



Международная научно-практическая конференция молодых ученых и обучающихся
«Интеллектуальный потенциал молодых ученых как драйвер развития АПК», 19-21
марта 2024 г., г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, дом 2, литер А.



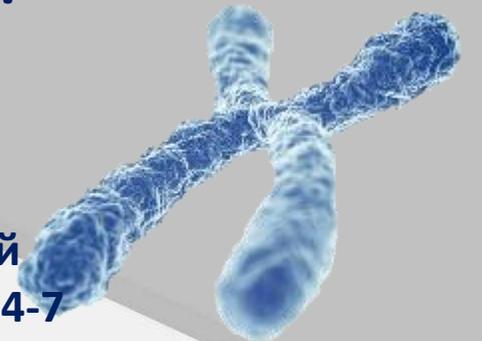
Клонирование как инструмент сохранения биоразнообразия

Аспирант: Азовцева Анастасия Ивановна

Научный руководитель: Дементьева Наталия
Викторовна, зав.лаб. молекулярной генетики
ВНИИГРЖ, в.н.с., к.б.н.



Исследование проведено в рамках выполнения научных исследований
Министерства науки и высшего образования РФ по теме № 124020200114-7
(FGGN-2024-0015)





Вспомогательные репродуктивные технологии (BPT, Assisted reproductive technologies, ARTs)



BPT

Искусственное осеменение

Трансплантация эмбрионов

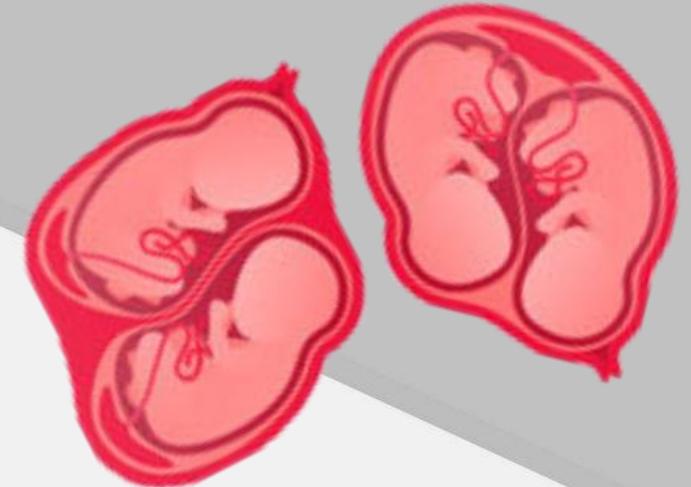
Клонирование

Клонирование как результат формирования монозиготных близнецов или расщепления эмбрионов

- **IN VITRO:** физическое разделение бластомеров на ранних стадиях расщепления – успешно проведено на мышах в 1970 г., на овцах – в 1979 г. и на КРС – в 1981 г.
- Расщепление возможно на стадиях морулы и бластоцисты, при условии, что в каждом сегменте будет присутствовать часть внутренней клеточной массы и трофобласта.



Девятиполосый броненосец (лат. *Dasypus novemcinctus*)



Клонирование – получение генетически идентичной копии организма, клетки, гена.

Базис для возникновения клонирования в биотехнологии – естественное клонирование:

- Митоз
- Партеногенез
- Монозиготные близнецы



Методологии создания клонов



Партеногенез

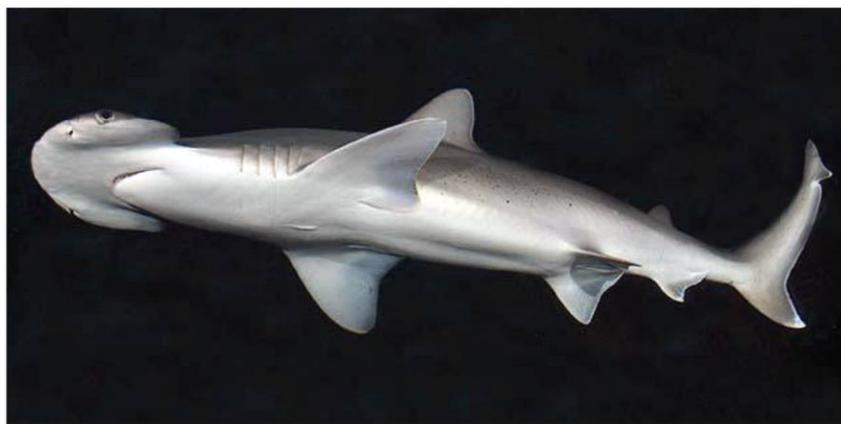
- рост и развитие эмбриона без объединения с другой гаметой.
- Наблюдается у птиц, рептилий, беспозвоночных и пластиножаберных.
- Встречается у видов с низкой плотностью популяции, в неблагоприятных условиях, а также в закрытых популяциях рептилий.
- Попытки искусственно вызвать партеногенез у млекопитающих имели ограниченный успех в получении выжившего потомства из-за проблем с геномным импринтингом.



Тутовый шелкопряд
(лат. *Bombyx mori*)



Малоголовая молот-рыба (лат. *Sphyrna tiburo*)



Обыкновенная дафния
(лат. *Daphnia pulex*)



Обыкновенная злаковая тля
(лат. *Schizaphis graminum*)

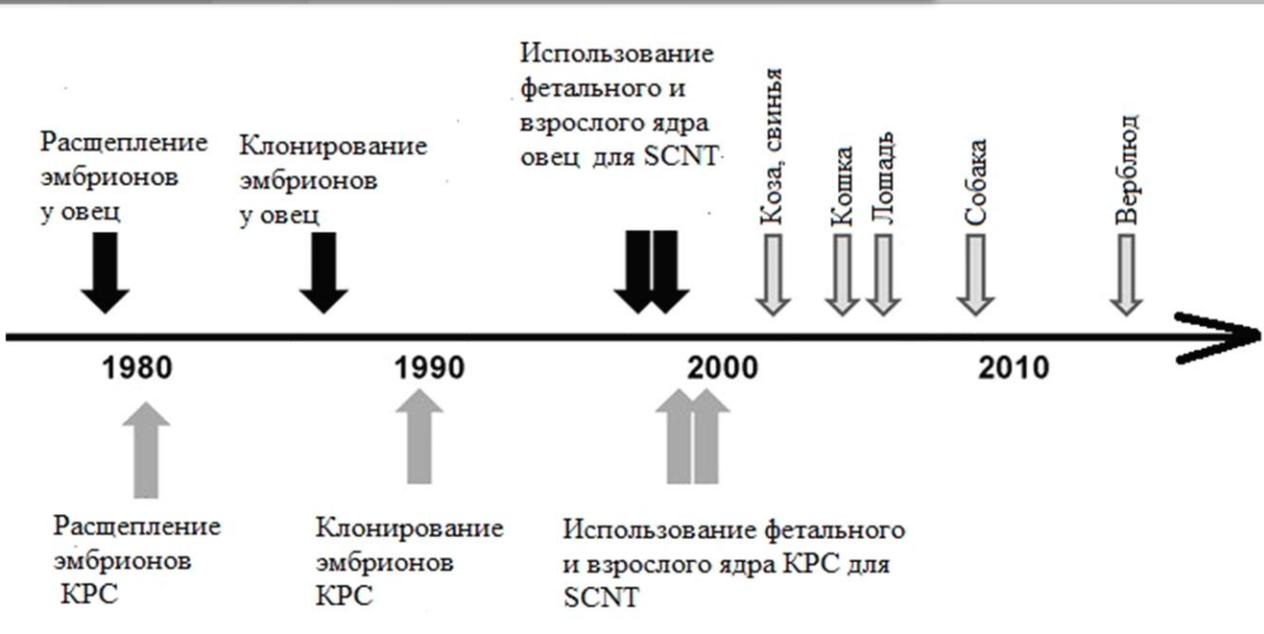


Методологии создания клонов



Перенос ядер соматически клеток (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT)

- Перенос ядра клетки молочной железы в энуклеированный ооцит – клонированная овечка Долли (1996 г).



- В настоящее время методология SCNT используется в качестве стандарта при клонировании домашних и сельскохозяйственных животных, а также в индустрии спортивных лошадей, где известен случай использования 6 клонов одной лошади для игры в поло.

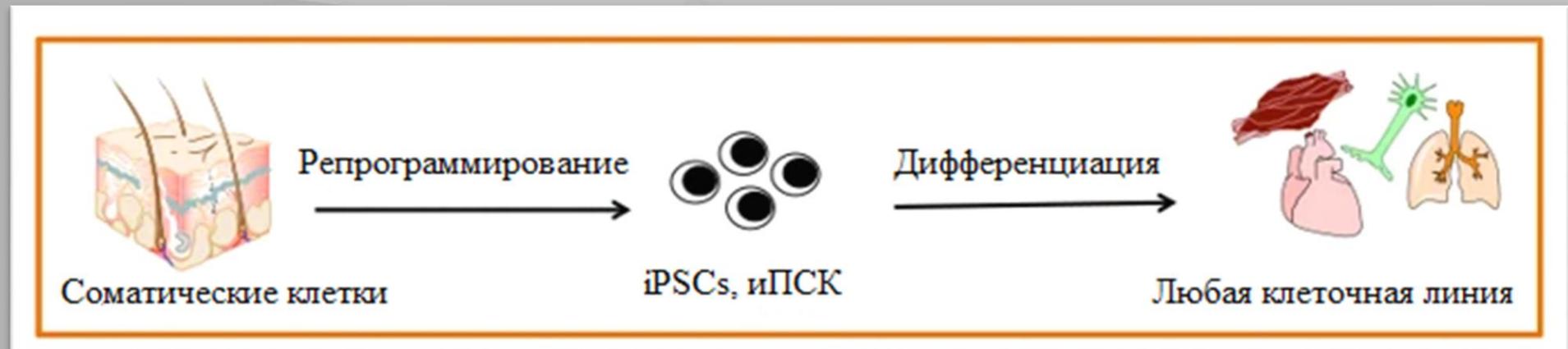
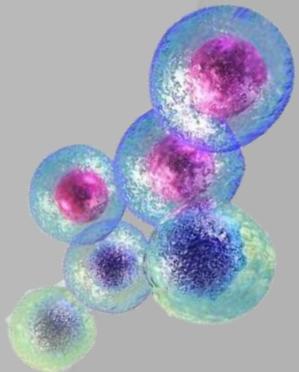
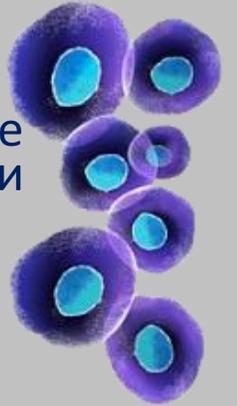


Методологии создания клонов



Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК, *induced pluripotent stem cells, iPSCs*) и тетраплоидная комплементация

- Открытие набора генов, активация которых превращает дифференцированные соматические клетки в стволовые – т.е. в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). Они могут развиваться в любую клеточную линию, и, соответственно, в целый организм.
- Подтверждение плюрипотентности iPSCs и развитие эмбриона возможно в двух случаях:
 1. перенос iPSCs в бластоцисту, у которой удалена первоначальная клеточная масса;
 2. индуцирование тетраплоидии электрическим током для слияния ядер на стадии двух клеток в одну. Эта процедура известна как тетраплоидная комплементация и она гарантирует, что в дальнейшем развитии будут участвовать только внеэмбриональные компоненты донорской бластоцисты. Эта процедура приводит к созданию животного, генетически идентичного тому, от которого получены iPSCs, поэтому может рассматриваться в качестве разновидности клонирования.





Методологии создания клонов



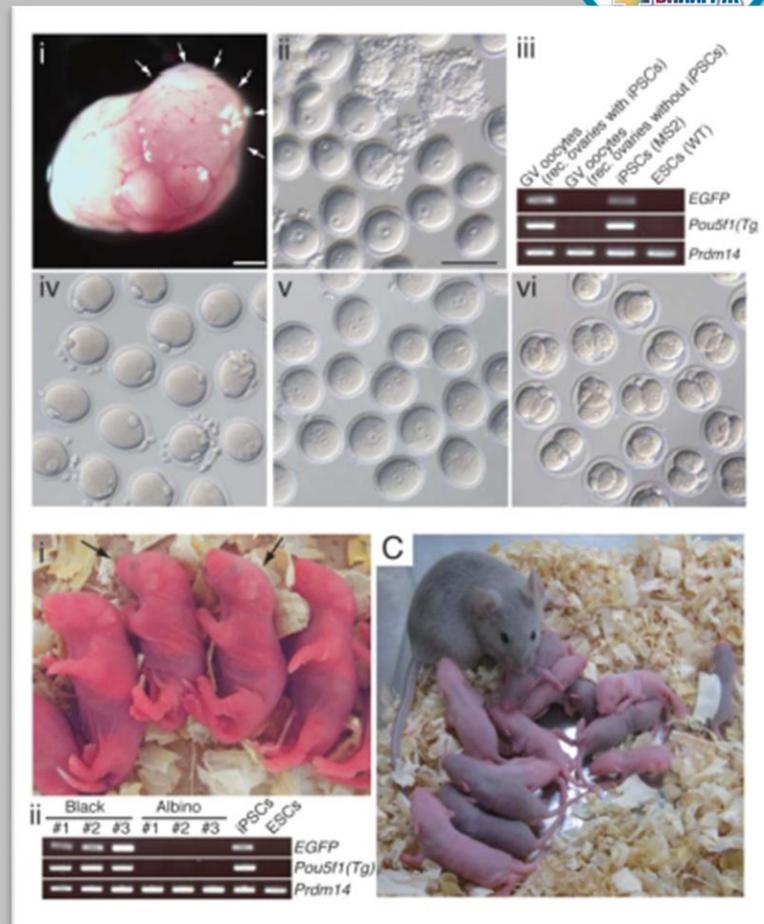
Гаметогенез IN VITRO

- Программирование iPSCs в гаметы может быть важным для сохранения генетического разнообразия и консервации видов. Такие гаметы не будут являться генетическими клонами, так как:
- в ходе развития они пройдут мейоз, а значит и кроссинговер -> **новые аллельные комбинации**;
- для создания живого организма гаплоидные гаметы должны слиться в диплоидную зиготу -> **новые аллельные комбинации**.
- Создание ооцитов из **эмбриональных стволовых клеток** (embryonic stem cells, ESCs) мышей была описана еще 12 лет назад. С тех пор in vitro был создан полный жизненный цикл: мышинные фибробласты, полученные из клеток кожи взрослой мыши, были перепрограммированы в iPSCs и направлены на создание ооцитоподобных клеток, которые затем оплодотворялись и приводили к получению живого потомства. Полученное потомство при скрещивании с обычными мышами сохранило фертильность.



Mouse ID	Sex	No. of pups
1501261	Male	15
1503021	Male	15
1503022	Female	12
1503091	Male	11
1503092	Female	11

Hikabe, O., Hamazaki, N., Nagamatsu, G., Obata, Y., Hirao, Y., Hamada, N., Shimamoto, S., Imamura, T., Nakashima, K., Saitou, M., & Hayashi, K. (2016). Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*, 539(7628), 299–303.



Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. 2012. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338(6109):971–75.

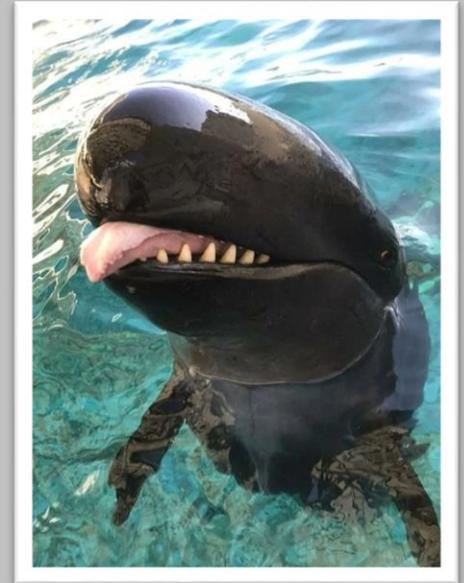


Практические и технические аспекты клонирования



- **Понимание репродуктивной биологии видов:** знания о репродуктивной биологии большинства диких видов ограничены.
- **Биоматериал для клонирования:**
- ценные биологические образцы биобанков (ДНК, кровь, ткани, соматические и половые клетки, репродуктивные ткани, эмбрионы);
- Выделение ядер происходит преимущественно из фибробластов (кожа и др. органы).
- Исключение: рыбы и амфибии, т.к. их кожные покровы содержат множество бактерий, -> ткани внутренних органов.

Фибробласты были изолированы и культивированы для таких видов, как: бобры, дикобразы, ошейниковых пекари, азиатские слоны, карликовые касатки, а также головастые черепахи.



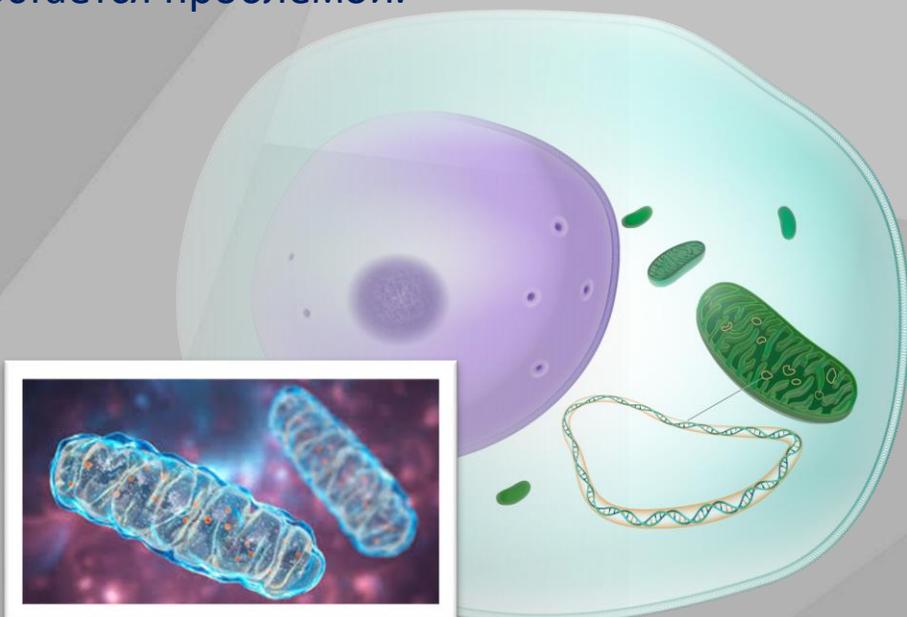


Практические и технические аспекты клонирования



- *Получение и созревание реципиентных ооцитов для SCNT:*
- *Совместимость реципиентных ооцитов с донором;*
- *Знания об эстральном цикле интересующих видов;*
- *Необходимость отработки протоколов стимуляции яичников, транспортировки и созревания ооцитов, криоконсервации.*

На сегодняшний день проведено биобанкирование ооцитов для КРС, лошадей, мексиканских серых волков и равнинных горилл, но для большинства видов сохранение ооцитов остается проблемой.



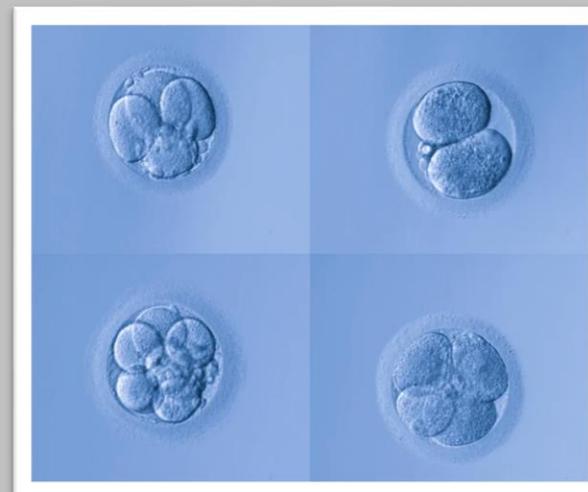
- **Митохондрии донорских ооцитов:**
- *Методология SCNT создает только ядерный клон, т.к. сохраняется митохондриальная ДНК (мтДНК) от исходного ооцита.*
- *Если клонирование используется для увеличения генетического разнообразия, то ядерная ДНК будет обновлена, а мтДНК – нет; использование донорских ооцитов от альтернативного вида и вовсе создаст гибридный эмбрион.*
- **Тетраплоидная комплементация:**
- *необходимость обильного источника донорских бластоцист, что практически невозможно получить от исчезающих видов;*
- *осуществима только при получении химерных бластоцист (совместимый, генетически близкий вид): эмбрионы будут химерами всю беременность, пока при родах не отделится межвидовая плацента.*



Практические и технические аспекты клонирования



- **Генерация iPSCs и гаметогенез in vitro:** неисчерпаемый источник половых клеток. Могут быть использованы для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида.
- Методика получения гамет из стволовых клеток успешно проведена **только на мышах**;
- Скудность знаний о функционировании половых клеток in vitro (особенности капацитации сперматозоидов у разных видов) и необходимость оптимизации протоколов ЭКО для разных видов.



- **Культивирование эмбрионов:**
- Разработка протоколов с видоспецифичными условиями культивирования эмбрионов – сложная задача в случае исчезающих видов, где численность особей низкая, физиология плохо изучена, а исследовательские ресурсы ограничены.
- **Использование суррогатных самок у млекопитающих:** пересадка эмбрионов отработана только для небольшой когорты сельскохозяйственных животных, но не распространена среди исчезающих видов. Тем не менее, в 2020 г. в результате ЭКО и трансплантации эмбрионов было получено первое IVF потомство гепарда.



Этические аспекты клонирования



▪ **Благополучие животных:**

- Аномалии развития и плохая выживаемость новорожденных клонов (плацентарные аномалии, длительная гестация, чрезмерный рост плода, дыхательная недостаточность, плохая выживаемость после рождения и общий низкий уровень здоровья);
- Показатели выживаемости половозрелых клонов, с другой стороны, не сильно отличаются от не клонированных животных. Клонированные собаки фертильны и обладают темпераментом и продолжительностью жизни, схожими с не клонированными.
- Клонированные козы, овцы и молочные коровы имеют почти нормальную продолжительность жизни, в то время как у клонов свиней она сокращена.
- Учитывая распространенность клонирования у лошадей, было опубликовано сравнительно мало данных о состоянии здоровья клонов.



▪ **Экологическое влияние:**

Устранение угроз для репопуляции видов в естественных местообитаниях, обеспечение экологических потребности видов, создание подходящих охраняемых территорий для реинтродукции.

▪ **Возрождение видов:** первое возрождение вида методом SCNT – **возрождение пиринейского горного козла** (лат. *Capra pyrenaica pyrenaica*), который имел чел вымереть дважды: в 2000 г., когда умер последний представитель, и в 2003 г., когда клонированное потомство погибло вскоре после рождения из-за дефекта легких.



**Благодарю за
внимание!**

