

THE ANIMAL CLONING

L. I. KOROCHKIN

A problem of animal cloning and some difficulties, which appeared during decision of this problem are analyzed. The success of embryology and genetics in this field is shown.

В статье кратко рассматриваются история клонирования животных, сложности этой проблемы, а также успехи, достигнутые в этой области эмбриологами и генетиками.

КЛОНИРОВАНИЕ ЖИВОТНЫХ

Л. И. КОРОЧКИН

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Проблема клонирования животных приобрела в последнее время не только научное, но и социальное звучание, поэтому она широко освещается в средствах массовой информации, зачастую некомпетентными людьми и с непониманием сути проблемы. В связи с этим возникает необходимость объективно осветить подлинное положение дел.

Прежде всего договоримся о том, что следует понимать под клонированием животных и что такое клон. По принятому в науке определению, клонирование является точным воспроизведением того или иного живого объекта в каком-то количестве копий. Вполне естественно, что все эти копии должны обладать идентичной наследственной информацией, то есть нести идентичный набор генов. Для генетиков растений получение клонов не составляет никаких проблем. В некоторых случаях и у животных получение клона не вызывает удивления и является рутинной процедурой, хотя и не такой уж простой. Генетики получают подобные клоны, когда используемые ими объекты размножаются посредством партеногенеза, то есть бесполом путем, без предшествующего оплодотворения. Естественно, те особи, которые будут развиваться из потомков той или иной исходной половой клетки, будут в генетическом отношении одинаковыми и могут составить клон. У нас в стране блестящие работы по клонированию выполняет на шелкопряде с помощью разработанной им специальной методики академик В.А. Струнников. Выведенные им клоны шелкопряда известны на весь мир. Он, однако, продемонстрировал и то, что члены одного клона могут сильно отличаться друг от друга и обнаруживают значительное разнообразие по многим количественным признакам: величине, продуктивности и плодовитости. В некоторых клонах это разнообразие бывает большим, чем в генетически разнообразных популяциях.

Получают клоны и в экспериментальной эмбриологии. Если зародыша морского ежа на стадии раннего дробления искусственно разделить на составляющие его клетки – бластомеры, то из каждого разовьется целый организм. В ходе последующего развития зародышевые клетки теряют эту замечательную способность и становятся все более специализированными. У многих объектов можно также использовать ядра так называемых стволовых эмбриональных клеток от какого-нибудь конкретного раннего эмбриона, которые еще не являются очень специализированными (таковым будет их потомство). Эти ядра пересаживают в яйцеклетки, из которых

удалено собственное ядро, и такие яйцеклетки, развиваясь в новые организмы, опять-таки могут образовать клон генетически идентичных животных. У человека известны случаи своеобразного естественного клонирования — это так называемые однояйцевые близнецы, которые возникают благодаря редко встречающемуся естественному разделению оплодотворенной яйцеклетки на два отделяющихся друг от друга и в последующем самостоятельно развивающихся blastomeres. Такие монозиготные близнецы очень похожи друг на друга, но неидентичны. Однако в настоящее время речь идет о клонировании другого рода, а именно о получении точных копий того или иного взрослого животного, отличающегося какими-то выдающимися качествами (например, рекордными надоями молока, высоким настригом шерсти и т.д.), или человека, особо ценного для человечества из-за его, например, гениальности. Тут не все так просто, как порой пытается представить пресса.

История клонирования начинается в далекие 40-е годы, когда российский эмбриолог (ныне Заслуженный Соросовский профессор) Георгий Викторович Лопашов разработал метод пересадки (трансплантации) ядер в яйцеклетку лягушки. В июне 1948 года он отправил в “Журнал общей биологии” статью, написанную по материалам собственных экспериментов. Однако на беду Г.В. Лопашова в августе 1948 года состоялась печально известная сессия ВАСХНИЛ, утвердившая по воле коммунистических вождей беспредельное господство в биологии малограмотного агронома Т.Д. Лысенко, и набор статьи Г.В. Лопашова, принятой к печати, был рассыпан, потому что она доказывала ведущую роль ядра и содержащихся в нем хромосом в индивидуальном развитии организмов. Работу Г.В. Лопашова

забыли, а в 50-е годы американские эмбриологи Бриггс и Кинг выполнили сходные опыты, и приоритет достался им, как это часто случалось в истории российской науки.

В дальнейшем Джон Гердон из Великобритании усовершенствовал методику и стал удалять из яйцеклетки лягушки собственное ядро и трансплантировать в нее разные ядра, выделенные из специализированных клеток. В дальнейшем он начал пересаживать ядра из клеток взрослого организма, в частности из эпителия (покровные клетки) кишечника. Более того, Дж. Гердон добился того, чтобы яйцеклетки с чужим ядром развивались и в определенном количестве случаев до достаточно поздних стадий. И вот 1–2% особей проходили стадию метаморфоза и превращались во взрослых лягушек (на рис. 1 можно проследить, как это делалось). Впрочем, на фотографии таких лягушек (рис. 2) видно, что они не без дефектов, да и выглядят более хилыми по сравнению со своим “родителем”, так что даже в этом случае едва ли можно говорить об абсолютно точном копировании.

Тем не менее вокруг достижений английского ученого поднялся большой шум. Вот тогда и заговорили о клонировании млекопитающих и человека: если можно клонировать лягушку, почему бы не попробовать сделать то же на других объектах. Появились научно-фантастические рассказы о человеческих клонах, творящих то добро, то зло, используемых то тупыми солдафонами, то недальновидными политиками. Снимали и кинофильмы по этому поводу.

Возникли и социальные аспекты проблемы, с которыми мне впервые довелось соприкоснуться в 1973 году на очередном Международном генетическом конгрессе в Беркли (США), в котором я участвовал в составе советской делегации, достаточно



Пионер метода трансплантации ядер Георгий Викторович Лопашов



Выдающийся английский эмбриолог Джон Гердон (справа), усовершенствовавший метод трансплантации ядер

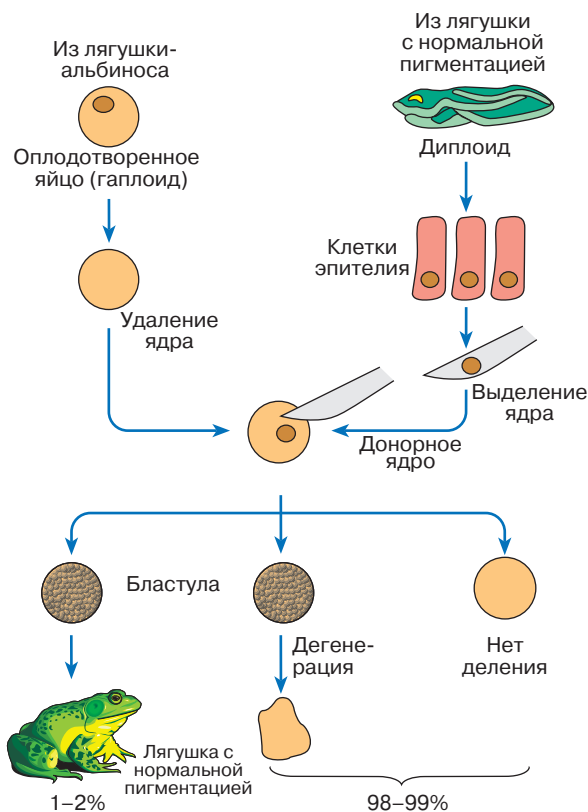


Рис. 1. Сокращенная схема (выпущены серийные трансплантации ядер) получения клонированной лягушки

представительной по тем временам. Приехали мы под утро, кое-как наскоро позавтракали и отправились на торжественное открытие конгресса. Каково же было наше удивление, когда вместо организаторов нас встретило плотное оцепление из дюжих полицейских, вооруженных автоматами. Что же случилось? Оказывается, студенты университета прослышали, что на конгрессе будут обсуждать проблему клонирования и решили пригрозить генетикам, которые, как они почему-то считали, собираются клонировать Ленина, Гитлера, Сталина и подобных им преступников. В университетском городке шли митинги, демонстрации протеста, ораторы клеймили позором участников научного форума, распространяли листовки. Над конгрессом сгустились тучи студенческого гнева, возникла угроза его срыва. Организаторы не на шутку перепугались, писали в газетах, выступали по телевидению, пытались объяснить не в меру разгоряченной молодежи, что речь идет не о клонировании людей, а всего лишь о возможности копировать хозяйственно-полезных животных, например коров. Закончилось все благополучно — американские студенты оказались людьми благоразумными, угомонились и в конце концов пригласили всех участников конгресса на пикник,

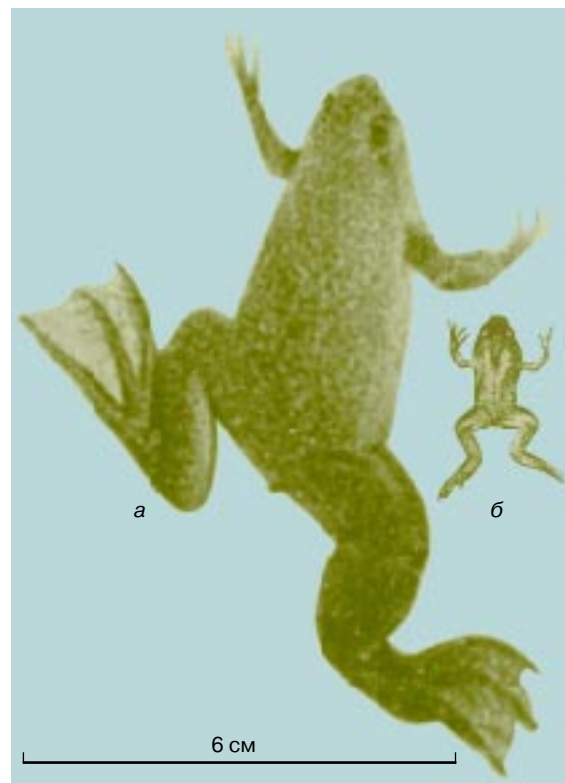


Рис. 2. а – лягушка – донор ядер; б – одна из клонированных лягушек (для трансплантации были использованы ядра, выделенные из клеток плавательной перепонки донора)

где шли мирные беседы с дружескими объятиями. А на конгрессе между тем было отмечено, что проблема клонирования вовсе не так проста, как первоначально думали, имеется множество подводных камней и рано строить рассчитанные под клон коровники.

Проблемой клонирования животных заинтересовались и в России: программа “Клонирование млекопитающих” стояла в плане совместной работы двух лабораторий — моей и академика Д.К. Беляева, обратившего внимание на идею клонирования и поддерживавшего исследования в этой области. В 1974 году я даже выступал с докладом на сессии ВАСХНИЛ, опубликованным в книге “Генетическая теория отбора, подбора и методов разведения животных” (Новосибирск: Наука, 1976), и сообщавшим, что “в настоящее время ставится задача получения клона млекопитающих”, и с преждевременным оптимизмом заключающим, что задача эта очень сложная, но принципиально разрешимая. Наши начинания первоначально неплохо финансировались, но вскоре государство потеряло к ним интерес. Основным выводом, сделанным нами на основе тех результатов, которые мы успели получить, явилось признание бесперспективности трансплантации ядер при попытках получить клон

млекопитающих. Эта операция оказалась слишком травматичной, предпочтительнее было применить метод соматической гибридизации, то есть перенос чужеродного ядра с помощью слияния яйцеклетки с соматической клеткой, ядро которой требовалось поместить в яйцеклетку. Именно такой подход использовал впоследствии Ян Вильмут при получении овечки Долли. Кстати, его сотрудник посещал Новосибирский институт цитологии и генетики АН СССР и беседовал с сотрудниками, когда-то занимавшимися проблемой клонирования (это не значит, конечно, что он непременно воспользовался их идеями).

В конце 70-х годов американец швейцарского происхождения Карл Иллменсе опубликовал статью, из которой следовало, что ему удалось получить клон из трех мышек. И вновь клональный бум вытеснил все остальные научные новости, вновь зазвучали фанфары, возвещавшие об осуществлении вековой мечты человечества о бессмертии, достижимом, впрочем, своеобразным способом — через искусственное производство себе подобных копий. Горечь разочарования не заставила себя ждать: в научной среде поползли слухи о том, что в опытах Иллменсе что-то нечисто, что их никому (даже самым искусным экспериментатором) не удастся воспроизвести. В конце концов была создана авторитетная комиссия, поставившая на работе Иллменсе крест, признав ее недостоверной. Таким образом, по самой проблеме был нанесен весьма болезненный удар и поставлена под сомнение ее разрешимость. На какое-то время воцарилось спокойствие. И вдруг как гром с ясного неба — овечка Долли!

Что же произошло? В феврале 1997 года появилось сообщение, что в лаборатории Яна Вильмута в Рослинском институте (Эдинбург, Шотландия) разработали эффективный метод клонирования млекопитающих и на основе его использования получили овечку Долли (схема экспериментов представлена

на рис. 3 и 4). Прежде всего, естественно, необходимо было выделить ооциты (яйцеклетки). Их извлекли из овец породы Шотландская черномордая, поместили в искусственную питательную среду с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37°C и провели операцию энуклеации (удаление собственного ядра). После этого возникла задача обеспечения яйцеклетки генетической информацией от организма, который надлежало клонировать. Для этой цели использовали разные клетки донора, но наиболее удобными оказались диплоидные клетки молочной железы взрослой *беременной* овцы породы Финский дорсет. Эти клетки выводили из стадии роста клеточного цикла, разбавляя сыворотку, и через пять дней сливали с энуклеированным ооцитом. Последний затем активировали к развитию посредством электрического удара. Развивающийся зародыш культивировали в течение 6 дней в искусственной химической среде или яйцеводе овцы, перетянутом лигатурой ближе к рожу матки. На стадии морулы или бластоцисты эмбрионы (от одного до трех) трансплантировали в матку приемной матери, где они могли развиваться до рождения.

Из 236 опытов успех сопутствовал лишь одному, в результате которого и родилась овечка Долли, содержащая генетический материал взрослой овцы, умершей три года назад. Авторы использовали некоторые методы, чтобы сопоставить геном овец-доноров и реципиентов, в частности метод определения так называемых микросателлитных последовательностей ДНК, который позволяет идентифицировать личность объекта наподобие отпечатков пальцев, хотя и с гораздо меньшей степенью точности. После этого Вильмут заявил, что технически возможно осуществить и клонирование человека, но в этом случае возникают моральные, этические и юридические проблемы, связанные с манипуляциями над эмбрионами человека. Недавно пришло сообщение из Японии о том, что там пытаются клонировать

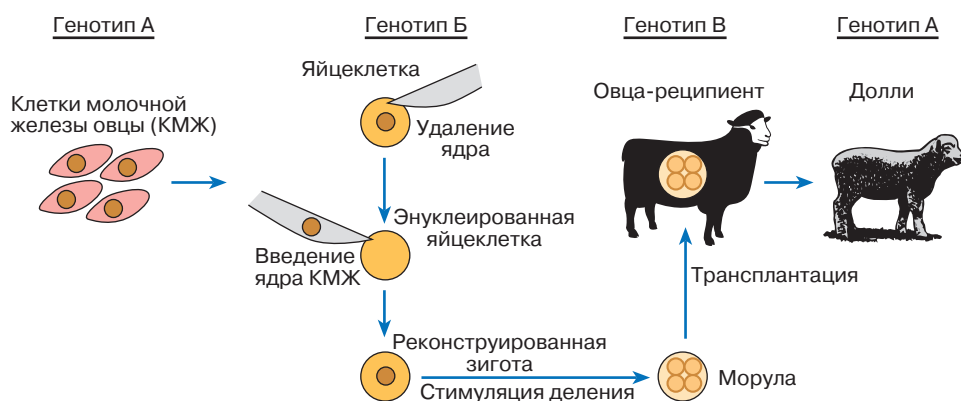


Рис. 3. Принцип получения клона млекопитающих, использованный в опытах Яна Вильмута. Цитоплазма яйцеклетки и клетки донора окрашены в разный цвет

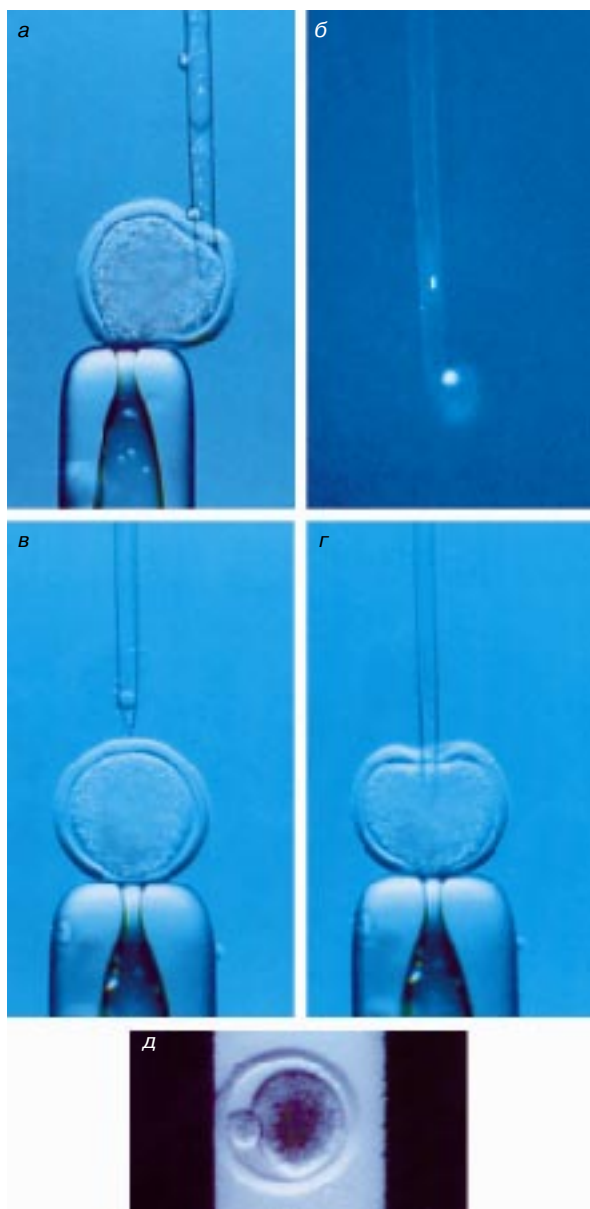


Рис. 4. Ранние этапы опытов по получению клонированной овцы: удаление собственного ядра и слияние энуклеированной яйцеклетки с соматической клеткой: а – удаление ядра из яйцеклетки с помощью тонкой стеклянной микропипетки; б – контроль успеха энуклеации: ДНК удаленного ядра светится в ультрафиолете и, следовательно, ядро удалено из яйцеклетки; в – стеклянная микропипетка с соматической клеткой подводится к яйцеклетке; г – перенос соматической клетки с ее ядром в яйцеклетку; д – электрослияние яйцеклетки и соматической клетки

коров по методу Вильмута, и уже родились два клонированных теленка. Отмечается, однако, что телята родились очень ослабленными, и неизвестно, выживут ли они.

Перед биологией, казалось бы, открылись новые заманчивые перспективы. Снова стали задумываться над глобальными проектами, всерьез обсуждать этическую сторону проблемы, а наиболее предприимчивые “организаторы науки” наперебой бросились доставать деньги под это дело. И вот уже высокопоставленные чиновники из Комитета по геополитике Государственной думы ничтоже сумняшеся торжественно провозглашают, что будут финансировать работы, в результате которых уже через два года будут клонированы животные и человек. Почему-то никто не обратил внимания на то, что у Вильмута процент выхода рожденных животных был ничтожно мал – всего одна овечка из 236 попыток. А что с остальными? Уроды, погибли? И где же, собственно, клон, предполагающий *множество* копий? И достаточно ли чисто проведены эксперименты?

В одном из январских номеров авторитетного журнала “Science” появилось сообщение д-ра Витторио Сгарамелла из Университета Калабрия (Италия) и д-ра Нортон Зайндера из знаменитого Рокфеллеровского университета (США), в котором авторы обвиняют Вильмута и его коллег в подтасовке и фальсификации результатов их экспериментов по клонированию млекопитающих. Они считают, что не представлено убедительных доказательств того, что Долли – продукт клонирования. Кроме того, оказалось, что три ведущие в данной области лаборатории пытались воспроизвести результаты опытов Вильмута, но безуспешно. Авторы статьи в “Science” указывают и на возможный источник ошибки шотландских эмбриологов. Дело в том, что овца, у которой брали соматические клетки для Долли, была беременна. А известно, что фетальные клетки (клетки зародыша) у некоторых животных могут попасть в систему циркуляции (кровооток). Вильмут признал, что совершенно упустил из виду это обстоятельство и не исключил возможности такого рода просчета в своих экспериментах. Недавно точными молекулярно-генетическими исследованиями было доказано, что Долли является клонированной овечкой и, следовательно, выдвинутые возражения можно считать опровергнутыми. Многочисленные сообщения вроде того, что в Японии уже получили клон человека или что где-то бродят стада клонированных коров, являются либо ошибочными, либо сознательной мистификацией. Во всяком случае в серьезной научной литературе подтверждения подобных сообщений отсутствуют.

Потому-то особый интерес вызывают опыты группы ученых из университета в Гонулулу во главе с Риузо Янагимачи. Авторам удалось усовершенствовать метод Вильмута, они отказались от электрической стимуляции слияния донорской соматической клетки с яйцеклеткой и изобрели такую микропипетку, с помощью которой можно было безболезненно извлечь ядро из соматической клетки и трансплантировать его в обезьядренную яйцеклетку. Кроме того, авторы использовали в качестве

донорских относительно менее дифференцированных ядра клеток, окружающих ооцит. Наконец, удалось как бы синхронизировать процессы, протекающие в яйцеклетке и трансплантируемом в нее ядре, что позволило обеспечить естественные ядерно-цитоплазматические взаимоотношения между ядром и цитоплазмой, поскольку трансплантируемое дифференцированное в определенном направлении ядро и цитоплазма яйцеклетки до того работали как бы в разных режимах.

Суть этих экспериментов Янагимачи отражена на рис. 5. Авторы использовали для трансплантации ядра клеток, окружающих ооцит (клеток так называемого *stimulus oophorus*), клеток Сертоли из семенников и клеток, выделенных из мозга (авторы утверждают, что нейронов, однако из текста статьи не очень понятно — нейронов или глии). Ядра, выделенные из соматических клеток, инъецировали в энуклеированное яйцо с помощью микропипетки. Яйцо активировали к развитию, поместив в специальный раствор (так называемый HEPES-CZB), свободный от кальция, и добавляя стронций и цитохалазин. Стронций активировал яйцо, а кальций подавлял образование полярных телец. Эмбрионы культивировали до стадии 2–8 клеток, морулы или бластулы и затем трансплантировали в матку приемной матери, где многие из них имплантировались и некоторые (15–16%) продолжали развитие. Процент выхода рожденных мышат (их извлекали с помощью кесарева сечения на 18,5–19-й дни беременности) был, однако, низок — в разных сериях экспериментов от 2 до 2,8%. Молекулярные исследования доказали принадлежность ядер рожденных мышат к клеткам донора соматических клеток. Таким образом, по крайней мере в некоторых случаях была доказана способность ядер соматических клеток обеспечивать нормальное развитие млекопитающих. Следовательно, получение клона принципиально возможно. Однако получение клона еще не означает получения точной копии клонированного животного. Как уже отмечалось, исследованиями В.А. Струнникова показано, что в партеноклонах шелкопряда разнообразие по многим признакам может быть даже выше, чем в обычной популяции. А однойщевые (монозиготные) близнецы человека развиваются в матке одной матери, то есть в абсолютно равных условиях, так что пределы колеблемости различных признаков в рамках нормы реакции сведены к минимуму. И тем не менее и у них обнаруживают отличия, иногда существенные. В случае использования приемных матерей при клонировании млекопитающих столь идеальные условия создать невозможно, а значит, абсолютная точность копирования исходной особи едва ли может быть обеспечена.

Следовательно, хотя работы Яна Вильмута и ученых из Глоболулы являются, бесспорно, выдающимся достижением, перспективы их дальнейшего развития следует оценивать с осторожностью. На

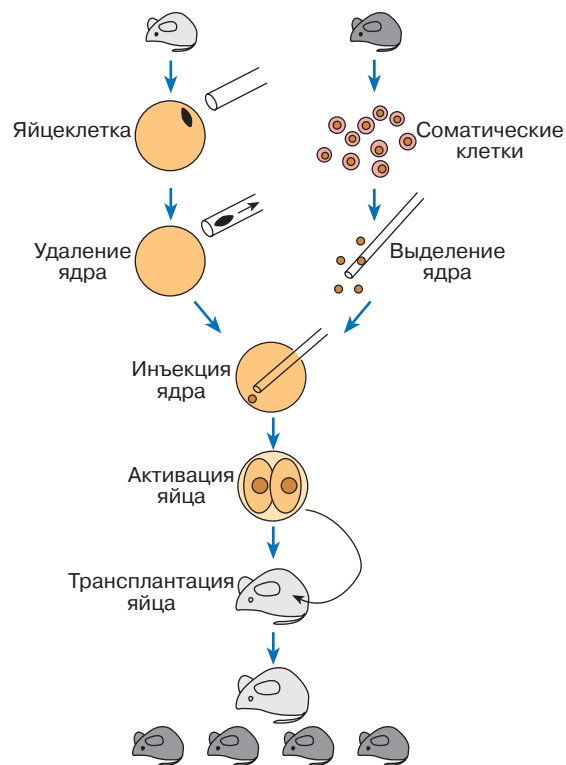


Рис. 5. Схема эксперимента Р. Янагимачи по получению клона мыши

самом деле получить абсолютно точную копию данного конкретного животного (а именно такая конечная цель ставится сейчас в экспериментах по клонированию) намного сложнее, чем это представляется при поверхностном знакомстве с проблемой. И дело вовсе не в технической разработке методов клонирования, а в том, что структурно-функциональные изменения ядер в ходе индивидуального развития животных достаточно глубоки: одни гены активно работают, другие инактивируются и “молчат”, при этом сам зародыш представляет собой своеобразную мозаику полей распределения таких функционально различных генов. И чем организм более специализирован, чем выше ступенька эволюционной лестницы, на которой он стоит, тем эти изменения глубже и труднее обратимы. У некоторых организмов, например у известного кишечного паразита аскариды, генетический материал в будущих зародышевых клетках остается неизменным в ходе развития, а в других, соматических клетках выбрасываются целые большие фрагменты ДНК — носителя наследственной информации. В красных кровяных клетках (эритроцитах) птиц ядра сморщиваются в маленький комочек и не работают, а из эритроцитов млекопитающих, стоящих эволюционно выше птиц, вообще выбрасываются за ненадобностью. У плодовой мушки дрозофилы особенно четко выражены процессы, свойственные и другим

организмам: селективное умножение или, наоборот, недостача каких-то участков ДНК, по-разному проявляющиеся в разных тканях. Совсем недавно было показано, что в соматических клетках в ходе их развития хромосомы последовательно укорачиваются на своих концах, в зародышевых клетках специальный белок — теломераза достраивает, восстанавливает их, то есть полученные данные опять-таки свидетельствуют о существенных различиях между зародышевыми и соматическими клетками. И следовательно, встает вопрос, способны ли ядра соматических клеток полностью и эквивалентно заменить ядра зародышевых клеток в их функции обеспечения нормального развития зародыша.

Уже упомянутый Карл Иллменсе исследовал, насколько дифференцированные ядра дрозофилы способны обеспечить нормальное развитие этого животного из яйца. Оказалось, что до поры до времени зародыш развивается нормально, но уже на ранних стадиях эмбриогенеза наблюдаются отклонения от нормы, возникают уродства, и такой эмбрион неспособен превратиться даже в личинку, не говоря уже о взрослой мухе. У лягушки как существа менее развитого, чем млекопитающие, ядерные изменения менее выражены. И при этом процент успеха при клонировании, как уже отмечалось, невысоок (1–2%), а кроме того, даже те лягушки, которые достигают в опытах по клонированию взрослого состояния, — не без дефектов, так что о точном копировании донора, к сожалению, трудно говорить даже в этом простейшем случае. Но млекопитающие значительно сложнее лягушек по своему устройству и степени дифференцированности клеток. Естественно, у них процент успеха будет по крайней мере не выше (о чем и свидетельствуют результаты опытов Янагимачи). Возникает проблема — как вернуть изменившиеся ядра соматических клеток в исходное состояние, чтобы они могли обеспечить нормальное развитие той яйцеклетки, в которую их трансплантировали. Успех будет зависеть от того, удалось ли “поймать” такую соматическую клетку (из числа так называемых камбиальных), ядро которой еще не утратило своего потенциала, да еще и не повредить это ядро в процессе сложных хирургических манипуляций.

Кроме того, условия развития в матке разных приемных матерей будут различаться, а существует такое понятие, как норма реакции, то есть определенные пределы колеблемости проявления данного гена в фенотипическом признаке. Это означает, что в разных условиях развития зародыша одинаковые гены будут обнаруживать свое действие по-разному. А ведь таких генов тысячи. Следовательно, вероятность полного сходства “клонированных” животных будет не очень велика. Но даже если все проблемы удастся решить и все трудности преодолеть, клонирование человека едва ли будет реальным. Действительно, допустим, что трансплантировали развивающиеся яйцеклетки с чужеродными ядрами несколькими стам приемных матерей (ведь процент выхода низкий), чтобы получить хотя бы одну-единственную живую и точную копию “видного политического деятеля”, как обещал по телевидению один из лидеров ЛДПР. А что будет с остальными зародышами? Ведь большая часть погибнет в утробе матери или разовьется в уродов, часть которых, не дай Бог, родится. Представляете себе — сотни искусственно полученных человеческих уродов! Полагаю, что это было бы преступлением, а потому вполне естественно ожидать принятия закона, запрещающего такого рода исследования как аморальные.

Что касается млекопитающих, то в принципе можно говорить о том, что техническая задача получения клонированных животных решена, однако, как уже говорилось, основной вопрос заключается в том, насколько точно эти животные будут копировать соответствующий прототип. И оправдают ли результаты работ по получению подобных клонов те затраты, которых они потребуют? Поэтому необходимо серьезное обсуждение этой проблемы на самом высоком уровне научного сообщества.

* * *

Леонид Иванович Корочкин, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, лауреат Государственной премии и премии им. Н.К. Кольцова. Область научных интересов — генетика развития и нейрогенетика. Автор около 400 публикаций, в том числе пяти книг и учебного пособия по генетике развития.