**Биотехнология**

*Лекция*

**1. Использование микроорганизмов в различных отраслях народного хозяйства**

 Традиционная селекция микроорганизмов (в основном бактерий и грибов) основана на экспериментальном мутагенезе и отборе наиболее продуктивных штаммов. Но и здесь есть свои особенности. Геном бактерий гаплоидный, любые мутации проявляются уже в первом поколении. Хотя вероятность естественного возникновения мутаций такая же кА и у остальных организмов, но очень высокая интенсивность размножения дает возможность найти полезную мутацию по интересующему исследователя гену. В результате искусственного мутагенеза и отбора была повышена продуктивность штаммов гриба пеницилла более чем в 1000 раз. Продукты микробиологической промышленности используются в хлебопечении, пивоварении/, виноделии, приготовлении многих молочных продуктов. С помощью микробиологической промышленности получают антибиотики, аминокислоты, белки, гормоны, различные ферменты, витамины и многое другое. Микроорганизмы используют для очистки сточных вод, улучшения качества почвы. В настоящее время разработаны методы получения марганца, меди, хрома при разработке отвалов старых рудников с помощью бактерий, где остальные методы добычи экономически не выгодны.

**2. Биотехнология**

 *Биотехнология* – использование живых организмов и их биологических процессов в производстве необходимых человеку веществ. Объектами биотехнологии являются бактерии, грибы, клетки растительных и животных тканей. Их выращивают на питательных средах в специальных биореакторах. С развитием биотехнологии связывают решение глобальных проблем человечества — ликвидацию нехватки продовольствия, энергии, минеральных ресурсов, улучшение состояния здравоохранения и качества окружающей среды.

 С древнейших времен человек использовал биотехнологические процессы при хлебопечении, приготовлении кисломолочных продуктов, в виноделии и т. п., но лишь благодаря работам Л. Пастера в середине 19 в., доказавшего связь процессов брожения с деятельностью микроорганизмов, традиционная биотехнология получила научную основу. В 40-50-е годы 20 в., когда был осуществлен биосинтез пенициллинов методами ферментации, началась эра антибиотиков, давшая толчок развитию микробиологического синтеза и созданию микробиологической промышленности. В 60-70-е гг. 20 в. начала бурно развиваться клеточная инженерия. С созданием в 1972 группой П. Берга в США первой гибридной молекулы ДНК in vitro формально связано рождение генетической инженерии, открывшей путь к сознательному изменению генетической структуры организмов таким образом, чтобы эти организмы могли производить необходимые человеку продукты и осуществлять необходимые процессы. Эти два направления определили облик новой биотехнологии, имеющей мало общего с той примитивной биотехнологией, которую человек использовал в течение тысячелетий. Показательно, что в 70-е гг. получил распространение и сам термин «биотехнология». С этого времени биотехнология неразрывно связана с молекулярной и клеточной биологией, молекулярной генетикой, биохимией и биоорганической химией. За краткий период своего развития (25-30 лет) современная биотехнология не только добилась существенных успехов, но и продемонстрировала неограниченные возможности использования организмов и биологических процессов в различных отраслях производства и народного хозяйства.

 В медицине биотехнологические приемы и методы играют ведущую роль при создании новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов, предназначенных для ранней диагностики и лечения различных заболеваний. Антибиотики — самый большой класс фармацевтических соединений, получение которых осуществляется с помощью микробиологического синтеза. Созданы генноинженерные штаммы кишечной палочки, дрожжей, культивируемых клеток млекопитающих и насекомых, используемые для получения ростового гормона, инсулина и интерферона человека, различных ферментов и противовирусных вакцин. Изменяя нуклеотидную последовательность в генах, кодирующих соответствующие белки, оптимизируют структуру ферментов, гормонов и антигенов (так наз. белковая инженерия). Важнейшим открытием явилась разработанная в 1975 Г. Келером и С. Мильштейном техника использования гибридом для получения моноклональных антител желаемой специфичности. Моноклональные антитела используют как уникальные реагенты, для диагностики и лечения различных заболеваний.

 Вклад биотехнологии в сельскохозяйственное производство заключается в облегчении традиционных методов селекции растений и животных и разработке новых технологий, позволяющих повысить эффективность сельского хозяйства. Во многих странах методами генетической и клеточной инженерии созданы высокопродуктивные и устойчивые к вредителям, болезням, гербицидам сорта сельскохозяйственных растений. Разработана техника оздоровления растений от накопленных инфекций, что особенно важно для вегетативно размножаемых культур (картофель и др.). Как одна из важнейших проблем биотехнологии во всем мире широко исследуется возможность управления процессом азотфиксации, в том числе возможность введения генов азотфиксации в геном полезных растений, а также процессом фотосинтеза. Ведутся исследования по улучшению аминокислотного состава растительных белков. Разрабатываются новые регуляторы роста растений, микробиологические средства защиты растений от болезней и вредителей, бактериальные удобрения. Генноинженерные вакцины, сыворотки, моноклональные антитела используют для профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных. В создании более эффективных технологий племенного дела применяют генноинженерный гормон роста, а также технику трансплантации и микроманипуляций на эмбрионах домашних животных. Для повышения продуктивности животных используют кормовой белок, полученный микробиологическим синтезом.

 Биотехнологические процессы с использованием микроорганизмов и ферментов уже на современном техническом уровне широко применяют в пищевой промышленности. Промышленное выращивание микроорганизмов, растительных и животных клеток используют для получения многих ценных соединений — ферментов, гормонов, аминокислот, витаминов, антибиотиков, метанола, органических кислот (уксусной, лимонной, молочной) и т. д. С помощью микроорганизмов проводят биотрансформацию одних органических соединений в другие (например, сорбита во фруктозу). Широкое применение в различных производствах получили иммобилизованные ферменты. Для выделения биологически активных веществ из сложных смесей используют моноклональные антитела. А. С. Спириным в 1985-88 разработаны принципы бесклеточного синтеза белка, когда вместо клеток применяются специальные биореакторы, содержащие необходимый набор очищенных клеточных компонентов. Этот метод позволяет получать разные типы белков и может быть эффективным в производстве. Многие промышленные технологии заменяются технологиями, использующими ферменты и микроорганизмы. Таковы биотехнологические методы переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, очистки и использования сточных вод для получения биогаза и удобрений. В ряде стран с помощью микроорганизмов получают этиловый спирт, который используют как горючее для автомобилей (в Бразилии, где топливный спирт широко применяется, его получают из сахарного тростника и других растений). На способности различных бактерий переводить металлы в растворимые соединения или накапливать их в себе основано извлечение многих металлов из бедных руд или сточных вод.

 Дальнейший прогресс человечества во многом связан с развитием биотехнологии. Вместе с тем необходимо учитывать, что неконтролируемое распространение генноинженерных живых организмов и продуктов может нарушить биологический баланс в природе и представлять угрозу здоровью человека.

**3. Клеточная и генная инженерия.**

 Новыми методами селекции микроорганизмов, растений и животных являются клеточная, хромосомная и генная инженерия.

 *Генная инженерия* основана на выделении нужного гена из генома одного организма и введение его в геном другого организма. «Вырезание» генов проводят с помощью специальных «генетических ножниц», ферментов-рестриктаз, затем ген «вшивают» в вектор-плазмиду, с помощью которого ген вводится в бактерию. «Вшивание» осуществляется с помощью лигаз. Вектор должен содержать промотор, терминатор, ген-оператор, ген-регулятор и маркерные гены. Отбираются те бактерии, у которых введенные гены работают успешно. Излюбленный объект генных инженеров – кишечная палочка. С ее помощью получают гормон роста, инсулин, интерфероны. Второй путь – синтез гена искусственным путем. Для этого используются и-РНК, с помощью обратной транскриптазы на и-РНК синтезируется ДНК. Растения и животные, геном которых изменении в результате таких операций, получили название трансгенных. Годом рождения генной инженерии считается 1972г., когда в лаборатории Пола Берга в США была получена первая рекомбинантная ДНК. Благодаря генной инженерии были получены растения картофеля, томатов, табака, устойчивые к разнообразным вредителям. В июле 1996г. был принят закон «О генно-инженерной деятельности в России», который определил правила работы по созданию гибридных ДНК.

 Направления генной инженерии:

* Производство лекарств нового поколения, представляющих собой биологически активные белки человека. Таким образом получают интерферон, инсулин, гормон роста, эритропоэтин. В настоящее время в мире применяются более 30 препаратов и боле 200 находятся в клинических испытаниях.
* Генная терапия – использование рекомбинантных белков человека.
* Биокатализ – получение акриламида из акрилонитрила с использованием микроорганизмов. Процесс идет при комнатной температуре, не имеет отходов, экологически чист. Получаемый акриламид имеет высокую степень чистоты, что важно для дальнейшей полимеризации.
* Получение биоматериалов. В 1995г. гены, ответственные за синтез паучьего шелка перенесли в микроорганизмы, сырьем для которых служат крахмал, патока. Единственная проблема – превращение аморфного белка в тонкие нити. Тот же ген был пересажен овцам, белок выделяется с молоком, превращается в порошок, затем растворяется специальным растворителем, и вытягиваются нити.

 *Хромосомная инженерия* основана на введении в генотип растительного организма пары чужих гомологичных хромосом, контролирующих развитие нужных признаков, или замещение одной пары гомологичных хромосом на другую. На этом основаны методы получения замещенных и дополненных линий, с помощью которых в растениях собираются признаки, приближающие к созданию «идеального сорта». Очень перспективен метод гаплоидов, основаны на выращивании гаплоидных растений с последующим удвоением хромосом. Этот метод позволяет за 2-3 года получить чистую линию вместо 6-8 лет инбридинга (кукуруза). Сюда же можно отнести и получение полиплоидных растений.

 *Клеточная инженерия* связана с культивированием отдельных клеток в питательных средах, где они образуют клеточные культуры. Оказалось, что клетки растений и животных, помещенные в питательную среду, содержащую все необходимые для жизнедеятельности вещества, способны делиться. Клетки растений обладают тотипотентностью, т.е. при определенных условиях они способны сформировать полноценное растение.

 Это дает возможность с помощью клеточных культур получать ценные вещества (женьшень).

 Выращиваемые на искусственных питательных средах клетки и ткани растений составляют основу разнообразных технологий в сельском хозяйстве. Одни из них направлены на получение идентичных исходной форме растений (оздоровление и размножение на основе меристемных культур, создание искусственных семян, криосохранение генофонда при глубоком замораживании меристем и клеток пыльцы). Другие — на создание растений, генетически отличных от исходных, путем или облегчения и ускорения традиционного селекционного процесса или создания генетического разнообразия и поиска и отбора генотипов с ценными признаками. В первом случае используют искусственное оплодотворение, культуру незрелых гибридных семяпочек и зародышей, регенерацию растений из тканей летальных гибридов, гаплоидные растения, полученные при культивировании пыльников или микроспор. Во втором — новые формы растений создаются на основе мутантов, образующихся in vitro, и трансгенных растений. Таким путем получены растения, устойчивые к вирусам и другим патогенам, гербицидам, растения, способные синтезировать токсины, патогенные для насекомых-вредителей, растения с чужеродными генами, контролирующими синтез белков холодоустойчивости и белков с улучшенным аминокислотным составом, растения с измененным балансом фитогормонов и т. д. Так можно размножать редкие и ценные растения (безвирусный картофель).

 Гибридизация клеток (слияние протопластов картофеля и томата, яблоня и вишни, лимфоцитов и раковых клеток). В основе метода лежит слияние клеток, в результате чего образуются гетерокарионы, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам. В 1965 английский ученый Г. Харрис впервые получил гетерокарионы, образованные клетками мыши и человека. Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам и даже между растительными и животными клетками. Гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследовании механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления (экспрессивности) отдельных генов, клеточного деления, в картировании генов в хромосомах человека, в анализе причин злокачественного перерождения клеток. С помощью этого метода созданы гибридомы, используемые для получения моноклональных (однородных) антител. Первый межвидовой гибрид при слиянии протопластов из клеток разных видов табака был получен в 1972 П. Карлсоном (США). Гибриды, полученные при слиянии протопластов, имеют важные отличия от половых гибридов, поскольку несут цитоплазму обоих родителей. Возможно создание гибридов, наследующих ядерные гены одного из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей. Особый интерес представляют гибриды растений, несущие цитоплазматические гены устойчивости к различным патогенам и стрессорным факторам от дикорастущих видов или цитоплазматические гены мужской стерильности. Слияние протопластов используют также для получения гибридов с ценными в хозяйственном отношении свойствами между отдаленными видами, которые плохо или вообще не скрещиваются обычным путем. Удалось, например, «ресинтезировать» рапс, являющийся естественным амфидиплоидом между турнепсом и капустой, получить соматический гибрид картофеля с томатами и т. д. При слиянии протопластов создают и новые клеточные линии-продуценты важных соединений.

 Пересадка ядер соматических клеток в яйцеклетки. Клонирование животных.

 Слияние эмбрионов на ранних стадиях, создание химерных животных (химерные мыши, овца-коза). Важную роль в животноводстве сыграла разработка методов длительного хранения спермы в замороженном состоянии и искусственного осеменения. Реально же развернулись исследования по клеточной и генной инженерии на млекопитающих только с освоением техники оплодотворения in vitro, обеспечившей получение достаточного количества зародышей на ранних стадиях развития. Генетическое улучшение животных связано с разработкой технологии трансплантации эмбрионов и методов микроманипуляций с ними (получение однояйцовых близнецов, межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных, клонирование животных при пересадке ядер эмбриональных клеток в энуклеированные, т. е. с удаленным ядром, яйцеклетки). В 1996 шотландским ученым из Эдинбурга впервые удалось получить овцу из энуклеированной яйцеклетки, в которую было пересажено ядро соматической клетки (вымени) взрослого животного. Эта работа открывает широкие перспективы в области клонирования животных и принципиальную возможность клонирования в будущем и человека. В этой же лаборатории было получено еще пять клонированных ягнят, в геном одного из которых был встроен ген белка человека.

 Реконструкция клеток. Одним из способов модификации клеток является введение в них индивидуальных генов, т.е. метод генетической инженерии. Встраивание активного гена на место отсутствующего или поврежденного открывает путь для лечения генетических заболеваний человека. Изменять свойства клеток можно, вводя клеточные органеллы (ядра, хлоропласты), изолированные из одних клеток, в протопласты других клеток. Так, одним из путей активизации фотосинтеза растительной клетки может служить введение в нее высокоэффективных хлоропластов. Искусственные ассоциации растительных клеток с микроорганизмами используют для моделирования на клеточном уровне природных симбиотических отношений, играющих важную роль в обеспечении растений азотным питанием в природных экосистемах. Рассматривается возможность придания растениям способности к фиксации молекулярного азота при введении в них целых клеток азотфиксирующих микроорганизмов. Реконструкцию клеток проводят также при слиянии клеточных фрагментов (безъядерных, кариопластов с ядром, микроклеток, содержащих лишь часть генома интактной клетки) друг с другом или с интактными (неповрежденными) клетками. В результате получают клетки с различными свойствами, например, гибриды, либо клетки с ядром и цитоплазмой от разных родителей. Такие конструкции используют для изучения влияния цитоплазмы в регуляции активности ядра.

**4. Трансгенные организмы**

 Генетическое модифицирование сельского хозяйства основано на использовании высокопродуктивных сортов растений и пород животных, полученных на основе генетической селекции. Генная инженерия расширила возможности селекции. Это позволило решить одну из важнейших проблем современности – повышение качества и увеличение количества продуктов питания.

 Первыми коммерческими трансгенами стали помидоры, появившиеся в супермаркетах США. Однако через три года их сняли с продаж из-за проблем с производством и транспортировкой. Затем были получены и другие ГМ-продукты. Среди них наиболее распространена соя (коммерческое выращивание с 1995 г.), она составляет более половина от общего урожая; на втором месте – кукуруза, а за ними – хлопок, масличный рапс, табак и картофель. Мировые лидеры в выращивании трансгенных растений – США, Аргентина, Канада и Китай. К 1998 г. в 45 странах было проведено более 25 тыс. полевых испытаний 60 различных сельскохозяйственных культур. В 1997 г. площадь, занятая под посевами трансгенных культур, в мире увеличилась в 4,5 раза по сравнению с 1996 г. В 1998 г. площадь посевов составила более 30 млн. га. В России существуют несколько экспериментальных «закрытых» полей с ГМ-культурами. Там выращиваются сорта картофеля, устойчивого к колорадскому жуку.

 ГМ-продукты используются для производства, как продуктов питания, так и пищевых добавок. Из сои получают соевое молоко, которое заменяет натуральное для многих грудных детей. ГМ-сырье обеспечивает большую часть потребности в растительном масле и пищевом белке. Соевый лецитин (Е322) используют как эмульгатор и стабилизатор в кондитерской промышленности, а шкурки соевых бобов – при производстве отрубей, хлопьев и закусок. В пищевой промышленности ГМ-соя широко применяется в качестве дешевого наполнителя (Хлеб, колбаса, шоколад). Модифицированные картофель и кукурузу используют для приготовления чипсов, перерабатывают на крахмал, применяемый в качестве загустителей, студнеобразователей и желирующих веществ в кондитерской и хлебопекарной промышленности, при производстве соусов, кетчупов, майонезов. Кукурузное и рапсовое масло используют в виде добавок в маргарин, выпечку, бисквиты.

 Несмотря на положительные аргументы у новой технологии нашлось немало противников. Основная причина в том, что в рамках традиционной селекции скрещивание проводилось между сортами одного или нескольких близких видов, а генно-инженерные манипуляции перемещают гены одних видов в другие и нарушают все установленные природой границы между живыми организмами. Такая пересадка генов приводит к появлению принципиально новых форм растений с измененной программой наследственности, в клетках которых непредсказуемо могут начать синтезироваться какие-либо опасные для здоровья человека вещества (токсины, аллергены). Это изменит свойства самих сельскохозяйственных растений и продуктов, получаемых из них. Опасения вызывает и то, что генно-инженерная технология несовершенна и процесс встраивания нового гена недостаточно точен. В связи с этим невозможно достоверно предвидеть его местоположение в геноме клетки хозяина. «Новый» ген может оказаться рядом с любым геном или даже внутри него, мешая функционированию и регуляции последнего. Непредсказуемые побочные эффекты могут быть связаны с множественным действием гена, действием на процесс развития организма (гены красного цвета, перенесенные в цветки петунии, вызвали не только изменение окраски лепестков венчика, но и изменили рост корней и листьев растения). Разговоры о том, что модифицированные продукты помогут накормить человечество, оппоненты опровергают данными, свидетельствующими о том, что они не обладают какой-либо пищевой ценностью или таковая незначительна. Серьезных результатов в борьбе с голодом в развивающихся странах с их помощью до сих пор не достигнуто. Подобные продукты скорее удовлетворяют чисто коммерческие интересы. Не позволят они сократить и применение пестицидов. Наоборот, их будут употреблять больше, т.к. устойчивые к ядохимикатам растения перестали их «бояться», а значит, нет ограничений для применения.

 Трансгенные животные, экспериментально полученные животные, содержащие во всех клетках своего организма дополнительную интегрированную с хромосомами и экспрессирующуюся чужеродную ДНК (трансген), которая передается по наследству по законам Менделя. Получение трансгенных животных осуществляется с помощью переноса клонированных генов (ДНК) в ядра оплодотворенных яйцеклеток (зигот) или эмбриональных стволовых клеток. Затем в репродуктивные органы реципиентной самки пересаживают модифицированные зиготы или яйцеклетки, у которых собственное ядро заменено на модифицированное ядро эмбриональных стволовых клеток, либо бластоцисты (эмбрионы), содержащие чужеродную ДНК эмбриональных стволовых клеток. Имеются отдельные сообщения об использовании спермиев для создания трансгенных животных, однако этот прием пока не получил широкого распространения.

 Первые трансгенные животные были получены в 1974 в Кембридже (США) Рудольфом Янишем в результате инъекции в эмбрион мыши ДНК вируса обезьяны SV40. В 1980 американским ученым Жоржем Гордоном с соавторами было предложено использовать для создания трансгенных животных микроинъекцию ДНК в пронуклеус зиготы. Именно этот подход положил начало широкому распространению технологии получения трансгенных животных. Первые трансгенные животные в России появились в 1982г. В 1985 в США были получены первые трансгенные сельскохозяйственные животные (кролик, овца, свинья). В настоящее время для создания трансгенных животных, кроме микроинъекций, используются другие экспериментальные приемы: инфицирование клеток рекомбинантными вирусами, электропорация, «обстрел» клеток металлическими частицами с нанесенными на их поверхности рекомбинантными ДНК.

 В последние годы в результате появления технологии клонирования животных возникли дополнительные возможности для создания трансгенных животных. Уже есть трансгенные животные, полученные с помощью микроинъекции генов в ядра дифференцированных клеток. Все имеющиеся методы переноса генов пока еще не очень эффективны. Для получения одного трансгенного животного в среднем необходимы микроинъекции ДНК в 40 зигот мышей, 90 зигот козы, 100 зигот свиньи, 110 зигот овцы и в 1600 зигот коровы. Технология создания трансгенных животных является одной из наиболее бурно развивающихся биотехнологий в последние 10 лет. Трансгенные животные широко используются как для решения большого числа теоретических задач, так и в практических целях для биомедицины и сельского хозяйства. Некоторые научные проблемы не могли бы быть решены без создания трансгенных животных. На модели трансгенных лабораторных животных проводятся широкие исследования по изучению функции различных генов, регуляции их экспрессии, фенотипическому проявлению генов, инсерционному мутагенезу и др. Трансгенные животные важны для различных биомедицинских исследований. Существует множество трансгенных животных, моделирующих различные заболевания человека (рак, атеросклероз, ожирение и др.). Так, получение трансгенных свиней с измененной экспрессией генов, определяющих отторжение органов, позволит использовать этих животных для ксенотрансплантации (пересадки органов свиньи человеку). В практических целях трансгенные животные используются различными зарубежными фирмами как коммерческие биореакторы, обеспечивающие производство разнообразных медицинских препаратов (антибиотиков, факторов свертываемости крови и др.). Кроме того, перенос новых генов позволяет получать трансгенных животных, отличающихся повышенными продуктивными свойствами (например, усиление роста шерсти у овец, понижение содержания жировой ткани у свиней, изменение свойств молока) или устойчивостью к различным заболеваниям, вызываемым вирусами и другими патогенами. В настоящее время человечество уже использует множество продуктов, получаемых с помощью трансгенных животных: медицинские препараты, органы, пища.

**5. Клонирование животных**

 Пожалуй, ни одно из достижений биологической науки не вызывало такого накала страстей в обществе, как клонирование млекопитающих. Греческое слово «клон» означает побег, отросток. Сейчас клонами называют особи растений или животных, полученных путем бесполого размножения и имеющие полностью идентичные генотипы. Клоны очень широко распространены среди растений – все сорта вегетативно размножаемых культурных растений являются клонами.

 Для животных такой тип размножения распространен значительно меньше. Тем не менее, известно более 10 тыс. видов многоклеточных животных, размножающихся путем деления одного организма на две или даже несколько частей (аутофрагментация), которые вырастают в полноценные организмы. Эти новые организмы также являются клонами. Естественные клоны, возникающие путем обособления части клеток организма и развития из них полноценной особи, характерны не только для таких примитивных животных, как губки или кишечнополостные. Даже достаточно высокоорганизованные морские звезды и черви могут размножаться делением. А вот позвоночные или насекомые такой способности лишены. И все же клоны, возникшие естественным путем, встречаются и у млекопитающих – это монозиготные близнецы.

 Клонированием называют искусственное получение клонов животных. Поскольку высшие животные не могут размножаться вегетативно, то для получения клона можно в принципе воспользоваться тремя методами:

удвоить набор хромосом в неоплодотворенной яйцеклетке, получив таким образом диплоидную клетку, и заставить ее развиваться без оплодотворения;

искусственно получить монозиготных близнецов, разделив начавший развиваться эмбрион;

удалить ядро из яйцеклетки, заменив его на диплоидное ядро соматической клетки, и тоже заставить развиваться такую «зиготу».

 Все эти три возможности ученые использовали для клонирования животных.

 Первый способ удается применить не для всех животных. Еще в 30-е гг. ХХ в. Б.Л. Астаурову удалось с помощью термического воздействия активировать неоплодотворенное яйцо тутового шелкопряда к развитию, блокировав при этом прохождение первого деления мейоза, ядро оставалось диплоидным. Развитие такой диплоидной яйцеклетки заканчивалось вылуплением личинок, точно повторяющих генотип матери. естественно, получались только самки. К сожалению, разводить самок экономически невыгодно, т.к. при большой затрате корма они дают коконы худшего качества.

 В.А. Струнников усовершенствовал этот метод, разработав способ получения клонов тутового шелкопряда, состоящих только из особей мужского пола. Для этого на ядро яйцеклетки воздействовали гамма-лучами и высокой температурой. Ядро становилось неспособным к оплодотворению. Ядро сперматозоида, проникшего в такое яйцо, удваивалось и приступало к делению. Развивался самец, повторявший генотип отца. Правда, полученные клоны для промышленного шелководства непригодны, но их используют в селекции для получения эффекта гетерозиса. Это позволяет резко ускорить и облегчить получение выдающегося по продуктивности потомства. Однако, данный метод оказался не пригодным для клонирования млекопитающих. Оказалось, что для нормального развития зародыша млекопитающих необходимы два разных генома – материнский и отцовский. Дело в том, что при формировании половых клеток имеет место явление выключения отдельных генов, сохраняющееся всю жизнь. Поскольку в мужских и женских половых клетках выключаются разные гены, то для нормального развития организма нужны оба генома – одна работающая копия гена должна быть.

 Второй метод – разделение эмбриона на ранних стадиях дробления – в эмбриологии используется очень давно, правда, в основном на морских ежах и лягушках. Именно использование этого метода позволило говорить о способности выделенных из зародыша бластомеров давать начало полноценному организму. Искусственное разделение эмбрионов и последующая их имплантация «суррогатным матерям» уже применяется в селекции сельскохозяйственных животных для получения большого числа потомков от особо ценных родителей. В 1999г. таким способом клонировали обезьяну. Оплодотворение было произведено в пробирке. Зародыш на стадии 8 клеток разделили на 4 части, и каждую часть имплантировали в матку другой обезьяны. Три зародыша не развились, а из четвертого родилась обезьянка, которую назвали Тетра (Четвертинка).

 Самое знаменитое клонированное животное, овечка Долли, была получена с помощью третьего метода – переноса генетического материала соматической клетки в яйцеклетку, лишенную собственного ядра. Метод пересадки ядер был разработан еще в 40-х гг. ХХ в. русским эмбриологом Г.В. Лопашовым, работавшим с яйцеклетками лягушки. Правда, взрослых лягушек он не получил. Позднее Дж. Гёрдону удалось заставить яйцеклетки лягушки с чужим ядром развиваться до взрослых особей. Это было выдающееся достижение – ведь он пересаживал в яйцеклетку ядра дифференцированных клеток взрослого организма. Ученый использовал клетки плавательной перепонки и клеток эпителия кишечника. Но и в этих опытах до взрослого состояния развивалось не более 2% таких яйцеклеток, причем выросшие из них лягушата отличались меньшими размерами и пониженной жизнеспособностью по сравнению с нормальными сверстниками.

 Пересадить ядро в яйцеклетку млекопитающих значительно труднее, поскольку она примерно в 1000 раз мельче, чем яйцеклетка лягушки. В 1970-х гг. в нашей стране в Институте цитологии и генетики в Новосибирске на мышах это пытался сделать Л.И. Корочкин. К сожалению, его работы не получили продолжения из-за трудностей с финансированием. Зарубежные ученые продолжили исследования, однако операция по трансплантации ядра оказалась слишком травматичной для мышиных яйцеклеток. Поэтому экспериментаторы пошли другим путем – стали просто проводить слияние яйцеклетки, лишенной собственного ядра, с целой неповрежденной соматической клеткой. Исследователи из Рослинского института в Шотландии во главе с Я. Вилмутом, клонировавшие Доли, использовали для слияния клеток электрический импульс. Они удаляли ядра из зрелых яйцеклеток, затем с помощью микропипетки вводили под оболочку яйцеклетки соматическую клетку, выделенную из молочной железы овцы. С помощью электрического удара клетки сливались, и в них стимулировалось деление. Затем, после культивирования в течение 6 дней в искусственных условиях, начавший развиваться эмбрион на стадии морулы имплантировали в матку специально подготовленной овцы другой породы (хорошо отличавшейся фенотипически от донора генетического материала). Рождение овечки Долли стало сенсацией, а у некоторых ученых возникли сомнения в том, что она действительно была клоном. Однако специально проведенные исследования ДНК показали, что Долли – настоящий клон. В дальнейшем техника клонирования млекопитающих была усовершенствована. Группе ученых из университета Гонолулу под руководством Р. Янагимачи удалось с помощью изобретенной ими микропипетки осуществить перенос ядра соматической клетки непосредственно в яйцеклетку. Это позволило обойтись без электрического импульса, далеко не безопасного для живых клеток. К настоящему времени этим методом клонированы корова, свинья, мышь, кошка, собака, лошадь, мул, обезьяна.

 Клонирование животных может иметь и практическое значение. В первую очередь клонирование высокопродуктивных домашних животных может быть использовано для получения в короткий срок больших количеств элитных коров, ценных пушных зверей, спортивных лошадей и т.д. Некоторые ученые считают, что клонирование никогда не будет широко применяться в животноводстве из-за того, что эта процедура весьма дорогая. Кроме того, условием селекции всегда было генетическое разнообразие, клонирование же, тиражируя один генотип, это разнообразие сужает. Тем не менее, поскольку половое размножение связано с рекомбинацией, разрушающей сочетания аллелей, клонирование может помочь сохранить уникальные генотипы. Клонирование путем разделения начавших дробиться эмбрионов уже сейчас используется в селекции крупного рогатого скота.

 Особые надежды ученые возлагают на клонирование диких животных, которым грозит исчезновение. Уже в настоящее время создаются «Замороженные зоопарки» - образцы клеток животных хранятся в замороженном виде при температуре жидкого азота. В Америке уже родились два детеныша быка бантенга, клонированные из клеток животного, умершего в 1980г. Его клетки были заморожены и более 20 лет хранились в жидком азоте. Клонированы также дикий бык гаур, европейский дикий баран, дикие африканские степные кошки.

 Клонирование кошек – особо интересный и важный эксперимент, проведенный в Институте природы в городе Одюбоне (США). Ученые получили два клона-самки от одной кошки – донора и один клон-самец от кота по имени Джаз. Джаз, в свою очередь, был выращен из эмбриона, в течение 20 лет хранившегося в замороженном состоянии в жидком азоте, а потом выношен и рожден обычной домашней кошкой. В 2005г. обе кошки-клоны общими усилиями родили восьмерых котят. Отцов всех восьмерых был кот-клон Джаз. Опыт показал, что клоны способны к нормальному размножению. Следует, однако, понимать, что с помощью клонирования вряд ли удастся «воскресить» исчезнувший вид. Тем не менее, это может помочь сохранить генофонд, если использовать полученные клоны в скрещиваниях с животными, содержащимися в зоопарках. Такое использование клонов может помочь избежать негативных последствий близкородственного скрещивания, неизбежного при малой численности вида.

 Безусловно, клонирование – незаменимый метод для получения трансгенных животных. В том же Рослинском институте в Эдинбурге, где родилась Доли, получены и клонированы овечки Полли и Молли. Для их клонирования использовались генетически измененные клетки, культивировавшиеся в искусственных условиях. Эти клетки, кроме обычных овечьих генов, несли человеческий ген IX фактора свертываемости крови. Этот белок выделялся вместе с молоком. Это открывает новые перспективы в лечении некоторых заболеваний человека. Многие его болезни связаны с нехваткой определенного белка – фактора свертываемости или гормона. До сего времени такие лекарства можно было получить из донорской крови. А ведь количество гормона в крови мало! Кроме того, использование препаратов крови чревато инфекционными заболеваниями – не только СПИДом, но и вирусными гепатитами, которые не менее опасны. А трансгенных животных можно тщательно отобрать и проверить, содержать их на чистейших альпийских пастбищах. Ученые подсчитали, что для того чтобы обеспечить лекарственным белком всех больных гемофилией на Земле, потребуется стадо в 35-40 коров. При этом провести трансгенез и клонирование нужно всего-то двух животным – самки и самца, а они, размножаясь естественным путем, передадут нужный ген потомству. А поскольку у самцов ген в молочной железе не работает вообще, а у самок работает только во время лактации и сразу же выводится с молоком из организма, никаких неудобств или нежелательных последствий для животных этот чужой ген не представляет. Сейчас используют в качестве таких биореакторов коз, овец, кроликов и мышей. Правда, коровы дают существенно больше молока, но и размножаются они гораздо медленнее и лактировать начинают позже.

 Несмотря на впечатляющие успехи, пока нельзя утверждать, что клонирование стало обычной лабораторной методикой. Это по-прежнему очень сложная процедура, не слишком часто приводящая к ожидаемому результату. Какие же трудности возникают при клонировании животных?

 В первую очередь низкая эффективность данного метода. Процедуры, применяемые при клонировании млекопитающих, являются весьма травмирующими для клеток. Далеко не всем клеткам удается их благополучно пережить. Не все начавшие развиваться эмбрионы доживают до рождения. Чтобы получить Долли, пришлось для получения яйцеклеток прооперировать 40 овец. Из 430 яйцеклеток удалось получить 277 диплоидных зигот, из которых 29 начали развиваться и были имплантированы суррогатным матерям. Из них до рождения дожил только один эмбрион – Долли.

 Другая серьезная проблема – здоровье родившихся клонов. Как правило, когда сообщается о рождении очередного клона, подчеркивается его отменное здоровье. Действительно, многие клонированные животные, вполне здоровые при рождении, доживали до взрослого состояния и рождали нормальных детенышей. Однако потом у них проявлялись нарушения со стороны разных систем органов. Так, Долли родилась здоровой и родила нескольких здоровых ягнят, но потом начала стремительно стареть и прожила вдвое меньше, чем обычная овца. Трансгенные Полли и Молли прожили еще меньше. Успешно размножались клонированные степные кошки. Правда, о продолжительности их жизни данных пока нет. А вот бычок гаур, также производивший при рождении впечатление здорового, прожил всего два дня из-за кишечного заболевания.

 Вопрос о здоровье клонов еще нельзя считать окончательно решенным – результаты разных исследователей противоречивы. По некоторым данным, очень многие клоны обладают слабым иммунитетом, подвержены простудным и желудочно-кишечным заболеваниям и стареют в 2-3 раза быстрее своих генетических родителей. Исследования японских ученых показали, что у клонированных мышей серьезно нарушено функционирование примерно 4% генов.

 Но, пожалуй, самым обескураживающим оказалось то, что клоны могут довольно сильно отличаться от оригинала. Еще Струнниковым на тутовом шелкопряде было установлено, что, несмотря ан одинаковые генотипы, члены одного клона оказываются непохожими по целому ряду признаков. В некоторых клонах это разнообразие оказалось даже большим, чем в обычных, генетически разнородных, популяциях. Несколько лет назад в США родилась очередная клонированная кошечка Сиси. Генетической мамой ее была трехцветная кошка Рэйнбоу. Сиси оказалась двухцветной. Различия оказались связаны с тем, что ген рыжей окраски находится в Х-хромосоме. У самок одна из Х-хромосом инактивируется в раннем эмбриогенезе, причем этот процесс случайный. У гетерозиготной кошки рыжими оказываются те клетки, где инактивирована «нерыжая» Х-хромосома. Клон был получен из соматической клетки, в которой одна из Х-хромосом («рыжая») была уже инактивирована.

 У млекопитающих в Х-хромосоме находится около 5% всех генов, и клоны могут оказаться непохожими друг на друга по достаточно большому числу признаков. Кстати, такое явление известно и для природных монозиготных близнецов (одна сестра была здорова, другая страдала гемофилией). Могут быть и другие причины непохожести клонов. Все искусственно полученные клоны развиваются не в таких условиях, как оригинал; возраст суррогатной матери, ее гормональный статус, питание и т.д. Причинами различий клона и оригинала могут быть и вариации фенотипического проявления генов, различия в геноме митохондрий, отличия в рисунке инактивации некоторых генов в эмбриогенезе, неустранимые различия ядер соматических и половых клеток.

 Еще одна проблема – клонирование человека. Именно возможность искусственного клонирования человека вызвала бурные эмоции в обществе. Количество самых полярных высказываний не поддается исчислению. Некоторые люди уже завещают сохранить их клетки в состоянии глубокого замораживания для того, чтобы, когда техника клонирования будет отработана, воскреснуть в виде клона, обеспечив себе бессмертие. Другие думают путем клонирования преодолеть бесплодие или вырастить себе «запасные части» - органы для трансплантации. Третьи хотят облагодетельствовать человечество, населив его клонами гениев. Насколько оправданы эти оценки и чаяния? Клонирование человека технически возможно. Другой вопрос – для чего? Проблему личного бессмертия можно не обсуждать. Выращивание гениев – спорный вопрос. А вот использование клонирования в медицинских целях – этот тот вопрос, который можно серьезно обсуждать.

 Предполагается, что можно использовать клонирование для преодоления бесплодия – так называемое репродуктивное клонирование. Однако, что нового может дать клонирование по сравнению с экстракорпоральным оплодотворением (дети из пробирки)? Ничего. Клонированный ребенок не будет иметь генотипа, являющегося комбинацией генотипов мужа и жены. Кроме того, эффективность клонирования невысока, значит, перспектив у репродуктивного клонирования нет. В большинстве тех стран, где технически возможно осуществление клонирования человека, репродуктивное клонирование запрещено законодательно.

 Терапевтическое клонирование предполагает получение эмбриона, выращивание его до 14-дневного возраста, а затем использование эмбриональных стволовых клеток в лечебных целях. Перспективы лечения с помощью стволовых клеток ошеломляющи – излечение многих нейродегенеративных заболеваний (болезней Альцгеймера, Паркинсона), восстановление утраченных органов, а при клонировании трансгенных клеток – лечение многих наследственных болезней. Однако, стволовые клетки можно получать другим путем. Китайские ученые создали гибридные эмбрионы путем клонирования ядер клеток кожи человека в яйцеклетках кроликов. Было получено 100 эмбрионов, которые в течение нескольких дней выращивались в искусственных условиях, а затем из них были получены стволовые клетки. Можно получить эмбриональные стволовые клетки еще более простым способом. У каждого новорожденного в его собственной пуповинной крови содержится довольно много стволовых клеток. Если эти клетки выделить, а затем хранить в замороженном виде, их можно использовать, если возникнет необходимость. Создавать банк стволовых клеток можно уже сейчас. Правда, следует иметь в виду, что стволовые клетки могут преподнести сюрпризы, в том числе и неприятные. В частности, имеются данные о том, что стволовые клетки могут принимать свойства злокачественности. Скорее всего, это связано с тем, что в искусственных условиях над ними нет жесткого контроля со стороны организма.