pouzdan način kojim bi se moglo pri *in vivo* genskoj terapiji sprečiti unos genetskog materijala u polne ćelije.

Prema načinu primene genska terapija može biti:

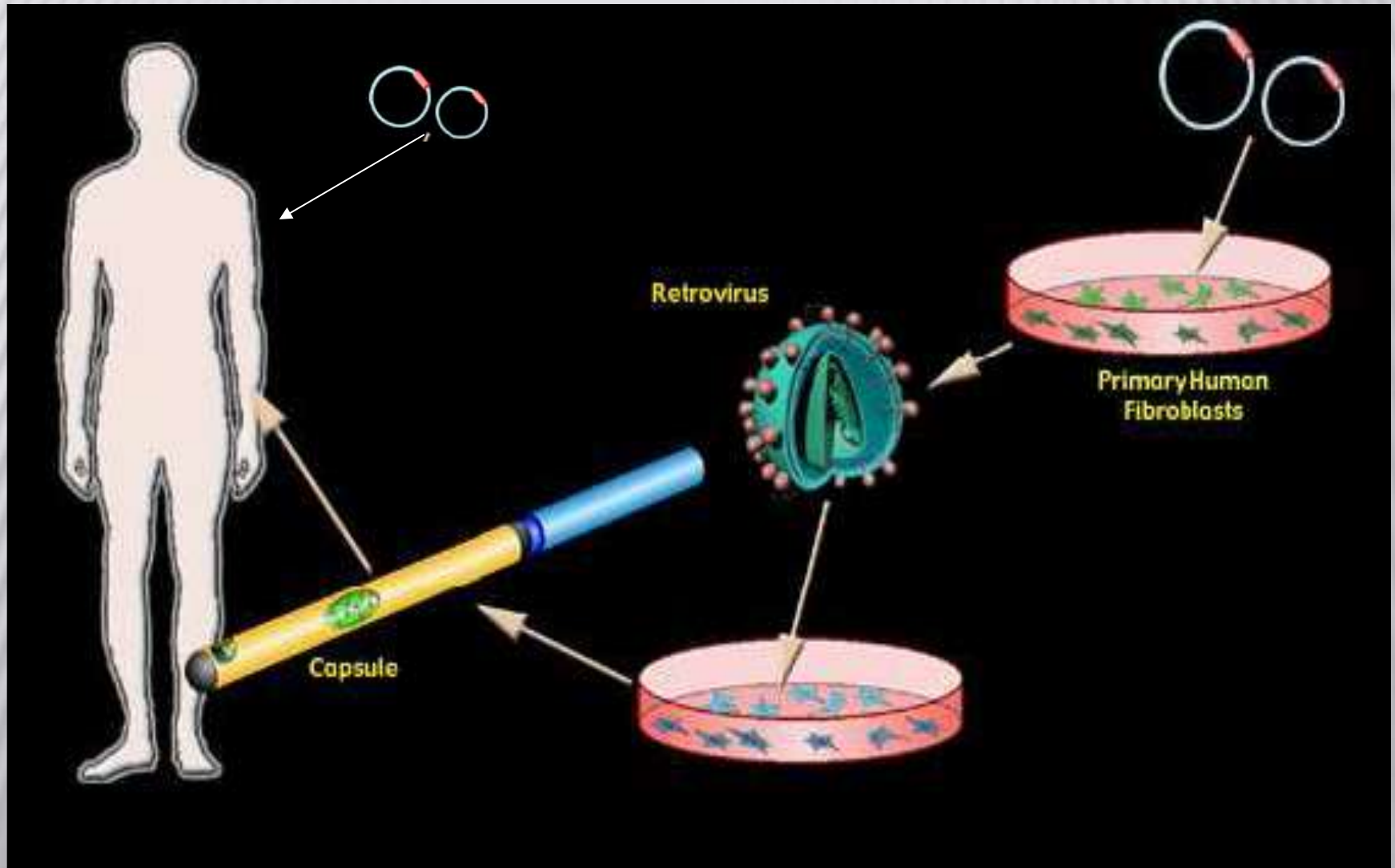
- *ex vivo* genska terapija, koja se obavlja u laboratorijskim uslovima na ćelijama koje se kasnije vrata u organizam bolesnika i
- *in vivo* genska terapija kod koje se genski materijal unosi direktno u telo bolesnika putem vektora.

**Genska
terapija**

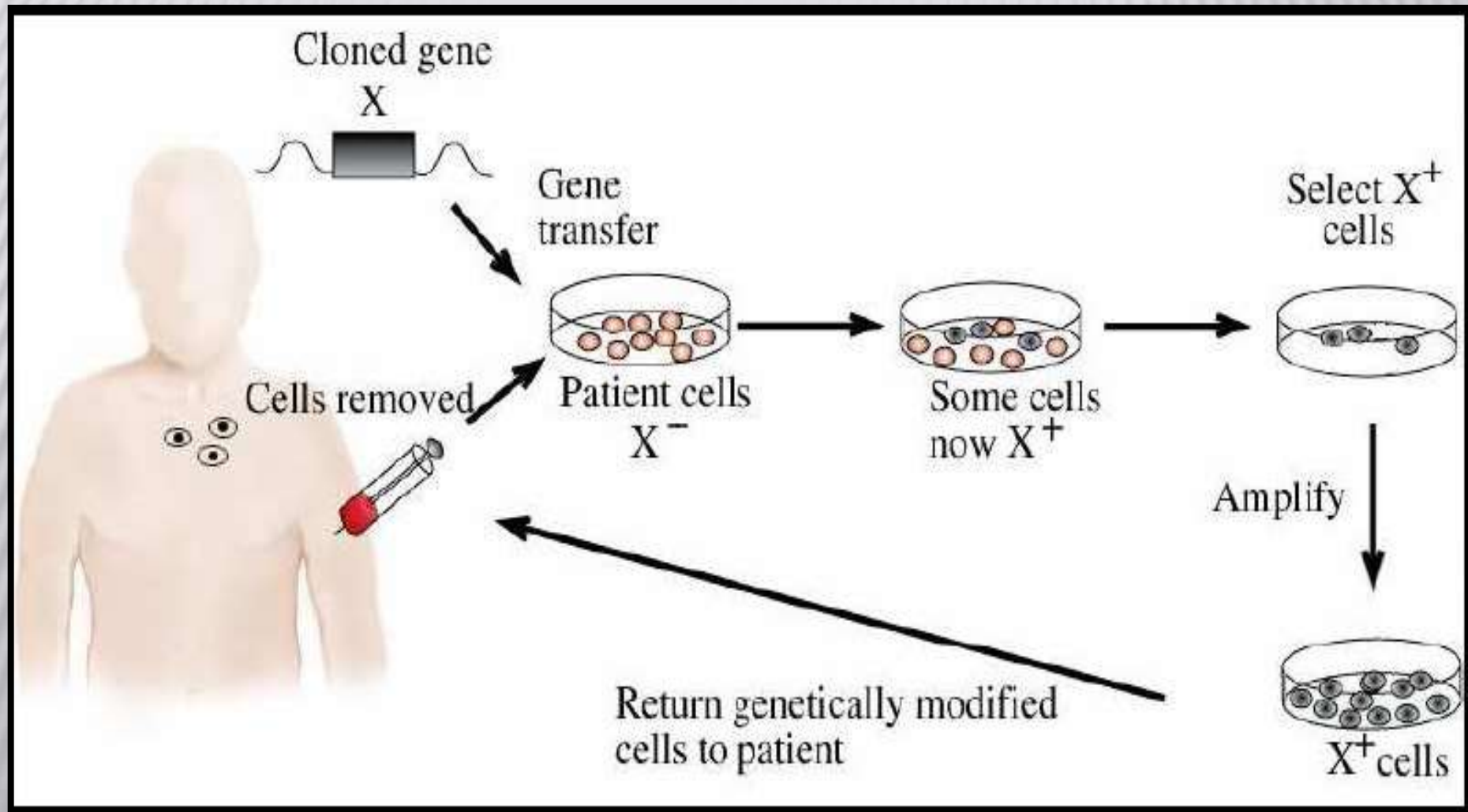
Dva tipa genske terapije

in vivo

ex vivo



GT ex vivo



GT *in vivo* i *ex vivo*

in vivo

- Genetički materijal unosi se direktno u telo pacijenta.
- Prilično nasumičan proces i mala mogućnost kontrole.
- Jedina mogućnost za tkiva koja se ne mogu uzgajati *in vitro*.

ex vivo

- Genetički materijal se najprije unosi u ćelije u kulturi.
- Kontrolisan proces, selekcija ćelija sa transgenom.
- Ćelije su obično autologne tj. uzimaju se iz tela pacijenta i nakon modifikacije vraćaju nazad.

Načini unosa DNK zavisno od namene GT

- Unos visokoefikasnim biološkim vektorima; virusnim vektorima-Zamena gena. Monogenske bolesti: cistična fibroza, teška kombinovana imunodeficijencija, hemofilija.
- Direktni unos gole DNA- Kratkotrajna ekspresija za podsticanje imunog odgovora.
- Unos DNK putem liposoma čime se ćelije čine osjetljivijim za radioterapiju.

Metode unosa terapeutskih elemenata DNA

- *Unos putem bioloških vektora*

Geneticki modificirani virusi - ne mogu se replicirati u domaćinu.

Trenutno najefikasnija metoda prenosa DNA u genskoj terapiji

Poželjna svojstva vektora za gensku terapiju

- Visoki titar ($>10^8$ čestica/ml).
- Laka i reproducibilna metoda proizvodnje.
- Precizno i stabilno uvođenje transgena.
- Vektor ne bi smeo indukovati imuni odgovor nakon unosa u organizam.
- Kontrolisana ekspresija transgena (on/off sistem)
 - regulatorni elementi unutar transgena.
- Specifičnost za pojedine tipove ćelija.

Virusni vektori za gensku terapiju

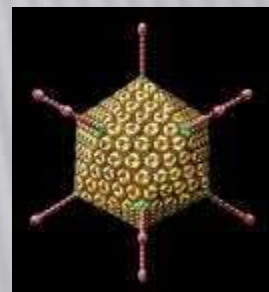
Retrovirusi

dl RNA (*dendrimer-like RNA*) virusi koji se ugrađuju u genom domaćina putem dl DNA oblika, HIV, mišji virus Leukemije (MoMuLV), (Reverzna transkripcija).



Adenovirusi

dl DNA (*dendrimer-like DNA*) virusi koji uzrokuju respiratorne, intestinalne i infekcije oka u ljudi
Virus obične prehlade.



Adeno-asocirani virusi

jl DNA (*jejuni like DNK*) virusi koji se mogu ugraditi na specifično mesto unutar kromosoma 19.



Herpes simplex virusi

dl DNA virusi koji napadaju specifične tipove ćelija, npr. Neurone.



Metode unosa terapijskih elemenata DNA

•Unos gole DNA

Jednostavnom iglom i špricom – tumorsko tkivo,

*Genskim pištoljem – koža, neprikladno za
tumore,*

Unos liposomima :

**Dopremanje do ciljnog tkiva intravaskularnim,
intratrahealnim, intraperitonealnim,
intrakolonskim putem.**

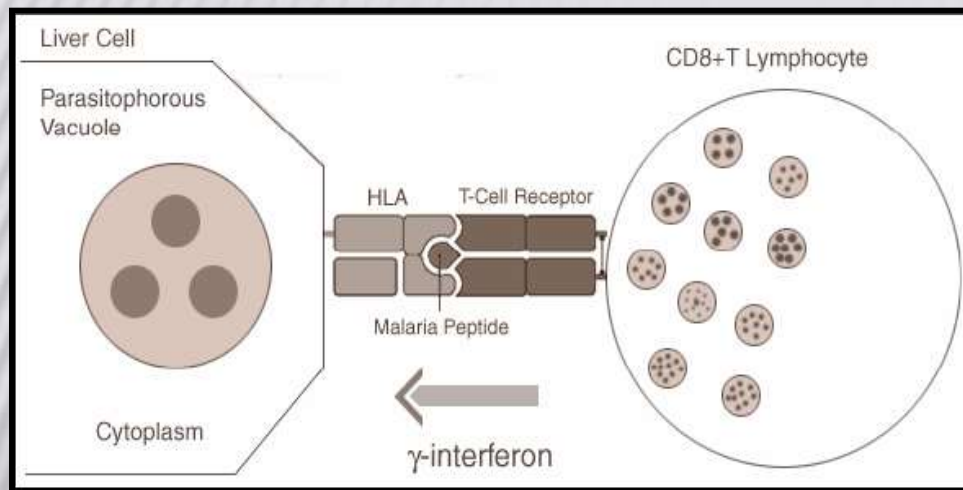
Unos gole DNA

Intramuskularno, intravaskularno.

Produžena *in vivo* ekspresija niskog stepena.

Jednostavno i jeftino, ali ne i univerzalne

DNA vakcine:



T-limfociti prepoznaju ćeliju s parazitom malarije

Proizvodnja INF-A i stimulacija prezentacije antigena

Infektivne bolesti

Tradicionalne vakcine još uvek efikasne.

Rak

Povećanje postojećeg imuno-odgovora i podsticanje imuno odgovora prema neprepoznatom ili slabo antigenom tumoru.



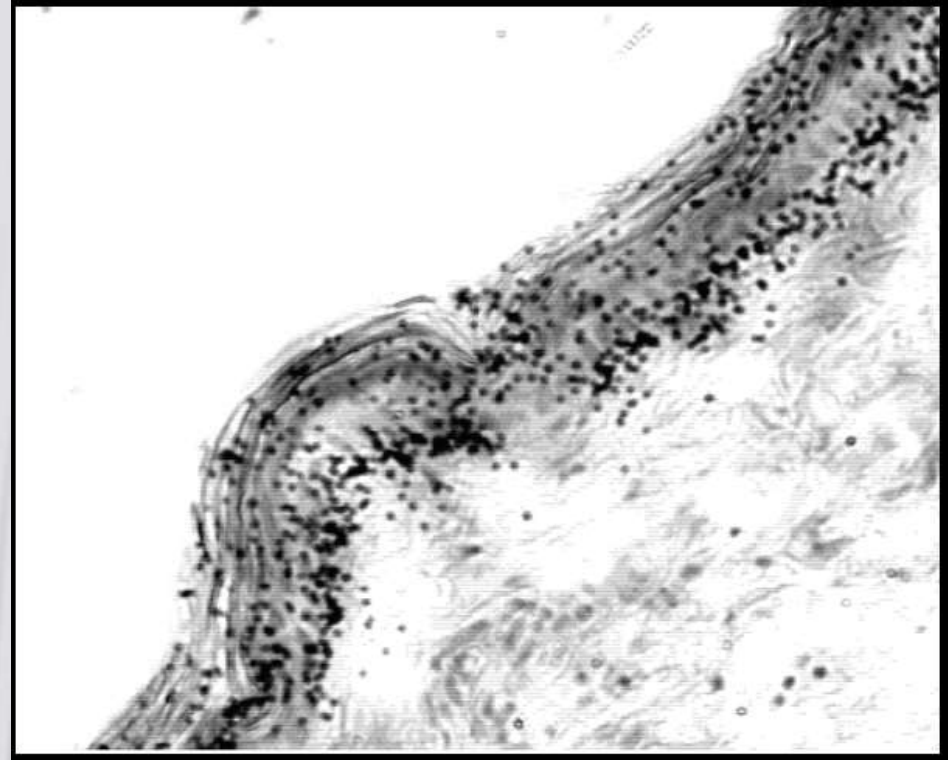
**Biolistika
mikroinektori**
Mišicna distrofija

Genski pištolj

Plazmidna DNA se taloži na čestice zlata ili volframa dijametra 1-3 μm

Ispaljivanje pod pritiskom helijuma ili pod visokim naponom.

Unos gole DNA



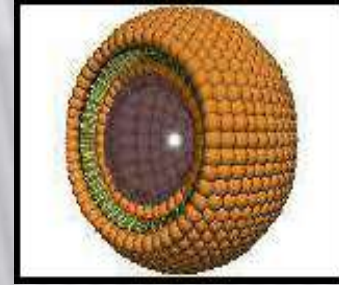
Čestice zlata obavijene oko DNA
nakon ispaljivanja u kožu

Biolistika-mikroinektori
Mišicna distrofija

Unos gole DNA

Liposomi – Cistična fibroza

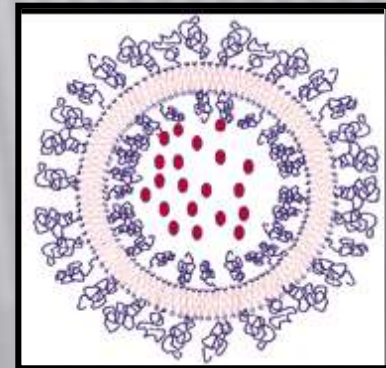
Nastaju spontanom agregacijom lipidnih molekula u vodenom okruženju. Kationski liposomi vežu negativno naelektrisanu DNA. Tako omotana DNA zaštićena je od razgradnje. Lipofektin, lipofektamin – služe i za transfekciju ćelija u kulturi.



Nedostatak jednostavnih liposoma je jer se vrlo se brzo uklanjaju iz cirkulacije putem makrofaga iz jetre.

Međutim, dodatak površinskih liganada smanjuje degradaciju liposoma: Modifikatori lipozoma su: Monosijalogangliozi, Polioksietileni, Holesterol, Glukuronska kiselina

Modifikovani lipozomi imaju produženi polu-život zbog reducirane opsonizacije (ometanja) proteinima iz plazme.



Liposomi mogu poslužiti kao tumor-specifične vezikule čak i bez posebnog usmeravanja

PREDNOSTI

Jeftiniji od virusnih vektora.

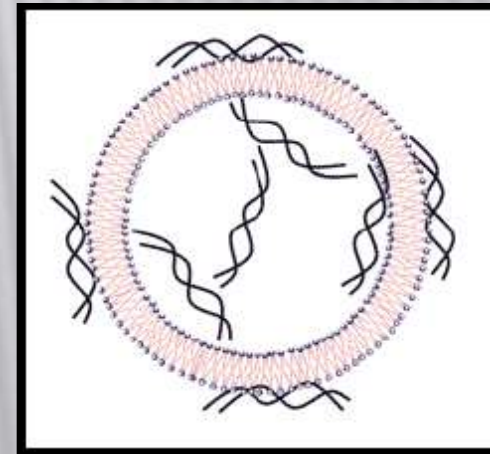
Ne izazivaju imuni odgovor.

Izuzetno prikladni za dopremu DNA u pluća putem aerosola (cistična fibroza).

NEDOSTACI

Potrebno 100-1000 puta više DNA da bi se postigao isti efekat kao kod virusnih vektora.

Nisu prikladni za tretman mnogih bolesti.



Unos gole DNA

Kohleati – višeslojni liposomi

Dugotrajno i jednostavno čuvanje

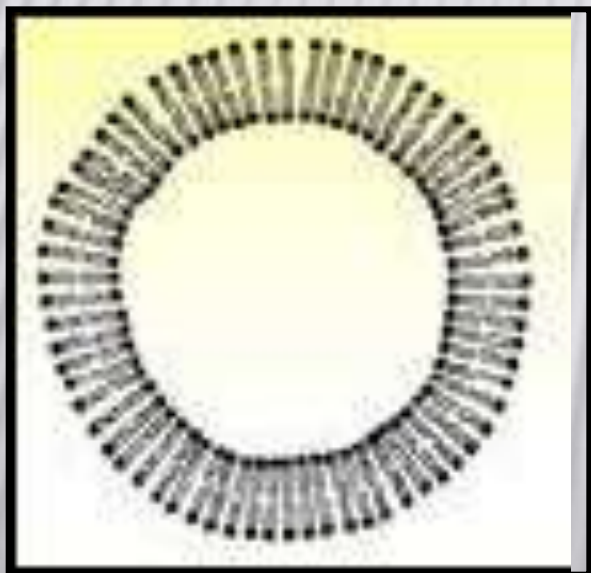
barem godinu dana kao liofilizirani prah na sobnoj temperaturi,

Trajne vezikule

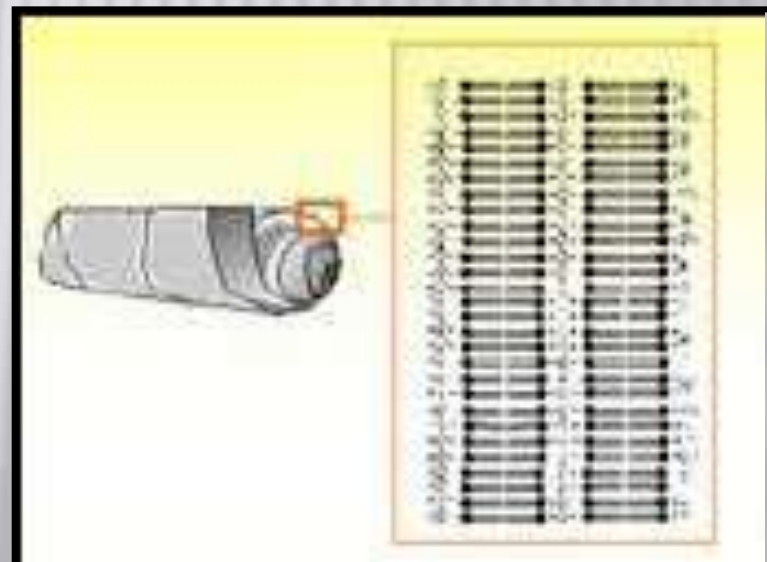
preživljavaju višestruke fuzije s membranom,

Preživljavanje u gastrointestinalnom traktu

prikladni za oralnu primjenu,



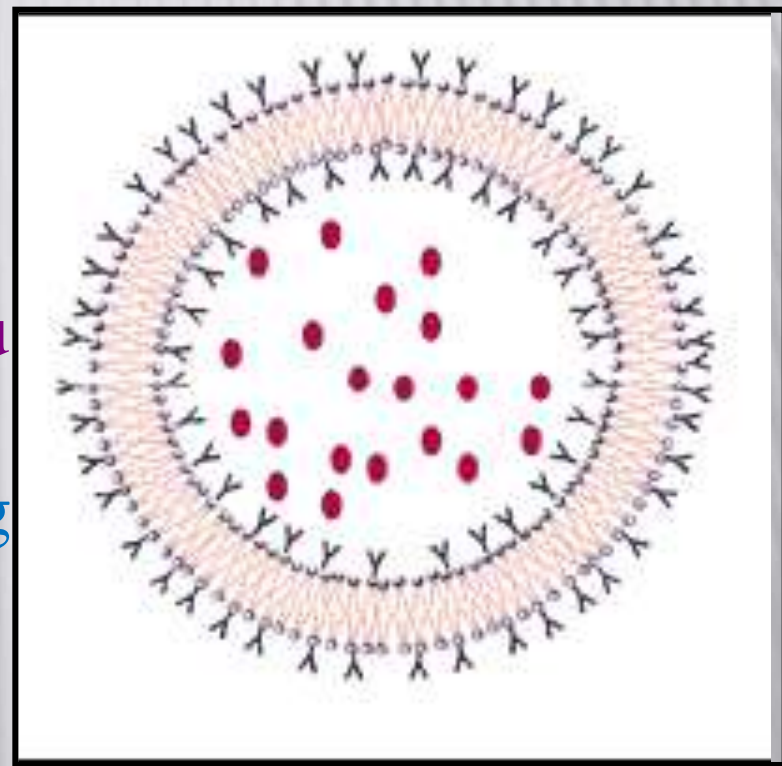
liposom



kohleat

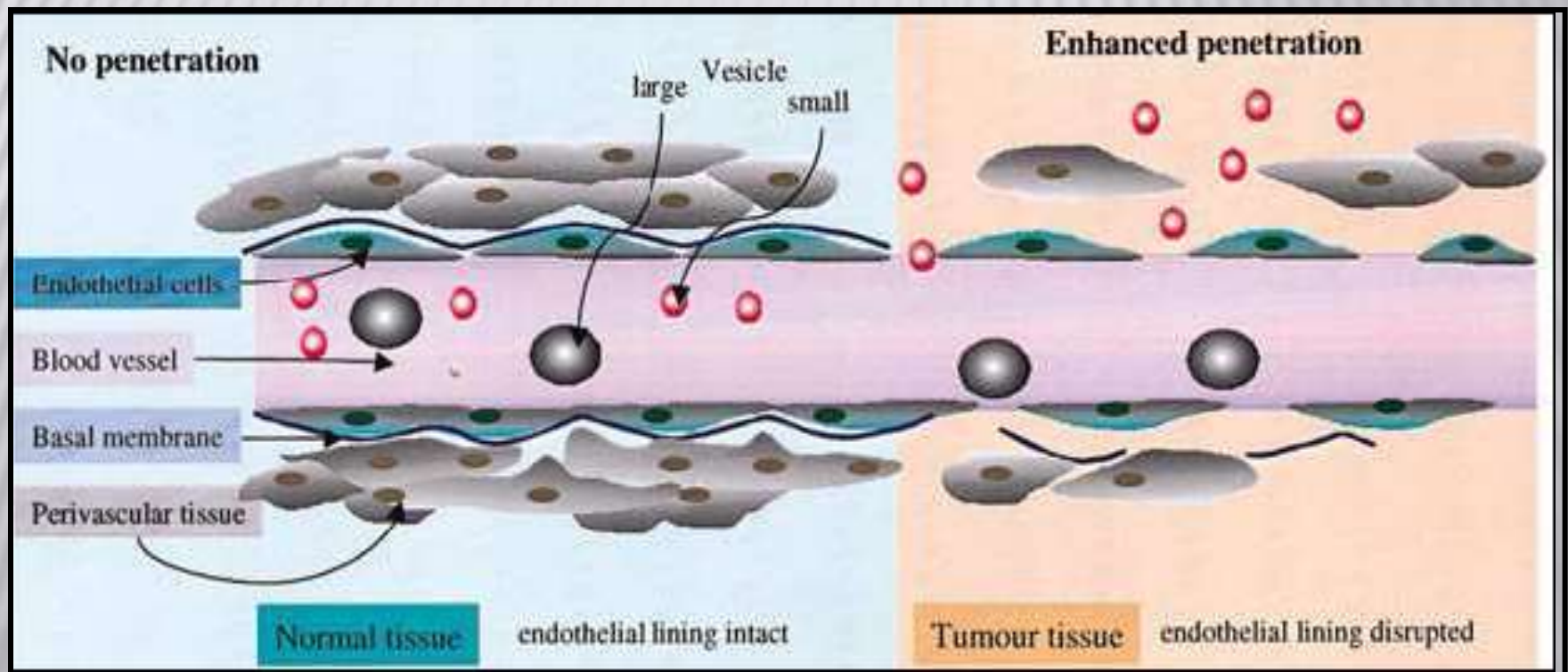
Imunoliposomi

- Za aktivno usmeravanje DNA
- Na površini nose specifična protivtela=antitela
- Antitela na unutarćelijskom miozinu usmeravaju imunoliposome na područje srčanog mišića zahvaćenog infarktom.
- Antitela na molekule specifične za tumore usmeravaju imunoliposome na ćelije tumora.

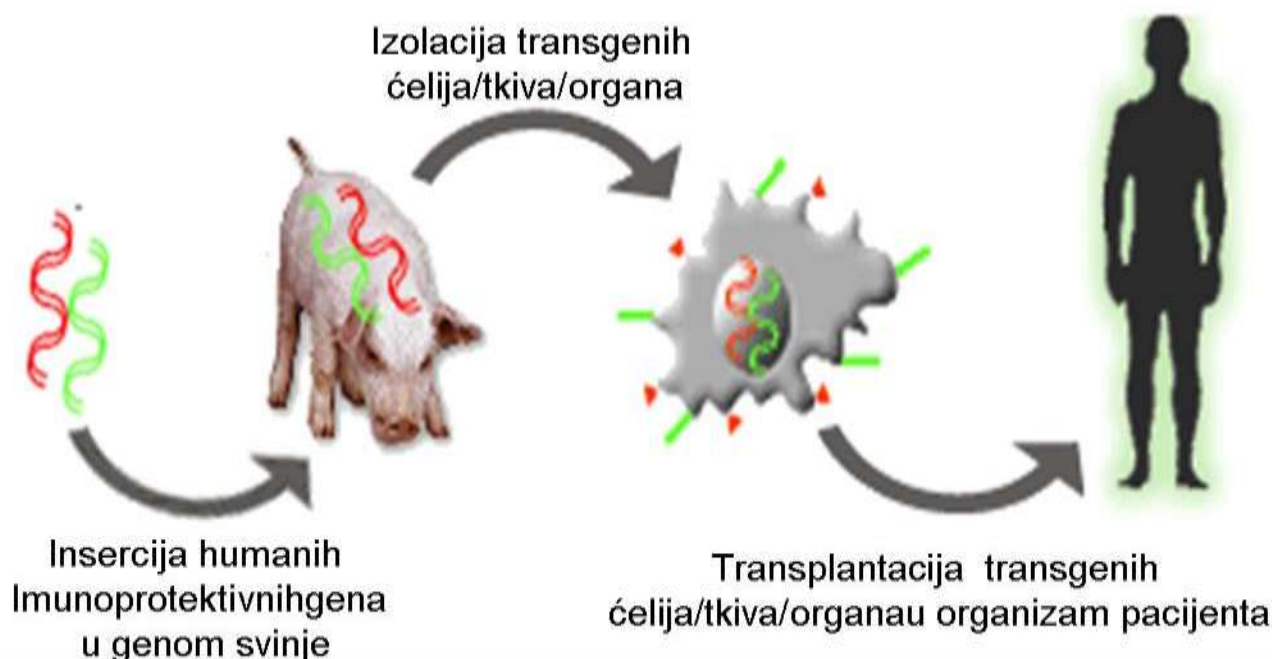


Liposomi mogu poslužiti kao tumor-specifične vezikule čak i bez posebnog usmeravanja

Liposomi lakše ulaze u krvne sudove sa oštećenim endotelom -tumorska tkiva

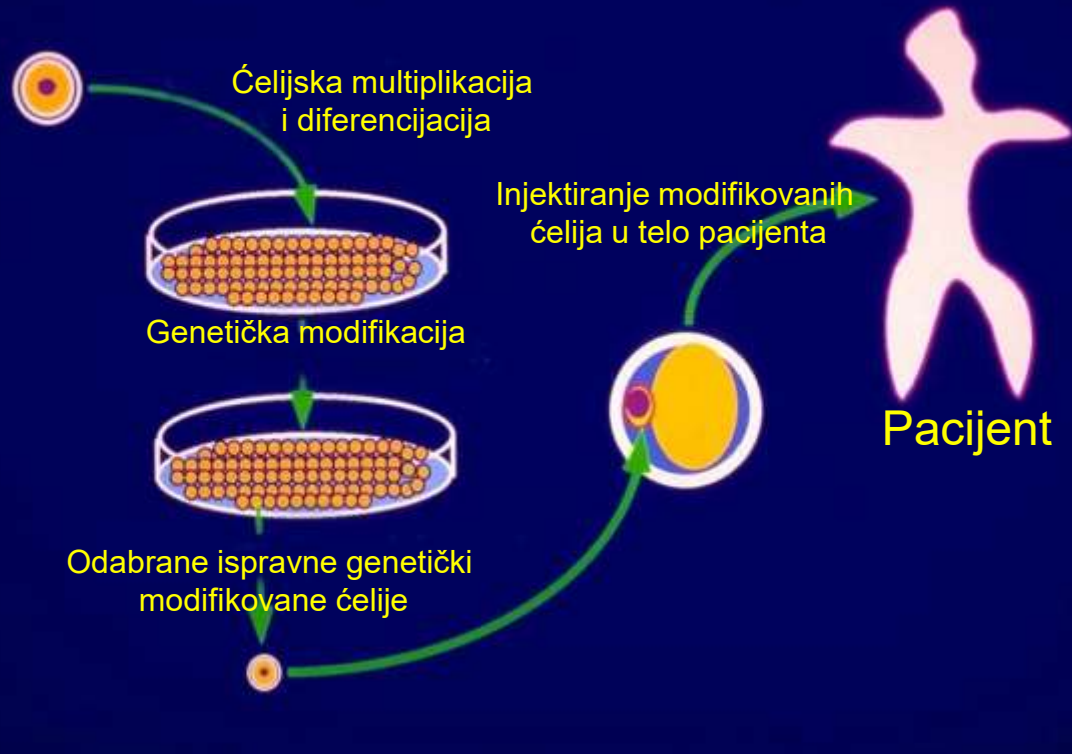


Transgeneza kodirajućih sekvenci može značiti uvođenje novih alela ili već postojećih gena u genom određene vrste. Tako su, u genomu ženki životinja, već prisutni geni koji kodiraju sintezu enzima, aktivnih u laktogenezi. Postupkom transgeneze, moguće je dobiti ženke koje će proizvoditi mleko sa niskim sadržajem laktoze. Ovakve životinje u svom genomu sadrže transgen, tj. gensku konstrukciju, čija kodirajuća sekvenca kontroliše sintezu enzima koji učestvuju u stvaranju mlečnog šećera, tj. Laktoze.



**Genska
terapija**

Posebnu pažnju zaslužuju transgene životinje koje služe za proizvodnju humanih proteina u terapijske svrhe, kao što su npr. faktori koagulacije krvi ili alfa-1-antitripsin. Tako, mogu da se dobiju transgene ovce za genske sekvence koje kodiraju sintezu faktora koagulacije krvi kod čoveka. Obično se, u ovom postupku, kodirajuće sekvence humanog genoma za faktore koagulacije krvi insertuju u molekul DNK, neposredno iza promotorne sekvence gena koji kodiraju sintezu proteina mleka, kao što je npr. promotorna sekvenca gena za beta-laktoalbumin



**Genska
terapija**

Tada se u organizmu transgenih ovaca, proizvode faktori koagulacije krvi čoveka, izlučuju se u mleku, a iz mleka se mogu jednostavno izolovati u čistom obliku. Razmatra se upotreba transgenih životinja za proizvodnju tkiva ili organa, namenjenih za transplantaciju kod čoveka. Tako mogu da se dobiju transgene svinje za gene koji kodiraju sintezu polipeptida, a koji se nalaze na površini ćelija tkiva i organa kod čoveka i da, na taj način, pri transplantaciji bude onemogućena reakcija odbacivanja transplantanata.

Genska terapija



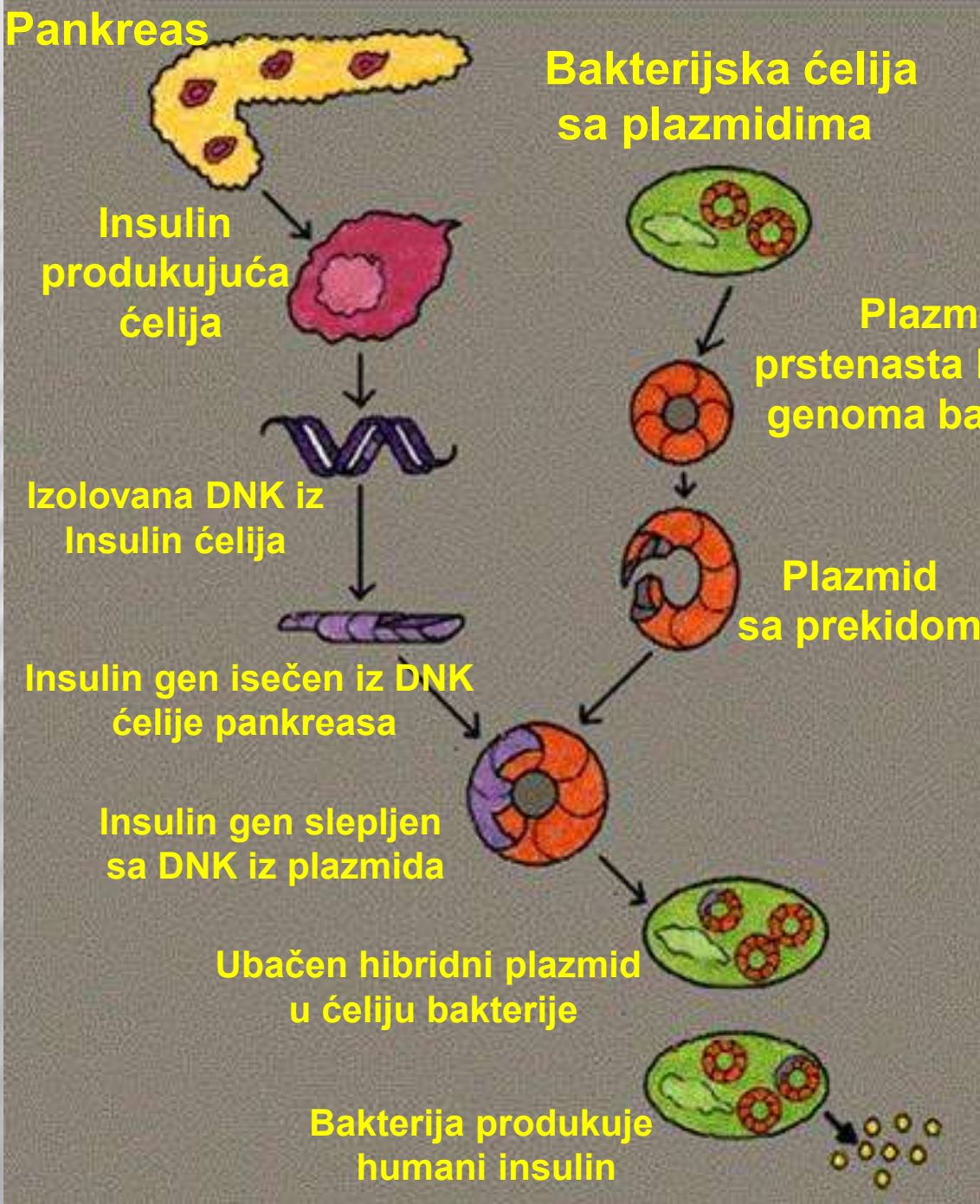
Oduvek je čovekova želja bila da utiče na kvantitativne, tj. proizvodne karakteristike domaćih životinja. Međutim, rani eksperimenti u proizvodnji transgenih životinja sa bržim i većim prirastom, ostali su bez uspeha. Transgene svinje za gen koji kodira sintezu hormona rasta sa bržim i većim prirastom, bile su podložne nizu koštano-zglobnih oboljenja, koja su upravo bila posledica abnormalnog prirasta

Genska terapija

Transgeno prase sa izmenjenim
genom za hormon rasta



GENETIČKI INŽINJERING I TRANSGENEZA–



Danas je moguće sintetisati pojedine proteine koji se koriste u terapijske svrhe (insulin, somatostatin, interferon) ubacivanjem humanih gena u prokariotske sisteme. Humani insulin sintetisan u *Escherichia coli* pušten je na tržište 1982. god.

Genska terapija kod psa sa mukopolisaharidozom VII koja je u osnovi Taj Sach sindroma (deficit b-glukuronidaze)



The image features a close-up of a glass Erlenmeyer flask on the right side, partially filled with a vibrant blue liquid. The flask has measurement markings on its side. To the left of the flask is a solid blue rectangular block. The background is a light, neutral color. The title text is centered in the lower half of the image.

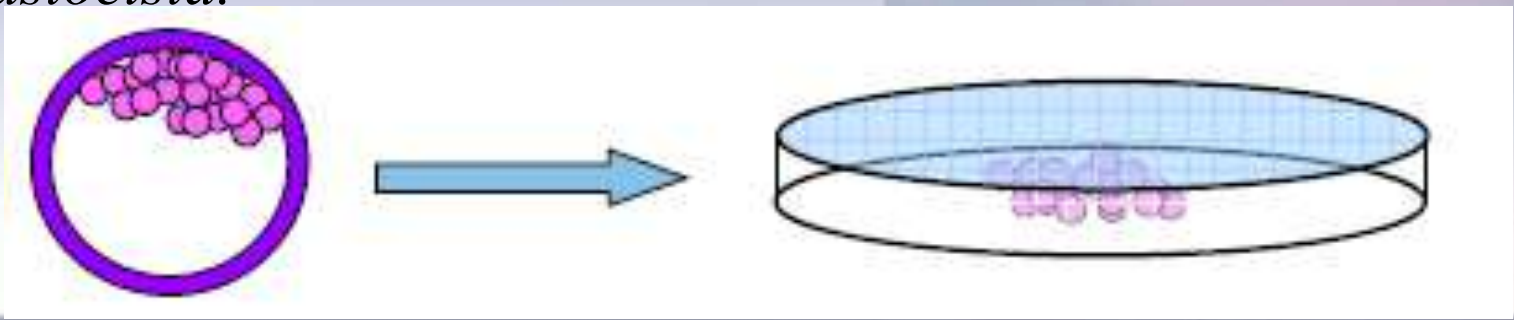
TERAPIJA MATIČNIM ČELIJAMA

Embrionalne matične ćelije

- *TOTIPOTENTNE ĆELIJE* su sposobne stvoriti bilo koji drugi tip ćelije, to su embrionalne ćelije u fazi od 8 blastomera.

PLURIPOTENTNE ĆELIJE su sposobne stvoriti mnoge, ali ne sve tipove ćelija, to su embrionalne matične ćelije i odrasle matične ćelije.

- *Pluripotentne embrionalne matične ćelije* potiču iz unutrašnje ćelijske mase blastocista.



- *Moguće je gajenje ovih ćelija u kulturi, manipulacija i ponovno vraćanje u blastocistu gde doprinose rastu svih delova embriona.*



Odrasle matične ćelije

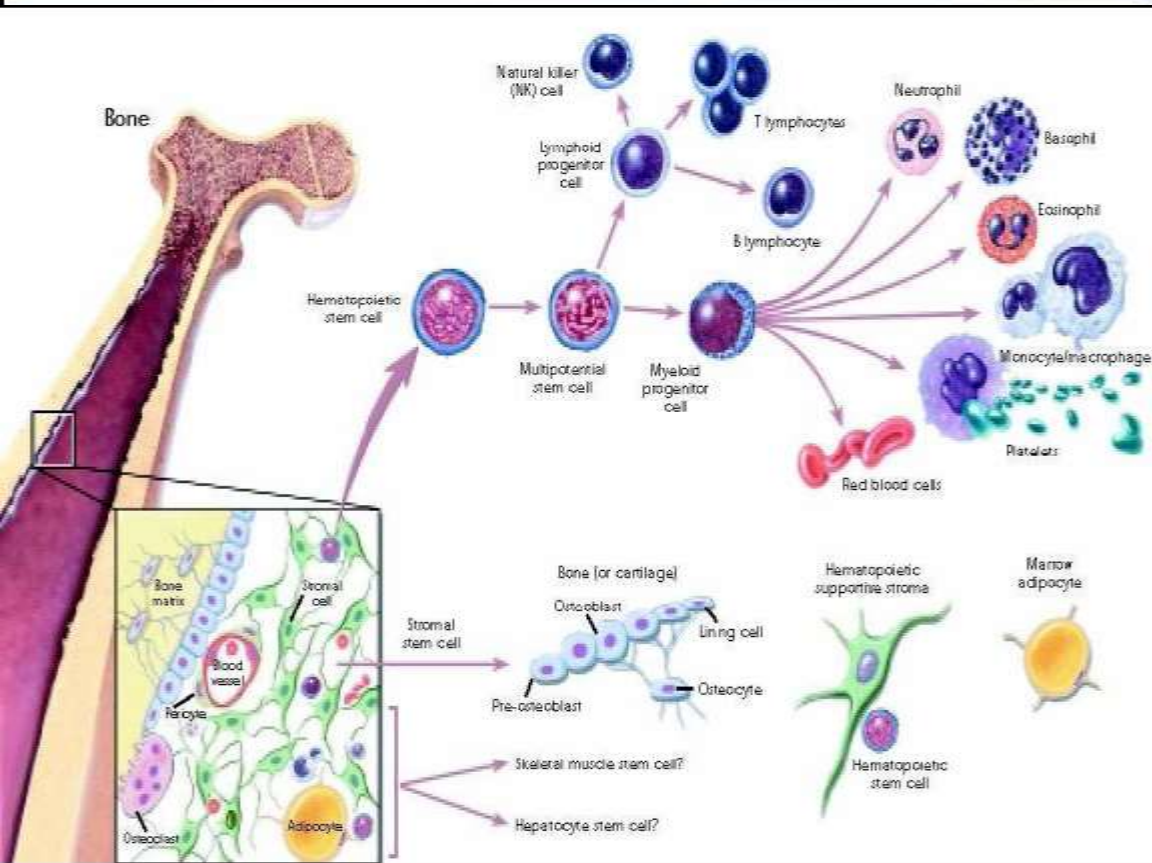
- **Multipotentne ćelije** su malobrojne nediferencirane ćelije među diferenciranim ćelijama ili tkivu, koje mogu da se diferenciraju u glavne specijalizovane tipove ćelija.

- Hematopoietske matične ćelije.
- Matične ćelije strome koštane srži.
- Moždane matične ćelije.
- Ćelije nađene u koži u perifernoj krvi, krvnim sudovima i jetri.

• **Umbilikalne matične ćelije**
(izolovane iz umbilikalne vene po rođenju)



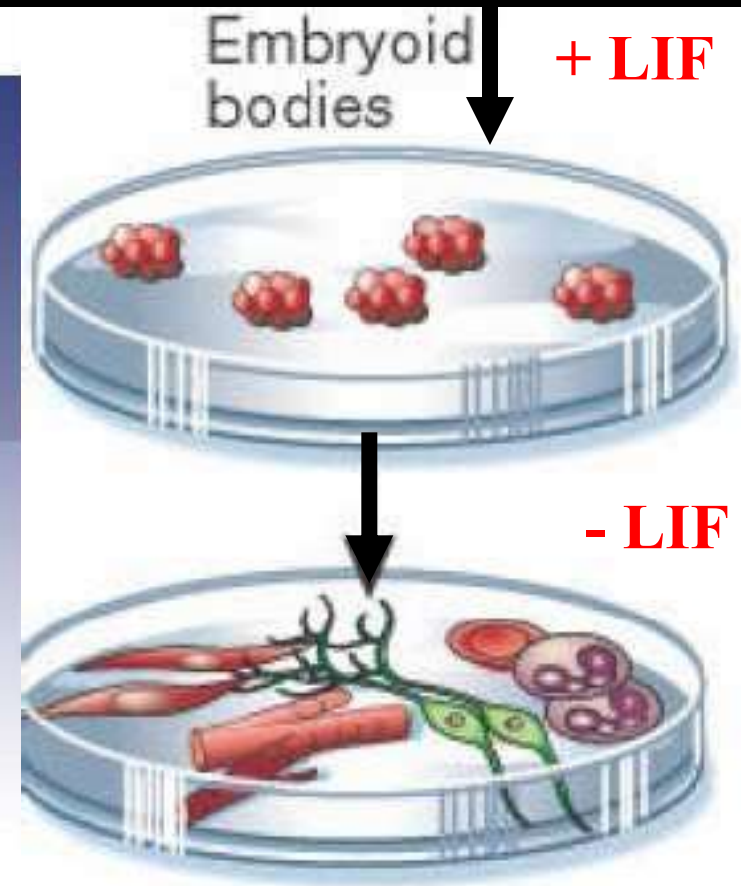
Diferencijacija hematopoetskih i stromalnih matičnih ćelija



Održavanje EMS u kulturi

- U kulturi se EMS održavaju u nediferenciranom stanju na sloju ćelija hraniteljica (feeder layer) uz dodatak faktora inhibicije leukemije (*leukemia inhibitory factor, LIF*).
- Održavaju se lako u kulturi u dužem vremenskom periodu.
- Neograničena količina ćelija.
- Ne pokazuju znakove starenja ili degeneracije.

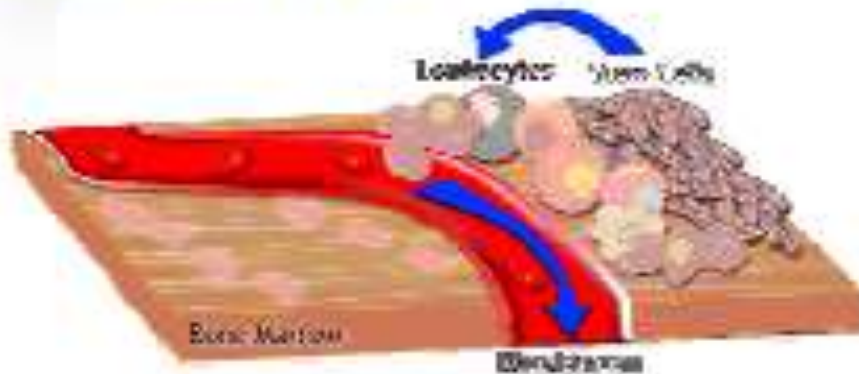
EMS spontano diferenciraju u različite ćelijske tipove u odsutnosti LIF.



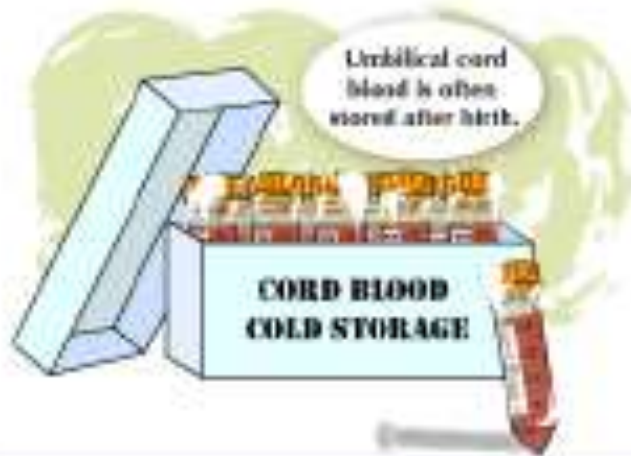


Najčешci izvori odraslih MS

■ Koštana srž



Krv iz umbilikalne vene



■ Periferna krv



Embrionalne i odrasle matične ćelije

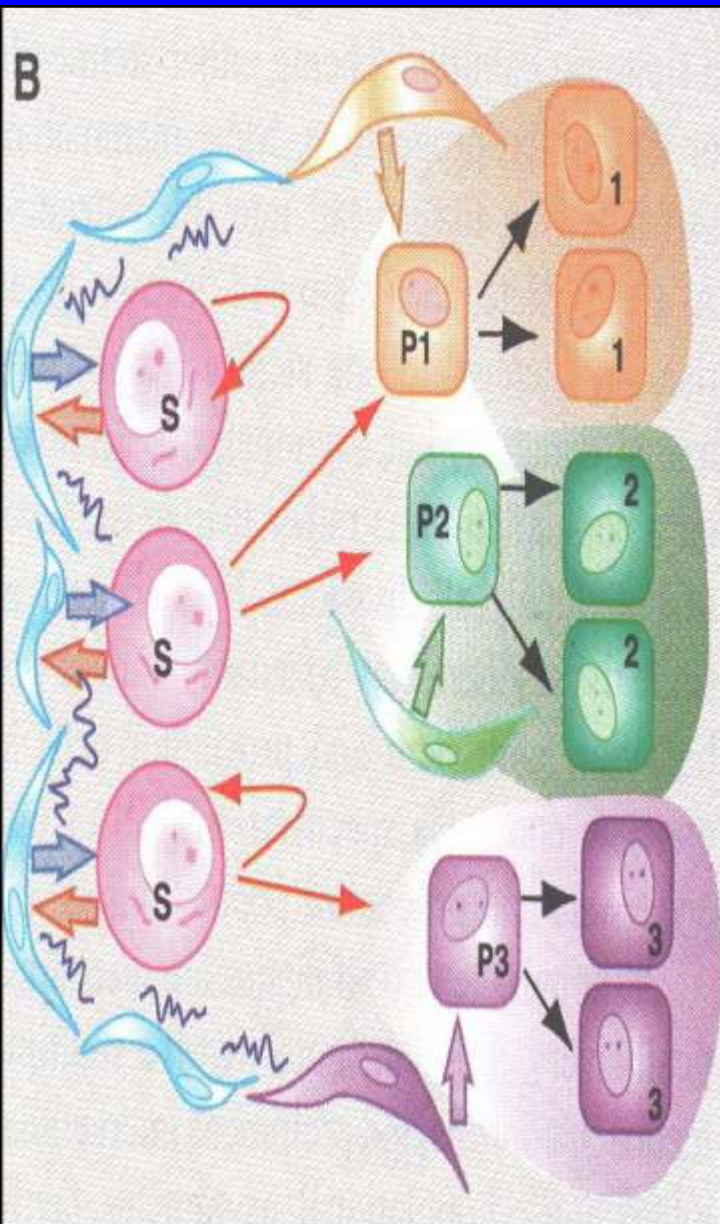
EMBRIONALNE MS

- *Visoki kapacitet za adaptivne promene.*
- *Potencijal za razvoj malignih bolesti.*
- *Neograničen životni vek.*
- *Neograničene zalihe.*
- *Etički i legalno problematični status.*

ODRASLE MS

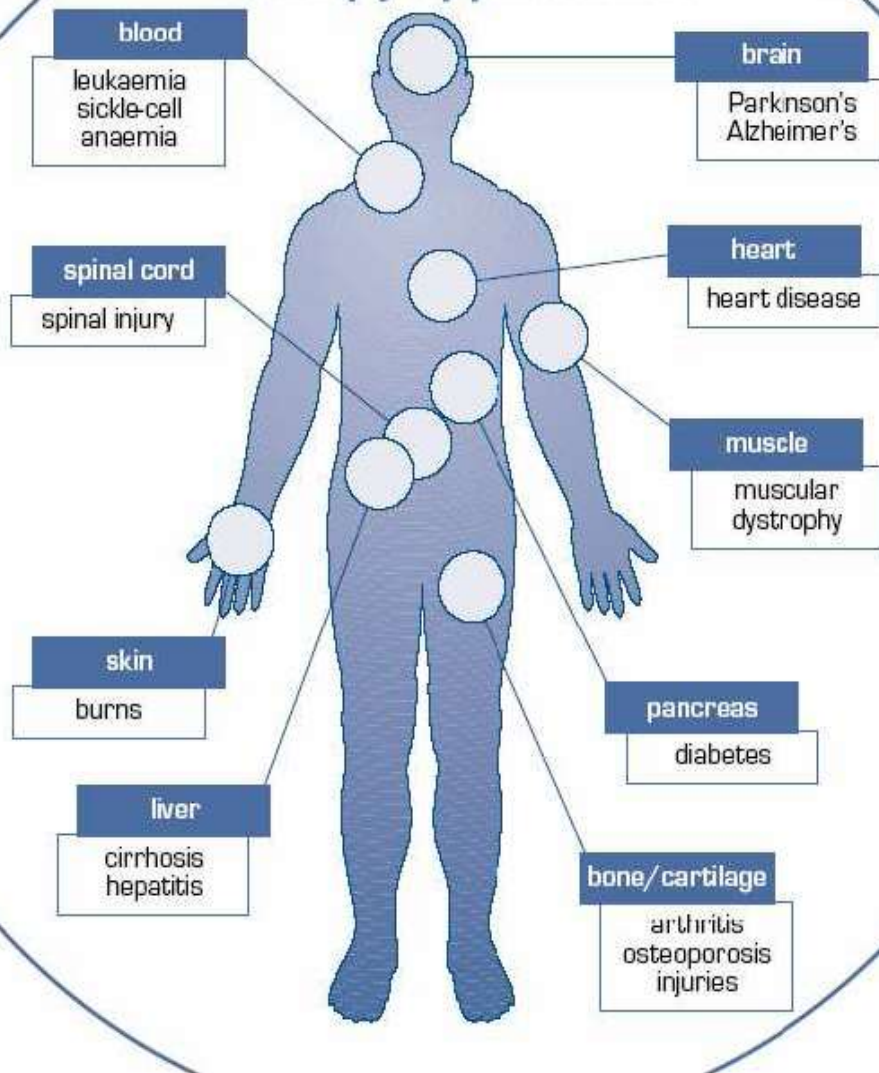
- *Ograničen razvojni potencijal*
- *Lakše za održavanje u kulturi.*
- *Gubitak sposobnosti proliferacije i diferencijacije nakon nekog vremena u kulturi.*
- *Etički status je manje problematičan.*

Ponašanje embrionalnih ćelija zavisi od sredinskog okruženja



- *Matične ćelije žive u specifičnom okružju koje im omogućava zadržavanje funkcije.*
- *Matična ćelija se nalazi unutar džepa kojeg čine potporne ćelije, omogućavajući pravilno orjentisanu ćelijsku deobu.*
- *Nakon deobe jedna ćelija prima specifične biohemijske signale kojima se zadržava u stanju matične ćelije, a druga ćelija ulazi u specifičnu diferencijaciju.*

Potential stem-cell therapy applications



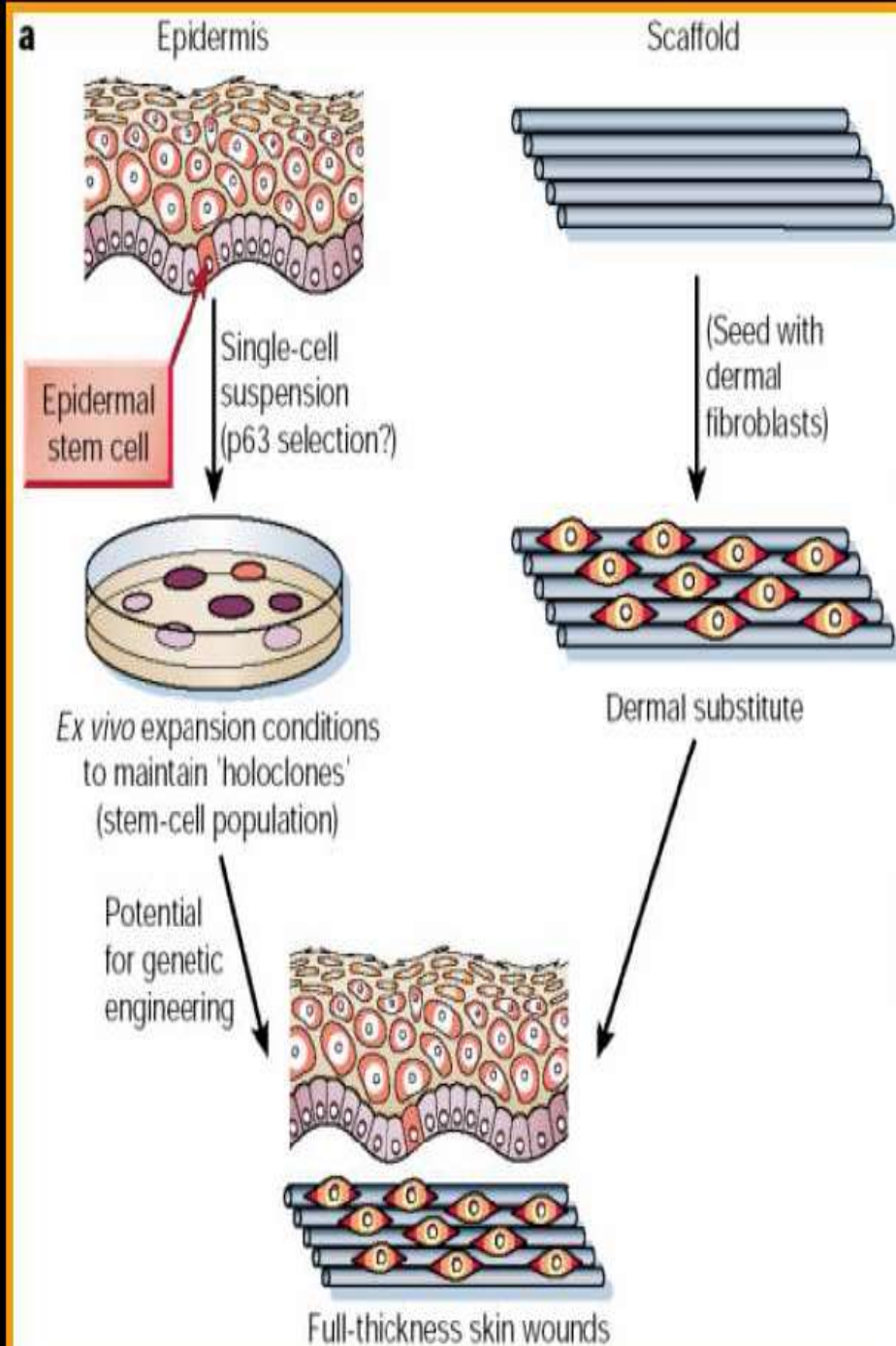
Degenerative diseases of many tissues and organs might be treated by transplanting either stem cells or stem cell derived material



TERAPIJA MATIČNIM ĆELIJAMA

Klinička primena embrionalnih ćelija

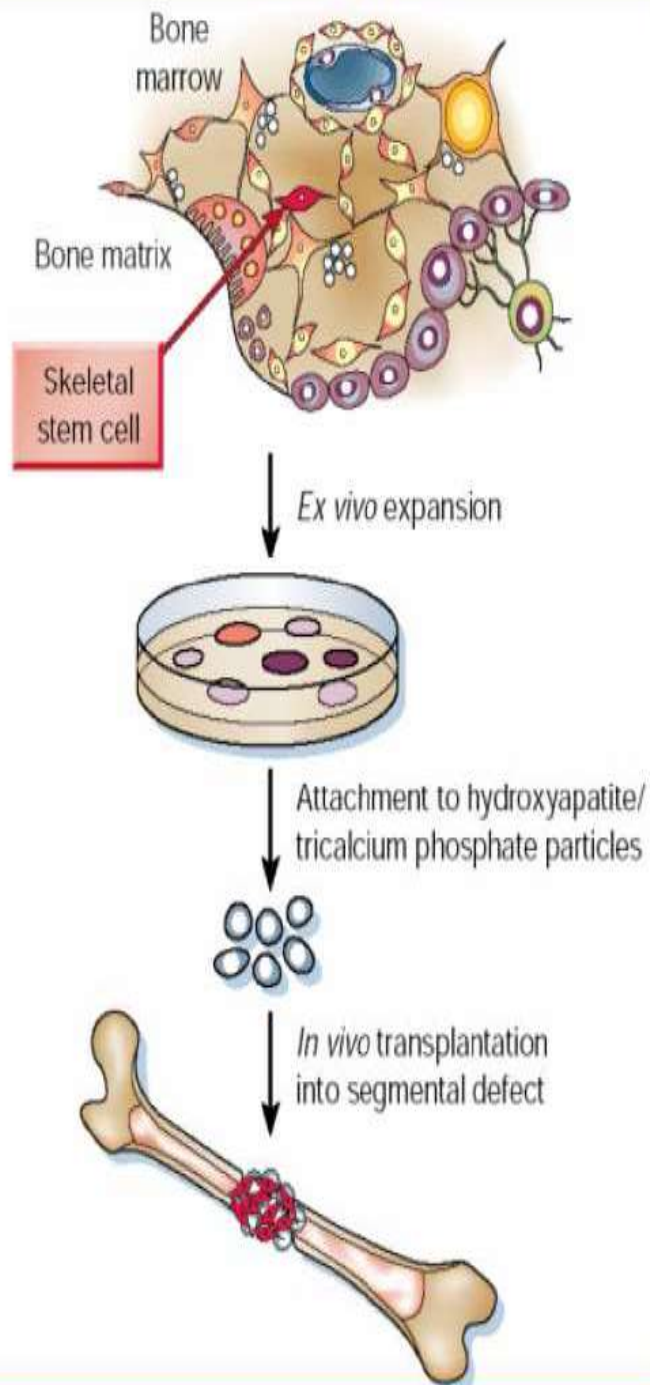
- *Hematopoeza kao model transplantacije matičnih ćelija:*
 - *Eliminacija endogenih tumorskih ćelija zračenjem, hemoterapijom i unos zdravih matičnih ćelija*
 - *Leukemija, limfom, rak dojke...*
- *Transplantacijska terapija akutnih i hroničnih degenerativnih bolesti; tkivno inženjerstvo.*
 - *Teške opekline, Parkinsonova bolest, multipla skleroza, oštećenja jetre, dijabetes (Langerhansova ostrvca koja ne proizvode insulin), plastična i rekonstruktivna hirurgija*
- *Genska terapija*



Tkivno inženjerstvo

- *Regeneracija 2D tkiva – koža*
- *Izolacija epidermalnih matičnih ćelija i propagacija u kulturi.*
- *Združivanje sa tkivom kože za zamenu (rešetka s fibroblastima)*
- *Bianco & Robey, Nature 414: 118-121, 2001*

b



Tkivno inženjerstvo

Regenracija 3D tkiva – kost

*Izolacija skeletnih matičnih ćelija i
propagacija u kulturi*

*Združivanje s 3D rešetkom,
česticama hidroksiapatita/
trikalcijum fosfata*

Unošenje na mesto povrede

*Bianco & Robey, Nature
414: 118-121, 2001*



Transplatacija matičnih ćelija u kombinaciji sa GT

Ekstrakcija matičnih ćeleija koštane srži



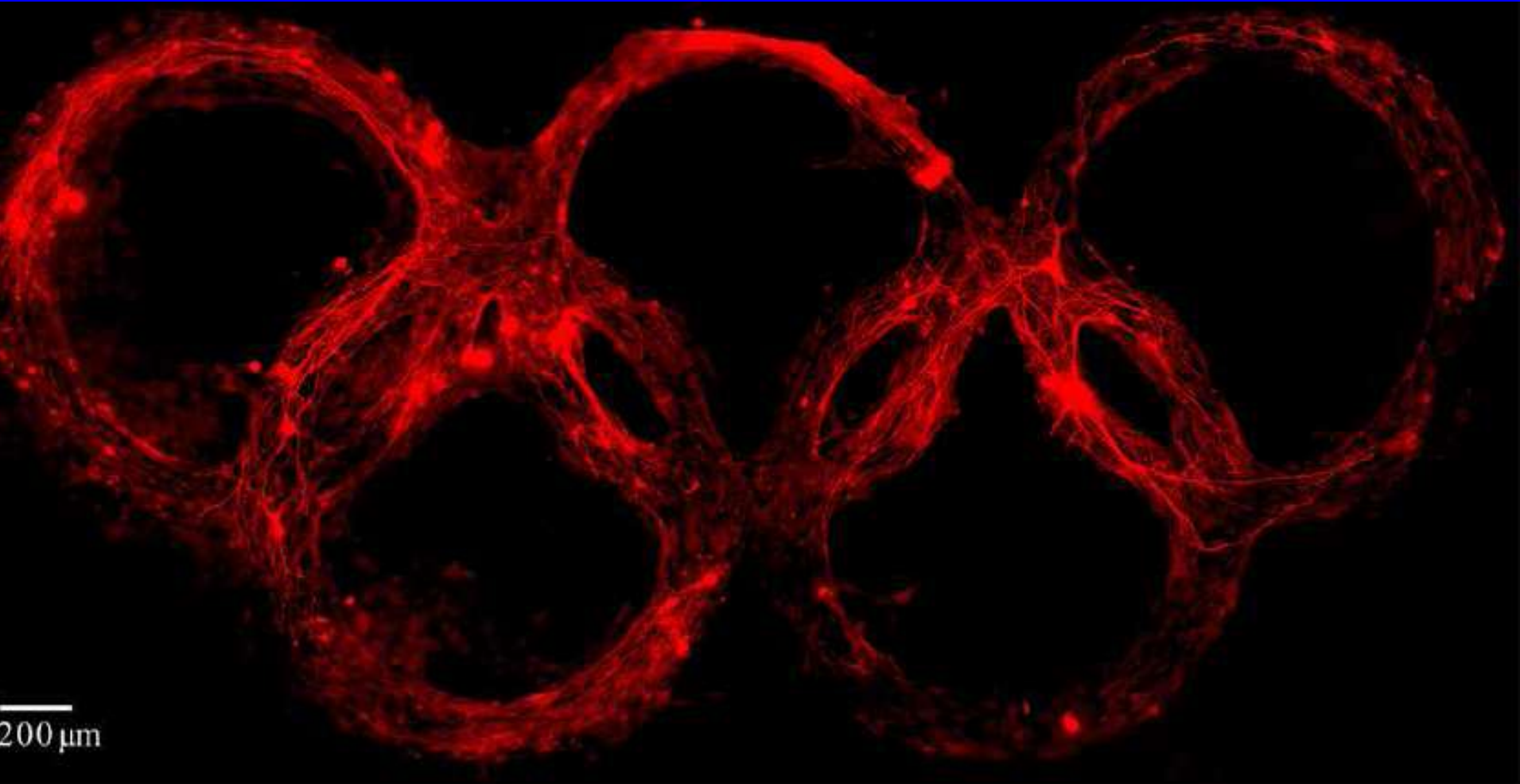
Koliko smo daleko od uzgoja organa in vitro ?

- *Organi su građeni od više vrsta tkiva – potrebno više vrsta matičnih ćelija; ćelije različitog tipa?*
- *Uzgojiti matične ćelije u kulturi, podstaći ih na ispravnu diferencijaciju-nesavršenost biotehničkih metoda*
- *Simulacija fizičkog okružja*
- *Izrada 3D rešetke za oblikovanje organa*
- *In vitro angiogeneza*



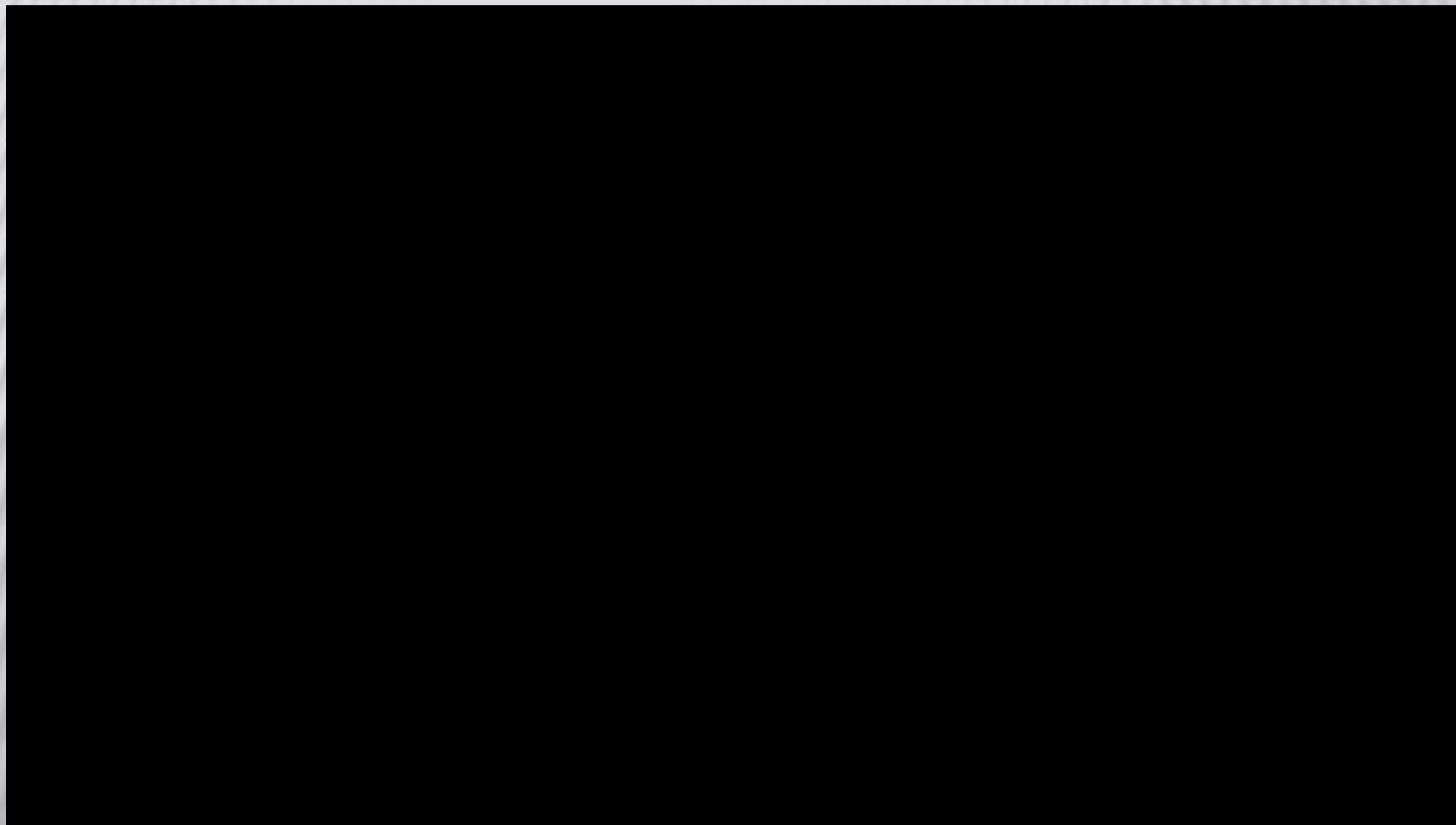
*Još uvek je mnogo
nepoznanica*

*Današnja nivo tehnologije:
olimpijski prsteni načinjeni od živih
ćelija u kulturi*



plastična rešetka+fibronektin+fibroblasti+neuroni+fl. antitela

Tkivno inženjerstvo - 3D produkcija cevastih organa



2266-USA-BIOPRINTING-TRACKED

LOCATION: WINSTON-SALEM, NORTH
CAROLINA, UNITED STATES

Duration: 0.57

Date Shot: RECENT

Narration by Matthew Stock

Restrictions: Broadcasters: None

Digital: None



REUTERS

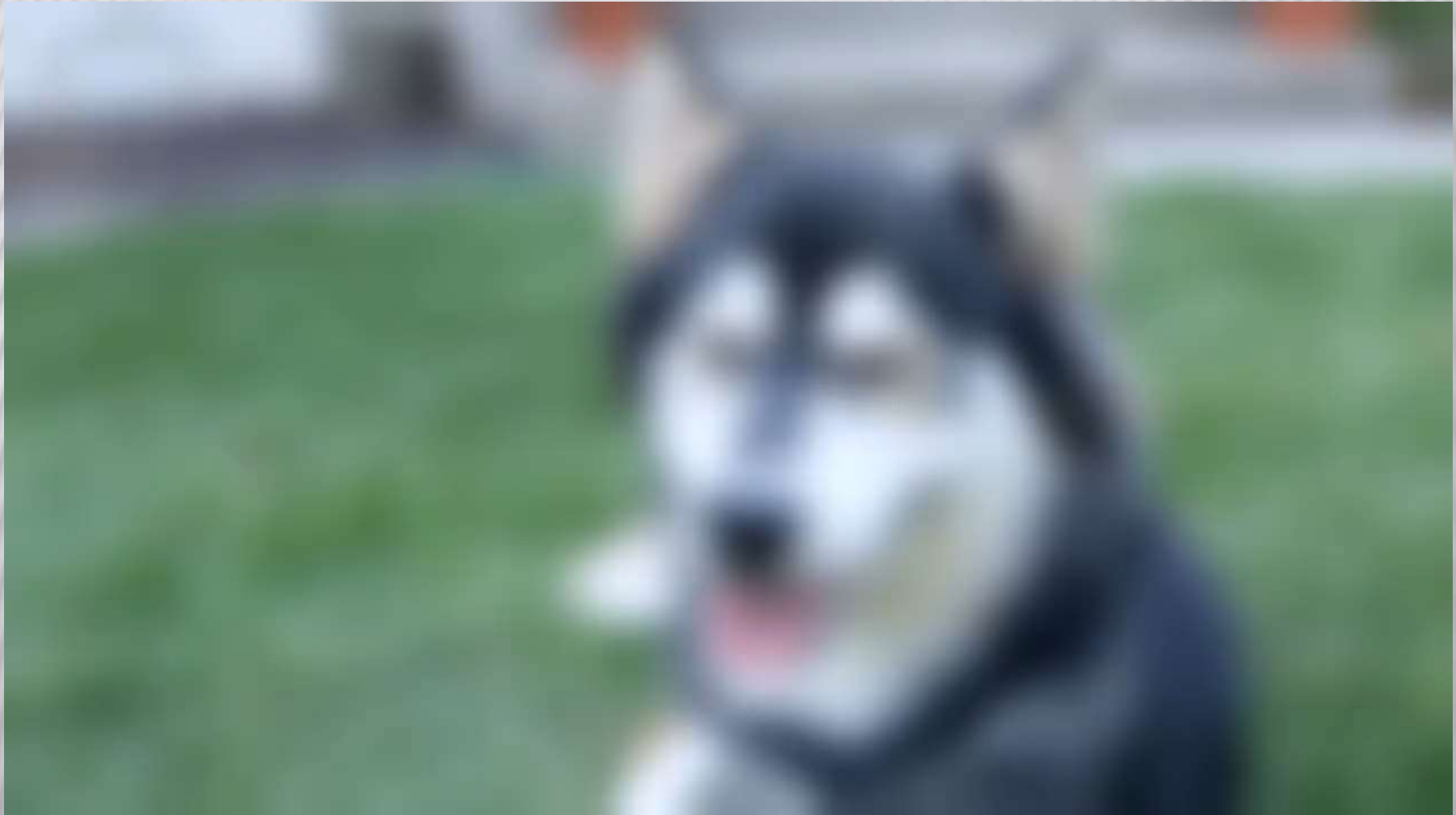
Tkivno inženjerstvo

*3D bioprodukcija
ušne školjke
čoveka*

Tkivno inženjerstvo

*3D nanoprodukcija
ušne školjke čoveka*

*Tkivno inženjerstvo -
3D nanoprodukcija proteza za prednje ekstremitete psa*



Kloniranje i genska terapija

Kloniranje je definisano kao stvaranje grupe genetski istovetnih organizama od jedne jedinke aseksualnim putem; to je izazivanje deoba somatskih ćelija kojima se dobijaju nove jedinke, istovetne kako sa organizmom iz kojeg su izvedene tako i medjusobno.

<i>Tipovi kloniranja</i>	<i>Tehnika kloniranja</i>	<i>Specifcnost</i>	<i>Rezultati</i>
<i>reproduktivno</i>	<i>Bilo koja od 3 poznate tehnike kloniranja</i>	<i>Klonirani embrion se <u>implantira</u> u matericu</i>	<i>Radja se klonirani embrion</i>
<i>terapeutsko</i>	<i>Bilo koja od 3 poznate tehnike kloniranja</i>	<i>Klonirani embrion se <u>ne</u> <u>implantira</u> u matericu</i>	<i>Generišu se stem celije, koje mogu dati “rezervna” tkiva i organe</i>

TRI NAČINA KLONIRANJA SISARA

1. Odvajanje ćelija od embriona

2. Roslin tehnika kojom je stvorena Doli

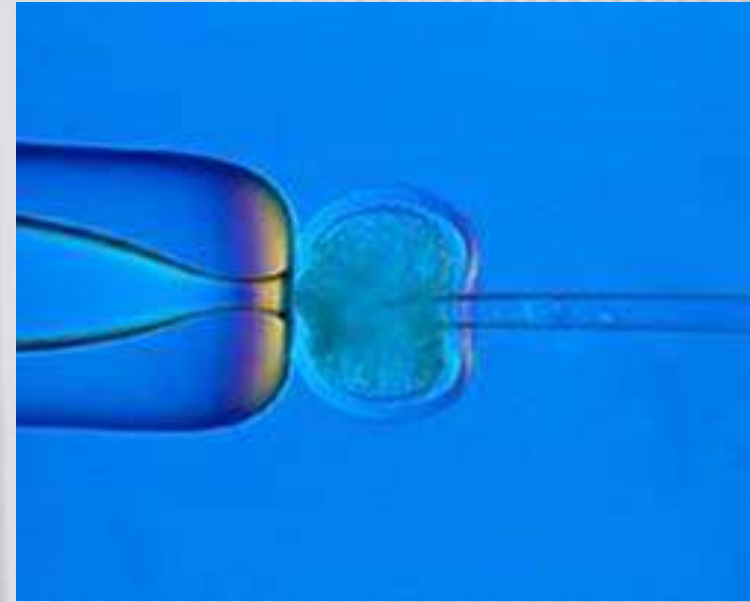
3. Honolulu tehnika

Odvajanje ćelija od embriona

Odvajanje ćelija od embriona se koristi za kloniranje već stvorenog embriona, a za kloniranje adulta se koriste druge dve tehnike.

Kloniranje adulta zahteva transfer nukleusa iz donorske ćelije adulta u OOCITU (jajnu ćeliju) kojoj je prethodno izvađen nukleus. U eksperimentima su se bolje pokazale neoplođene jajne ćelije jer bolje prihvataju nov nukleus. Nakon uklanjanja nukleusa iz jajne ćelije eliminiše se glavina (većina) njenog genetičkog materijala. Ono što je veoma važno, jeste, da donorska ćelija mora biti u G0 (Gap Zero) fazi ćelijskog ciklusa što se postiže na različite načine.

Nukleus donorske ćelije se postavlja u jajnu ćeliju ili ćelijskom fuzijom ili transplatacijom.





Roslin tehnika :



To je tehnika kojom je stvorena ovca Doli. Za kloniranje Doli zaslužni su Jan Vilmut i Kejt Kembl iz Rozlin Instituta u Edinburgu.

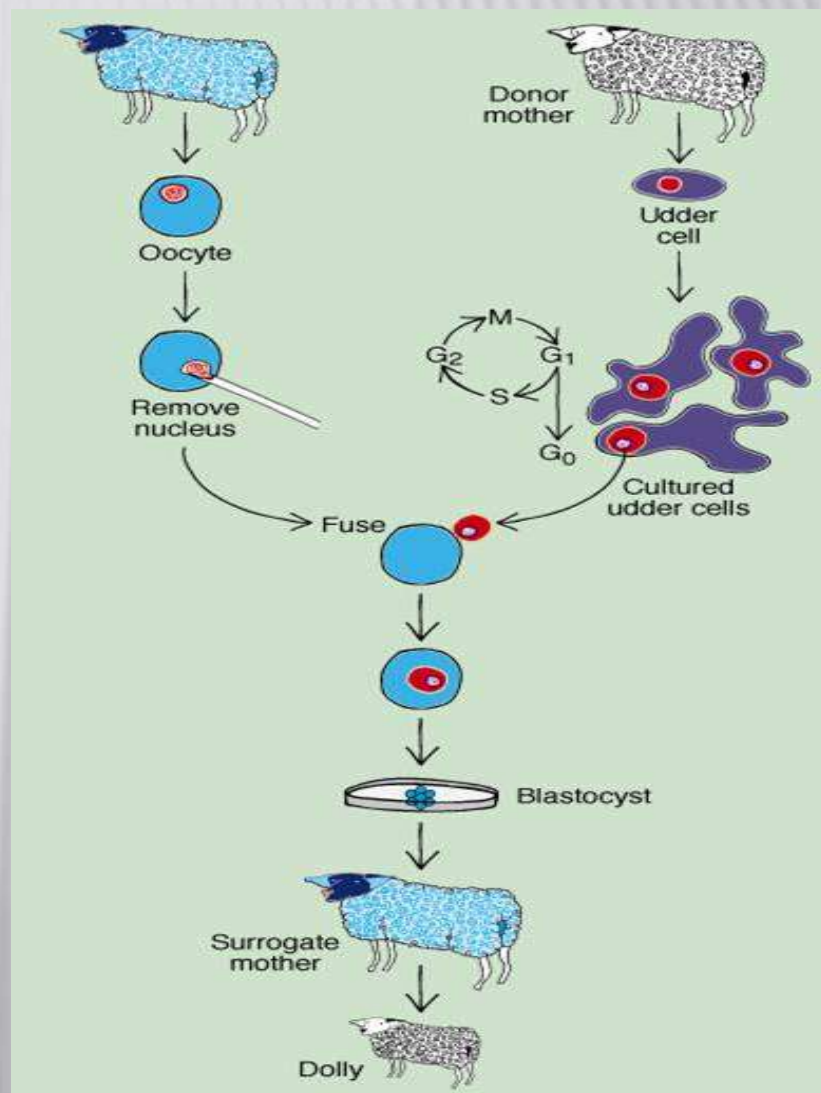
Crna ovca se tretira hormonima i izaziva se oslobađanje ocite spremne za oplođenje koja nastavlja mejozu I.

Pod visokovoltnim mikroskopom, pomoću mikropipeta iz oocite se vadi prvo polarno telo i haploidni pronukleus.

Donorska ćelija je uzeta iz vimena ovce Fin Dorset koja je bela.

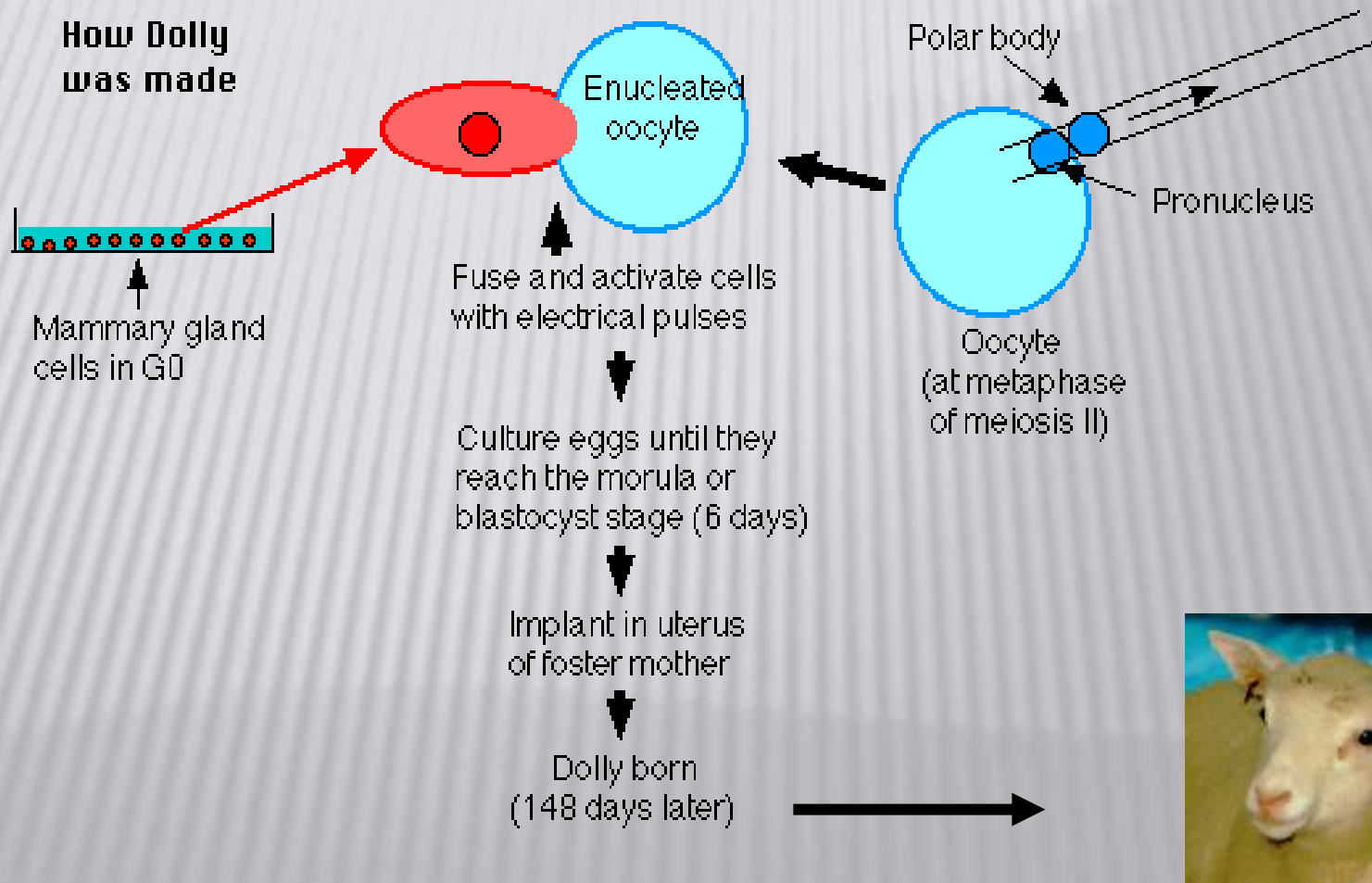
Ćelije mlečne žlezde se gaje u kulturi pošto su to primitivne stem ćelije i mogu da se dele.

Najvažnije dostignuće eksperimenta je postići da sve ćelije uđu u G₀ fazu ćelijskog ciklusa, tako što se smanjuje koncentracija nutritijenata, tj. ćelije imaju samo onoliko hrane koliko im je potrebno da prežive, ali se ne dele.



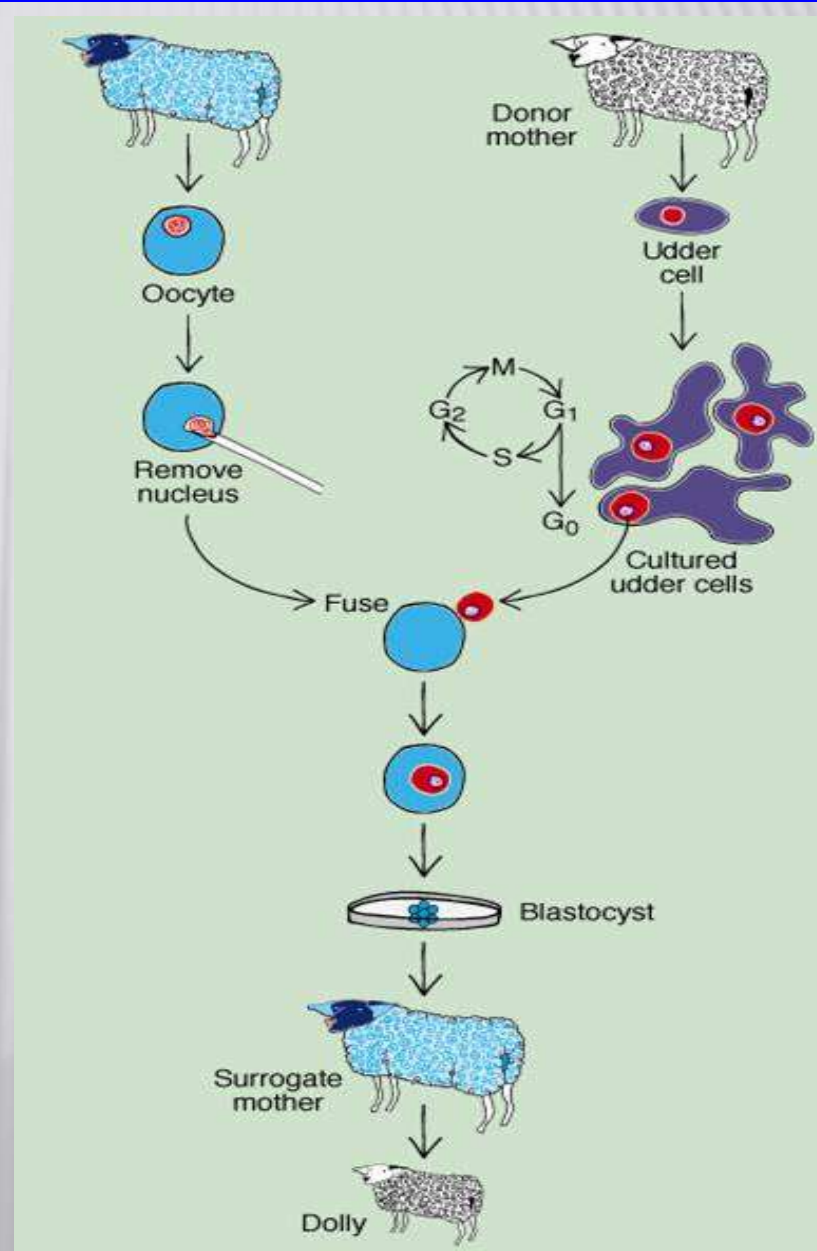
ZAŠTO JE VAŽNO DA DONORSKA ČELIJA BUDE U G0 FAZI ?

Zbog toga što je tada sprečena replikacija DNK, većina gena je inaktivirana metilacijom i samo ovakvo stanje nukleusa omogućava njegovo reprogramiranje demetilacijom nakon implantacije u jajnu ćeliju.



Roslin tehnika :

Donorske ćelije i jajne ćelije bez nukleusa su stavljene zajedno u kulturu. Nakon toga se primenjuje kratak električni impuls visokog napona da bi se promenila permeabilnost membrane što izaziva fuziju ćelija (metod je razvio Zimerman 1978. godine), a da bi se novonastala ćelija stimulisala da počne deobu (imitiranje stimulusa spermatozoida pri fertilizaciji). Zigot se inkubira 6 dana do stanja morule, ili blastule, ili u kulturi, ili bolje u jajovodu ovce. Zatim se obavlja implantacija embriona u hormonski pripremljenu surogat majku – crnu ovcu. Od 277 pokušaja 29 embriona je implantirano, a samo 1 se razvio – nakon 148 dana rodila se ovca Doli.



Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells

I. Wilmut, A. E. Schrieke*, J. McWhir, A. J. Kind* & K. H. S. Campbell

Buyer's Name / E-Mail Address: Home: Mobile:

^a 1.2% Thermomarine, 2.0% Molluscan, 8.42% 9.9% D.R.

NATURE VOL 365 27 FEBRUARY 1992

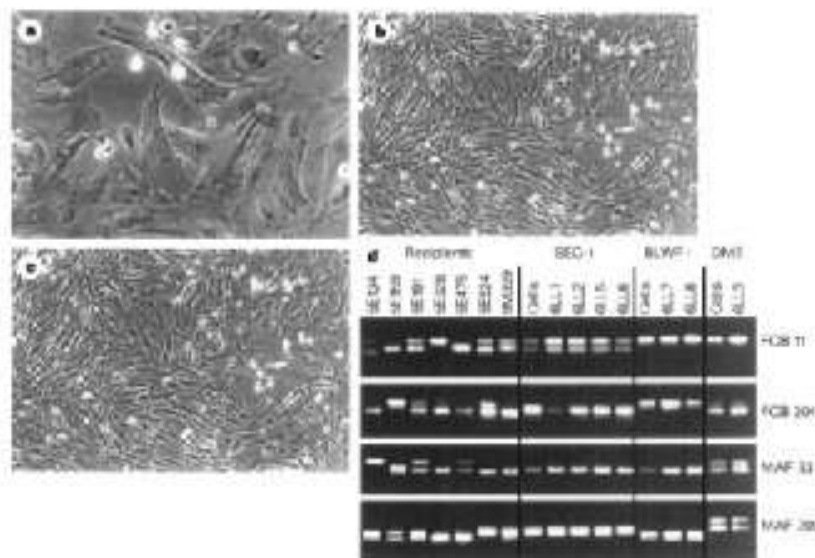


Figure 1 Phase-contrast photomicrograph of starch-cell-polymerized: a, Oryza sativa embryo (SEC); b, rice *l*-homocysteine (HcAP); c, transgenic, normal cells (CARE); d, Microarray analysis of receptor genes: 1, *cytochrome P-450*; 2, *cytochrome P-450*; 3, *cytochrome P-450*; 4, *cytochrome P-450*; 5, *cytochrome P-450*; 6, *cytochrome P-450*; 7, *cytochrome P-450*; 8, *cytochrome P-450*; 9, *cytochrome P-450*; 10, *cytochrome P-450*; 11, *cytochrome P-450*; 12, *cytochrome P-450*; 13, *cytochrome P-450*; 14, *cytochrome P-450*; 15, *cytochrome P-450*; 16, *cytochrome P-450*; 17, *cytochrome P-450*; 18, *cytochrome P-450*; 19, *cytochrome P-450*; 20, *cytochrome P-450*; 21, *cytochrome P-450*; 22, *cytochrome P-450*; 23, *cytochrome P-450*; 24, *cytochrome P-450*; 25, *cytochrome P-450*; 26, *cytochrome P-450*; 27, *cytochrome P-450*; 28, *cytochrome P-450*; 29, *cytochrome P-450*; 30, *cytochrome P-450*; 31, *cytochrome P-450*; 32, *cytochrome P-450*; 33, *cytochrome P-450*; 34, *cytochrome P-450*; 35, *cytochrome P-450*; 36, *cytochrome P-450*; 37, *cytochrome P-450*; 38, *cytochrome P-450*; 39, *cytochrome P-450*; 40, *cytochrome P-450*; 41, *cytochrome P-450*; 42, *cytochrome P-450*; 43, *cytochrome P-450*; 44, *cytochrome P-450*; 45, *cytochrome P-450*; 46, *cytochrome P-450*; 47, *cytochrome P-450*; 48, *cytochrome P-450*; 49, *cytochrome P-450*; 50, *cytochrome P-450*; 51, *cytochrome P-450*; 52, *cytochrome P-450*; 53, *cytochrome P-450*; 54, *cytochrome P-450*; 55, *cytochrome P-450*; 56, *cytochrome P-450*; 57, *cytochrome P-450*; 58, *cytochrome P-450*; 59, *cytochrome P-450*; 60, *cytochrome P-450*; 61, *cytochrome P-450*; 62, *cytochrome P-450*; 63, *cytochrome P-450*; 64, *cytochrome P-450*; 65, *cytochrome P-450*; 66, *cytochrome P-450*; 67, *cytochrome P-450*; 68, *cytochrome P-450*; 69, *cytochrome P-450*; 70, *cytochrome P-450*; 71, *cytochrome P-450*; 72, *cytochrome P-450*; 73, *cytochrome P-450*; 74, *cytochrome P-450*; 75, *cytochrome P-450*; 76, *cytochrome P-450*; 77, *cytochrome P-450*; 78, *cytochrome P-450*; 79, *cytochrome P-450*; 80, *cytochrome P-450*; 81, *cytochrome P-450*; 82, *cytochrome P-450*; 83, *cytochrome P-450*; 84, *cytochrome P-450*; 85, *cytochrome P-450*; 86, *cytochrome P-450*; 87, *cytochrome P-450*; 88, *cytochrome P-450*; 89, *cytochrome P-450*; 90, *cytochrome P-450*; 91, *cytochrome P-450*; 92, *cytochrome P-450*; 93, *cytochrome P-450*; 94, *cytochrome P-450*; 95, *cytochrome P-450*; 96, *cytochrome P-450*; 97, *cytochrome P-450*; 98, *cytochrome P-450*; 99, *cytochrome P-450*; 100, *cytochrome P-450*; 101, *cytochrome P-450*; 102, *cytochrome P-450*; 103, *cytochrome P-450*; 104, *cytochrome P-450*; 105, *cytochrome P-450*; 106, *cytochrome P-450*; 107, *cytochrome P-450*; 108, *cytochrome P-450*; 109, *cytochrome P-450*; 110, *cytochrome P-450*; 111, *cytochrome P-450*; 112, *cytochrome P-450*; 113, *cytochrome P-450*; 114, *cytochrome P-450*; 115, *cytochrome P-450*; 116, *cytochrome P-450*; 117, *cytochrome P-450*; 118, *cytochrome P-450*; 119, *cytochrome P-450*; 120, *cytochrome P-450*; 121, *cytochrome P-450*; 122, *cytochrome P-450*; 123, *cytochrome P-450*; 124, *cytochrome P-450*; 125, *cytochrome P-450*; 126, *cytochrome P-450*; 127, *cytochrome P-450*; 128, *cytochrome P-450*; 129, *cytochrome P-450*; 130, *cytochrome P-450*; 131, *cytochrome P-450*; 132, *cytochrome P-450*; 133, *cytochrome P-450*; 134, *cytochrome P-450*; 135, *cytochrome P-450*; 136, *cytochrome P-450*; 137, *cytochrome P-450*; 138, *cytochrome P-450*; 139, *cytochrome P-450*; 140, *cytochrome P-450*; 141, *cytochrome P-450*; 142, *cytochrome P-450*; 143, *cytochrome P-450*; 144, *cytochrome P-450*; 145, *cytochrome P-450*; 146, *cytochrome P-450*; 147, *cytochrome P-450*; 148, *cytochrome P-450*; 149, *cytochrome P-450*; 150, *cytochrome P-450*; 151, *cytochrome P-450*; 152, *cytochrome P-450*; 153, *cytochrome P-450*; 154, *cytochrome P-450*; 155, *cytochrome P-450*; 156, *cytochrome P-450*; 157, *cytochrome P-450*; 158, *cytochrome P-450*; 159, *cytochrome P-450*; 160, *cytochrome P-450*; 161, *cytochrome P-450*; 162, *cytochrome P-450*; 163, *cytochrome P-450*; 164, *cytochrome P-450*; 165, *cytochrome P-450*; 166, *cytochrome P-450*; 167, *cytochrome P-450*; 168, *cytochrome P-450*; 169, *cytochrome P-450*; 170, *cytochrome P-450*; 171, *cytochrome P-450*; 172, *cytochrome P-450*; 173, *cytochrome P-450*; 174, *cytochrome P-450*; 175, *cytochrome P-450*; 176, *cytochrome P-450*; 177, *cytochrome P-450*; 178, *cytochrome P-450*; 179, *cytochrome P-450*; 180, *cytochrome P-450*; 181, *cytochrome P-450*; 182, *cytochrome P-450*; 183, *cytochrome P-450*; 184, *cytochrome P-450*; 185, *cytochrome P-450*; 186, *cytochrome P-450*; 187, *cytochrome P-450*; 188, *cytochrome P-450*; 189, *cytochrome P-450*; 190, *cytochrome P-450*; 191, *cytochrome P-450*; 192, *cytochrome P-450*; 193, *cytochrome P-450*; 194, *cytochrome P-450*; 195, *cytochrome P-450*; 196, *cytochrome P-450*; 197, *cytochrome P-450*; 198, *cytochrome P-450*; 199, *cytochrome P-450*; 200, *cytochrome P-450*; 201, *cytochrome P-450*; 202, *cytochrome P-450*; 203, *cytochrome P-450*; 204, *cytochrome P-450*; 205, *cytochrome P-450*; 206, *cytochrome P-450*; 207, *cytochrome P-450*; 208, *cytochrome P-450*; 209, *cytochrome P-450*; 210, *cytochrome P-450*; 211, *cytochrome P-450*; 212, *cytochrome P-450*; 213, *cytochrome P-450*; 214, *cytochrome P-450*; 215, *cytochrome P-450*; 216, *cytochrome P-450*; 217, *cytochrome P-450*; 218, <

Interleukin-6 is secreted by the large T cell populations as embryonic-derived (SEC), fetal-derived (FBLN), and non-manipulated (pMAR) respectively. Some have the same phenotype as the donor cells and differ from the recipient conditions.

Table 1 Development of embryos reconstructed with three different cell types

Cell type	No. of fused oocytes (n)	No. recovered from oviduct (%)	No. cultured	No. of molecules analysed (n)	No. of molecules or foci assayed (n)	% of pregnancies/ no. of recipients (n)	No. of live ones (%)
Mammary epithelium	277 (53.0)*	247 (89.1)	-	22 (11.7)	25	1/10 (7.7)	1 (3.4%)
Fetal fibroblast	172 (84.7)	154 (90.1)	-	54 (27.4)*	34	4/12 (40.0)	2 (5.5%)
			34	13 (6.2)*	6	1/5 (10.0)	1 (16.6%)
Embryonic liver	385 (52.6)	231 (59.7)	-	90 (23.0)*	72	34/27 (81.5)	4 (5.6%)
			32	36 (28.0)*	3	1/5 (20.0)	0

Ovca Dolly

Table 2 Delivery of lambs developing from embryos derived by nuclear transfer from three different donor cells types, showing gestation length and birth weight

Cell type	Breed of lamb	Lamb identity	Duration of pregnancy (days)	Birth weight (kg)
Mammary epithelium	Fin Dorset	6.1.8	48	6.5
Fetus	Black Welsh	6.1.7	52	6.5
Fibroblast	Black Welsh	6.1.8	48	3.5
	Black Welsh	6.1.9	56	3.1
Embryo derived	Pol Dorset	6.1.1	48	6.5
	Pol Dorset	6.1.2	52	6.2
	Pol Dorset	6.1.5	50	4.2
	Pol Dorset	6.1.6	52	5.3

* Breed averages are 143, 147 and 146 days, respectively for the three genotypes: Fm Dorset, Black Welsh Mountain and Ash Dorset.

- This is mixed with a few minutes of beta

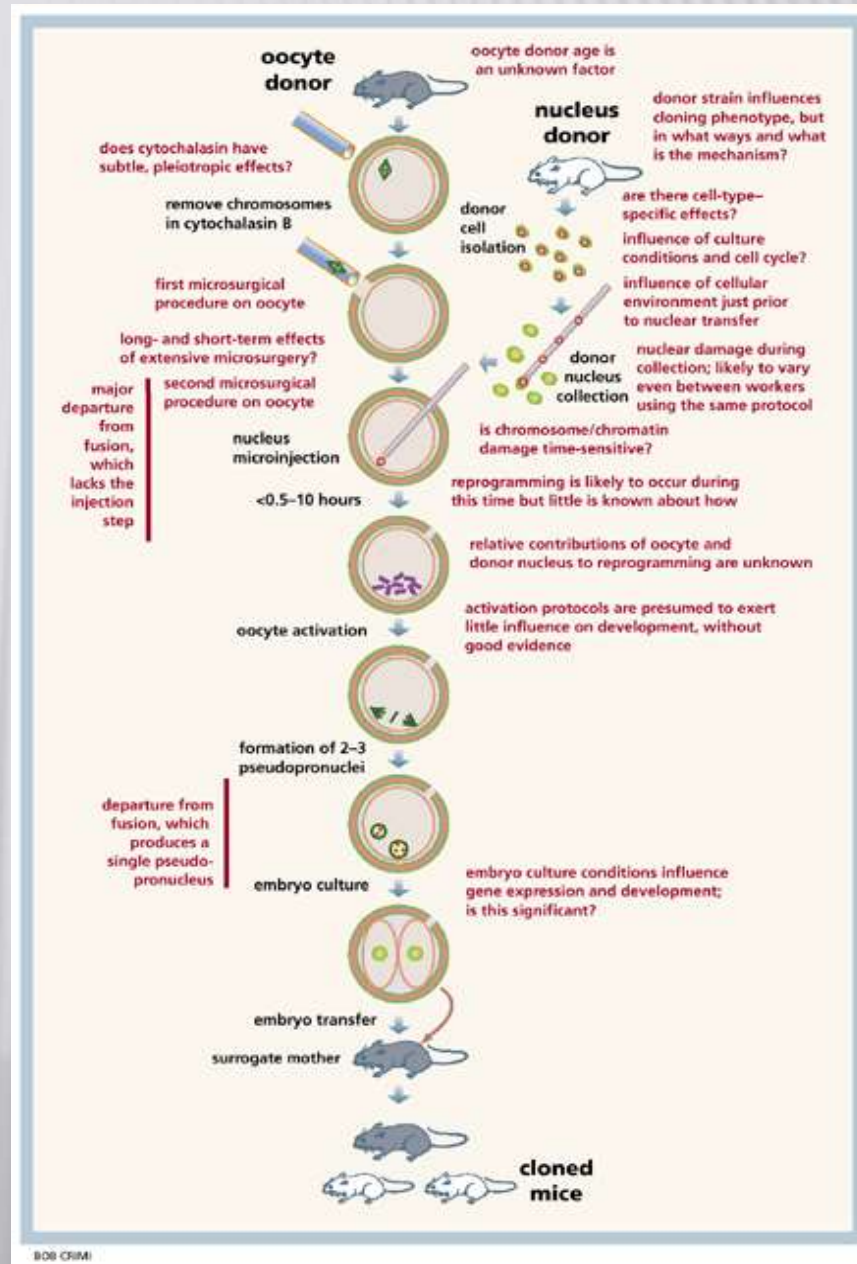
These lambs were delivered by caesarean section. Overall the nature of the assistance provided by the father to his offspring was similar to that experienced in a commercial flock.

Figure 2 (and number 8) 3 derived from the mammary gland of a Finn-Danish sow with the Spanish Blackface ear, which was the recipient.



Honolulu tehnika

Ovu tehniku su razvili Terihiko Wakayama i Rynzo Yamaginalbi iz Havajskog Univerziteta koji su uspeli da stvore tri generacije (genetički istih) kloniranih miševa. Miševi su dugo smatrani za životinje koje se najteže kloniraju jer kod njih oplođena jajna ćelija počinje da se deli odmah nakon fertilizacije i nema dovoljno vremena da se izvrši reprogramiranje nukleusa. Ali bez obzira na to, ovi naučnici su uspeli da kloniraju miševe sa mnogo većom efikasnošću nego što je kloniranje ovaca: 3 klona na svakih 100 pokušaja.

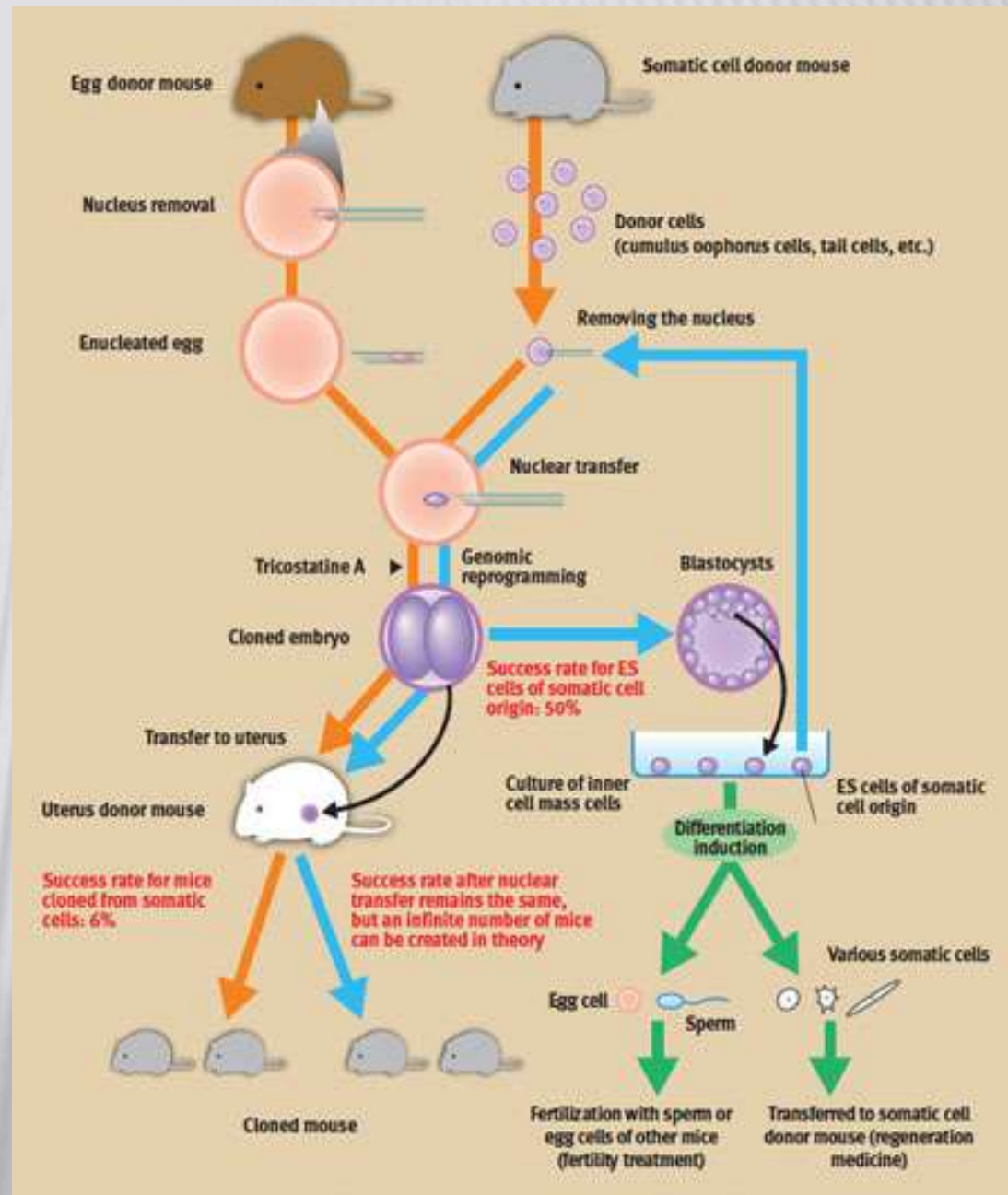


Honolulu tehnika

Za razliku od Vilmuta, koji je koristio ćelije mlečne žlezde koje je trebalo održati u G0 fazi, Vakajama i Yamaginalbi su eksperimentisali sa potpuno izdiferenciranim ćelijama koje su bile u G0 fazi. Koristili su tri tipa ćelija:

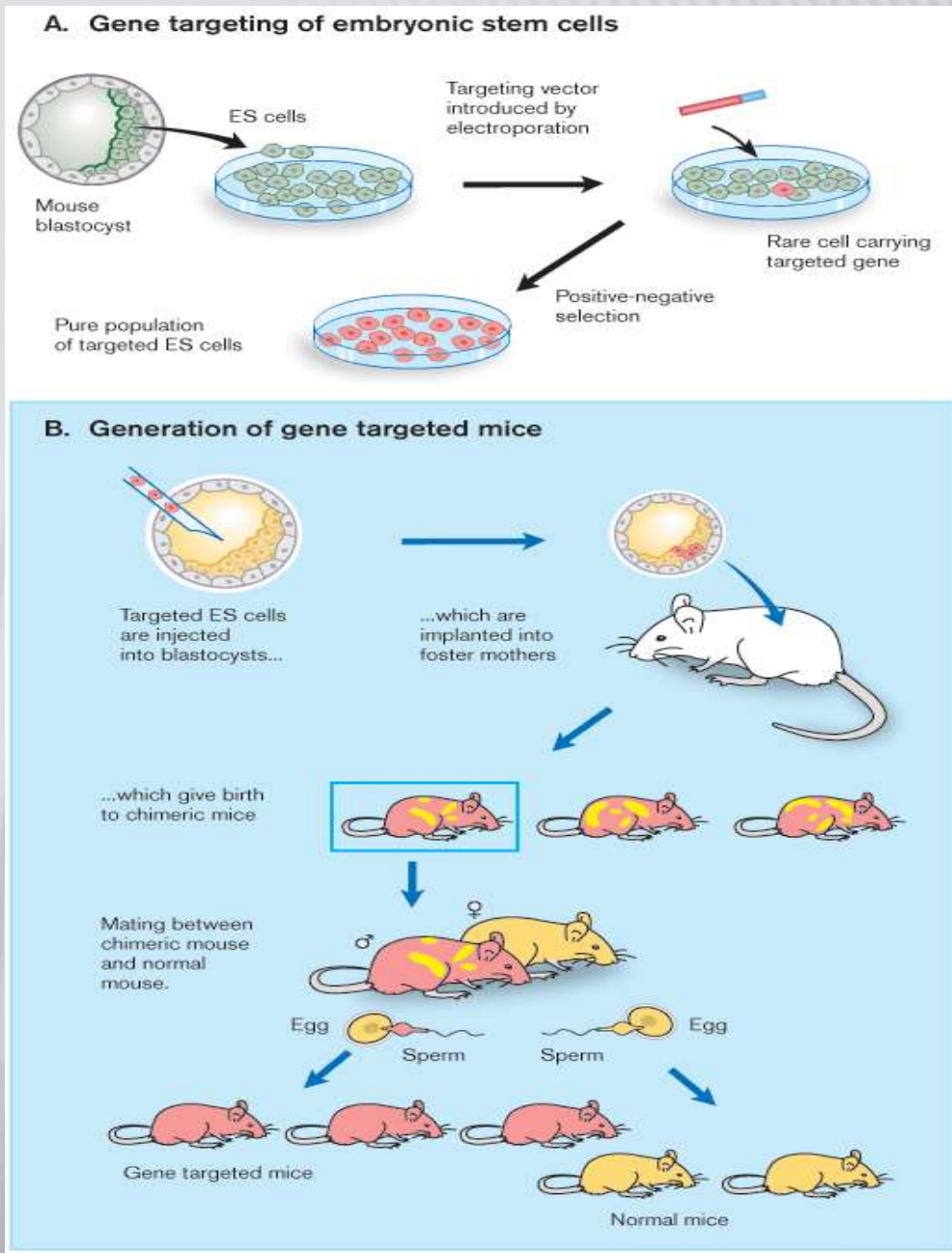
Sertolijeve ćelije,
Nervne ćelije i
Ćelije cumulus
oophorus-a iz jajnika.

Nakon vađenja nukleusa iz jajnih ćelija novi nukleus je ubačen u njih (transplantacija nukleusa, a ne fuzija ćelija).



Honolulu tehnika

Nukleusi donorskih ćelija su vađeni iz njih odmah nakon ekstrakcije ćelija iz miša i nije obavljano kultivisanje donorskih ćelija. Nakon jednog sata ćelije su prihvatile novi nukleus, a nakon narednih 5 sati, koliko je bilo potrebno za reprogramiranje nukleusa, ćelija se stavlja u kulturu gde počinje da raste i da se deli. U kulturi se nalazi i supstanca (CITOHALAZIN B) koji zaustavlja formiranje prvog polarnog tela koje se normalno formira pre fertilizacije. To se čini da ne bi došlo do odstranjivanja polovine genetičkog materijala.



Honolulu tehnika



Klonirani miševi

Ćelija se potom razvija u embrion koji se implantira u surogat majku. Najuspešnije za proces su se pokazale ćelije kumulus oforus. Vakajama je posle pravio klonove klonova i prvobitne klonove je puštao da se reprodukuju i dokazao da je njihova reprodukcija bila normalna.

Kloniranje ogroženih vrst /2

Kloniranje gaura Noaha (ACT, januar 2001)

Epitelne celice samca, ki je poginil 8 let pred tem, so odmrznili in jih spojili z jajčnimi celicami navadne krave. Porabili so 692 jajčec, rodilo pa se je samo eno tele. 48 ur po rojstvu je klonirano ogroženo azijsko govedo gaur poginilo zaradi griže.



Prva klonirana ogrožena divja žival, ki so jo klonirali, je bil **muflon** (2000).

Kot nadomestna mati je služila običajna ovca, ki je bila tudi donorka (izpraznjene) jajčne celice. Somatske celice so odvzeli poginulemu divjemu muflonu in izvedli fuzijo. Analiza mtDNA je pokazala, da je klon imel mtDNA identično kot donorka oocit. 23 celičnih fuzij, 7 implantiranih embrijev, 1 mladič (Nature Biotechnology, 10/2001)



Kloniranje drugih sesalcev

Japonci so že 7/1998 klonirali govedo (Noto in Kaga, kasneje še Noto II in III). Leta 2000 je Kaga II povrgla tele, ki je bilo spočeto z umetno osemenitvijo.



Ameriškim znanstvenikom je (Science, 5/2003) uspelo klonirati mulo (križanca med oslom, ki ima 62 kromosomov in kobilu, ki jih ima 64). DNA izhaja iz gojenih fetusnih celic, ki so jih 1998 začeli gojiti na Univerzi Idaho. Po implantaciji 305 oocit se je nadomestni materi, kobili Syringi, skotila ena mula (s 63 kromosomi), ki je bila zdrava. Ime ji je Idaho Gem.



Kloniranje prašičev

Podjetje PPL Therapeutics je po Dolly kloniralo še prašiče (3/2000): Millie, Christa, Alexis, Carrel, Dotcom. Končni cilj je bil pripraviti živali z izbitimi geni in za vir organov za (kseno)transplantacijo. Klone prašičev z izbito eno kopijo gena za α -1,3-galaktoziltransferazo so pripravili konec leta 2002 (Noel, Angel, Star, Joy in Mary).

Na Univerzi Missouri so le malo zatem objavili podatek, da so pripravili 3000 gensko spremenjenih embrijev in jih vstavili v 28 nadomestnih svinj. Do skotitve se jih je razvilo le 7, od teh so 3 kmalu poginili.

S kloniranimi prašiči so izvedli več študij njihove morfološke, fiziološke in etiološke podobnosti. Ugotovili so, da so si genetsko identični kloni med seboj različni.



"Behavioral variation among cloned pigs"

Authors: Gregory S. Archer and T.H. Friend, Texas A&M University, J. Piedrahita, North Carolina State University, C.H. Nevill, S. Walker, Texas A&M University

Published: Feb. 19, 2003, in the early online edition of Applied Animal Behaviour Science

"Hierarchical Phenotype and Epigenetic Variation in Cloned Swine"

Authors: Greg S. Archer, Scott Dindor, Ted H. Friend, Shawn Walker, Gretchen Zaunbrecher, Bruce Lawhorn, Texas A&M University, Jorge A. Piedrahita, North Carolina State University

Published: Accepted by *Biology of Reproduction*

Kloniranje mačk

2000: Kitajci so klonirali kozo Yuanyuan.

2001: Francozi klonirali zajca na osnovi DNA iz odrasle somatske celice.

CC=CopyCat je bila prva klonirana mačka. Raziskovalce je presenetilo, ker je bil njen kožuh drugačen kot pri donorki kumulusnih celic (DNA). CC je bila edina rojena mačka od 87 ustvarjenih embrijev. (Nature 2/2002)



Leta 2004 so na osnovi DNA mačka Tahinija s t.im. "prenosom kromatina" klonirali mačka (Tabouli in Baba Ganoush). Kasneje so pri podjetju "Genetics Savings & Clone" klonirali še več drugih mačk: Mango → Peaches, Nicky → Little Nicky, Gizmo → Little Gizmo; zadnja dva po naročilu.



Kloniranje drugih sesalcev /3

Psa je prvič uspelo klonirati korejskim znanstvenikom (Nature, 4.8.2005).

Somatsko celico so odvzeli iz uhlja afganistanskega hrta Taija in jo spojili z izpraznjeno jajčno celico.

Nadomestna mati je bila druge pasme.

Psa so tako pozno klonirali, ker oocite še ne dozoriijo v jajčnikih in jih je tudi težko gojiti v laboratoriju.

Jajčne celice so zato odvzeli šele 3 dni po ovulaciji in jim odvzeli DNA. Po fuziji in kemičnem šoku so se celice začele deliti, zgodnje zarodke pa so vstavili v nadomestne matere (123).

Implantirali so 1095 zgodnjih embrijev, zaznali pa so le tri brejosti. V enem primeru je prišlo do splava, dva psa pa sta se rodila živa s carskim rezom. En je poginil zaradi pljučnice, preživelemu pa je ime **Snuppy** (Seoul National University). Ker psi zbolevajo za podobnimi boleznimi kot ljudje (visok krvni tlak, okvare srca, rak na dojki), bi bili psi lahko uporabni za raziskave teh bolezni.



Figure 1 | Dog cloned by somatic-cell nuclear transfer. a, Snuppy, the first cloned dog, at 67 days after birth (right), with the three-year-old male Afghan hound (left) whose somatic skin cells were used to clone him. Snuppy is genetically identical to the donor Afghan hound. b, Snuppy (left) was implanted as an early embryo into a surrogate mother, the yellow Labrador retriever on the right, and raised by her.