



ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤ' ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων
Τ.Ε.Ι. Αθήνας

Μάθημα 4^ο
Κλωνοποίηση

Διδάσκων

Δρ. Ιωάννης Δρίκος

Απόφοιτος Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων (ΠΙ)

Απόφοιτος Βιολογίας, ΑΠΘ

Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Ειδ. Παιδιατρικής

email: johndrikos@yahoo.com



Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό
Ίδρυμα Αθήνας



Ιστορική αναδρομή (1)

1938: Ο Γερμανός εμβρυολόγος Χανς Σπίμαν διεξάγει τα πρώτα πειράματα εξαγωγής του πυρήνα του κυττάρου βατράχων από το περίβλημά τους και μεταφύτευσής τους σε ωοθήκες από τις οποίες έχει αφαιρεθεί ο πυρήνας τους.

1952: Στις ΗΠΑ, οι Ρόμπερτ Μπριγκς και Τόμας Κινγκ πραγματοποιούν την πρώτη κλωνοποίηση βατράχων με κύτταρα νεογέννητων βατράχων.

1962: Ο Άγγλος Τζον Γκάρντον δημιουργεί κλώνους βατράχων με κύτταρα ενηλίκων βατράχων.

1975: Γέννηση των πρώτων κλωνοποιημένων κουνελιών από εμβρυικά κύτταρα.

1980: Κλωνοποίηση ποντικών με μεταφορά του πυρήνα εμβρυικών κυττάρων.

1986: Κλωνοποίηση ενός μοσχαριού με την ίδια τεχνική.

1990: Στη Γαλλία, το INRA κλωνοποιεί έξι κουνέλια.

Ιστορική αναδρομή (2)

Ιούλιος 1997: Το ίδιο Ινστιτούτο ανακοινώνει τη γέννηση της Πόλι, ενός κλωνοποιημένου και διαγονιδιακού αρνιού: είναι προικισμένο με ένα γονίδιο μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης.

Ιανουάριος 1998: Η αμερικανική εταιρεία Advanced Cell Technology παρουσιάζει δύο κλωνοποιημένα και διαγονιδιακά μοσχάρια: είναι φορείς ενός γονιδίου που αντιστέκεται στα αντιβιοτικά.

Φεβρουάριος 1998: Γέννηση του πρώτου κλωνοποιημένου μοσχαριού στη Γαλλία. Πεθαίνει δύο μήνες αργότερα.

Ιούλιος 1998: Ο Ρίτσο Γιανατζιμάτσι, από τη Χαβάη, παράγει πενήντα κλωνοποιημένα ποντίκια με κύτταρα πολλών ενηλίκων ποντικών.

Ιστορική αναδρομή (3)

Σεπτέμβριος 1998: Ο Αμερικανός φυσικός, Ρίτσαρντ Σιντ, 69 ετών, δηλώνει ότι θα είναι σε θέση να αναπαράξει τον εαυτό του σε τρία χρόνια και ότι το αντίγραφο του θα το κυοφορήσει η γυναίκα του.

Δεκέμβριος 1998: Ερευνητές του πανεπιστημίου της Νάρα δημιουργούν οκτώ κλωνοποιημένα μοσχάρια από το κύτταρο ενός ενηλίκου ζώου.

Δεκέμβριος 1998: Μια νοτιοκορεατική ομάδα στο νοσοκομείο Κουνγκτί δηλώνει ότι κλωνοποίησε έναν άνθρωπο και κατόπιν διέκοψε το πείραμα. Το έμβρυο δεν επέζησε πέρα από το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων.

Κλωνοποίηση – Εισαγωγή (1)

✓ Ο όρος "κλώνος" προέρχεται από την ελληνική λέξη που προσδιορίζει τον πολλαπλασιασμό πανομοιότυπων κυττάρων με διαδικασία μη σεξουαλικής αναπαραγωγής.

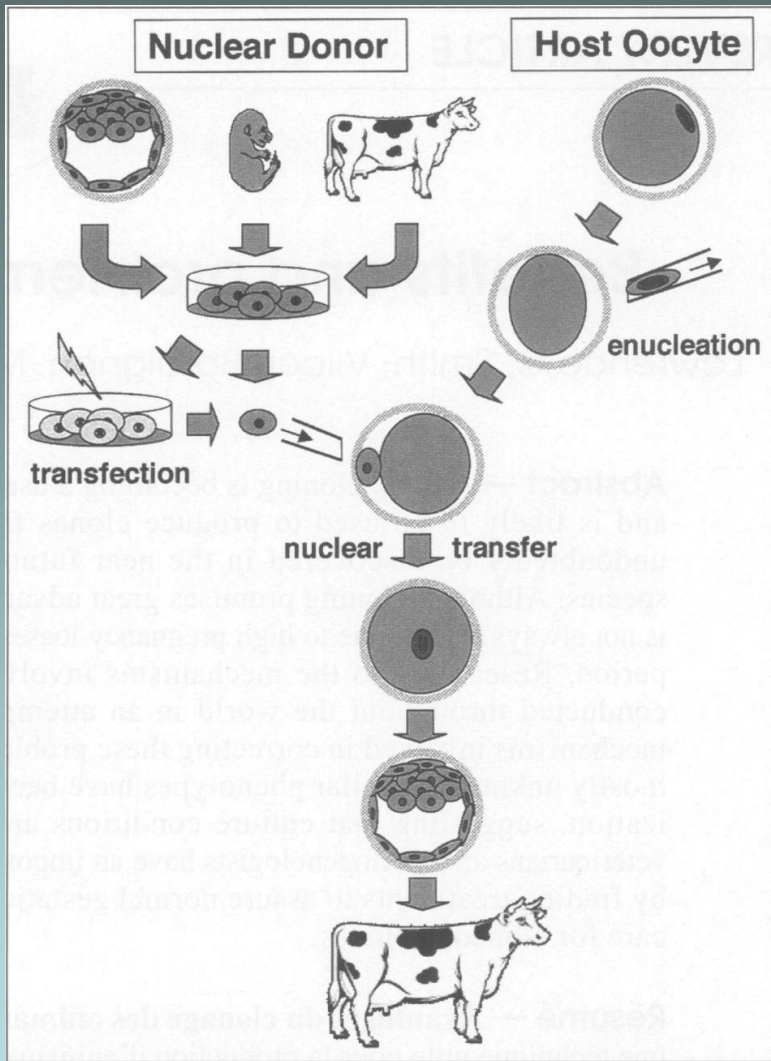
✓ Στα θηλαστικά, η κλωνοποίηση απαιτεί την χρήση των ωοκυττάρων, εφόσον μέχρι σήμερα, αυτά τα γεννητικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν ένα αναπτυξιακό στάδιο για να διασφαλιστεί η προέλευση της ζωής των θηλαστικών.

✓ Το πυρηνικό γονιδίωμα μπορεί να απομακρυνθεί από αυτά τα κύτταρα, με μια μικρο-επεμβατική διαδικασία.

✓ Στο τμήμα που απομένει δηλαδή στο κυτταρόπλασμα μπορεί να μεταφερθεί ο πυρήνας από ένα εμβρυϊκό κύτταρο ή κύτταρο ενήλικα μέσω διαδικασιών σύντηξης και ενεργοποίησης.

Κλωνοποίηση – Εισαγωγή (2)

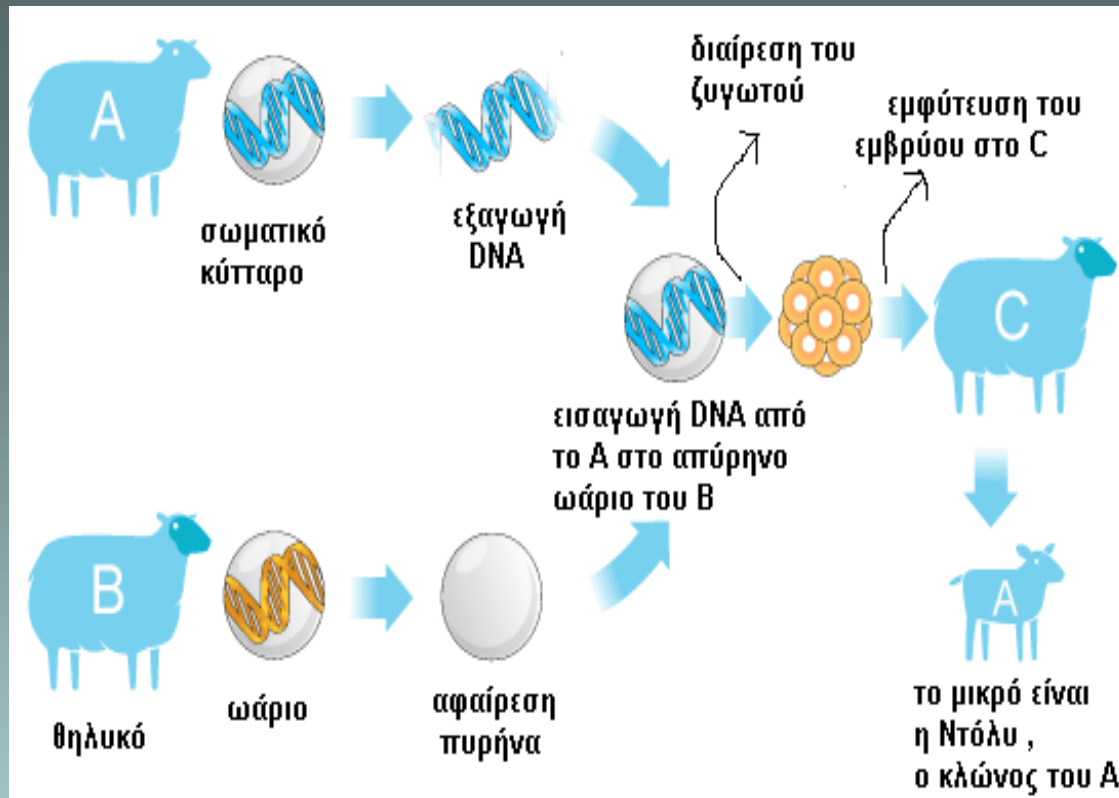
- ✓ Αυτή η διαδικασία κλωνοποίησης μέσω μεταφοράς πυρήνων σωματικών κυττάρων (SCNT) μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία πολλών πανομοιότυπων κυττάρων με ίδιο γονιδίωμα.
- ✓ Τα SCNT τροποποιημένα ωάρια μπορούν να καλλιεργηθούν in vitro για αρκετές ημέρες.
- ✓ Το κλωνοποιημένα έμβρυα μπορούν να μεταφερθούν στη μήτρα της παρένθετης μητέρας να γεννήσουν απογόνους που είναι γονιδιωματικά πανομοιότυποι με τους αρχικούς πυρήνες του κυττάρου δότη, αλλά κυρίως είναι διαφορετικά όσον αφορά το μιτοχονδριακό (mt) DNA.



Σχηματικό διάγραμμα της διαδικασίας πολλαπλών σταδίων, που χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και την παραγωγή διαγονιδιακών θηλαστικών με μεθοδολογίες πυρηνικής μεταφοράς.

Αναπαραγωγική κλωνοποίηση στους ζωϊκούς οργανισμούς (1)

- ✓ Η αναπαραγωγική κλωνοποίηση σε θηλαστικά βρίσκει την απαρχή της το 1981 σε πειράματα κλωνοποίησης που διεξήχθησαν με επιτυχία σε ποντίκια.
- ✓ Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν εμβρυϊκοί πυρήνες κυττάρων από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) των βλαστοκύστεων για μεταμόσχευση τους σε επιλεγμένα ωάρια.
- ✓ Το 1997, για πρώτη φορά, κύτταρα από ενήλικες δότες χρησιμοποιήθηκαν για την επιτυχή κλωνοποίηση του προβάτου "Ντόλι" (Dolly).
- ✓ Ακολούθως το 1998, οκτώ μόσχοι κλωνοποιήθηκαν από ενήλικα κύτταρα από ένα μόνο ζώο - δότη.



Αναπαραγωγική κλωνοποίηση στους ζωϊκούς οργανισμούς (2)

- ✓ Το 2000, για πρώτη φορά, παρήχθησαν κλωνοποιημένα μοσχάρια από κύτταρα ινοβλαστών μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια τους in vitro.
- ✓ Η κλωνοποίηση έχει πρόσφατα επεκταθεί και εφαρμόζεται σε οικιακά ζώα, όπως η γάτα και ο σκύλος.
- ✓ Το πιο σημαντικό στοιχείο είναι το γεγονός ότι η αναπαραγωγική κλωνοποίηση θεωρείται ως μια πιθανή στρατηγική για τη διατήρηση των απειλούμενων ειδών και τη διάσωση αυτών που βρίσκονται υπό εξαφάνιση.
- ✓ Αμερικανοί ερευνητές πρόσφατα ανέφεραν την αποτυχία να αποκτήσουν κλωνοποιημένα έμβρυα από πρωτεύοντες οργανισμούς.

Αναπαραγωγική κλωνοποίηση στους ζωϊκούς οργανισμούς (3)

- ✓ Τα τρέχοντα ποσοστά επιτυχίας (μεταξύ 2 και 20%) για τη λήψη κλώνων ενήλικων θηλαστικών από διαδικασίες SCNT από κύτταρα δότη δεν είναι ενθαρρυντικά.
- ✓ Υπάρχουν ακόμα αρκετοί άγνωστοι κυτταρικοί μηχανισμοί που μπορούν να συσχετίζονται με τα χαμηλά ποσοστά επιτυχίας στις διαδικασίες αναπαραγωγικής κλωνοποίησης.
- ✓ Ορισμένες από τις βασικές έρευνες επικεντρώνονται στις πυρηνο-κυτταροπλασματικές αλληλεπιδράσεις και στον επαναπρογραμματισμό του ωοκυττάρου από τον πυρήνα των σωματικών κυττάρων.
- ✓ Άλλες διαδικασίες που μπορεί να σχετίζονται είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης του πυρήνα των σωματικών κυττάρων, το μήκος των τελομερών των χρωμοσωμάτων και ο συντονισμός του κυτταρικού κύκλου μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης.

Παράγοντες κινδύνου για την κλωνοποίηση ζωϊκών οργανισμών (1)

- ✓ Οι συνθήκες καλλιέργειας έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των κανονικών και των κλωνοποιημένων εμβρύων (IVF) κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τους *in vitro*.
- ✓ Έχει υποστηριχθεί ότι οι επιγενετικές αλλαγές στο DNA ειδικά αυτές της μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για την παρατηρούμενη αναπτυξιακή δυσλειτουργία.
- ✓ Αμερικανοί ερευνητές έχουν πρόσφατα δείξει ότι η αρτιοδάκτυλα (σε πρόβατο, αίγα, βοοειδή, χοίρο) κληρονομείται με αλληλόμορφο μητρικής προέλευσης, ενώ σε πρωτεύοντα τα πατρικά αλληλόμορφα παραμένουν ενεργά, πιθανότατα ως αποτέλεσμα εξελικτικών διεργασιών.

Παράγοντες κινδύνου για την κλωνοποίηση ζωϊκών οργανισμών (2)

- Τέτοιες ειδικές διαφορές στις διαδικασίες γονιδιωματικής αποτύπωσης μπορεί να εξηγήσουν σε κάποιο βαθμό τις παρατηρούμενες διαφορές στην εξέλιξη του εμβρύου μεταξύ της αρτιοδακτυλίας των πρωτευόντων ή μη.
- Ένα άλλο ζήτημα ανησυχίας για την αναπαραγωγική κλωνοποίηση είναι ότι το σύντομο χρονικό διάστημα που οι σωματικοί πυρήνες των κυττάρων του δότη-κυττάρων μπορούν να επαναπρογραμματιστούν.
- Στις διαδικασίες αυτές το κυτταρόπλασμα των ωαρίων μπορεί να μην επαρκεί αρκετά για να ξεκινήσει και να προωθήσει την ομαλή εμβρυογένεση.

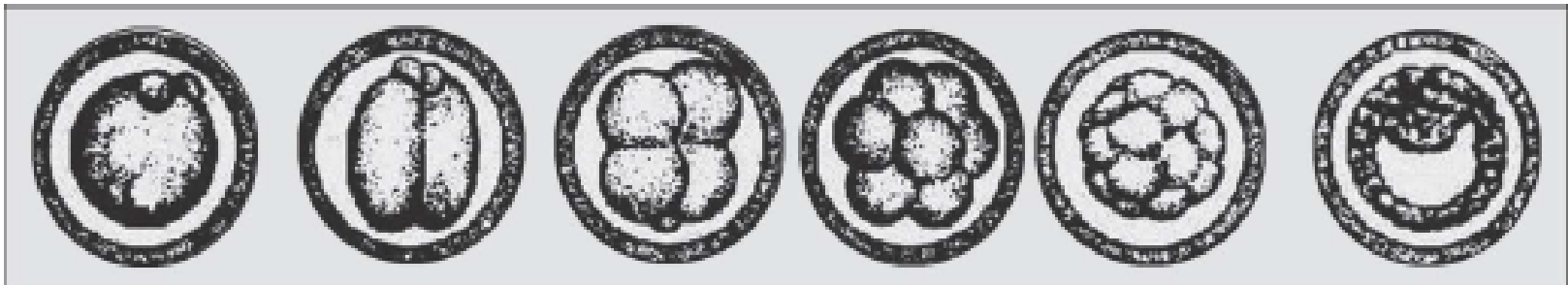
TIME

HUMAN
CLONING
IS CLOSER
THAN YOU
THINK

For couples who can't have a child—
or who have lost one—the unthinkable
may soon be possible. Here are the perils

Κλωνοποίηση σε διαδικασίες αναπαραγωγικής Ιατρικής (1)

- ✓ Οι διαδικασίες εφαρμογών της εμβρυοτεχνολογίας (embryobiotechnology) που εφαρμόζονται στην αναπαραγωγική ιατρική εξαρτώνται από την επιστημονική πρόοδο και την κοινωνική αποδοχή.
- ✓ Ζαβός και οι συνεργάτες του (2001) δημοσίευσαν την πρώτη κλωνοποίηση ανθρώπινου εμβρύου για αναπαραγωγικούς σκοπούς μέσω ετερόλογης SCNT.
- ✓ Χρησιμοποίησαν απύρηνο ανθρώπινο ωοκύτταρο που συντήχθηκε με ένα κοκκιώδες κύτταρο ωοθηκών από έναν ασθενή δότη.



polar body transfer
 nuclear and cytoplasmic
 transplantation
 reproductive cloning
 gene transfer
 germ line therapy
 PGD

embryo splitting
 multiple cloning
 embryo aggregation
 chimeras
 reproductive cloning
 PGD

embryo division
 cloning twins
 cell transfer
 chimeras
 stem cells
 therapeutic cloning
 pharmaceutical cloning
 PGD

Έμβρυα θηλαστικών σε διάφορα στάδια της προεμφυτευτικής ανάπτυξης με πολλαπλές εφαρμογές στην αναπαραγωγική και θεραπευτική ιατρική.

Κλωνοποίηση σε διαδικασίες αναπαραγωγικής Ιατρικής (2)

- ✓ Κάποια από τα κεντρικά ζητήματα επικεντρώνονται στις ηθικές προσεγγίσεις και στις επιπτώσεις στην κοινωνία και την οικογένεια.
- ✓ Η αναπαραγωγική κλωνοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ομόφιλα ζευγάρια που στερούνται αναπαραγωγικής ικανότητας.
- ✓ Η αναπαραγωγική λοιπόν δυνατότητα των SCNT με αυτό τον τρόπο μπορεί να οδηγήσει την επιθυμία των ζευγαριών στην ανάπτυξη ενός νέου ανθρώπινου όντος κατά παραγγελία.

Κλωνοποίηση σε διαδικασίες αναπαραγωγικής Ιατρικής (3)

- ✓ Πρόσφατα αναφέρθηκε η περίπτωση κλωνοποίησης ενός ανθρώπινου εμβρύου για ένα υπογόνιμο ζευγάρι.
- ✓ Ο άνδρας ασθενής έπασχε από αζωοσπερμία και πλήρη αδυναμία παραγωγής σπέρματος λόγω κρυπορχίας.
- ✓ Πραγματοποιήθηκε λοιπόν διαδικασία SCNT.

Κλωνοποίηση σε διαδικασίες αναπαραγωγικής Ιατρικής (4)

- ✓ Ιστός του δέρματος συλλέχθηκε από τον σύζυγο και αφέθηκε να αναπτυχθεί in vitro για τη δημιουργία πρωτογενούς καλλιέργειας ινοβλαστών.
- ✓ Μετά από ορμονική υπερδιέγερση της συζύγου έγινε ανάκτηση των ωαρίων της συζύγου του ασθενούς.
- ✓ Συλλέχθηκαν τρία ωοκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για SCNT και συντήχθηκαν τα κύτταρα ινοβλαστών του αρσενικού ατόμου ασθενούς.
- ✓ Το κλωνοποιημένο έμβρυο αναπτύχθηκε περαιτέρω για 60 ώρες (μετά-SCNT) μέχρι να φτάσει στο στάδιο των 4-κυττάρων.

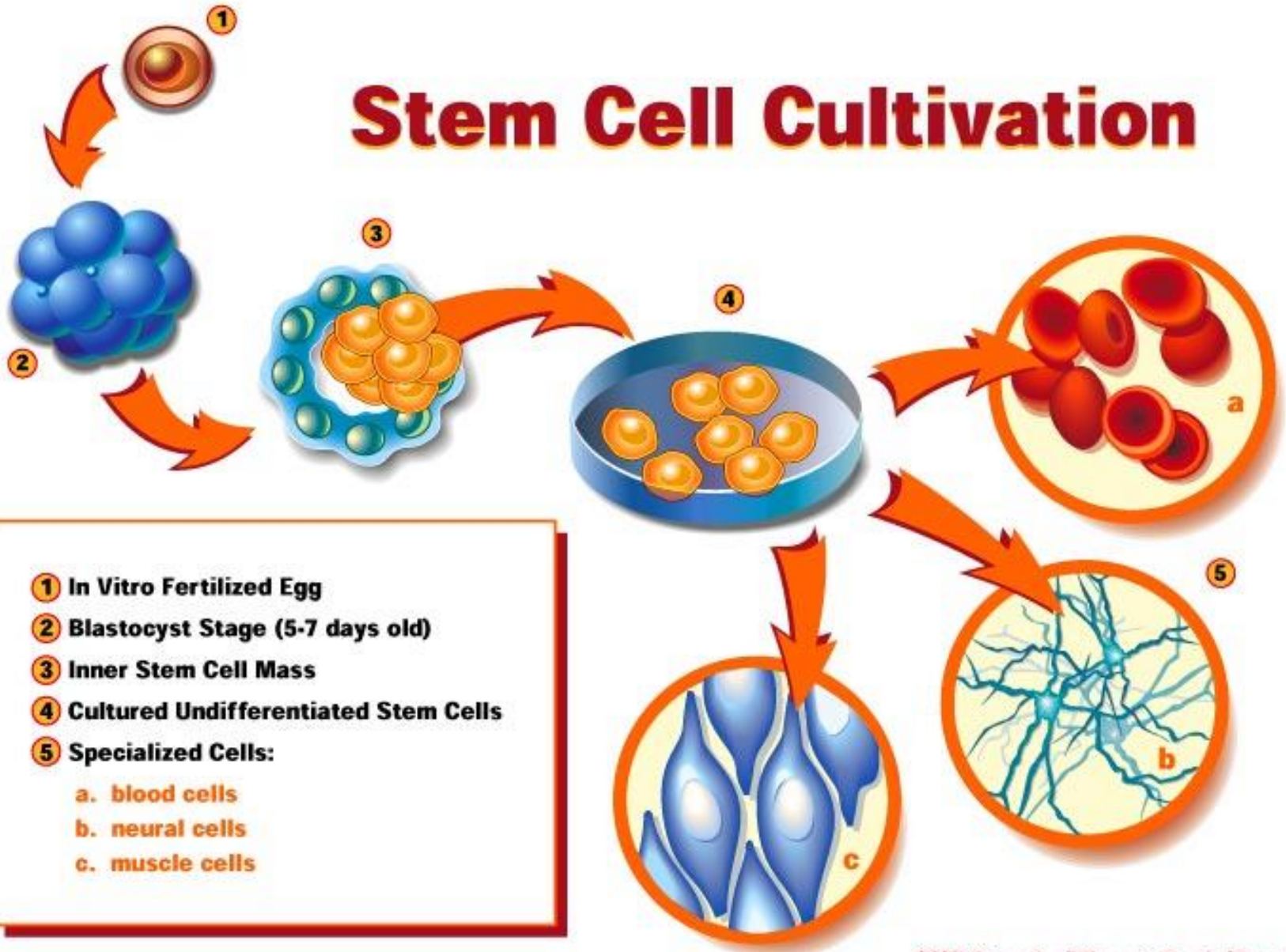
Βιοδοκιμασία αναπαραγωγικής εμβρυοκλωνικής μεταξύ των ειδών (Species Embryocloning)

- ✓ Για τις μελλοντικές εφαρμογές στην αναπαραγωγική κλωνοποίηση, είναι πολύ σημαντικό να προχωρήσουμε περαιτέρω στην κατανόηση του προγραμματισμού ανθρώπινων κυττάρων ενηλίκων με μεθόδους σύγχρονης βιοτεχνολογίας.
- ✓ Στο πλαίσιο αυτό, ξεκινήσαμε πρόσφατα μια νέα προσέγγιση με τη χρήση ενηλίκων κοκκιωδών κυττάρων ωοθηκών και ινοβλαστών του δέρματος για δοκιμασίες SCNT σε απύρηννα ωάρια βοοειδών.
- ✓ Σκοπός είναι ο προσδιορισμός διαφορετικών τύπων ανθρώπινων κυττάρων δότη.
- ✓ Το ωοκύτταρο βοοειδών είναι ένα εξαιρετικό και άκρως αποτελεσματικό μοντέλο, καθώς παρέχει επαρκείς παραμέτρους για την χρήση του σε δοκιμασίες SCNT.

Εμβρυϊκά κύτταρα (Embryonic Stem Cells) με μελλοντικές θεραπευτικές εφαρμογές (1)

- ✓ Ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ES) μπορεί να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως για την ανασύσταση ή την επισκευή ελαττωματικών οργάνων.
- ✓ Είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε μια ποικιλία ιστών και κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αναγεννητικής ιατρικής.
- ✓ Οι πρώτα θεραπευτικές εφαρμογές αφορούσαν τη θεραπεία ασθενών με εκφυλιστικές ασθένειες.

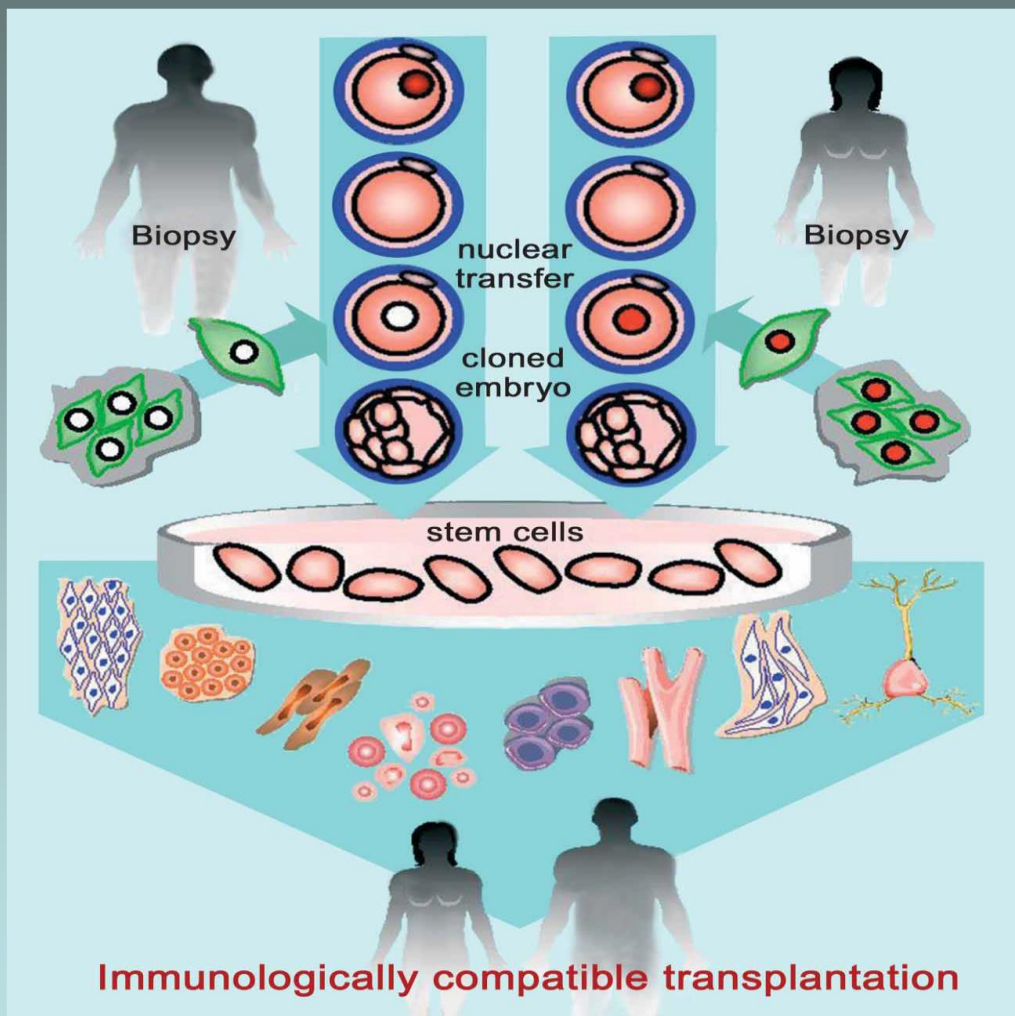
Stem Cell Cultivation



Εμβρυϊκά κύτταρα (Embryonic Stem Cells) με μελλοντικές θεραπευτικές εφαρμογές (3)

- ✓ Οι ανθρώπινες κυτταρικές θεραπείες (ES) μπορεί να είναι εφαρμόζονται για την επιδιόρθωση κατεστραμμένων ιστών όπως της καρδιάς σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου και σε καρδιακή ανεπάρκεια.
- ✓ Στο εγγύς μέλλον, οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο θα μπορούν επίσης να αντιμετωπιστούν με επιτυχία με ανθρώπινα κύτταρα (ES).
- ✓ Τα κύτταρα αυτά θα μπορούν να διοχετευθούν για την σύνθεση όργανο-ειδικών γονιδιακών προϊόντων όπως η ντοπαμίνη ή η ινσουλίνη.

Εμβρυϊκά κύτταρα (Embryonic Stem Cells) με μελλοντικές θεραπευτικές εφαρμογές (2)



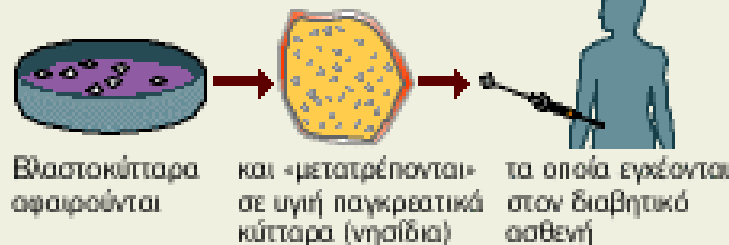
Διαδικασία μεταφοράς πυρήνων σωματικών κυττάρων (SCNT) για την δημιουργία εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ES) σε θεραπευτικές διαδικασίες.

Η διαφορά της θεραπευτικής από την αναπαραγωγική κλωνοποίηση

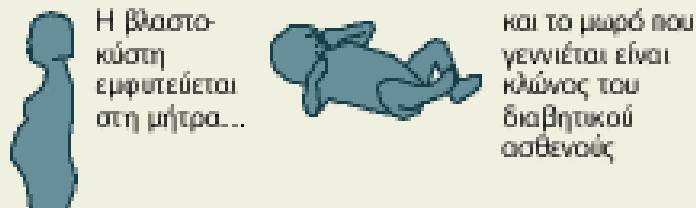
Οι βρετανικές Αρχές επέτρεψαν σε ερευνητές του Πανεπιστημίου του Νιούκασλ να προχωρήσουν στην κλωνοποίηση βλαστικών κυττάρων, που προέρχονται από έμβρυα, για θεραπευτικούς σκοπούς. Τα έμβρυα σε ηλικία λίγων ημερών αποτελούνται από 200 κύτταρα. Στην ίδια χώρα η κλωνοποίηση ανθρώπου τιμωρείται με 10ετή φυλάκιση

Επιτρέπεται στη Βρετανία

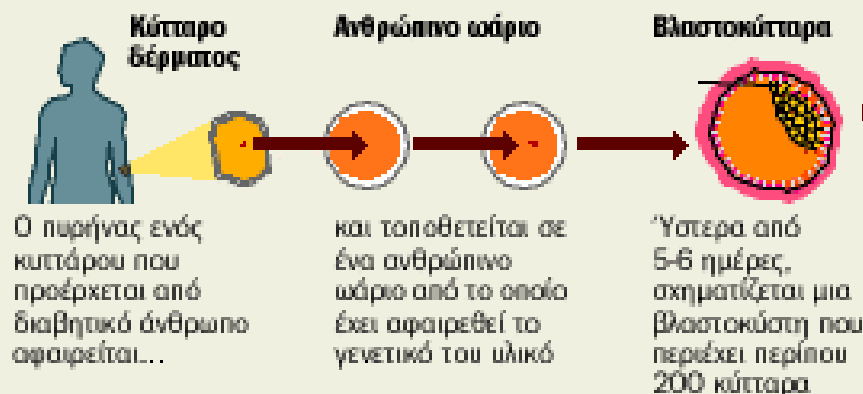
Θεραπευτική κλωνοποίηση



Αναπαραγωγική κλωνοποίηση



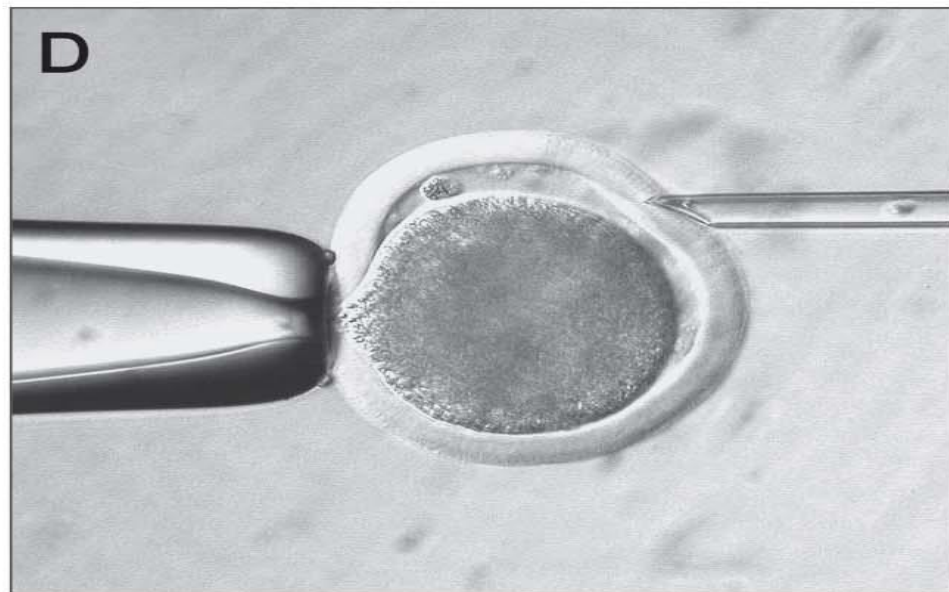
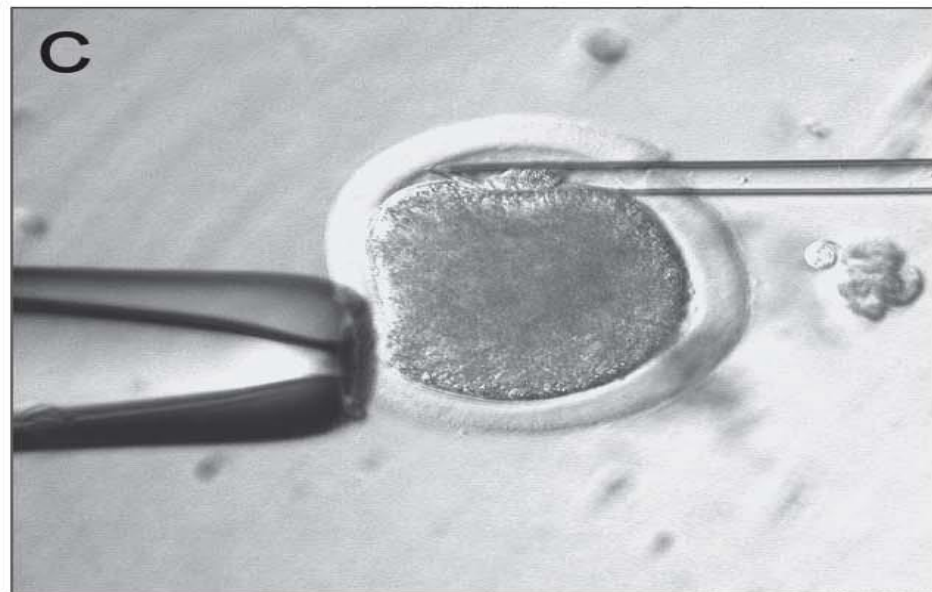
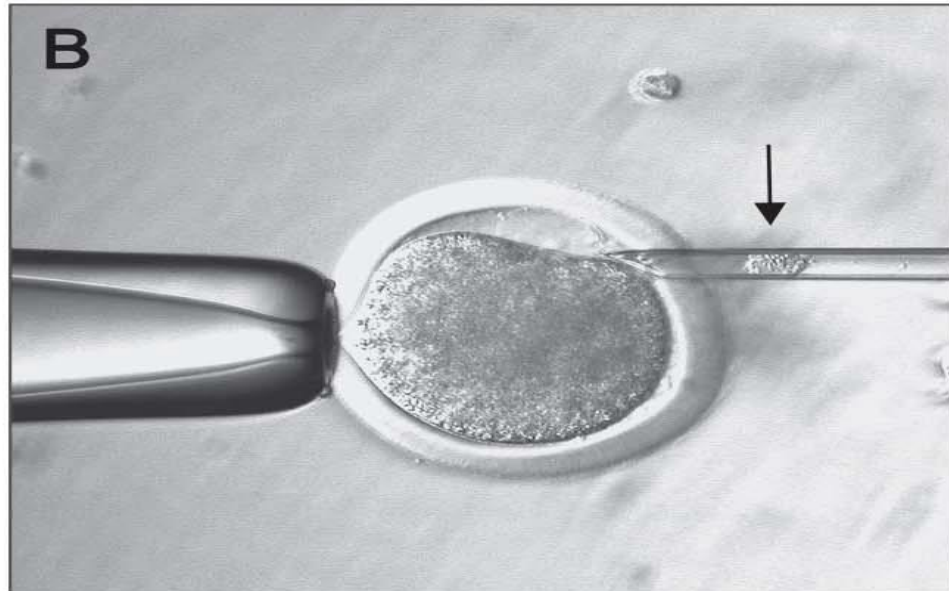
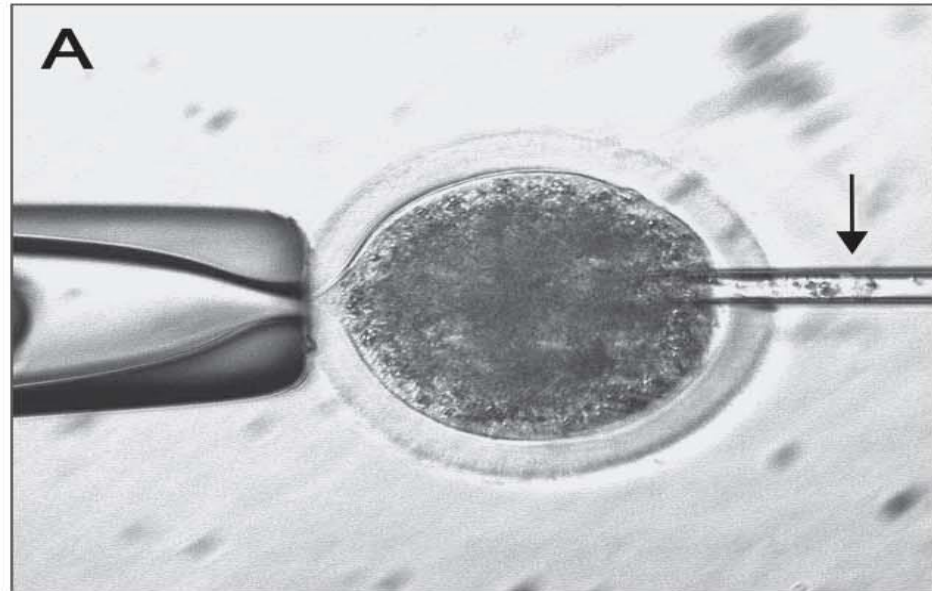
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Ασθενής με διαβήτη



Πηγή: Διεθνές Ινστιτούτο Υγείας

The New York Times

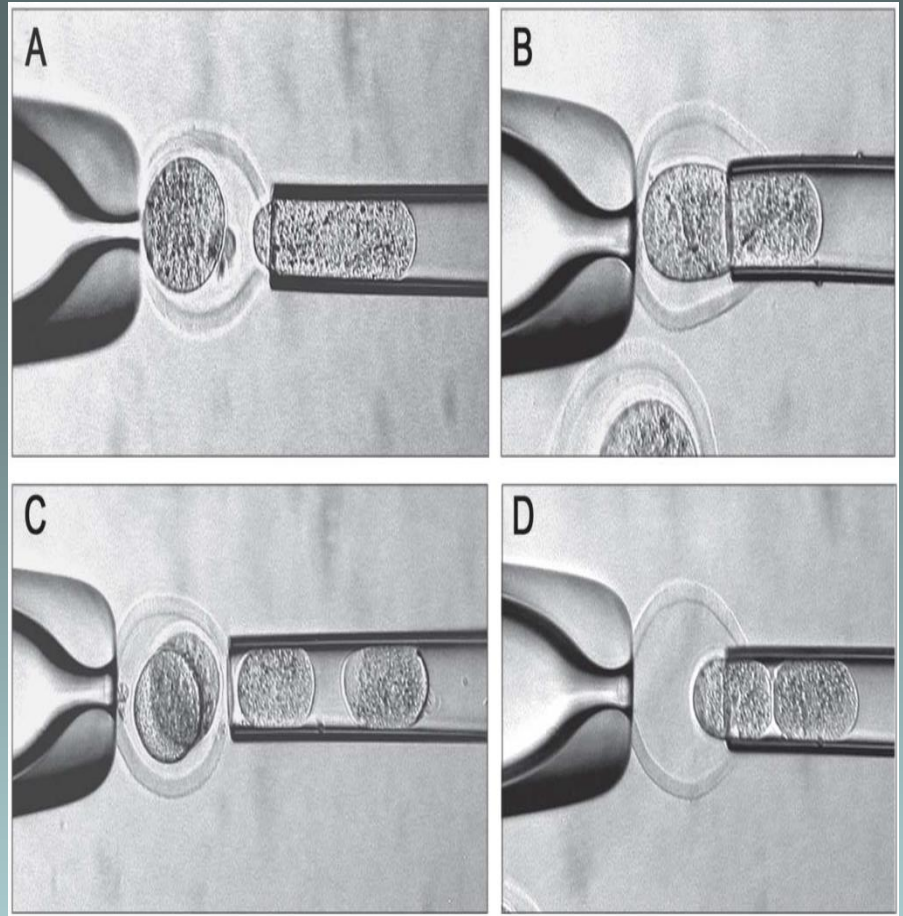
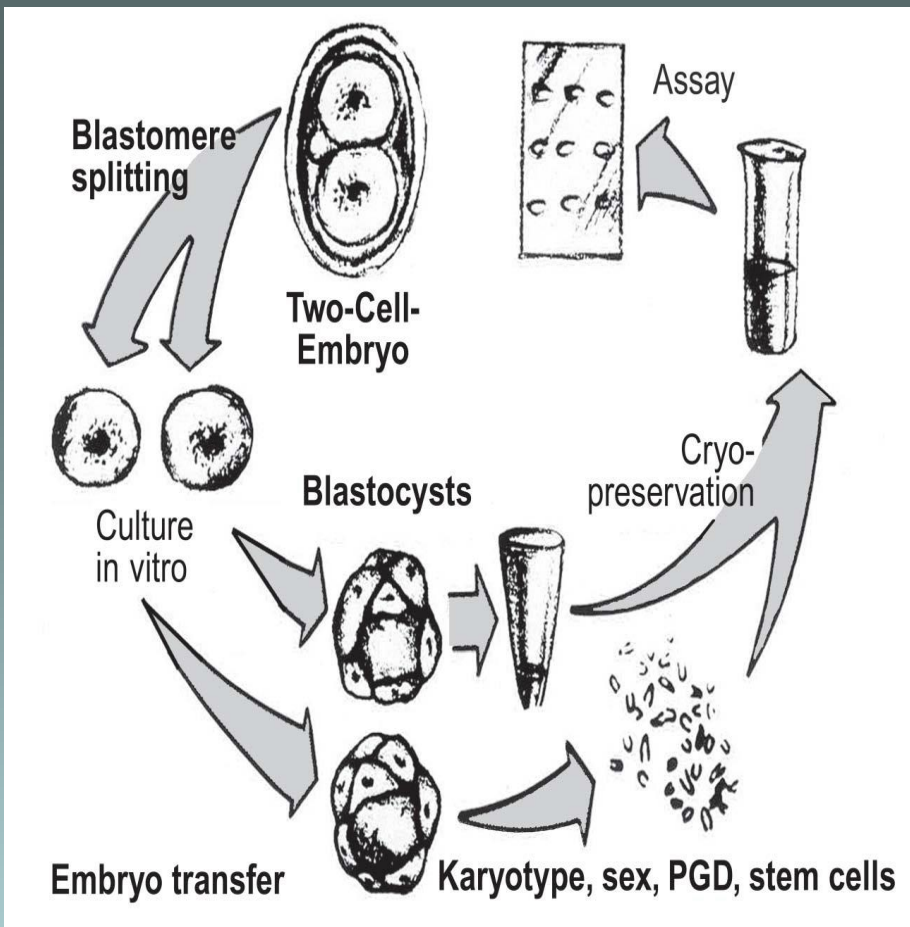
ΤΑ ΝΕΑ



Διάφορα είδη SCNT. (A) Ωάριο βοοειδών σε μετάφαση (B) επιλογή ενήλικων κυττάρων ανθρώπινου δότη (Γ) έγχυση των ενήλικων κυττάρων ανθρώπινου δότη μέσα στο περιβιτελλινικό χώρο (PE) κύτταρο ανθρώπινου δότη που συνδέεται με το εκπυρηνισμένο ωκύτταρο βοοειδών.

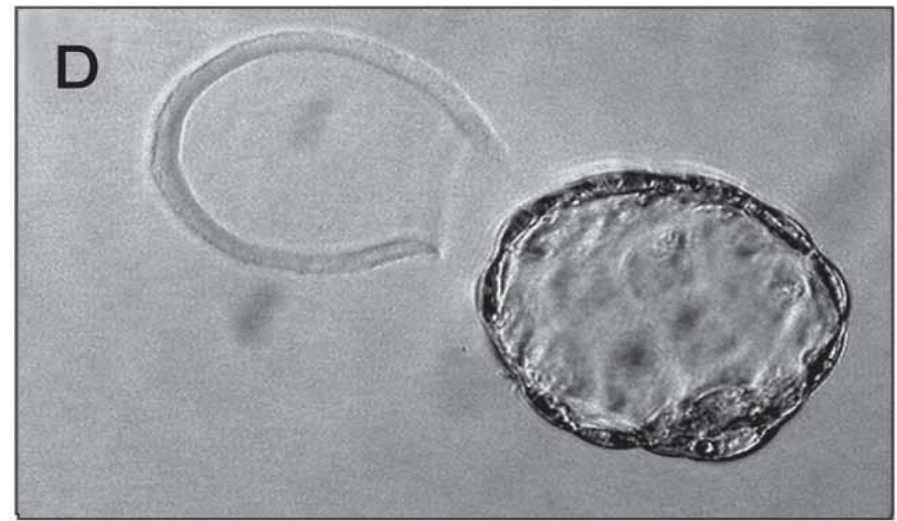
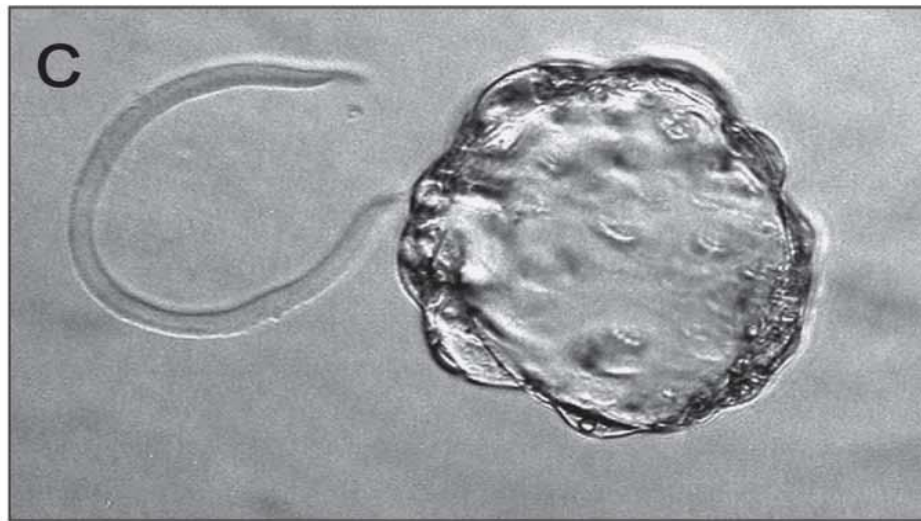
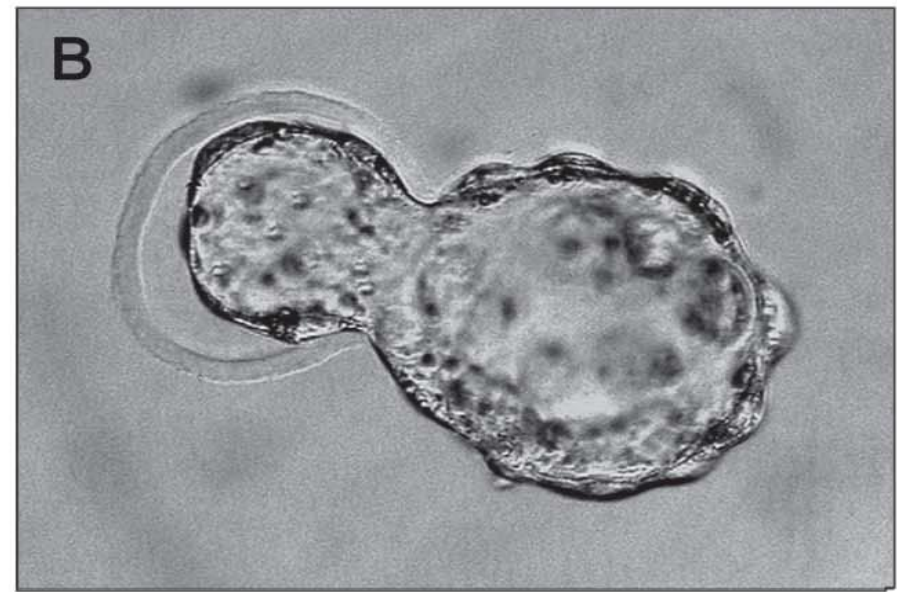
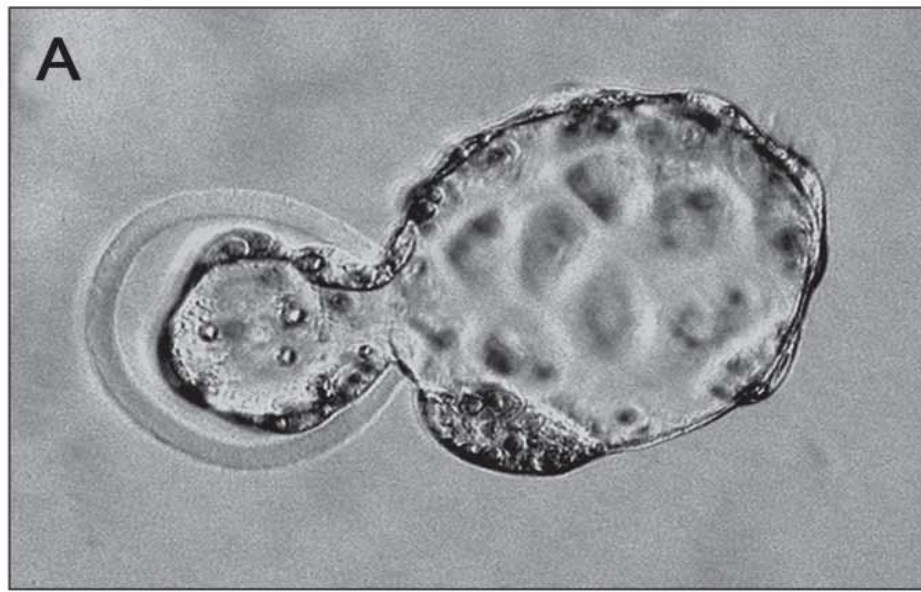
Κλωνοποίηση μέσω της διαίρεσης του εμβρύου

- ✓ Διάσπαση του εμβρύου των θηλαστικών και απομόνωση των βλαστομεριδίων για τη δημιουργία πανομοιότυπων διδύμων.
- ✓ Στα πρόβατα με το διαχωρισμό των πρώιμων εμβρύων μέσω της διαίρεσης των βλαστομεριδίων και τη μεταφορά τους στη μήτρα, το 36% των εμβρύων αναπτύχθηκε σε αυτοτελή οργανισμό.
- ✓ Η διάσπαση των βλαστομεριδίων ως μοντέλο που αναπτύχθηκε στον ποντικό μπορεί να θεωρηθεί ως μια ασφαλής και αποτελεσματική τεχνική για τη μελλοντική διάσπαση ανθρώπινων εμβρύων με πολλαπλές εφαρμογές στην αναπαραγωγική και θεραπευτική ιατρική.



Διάσπαση των πρώιμων εμβρύων (αδελφοποίηση) για διάφορες εφαρμογές στην αναπαραγωγική και θεραπευτική ιατρική.

Βιοψία βλαστομεριδίων από έμβρυα 2-κυττάρων και 4-κυττάρων δότη ποντικού (A και C) έγχυση στον δότη (B και D).



Επώαση βλαστοκύστεων που προέρχονται από έμβryo στο στάδιο των 2-κυττάρων (A και B) και των 4 κυττάρων (Γ και Δ). Βλαστοκύστες του δότη στα αριστερά και του δέκτη δεξιά.

Πλεονεκτήματα κλωνοποίησης

✓ Τα βελτιωμένα προϊόντα. Με την κλωνοποίηση μας δίνεται η δυνατότητα να παράγουμε τρόφιμα με βελτιωμένη θρεπτική αξία.

✓ Η δημιουργία ιστών-όπως αγγείων ή δέρματος-και κατ' επέκταση οργάνων καρδιάς νεφρών-που θα δώσουν άλλη διάσταση στις μεταμοσχεύσεις. Επιπλέον είναι πιο εύκολο και πιο αποτελεσματικό να δημιουργήσουμε ζώα που θα παράγουν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες που θέλουμε για τη θεραπεία κάποιων ασθενειών.

✓ Το απεριόριστο πεδίο μελετών και εμπειριστατωμένων ερευνών. Με την κλωνοποίηση μπορούμε να δημιουργήσουμε μια σειρά από γενετικά πανομοιότυπα ζώα, πάνω στα οποία μπορούμε να μελετήσουμε την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στα γονίδια και τους μηχανισμούς γήρανσης μέχρι τις μεταλλάξεις των γονιδίων της καρκινογένεσης κ.ο.κ

Μειονεκτήματα κλωνοποίησης

- ✓ Οι συγγενείς ανωμαλίες που πιθανόν να δημιουργηθούν.
- ✓ Τα πολύ χαμηλά-τουλάχιστον προς το παρόν-ποσοστά επιτυχίας της κλωνοποίησης με κυτταρική καλλιέργεια.
- ✓ Η εξάλειψη της ποικιλομορφίας. Ένας από τους λόγους που τα θηλαστικά και γενικότερα τα ανώτερα ζώα έχουν επιβιώσει και κυριαρχήσει στη Γη, είναι η ποικιλομορφία τους.
- ✓ Κακή χρήση της κλωνοποίησης. Κανείς δεν μπορεί να αποκλείσει, να αποτρέψει ή να δημιουργήσει τις ασφαλιστικές εκείνες δικλίδες για την περιορισμένη ή συγκεκριμένη χρήση της κλωνοποίησης.

Τι ισχύει στην Ελλάδα;

- ❖ Η Ελλάδα έχει ενσωματώσει με την υπουργική απόφαση Φ.0546/1/ΑΣ 723/Μ.4898 το Πρόσθετο Πρωτόκολλο της Σύμβασης του Οβιέδο που απαγορεύει την κλωνοποίηση ανθρωπίνων όντων.
- ❖ Επιπλέον, η αναπαραγωγική κλωνοποίηση απαγορεύεται ρητά από το άρθρο 1455 του νόμου 3089/2002, ενώ το άρθρο 26 του νόμου 3305/2005 προβλέπει ποινή κάθειρξης μέχρι 15 ετών για τους παραβάτες.