

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Klonování koní a jeho využití v dnešní době**

**Bakalářská práce**

**Adéla Řepová**

**Chov koní**

**Ing. Lucie Starostová**

**© 2023 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Klonování koní a jeho využití v dnešní době" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4. 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Lucii Starostové za cenné rady, ochotu a vedení práce. Dále bych ráda poděkovala svým nejbližším za nekonečnou podporu a důvěru.

# Klonování koní a jeho využití v dnešní době

## Souhrn

Klonování jako reprodukční metoda se čím dál tím více dostává do popředí a vchází tak do podvědomí chovatelů a majitelů koní.

Bakalářská práce ve formě literární rešerše pojednává o problematice klonování koní jako takové. Úvodní část je věnována stručnému seznámení s průběhem oplození, embryonálním vývojem a v neposlední řadě s obecnou historií klonování. Oproti ostatním hospodářským zvířatům se svět dočkal prvního koňského klonu až v roce 2003. Prvním klonovaným koňovitým bylo hříbě muly odvozené z buněk embryoblastů 45 dnů starého plodu. Ve stejném roce výzkumný tým Cesara Galliho přišel se zprávou o prvním klonovaném hříběti vytvořeného z fibroblastů dospělého jedince. Následující část práce se zabývá metodami klonování. Nejpoužívanější metodou je přenos jader somatických buněk (SCNT). Tu můžeme shrnout do tří kroků. První fází je enukleace oocytů (vyjmutí jádra). V následujícím kroku se jedná o nukleární transfer neboli vložení dárcovských buněk do prázdného vajíčka a následná aktivace rekonstruovaného embrya. Poslední část se zabývá kultivací klonovaného embrya *in vitro* a následným embryotransferem do klisny příjemkyně.

Druhá část literární rešerše pojednává o využití klonování v dnešní době. Zájem o technologii SCNT výrazně vzrostl, o čemž svědčí několik komerčních společností zabývajících se klonováním koní. Do roku 2018 bylo v nejméně šesti zemích vyprodukováno více než 370 klonů. Důvodů pro klonování je hned několik. Prvním a nejčastějším je zachování genetického fondu zvířat, která by se dále nemohla rozmnožovat (nemoc, úhyn, kastrace). Dalším důvodem může být uchování genetického materiálu ohrožených plemen (kůň Převalského). Nejčastěji se setkáváme s klonováním špičkových koní, kteří dosáhli výjimečných sportovních výkonů.

Poslední část bakalářské práce shrnuje zdravotní a etické aspekty klonování. Zdravotní stav klonů po narození vyžaduje intenzivní péči. Ve většině případů se jedná o běžné problémy a onemocnění, která doprovázejí i neklonovaná hříbata. Doposud existuje málo studií o souvislostech poporodních komplikací a metody klonování. Finální kapitola pojednává o etických aspektech a názoru veřejnosti na danou problematiku.

**Klíčová slova:** klonování, oocyt, equinní reprodukce, embryo, etika

# Equine cloning and its current usage

## Summary

Cloning, as an equine reproductive method, has become ever more relevant and as such, is on the mind of many a horse breeders and owners.

This literary research paper focuses on the problematic of the horse cloning itself. The foremost part is dedicated to a brief introduction of the impregnation process, embryo development and general history of cloning. Unlike in the case of other farm animals, the horse was first cloned as late as in 2003 and it was a mule foal derived from the embryoblast cells of a 45 days old foetus. In the same year, the research team of Cesare Galli announced the first cloned foal created from an adult individual fibroblasts. The following part of this thesis focuses on the cloning methods. The most frequent method is the transportation of the somatic cells' (SCNT) nuclei. That can be summarised into three phases. The first phase is an enucleation of oocytes (nucleus extraction). The second phase is a nuclear transfer, i.e. insertion of donor cells into an empty egg after which an activation of a reconstructed embryo follows. The third phase deals with the cultivation of the cloned embryo *in vitro* and the following embryotransfer into the mare-recipient.

The second part of the literary research discusses the utilisation of cloning nowadays. The SCNT technology has become a subject of significantly increased interest, the proof of which being several commercial entities that focus on horse cloning. By 2018, at least 370 clones were produced. There are several reasons for an increased exploitation of this cloning method. The first and foremost is a gene pool preservation for animals that could not further reproduce (sickness, death, castration). Another reason may be a preservation of genetic material of endangered breeds (Przewalski's horse). The most frequent reason for cloning is, however, cloning of high-end race horses that achieved exceptional results.

The final part of this paper summarises medical and ethical aspects of cloning. The health condition of clones requires an intensive care after birth. In majority of cases, the problems and illnesses are common and would affect non-cloned foals as well. Very few studies have been made so far, that would elaborate on the correlation of post-birth complications with the cloning methods. The final chapter then assesses ethical factors and opinions of wide public on the topic of cloning.

**Keywords:** cloning, oocyte, equine reproduction, embryo, ethics

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	7
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	8
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	9
	<b>3.1. Fertilizace a embryonální vývoj</b> .....	9
	3.1.1. Stručný popis fertilizace.....	9
	3.1.2. Fáze embryonálního vývoje.....	10
	<b>3.2. Klonování</b> .....	12
	3.2.2. Historie klonování.....	12
	3.2.3. Klonování koní.....	13
	<b>3.3. Klonování koní jako reprodukční technika</b> .....	15
	3.3.1. Klonování v přírodě.....	15
	3.3.2. Metoda klonování embryí.....	16
	3.3.2.1. Biopsie (separace) blastomer.....	17
	3.3.2.2. Bisekce embrya.....	18
	3.3.3. Metoda klonování pomocí přenosu jader somatických buněk (SCNT).....	19
	3.3.3.1. Zdroj a příprava oocytů.....	20
	3.3.3.1.1. Odběr oocytů z živých klisen.....	20
	3.3.3.1.2. Odběr oocytů z poražených klisen .....	22
	3.3.3.2. Dárcovská buňka.....	23
	3.3.3.3. Enukleace oocytu.....	24
	3.3.3.4. Nukleární transfer (NT) a aktivace.....	25
	3.3.3.5. Kultivace embryí.....	26
	3.3.3.6. Embryotransfer (ET).....	26
	3.3.4. Metoda klonování handmade cloning (HMC).....	27
	<b>3.4. Využití klonování v dnešní době</b> .....	28
	<b>3.5. Etické aspekty klonování koní</b> .....	32
	3.5.1. Zdravotní způsobilost klonů.....	32
	3.5.2. Etická stránka klonování koní.....	33
<b>4</b>	<b>Závěr</b> .....	34
<b>5</b>	<b>Bibliografie</b> .....	35

# 1. Úvod

Klonování je definováno jako vytváření nového jedince geneticky shodného (identického) s předlohou. Ačkoli se dnes běžně provádí v laboratořích po celém světě, v přírodě případy klonování zvířat existovaly již dříve, a to ve formě jednovaječných dvojčat. V dnešní době používaná laboratorní technika byla původně převzatá od nižších živočichů (Maserati & Mutto 2016). Klonování ve srovnání s ostatními metodami asistované reprodukce (ART) je zásadně odlišné, jelikož cílem je zreprodukovat dané zvíře, zatímco pomocí ostatních metod je vyprodukován nový jedinec (Campbell 2016). Klonování zvířat jako reprodukční technika se dočkalo rychlého vzestupu koncem 20. století, kdy se týmu profesora Iana Wilmuta povedl revoluční úspěch. Naklonovat savce pomocí somatických buněk z dospělého jedince. Narození ovce Dolly odstartovalo použití metody přenosu jader somatických buněk (SCNT), která se stala nejvyužívanějším způsobem klonování.

Zájem o technologii SCNT u koní výrazně vzrostl od doby, kdy se v Itálii v roce 2003 narodilo první klonované hříbě (Hinrichs 2006). Svědčí o tom nárůst komerčních společností, které se touto asistovanou reprodukční metodou zabývají. Dle Maserati & Mutto (2016) jsou základními výhodami jaderného přenosu u koní:

- 1) Genetická kryokonzervace buněk nebo tkáně starších zvířat, která již nejsou reprodukčně aktivní.
- 2) Kryokonzervace genetického materiálu ohrožených plemen.
- 3) V reprodukčních centrech koní, kde se nachází více dárcovských klisen s vysokou genetickou hodnotou.
- 4) Obnovení genetického fondu starých či uhynulých zvířat.

Navzdory všem novým úspěchům v posledních letech, jsme stále ještě daleko, abychom dosáhli kompletního pochopení všech mechanismů, které stojí za transformací jediné diferencované buňky v plnohodnotný a životaschopný organismus. Zejména u koní se ukázal potenciál zachování tkáně zvířete s cennou genetikou jako reprodukční výhodou. Zvláště pak u valachů nebo jedinců, kteří uhynuli. Tento fakt svědčí o možnosti využití klonu koní v chovu, kdy jinak by tito jedinci neměli možnost se dále reprodukovat (Gambini & Maserati 2018).

## **2. Cíl práce**

Cílem této práce je popsat současné poznatky a metody z oblasti klonování koní. Shromáždit informace o jeho využití v dnešní době a zpracovat literární řešení s využitím dostupných zdrojů.



### 3. Literární rešerše

#### 3.1 Fertilizace a embryonální vývoj

##### 3.1.1 Stručný popis fertilizace

Fertilizace neboli oplození je specifický biologický proces, jímž je odstartován vývoj jedince a je charakterizována jako spojení samičí a samčí pohlavní buňky a tvorbou zygoty. Dalším vývojem zygoty v průběhu blastogeneze, organogeneze a histogeneze vzniká nový jedinec. Samotné oplození je složitý proces, doprovázený cytologickými, fyziologickými a imunologickými změnami (Marvan et al. 1992).

Průběh oplození popsán dle Doležela (2003):

- Průnik spermie k mukoproteinovému obalu vajíčka (*zona pellucida*) přes zbytky *corona radiata* (denudace, akrozomální reakce, aktivní pohyb spermie)
- Uchycení hlavičky spermie na *zona pellucida* (kompatibilita vazebných míst)
- Zonární reakce (změny v *zona pellucida* zabraňující navázání další spermie)
- Penetrace spermie přes *zona pellucida* (akrozomální enzymy, vlastní pohyb spermie)
- Uchycení hlavičky na *membrana vitellina* (menší specifita ve srovnání se *zona pellucida*)
- Viteliní blok (změny v *membrana vitellina* zabraňující průnik další spermie, fúze plasmatických membrán)
- Dokončení meiotického zrání a přeměna ve vajíčko – *ovum* (vyloučení II. pólového tělíska, rozpad jaderné membrány)
- Syngamie (dekondenzace chromatimu spermie i vajíčka, tvorba pronukleů a splynutí jader)

Fertilizace je završena zmizením prvojádra, kdy je nahrazeno skupinami chromozomů spojených v profázi prvního dělení (Reece 2011). Jestliže nedošlo k oplodnění, vajíčko začíná klesat vejcovodem do dělohy a s ním rapidně klesá i šance na oplození. Neoplozené vajíčko posléze sestoupí do děložního rohu, kde zaniká a klisně nastupuje nový estrální cyklus. Pokud dojde k fertilizaci, oocyt se začíná dělit (rýhovat) a nastává další část procesu a tou je embryonální vývoj.

### 3.1.2 Fáze embryonálního vývoje

Vývojové stádium dělíme na období prenatální, toto období začíná oplozením a končí porodem. Následuje období postnatální, které začíná narozením a končí smrtí. Embryonální vývoj jako takový je klíčový pro správné fungování organismu po celý život jedince. Po úspěšné fertilizaci nastává dlouhá cesta k porodu zdravého hříběte – u koní je délka březosti v průměru 333 dní. V praxi se za akceptovatelnou délku gravidity považuje rozmezí mezi 320-360 dny. Oplodněné vajíčko, které se nachází v první fázi vývoje, nazýváme zygota. Vzniklé embryo je diploidní a začíná se mitoticky dělit (Marvan et al. 1992).

Po dvacetičtyřech hodinách od oplození se zygota rozdělí na dvě blastomery. Toto dělení nazýváme rýhování, blastomery se postupně zmenšují, zatímco původní velikost oocyty zůstává zachována (Marvan et al. 1992). V této fázi dochází ke ztrátě vnější vrstvy *corona radiata*, zatímco oplodněné vajíčko se stále nachází v *zona pellucida*, kde se dále dělí na čtyři blastomery (48 hodin), osm blastomer (72 hodin), šestnáct blastomer (96 hodin). Čtvrtý den dělení je zárodek tvořen 16-32 blastomery a je označován jako morula. Morula se v této fázi stále nachází uvnitř *zona pellucida* (Davies Morel 2020).

Přibližně šestý den od oplození se zárodek začne přesouvat z vejcovodu směrem k děložnímu rohu. Mezi 6. -16. dnem gravidity zárodek kontinuálně migruje v rozsahu celé dělohy. Pohybující se embryo vysílá biochemické signály, které informují organismus matky o přítomnosti zárodka a brání nástupu dalšího říjového cyklu. Dalším důvodem migrace je výživa embrya zajišťována sekrecí děložních žlázek produkujících „děložní mléko“. Bylo zjištěno, že transuterinní migrace není jednoduchý jednosměrný pohyb, ale embryonální váček obchází své konečné místo uchycení několikrát za den, přičemž prochází celou délkou každého děložního rohu a těla dělohy (Ginther 1983; Ginther 2010). Pohyblivost se zvyšuje v průběhu 9. a 10. dne od fertilizace. Maximální pohyblivosti dosahuje 12. dne, která se pak udržuje až do 15. dne (Ginther 2021). Během této fáze se embryo pohybuje v oblasti děložních rohů více než před tím (Ginther 2010).

V osmi dnech se buňky moruly začnou diferencovat na zárodečný terčík, blastocel a trofoblast (Kovaříková 2012). Uvnitř moruly se formuje dutina a toto zárodečné stádium vytváří blastocystu (Reece 2011). Další diference je patrná ve stádiu časná a pozdní blastocysty. Časná blastocysta je charakteristická tvorbou blastocelu, který se zvětšuje, ale stále se nachází uvnitř *zona pellucida*. Pozdní neboli expandovaná blastocysta v důsledku zvětšování blastocelu ztrácí perivitellinní prostor za současného ztenčování *zona pellucida*, která později praská a blastocysta se uvolňuje k dalšímu vývoji (Marvan et al. 1992). Devátý den se začínají tvořit zárodečné listy ektoderm a endoderm. Třetí zárodeční list, mezoderm, se vytváří čtrnáctý den. Tyto tři zárodečné listy slouží pro následovný vývoj placentárních a embryonálních tkání (Kovaříková 2012).

V případě placenty tvoří ektoderm vnější buněčnou vrstvu, která je v kontaktu s endometriem. Mezoderm tvoří cévy a systém přenosu živin v placentě. Endoderm tvoří vnitřní buněčnou výstelku, která se stane alantoickým vakem (Davies Morel 2020). Co se týče embryonálních tkání, tak z ektodermu se diferencují tkáně a orgány, které jsou ve styku s vnějším prostředím. Z entodermu vznikají orgány trávicí a dýchací soustavy, štítné a příštítné žlázy, brzlík, ostrůvky slinivky břišní a prvopohlavní buňky. Z mezodermu se diferencují tkáně a orgány s podpůrnou funkcí, které slouží k pohybu, vylučování, rozmnožování a také se zde vytváří kůra nadledvin (Marvan et al. 1992).

K fixaci embrya dochází šestnáctý den gravidity a to v místě ohybu děložního rohu, který má průměr průřezu endometria podobný jako průměr embrya (Ginther 2021). Osmnáctý den se záhyby ektodermu spojí a vznikne ochranný prostor vyplněný tekutinou – amniový vak obsahující plodovou vodu. Po celou dobu života embrya v děloze, poskytuje amniový vak čisté a ochranné prostředí, ve kterém se plod může vyvíjet (Davies Morel 2020).

U klisen se začínají kolem 35. dne březosti vytvářet z buněk migrujících z placenty tzv. endometriální pohárky. Tyto pohárky secernují hormon, známý jako gonadotropin séra březích klisen, označovaný zkratkou PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) (Reece 2011). Placenta se začíná formovat po 40. dni gravidity a v průběhu dalších 40 dní expanduje po celé děloze. Do finální podoby, kdy vyplňuje již celou dělohu, se placentární spojení rozšíří kolem 120. -150. dne. Embryonální období je charakterizováno rychlým růstem, vyvíjejí se důležité tkáně, orgány a systémy. Hlavní rysy vnější podoby těla se stávají rozpoznatelnými (Tab. 1) (Reece 2011).

Tab. 1 Pokračování březosti (Davies Morel 2020)

Den březosti	Významné fáze vývoje
45	Vnější genitálie, objem alantoického vaku 110ml
47	Srůst patra
49	Mléčné struky
55	Formování uší, víčka se začínají zavírat
60	Rozměr chorionového váčku 13,3×8,9 cm
63	Srůst očních víček, vývoj očí, patrná kopýtko, vývoj částí kopyt
75	Patrný klitoris u samic
80	Jasně patrný šourek u samců
90	Degenerace endometriálních pohárků, rozměr chorionového váčku 14×23 cm
95	Kopyto má žlutý odstín
112	Růst hmatových chlupů kolem huby
120	Růst jemné srsti kolem nosu, růst řas, oči jsou dobře patrné a zřetelné
150	Přichycení placentárních mikrokloků, viditelné řasy, zvětšení mléčné žlázy
180	Viditelná hříva a ocas
240	Ochlupení na uších, bradě, čenichu a krku
270	Srst patrná po celém těle, delší žíně ocasu a hřívě
310	Objem alantoického vaku 8,5l
320	Varlata mohou začít sestupovat
320-340	Narození plně vyvinutého plodu

Porod je fyziologický proces, při němž březí děloha vypudí plod a plodové obaly z těla matky (Reece 2011). Mechanismy, které u klisny vyvolávají porod, nejsou tak dobře objasněny jako u jiných druhů zvířat. Předpokládá se, že za spuštění kaskády procesů vedoucích k porodu je zodpovědný plod. Porodem končí embryonální vývoj a nastupuje postnatální období.

## **3.2 Klonování**

Podle běžné definice je klonování charakterizováno, jako vytváření nového jedince geneticky identického s předlohou. Tyto jedince poté označujeme jako klony.

### **3.2.1 Historie klonování**

Pokud nepočítáme přirozené děje v přírodě, známé především jako vegetativní rozmnožování, první pokusy klonování živočichů prováděné lidmi se týkaly dělení embryí. Prvním malým krokem v oblasti klonování byla v roce 1891 práce německého biologa Hanse Driescha, který experimentoval se zárodkem mořské ježovky (Bowring 2004). Driesche oddělil blastomery od buněk dvoubuněčného embrya ježovky mechanickým třepáním v nádobě s mořskou vodou (Vajta & Gjerris 2006). O jedenáct let později, stejný experiment s podobnými výsledky provedl Hans Spemann na mlocích, kdy k oddělení buněk používal vlasy svého syna (Spemann 1902; Vajta & Gjerris 2006).

Počátkem padesátých let dvacátého století se objevila více sofistikovaná metoda nepohlavního rozmnožování živočichů, kdy diferencované buňky dospělého jedince by mohly být použity k vytvoření živého organismu – klonu (Bowring 2004). První úspěšný jaderný přenos popsali Briggs a King (1952) a první klonované obratlovce v roce 1962 John Bertrand Gurdon (Tsunoda & Kato 2002). Embryologové Robert Briggs a Thomas King nazvali tuto novou techniku jako „transplantaci jader“ (Bowring 2004).

Rok 1996 byl pro oblast klonování zlomový. Výzkumný tým Roslinova Institutu (The Roslin Institute) ve Skotsku, provedl experiment, jehož výsledkem bylo narození jehňat Megan a Morag, klonovaných z embryonálních buněk (Wadman 2007).

Dne 5. 7. 1996 se pod vedením profesora Iana Wilmuta a jeho týmu Roslinova Institutu podařilo přivést na svět ovci Dolly. Dolly je jedním z nejvýznamnějších zvířat moderní biomedicíny. Embryo, bylo získáno vnesením jádra buňky mléčné žlázy jedné ovce do vajíčka druhé ovce. Tím se stala prvním savcem, který byl naklonován z genetického materiálu dospělého jedince (García-Sancho 2015). V dnešní době je klonování přítomné v běžném životě, a to především v oblasti zemědělství a biotechnologických oborech.

### 3.2.2 Klonování koní

První pokrok v oblasti klonování koní zaznamenali Allen & Pashen (1984), kdy ve své práci popisují narození dvou geneticky identických (monozygotních) dvojčat za použití splitting techniky a následným přenesením embryí do dělohy náhradních matek. Od narození ovce Dolly, prvního klonovaného savce ze somatické buňky dospělého jedince, klonování dočkalo rychlého vzestupu. Poměrně pozdě v porovnání s ostatními druhy domácích zvířat a 36 let po první zprávě o *in vitro* dozrání koňských oocytů (Fulka & Okolski 1981; Gambini & Maserati 2018) se v roce 2003 narodily první klony koňovitých vytvořené pomocí metody přenosu jader somatických buněk (SCNT) (Galli et al. 2003a; Woods et al. 2003; Gambini & Maserati 2018). První narození koňovití v roce 2003 byli tři muly vytvořené z fetálních embryblastů (Woods et al. 2003; Maserati & Mutto 2016). První klonovaná mula (Obr. 1a) byla odvozená z buněk 45 dnů starého plodu vytvořeného *in vivo* zralých oocytů a za využití okamžitého oviduálního přenosu embryí (Woods et al. 2003; Gambini & Maserati 2018).



Obr. 1 Přehled klonů koňovitých, které se narodily v různých zemích po celém světě  
(Gambini & Maserati 2018)

(a) Idaho Gem, klon muly narozený v USA 2003, (b) Prométhea, klon koně narozený v Itálii 2003, (c) klon koně narozený v USA 2005, (d) Ñandubay Bicentenario, klon koně narozený v Argentíně 2010, (e) klon koně narozený v Koreji 2010, (f) Turbante, klon koně narozený v Brazílii (In Vitro Clonagem) 2012, (g) klon koně narozený v Kolumbii (GenesCol) 2016

Téhož roku přišel výzkumný tým vedený Cesarem Gallim z Laboratoře reprodukčních technologií v Cremoně (Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione) se zprávou o narození hříběte (Obr. 1b), klonu u kterého byl použit fibroblast dospělého koně. Fibroblasty byly získány biopsií kožních buněk klisny plemene hafling a hřebce arabského plnokrevníka (Galli et al. 2003a). Klonované hříbě pojmenované Prométhea, bylo geneticky shodné s klisnou, která ho odosila (zároveň byla i dárkyní somatických buněk), čímž bylo zpochybněno tvrzení, že pro vývoj plodu v těle matky je nezbytné, aby matka rozeznala plod jako imunologicky odlišný (Szekeres-Bartho 2002; Gambini & Maserati 2018). V roce 2008 se klisně Prométhee narodilo první hříbě, které bylo pojmenováno Pegasus. K oplodnění klisny byla použita metoda umělé inseminace. V roce 2017 byla Prométhea nejstarším žijícím klonem koně (Gambini & Maserati 2018).

V roce 2005 oznámila laboratoř v Itálii narození druhého životaschopného klonu koně. Bohužel, hříbě do 48 hodin po narození uhynulo v důsledku sepse, která nesouvisela s metodou klonování (Lagutina et al. 2005; Hinrichs 2006). Ve stejném roce laboratoř Texas A&M University (TAMU) pod vedením profesorky Katrin Hinrichové naklonovala životaschopné hříbě (Obr. 1c) a později téhož roku i druhé, čímž se počet úspěšně narozených klonů za využití dárcovských buněk z dospělého jedince zvedl celkově na čtyři (Hinrichs 2006). Ve své práci Katrin Hinrichová (2006) uvádí, že v roce 2006 se laboratoři Texas A&M University podařilo odchovat 7 z 9 narozených klonovaných hříbat a komerční laboratoři ViaGen zdravá hříbata dvě. Do června roku 2017 vyprodukovala skupina profesorky Hinrichové 21 klonovaných koní, z toho 18 hříbat bylo zdravých a životaschopných (Gambini & Maserati 2018).

První úspěch na poli klonování koní začíná zaznamenávat i Jižní Amerika, a to konkrétně Argentina. V roce 2008 bylo v Argentině odchováno první klonované hříbě, které zemřelo pár hodin po porodu (Miragaya et al. 2010; Gambini & Maserati 2018). O dva roky později se skupině Daniela Salamoneho narodil první zdravý klonovaný kůň (Obr. 1d) v Jižní Americe (Gambini et al. 2012; Gambini & Maserati 2018). V letech 2012-2016 se díky dvěma soukromým společnostem Kheiron a Crestview Genetics narodilo přibližně 120 hříbat (Gambini et al. 2012, 2014; Olivera et al. 2016; Gambini & Maserati 2018).

V roce 2010 se v Koreji narodilo klonované hříbě (Obr. 1e) za pomoci techniky ovum pick-up (OPU). Úspěchu se dočkala i Brazílie a Kolumbie. V roce 2012, oznámila brazilská společnost *In Vitro Brasil Clonagem Animal* narození prvního klonovaného koně (Obr. 1f). O čtyři roky později slavila úspěch kolumbijská společnost GenesCol s prvním odchovaným hříbětem (Obr. 1g) (Gambini & Maserati 2018).

Nejaktuálnějším úspěchem v oblasti klonování koní je narození prvního klonovaného plnokrevního koně v Číně, který zároveň získal úřední registraci pro jezdecký sport. Tento kůň pojmenovaný Zhuang Zhuang, narozený v červnu roku 2022 je úspěchem laboratoře Sinogene v Pekingu. Zhuang Zhuang je klonem závodního koně importovaného z Německa ("Cloned horse raises hopes for equestrian sports in China" 2023).

### **3.3 Klonování jako reprodukční technika**

Klonování koní je nákladný a neefektivní proces, který si však získal zájem ve společnosti (Damasceno Teixeira et al. 2019). Klonování je v současné době jedinou osvědčenou technikou, jak efektivně rozmnožit cenné jedince, kteří se ve velkém počtu vyskytují po celém světě. Poptávka po jejich množení roste, nicméně účinnost jaderného přenosu je stále nízká (Olivera et al. 2016).

#### **3.3.1. Klonování v přírodě**

Klonování jako nepohlavní rozmnožování je v přírodě běžnou formou množení rostlin. U vyšších rostlin se jedná o vegetativní rozmnožování ve formě řízkování či odnožování. U živočichů je proces rozmnožování natolik rozmanitý, že téměř jakýkoliv princip, který si můžeme představit, byl použit. Nepohlavní rozmnožování můžeme pozorovat například u pučení korálů nebo medúz, fragmentace červů či partenogeneze u některých ryb, hmyzu, žab a plazů. Většina živočichů, kteří mají možnost se rozmnožovat pomocí partenogeneze, tuto metodu využívá jen omezeně (Vajta & Gjerris 2006).

U savců se s „klonováním v přírodě“ můžeme setkat v případě vzniku jednovaječných dvojčat. Aby se narodila monozygotická dvojčata, embryo se musí rozdělit, kdy z jednoho zárodku vzniknou dvě (vzácně i více) identické kopie. K tomuto procesu nejčastěji dochází v rané fázi dělení (stádium 2 buněk) nebo v pozdějších fázích (stádium 4-16 buněk) (Scott 2002). Obecně platí, že v případě, kdy se vajíčko rozdělí 0-3 den od oplodnění, jsou zárodky bichoriální, biamniální a každý má svou vlastní placentu. Pokud dojde k rozdělení mezi 3-7 dnem od fertilizace, jsou zárodky monochoriální, biamniální a mají společnou placentu.

Nejvzácnějším případem je rozdělení vajíčka mezi 8-12 dnem od početí. Tyto zárodky jsou monochoriální, monoamniální a mají společnou placentu. Dojde-li k rozdělení vajíčka po 13. dni od fertilizace, nedojde k úplnému rozdělení a vznikají dvě srostlá embrya, tzv. siamská dvojčata.

Dle Daviese Morela (2008) je vícečetná březost u koní stále větším problémem. Obvykle jsou narozená hříbata dizygotní (pocházejí z více oplodněných vajíček a jsou neidentická). Zatímco jednovaječná dvojčata jsou velmi vzácná. Studie naznačují, že naprostá většina vícečetných březostí u koní jsou dizygotní dvojčata (94,8 %) a pouze v 5,2 % případů se jedná o monozygotní dvojčata.

Mezi chovateli je přítomnost dvojčat nežádoucí. Klisny se řadí mezi uniparní zvířata a vznik dvojčat provázejí často komplikace. Velkým problémem u vícečetné březosti je anatomie a fyziologie dělohy a placenty. Děloha klisny může adekvátně uživit pouze jeden plod. Vzhledem k povaze koňské placenty (*placenta diffusa*), kdy klky jsou vyvinuté po celém povrchu choria, dochází k pevnému spojení s děložní sliznicí. V ideálním případě placenta vyplňuje zhruba  $\frac{3}{4}$  prostoru dělohy a může tak docházet k výměně látek mezi plodem a matkou. Pokud jsou přítomny zárodky dva, prostor pro spojení placenty s dělohou se zmenšuje a nedochází k dostatečné výměně látek, což má negativní následky pro budoucí vývoj obou plodů (Davies Morel 2008).

### 3.3.2. Metoda klonování embryí

Průkopníkem v oblasti dělení embryí byl německý biolog Hans Driesch, který experimentoval se zárodky mořské ježovky. S podobnými výsledky přišel Hans Spemann, který prováděl výzkum na mlčích. Nicméně nedostupnost vybavení a nedostatečné znalosti o uchovávání savčích oocytů a embryí vedly k tomu, že tato metoda se u savců nedočkala úspěchu téměř dalších 80 let (Vajta & Gjerris 2006). V roce 1979 se dánskému biologovi S. M. Willadsenovi podařilo vyvinout zárodky hospodářských zvířat, oddělených z osmibuněčných embryí.

Dělení embryí je stejný proces jako přirozený proces vzniku jednovaječných dvojčat. V principu se jedná o *in vitro* rozdělení zárodku ve dvou, čtyř nebo osmibuněčném stádiu blastocysty (Rahbaran et al. 2021). Dle Vajta & Gjerris (2006) se tato metoda po počátečním nadšení nestala tak účinnou, jak se očekávalo. I kdyby byly technické potíže a nízká míra březosti vyřešeny, setrval by problém, že embryo lze rozdělit pouze jednou či dvakrát. V tomto případě mohou vzniknout nanejvýš 4 identická dvojčata.

Karl Illmensee & Mike Levanduski (2010) ve své práci popisují případ u myši, kdy první a druhé dělení embryí přineslo vysokou míru účinnosti pro blastocysty. Zatímco v porovnání s třetím dělením, které neposkytlo žádné zlepšení a vedlo k významnému snížení počtu embryí. Tyto údaje jasně ukazují, že první a druhé dělení embryí zvyšuje množení blastocyst a tím i počet embryí dostupných pro potenciální přenos. I přes jistá negativa byly zjištěny četné výhody této metody ve výzkumných a reprodukčních programech:

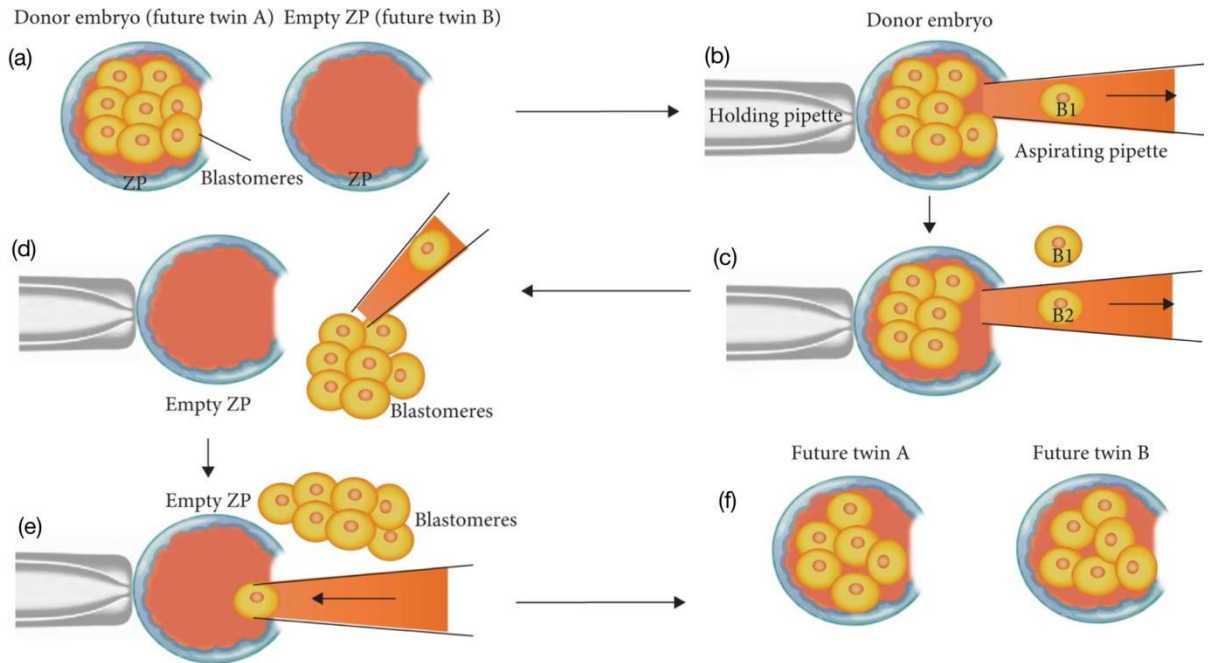
- 1) Pokud vaječník obsahuje nízký počet oocytů a šance na vznik embrya je značně nízká, lze splitting technikou zajistit dostatečný počet pro přenos do dělohy. Ostatní embrya lze zmrazit pro pozdější implantaci (Casser et al. 2019).
- 2) Genetická onemocnění lze diagnostikovat ještě před implantací zárodku do dělohy. Za tímto účelem se embryo rozdělí, vytvoří se dvojčata, z nichž jedno je použito k diagnostice a druhé je kultivováno k vytvoření plnohodnotného organismu (Rahbaran et al. 2021).
- 3) Léčba genetických onemocnění pomocí genové terapie v nejranější fázi tvorby embrya (Omidi et al. 2020).
- 4) *In vitro* produkce tkání nebo orgánů. Pokud potomek potřebuje transplantaci tkáně nebo orgánu, lze k výrobě použít druhé embryo chráněné v reprodukční biologické laboratoři (Noli et al. 2016).

Nejnovější zdokonalení mikroskopie a mikromanipulační technologie umožnilo mechanickou indukci monozygotických dvojčat pomocí biopsie blastomer nebo bisekce blastocysty (Noli et al. 2016).



### 3.3.2.1. Biopsie (separace) blastomer

Separace blastomer zahrnuje odebrání jedné nebo více blastomer a jejich vložení do připravené a evakuované *zona pellucida* (ZP) pro následovný růst a vývoj (Noli et al. 2016).



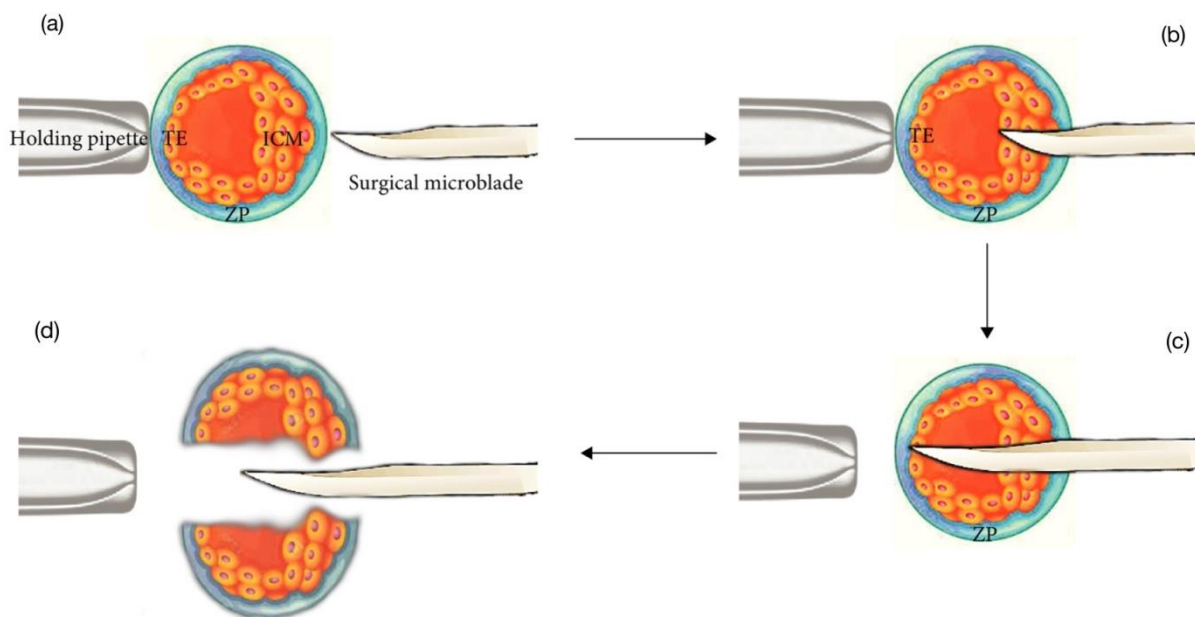
Obr. 2 Fáze biopsie (separace) blastomer (Rahbaran et al. 2021)

- (a) Dárčovské embryo s přítomnými blastomerami a prázdná zona pellucida
- (b) Dárčovské embryo je fixováno a pomocí aspirační pipety nasávána blastomera
- (c) Pomocí aspirační pipety nasávány další blastomery
- (d) Prázdná zona pellucida připravena pro přenos blastocyst
- (e) Přenos blastocyst do prázdné zona pellucida
- (f) Dokončený proces a dvě embryo připravena k přenosu

V první řadě je dárčovské embryo ošetřeno Tyrodovým roztokem, který vytvoří v *zona pellucida* otvor. Poté se blastomery vyjmou pomocí aspirační pipety skrz vzniklý otvor. Tyto volné blastomery se přenesou do prázdné *zona pellucida*, které byla předtím vyprázdněna odstraněním jejího buněčného obsahu (Obr. 2e). Tato technika byla úspěšně testována u velkých druhů zvířat, zejména hospodářských zvířat, včetně ovcí, skotu, koní a prasat (Rahbaran et al. 2021).

### 3.3.2.2. Bisekce embrya

Bisekce se používá k mechanickému rozdělení kompaktního embrya na dvě stejné části, které obsahují rovnoměrné rozložení vnitřní buněčné hmoty (ICM) a trofektodermu (TE). Při použití této techniky se klonovaná embrya následně kultivují *in vitro* s použitím kultivačního média, které podporuje další vývoj (Noli et al. 2016). Podobně jako technika separace blastomer je tato metoda úspěšně testována u velkých druhů zvířat, zejména hospodářských zvířat, včetně ovcí, skotu, koní a prasat (Rahbaran et al. 2021).



Obr. 3 Bisekce embrya (Rahbaran et al. 2021)

- (a) Embryo je fixováno
- (b) Chirurgická mikročepel proniká skrz zona pellucida
- (c) Mikročepel proniká skrz celé embryo a rozděluje ICM a TE na polovinu
- (d) Embryo bylo rozdělené na dvě části

S prvním úspěchem v oblasti dělení equinních embryí přišli v roce 1984 W. R. Allen & R. L. Pashen. Podařilo se jim odchovat jednovaječná dvojčata s použitím techniky vyvinuté na Výzkumné stanici živočišné výroby v Cambridge (Animal Research Station in Cambridge) doktorem S. M. Willadsenem. Byly použity blastomery ze čtyř až osmibuněčných embryí (Allen 2005). Každé embryo bylo odebráno výplachem vejcovodu na ovulované straně, kdy k výplachu byl použit Dulbeccův roztok (PBS). Ve stěně ipsilaterálního děložního rohu byl proveden 1 cm dlouhý řez. V místě řezu byla zavedena skleněná trubička, širší konec o průměru 8 mm byl aplikován do děložního lumen. Užší konec a průměru 2 mm byl připojen k silikonové hadičce, která ústila do konkávní skleněné nádoby. Vejcovod byl poté propláchnut 30-40 ml PBS. Poté, co bylo embryo nalezeno ve vypláchnuté tekutině, bylo přeneseno do čisté nádoby s PBS a uchováváno při teplotě 20-25 °C (Allen & Pashen 1984).

Po odstranění *zona pellucida* byly blastomery každého embrya rozděleny na dvě stejné části (Allen & Pashen 1984). Páry pluripotentních blastomer byly následně vstříknuty do prázdné *zona pellucida* získané z oocyty jatečné prasnice. Embrya byla vložena do menší agarové zátky, která byla vložena do větší agarové zátky a poté jako celek byla přenesena do podvázaných vaječníků ovcí, kde po dobu 3-4 dnů dozrávala do podoby blastocysty. Agarová zátka byla po uplynutí doby laparotomicky vyjmuta z vejcovodů. Blastocysty byly vypreparovány a následně přeneseny do klisny příjemkyně (Allen 2005). Březost byla diagnostikována rektálním vyšetřením dělohy nebo potvrzena porážkou klisny či porodem živého hříběte (Allen & Pashen 1984).

Dělení embryí má potencionální přínos v programech asistované reprodukce a ve výzkumu. U pacientů s nízkou odezvou na hormonální léčbu může tato technologie, pokud se prokáže její bezpečnost, poskytnout další embrya pro intrauterinní přenos a tím zvýšit pravděpodobnost zabřeznutí (Illmensee et al. 2010; Noli et al. 2016). Mnoho studií uvádí vysokou účinnost dělení embryí u hospodářských zvířat. Například u ovcí se 36 % rozdělených embryí ve 2-4 buněčném stádiu po přenosu do dělohy vyvinulo v plnohodnotné organismy. Z koňských embryí rozdělených biopsií blastomer ve stádiu 2-8 buněk mohou vzniknout zdravé a plnohodnotně žijící monozygotická dvojčata (Moore & Hasler 2017; Rahbaran et al. 2021). Nebyly zaznamenány žádné vývojové ani fyziologické vady u mláďat narozených z rozdělených embryí. Avšak studie (Allen & Pashen 1984) ukázala, že u koní velikost dvojčat narozených z embryí s nerovnoměrně rozdělenými buňkami je rozdílná a přetrvává po celý život jedince (Noli et al. 2016).

### 3.3.3. Metoda klonování pomocí přenosu jader somatických buněk (SCNT)

Relativně pozdní použití metody klonování pomocí přenosu jader somatických buněk (SCNT) v reprodukci koní, bylo důsledkem omezeného počtu informací dostupného v publikovaných studiích. Zejména informace o technikách asistované reprodukce koňovitých, dozrávání oocytů a aktivaci *in vitro* kultivovaných preimplantačních embryí (Galli et al. 2008). Práce, která vedla k prvním klonování koňovitých (Woods et al. 2003) se zakládala na *in vivo* vyzrálých oocytech, které byly přeneseny do vejcovodů recipientních klisen bezprostředně po přenosu jader a následné aktivaci. Pouze práce Galliho et al. (2003) byla provedena kompletně *in vitro* až do stádia blastocysty (Lagutina et al. 2005).

Prvním krokem je adekvátní zrání oocytů, po kterém následuje enukleace a rekonstrukce oocytů, při níž se používají oocyty se *zona pellucida* nebo oocyty bez *zona pellucida*. Následujícím krokem je účinná aktivace vajíček, která umožní vysokou míru štěpení a nakonec vhodná technika kultivace embryí *in vitro* (Galli et al. 2008). Tuto metodu bylo možné použít až po vývoji protokolu pro *in vitro* zrání oocytů, oplození pomocí intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI) a *in vitro* kultivaci embryí schopných reprodukce (Galli et al. 2007, 2014b; Hinrichs 2010). Kromě těchto zdokonalení bylo třeba přizpůsobit protokoly SCNT a optimalizovat je pro koně, kteří vzhledem ke svým tělesným zvláštnostem nejsou vhodným zdrojem vajíček. Protokoly pro přenos jader používané v současné době jsou

založeny na metodě oocyty bez *zona pellucida* (Lagutina et al. 2007), kvůli zvýšení fúze buněk na piezoelektrickém systému (Westhusin et al. 2003) pro enukleaci a mikroinjekci jádra přímo do oocyty (Galli et al. 2014b). Pozdější studie o klonování koní uvádějí vysokou účinnost v porovnání s jinými druhy. Klonování koňovití se zdají být normální a ti, kteří se narodili, dosáhli pohlavní dospělosti a byla potvrzena jejich plodnost (Galli et al. 2008).

### 3.3.3.1. Zdroj a příprava oocytů

Oocyty v metafázi II (MII) jsou standardní fází oocytů vyžadovaných pro metodu klonování pomocí přenosu jader somatických buněk. Mohou být získány pomocí zrání metody *in vivo* či *in vitro* (Galli et al. 2014b). Při přenosu jader je dostupnost koňských oocytů limitujícím faktorem vzhledem k anatomii a fyziologii vaječnicků klisny. Tyto faktory dělají z koňovitých špatný zdroj oocytů ve srovnání s jinými velkými hospodářskými zvířaty (Lagutina et al. 2005). Oocyty lze odebrat z vaječnicků živých dárkyň nebo z vaječnicků poražených klisen na jatkách (Zhang et al. 1989; Galli et al. 2008). Tyto dvě metody jsou jedinou ekonomicky udržitelnou možností pro SCNT (Galli et al. 2008). Z vaječnicků poražených klisen je možné získat v průměru 3-4 nezralé oocyty na jeden vaječník, zatímco z vaječnicků živých dárkyň lze odebrat pomocí transvaginální aspirace folikulů (ovum pick-up, OPU) 3-6 vajíček z jednoho vaječnicku (Galli et al. 2007, 2008). Rychlost zrání koňských oocytů je rovněž značně variabilní a v průměru se pohybuje mezi 25-70 % v publikovaných studiích (Hinrichs & Williams 1997; Dell'Aquila et al. 2001, 2003; Carneiro et al. 2001; Lorenzo et al. 2002; Choi et al. 2002; Bøgh et al. 2002; Lagutina et al. 2005).

#### 3.3.3.1.1. Odběr oocytů z živých klisen

Kvalita *in vivo* zralých oocytů je vyšší než u oocytů zralých *in vitro*. Nicméně počet dominantních folikulů na vaječnicku v daném okamžiku je nízký, proto je zapotřebí velké množství klisen k dosažení dostatečného množství získaných vajíček. Postup získání zralých oocytů *in vivo* se obvykle používá pro účely klinické asistované reprodukce pro léčbu neplodnosti (Altermatt et al. 2009; Galli et al. 2014b), ale není příliš využíván při použití metody SCNT. Pro tuto metodu klonování jsou upřednostňovány oocyty zralé *in vitro* případně nezralé oocyty odebírané z vaječnicku živých klisen (Galli et al. 2014b).

První metodou odběru zralých folikulů živých dárkyň je punkce dominantního preovulačního folikulu skrz stěnu dutiny břišní za pomoci fixace vaječnicku *per rectum*. Při aspiraci neovulačního folikulu je šance na získání jednoho (výjimečně více oocytů) za cyklus. Na druhou stranu tato metoda poskytuje oocyt s optimální vývojovou kompetencí. Míra regenerace folikulů je vysoká, protože oocyt-kumulus komplex se uvolnil ze stěny vaječnicku v rámci přípravy na nastávající ovulaci. Tato technika vyžaduje minimální instrumentární vybavení (koňský abdominální trokar o délce 20 cm, jehla o velikosti 13 G, spojovací hadička a injekční stříkačka) (Westhusin et al. 2003). Metoda vyžaduje časté sledování růstu folikulů a přesné načasování případné aplikace hCG (human chorionic gonadotropin) nebo GnRH (gonadotropin-releasing hormon) ke stimulaci dominantního folikulu. Aspirace musí být

provedena v okamžiku, kdy folikul reaguje na gonadotropin, avšak ještě před ovulací. Obvykle se zákrok provádí 24-35 hodin po podání hormonální terapie (Hinrichs 2013). Samotný postup je umožněn díky velikosti preovulačního folikulu (40 mm) a tím i jeho dobrou palpací *per rectum* a snadnou lokalizaci jehlou při aspiraci. Westhusin et al. (2003) uvádí použití účinné látky detomidin hydrochlorid v kombinaci s účinnou látkou butorfanol pro navození analgezie a trankvilizace. Dále doporučuje podání účinné látky propantelin bromid pro navození relaxace konečníku. Klisna v průběhu anestezie stojí. V oblasti boku, ipsilaterálně od aspirovaného folikulu, je připraveno operační pole a proveden řez. Trokar je zaveden skrz stěnu do dutiny břišní. Operatér manipuluje jednou rukou s vaječником *per rectum*, zatímco druhou rukou směřuje jehlu k dominantnímu preovulačnímu folikulu. Samotnou aspiraci provádí druhá osoba.

Druhá metoda zisku zralých folikulů *in vivo* je založena na transvaginální aspiraci folikulů pod ultrasonografickou kontrolou. Zákrok je prováděn ve stojící sedaci a Westhusin et al. (2003) doporučuje podání účinné látky propantelin bromid pro navození relaxace konečníku. K zákroku může být využita kaudální epidurální anestezie (aplikací 8 ml 2% lidokainu). Při této metodě je ultrazvuková sonda umístěna do dlouhého držáku, který má v sobě kanálek pro správné směřování jehly. Vaječník je uchopen *per rectum* a přiblížen k peritoneální straně poševní stěny (Hinrichs 2018). Aspirace se provádí dvoulumennou jehlou (velikost 12 G) přes vnitřní stylet, který je přes sběrnou nádobu připojen k vakuové pumpě. Ta je nastavena na aspiraci 20-25 ml za 1 minutu, protože vyšší tlak zvyšuje riziko denudace kumulárních buněk. Jehla je vedena přes poševní stěnu do folikulu, kde je odsáván obsah. Jakmile dojde k evakuaci, folikul je propláchnut komerčním médiem doplněným o heparin, aby došlo k zábraně srážení krve (Bols & Stout 2018). Při samotném zákroku je důležité dbát na důkladnou hygienu všech nástrojů, ale i samotné klisny.

Metoda transvaginální aspirace se využívá i v případě zisku nezralých folikulů. Pokud mají být oocyty získány z nezralých folikulů, je potřeba provádět zákrok dle určitého harmonogramu (např. jednou za 14 dní), kdy není potřeba dlouhodobě sledovat aktivitu vaječníků mezi jednotlivými aspiracemi (Jacobson et al. 2010; Hinrichs 2018). Alternativně lze sledovat dárcovské klisny pomocí ultrasonografie, aby bylo možné vybrat správný čas pro aspiraci, kdy je dostatečný počet malých folikulů (např. 8-10) a žádné velké předovulační folikuly (Galli et al. 2014a; Hinrichs 2018). Zatímco získání oocytů z dominantního, gonadotropinem stimulovaného folikulu je podobné jako při punkci přes bok klisny a výtěžnost je velká, zisk oocytů z nezralých folikulů je nízký. Tento fakt se přičítá těsnějšímu a širšímu spojení kumulu vajíčka se stěnou folikulu (Westhusin et al. 2003). Princip transvaginální aspirace je téměř stejný jako u zisku zralých folikulů s tím rozdílem, že během aspirace je s jehlou manipulováno. Díky pevnému spojení kumulu oocyty se stěnou folikulu je nutné folikul jehlou „seškrábat“. Společně s manipulací jehly se provádí několikanásobný výplach, aby se dosáhlo co nejvyšší výtěžnosti při jednom zákroku (Hinrichs 2018). Vzhledem k opakovanému proplachu je zákrok poměrně zdlouhavý (15-45 minut), proto se doporučuje epidurální anestezie (2% lidokain) v kombinaci se sedací a léky pro zajištění relaxace konečníku, aby byl zajištěn co největší komfort klisny při zákroku.

Bols & Scout (2018) doporučují podání nesteroidních antiflogistik (NSAID) proti bolesti a zánětu během a po ukončení léčby. Těž doporučují perioperační podání antibiotik k pokrytí možnosti kontaminace dutiny břišní během zákroku. Profesorka Katrin Hinrichs (2018) ve svém článku uvádí, že po aspiraci klisnám, které jsou součástí výzkumu, antibiotika nepodávají, aby nedocházelo k antibiotické rezistenci. S výzkumným týmem hodnotili morfologii a ovariální funkci vaječníků výzkumných klisen, kdy zjistili, že výskyt komplikací je vzácný. Vyskytly se však komplikace jako ovariální absces, peritonitida a ve výjimečném případě i úhyn klisny (Vanderwall & Woods 2002; Bøgh et al. 2010; Velez et al. 2012; Hinrichs 2018). Z těchto důvodů Hinrichs (2018) podává klientským klisnám (které mají omezený počet odběru folikulů za rok a nežijí ve stejném prostředí) širokospektrá antibiotika. Pokusy o „sterilaci“ pochvy (např. zředěným dezinfekčním betadine roztokem) nebyly úspěšné, jelikož antimikrobiální látky jsou pro oocyty toxické.

#### 3.3.3.1.2. Odběr oocytů z poražených klisen

Pokud klisna uhynie nebo musí být utracena či poražena, mohou jí být odebrány vaječníky a z nich následovně získány oocyty. Pokud mají být vaječníky převezeny na jiné místo ke zpracování, měly by se pomalu nechat vychladnout na pokojovou teplotu (minimální teplota je 12 °C, ale ne nižší (Preis et al. 2004)). Vaječníky by měly být do laboratoře přepraveny co nejrychleji, ideální čas je uváděn 6 hodin od smrti klisny (Hinrichs 2018). Olivera et al. (2016) při svém výzkumu využíval vaječníky získané na jatkách, jejichž teplota byla udržována kolem 25-29 °C během 2-4 hodin po porážce. Alternativně mohou být vaječníky zpracovány v místě úhynu klisny nebo v laboratoři během přepravy a následně odeslány již vypreparované nezralé folikuly do finální laboratoře (Hinrichs 2018).

Preferovanou metodou zisku oocytů *post mortem* je rozříznutí koňských vaječníků a vyjmutí oocytů z folikulů. Přebytečná tkáň se odstraní a poté se lokalizované povrchové folikuly rozříznou. Vyjmutí oocytů se provádí „vyškrábáním“ za pomoci kyrety (Westhusin et al. 2003). K promytí odebraných buněk do Petriho misky lze použít médium pro uchování embryí. Stěna folikulu se seškrábe a tyto buňky se vypláchnou do Petriho misky. Používá se jedna Petriho miska na jeden folikul. Takto se postup opakuje stále dokola, dokud není seškrábán celý povrch folikulu (Hinrichs 2018). Jakmile jsou všechny folikuly na povrchu zpracovány, vaječník se rozřeže na 0,5 cm tenké pláty, aby se zpracovaly všechny folikuly uvnitř vaječníku (Westhusin et al. 2003). Dle Galli et al. (2008) každý vaječník obsahuje v průměru 5,3 folikulů s průměrem nad 5 mm, které jsou vhodné pro získání oocytů. Pokud jsou tyto folikuly seškrábnuty a promyty jejich výtěžnost se pohybuje kolem 3,8 oocytů se 70 % účinností. Faktory, které pravděpodobně ovlivňují pozdější možnost vzniku hříběte z těchto oocytů, jsou věk klisny, délka a závažnost onemocnění, použitá terapie, způsob eutanazie, doba po kterou vaječníky zůstaly v těle klisny po smrti, teplota a interval mezi smrtí a zpracováním. Oocyty z jatečních vaječníků jsou nákladově nejefektivnější a nejudržitelnějším zdrojem, ačkoli jatek pro koně je málo a nejsou přítomny ve všech zemích (Galli et al. 2014b).

### 3.3.3.2. Dárcovská buňka

Původ jader, která se používají, může mít zásadní vliv na schopnost vývoje do stádia blastocysty, ale také na postimplantační vývoj (Galli et al. 2003b). Význam fáze buněčného cyklu dárcovského jádra a cytoplasmu příjemce byl zřejmý již při klonování embryí. Bylo zjištěno, že blastomery, které neustále duplikují svou DNA, se lépe vyvíjejí v předaktivovaných oocytech (Campbell et al. 1996; Galli et al. 2003b). U koní se využívají buňky, které se nacházejí ve fázi G0 nebo G1. Těchto fází lze dosáhnout snížením obsahu séra, kontaktní inhibicí (buňky přestávají růst po vzájemném kontaktu) či použitím inhibitorů kinázy (např. roskovitin) (Chavatte-Palmer et al. 2002; Hinrichs et al. 2007; Wakchaure & Ganguly 2016). Nejčastěji jsou využívány fetální fibroblasty, fibroblasty z dospělých jedinců a buňky granulózy. Buněčné linie fibroblastů se vytvářejí z buněk, které jsou odebrány pomocí biopsie (Galli et al. 2014b).

Přestože přínos buňky je mnohem větší než sekvence DNA, je význam dárcovské buňky v SCNT podceňován. Nejběžnější typ, používaný pro koně, je fibroblast získaný z pojivové tkáně kůže. Především kvůli nekomplikovanosti odběru, snadným podmínkám pro kultivaci v laboratoři a jednoduché kryokonzervaci. Existuje však mnoho typů dalších buněk, které byly použity ke klonování koní. Různé použité zdroje buněk a jejich výsledky klonování jsou popsány v tabulce (Tab. 2) (Gambini & Salamone 2019).

Tab. 2 Výsledky klonování koní podle původu dárcovské buňky (Gambini & Salamone 2019)

Dárcovská buňka	Blastocysta	Březost	Hříbě	Reference
Fibroblast z dospělého jedince	Ano	Ano	Ano	Galli et al. 2003 Hinrichs et al. 2006 Choi et al. 2009; 2013; 2014; 2015 Gambini et al. 2012; 2014 Olivera et al. 2016; 2018
Buňky kumulu	Ano	Ano	Ne	Vanderwall et al. 2004 Lagutina et al. 2005
Buňky granulózy	Ne	-	-	Lagutina et al. 2005
Klonované fetální fibroblasty	Ano	Ano	Ano	Lagutina et al. 2005 Olivera et al. 2016
Fetální fibroblasty	Ano	Ano	Ano	Woods et al. 2003
Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)	Ne	-	-	Olivera et al. 2016
Mezenchymální buňky tkáně pupečnickové šňůry	Ano	Ano	Ne	Olivera et al. 2016
Mezenchymální buňky z kostní tkáně	Ano	Ano	Ano	Olivera et al. 2018

Buněčné linie fibroblastů se nejčastěji odebírají v oblasti krku pod hřívou nebo z přední části hrudníku. Existuje mnoho způsobů odběru, nejčastěji používaným je bioptický vpich (obvykle o průměru 3-4 mm), kterým se odebere malý vzorek tkáně. Místo odběru by mělo být vyholené a řádně dezinfikované, aby nedocházelo ke kontaminaci. Tento postup je koňmi obvykle dobře snášen. V případě nutnosti je použita krátkodobá sedace a lokální anestezie (Gambini & Salamone 2019). Katrin Hinrichs (2006) při své práci využívá lehce rozdílnou metodu, kdy je připraveno operační pole 4×4 cm a proveden přibližně 2 cm dlouhý řez skalpelem. Následně jsou odříznuty okrajové části tkáně, kdy vzorky (o velikosti malého hrášku) se vloží do zkumavek naplněné kultivačním médiem a zchlazené zhruba na 4 °C putují do laboratoře. Při odběru bioptického vzorku je nutné používat sterilní nástroje, aby došlo k zábraně bakteriální kontaminace. Životaschopné buňky lze získat i několik dní po smrti zvířete, pokud byla tkáň zchlazená. Zmrazené vzorky bez kryoprotektiv mají malou šanci poskytnout životaschopné buňky.

Zpracovává se jeden vzorek, kdy ostatní jsou uchovávány pro případ, že kultivace prvního nebude úspěšná. Vzorky lze skladovat při teplotě 4 °C po dobu 4-5 dní bez výrazné ztráty životaschopnosti. Po odběru je tkáň jemně rozmělněna čepelí skalpelu za sterilních podmínek v Petriho misce. Rozmělněná tkáň je přesunuta do čisté Petriho misky se specializovaným kultivačním médiem, kde se bude kultivovat po dobu 1-2 týdnů, dokud z kousků tkáně nevzniknou fibroblasty. Následnou trypsinizací a opětovným naočkováním se vytvoří dostatečné množství buněk pro uchování (Galli et al. 2014b). Somatické buňky lze kultivovat *in vitro*, ačkoli kultivační podmínky se liší dle typu, druhu a zdroje buněk. Koňské buňky se obvykle kultivují při teplotě 37-39 °C v baňkách či Petriho miskách za použití speciálních kultivačních médií. Využívá se i kryokonzervace za pomoci tekutého dusíku. V tomto případě lze uchovávat genetický materiál po neurčitou dobu, což umožňuje dlouhodobé udržení genetického materiálu a vznik genetických bank (Gambini & Salamone 2019).

### 3.3.3.3. Enukleace oocyту

Pro úspěšné klonování je zapotřebí, aby z oocyту bylo odstraněno (mikromanipulačními technikami) vlastní jádro. Vajíčko se tak stane „prázdnou schránkou“ připravené pro přenos a následnou aktivaci. *Zona pellucida in vitro* zralých oocyту je velmi silná a heterogenní. V důsledku ztvrdnutí je obtížné do ní proniknout pomocí standardní zkosené pipety, jaká se používá k enukleaci. V tomto případě je konvenční metoda enukleace s uzavřenou *zona pellucida* obtížnější a méně účinná. Kromě toho přenos dárcovské buňky do perivitellinového prostoru vede ke špatnému kontaktu mezi membránami oocyту a somatické buňky, čímž se snižuje šance na úspěšnou elektrofúzi i při vysokém napětí (Li et al. 2002; Lagutina et al. 2005; Galli et al. 2014b). Při enukleaci oocyту se zralá vajíčka vyjmou z inkubátoru a kumulární buňky se odstraní opakovaným pipetováním v roztoku TCM 199 doplněn o 5% FBS (fetal bovine serum) a 0,05% hyaluronidázy (Westhusin et al. 2003). U metody bez *zona*



*pellucida* je oocytu pomocí 0,5% pronázou v PBS (phosphate-buffered saline) odstraněna ZP. Oocyty bez *zony* se enukleují tupou mikropipetou pod UV světlem (Galli et al. 2014b).

Westhusin et al. (2003) popisuje tři různé metody enukleace koňských oocytů:

- 1) První metoda se provádí s použitím zkosené skleněné pipety (vnější průměr 20 mm). Oocyt je fixován a pomocí enukleační pipety (špičku lze nabrousit pro snadnější průnik do *zona pellucida*) se odstraní polární tělísko spolu s cytoplazmou obsahující metafázní destičku.
- 2) Jako druhá metoda byla zavedena enukleace pomocí řezu skleněnou jehlou. Vzhledem k pevnosti *zona pellucida* je nejprve proveden jehlou řez nad polárním tělískem, poté se pomocí tupé pipety aspiruje polární tělísko společně s metafázní destičkou. V případě, že je metafázní destička oddělena od polárního tělíska, je proveden druhý řez nebo je manipulováno s cytoplazmou oocytu, tak aby byla destička přístupná.
- 3) Třetí metoda je založena na použití tupé pipety (vnější průměr 10-13 mm) a vyvrtání otvoru do *zona pellucida* pomocí piezoelektrického vrtáku. Oocyt je fixovaný vedle polárního tělíska a vrtákem je vyvrtán otvor do ZP. Polární tělísko a metafázní destička jsou poté aspirovány pipetou.

Zda byla enukleace úspěšná, se dá zjistit zkouškou, kdy se metafázní destička obarví a poté se její přítomnost v pipetě kontroluje pod UV světlem (Olivera et al. 2016). Enukleovaný oocyt se označuje jako ooplast či cytoplast (Hinrichs 2006).

#### 3.3.3.4. Nukleární transfer (NT) a aktivace

Jak už bylo popsáno výše (3.3.3.3. Enukleace oocytu) přítomnost *zona pellucida* ztěžuje postup enukleace, ale také následnou rekonstrukci. *Zona* působí jako elektrické stínění, které vyžaduje zvýšení napětí během fúze (2-2,5 kV/cm), avšak toto napětí snižuje štěpení embryí. Oocyty bez *zona pellucida* se zpracovávají mnohem snadněji (Galli et al. 2014b). Westhusin et al. (2003) ve své práci popisuje, že enukleované vajíčko a dárcovská buňka jsou umístěny do Petriho misky obsahující médium pro manipulaci s oocyty. Jádro dárcovské buňky bylo spojováno s ooplastem pomocí stejné pipety, která byla použita pro enukleaci. Spojený ooplast s fibroblastem byl vrácen do prostředí tvořené TCM 199 doplněné o 0,3% BSA (bovine serum albumine) při teplotě 38 °C v atmosféře tvořené 5 % CO<sub>2</sub> a vzduchem, dokud nedojde k elektrofúzi. Fúze buněk byla vyvolána dvěma dávkami stejnosměrných pulzů o síle 3 kV/cm za 25 mikrosekund. Li et al. (2002) zjistil, že i vysokonapěťové stejnosměrné pulsy o hodnotě 2,2-2,5 kV/cm dokázaly sloučit méně než 60 % kupletů a přibližně 2,5 % NT-embryí dosáhlo do stádia blastocysty.

Z fyziologického hlediska je aktivace spuštěna po průniku spermie do oocytu a následovnými oscilacemi vápníku. Nedostatečná nebo nefyziologická aktivace může být příčinou selhání vývoje embrya.

### 3.3.3.5. Kultivace embryí

Cílem kultivace embryí *in vitro* je co nejvíce napodobit podmínky pro vývoj *in vivo* (Galli et al. 2007). Protokolů pro kultivaci je mnoho a závisí na postupech dané laboratoře. Dle Westhusin et al. (2003) jsou nejprve oocyty s přeneseným jádrem umístěny do modifikovaného Tyrodova roztoku po dobu 1-3 dnů. Po uplynutí počáteční fáze jsou embrya přemístěna do média IVC 2 a kultivována po dobu až 8 dnů ve zvlhčeném prostředí 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 90 % N<sub>2</sub> při teplotě 38 °C. Vývoj embryí byl hodnocen 3. den kultivace *in vitro*. Procento embryí, které se vyvinulo do stádia blastocysty, bylo zaznamenáno po 7 dnech kultivace. Galli et al. (2007) uvádí při porovnání počtu buněk mezi embryi kultivovanými *in vitro* a *in vivo* v modifikovaném médiu. V případě kultivace *in vitro* měla 7. den embrya výrazně menší počet buněk a připomínala spíše vývojové stádium staré 5 dní.

### 3.3.3.6. Embryotransfer (ET)

Jediným skutečným měřítkem vývojové kompetence vzniklého embrya je jeho schopnost vyvinout se v životaschopného jedince po přenosu do recipientní klisny. I když na procentech neúspěchů se může podílet i klisna příjemkyně (Galli et al. 2007). Klisny jsou před transferem kontrolovány pomocí ultrasonografického vyšetření, aby byla stanovena přesná doba ovulace. Ta může být urychlena podáním hormonu hCG (zároveň dojde ke snížení počtu nutných vyšetření) (Lazzari et al. 2020). Klonovaná embrya jsou vyjmuta z kultivačního média a přenesena do dělohy či vejcovodu v závislosti na stupni vývoje a fázi říjového cyklu klisny příjemkyně (Westhusin et al. 2003). Tři až sedm dnů (průměrně 5 dnů) po ovulaci jsou klisně přenesena 1-4 embrya (v 7. či 8. dni vývoje stádia blastocysty). Pomocí ultrasonografického vyšetření je klisna 17. den po ovulaci vyšetřena pro potvrzení březosti. V prvním trimestru klisna podstupuje vyšetření každý týden a ve zbytku březosti 1× do měsíce (Galli et al. 2008).

Podle Vajta & Gjerris (2006) a jejich současných poznatků mohou být anomálie související s jaderným přenosem způsobeny:

- 1) Nevhodnou dárcovskou buňkou či oocytem.
- 2) Špatná synchronizace fází buněčného cyklu jádra dárkyně a cytoplazmy příjemkyně.
- 3) Neadekvátní přeprogramování genomu dárkyně.
- 4) Nevhodná manipulace s oocyty, somatickými buňkami a embryem během zrání.
- 5) Různé manipulace, kultivační techniky způsobující mechanické, osmotické, elektrické, toxické, tepelné a jiné poruchy.

Některé z těchto faktorů jsou zřejmé, jiné (včetně těch, které souvisejí s přeprogramováním genomu) potřebují další výzkum.

### 3.3.4. Metoda klonování handmade cloning (HMC)

Metoda handmade cloning – ruční klonování (HMC) je jednodušší a bezmikromanipulátorová verze přenosu jader somatických buněk (SCNT). Tradiční klonování (TC tj. SCNT) vyžaduje kromě vysoce kvalifikovaných odborníků také použití drahých mikromanipulátorů. Během posledních let byla tato technika modifikována, aby zvýšila svou účinnost (Verma et al. 2015). Při této metodě se po dozrání oocyty odstraní *zona pellucida*. Tento postup přináší vysoce účinné výsledky enukleace, fúze a aktivace (Vajta & Gjerris 2006). HMC a TC mají stejný cíl, ale liší se převážně v požadavcích na přístrojové vybavení. Tab. 3 shrnuje podrobnosti a rozdíly mezi těmito metodami.

Tab. 3 Shrnutí podrobností a rozdílů mezi TC a HMC (Verma et al. 2015)

Funkce	Tradiční klonování (TC)	Handmade cloning (HMC)
Přenos jader somatických buněk	✓	✓
Synchronizace dárcovské buňky	✓	✓
Vysoký počet pokusů	✓	✓
Problémy spojené s jaderným přeprogramováním a reprodukovatelností pokusů	✓	✓
Pravý klon	×	×
Bez použití mikromanipulátorů	×	✓
Bez <i>zona pellucida</i>	×	✓
Problémy spojené s odstraněním <i>zona pellucida</i>	×	✓
Počet potřebných cytoplasm	Nižší	Vyšší
Náklady	Vyšší	Nižší než TC

HMC vychází z SCNT a představuje pokročilý způsob enukleace oocytů bez *zona pellucida* pomocí ruční bisekce s použitím specializovaného velmi ostrého skalpelu. Ruční klonování se v mnoha ohledech neliší od TC. Zisk oocytů a příprava dárcovská buňky je téměř totožná a rozdíl přináší až enukleace oocyty. Oocyty bez *zona pellucida* lze enukleovat pomocí chemikálií, centrifugace v hustotním gradientu nebo ruční bisekcí (Verma et al. 2015). Jako první popisují postup chemické enukleace Fulka & Moor (1993), kteří využili chemického ošetření pro blokadu DNA topoisomerasy II během metafáze I. To má za následek inhibici dělení chromozomů oocyty a vypuzení celého chromatinu do polárního tělíska, čímž vzniká cytoplasm bez chromatinu známý také jako chemicky enukleovaný oocyt (CEO) (Adil 2007). Tatham et al. (1995) popsal metodu enukleace pomocí centrifugace v hustotním gradientu. Vajta et al. (2001) vyvinuli vynikající techniku HMC využívající ostré čepel pro ruční bisekcí oocytů bez ZP.

Po odstranění *zona pellucida* z oocyty vyčnívá tzv. protruzní kužel. Bisekce se provádí pod stereomikroskopem pomocí ostré čepel. Oocyt by měl být rozříznut v blízkosti protruzního kužele, protože se zde nachází polární tělísko (Adil 2007). Po rozdělení se všechny půlené oocyty bez chromatinu kontrolují pomocí barvení pod UV světlem. Rekonstrukce embryí se dosahuje rychlým vystavením jednoho nebo dvou enukleovaných ooplastů fytohemoaglutinu, který napomáhá spojení ooplastu s dárcovskou buňkou. Po rekonstrukci aktivace provádí za pomoci elektrofúze (Verma et al. 2015).

### 3.4 Využití klonování v dnešní době

Klonování je v dnešní době přítomné v každodenním životě. Klonování koní je dnes komerčně dostupné v Severní Americe (USA), Jižní Americe (Argentina, Brazílie a Kolumbie), Evropa (Itálie), Asie (Čína, Jižní Korea), Nový Zéland a Austrálie. Odhadovaný počet klonovaných koní v roce 2018 je 375 klonů. Skutečný celkový počet koní by mohl být vyšší, vzhledem k narození koňovitých, kteří soukromými společnostmi nebyli hlášeni (Gambini & Maserati 2018). Hlavní plemena, která byla do roku 2016 klonována, jsou uvedena v tabulce níže (Tab. 4):

Tab. 4 Některá hlavní plemena koní klonovaná do roku 2016 (Gambini & Maserati 2018)

Plemeno koně	Reference
Criollo	Gambini et al. 2012
Pólo pony	Gambini et al. 2014; Olivera et al. 2016; Kheiron; Crestview Genetics
Hafling	Galli et al. 2003a; Lagutina et al. 2005
Teplokrevník	Lee et al. 2015
Arabský plnokrevník	Lagutina et al. 2005; Crestview Genetics
Anglický plnokrevník	Kheiron
Parkurový kůň	Gambini et al. 2014; ViaGen; Kheiron
Pasocolombiano	GenesCol
Pasofino	ViaGen
Cuttingový kůň	ViaGen
Mangalarga Marchador	<i>In Vitro</i> Brasil Clonagem
Campolina	<i>In Vitro</i> Brasil Clonagem
Rodeo kůň	ViaGen
Barellový kůň	ViaGen
Quarterhorse	ViaGen

Jako nejčastější důvody majitelů pro rozhodnutí nechat naklonovat svého koně, Vanderwall et al. (2005) uvádí:

- 1) Zachování genetického fondu zvířat, která by se jinak dále nemohla rozmnožovat (např. valaši).
- 2) Uchování genetického materiálu ohrožených druhů či plemen (např. kůň Převalského).
- 3) Citové plnění, kdy role zvířecího společníka je pro některé jedince nenahraditelná.

Hřebci a plemenné klisny jsou obvykle klonovány pro účely reprodukce. Dokonce více než skot, mohou mít jednotliví koně extrémně vysokou tržní hodnotu, kterou jsou ospravedlňovány vysoké náklady spojené s jejich klonováním (Galli & Lazzari 2021).

Publikace o chovu koní za posledních 15 let naznačují, že klonování v koňském průmyslu se ukazuje jako přínosné z výše uvedených důvodů. Ačkoli přijetí této technologie je chovatelskými svazy různé. Důvodem může být částečně nedostatečná informovanost veřejnosti ze strany odborníků, což má za následek snadnější kolování dezinformací. Příkladem je asociace plemene Quarterhorse (American Quarter Horse Association, AQHA), která nepovoluje registraci plemenných klonovaných zvířat (Maserati & Mutto 2016). Dalším příkladem je uzavřená plemenná kniha anglického plnokrevníka. Nejenže neregistruje žádné klonované koně, ale nepovoluje ani jiné asistované reprodukční technologie (ART). Registraci klonů neumožňuje ani plemenná kniha arabského plnokrevníka. Na druhou stranu mezinárodní jezdecké organizace ukazují, že technologie klonování může být pro chovatelské programy přínosem a mění konvenční registrační předpisy, tak aby umožnily registraci klonovaných koní (Maserati & Mutto 2016). Mezinárodní jezdecká federace (Fédération Equestre Internationale, FEI) oznámila v roce 2012 na zasedání v Lausanne, že ruší zákaz účasti klonovaných koní v soutěžích. Tehdejší zákaz byl zdůvodněn nedostatkem vědeckých poznatků.

Naproti tomu jsou plemenné knihy, které registraci klonovaných jedinců umožňují: Anglo European Studbook (Anglo-evropská plemenná kniha, AES), Zangersheide, KWPN (holandský teplokrevník), a Asociación Argentina de Criadores de Caballos de Polo (Nevečeřalová 2020). Právěsvaz chovatelů pólo koní v Argentině (Argentina Polo Horse Breeders Association, AACCP) napřímo podporuje výzkum a užívání asistovaných reprodukčních metod (ART) (Gambini & Maserati 2018). Za největšího a nejlepšího producenta pólo koní mnozí považují právě Argentinu. Během posledních let bylo dosaženo velkého pokroku v oblasti reprodukčních biotechnologií. Laboratoř Crestview Genetics využívá techniku koní založenou na přenosu jader somatických buněk. Ke svým pokusům využívá oocyty získané na jatkách.

Potenciální problém pro společnost není počet nebo kvalita získaných oocytů, ale intenzivní zájem lidí o porážku koní na jatkách. I přes to, že v Argentině převládá velké povědomí o porážce koní, tak se stoupající popularitou klonování stoupá i zájem aktivistů za práva zvířat. Crestview Genetics v současné době zkoumá zisk oocytů pomocí aspirace folikulů, čímž zachová produkci klonovaných koní, ale vyhne se střetu s aktivisty (Maserati & Mutto 2016). V prosinci roku 2016 tým známého hráče Adolfa Cambiasa vyhrál šampionát se šesti klonovanými koňmi (Obr. 4), kdy všech šest koní bylo klony slavné klisny Cuartetera.

Protokol, který komerčně používá ke klonování většina společností včetně Crestview Genetics, byl převzat z postupu použitého při klonování ovce Dolly. V roce 2005 společnost *In Vitro Clonagem* adaptovala nový postup pro klonování skotu, který později upravila pro potřeby koní. Tato metoda spočívala v použití dárcovské buňky ve fázi buněčného cyklu G2spárované s enukleovaným oocytem v telofázi II (Maserati & Mutto 2016). Díky této metodě společnost *In Vitro Clonagem* vyprodukovala slavného hřebce plemene Mangalarga jménem Turbante. Za svůj život tento hřebec díky metodám ART zplodil více než 1600 hříbat.

Co se týče kontinentálních úspěchů, nejznámějším naklonovaným hříbětem je beze sporu klisna Prométhea. Výzkumný tým Cesara Galliho v roce 2005 vyprodukoval hříbě (Obr.5B) arabského plnokrevníka pojmenované Pieraz (Pieraz-Cryozootech-Stallion) (Galli et al. 2014b). Jednalo se o klon mezinárodního šampiona ve vytrvalosti, který byl svými majiteli v mládí vykastrován a již se nemohl dále množit. Již ve dvou letech začal hřebec připouštět a v roce 2008 se narodil první jeho potomek, klisna Pierazade du Vialaret.



Obr. 4 První dva klonování koně na světě (Prométhea a Pieraz)(Galli et al. 2014b)

(A) Prométhea se svou matkou ve věku 2 měsíců (B) Pieraz ve věku 3 měsíců (C) Břeží Prométhea (D) Pieraz

Svět jezdeckého sportu pod vedením Erica Palmera (vedoucího společnosti Cryozootech) se dal rychle do pohybu. Spoustu slavných a úspěšných koní má nyní své klony. Výtečný parkurový kůň Gem Twist, který je považovaný za jednoho z nejlepších skokanů v historii, má spoustu klonovaných potomků, kteří též nachází uplatnění ve sportu. Mezi další slavné koně, kteří mají své klony, můžeme řadit: valach ET FRH, hřebec Chellano Alpha Z, Quidam de Revel, Calvaro V, klisna Ratina Z, klisna Poetin a mnoho dalších koní (Hector 2018). Spojené státy se s klonováním domácích zvířat, zejména koní, setkávají ve velké míře. V roce 2005 začala společnost ViaGen komerčně produkovat skot a koně. Ačkoli dříve existovalo několik společností, které se zaměřovaly na komerční klonování skotu (Cyagra, Advanced Cell Technology, Infigen), prasat (PPL, MOFA) a zvířat pro produkci terapeuticky hodnotných proteinů v jejich krvi nebo mléce. Společnost ViaGen byla první, která nabízela klonování koní. V dnešní době má laboratoř v Kanadě, kde získává vaječníky z koňských

jatek (Maserati & Mutto 2016). I přes rozšíření laboratoří zaměřených na klonování koní, si laboratoř ViaGen účtuje zhruba 85 000 USD (<https://www.viagenpets.com/product/equine-cloning>), což stále dělá klonování nedostupné pro většinu majitelů a chovatelů. Dá se očekávat, že pokud by cena v budoucnosti začala klesat, stane se klonování běžnou součástí chovu koní.

Klonování nemusí být pouze cestou, jak zachovat slavné a sportovní koně. Tuto asistovanou reprodukční metodu lze využít pro záchranu ohrožených druhů. Například se v poslední době uplatňuje v záchranném programu koně Převalského. První klonovaný kůň Převalského na světě se narodil 6. srpna 2020 a byl pojmenován Kurt. Kurt je klonem hřebce, jehož DNA byla 42 let kryokonzervována. Narodil se díky spolupráci společnosti Revive & Restore, ViaGen a San Diego Zoo Wildlife Alliance, kde momentálně žije. Kurt se narodil náhradní matce plemene Quarterhorse a nyní se učí divokému chování od klisny koně Převalského Holly (Tuff 2022).

I přes to, že v roce 2012 FEI změnila svá pravidla a povolila klonům a potomkům klonů soutěžit. Evropská komise v prosinci 2013 předložila návrh na zákaz používání techniky klonování v EU pro hospodářská zvířata a dovoz klonů těchto zvířat (IP/13/1269 18/12/2013). V říjnu 2015 však Evropský Parlament změnil evropskou legislativu a podal návrh na zrušení výjimky ze zákazu pro jezdecké sportovní a kulturní akce (Campbell 2016; Gambini & Maserati 2018). Další zajímavé nařízení vydala argentinská asociace Sociedad Rural Argentina (SRA), které neumožňuje registraci 100 % identických klonů a vyžaduje studii mtDNA k rozlišení mezi klonovaným a dárcovským zvířetem. Pokud toto není možné rozlišit, nemůže být klon u SRA registrován. Toto nařízení se liší od brazilského, kde oocyty musí pocházet od jedinců stejného plemene. Testování mtDNA se v Brazílii zatím nevyžaduje (Gambini & Maserati 2018).

V některých částech Evropy je koňské maso stále konzumováno. Původní debata v rámci Evropské Unie o klonování hospodářských zvířat zahrnovala obavu o možných zdravotních dopadech na člověka při konzumaci masa a jiných produktů pocházejícího z klonovaných zvířat. Otázkou nastává, zda byly tyto obavy oprávněné a zda se vztahují i na koně (Campbell 2016)? Úřad pro kontrolu léčiv a potravin (FDA) společně s Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) a dalšími úřady po celém světě, prováděly dlouhé hodnocení a zkoumání rizik na základě tehdy zveřejněné vědecké literatury. Oba hlavní úřady došly k závěru, že produkty vyrobené z klonovaných zvířat se neliší od zvířat narozených „klasickým“ způsobem. Nejenže se neliší, ale je také nemožné je od sebe bez popisu rozlišit (Galli & Lazzari 2021).

V USA, Brazílii a Argentině se klonování živočichové nijak neoznačují a jejich maso a ostatní produkty jsou povoleny ke konzumaci a mohou být vyváženy. Maso, které se dostává do potravních řetězců, není označeno a vyvolává etický problém ohledně transparentnosti týkající se práva spotřebitelů, kteří tak netuší, co vlastně konzumují (Campbell 2016). V důsledku toho se SCNT pro zemědělské využití v EU nachází ve velké nejistotě. Momentálně neexistuje žádná dohoda mezi Evropskou komisí, která je pro schválení a Evropským parlamentem, který je velkou většinou hlasů proti. V současné době potravin

v EU získané z klonovaných zvířat spadají pod nařízení o „nových potravinách“ (nařízení (EU) 2015/2283) jako potraviny získané z tzv. zvířat získaných netradičními chovatelskými postupy (Campbell 2016).

### **3.5 Etické aspekty klonování koní**

#### **3.3.1. Zdravotní způsobilost klonů**

Vzhledem ke křehké rovnováze během přirozeného procesu oplodnění a vývoje gamet je zázrak, že tak „drastický“ zásah, jako je SCNT, vůbec vede ke vzniku životaschopného jedince (Vajta & Gjerris 2006). Problémy spojené s klonováním živočichů jsou nejčastěji abnormality placenty, abnormality a poruchy plodu, dystokie, syndrom velkého potomka (LOS), slabost či nemoc novorozenců, systémové onemocnění, předčasné stárnutí či smrt (Campbell 2016). Tyto problémy však převládají spíše u hospodářských zvířat, jako je skot a prasata. U koní jsou údaje o zdraví a životaschopnosti klonu poměrně nedostatečné. Pouze skupiny vedené Katrin Hinrichsovou (USA) (Hinrichs 2006) a Cesarem Gallim (Itálie) (Galli et al. 2003a) publikovali údaje o stavu zvířat a o své úspěšnosti a problematice klonování.

Nejčastější problematikou u klisen jsou aborty v různých fázích březosti. Dle Hinrichs (2006) 26 % jimi přenesených klonovaných embryí vedlo k narození hříběte, zatímco Galli et al. (2003a) uvedl narození 3 zdravých hříbat po přenosu více než 100 klonovaných embryí. Ve své studii Johnson et al. (2010) uvádí, že u dvou hříbat byly zjištěny známky hypoxické ischemické encefalopatie při narození, ale po terapii došlo k jejich uzdravení. Dvě hříbata zemřela krátce po narození (jedno na následky pneumonie a druhé na následky anestezie během pokusu o chirurgickou korekci abnormalit močového měchýře). Celkem 7 ze 14 hříbat vyžadovalo kyslíkovou terapii do 12 hodin po narození a u jednoho hříběte bylo nutné kyslík podávat po dobu 15 dnů. Všechna hříbata byla považována za „vysoce riziková“ a byla jim podávána preventivně antibiotika. Polovina hříbat měla pupečnickovou infekci a 8 hříbat ze 14 mělo určitou formu flexory končetin (všechny se podařilo srovnat do 6 měsíců věku). V průměru hříbata vyžadovala 8,5 dne intenzivní péče.

Není pochyb o tom, že hříbata narozená za pomoci techniky SCNT průměrně vykazují větší zdravotní komplikace a jsou náchylnější, než hříbata počata „klasickou“ cestou. Široká škála z mála dostupných údajů dokazuje, že klonování koní je spojeno s vysokou mírou výskytu embryonálních abnormalit plodu (ačkoliv je stále nižší než výskyt u ostatních druhů hospodářských zvířat) a požadavkem na intenzivní neonatální péči. Je obtížné zjistit, zda poporodní abnormality souvisí s metodou klonování, jelikož se vyskytují i u běžných hříbat. Je zjevně zapotřebí dalších výzkumů a studií zkoumajících zdravotní stav hříbat a následné welfare života klonovaných koní (Campbell 2016).



### 3.3.2. Etická stránka klonování koní

Vzhledem k předchozí kapitole (3.3.1. Zdravotní způsobilost klonů) je velice diskutabilní, zda se klonování nachází v mezích etické roviny. V současné době nejsou k dispozici žádné údaje o případných korelacích mezi technikou SCNT a konkrétními problémy u koní (Campbell 2016). Dá se předpokládat, že výskyt problémů se bude pravděpodobně zmenšovat v souvislosti s pokrokem a zdokonalením techniky. Avšak kombinace nedostatku komerčních zájmů a vysokých nákladů se odráží na nízkých počtech vědeckých skupin zkoumajících klonování koní.

Na druhou stranu se setkáváme se silnými argumenty, že některé typy asistovaných reprodukčních metod (ART) jsou užitečným nástrojem pro zlepšení welfare plemenných koní. Například užitím umělé inseminace (AI) včetně zaslání spermatu odstraňuje nutnost transportu klisny či hřebců na národní nebo mezinárodní úrovni a tím se snižuje jejich vystavení stresu a infekčním chorobám. Campbell & Sandøe (2015) uvádí, že společnost Sport Horse Breeding of Great Britain v rámci plemenné knihy souhlasila s povolením uchovnění valachů, kteří mají z předchozí doby kryokonzervované sperma. Valaši jsou v systému klasifikováni jako plemenní hřebci. Jedná se o další důkaz, že využití ART vede ke zlepšení míry welfare koní.

Dle Campbella (2016) je velkou překážkou odpor veřejnosti ke klonování. Jeden z průzkumů veřejného mínění a postoji lidí ke klonování zvířat ukázal, že veřejnost tuto metodu považuje za „urážku důstojnosti zvířete“ a že se obávají „narušení integrity zvířat“. Z průzkumu Eurobarometru z roku 2008 61 % respondentů označilo klonování jako „morálně závažné“ a 38 % uvedlo klonování zvířat za „neetické“ bez ohledu na potencionální přínosy v medicíně nebo z hlediska produkce potravin. Většina asistovaných reprodukčních metod porušuje přirozené přírodní postupy, ale žádná z metod (embryotransfer, umělé oplodnění atd.) nevzbuzuje takový odpor jako klonování. I přes to všechno se k zákazu klonování zvířat neschyluje. Paradoxně právě intenzivnější míra využívání této reprodukční metody zvyšuje možnosti jejího zlepšení a umožní dělat čím dál tím větší pokroky ke zlepšení welfare a etické stránky celé problematiky.

## 4. Závěr

Bakalářská práce ve formě literární rešerše uvedla čtenáře do problematiky týkající se klonování koní a popsala nejdůležitější aspekty celé asistované reprodukční metody. Z výstupu práce lze říci, že klonování koní není zdaleka na vrcholu a ještě nějaký čas bude předmětem zkoumání mnoha výzkumných týmů. Lze předpokládat, že s hlubším poznáním asistovaných reprodukčních metod, se technika klonování bude zlepšovat a s ní i aspekty welfare života klonů. V zájmu odborníků je šířit osvětu a stále zlepšovat své metody z důvodu lepšího přijetí mezi chovateli koní.

Široká veřejnost je stále ke klonování dosti zdrženlivá, a spíše než s podporou se výzkumníci setkávají s nepochopením a odsouzením dané metody. Pokud tomu tak zůstane, lze očekávat úpadek klonování a jeho omezení pouze pro vědecké účely.

## 5. Bibliografie

- Adil SE. 2007. Handmade cloning of mammals. *African Journal of Biotechnology* **6**:1862–1868.
- Allen W. 2005. The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. *Reproduction in Domestic Animals* **40**:310–329.
- Allen WR, Pashen RL. 1984. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *Reproduction* **71**:607–613.
- Altermatt JL, Suh TK, Stokes JE, Carnevale EM. 2009. Effects of age and equine follicle-stimulating hormone (eFSH) on collection and viability of equine oocytes assessed by morphology and developmental competency after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction, Fertility and Development* **21**:615.
- Bøgh IB, Bézard J, Duchamp G, Baltsen M, Gérard N, Daels P, Greve T. 2002. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes. *Theriogenology* **57**:1765–1779.
- Bøgh IB, Brink P, Jensen HE, Lehn-Jensen H, Greve T. 2010. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine Veterinary Journal* **35**:575–579.
- Bols PEJ, Stout TAE. 2018. Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in Cows and Mares. Pages 209–233 in Niemann H, Wrenzycki C, editors. *Animal Biotechnology 1*. Springer International Publishing, Cham. Available from [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-92327-7\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-92327-7_10) (accessed April 6, 2023).
- Bowring F. 2004. Therapeutic and reproductive cloning: a critique. *Social Science & Medicine* **58**:401–409.
- Briggs R, King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **38**:455–463.
- Campbell KHS, Loi P, Otaegui P, Wilmut I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of reproduction* **1**:40–6.
- Campbell MLH. 2016. Is cloning horses ethical? *Equine Veterinary Education* **30**:268–273.
- Campbell MLH, Sandøe P. 2015. Welfare in horse breeding. *Veterinary Record* **176**:436–440.
- Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I. 2001. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I and Its Interaction with Gonadotropins, Estradiol, and Fetal Calf Serum on In Vitro Maturation and Parthenogenic Development in Equine Oocytes<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **65**:899–905.

- Casser E, Israel S, Boiani M. 2019. Multiplying embryos: experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *The International Journal of Developmental Biology* **63**:143–155.
- Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP. 2002. Clinical, Hormonal, and Hematologic Characteristics of Bovine Calves Derived from Nuclei from Somatic Cells. *Biology of Reproduction* **66**:1596–1603.
- Choi Y-H, Shin T, Love CC, Johnson C, Varner DD, Westhusin ME, Hinrichs K. 2002. Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence, and subsequent fusion and activation rates after nuclear transfer. *Theriogenology* **57**:1005–1011.
- Cloned horse raises hopes for equestrian sports in China. (2023). Available from <https://phys.org/news/2023-01-cloned-horse-equestrian-sports-china.html> (accessed March 21, 2023).
- Damasceno Teixeira TV, Fry RC, McKinnon A, Fry KL, Kelly JM, Verma PJ, Burden C, Salamone DF, Gambini A. 2019. Targeting epigenetic nuclear reprogramming in aggregated cloned equine embryos. *Reproduction, Fertility and Development* **31**:1885.
- Davies Morel MCG. 2008, July 1. Multiple Pregnancies: Double the Trouble. Available from <https://thehorse.com/122972/multiple-pregnancies-double-the-trouble/> (accessed March 28, 2023).
- Morel Davies MCG. 2020. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. CABI Publishing, Oxfordshire.
- Dell'Aquila ME, Albrizio M, Maritato F, Minoia P, Hinrichs K. 2003. Meiotic Competence of Equine Oocytes and Pronucleus Formation after Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) as Related to Granulosa Cell Apoptosis. *Biology of Reproduction* **68**:2065–2072.
- Dell'Aquila ME, Masterson M, Maritato F, Hinrichs K. 2001. Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **60**:79–88.
- Doležel R. 2003. *Vybrané kapitoly z veterinární gynekologie a porodnictví pro výuku porodnictví*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice
- Fulka J, Moor RM. 1993. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **34**:427–430.
- Fulka J, Okolski A. 1981. Culture of horse oocytes in vitro. *Reproduction* **61**:213–215.

- Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. 2007. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* **98**:39–55.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2014a. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* **81**:138–151.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. 2003a. A cloned horse born to its dam twin. *Nature* **424**:635–635.
- Galli C, Lagutina I, Duchi R, Colleoni S, Lazzari G. 2008. Somatic Cell Nuclear Transfer in Horses. *Reproduction in Domestic Animals* **43**:331–337.
- Galli C, Lagutina I, Duchi R, Colleoni S, Lazzari G. 2014b. Cloning of Equines. Pages 287–297 *Principles of Cloning*. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123865410000229> (accessed March 19, 2023).
- Galli C, Lagutina I, Lazzari G. 2003b. Introduction to Cloning by Nuclear Transplantation. *Cloning and Stem Cells* **5**:223–232.
- Galli C, Lazzari G. 2021. 25th ANNIVERSARY OF CLONING BY SOMATIC-CELL NUCLEAR TRANSFER: Current applications of SCNT in advanced breeding and genome editing in livestock. *Society for Reproduction and Fertility* 2021.
- Gambini A, De Stefano A, Bevacqua RJ, Karlanian F, Salamone DF. 2014. The Aggregation of Four Reconstructed Zygotes is the Limit to Improve the Developmental Competence of Cloned Equine Embryos. *PLoS ONE* **9**:e110998.
- Gambini A, Jarazo J, Olivera R, Salamone DF. 2012. Equine Cloning: In Vitro and In Vivo Development of Aggregated Embryos. *Biology of Reproduction* **87**. Available from <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.098855> (accessed May 26, 2022).
- Gambini A, Maserati M. 2018. A journey through horse cloning. *Reproduction, Fertility and Development* **30**:8.
- Gambini A, Salamone D. 2019. The relevance of the donor cell in horse cloning. Pages 77–89.
- García-Sancho M. 2015. Animal breeding in the age of biotechnology: the investigative pathway behind the cloning of Dolly the sheep. *History and Philosophy of the Life Sciences* **37**:282–304.
- Ginther OJ. 1983. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* **19**:603–611.
- Ginther OJ. 2010. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. *Equine Veterinary Journal* **17**:41–47.

- Ginther OJ. 2021. Equine Embryo Mobility. A Friend of Theriogenologists. *Journal of Equine Veterinary Science* **106**:103747.
- Hector C. 2018. Clones – success or failure?. *The Horse Magazine*. Available from [https://www.horsemagazine.com/thm/2022/05/clones-success-or-failure/?fbclid=IwAR3xfUNINI8uJN785N2reGJdy2nhRSZjvTUnxF\\_V3IbNkEsc2AnADWZWkEQ](https://www.horsemagazine.com/thm/2022/05/clones-success-or-failure/?fbclid=IwAR3xfUNINI8uJN785N2reGJdy2nhRSZjvTUnxF_V3IbNkEsc2AnADWZWkEQ) (accessed April 15, 2023).
- Hinrichs K. 2006. Equine Cloning. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **22**:857–866.
- Hinrichs K. 2010. The equine oocyte: Factors affecting meiotic and developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* **77**:651–661.
- Hinrichs K. 2013. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility and Development* **25**:80.
- Hinrichs K. 2018. Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals* **53**:4–13.
- Hinrichs K, Choi YH, Varner DD, Hartman DL. 2007. Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. *Reproduction* **134**:319–325.
- Hinrichs K, Williams KA. 1997. Relationships among Oocyte-Cumulus Morphology, Follicular Atresia, Initial Chromatin Configuration, and Oocyte Meiotic Competence in the Horse<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **57**:377–384.
- Illmensee K, Levanduski M. 2010. Embryo splitting. *Middle East Fertility Society Journal* **15**:57–63.
- Illmensee K, Levanduski M, Vidali A, Husami N, Goudas VT. 2010. Human embryo twinning with applications in reproductive medicine. *Fertility and Sterility* **93**:423–427.
- Jacobson CC, Choi Y-H, Hayden SS, Hinrichs K. 2010. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* **73**:1116–1126.
- Johnson AK, Clark-Price SC, Choi Y-H, Hartman DL, Hinrichs K. 2010. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **236**:983–990.
- Kovářiková L. 2012. Reprodukce u koně Převalského. [BSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Colleoni S, Ponderato N, Turini P, Crotti G, Galli C. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: Effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction (Cambridge, England)* **130**:559–67.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Colleoni S, Crotti G, Galli C. 2007. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* **67**:90–98.
- Lazzari G et al. 2020. Laboratory Production of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science* **89**:103097.
- Lee W, Song K, Lee I, Shin H, Lee BC, Yeon S, Jang G. 2015. Cloned foal derived from *in vivo* matured horse oocytes aspirated by the short disposable needle system. *Journal of Veterinary Science* **16**:509.
- Li X, Morris LH-A, Allen WR. 2002. In Vitro Development of Horse Oocytes Reconstructed with the Nuclei of Fetal and Adult Cells<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **66**:1288–1292.
- Lorenzo PL, Liu IKM, Carneiro GF, Conley AJ, Enders AC. 2002. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Veterinary Journal* **34**:378–382.
- Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze v nakladatelství Brázda, Praha.
- Maserati M, Mutto A. 2016. In Vitro Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. *Journal of Equine Veterinary Science* **41**:42–50.
- Miragaya M et al. 2010. 50 FIRST EQUINE CLONE BORN IN ARGENTINA BY SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER FROM A POLO ARGENTINO MARE. *Reproduction, Fertility and Development* **23**:131–131. CSIRO PUBLISHING.
- Moore SG, Hasler JF. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science* **100**:10314–10331.
- Nevečeřalová K. 2020. Klonování koní jako výzva 21. století. Available from <https://jezdectvi.cz/clanek/zajimavosti/klonovani-koni-jako-vyzva-21-stoleti> (accessed April 16, 2023).
- Noli L, Ogilvie C, Khalaf Y, Ilic D. 2016. Potential of human twin embryos generated by embryo splitting in assisted reproduction and research. *Human Reproduction Update*:humupd;dmw041v1.
- Olivera R, Moro LN, Jordan R, Luzzani C, Miriuka S, Radrizzani M, Donadeu FX, Vichera G. 2016. In Vitro and In Vivo Development of Horse Cloned Embryos Generated with iPSCs, Mesenchymal Stromal Cells and Fetal or Adult Fibroblasts as Nuclear Donors. *PLOS ONE* **11**:e0164049.

- Omidi M, Khalili MA, Halvaei I, Montazeri F, Kalantar SM. 2020. Quality of Blastocysts Created by Embryo Splitting: A Time-Lapse Monitoring and Chromosomal Aneuploidy Study. *Cell Journal (Yakhteh)* **22**:367–374.
- Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, Maclellan LJ, Squires EL. 2004. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 °C. *Theriogenology* **61**:1215–1223.
- Rahbaran M et al. 2021. Cloning and Embryo Splitting in Mammals: Brief History, Methods, and Achievements. *Stem Cells International* **2021**:e2347506. Hindawi.
- Reece WO. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada Publishing a. s., Praha.
- Scott L. 2002. The origin of monozygotic twinning. *Reproductive BioMedicine Online* **5**:276–284.
- Spemann H. 1902. *Entwicklungsphysiologische Studien am Tritonei II*. 15, 448–534
- Szekeres-Bartho J. 2002. IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIP BETWEEN THE MOTHER AND THE FETUS. *International Reviews of Immunology* **21**:471–495.
- Tatham BG, Dowsing AT, Trounson AO. 1995. Enucleation by Centrifugation of in Vitro-Matured Bovine Oocytes for Use in Nuclear Transfer<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **53**:1088–1094.
- Tsunoda Y, Kato Y. 2002. Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation* **69**:158–161.
- Tuff K. 2022. Cloned Przewalski's Horse, Kurt, now learning the language of wild horses - Revive & Restore. Available from <https://reviverestore.org/cloned-przewalskis-horse-kurt-now-learning-the-language-of-wild-horses/> (accessed April 15, 2023).
- Vajta G, Gjerris M. 2006. Science and technology of farm animal cloning: State of the art. *Animal Reproduction Science* **92**:211–230.
- Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO. 2001. Somatic Cell Cloning without Micromanipulators. *Cloning* **3**:89–95.
- Vanderwall DK, Woods GL. 2002. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare. *Journal of Equine Veterinary Science* **22**:84–86.
- Vanderwall DK, Woods GL, Sellon DC, Tester DF, Schlafer DH, White KL. 2005. The current status of equine cloning. *Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*.



- Velez IC, Arnold C, Jacobson CC, Norris JD, Choi YH, Edwards JF, Hayden SS, Hinrichs K. 2012. Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status: Effect of transvaginal aspiration on health. *Equine Veterinary Journal* **44**:78–83.
- Verma G, Arora J, Sethi R, Mukhopadhyay C, Verma R. 2015. Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **6**:43.
- Wadman M. 2007. Dolly: a decade on. *Nature* **445**:800–801.
- Wakchaure R, Ganguly S. 2016. Advances in equine cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) technique in horses: a review. *International Journal of Bioassays* **5**:5124.
- Westhusin M, Hinrichs K, Choi Y-H, Shin T, Liu L, Kraemer D. 2003. Cloning Companion Animals (Horses, Cats, and Dogs). *Cloning and Stem Cells* **5**:301–317.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li G-P, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. 2003. A Mule Cloned from Fetal Cells by Nuclear Transfer. *Science* **301**:1063–1063.
- Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C. 1989. Recent studies on in vivo fertilisation of in vitro matured horse oocytes. *Equine Veterinary Journal* **21**:101–104.