

## ОГЛЯДОВА СТАТТЯ

УДК 602.6:599.323.4

СИВИК А.Є., канд. с.-г. наук, магістр з біотехнології

ДЯЧЕНКО Л.С., д-р с.-г. наук

СИВИК Т.Л., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

dr.syvyk@hotmail.com

### ТРАНСГЕНЕЗ ЧЕРЕЗ СПЕРМАТОГОНАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ У ТВАРИННИЦТВІ І ПЕРСПЕКТИВИ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ У БІЛОЦЕРКІВСЬКОМУ НАУ

Представлено сучасні технології створення трансгенних тварин, проаналізовано їх переваги і недоліки порівняно одна до одної. Висвітлено основи трансгенезу і генетичних модифікацій. Наведено перспективні можливості ринку трансгенних тварин у світі. Обґрунтовано ефективність і доцільність застосування новітньої технології створення трансгенних тваринних моделей через сперматогональні стовбурові клітини. Проаналізована конкурентоспроможність лабораторії генної зооінженерії з виробництва трансгенних моделей лабораторних тварин, запропонованої для створення в Білоцерківському НАУ. Описано основні і перспективні напрями розвитку діяльності лабораторії.

**Ключові слова:** генна інженерія, трансгенез, рекомбінантна ДНК, трансгенні тварини, сперматогональні стовбурові клітини, трансплантація сперматогонії.

**Генна інженерія і трансгенез – новий напрям молекулярної біології і генетики.** Отримання Паулом Бергом у 1972 році рекомбінантної дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) поклало початок новому напрямку молекулярної біології і генетики – генній інженерії. Основну роль у створенні нових комбінацій генетичного матеріалу відіграють особливі ферменти (рестриктази, ДНК-лігази), що дозволяють розрізати молекулу ДНК у чітко визначених місцях, а потім “зшивати” фрагменти ДНК в єдине ціле. Тільки після відкриття таких ферментів стало практично можливим створення штучних гібридних генетичних структур рекомбінантних ДНК [1, 2, 3].

На технології отримання рекомбінантної ДНК ґрунтується генетична модифікація і трансгенез, який є її підвидом. Трансгенез – це штучно запроваджений перенос гена (або фрагмента ДНК) з одного біологічного виду в інший. Генетична модифікація відбувається також при зміні послідовності ДНК в організмі без переносу чужорідних генів [4, 5].

Живі організми, геном яких було штучно видозмінено або введена додаткова генетична послідовність (трансген), мають назву генетично модифіковані (ГМ), їх часто також називають трансгенними. Трансгенні тварини створюються для таких основних цілей:

- фундаментальні біологічні дослідження проводяться на гризунах для встановлення функцій різних генів, регуляції їх експресії, генотипового прояву, мутагенезу тощо;
- моделювання специфічних генетично детермінованих хвороб людини, а також тварин для біомедичних досліджень (гризуни та тварини сільськогосподарського призначення);
- виробництва лікарських білків *in vivo* (фактори згортання крові, фіброген, колаген, інтерферон, кальцитонін, лактоферин та багато інших);
- удосконалення господарсько-корисних ознак сільськогосподарських тварин (покращення продуктивності, оплати корму, стійкості до хвороб тощо) – селекція на генному рівні.

У країнах з високим або прийнятним рівнем розвитку освіти, науки і економіки основними користувачами трансгенних тварин є державні або приватні науково-дослідні установи, фармакологічні або біолого-технологічні компанії, а також сільськогосподарський сектор [6, 7, 8].

**Існуючі методи створення трансгенних тварин.** Перша трансгенна тварина (миша) була отримана у 1981 році в результаті співпраці декількох наукових лабораторій у США, що місти-

лися у Єльському університеті (Dr. Frank Ruddle), Оксфорді (Dr. Frank Constantini and Elizabeth Lacy), університетах Пенсильванії і Вашингтоні (Dr. Ralsh Brinster and Richard Palmiter). Вчені Палмітер і Брінстер можуть вважатися основоположниками трансгенезу у тварин [9-14].

Генетична модифікація тварин була запроваджена з використанням технології рекомбінантної ДНК, що ґрунтується на введенні клонованого гена в геном клітини, з якої могла б утворитися лінія статевих клітин. У результаті схрещування трансгенних нащадків можна одержувати гомозиготні лінії трансгенних тварин.

На сьогодні серед різноманітних способів уведення чужорідної ДНК в геном тварини можна виділити наступні, які широко застосовуються в практиці створення трансгенних тварин:

- метод мікроін'єкцій у запліднену яйцеклітину;
- використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин;
- використання сперматогональних стовбурових клітин і спермій як переносників ДНК.

Мікроін'єкції рекомбінантної ДНК у запліднені ооцити тварин допоки залишаються найбільш популярним способом уведення чужорідних генів в організм тварин. Цей метод потребує високої кваліфікації і досвіду фахівців, а також дорогого устаткування, проте він добре розроблений і ефективно працює на мишах. Донорних самок мишей після індукованої суперовуляції схрещують із самцями-плідниками. Через 12 годин виділяють запліднені яйцеклітини і поміщають їх у культуру. Потім у два пронуклеуси (зазвичай чоловічі) ін'єктують рекомбінантну ДНК. Ті яйцеклітини, що вижили після ін'єкції, пересаджують самкам реципієнтам. Тільки частина трансплантованих ооцитів продовжує розвиватися до народження нащадків [15-18].

Трансгенних тварин ідентифікують різними методами, найчастіше полімеразно ланцюговою реакцією, а потім схрещують для отримання трансгенних ліній. У ряді випадків гомозиготні лінії отримати не вдається, оскільки 5–15 % трансгенів у гомозиготному стані летальні [16-20].

Іншим, використовуваним на сьогодні методом створення трансгенних мишей, є трансгенез через модифіковані стовбурові клітини. Для того щоб зрозуміти, як відбувається трансгенез, потрібно знати природу стовбурових клітин. Стовбуровою клітиною вважають недиференційовану примітивну клітину, основною ознакою якої є здатність до двох типів поділу: симетричного і асиметричного. За симетричного поділу із материнської стовбурової клітини утворюються дві однакові недиференційовані клітини. За асиметричного поділу одна із дочірніх клітин залишається стовбуровою, водночас як інша – дочірня клітина стає на шляху диференціації у клітину спеціалізованої тканини. До тих пір поки клітина залишається здатною до обох типів поділу, вона вважається стовбуровою [17, 21].

Залежно від походження існує декілька типів стовбурових клітин:

- тотипотентні стовбурові клітини (всемогутні – тоти, тотальні, потентні – могутні), які можуть диференціюватися у будь-які типи клітин. Такими клітинами вважаються ембріональні стовбурові клітини;

- плюрипотентні (тканинно-специфічні) клітини, які можуть диференціюватися у різні типи клітин у межах однієї клітини. Наприклад, стовбурові клітини крові диференціюють у еритроцити, лімфоцити чи лейкоцити, а нервові стовбурові клітини диференціюють у нейрони та гліальні клітини астроглії, олігодендроцити, епендими та мікроглії;

- уніпотентні клітини можуть перетворюватися лише на один тип клітин. Це клітини епітелію, м'язові, а також статеві стовбурові клітини.

Ембріональні стовбурові клітини виділяють з мишачих ембріонів на стадії бластоцити, нагощують у культурі, в якій вони проліферують, але при цьому зберігають здатність диференціюватися в будь-які типи клітин, у тому числі і в лінію статевих клітин за уведення їх в ембріон на стадії бластоцити.

Такі клітини називають плюрипотентними ембріональними стовбуровими клітинами (ЕСК). У ЕС-клітини в культурі можна увести трансгени різними методами (трансфекція, електропорація, ретровірусна інфекція тощо) без порушень їх плюрипотентності [22-25].

Практична цінність цих методів полягає в тому, що вони дають можливість проводити селекцію клітин за певним параметром. Це може бути число копій трансгену, його локалізація або характер експресії. Знаючи послідовності, що оточують конкретний сайт для бажаної інтеграції, можна сконструювати вектор для вбудовування цільової ДНК шляхом гомологічної рекомбінації [25-27].

**Перспективні можливості ринку трансгенних тварин.** Підкреслимо ще раз, що описані вище методи створення трансгенних моделей тварин добре відпрацьовані і широко використовуються нині для продукування трансгенних мишей, тому ринок трансгенних мишей тепер достатньо насичений. Так, якщо кількість трансгенних моделей мишей обчислюється десятками тисяч, то кількість загальнодоступних трансгенних щурів не перевищує 500 моделей. Щур, як модель, перевершує мишу, оскільки він більш наближений до біології людини, а тому і більш трансляційний. Окрім того, з щурами простіше впоратися та проводити хірургічні процедури; вони забезпечують до 10 разів більше зразків тканини для подальшого аналізу. Щурі широко використовуються в поведінкових, годівельних, токсикологічних та фізіологічних дослідженнях [28-30]. Відсутність конкретних генетично розроблених моделей щурів призводить до зниження якості та зменшення кількості досліджень у цих сферах. За наявності доступу до нових та бажаних моделей щурів вчені у багатьох напрямках досліджень матимуть можливість вибору для проведення експериментів на тваринах, більш наближених до людини. Згідно зі звітом "Marked and Marked", ринок моделей щурів оцінений в 358,5 млн доларів США у 2014 році, і очікується, що до 2020 року він досягне 602,3 млн доларів.

Удосконалення технологій редагування генів, таких як CRISPR / Cas 9, TALEN, нуклеази з мотивами цинкових пальців, роблять генерацію щурів з деякими типами генетичних модифікацій технічно можливою та економічно обґрунтованою. Як повідомляється, створення ГМ-щурів є основним фактором економічного зростання ринку моделей щурів, яке оцінюється на рівні 9,4 % за рік з 2015 до 2020 років [31, 32].

Поряд зі щурами, морська свинка, як модель, перевершує щура як лабораторна тварина за такими ж показниками, як і щур переважає мишу. Морська свинка за біологічними особливостями ще більш наближена до людини, а також є більш зручною для досліджень, порівняно з моделлю щура. Нижче показано наближеність згаданих вище модельних організмів до людини з використанням філогенетичного дерева на основі послідовностей білка FOXN1 (рис.1).

«Дерево» наочно демонструє, що на прикладі цього конкретного протеїну морська свинка є найбільш наближеним до людини видом, порівняно з іншими лабораторними тваринами. Морська свинка вважається оптимальною моделлю для вивчення інфекційних захворювань (туберкульоз, хламідіоз, сифіліс, стафілококові та вірусні інфекції тощо) через подібність із симптомами людини та імунною реакцією [33-35].

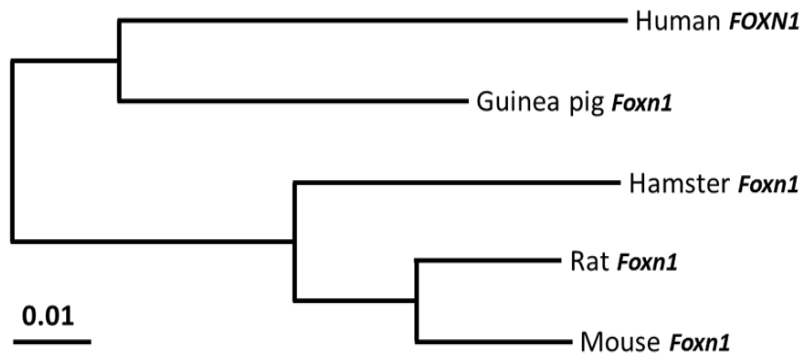


Рис. 1. Філогенетичне дерево для людини та загальноовживаних модельних тварин (морська свинка, хом'як, щур, миша) побудоване на основі послідовностей білка FOXN1 методом приєднання наближених організмів з використанням програми Seaview 4.

Морська свинка є головною піддослідною твариною для розробки та тестування ліків, зокрема від астми та алергії. На жаль, використання морської свинки на сьогодні обмежене через суттєві труднощі застосування існуючих технологій маніпулювання геномом у цьому виді. Нині не існує жодної генетично інженерованої моделі морської свинки, оскільки загальноовживані методи не дають позитивних результатів, через біологічні особливості цього виду тварин.

**Основні складові технології створення трансгенних тварин через сперматогональні стовбурові клітини.** Основою такої технології є здатність вводити генетичну модифікацію безпосередньо в статеві стовбурові клітини, як *in vivo*, так і *in vitro*. Після модифікації сперматогонія може бути трансплантованою у сім'яники реципієнта, де буде розвиватися і диференці-

юватися у сперматозоїди, що нестимуть заплановану генетичну зміну. Після спаровування і розведення тварин модифікація буде передаватися наступним поколінням. Простий трансгенез або вибивання гена може бути досягнуто шляхом вірусної трансдукції *in vivo* [36, 37]. Комплексна та/або цілеспрямована модифікація гена може бути виконана спочатку в культурі сперматогональних стовбурових клітин *in vitro*. Культура дозволяє здійснювати клональну ідентифікацію запланованої трансгенної модифікації та розмноження у подальшому позитивно ідентифікованого клону. Після нарощування модифікованої клітинної культури сперматогоній до необхідної кількості, їх трансплантують у сім'яники попередньо обробленого хімічно стерильного реципієнта. Трансплантація модифікованих стовбурових клітин генерує химерного самця-плідника, що продукує генетично модифіковану сперму. Послідовні кроки цієї технології наведені на рисунку 2.

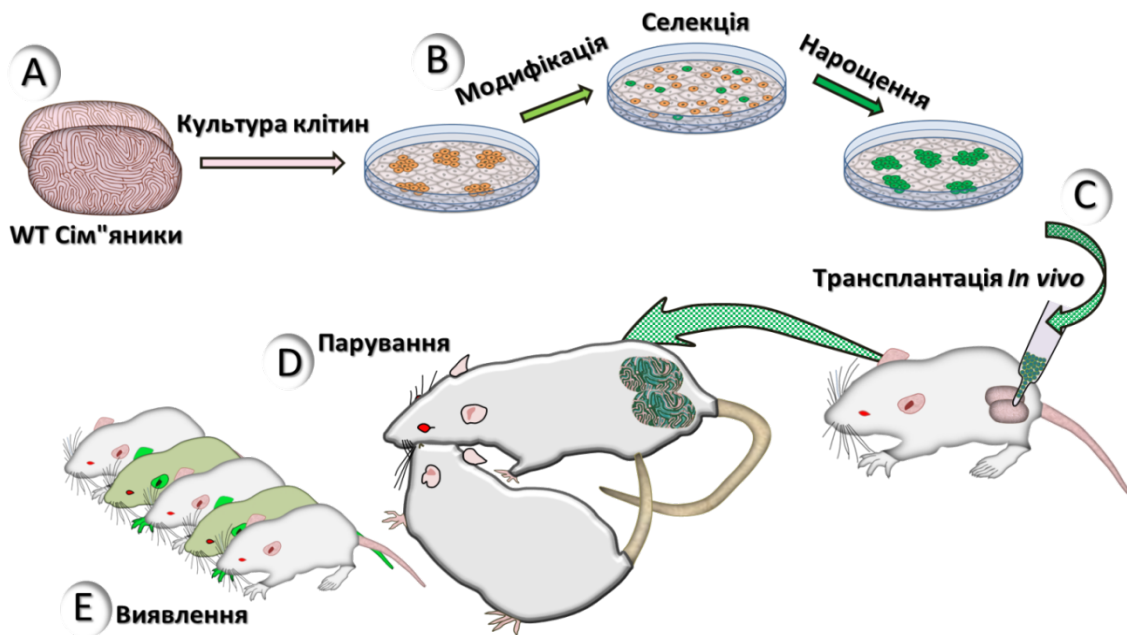


Рис. 2. Схема послідовних кроків створення трансгенних модельних тварин через сперматогональні стовбурові клітини.

Трансгенез через модифікацію запліднених яйцеклітин або ембріональних стовбурових клітин у щурів є низькорезультативним унаслідок технічно складних маніпуляцій з ооцитами та ембріональними стовбуровими клітинами. Трансгенез у щурів через сперматогональні стовбурові клітини є альтернативним і більш ефективним методом, а тому більш привабливим для генерації бажаних геномних перетворень [38-40]. Сперматогональні стовбурові клітини є однопотентними, а тому значно стабільнішим типом стовбурових клітин, які можна надійно підтримувати в клітинній культурі впродовж більше 25 пасувань без диференціювання, нестабільності каріотипу або перебудови хромосом, що притаманні ембріональним стовбуровим клітинам. Сперматогональні стовбурові клітини піддаються тим же методам генетичної маніпуляції, що використовуються на ембріональних стовбурових клітинах: електропорація, ліпофекція та вірусна трансдукція [41-44]. Пряма генетична маніпуляція в чоловічих статевих лініях дозволяє уникнути виконання додаткових етапів, пов'язаних зі створенням химери, її перевірки та розведення. Таким чином, запропонована технологія потребує менше технологічних кроків, менше ресурсів і тварин [45-48]. Нині потенційні користувачі не мають жодних доступних економічно ефективних та конкурентоспроможних альтернативних варіантів створення моделей лабораторних тварин власного дизайну на комерційній основі.

Запропонована технологія створення трансгенних щурів є удосконаленою і придатною до наукового та комерційного використання. Водночас із наведеним вище, додатково були проведені експерименти на морських свинках щодо ізоляції сперматогональних стовбурових клітин та розробки процедури трансплантації. Отримані результати дають підставу стверджувати, що

генерація генетично модифікованої морської свинки за допомогою цього методу буде виконана найближчим часом (1-1,5 року).

**Конкурентоспроможність запропонованої в Білоцерківському НАУ лабораторії генної зооінженерії.** На світовому рівні трансгенна технологія на основі модифікації сперматогональних стовбурових клітин розробляється у кількох академічних установах США, Канади та Японії. Комерційні компанії на сьогодні не мають змоги використовувати цю технологію через її новизну та відсутність фахівців у цій галузі. Деякі кроки, що використовуються у цій технології, потребують специфічних знань, навичок і досвіду. Слід зазначити, що процедура трансплантації є ключовим і найбільш відповідальним етапом. Наскільки нам відомо, лише в одній лабораторії в США (у Південно-Західному медичному центрі в Далласі) може здійснюватися трансплантація сперматогонії у сім'яники пацюків з прийнятним відсотком успіху. Щонайменше ще одна американська лабораторія відкрито заявляє про намір використовувати цей підхід для генерації трансгенних шурів, зосереджуючи увагу на розробці методів трансплантації.

Науковці, задіяні у створення запропонованої лабораторії, суттєво покращили техніку трансплантації у сім'яники шурів, досягнувши 100 % успіху. Окрім того, попередній успіх процесу трансплантації у морських свинок дозволяє впевнено спрогнозувати, що за використання сперматогонального підходу трансгенні морські свинки будуть створені в найближчому майбутньому.

Запропонована лабораторія генної зооінженерії буде біотехнологічним підрозділом Білоцерківського національного аграрного університету для продукування генетично модифікованих тварин. В лабораторії передбачається:

1. Впровадити завершений надійний технологічний процес з виробництва трансгенних лабораторних тварин.
2. Запропонувати створення генетично сконструйованих моделей тварин для використання у наукових дослідженнях вченими БНАУ.
3. Маючи успішні приклади створення і використання моделей лабораторних тварин, запропонувати послуги зі створення модельних тварин на національному та міжнародному рівнях.
4. Поширити технологію на інші види тварин, де створення генетичних модифікацій традиційними методами (маніпуляція яйцеклітиною або ембріоном) не були розроблені, не є ефективними або мають непомірно високу вартість. Створення першої модифікації у морської свинки є першочерговим завданням.
5. У найкоротші терміни забезпечити створення і постачання генетично модифікованих морських свинок високої комерційної цінності для загального використання у дослідженнях інфекційних хвороб, алергій, імунітету та астми.
6. У перспективі створити генетичну базу для ведення селекції сільськогосподарських тварин з підвищення продуктивності, стійкості до захворювань, покращення трансформації поживних речовин у продукцію, а також використання тварин для біологічного виробництва протеїнів фармакологічного призначення.

Перевага лабораторії ґрунтується на глибоких знаннях та унікальному досвіді авторів проекту в галузі біології статевих стовбурових клітин. Ключовим персоналом запропонованої лабораторії є професор Сивик Т.Л. та кандидат с.-г. наук за спеціальністю біохімія та магістр з біотехнології Сивик А.Є., які є членами Міжнародного товариства з трансгенних технологій (ISTT) і брали безпосередню участь у дослідженнях в області сперматогенезу у Південно-Західному медичному центрі в Далласі (США). Впродовж шести років вони набули унікального досвіду у створенні цілеспрямованих генетичних змін у статевих стовбурових клітинах та генерації трансгенних лабораторних тварин трансплантацією генетично модифікованої сперматогонії. Використовуючи цей підхід, Т.Л. Сивик та А.Є. Сивик успішно згенерували численні генетично модифіковані лінії сперматогональних стовбурових клітин, окремі з яких були використані для створення кількох трансгенних ліній шурів з бажаним проявом трансгенів [38, 49, 50]. Набуті знання та досвід у поєднанні із навичками мікрохірургії будуть використовуватися для застосування та вдосконалення трансгенних технологій через сперматогональні стовбурові клітини.

Лабораторія стане першим науково-експериментальним підрозділом в Україні, який запропонує моделі лабораторних тварин, створених альтернативною і більш ефективною технологією в трансгенезі.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Busso, D., Stierle, M., Thierry, J. C., Moras, D. (2008). A comparison of inoculation methods to simplify recombinant protein expression screening in *Escherichia coli*, *Biotechniques* 44, pp. 101–106.
2. Choi, J.H., Lee, S.Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol, Biotechnol*, 64, pp. 625–635.
3. Demain, A.L., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol, Adv.* 27, pp. 297–306.
4. Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S., Ramirez, O.T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol, Biol.* 267, pp. 15–52.
5. Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J., Biotechnol.* 115, pp. 113–128.
6. Pedro, A. Prieto, John J Kopchick, Bruce Kelder. (1999). Transgenic animals and nutrition research, *Journal of nutritional Biochemistry.* 12, pp. 682-695.
7. Merlino, G.T. (1991). Transgenic animals in biomedical research. *FASEB J.* 5(14), pp. 2996-3001.
8. Sauer, UG1, Kolar, R, Rusche, B. (2005). The use of transgenic animals in biomedical research in Germany. *Akademie fuer Tierschutz, Neubiberg, Germany,* 22(4), pp. 233-57.
9. Raju Kucherlapati (2013). Francis H. Ruddle (1929–2013): A Pioneer in Human Gene Mapping, 24, pp. 9619–9620.
10. Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*, 318(6046):533-8, pp. 12-18.
11. Babinet, C, Farza, H, Morello, D, Hadchouel, M, Pourcel, C. (1985). Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. *Science*, 230(4730):1160-3 p.
12. Pursel, V.G., Rexroad Jr, C.E., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E. (1988). Gene transfer for increased animal growth. *Biomechanisms Regulating Growth and Development*, pp. 77-85.
13. Wall, R.J., Seidel, Jr. G.E. (1992). Transgenic farm animals – a critical analysis. *International Journal of animal reproduction*, Volume 38, Issue 2, pp. 337–357.
14. Brinster, R.L., Snadgre, E.P., Behringer, R.R., Palmiter, R.D. (1989). No simple solution for making transgenic mice, *Cell.* 59, pp. 239-241.
15. Lavitrano, M. (1989). Sperm cells as vector for inducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation in mice, *Cell.* 57, pp. 723-725.
16. Brem, G. (1993). Transgenic animals. In *biotechnology*, VCN Press, pp. 745-832.
17. Chan, A.W.S. (2010). Transgenic animals: current and alternative strategies, *Cloning.* V.1, no.1, pp. 25-46.
18. Lapinski, P.E., Bauler, T.J., Brown, E.J., Hughes, E.D., Saunders, T.L., King, P.D. (2007). Generation of mice with a conditional allele of the p120 Ras GTPase-activating protein, *Genesis.* 45, pp. 762-767.
19. Ginzinger, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream, *Exp. Hematol.* 30, pp. 503-512.
20. Soliman, G.A., Ishida-Takahashi, R., Gong, Y., Jones, J.C., Leshan, R.L., Saunders, T.L., Fingar, D.C., Myers, M.G. (2007). A simple qPCR-based method to detect correct insertion of homologous targeting vectors in murine ES cells, *Transgenic Res.* 16, pp. 665-670.
21. Van, Ree J1, Zhou, W, Li M, van Deursen, JM. (2011). Transgenesis in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011; *Transgenic Mouse Methods and Protocols. Part of the Methods in Molecular Biology book series (MIMB)* 693, pp. 143-162.
22. Ko, B. S., Chang, T. C., Shyue, S. K., Chen, Y. C., Liou, J. Y. (2009). An efficient transfection method for mouse embryonic stem cells, *Gene Therapy.* 16, pp. 154–158.
23. Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., Verma, I. M. (2001). Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos, 99, pp. 2140-2145.
24. Kawamata, M., Ochiya, T. (2010). Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 107, pp. 14223-14228.
25. Park, S. M., Song, S. J., Uhm, S. J., Cho, S. G., Park, S. P., Lim, J. H., Lee, H. T. (2004). Generation of Embryonic Stem Cell-derived Transgenic Mice by Using Tetraploid Complementation. *Asian-Aust. J. Anim, Sci.* 17, pp. 1641-1646.
26. Gerlai, R. (2016). Gene Targeting Using Homologous Recombination in Embryonic Stem Cells: The Future for Behavior Genetics? *Frontiers in Genetics*, 17, 43 p.
27. Chang, Tong, Guanyi Huang, Charles, Ashton, Ping, Li & Qi-Long, Ying. (2011). Generating gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells, *Nature protocols.* 6, pp. 827–844.
28. Ellenbroek, B. and Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease Models & Mechanisms.* 9, pp. 1079-1087.
29. Iannaccone, P.M., Jacob, H.J. (2009). Rats! Disease models mechanisms, 2 (5-6), pp. 206-210.
30. Penny, Hawkins, Rachel, Armstrong, Tania, Boden, Paul, Garside, Katherine, Knight, Elliot, Lilley, Michael, Seed, Michael, Wilkinson, Richard O. Williams. (2015). Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research, *Inflammopharmacology*, 23, pp. 131–150.
31. Nemudryi, A.A., Valetdinova, K.R., Medvedev, S.P., Zakian, S.M. (2014). TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery, *Acta Naturae.* 6(3), pp. 19–40.
32. Heidi, Ledford. (2016). CRISPR: gene editing is just the beginning. *Nature*, 531, pp. 156-159.
33. Padilla-Carlin, D.J., McMurray, D.N., Hickey, A.J. (2008). The Guinea Pig as a Model of Infectious Diseases. *Comparative Medicine*, 58(4), pp. 324–340.
34. Clark, S., Hall, Y., Williams, A. (2015). Animal models of tuberculosis: Guinea pigs. *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*, 5, pp. 1-9.

35. Hickey, A.J. (2011). Guinea Pig Model of Infectious Disease – Viral Infections, *Current Drug Targets*, 12, pp. 1018-1023.
36. Aponte, P.M. (2015). Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine, *World Journal Stem Cells*, 26, pp. 669–680.
37. Han, S.Y., Gupta, M.K., Uhm, S.J., Lee, H.T. (2009). Isolation and In vitro Culture of Pig Spermatogonial Stem Cell. *Asian-Aust. Journal Animal Science*, 22, pp. 187 – 193.
38. Chapman, K.M., Saidley-Alsaadi D., Syvyk, A.E., Shirley, J.R., Thompson, L.M., Hamra, K.F. ( 2011). Rat Spermatogonial Stem Cell-Mediated, Advanced Protocols for Animal Transgenesis, pp. 237-266.
39. Oliveira de Barros, F.R., Giassetti, M.I., Visintin, J.A. (2012). Spermatogonial Stem Cells and Animal Transgenesis. *Innovations in Biotechnology*, ISBN: 978-953-51-0096-6, InTech, pp. 303-318.
40. Mito Kanatsu-Shinohara, Megumi, Kato, Masanori, Takehashi, Hiroko, Morimoto, Seiji, Takashima, Shinichiro, Chuma, Norio, Nakatsuji, Masumi, Hirabayashi, Takashi, Shinohara. (2008). Production of Transgenic Rats via Lentiviral Transduction and Xenogeneic Transplantation of Spermatogonial Stem Cells, *Biology of Reproduction*, 79, pp. 1121–1128.
41. Jinzhou, Qin, Haixia, Xu, Pengfei, Zhang, Conghui, Zhang, Zhendong, Zhu, Rongfeng, Qu, Yuwei, Qin, Wenxian, Zeng (2015). An efficient strategy for generation of transgenic mice by lentiviral transduction of male germline stem cells in vivo. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, DOI 10.1186/s40104-015-0058-4.
42. Izsvák, Z., Fröhlich, J, Grabundzija, I., Shirley, J.R., Powell, H.M., Chapman, K.M., Ivics, Z., Hamra, F.K. (2010). Generating knockout rats by transposon mutagenesis in spermatogonial stem cells, *Nature Methods*, 7, pp. 443-445.
43. Y. Ma, B. Shen, X. Zhang, Y. Lu, W. Chen, J. Ma, X. Huang, L. Zhang. (2014). Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9, *PLoS one*, 9, e89413.
44. W. Zeng, L. Tang, A. Bondareva, A. Honaramooz, V. Tanco, C. Dores, S. Megee, M. Modelski, J.R. Rodriguez-Sosa, M. Paczkowski, et al. (2013). Viral transduction of male germline stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation in pigs, *Biology Reproduction*, 88, 27 p.
45. W. Ni, J. Qiao, S. Hu, X. Zhao, M. Regouski, M. Yang, I.A. Polejaeva, C. Chen. (2014). Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9, e106718.
46. Chapman, K.M., Medrano, G.A., Ober, C., Hamra, K.F. (2015). Targeted Germline Modifications in Rats Using CRISPR/Cas9 and Spermatogonial Stem Cells, *Cell reports*, 10, pp. 1828–1835.
47. Jens Ehmcke, Joachim, Wistuba, Stefan Schlatt. (2006). Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Human Reproduction Update*. V. 12, 3, pp. 275–282.
48. Masanori, Takehashi, Mito Kanatsu-Shinohara, Takashi Shinohara. (2010). Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells, *Development, Growth & Differentiation*. 52, pp. 303–310.
49. Syvyk, A.E., Chapman, K.M., Hamra, K.F. (2011). ERBB gene family signaling molecules in the rat testis. Poster presentation, American Society of Andrology, 36 th Annual Meeting, pp. 47-48.
50. Jaichander P., Syvyk, A.E., Syvyk, T.L., Medrano, G.M., Chapman, K. M. and Hamra K.F. (2013). Inducible gene regulation in the rat germline. XXII-nd North American Testis workshop, pp. 77-85.

**Трансгенез через сперматогональные стволовые клетки в животноводстве и перспективы применения его в Белоцерковском НАУ**

**Сывык А.Е., Дьяченко Л.С., Сывык Т.Л.**

Представлено современные технологии создания трансгенных животных, сделан их сравнительный анализ друг с другом, проанализировано их преимущества и недостатки. Освещены основы трансгенеза и генетических модификаций. Приведены перспективные возможности рынка трансгенных животных в мире и обосновано эффективность и целесообразность использования новой технологии создания трансгенных моделей животных через сперматогональные стволовые клетки. Проанализирована конкурентоспособность предложенной для создания в Белоцерковском НАУ лаборатории генной зооинженерии по созданию трансгенных лабораторных моделей животных. Описано основные и перспективные направления развития деятельности лаборатории.

**Ключевые слова:** генная инженерия, трансгенез, рекомбинантная ДНК, трансгенные животные, сперматогональные стволовые клетки, трансплантация сперматогонии.

**Transgenesis through the spermatogonia stem cells in the animals and prospects of its application in Bilotserkiva NAU**  
**Syvyk A., Djachenko L., Syvyk T.**

Genetic modification and transgenesis are based on the technology of obtaining recombinant DNA based on. Transgenesis is an artificial transfer of a gene (or DNA fragment) from one organism to another. Genetic modification can occur when the DNA sequence in an organism is modified without the transfer of foreign genes.

Living organisms with artificially modified genome are called genetically modified (GM) or transgenic. Transgenic animals are created for the following main purposes:

- Basic biological research (rodents);
- Modeling of specific human disease for biomedical applications (rodents and large animals);
- In vivo production of therapeutic proteins;
- Enhancement of useful traits in agriculturally important animals.

The first transgenic animal (mouse) was obtained in 1981 as a result of the collaboration of several scientific laboratories in the United States.

Today there are several widely used methods of introducing of foreign DNA into the animal's genome, for the production of transgenic animals:

- microinjection method;
- the use of modified embryonic stem cells followed by the transfer of transformed into early embryo;

- use of spermatogonial stem cells and sperm as a vector for DNA transfer.

Microinjection of recombinant DNA into fertilized oocytes remains the most popular method of introduction of foreign genes into the genome of animals. This method requires highly qualified and experienced specialists, as well as expensive equipment and reagents. Another method to create a transgenic mice used today is transgenesis through modification of embryonic stem cells followed by introduction of modified cells into early donor embryo.

We emphasize that the methods described above have been well developed and are widely used today for the production of transgenic mice. Therefore, the market for transgenic mice is now sufficiently saturated. However, these methods are way less effective for rats and other species. The number of transgenic mice models is calculated by tens of thousands, while the number of available transgenic rats does not exceed 500 models. Rat, as a model, surpasses the mouse as it is closer to the human biology. The access to new and desired models of rats will give scientists in many research areas the opportunity to choose experimental animals that are closer to man.

According to "Marked and Marked" report "The rat model market is estimated at USD 358.5 Million in 2014 and is expected to reach USD 602.3 Million by 2020, growing at a CAGR (Combined Average Growth Rate) of 9.4% from 2015 to 2020".

Advancements in gene editing technologies such as CRISPR/Cas 9, TALEN, Zinc Finger Nucleases make generation of rats with some types of genetic modifications technically possible and economically reasonable.

Worldwide, the spermatogonia mediated transgenic technology is being developed at several academic institutions in the United States, Canada and Japan. Currently, commercial companies cannot use this technology because of its novelty and the absence of trained specialists in this field. Some steps utilized in this technology require specific knowledge, skills and experience. The proposed laboratory of genetic zoinengineering will be a biotechnological unit of the Bila Tserkva National Agrarian University for the production of genetically modified animals. It is assumed that the laboratory will be involved in:

1. Implementation of a reliable technological process for the production of transgenic model animals;
2. Proposition for the creation of genetically engineered animal models for use in scientific research by scientists of BNAU;
3. Having successful examples of the creation and use of models animals, the laboratory will offer services for the generation of transgenic model animals at the national and international levels;
4. Extension of the technology onto other species of animals, where generation of genetic modifications by traditional methods (oocyte or embryo manipulation) have not been developed, is not effective, or has an excessively high cost. Creating the first modification in guinea pig is a priority task;
5. Creation and supply of genetically modified guinea pigs of high commercial value for general use in fundamental study of infectious diseases, allergies, immunity and asthma;

In the future, the laboratory will aim on creation of genetically improved farm animals with increased productivity or resistance to diseases, as well as animals for the biological production of proteins of pharmacological significance.

The laboratory will become the first scientific-experimental unit in Ukraine to offer models of genetically engineered laboratory animals created by alternative and more effective transgenic technology.

**Key words:** genetic engineering, transgenesis, recombinant DNA, transgenic animals, spermatogonial stem cells, transplantation of spermatogonium.

*Надійшла 19.09.2017 р.*