

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Současný pohled na klonování koní a jeho využití**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Kateřina Nevečeřalová**

**Obor studia: Zájmové chovy zvířat (AMPSKS)**

**Vedoucí práce: ing. Lucie Starostová**

**Konzultant práce: ing. Barbora Hofmanová, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Současný pohled na klonování koní a jeho využití" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

---

**Bc. Kateřina Nevečeřalová**

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala ing. Lucii Starostové za vedení práce, ochotu a vstřícnost, ing. Barboře Hofmanové, Ph.D za konzultace a odborné rady a MVDr. Otakarovi Chvátalovi, CSc. za odborné rady.

# Současný pohled na klonování koní a jeho využití

## Souhrn

Zájem o klonování koní se v poslední době výrazně zvýšil. V mnoha různých zemích byly vytvořeny stovky koňských klonů, i když přesné číslo je obtížné získat.

Úvodní částí je literární rešerše, věnovaná historii a bližšímu popisu hlavních technik používaných při klonování koňovitých a případným problémům, které z těchto metod vyplývají. Popsán byl stav aktuálních znalostí, současného vývoje trhu a zároveň byly uvedeny rozdíly v předpisech při registraci různých plemen. Klonování se uplatňuje především v disciplínách, kde pravidla pro registraci koní jsou volnější. V případě anglického nebo arabského plnokrevníka je klonování prozatím zakázáno.

Praktická část je zaměřena na zjištění postoje odborné i laické veřejnosti v oblasti jezdeckví, chovatelství a veterinární medicíny ke klonování zpracováním dotazníkového průzkumu ve vybraných zemích (Česká republika, Francie, Německo, Argentina a Velká Británie). Hlavním cílem diplomové práce bylo potvrdit domněnku, že existuje statisticky významný rozdíl ve vnímání problematiky klonování koní mezi zmíněnými zeměmi. Bylo stanoveno šest vědeckých hypotéz týkajících se bezpečnosti konzumace masa, využitím klonů v potravinovém řetězci, používání klonů v reprodukci, účasti klonovaných koní nebo jejich potomků v soutěžích FEI, sledován byl sportovní aspekt i „morální“ správnost klonování. Všech šest hypotéz bylo statisticky potvrzeno. Výsledky dotazníkového šetření otevírají debatu o případném masivnějším využití této biotechnologie.

**Klíčová slova:** klonování, kůň, equinní reprodukce, bioetika

# **The Current View on Equine Cloning and Its Use**

## **Summary**

Recent years have witnessed an increased interest in horse cloning. Hundreds of horse clones have been produced in many different countries although the exact number is difficult to obtain.

The introductory part is a literature review, addressing the history and giving a more detailed description of the main techniques used in equine cloning and of the potential problems that arise from these methods. The state of current knowledge, current market development, and at the same time, the differences in the rules applicable to the registration of different breeds are described. Cloning is mainly used in disciplines where the rules for registering horses are more relaxed. In the case of the Thoroughbred and the Arabian, cloning is prohibited for the present.

The practical part focuses on identifying the attitudes of the professionals and lay people (riders, breeders, veterinary doctors) to cloning through a questionnaire survey conducted in selected countries (the Czech Republic, France, Germany, Argentina and the UK). The main objective of this master's thesis was to confirm the assumption that there is a statistically significant difference in the perception of the issue of horse cloning among the countries mentioned. Six scientific hypotheses, i.e. the safety of meat consumption, the use of clones in the food chain, the use of clones in reproduction, the participation of cloned horses or their offspring in FEI competitions, were established. The views on the sporting aspect and the "ethical" correctness of cloning were monitored, too. All the six hypotheses were statistically validated. The results of the questionnaire survey open up a debate on the potential more massive use of this biotechnology.

**Keywords:** cloning, horse, equine reproduction, bioethics

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíle práce a vědecké hypotézy .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Klonování koní .....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Historie .....	11
3.1.2 Stručný popis techniky klonování .....	13
3.1.2.1 Dárcovská somatická buňka .....	14
3.1.2.2. Vliv dárcovského zvířete .....	16
3.1.2.3 Zdroj oocytů .....	18
3.1.2.4 Maturace oocytů .....	21
3.1.2.5 Americký a italský postup klonování koní .....	22
3.1.2.6 Agregace (spojování) embryí neboli tvorba chimér .....	26
3.1.3 Zdravotní stav koňských klonů .....	28
3.1.4 Využití a komercializace klonů koní.....	30
3.1.5. Zdravotní rizika spojená s klonováním koní .....	32
3.1.6 Chovatelské svazy a registrace klonů.....	33
3.1.7 Etické aspekty klonování.....	34
<b>4 Materiál a metodika .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Dotazníkové šetření.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Metody statistického vyhodnocení.....</b>	<b>37</b>
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Výsledky dotazníkového šetření .....</b>	<b>38</b>
5.1.1 Struktura respondentů.....	38
5.1.2. Popisná statistika vybraných otázek.....	41
5.1.3 Výsledky testování vědeckých hypotéz .....	51
<b>6 Diskuze.....</b>	<b>63</b>
<b>6.1 Informovanost o klonování .....</b>	<b>63</b>
<b>6.2. Bezpečnost konzumace masa z klonovaných zvířat.....</b>	<b>63</b>
<b>6.3 Využití klonů v potravinovém řetězci v rámci EU.....</b>	<b>64</b>
<b>6.4 Etický aspekt klonování.....</b>	<b>64</b>
6.4.1 Otázka „sériově“ vyráběných zvířat.....	65
6.4.2 Proč klonovat?.....	65
<b>6.5 Klonování koní a FEI.....</b>	<b>65</b>
<b>6.6 Klonování koní a sport .....</b>	<b>66</b>
<b>6.7 Identifikace klonů koní.....</b>	<b>66</b>

6.8 Nebezpečí zneužití, rizika spojená s klonováním .....	67
6.9 Legislativní rámec .....	67
7 Závěr .....	69
8 Literatura .....	71
9 Seznam použitých zkratk a symbolů .....	79
10 Přílohy.....	80
10.1 Příloha č. 1 .....	80
10.2 Příloha č. 2 .....	85

# 1 Úvod

Od narození ovce Dolly, která byla prvním savcem úspěšně naklonovaným z dospělé somatické buňky, uplynula více jak dvě desetiletí (Wilmut et al. 1997). Navzdory novým úspěchům dosaženým v posledních letech v oblasti klonování stále nemáme zdaleka úplnou představu o všech mechanismech transformace jediné diferencované somatické buňky na celý organismus.

Zvláště u koní se ukázalo, že možnost uchovat tkáň zvířete s unikátním genotypem má reprodukční výhodu v případě, že byl k reprodukci použit výjimečný valach nebo uhynulý jedinec. To umožňuje použití koňských klonů v chovu, protože jinak by tito jedinci neměli šanci předat svoji genetickou informaci dalším generacím (Gambini et al. 2012; Gambini & Maserati 2018).

Zásadní technikou klonování koní je tzv. klonování přenosem jader somatických buněk, a jako komerční metoda reprodukce koní je nabízena v různých zemích: Francie (do roku 2016), Spojené státy, Kanada, Austrálie, Nový Zéland a Jižní Amerika (Campbell 2016). Odhaduje se, že v šesti různých zemích bylo naklonováno přes 383 koní (Maserati & Mutto 2016). V odborné literatuře se uváděné počty klonovaných koní u jednotlivých autorů liší.

Výzkum v oblasti klonování koní je v současné době stále velmi aktivní a výsledné informace přispívají ke zlepšení této technologie i k pochopení genetických a epigenetických mechanismů, které nastávají po oplodnění. Sedmnáct let po prvním úspěšném klonování koňovitých je možné zhodnotit různé výzkumné projekty, zaznamenat již získané výsledky a popsat využití a perspektivy, zejména ekonomické, vyplývající z této technologie.

Dle Nolen (2007) je však klonování jakéhokoli živočišného druhu eticky sporné. Mezinárodní jezdecká federace (FEI) sice změnila pravidla a umožnila od roku 2012 klonům koní, i jejich potomkům účast na závodech, Evropský parlament však v roce 2015 schválil návrh směrnice zakazující klonování hospodářských zvířat a dovoz a prodej výrobků pocházející z klonů. Nicméně klonování koní pro různé účely je povoleno v mnoha jiných zemích (Cambell 2016). Na základě tohoto poněkud nejednotného legislativního pozadí je cílem této práce mimo jiné zjistit, zda existují přesvědčivé etické argumenty pro zákaz klonování koní.

Tento přehled shrnuje hlavní úspěchy ve vývoji technologie klonování koně a popisuje také stav mezinárodní komercializace této techniky.



## 2 Cíle práce a vědecké hypotézy

Cílem teoretické části práce bylo shromáždit a analyzovat zásadní informace týkající se metod a biotechnologických postupů, významu i využití klonování koní. Praktická část byla zaměřena na zjištění postoje a vnímání klonování odbornou i laickou veřejností v oblasti jezdeckví, chovatelství a veterinární medicíny statistickým zpracováním dotazníkového průzkumu v České republice, Francii, Německu, Argentině a Velké Británii. Získané výsledky mohou směřovat aktéry procesu klonování ve svých strategických rozhodnutích, nebo pomoci chovatelům při rozhodování o využití této technologie. Mohou být také zdrojem informací při vytváření nezbytných legislativních nástrojů a pravidel.

Věcná hypotéza (domněnka)

- Existuje statisticky významný rozdíl ve vnímání problematiky klonování koní ve vybraných zemích (Francie, Velká Británie, Německo, Argentina, Česká republika).

Testovány byly následující hypotézy:

- (1) Hodnocení bezpečnosti konzumace masa z klonovaných zvířat pro lidi se mezi sledovanými státy liší.
- (2) Souhlas s přístupem EU k využití klonů v potravinářském řetězci se liší podle sledovaných států.
- (3) Uváděné důvody, proč by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci, se liší podle států.
- (4) Souhlas s účastí klonovaných koní v soutěžích FEI se liší podle států.
- (5) Souhlas s tvrzením, že hlavním důvodem klonování koní je sportovní aspekt, se liší podle jednotlivých států.
- (6) Hodnocení, zda je klonování „morálně“ správné, se liší podle států.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Klonování koní

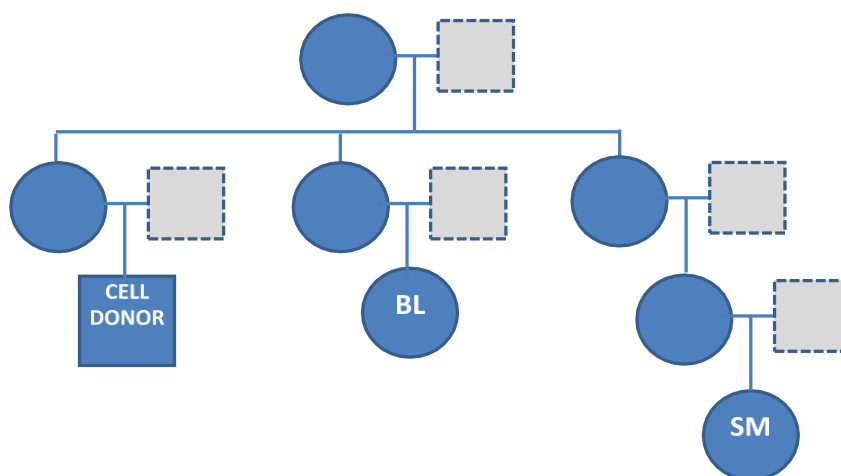
Celá řada asistovaných reprodukčních technologií (ART's), které se používají v oblasti equinní reprodukce, se stala rutinní praxí na mnoha místech světa. Umělá inseminace čerstvým nebo zmrazeným spermatem byla popsána již před šesti desetiletími a je běžnou metodou pro produkci hříbat. Druhá generace ART's zahrnuje ultrasonografii a embryotransfer (ET). Mezinárodní společnost pro přenos embryí (The International Embryo Transfer Society) oznámila, že v roce 2015 bylo na celém světě provedeno více než 20 000 ET. Sonografické vyšetření je posledních 20 let u koní široce používanou technologií, která umožňuje zobrazování reprodukčních struktur a sexování plodů. Třetí generace zahrnuje sexování spermií a embryí, aspiraci oocytů, oplodnění *in vitro* (IVF) a hlavně metodu intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI, intracytoplasmic sperm injection), kdy se přímo do oocytu injikuje jedna znehybněná spermie (Chavatte-Palmer et al. 2017; Valenzuela et al. 2018).

V posledních letech se objevily nové technologie s vysokou úrovní specializace a kvalifikovaným personálem, které mají chovatelé a majitelé koní k dispozici. Tímto novým biotechnologickým postupem je i klonování. Odborná literatura je na texty o klonování poměrně bohatá a navzdory technologickým obtížím, které jsou v publikacích stále patrné, jsou autoři ohledně komerčního využití této metody optimističtí (Reis 2013).

Klonování je vytváření nového jedince geneticky identického s předlohou. Klony savců ovšem představují průlomovou inovaci v reprodukci, protože na rozdíl od jednovaječných dvojčat mají klony totožnou DNA, ale zároveň odlišnou mitochondriální DNA (mtDNA), která je obsažena v malé míře v oocytu (Reis 2013). V důsledku toho není klonovaný živočich se svým klonem geneticky naprosto shodný. Liší se především v genech uložených v mitochondriích, protože ty klon dostává od samice, která poskytla vajíčko pro přípravu cytoplasmu (Petr 2003). Na druhé straně jsme také svědky toho, že se rodí klonovaná zvířata s vysokým podílem mitochondrií pocházejících ze somatické (tělní) buňky (Ibtisham et al. 2017). Choi et al. (2014) a Hinrichs (2018) ovšem ve své práci popisují i narození prvního hříběte (klonu), které mělo identickou mtDNA s dárcem. V tomto případě se jednalo o oocyty dvou klisen příbuzných po mateřské linii s klonovaným koněm (Obr. 1).

Ve srovnání s klonováním jiných domácích zvířat je klonování koní méně prostudované. Pravděpodobně v důsledku nedostatku oocytů vlivem nízké efektivity superovulačního protokolu (Hinrichs 2012; Farias et al. 2019), který je způsoben anatomicko-fyziologickými specifiky reprodukční soustavy klisen, obecným nedostatkem koňských jatek (Alvarenga et al. 2008;

Wakchaure & Ganguly 2016; Gambini & Maserati 2018) a nedostatečným zájmem chovatelů a chovatelských sdružení (Galli et al. 2007).



Obr. 1 Schéma vztahu dvou donorek oocytů (BL - 2letá klisna plemene QH, SM - 12letá klisna plemene QH) s dárcem somatických buněk (Choi et al. 2014)

### 3.1.1 Historie

Allen & Pashen (1984) ve své práci popisují narození dvou geneticky identických hříbat splitting technikou. Jednalo se o monozygotní dvojčata. Při této proceduře se pomocí mikromanipulátoru rozdělí časné embryo na dvě části. Po rozdělení jsou embryo přenesena do dělohy náhradních matek.

Relativně pozdě, v porovnání s jinými druhy zvířat (Příloha č. 2), oznámili (Woods et al. 2003) úspěšné klonování muly. Při tomto postupu byly použity fibroblasty 45 dnů starého plodu muly, který se vyvíjel v děloze a enukleované oocyty koně. Následně skupina vedená Cesarem Gallim z Laboratoře reprodukčních technologií (Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione) v Cremoně informovala o narození prvního klonu koně, u kterého byl tentokrát použit fibroblast dospělého jedince. Kožní buňky byly odebrány klisně plemene hafling a hřebci arabského plnokrevníka (Galli et al. 2003a). Klisna Prométhea se narodila zcela zdravá a v roce 2017 byla nejstarším žijícím klonovaným koněm (Gambini & Maserati 2018).

Úspěchy v klonování koní se začínají množit. Začátkem roku 2006 oznámila soukromá společnost Viagen, která sídlí ve Spojených státech, narození dvou zdravých hříbat (Hinrichs 2006a) a od té doby bylo komerčně narozeno prostřednictvím této společnosti několik stovek klonů. Do června 2017 skupina profesorky Hinrichsové z Texas A&M University (TAMU) vyprodukovala 21 živých hříbat, z nichž 18 přežilo a bylo bez zdravotních komplikací.

Ze čtrnácti zemí Jižní Ameriky jsou v současnosti pouze Argentina a Brazílie schopné produkovat větší počty klonů. V Argentině přišel na svět první koňský klon v roce 2008. Produkce klonů pokračovala a do roku 2016 se narodilo díky dvěma soukromým společnostem Kheiron a Crestview Genetics přibližně 120 klonovaných koní (Maserati & Muto 2016; Gambini&Maserati 2018).



Obr. 2 Klony koňovitých, které se narodily v různých zemích.

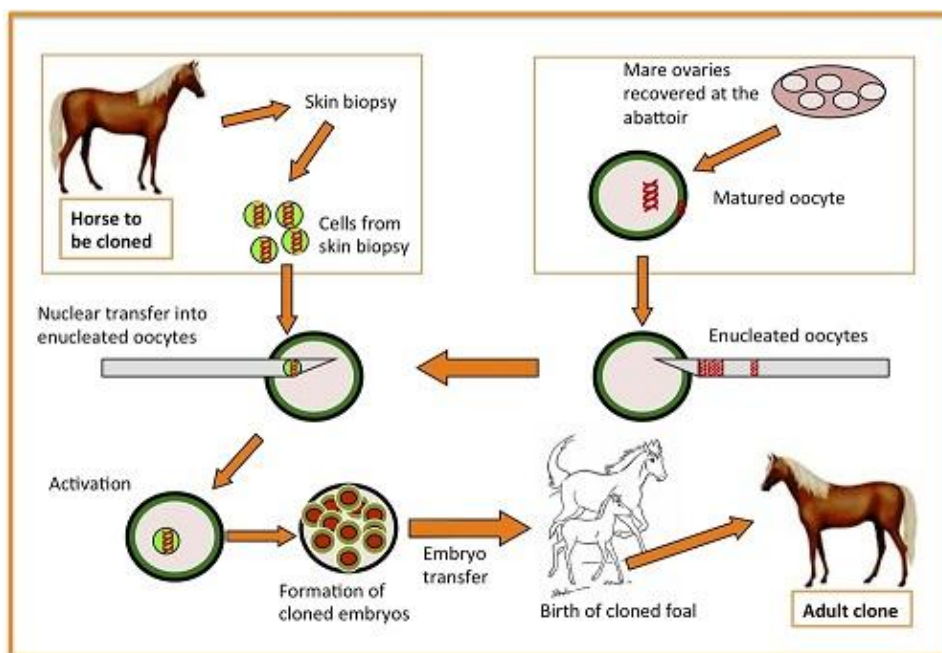
(a) Idaho Gem, klon muly, USA 2003, (b) Promethea, klon koně, Itálie 2003, (c) klon koně, USA 2005, (d) Ñandubay Bicentenario, klon koně, Argentina 2010, (e) klon koně, Korea 2010, (f) Turbante, klon koně, Brazílie In Vitro Clonagem 2012, (g) hříbě – klon, Kolumbie GenesCol 2016 (Gambini & Maserati 2018)

Klonování koně se podařilo v mnoha zemích a téměř na každém kontinentu (Obr. 2), ale stejně jako u ostatních druhů zvířat, je zatím celková úspěšnost velice nízká a klonování zůstává velmi neefektivním procesem (Galli et al. 2003; Woods et al. 2003; Vanderwall et al. 2004a; Keefer 2015; Olivera et al. 2016; Teixeira et al. 2019). Průměrná výnosnost je jen 0,16 %, (na jedno živé, měsíc staré hříbě, je třeba více než 600 oocytů) (Reis & Nakhla 2012). Nízká účinnost přenosu jader somatických buněk (SCNT) byla primárně přičítána problémům během procesu reprogramace jader, který je nutný k obnovení totipotence jádra dárcovské buňky (Teixeira et al. 2019). Zdroj dárcovské buňky, synchronizace buněčného cyklu, podmínky při kultivaci, reprogramace somatického jádra a počet buněčných dělení, to všechno jsou proměnné, které by měly být brány v úvahu při pokusech jak zvýšit efektivitu klonování koní (Gambini & Maserati 2018).

### 3.1.2 Stručný popis techniky klonování

V současné době se klonování koní provádí technikou známou jako přenos jader somatických buněk (SCNT, somatic cell nucleus transfer) z kožních buněk dospělého zvířete a oocytů odebraných z ovárií klisen čerstvě poražených na jatkách. Tyto oocyty jsou dostupnější a levnější než oocyty odebrané ze živých zvířat (Alvarenga et al. 2008; Reis 2013; Galli et al. 2014). Vaječníky jsou transportovány v termosce z jatek do laboratoře při teplotě mezi 25 °C až 29 °C, doba přepravy od 2 do 4 hod., vyčištěny sterilní gázou a dekontaminovány opakovaným oplachem sterilní redestilovanou vodou. Všechny viditelné folikuly jsou otevřeny pomocí skalpelu. Oocyty obalené vrstvami kumulárních buněk (COC's), získané „seškrábáním“ kyretou (Olivera et al. 2016), jsou hodnoceny a rozděleny na oocyty s expandovaným kumulem a s kompaktním kumulem (Tremoleda et al. 2003). V laboratoři dochází ve vhodném prostředí ke kultivaci dárcovské samičí pohlavní buňky (oocytu) *in vitro* do stádia metafáze II (MII) meiotického dělení, stejně jako jsou přirozeně ovulované oocyty. Pak je z oocytu enukleací odstraněno jádro, které obsahuje chromozomy. Následuje přenesení jádra kultivované somatické buňky (od zvířete, které chceme klonovat) do jádra zbaveného oocytu.

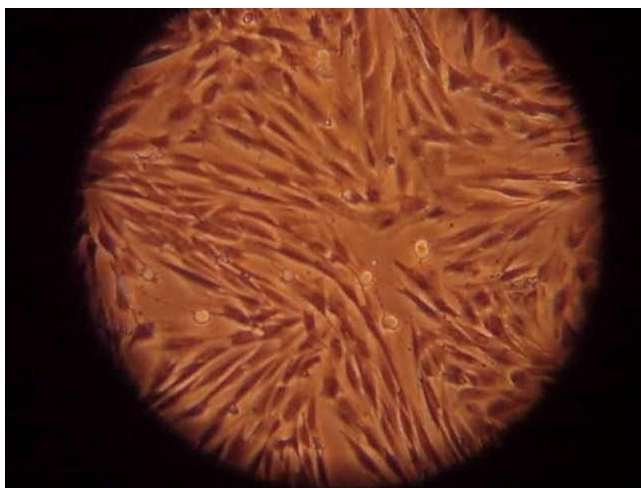
Prostřednictvím elektrických pulzů dochází k fúzi těchto dvou buněk (oocytu a jádra somatické buňky) a následné chemické procesy umožní zahájení mitotického dělení buněk. Po aktivaci jsou zygoty kultivovány asi 8 dní do stadia blastocysty. Pak je proveden embryotransfer (ET) do dělohy klisny příjemkyně, kde se embryo dále vyvíjí (Obr. 3) (Choi et al. 2004; Reis 2013).



Obr. 3 Technika klonování  
[www.avantea.it](http://www.avantea.it)

### 3.1.2.1 Dárcovská somatická buňka

Použití fetálních fibroblastů nebo fibroblastů z dospělého jedince (Obr. 4) jako dárcovských buněk a jejich vliv na raný vývoj rekonstruovaných oocytů porovnávali Li et al. (2002). Jejich výsledky ukázaly, že míra reprogramace jader byla 88 % a 84 % z fetálních resp. dospělých buněk, tedy bez výrazného rozdílu mezi oběma druhy buněk. Tato zjištění jsou v souladu s tím, co bylo pozorováno i u jiných druhů savců. Buněčná reprogramace během SCNT zahrnuje změny v genové expresi, které jsou spojeny s epigenetickými modifikacemi jako je metylace DNA, metylace histonů, acetylace, fosforylace nebo ubiquitylace (Teixeira et al. 2019).



Obr. 4 Fibroblasty koně (© Cryozootech)

Galli et al. (2008) uvádějí, že pro klonování koní byly použity různé druhy dárcovských buněk (fibroblasty fetální a z dospělých jedinců), včetně buněk granulózy (Vanderwall et al. 2004; Lagutina et al. 2005), což vedlo k rozdílné míře úspěšnosti SCNT (Tabulka 1). Buněčný cyklus donorové buňky je zásadní pro úspěch celého procesu (Galli et al. 2003b). U koní se využívají buňky nacházející se ve fázi G0 a G1. Těchto fází lze dosáhnout sníženým obsahem séra, kontaktní inhibicí (buňky zastaví růst po vzájemném kontaktu) nebo použitím inhibitorů kinázy, jako je roskovitin (Choi et al. 2006; Olivera et al. 2016; Wakchaure & Ganguly 2016).

Niemann & Lucas-Hahn (2012) poukázali na to, že fetální buňky jsou často používány pro klonování, protože vykazují menší poškození genetické informace a lepší proliferační kapacitu než somatické buňky z dospělých jedinců. Jejich praktické a komerční využití je ale zpochybňováno v tom smyslu, že zvířata, která chceme klonovat, jsou obvykle dospělá. Proto u koňovitých se při klonování většinou využívají fibroblasty získané z kožní biopsie. Odebrání vzorku tkáně je snadné, rychlé a neinvazivní. Biopsie se obvykle provádí v oblasti prsou koně, protože kožní tkáň je zde snadno dostupná a pružná. Krk, dásně nebo uši byly také popsány jako případná další vhodná místa pro biopsii (Choi et al. 2002; Sansinena et al. 2002; Lagutina et al. 2006).

Tabulka 1 Vliv dárcovské buňky na výsledek klonování (Gambini & Salamone 2019)

Původ dárcovské buňky	Blastocysta	Březost	Hříbě	Odkazy
Fibroblasty 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
Naklonované fetální fibroblasty	Ano	Ano	Ano	Lagutina et al. 2005 Olivera et al. 2016
Fetální fibroblasty	Ano	Ano	Ano	Woods et al. 2003
iPSCs (indukované pluripotentní kmenové buňky)	Ne	--	--	Olivera et al. 2016
MSCs (mezenchymální kmenové buňky) z tkáně pupečnickové šňůry	Ano	Ano	Ne	Olivera et al. 2016
MSCs (mezenchymální kmenové buňky) z kostní dřevě	Ano	Ano	Ano	Olivera et al. 2018

Equine Embryo Laboratory (TAMU, Texas A&M University) doporučuje z estetických důvodů a kvůli ochraně jizvy před světlem biopsii v oblasti krku pod hřívou nebo v krajním případě z dásně. Při kožní biopsii se po dezinfekci a vyholení operačního pole (7 x 7 cm) provede 2 cm řez ve středu této sterilní zóny, kde jsou odebrány vzorky podkožní pojivové tkáně (velikosti rýžového zrna), které se okamžitě umístí do zchlazeného kultivačního média (DMEM/F12+10% BFS+ATB). Označené zkumavky se vzorky tkáně se v chlazeném kontejneru dopraví do laboratoře (<http://vetmed.tamu.edu/files/vetmed/equine-embryo-lab/Obtaining-a-Tissue-Sample-for-Cell-culture-12-17.pdf>). Pro dlouhodobé uchování vzorků je možné jejich zmrazení v tekutém dusíku (Vanderwall et al. 2004b). Gambini & Salamone (2019) upozorňují, že nejčastější komplikací během biopsie je kontaminace. Proto je velmi důležité, aby byl odběr v terénu proveden za aseptických podmínek. To se týká i dopravy tkáně do laboratoře.

V ideálním případě by tkáň měla být odebrána z živého zvířete. V „nouzové“ situaci je možné odebrat vzorky i z uhynulého zvířete. Aby se maximalizovala pravděpodobnost získání životaschopných buněk, měla by být tkáň zemřelého zvířete udržována při teplotě v rozmezí 3 °C až 8 °C. Šance na získání životaschopných buněk se snižují, pokud je tkáň skladována při teplotě nad 10 °C (Vanderwall et al. 2004b).

Díky své schopnosti regenerace a podmínek, které při kultivaci a kryokonzervaci vyžadují, jsou fibroblasty běžným zdrojem dárcovských buněk používaných při klonování koní (Gambini & Maserati 2018).

Plasticita buněk, tedy schopnost umožnit vznik také buňkám jiných tkání, než ke kterým samy náleží, je při klonování pro účinnou reprogramaci jader a narození zdravého potomstva zásadní. Proto buňky s vysokou plasticitou, jako jsou mezenchymální kmenové buňky (MSCs), jsou slibnou alternativou pro klonování koní (Hinrichs 2018). Odběr MSCs se provádí aspirací kostní dřeně z hrudní kosti (sternální punkce) sedovaných koní (3 ml Xilacina 100; 0,5 ml Turbogestic) a za použití lokálního anestetika (2% lidokain 20 ml). Aspirát kostní dřeně je ošetřen citrátem sodným a dodán do laboratoře během 3 hodin při teplotě 8 °C (Oliveira et al. 2018). MSCs z tkáně pupečnickové šňůry (Tabulka 1) byly také použity při produkci embryí klonovaných koní, ale bez narození živých hříbat (Gambini & Maserati 2018).

Existuje možnost, že klonování by mohlo být provedeno s použitím somatických diploidních buněk izolovaných ze zmrazeného a následně rozmrazeného spermatu. To by umožnilo produkci klonů v případech, kdy zmrazené sperma je jediným existujícím zdrojem buněk zvířete, které chceme klonovat. Tímto způsobem se narodilo jedno živé tele. Somatické buňky byly také již úspěšně izolovány ze zmrazeného hřebčího spermatu, ale klonování provedeno nebylo (Hinrichs 2018).

#### 3.1.2.2. Vliv dárcovského zvířete

Vzhledem k relativně nízkému počtu klonovaných koní, byly hypotézy o vlivu dárcovského zvířete prezentovány na základě zkušeností z klonování skotu (Galli et al. 2003b; Keefer 2015). Heymann et al. (2005) provedli přenos jader z kožních fibroblastů dospělého skotu (různého původu) získaných biopsií a porovnali vývoj rekonstruovaných embryí *in vitro*. Počet získaných blastocyst po 7 dnech kultivace rekonstruovaných embryí se lišil od 6 % do téměř 45 % v závislosti na liniích fibroblastů. Následný vývoj těchto klonovaných blastocyst se dále může lišit od 3 % do 25 % podle původu dárcovského zvířete, použitého jako zdroj somatických jader. Genetická výbava dárcovského zvířete (zdroj fibroblastů) se tedy jeví jako variační faktor, i když příčina tohoto jevu zůstává stále nejasná.

Studie Sansinena et al. (2002) je zajímavá pro zhodnocení vlivu dárcovského zvířete. Pro pokus byly vybrány dvě podobné klisny: dle věku (14 a 16 let), hmotnosti (550 a 600 kg) a tělesné kondice (stupnice 8 a 8,5). Obě klisny byly teplokrevné s pravidelnými říjovými cykly. Dárcovské buňky byly získány biopsií v oblasti krku v týž den stejným technikem. Následně byla provedena



elektrofúze jádra dárcovských buněk a hovězích oocytů v metafázi II (MII). Pro kultivaci rekonstruovaných embryí bylo použito stejné kultivační médium pro obě dárcovské buněčné linie. Výsledky ukázaly, že mezi oběma dárcovskými klisnami nebyl významný rozdíl v počtu fúzí (54 % a 60 %), ale počet zryhovaných zygot u klisny označené A byl však výrazně odlišný oproti klisně B (70 % a 50 % rekonstruovaných embryí).

Ve své práci Sansinena et al. (2002) sice uvádí, že hovězí oocyty mají schopnost aktivovat mRNA a reprogramovat jádra somatických buněk koní. Po počátečním rýhování se však embrya nikdy nevyvinula do stadia moruly nebo blastocysty, což naznačuje selhání aktivace embryonálního genomu (Galli et al. 2014).

Lagutina et al. (2005) publikovali výsledky po přenosu jader z fibroblastů z dospělých jedinců (koní) za použití identické metody přenosu jader (Tabulka 2). Výsledky pro tři buněčné linie stejného původu se mezi třemi dárci lišily, pokud jde o zahájení březosti a narození živých hříbat.

Tabulka 2 Příklad vlivu dárce buněk na účinnost přenosu jader (Lagutina et al. 2005)

Dárce buněk (kůň)	Počet embryí	Počet recipientek	Březost n (%)	35 dní březosti n (%)	3 měsíce březosti n (%)	6 měsíců březosti n (%)	Počet potomků n (%)
Fibroblasty z dospělého ♂ A	4	2	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Fibroblasty z dospělého ♂ B	71	23	6 (26,1)	4 (17,4)	3 (13)	2 (8,7)	2 (8,7)
Fibroblasty z dospělého ♂ C	26	12	2 (16,7)	2 (16,7)	1 (8,3)	1 (8,3)	0 (0)

Všechny studie naznačují vliv dárcovského zvířete na účinnost klonování, ovšem pro přijetí této hypotézy by bylo zapotřebí většího počtu koní v jednotlivých studiích.

### 3.1.2.3 Zdroj oocytů

Galli et al. (2008; 2014) uvádějí, že u koňovitých mohou oocyty pocházet z živých dárkyň nebo mohou být získané z jatečných vaječníků, přičemž druhá varianta je jako zdroj oocytů pro přenos jader jediná ekonomicky schůdná. Ve valné většině byly při klonování koní použity oocyty z poražených klisen (Choi et al. 2002a; Choi et al. 2002b; Lagutina et al. 2005; Lagutina et al. 2006; Hinrichs 2007; Miragaya et al. 2010). Byl to i případ prvního klonovaného koně (Galli et al. 2003a; Galli et al. 2014).

Některé studie nicméně popisují použití oocytů odebraných ze živých klisen. V případě prvního klonu lichokopytníka se navíc jednalo o klon neplodného mezidruhového křížence muly, a byly zde pro přenos jádra somatické buňky použity oocyty plemene quarter horse získané transvaginální aspirací folikulů (OPU, ovum pick-up) (Woods et al. 2003). V roce 2010 uvedl tým vědců z Texas A&M University (TAMU) první zmínku o narození životaschopného klonu koně, který vznikl z oocytů odebraných z nezralých folikulů získaných z živých klisen. Od té doby se narodilo nejméně jedno hříbě (klon) ze stejného typu oocytů (Choi et al. 2013). Použití oocytů z jatečných klisen ponechává jen velmi málo možností vybrat si vhodnou dárcovskou klisnu, která poskytuje vajíčka.

Zajímavé výsledky ovšem přinesli Yan et al. (2010), kteří popsali, že pro účinnost klonování je vliv kompatibility haplotypu mitochondriální DNA (mtDNA) mezi hostitelskými oocyty a dárcovskými buňkami důležitý. Může totiž významně ovlivnit vývojovou kompetenci rekonstruovaných embryí při jaderného přenosu somatických buněk (SCNT), případně i epigenetický mechanismus. Pokud se tyto výsledky u koňovitých potvrdí, bylo by dobré zvážit použití oocytů klisen stejného plemene.

#### a) Odběr oocytů z živých klisen

Dle Galli et al. (2007) metoda ovum pick-up (OPU) - transvaginální aspirace folikulů pod ultrazvukovou kontrolou, používaná od 90. let minulého století, prokázala u skotu svou opakovatelnost a bezpečnost a má značnou výhodu v tom, že pro odběr oocytů nevyžaduje hormonální stimulaci dárkyň v případě odběru nezralých vajíček (Choi et al. 2015). Tato výhoda je důležitá u koní, protože u klisen jsou stále neuspokojivé výsledky superovulace (Hinrichs 2012). Ovšem kvůli nízkému počtu získaných oocytů na aspiraci se tato metoda jeví jako pracná, časově náročná a zároveň finančně nákladná (Choi et al. 2015).

Odběr oocytů z živých klisen umožňuje výběr donorek, aby se optimalizovala kompatibilita mezi jádrem a ooplazmou. Sběr vajíček z živých klisen je však technicky náročný: vyžaduje naříznutí folikulů, jejich promytí a mechanické zbavení kumulárních buněk oocytů (COC's,

cumulus oocyte complexes). Jedná se tedy o manipulaci, která vyžaduje čas a vyškolený personál. Galli et al. (2007) uvádějí průměrně 6,6 folikulů na jednu aspiraci OPU a 3,2 oocyty odebrané na jednu aspiraci OPU, což představuje výtěžnost 48 %.

Po OPU se antibiotika klisnám, které jsou součástí výzkumu, rutinně nepodávají. Podstupují během roku zákrok v podstatě každých 14 dní (Choi et al. 2015) a je třeba zabránit antibiotické rezistenci. Byl hodnocen vliv opakovaných OPU na zdraví klisen a na morfologii vaječníků a zjistilo se, že výskyt komplikací je poměrně vzácný (1 případ na 300 OPU). Komplikace jako např. ovariální absces, peritonitida až smrt ovšem po OPU existují. Proto se klisnám klientů, které mají jen omezený počet OPU za rok, po zákroku podávají širokospektrá antibiotika. Je důležité, aby si majitelé klisen byli vědomi toho, že vaginální aspirace folikulů představuje pro donorku riziko. Pokusy o „sterilizaci“ vagíny např. zředěným roztokem Betadine nejsou vhodné, protože antimikrobiální látky jsou pro oocyty toxické (Hinrichs 2018).

#### b) Odběr oocytů z jatečných vaječníků

Získávání oocytů z jatečných vaječníků je technicky méně náročné než z živých klisen, omezujícím faktorem je však u koní častá nedostupnost vaječníků z jatek (Galli et al. 2014).

Galli et al. (2007) v rozsáhlé studii provedené v laboratoři popsali, že každý zkoumaný vaječník obsahoval průměrně 5,3 folikulů větších než 5 mm a z každého vaječniku byly průměrně extrahovány 3,8 oocytů (Tabulka 3), což odpovídá 70% výtěžnosti. Mezi výsledky odběru z jatečných vaječníků a ze živých klisen je tedy významný rozdíl.

Bruck et al. (1996) uvedli, že množství oocytů bylo významně vyšší, když byly folikuly o průměru 11-20 mm (61,3 %) ve srovnání s folikuly s průměrem menším než 10 mm (43,7 %).

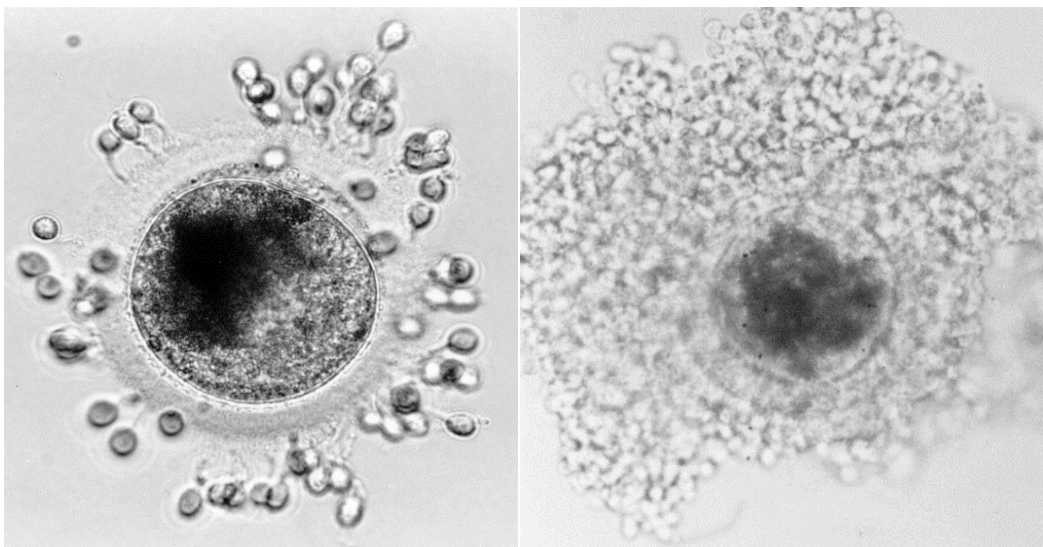
Tabulka 3 Schopnost maturace koňských oocytů (COC's expandované nebo kompaktní) (Galli et al. 2007)

Počet vaječníků	Počet folikulů (na vaječník)	Počet expandovaných COC's (na vaječník)	Počet kompaktních COC's (na vaječník)	Počet COC's (maturovaných) po IVM	Počet COC's (degenerujících) po IVM
				expandované (%)	kompaktní (%)
603	3204	590	1672	354	855
	5,3	1	2,8	(60 %)	(51,1 %)

Hinrichs et al. (2005) studovali vliv časového rozmezí mezi úmrtím zvířete a odběrem oocytů s kumulárními buňkami (COC's) a konfigurací chromatinu. Tato konfigurace je rozhodující zejména pro přístup enzymů katalyzujících replikaci v molekule DNA. Pro tento experiment použili oocyty z vaječníků jednu hodinu po porážce a oocyty z vaječníků 5 až 9 hodin post

mortem. Pozorování chromatinu bylo prováděno pomocí fluorescenčního mikroskopu před a po kultivaci oocytů. Výsledky ukázaly, že po skladování vaječnicků se podíl kompaktních oocytů s konfigurací příznivou pro replikaci snížil z 68 % na 16 %. Současně podíl kompaktních oocytů, jejichž konfigurace byla nepříznivá nebo jejichž chromatin degeneroval po skladování, vzrostl z 12 % na 58 %. Došli proto k závěru, že konfigurace chromatinu se mohla během skladování vaječnicků vyvíjet nepříznivě a že kompaktní oocyty se zdály být citlivější na prodloužené skladování a vykazovaly výraznější degeneraci chromatinu než expandované oocyty.

V případě použití technologií asistované reprodukce u koní by oocyty měly být extrahovány do 10 hodin po odběru vaječnicků (Gambini et al. 2014). Reis & Nakhla (2012) popisují, že časový interval mezi odběrem oocytů a začátkem maturace *in vitro* delší než 6 hodin signifikantním způsobem snižuje kvalitu oocytů. Tento faktor je v době, kdy počet koňských jatek klesá a jejich vzdálenost od laboratoří stoupá, o to důležitější. Uvádí se, že ve Spojených státech existovala jen tři jatka pro porážku koní (Choi et al. 2006) a v roce 2007 dokonce vstoupil v platnost zákaz porážek koní (Choi et al. 2015). Proto jsou američtí odborníci nuceni používat jatečné vaječnický klisen poražených v Kanadě nebo získávat oocyty aspirací (OPU).



Obr. 5 Oocyty s kumulárním buňkami (COC's) - expandované (vlevo) a kompaktní (vpravo) (Deleuze et al. 2010)

Zajímavým aspektem u koňských oocytů je častý odběr oocytů s expandovaným kumulem (Obr. 5); tvoří přibližně jednu třetinu ze všech extrahovaných oocytů s kumulárními buňkami (COC's). U jiných druhů, jako jsou přežvýkavci a prasata, jsou oocyty s expandovaným kumulem ihned vyřazeny kvůli jejich extrémně nízké vývojové kompetenci (schopnost vyvinout se do stádia blastocysty). U koní však oocyty s expandovaným kumulem zrají normálně a mají normální vývojovou kompetenci. Jak je uvedeno v Tabulce 3, počet dozrání do metafáze II (MII) se

pohybuje od 51,1 % do 60 % u kompaktních resp. expandovaných COC's. Tento rozdíl je statisticky významný a je v souladu i s jinými studiemi, ve kterých schopnost zrání oocytů s expandovaným kumulem byla vyšší než u oocytů s kompaktním kumulem (Galli et al. 2007).

#### 3.1.2.4 Maturace oocytů

První úspěšnou *in vitro* maturaci koňských oocytů popsali Fulka & Okolski (1981).

V případě tří klonovaných mul byly použity *in vivo* maturované oocyty (Woods et al. 2003; Galli et al. 2014). Zralé oocyty *in vivo* představují zlatý standard pro asistované reprodukční technologie (ART's). Ovšem výzkum vyžaduje velké množství oocytů, které nemohou být pokryty dozrávajícemi oocyty *in vivo*. V této souvislosti je kvalita a vývojová kompetence dozrávajících oocytů *in vitro* (IVM, *in vitro* maturation) klíčovým prvkem metod asistované reprodukce (Deleuze et al. 2010).

Fyziologicky maturace oocytů zahrnuje dva procesy: jadernou maturaci a cytoplazmatickou maturaci. Platí, že oocyt musí dokončit maturaci ve chvíli, kdy je vyloučeno 1. pólové tělísko a oocyt je zastaven v druhé meiotické metafázi (MII). Ačkoli jaderně maturovaný oocyt může být oplodněn, tak může postrádat některé plazmatické faktory nutné pro dokončení svého vývoje (Deleuze et al. 2010). Cytoplazmatická maturace je komplexní proces zahrnující ultrastrukturní změny cytoskeletu a redistribuci organel, nahromadění rRNA a mRNA a aktivaci proteinů (Ferreira et al. 2009).

Oocyty lze rozdělit do šesti stádií dle morfologických změn spojených s dozráváním (Grondahl et al. 1995):

1. fáze **centrálně umístěného jádra** v ooplazmě (the central spherical nucleus stage)
2. fáze **kulovitěho jádra**, přesouvá se **excentricky v ooplazmě** (presence of a nucleus located at the periphery)
3. fáze **zploštělého jádra**, přesouvá se **excentricky v ooplazmě** (peripheral oocyt nucleus in stage II)
4. fáze **rozpuštění jaderné membrány** a rozpadu tzv. zárodečného váčku (GVBD, germinal vesicle break down)
5. **M1 oocyt** (metafáze I) - chromatin je organizovaný v chromozomech, kumulus oocytu je expandující
6. **M2 oocyt** (metafáze II) - zralý, ovulační oocyt, který má vydělené 1. pólové tělísko v perivitellinním prostoru a expandovaný rosolovitý kumulus.

Po výběru oocytů na základě morfologie buněk kumulu jsou oocyty přeneseny do maturačního média a ponechány po dobu 24 hodin, i když optimální doba maturace koňských oocytů používaných pro přenos jader nebyla stanovena (Choi et al. 2015). Jak již bylo uvedeno, oocyty s expandovaným kumulem mají větší schopnost maturace než oocyty s kompaktním kumulem (Galli et al. 2007). Podmínky zrání *in vitro* významně ovlivňují vývoj oplodněných oocytů do stadia blastocysty. Oocyty zrají v *in vitro* podmínkách 24 až 28 hodin při teplotě 38,5 °C, složení plyné fáze s 5 % CO<sub>2</sub> a nasycením vodní parou. Nejběžnějším médiem používaným pro maturaci koňských oocytů je TCM-199 (Miragaya et al. 2010; Olivera et al. 2018; Teixeira et al. 2019), pravděpodobně kvůli jeho rozšířenému použití u skotu (Galli et al. 2008; Wakchaure & Ganguly 2016).

Gambini et al. (2012; 2014) ve své práci popisují zrání oocytů při teplotě 39 °C, v atmosféře zvlhčeného vzduchu s 6,5 % CO<sub>2</sub> po dobu 24 až 26 hodin. Pro kultivaci použili kultivační médium TCM-199 obohacené o 10% fetální bovinní sérum (FBS), směs insulin-transferin-selen (ITS), Napyruvát, cysteamin, folikulostimulační hormon (FSH), 2% ATB a minerální olej. Olivera et al. (2016) uvádějí maturaci v atmosféře zvlhčeného vzduchu s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 39 °C po dobu 22 až 24 hodin.

### 3.1.2.5 Americký a italský postup klonování koní

Reis (2013) ve své práci popisuje, pro pochopení míry komplexnosti postupu, dvě metody klonování koní. Kritéria výběru byla: opakovatelnost výsledků a dostupnost podrobných informací v odborné literatuře. Dvě metody odpovídaly zmíněným kritériím (Lagutina et al. 2005, Choi et al. 2002a) a byly nazvané podle svých tvůrců „americký postup“ a „italský postup“. Srovnání obou metod umožnilo identifikovat důležité rozdíly od fáze denudace (označeno \*, Obr. 6). Z teoretického hlediska mají tyto metody výhody i nevýhody, které mohou ovlivnit celkový výsledek. V praxi jsou investice do vybavení a know-how specifické pro každou metodu a jsou také rozhodující pro její úspěšnost. Hlavní rozdíly mezi oběma postupy:

#### \* Etapa denudace

Slouží k odstranění kumulárních buněk z oocytů. Oocyty se vystaví roztoku hyaluronidázy (Olivera et al. 2016; Olivera et al. 2018), která rozruší spojení mezi buňkami membrána granulosa obklopující vajíčko (Tremoleda et al. 2003). Při italském postupu se přidává ještě médium s trypsinem (Galli et al. 2008). Oocyty se mechanicky čistí od zbytku kumulárních buněk denudační pipetou (Wakchaure & Ganguly 2016).

AMERICKÝ	ETAPA	ITALSKÝ
vaječníky z jatek	zdroj oocytů	vaječníky z jatek
"seškrabání vaječnicků"	způsob získání oocytů	"seškrabání vaječnicků"
5 % CO <sub>2</sub> ; 38,2°C; 24-30 h	zrání <i>in vitro</i>	5 % CO <sub>2</sub> ; 38,2 °C; 22-24h
mechanicky + 1 enzym	denudace*	mechanicky + 2 enzymy
piezoelektrický vrt	enukleace*	pipeta se zkosenou špičkou rozpuštění ZP + pipeta s tupým koncem
piezoelektrický vrt: ooplasma	injekce*	pipeta se zkosenou špičkou: periviteliní prostor fytohemaglutinin (PHA)
X	fúze*	elektroporace
chemická (1) + extrakt spermatu	aktivace*	chemická (2)
médium pro kultivaci embryí; O <sub>2</sub> ; N <sub>2</sub> ; CO <sub>2</sub> ; 38,2°C	kultivace embryí*	médium pro kultivaci embryí; O <sub>2</sub> ; N <sub>2</sub> ; CO <sub>2</sub> ; 38,5°C
1 embryo/klisna	embryotransfer*	2-3 embrya/klisna

Obr. 6 Americký a italský postup klonování koní, rozdíly v různých etapách klonování; metody používané americkou školou (TAMU, Texas A&M University) a italskou školou (Avantea, pův. LTR-CIZ) (upraveno z Reis 2012; Reis 2013)

#### \* Etapa enukleace

Pro úspěšné klonování je nutné, aby oocyt neobsahoval chromozomy, které se nacházejí v jeho jádře. Speciálními mikromanipulačními technikami je tedy enukleací odstraněno jádro oocyty. Takto enukleovaný oocyt neobsahuje genetickou informaci a tvoří jakousi schránku, tzv. cytoplast (Šichtař & Hošková 2012). Při provádění této operace je třeba penetrovat enukleační pipetou *zona pellucida* (ZP) v místě, kde cytoplasma obsahuje chromatin. Problémem při této manipulaci je však značná deformace oocyty, která může vést k nárůstu vnitřního tlaku ooplasmu a jejímu výronu po vytažení mikropipety, a tím nenávratně poškodit oocyt (Yanagida et al. 1999).

Oba postupy (americký i italský) díky svým technikám enukleace, sníží riziko deformace během penetrace do periviteliního prostoru na minimum. Americký postup provádí perforaci *zona pellucida* a následně proniknutí do periviteliního prostoru pomocí piezo-mikromanipulátoru (Choi et al. 2015). Sníží se tím riziko deformace oocyty vlivem tlaku (Choi et al. 2002a). Účinnost tohoto postupu byla prokázána i u jiných druhů zvířat (Kimura & Yanagimachi 1995). Představuje však větší instrumentální náročnost a jeho další nevýhodou, pro fungování celého procesu, je používání rtuti.

Pro snadnější přístup k oocyty upřednostňuje italský postup techniku enzymatického odstranění *zona pellucida*. ZP je odstraněna oplachem v roztoku enzymu pronázy po dobu 3 až 8 minut při teplotě 35 °C (Olivera et al. 2016). Tento postup nepředstavuje dodatečné náklady na vybavení, ale vyžaduje zručnost při mikromanipulaci, aby nedošlo zároveň k narušení membrány oocyty nebo k aglutinaci oocytů.

#### \* Etapa vložení jádra ze somatické buňky (mikroinjekce) a fúze

Niemann & Lucas-Hahn (2012) uvádějí, že úkolem této fáze je zajistit, aby dárcovská somatická buňka předala své jádro do recipientního vajíčka zbaveného vlastní jaderné informace. Prostřednictvím krátkých vysokonapěťových elektrických pulzů se navodí fúze těchto dvou buněk (oocyty a jádra somatické buňky) (Wakchaure & Ganguly 2016). Li et al. (2002) ovšem pozorovali menší schopnost koňských oocytů fúzovat s dárcovskými buňkami, a to i při aplikaci vysokonapěťových impulsů (2,2-2,5 kV/cm). Fúze probíhá při pokojové teplotě (Oback et al. 2003).

Americký postup upřednostňuje systém piezo drill, který umožňuje injikovat jádro dárcovské somatické buňky přímo do oocyty (Choi et al. 2015). Tato technika však vyžaduje velkou instrumentální náročnost při mikromanipulaci.

Italský postup využívá oocytů bez *zona pellucida* (ZFO, zona free oocytů). Metoda ZFO byla vyvinuta v roce 1998 T.T. Peou, a Cesare Galli ji následně zdokonalil. Množství



zfúzovaných oocytů a jader somatických buněk se u koňských ZFO zvýšilo, i když byla použita nižší elektrická stimulace (kV/cm) než se používá u oocytů se ZP (Reis 2013).

#### \* Etapa aktivace

Jde o klíčový krok, který má za úkol znovu zahájit meiózu a aktivovat rekonstruované embryo. Pokračování meiózy a její dokončení je možné jen po tzv. aktivačním stimulu. Ten za normálních okolností zajistí oocytu průnik spermií při oplození, *in vitro* může být vyvolán partenogenetickou aktivací, například ionty vápníku (Tichovská 2011). Pokud není aktivační stimul přítomen, oocyt se zastaví v druhé metafázi meiotického dělení (MII) a po určité době, specifické pro každý druh, odumře (Reis 2013).

Galli et al. (2003b) uvádějí, že pro aktivaci oocytu je zásadní uvolnění SOAF (sperm oocyte activating factor) do ooplazmy. Jedná se o soubor ve spermiích obsažených látek, které aktivaci oocytu umožňují a jsou zodpovědné za masivní influx vápníku a jeho opakovanou oscilaci. Bedford et al. (2004) prokázali, že po oplodnění koňského oocytu spermií následuje po dobu 4 hodin několik oscilací intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , přičemž první pík má větší amplitudu než ty následující.

Americký postup se snaží imitovat metodu popsanou Bedfordem et al. (2004). Je to kombinace ionomycinu (vyvolá jednu velkou vlnu  $\text{Ca}^{2+}$ ), extraktu spermatu (spouští několik oscilací  $\text{Ca}^{2+}$ ) a 4hodinové expozice inhibitoru proteinkinázy 6-dimethylaminopurinu (Galli et al. 2007; Hinrichs et al. 2007; Gambini & Maserati 2018).

Italský postup spočívá v působení ionomycinu (vyvolá první zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$ ), poté 4hodinové expozici cykloheximidu (inhibuje syntézu proteinů *in vitro*) k inaktivaci cytostatického faktoru (Choi et al. 2006; Miragaya et al. 2010) a ke snížení úrovně aktivity MPF (mitosis promotion factor) v oocytu, což vyvolá obnovení meiózy.

Několik studií ukázalo, že společné působení cykloheximidu, ethanolu, stroncia nebo elektrických pulzů zvyšuje procento oocytů obsahujících prvojadra a buněčně se dělících (Reis 2013).

#### \* Etapa kultivace embryí

Cílem *in vitro* kultivace embryí je napodobit fyziologické podmínky *in vivo* a poskytnout všechny potřebné živiny pro jejich vývoj (Galli et al 2007). Jedná se o jednu z nejcitlivějších fází produkce klonů koní. Přestože různé postupy vedou k uspokojivému počtu rýhujících se vajíček v období těsně po aktivaci, tak fáze kultivace embryí do stádia blastocysty (7 až 10 dnů) zůstává pro vědce stále velkou výzvou (Reis 2013).

Americký postup překvapil tím, že pro kultivaci koňských embryí bylo použito médium DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: nutrient mixture Ham's F12)

(Choi et al. 2006). Jedná se o médium, které obsahuje HEPES a vysokou koncentraci glukózy, což by obvykle bylo pro embryonální vývoj u jiných druhů savců považováno za nevhodné. Bylo prokázáno, že vysoká koncentrace glukózy v kultivačním médiu zvýšila počet vyvinutých koňských embryí. Reis (2013) uvádí, že dosud neexistuje vědecké vysvětlení této zvláštnosti u koňovitých. Galli et al. (2007) ve své studii také potvrdili účinnost tohoto kultivačního média oproti běžně používanému TCM199.

Italský postup nejprve zavedl protokol, dle kterého se embrya kultivovala *in vitro* po dobu 48 hodin v médiu SOF (synthetic oviductal fluid) bohatém na pyruvát. Poté bylo toto médium postupně nahrazeno DMEM-F12 bohatém na glukózu. V současné době používá italský postup pro kultivaci embryí jen médium DMEM-F12 (Gambini & Maserati 2018).

Aktivace embryonálního genomu (EGA, embryonic genome activation) není u koní dosud dobře prozkoumána a znalosti o metabolismu embrya během prvních 3 dnů vývoje také nejsou dostatečné (Reis 2013).

#### \* Etapa embryotransferu (ET)

Jedná se o vyjmutí zárodku z klisny dárkyně a jeho přenos do dělohy klisny příjemkyně. Woods et al. (2003) popisují chirurgickou metodu ET (injektáž embrya do děložního rohu), která byla používána v časných experimentech s klonováním koní. Tato invazivní metoda byla brzy nahrazena nechirurgickou (transcervikální), kdy se pomocí speciálního katetru zavádí embryo přes krček do dělohy (Lagutina et al. 2005). Tato technika je dnes nejvíce rozšířená.

Italský postup je založený na přenosu více embryí (2 až 3 na klisnu), aby se zvýšila šance získání životaschopného embrya. Tato strategie však představuje určité riziko. Koňská děloha je svojí stavbou přizpůsobená k tomu, aby se v ní vyvíjel a rostl jen jeden plod. Aby se zbránilo vývoji dvojčat u koní, je nutné zvolit tzv. manuální redukci. Tato metoda, pokud není provedena zkušeným veterinárním lékařem, není úplně bez rizika (Reis 2013).

Americký postup volí přenos jednoho embrya na klisnu (Reis 2013).

#### 3.1.2.6 Agregace (spojování) embryí neboli tvorba chimér

V Jižní Americe je v poslední době stále častěji využívanou metodou klonování koní tzv. agregace embryí (Obr. 7) neboli tvorba chimér (Gambini & Maserati 2018; Olivera et al. 2018).

Kromě dělení embryí a přenosu jader somatických buněk (SCNT) se jedná o další postup při klonování zvířat. Jeho podstatou je spojování (agregace) několika časných embryí v jediný zárodek. Při tomto postupu jsou použity dárcovské buňky od stejného zvířete, jaderná informace

všech blastomer je stejná, ale mohou existovat rozdíly v epigenetickém přeprogramování DNA a v mtDNA přítomné v každém embryu. Agregace embryí představuje strategii zdvojnásobení nebo ztrojnásobení počátečního počtu buněk, které tvoří embryo, což vede ke zlepšení jeho vývojové kompetence a v raných stádiích může kompenzovat epigenetické defekty jednotlivých buněk s různým stavem přeprogramování. Klony koní pocházející z agregovaných embryí by mohly mít různou mtDNA s ohledem na tkáň, ze které byl vzorek odebrán (Gambini & Salamone 2019).



*Obr. 7 Hříbata, která se narodila v Argentině pomocí agregace embryí (Gambini & Salamone 2019)*

*A)2010, první zdravé klonované hříbě (Criollo) pocházející z blastocysty získané agregací dvou embryí,*

*B)2012, klonované hříbě (Criollo) pocházející z blastocysty získané agregací tří embryí,*

*C)2013, klon parkurového koně pocházející z blastocysty získané agregací čtyř embryí,*

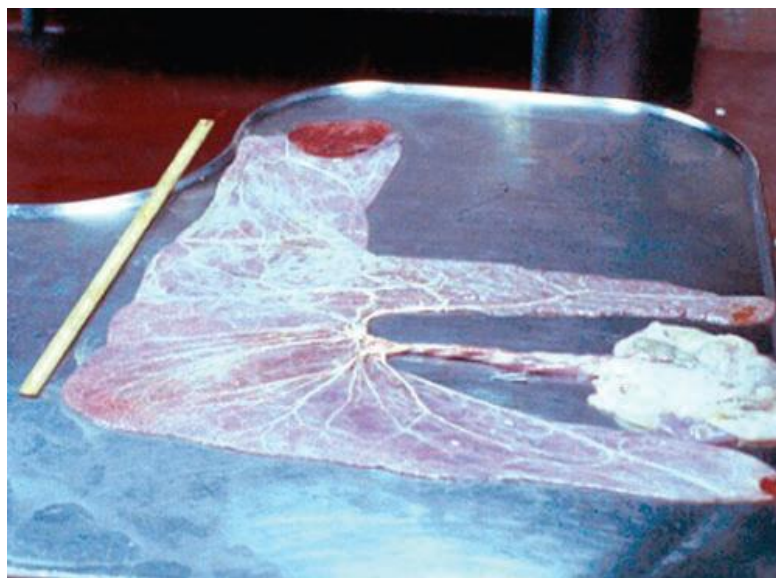
*D)2013, klonované hříbě Polo Pony pocházející z blastocysty získané agregací čtyř embryí*

Tělo chiméry obsahuje buňky různého původu, odvozené z embryí, jejichž agregací byl zárodek vytvořen. Jaký podíl případně v těle chiméry na buňky vzniklé z jednotlivých embryí, určuje do značné míry náhoda, stejně jako to, kam se v těle chiméry buňky z jednotlivých embryí dostanou (Petr 2003). Tato skutečnost by se měla vzít v úvahu při analýze mtDNA pro registraci nebo identifikaci klonovaných zvířat (Choi et al. 2014; Gambini & Salamone 2019).

### 3.1.3 Zdravotní stav koňských klonů

U koňovitých dochází zřídka k abnormalitám během březosti a k relativně nízké postnatální úmrtnosti ve srovnání např. se skotem nebo s ovceci (Vanderwall et al. 2006; Galli et al. 2008), u jejichž klonů se velmi často vyskytuje tzv. syndrom velkých potomků (LOS, large offspring syndrome), který je spojen s nadměrným růstem (Young et al. 1998; Renard & Chavatte-Palmer 2004; Chang et al. 2005; Niemann & Lucas-Hahn 2012; Chen et al. 2013; Keefer 2015). Stejně projevy se vyskytují u Beckwithova-Wiedemannova syndromu (BWS), onemocnění, které u člověka narušuje růst a způsobuje deformace různých tkání a orgánů, a je více vázáno na asistované reprodukční technologie (ART's) (Weksberg et al. 2003).

Prvním naklonovaným koňovitým byla mula. Jednalo se o tři klony dostihového šampióna (Woods et al. 2003). Rok po jejich narození Vanderwall et al. (2004b) zkoumali zdravotní stav všech tří klonů. Popsali, že recipientky měly porod spontánní, bez jakékoli asistence; v prvním případě klisna porodila po 340 dnech březosti a ostatní dvě klisny porodily po 346 dnech březosti (Obr. 8). Hříbata byla při narození zdravá a aktivní. Placenta byla vyloučena u každé z klisen do 90 minut. Bezprostředně po narození byla hříbatům poskytnuta následující péče: dezinfekce pupeční šňůry každých šest hodin po dobu tří dnů chlorhexidinem, jedno podání klyzmatu a profylaxe včetně vitamínu E a selenu, dále gentamicin (5 mg/kg každých 24 hodin po dobu tří dnů) a prokain penicilin (24000 IU/kg každých 12 hodin po dobu tří dnů). Všechna hříbata byla na nohách do třiceti minut od narození. Novorozená hříbata dostala během prvních šesti hodin kolostrum od předem testovaných dárcovských klisen, aby se zabránilo neonatální isoerytolýze. Kromě toho jim bylo aplikováno, do čtyř hodin po narození, 150 až 250 ml komerčního roztoku imunoglobulinu třídy G (IgG).



Obr. 8 Placenta klisny, které se narodilo živé hříbě (klon muly) po 346 dnech březosti. Na placentě nebyly zaznamenány žádné abnormality (Vanderwall et al. 2006).

Hinrichs (2006b) ve své práci uvádí, že z 16 klonovaných hříbat po porodu uhynula pouze 3 z následujících příčin: septikémie (48 h), pneumonie (48 h) a komplikace spojené s anestezií. S narůstajícím počtem klonovaných jedinců se objevují obavy, zda narozená mláďata nenesou známky předčasného stárnutí. Tato myšlenka souvisí s ovci Dolly, která byla prvním klonem dospělého savce a u které analýzy jejích buněk prokázaly zkrácení telomer. Telomery jsou koncové části chromozomů a jsou postupně spotřebovávány při procesu dělení buněk. Délka telomer je marker replikativního stáří buněk a po dosažení určité minimální délky indukuje apoptózu a zánik buňky. U klonu délka telomer úzce závisí na původu dárcovského jádra buněk použitých pro klonování (Heyman et al. 2005). Klony telat vzniklých z buněk mléčné žlázy (jako v případě Dolly) nebo epiteliálních buněk měly telomery kratší, zatímco v případě použití fibroblastů měla telata normální délku telomer. Od té doby byla potvrzena normální délka telomer i u jiných druhů zvířat, při jejichž klonování byly použity fibroblasty (Hinrichs 2006a).

Johnson et al. (2010) vyhodnotili veterinární záznamy (2004 až 2008) všech březostí, které vedly k narození hříbat pocházejících z přenosu jader somatických buněk. Získané informace zahrnovaly: délku březosti, porodní hmotnost, postnatální komplikace, abnormality plodových obalů, výskyt zvětšené pupeční šňůry, deformity končetin a jiné abnormality, zjištěné v novorozeneckém období. Šest hříbat bylo ve všech hodnocených parametrech klinicky v pořádku, u zbývajících osmi hříbat byl zjištěn výskyt zvětšené pupeční šňůry, angulární deformity předních končetin a tzv. neonatálního maladaptčního syndromu (Olivera et al. 2018).

Novější studie popisuje 29 klonů koní, z nichž pouze pět uhynulo po narození (Olivera et al. 2016). Všechna tato hříbata se však narodila ve veterinárním zařízení, kde jim byla poskytnuta patřičná neonatální intenzivní péče. Proto se obecně u všech novorozených klonů doporučuje nezbytná podpora dýchacího aparátu založená na permanentním intranazálním podávání kyslíku, zajištění příjmu kolostra (Olivera et al. 2018) a profylaktické podávání antibiotik (Johnson & Hinrichs 2015). U klonovaného skotu byly hlášeny dystokie (dystokia fetalis) způsobené syndromem velkých potomků (LOS, large offspring syndrome) (Young et al. 1998), ale nebyly zaznamenány u koní, kde březosti klonovaných koní obvykle končí normálním porodem (Campbell & Sandoe 2015; Gambini & Maserati 2018).

Se zlepšováním technik přenosu jader somatických buněk (SCNT) bude těchto problémů pravděpodobně ubývat. Zásadní znalost postupů, zejména kultivačních podmínek *in vitro*, povede ke zlepšení účinnosti klonování koní (Wakchaure & Ganguly 2016).

### 3.1.4 Využití a komercializace klonů koní

Klonování koní je dnes komerčně dostupné v Severní Americe (USA), Jižní Americe (Argentina, Brazílie a Kolumbie), Evropě (Itálie) a Austrálii. Gambini & Maserati (2018) ve své práci uvádějí, že se počet klonovaných koní na světě v současnosti odhaduje na minimálně 383 exemplářů. Produkce klonovaných koní podle zemí je následující: USA (220), Argentina (126), Brazílie (15), Itálie (20), Kolumbie (1) a Jižní Korea (1). Skutečný celkový počet koňských klonů bude spíše vyšší vzhledem k tomu, že narození některých jedinců nebylo soukromými společnostmi oznámeno. Hlavní plemena, která byla do roku 2016 klonována, jsou shrnuta v Tabulce 4.

Tabulka 4 Klonování hlavních plemen koní do roku 2016 (upraveno z Gambini & Maserati 2018)

Plemeno	Odkaz
Criollo	Gambini et al. 2012
Pólo Pony	Gambini et al. 2014; Oliveira 2016; Kheiron; Crestview Genetics
Hafling	Galli et al. 2003; Lagutina et al. 2005
teplokrevník	Lee et al. 2015
Arabský kůň	Lagutina et al. 2005; Crestview Genetics
Anglický plnokrevník	Kheiron
parkurový kůň	Gambini et al. 2014; ViaGen; Crestview Genetics; Cryozootech
drezurní kůň	Cryozootech
Paso fino colombiano	Genes Col
Paso fino	ViaGen
cuttingový kůň	ViaGen
Mangalarga	Brasil In Vitro Clonagem (IVC)
Campolina	Brasil In Vitro Clonagem (IVC)
bronco	ViaGen
barelový kůň	ViaGen
Quarter horse	ViaGen

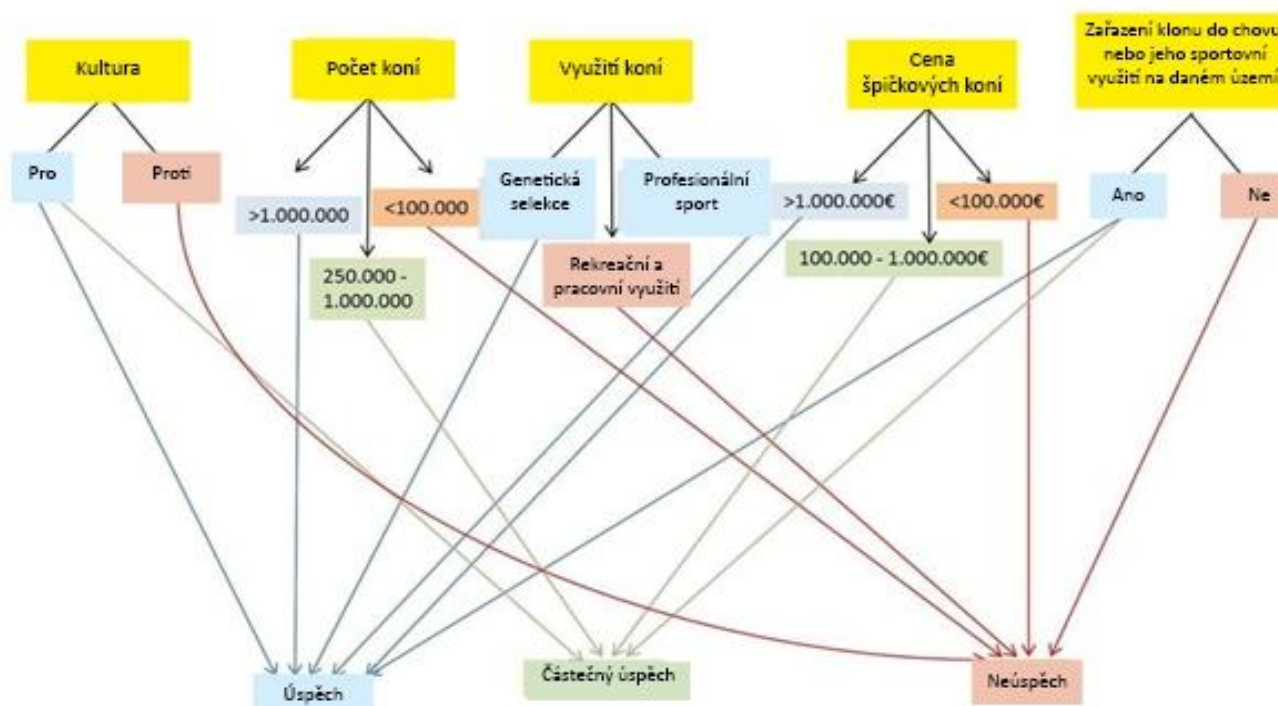
Pokud jde o brazilský trh, biotechnologie v chovu koní je od roku 2005 velmi rozvíjející se obor, který si získává velký zájem veřejnosti. In Vitro Clonagem (IVC) je společnost, která se nachází ve městě Mogi Mirim v Brazílii. Tato společnost začala etapu klonování koní se slavným hřebcem plemene Mangalarga jménem Turbante. Tento hřebec má více než 1600 potomků díky metodám asistované reprodukce (ART's).

Mnozí považují Argentinu za nejlepšího a největšího producenta polo ponies (Polo Argentino) na světě. Nabídka moderních biotechnologií (produkce embryí *in vivo*, *in vitro* nebo embryotransfer) u koní v současné době nestačí a je tedy sektorem s největším potenciálem pro ekonomický růst. Současně se klonování koní jeví jako užitečný biotechnologický postup v reprodukci vysoce cenných starých nebo kastrovaných polo koní. A také jako postup, který zároveň zajišťuje zvýšení počtu chovných jedinců (Maserati & Mutto 2016).

Ve Francii v roce 2001 Eric Palmer a patnáct soukromých akcionářů založili společnost Cryozootech zaměřenou na komerční klonování koní. Jejich cílem bylo uchování významných genetických linií výjimečných sportovních koní (hlavně skokových) v genové bance nebo jejich naklonování. Kromě komerčních aktivit se společnost Cryozootech také zabývala investicemi do výzkumu klonování koňovitých. Spolupracovala s různými výzkumnými laboratořemi v Evropě a Spojených státech a také se podílela na projektu s názvem „Mezinárodní výzkumná síť zabývající se mitochondriemi koní“ ve spolupráci s Evropským centrem pro koně v Mont-le-Soie, s Center for Oxygen, Research and Development (C.O.R.D.) a s Klinikou chorob koní Université de Liège v Belgii. Do roku 2013 se podařilo vyprodukovat až 30 klonů koní, kteří se těší dobrému zdraví, a potomci těchto klonů se s úspěchem účastní mezinárodních jezdeckých soutěží. Svoji činnost firma ukončila v roce 2016 (personal communication).

Reis & Palmer (2010) uvádějí, že klisny nebo valaši představovali každý po 37,5 % a hřebci 25 % z celkového počtu 56 identifikovaných klonovaných koní. To dokazuje, že tato technologie původně vnímaná jako nástroj pro zachování genů špičkových valachů, může být také dobrým prostředkem pro využití genů kvalitních klisen. Klony klisny vysoké genetické hodnoty mohou být použity v programech přenosu embryí a přispívají tak i ke zvýšení počtu jejich potomků.

Analýza (Obr. 9) je založena na současné situaci, kdy cena za klonování zůstává stále ještě vysoká (např. firma Viagen si účtuje 85 000 USD za koně <https://viagenpets.com/equine/>). Některý z uvedených parametrů by mohl změnit rozvoj moderních metod, které zlepšují biotechnologické postupy a následně sníží výrobní náklady. Pokud by se cena za klonování snížila, lze očekávat, že tato technologie výrazněji zasáhne do chovu špičkových koní. Jde o to definovat, do jaké míry by z genetického hlediska bylo častější využití těchto klonů přínosné pro obchod s koňmi (Reis 2013).



Obr. 9 Parametry, které ovlivňují rozvoj klonování koní v různých zemích (upraveno z Reis 2013)  
 (Modrá barva označuje podmínky s dobrým potenciálem pro úspěšný rozvoj klonování v zemi,  
 zelená barva označuje spíše dobrou prognózu a hnědá barva označuje neúspěch, protože existuje  
 několik nepříznivých parametrů pro rozvoj klonování v konkrétní zemi)

Jaderný přenos somatických buněk (SCNT) má potenciál ovlivnit šlechtění zvířat stejně zásadním způsobem jako umělá inseminace. Equinní reprodukční metody, jako je klonování a intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI), se staly běžnou laboratorní praxí v mnoha částech světa (Wakchaure & Ganguly 2016).

Galli et al. (2014) se domnívá, že rozsah využití klonování koňovitých bude mimo jiné záviset i na předpisech, které budou diktovány registry plemen, ačkoli v posledních letech se postoj ke klonování stal pozitivnějším.

### 3.1.5. Zdravotní rizika spojená s klonováním koní

Nárůst poptávky po produkci klonů koní nás nutí zabývat se nejen etickým aspektem, ale také případnými zdravotními riziky spojenými s touto biotechnologií. Jedná se zejména o virus infekční anémie koní (EIA, Equine Infectious Anemia). Gregg & Polejaeva (2009) byli první, kdo se zabývali rizikem přenosu tohoto viru během procesu klonování. Prevence a regulace přenosu EIA koní závisí pouze na identifikaci, izolaci a eliminaci infikovaných zvířat, protože chybí účinná vakcína. Gregg & Polejaeva (2009) poukázali na to, že produkce embryí pomocí technologie přenosu jader somatických buněk (SCNT) využívá oocyty odebrané převážně od netestovaných



zvírat, což vytváří potenciální riziko přenosu EIA prostřednictvím infikovaných embryí. Původcem EIA je lentivirus, který je příbuzný lidskému HIV a stejně jako on vyvolává snížení imunity. U lidí nebyl virus lidské imunodeficiency (HIV) izolován z oocytů HIV pozitivních žen, u skotu a koček došlo ke stejnému zjištění. U malých přežvýkavců (ovce, kozy) byl virus izolován z buněk kumulu, ale nikdy z oocytů. Při klonování koní jsou oocyty ošetřeny roztokem hyaluronidázy a případně trypsinem; kumulární buňky jsou mechanicky odstraněny. Tento postup se podle autorů jeví jako přiměřený k eliminaci virových částic, které mohou být přítomny na *zona pellucida* nebo v okolí oocytu. Dospěli k závěru, že riziko přenosu EIA prostřednictvím klonování ze somatických buněk je nízké, ale je nutné mít na paměti hostitelskou specifickou lentivirů a nedostatek studií týkajících se koní.

Společnosti, které se ve Spojených státech zabývají klonováním koní, importují embrya klonů z Kanady. Důvodem je nedostatek vaječníků z poražených klisen na území Spojených států. Embrya klonů, stejně jako jakákoli jiná zemědělská komodita, představují vysoké riziko zavlečení chorob do dovážející země. To se týká také rizika přenosu EIA mezi Kanadou a Spojenými státy prostřednictvím klonovaných embryí dovezených z Kanady. S ohledem na současné postupy klonování koní a na základě aktuálních znalostí, je pravděpodobnost zavlečení EIA do Spojených států prostřednictvím takto dovezených embryí extrémně nízká (Asseged et al. 2012).

### 3.1.6 Chovatelské svazy a registrace klonů

Pohled většiny plemenných knih na klonování se vyvíjel v průběhu let. Plemenné knihy, které umožňují registraci klonovaných koní, zahrnují: Anglo European Studbook (AES, Anglo-evropská plemenná kniha), KWPN (holandský teplokrevník), Zangersheide a The Argentine Association of Polo Pony Breeders (AACCP, Asociace chovatelů pólo pony). Vedoucí chovu KWPN uvádí, že sice klony do plemenné knihy zapisují, ale klonování jako takové nepodporují, protože zastávají názor, že s novou generací se při klasickém šlechtitelství genetický pokrok zvyšuje. V tomto smyslu je klonování krokem zpět. The World Breeding Federation for Sport Horses (WBFSH, Světová federace chovatelů sportovních koní) se snaží iniciovat vytvoření pevného legislativního rámce v EU v oblasti klonování koní (personal communication). Organizace American Quarter Horse Association (AQHA), která vede plemennou knihu QH, nejrozšířenějšího plemene v USA, registraci klonů neumožňuje, stejně tak plemenná kniha arabského i anglického plnokrevníka (Reis & Palmer 2012; Gambini & Maserati 2018; Campbell 2018).

Z komerčního hlediska je nutné harmonizovat předpisy upravující registraci klonů koní mezi jednotlivými zeměmi i různými chovatelskými sdruženími. Vznikly nové nástroje pro genetický

pokrok plemen koní, a proto je třeba klást větší důraz na úpravu pravidel pro registraci plemene, na zdraví i bezpečnost zvířete s ohledem na solidní biologické základy. To vše pro podporu a růst mezinárodního obchodu s koňmi (Gambini & Maserati 2018).

### 3.1.7 Etické aspekty klonování

Při procesu klonování se zapojení většiny veterinárních lékařů pravděpodobně omezí jen na odběr kožní biopsie od dárcovského zvířete (poskytnutí jaderného materiálu nezbytného pro proces SCNT) a případné zajištění novorozenecké zdravotní péče. Všechny asistované reprodukční technologie (ART's) jsou eticky sporné v tom, že na rozdíl od většiny veterinárních postupů nejsou prováděny s cílem zlepšení zdraví nebo dobrých životních podmínek zvířete. V tomto ohledu se klonování neliší od běžně používaných ART's u koní (umělá inseminace, odběr oocytů a embryotransfer). V návaznosti na vybranou techniku ART's, se zdraví a welfare týká až tří zvířat najednou (dárce somatické buňky, donorka vajíčka a recipientka) (Campbell 2016).

Výše zmíněné postupy nejsou pro zvíře zdravotním přínosem, jsou stresující a bolestivé, ale při jejich provádění lze poskytnout analgezii a sedaci (Campbell & Sandoe 2015).

Další etický argument, který by se mohl vztahovat na klonování koní, se týká etiky ve sportu. Ačkoliv se klony koní mohly v některých disciplínách (např. koňské pólo) účastnit soutěží, tak Mezinárodní jezdecká federace (FEI) zpočátku zakázala klonům koní účast v jezdeckých soutěžích, protože identifikace klonů jen díky testům DNA by byla problematická. Vzhledem k tomu, že klon nevypadá stejně jako dárcovské zvíře, a že mikročipování koní je samozřejmostí (v některých zemích se jedná o zákonnou povinnost), rozlišení mezi klonem a dárcovským zvířetem nebo mezi dvěma klony by nemělo činit problémy (Cambell 2016).

Zajímavé nařízení má ovšem Argentina. Sociedad Rural Argentina (SRA) vyžaduje pro identifikaci klonu koně a dárcovského zvířete testování mitochondriální DNA (mtDNA). Pokud toto rozlišení nelze provést, nelze klon registrovat u SRA. V Brazílii není testování mtDNA dosud vyžadováno (Gambini & Maserati 2018).

Pochybnosti, že klonování poskytuje konkurenční výhodu, jsou neprokázané. Dosud se v médiích neobjevila informace o tom, že by klon koně vyhrál soutěž pořádanou pod hlavičkou FEI. Neexistuje žádný přesvědčivý důkaz, že klonování koní je neetické z důvodů souvisejících se sportovní etikou. V souvislosti s touto skutečností, FEI svůj zákaz klonům účastnit se jezdeckých soutěží v roce 2012 zrušila (Campbell 2016).

Nástup nových technologií jako je CRISPR/Cas9 (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats), technika známá pod názvem editace genů, umožňuje rychlejší a účinnější

produkcí geneticky modifikovaných zvířat. Toto téma je u koní poměrně kontroverzní a využití tzv. křížování by mělo být posuzováno z etického hlediska (Gambini & Salamone 2019).

Banati (2009) se obává možného zneužití klonování a zkušeností spojených s rozvojem techniky SCNT u zvířat. Využití této technologie „otevívá dveře“ v případě klonování lidí.

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Dotazníkové šetření

Pro realizaci výzkumu byl vytvořen dotazník v několika jazykových mutacích (francouzštině, argentinské španělštině, angličtině, němčině a češtině) s cílem zjistit, jaký je postoj a vnímání klonování koní odbornou i laickou veřejností z oblasti jezdeckví, chovatelství a veterinární medicíny ve vybraných zemích (Francie [FR], Argentina [ARG], Velká Británie [UK], Německo [DE] a Česká republika [CZ]). Šablona všech jazykových verzí s názvem "Jak vnímáme klonování koní?" byla vytvořena zdarma na docs.google.com. Dotazníky byly dostupné na sociálních sítích, odkazy na ně byly zveřejněné prostřednictvím internetu na různých diskusních fórech specializovaných na jezdeckou a chovatelskou tematiku, a také byly zasílány na konkrétní e-mailové adresy chovatelům, jezdcům a veterinárním lékařům. Dále byla založena facebooková stránka s názvem „Současný pohled na klonování koní“ <https://www.facebook.com/klonovanikoni/> a zde zveřejněné dotazníky propagovány s možností prokliku. Cílení, kde či komu se dotazník zobrazoval, bylo možné za pomoci klíčových slov a zvolené země. Další formou bylo publikování dotazníku v časopise Jezdeckví (včetně facebookové stránky). Ve Francii byl dotazník zveřejněn v newsletteru paní Héléne Roche, která se zabývá aplikovanou etologií koní. Data byla sbírána v období od července do listopadu 2019.

Dotazník (Příloha 1) obsahuje 25 otázek a je rozdělen do 7 tematických okruhů:

- INFORMOVANOST O KLONOVÁNÍ - způsob získání informací o klonování, jejich dostatečnost a srozumitelnost
- OTÁZKA BEZPEČNOSTI POTRAVIN - konzumace masa z klonovaných zvířat
- ETIKA KLONOVÁNÍ - morální stránka klonování
- ZDRAVÍ A WELFARE KLONOVANÝCH ZVÍŘAT – životní podmínky a zdravotní stav klonů
- KLONOVÁNÍ A ETIKA VE SPORTU - identifikace klonů, legislativa
- PROČ SE KONĚ KLONUJÍ? - sportovní a chovatelský aspekt, zachování genů
- OSOBNÍ INFORMACE.

Na každou otázku byla možná jen jedna odpověď a poslední otázka, týkající se víry respondenta, byla dobrovolná.

## 4.2 Metody statistického vyhodnocení

Ke konečnému vyhodnocení bylo použito 686 odpovědí. Získaná data byla vložena do tabulky v Microsoft Excel s následným grafickým zpracováním. Statistické zpracování dat proběhlo v programu SPSS.

K vyhodnocení hypotéz byl použit  $\chi^2$ -test (chí kvadrát test) nezávislosti v kontingenční tabulce. Tento test ve své nulové hypotéze ( $H_0$ ) předpokládá, že znaky v kontingenční tabulce jsou nezávislé. Při ověřování nezávislosti tento test porovnává získané (empirické) četnosti s teoretickými četnostmi, které by měly nastat, pokud jsou sledované znaky nezávislé.

K vyhodnocení testu byla využita jeho p-hodnota (p-value), která je porovnána se zvolenou hladinou významnosti  $\alpha = 0,05$  udávající, že výsledky mohou nést 5% chybu. Sledované znaky jsou nezávislé, pokud je p-hodnota větší, než hladina významnosti  $\alpha$ . Pokud je p-hodnota menší nebo rovna  $\alpha$ , vyvracíme nulovou hypotézu ( $H_0$ ) testu a můžeme prohlásit, že existuje statisticky významná závislost mezi sledovanými znaky v kontingenční tabulce. Pro ověření výsledků je vždy uvedena i testová statistika G.

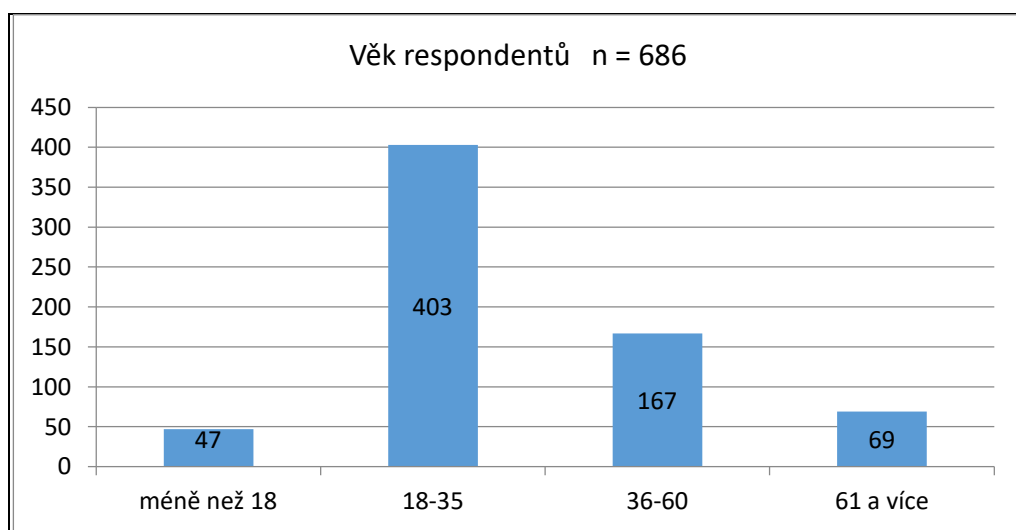
Pro správné použití tohoto testu se doporučuje, aby podíl polí, kde jsou očekávané četnosti nižší než 5, byl maximálně 20 %.

## 5 Výsledky

### 5.1 Výsledky dotazníkového šetření

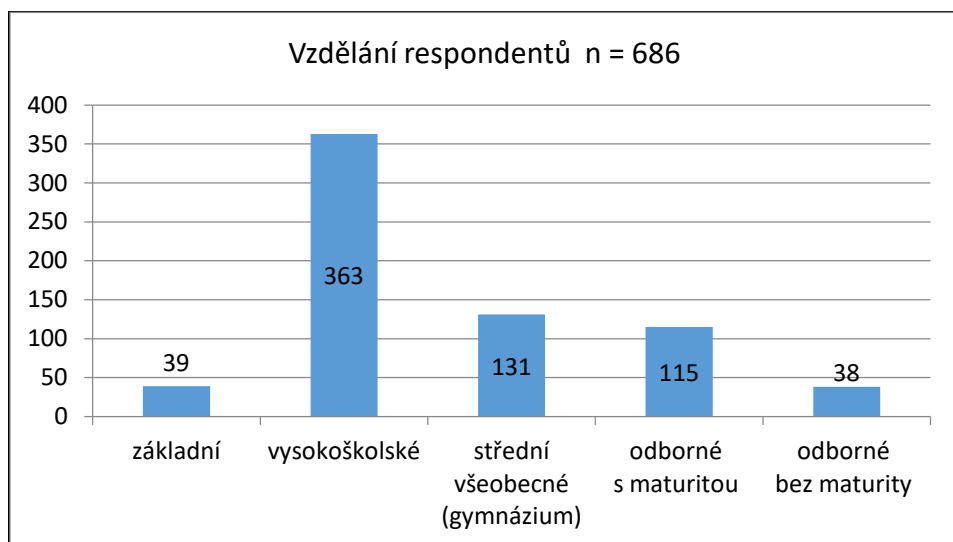
#### 5.1.1 Struktura respondentů

Celkem bylo získáno a analyzováno 686 odpovědí. Největší počet byl z České republiky (314), ostatní země byly zastoupeny následovně: Francie (127), Argentina (106), Německo (70) a Velká Británie (69). Nejvíce byla v odpovědích zastoupena věková skupina 18-35 let s 403 respondenty (58,8 %), následovaná skupinou 36-60 let se 167 respondenty (24,3 %). Osob starších 61 let odpovědělo 69 (10,1 %) a nejméně zastoupená byla věková skupina pod 18 let s 47 respondenty (6,9 %) Graf 1.



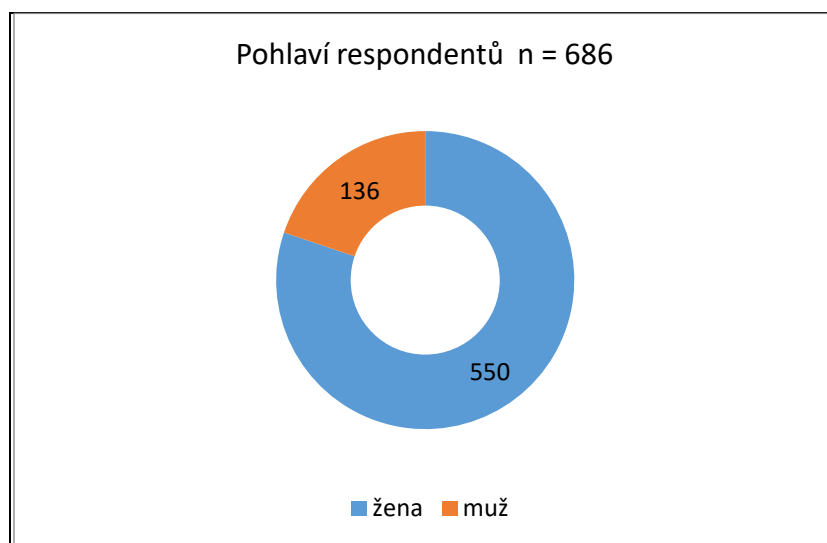
Graf 1 Věkové složení respondentů

Nejčastěji se k dané problematice vyjadřovali lidé s vysokoškolským vzděláním 363 (52,9 %) a se středním všeobecným vzděláním (gymnázium) 131 (19,1 %). Respondentů s odborným vzděláním s maturitou bylo 115 (16,8 %), se základním vzděláním 39 (5,7 %) a nejméně byla zastoupena skupina respondentů s odborným vzděláním bez maturity 38 (5,5 %) Graf 2.

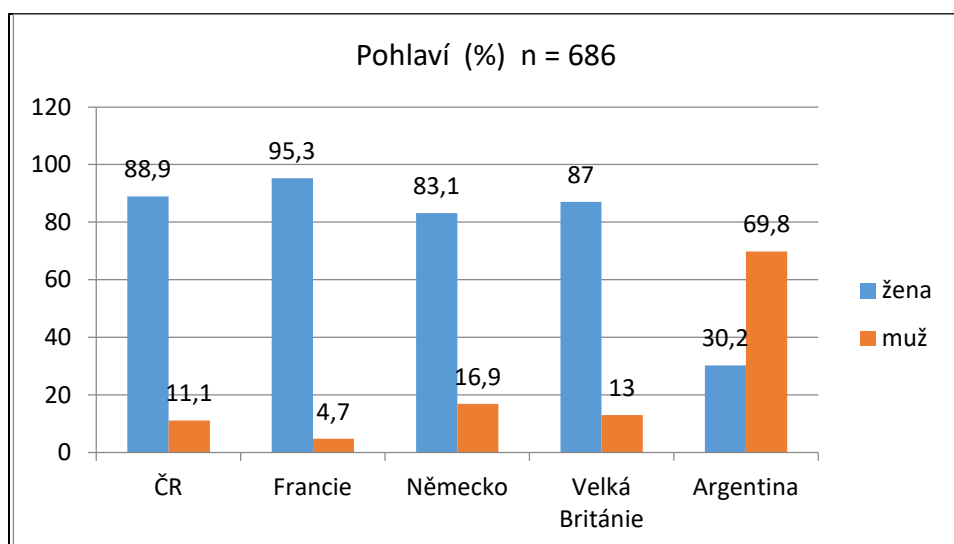


*Graf 2 Rozdělení respondentů podle dosaženého vzdělání*

Z hlediska pohlaví byly v průzkumu nejvíce zastoupeny ženy 550 (80,2 %), mužů bylo jen 136 (19,8 %) Graf 3. Argentina byla jedinou zemí, kde mezi odpovídajícími výrazně převažovali muži (69,8 %) Graf 4.

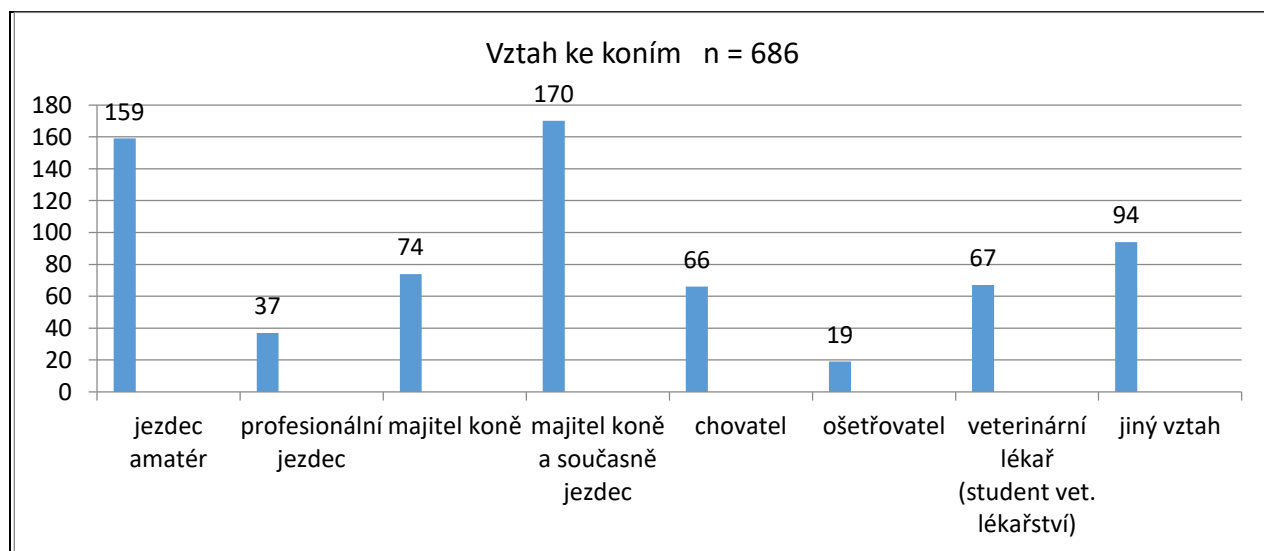


*Graf 3 Celkové rozdělení respondentů podle pohlaví*



Graf 4 Rozdělení respondentů podle pohlaví ve vybraných zemích, vyjádřeno v procentech

Největší zastoupení dotazovaných bylo mezi jezdci a současně majiteli koní 170 (24,8 %) a dále mezi jezdci amatéry 159 (23,2 %). Majitelů koní bylo 74 (10,8 %), veterinárních lékařů nebo studentů veterinární medicíny 67 (9,8 %) a chovatelů 66 (9,6 %). Z ostatních kategorií byli minoritně zastoupeni profesionální jezdci 37 (5,4 %) a ošetřovatelé 19 (2,8 %). Jiný vztah ve vztahu ke koním uvedlo 94 respondentů (13,7 %) Graf 5.

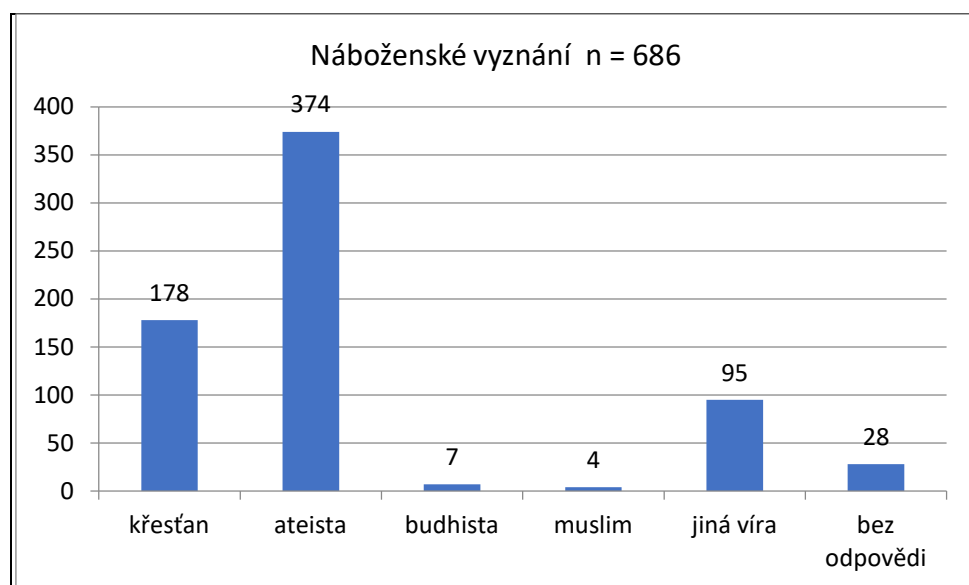


Graf 5 Celkové rozdělení respondentů podle vztahu ke koním

Zajímavý pohled nabízí struktura respondentů podle náboženského vyznání Graf 6. Křesťanskou víru vyznávalo 178 (25,9 %) dotázaných, buddhismus uvedlo jako své náboženství 7 (1 %) respondentů a 4 (0,6 %) se prezentovali jako muslimové. Nejvíce respondentů uvedlo, že



jsou ateisté 374 (54,5 %) a 95 (13,8 %) je jiného vyznání. Odpověď na otázku vyznání byla v dotazníku dobrovolná a 28 (4,1 %) respondentů využilo možnosti neodpovědět.



Graf 6 Struktura respondentů podle náboženského vyznání

Tento reprezentativní vzorek respondentů nám umožnil získat ve sledovaných kategoriích otázek následující výsledky.

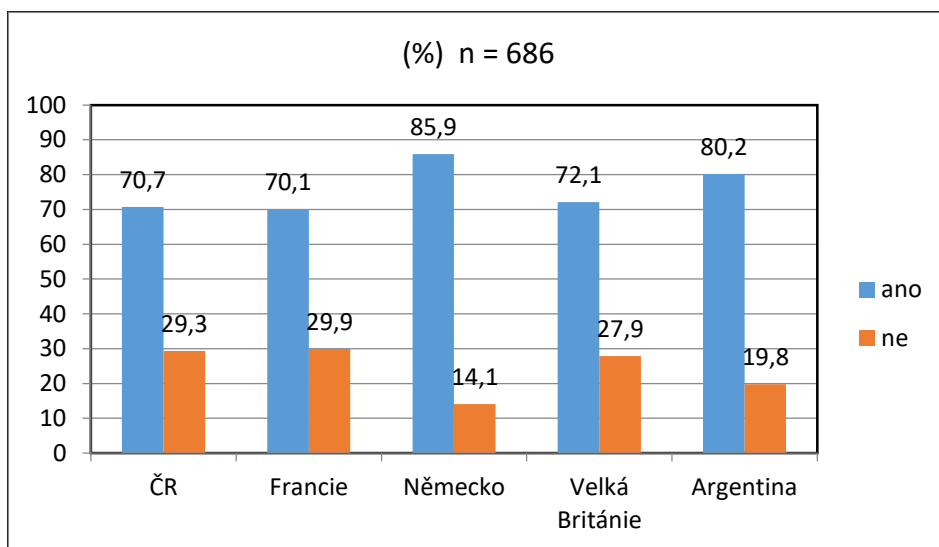
#### 5.1.2. Popisná statistika vybraných otázek

Z obsáhlého dotazníku jsou v následujícím textu zpracována a vyhodnocena pouze vybraná témata.

### **KATEGORIE INFORMOVANOST O KLONOVÁNÍ**

#### **Otázka č. 1 Slyšel/a jste již o klonech koní nebo jiných koňovitých (zebry, osli)?**

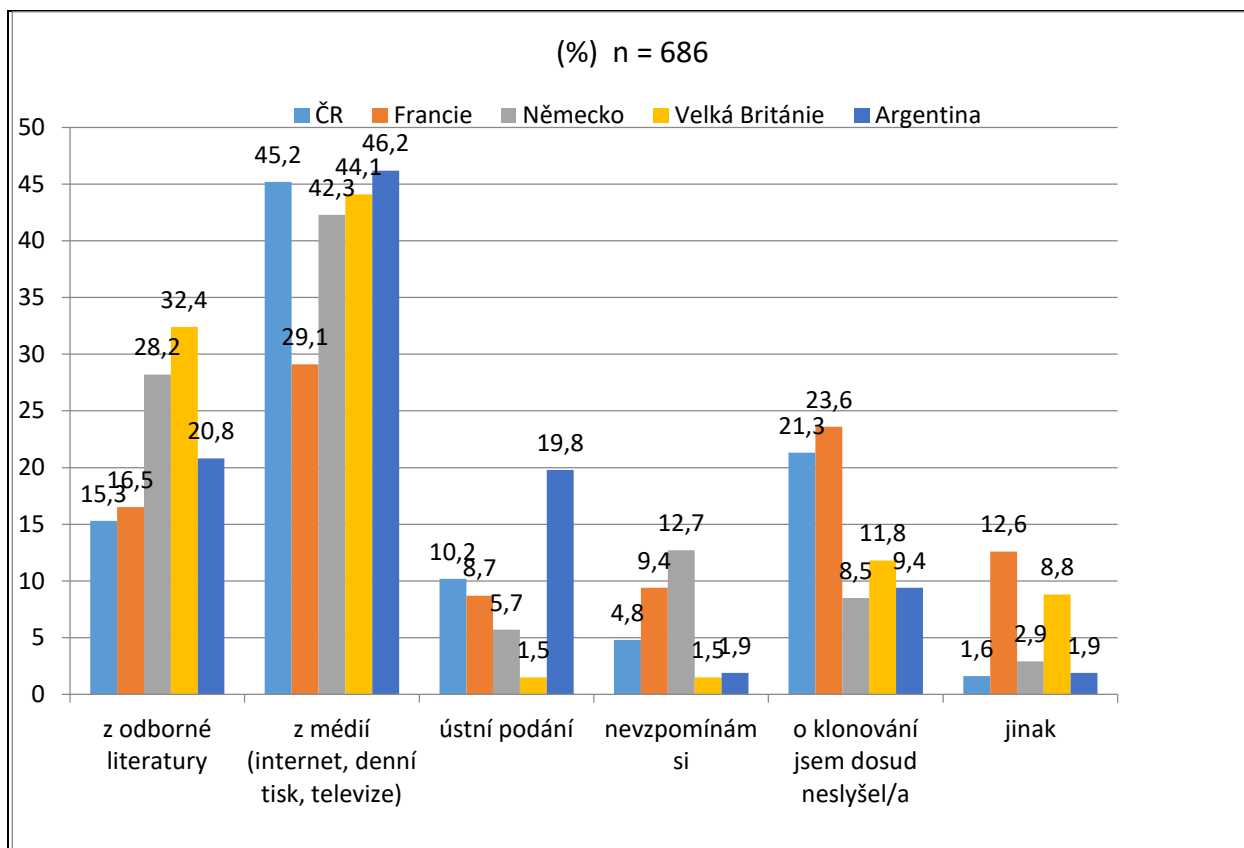
V odpovědi na první analyzovanou otázku z této kategorie dotazníkového šetření se nejvíce respondentů z Německa 85,7 % (60) vyjádřilo, že již o klonech koní nebo jiných koňovitých slyšelo. Překvapivě nejmenší počet respondentů 70,1 % (89), kteří o klonování slyšeli, bylo ve Francii. Přitom na jejím území v letech 2003 až 2016 působila v rámci Evropy jediná společnost zabývající se komerčním klonováním koní (Cryozootech). Graf 7 nabízí souhrnný pohled na tuto otázku.



Graf 7 Odpovědi respondentů na otázku „Slyšel/a jste již o klonech koní nebo jiných koňovitých (zebrý, osli)?“, vyjádřeno v procentech

## Otázka č. 2 Jak jste se dozvěděl/a o klonování?

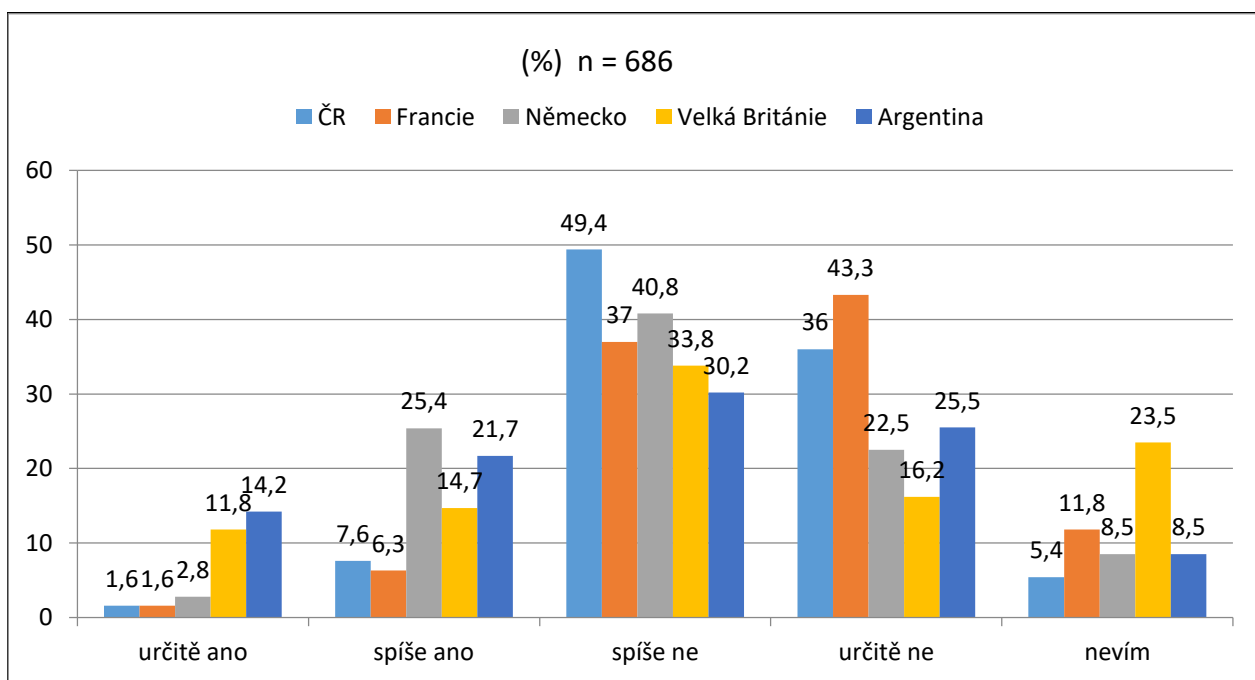
Zdrojem informací o klonování 42,1 % (289) jsou především média (internet, denní tisk, TV). To je pravděpodobně důvod, proč mají respondenti často zkreslené a zavádějící informace. Na druhém místě je odborná literatura 20,0 % (137). O klonování zvířat nikdy neslyšelo 17,6 % (121) dotázaných, což nejspíše souvisí s nedostatečnou medializací této problematiky Graf 8.



Graf 8 Odpovědi respondentů na otázku „Jak jste se dozvěděl/a o klonování?“, vyjádřeno v procentech

### Otázka č. 3 Je informovanost o klonování a klonech zvířat dostačující?

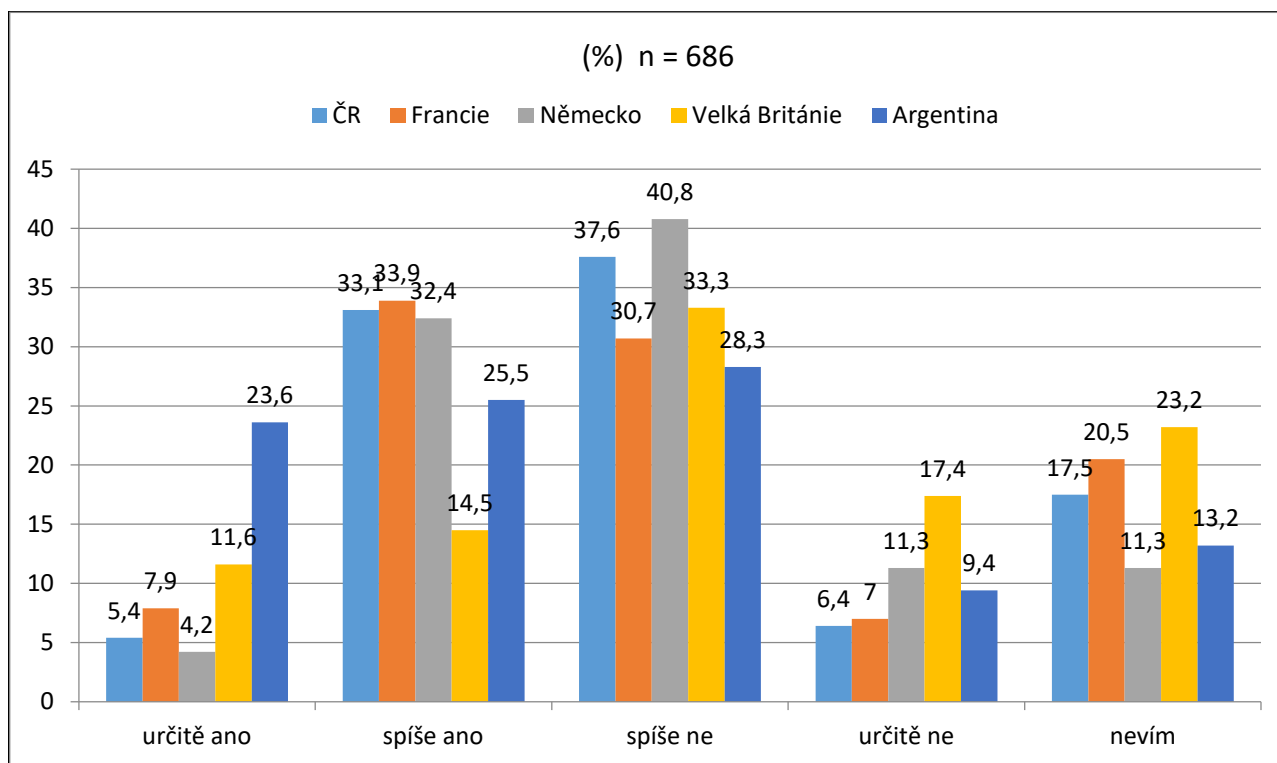
Většina dotázaných 509 (74,2 %) odpověděla na otázku „spíše ne“ a „učitě ne“. V České republice považuje informovanost o klonování a klonech zvířat za nedostačující dokonce 85,4 % (268) respondentů. Jako dostačující („určitě ano“ a „spíše ano“) ji z celkové počtu dotázaných vnímá pouze 114 (16,6 %). Zbýlých 63 (9,2 %) nemá na danou problematiku názor. Graf 9 sleduje tuto problematiku v závislosti na jednotlivých zemích.



Graf 9 Odpovědi respondentů na otázku „Je informovanost o klonování a klonech zvířat dostačující?“, vyjádřeno v procentech

### Otázka č. 4 Jsou informace o klonování zvířat dostatečně srozumitelné?

Necelá polovina dotázaných 326 (47,5 %) považuje informace o klonování za nesrozumitelné („spíše ne“ a „učitě ne“). Za dostatečně srozumitelné („určitě ano“ a „spíše ano“) tyto informace považuje 258 (37,6 %) respondentů a 102 (14,9 %) účastníků průzkumu odpovědělo nevím. Graf 10 sleduje tuto problematiku podrobně z pohledu jednotlivých zemí.



Graf 10 Odpovědi respondentů na otázku „Jsou informace o klonování zvířat dostatečně srozumitelné?“, vyjádřeno v procentech

## KATEGORIE BEZPEČNOST POTRAVIN

### Otázka č. 6 Domníváte se, že konzumace masa z klonovaných zvířat je pro lidi bezpečná?

K této otázce se vztahuje **hypotéza 1**. Zpracováno v kap. 5.1.3 viz Graf 17.

### Otázka č. 7 V USA, Kanadě, Argentině a Austrálii je povoleno klonování zvířat, která vstupují do potravinového řetězce. V EU je toto využití klonů zakázáno. Souhlasíte s přístupem EU?

K této otázce se vztahuje **hypotéza 2**. Zpracováno v kap. 5.1.3 viz Graf 18.

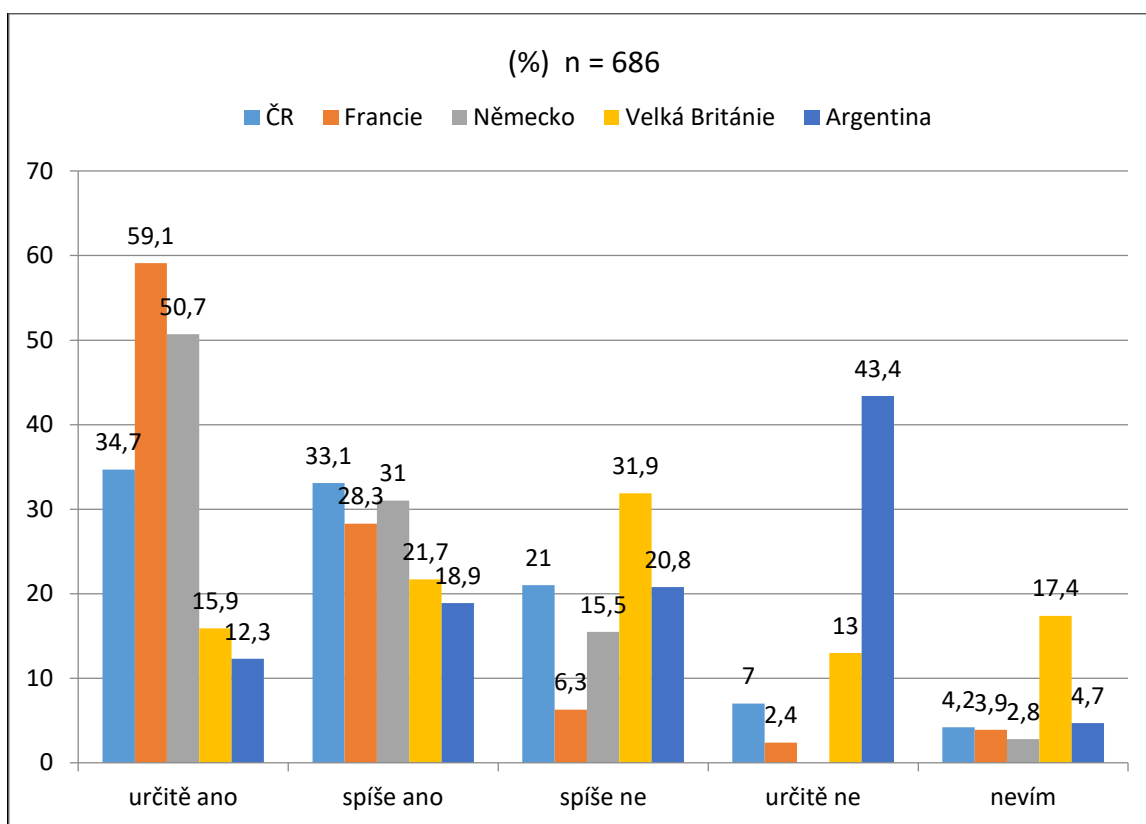
### Otázka č. 8 Je klonování "morálně" správné?

K této otázce se vztahuje **hypotéza 6**. Zpracováno v kap. 5.1.3 viz Graf 22.

### Otázka č. 9 Představují pro Vás "sériově" vyráběná zvířata etický problém?

Z výsledků šetření je patrné, že 64,1 % (440) respondentů považuje „sériově“ vyráběná zvířata za etický problém a jako velmi významnou tuto záležitost vnímá 87,4 % (111) dotázaných ve Francii. Přibližně jedna třetina respondentů 30,5 % (209) se nedomnívá, že tato otázka představuje etický problém, v Argentině to jsou dokonce téměř dvě třetiny 64,2 % (68). Pouze

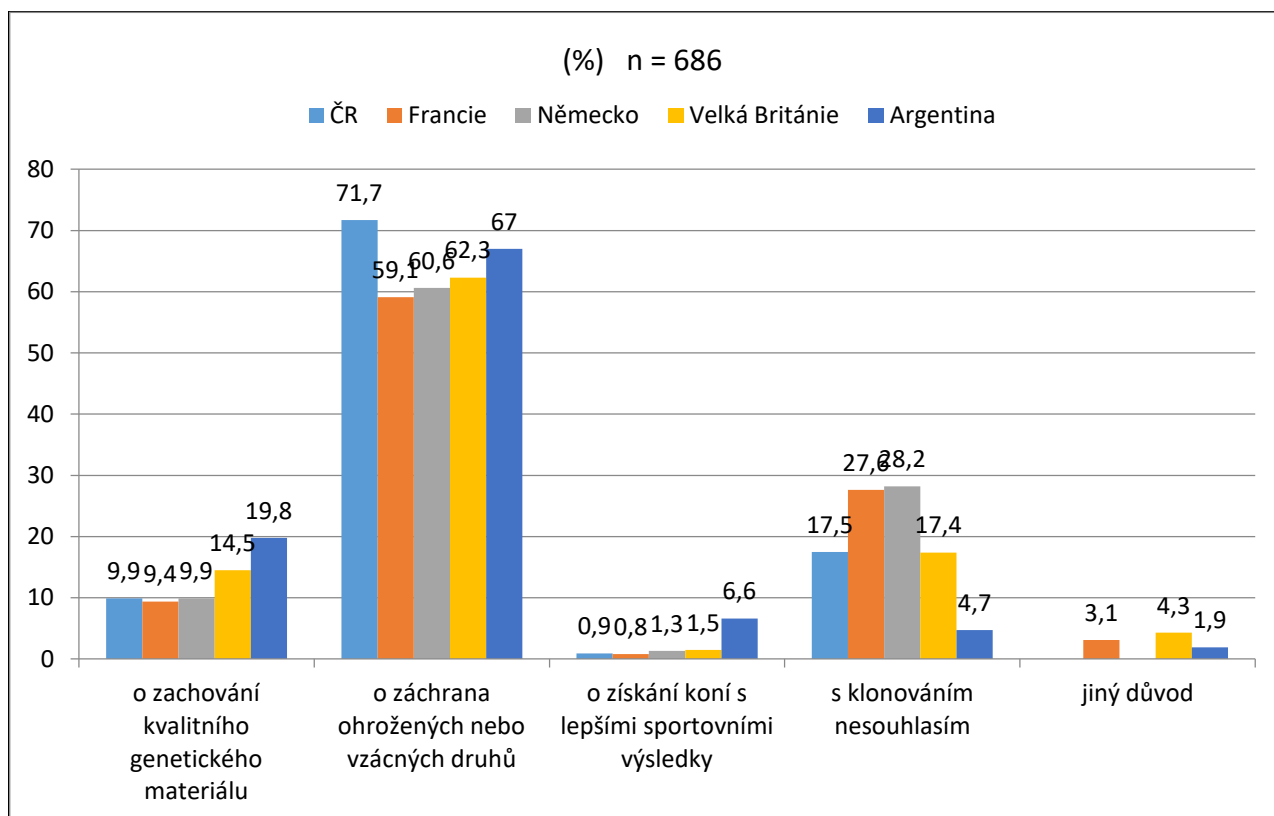
5,4 % (37) odpovědělo nevíím. Graf 11 sleduje tuto problematiku podrobně z pohledu jednotlivých zemí.



Graf 11 Odpovědi respondentů na otázku „Představují pro Vás "sériově" vyráběná zvířata etický problém?“, vyjádřeno v procentech

### Otázka č. 10 Souhlasíte s klonováním zvířat, pokud se jedná...

Rozložení odpovědí napovídá, že dvě třetiny dotázaných 66,5 % (456) souhlasí s použitím klonování jen pro záchranu kriticky ohrožených nebo vzácných druhů. Pro klonování s cílem zachovat kvalitní genetický materiál se vyslovilo 11,8 % (81) respondentů a pro získání koní s lepšími sportovními výsledky je pouze 1,9 % (13) z celkového počtu dotazovaných. Jiný důvod je uveden v 9 (1,3 %) odpovědích. S klonováním vůbec nesouhlasí 18,5 % (127) respondentů. Graf 12 sleduje tuto problematiku podrobně z pohledu jednotlivých zemí.



Graf 12 Odpovědi respondentů na otázku „Souhlasíte s klonováním zvířat, pokud se jedná...“, vyjádřeno v procentech

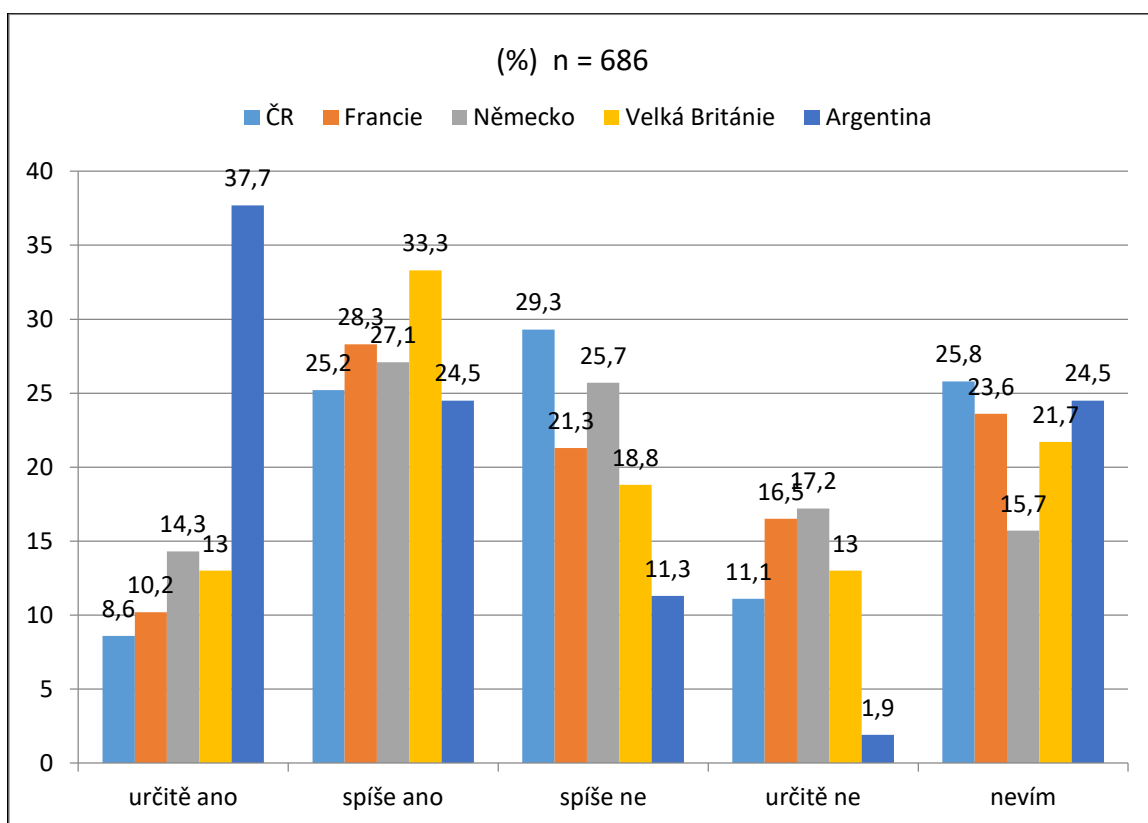
## KATEGORIE KLONOVÁNÍ A ETIKA VE SPORTU

**Otázka č. 14 V koňském pólu, a v návaznosti na povolení Mezinárodní jezdecké federace (FEI) z roku 2012, je účast klonovaných koní možná i v soutěžích FEI. Je to správné rozhodnutí?**

K této otázce se vztahuje hypotéza 4. Zpracováno v kap. 5.1.3 viz Graf 20.

**Otázka č. 15 Je v soutěžích identifikace mezi klonem a jeho dárcem nebo mezi dvěma klony čipováním dostačující (všichni mají stejnou DNA)?**

Celkem 282 oslovených (41,1 %) se domnívá, že trvalá identifikace koní v případě klonování pomocí mikročipu je dostačující (odpovědi „určitě ano“ a „spíše ano“). 241 (35,1 %) respondentů si nemyslí (odpovědi „spíše ne“ a „určitě ne“), že mikročipování je vhodný způsob identifikace. Za povšimnutí stojí fakt, že téměř dvě třetiny respondentů 62,2 % (66) z Argentiny jsou přesvědčeny, že čipování k identifikaci mezi klonem a jeho dárcem nebo mezi dvěma klony postačuje. Názor nemá 23,8 % (163) respondentů. Graf 13 sleduje tuto problematiku podrobně z pohledu jednotlivých zemí.



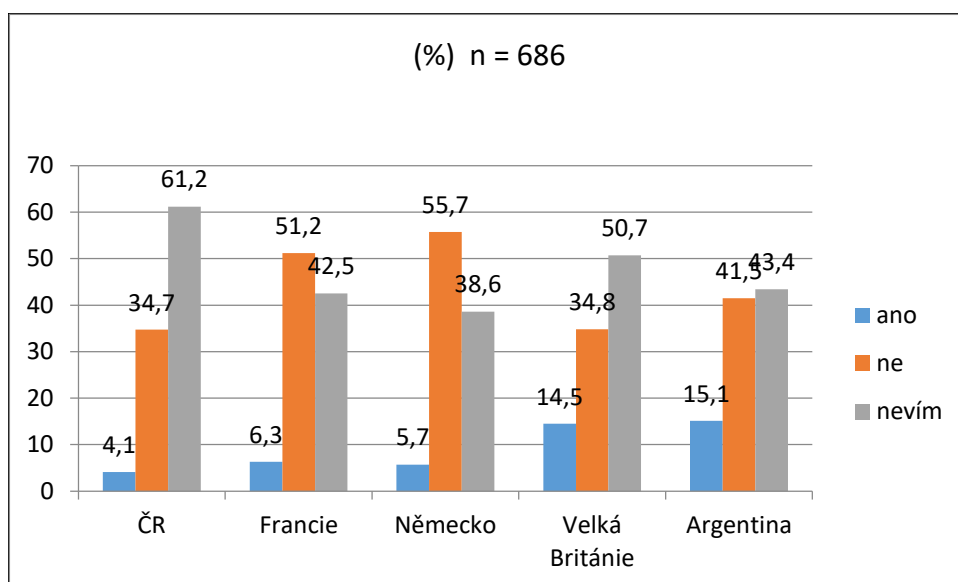
Graf 13 Odpovědi respondentů na otázku „Je v soutěžích identifikace mezi klonem a jeho dárcem nebo mezi dvěma klony čipováním dostačující (všichni mají stejnou DNA)?“, vyjádřeno v procentech

### Otázka č. 16 Z jakého důvodu by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci?

K této otázce se vztahuje hypotéza 3. Zpracováno v kap. 5.1.3 viz Graf 19.

### Otázka č. 17 Legislativa a ostatní předpisy týkající se klonování jsou dostačující?

V České republice bylo nejvíce respondentů 192 (61,2 %), kteří neměli na otázku legislativy a předpisů o klonování názor. V Německu se více než polovina dotázaných 55 % (39) domnívá, že zákonodárství spojené s klonovacím procesem není uspokojivé. Největší počet respondentů, kteří si myslí, že legislativa je dostačující, byl zjištěn v Argentině, přesto však pouhých 15,1 % (16). Graf 14 sleduje tuto problematiku podrobněji z pohledu jednotlivých zemí.



Graf 14 Odpovědi respondentů na otázku „Legislativa a ostatní předpisy týkající se klonování jsou dostačující?“, vyjádřeno v procentech

## KATEGORIE PROČ SE KONĚ KLONUJÍ?

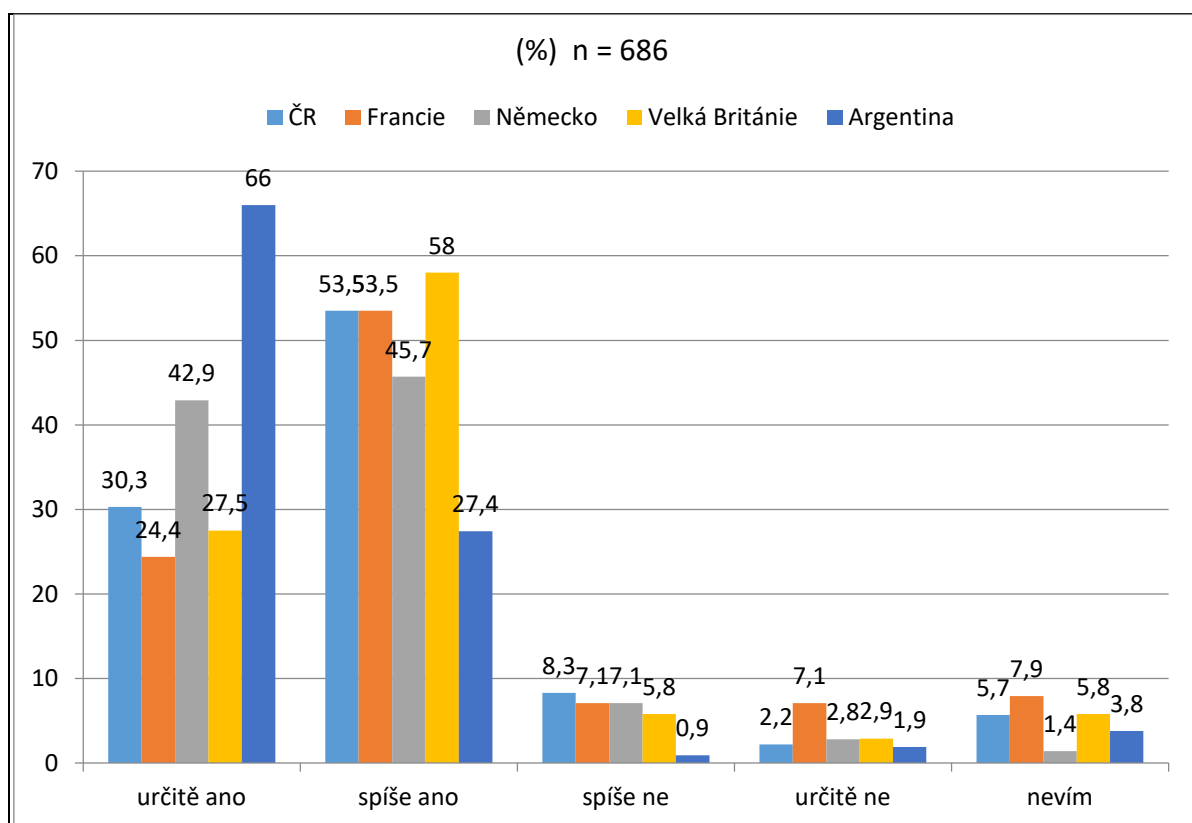
**Otázka č. 18** Myslíte si, že důvodem je sportovní aspekt (touha po tom, aby klon zopakoval výkony svého dárce)?

K této otázce se vztahuje hypotéza 5. Zpracováno v kap. 5.1.3 viz Graf 21.

**Otázka č. 19** Myslíte si, že důvodem je chovatelský aspekt (možnost vlastnit stále stejně kvalitního a sportovně prověřeného koně)?

Za podstatný důvod pro klonování (odpověď „určitě ano“) považuje možnost vlastnit chovatelsky a sportovně prověřeného koně 35,7 % (245) respondentů. V Argentině se jedná dokonce o 66 % (62) dotazovaných. Necelá polovina z celkového počtu respondentů 49,1 % (337) odpověděla „spíše ano“. Minoritně jsou zastoupeny odpovědi „spíše ne“ 6,6 % (45), „určitě ne“ 3,2 % (22) a „nevím“ 5,4 % (37). Graf 15 sleduje tuto problematiku podrobněji z pohledu jednotlivých zemí.

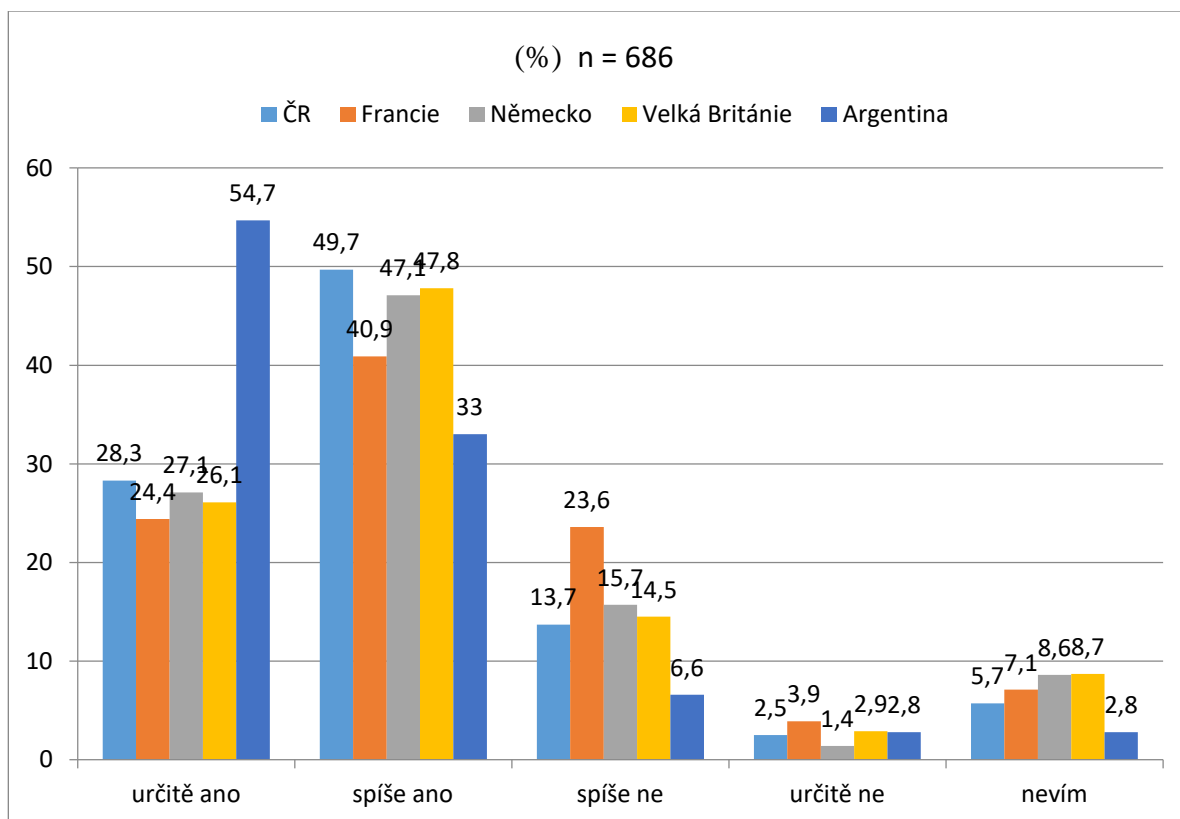




Graf 15 Odpovědi respondentů na otázku „Myslíte si, že důvodem je chovatelský aspekt (možnost vlastnit stále stejně kvalitních a sportovně prověřeného koně)?“, vyjádřeno v procentech

### Otázka č. 20 Myslíte si, že důvodem je snaha o zachování genů původního jedince (v případě jeho úmrtí, kastrace nebo vyhynutí druhu)?

S tvrzením, že hlavním důvodem klonování je zachování genů původního jedince, souhlasí většina dotazovaných 76,4 % (524). Největší míra souhlasu je u respondentů z Argentiny 54,7 % (58 odpovědí „určitě ano“), pokud přičteme respondenty, kteří spíše souhlasí 33 % (35), vyjádřilo souhlas 87,7 % (93) dotazovaných. Nejmenší míra souhlasu je pak ve Francii, a to 65,3 % (24,4 % „určitě ano“ a 40,9 % „spíše ano“). Graf 16 sleduje tuto problematiku podrobněji z pohledu jednotlivých zemí.



Graf 16 Odpovědi respondentů na otázku „Myslíte si, že důvodem je snaha o zachování genů původního jedince (v případě jeho úmrtí, kastrace nebo vyhynutí druhu)?“, vyjádřeno v procentech

### 5.1.3 Výsledky testování vědeckých hypotéz

Mezi jednotlivými zeměmi byly v odpovědích zaznamenány rozdíly. V rámci předložených hypotéz bylo ověřeno, zda jsou tyto rozdíly mezi státy u sledovaných otázek statisticky významné. Pro ověření existující závislosti byl použit  $\chi^2$ -test nezávislosti v kontingenční tabulce.

- konzumace masa z klonů (včetně koní)

#### **OTÁZKA BEZPEČNOST POTRAVIN**

**Hypotéza 1: Rozdíly v hodnocení otázky „Domníváte se, že konzumace masa z klonovaných zvířat je pro lidi bezpečná?“ (Otázka č. 6)**

První hypotéza sleduje otázku bezpečnosti konzumace masa z klonovaných zvířat. Testovaná hypotéza je ve tvaru:

H<sub>0</sub>: Hodnocení bezpečnosti konzumace masa z klonovaných zvířat pro lidi se mezi sledovanými státy neliší

H<sub>1</sub>: Hodnocení bezpečnosti konzumace masa z klonovaných zvířat pro lidi se mezi sledovanými státy liší

Na základě provedeného testu (G=60,358; p-hodnota = 0,000), kdy je p-hodnota nižší než námi zvolená hladina významnosti  $\alpha = 5 \%$ , testovanou hypotézu H<sub>0</sub> zamítáme, tj. **prokázali jsme, že mezi zeměmi existují statisticky významné rozdíly ve vnímání bezpečnosti potravin z klonovaných zvířat.**

Výsledky  $\chi^2$ -testu (výstup programu SPSS):

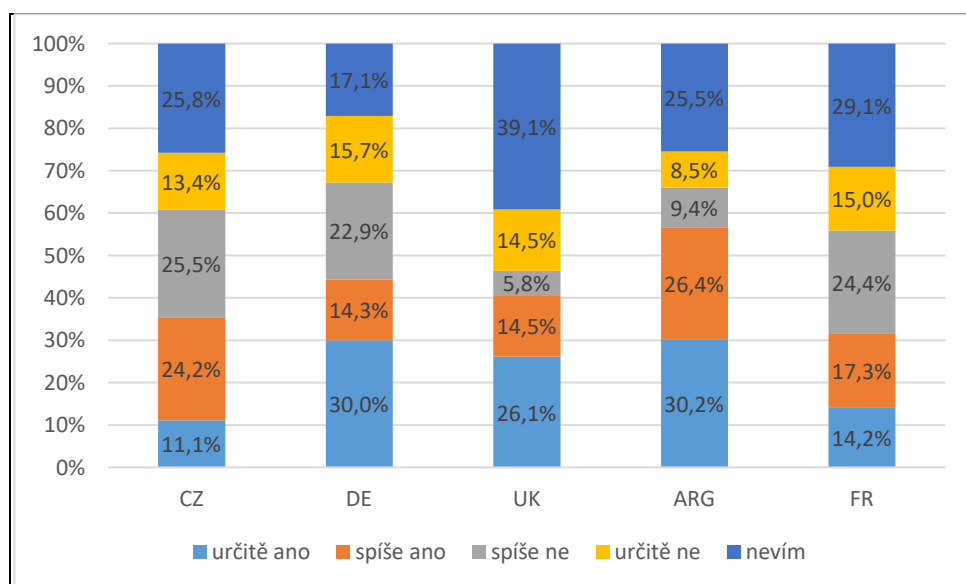
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	60,358 <sup>a</sup>	16	,000
Likelihood Ratio	63,755	16	,000
N of Valid Cases	686		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,15.

V kontingenční tabulce vidíme, jaké jsou rozdíly v odpovědích na sledovanou otázku; Tabulka 5. Pro každý typ odpovědi je uvedena absolutní a relativní (%) četnost respondentů z jednotlivých zemí. Červeně jsou vyznačeny zajímavé hodnoty, ke kterým níže následuje komentář. Graf 17 názorně zobrazuje rozdělení odpovědí podle států.

Tabulka 5 Kontingenční tabulka sledující názory na bezpečnost konzumace potravin z klonovaných zvířat podle států

			Stát					Celkem	
			CZ	DE	UK	ARG	FR		
OTÁZKA BEZPEČNOST POTRAVIN Domníváte se, že konzumace masa z klonovaných zvířat je pro lidi bezpečná?	určitě ano	Absolutní četnost	35	21	18	32	18	124	
		Relativní četnost	11,1%	30,0%	26,1%	30,2%	14,2%	18,1%	
	spíše ano	Absolutní četnost	76	10	10	28	22	146	
		Relativní četnost	24,2%	14,3%	14,5%	26,4%	17,3%	21,3%	
	spíše ne	Absolutní četnost	80	16	4	10	31	141	
		Relativní četnost	25,5%	22,9%	5,8%	9,4%	24,4%	20,6%	
	určitě ne	Absolutní četnost	42	11	10	9	19	91	
		Relativní četnost	13,4%	15,7%	14,5%	8,5%	15,0%	13,3%	
	nevím	Absolutní četnost	81	12	27	27	37	184	
		Relativní četnost	25,8%	17,1%	39,1%	25,5%	29,1%	26,8%	
	Celkem		Absolutní četnost	314	70	69	106	127	686
			Relativní četnost	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



Graf 17 Rozdělení odpovědí na otázku „Domníváte se, že konzumace masa z klonovaných zvířat je pro lidi bezpečná?“

V bezpečnost konzumace masa z klonovaných zvířat nejvíce věří respondenti z Argentiny, 30,2 % odpovědělo „určitě ano“, 26,4 % pak „spíše ano“, dohromady se jedná o nadpoloviční většinu 56,6 %. Naopak nejmenší důvěru má konzumace masa z klonovaných zvířat ve Francii, kde jen 31,5 % respondentů (14,2 % „určitě ano“ a 17,3 % „spíše ano“) věří v bezpečnost tohoto masa a naopak nevěří 39,4 % (24,4 % „spíše ne“ a 15,0 % „určitě ne“). Ve Francii tedy převládá spíše negativní postoj.

Negativní postoj převládá i v České republice, kde 38,9 % dotázaných (13,4 % „určitě ne“ a 25,5 % „spíše ne“) nepokládá konzumaci masa z klonovaných zvířat za bezpečnou.

Zbylé 2 země, Německo a Velká Británie, jsou ke konzumaci masa z klonů vstřícnější. V Německu považuje klonované maso za bezpečné 44,3 % respondentů (30,0 % „určitě ano“ a 14,3 % „spíše ano“). Ve Velké Británii kladný postoj vyjádřilo 40,6 % respondentů (26,1 % „určitě ano“ a 14,5 % „spíše ano“), je zde však velká skupina respondentů (39,1 %), kteří nevědí, zda konzumaci masa z klonů považovat za bezpečnou či nikoliv.

**Hypotéza 2: Rozdíly v hodnocení otázky „V USA, Kanadě, Argentině a Austrálii je povoleno klonování zvířat, která vstupují do potravinového řetězce. V EU je toto využití klonů zakázáno. Souhlasíte s přístupem EU?“ (Otázka č. 7)**

Druhá hypotéza sledovala rozdíly souhlasu přístupem Evropské unie k využití klonů v potravinářském řetězci. Testované hypotézy budou ve tvaru:

$H_0$ : Souhlas s přístupem EU k využití klonů v potravinovém řetězci se neliší podle sledovaných států

$H_1$ : Souhlas s přístupem EU k využití klonů v potravinovém řetězci se liší podle sledovaných států

Na základě provedeného testu ( $G = 103,523$ ;  $p$ -hodnota = 0,000), kdy  $p$ -hodnota nabývá hodnoty 0,000 a je tedy nižší než hladina významnosti  $\alpha = 5 \%$ , testovanou hypotézu  $H_0$  zamítáme. Na hladině významnosti  $\alpha = 5 \%$  **jsme tedy prokázali, že mezi zeměmi existují statisticky významné rozdíly ve vnímání přístupu EU k využití klonů.**

Výsledky  $\chi^2$ -testu (výstup programu SPSS):

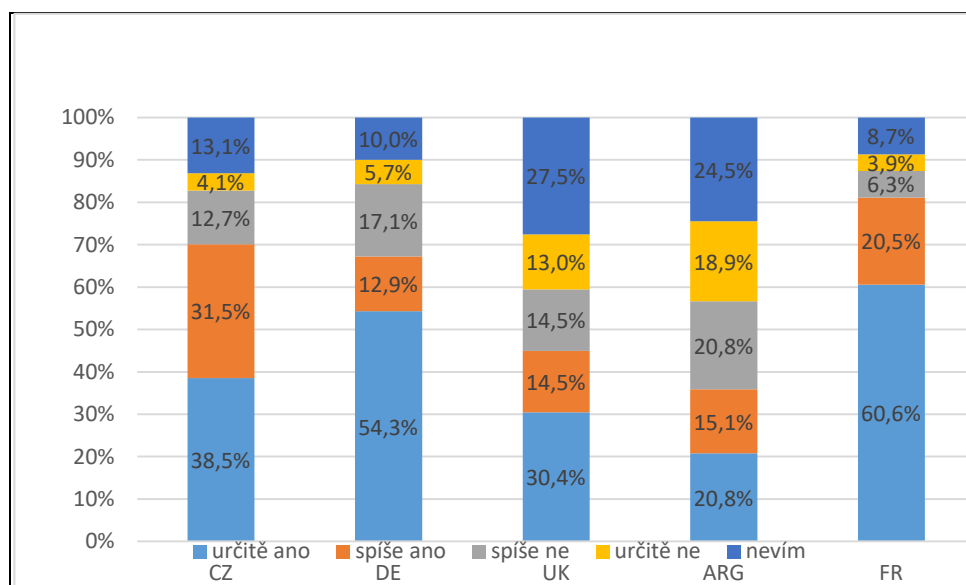
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	103,523 <sup>a</sup>	16	,000
Likelihood Ratio	98,804	16	,000
N of Valid Cases	686		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,13.

Výsledky dotazníkového šetření jsou shrnuty v kontingenční tabulce a zajímavé hodnoty jsou vyznačeny červeně; Tabulka 6. Graf 18 názorně zobrazuje rozdělení odpovědí podle států.

Tabulka 6 Kontingenční tabulka sledující souhlas s postupem EU podle států

			Stát					Celkem	
			CZ	DE	UK	ARG	FR		
V USA, Kanadě, Argentině a Austrálii je povoleno klonování zvířat, která vstupují do potravinového řetězce. V EU je toto využití klonů zakázáno. Souhlasíte s přístupem EU?	určitě ano	Absolutní četnost	121	38	21	22	77	279	
		Relativní četnost	38,5%	54,3%	30,4%	20,8%	60,6%	40,7%	
	spíše ano	Absolutní četnost	99	9	10	16	26	160	
		Relativní četnost	31,5%	12,9%	14,5%	15,1%	20,5%	23,3%	
	spíše ne	Absolutní četnost	40	12	10	22	8	92	
		Relativní četnost	12,7%	17,1%	14,5%	20,8%	6,3%	13,4%	
	určitě ne	Absolutní četnost	13	4	9	20	5	51	
		Relativní četnost	4,1%	5,7%	13,0%	18,9%	3,9%	7,4%	
	nevím	Absolutní četnost	41	7	19	26	11	104	
		Relativní četnost	13,1%	10,0%	27,5%	24,5%	8,7%	15,2%	
	Celkem		Absolutní četnost	314	70	69	106	127	686
			Relativní četnost	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



Graf 18 Rozdělení odpovědí na otázku „V USA, Kanadě, Argentině a Austrálii je povoleno klonování zvířat, která vstupují do potravinového řetězce. V EU je toto využití klonů zakázáno. Souhlasíte s přístupem EU?“

Většina států souhlasí s přístupem EU, odpovědi „spíše ano“ a „určitě ano“ bylo celkem 439 (64,0 %). Souhlasný názor převládá u respondentů v České republice, Německu, Anglii a Francii (hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 6). Opačný je názor respondentů z Argentiny, kde mírná většina s přístupem EU nesouhlasí, 39,6 % (20,8 % „spíše ne“ a 18,9 % „určitě ne“) a 35,8 % souhlasí (20,8 % „určitě ano“ a 15,1 % „spíše ano“).

Obecně se ke konzumaci masa z klonů nejvstřícněji staví Argentina, nejskeptičtější jsou respondenti z České republiky a Francie. Za povšimnutí stojí zjištění, že 81,1 % (60,6 % „určitě ano“ a 20,5 % „spíše ano“) občanů Francie schvaluje přístup EU. Ze všech zkoumaných zemí se jedná o nejvyšší podporu. Respondenti z Velké Británie a Německa považují konzumaci masa z klonů spíše za bezpečnou, ale zároveň souhlasí s tím, že v EU není povoleno klonování zvířat, která vstupují do potravinového řetězce. Velká Británie je specifická i tím, že existuje velké procento respondentů, kteří nemají v této otázce názor (odpověď „nevím“).

- **zákaz klonů v reprodukci (v chovu)**

**Hypotéza 3: Rozdíly v odpovědích na otázku: „Z jakého důvodu by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci?“ (Otázka č. 16)**

Třetí hypotéza sleduje rozdíly v názorech, z jakého důvodu by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci. Testované hypotézy budou ve tvaru:

H<sub>0</sub>: Uváděné důvody, proč by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci, se neliší podle států.

H<sub>1</sub>: Uváděné důvody, proč by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci, se liší podle států.

Na základě provedeného testu (G=46,708; p-hodnota = 0,000), kdy p-hodnota je nižší než hladina významnosti  $\alpha = 5 \%$ , testovanou hypotézu H<sub>0</sub> zamítáme. **Prokázali jsme tedy statisticky významné rozdíly mezi zeměmi v otázce důvodů zákazu klonů v reprodukci.**

Výsledky dotazníkového šetření jsou shrnuty v kontingenční tabulce a zajímavé hodnoty jsou vyznačeny červeně; Tabulka 7. Graf 19 názorně zobrazuje rozdělení odpovědí podle států.

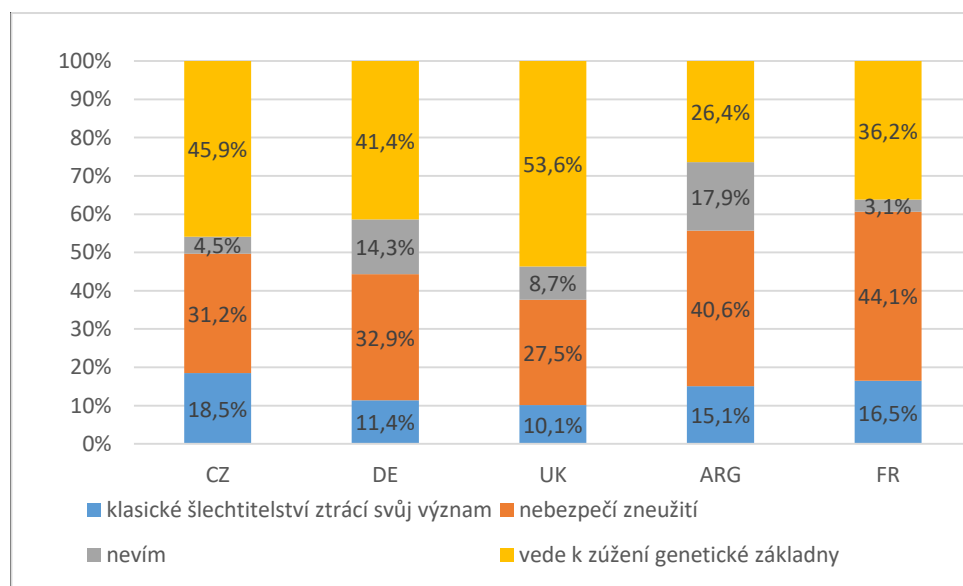
Výsledky  $\chi^2$ -testu (výstup programu SPSS):

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	46,708 <sup>a</sup>	12	,000
Likelihood Ratio	44,530	12	,000
N of Valid Cases	686		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,33.

Tabulka 7 Kontingenční tabulka sledující možné důvody zákazy používání klonů v reprodukci podle států

			Stát					Celkem
			CZ	DE	UK	ARG	FR	
Z jakého důvodu by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci?	klasické šlechtitelství ztrácí svůj význam	Absolutní četnost	58	8	7	16	21	110
		Relativní četnost	18,5%	11,4%	10,1%	15,1%	16,5%	16,0%
	nebezpečí zneužití	Absolutní četnost	98	23	19	43	56	239
		Relativní četnost	31,2%	32,9%	27,5%	<b>40,6%</b>	<b>44,1%</b>	34,8%
	nevím	Absolutní četnost	14	10	6	19	4	53
		Relativní četnost	4,5%	14,3%	8,7%	17,9%	3,1%	7,7%
	vede k zúžení genetické základny	Absolutní četnost	144	29	37	28	46	284
		Relativní četnost	<b>45,9%</b>	<b>41,4%</b>	<b>53,6%</b>	26,4%	36,2%	41,4%
Celkem		Absolutní četnost	314	70	69	106	127	686
		Relativní četnost	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



Graf 19 Rozdělení odpovědí na otázku „Z jakého důvodu by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci?“

Nejvíce respondentů 284 (41,4 %) považuje za vážný problém zúžení genetické základny, zneužití se bojí 239 (34,8 %) a negativní vliv na klasické šlechtitelství vnímá 110 (16,0 %) dotázaných. V České republice (49,5 %), Německu (41,4 %) a Velké Británii (53,6 %) mají respondenti největší obavu ze zúžení genetické základny. Respondenti z Argentiny (40,6 %) a Francie (44,1 %) vnímají za vážný problém nebezpečí zneužití.



- využití klonů ve sportu

### ***KLONOVÁNÍ A ETIKA VE SPORTU***

***Hypotéza 4: Rozdíly v odpovědích na otázku „V koňském pólu, a v návaznosti na povolení Mezinárodní jezdecké federace (FEI) z roku 2012, je účast klonovaných koní možná i v soutěžích FEI. Je to správné rozhodnutí?“ (Otázka č. 14)***

Čtvrtá hypotéza sleduje rozdíly mezi státy v odpovědích na otázku účasti klonovaných koní v soutěžích FEI. Testované hypotézy budou ve tvaru:

$H_0$ : Souhlas s účastí klonovaných koní v soutěžích FEI se neliší podle států

$H_1$ : Souhlas s účastí klonovaných koní v soutěžích FEI se liší podle států

Na základě provedeného testu ( $G = 60,060$ ;  $p$ -hodnota =  $0,000$ ), kdy  $p$ -hodnota testu je opět nižší než  $\alpha = 5\%$ , testovanou hypotézu  $H_0$  zamítáme. Na hladině významnosti  $\alpha = 5\%$  můžeme říci, **že v této otázce existují mezi zeměmi statisticky významné rozdíly.**

Výsledky dotazníkového šetření jsou shrnuty v kontingenční tabulce a zajímavé hodnoty jsou vyznačeny červeně; Tabulka 8. Graf 20 názorně zobrazuje rozdělení odpovědí podle států.

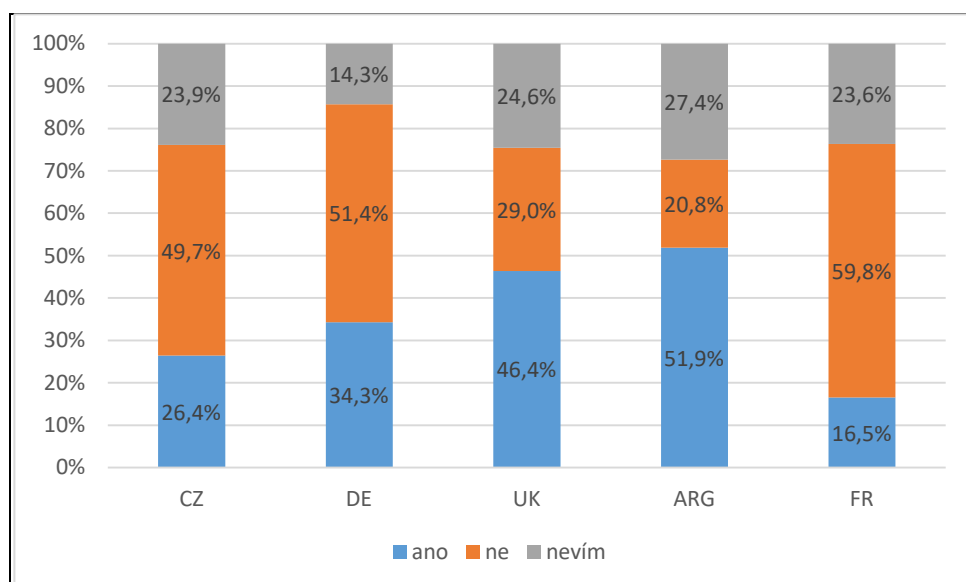
Výsledky  $\chi^2$ -testu (výstup programu SPSS):

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	60,060 <sup>a</sup>	8	,000
Likelihood Ratio	62,927	8	,000
N of Valid Cases	686		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 16,19.

*Tabulka 8 Kontingenční tabulka sledující souhlas s účastí klonovaných koní v soutěžích FEI podle států*

			Stát					Celkem
			CZ	DE	UK	ARG	FR	
KLONOVÁNÍ A ETIKA VE SPORTU V koňském pólu, a v návaznosti na povolení Mezinárodní jezdecké federace (FEI) z r. 2012, je účast klonovaných koní možná i v soutěžích FEI. Je to správné rozhodnutí?	ano	Absolutní četnost	83	24	32	55	21	215
		Relativní četnost	26,4%	34,3%	<b>46,4%</b>	<b>51,9%</b>	16,5%	31,3%
	ne	Absolutní četnost	156	36	20	22	76	310
		Relativní četnost	<b>49,7%</b>	<b>51,4%</b>	29,0%	20,8%	<b>59,8%</b>	45,2%
	nevím	Absolutní četnost	75	10	17	29	30	161
		Relativní četnost	23,9%	14,3%	24,6%	27,4%	23,6%	23,5%
Celkem		Absolutní četnost	314	70	69	106	127	686
		Relativní četnost	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



Graf 20 Rozdělení odpovědí na otázku „V koňském pólu, a v návaznosti na povolení Mezinárodní jezdecké federace (FEI) z roku 2012, je účast klonovaných koní možná i v soutěžích FEI. Je to správné rozhodnutí?“

Rozhodnutí FEI považuje za správné 239 (34,8 %) dotázaných. Celkem 310 (45,2 %) odpovědí bylo negativních. S účastí klonů koní v soutěžích pod hlavičkou FEI nejvíce souhlasí respondenti z Argentiny (51,9 %) a Velké Británie (46,4%). Naopak nesouhlasí respondenti z Francie (59,8 %), Německa (51,4 %) a České republiky (49,7 %).

### **PROČ SE KONĚ KLONUJÍ?**

**Hypotéza 5: Rozdíly v odpovědích na otázku: „Myslíte si, že důvodem je sportovní aspekt (touha po tom, aby klon zopakoval výkony svého dárce)?“ (Otázka č. 18)**

Pátá hypotéza sleduje rozdíly v odpovědích na otázku sledující sportovní aspekt jako důvod klonování koní. Testované hypotézy budou ve tvaru:

$H_0$ : Souhlas s tvrzením, že hlavním důvodem klonování koní je sportovní aspekt, se neliší podle jednotlivých států

$H_1$ : Souhlas s tvrzením, že hlavním důvodem klonování koní je sportovní aspekt, se liší podle jednotlivých států

Na základě provedení testu ( $G = 65,562$ ;  $p$ -hodnota = 0,000), kdy  $p$ -hodnota testu je opět nižší než  $\alpha = 5 \%$ , testovanou hypotézu  $H_0$  zamítáme. Na hladině významnosti  $\alpha = 5 \%$  můžeme říci, že souhlas s tvrzením, že hlavním důvodem klonování koní je sportovní aspekt, tj. touha po tom, aby klon zopakoval výkony svého dárce, se liší podle jednotlivých států.

Výsledky dotazníkového šetření jsou shrnuty v kontingenční tabulce a zajímavé hodnoty jsou vyznačeny červeně; Tabulka 9. Graf 21 názorně zobrazuje rozdělení odpovědí podle států.

Výsledky  $\chi^2$ -testu (výstup programu SPSS):

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	65,562 <sup>a</sup>	16	,000
Likelihood Ratio	64,704	16	,000
N of Valid Cases	686		

a. 6 cells (24,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,21.

V průběhu testu bylo zjištěno, že existuje 24 % polí, kde jsou očekávané četnosti nižší než 5. Pro správné provedení a vyhodnocení testu se doporučuje, aby polí s očekávanou četností méně než 5 bylo maximálně 20 %. Proto musíme přistoupit ke sloučení některých odpovědí. V rozhodnutí, jaké odpovědi sloučit, nám pomůže pohled na kontingenční tabulku. Vzhledem k malému počtu odpovědí „spíše ne“ a „určitě ne“ se nabízí sloučení těchto dvou kategorií do jedné. Byl opět proveden  $\chi^2$ -test nezávislosti v kontingenční tabulce ( $G=56,475$ ;  $p$ -hodnota= $0,000$ ).

Výsledky  $\chi^2$ -testu po redukci kategorií jsou následující:

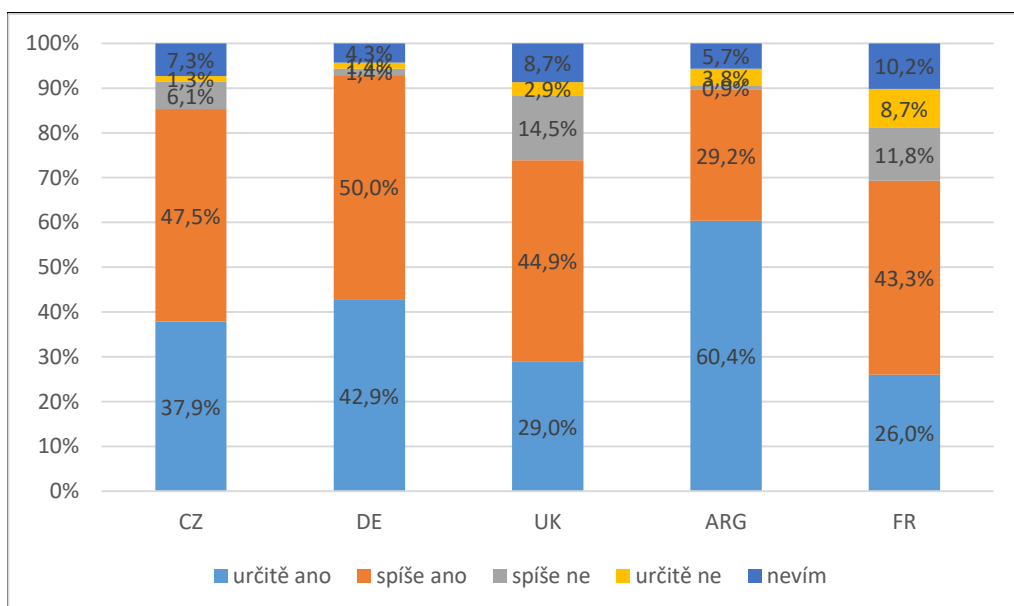
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	56,475 <sup>a</sup>	12	,000
Likelihood Ratio	54,361	12	,000
N of Valid Cases	686		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,13.

I na základě tohoto testu hypotézu  $H_0$  zamítáme. Po úpravě dat stále **existují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými státy v pohledu na to, že sportovní aspekt je hlavním důvodem pro klonování koní.**

Tabulka 9 Kontingenční tabulka sledující souhlas s tvrzením, že hlavním důvodem účasti klonovaných koní je sportovní aspekt podle států

			Stát					Celkem
			CZ	DE	UK	ARG	FR	
PROČ SE KONĚ KLONUJÍ?	určitě ano	Absolutní četnost	119	30	20	64	33	266
		Relativní četnost	37,9 %	42,9 %	29,0 %	60,4 %	26,0 %	38,8 %
Myslíte si, že důvodem je	spíše ano	Absolutní četnost	149	35	31	31	55	301
		Relativní četnost	47,5 %	50,0 %	44,9 %	29,2 %	43,3 %	43,9 %
sportovní aspekt (touha po tom, aby klon zopakoval	spíše ne	Absolutní četnost	19	1	10	1	15	46
		Relativní četnost	6,1%	1,4%	14,5%	0,9%	11,8%	6,7%
výkony svého dárce)?	určitě ne	Absolutní četnost	4	1	2	4	11	22
		Relativní četnost	1,3%	1,4%	2,9%	3,8%	8,7%	3,2%
	nevím	Absolutní četnost	23	3	6	6	13	51
		Relativní četnost	7,3%	4,3%	8,7%	5,7%	10,2%	7,4%
Celkem		Absolutní četnost	314	70	69	106	127	686
		Relativní četnost	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



Graf 21 Rozdělení odpovědí na otázku „Myslíte si, že důvodem je sportovní aspekt (touha po tom, aby klon zopakoval výkony svého dárce)?“

S tvrzením, že hlavním důvodem klonování koní je sportovní aspekt, souhlasí respondenti ve všech zemích, celkem 567 (82,7 %) odpovědí „určitě ano“ a „spíše ano“. Největší míra souhlasu je u respondentů z Argentiny (60,4 % „určitě ano“), přičteme-li i respondenty, kteří spíše souhlasí (29,2 % „spíše ano“), vyjádřilo souhlas 89,6 % respondentů. Nejmenší míru souhlasu vyjádřili francouzští respondenti, a to 69,3 % (26 % „určitě ano“ a 43,3 % „spíše ano“). Průzkum ukázal, že hlavním důvodem klonování koní je sportovní aspekt, ale pouze angličtí a argentinští respondenti s využitím klonů ve sportu souhlasí.

- Je klonování morálně správné?

### ETIKA KLONOVÁNÍ

**Hypotéza 6: Rozdíly v odpovědích na otázku „Je klonování „morálně“ správné“? (Otázka č. 8)**

Šestá hypotéza sleduje hodnocení respondentů z pohledu na etickou stránku klonování. Testovaná hypotéza bude ve tvaru:

H<sub>0</sub>: Hodnocení, zda je klonování „morálně“ správné se neliší podle států

H<sub>1</sub>: Hodnocení, zda je klonování „morálně“ správné se liší podle států

Na základě provedeného testu (G = 179,574; p-hodnota = 0,000), kdy p-hodnota testu je opět nižší než  $\alpha = 5\%$ , testovanou hypotézu H<sub>0</sub> zamítáme. Na hladině významnosti  $\alpha = 5\%$  **jsme tak v odpovědi na otázku morální správnosti klonování prokázali statisticky významné rozdíly mezi sledovanými zeměmi.**

Výsledky dotazníkového šetření jsou shrnuty v kontingenční tabulce a zajímavé hodnoty jsou vyznačeny červeně; Tabulka 10. Graf 22 názorně zobrazuje rozdělení odpovědí podle států.

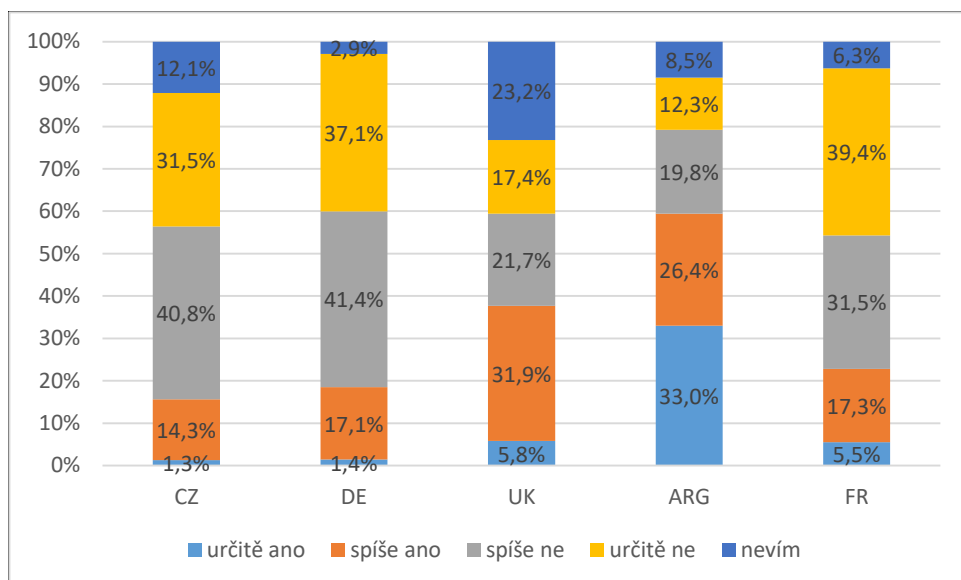
Výsledky  $\chi^2$ -testu (výstup programu SPSS):

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	179,574 <sup>a</sup>	16	,000
Likelihood Ratio	149,133	16	,000
N of Valid Cases	686		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,13.

Tabulka 10 Kontingenční tabulka sledující hodnocení, zda je klonování „morálně“ správné podle států

			Stát					Celkem
			CZ	DE	UK	ARG	FR	
ETIKA KLONOVÁNÍ Je klonování "morálně" správné?	určitě ano	Absolutní četnost	4	1	4	35	7	51
		Relativní četnost	1,3%	1,4%	5,8%	<b>33,0%</b>	5,5%	7,4%
	spíše ano	Absolutní četnost	45	12	22	28	22	129
		Relativní četnost	14,3%	17,1%	31,9%	<b>26,4%</b>	17,3%	18,8%
	spíše ne	Absolutní četnost	128	29	15	21	40	233
		Relativní četnost	<b>40,8%</b>	<b>41,4%</b>	21,7%	19,8%	<b>31,5%</b>	34,0%
	určitě ne	Absolutní četnost	99	26	12	13	50	200
		Relativní četnost	<b>31,5%</b>	<b>37,1%</b>	17,4%	12,3%	<b>39,4%</b>	29,2%
	nevím	Absolutní četnost	38	2	16	9	8	73
		Relativní četnost	12,1%	2,9%	<b>23,2%</b>	8,5%	6,3%	10,6%
Celkem		Absolutní četnost	314	70	69	106	127	686
		Relativní četnost	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%



Graf 22 Rozdělení odpovědí na otázku „Je klonování "morálně" správné?“

Za morálně správné považuje klonování pouze 129 (26,2 %) z celkového počtu respondentů (7,4 % „určitě ano“ a 18,8 % „spíše ano“). Česká republika, Německo a Francie zaujímají k této otázce výrazně negativní postoj. Naopak v Argentině je klonování vnímáno většinou jako morální (59,4 %). Na pomezí se nachází Velká Británie, kde 37,7 % respondentů (5,8 % „určitě ano“ a 31,9 % „spíše ano“) považuje klonování za morálně správné, ale téměř stejný počet dotázaných, 39,1 % (21,7 % „spíše ne“ a 17,4 % „určitě ne“), se vyslovila proti. Proti ostatním zkoumaným zemím je také ve Velké Británii větší množství odpovědí „nevím“ (23,2 %).

## 6 Diskuze

Informace o klonování koní, dostupné ve vědecké literatuře, neumožňují celkový pohled na vývoj a širší využití této biotechnologie. To nás ospravedlňuje k tomu, aby byly použity různé zdroje za účelem shromáždit podrobnější informace o dané problematice. Diskutovány jsou vybrané otázky realizovaného dotazníkového průzkumu.

Přestože klonování zůstává velmi neefektivním procesem a náklady na produkci klonů jsou stále poměrně vysoké, počet koňských klonů roste (Olivera et al. 2016; Teixeira et al. 2019). Přesná čísla počtu klonů žijících po celém světě však není možné získat, viz kapitola 3.1.4. Vývoj v této oblasti vyvolává četné otázky a nedostatečné informace přispívají dokonce i k odmítání této technologie. S přijetím či odmítnutím souvisí do značné míry i náboženské a kulturní tradice jednotlivých zemí (Reis 2013).

### 6.1 Informovanost o klonování

Ze získaných výsledků dotazníkového výzkumu se zdá, že informace i poznatky o klonování nejsou pro odbornou a laickou veřejnost z oblasti jezdeckví, chovatelství a veterinární medicíny, zcela dostupné nebo srozumitelné. Většina dotázaných z České republiky (85,4 %) se vyslovila, že nejsou na dostatečné úrovni. Dokonce jedna pětina (21,3 %) o klonování zvířat nikdy neslyšela, což patrně souvisí s nedostatečnou medializací této problematiky v naší zemi. Zajímavé srovnání naopak přináší průzkum veřejného mínění Eurobarometr, který si v roce 2008 nechal zpracovat Evropský parlament ve všech členských státech EU. Zde pouze 7 % dotázaných uvedlo, že o klonování ještě neslyšelo (Weimer 2009).

### 6.2. Bezpečnost konzumace masa z klonovaných zvířat.

V některých částech Evropy je konzumace koňského masa běžná. V současné době probíhá v rámci EU intenzivní debata o klonování hospodářských zvířat a možných zdravotních účincích konzumace masa z klonovaných zvířat na člověka. Nabízí se otázka, zda jsou tyto obavy odůvodněné a pokud ano, platí i pro koně? Vědecké důkazy naznačují, že obavy opodstatněné nejsou (Campbell 2016). Znepokojení s použitím klonovaných zvířat při výrobě potravin spíše souvisí se zdravím a dobrými životními podmínkami zvířat (Weimer 2009). Výsledky dotazníkového šetření ukazují, že v České republice nedůvěřuje v bezpečnost masa z klonovaných zvířat 38,9 % respondentů. V Argentině má naopak nadpoloviční většina odpovídajících v jeho bezpečnost důvěru. Není to žádným překvapením, protože pozici světového lídra v produkci klonovaného masa drží právě Argentina. Podle dostupných údajů, přijetí klonování jako výzkumného nástroje v biomedicině je pro veřejnost přijatelné, ale nikoli jeho použití v oblasti

zemědělství. Zdá se, že evropští občané rozlišují mezi lékařským a zemědělským využitím a jsou skeptičtí k biotechnologii, která se používá při chovu zvířat nebo při výrobě potravin (Banati 2009).

### 6.3 Využití klonů v potravinovém řetězci v rámci EU

Ze zprávy Evropské komise z roku 2015 vyplývá, že klonování k reprodukci zvířat používá USA, Kanada, Argentina a Austrálie. Klonování pro komerční živočišnou výrobu probíhá i v jiných zemích jako je Brazílie, Nový Zéland, Chile, Čína a Uruguay a klonovaná zvířata i jejich produkty vstupují do potravinového řetězce. O spotřebě koňského masa z klonů nejsou žádné údaje, protože maso není nijak označeno. Vystává proto otázka týkající se práva spotřebitelů vědět, co konzumují. Je třeba brát v úvahu stávající právní rámec a touhu spotřebitelů po relevantních informacích.

Dle Centner (2019) dnes neexistuje žádná záruka, že steak nebo hamburger, který jíte, nepochází z klonovaného zvířete. V EU je takové použití klonů zakázáno. Weimer (2009) uvádí, že 58 % dotazovaných z členských zemí EU se domnívá, že klonování pro potravinářské účely nemá své opodstatnění. Z dotazníkového průzkumu je vidět jiné procentuální zastoupení respondentů v České republice (70 %), kteří s postojem EU souhlasí, což může být dáno tím, že mezi anketami je více než desetiletý odstup a průzkumem získaná data (na rozdíl od zjištění Eurobarometru) se netýkala široké veřejnosti.

### 6.4 Etický aspekt klonování

Campbell (2016) uvádí, že zásadní rozdíl mezi klonovaným zvířetem a zvířetem, které vzniklo jinými metodami asistovaných reprodukčních technologií (ART's) je ten, že klonováním vzniká již existující zvíře, zatímco u ostatních metod asistované reprodukce vzniká zvíře nové. Dále popisuje, že jeden z průzkumů veřejného mínění ohledně klonování zvířat ukázal, že pojem „morálně“ správné, je nejdůležitějším faktorem pro podporu této biotechnologie. Zdá se, že klonování překračuje pomyslnou hranici mezi přirozeným a nepřirozeným. V průzkumu Eurobarometr z roku 2008, se 61 % respondentů domnívá, že klonování zvířat je „morálně“ nesprávné. S tímto zjištěním korespondují výsledky dotazníkového šetření, kde (63 %), tedy většina respondentů ze zkoumaných zemí (Francie, Německo, Velká Británie a Česká republika), považuje klonování za „morální“ problém. Stejně tak údaje z jiného průzkumu veřejného mínění ukazují, že 64 % Američanů je přesvědčeno, že klonování zvířat je „morálně“ špatné. Přesto téměř neexistuje veřejná diskuze o této technologii nebo poptávka po přísnějších předpisech (Fiester 2005). Naproti



tomu více jak polovina (59,4 %) respondentů dotazníkového průzkumu v Argentině vnímá klonování za „morálně“ přijatelné.

Naše společnost nevyřešila ani ty nezákladnější otázky o morálním statusu zvířat a zacházení s nimi. Dokonce i otázky, které se zdály být vyřešeny v minulosti, se nyní revidují. Například morální oprávněnost pokusů na zvířatech. Rozsáhlý průzkum agentury Gallup zjistil, že pouze 32 % Američanů si myslí, že lékařské testy na zvířatech jsou „morálně“ nesprávné (Fiester 2005).

#### 6.4.1 Otázka „sériově“ vyráběných zvířat

„Sériově“ vyráběná zvířata považuje za etický problém 87,4 % respondentů ve Francii. Jedná se o nejvyšší procentuální zastoupení ze všech zkoumaných zemí. Toto téma je zde velmi diskutované, a proto je možné se domnívat, že je do značné míry ovlivněno i názory velké skupiny filosofů, biologů a právníků, kteří se zabývají otázkou ochrany, postavením a právy zvířat. Zájem obyvatel Francie o imperativy ochrany zvířat v posledních letech výrazně narůstá (Chapouthier 2013). Téměř dvě třetiny respondentů z Argentiny „sériově“ vyráběná zvířata za etický problém nepovažují. Reis (2013) ve své studii dospěla ke stejnému závěru. V Argentině, Brazílii a Spojených arabských emirátech nepředstavují „sériově“ vyráběná zvířata etický problém, v Belgii spíše ano a ve Francii určitě ano.

#### 6.4.2 Proč klonovat?

Celkově lze konstatovat, že necelé dvě třetiny respondentů jsou přesvědčeny, že hlavním důvodem pro klonování má být zachování ohrožených druhů. Komerční producenti klonů však zdůrazňují použití této technologie především jako prostředek pro reprodukci jedinců, kteří se již reprodukovat nemohou. Naopak Centner (2019) ve své knize popisuje jako hlavní důvod pro klonování hospodářských zvířat jejich genetické vylepšení. Vytváření zvířat s požadovanými vlastnostmi tak, aby jejich potomci mohli být použiti pro výrobu potravin. Klonování hospodářských zvířat však otevírá širokou škálu bezpečnostních, právních a společenských otázek; ve hře jsou také politické zájmy (např. globální obchod). Názory na roli a význam jídla, kulturní a sociální tradice s ním spojené se v Evropě a ve světě značně liší.

### 6.5 Klonování koní a FEI

Dotazníkem byla také zkoumána otázka, zda Mezinárodní jezdecká federace (FEI) učinila v roce 2012 správné rozhodnutí, když umožnila klonům a jejich potomkům účast v jezdeckých soutěžích pořádaných pod její hlavičkou. S tím souhlasí mírně nadpoloviční počet respondentů v Argentině. Pravděpodobně proto, že The Argentine Association of Polo Pony Breeders (AACCP, Asociace chovatelů pólo pony) umožňuje registraci klonů a mezinárodních soutěží v koňském pólu

se klony také běžně účastní. Biolog Dr. Adrián Mutto je přesvědčen, že klony dědí i naučené chování dárce, a že určitá vlastnost se zároveň s DNA předává na potomstvo. Poznání epigenetických vlivů je na samém počátku, je však jisté, že klony koní projevují chování, aniž by se jej museli učit a jejich trénink je o poznání snazší. Tato slova potvrzuje i Adolfo Gambiaso, uznávaný hráč póla a průkopník klonování, který sám vlastní šest klonů své vynikající klisny Cuartetera (Lopez Frias 2019). Česká republika (49,7 %), Francie (59,8 %) a Německo (51,4 %) ovšem s rozhodnutím FEI nesouhlasí, i když k dnešnímu dni je známo, že klony nebo jejich potomci se pravidelně soutěží FEI účastní.

## **6.6 Klonování koní a sport**

Z výsledků dotazníku dále vyplývá, že respondenti všech zkoumaných zemí vnímají jako důvod pro klonování touhu po tom, aby klon zopakoval sportovní výkony svého dárce. Průměrná dědivost sportovní výkonnosti je však u koní nízká, protože na výkonnost má vliv hodně faktorů, např. trénink, schopnost být ježděn, krmení, odchov atp.

Reis (2013) také ve své práci uvádí zajímavý příklad. Pokud bychom vzali všechny hráče póla s přiděleným handicapem +10, mající obvykle pro hru 4 koně (klisny jsou preferovány před valachy nebo hřebci), pak tento sport představuje potenciální trh čítající 25 až 100 kandidátních koní vhodných ke klonování (do sportu a chovu) s tím, že obrat této populace je jen 2 roky. Z ostatních disciplín popisuje 132 koní (skoky 100, drezura 24, soutěže všestrannosti 11 a vytrvalost 8), kteří by přicházeli v úvahu pro naklonování.

## **6.7 Identifikace klonů koní**

Jen 41,1 % dotazovaných se domnívá, že identifikace koní v případě klonování pomocí mikročipu je dostačující. V České republice převládá ohledně této metody ještě větší skepse (33,8 %). Při nedostupnosti nebo nefunkčnosti mikročipu je identifikace pomocí DNA nemožná. Klon koně a dárcovské zvíře mají DNA totožnou, což znemožňuje použít tuto metodu identifikace. Jednou z možností je testování mitochondriální DNA (mtDNA) jak vyžaduje Argentina. Sociedad Rural Argentina (SRA) klonovaného kloně bez tohoto testu nezaregistruje. V případě vzniku klonů agregací embryí je existence chimérismu pro testování mtDNA problematická viz kapitola 3.1.2.6. Za povšimnutí proto stojí fakt, že zrovna respondenti z Argentiny považují mikročipování za dostačující způsob identifikace.

## 6.8 Nebezpečí zneužití, rizika spojená s klonováním

Dle Broom (2014) by genetická uniformita produkované populace mohla zvýšit riziko epidemií onemocnění. Respondenti z České republiky (45,9 %), Německa (40,8 %) a Velké Británie (53,6 %) si myslí, že právě klonování vede k zúžení genetické základny. Tento výsledek úplně nekoresponduje s výzkumem veřejného mínění Eurobarometr z roku 2008, kdy šest z deseti dotazovaných (63 %) bylo přesvědčeno, že klonování snižuje genetickou rozmanitost hospodářských zvířat.

Z provedeného výzkumu dále vyplývá, že nebezpečí zneužití této biotechnologie se nejvíce bojí respondenti Argentiny (40,6 %) a Francie (44,1 %). Pokrok v biologických a veterinárních vědách vyvolává u respondentů obavy z jejich nepředvídatelných důsledků pro lidstvo. V této otázce se průzkum Eurobarometr (Weimer 2009) s výsledky dotazníkového šetření výrazně neshoduje. Až 77 % respondentů se tehdy domnívalo, že klonování zvířat povede ke zneužití, např. ke klonování lidí.

## 6.9 Legislativní rámec

Existuje hranice vědeckého bádání, a co limituje jeho svobodu? Provedený výzkum ukázal, že jen 7 % respondentů považuje legislativu a ostatní předpisy týkající se klonování za dostačující. V České republice se jednalo o pouhé 4 %. Tento výsledek potvrzuje Kavan (2010), který říká, že právo bude vždy zaostávat za technickým pokrokem. Údělem práva je upravovat až vzniklou situaci, alespoň co se vědeckého pokroku týče i jeho možných neblahých následků.

Došlo k zmrazení návrhu Směrnice evropského parlamentu a Rady o klonování zvířat z řad skotu, prasat, ovcí, koz a koňovitých chovaných a rozmnožovaných pro hospodářské účely z roku 2015 ([europarl.europa.eu/legislative-train/theme-agriculture-and-rural-development-agri/file-cloning-of-animals/12-2019](http://europarl.europa.eu/legislative-train/theme-agriculture-and-rural-development-agri/file-cloning-of-animals/12-2019)). V říjnu 2019 se Konference předsedů parlamentů zemí EU rozhodla navrhnout, aby jednání o klonování zvířat začala od začátku. Očekává se, že dojde k rozšíření poznatků o dopadu klonování na dobré životní podmínky zvířat, a zároveň i ke zdokonalení této biotechnologie. Proto by mělo být možné tyto zákazy přehodnotit a aktualizovat. Výbor pro mezinárodní obchod podal návrh, aby jako právní nástroj bylo použito nařízení místo směrnice. Tím by se zvýšila právní jistota a jednotnost v prosazování zákazu klonování. Nařízení by mělo být po uplynutí přiměřené doby podrobena přezkumu s přihlédnutím ke zkušenostem, které získají členské státy při jeho uplatňování, ke změnám v názorech spotřebitelů a mezinárodnímu vývoji, zejména k obchodním tokům a obchodním vztahům Unie (personal communication).

Heyman et al (2005) také poukázali na fakt, že na evropské úrovni je potřebná koordinace činností, které umožňují základní výzkum v oblasti klonování a současně je nutné rozvíjet mezinárodní výzkumý program týkající se rizik spojených s touto biotechnologií.

Na závěr diskuze lze konstatovat, že stále převládají mnohé nejasnosti kolem tohoto tématu. Respondenti by jistě přivítali více informací, jejich transparentnost i dostupnost, ale hlavně větší srozumitelnost. Tyto změny by pravděpodobně poskytly odpovědi na otázky, které si veřejnost klade a zabránily by mylným představám a předsudkům, kterými je proces klonování koní stále obklopen.

## 7 Závěr

V předložené diplomové práci bylo posouzeno šest hypotéz s cílem potvrdit domněnku, že existuje statisticky významný rozdíl ve vnímání problematiky klonování koní u odborné i laické veřejnosti v oblasti jezdeckví, chovatelství a veterinární medicíny ve vybraných zemích (Francie, Velká Británie, Německo, Argentina, Česká republika). Z dat získaných od 686 respondentů z uvedených zemí bylo všech šest hypotéz potvrzeno.

- V **bezpečnost** konzumace masa z klonovaných zvířat nejvíce věří respondenti z Argentiny (56,6 %). V České republice převládá negativní postoj (38,9 %).
- S přístupem EU, která **využití klonů v potravinovém řetězci** zakázala, souhlasí nejvíce Francie (81,1 %) následovaná Českou republikou (70 %). Naproti tomu s tímto přístupem většinou nesouhlasí Argentina (39,7 %), která je světovým lídrem v produkci klonovaného masa.
- 45,9 % dotázaných v České republice má obavu, že klonování povede k **zúžení genetické základny**, respondenti z Argentiny a Francie se pro změnu nejvíce bojí **zneužití této technologie**.
- S **účastí klonů ve sportu** více souhlasí respondenti z Velké Británie a Argentiny, naopak nesouhlasí respondenti z České republiky (49,7 %) a z ostatních sledovaných zemí.
- Se **sportovním aspektem** jako důvodem klonování souhlasí většina respondentů ze zkoumaných zemí. Největší míra souhlasu byla zjištěna v Argentině (89,6 %).
- Za „**morálně**“ **správné** považuje klonování 59,4 % dotazovaných v Argentině, v České republice jen 15,6 %.
- V průzkumu byly nejvíce zastoupeny ženy. Argentina byla jedinou zemí, kde mezi odpovídajícími převažovali muži.
- Nejvíce se k dané problematice vyjadřovali lidé s **vysokoškolským vzděláním**.
- 85,4 % (!) respondentů z České republiky se vyslovilo, že **komunikace o klonování není na dostatečné úrovni**.
- Necelá polovina dotázaných považuje informace o klonování za **nesrozumitelné** (v České republice 44 %).
- Zdrojem informací o klonování jsou především **média** (internet, denní tisk, TV), což je důvod, proč mají respondenti často zkreslené a zavádějící informace.

Z výše uvedeného lze na závěr konstatovat, že je třeba **zvýšit povědomí veřejnosti** o genetickém inženýrství a o klonování zvířat, aby se vyjasnily sociokulturní a náboženské otázky, kterým tento technologický pokrok čelí. Klonování koní se pak možná setká s úspěchem stejně,

jako k tomu došlo u umělé inseminace či embryotransferu. Tyto biotechnologie byly také na počátku jejich použití silně kritizovány.

Argentina, zejména díky chovu koní na pólo (Polo Pony), které dodává do celého světa, se stává lídrem „klonovacího průmyslu“. Evropa také představuje trh s dobrým potenciálem, který ovšem závisí na předpisech, které budou diktovány různými registry plemen. Stejně tak se čeká na rozhodnutí Evropského parlamentu, který by měl v letošním roce začít projednávat pozměňovací návrhy ke směrnici navržené roku 2015 a týkající se klonování zvířat. Existuje však důvodná obava, že právní úprava bude i nadále pokulhávat za možnostmi vědy a dosaženými vědeckými poznatky.

Evropa je stále vůči této reprodukční biotechnologii spíše zdrženlivá. Pokud tomu tak zůstane, bude klonování koňovitých v Evropě pravděpodobně omezeno jen na základní výzkum, nebo na zachování ohrožených druhů.

## 8 Literatura

Allen WR, Pashen R L. 1984. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *Journal of Reproduction and Fertility* **71**:607-613.

Alvarenga MA, Carmo MT, Landim-Alvarenga FC. 2008. Superovulation in mares: Limitations and perspectives. *Pferdeheilkunde* **24**(1): 88-91.

Asseged BD, Habtemariam T, Tameru B, Nganwa D. 2012. The risk of introduction of equine infectious anemia virus into USA via cloned horse embryos imported from Canada. *Theriogenology* **77**(2):445-58.

Banati D. 2009. Animal cloning for food supply: A review. *Acta Alimentaria* **38**(1):117-132.

Bedford SJ, Kurokawa M, Hinrichs K, Fissore RA. 2004. Patterns of Intracellular Calcium Oscillations in Horse Oocytes Fertilized by Intracytoplasmic Sperm Injection: Possible Explanations for the Low Success of This Assisted Reproduction Technique in the Horse. *Biology of Reproduction* **70**: 936-944.

Broom DM. 2018. Animal welfare and the brave new world of modifying animal. Pages 172 - 180 in T. Grandin and M. Whiting, editors. *Are we Pushing Animals to their Biological Limits?* Wallingford: CABI.

Bruck I, Grondahl C, Host T, Greve T. 1996. In vitro maturation of equine oocytes: Effect of follicular size, cyclic stage and season. *Theriogenology* **46**: 76-84.

Campbell MLH, Sandoe P. 2015. Welfare in horse breeding. *Vet. Rec.* **176**: 436-440.

Campbell MLH. Is cloning horses ethical? 2016. *Equine Veterinary Education*. Available from <https://doi:10.1111/eve.12566>.

Centner TJ. 2019. *Consumers, Meat and Animal Products: Policies, Regulations and Marketing*. Routledge. London.

CRESTVIEW. 2015. *Game of Clones*.

<http://www.cviewfarm.com/images/PDF/Game%20of%20Clones%20Spread1.pdf> Available from (accessed October 2019).

Deleuze S, Dubois CS, Caillaud M, Bruneau B, Goudet G, Duchamp G. 2010.

Influence of cysteamine on in vitro maturation, in vitro and in vivo fertilization of equine oocytes. *Reprod Domest Anim* **45**(1): 1-7.

europarl.europa.eu. 2019. Legislative train schedule.

Available from <https://www.europarl.europa.eu/legislative-train/theme-agriculture-and-rural-development-agri/file-cloning-of-animals/12-2019> (accessed March 2020).

- ec.europa.eu. 2008. Comm Front Office. Available from [https://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/flash/fl\\_238\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/flash/fl_238_en.pdf) (accessed January 2020).
- ec.europa.eu. 2015. Agriculture and rural development. Available from [https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/external-studies/2015/clone-offspring-labelling/final-report\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/external-studies/2015/clone-offspring-labelling/final-report_en.pdf) (accessed January 2020).
- Evropský parlament. 2020. Eurobarometr. Available from <https://www.europarl.europa.eu/at-your-service/cs/be-heard/eurobarometer> (accessed January 2020).
- Eyachew A, Gizachew F, Ayalew N, Fentahun M, Mebrie Z, Fikre Z. 2017. Review on Applications of Genetic Engineering And Cloning in Farm animals. *Dairy and Vet Sci J* **4**(1): 555629. DOI: 10.19080/JDVS.2017.04.555629
- Farias D, Bunn S, Friso A, Thaler Neto A, Mezzalira A, Pinto M, Oliveira R, Mozzaquatro F. 2019. Superovulatory protocol with equine pituitary extract (EPE) in mares crioula and the Quarter Horse. *Ciência Animal Brasileira* **20**(1): 1-8.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**: 836-848.
- Fiester A. 2005. Ethical Issues in Animal Cloning. Penn Libraries. Available from [http://repository.upenn.edu/bioethics\\_papers/35](http://repository.upenn.edu/bioethics_papers/35) (accessed February 2020).
- Fulka J Jr, Okolski A. 1981. Culture of horse oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* **61**: 213-215.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. 2003a. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* **424**: 635.
- Galli C, Lagutina I, Lazzari G. 2003b. Introduction to Cloning by Nuclear Transplantation. *Cloning and stem cells* **5**(4): 223-232.
- 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**(1-2): 39-55.
- Galli C, Lagutina I, Duchi R, Colleoni S, Lazzari G. 2008. Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reproduction in Domestic Animals* **43** (Suppl. 2): 331-337.
- Galli C, Lagutina I, Duchi R, Colleoni S, Lazzari G. 2014. Principles of Cloning (Chapter 22-Cloning of Equine): 287-297. Available from <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386541-0.00022-9>.



- Gambini A, Jarazo J, Olivera R, Salamone DF. 2012. Equine Cloning: In Vitro and In Vivo Development of Aggregated Embryos. *Biology of reproduction* **87**(1): 15, 1-9.
- Gambini A, Jarazo J, Karlanian F, De Stéfano A, Salamone DF. 2014. Effect of collection-maturation interval time and pregnancy status of donor mares on oocyte developmental competence in horse cloning. *Journal of Animal Science* **92**: 561-567.
- Gambini A, Maserati M. 2018. A journey through horse cloning. *Reproduction, Fertility and Development* **30**: 8-17.
- Gambini A, Salamone D. 2019. The relevance of the donor cell in horse cloning. *Equine Assisted Reproduction (Chapter X)*: 77-89. In print.
- Gregg K, Polejaeva I. 2009. Risk of equine infectious anemia virus disease transmission through in vitro embryo production using somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* **72**(3): 289-99.
- Grondahl C, Hyttel P, Grondahl ML, Eriksen T, Gotfredsen P, Greve T. 1995. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Molecular Reproduction and Development* **42**: 94-105.
- Hinrichs K. 2005. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology* **64**(3): 344-351.
- Hinrichs K. 2006a. Equine Cloning. *Vet Clin Equine* **22**: 857-866.
- Hinrichs K. 2006b. A Review of Cloning in the Horse. *Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners Proceedings* **52**: 398-401.
- Hinrichs K, Choi YK, Varner DD, Hartman DL. 2007. Production of horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. *Reproduction* **134**: 319-325.
- Hinrichs K. 2012. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reprod. Fertil. Dev.* **25**: 80-93.
- Hinrichs K. 2018. Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals* **53**(15): 4-13.
- Chang AS, Moley KH, Wangler M, Feinberg AP, DeBaun MR. 2005. Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertility and Sterility* **83**:349-354.
- Chapouthier G. 2013. *Zvířecí práva*. TRITON, Praha.
- Chavatte-Palmer P, Peugnet P, Robles M. 2017. Developmental programming in equine species: relevance for the horse industry. *Animal Frontiers* **7**(3): 48-54. DOI:10.2527/af.2017-0128.

Chen Z, Robbins KM, Wells KD, Rivera RM. 2013. Large offspring syndrome A bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics* **8**(6): 591-601.

Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD, Westhusin ME, Burghardt RC et al. 2002a. Production of nuclear transfer horse embryos by Piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. *Biology of Reproduction* **67**: 561-567.

Choi YH, Shin T, Love CC, Johnson C, Varner DD, Westhusin ME et al. 2002b. 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**(3): 1005-1011.

Choi YH, Love LB, Westhusin ME, Hinrichs K. 2004. Activation of equine nuclear transfer oocytes : methods and timing of treatment in relation to nuclear remodeling. *Biology of Reproduction* **70**: 46-53.

Choi YH, Love LB, Westhusin ME, Hinrichs K. 2004. Activation of equine nuclear transfer oocytes : methods and timing of treatment in relation to nuclear remodeling. *Biology of Reproduction* **70**(1): 46-53.

Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K, 2006. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* **66**(4): 955-963.

Choi YH, Norris JD, Velez IC, Jacobson CC, Hartman DL, Hinrichs K. 2013. A viable foal obtained by equine somatic cell nuclear transfer using oocytes recovered from immature follicles of live mares. *Theriogenology* **79**(5): 791-796.

Choi YH, Ritthaler J, Hinrichs K. 2014. Production of a mitochondrial-DNA identical cloned foal using oocytes recovered from immature follicles of selected mares. *Theriogenology* **82**(3):411-417.

Choi YH, Velez IC, Macías-García B, Hinrichs K. 2015. Timing factors affecting blastocyst development in equine somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.* **17**: 124-130.

Ibtisham F, Fahd Qadir MM, Xiao M, An L. 2017. Animal Cloning Applications and Issues. *Russian Journal of Genetics* **53**(9): 965-971.

Johnson AK, Clark-Price S C, Choi Y, Hartman D L, Hinrichs K. 2010. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004-2008). *J. Am. Vet. Med.Assoc.* **236**: 983-990.

Johnson AK, Hinrichs K. 2015. Neonatal care and management of foals derived by somatic cell nuclear transfer. *Methods Mol. Biol.* **1330**: 189-201.

- Kavan L. 2011. Klonování lidí jako problém ústavního práva [MSc. Thesis]. Právnická fakulta Masarykovy univerzity, Brno.
- Keefer CL. 2015. Artificial cloning of domestic animals. PNAS 112 (29): 8874-8878.
- Kheiron. 2019. Clones. Available from [http://www.kheiron-biotech.com/index\\_en.html](http://www.kheiron-biotech.com/index_en.html) (accessed December 2019).
- Kimura Y, Yanagimachi R, 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of Reproduction* **52**: 709-720.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Colleoni S, Ponderato N, Turini P et al. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses : effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction* **130**(4): 559-567.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I et al. 2006. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* **67**: 90-98.
- Li X, Tremoleda JL, Allen WR. 2003. Effect of the number of passages of fetal and adult fibroblasts on nuclear remodelling and first embryonic division in reconstructed horse oocytes after nuclear transfer. *Reproduction* **125**: 535-542.
- Lopez Frias FJ, Torres CR. 2019. The Ethics of Cloning Horses in Polo in advance. *International Journal of Applied Philosophy*. Available from <https://doi: 10.5840/ijap2019729114>.
- 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, Revora M, Rigali F, Herrera C, Viviani L, Quintans C, Pascualini S, Losinno L. 2010. 50 FIRST EQUINE CLONE BORN IN ARGENTINA BY SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER FROM A POLO ARGENTINO MARE. *Reproduction, Fertility and Development* **23** (1): 131-131.
- Niemann H, Lucas-Hahn A. 2012. Somatic cell nuclear transfert cloning : Practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim* **47** (suppl ): 2-10.
- Nolen RS. 2007. The ethics debate over animal cloning. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **230**: 467.
- Oback B, Wiersema AT, Gaynor P, Laible G, Tucker FC, Oliver JE, Miller AL, Troskie HE, Wilson KL, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, McMillan V, Tervit HR, Wells DN. 2003. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* **5**: 3-12.

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. Available from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164049>.

Olivera R, Moro LN, Jordan R, Pallarols N, Guglielminetti A, Luzzani C, Miriuka SG, Vichera G. 2018. Bone marrow mesenchymal stem cells as nuclear donors improve viability and health of cloned horses. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* **11**: 13-22.

Petr J. 2003. *Klonování. Hrozba nebo naděje?* Paseka, Praha.

Reis A de P, Palmer E. 2010. L'insertion des clones et enseignements du marché. *Équ'idée* **73**: 56-58.

Reis A de P, Nakhla M. 2012. Conception et planification dans les biotechnologies innovantes : le clonage équin. *Revue française de gestion industrielle* **31**(1): 35-58.

Reis A de P. 2013. *Complex Biologic Conception : Planning and business models. The case of equine cloning* [PhD thesis]. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech), Paris.

Renard JP, Chavatte-Palmer P. 2004. Le clonage de l'animal et son apport en recherche vétérinaire. *Bull. Acad. Vét. France* **157**(4): 5-15.

Sansinena MJ, Reggio BC, Denniston RS, Godke RA. 2002. Nuclear transfer embryos from different equine cell lines as donor karyoplasts using the bovine oocyte as recipient cytoplasm. *Theriogenology* **58**: 775-777.

Šichtař J, Hošková K. 2012. I pony mají své klony. *Jezdeckví* **3**: 20-27.

Teixeira DTV, 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*. Available from <https://doi.org/10.1071/RD19239>.

TEXAS A&M UNIVERSITY. 2017. *Obtaining a Tissue Sample for Cell Culture and Freezing*. Available from <http://vetmed.tamu.edu/files/vetmed/equine-embryo-lab/Obtaining-a-Tissue-Sample-for-Cell-culture-12-17.pdf> (accessed October 2019).

Tichovská H. 2011. *Vliv oxidu dusnatého na meiotickou kompetenci prasečích oocytů* [PhD thesis]. Česká zemědělská univerzita, Praha.

- Tremoleda JL, Stout TAE, Lagutina I, Lazzari G, Bevers MM, Colenbrander B, Galli C. 2003. Effects of In Vitro Production on Horse Embryo Morphology, Cytoskeletal Characteristics, and Blastocyst Capsule Formation. *Biology of Reproduction* **69**: 1895-1906.
- Vanderwall DK, Woods GL, Aston K I, Bunch TD, Li GP, Meerdo LN, White KL. 2004a. Cloned horse pregnancies produced using adult cumulus cells. *Reproduction Fertility Development* **16**: 675–679.
- Vanderwall DK, Woods GL, Sellon DC, Tester DF, Schlafer DH, White KL. 2004b. Present status of equine cloning and clinical characterization of embryonic, fetal, and neonatal development of three cloned mules. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **225**(11): 1694-1699.
- Vanderwall DK, Woods GL, Roser JF, Schlafer DH, Sellon DC, Tester DF, White KL. 2006. Equine cloning: applications and outcomes. *Reproduction Fertility and Development* **18**: 91–98.
- Valenzuela OA, Couturier-Tarrade A, Choi YH, Aubrière MC, Ritthaler J, Pascale Chavatte-Palmer P, Hinrichs K. 2018. Impact of equine assisted reproductive technologies (standard embryo transfer or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with in vitro culture and embryo transfer) on placenta and foal morphometry and placental gene expression. *Reproduction, Fertility and Development* **30**: 371-379.
- VIAGEN PETS. 2019. Equine cloning. Available from <https://viagenpets.com/product/equine-cloning/> (accessed December 2019).
- Wakchaure R, Ganguly S. 2016. Advances in equine cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) technique in horses: A review. *International Journal of Bioassays* **5.12**: 5124-5127.
- Weimer M. 2009. Policy Choice versus Science in Regulating Animal Cloning under the WTO Law. DOI: 10.5235/205230509806345198.
- Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. 2003. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Human Molecular Genetics* **12**(1):61-68.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**: 810-813.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD et al. 2003. A mule cloned from foetal cells by nuclear transfer. *Science* **301**: 1063.
- Yan Z, Zhou Y, Fu J, Jiao F, Zhao L, Guan P, Huang S, Zeng Y, Zeng F. 2010. Donor-host mitochondrial compatibility improves efficiency of bovine somatic cell nuclear transfer. *BMC Developmental Biology* **10**: 31-39.

Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K, Sato A. 1999. The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Human Reproduction* **14**(2): 448-453.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction* **3**(3):155-63.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ART's = assisted reproductive technologies, asistované reprodukční technologie

COC's = cumulus oocyte complexes, oocyty s kumulárními buňkami

DNA = deoxyribonukleová kyselina

ET = embryo transfer

Eurobarometr = Eurobarometer, série průzkumů veřejného mínění, které zadává sekce Analýz veřejného mínění Evropské komise

FBS = fetal bovine serum, bovinní sérum

FSH = follicles stimulating hormone, folikulostimulační hormon

GVBD = germinal vesicle breakdown, rozpad jádra

ICSI = intracytoplasmic sperm injection, intracytoplazmatické injekce spermií

IVC = *in vitro* kultivace

IVF = *in vitro* fertilizace

IVM = *in vitro* maturation, *in vitro* maturace

MI = meiotic arrest in metaphase I, první meiotická metafáze

MII = meiotic arrest in metaphase II, druhá meiotická metafáze

MPF = mitosis promotion factor, faktor vyvolávající maturaci oocytů a mitózu oplodněných vajíček

MSC = mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky

mtDNA = mitochondriální DNA

OPU = ovum pick-up, odběr oocytů z vaječníků

SCNT = somatic cell nucleus transfer, přenos jader somatických buněk

SOAF = sperm oocyte activating factor; faktor ze spermií, který aktivuje oocyt při oplození

ZFO = zona-free oocyte, oocyty bez *zona pellucida*

ZP = *zona pellucida*

## 10 Přílohy

### 10.1 Příloha č. 1

#### Dotazník



[http://www.kheiron-biotech.com/index\\_en.html#prettyPhoto\[gal-violita\]/0/](http://www.kheiron-biotech.com/index_en.html#prettyPhoto[gal-violita]/0/)

#### JAK VNÍMÁME KLONOVÁNÍ KONÍ?

**On line dotazník zaměřený na průzkum problematiky vnímání klonování koní šířený prostřednictvím internetu s cílem shromáždit informace od odborné i laické veřejnosti v oblasti jezdeckví, chovatelství a veterinární medicíny.**

Prosím o vyplnění krátkého dotazníku, který potřebuji pro svoji diplomovou práci na téma *Současný pohled na klonování koní a jeho využití*. Je určen pro odbornou a laickou veřejnost v oblasti jezdeckví, chovatelství a veterinární medicíny, a pravděpodobně vám nezabere více jak 10 min. Anonymita respondentů a jejich odpovědí jsou zachovány. Získaná data budou použita výhradně pro zpracování diplomové práce. Předem děkuji za váš osobní názor na danou problematiku i čas, který vyplnění dotazníku věnujete!

Kateřina Nevečeřalová  
ČZU

#### INFORMOVANOST O KLONOVÁNÍ

**Slyšel/a jste již o klonech koní nebo jiných koňovitých (zebry, osli)?**

- ano
- ne



**Jak jste se o klonování dozvěděl/a ?**

- z odborné literatury
- z médií (internet, denní tisk, televize atp.)
- ústní podání
- nevzpomínám si
- jinak
- o klonování jsem dosud neslyšel/a

**Je informovanost o klonování a klonech zvířat dostačující?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**Jsou informace o klonování zvířat dostatečně srozumitelné?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**Domníváte se, že za klonováním je spíše touha se zviditelnit? (např. oznámení o narození klonů v médiích)**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**OTÁZKA BEZPEČNOSTI POTRAVIN**

**Domníváte se, že konzumace masa z klonovaných zvířat je pro lidi bezpečná?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**V USA, Kanadě, Argentině a Austrálii je povoleno klonování zvířat, která vstupují do potravinového řetězce. V EU je toto využití klonů zakázáno. Souhlasíte s přístupem EU?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

## **ETIKA KLONOVÁNÍ**

**Je klonování „morálně“ správné?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**Představují pro Vás „sériově“ vyráběná zvířata etický problém?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**Souhlasíte s klonováním zvířat, pokud se jedná?**

- o záchranu ohrožených nebo vzácných druhů (kůň Převalského, zebry, osli atp.)
- získání koní s lepšími sportovními výsledky
- zachování kvalitního genetického materiálu
- jiný důvod
- s klonováním nesouhlasím

**ZDRAVÍ A WELFARE KLONOVANÝCH ZVÍŘAT (pozn. welfare zvířat = životní pohoda zvířat)**

**Myslíte si, že při samotném procesu klonování jsou životní podmínky zvířat dobré?**

- ano
- ne
- nevím

**Myslíte si, že spontánní potraty, abnormality plodu nebo problematické porody jsou častou záležitostí během procesu klonování?**

- ano
- ne
- nevím

**Jaký je zdravotní stav čerstvě narozených klonů?**

- není rozdíl v porovnání s ostatní populací
- trpí ve větší míře různými chorobami a malformacemi
- nevím

## **KLONOVÁNÍ A ETIKA VE SPORTU**

**V koňském pólu, a v návaznosti na povolení Mezinárodní jezdecké federace (FEI) z roku 2012 je účast klonovaných koní možná i v soutěžích FEI. Je to správné rozhodnutí?**

- ano
- ne
- nevím

**Je v soutěžích identifikace mezi klonem a jeho dárce nebo mezi dvěma klony čipováním dostačující (všichni mají stejnou DNA)?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**Z jakého důvodu by mohlo dojít k zákazu používání klonů v reprodukci?**

- vede k zúžení genetické základny
- klasické šlechtitelství ztrácí svůj význam
- nebezpečí zneužití
- nevím

**Legislativa a ostatní předpisy týkající se klonování jsou dostačující?**

- ano
- ne
- nevím

**PROČ SE KONĚ KLONUJÍ?**

**Myslíte si, že důvodem je sportovní aspekt (touha po tom, aby klon zopakoval výkony svého dárce)?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**Myslíte si, že důvodem je chovatelský aspekt (možnost vlastnit stále stejně kvalitního a sportovně prověřeného koně)?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**Myslíte si, že důvodem je snaha o zachování genů původního jedince (v případě jeho úmrtí, kastrace nebo vyhynutí druhu)?**

- určitě ano
- spíše ano
- spíše ne
- určitě ne
- nevím

**OSOBNÍ INFORMACE**

**Pohlaví**

- žena
- muž

## Věk

- méně než 18
- 18 - 35
- 36 - 60
- 61 a více

## Vzdělání

- základní
- odborné bez maturity
- odborné s maturitou
- střední všeobecné (gymnázium)
- vysokoškolské

## Ve vztahu ke koním jste

- jezdec amatér
- profesionální jezdec
- majitel koně
- majitel koně a současně jezdec
- chovatel koní
- ošetřovatel
- veterinární lékař (nebo student veterinárního lékařství)
- jiný vztah

## Víra

- ateista
- křesťan
- muslim
- budhista
- jiná

## ostatní jazykové mutace:

francouzština

[https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdK7WIA64Vbz1JTAe6IWGjIkQ9k7gtV5VDHA9JEqzsyP8y5g/viewform?usp=fb\\_send\\_fb&fbclid=IwAR3E1eMJyArSXDQMTrdvtVEZWwR3\\_cCnPoHQnRpHINRPQL5CkDxaJOIHfdQ](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdK7WIA64Vbz1JTAe6IWGjIkQ9k7gtV5VDHA9JEqzsyP8y5g/viewform?usp=fb_send_fb&fbclid=IwAR3E1eMJyArSXDQMTrdvtVEZWwR3_cCnPoHQnRpHINRPQL5CkDxaJOIHfdQ)

argentinská španělština

[https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSctpdEQ3svkf3aFjhViN-l4xSyqJcDuuiGJBCh61RaRaJ1h1A/viewform?fbclid=IwAR33n2\\_c0xxhU4D9A9Xldjdj-f41\\_bfhDZDqz6iK4\\_qemtBwWy3HdroDm44](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSctpdEQ3svkf3aFjhViN-l4xSyqJcDuuiGJBCh61RaRaJ1h1A/viewform?fbclid=IwAR33n2_c0xxhU4D9A9Xldjdj-f41_bfhDZDqz6iK4_qemtBwWy3HdroDm44)

němčina

[https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSe6GfltQYehbIUj2j73IgDzk2TUf4rH0JGxgDWvUySDJecsEQ/viewform?fbclid=IwAR2SMfFQP8WEe1Nd8fsap\\_bjc4PVAw\\_wEqgn9ZPErvFsznrLOHFSTmewCTw](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSe6GfltQYehbIUj2j73IgDzk2TUf4rH0JGxgDWvUySDJecsEQ/viewform?fbclid=IwAR2SMfFQP8WEe1Nd8fsap_bjc4PVAw_wEqgn9ZPErvFsznrLOHFSTmewCTw)

angličtina

[https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSeMnDd5cD7EYH7DEA64VVJd4EAAC8u\\_hGejDWGaZloTHiyatA/viewform?fbclid=IwAR1ez06zyghpsv0l5BLsJqpcEPOBTqf1JP8hO-WP8teM8OHVni7KsaZWUkA](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSeMnDd5cD7EYH7DEA64VVJd4EAAC8u_hGejDWGaZloTHiyatA/viewform?fbclid=IwAR1ez06zyghpsv0l5BLsJqpcEPOBTqf1JP8hO-WP8teM8OHVni7KsaZWUkA)

## 10.2 Příloha č. 2

Časová osa klonování zvířat  
(upraveno z *Eyachew 2017*)

Klonované zvíře	Autor a datum první publikace
ovce	Wilmut et al. 1997
myš	Wakayama et al. 1998
kráva	Kato et al. 1998
gaur	Lanza et al. 2000
prase	Polejaeva et al. 2000
muflon	Loi et al. 2001
kočka	Shin et al. 2002
koza	Keefer et al. 2002
králík	Chesne et al. 2002
jelen	Texas A&M University 2003
kůň	Galli et al. 2003
mula	Woods et al. 2003
potkan	Zhou et al. 2003
divoká kočka	Gómez et al. 2004
pes	Lee et al. 2005
fretka	Li et al. 2006
buvol domácí	Shi et al. 2007
vlk	Kim et al. 2007
velbloud	Wani et al. 2009