

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 611-013.1:615.36:57.089.3

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯЧайлахян Л.М., Свиридова-Чайлахян Т.А., Хохлов А.М. *,
Кантор Г.М., Шахбазян А.К.*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Институт биологического приборостроения РАН, Пуцзино, Россия

Возможность клонирования связана с удивительным явлением, когда ядро дифференцированной клетки со своей спецификой организации хроматина, со спецификой профиля экспрессии генов, попадая в цитоплазму зрелого ооцита, начинает преобразовываться структурно и функционально настолько значительно, что становится тотипотентным, т.е., дающим начало целому организму. Впервые это было показано в работах Д. Гердона 60-х годов, когда ядро эпителиальной клетки кишечника лягушки, введенное в энуклеированный ооцит, поддерживало развитие, вплоть до стадии взрослой лягушки (Curdon, 1963). Тем самым было сделано принципиальное открытие, значительное даже с позиций сегодняшнего дня. Однако, лишь после знаменитой работы Я. Вилмута и соавт. (Wilmut et al., 1997) по созданию овечки Долли интерес к этой проблеме из-за реальной перспективы клонирования человека, вышел далеко за пределы специальной научной литературы и вызвал невероятный ажиотаж во всех сферах человеческого общества. Это было связано с этической стороной данной проблемы. В обсуждение включились религиозные, общественные и политические сферы и к настоящему времени во многих странах, в том числе и в нашей, работы по репродуктивному клонированию человека находятся под запретом.

Терапевтическое клонирование преследует совершенно другие цели. Решающим толчком здесь послужили работы, в которых была показана возможность получения клеточных линий плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из бластоцист человека (Thomson et al., 1998) и примордиальных зародышевых клеток человека (Shamblott et al., 1998).

На первом этапе из зрелых ооцитов удаляют собственный генетический материал и вводят ядра соматических клеток. Реконструированные таким образом зародыши культивируют *in vitro* до стадии бластоцисты. Этот этап является общим для репродуктивного и терапевтического клонирования. В дальнейшем их пути резко расходятся. В случае репродуктивного клонирования бластоцисты вводят приемной матери для продолжения развития вплоть до рождения клона. В случае терапевтического клонирования из бластоцист извлекают внутреннюю клеточную массу (ВКМ) и культивируют *in vitro* для получения плюрипотентных ЭСК. При этом чистоту линии ЭСК идентифицируют целым комплексом тестов с использованием специфических маркеров, а также по характерным особенностям поведения самих клеток.

На следующем этапе терапевтического клонирования из исходных ЭСК получают различные типы клеток, детерминированных в том или ином направлении, т.е., предшественников какого-либо типа ткани: нейробласты, миобласты, кардиомиоциты, гепатоциты, клетки гематопоэтического ряда и т.п.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 05-04-08070-офи_а; № 05-04-49101; № 05-08-65494; № 06-04-89503-ННС_а)

Полученные типы клеток являются ценным материалом для заместительной клеточной терапии. Главная их ценность в том, что в результате соответствующей пересадки ядер, эти клетки могут иметь геном, идентичный геному пациента, что исключит любые нежелательные иммунные реакции при использовании этих клеток для лечения данного пациента. В этом главный смысл терапевтического клонирования. Ясно, сколь заманчива такая возможность для ее использования в медицине.

Трудности репродуктивного клонирования не распространяются на терапевтическое. Сразу же можно обратить внимание, как много здесь присутствует сложных биологических и медицинских проблем фундаментального, и прикладного характера. Для обсуждения проблем терапевтического клонирования существенно подвести основные итоги исследований по репродуктивному клонированию. Работы последних лет в области репродуктивного клонирования различных животных показали следующее. Большинство клонированных животных гибнут вскоре после имплантации (Hoshedlinger, Jaenisch, 2002, 2003; Solter, 2000; Rideout et al., 2001; Tamashiro et al., 2002); те же, которые рождаются, имеют различные патологии и отклонения, независимо от типа донорской клетки. Как правило, они страдают респираторными болезнями и у них могут быть дефектны почки, печень, сердце, мозг. Некоторые из этих отклоняющихся от нормы фенотипов проявляют специфичность по отношению к определенному типу донорских клеток. Например, характерным признаком клонов, у которых донорами ядер были кумулюсные клетки, является тучность, ожирение, тогда как клоны, производные от клеток Сертол-ли, преждевременно гибнут (Ogonuki et al., 2002).

Эффективность клонирования существенным образом зависит от степени дифференцировки донорской клетки. Чем дальше продвинута клетка в сторону терминальной дифференцировки, тем труднее осуществляется процесс репрограммирования и тем ниже ее потенции для развития. Так, например, если донорами ядер были фибробласты или кумулюсные клетки, то процент родившихся мышей по отношению к числу реконструированных бластоцист составлял 1 - 3%. Если в качестве донорских использовали бластомеры – отдельные клетки самих эмбрионов или ЭСК, то количество родившихся мышей уже составляло 10 - 30%.

В работах по репродуктивному клонированию была выявлена еще одна важная закономерность - потомство клонированных животных не наследует их специфических дефектов (Tamashiro et al., 2002). Это подтверждает, что большинство проблем в клонировании обусловлено отклонениями эпигенетического характера. Эпигенетические изменения, специфичные для дифференцированных клеток, такие как метилирование ДНК, модификация гистонов, общей структуры хроматина, при репрограммировании должны прийти в состояние, согласующееся с эмбриональным развитием. Ошибки эпигенетического репрограммирования связаны с недостаточной обратимостью программы генной экспрессии в донорских ядрах, возвращающихся к паттерну эмбриональной экспрессии (Rideout et al., 2001; Hoshedlinger, Jaenisch, 2002). Так, например, показано, что эмбрионы, несущие ядра соматических клеток, часто не реактивируют ключевые эмбриональные гены на стадии бластоцисты (Bortvin et al., 2003; Voiani et al., 2002; Kang et al., 2001, 2002; Dean et al., 2001), в них преждевременно экспрессируются специфические гены донорских клеток (Solter, 2000). В противоположность этому, эмбрионы, клонированные с использованием ядер ЭСК, способны экспрессировать ранние эмбриональные гены (Bortvin et al., 2003), возможно потому, что такие гены исходно активны в геноме донора. Этим можно объяснить, почему клонирование при использовании ЭСК в 10-20 раз эффективнее клонирования при использовании соматических клеток.

Принципиальный барьер для создания нормального животного путем клонирования связан с явлением геномного импринтинга или эпигенетическими разли-

чиями между геномами, ведущими свое происхождение от матери и отца. Как известно геномы ооцита и спермия различаются по паттерну метилирования (эпигенетическое маркирование), возникающему в процессе гаметогенеза. Вследствие оплодотворения геном спермия подвергается в зиготе активному деметилированию, тогда как геном ооцита деметилируется существенно слабее, поскольку у материнского генома конфигурация хроматина существенно иная, чем у отцовского, и в связи с этим он более устойчив к процессу деметилирования. Таким образом, паттерн метилирования у двух родительских геномов будет отличаться к концу процесса дробления и при дальнейшем развитии. Очевидно, что сложность и специфичность преобразований (репрограммирования) генома в течение гаметогенеза при естественном воспроизведении потомства не может в той же степени осуществиться в геноме дифференцированной донорской клетки при клонировании, и возникшее неполное репрограммирование приводит к аномальному фенотипу, отклонению от нормы профиля генных экспрессий и гибели большинства клонов.

Таким образом, на основании чисто фундаментальных научных причин, не говоря уже об этической стороне, запрет на репродуктивное клонирование человека в настоящее время обоснован и оправдан. Однако будут ли те же самые фундаментальные научные причины, касающиеся ошибок репрограммирования, ограничивать использование терапевтического клонирования для человека? Известно, что из ВКМ обычных бластоцист получают *in vitro* клеточные колонии, где только одна или несколько клеток потенциально дают линию ЭСК (Buehr et al., 2003), т.е., уровень компетентности клетки снижается в процессе культивирования. При использовании бластоцист из реконструированных зародышей также происходит селекция и линия рЭСК возникает из наиболее успешно репрограммированных клеток. В случае репродуктивного клонирования при трансплантации эмбрионов приемным матерям происходит резкое усложнение всей развивающейся системы, по сравнению с клеточным уровнем, требуется более тонкая организация множественных межклеточных взаимодействий, а это определяет гораздо более жесткие требования к полному и адекватному репрограммированию. Все это означает, что с позиции фундаментальной науки использование терапевтического клонирования по отношению к человеку, в отличие от репродуктивного клонирования оправдано уже в настоящее время.

Исследования по терапевтическому клонированию. Работ по терапевтическому клонированию пока не очень много, но, учитывая всеобщий интерес к этой проблеме, количество их, несомненно, будет быстро расти. Основная тенденция этих работ – получение клонированных бластоцист и затем, на их основе, – линий рЭСК. В ряде случаев производные этих линий – различные дифференцированные клетки уже использованы на животных моделях в терапевтических целях.

Первая работа по терапевтическому клонированию была опубликована в 2000 году (Munsie et al., 2000) и выполнена на мышах. В качестве доноров генетического материала использовали кумулюсные клетки. Было получено 10 реконструированных бластоцист и из внутренней клеточной массы этих бластоцист получена одна линия рЭСК. Клетки этой линии оказались способны к различным дифференцировкам как *in vitro*, так и *in vivo*. Их инъекция в нормальные бластоцисты приводила в дальнейшем к рождению химерных мышей, не отличающихся функционально от исходных нормальных мышей. В следующем году вышла еще одна работа по терапевтическому клонированию, также на мышах (Wakayama et al., 2001). В работе было получено уже 35 рЭСК от 396 бластоцист. Исходное число реконструированных зародышей составило 1016. При этом использовали кумулюсные клетки и клетки, получаемые из кончика хвоста от инбредных, гибридных и мутантных линий мышей. Был накоплен большой материал по анализу химерных мышей, полученных при инъекции рЭСК в нормальные бластоцисты. Отмечается, что потомки рЭСК находились практически во всех органах химерных мышей –

они дифференцировались в соответствующие соматические клетки, а также в гаметы. Убедительно показано, что рЭСК полностью плюрипотентны.

В 2002 году появились еще две работы по терапевтическому клонированию на мышах. В работе (Hochedlinger, Jaenisch, 2002) авторы в качестве донорских клеток использовали зрелые В- и Т- лимфоциты из периферических лимфатических узлов, являющихся соматическими клетками терминальной дифференцировки, и исследовали их способность к репрограммированию. В результате от 41-й реконструированной бластоцисты было получено две линии рЭСК.

В работе (Hochedlinger et al., 2002) была по существу впервые сделана попытка применения полученных рЭСК линий для клеточной терапии в сочетании с генной терапией. Была выбрана хорошо изученная мутация мышей по гену *Rag2*. Эти мыши характеризуются комбинированным иммунодефицитом: В- и Т- клетки у них лишены продукта *Rag2* гена, катализирующего определенные иммунные рецепторы в лимфоцитах (ситуация, схожая с синдромом Омениса у людей). В энуклеированные ооциты вводили ядра фибробластов из кончика хвоста мутантных мышей. В результате была получена аутологическая для этих мышей линия рЭСК. Далее, одна из мутантных по *Rag2* аллелей была мишенью при гомологичной рекомбинации, чтобы восстановить нормальную структуру гена в рЭСК. Затем из эмбрионидных тел этой, уже генетически «подправленной» линии, при обработке гомеобоксным протеином NoxB4 получали клетки – предшественники гематопоэтического ряда. Инъекция этих, уже нормальных гематопоэтических предшественников, предварительно облученным, дефектным по гену *Rag2* мышам, спасала последних от гибели. Эта работа имеет принципиальное значение. В ней четко продемонстрированы огромные возможности сочетания терапевтического клонирования с генной терапией для успешного лечения генетических патологий. Можно не сомневаться, что в ближайшее время появится поток работ по использованию терапевтического клонирования для лечения различных патологий на различных животных моделях.

Суммируя основные результаты по терапевтическому клонированию на мышах, можно отметить следующее: уже получены в различных лабораториях около 50 рЭСК линий. Все эти линии достаточно достоверно определены как линии, состоящие из истинно плюрипотентных клеток, которые при определенных условиях культивирования могут бесконечно долго оставаться в недифференцированном состоянии. Идентификация рЭСК обычно осуществляется на основе использования методов иммуноцитохимии, гистохимии, степени иммортализации (отсутствие лимита Хейфлика), кариотипирования. Для них характерны определенные специфические маркеры: активность щелочной фосфатазы, активность теломеразы, экспрессия транскрипционного фактора Oct-4 и др. При культивировании они могут формировать характерные эмбрионидные тела, после чего на их периферии возникают группы дифференцированных клеток различных типов. Показано, что *in vitro* рЭСК дают практически все основные типы дифференцированных соматических клеток. Еще большее разнообразие дифференцировок возникает в условиях *in vivo*, когда рЭСК инъецируют в нормальную бластоцисту и получают химерных животных. При этом клетки, ведущие свое начало от линий рЭСК, обнаруживают практически во всех органах и тканях, в том числе и в гонадах. Это указывает на то, что рЭСК по своему поведению, потенциальным возможностям, взаимодействию с различными реагентами практически эквивалентны ЭСК₂, полученным из естественно развивающихся эмбрионов. Тем самым при работе с рЭСК можно использовать опыт, полученный при исследовании поведения и различных свойств обычных ЭСК. И, конечно, в развитии этого направления большую роль имеют работы, в которых показана возможность получения человеческих линий ЭСК со всеми характерными для этих клеток свойствами.

Возможности терапевтического клонирования человека. Экспериментальные возможности терапевтического клонирования человека стали активно обсуждаться с 2003 года. В апрельском номере Science 2003 года появилась работа (Simerli et al., 2003), в которой было показано, что при энуклеации ооцитов у приматов (макака-резус) цитоплазма теряет белок NuMA и кинезин HSET, необходимые для формирования полюсов митотического веретена. Авторы считают это обстоятельство основной причиной их неудач в опытах по клонированию на приматах. Эта работа вызвала серьезный скепсис по поводу возможностей применения терапевтического клонирования к приматам и, соответственно, к человеку.

Однако в том же 2003 году выходит очень интересная работа, в которой ядра зрелых соматических клеток человека пересаживали в энуклеированные ооциты кролика (Ying Chen et al., 2003). В качестве доноров ядер были использованы человеческие фибробласты, которые брали у четырех возрастных групп (5, 44, 52 и 60-летних людей). Полученные от реконструированных зародышей линии рЭСК оценивались отдельно для каждой возрастной группы доноров. Эти оценки показали, что ядра соматических клеток человека пригодны для создания рЭСК независимо от возраста донора. Исследование полученных рЭСК с использованием различных тестов, которые четко выявляют видовую принадлежность исследуемой клетки, а именно: кариотипный анализ, изогенетический, гибридизация ДНК *in situ*, PCR анализ, иммуноцитохимический (с пробами, характерными для различных видов) - убедительно показали, что рЭСК, производные от человеческих соматических клеток, сохраняют фенотип, сходный с фенотипом обычных человеческих ЭСК. Клетки человеческих рЭСК линий обладали способностью к непрерывному росту в недифференцированном состоянии и формировали эмбриоидные тела, в которых выявлялись все три зародышевых листка. В дальнейшем, при соответствующей индукции, они были способны к множественным клеточным дифференцировкам.

Таким образом, оказалось возможным получать человеческие линии рЭСК без участия человеческих ооцитов. Однако используемый подход для получения рЭСК человека в терапевтических целях имеет существенный недостаток из-за того, что цитоплазма таких клеток содержит смешанную популяцию кроличьих и человеческих митохондрий.

В начале 2004 года в февральском номере Science была опубликована сенсационная работа южнокорейских ученых, полностью выполненная на человеческих клетках, в которой показана возможность получения человеческих рЭСК при введении ядер кумулюсных клеток в энуклеированные ооциты человека (Woo Suk Hwang et al., 2004). Было прооперировано 176 ооцитов, получено 30 бластоцист, на основе внутренней клеточной массы 20 из них получена линия рЭСК, которая по своим характеристикам практически ничем не отличалась от уже исследованных линий ЭСК человека, получаемых из обычных бластоцист. Наблюдались сходная морфология и те же поверхностные маркеры, такая же способность формировать *in vitro* эмбриоидные тела, содержащие производные всех трех зародышевых листков, и тератомы *in vivo*. После непрерывной пролиферации, свыше 70 пассажей, клетки поддерживали нормальный кариотип и генетическую идентичность донорским соматическим клеткам. Свой успех авторы объяснили модификацией методических приемов пересадки ядер, использованных ранее, а также изменениями протокола по среде культивирования человеческих эмбрионов *in vitro*.

Еще более сенсационной оказалась следующая работа этих авторов (Woo Suk Hwang et al., 2005), опубликованная в Science, в которой указывалось, что получены с полной иммунологической совместимостью индивидуальные для 11 тяжелобольных пациентов линии рЭСК с использованием клеток кожи - фибробластов в качестве доноров ядер. К сожалению, вскоре выяснилось, что результаты этих двух работ южнокорейских ученых сфальсифицированы и обе работы были отозваны из журнала. И все же движение науки в развитии этого направления уже не остановить. К примеру, в самое недавнее время был запущен многомиллионный

проект по созданию клонированных человеческих эмбрионов для получения стволовых клеток (рЭСК) в Гарвардском университете в США.

В настоящее время имеются все основания считать, что путь для терапевтического клонирования человека открыт, так как и фундаментальные, и технологические аспекты этой проблемы не создают серьезной преграды. Сейчас уже достаточно хорошо известны свойства рЭСК, в том числе и человеческих. Имеются четкие протоколы получения линий ЭСК, которые можно экстраполировать и на получение линий рЭСК. То же самое можно сказать о получении различных дифференцированных клеток из рЭСК на основе протоколов для ЭСК. Пока отсутствуют единые протоколы по пересадке ядер и реконструкции зародышей, но, очевидно, это дело ближайшего будущего. И только, по-видимому, один аспект будет создавать трудности – этический. Для многих в обществе представляется предосудительным как получать клонированные эмбрионы, так и разрушать их на стадии бластоцисты с извлечением внутренней клеточной массы для создания рЭСК линий.

Альтернативные подходы. Альтернативой терапевтическому клонированию в заместительной клеточной терапии является использование ЭСК, стволовых клеток крови из пупочной вены новорожденных и стволовых клеток взрослого организма. За последние годы появилось значительное количество работ, в которых для терапевтических целей используются обычные ЭСК. Для оценки возможностей терапевтического клонирования они весьма существенны, так как все интересное и положительное в этих работах по терапевтическому потенциалу ЭСК можно экстраполировать на рЭСК. Исследования с ЭСК достаточно оптимистичны. Например, исследование Izhak Kehat и соавт. (2004), в котором показано, что кардиомиоцитоподобные клетки, производные от человеческих ЭСК, трансплантированные в стенку левого желудочка свиньи, могли заместить пейсмекерные клетки в модели полного атриовентрикулярного блока и вызвать эктопический ритм, сходный с естественным ритмом. Эти результаты указывают на то, что трансплантированные клетки способны интегрироваться электромеханически с реципиентной тканью. По-существу, трансплантирован естественный стимулятор сердца. Можно предположить, что подобное использование производных рЭСК по схеме терапевтического клонирования может выглядеть очень оптимистичным для человека.

Поразительная по своим результатам работа (Diego Fraidenraich et al., 2004), в которой также выявлены принципиально новые способности у ЭСК. В работе показано, что нокаутные по Id-генам (Id-гены регулируют дифференцировку при развитии) мыши, имеющие множественные кардиальные дефекты и гибнущие на стадии средней беременности, сохраняются живыми при инъекции в бластоцисты мутантных мышей ЭСК линии R26. Миокардиальные маркеры при этом нормализуются в химерном миокарде. Более того, внутрибрюшинная инъекция ЭСК R26 мутантным самкам перед их оплодотворением частично возвращает к норме фенотип миокардиальных клеток плодов без прямого контакта с ЭСК. Таким образом, ЭСК имеют потенциальные возможности для исправления врожденных Id-зависимых дефектов при локальном и далекодействующем влиянии. Специальный анализ показал, что далекодействие осуществляется за счет секреции ЭСК инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1), а локальным фактором является липидмодифицированный гликопротеин, ассоциированный с клеточной мембраной и экстраклеточным матриксом – WNTS.

Возможность получения стволовых клеток из крови пупочной вены рассматривается как один из важных источников аутологических стволовых клеток. Именно это обстоятельство, очевидно, и послужило толчком к созданию индивидуальных клеточных криобанков, когда сразу же после рождения из пупочной вены забирается кровь для получения стволовых клеток ребенка. В дальнейшем их размножают, криоконсервируют и содержат в специальных клеточных банках на все

время жизни доноров этих клеток. Такой «запас» собственных стволовых клеток данного конкретного индивидуума обеспечивает ему возможность лечения от ряда тяжелых заболеваний методами заместительной клеточной терапии. Однако использование подобного подхода имеет определенные ограничения. И главное из них состоит в том, что он может быть использован только для вновь рождающихся, в то время как ныне живущие поколения составляют миллиарды людей. Кроме того, стволовые клетки, полученные из крови, могут иметь определенные ограничения в потенциальной возможности к детерминации и дифференцировке.

Взрослые стволовые клетки – это другой источник аутологических клеток для заместительной клеточной терапии. Их выделяют из таких тканей, как мозг, костный мозг, кожа, мышцы, жировая ткань и некоторых других. Ожидалось, что они могут иметь широкий потенциал к развитию так называемой «трансдифференцировке». Однако в ряде работ последних лет, опубликованных в ведущих зарубежных журналах, показано, что данные, свидетельствующие о «трансдифференцировке» взрослых стволовых клеток на самом деле являются артефактом, связанным, в первую очередь, со слиянием трансплантированных стволовых клеток с клетками-аборигенами (Joshi et al., 2002; Ying et al., 2002; Terado et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003). И хотя вопрос о пластичности взрослых стволовых клеток в настоящее время остается открытым, очевидно, что возможности дифференцировки стволовых клеток, выделенных из взрослых организмов, ограничены и терапевтический потенциал этих клеток ниже, чем у ЭСК, которые способны дифференцироваться в любой тип клеток и очень удобны для сочетания клеточной терапии с генной.

Альтернативные пути, несомненно, нужно разрабатывать, но достижения последних лет по разработке этой проблемы на животных и человеке указывают, что терапевтическое клонирование в перспективе станет одним из главных направлений в клеточной терапии. Возможно, в сочетании с генной терапией оно будет использоваться для лечения наследственных заболеваний.

Перспективы развития терапевтического клонирования в нашей стране. К настоящему моменту ведущие зарубежные ученые, многие лаборатории мира сосредоточивают свои усилия на развитии технологии терапевтического клонирования, хорошо понимая, что это одно из самых прогрессивных биомедицинских направлений. В нашей стране, к сожалению, уделяется очень мало внимания этой проблеме, несмотря на жизненную важность и актуальность ее развития. Отечественная медицина должна иметь возможность использовать достижения терапевтического клонирования в заместительной клеточной терапии на всех ее ключевых этапах непосредственно в своих клиниках и больницах.

Очевидно, что работы в данном направлении пока должны проводиться на модельных объектах. Ранее выполненные исследования показывают, что наиболее удачной и адекватной моделью для изучения проблем терапевтического клонирования и разработки соответствующих биотехнологий для заместительной клеточной терапии является реконструкция зародышей мышей с ядрами соматических клеток. В Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН в лаборатории биофизики клетки и межклеточных взаимодействий накоплен уникальный опыт исследований по трансплантации ядер и реконструкции зародышей (Свиридова и соавт., 1987, 1987, 1989, 2005; Чайлахян и соавт., 1987, 2001, 2003, 2005; Галат и соавт., 1999).

Терапевтическое клонирование является комплексной мультидисциплинарной проблемой, фокусирующей множество как фундаментальных, так и биотехнологических задач. Терапевтическое клонирование является основой для развития заместительной клеточной терапии, которая должна опираться на строгую и глубокую идеологию фундаментальной науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gurdon J.B. Nuclear transplantation in Amphibian and the importance of stable nuclear changes in cellular differentiation. *Rev. Biol.*, 1963, 38: 54-78.
2. Wilmut, I., Schneider, A.E., Chirr, J., Kind, A.J. Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-813.
3. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145-1147.
4. Shambloott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95.
5. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *New Eng. J. Med.*, 2003, 349: 275-86.
6. Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat. Rev. Genet.*, 2000, 1: 199-207.
7. Rideout W.M., Eggan K., Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293: 1093-1098.
8. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2002, 14: 741-748.9.
9. Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H. et al. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat. Med.*, 2002, 8: 262-267.
10. Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, et al. Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet.*, 2002, 30: 253-254.
11. Bortvin A., Eggan K., Skaletsky H. et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*, 2003, 130: 1673-1680.
12. Boiani M., Eckardt S., Scholer H.R., McLaughlin K.J. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes. Dev.*, 2002, 16: 1209-1219.
13. Kang Y.K., Koo D.B., Park J.S. et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.*, 2001, 28: 173-177.
14. Kang Y.K., Park J.S., Koo D.B. et al. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J.*, 2002, 21: 1092-1100.
15. Dean W., Santos F., Stojkovic M. et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2001, 98: 13734-13738.
16. Buehr M., Nichols J., Stenhouse F. et al. Rapid loss of oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocyst and derivative cell lines. *Biol. Reprod.*, 2003; 68: 222-229.
17. Munsie M.J., Michalska A.E., O'Brien C.M., Trounson A.O., Pera M.F., Mountford P.S. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr. Biol.*, 2000, 10: 989-92
18. Wakayama T., Tabar V., Rdrigues I., Perry A.C., Studer I., Mombaets P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*, 2001, 297: 740-3.
19. Hochedlinger K., Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, 415: 1035-8.
20. Hochedlinger K., Kyba M., Daley G.Q., Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, 2002, 109: 17-27.
21. Simerli C., Dominko T., Navara Ch., Payne Ch., Capuanu S., Gosman G., Chong K.-Yu., Takahashi, Chace C., Compton D., Hewiston L., Schatten G. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science*, 2003, 300: 297.
22. Ying Chen, Zhi Xu He, Ailian Liu, Kai Wang, Wen Wei Mao, Jian Xin Chu, Yong Lu, Zheng Fu Fang, Ying Tang Shi, Qing zhang Yang, Da Yuan Chen, Min Kang Wang, Jin sng Li, Shao Liang Huang, Xiang Yin Kong, Yao Zhoi Shi, Zhi Qiang Wang, Jia Hui Xia, Zhi Gao Xue, Wen Xiang Ding, Hui Zhen Sheng. Embryonic stem cell generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Research*, 2003, 13(4): 251-263
23. Woo Suk Hwang., Young June Ryu., Jong Hyuk Park, Eu Gene Lee, Ja mMin Koo, Hyun Yong Chun, Byeong Chun Lee, Sung Keun Kang, Sun Jong Kim, Curie Ahn Jung Hye Hwang, Ky Young Park, Jose B. Cibelli, Shin Yong Moon. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 2004, 12.

24. Woo Suk Hwang W.S. Roh S.I., Lee B.C. et al. (2005). Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. Scienceexpress/www.scienceexpress.org/19 May 2005/Page 1/10.11.1126/science. 1112286
25. Izhak Kehat, Leonid Khimovich, Oren Caspi, Amira Gepstein, Rona Shofti, Gil Arbel, Irit Huber, Jonathan Satin, Joseph Itskovitz-Eldor, Lior Gepstein. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Nature Biotechnology, 2004, 22: 1282 - 1289.
26. Diego Fraidenraich, Elizabeth Stillwell, Elizabeth Romero, David Wilkes, Katia Manova, Craig T. Basson, and Robert Benezra. Rescue of cardiac defects in id knockout embryos by injection of embryonic stem cells. Science, 2004, 306: 247-252.
27. Joshi C.V., Enver T. Plasticity revisited. Curr. Opin. Cell. Biol., 2002, 14:749-55.
28. Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.C. Changing potency by spontaneous fusion. Nature, 2002, 416: 545-548.
29. Terada N., Hamazaki T., Oka M. et al. Bone marrow cells adapt to the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature, 2002, 416: 542-545.
30. Vassilopoulus G., Wang P-R., Russel D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature, 2003, 422: 901-904.
31. Wang X., Willenbring N., Akkari Y., et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature, 2003, 422: 897-901
32. Свиридова Т.А., Никитин В.А., Вепринцев Б.Н., Чайлахян Л.М. Метод локального слияния пронуклеусов с энуклеированной зиготой. ДАН СССР, 1987, 295(1): 241-244.
33. Свиридова Т.А., Вепринцев Б.Н., Чайлахян Л.М. Получение химеры мышцы путем замены ядра у двухклеточного зародыша. ДАН СССР, 1987, 296(3): 749-754.
34. Чайлахян Л.М., Вепринцев Б.Н., Свиридова Т.А., Никитин В.А. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии. Биофизика, 1987, 32(5): 874-887.
35. Чайлахян Л.М., Свиридова-Чайлахян Т.А. Клеточная инженерия. Наука в России, 2001, 2: 10-15.
36. Свиридова Т.А., Вепринцев Б.Н., Чайлахян Л.М. Эффективность микрохирургического удаления ядер у ранних зародышей мышей в зависимости от времени деления дробления. Онтогенез, 1989, 20, 1: 33-39.
37. Галат В.В., Лагутина И.С., Мезина М.Н., Прокофьев М.И. Влияние сывороточного голодания на эффективность репрограммирования ядер эмбриональных фибробластов кролика. Онтогенез, 1999, 30(6): 411-416.
38. Чайлахян Т.А., Давыдова Г.А., Ковалева М.А., Селезнева И.И., Гаврилюк Б.К., Чайлахян Л.М. Исследование факторов, влияющих на выживание реконструированных зародышей мышей при пересадках ядер. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2005, 1: 47-52.
39. Чайлахян Т.А., Вихлянцева Е.Ф., Чеботарева Т.Н., Чайлахян Л.М. Среда для микрохирургических пересадок ядер у мышей. Феномен осмолярности. ДАН, 2003, 388(4): 555-557.
40. Свиридова-Чайлахян Т.А., Смольянинова Е.И., Чайлахян Л.М. Механизмы изменения внутриклеточной осмолярности в циклах деления дробления в раннем эмбриогенезе мышей. ДАН, 2005, 404(4): 555-558.
41. Свиридова-Чайлахян Т.А., Чайлахян Л.М. Реконструкция зародышей мышей как адекватная модель для разработки основ терапевтического клонирования. ДАН, 2005, 404(3): 422-424.

Basic biotechnological problems in therapeutic cloning

L.M. Chailachyan

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,
Russian Academy of Sciences*

The first report about therapeutic cloning of mouse was published in 2000 year. The main tendency in this field of research is the establishment of cloned blastocysts and, thereafter, the lines of reconstructed stem cells. Approximately 50 lines of reconstructed stem cells are obtained at present time. In many laboratories they are identified as pluripotent cells which, in definite conditions, can be maintained in non differentiated state during indefinitely long time. The various differentiated cells obtained from these lines are by now used in animal models as therapeutic means. Experimental approaches to cloning human have been discussed since 2003 year. The recent progress in this research area suggest that therapeutic cloning in perspective will be the one of the main methods of cell therapeutics. In conjunction with gene therapeutics, this method, possibly, will be used in medical treatment of hereditary defects.

Key words: stem cells, animal cloning, cell therapeutics

Prob. Prod. Anim. Biol., 2007, 1: 113-122