

# Клонирование млекопитающих

**Л.С.Бочарова,**

кандидат биологических наук

**Т.А.Чайлахян,**

доктор биологических наук,

член-корреспондент РАН

**Л.М.Чайлахян,**

Институт теоретической

и экспериментальной

биофизики РАН,

г. Пущино

Художник Г. Гончаров



Проблема клонирования млекопитающих — одна из самых горячих точек современной биологии и биотехнологии. После того как в эксперименте Вилмута и сотрудников появилась на свет овечка Долли, стало очевидно, что ядра клеток взрослых животных (а не только эмбрионов) могут быть репрограммированы при пересадке их в яйцеклетку, лишенную собственного ядра, и что полученные таким образом эмбрионы способны развиваться, превращаясь во взрослую особь. Принципиальная возможность применения этих сенсационных достиже-

Таблица 1

## Клонирование сельскохозяйственных животных

Животное	Клетки — доноры ядер	Количество реконструированных зигот	Число зародышей, достигших стадии морулы и бластоцисты	Число новорожденных
Овца	Клетки молочной железы	277	29 (10,4%)	1(0,36%) Долли
	Эпителиальные клетки	1000	235 (23,5%)	18 (1,8%)
	Фибробласты из ткани плода	676	116 (17,2%)	9 (1,3%)
Корова	Фолликулярный эпителий	562	358 (63,7%)	10(1,8%)
	Фибробласты	512	138 (27%)	8 (1,5%)
	Миоциты	346	73 (21%)	4 (1,15%)
Коза	Ткани трансгенного плода	127	70 (55%)	3(2,3%) в молоке антитромбин человека



## ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

имплантации в стенку матки. Многие эмбрионы погибают и на более поздних стадиях, в постимплантационный период. Живыми рождаются лишь единицы, не более 1–2%. Если сравнить это с исследованиями на лабораторных животных, то, к примеру, у мышей ситуация еще хуже (таблица 2). Процент зародышей, развивающихся до морулы и бластоцисты у мышей примерно такой же, как у сельскохозяйственных животных (от 18 до 56%), однако рождаемость живых мышат составляет малые доли процента. И только в экспериментах, где донорами ядер были эмбриональные стволовые клетки (то есть недифференцированные клетки, родоначальники обновляющихся тканей), рождаемость достигала 1,2%.

Таким образом, пока что главный итог исследований — это констатация факта: методики клонирования несовершенны, выход удачных случаев чрезвычайно мал. Совершенно очевидно, что с таким выходом не может быть и речи о реальном использовании клонирования для достижения практических целей. Поэтому главная дальнейшая задача — разработать более эффективные технологии.

К настоящему времени накоплен большой опыт по оптимизации условий пересадки ядер соматических клеток в яйцеклетки (ооциты). Чтобы получился жизнеспособный зародыш, донорское ядро, взятое из специализированной клетки взрослого животного, должно перейти из дифференцированного состояния в тотипотентное (как, например, в случае овечки Долли — ядро клетки, взятой из молочной железы взрослой овцы, потеряло свою «узкую специализацию» и поэтому смогло дать начало всем клеткам и тканям клонированного ягненка). Этот процесс и сопряженные с ним структурные и функциональные изменения называют, как правило, «репрограммирование» ядра. После репрограммирования ядро соматической клетки способно заместить ядро зиготы, с дробления которой начинается развитие зародыша.

Что же происходит при репрограммировании, как начинается взаимодействие яйцеклетки с «чужим» ядром? Сначала разрушается оболочка ядра

ний к человеку вызвала ажиотаж у мировой общественности. Восторги, протесты, зловещие предсказания зазвучали по радио и телевидению, заполнили бумажные и электронные носители информации.

Действительно, основания для бурных эмоций есть: нетрудно догадаться, какие фантастические перспективы может открыть клонирование для животноводства, медицины и для человечества в целом. Однако в этой статье мы не будем говорить ни о клонах элитных пород животных, ни о сохранении клонов исчезающих видов, ни об использовании клонированных клеток в терапевтических целях, ни о самом волнующем — о репродуктивном клонировании человека. Обо всем этом уже много написано и сказано.

Мы рассмотрим подробнее те практические трудности, с которыми встречаются специалисты при клонировании взрослых млекопитающих. Ведь пока эти проблемы не решены, фантастические перспективы так и останутся фантастикой.

Сегодня, когда прошло четыре года с момента публикации Вилмута и соавторов, интенсивные исследования по клонированию сельскохозяйственных и лабораторных животных уже позволяют сделать некоторые выводы. Наибольшие успехи достигнуты в экспериментах на сельскохозяйственных животных (таблица 1). Из таблицы видно, что до стадии морулы и бластулы развивается всего от 10 до 60% зародышей — другими словами, имеет место массовая гибель эмбрионов еще до

Таблица 2

## Клонирование мыши

Клетки — доноры ядра	Количество реконструированных зигот	Число зародышей, достигших стадии морулы и бластоцисты	Количество плодов	Количество живых новорожденных	
Кумулюсные клетки	2468	1385 (56%)	16	7(0,28%)	
Фолликулярный эпителий	468	183 (39%)	4	0 (0%)	
Фибробласты	717	274 (38%)	3	1 (0,14%)	
Линии эмбриональных стволовых клеток	E-14 129/о/a	1767	323 (18,2%)	5	1 (0,05%)
	R-1 129/ср(F1)	1087	312 (28,7%)	26	13 (1,2%)
	T-2	1014	268 (26,4%)	0	0 (0%)
	C 57 BU/CBA F1				

Чтобы клетка-предшественник — оогоний дала начало ооциту — яйцеклетке, она претерпевает особое деление, мейоз. Деление останавливается на метафазе II до встречи яйцеклетки со сперматозоидом, а после оплодотворения (но ДО слияния ядер) мейоз завершается



## ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

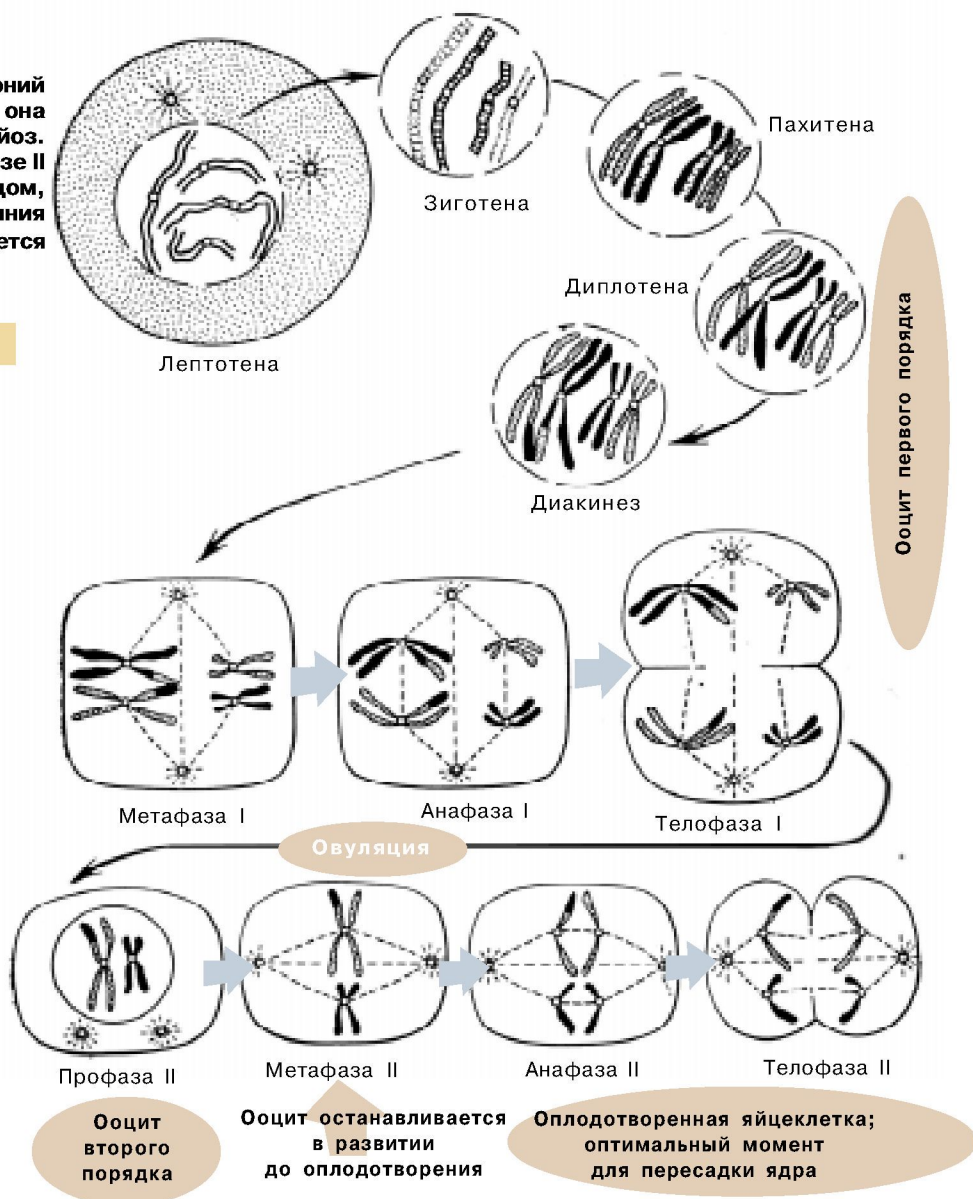
(так же, как это происходит перед делением обычной клетки), конденсируется хроматин — нити ДНК и связанные с ними белки укладываются в компактную структуру. После активации яйцеклетки хроматин вновь деконденсируется, формируется новая ядерная оболочка, ядро увеличивается в размере.

Установлено, что активность процесса репрограммирования ядра зависит от того, на какой стадии клеточного цикла находится ооцит — реципиент: оптимальный период — между метафазой II и телофазой II. (Напомним, что половые клетки млекопитающих формируются в результате мейоза — двух последовательных делений, причем в будущей половой клетке становится вдвое меньше хромосом, нормальное для данного вида число хромосом восстанавливается при слиянии мужской и женской половых клеток.) Кроме того, уже ясно, что ядро лучше пересаживать в ооцит не слишком поздно, за несколько часов до его активации. Таким образом, время, когда ооцит пригоден для пересадки ядра, жестко ограничено.

Существенной оказалась и фаза клеточного цикла донорского ядра. Установлено, в том числе и в работах, выполненных в нашей лаборатории, что лучше всего использовать ядра покоящихся клеток, на фазе  $G_0/G_1$  (то есть таких клеток, которые не делятся и не собираются делиться). Эти условия были соблюдены и в знаменитой работе Вилмута с соавторами: яйцеклетки находились на стадии метафазы II, а клетки молочной железы, росшие в культуре, — на стадии  $G_0$ .

Однако, как видно из таблиц, даже опыты, проведенные с соблюдением условий, благоприятствующих процессу репрограммирования, все равно дают очень низкий выход.

В чем же причины столь массовой гибели реконструированных зародышей? Пока это неизвестно, можно лишь делать предположения. Не исключено, что в геноме соматической клетки происходят какие-то необратимые изменения. Возможно, репрограммирование ядра соматической клетки в цитоплазме яйцеклетки в большинстве случаев осуществляется не полностью. Гибель зародышей на разных сроках их



жизни, очевидно, связана с нарушениями развития: при имплантации, формировании плаценты, при закладке органов (известно, что у всех клонированных зародышей наблюдается диспропорция между размерами тела и размерами плаценты). Может быть, до и после имплантации реконструированного эмбриона остается выключенной та или иная группа генов, которая в норме включается. Кроме того, нужно учесть и фактор гетероплазии: митохондрии клонированного организма принадлежат яйцеклетке, а в клетках организма, у которого взято ядро, митохондрии были другими, так что в принципе здесь возможно губительное несоответствие. (О митохондриях — клеточных «энергетических станциях», которые обладают собственной ДНК и размножаются делением внутри одной клетки, «Химия и жизнь» писала не раз.) Наконец, свою роль может играть и возраст клонированного животного: укорочение теломерной ДНК соматических клеток, которое происходит в те-

чение жизни любого организма, теоретически вполне способно снизить выживаемость зародышей.

В нашей лаборатории впервые было показано, что на самых первых стадиях развития эмбриона может включаться программа апоптоза — гибели клеток. И мы в своей дальнейшей работе намерены специально обратить внимание на то, как это происходит и происходит ли в реконструированных зародышах. По результатам этой работы можно будет ответить на вопрос: не заключается ли причина сверхвысокой летальности клонированных эмбрионов в очень высокой вероятности переключения их генома на реализацию программы апоптоза. Это может происходить в результате действия многих неблагоприятных факторов или же по причине неполного репрограммирования ядер соматических клеток. Понятно одно: только после детального анализа причин и механизмов гибели эмбрионов можно будет проводить целенаправленную работу по повышению эффективности клонирования.