

К ВОПРОСУ ОБ ИСТОРИИ КЛОНИРОВАНИЯ

И.А. МИНЕНКО*, Д.Г. СЕРДЮКОВ**

*Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова,
e-mail: kuz-inna@mail.ru;

** Российский государственный аграрный заочный университет, e-mail: dgs1959@mail.ru

Аннотация: клонирование в биологии – получение как бесполом естественным путем, включая вегетативное размножение, так и при помощи биотехнологических методов генетически тождественных организмов, клеток или молекул. В XXI веке, в условиях безудержного роста населения и обострения продовольственной проблемы, перед человечеством все острее и требовательнее встает задача создания в необходимом количестве живых организмов – растений и животных, с заранее определенными свойствами: невосприимчивых к болезням, колебаниям климата, высокой продуктивностью, плодовитостью, заданными вкусовыми, ароматическими, питательными и другими характеристиками. Бурное развитие молекулярной биологии привело к становлению принципиально нового направления в биотехнологии – геной и клеточной инженерии. Использование методов клонирования позволяет значительно сократить сроки получения принципиально новых свойств у селекционных сортов сельскохозяйственных растений и пород животных, штаммов микроорганизмов. Биоинженерия дает шанс человеку излечения от десятков болезней, считающихся до сих пор неизлечимыми, включая рак и старение организма, открывает новые горизонты в области регенеративной биомедицины – клонирование органов и тканей человека.

Ключевые слова: биотехнология, клонирование, стволовая клетка, ген.

TO THE QUESTION OF THE CLONING HISTORY

I.A. MINENKO*, D.G. SERDYUKOV**

*The first I.M.Sechenov moscow state medical university, e-mail: kuz-inna@mail.ru;

** Russian state agrarian correspondence university, e-mail: dgs1959@mail.ru

Abstract. Cloning in biology – cloning in biology is getting both asexually by natural means, including vegetative reproduction, and by means of biotechnological methods genetically identical organisms, cells or molecules. In the XXI century, in the conditions of the impetuous growth of the population and the food problem aggravation, humanity faces a growing and more demanding challenge of creating the necessary quantity of living organisms-plants and animals, with pre-defined properties: resistant to disease, climate fluctuations, high productivity, fertility, desired flavoring, aromatic, nourishing, and other characteristics. The rapid development of molecular biology has led to the formation of a principally new direction in biotechnology - genetic and cell engineering. The use of cloning techniques can significantly reduce the time of obtaining fundamentally new properties of breeding varieties of agricultural plants and breeds of animals and strains of microorganisms. Bioengineering gives a chance to cure disease, considered dozens of still incurable, including cancer and aging, opens new horizons in the field of regenerative biomedicine-cloning of human organs and tissues.

Key words: biotechnology, cloning, stem cell, gen.

Впервые термин «клон» по отношению к животным использовал в 1963 году шотландский биолог Джон Бёрдон Сандерсон Хоолдейн, говоря о возможности бесполого размножения лягушки. Однако и сейчас, спустя полвека в биологии не существует единого общепринятого научного определения понятия «клонирование».

В природе клонирование – достаточно распространенное явление и встречается у различных организмов. Тем не менее, понятие «клонирование» до недавнего времени употреблялось по отношению к фотосинтезирующим растениям (вегетативное размножение) и в микробиологии (например, к бактериям, у которых этот способ размножения является единственным). Клетки растений имеют способность сохранять в процессе развития (пройдя анатомическую дифференцировку) тотипотентность, т.е. способность генома клетки реализовать при определенных условиях имеющуюся у нее генетическую программу для построения и поддержания нового организма. Поэтому и клетки исходного организма-донора и клетки организма-клона имеют тождественный набор генов и могут в будущем различаться только фенотипически. Именно эта регенеративная способность живой растительной клетки и послужила основанием для плодотворной генетической и селекционной работы в растениеводстве. Но и у животных это явление встречается достаточно часто, например, при партеногенезе у насекомых и ракообразных - тлей, дафний, пчелиных трутней, или при специфической или спорадической полиэмбрионии, когда у животных происходит развитие более одного зародыша из одной зиготы.

Однако у эмбриональных стволовых клеток животных тканевая специфичность наблюдается с самых ранних стадий развития организма. В процессе морфогенеза, контролирующего целенаправленное пространственное распределение и дифференциацию этих клеток, часть клеточного генома репрессируется. Сформировавшиеся соматические клетки лишены тотипотентности, её можно обнаружить лишь у отдельных видов клеток кишечнорастных, наиболее древних и низкоорганизованных многоклеточных животных. Именно эта особенность соматических клеток и является в настоящее время главным барьером для искусственного клонирования животных.

Что же касается стволовых, то в зависимости от их возможностей к дифференцировке, выделяют тотипотентные, плюрипотентные и мультипотентные стволовые клетки. У многоклеточных животных по мере развития организма стволовые клетки проходят три этапа превращений. После оплодотворения яйцеклетки происходит её многократное дробление, что приводит к появлению тотипотентных стволовых клеток, способных до стадии 4-8 клеток сформировать целый организм и образовать любой тип тканей. Далее, в течение нескольких дней, в так называемый предимплантационный период развития, появляется «зачаток»- бластоциста, состоящая уже из 50 - 150 стволовых клеток. Из наружной части зачатка – трофобласта, формируется плацента, а внутренняя клеточная масса – эмбриобласт, превращается в эмбрион. Это - плюрипотентные стволовые клетки, они дают начало практически всем видам тканей, но уже не могут создать новый организм. Дальнейшее развитие организма приводит к появлению мультипотентных стволовых клеток, способных образовывать лишь строго определенные виды тканей. Последние два вида стволовых клеток также называют взрослыми стволовыми клетками.

Различают три типа клонирования: молекулярное, терапевтическое и репродуктивное. Молекулярное, включающее генетическое клонирование, представляет собой технологическое создание (клонирование) необходимого количества генетического материала (фрагментов генов, генов, молекул ДНК и т.д.) с помощью живых организмов. Для этого, обычно измененную, полинуклеотидную последовательность встраивают в геном бактериофага или плазмиду (вектор) и привносят в клетки прокариотов или эукариотов, которые затем выращивают в питательной среде в лабораторных условиях (*in vitro*). Размножаясь, эти клетки обеспечивают сохранение данного вектора и клонируют необходимую вставку последовательности нуклеотидов, в точности сохраняя ее структуру. Получаемые таким способом гибридные молекулы называются рекомбинантными. Метод молекулярного клонирования применяется для исследования биологических молекул и создания рекомбинантных биологических структур с заданными параметрами, клонирования тканей и других научных и производственных целей.

Под репродуктивным клонированием понимается бесполовая технология создания нового многоклеточного организма, с генотипом идентичным исходному организму. Главная цель терапевтического клонирования – получение культуры стволовых клеток, генетически идентичных клеткам донора, для разработки новых методик и терапии различных заболеваний.

Основы современной клеточной теории были заложены Теодором Шванном, выдающимся немецким гистологом и физиологом, опубликовавшим в 1839 году свой знаменитый труд «Микроскопическое исследование о сходстве в строении, росте животных и растений». В нем он сформулировал положение о том, что все ткани животных и растительных организмов состоят из клеток.

Термин "стволовая клетка" или «порождающая клетка» был впервые использован в 1909 году русским ученым-гистологом А.А. Максимовым на заседании Общества гематологов, проходившем в Берлине - так он назвал клетки крови во взрослом организме, в частности, «стволовые клетки крови», способные дать начало нескольким другим типам клеток.

В 1866 году в трудах Брюннского общества естествоиспытателей вышла статья Г. И. Менделя о результатах его почти семилетней работы по селекции растений (различных сортов гороха). Используя математические методы в анализе результатов скрещивания различных сортов, Г.И. Мендель сформулировал закономерности распределения невидимых, внутренних наследственных «факторов» или «единиц информации» в потомстве, заложив основы генетики, как новой научной дисциплины.

Собственно историю клонирования можно проследить с начала 80-х годов XIX в., когда многие ученые пытались выяснить, как работает генетический материал в клетках. Так, в 1882-83 гг. Август Вейсман, профессор Фрайбургского университета, один из основателей хромосомной теории наследственности, опубликовал статьи «О продолжительности жизни» и «О наследственности». Он предположил, что разделение клеток тела на зародышевые и соматические происходит в раннем эмбриогенезе, зачатковые клетки и клетки тела принципиально различны, а генетическая информация постепенно уменьшается при каждом делении клетки.

Одним из первых, кто предпринял попытки клонирования животных, был профессор-зоолог Московского Университета А.А. Тихомиров. Русский ученый, проводя опыты с шелкопрядами, открыл в 1886 г. явление искусственного партеногенеза: развитие неоплодотворенного яйца под влиянием химических и физических активаторов, заменяющих раздражение, которое вызывает сперматозоид при проникновении в яйцо. В качестве активаторов он использовал горячую воду, серную кислоту и электризацию трением. Однако развитие партеногенетических эмбрионов шелкопряда происходило с отклоне-

ниями от нормы и приводило к их гибели внутри грены. Тем не менее, это уже был первый шаг на пути к созданию клонированных животных.

В 1892 г. Г. Дриш, проводя опыты с эмбрионами амфибий и иглокожих, стал одним из первооткрывателей явления эмбриональной регуляции. Учитывая большой размер яиц, откладываемых земноводными, эти животные позднее стали основным объектом исследований ученых в экспериментах по клонированию. В то время биологи пытались разобраться, что происходит с генетическим материалом клетки во время ее деления. Как протекает этот процесс, продемонстрировал Г. Дриш в своих исследованиях с зародышами морских ежей. Сначала он произвел деление первого двухклеточного бластомераморского ежа на две отдельные клетки, затем подобные процедуры были проделаны с четырех и восьми клеточными эмбрионами. В процессе эксперимента некоторые отдельные клетки смогли развиваться в полноценные зародыши, превращавшиеся в дальнейшем в нормальные взрослые особи. Эта способность отдельного бластомера контролировать развитие целого организма была названа регуляционным развитием. Впоследствии многие ученые провели подобные эксперименты с разделением клеток эмбрионов, в том числе эксперименты по развитию круглых червей - нематод. В процессе проведенных исследований учеными было установлено, что информация о наследственности заключена в клеточном ядре, содержащим определенное количество хромосом. Это послужило толчком для начала целенаправленных работ с ядром клетки. Именно в этот период ученые переключили свое внимание с клеточного уровня на ядерный.

В 1902 г. два независимых исследователя У. Саттон (США) и Т. Бовери (Германия) выдвинули предположение, что «факторы» Менделя локализованы в хромосомах. В У. Саттон описывал поведение хромосом в процессе деления клетки как случайное. В 1902-1903 годах Уолтер Станборо Саттон объявил, что «факторы» Менделя локализованы именно в хромосомах. В 1909 году датчанин Вильгельм Йохансен нарекает «факторы» Менделя генами. В следующем году Томас Хант Морган определяет расположение различных генов мушки дрозофилы в хромосомах.

В 1918 г. немецкий эмбриолог Ганс Шпеманн, проводивший более 20 лет эксперименты с эмбриональными клетками тритона, обнаружил, что при искусственном разделении яйца земноводного обе части зародыша развиваются в нормальных животных. Используя петлю из человеческого волоса, он делил яйцеклетку тритона, находящуюся на ранних стадиях эмбриогенеза, на две части и из каждой половины развивался здоровый эмбрион земноводного. Опыты с эмбрионами саламандер показали, что потенциал развития у ядер не изменялся до 4 делений, т.е. до 16 клеток. Но на более поздних стадиях полноценных эмбрионов тритона получить таким образом не удавалось. Из этого Шпеманн заключил, что «план развития» каждой половины яйцеклетки определяется в этот начальный период. Опыт показал, что даже отдельные клетки содержат информацию, достаточную для формирования целого нового организма. Похожие эксперименты с 1928 по 1935 гг. проводил шведский биолог Свен Гёрстадиус. Он разделял разные слои ранних зародышей морского ежа и наблюдал их последующее развитие. В 1938 г. Г. Шпеманн, осуществивший до этого первые в мире опыты по пересадке зародышевых тканей, принадлежащими двум близкородственным видам тритона, предположил возможность пересадки в энуклеированную яйцеклетку ядра зрелой дифференцированной клетки, создав предпосылки для всех последующих исследований в области клеточного клонирования.

В 40-х годах прошлого века советский ученый-эмбриолог Г.В. Лопашов провел ряд экспериментов по трансплантации клеточных ядер в яйцеклетку земноводных. В 1948 г. он описал результаты своих исследований в большой статье и направил ее в «Журнал общей биологии», однако его работа так и не вышла в свет по причине начавшейся кампании против наиболее передового направления в биологии того времени – генетики. Однако краткая заметка Г.В. Лопашова «Пересадка компонентов ядер овоцитов в оплодотворенные яйца тритонов» все же была опубликована в 1945 г. в одном из сборников биологического отделения Академии Наук СССР.

В США аналогичные работы с земноводными проводились эмбриологами Т. Кингом и Р. Бриггсом из Института исследования раковых заболеваний. Они разработали микрохирургическую технологию трансплантации клеточного ядра с помощью тонкой стеклянной пипетки. В то время считалось, что ядро клетки, прошедшей дифференцировку, уже отработало заложенную программу и претерпевает необратимые изменения, т.е. безвозвратно теряет необходимую для нормального развития генетическую информацию. Поэтому источником генетического материала для исследований послужили клетки зародышей земноводных. Для клонирования первоначально из яйцеклетки леопардовой лягушки удалялось ядро, содержащее генетический материал и отвечающее за клеточное развитие. Следующий шаг - в лишенную ядра (энуклеированную) цитоплазму яйцеклетки амфибии помещали ядро эмбриональной клетки и подавали слабый электрический разряд. Было установлено, что если при пересадке клетка – ядерный донор, находился на стадии бластулы, то развитие 80 % головастиков происходило нормально. Но уже на следующей стадии – гастролы, показатель выживаемости резко снижался - до 20 - 40%. Попытки проведения подобных манипуляций с соматическими клетками головастиков на стадии почки хвоста не давали положительных результатов, что и показывало, по мнению ученых, утрату у них плюрипотентного потенциала.

В конце 50-х годов подобные опыты были проведены английским эмбриологом Д. Гордоном, получившим в 2012 г. Нобелевскую премию за работы в области получения и развития индуцированных стволовых клеток. Но принципиальным отличием от предыдущих исследований было использование клеточных ядер не эмбриональных, а эпителиальных клеток кишечника головастика южноафриканской гладкой шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). Ядро из яйцеклетки удалялось не с помощью хирургических манипуляций, а разрушалось воздействием ультрафиолетового излучения. Результаты были не столь впечатляющими, как у Т. Кинга и Р. Бриггса – большая часть реконструированных яйцеклеток не развивалась и погибала, лишь 1 % эмбрионов достигал стадии половозрелых особей. Но даже и в этих скромных результатах была вероятность ошибки, так как для пересадки случайно могли быть использованы ядра гоноцитов – первичных половых клеток, находящихся в эпителии кишечника головастика. Впоследствии Д. Гордон модернизировал свои опыты, применив метод ядерной серийной пересадки. Было установлено, что выживаемость эмбрионов может быть увеличена, если осуществлять последовательные трансплантации ядер из реконструированных яйцеклеток, находящихся еще на стадии бластулы во вновь энуклеированные половые клетки. Позднее, Д. Гордон использовал для пересадки ядра клеток тканей взрослых животных – кожного покрова, почки и легкого, выращенных в питательной среде (*in vitro*), также применяя метод серийной трансплантации ядра. И вновь, 25% яйцеклеток благополучно проходили стадию бластулы и развивались в полноценных, плавающих головастиков. Проведенные Д. Гордоном работы показали, что уже прошедшие дифференцировку клетки живого организма сохраняют в своих ядрах генетическую информацию, достаточную для воспроизводства исходного биологического объекта. Столь обнадеживающие результаты исследований, тем не менее, долгое время не признавались учеными, чему, впрочем, не стоит удивляться, так как и сам Д. Гордон в 1970 г. утверждал, что еще предстоит доказать, что соматические клетки могут сохранять гены, способные управлять эмбриогенезом.

У истоков клонирования животных стоял и китайский ученый Тонг Дизхоу, проводивший опыты по переносу генетического материала взрослой особи карпа в икринку, из которой благополучно развился малёк. Но об этих исследованиях долгое время мировой науке не было ничего известно, так как отчет о работе был опубликован в 1963 г. в малоизвестном научном журнале.

Как уже было сказано выше, неоспоримыми возможностями в клонировании обладают растения. В 1964 г. американский исследователь Ф. Стюард, профессор Корнелльского университета, опубликовал результаты оригинальных опытов по выращиванию целых растений из отдельных клеток корневища (флоэмы) моркови.

В 70-х годах более активно начали предприниматься шаги по клонированию млекопитающих – кроликов и мышей. В 1975 г. в журнале «Nature» Д. Бромхоллом были опубликованы результаты экспериментов с эмбрионами кроликов. Было показано, что полиплоидные клоны, получавшиеся в результате слияния женской гаметы с целой клеткой, взятой от эмбриона самой ранней стадии развития, проходили лишь несколько делений дробления. Лучшие результаты были достигнуты в исследованиях МакГрата и Солтера [7], модернизовавших методику и оборудование для пересадки клеточных ядер. В качестве экспериментальных клеток были использованы только зиготы: в энуклеированную клетку, лишенную пронуклеуса, подсаживали пронуклеусы с цитоплазмой и окружающей их частью мембраны, от второй зиготы. Процесс слияния мембран осуществлялся с помощью инактивированного вируса. В итоге около 90 % реконструированных зигот успешно достигали стадии морулы или бластоцисты. Однако пересаженные в энуклеированные зиготы мышей ядра 4-х и 8-ми клеточных эмбрионов уже не могли обеспечить развитие зародышей.

В 1983 г. в № 5 «Журнала общей биологии» появилась статья Слепцовой Л.А., Кочерга М.П., Дабаяна Н.В., Газаряна К.Г. «Трансплантация ядер в яйцеклетки костистых рыб (вьюн): анализ нормального развития и аномалий», с описанием усовершенствованной технологии пересадки генетического материала в неоплодотворенные яйцеклетки вьюна. Новая методика обеспечивала появление на свет более 60% генетически однородных здоровых мальков. Ядра клеток зародышей вносили в цитоплазму яйцеклеток в период формирования пронуклеуса, что предотвращало контакт трансплантированного ядра с женским пронуклеусом и объединение их хромосомных наборов и запускало процесс дробления и превращения яйцеклеток в личинки. Экспериментальным путем было определено оптимальное время для этой пересадки – 30-60 мин после оплодотворения и искусственной активации яйцеклетки (это время дегенерации пронуклеуса, что и предотвращает появление полиплоидных зародышей). Было установлено, что цитоплазма яйцеклетки воздействует на время прохождения пересаженным ядром фаз митотического цикла. При сближении трансплантированного ядра с женским пронуклеусом отмечалось их взаимодействие и увеличение длительности профазы первого деления дробления. Это деление происходило позже, чем в оплодотворенных икринках этой партии. Оптимальными для трансплантации фазами митотического цикла донорских ядер являлись поздняя интерфаза и профаза. Эти исследования также показали, что потеря ядром тотипотентности в процессе онтогенеза была связана не с утерей генов, а их репрессией.

В 1987 г. советскими учеными Л.М. Чайлахян, Б.Н. Вепринцевым, Т.А. Свиридовой, В.А. Никитиным в журнале «Биофизика» АН СССР были опубликованы результаты по применению метода электро-

стимулируемого слияния эмбриональных клеток млекопитающих – мышей-альбиносветetra-гибридов. Однако, как отмечали исследователи, яйцеклетки млекопитающих были значительно более чувствительны к микрохирургическим манипуляциям. Инъекционный способ введения кариопластов часто приводил к гибели клетки. Это связано с тем, что объемные размеры зиготы млекопитающих в несколько тысяч раз меньше, чем размеры зигот амфибий и рыб. И при проколе поверхностной мембраны микроинструментом для удаления и введения ядер зиготы млекопитающих получают значительно большее повреждение, что практически всегда приводит к гибели клетки млекопитающих из-за необратимого нарушения гомеостаза. Советскими учеными была разработана уникальная методика и изготовлено специальное оборудование для проведения этой операции. Экспериментальным путем было доказано, что при электростимулируемом слиянии клеток геном не повреждается. Об этом свидетельствовал факт полного и нормального эмбрионального развития мышей от зиготы до взрослых особей. Было высказано предположение об универсальности данного метода и возможности распространения его на другие клетки животного и растительного происхождения, так как явлению электрослияния должны быть подвержены все клеточные мембраны без исключения.

В 1972 г. американский биохимик Пол Нейм Берг, профессор Стэнфордского университета, создал методику химического соединения двух отдельных частей ДНК, получив первые синтезированные рекомбинантные молекулы ДНК. В последующем процесс получения генных цепей из молекул ДНК был усовершенствован и автоматизирован.

С начала 1980-х годов датский ученый С. Вилладсен проводит серию опытов по клонированию сельскохозяйственных животных. В 1984 г. ему удалось клонировать овцу, используя для пересадки в энуклеированный ооцит клеточное ядро зародыша, находящегося на стадии морулы. Чуть позже аналогичные эксперименты с ядрами 32-клеточных зародышей коров холстейнской породы приводят к появлению здоровых телят. Подобные успешные работы с сельскохозяйственными животными – коровами, свиньями, овцами, лошадьми в это время ведутся во многих научных центрах мира. Успех клонирования сельскохозяйственных животных в отличие от неудач с зародышами мышей, по всей видимости, связан с более ранней активацией генома эмбриона грызунов и потерей тотипотентности клеточным ядром. У них наблюдается более быстрый, на второй клеточной стадии, переход контроля за развитием организма от материнских матричных РНК, обеспечивающих синтез белков на ранних стадиях, к собственным мРНК. А у крупнорогатых животных транскрипция генов в эмбриогенезе происходит только на 8-16-клеточной стадии. Тем более что сам процесс замены РНК – MZT (maternal-zygotic transition), а точнее уничтожение материнских матричных РНК, происходит достаточно быстро.

В начале 1997 г. появилось сообщение от группы ученых во главе с Я. Вилмутом и К. Кэмпбеллом, сотрудников фирмы «PPL Therapeutics», коммерческой структуры института Розлина, г. Эдинбург, Шотландия о настоящем прорыве в эмбриологии: клонированию животных с использованием соматических клеток взрослых животных. Этот метод клонирования был назван впоследствии «ядерной передачей соматических клеток» (somatic cell nuclear transfer — SCNT). Значение этого достижения сложно переоценить, ведь в сельском хозяйстве использование технологии клонирования, в первую очередь, должно приводить к коммерческому тиражированию взрослых высокопродуктивных животных или к созданию геномодифицированных животных с заранее заданными свойствами. Однако все предыдущие исследования проводились с ядрами из донорских эмбриональных клеток, находящихся на стадии дробления. Поэтому проблема успешного клонирования взрослой особи заключалась в том, чтобы заставить яйцеклетку перепрограммировать генетическую программу соматического донорского ядра в эмбриональную. В этой работе Я. Вилмутом была использована методика, отработанная им в предыдущих исследованиях. Источником генетического материала для создания культуры клеток послужили замороженные образцы тканей вымени овцы породы финн дорсет, находившейся на последнем триместре беременности и уже умершей к моменту эксперимента. Все клетки в этих культурах содержали по 54 хромосомы, и состояли, помимо эмбриональных, из эпителиальных клеток молочной железы, клеток соединительной ткани (фибробласты) и миоэпителиальных клеток. Донорские клетки от этих тканевых культур использовались на разных сроках культивирования: клетки молочной железы – на 3-6 пассаже, клетки соединительной ткани – 4-6, эмбриональные – 7-9 пассаже. Выяснилось, что ядерная трансплантация в яйцеклетку, лишенные генетического материала, была эффективна, только когда тканевые клетки оставались в фазе G₀ периода клеточного роста. Поэтому ученые для синхронизации клеточных циклов ооцитов и клеток-доноров, последовательно, в течение 5 суток, изменяли состав в питательных средах, понижая концентрацию эмбриональной сыворотки (альфа-фетопrotein) с 10% до 0,5%. В опытах с клетками молочной железы было реконструировано 277 эмбрионов, которых культивировали как *in vitro*, так и в перевязанном яйцеводе овцы. В результате было получено 29 зародышей на ранних стадиях развития – морула и бластоциста, причем процент эмбрионов с нормальным развитием и в пробирке и в яйцеводе практически совпадал. В дальнейшем они были пересажены в матку овец-реципиентов, однако суягность закончилась рождением только одного ягненка, что показало крайне низкую, на тот момент, эффективность подобных опытов. Тем не менее, появления на свет ягненка показало, что в соматических клетках не происходит необратимой трансформации генетического материала

ла, который требуется для развития нормального эмбриона. Впоследствии эта овца, которую назвали Долли, родила шестерых здоровых ягнят: первого – в апреле 1998 г., двойню – в 1999 г. и чуть позже – ещё троих. Долли прожила 6,5 лет и была усыплена из-за заболеваний легких, вызванных ретровирусом JSRV и прогрессирующего артрита. Но, по всей видимости, причины этих болезней, как было установлено позднее, заключались в неправильном содержании, малоподвижном образе жизни и плохой наследственности, т.к. исходный образец – овца-донор, уже после биопсии, также умерла от рака. В 2007 г. ученые использовали именно этот замороженный донорский материал для получения ещё четырех овец, которые хорошо развивались и не имели признаков аналогичных заболеваний. В 1997 г. Я. Вилмутом была клонирована овца из клеток кожи с генетически вживленным в них человеческим геном. В конце 2012 г. в этой же лаборатории института Рослина появился на свет поросенок, созданный с использованием технологии «генетического редактирования». Суть метода заключается в коррекции генетического кода свиньи, состоящего из 3 млрд. звеньев, путем замены только одного из них. Химерному поросенку подсадили ген его африканских сородичей, позволяющий ему стать невосприимчивым к смертельному для свиней вирусу африканской чумы. Данный метод позволяет напрямую работать с оплодотворенной яйцеклеткой и, что также немало важно, эта технология показала хорошую результативность – 10-15%.

После рождения овцы Долли учеными были клонированы более двух десятков млекопитающих, в их числе были мыши, кошки, собаки, свиньи, коровы, козы и т.д. В 1997 г. Гавайском университете Р. Янагимач и произвел клонирование обыкновенной бурой домовый мыши из соматических клеток взрослых особей. Она дважды принесла потомство и умерла в мае 2000 г. В 2001 г. ученые из компании Advanced Cell Technology, Inc. произвели клонирование гаура (*Bos frontalis*), животное, находящееся на грани вымирания, что дало надежду человечеству на сохранения вымирающих видов животных. Однако он прожил всего двое суток после рождения. В этом же году в Техасском университете агрокультуры и машиностроения появилась на свет первая клонированная кошка, а спустя два года исследователи этого института впервые клонировали оленя и лошадь. В Германии были выведены коровы и овцы, в клетки которых был вживлен ген, отвечающий за наличие в их молоке сычужного фермента ренина (химозина). У жвачных данный вид белка вырабатывается в слизистой оболочке желудка железами сычуга. Именно он позволяет превращать белки молока в нерастворимый белок казеин при створаживании молока, что позволяет исключить из производства творога и сыра этап дорогостоящей переработки молока. Аналогичные успешные опыты по выведению трансгенных животных проведены учеными из РАСХН.

Начиная с 2002 г. были клонированы: в Китае – кролики, в Италии – лошадь, в США родился клонированный олень, в 2005 г. в Южной Корее в Национальном университете г. Сеула появился клон афганской борзой и вымирающего вида волка, в 2009 г. в ОАЭ родился клонированный верблюд с измененным ДНК, молоко которого можно применять для лечения ряда серьезных заболеваний человека, и т.д. В июне 2013 г. эстонским Центром развития технологий репродуктивной медицины был клонирован теленок с человеческим геном гормона роста. В скором будущем молоко этой коровы можно будет использовать в фармацевтических целях для получения соматотропина, одного из полипептидных гормонов передней доли гипофиза человека.

Опыты с обезьянами поначалу проходили крайне неудачно, и не одна сотня попыток создать клон не привела к успеху. Ученые из американского университета в г. Питтсбург первыми клонировали методом «овечки Долли» 135 эмбрионов обезьян. Пересаженные к 25 самкам макак зародыши не прижились, хотя и достигли стадии стволовых клеток. По мнению исследователей, при удалении генетического материала происходила частичная потеря цитоплазмы из яйцеклетки, несущей в себе активаторы развития оплодотворенного ооцита. Экспериментов по клонированию свиней проводилось немного, хотя, как известно, из всех животных свинья имеет наиболее близкие к человеку по размеру и строению внутренние органы. Но при трансплантации органов даже от человека к человеку непреодолимой остается проблема отторжения иммунной системой пересаженных чужих органов. Ответственность за это несет ген альфа-1,3-галактозилтрансфераза, производящий молекулы углеводов. При пересадке человеческие антитела прикрепляются к молекулам сахара, расположенным на поверхности чужеродных клеток и убивают эти клетки. Именно в этом направлении и сосредоточила свои усилия уже упомянутая шотландская биотехнологическая компания «PPL Therapeutics», которая в январе 2002 г. объявила о том, что в их научном центре родились пять клонированных поросят с органами, подходящими для пересадки человеку. Подобные разработки сейчас ведутся во многих лабораториях мира. В 2011 г. ученые из медицинского университета в г. Нанкин (Китай) заявили о готовности приступить в ближайшие 2-3 года к клиническим испытаниям по пересадке человеку органов генетически модифицированных свиней. На начальном этапе исследований будут использованы кожа и роговица свиней, а для пересадки печени, почек и сердца потребуется еще около пяти лет. Появилось сообщение о работах Р. Пратера, профессора Миссурийского университета (США), о клонировании миниатюрной свиньи, в клетках которой нет генов альфа-1,3-галактозилтрансфераза, отвечающих за отторжение чужеродных тканей и органы которой можно использовать для ксенотрансплантации человеку. Органы обычной свиньи, по мнению Р. Пратера, велики для пересадки человеку и если предварительные исследования окажутся удачными, то испытания на людях начнутся через три-пять лет.

Первое успешное клонирование эмбрионов из эпидермальных клеток кожи 9-летнего самца макаки резус было произведено в 2007 г. Исследования проводились в Орегонском национальном центре исследования приматов (США) под руководством Ш. Металипова. Учеными были созданы жизнеспособные зародыши приматов, из которых на эмбриональной стадии были извлечены стволовые клетки. В лабораторных условиях, *in vitro*, эти стволовые клетки прошли стадию дифференцировки и превратились в клетки сердца и нейроны мозга. Однако эмбриональная программа была неудачной, не смотря на то, что было имплантировано 77 эмбрионов обезьян.

В начале марта 2013 г. исследователи из Центра биологического развития RIKEN в г. Кобе (Япония) опубликовали отчет о своих исследованиях в области клонирования, которые, по словам руководителя этой группы ученых Т. Вакаяма, могут быть очень полезны для улучшения продуктивных характеристик сельскохозяйственных видов животных и сохранения и восстановления дикой природы. Пройдя, в общей сложности, через 25 пять этапов последовательного клонирования, ученые создали 581 мышь из биологического материала одной донорской мыши. За основу японскими исследователями была взята, уже ставшая классической, техника переноса ядер соматических клеток, которую отличают низкая производительность и невозможность получения потомства при повторном клонировании клона из клеток клона из-за аккумулялирующихся генетических аномалий. Подобные исследования, ранее проведенные на кошках, собаках, свиньях, крупном рогатом скоте показали, что полноценными, здоровыми могут быть только первые 2–3 поколения клонов. По мнению ученых, это связано с накоплением ошибок в гистонах, отвечающих за эпигенетическую регуляцию многих ядерных процессов. В ходе проведенного эксперимента Т. Вакаяма вырастил клонированные клетки, используя в методе SCNT ингибиторы деацетилазы гистонов – трихостатин А, что и позволило значительно повысить эффективность клонирования и многократно воспроизводить клоны без накопления геномных нарушений. Особенностью одного из удачно проведенных опытов Т. Вакаяма было использование тканей мышей, замороженных при температуре -20°C , что дает возможность говорить о реальных перспективах клонирования, например, шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*) или других давно вымерших животных, останки которых время от времени находят в вечной мерзлоте. С этой же целью эта группа ученых намерена в дальнейшем провести эксперименты по клонированию мышей из клеток шерсти и экскрементов, а это, возможно, позволит возродить многие исчезнувшие виды животных, чьи чучела или фрагменты (шерсть, перья, когти и т.д.) хранятся во многих музеях мира. Остается открытым вопрос – возможно ли применение данной методики для клонирования приматов и даже человека? Но, судя по заявлениям Т. Вакаямы, его научная группа не планирует в ближайшее время расширение круга исследований и сосредоточилась исключительно на работе с мышами.

Использование улучшенной и технологически упрощенной процедуры клонирования позволило ученым из Пекинского института геномики в марте 2012 г. получить потомство овец, у которых за счет добавленного гена, взятого у круглого червя *Caenorhabditis elegans*, происходит синтез в молоке омега-3 полиненасыщенных жиров. В августе 2013 г. голландский ученый М. Пост впервые в мире предложил для апробации кусок мяса, выращенный из стволовых клеток. На создание этого образца было потрачено более 3 месяцев работы и около 20 тыс. отдельных мышечных волокон. Мясо, по отзывам экспертов, было вполне съедобным, хотя и не достаточно сочным. По мнению ученых, мясо из стволовых клеток может поступить в продажу уже лет через 10–15, а цена может опуститься до 4,5–5 евро за кг. В июне 2013 г. эстонским Центром развития технологий репродуктивной медицины, Тартуским университетом и Аграрным университетом был клонирован теленок со вставленным в его геном человеческим геном гормона роста. В будущем из молока такой коровы в фармацевтических целях будут получать соматотропин, один из полипептидных гормонов передней доли гипофиза человека.

Применение метода терапевтического клонирования помогло в 2008 г. вылечить мышей с смоделированным тяжелым заболеванием центральной нервной системы. У подопытных животных были искусственно поражены нейроны, вырабатывающие дофамин, вследствие чего у них возникли проблемы с передвижением, аналогичные тем, которые существуют у людей с болезнью Паркинсона. Ученые из американского Мемориального центра лечения рака Слоан-Кеттеринг направили образцы соматических клеток, взятых из хвостов заболевших мышей 5–6 недельного возраста, в японский Центр биологии развития в г. Кобе, где команда исследователей во главе с Т. Вакаяма, провела терапевтическое клонирование, пересадив генетический материал из полученных клеток в безядерные яйцеклетки. После того, как последние развились до стадии бластоцисты, из них были извлечены стволовые клетки, которые пройдя направленную дифференцировку, превратились в нейроны, производящие дофамин. Полученные нервные клетки были подсажены заболевшим мышам и уже через 20 дней у них были зафиксированы первые признаки улучшения состояния. И хотя ученые заявили, что до лечения таким методом болезни Паркинсона еще далеко, тем не менее, они надеются применить эту методику для лечения других болезней животных и человека, учитывая минимальные риски отторжения трансплантатов.

В 2006 г. С. Яманака, профессор университета г. Киото, впервые получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки – IPS-клетки (induced pluripotent stem). Сравнивая гены, работающие в эм-

бриональных стволовых клетках и выключенные в соматических клетках, С. Яманака обнаружил в геноме человека гены, отвечающие за функционирование 24 регуляторных белков (факторов транскрипции), регулирующих экспрессию других генов. Далее, внедрив все эти гены стволовых клеток в хромосомную ДНК в клетки соединительной ткани (фибробласты), ученые начали их «выключать» один за другим, в результате чего и были обнаружены четыре гена, активное состояние которых обеспечивало превращение фибробластов в стволовые клетки: Oct4, Klf4, Sox2, с-Мус. Эти модифицированные клетки были названы С. Яманака индуцированными стволовыми клетками. Ему удалось получить из этих стволовых клеток клетки сердечной мышцы и нервные клетки, которые на 12-й день начали сокращаться. В 2008 г., пытаясь исключить онкоген с-Мус, он продолжил исследования с выявленными индукционными факторами, и смог сократить до двух число генов, отвечающих за превращение соматических клеток в стволовые. Позднее С. Яманака удалось перепрограммировать соматическую клетку в IPS-клетку даже без применения вирусных векторов.

Китайские ученые Ци Чжоу и Фэни Цен развили этот успех, получив потомство мышей из индуцированных стволовых клеток. Для перепрограммирования генома эмбрионального мышиног фибробласта и создания линии индуцированных стволовых клеток ими, так же как и С. Яманака, был применен вирусный метод переноса генов. Создав далее тетраплоидный эмбрион из эмбриональных клеток, они пересадили в него полученные индуцированные клетки. Полученный жизнеспособный эмбрион подсадили в матку мыши. Проведенные после рождения мышонка генетические исследования подтвердили его происхождение именно из индуцированных стволовых клеток. Всего было получено 27 мышат и почти у половины из них появилось здоровое потомство.

Интересными и перспективными для восстановления многих исчезнувших видов животного мира были опыты, проведенные учеными из Висконсинского университета (США), с применением технологии SCNT. В энуклированную яйцеклетку коровы пересаживали генетический материал – IPS-клетки(эмбриональные фибробласты), полученные из соматических клеток взрослых животных - как самой коровы, так и обезьяны, крысы, свиньи и овцы. В результате эксперимента появились здоровые химерные эмбрионы всех этих животных. Эта технология настолько эффективна и проста в исполнении и подходит для клонирования человека, что тут же возникли опасения в возможности ее применения в любых центрах, где оказываются услуги экстракорпорального оплодотворения человека. Дело в том, что применение IPS-клеток во многих странах на законодательном уровне не запрещено, что позволяет их использовать не только для лечения таких заболеваний, как болезни Альцгеймера или Паркинсона, но и применять их в репродуктивной медицине человека. Однако вопрос о клонировании человека остается предметом очень острой и серьезной общественной дискуссии. Технология клонирования человека в настоящее время теоретически уже разработана, но ее практическое осуществление сталкивается с огромным количеством юридических, этических и религиозных проблем. Поэтому на любые исследования, связанные с репродуктивным клонированием человека, во многих странах мира введен запрет. Такие запрещающие законы были приняты в Европе - в Австрии, Бельгии, Чехии, Дании, Финляндии, Франции, ФРГ, Италии, Швеции, Швейцарии, а также в Аргентине, Австралии, Бразилии, Японии, Канаде США и в ряде других стран. Россия не осталась в стороне от этого процесса и в 2002 г. был также введен пятилетний мораторий на опыты по клонированию человека. Позже, в 2010 г. был принят закон, продлевающий этот мораторий. При этом законом не запрещается использование биомедицинских клеточных технологий для клонирования животных, органов для трансплантации, а также клеток и организмов в научно-исследовательских целях. Поэтому в ряде стран Европы, США, Японии, Кореи и др. продолжают масштабные исследования в этой области. Из эмбриональных стволовых клеток в лабораторных условиях хуже получают клетки печени, поджелудочной железы, сердца, нервные клетки. В США на стадии клинических испытаний находятся исследования по использованию эмбриональных стволовых клеток в регенеративной терапии целого ряда заболеваний. В Японии принято решение о расширении государственной финансовой поддержки исследований в этой области медицины и до конца 2022 г. на эти цели будет выделено более 1,2 млрд. долларов. И сейчас в Японии впервые в мире начинаются эксперименты по пересадке людям органов, выращенных из стволовых клеток. У теряющих зрение пациентов будут взяты клетки кожи, из которых планируется получить многофункциональные стволовые клетки. Из них будет выращена здоровая ткань сетчатки. Летом 2014 г. японские ученые планируют пересадить выращенную из многофункциональных стволовых клеток сетчатку глазу больному макулодистрофией. Разрешение на проведение клинических испытаний было получено от министерства здравоохранения, труда и благосостояния Японии.

К сожалению, в России, в области фундаментальных научных исследований сложилась диаметрально противоположная картина. С одной стороны, великолепная научная школа, с другой - малобюджетное финансирование, отсутствие собственной промышленности для производства необходимого оборудования и расходных материалов для исследований. Многие ученые, как молодые, так и уже вполне состоявшиеся, вынуждены уезжать за границу для продолжения своих исследований, где для этого специально создаются благоприятные условия. Поэтому для России все еще остается открытым вопрос - будет ли она интенсивно развивать это, одно из наиболее перспективных направлений современной науки о живых организмах -

биотехнологию, в том числе и клонирование, что в итоге приведет к решению задачи самостоятельного продовольственного обеспечения страны и одновременно позволит существенно улучшить здоровье нации или же останется на обочине научного прогресса и будет догонять или покупать результаты научных достижений у наиболее дальновидных государств мира?

Литература

1. Чайлахян Л.М., Вепринцев Б.Н., Свиридова Т.А., Никитин В. А. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии // Биофизика. 1987. Т. 32. № 5. С. 874-887.
2. Briggs R., King T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. 1952. 39. P. 455-463.
3. Bromhall J.D. Nuclear transplantation in the rabbit egg // Nature. 1975. . 258. P. 719-722.
4. McGrath J., Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion // Science. 1983. V. 220. P. 1300-1302.
5. Prather R.S., Sims M.M., First N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos // Biol. Repord. 1989, V. 41. P. 414-418.
6. Robl J.M., Prather R., Barnes F., Eyestone W., Northey D., Gilligan B., First N.L. Nuclear Transplantation in Bovine Embryos. Journal of Animal Science. 1987. V. 64. P. 642-647.
7. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. Science, 1983, Vol. 220, p. 1300-1302.

References

1. Chaylakhyan LM, Veprintsev BN, Sviridova TA, Nikitin V. A. Elektrostimuliruemoe sliyanie kletok v kletochnoy inzhenerii. Biofizika. 1987;32(5):874-87. Russian.
2. Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. 1952;39:455-63.
3. Bromhall JD. Nuclear transplantation in the rabbit egg, Nature. 1975;258:719-22.
4. McGrath J, Solter D Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion, Science. 1983;220:1300-2.
5. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. Biol. Repogd. 1989;41:414-8. Russian
6. Robl JM, Prather R, Barnes F, Eyestone W, Northey D, Gilligan B, First NL. Nuclear Transplantation in Bovine Embryos. Journal of Animal Science. 1987;64:642-7.
7. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. Science. 1983; 220:1300-2.