

Reproduktivno kloniranje

Ivković, Kate

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:064983>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Reproduktivno kloniranje

Reproductive cloning

SEMINARSKI RAD

Kate Ivković

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Inga Urlić

Zagreb, 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. POVIJEST KLONIRANJA	2
3. METODOLOGIJA	4
3.1. IZRADA MANIPULACIJSKOG ALATA.....	4
3.2. UKLANJANJE JEZGRE	5
3.3. TRANSFER JEZGRE, FUZIJA I ALTERNATIVNE METODE	8
3.4. AKTIVACIJA OOCITE.....	9
3.5. KULTURA EMBRIJA <i>IN VITRO</i> I IMPLANTACIJA U SUROGAT MAJKE	10
4. TERAPEUTSKO I REPRODUKTIVNO KLONIRANJE	10
5. PRIMJERI	11
5.1. POČETCI NA VODOZEMCIMA	11
5.2. DOLLY.....	12
5.3. KUĆNI LJUBIMCI.....	13
6. ETIKA	13
7. LITERATURA	15
8. SAŽETAK	17
9. SUMMARY	18

1. Uvod

Riječ klon dolazi od grčke riječi *klón* koja ima značenje grančica. Takvo podrijetlo riječi nije začuđujuće jer od davnih vremena ljudi su znali da se biljke mogu razmnožavati iz somatskih stanica i da se može dobiti identična biljka iz grančice originalne biljke (Cibelli i sur., 2013). U prirodi, identične jedinke se javljaju i u životinjskom svijetu. Relativno su česti identični potomci iz višeplođnih trudnoća među vrstama sisavaca. Kod nekih vrsta to se događa rijetko kao npr. kod ljudi, a kod nekih događa se skoro sa svakom trudnoćom. Rekorderi su sedmo- pojasni pasanci koji znaju imati do 15 identičnih mladih u jednom leglu (Westhusin i Long, 2018). Takve identične životinje nastaju prilikom ranih dioba zigote i formacije više embrija iz jedne zigote. Što točno potiče taj proces nije još danas potpuno razjašnjeno. Bez obzira što su takve životinje genetički istovjetne tehnički se ne smatraju klonovima jer su nastale iz embrija dobivenih spolnim razmnožavanjem. Reproductivno kloniranje bavi se proizvodnjom genetički identičnih životinja koristeći se specifičnom tehnologijom transplantacije jezgre (Westhusin i Long, 2018). Životinje dobivene metodom reproductivnog kloniranja su klonovi životinja donora jezgre, ali metodom transplantacije jezgre nije moguće dobiti postotak fenotipske sličnosti koju imaju identični multiplati (Cibelli i sur., 2013). Transplantacija jezgre odnosi se na prijenos jezgre jedne stanice u drugu stanicu. U slučaju reproductivnog kloniranja jezgra stanice izolirane iz životinje koju se klonira (donora) prenosi se u neoplođenu jajnu stanicu, preferencijalno životinje iste vrste, kojoj je prethodno uklonjena vlastita jezgra. Kada se jezgra donora premjesti u jajnu stanicu, komponente citoplazme jajne stanice reprogramiraju genom jezgre donora i omogućuje razvoj embrija. U slučaju da je sve uspješno izvedeno embrij se onda može transplantirati u surogat majku i nastaviti razvoj (Westhusin i Long, 2018). Danas je velik broj životinja uspješno kloniran metodom reproductivnog kloniranja te su istraživanja kloniranja dovela do mnogih drugih bitnih znanstvenih otkrića na području razvojne biologije, reprogramiranja jezgre te staničnog starenja.

2. Povijest kloniranja

Iako često zvuči futuristički, povijest kloniranja se proteže na više od sto godina. Velika otkrića na početku povijesti kloniranja došla su od znanstvenika koji su proučavali druge teme koje su isprepletene s kloniranjem, kao što je stanična diferencijacija. Krajem 19. stoljeća Hans Driesch proučavao je diferencijaciju stanica embrija morskog ježinca i opovrgnuo dotadašnju hipotezu Augusta Weismanna da se nasljedni materijal nejednako dijeli po stanicama prilikom diferencijacije tijekom embriogeneze. Otkrio je da se odvajanjem stanica dvostaničnog stadija blastomere morskog ježinca iz svake stanice može razviti potpuni organizam. Time je dokazao da se nasljedni materijal ne gubi tijekom diobe nego se reproducira i podjednako raspoređuje u sve stanice (McKinnell i Di Berardino, 1999).

Hans Spermann je 1914. izveo bitan pokus na zigoti vodozemca. Vežao je čvor na zigoti pomoću dječje dlake tako da je odvojio citoplazmu na dio bez jezgre i dio s jezgrom. Kada je dio s jezgrom postigao razvojni stadij od 8 ili 16 stanica popustio je čvor te je omogućio jezgri da dođe u kontakt s odvojenim dijelom citoplazme što je rezultiralo nastankom još jednog embrija iz te stanice (McKinnell i Di Berardino, 1999). Njemu se pridaje velika važnost kada je u pitanju kloniranje jer je on prvi predložio i opisao tehnike transplantacije jezgre. On nije bio prvi koji je izveo tu tehniku jer su u njegovo vrijeme tehnologija i oprema bile nedovoljno razvijene za izvedbu tako kompliciranog zahvata, ali 50-ih godina prošlog stoljeća njegovu ideju isprobali su znanstvenici Robert Briggs i Thomas King. Transplantirali su jezgre vrste *Rana Pipiens* iz ranih razvojnih stadija embrija u neoplođene jajne stanice, kojima su prethodno uklonili jezgru koristeći malu staklenu pipetu (Westhusin i Long, 2018). Cilj njihovih istraživanja bio je proučiti potencijal jezgara, stanica različitog stupnja diferenciranosti, u razvoju embrija. Kao bazni eksperiment provjerili su kako se razvija zigota koja sadrži centar za diobu, ali ne i funkcionalnu jezgru. Rezultati su pokazali da se takva stanica može maksimalno razviti do stadija nepotpune blastule te su time potvrdili da će svaki daljnji razvoj biti atribuiran transplantiranoj jezgri (McKinnell i Di Berardino, 1999). Njihovo istraživanje pokazalo je da su stanice u kasnijim stadijima embriogeneze lošiji donori za transplantaciju jezgre i već s jezgrama iz stadija gastrule su bile drastične razlike u uspješnosti razvoja embrija u usporedbi s jezgrama stanica blastule (Gurdon i Byrne, 2003). Bitno je naglasiti da su sve stanice koje su korištene u ranim eksperimentima kloniranja bile embrionalnog podrijetla. Tada je bilo uvriježeno mišljenje da se samo jezgre iz tih stanica mogu koristiti jer se nisu diferencirale u specifični tip stanica te imaju određen stupanj pluripotencijalnosti, za razliku od stanica odraslog organizma, koje su većinom potpuno diferencirane (Westhusin i Long, 2018).

Iznenadujuće otkriće bilo je kada je John Gurdon 1962. uspio dobiti normalne klonove transplantacijom jezgara stanica crijeva punoglavaca vrste *Xenopus laevis* (McKinnell i Di Berardino, 1999). Time je opovrgnuo teoriju da su jezgre somatskih diferenciranih stanica nesposobne upravljati razvojem zigote.

Počeci kloniranja izvedeni su pretežito na vodozemcima. Ozbiljniji pokušaji kloniranja sisavaca krenuli su tek krajem 1970-ih godina. Iako su sisavci zanimljiviji u kontekstu kloniranja bilo je zahtjevno prilagoditi tehnike drugim vrstama. Još jedna od otežavajućih okolnosti je sama oocita sisavaca koja je znatno manja od oocite vodozemaca te ih je puno teže pribaviti u većim količinama (Westhusin i Long, 2018). Oocita sisavaca u metafazi II mejoze je manja od 0,1% volumena oocite vodozemaca (Gurdon i Byrne, 2003). Zbog toga su se prvo trebale usavršiti mikromanipulacijske tehnike. Prvi pokušaji bili su masovno neuspješni. Problem je bio što su jezgre transplantirane u zigote odstranjenih jezgara jer se smatralo da će citoplazma zigote bolje potaknuti razvoj od citoplazme oocite, ali to se ispostavilo netočno (Gurdon i Byrne, 2003). Prvi koji su objavili da su uspješno klonirali sisavce (miševce) su Peter Hoppe i Karl Illmensee 1981. godine, ali njihovi rezultati nikad nisu uspješno reproducirani. Jim McGrath i Davor Solter su uspješno producirali klonirane miševce transplantacijom jezgre iz dvostaničnog stadija embrija, ali neuspješno iz bilo koje kasnije faze (Westhusin i Long, 2018). Dvostanični embrij kod miša je vrijeme kada se genom embrija aktivira, tj. kada embrij počinje transkribirati vlastitu mRNA i proizvoditi vlastite proteine te se više ne oslanja na ostatke iz citoplazme majčine stanice. Njihovo je mišljenje bilo da se jezgre diferenciranih stanica sisavaca ne mogu koristiti za transplantaciju jezgre i kloniranje te da diferencijacijom gube potencijal za reprogramiranje, unatoč rezultatima Gurdon koji je pokazao da se diferencirane stanice mogu koristiti za kloniranje vodozemaca. Istraživanja znanstvenika koji su klonirali druge vrste sisavaca poklapala su se s tom hipotezom. Steen Willadsten je uspješno klonirao ovce i goveda iz 8-16 staničnog embrija što se poklapa s dvostaničnim embrijem kod miša u pitanju aktivacije genoma embrija. Pretpostavke McGratha i Soltera pokazale su se netočnima pokusima Simsa i Firsta 1994. i Campbella 1996. Njihovi rezultati, dobiveni koristeći stanice diferencirane u kulturi, dokazali su da se jezgre diferenciranih stanica mogu koristiti za kloniranje (Westhusin i Long, 2018).

Nedugo nakon, kloniranje je postalo poznato javnosti zbog velikog uspjeha kloniranja ovce nazvane Dolly. Keith Campbell i Ian Wilmut klonirali su ju iz stanica epitela mliječne žlijezde odrasle ovce (Westhusin i Long, 2018). Uspjeh s Dolly okrenuo je mnoge znanstvenike prema kloniranju i klonirane su brojne druge vrste. Danas se veći dio istraživača opredijelio za

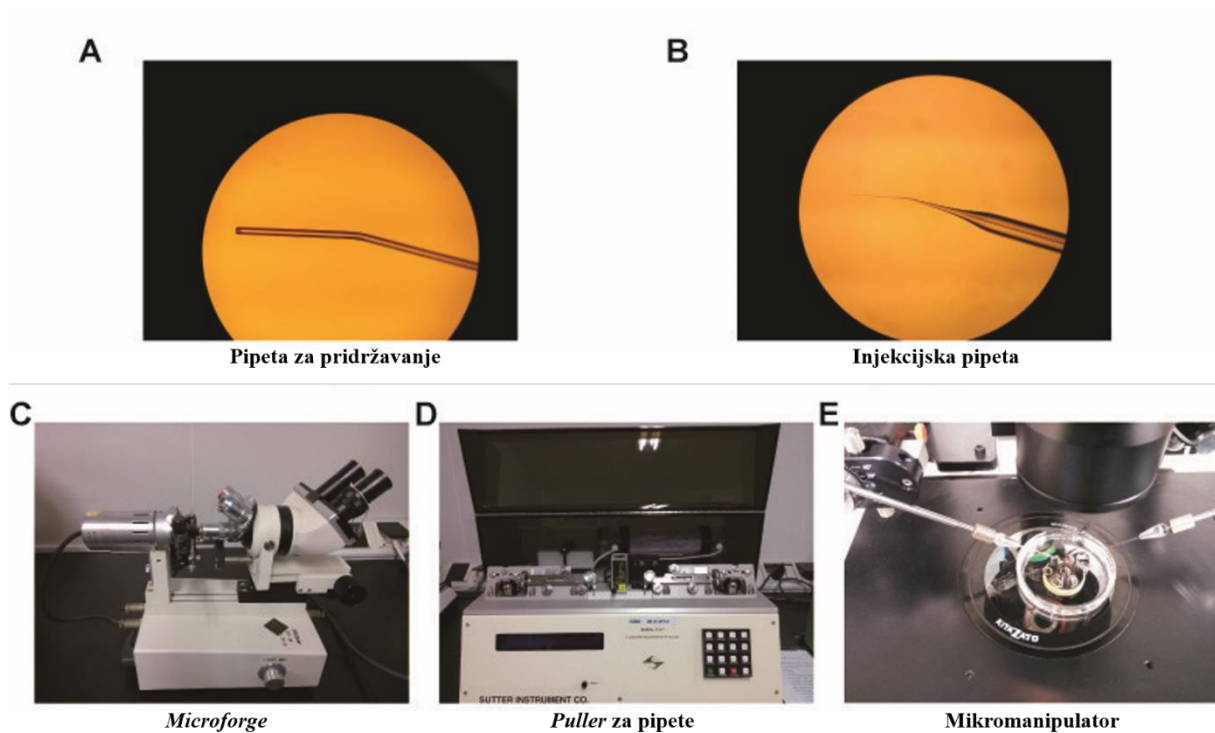
terapeutsko kloniranje koje pokazuje obećavajući potencijal za primjenu u medicinske svrhe te je etički prihvatljivije. Reproductivno kloniranje se najviše koristi u svrhe kloniranja životinja potrebnih za gospodarstvo i kućnih ljubimaca. Potrebe tržišta su procijenjene na otprilike 100 konja po godini, malo manje od 500 goveda i par stotina kućnih ljubimaca (Westhusin i Long, 2018).

3. Metodologija

Reproductivno kloniranje zasniva se na tehnikama transplantacije jezgre. Jezgra iz stanice donora se transplantira u stanicu kojoj je prethodno uklonjena jezgra i koja ima potencijal reprogramirati jezgru donora i potaknuti embrionalni razvoj. Ta je stanica najčešće neoplođena oocita u metafazi II. Za uspješno izvođenje transplantacije jezgre bitni su mnogi parametri od izrade alata, opreme, mikroskopije do medija za manipulaciju i fuzije stanica.

3.1. Izrada manipulacijskog alata

Otprilike 75% uspješnosti kloniranja pridaje se dobrom manipulacijskom alatu (Cibelli i sur., 2013). Manipulacijski alat se može kupiti ili samostalno napraviti, a s obzirom da ovisi o vrsti eksperimenta i individualnim preferencijama gotovo je nemoguće da će komercijalni manipulacijski alat odgovarati svima. Mikromanipulacijske pipete (Sl. 1.) se izrađuju od kapilara tankih stijenka obično 1 mm vanjskog promjera, 0.75 mm unutarnjeg promjera i duljine 15 cm (Cibelli i sur., 2013). Oprema koja je potrebna (Sl. 1.) sastoji se od *puller*-a za pipete, *microforge*-a, brusilice za pipete, olovke s dijamantnim vrhom i plinskog plamenika. *Puller* za pipete se koristi za izvlačenje finih pipeta iz staklenih kapilara, iz kojih se onda izrađuju precizni mikromanipulacijski alati. *Microforge* se koristi za dovršavanje i poliranje vrhova pipeta. Brusilica za pipete služi za izradu ukošenih vrhova pipeta. Olovka s dijamantnim vrhom koristi se za precizno rezanje staklenih kapilara, a plamenik za izradu pipeta za pomicanje embrija i zavoja na mikromanipulacijskim pipetama (Cibelli i sur., 2013).

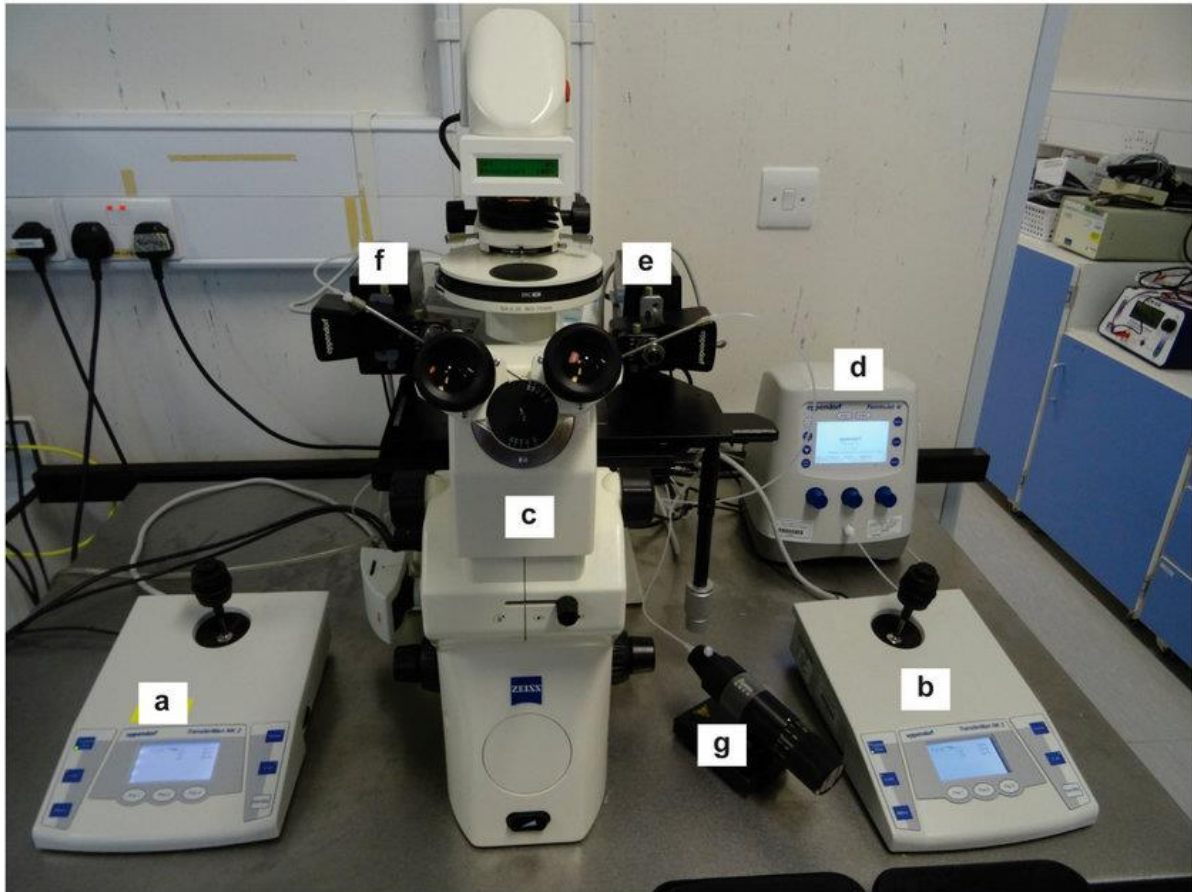


Slika 1. Prilagođeno prema Wang i sur., 2014. Fotografije A) pipete za pridržavanje, B) injekcijske pipete, C) *microforge*-a, D) *puller*-a za pipete i E) mikromanipulatora.

3.2. Uklanjanje jezgre

Pri uklanjanju jezgre iz oocite potrebno je oocitu pozicionirati i zadržati pri čemu se koristi pipeta za pridržavanje. Optimalna veličina ovisi o osobnim preferencijama i o vrsti oocite. Poželjno je da vanjski promjer pipete bude 90% promjera oocite, a unutarnji 20%, tako da omogući čvrsto pridržavanje oocite bez da preveliki dio oocite uvuče u držač te je tako ošteti i deformira (Cibelli i sur., 2013). Iznimno je važno izolirati radno mjesto od vibracija, primjerice onih koje proizvode hladnjaci i zamrzivači u prostoriji. Čak i mala količina vibracija se može prenijeti na mikromanipulacijske pipete i otežati ili narušiti izvođenje tehnike (Cibelli i sur., 2013). Od mikroskopa preferiran je invertni mikroskop zato što slika nije zaokrenuta i poklapa se s orijentacijom uzorka i mikromanipulacijskog alata. Da bi se bolje vizualizirale stanice koriste se kontrastni optički sustavi kao što su HMC (engl. *Hoffman Modulation Contrast*) i DIC (engl. *Differential Interference Contrast*) (Cibelli i sur., 2013). Za opću pripremu i promatranje oocita i embrija potreban je stereomikroskop. Kvalitetnim stereomikroskopom može se promatrati polarno tijelo i potvrditi zrelost oocite te se koristi i za poravnavanje stanica za fuziju te potvrđivanje fuzije (Cibelli i sur., 2013). Za fino kontroliranje pokreta pipete koriste

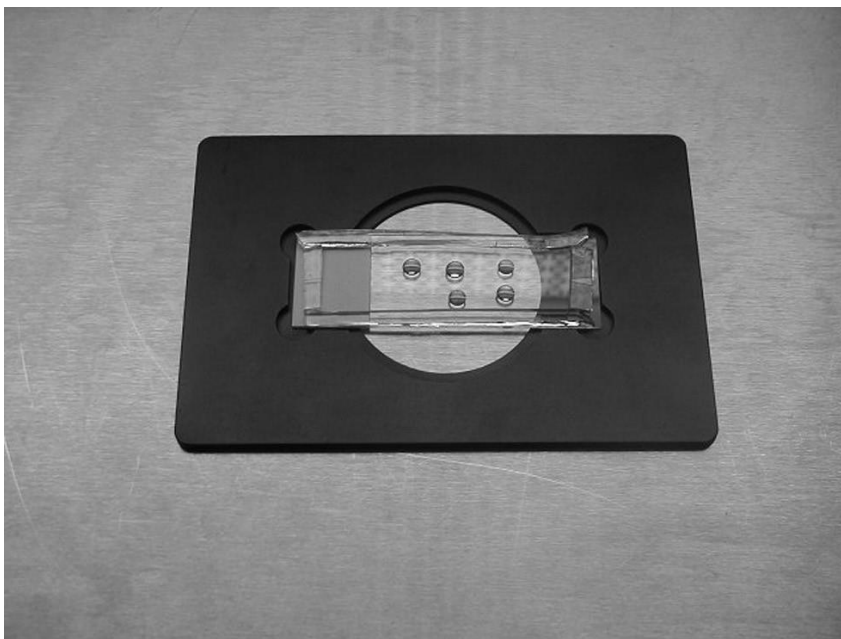
se mikromanipulatori. Mikromanipulator (Sl. 2.) je stroj koji se montira na invertni mikroskop i na koji se stavlja mikromanipulacijski alat.



Slika 2. Preuzeto iz Doe, Brown i Boroviak, 2018. a) Elektronički mikromanipulator za pipetu za pridržavanje; b) elektronički mikromanipulator za injekcijsku pipetu; c) invertni mikroskop; d) automatski mikroinjektor; e) držač za injekcijsku pipetu; f) držač za pipetu za pridržavanje; g) ručni mikroinjektor za kontroliranje tlaka u pipeti za pridržavanje

Najčešće se za mikromanipulacijske tehnike koristi hranjivi medij za embrije dodatno puferiran puferom HEPES. Izbor hranjivog medija najviše ovisi o vrsti oocite. Mikromanipulacijska komorica (Sl. 3.) sastavljena je od nekoliko kapljica manipulacijskog medija na staklenoj ili plastičnoj pločici, preko kojih je parafinsko ulje koje sprječava isparavanje i onečišćenje medija (Cibelli i sur., 2013). U procesu transplantacije jezgre prvo je potrebno odstraniti jezgru stanice primatelja. Oocita je najčešća stanica primatelj i ona ima par specifičnih karakteristika. Okružena je zaštitnim slojem glikoproteina koji se zove zona

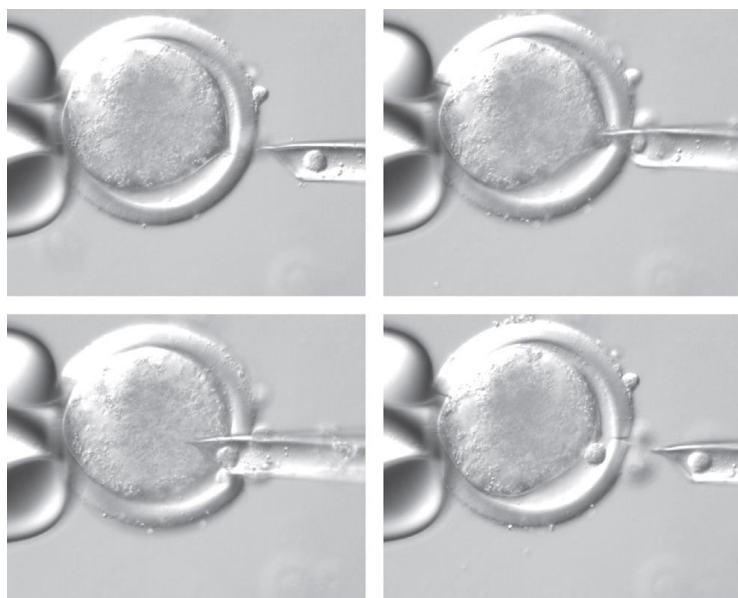
pellucida. Kromosomi oocite nalaze se u metafazi II i kondenzirani su u metafaznoj ravnini i u većini slučajeva smješteni su na rubu oocite blizu izbačenog prvog polarnog tijela. Svjetlosnim mikroskopom je teško uočiti metafazne kromosome pa se koristi interkalirajuća boja za DNA Hoechst 33342 za vizualizaciju uklonjenih kromosoma (Cibelli i sur., 2013). Epi-iluminacija oocite prije odstranjivanja jezgre nije preporučena jer može dovesti do oštećenja oocite. U slučaju kada metafazni kromosomi nisu uz polarno tijelo i kada je potrebno ozračiti oocitu nužno je koristiti UV filter da bi se oocita zaštitila. Alternativna tehnika je korištenje H3S10ph antitijelo-fikoeritrin konjugata koji se vizualizira niskoenergetskim halogenskim svjetlom koje je značajno manje fototoksično (Cibelli i sur., 2013). Ta metoda je sporija i zahtjeva dodatno mikroinjektiranje, ali omogućava veću vijabilnost embrija. Za najbolju izvedbu unutarnja površina zone pellucide, polarno tijelo i vršak pipete trebaju biti u istoj žarišnoj ravnini, a da bi se to postiglo oocita se labavo pridržava pipetom za pridržavanje i pipetom za odstranjivanje jezgre se rotira dok se ne postigne željena pozicija. Zatim se učvrsti oocita pipetom za pridržavanje i pipetom za odstranjivanje jezgre se probije zona pellucida i pomoću mikroinjektora se citoplazma oocite uvuče u pipetu dok se ne povuče i polarno tijelo. Pipeta se onda nježno izvuče i sa sobom povlači kromosome oocite (Cibelli i sur., 2013). Tako nastaje oocita bez jezgre. Oocite je nakon procesa uklanjanja jezgre dobro staviti u inkubator u hranjivi medij da se membrana i citoskelet oporave.



Slika 3. Preuzeto iz Cibelli i sur., 2013. Mikromanipulacijska komorica

3.3. Transfer jezgre, fuzija i alternativne metode

Sinkroniziranost staničnog ciklusa između oocite i stanice donora jezgre je iznimno bitna za uspješnost kloniranja. Stanice donori jezgre najčešće su sinkronizirane u G₀, G₁ i M fazi (Cibelli i sur., 2013). Stanice donori jezgre se prikupe i suspendiraju u manipulacijskom mediju te se prebace u manipulacijsku kapljicu koja sadrži oocite bez jezgre. Pomoću mikromanipulatora i odgovarajućih pipeta stanice se uvode u perivitelinu prostor, odnosno u prostor između membrane oocite i zone pellucide (Sl. 4.). Iako je to teško postići, dobro je injektirati stanice kroz isto mjesto koje je probušeno u zoni pellucidi tijekom odstranjivanja jezgre oocite. Tako se sprječava potiskivanje oocite i kasniji izlazak embrionskog materijala na dva mjesta (Cibelli i sur., 2013). Fuzija stanica se može napraviti pomoću električnog impulsa, što je ujedno i najčešća metoda, pomoću polietilenglikola i pomoću Sendai virusa. Oocita sa stanicom donorom jezgre u perivitelinomu prostoru se stavi u neionski, blago hipotonični medij između dviju paralelnih elektroda i pusti se visokonaponska istosmjerna struja što djeluje na membranu i omogućuje fuziju stanica (Cibelli i sur., 2013). Nakon fuzije stanice se stave u inkubator u hranjivi medij. Sljedeći korak u kloniranju je aktivacija oocite.



Slika 4. Preuzeto iz Cibelli i sur., 2013. Transfer odraslih fibroblasta uzgojenih u kulturi u perivitelini prostor oocite kojoj je uklonjena jezgra.

Piezelektrično potpomognuti transfer jezgre funkcionira po principu direktne injekcije jezgre donora u oocitu bez jezgre. Piezelektrični materijal je posebna keramika koja ima jedinstvena elektromehanička svojstva tako da izlaganje električnom polju inducira usmjereno iskrivljenje materijala (Cibelli i sur., 2013). Koristeći ta svojstva može se dobiti jaki i precizni usmjereni pokret vrška pipete. Prednosti su što se tako minimalizira transfer citoplazme donora jezgre i nije potrebna fuzija.

Mikroinjektiranje je nepovoljna tehnika kada je potrebno obraditi velik broj stanica tako da se radi na mnogim alternativama koje bi mogle zamijeniti mikroinjektiranje u procesu uklanjanja jezgre i transfera jezgre. Primjeri su uklanjanje jezgre pomoću centrifugiranja u gradijentu, kemijsko uklanjanje jezgre, funkcionalno uklanjanje jezgre, telofazno uklanjanje jezgre i prijenos jezgre bez mikromanipulatora (Cibelli i sur., 2013). Centrifugiranje u gradijentu koristi se činjenicom da je genetički materijal teži od citoplazme i ako se ukloni zona pellucida te se oocite centrifugiraju u gradijentu u prisutnosti inhibitora citoskeleta metafazna ploča se može odvojiti od stanica. Kemijsko uklanjanje jezgre funkcionira na temelju djelovanja kemikalije koja sprječava razdvajanje kromosoma u drugoj mejotskoj diobi i dovodi do izbacivanja cijelog genetičkog materijala u obliku drugog polarnog tijela. Telofazno i kemijsko uklanjanje jezgre djeluju nakon aktivacije oocite tako da imaju potencijal za zadržavanje materijala povezanog s diobenim vretenom koji je bitan za razvoj. Prijenos jezgre bez mikromanipulatora funkcionira na principu da se oocitama ukloni zona pellucida te se vezanje stanica donora jezgre i oocita poboljša koristeći fitohemaglutinin te se zatim provede fuzija.

3.4. Aktivacija oocite

U procesu oplodnje jajne stanice (oocite) potiče se nastavak mejoze, egzocitoza kortikalnih granula, izbacivanje drugog polarnog tijela i formacija pronukleusa. Zajedničkim imenom, procesi koje potiče oplodnja nazivaju se aktivacija oocite. Kod sisavaca aktivacija oocite popraćena je oscilacijama u koncentraciji Ca^{2+} iona. Iako nije još potpuno razjašnjeno kako spermij aktivira jajnu stanicu i potiče oscilacije kalcijevih iona, smatra se da je za to bitan faktor fosfolipaza C zeta (Cibelli i sur., 2013). Fosfolipaza C zeta djeluje preko IP_3 (inozitol 1,4,5-trifosfat) na receptore endoplazmatskog retikuluma koji je glavno skladište kalcijevih iona u stanici. Oscilacije koncentracija kalcijevih iona potiču druge signale u stanici i dovode do procesa karakterističnih za aktivaciju oocite. U procesu kloniranja i transplantacije jezgre u oocitu, da bi se potaknuo embrionalni razvoj, potrebno je umjetno aktivirati oocitu. Aktivacijski protokoli su dizajnirani tako da potiču promjene koncentracija kalcija ili oponašaju efekte tih oscilacija (Cibelli i sur., 2013). Česta metoda koja se koristi u aktivaciji oocite je izlaganje

etanolu ili Ca^{2+} ionoforima i ionomicinu koji potiču jedno dugotrajnije povećanje koncentracija Ca^{2+} . Te metode potrebno je kombinirati s drugim spojevima koji održavaju nisku aktivnost MPF (engl. *Maturation Promoting Factor*) i MAPK (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) jer signal Ca^{2+} ne traje dovoljno dugo, pogotovo kod sisavaca gdje je za prijelaz iz MII u interfazu potrebno nekoliko sati (Cibelli i sur., 2013). Za aktivaciju mogu se koristiti i stroncijev klorid (SrCl_2), timerosal ili acetilkolin koji potiču ponavljajuće promjene u koncentraciji Ca^{2+} iona koje traju nekoliko sati (Cibelli i sur., 2013). Osim kemijskih spojeva mogu se koristiti i električni impulsi u prisutnosti visokih koncentracija ekstracelularnog kalcija. Ne može se predložiti univerzalna metoda aktivacije oocite jer većina metoda koje se koriste ne uspijevaju proizvesti željene oscilacije kalcija i zahtijevaju korištenje spojeva koji imaju više meta djelovanja (Cibelli i sur., 2013). Pri biranju metode bitno je paziti na tri parametra: 1) da postiže visoku stopu aktivacije oocita i pred-implantacijskog razvoja embrija, 2) da je visoka stopa preživljavanja zigota i 3) da je laka primjena metode.

3.5. Kultura embrija *in vitro* i implantacija u surogat majke

Prije implantacije u surogat majku embriji dobiveni transplantacijom jezgre uzgajaju se neko vrijeme u kulturi. Vijabilnost embrija ovisi o uvjetima uzgoja u kulturi. Vijabilnost se definira kao sposobnost blastociste da se uspješno implantira i razvije u fetus (Cibelli i sur., 2013). Da bi se održala vijabilnost embrija u kulturi potrebno je minimalizirati metabolički, homeostatski i osmotski stres. U inkubatoru je bitno izbjeći pH i temperaturne promjene (Cibelli i sur., 2013). U prirodnim uvjetima, u jajovodu i maternici, gradijent nutrijenata nije pasivan već regulira metaboličke funkcije embrija. S obzirom da je regulacija metabolizma osnova uspješnog ishoda trudnoće, u nekoliko vrsta sisavaca usvojen je pristup sekvencijalnog hranjivog medija u kulturi te je pokazao visoku uspješnost (Cibelli i sur., 2013).

Odabir surogat majke ovisi o vrsti koju se klonira i postoji puno više uputa za vrste koje se češće kloniraju kao što su krave i ovce. Pravilno veterinarsko praćenje i briga tijekom trudnoće su esencijalni faktori za uspješno reproduktivno kloniranje. Postotak uspješnosti preživljenja fetusa do rođenja je jako nizak neovisno o vrsti koju se klonira ili tehnici koja se koristi. Glavni problem u trudnoćama s klonovima za većinu vrsta je neuspješnost formiranja placente ili abnormalni razvoj placente (Cibelli i sur., 2013).

4. Terapeutsko i reproduktivno kloniranje

Terapeutsko kloniranje je transfer jezgre izolirane iz somatske stanice u oocitu kojoj je uklonjena jezgra s ciljem dobivanja embrionskih matičnih stanica s istim genomom kao i donor

jezgre (Kfoury, 2007). Glavna razlika između reproduktivnog i terapijskog kloniranja je u tome što se pri reproduktivnom kloniranju dobiveni embriji implantiraju u maternicu surogat majke dok se kod terapijskog kloniranja, kada embrio postigne fazu blastule, stanice iz embrioblasta ili unutrašnje stanične mase izoliraju i uvode u kulturu stanica. Embrijske matične stanice dobivene terapijskim kloniranjem mogu proliferirati vječno *in vitro* te su pluripotentne, što znači da se mogu razviti u bilo koji tip stanice prisutne u tijelu (Kfoury, 2007). Proces transfera jezgre koji se koristi u terapijskom kloniranju ne razlikuje se od transfera jezgre za reproduktivno kloniranje (Kfoury, 2007). Ciljevi reproduktivnog i terapijskog kloniranja značajno se razlikuju. Dok reproduktivno kloniranje kao cilj ima proizvesti organizam identičan donoru te je u većini država zabranjeno izvođenje na ljudima, terapijsko kloniranje usmjereno je primarno prema ljudima kao tehnika za liječenje nekih bolesti i nadomještanje oštećenih organa ili tkiva. Neki od slučajeva u kojima se kao liječenje može koristiti terapijsko kloniranje su paraliza, ciroza jetre, teške opekline, osteoporoza i uz kombinaciju s genskom terapijom može se koristiti kod liječenja dijabetesa, hemofilije, Parkinsonove bolesti i mnogih drugih (Kfoury, 2007). Najveća prednost je u tome što organi ili tkiva dobiveni putem terapijskog kloniranja imaju isti genom kao i primatelj, koji je ujedno i donor jezgre, te ne izazivaju imunološki odgovor kada se transplantiraju. Najveće prepreke terapijskom kloniranju su nabavka velikog broja ljudskih oocita te etički problemi vezani uz uništavanje embrija (Whittaker, 2005). Otkriće induciranih pluripotentnih stem stanica (iPS) smanjilo je zainteresiranost za terapijsko kloniranje zato što predstavlja jeftiniju i sigurniju alternativu, ali neke istraživačke grupe objavile su razlike u iPS stanicama i embrionalnim stem stanicama, dobivenim putem terapijskog kloniranja, koje idu u korist terapijskom kloniranju (Cibelli i sur., 2013).

5. Primjeri

5.1. Početci na vodozemcima

Prvi uspjesi u kloniranju postignuti su na vodozemcima kao što je već spomenuto u pregledu povijesti kloniranja. Razlog tome je njihova velika oocita i velik broj dostupnih oocita. Specifičnost nekih oocita vodozemaca je u tome što nije potrebna dodatna aktivacija oocite već se ona aktivira injekcijskom iglom pri transplantaciji jezgre (Cibelli i sur., 2013). Takve oocite ima i vrsta *Xenopus laevis* na kojoj je napravljen prvi uspješni pokus kloniranja diferenciranih stanica intestinalnog epitela.

5.2. Dolly

Najpoznatiji pokus kloniranja je ovca Dolly (Sl. 5.). Dolly je prvi sisavac kloniran iz ne-embrijskih stanica. Rođena je u srpnju 1996. u Škotskoj na Institutu Roslin, a za njezin nastanak zaslužni su znanstvenici Ian Wilmut i Keith Campbell. Klonirana je metodom transplantacije jezgre iz stanica mliječnih žlijezda šestogodišnje ovce Finn Dorset, koje su se prethodno izglednijale nedostatkom seruma u kulturi da bi im se induciralo stanje mirovanja tj. da bi ušle u G_0 fazu staničnog ciklusa (Cibelli i sur., 2013). Nakon toga su fuzionirane elektrofuzijom s oocitom kojoj je uklonjena jezgra. Predstavljena je svijetu u veljači 1997. i izazvala je veliku zainteresiranost medija te približila pojam kloniranja široj javnosti. Analizom njene DNA otkriveno je da su joj telomere kraće nego što bi trebale biti, ali nije ustanovljeno nikakvo preuranjeno starenje. Dolly je bila zdrava i fertilna te je imala 6 potomaka. 2001. dijagnosticiran joj je artritis koji je uspješno liječen. Eutanazirana je u veljači 2003. godine nakon što je počela pokazivati simptome zaraze Jaagsiekte ovčjim retrovirusom (The Life of Dolly | Dolly the Sheep, 2020).



a.

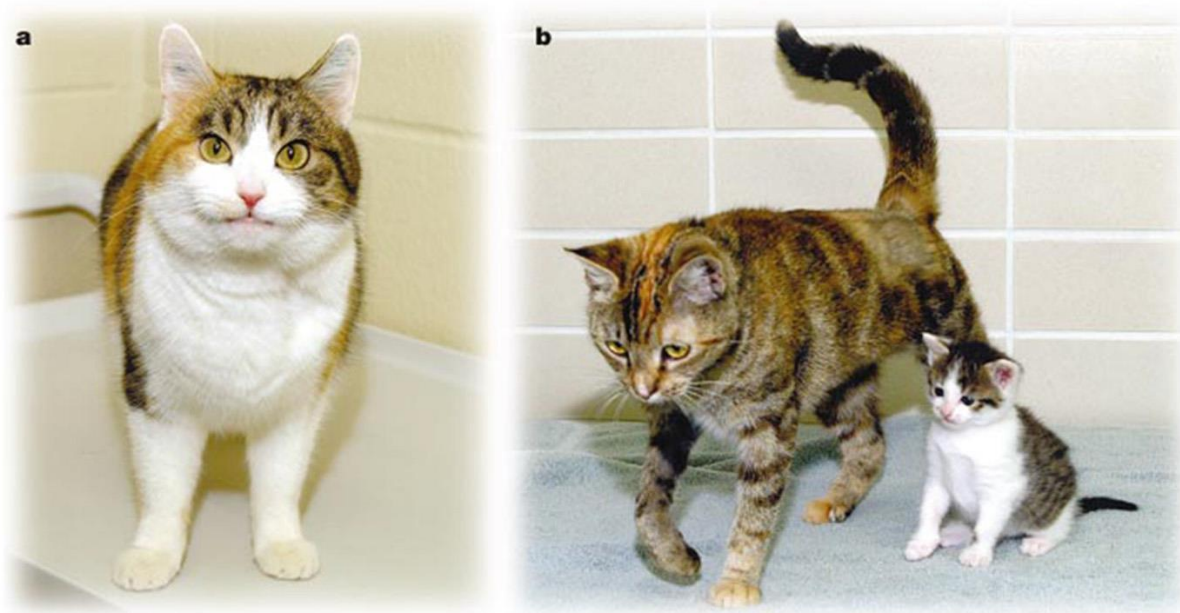
b.

Slika 5. Preuzeto iz Westhusin i Long, 2018. A) Dolly i njena surogat majka B) Odrasla Dolly sa svojim prvim janjetom

Nakon Dolly klonirane su brojne druge vrste uključujući miševe, krave, koze, svinje, mačke, zečeve, štakore, pse i deve (Cibelli i sur., 2013), a 2018. uspješno su klonirani i prvi primati (Greely, 2020).

5.3. Kućni ljubimci

Prva klonirana mačka Copy Cat (CC) (Sl. 6.), rođena je 22. prosinca 2001. godine. Klonirana je od domaće kratkodlake calico mačke na Fakultetu veterinarske medicine u Teksasu (Cibelli i sur., 2013). Prvi klonirani pas Snuppy, rođen je 2005. godine, a kloniran je iz stanica Afganistanskog hrta (Cibelli i sur., 2013). CC i Snuppy otvorili su vrata biznisu kloniranja kućnih ljubimaca. Danas se tim biznisom bavi nekoliko tvrtki diljem svijeta, a jedna od najpoznatijih je ViaGen Pets koji nude usluge kloniranja mačaka i pasa. Cijena kloniranja psa je 50 000 američkih dolara, a mačke 35 000 američkih dolara.



Slika 6. Preuzeto iz Westhusin i Long, 2018. A) Rainbow: mačka iz koje su uzete stanice za kloniranje CC. b) CC, prva klonirana mačka i njena surogat majka.

6. Etika

Etička pitanja, koja se odnose na reproduktivno kloniranje, vezana su za potencijalno kloniranje ljudi. Iako je tijekom godina kloniranje veoma napredovalo te su 2018. čak uspješno klonirani i primati smatra se da ljudski klonovi još uvijek nisu proizvedeni. U javnosti je bilo

izjava da su uspješno klonirani ljudi, ali nisu potvrđene ni dokazane. Jedna od poznatijih grupa koja je tvrdila da su klonirali ljude je grupa Clonaid (Greely, 2020). Većina zemalja danas tretira kloniranje ljudi kao ilegalno, ali to nije slučaj svugdje u svijetu.

Primarni problem kod reproduktivnog kloniranja ljudi je velika neefikasnost procesa kloniranja. Čak i s kloniranjem životinja za koje su procesi uhodani prenatalni gubitak je još uvijek iznimno visok. Jako nizak omjer uspješnih trudnoća i transferiranih embrija i brojni poremećaji pri rođenju ukazuju na to da proces epigenetičkog reprogramiranja koji se događa u rekonstruiranim embrijima nije još dovoljno razjašnjen i reproduktivno kloniranje predstavlja velik zdravstveni rizik za potencijalno klonirano dijete. Ta činjenica glavni je razlog zašto većina zemalja ima zakone protiv reproduktivnog kloniranja ljudi. Osim rizika za zdravlje klona postoje i druge etičke dileme vezane za reproduktivno kloniranje. Velik gubitak embrija koji se događa pri reproduktivnom kloniranju zabrinjava one koji vjeruju da život počinje od začetka. Još jedna problematika je nabavka humanih oocita što je invazivan i potencijalno opasan zahvat za žene donore oocita (Whittaker, 2005). U slučaju da se tehnika kloniranja poboljša i da se smanje rizici povezani s njom još uvijek postoje etički problemi koje predstavljaju psihološki čimbenici kojima bi klonirana djeca mogla biti izložena, poput prevelike znatiželje javnosti za njihov život i manjka privatnosti, nametnutih očekivanja koja bi im otežala traganje za vlastitim interesima i tretiranje djece kao sredstva, a ne cilja. Danas znamo da genetički materijal nije jedini presudan za oblikovanje fenotipa, a pogotovo ne osobnosti tako da se može argumentirati da će klonirana djeca biti individualci fizički i psihički različiti od osoba od kojih su klonirani. Iako postoji puno negativnih scenarija reproduktivnog kloniranja većina ih počiva na strahu, a ne toliko na opravdanim sumnjama. Reproductivno kloniranje bi se vjerojatno najviše koristilo kao potpomognuta reproduktivna tehnika kod parova koji ne mogu imati djecu, a žele imati djecu koja će im biti genetički u srodstvu. U tom slučaju bitno je zakonski regulirati kloniranje za etički prihvatljive svrhe te obaviti detaljno upućivanje i informiranost u proces te selekciju roditelja kojima bi tehnika bila dostupna.

7. Literatura

- Bowring, F., 2004. Therapeutic and reproductive cloning: a critique. *Social Science & Medicine*, 58(2), pp.401-409.
- Burley, J., 1999. The ethics of therapeutic and reproductive human cloning. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(3), pp.287-294.
- Cibelli, J., Wilmut, I., Jaenisch, R., Gurdon, J., Lanza, R., West, M. and Campbell, K., 2013. *Principles Of Cloning*. 2nd ed. Academic Press
- Doe, B., Brown, E. and Boroviak, K., 2018. Generating CRISPR/Cas9-Derived Mutant Mice by Zygote Cytoplasmic Injection Using an Automatic Microinjector. *Methods and Protocols*, 1(1), p.5.
- Gurdon, J., 2005. Reproductive cloning: past, present and future. *Reproductive BioMedicine Online*, 10, pp.43-44.
- Gurdon, J. and Byrne, J., 2003. The first half-century of nuclear transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), pp.8048-8052.
- Kfoury C., 2007. Therapeutic cloning: promises and issues. *Mcgill J Med*, 10(2), pp.112–120.
- McKinnell, R. and Di Berardino, M., 1999. The Biology of Cloning: History and Rationale. *BioScience*, 49(11), pp.875-885.
- Paterson, L., DeSousa, P., Ritchie, W., King, T. and Wilmut, I., 2003. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Animal Reproduction Science*, 79(3-4), pp.137-143.
- Savulescu, J., 2005. The ethics of cloning. *Medicine*, 33(2), pp.18-20.
- Wang, Y., Fan, N., Song, J., Zhong, J., Guo, X., Tian, W., Zhang, Q., Cui, F., Li, L., Newsome, P., Frampton, J., Esteban, M. and Lai, L., 2014. Generation of knockout rabbits using transcription activator-like effector nucleases. *Cell Regeneration*, 3(1), pp.3:3.
- Westhusin, M. and Long, C., 2018. Reproductive Cloning. *Encyclopedia of Reproduction*, pp.776-781.
- Whittaker, P., 2005. Therapeutic cloning: The ethical limits. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), pp.689-691.

Internetski izvori:

Dolly.roslin.ed.ac.uk. *The Life Of Dolly | Dolly The Sheep*. [online] Dostupno na: <https://dolly.roslin.ed.ac.uk/facts/the-life-of-dolly/index.html> [Pristupljeno 10.07.2020.].

Greely, H., 2020. *Cloning Humans Is Technically Possible. It's Curious No One Has Tried - STAT*. [online] STAT. Dostupno na: <https://www.statnews.com/2020/02/21/human-reproductive-cloning-curious-incident-of-the-dog-in-the-night-time/> [Pristupljeno 10.07.2020.].

Leonard, K., 2016. *What Ever Happened To Cloning?*. [online] US News. Dostupno na: <https://www.usnews.com/news/articles/2016-08-04/what-ever-happened-to-cloning> [Pristupljeno 10.07.2020.].

8. Sažetak

Reproduktivno kloniranje tehnika je kojom se jezgra jedne stanice transplantira u drugu stanicu, kojoj je prethodno uklonjena jezgra, te iz koje se može potaknuti embrionalni razvoj. Krajnji cilj reproduktivnog kloniranja je dobiti organizam koji je genetički istovjetan organizmu, tj. stanici iz koje je transplantirana jezgra. Kroz povijest koristilo se kao alat proučavanja staničnih procesa povezanih uz diobe, epigenetičkih promjena, staničnog starenja te potencijala genetičkog materijala da upravlja uspješnim embrionalnim razvojem. Danas glavnu uporabu ima većinom u komercijalne svrhe za proizvodnju životinja koje imaju neki poželjni genotip. Cilj ovog seminara je objasniti princip reproduktivnog kloniranja i kratko prijeći preko glavnih uspjeha tehnike te moralnih dilema u vezi kloniranja ljudi. Iako se više koristi u komercijalne svrhe nego u istraživačke, posjeduje veliki potencijal za otkrivanje novih spoznaja u području epigenetike, stanične biologije te embriologije. Kao i ostala tehnološka i znanstvena postignuća, reproduktivno kloniranje se stalno unaprjeđuje i ostaje nam samo predviđati kako će u budućnosti mijenjati svijet.

9. Summary

Reproductive cloning is a technique by which the nucleus of one cell is transplanted into an enucleated cell from which embryonic development can be stimulated. The goal of reproductive cloning is to obtain an organism that is genetically identical to the organism, i.e. the cell from which the nucleus was transplanted. Over the course of history, it has been used as a tool to study cellular processes related to division, epigenetic changes, cellular aging, and the potential of genetic material to manage successful embryonic development. Today it is mainly used for commercial purposes to produce animals that have some desirable genotype. The aim of this seminar is to explain the principle of reproductive cloning and briefly go over the main achievements of the technique and moral dilemmas regarding human cloning. Although it is more often used for commercial purposes than for research, it has great potential for acquiring new insights into the field of epigenetics, cell biology and embryology. Like other technological and scientific advances, reproductive cloning is constantly improving, and we can only imagine its way of shaping the future.