

# Я, как Долли, из клеток воскресну

Галина Казарина, автор «Эксперт Сибирь»

Как в эмбрионе, только-только начавшем свое развитие, заложено все о будущем поколении, так в исследованиях группы новосибирских ученых кроется ключ к разгадке вечных тайн жизни



Фото: Борис Барышников

**М**ожно ли обратить развитие человека вспять? Другими словами, можно ли восстановить потенциал дифференцированных клеток, из которых состоят наши органы и ткани, до уровня эмбриональных стволовых, дающих начало жизни? Более десяти лет в Институте цитологии и генетики СО РАН ищут ответ на этот непростой вопрос. Средство достижения цели — полномасштабное исследование эмбриональных стволовых клеток. Именно эмбриональных, а не просто стволовых. Ибо, как говорят в Одессе, это две большие разницы.

## Клетка клетке рознь

Ежедневно человек теряет от одного до двух граммов кожи. Но никогда не наступит день, в который человек «сбросит» кожу целиком — клетки эпителия восстанавливаются. Каждые три месяца происходит полное обновление клеток периферической крови: триллионы старых заменяются на равнозначное количество новых. То же самое случается с клетками эпителия кишечника. Они способны к самообновлению и регенерации в течение всей жизни. Источник самообновления — стволовые или, точнее, тканевые стволовые клетки взрослого организма. Количество их невелико, но именно они — своего рода строительный материал для самообновления или регенерации поврежденных тканей.

Однако многие органы и ткани взрослого организма состоят из других типов специализированных клеток — тех, которые утратили способность делиться и, следовательно, самообновляться или восстанавливаться в случае повреждения. Если нервные клетки или мышечная ткань погибают, то окончательно и бесповоротно. Таких клеток в человеческом организме гораздо больше первых.

До недавнего времени никто не знал, как решить проблему репарации (восстановления) специализированных клеток, утративших способность к делению. Единственным эффективным средством, которым располагала медицина для замены пораженного органа или ткани, была трансплантация (пересадка) органов: почек, сердца, печени. Однако в этом случае встает самый сложный вопрос донорства органов или тканей. Одним из самых выдающихся достижений современной биологии и медицины является создание технологии выращивания вне организма эмбриональных

стволовых клеток (ЭСК). Их фундаментальное свойство — способность давать начало всем остальным клеткам взрослого организма.

ЭСК выделяют из эмбрионов после семи–восьми делений оплодотворенной яйцеклетки. Извлеченные из эмбриона, эти клетки способны расти в культуре, вне организма, при этом они сохраняют свой потенциал и способны превращаться (дифференцироваться) в любые специфические (дифференцированные) клетки, из которых формируются органы человека. Если научиться управлять ростом эмбриональных клеток, человечество сможет избавиться от множества заболеваний. Как полагает большинство исследователей, в недалеком будущем в лабораторных условиях будут выращиваться любые ткани, из которых можно выкраивать «заплатки» на пораженные болезнью участки организма. Или даже формировать целиком «запасные» органы для пересадки — «запчасти», как говорит **Олег Серов**, заведующий лабораторией генетики развития Института цитологии и генетики СО РАН. Ученый, создавший технологию получения эмбриональных гибридных клеток, рассказал об исследованиях и перспективах в области клеточных технологий.

## Человек человеку — друг, товарищ и эмбрион

### — Олег Леонидович, где и как формируются эмбриональные стволовые клетки?

— У млекопитающих, в том числе у человека, развитие проходит в несколько стадий. Самая ранняя — когда после оплодотворения яйцеклетки эмбрион находится в свободном состоянии и не связан напрямую с материнским организмом. У человека этот период длится семь–восемь дней, у мыши — всего три дня. Но за этот короткий промежуток происходят очень важные события. Уже на такой ранней стадии развития, которая получила название бластоциста, известно, во что разовьются разные части эмбриона.

В бластоцисте около 250–300 клеток. Приблизительно 20–40, которые являются донорами эмбриональных стволовых, составляют так называемую внутреннюю клеточную массу. Именно из них развивается организм. И не просто растёт, но сам становится репродуктивно активным. То есть на этом этапе закладывается полноценная особь, способная после завершения своего развития обеспечить появление и следующего поколения. Эти клетки дают начало не только всем тканям, но и репродуктивным органам. Они закладывают будущее поколение.

Помимо внутренней клеточной массы в бластоцисте содержится экстраэмбриональная ткань, мы ее называем трофэктодерма. Из нее формируются вспомогательные органы, обеспечивающие питание плода. Но развивается плод из этих 20–40 клеток.

### — Как сейчас возможно получить эмбриональные стволовые клетки?

— Исключительно экспериментальным путем. Способ культивирования стволовых клеток сумели найти около 25 лет назад американские и британские ученые. Из эмбриона изымаются клетки внутренней массы и культивируются вне организма, в специальных культурных боксах, где они растут и размножаются.

Замечательным свойством таких клеток является то, что они не дифференцируются, то есть остаются примерно такими же, как если бы находились в эмбрионе. Однако их можно побудить к дифференцировке.

## — Каким образом можно оценить потенциал стволовых клеток и узнать, что он сопоставим с клетками внутренней массы?

— Например, мы можем взять бластоцисту от мыши черного цвета и ввести туда стволовые клетки белой мыши. Они начинают колонизировать эмбрион, смешиваться с ним, в результате развивается такой эмбрион, как химерный, то есть состоящий из двух типов клеток: потомков стволовых клеток и собственно эмбриона. Родится химерная мышь, у которой на фоне черной окраски — пятна или даже полосы белого цвета, что и указывает, собственно говоря, на то, что это «потомки» введенных клеток.

Если эту химерную двухцветную мышь скрестить с обычной, нехимерной белой мышью, получается интересная вещь. Появляются мыши как с черной окраской, так и с белой, чего не может быть при полном доминировании, когда все потомки только черного цвета.

## — Почему?

— Химерная мышь имеет два типа гамет (половых клеток). У одних генотип клеток от белой мыши, у других — от черной. Это говорит о том, что введенные эмбриональные стволовые клетки способны давать вклад не только в окраску шерсти, но и участвовать в формировании половых клеток у химер. Существуют молекулярные тесты, показывающие, что все органы и ткани у химерного животного содержат потомки введенных клеток.

В связи с этим был сделан очень важный вывод: клетки, взятые из бластоцисты, можно сколь угодно долго культивировать вне организма, но при этом они сохраняют все свойства, характерные для этой стадии развития. Они имеют потенциал дать полное развитие будущему организму. В эмбриональных стволовых клетках заложена вся программа развития. Этот факт привлекает внимание и биологического, и медицинского сообщества. На регенеративную, то есть заместительную, восстановительную, медицину возлагают большие надежды. Появляется экспериментальный источник клеток, которые все могут дать. Источник всех и вся клеток. Сегодня в условиях культуры, вне организма, можно побудить клетки к дифференцировке в любые клетки, например, нейроны, клетки миокарда, печени или поджелудочной железы в другие, в том числе и гаметы. У человека появляется не виданная ранее возможность получать собственные запчасти.

## Первый блин — клоном

### — Какие исследования проводит ваша лаборатория?

— Перед нами стоит очень серьезная биологическая, в меньшей степени медицинская задача. В результате деления яйцеклетки у человека, как и у ближайших к нему животных, появляется более 220 типов специализированных клеток: нейроны, спленциты, разные типы эпителиев, мышечные и многие другие специализированные клетки. С одной стороны, они возникают в результате дифференцировки, получая «специализацию», с другой — параллельно утрачивают свой потенциал. Есть даже такое понятие «терминальная дифференцировка», когда некоторые клетки — мышечные, нейроны головного или спинного мозга — совсем прекращают делиться. Так вот, мы должны понять, можно ли восстановить потенциал в таких дифференцированных клетках, вернуть их в состояние, близкое к зиготе или, по крайней мере, к уровню эмбриональных стволовых клеток. Можно или

нельзя? Это вопрос принципиальный, потому что природа не знает случаев обратного развития. У нас оно всегда идет в одну сторону.

### — Вопрос не нов?

— Еще в 1950–е годы, на амфибиях, был выработан экспериментальный подход с целью получить ответ на вопрос: обратима ли дифференцировка. Из зрелой оплодотворенной яйцеклетки удаляли собственное ядро — генетический материал, а в него с помощью микротехники помещали ядро дифференцированной клетки. Опыты **Джона Гердона** в Англии показали, что после такой трансплантации в ряде случаев возможно полноценное развитие такой реконструированной яйцеклетки. Ему удалось получить из реконструированной клетки эпителия кишечника полное развитие африканской жабы. Было доказано, что восстановить потенциал в специализированных клетках можно. Еще было осознано, что таким образом можно получать генетические копии животных.

В оплодотворенные яйцеклетки, из которых удалены ядра, трансплантируются ядра (генетический материал) другой особи, и, если все удачно, у вас могут родиться животные с генотипом, идентичным генотипу животного-донора. Получается стопроцентная генетическая копия.

### — Клонирование?

— Да, тогда впервые и заговорили о клонировании животных. Знаменитая овца Долли появилась благодаря этой технологии, в которой были использованы ядра клеток молочной железы.

Технология клонирования является одним из самых значительных достижений современной биологии. В настоящее время клонировано уже более десяти видов животных: коровы, овцы, кролики, лошади, кошки, свиньи. На млекопитающих очень долгое время эти эксперименты не давались из-за технических трудностей. Но со временем была разработана специальная техника, и проблемы разрешились сами собой.

### — Насколько эффективна технология клонирования, какими качествами обладают клонированные животные?

— У клонированных животных наблюдается очень много патологий. К тому же рождается не более двух процентов из всех экспериментальных реконструированных яйцеклеток. Если мы возьмем тысячу яйцеклеток, сделаем соответствующие операции, то родится максимум 20 животных, остальные умрут. Еще из этих двадцати половина погибнет в первую неделю жизни.

### — От чего?

— От разных болезней. В основном, пневмония. Все те немногие, которые остаются в живых, имеют ослабленный иммунитет, у них нарушено формирование иммунной системы, и целый букет патологий. У клонированных мышей, допустим, очень часто бывает ожирение.

То есть по замыслу генетические копии оказались в реальности не совсем копиями. Они генетически действительно идентичны, но у рождающихся животных много отклонений от нормального развития. Очень много. Во-первых, у всех — большой вес. Он появляется в результате неправильного формирования плаценты: плод питается лучше, оттого он громаднее. Во-вторых, многие из клонированных животных не могут родиться самостоятельно. Например, всех коров достают

кесаревым сечением, потому что они слишком большие. В-третьих, у клонированных животных нарушен дыхательный рефлекс. Они не могут сделать первый вдох, от этого, естественно, погибают. Поэтому их добывают кесаревым сечением дней за десять до рождения.

### — Причина известна?

— Да, это очень серьезная проблема, опять же фундаментальная. О практике пока не идет никакой речи. Вопрос в так называемом репрограммировании — изменении режима или профиля генной активности клеток, используемых в таких экспериментах: клеток молочной железы или фибробластов. Последние чаще других служат донорами ядер для переноса в яйцеклетку. Профиль генной активности этих клеток должен измениться и стать таким, как в зиготе, как на момент оплодотворения яйцеклетки. Экспрессия всех генов фибробласта должна правильно репрограммироваться. При клонировании, как показывает опыт, такого не происходит.

### — Опять же — почему?

— Дело в том, что в геноме у млекопитающих, в том числе у человека, импринтировано примерно около сотни генов. Это целый феномен, до конца не расшифрованный. Смысл его заключается в следующем. В отличие от «обычных» генов, которые представлены двумя функционирующими копиями, у импринтированных генов работает только одна копия. Это зависит от наследования: от матери или от отца. Если ген импринтирован по материнской линии, то он после оплодотворения не активен. Будут работать только отцовские гены. Или наоборот: после оплодотворения отцовские импринтированные гены не активны, а функционируют только материнские. В процессе оогенеза — созревания яйцеклетки и сперматогенеза — созревание спермия — происходит импринтирование примерно около 100 генов. Технология клонирования — трансплантация ядер в яйцеклетку — стартует только с этой стадии, и поэтому импринтированные гены не подвергаются репрограммированию. В связи с этим возникают все те нарушения, о которых я рассказывал.

### — Каковы перспективы развития технологии клонирования?

— Сегодня эту технологию объединяют с эмбриональными стволовыми клетками. Каким образом? В оплодотворенную яйцеклетку помещается ядро из какой-либо клетки уже взрослого животного. Развитие доводят до стадии бластоцисты, а затем извлекают внутреннюю клеточную массу и получают культуру эмбриональных стволовых клеток. То есть стволовые клетки клонированного эмбриона. Сейчас эта технология очень широко используется на различных животных. Перспективная цель — научиться получать индивидуальные, персональные клетки для человека.

## Управляй репрограммированием

### — Как вы в своих исследованиях используете потенциал эмбриональных стволовых клеток?

— Наша задача — использовать стволовые клетки для репрограммирования дифференцированных клеток. Есть такой прием в клеточной биологии — можно вызывать слияние двух клеток. Мы сливаем эмбриональные стволовые клетки с дифференцированными. Например, стволовые клетки мыши с фибробластом или спленцитом — клеткой селезенки. В результате такого слияния сначала образуется стадия, называемая гетерокарион: цитоплазма общая, два ядра лежат отдельно. Если деление совпадает в двух ядрах, образуется общее — возникает гибридная клетка. Ее особенность в том, что один геном у нее — от эмбриональной стволовой клетки, способной дифференцироваться

во что угодно, то есть с очень высоким потенциалом. Другой — от специализированной клетки: фибробласта или спленоцита. Получается клеточный гибрид.

**— С какими свойствами?**

— Свойства практически идентичны эмбриональным стволовым клеткам, и высокий потенциал эмбриональных стволовых клеток в таких гибридных клетках полностью сохраняется. Если их ввести в бластоцисту, вырастет химерная мышь.

**— Гибридные клетки могут дифференцироваться в любые клетки, так же, как эмбриональные?**

— Да, могут. Существуют определенные тесты, это показывающие. Таким образом, появляется альтернативный способ восстановления потенциала в дифференцированных клетках, который они утратили в ходе дифференцировки. Но прежде всего наша задача — фундаментальная: используя потенциал эмбриональных стволовых клеток, посредством формирования гибридных клеток узнать, как идет репрограммирование, можно ли им управлять? Одновременно мы решаем вопросы об обратимости дифференцировки. Все ли гены возможно репрограммировать? Вот этим мы сейчас занимаемся.

**— У вас есть партнеры?**

— Сейчас такие работы активно ведутся в других странах. Есть очень сильные исследовательские группы в Японии, Англии, Германии, США. Они знают наши работы, мы знаем их. У нас есть одна публикация с Эдинбургским университетом, но вообще мы работаем сами по себе, потому что в каком-то роде мы пионеры.

**— Пионеры?**

— Да, мы были первыми, кто предложил технологию получения эмбриональных гибридных клеток. В 1996 году мы впервые сделали заявку в российской печати, статья была опубликована в «Докладах Академии наук», в зарубежной — в 1998-м, публикация в международном профильном журнале *Molecular Reproduction and Development*.

**Олег Серов**

Родился 3 июня 1939 года.

В 1964 году закончил Башкирский государственный медицинский институт. После работы врачом в 1966 году поступил в аспирантуру Института цитологии и генетики СО АН СССР.

Заведующий лабораторией генетики развития Института цитологии и генетики СО РАН, доктор биологических наук, профессор. Автор около 200 публикаций в российских и зарубежных журналах. Лауреат Государственной премии Российской Федерации (1996).

