

# Klonování savčího embrya (3)

## Předčasné stárnutí potomstva

Josef Fulka

Klonování poskytlo nejen množství zajímavých výsledků, ale otevřelo i cestu pro málo očekávané využití ve zdánlivě odlehlých oblastech. Jsou s ním však spojovány takové problémy, jako předčasné stárnutí klonovaného potomstva a výskyt vývojových anomálií neslučitelných s přežitím.

S narůstajícím počtem klonovaných jedinců ze somatických buněk se stále častěji objevovaly obavy, zda narozená mláďata nenesou známky předčasného stárnutí. Důvod k tomu dávaly dřívější Hyflickovy studie (viz Hyflickova teorie omezeného počtu dělení buněk) a pozorované zkracování koncových částí chromozomů (telomer), k němuž dochází s každým dělením buňky, bez ohledu zda proběhlo *in vitro* či *in vivo*.

O telomerech se ví, že jsou tvořeny opakovanými nekódujícími sekvencemi DNA, chrání koncové části chromozomů před degradací a zajišťují bezchybný průběh replikace DNA. Postupné zkracování telomer pod kritickou hodnotu vyvolává narušení DNA syntézy, které končí smrtí poškozených buněk (viz Živa 2000, 6: 245-248). Pokud by se obavy ze zkracování telomer potvrdily, znamenalo by to, že klonování jedinci by již v době narození byli stejně staří jako dárci buněk, ze kterých vznikli. Pro klonování samotné by takové předčasné opotřebování buněk nepřinášelo příliš optimistické vyhlídky. V případě Dolly by to znamenalo, že v době narození měla buňky již šest let staré. Pro ovce to však není věk, kdy se projevují známky stárnutí, a po dosažení dospělosti se skutečně Dolly těšila dobrému zdraví a opakované zabřeznutí ukončené narozením potomků ukazovalo i na dobře fungující reprodukci.

Zdravotní problémy se objevily později, když dosáhla stáří zhruba pěti let a byla postižena artrózou kloubů levé zadní končetiny. Těžko říci, zda příčinou onemocnění byly předčasně zestárlé buňky jejího těla nebo jiné obtížně definovatelné vlivy. Faktem ale zůstává, že analýzy provedené u jejích buněk prokázaly zkrácení telomer o 20 %. V té době se již hromadily výsledky experimentů hledajících odpověď, zda zkracování telomer u klonovaných jedinců je obecným jevem, nebo zda existují opravné mechanismy schopné uvést délku koncových částí chromozomů do stavu odpovídajícího skutečnému věku klonovaného jedince. S jistotou jednoznačný důkaz nebyl nabídnut, ale převážná většina pozorování svědčí o úpravě délky telomer klonovaného embrya na obvyklou úroveň již během preimplantačního vývoje.

U skotu byl stav telomer studován velmi podrobně. Ukázalo se, že u klonu jejich délka úzce závisí na původu dárcovského jádra. Výsledky naznačily, že klony vzniklé z epitelálních buněk měly telomery kratší než kontrolní embrya. Naopak klony ze svalových buněk a fibroblastů vykazovaly srovnatelné hodnoty s neklonovanými kon-

trolními embryi. Objevují se i nečekané zprávy. K nim patří sdělení o narození klonované jalovičky s délkou telomer dostatečující na dva průměrné životy příslušného druhu.

Nelze vyloučit, že problémy s telomera mi přinesou ještě mnohá překvapení, a to již pro obtížnost uspořádat experiment, který by jejich vliv na opotřebování buněk klonovaného embrya jednoznačně vymežil. Srovnání dlouhověkosti klonovaných a kratšími telomery zatížených myší s normálními vrstevníky podaly zdánlivě jasný důkaz o negativním vlivu klonování na délku života, ale ani autoři pokusů nevykládají působení dalších faktorů, především chybné reprogramace a její možný účinek v pokročilém stadiu postnatálního života. Je proto zřejmé, že diskuse o zkrácených telomerech zdaleka nekončí, ale jistý je nález normálně dlouhých telomer u potomků ovce Dolly, která, jak je známo, měla telomery prokazatelně kratší. Znamená to tedy, že potomci postižených rodičů nemusí nutně být zatíženi zkrácením koncových částí chromozomů.

### Zdravotní problémy klonovaných jedinců

Část odborné veřejnosti s opatrným postojem k použití klonování v chovech hospodářských zvířat získala pro svoje názory další podporu, když se u mláďat po narození objevily nečekané zdravotní problémy a zřejmé vývojové odchylky. Zejména čerstvě narozená telata a jehňata na sebe upozornila vysokou hmotností, často převyšující dvojnásobek průměru příslušného plemene. Porody přinášely řadu obtíží, vyžadovaly asistenci chovatele a nezřídká končily císařským řezem. O příčinách se v počátcích vědělo jen málo a tato anomálie vešla do povědomí pod názvem syndrom velkých mláďat — v literatuře se označuje zkratkou LOS (z anglického Large Offspring Syndrom). Objevily se však i názory, které zpochybňují přenos jader jako jedinou příčinu syndromu LOS, poukazují na nízké počty hodnocených mláďat a argumentují i výskytem vyšší hmotnosti mláďat narozených z embryí po oplození *in vitro* nebo z embryí izolovaných z vejcovodů a kultivovaných před přenosem do stadia blastocysty (viz Živa 2005, 4 a 5).

Zdá se proto velmi pravděpodobné, že nejen mikromanipulace a přenos jádra se podílejí na vzniku tohoto jevu, ale nezanedbatelnou úlohu má i skladba médií užívaných pro kultivaci a doba, po kterou jsou

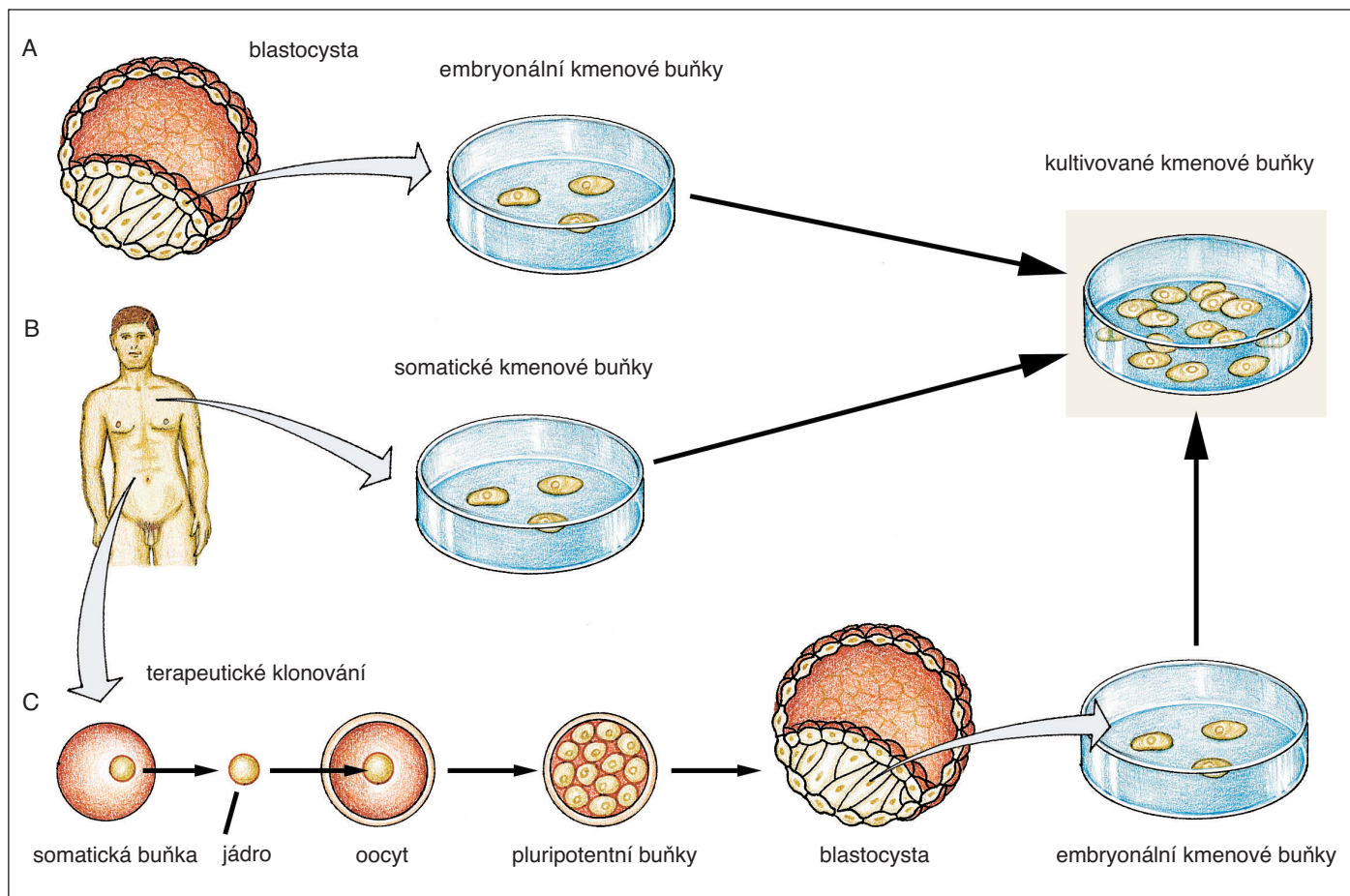
embrya vystavena prostředí *in vitro*. A ta je v mnoha případech u klonovaných embryí delší. Počáteční poznatky naznačovaly, že uvedeným syndromem jsou postiženi především nebo téměř výhradně přežvýkavci, a proto se jeho výskyt očekával i u kozy. I když se klonovaná kůzlata narodila dosud jen v omezeném počtu, nic nenasvědčuje tomu, že by syndromem LOS trpěla. Ten ostatně nebyl popsán ani u myši a dosud ani u prasete, kde se přenos jader prováděl často velmi náročným postupem vyžadujícím prodloužení pobytu embryí v kultivačním prostředí.

Pro klonovaná mláďata je také příznačná velmi nízká schopnost přežít narození. Mnohá se rodí již mrtvá a další se nedokáží vyrovnat se ztrátou podpory, kterou jim až do porodu poskytovala placenta. Mnohdy stačí k záchraně zvýšená péče, ale často ani ta nezabrání úhynu mláďat. Provedená šetření prokazují širokou škálu příčin, mezi něž patří morfologické změny a funkční poruchy základních orgánů jako jsou plíce, srdce, centrální nervový systém, ledviny a játra. Ale i u zdánlivě zdravých jedinců mohou nastat nečekané komplikace. V literatuře je hojně zmiňován případ francouzské jalovičky Marguerite, pocházející z jádra svalové buňky dospělého dárce, která neočekávaně uhynula po několika měsících „zdravého“ života. Jak se podařilo následně zjistit, příčinou smrti bylo náhlé selhání imunitního systému.

Podrobný přehled o zdravotním stavu dalších klonovaných velkých zvířat není dosud dostupný a objevují se jen občasné zprávy o narůstajících problémech během stárnutí. Studie u myší s definovanými genetickými parametry a chovanými v identických podmínkách prokázala, že klonování jedinci dosahují zhruba jen poloviční délky života ve srovnání s jejich partnery vzniklými normálním oplozením nebo po injekci spermií do cytoplazmy oocyty. Tyto údaje nemusí být zákonitě platné pro všechny savce, ale upozorňují na nutnost věnovat zdravotnímu stavu klonovaných zvířat trvalou pozornost.

Zdravotní potíže klonovaných jedinců však nezačínají až narozením. Ze zpráv zabývajících se monitorováním osudu přenaščených embryí vyplývá, že k jejich odumírání dochází během celého období březosti. U ovcí přežívalo za 30 dnů po přenosu jen 70 % a za 90 dnů pouhých 35 % klonovaných embryí. U kontrolních *in vitro* produkovaných skupin se embryonální mortalita objevila také, ale po 90 dnech žilo ještě téměř 70 % plodů. U mnohých embryí nedochází ani ke spojení buněk trofoblastu s buňkami děložní sliznice (implantaci), další pak hynou v různých stadiích vývoje. Příčinou bývají defekty orgánů rostoucích plodů, často neslučitelné se zachováním života. Pokud rozsah poškození nedosáhne kritické úrovně, narození jedinci vykazují sníženou životnost a v optimálním případě se rodí mláďata bez jakýchkoli zdravotních potíží.

Na zastavení vývoje nemají vliv pouze anomálie samotného embrya, ale do značné míry také celá řada patologických změn placenty, orgánů zajišťujícího spojení plodu s dělohou matky a zodpovědného za přívod živin a odvádění zplodin látkové výměny. Její tvorba se odvozuje od buněk trofoblastu vzniklých nástupem první vlny diferenciace embrya po dosažení stadia blastocysty. Stejně jako u buněk embryo-



blastu dochází u klonovaných embryí v buňkách trofoblastu k dramatickým odchylkám v úrovni metylace (Živa 2005, 5: 194–197) a následně i v genové regulaci vývoje placenty. Výsledkem jsou často již na první pohled patrné morfologické defekty, které neumožňují placentě plnit její funkce. Dochází pak nezdánlivě k situacím, kdy plod se všemi předpoklady zdárně dokončit nitroděložní vývoj narozením zdravého jedince odumírá pro nedostatek podpory extraembryonálními orgány.

S uspokojením je třeba přijmout zjištění, že klonování jedinců již nepřenašejí na potomstvo svoje zdravotní postižení. Přibývá tím další důkaz pro hypotézu, že reprogramace jádra diferencované buňky neovlivní samotnou DNA, ale omezuje se pouze na její epigenetickou úpravu. Ta je spolehlivě během oogeneze a spermiogeneze zrušena, včetně chyb vzniklých při reprogramaci. O účinnosti těchto nápravných mechanismů svědčí analýza exprese (vyjádření) 10 000 genů u klonovaných a kontrolních myší. Přibližně u 400 genů klonovaných jedinců došlo k chybám v jejich expresi, ale u potomstva postižených rodičů se již žádná odchylka neprojevila. U ostatních klonovaných savců nejsou dosud podobné rozborly dostupné, ale právem se očekává, že i u nich fungují stejně účinně všechny nápravné mechanismy.

### Splněný a očekávaný přínos přenosu jader savčích buněk

I když se nenaplnilo počáteční očekávání a ani několikaleté snahy nevedly k podstatnému zvýšení efektivity klonování, zůstává poznání o schopnosti ooplastu reprogramovat jádro plně diferencované savčí somatické buňky jedním z významných objevů konce 20. století. Nic na tom

nemění ani skutečnost, že o mechanismech odpovědných za změny genetické informace, vedoucí znovu k zahájení embryonálního vývoje, se ví jen velmi málo. Ještě méně je známo o řízení pochodů modifikujících chromatin jádra do optimálního stavu tak, aby rekonstruované embryo končilo svůj osud narozením zdravého jedince. Není pochyb o tom, že cesta k takovému cíli bude dlouhá a nesnadná, občas zaznějí i hlasy, které nevěří ve vypracování plně funkční technologie. Proto pro obecnější využití klonování v chovatelské praxi zůstává současný stav znalostí omezujícím faktorem a jen ojediněle se objeví zpráva o úspěšné aplikaci klonování při pořízené kopie jedince s vynikajícími genetickými vlastnostmi.

Zcela odlišná situace vzniká v případech, kdy počet narozených jedinců není rozhodující. To platí tehdy, když je cílem přenosu jader vznik zvířat produkujících proteiny použitelné v humánní medicíně při léčení některých chorob. Obvykle se mnohé z nich získávají z bakterií, jejichž genom byl obohacen o lidský gen odpovědný za syntézu vybraného proteinu. Izolace z velkých objemů kultivačních roztoků a složité čištění se odráží v ceně přípravku a navíc mnohdy bakterie nedovedou syntetizovat protein o žádané aktivitě. To dokáží jen živočišné buňky a kombinace klonování s genovou manipulací otevírá cestu k cílené produkci zvířat nazývaných „živé bioreaktory“. Žádané proteiny z jejich mléka, krevního séra či jiných tělních tekutin se snadněji izolují, čistí a hlavně, jejich příprava je nesrovnatelně levnější než při použití tradičních postupů.

První pokusy s injekcemi vybraných genů do prvojader končily obvykle nezdarem. S pokrokem molekulární genetiky se podařilo sestavit genový konstrukt obsahu-

*Schéma znázorňuje tři přístupy k získání lidských pluripotentních kmenových buněk. Postup A byl opakovaně ověřen a sledán jako funkční metoda. Zdrojem embryonálních buněk jsou embrya, která nenašla využití při asistované reprodukci a po inkubaci dosáhla stadia blastocysty s jasně diferencovanými buňkami embryoblastu a trofoblastu. Postup B vychází z izolace kmenových buněk z vybraných tkání dospělých jedinců, které jsou schopné chovat se po kultivaci jako pluripotentní buňky a diferencovat se na žádané typy. Pro terapeutické klonování se počítá s metodou C, kde se jádro somatické buňky přenáší do oocytu zbaveného vlastní chromozomální vybavy a po kultivaci rekonstruovaného embrya do blastocysty slouží k izolaci kmenových buněk z embryoblastu. Postupy B a C jsou v současné době předmětem intenzivních studií. Podle S. F. Gilberta, Developmental Biology 2003 kreslil S. Holeček, upraveno*

ující lidský gen pro příslušnou bílkovinu, doprovázený regulační sekvencí pro aktivaci genu k tvorbě vybrané bílkoviny v mléčné žláze. Po obohacení dárcovské buňky o tento gen vznikla pověstná ovce Polly, která v mléce produkuje faktor IX, bílkovinu pomáhající pacientům trpícím hemofilií. Postupně se rodila i další mláďata s geny pro řadu dalších zajímavých bílkovin a jejich nositelem jsou vedle ovce také kozy. Po narození klonovaného jehněte s genem pro produkci alfa-1-antitrypsinu, bílkoviny užívané při léčení cystické fibrózy a rozedmy plic, se však ukázalo, že ani tato cesta nebude zcela jednoduchá. Při náročných zkouškách se neočekávané vyskytly negativní účinky a hledání jejich příčin vedlo podle dostupných zpráv k opožděnému uvedení na trh v lékové formě. Pro britskou společnost PPL Therapeutics, která se na tvorbě živých bio-

reaktorů finančně významně podílí, není takové zjištění jistě povzbudivé a vybízí k opatrnosti i ostatní firmy s obdobným programem.

O klonování člověka byla již na začátku uvedena krátká zmínka s vyjádřením negativního postoje zasvěcené vědecké komunity k vytváření kopií dárce jádra a oznámení o probíhajících těhotenstvích po přenosu klonovaných embryí je třeba přijímat s krajní nedůvěrou. Není podstatné, zda přicházejí od Richarda Seeda z USA, Severina Antinoriho z Itálie či od náboženské sekty Clonaid. Skutečností zůstává, že neexistuje jediný důkaz o pravdivosti podobných zpráv a o případném narození dítěte vzniklého z embryonální nebo somatické buňky. Po zvážení všech rizik, kterým jsou klonovaná embrya vystavena, by nikdo z odborníků k reprodukci člověka touto metodou nepřistoupil. A jen těžko si lze představit reakci veřejnosti po narození dítěte s vážným zdravotním poškozením.

Ze zcela odlišného pojetí vycházejí experimenty zaměřené na produkci lidských embryí s cílem získat buňky využitelné v humánní medicíně. Jsou motivovány poznáním schopnosti některých buněk embryoblastu dělit se po izolaci ve vhodném médiu, aniž dochází k jejich diferenciaci. Setkáváme se s nimi pod názvem embryonální kmenové buňky (ESC — Embryonic Stem Cells) a ví se, že se nejen dělí, ale v přítomnosti specifických růstových faktorů diferencují na žádané buněčné typy. Jejich existence byla již před lety popsána u myši a od té doby bylo věnováno jejich získání u jiných savců, včetně člověka, velké úsilí. Publikované výsledky se dařilo však jen obtížně opakovat, a proto každá

další zpráva byla přijímána s oprávněnou nedůvěrou. Přesvědčivé důkazy o existenci embryonálních kmenových buněk u člověka podali teprve A. J. Thomson a spolupracovníci v r. 1998 a J. Gearhart také v r. 1998. První skupina použila ve svých experimentech nadbytečná lidská embrya vniklá oplazením *in vitro* při asistované reprodukci, druhá izolovala kmenové buňky z plodů získaných po přerušení těhotenství. Početné následné studie naznačily, že by humánní medicína mohla získat účinný nástroj na léčení chorob, s nimiž se až dosud obtížně bojovalo. Nejčastěji jsou zmiňovány degenerativní změny mozku jako Parkinsonova či Alzheimerova choroba, poškození míchy, diabetes, poruchy krve tvorby a mnohé další. Hrubou představu o současných zdrojích kmenových buněk a o manipulaci s nimi nabízí přiložené schéma. Povzbudivé výsledky při ošetření myši diferencovanými ESC skutečně prokázaly ústup typických syndromů u řady jmenovaných chorob a naznačily tak i využitelnost plasticity některých buněk ve prospěch člověka.

Neukončené dosud zůstávají diskuse o etických problémech spojených s použitím lidských embryí pro tyto účely. Ani mezi jednotlivými skupinami odpůrců nepanuje shoda, jaká vývojová stadia by mohla být ještě tolerována a kdy se embryo stává již nedotknutelné. Za úvahu také stojí posoudit, zda embryo vzniklé oplazením a připravené na ukončení vývoje má stejnou hodnotu jako embryo klonované se značně omezenou vývojovou schopností. Odlišné pohledy budou bezesporu zastávat erudovaní biologové a představitelé různých náboženství. Ve většině zemí vstupují do těchto rozepří zákonodárci a stanovují

se pro využití lidských embryí přísná, ne však zcela shodná pravidla. I u nás k podobným opatřením nedávno došlo. Je ale třeba připomenout, že jen soustředěné úsilí povede k rychlejšímu přiblížení slibných vlastností ESC k pacientovi. Jak ukazují mnohé příklady, na řadě pracovišť se o to pokouší. Svědčí o tom již zmíněná práce W. S. Hwanga a kol. (2005). Podařilo se nejen vytvořit lidská klonovaná embrya a ustavit z nich definované linie ESC, ale získat i buňky, které nevyvolají imunitní reakci a odmítnutí příjemcem. Tato stručná zmínka jen zcela povrchně naznačuje, jak nečekané perspektivy klonování nabízí, avšak lze jen těžko předvídat, jestli se zdaří jejich naplnění. Navíc, ESC mají velkého konkurenta v kmenových buňkách nalezených v řadě tkání, kde slouží jako záloha pro obnovu již odumírajících buněk. Před embryonálními kmenovými buňkami mají významnou výhodu v tom, že svou podstatou nejsou z etického hlediska tak zajímavé pro širokou veřejnou diskusi.

Na závěr by bylo vhodné uvést, že se v zahraniční i domácí literatuře objevují průběžně nové, často nečekané poznatky o využití různých typů buněk k prospěchu lidí i zvířat. Je jen potěšitelné, že i v České republice se v této oblasti intenzivně bádá v řadě výzkumných zařízení za úzké spolupráce s předními zahraničními ústavami. Zejména na úseku aplikace vybraných buněk k léčebným účelům si udržuje ČR dobré postavení a má cíleně rozpracované postupy na experimentálních modelech. Již povrchní pohled naznačuje propastný rozdíl mezi původní představou o využití klonování v chovu zvířat, ale také vě posuny nejsou v historii ojedinělé.

## Postavení českých vědeckých týmů v klonování a buněčné terapii

Jan Motlík

Bez ohledu na nespočetné experimenty zůstává efektivita klonování stále velmi nízká a ani v posledních letech se nedařilo vyloučit výskyt nepředvídatelných selhání obecně užívaných postupů. Jen u skotu lze zaznamenat patrnější pokrok a občas se objeví i potěšující obrázky, kdy vedle dárců stojí deset i více naklonovaných identických potomků. S velkým oceněním se setkalo také oznámení, když se konečně podařilo naklonovat prase, kterému se zejména v biomedicíně přikládá značná důležitost. Organizování takových experimentů je však velmi nákladné, nemohou si je často dovolit ani bohaté farmaceutické společnosti, pokud není zaručena návratnost vložených finančních zdrojů. A zdá se, že to byl i důvod k útlumu produkce prasečích klonů. Ve většině menších zemí, k nimž patří i ČR, si mohou jen těžko dovolit experimenty na velkých zvířatech v potřebném rozsahu, a proto se jejich výzkumné kapacity sdružují v ustavování cíleně mezinárodní spolupráce. Její poslání spočívá ve využití zkušeností a nákladného přístrojového vybavení

při studiu pochodů s očekávaným pozitivním vlivem na tvorbu a vývoj rekonstruovaných embryí.

V příštích letech se domácí pracovníci budou věnovat tématům, ve kterých dosáhli již v minulosti některých zajímavých výsledků. Patří k nim hledání a optimalizace vztahů mezi ooplástem a jádrem s cílem zajistit remodelaci a reprogramaci chromatinu a tím normální vývoj rekonstruovaného embrya. Významné poznatky se už dříve podařilo získat také při studiu mechanismů růstu a zrání ovariálních oocytů savců. Vzhledem k nezastupitelnému poslání ooplástu pro regulaci strukturálních a molekulárních změn po přenosu jádra budou dostupné poznatky sloužit k vytváření prostředí pro jejich pokud možno bezchybnou realizaci. V poslední době se povedlo posílit personálně i metodicky pracovní skupinu a položit dobrý základ pro studium pochodů rozhodujících o vzniku funkčního oocytu u savců.

K dalším úlohám vědců z týmů, které pracují ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhřetěvsi a v Ústavu fyziologie

a genetiky AV ČR v Liběchově, patří sledování aktivace genů savčích embryí vzniklých oplazením nebo jinými postupy užívanými při asistované reprodukci (IVF — oplazení *in vitro*, ICSI — intracytoplazmatická injekce spermie). Stejně metody poslouží k monitorování postupné aktivace genomu v jádrech somatických a embryonálních buněk po přenosu do definovaného ooplástu. V současné době není aktuálním cílem produkovat klonované jedince, ale používat jako experimentální model buď laboratorní myš nebo ovaria komerčně poražených dárců, především skotu a prasat. Ty také poslouží k produkci embryí pro experimentální účely a případně pro zjištění buněk, které se budou svými vlastnostmi blížit embryonálním kmenovým buňkám.

Většina studií probíhá v součinnosti se zahraničními pracovišti, a tak se nabízí bezprostřední kontakt se širokou světovou vědeckou komunitou i přístup k dosud nepublikovaným výsledkům. Lze předpokládat, že tato etapa nepřinese převratné objevy v klonování savců, ale je nutná k získávání chybějících znalostí pro zdokonalení současných technologií a přispěje k odstranění některých negativních jevů spojovaných s přenosem jader u savců.

Zcela odlišné postavení má využití kmenových buněk izolovaných z některých tkání vyvíjejících se plodů nebo již narozených jedinců. Právě vlivem úspěšné reprogramace jader somatických buněk se rozvinulo nemalé vědecké úsilí o rozpoznání kmenových buněk, které se nacházejí v již vytvořených tkáních a orgánech, a jsou proto nejčastěji označovány jako orgáno-