

# Klonowanie koni

Marian Tischner, Marek Tischner

z Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

W finale otwartych mistrzostw Argentyny, które odbyły się 10 grudnia 2016 r. w Buenos Aires, jeden z najlepszych na świecie graczy w polo Adolfo Cambiaso doprowadził swój zespół do zwycięstwa. Nie byłoby w tym nic nadzwyczajnego, gdyby nie fakt, że Adolfo Cambiaso dosiadał kolejno sześciu koni, klonów słynnej i zasłużonej klaczy zwanej Dolfia Cuartetera.

W grze w polo uczestniczą dwie drużyny, liczące po 4 zawodników, rozgrywające mecz konno. Celem jest wbicie do bramki rywala piłki, za pomocą kija zwanego malletą. Spotkania rozgrywane są w 4 do 8 częściach, z których każda trwa 7,5 minuty. Po każdej z nich są 3-minutowe przerwy, które zwykle wystarczają na zmianę konia. Gra w polo jest niezwykle widowiskowa, lecz bardzo wyczerpująca dla koni. Wymaga się od nich wytrzymałości, odwagi, posłuszeństwa, równowagi, idealnej współpracy z jeźdźcem i umiejętności natychmiastowego reagowania na jego sygnały. Takim właśnie koniem była sklonowana klacz Dolfia Cuartetera, którą wcześniej dosiadał Cambiaso, i podobnymi cechami charakteryzują się jej klony nazwane tym samym imieniem z dopiskiem od 01 do 06. W Argentynie gra w polo jest bardzo popularna, nic też dziwnego, że za trzymiesięczną klaczkę, klona klaczy Dolfia Cuartetera zapłacono na aukcji w Buenos Aires 800 tys. \$, co jest najwyższą ceną uzyskaną za konia przeznaczonego do gry w polo.

## Historia klonowania koni

Bliźnięta, trojaczki, a nawet czworaczki jednojajowe występujące normalnie u wielu ssaków oraz ludzi są rzeczywistymi klonami. Również w hodowli koni spotyka się

przypadki urodzenia i odchowania bliźniąt. Są to jednak zawsze bliźnięta różnojajowe. Niemniej możliwe jest uzyskanie bliźniąt jednojajowych u koni. Allen i Pashen (1) dzieliли zarodki na połowy i każdą z tych połówek transplutowali do klaczy biorczyń, które urodziły identyczne bliźnięta, czyli w ten sposób po raz pierwszy sklonowali konie (ryc. 1). Ze względu na niską wydajność, czasochłonność i ryzyko powikłań pooperacyjnych u klaczy dawczyń zarodków, metoda ta nie znalazła praktycznego zastosowania.

W 1996 r. prawdziwą rewolucją w biologii były narodziny owieczki Dolly, pierwszego ssaka sklonowanego z komórki dorosłej owcy. Wilmut i wsp. (2) prowadzący badania w Roslin Institute w Szkocji, obalili jeden z najbardziej podstawowych dogmatów w naukach biologicznych, wykazując, że można resetować „zegar biologiczny” komórek i zróżnicowane komórki somatyczne, np. fibroblasty skóry, po wprowadzeniu do enukleowanych oocytów, mogą przekształcić się w zarodkowe komórki pluri- i totipotencjalne, prowadząc do narodzenia zwierzęcia genetycznie identycznego z komórką dawcy. Wkrótce eksperyment klonowania somatycznego powtórzono na wielu innych gatunkach zwierząt i klonowanie stało się faktem. Od czasu urodzenia owieczki Dolly sklonowano już 22 różne gatunki zwierząt, w tym konie w 2003 r.

Pierwszym klonem konia była klaczka rasy haflinger o imieniu Prometea sklonowana z komórek skóry tej samej klaczy, która ją urodziła (3). Prometea wyrosła na zdrową, normalną i płodną klaczkę. W wyniku naturalnego krycia urodziła syna 12 marca 2008 r. (ryc. 2).

Prawie w tym samym czasie, kiedy wyprodukowano Prometeę, sukcesem

## Cloning horses

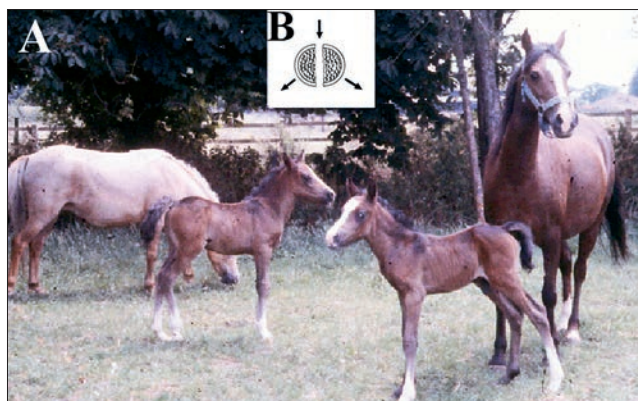
Tischner M., Tischner M. jr., Department of Animal Sciences, University of Agriculture in Krakow

The first in the world clone of an excellent jumping stallion Quidam de Revel has been recently leased by Polish breeders. Quidam de Revel II Z CL, born in 2005, is now available as reproducer in Stallion Stud Gniezno. Cloning horses remains the source of frequent disputes and controversy among breeders and numerous social groups. This paper presents the history, as well as advantages and disadvantages of equine cloning procedures. Attention was also given to the longevity of clones and factors affecting likeness between them. Methods for collection and storage of animal tissues for cloning were also described.

**Keywords:** horses, cloning, methods, likeness.

zakończyło się również klonowanie mułów w USA (4). Samice tej międzygatunkowej krzyżówki klaczy konia domowego i ogiera osła bardzo rzadko wykazują jakąkolwiek płodność, a samce są bezpłodne. Dzięki technice klonowania udało się stworzyć identyczne trojaczki mułów. Komórki do klonowania pobrano z 45-dniowego płodu męskiego, a zrekonstruowane zarodki transplutowano do klaczy biorczyń konia, które urodziły zdrowe i normalnie rozwinięte muły. Były to pierwsze klony hybrydowego zwierzęcia. W wieku dorosłym klony okazały się świetnymi mułami wyścigowymi.

Pionierem komercyjnego klonowania koni jest dr Eric Palmer z Francji, dobrze znany w Polsce z racji wieloletniej współpracy naukowej z Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie oraz wykładów dla lekarzy weterynarii i hodowców. W 2001 r., a więc dwa lata przed przyjściem na świat klaczki Prometei, założył firmę Cryozootech SA, której celem jest gromadzenie genów od wybitnych koni (w postaci skrawków skóry) w perspektywie ich



Ryc. 1. Pierwsze klony koni. Żrebięta bliźnięta jednojajowe uzyskane z podzielonego zarodka wraz z klaczami biorczyniami (1). Newmarket 1984 r.



Ryc. 2. Włochy (Cremona).

A. Z lewej prof. Cesare Galli demonstruje sklonowaną klaczkę rasy haflinger, obok pierwszy klon konia z somatycznych komórek Prometea trzymana przez Mariana Tischnera, która urodziła się 28.05.2003 r.

B. Ogierek urodzony przez Prometeę, 2.03.2008 r.

klonowania. Do tego czasu zgromadził skrawki skóry od ponad 200 koni.

Pierwszym komercyjnie sklonowanym koniem był wałach Pieraz wykastrowany w wieku 2 lat. Dla polskiej hodowli istotnym szczegółem jest fakt, że Pieraz to syn wyhodowanego w Janowie Podlaskim i wyeksportowanego do USA w 1976 r. ogiera Pierścienia. Pieraz okazał się znakomitym koniem rajdowym. W swojej karierze sportowej odznaczył się niezwykłą wytrzymałością. Brał udział w 52 rajdach. Zwyciężył 11 razy (w tym 10 razy na najdłuższym dystansie 100 mil), 9 razy zdobył tytuł *Best Condition*, w sumie pokonał ponad 6000 km. W 1994 i 1996 r. został mistrzem świata w rajdach długodystansowych pod dwoma różnymi jeźdźcami. W USA zaliczono go do grona *Top Ten* rajdowych koni minionego stulecia. Figuruje również w księdze 30 najsłynniejszych koni na świecie.

W 2002 r. Eric Palmer pobrał od dwudziestoczteroletniego wówczas Pieraza skrawki skóry, które zamroził w ciekłym azocie i przechowywał w banku komórek. Klonowanie Pieraza wykonał zespół, którym kierował prof. Cesare Galli we Włoszech. Zdrowy klon nazwany Pieraz-Cryozootech-Stallion urodził się 26 lutego 2005 r. Rozwinął się bardzo dobrze i jest w pełni płodnym ogierem, którego nasienie jest nośnikiem identycznego z Pierazem DNA, tak więc jego krzyżowanie z klaczkami daje dużą szansę otrzymania koni o predyspozycjach do rajdów. Jego pierwsze źrebie, po naturalnym kryciu, urodziło się we Francji w 2008 r. W chwili, gdy piszemy to opracowanie, Pieraz-Cryozootech-Stallion został już dziadkiem. Czas pokaże, jak potoczy się kariera sportowa potomstwa tego klona.

Drugim koniem sklonowanym komercyjnie był ogier Quidam de Revel, hodowli francuskiej, sprzedany do Danii w 1992 r. Ogier ten został najwyżej sklasyfikowany i najbardziej sprawdzony w konkursach

skokowych. Dobrze przysłużył się również polskiej hodowli. W 1994 r. sprowadzono do Polski 10 porcji mrożonego nasienia tego znakomitego ogiera, którym unasieniono klacze w SK Ochaby, uzyskując 10 źrebiąt. Kilka porcji mrożonego nasienia Quidam de Revel zakupił również dyr. Michał Wojnarowski do SO Łąck w 2000 r., które z powodzeniem zostały wykorzystane do inseminacji klaczy w Polsce. Matka aktualnego mistrza Polski Wibaro to córka Graf Quidama (po QdR) urodzonego z pierwszej inseminacji mrożonym nasieniem w SK Ochaby. Również klacz Bagazza, na której Dawid Kubiak zakwalifikował się w tym roku jako jedyny Polak do finałów Pucharu Świata, to córka QdR.

Sklonowanie ogiera Quidam de Revel na życzenie jego właściciela Flaminga Velina z Danii przeprowadził zespół pod kierunkiem prof. Katrin Hinrichs na Uniwersytecie w Teksasie. Wycinki skóry ogiera Quidam de Revel pobrał i dostarczył do USA dr Eric Palmer. Ówczesny koszt klonowania wynosił około 150 tys. \$. Pierwszy klon ogiera Quidam de Revel nazwany Paris-Texas Z przyszedł na świat 13 marca 2005 r., a drugi nazwany później Quidam de Revel II Z CL urodził się 1 maja 2005 r. Obydwa klony w wieku około roku zostały odesłane do swojego właściciela do Danii. Klon Quidam de Revel II Z CL okazał się bardzo podobny do pierwowzoru i w 2012 r. został uznany w renomowanej Księdze AES (Anglo-European Studbook) i w tym samym roku jego właściciel powierzył go słynnej Stadninie de Muze Jorisa De Brabandera w Belgii, gdzie zadebiutował w hodowli. Aktualnie ma już jednego licencjonowanego syna uznanego w Księdze BWP (Księga Stadna Belgijskiego Konia Wierzchowego).

Z inicjatywy dyrektora Stada Ogierów w Gnieźnie, Andrzeja Matławskiego, Quidam de Revel II Z CL w dniu 7 grudnia 2016 r. trafił do boks Stada Ogierów

w Gnieźnie i jego nasienie jest dostępne dla klaczy w Polsce (ryc. 3). Zatem historia zatoczyła koło i wkrótce polscy hodowcy będą mieli niepowtarzalną okazję porównania potomstwa po „oryginale” Quidam de Revel z potomstwem jego „kopii”.

Zainteresowanie klonowaniem koni z roku na rok wzrasta na całym świecie a lista sklonowanych koni jest bardzo długa. Brakuje jednak oficjalnej statystyki koni klonów, gdyż w niektórych krajach ta metoda reprodukcji nie jest akceptowana i wielu właścicieli koni klonów utrzymuje ich pochodzenie w tajemnicy. Niemniej niektóre źródła podają, że np. w samym Teksasie żyje około 900 koni klonów (5).

### Technika klonowania

Podstawą klonowania jest transfer dowolnej komórki somatycznej klonowanego zwierzęcia do oocyty biorcy (nieodjrzała komórka jajowa), z której wcześniej usunięto chromosomy (DNA). Wyjątkowe właściwości cytoplazmy enukleowanego oocyty sprawiają, że jądro komórkowe klonowanego zwierzęcia (2n) zostaje przeprogramowane (resetowanie) w toti- i pluripotencjalne komórki, z których rozwija się zarodek. Zrekonstruowany w ten sposób zarodek może być bezpośrednio transplantowany chirurgicznie do jajowodów klaczy biorczyń lub hodowany *in vitro* przez 7–8 dni do stadium blastocysty, a następnie umieszczony metodą niechirurgiczną w macicy klaczy biorczynie, która wyda na świat kopię dawcy komórki somatycznej. Pomimo że klonowanie wydaje się metodą prostą, to udaje się zaledwie w kilku procentach.

### Biologiczna śmierć komórek

Loi i wsp. (6) badali wpływ podwyższonej temperatury na rozwój komórek przeznaczonych do klonowania. W tym



Ryc. 3. A. Po lewej stronie kopia Quidam De Revel II Z CL, Gniezno 15.03.2017 r. B. Po prawej oryginał Quidam de Revel, Dania 2000 r. Na prawej tylnej i lewej przedniej kończynie, a także na głowie widoczne różnice w kształcie odmian

celu podgrzewano komórki granulocyty owiec przez 30 min w temp. 55°C i 15 min w temp. 75°C, z których następnie konstruowano klonalne zarodki. Spośród 19 owiec biorczyń, którym transplantowano blastocysty wytworzone ze zdenaturowanych komórek w temp. 55°C, u 5 (26%) stwierdzono w 80. dniu ciąży, i 4 z nich urodziły żywe jagnięta. Na skutek powikłań płucnych 2 jagnięta padły w pierwszym dniu po urodzeniu, trzecie z niewiadomych przyczyn w 15. dniu życia, a rozwój czwartego jagnięcia okazał się normalny. Natomiast u 11 biorczyń, którym transplantowano blastocysty ze zdenaturowanych komórek w temp. 75°C, u 3 (27%) stwierdzono w 80. dniu ciąży, lecz żadna z nich nie zakończyła się urodzeniem żywego jagnięcia.

W Japonii Wakayama i wsp. (7) uzyskali zdrowe klony myszy wyprodukowane z komórek pobranych od osobników zamrożonych bez krioprotektorów w temp. -20°C i przechowywanych przez 16 lat. Hoshino i wsp. (8) opisali z kolei urodzenie kilku sklonowanych buhajków z komórek pobranych z jąder, pozostawionych w zamrażarce bez kriogenicznych konserwantów w temp. -80°C przez 10 lat.

Saeki i wsp. (9) badali żywotność komórek cieląt pobranych z mózgu, ucha, serca, płuc, wątroby, nerek i śledziony przechowywanych od 1 do 15 dni w temp. 4°C. Żywe i przydatne do klonowania komórki uzyskano prawie z wszystkich tkanek wymienionych narządów przetrzymywanych do 3 dni. Dużym zaskoczeniem było zachowanie przydatności do klonowania komórek ucha przechowywanego w temp. 4°C w lodówce ponad 15 dni, jak również z ucha pozostawionego w temp. 25°C przez 2 dni. W następnym eksperymencie uzyskano żywe i aktywnie działające zarodki klonalne z opakowanej wołowiny zakupionej w sklepie mięsnym 8 dni po uboju.

Badania te wskazują, że jeżeli po śmierci zwierzęcia komórki są martwe, lecz ich materiał jądrowy (karioplast) nie został uszkodzony, można jeszcze wyprodukować poprzez klonowanie zdrowe zwierzęta. Klonowanie z tkanek martwych zwierząt stwarza zatem ogromną szansę odtwarzania wartościowych lub rzadkich zwierząt, które przypadkowo padły lub zostały uśpione, a także zwierząt wymarłych, których szczątki zachowały się w stanie zmrożonym.

W Polsce w 2016 r. powstał bank genów gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem, a także zwierząt udomowionych, w tym koni, w perspektywie ich klonowania. Kieruje nim dr inż. Joanna Kochan z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (e-mail: j.kochan@ur.krakow.pl).

## Komórki somatyczne dawcy

Do klonowania koni najczęściej wykorzystuje się fibroblasty skóry pobierane z niewielkich wycinków z okolic szyi (pod grzywą) lub z przedniej części klatki piersiowej, po uprzedniej, łagodnej sedacji zwierzęcia. Obszar biopsji dokładnie jest przemywany, gołony i znieczulany nasiekowo 2% lidokainą. Następnie, za pomocą skalpela i nożyczek, wycina się dwa lub trzy skrawki skóry o średnicy około 6 mm<sup>2</sup>, które deponuje się w oddzielnych szczegółowo opisanych probówkach zawierających pożywkę transportową. Tak przygotowane skrawki skóry można przechowywać w lodówce w temp. 4°C przez 4–5 dni lub nieograniczony czas w ciekłym azocie. Niewielką ranę po biopsji zszywa się i powleka antybiotykami w sprayu.

W laboratorium, w sterylnych warunkach, skrawki skóry są rozdrabniane i poddawane dezagregacji mechanicznej. W celu rozproszenia komórek tkanki są trypsynizowane i wysiewane do hodowli tkankowych na płytkach Petriego w pożywce TCM199/DMEM z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS). W kolejnym etapie komórki są kilkakrotnie pasażowane, tzn. przenoszone do następnej płytki Petriego ze świeżą pożywką i namnażane.

Z chwilą gdy nastąpi pełne pokrycie dna płytki (konfluencja) są zazwyczaj zamrażane w ciekłym azocie w pożywce hodowlanej z dodatkiem 10% DMSO, a następnie w dowolnym czasie wykorzystywane do klonowania.

Przeprogramowanie i rozwój komórek somatycznych w zarodkowe w dużym stopniu zależy od zsynchronizowania (skoordynowania) fazy cyklu podziałowego komórki dawcy jądra klonowanego osobnika, z cyklem oocyty biorcy. Komórki somatyczne, z których sklonowano owieczkę Dolly, były w ostatnim etapie hodowli *in vitro* głodzone, tzn. hodowane w pożywce ubogiej w surowicę (białko), dzięki czemu wypadły z naturalnego cyklu komórkowego i wprowadzone zostały w fazę G0. Jest to stan spoczynkowy komórki charakteryzujący się obniżeniem poziomu transkrypcji. Prawdopodobnie dzięki głodzeniu ich jądra po wprowadzeniu do pozbawionego DNA dały się łatwiej przeprogramować w totipotentne i pluripotencjalne komórki, z których rozwinęła się owieczka Dolly.

## Oocyt – biorca

Oocyt przeznaczony do klonowania pobierane są z jajników klaczy przyżyciowo lub po uboju. Najbardziej zdolne do przeprogramowania jąder komórkowych klonowanego osobnika są oocyty uzyskane przyżyciowo z dominujących przedowulacyjnych pęcherzyków w mejotycznej

metafazie II (MII). W tym stadium pod osłonką przejrzystą oocyty widoczne jest jedno ciało kierunkowe. Niestety, u klaczy nie udaje się wywołać superowulacji, a z reguły u tego gatunku podczas rui dojrzewa tylko jeden pęcherzyk jajnikowy, co znacznie ogranicza możliwości pozyskiwania *in vivo* większej liczby oocytów dojrzających do metafazy II. Do klonowania pozyskuje się zatem niedojrzałe oocyty z pęcherzyków jajnikowych klaczy w jakiegokolwiek fazie cyklu rujowego, a nawet poza sezonem rozrodczym. Z jednego jajnika uzyskuje się przeciętnie 3–4 oocyty, które poddaje się dojrzewaniu *in vitro* przez 22–30 godzin. Do metafazy II dojrzewa najczęściej 30–50% oocytów. Jakość oocytów dojrzewających w warunkach *in vitro* jest jednak znacznie mniejsza w porównaniu do oocytów dojrzewających *in vivo* (10).

Tuż przed enukleacją dojrzałe oocyty w metafazie II z wyrzuconym pierwszym ciałkiem kierunkowym są inkubowane w pożywce hodowlanej z dodatkiem fluorochromu Hoechst 33342. Barwnik ten przenika przez nienaruszone błony komórkowe i łączy się z DNA, które w mikroskopie fluorescencyjnym emituje światło niebieskofioletowe, co znacznie ułatwia usuwanie DNA. Podczas enukleacji oocyt jest ustalany pipetą podtrzymującą (*holding pipette*) o średnicy zewnętrznej 120–140 μm. Płytkę metafazową i ciało kierunkowe są usuwane tępą pipetą o średnicy 14 μm, zamontowaną w mikroskopie odwróconym do hydraulicznego mikromanipulatora.

Następnym krokiem w procesie klonowania jest transfer komórki dawcy do enukleowanego oocyty i agregacja poprzez fuzję tych dwu komórek. Komórka somatyczna dawcy w stadium G1/G0 jest zasysana do cienkiej mikropipety i umieszczana pod osłonką przejrzystą na błonie cytoplazmatycznej oocyty. Wprowadzanie komórki somatycznej pod osłonkę przejrzystą wykonuje się przez tę samą szczelinę w osłonce przejrzystej, przez którą dokonano enukleacji oraz przy użyciu tej samej pipety manipulacyjnej, którą usuwano płytkę metafazową z oocyty. Konwencjonalny sposób fuzji enukleowanego oocyty z somatyczną komórką polega na ich stymulacji impulsami prądu stałego. W tym celu obydwie komórki umieszcza się pomiędzy dwiema elektrodami. Siłę pola elektrycznego, wielkość i liczbę impulsów dobiera się eksperymentalnie. Pod wpływem impulsów elektrycznych następuje przypuszczalnie uformowanie porów lub destabilizacja błon komórkowych oraz wzrost wewnątrzkomórkowych jonów, co prowadzi do powstania hybrydy jądrowo-cytoplazmatycznej.

Ostatnim etapem przygotowania oocyty do przeprogramowania wprowadzonego jądra dawcy somatycznej komórki jest jego

aktywacja. Najczęściej stosowana jest aktywacja chemiczna jonowymylną 5  $\mu\text{M}$  (jonofor wapnia) połączona z synergicznym działaniem 1 mM 6-DMAP i 5  $\mu\text{g/ml}$  cykloheksamidyny.

### Niektóre modyfikacje klonowania koni

#### Faza cyklu komórki dawcy

W komercyjnych ośrodkach klonowania koni w Brazylii i Argentynie zaadaptowano metodę klonowania bydła opracowaną przez Bordignon i Smith (11), która polega na wprowadzeniu w ostatnim etapie hodowli *in vitro* komórek w fazę G2 (zahamowanie syntezy białka). Natomiast oocyty w metafazie II są aktywowane chemicznie i wprowadzane w stan telofazy II i w tej fazie mejozy z oocyty usuwane jest I i II ciało kierunkowe wraz z jądrem oocyty (DNA). Maserati i Mutto (12) podkreślają, że ten sposób znacznie skraca czas usuwania DNA z oocyty i prawdopodobnie dzięki temu osiągają lepszą skuteczność w porównaniu do klasycznej metody klonowania koni.

#### Oślonka przejrzysta oocyty biorcy

Oślonka przejrzysta oocyty klaczy podczas dojrzewania *in vitro* staje się niejednorodna, pogrubiona i stwardniała, co znacznie utrudnia mikromanipulację na oocyty klasycznymi metodami. Do pokonania tego problemu wykorzystuje się dwie metody. Jedna z nich, opracowana na oocytych myszy, polega na wywierceniu w osłonce przejrzystej wiertłem piezoelektrycznym otworu, który ułatwia enukleację i transfer komórki dawcy bezpośrednio do cytoplazmy oocyty biorcy (13). Druga metoda opracowana na oocytych bydłych polega na całkowitym, enzymatycznym, wytrawieniu osłonce (14).

Hinrichs i wsp. (15) enukleację oocytych dojrzewających *in vitro* przeprowadzają poprzez otwór wywiercony w osłonce przejrzystej pipetą o średnicy zewnętrznej 10–13  $\mu\text{m}$  dołączonej do elektronicznie regulowanego wiertła piezoelektrycznego. Przez utworzoną w ten sposób szczelinę aspirują ciało kierunkowe i płytkę metafazalną. Następnie spośród licznych komórek somatycznych przygotowanych do procedury klonowania wybierają jedną o średnicy 11–23  $\mu\text{m}$  i zasysają ją tak często do pipety o średnicy zewnętrznej 8–9  $\mu\text{m}$ , aż pęknie jej błona komórkowa, po czym deponują ją w plazmie oocyty biorcy. Zrekonstruowany w ten sposób oocyt poddają aktywacji poprzez wstrzyknięcie do jego cytoplazmy ekstraktu plemników ogiera.

Natomiast Galli i wsp. (16) stwardniają osłonce przejrzystą oocytych wytrawiają

0,5% pronazą (*the zona-free method*), co znacznie ułatwia enukleację i precyzyjne umieszczenie komórki dawcy na błonie cytoplazmatycznej oocyty biorcy. Na przygotowanym w ten sposób oocyty fuzję elektryczną uzyskują po zastosowaniu impulsów elektrycznych o niskiej częstotliwości i niewielkim napięciu. Prawdopodobnie dzięki tym modyfikacjom uzyskują wysoki wskaźnik podziałów komórek zarodka. Podobną metodę rekonstrukcji oocytych stosują również ośrodki klonowania koni w Argentynie i Brazylii (17). Niektórzy autorzy zwracają jednak uwagę, że zarodki pozbawione osłonce przejrzystej są trudniejsze do hodowli *in vitro*.

#### Hodowla klonalnych zarodków

W następnym etapie klonowania zarodki są transplantowane do jajowodów klaczy biorczyń lub hodowane *in vitro* do czasu osiągnięcia stadium blastocysty i dopiero w tej fazie rozwoju umieszczane w macicy klaczy biorczyń lub zamrażane w ciekłym azocie.

Woods i wsp. (4) jednokomórkowe lub w początkowym stadium rozwoju zarodki transplantowali chirurgicznie do jajowodów zsynchronizowanych klaczy biorczyń. Spośród 305 transplantowanych w ten sposób zarodków, ciążę w 21 dniu rozpoznano u 21 klaczy, i tylko 3 z nich urodziły źrebięta mała. Metoda ta z punktu widzenia praktycznego klonowania okazała się mało przydatna, głównie z powodu niskich kompetencji rozwojowych jednokomórkowych zarodków oraz czasochłonnej i kosztownej do jajowodowej transplatacji, a także konieczności odpowiedniego przygotowania dużej liczby klaczy biorczyń. Preferowana jest zatem metoda rozwoju zarodków *in vitro* do stadium blastocysty, gdyż w ten sposób eliminowane są z dalszych etapów klonowania zarodki, których rozwój zatrzymał się na etapie kilku-blastomerowym. Poza tym stadium blastocysty jest pierwszym widocznym wskaźnikiem zróżnicowania się komórek zarodka na dwie odrębne linie komórkowe – węzeł zarodkowy i trofoblast, co dobrze rokuje ich dalszy rozwój.

Zarodki klonalne hodowane są w pożywce Eagle'a w modyfikacji Dulbecco DMEM/F-12 (Sigma) z dodatkiem FBS 10% i 1% ATB (antybiotyk), w inkubatorze z regulowanym przepływem powietrza o składzie: 5%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  i 90%  $\text{N}_2$  i maksymalnej wilgotności w temp. 38,2°C. Podczas hodowli umieszcza się pojedynczo lub po kilka zarodków na szalkach Petriego w mikrokroplach pod olejem parafinowym lub systemem „well of the well” (WOW) w mikrostudzienkach uformowanych na dnie szalki Petriego. Pożywkę zmienia się co 2–3 dni. Pierwsze podziały zarodków

pojawiają się po 72 godzinach hodowli, a formowanie blastocysty po 7–8 dniach hodowli *in vitro*.

Odsetek zrekonstruowanych zarodków klonalnych osiągających stadium blastocysty jest bardzo zróżnicowany i waha się od 4 do 25%. Niezależnie od systemu hodowli klonalnych zarodków uzyskiwano powtarzalne wyniki na poziomie około 20%, gdy fuzję komórek przeprowadzano na oocytych pozbawionych osłonce przejrzystej (14).

W Argentynie osiągnęto najwyższe efekty rozwoju zarodków do stadium blastocysty, gdy 3–4 zarodki pozbawione osłonce przejrzystej poddawano agregacji poprzez ich inkubowanie w mikrostudzienkach systemem WOW. W ten sposób z 3–4 połączonych zarodków uzyskiwano około 35% pojedynczych, chimerowych, klonalnych blastocyst. Natomiast podczas kontrolnej hodowli pojedynczego klonalnego zarodka systemem WOW stadium blastocysty osiągało zaledwie 7% (16, 18, 19).

#### Dobór klaczy biorczyń i transplatacja zarodków klonalnych

Najlepszymi biorczyniami klonalnych blastocyst są klacze 4–10-letnie, które są w 5–6 dniu po spontanicznej owulacji. Galli i wsp. (16) zarodki koni uzyskane ze wspomaganego zapłodnienia (ICSI) rutynowo zamrażają w ciekłym azocie, uzyskując po ich transplatacji metodą niechirurgiczną około 50% zażrebień. Podobnie postępują z zarodkami klonalnymi. Zamrażanie zarodków znacznie ułatwia planowanie procedury przygotowania zarodków klonalnych do transplatacji, jak i dobór klaczy biorczyń, gdyż produkcję zarodków, jak i transplatację można przeprowadzić w dowolnym czasie i miejscu.

Do zamrażania w ciekłym azocie selekcionowane są wczesne ekspandujące blastocysty. Proces ich zamrażania opiera się na użyciu rozrzedzalników stosowanych powszechnie do zamrażania zarodków z dodatkiem 10% glicerolu i zastosowaniu konwencjonalnej metody mrożenia. Słomki z zarodkami wkładane są do frezera, oziębiane i posiewane (seeding) w temp. -6°C, a następnie schładzane z szybkością 0,5°C/min do temp. -32°C i zanurzone w ciekłym azocie.

Ze względu na niskie kompetencje rozwojowe klonalnych zarodków umieszcza się 2–3 blastocysty w rogu macicy klaczy biorczyni. Ciążę za pomocą USG rozpoznaje się w 10–15 dniu po transplatacji. W przypadku stwierdzenia 2–3 pęcherzyków zarodkowych można niektóre usunąć manualnie pod kontrolą USG i pozostawić jeden najbardziej rokujący dalszy rozwój.

## Ciąża, poród, okres żrebięcy

Resorpcje i poronienia klonalnych zarodków i płodów u klaczy występują przez cały okres ciąży, jest ich jednak znacznie mniej niż w przypadku klonów bydła i innych zwierząt. Najwięcej resorpcji i tzw. cichych ronień występuje w pierwszych 3 miesiącach. W późniejszym okresie ciąży ronienia występują rzadko. Średnia długość ciąży mieści się z reguły w granicach normy i wynosi około 330 dni. U koni nie występuje tzw. syndrom dużego potomstwa, który jest prawdopodobnie związany z typem łożyska liścieniowatego i jest częstym zjawiskiem u przeżuwaczy. Natomiast u nowo narodzonych żrebiąt pojawiają się zmiany pępowiny, zmniejszona odporność, przykurcze ścięgien mięśni zginaczy, zespół nieprzystosowania (*maladjustment*) i problemy neurologiczne. Z reguły krytyczny okres mija, gdy żrebię osiągnie wiek 3–4 tygodni.

## Długość życia klonów

Telomery to końcówki chromosomów. Telomerowa hipoteza starzenia się wskazuje, że istnieje zależność między długością telomerów a zdolnością komórek somatycznych do podziałów. Uważa się, że komórki o dłuższych telomerach mają potencjalne możliwości większej liczby podziałów oraz że telomery u starszych osobników są krótsze niż u młodszych. Od czasu urodzenia się pierwszej sklonowanej owcy Dolly wiele dyskusji dotyczyło problemów zdrowotnych uzyskanych w ten sposób zwierząt. Ponieważ długość telomerów owiczki Dolly była podobna do długości telomerów 6-letniej owcy dawczyni komórek somatycznych i znacznie krótsza niż długość telomerów będących w tym samym wieku owiec kontrolnych, uważano, że wiek klonowanych zwierząt jest podobny do wieku zwierząt dawców komórek somatycznych. Owce żyją 15–16 lat. Dolly z powodu raka płuc została uśpiona w wieku 6 lat.

Liczne badania przeprowadzone głównie na bydło wykazały, że różnice w długości telomerów zależą od typu komórek, a wiek biologiczny dawcy komórek klonalnych jest zresetowany w trakcie procesu przeprogramowania komórek somatycznych w zarodkowe. Zatem wiek biologiczny klonu jest taki sam jak jego wiek chronologiczny.

Czas życia pierwszej sklonowanej myszy nazwanej Cumulina wynosił 2 lata i 7 miesięcy i był dłuższy od średniego życia przeciętnej myszy. Kolejne badania wykazały, że powtarzające się klonowania (*recloning*), przynajmniej u myszy, również nie zmieniają efektywności przeprogramowania jąder komórek somatycznych w klonalne zarodki i rozwoju klonów oraz czasu życia.

Wakayama i wsp. (20) uzyskali 25 klonalnych pokoleń i ponad 581 osobników z jednej myszy dawcy komórek somatycznych, co wskazuje, że komórki ssaków są nieśmiertelne, a klonowanie można powtarzać w nieskończoność.

Pierwsze urodzone klony koni w 2003 r., podobnie jak i młodsze klony koni nie wykazują odchyłań od normy. Prometea jest płodną klaczą. Urodziła dwa żrebięta, a ogier Pieraz-Cryozootech-Stallion ma już wielu synów i wnuki. Również klony mułów są zdrowe i osiągają znakomite wyniki w gonitwach.

## Genetyczne różnice klonów

Klon jest pełną kopią jądrowego DNA dawcy komórki somatycznej. Jednak ze względu na mitochondrialne DNA oocyty biorcy oraz epigenetyczne i środowiskowe różnice, a także błędy przeprogramowania mogą się różnić od pierwowzoru.

U klonowanych klaczy oryginalne mitochondrialne DNA jest anulowane podczas procesu klonowania i zastępowane przez mitochondrialne DNA oocyty biorcy, dlatego kopia klaczy ma 1–2% mitochondrialnego DNA oocyty biorcy. Nie wiadomo jednak, w jakim stopniu te mitochondrialne różnice spowodują zmiany w fenotypie klonu. Można jednak sprawić, że klon klaczy będzie w 100% jej pierwowzorem. W tym celu od klonowanej klaczy należy pobrać nie tylko komórki somatyczne, ale również oocyt, który zostanie wykorzystany w procedurze klonowania jako biorca. Jest to metoda dosyć skomplikowana, ale możliwa do zastosowania praktycznego (15).

U ogierów klony są identyczne z dawcą, ponieważ dawcy nie przekazują mitochondrialne DNA i ich genomy są przeprogramowane podczas mejozy i zapłodnienia. Tak więc klon ogiera jest w 100% kopią pierwowzoru i pod względem genetycznym jest nie do odróżnienia od protoplastu. Również DNA jego plemników nie różni się od sklonowanego osobnika (15, 21, 22).

U samic chromosomy płci mogą mieć również wpływ na przekazywanie zaburzeń genetycznych. Jak ogólnie wiadomo, u samic występują dwa chromosomy żeńskie XX, a u samców jeden chromosom żeński X i drugi męskim Y. Chromosom X składa się z około 160 Mb DNA, które koduje ponad 1000 genów odpowiedzialnych za różnorodne funkcje organizmu. Natomiast chromosom Y jest mniejszy i koduje zaledwie 100 genów odpowiedzialnych głównie za determinację płci i płodność.

Badania genetyczne wskazują, że w genach pojedynczych chromosomów X osobników żeńskich występują często nieprawidłowości, które jednak nie manifestują

## Automat biochemiczny MINDRAY BS-120



## Automat hematologiczny 3-diff MINDRAY BC-2800vet



## Najnowszy automat hematologiczny 5-diff MINDRAY BC-5000vet



(cytometria przepływowa + laser)

**STAMAR**<sup>®</sup>

Autoryzowany  
i wyłączny dystrybutor sprzętów  
firmy **mindray**  
do laboratorium weterynaryjnego

Tel.: 601 845 055 (Marek)  
726 300 777 (Dominika)

się u ich nosicieli chorobami genetycznymi. Dzieje się tak dlatego, że drugi prawidłowy chromosom X usypia aktywność zmienionej kopii. Zdarza się jednak, że podczas procedury klonowania samic następują zaburzenia w przeprogramowaniu jądra somatycznej komórki dawcy w klonalny zarodek i dochodzi do „uśpienia” czynnej (zdrowej) kopii chromosomu X. Wówczas następuje aktywacja chromosomu zmienionej kopii genu, co prowadzi do ujawnienia się u sklonowanego osobnika genetycznych anomalii. Takie przypadki zostały opisane u bydła (23).

U klonów często występują różnice w kształcie odmian (ryc. 3). Dzieje się to dlatego, ponieważ kształt odmian nie jest zapisany w genach, lecz aktywowany losowo.

### Czynniki środowiskowe a podobieństwo klonów

Na cechy sklonowanych koni poza czynnikami genetycznymi istotny wpływ wywiera środowisko, w jakim się rozwijają. Kiedy przyjrzymy się bliźniętom jednojajowym, to zobaczymy, że pomimo jednakowego DNA nie są one całkowicie identyczne. Aczkolwiek często są tak podobne, że trudno je odróżnić. Na pewno ich osobowość jest różna. Szczególne różnice ujawniają się między parami bliźniąt chowanymi razem a chowanymi osobno. Podobnie jest z klonami.

Duży wpływ, zarówno w okresie pre-, jak postnatalnym, na rozwój koni wywiera klacz, która je rodzi. U źrebiąt rasy konik polski i welsh pony urodzonych po transplantacji zarodków przez duże klacze bioczynie zanotowano w wieku dorosłym większe wymiary kości długich kończyn i wysokość w kłębie. Występowała również u nich otyłość, do czego prawdopodobnie przyczyniły się lepsze warunki podczas życia płodowego i zbyt obfite odżywianie w okresie oseskowym. Natomiast źrebięta pełnej krwi angielskiej urodzone przez małe klacze typu pony charakteryzowały się mniejszymi wymiarami i deformacją kończyn (24). Dlatego klacze bioczynie zarodków klonalnych winny być nie tylko zdrowe i dobrymi matkami, ale również nie powinny zbyt różnić się wymiarami od klonowanych osobników. W późniejszym okresie życia duży wpływ na ostateczne cechy koni ma utrzymanie, wychowanie, żywienie, pielęgnację, trening itp.

### Podsumowanie

Klonowanie koni jest młodą dziedziną nauki. Metoda ta jest mało wydajna, pracochłonna, kosztowna i z biologicznego punktu widzenia nadal niewiadomą. Ten bezpłciowy sposób reprodukcji zwierząt jest źródłem częstych sporów

i kontrowersyjnym tematem wśród hodowców oraz wielu grup społecznych. Przeciwnicy klonowania uważają, że klonowanie zawęża różnorodność genetyczną i są zwolennikami doskonalenia ras, a nie tworzenia kopii. Natomiast zwolennicy klonowania są przekonani, że klonowanie niesie ze sobą liczne korzyści, m.in. przyczynia się do podnoszenia poziomu hodowli poprzez wykorzystanie potencjału genetycznego najlepszych osobników. Wśród zwolenników klonowania jest wielu jeźdźców, trenerów i właścicieli drużyn, którzy nie są zainteresowani długim oczekiwaniem na coraz to doskonalsze osobniki uzyskiwane drogą rozmnażania płciowego, ale chcą mieć szybko kopie koni obdarzonych konkretnymi cechami i chęcią zwyciężania. Dużą zaletą tej metody jest możliwość klonowania wałachów. W jeździeckich dyscyplinach wytrzymałościowych oraz skokach przez przeszkody i w ujeżdżeniu preferowane są wykastrowane ogiery i klonowanie reprodukcyjne pozwala na wykorzystanie klonów do hodowlanego doskonalenia kolejnych pokoleń wybitnych koni.

Księga stadna Unii Europejskiej znajdująca się w Stadninie Koni Zangersheide w Belgii (członek Światowej Federacji Hodowców Koni Sportowych WBFSH) od 2005 r. rejestruje klony koni. W 2010 r. do księgi tej było wpisanych już 18 koni klonów (22).

Kolejnym krokiem promowania klonowania koni jest zgoda Międzynarodowej Federacji Jeździeckiej (FEI) w 2012 r. na udział koni klonów w igrzyskach olimpijskich. Głównym powodem tej decyzji jest prawdopodobnie brak metody pozwalającej na odróżnienie „oryginału” od „kopii”.

Można przypuszczać, że klonowanie koni, podobnie jak sztuczne unasienianie i transplantacja zarodków, zapoczątkowane w ubiegłym wieku, zostanie wdrożone do hodowli przez większość związków hodowlanych w trzech etapach. Etap pierwszy to odmowa. Etap drugi – akceptacja z ograniczeniem liczby potomstwa i adnotacją w paszporcie „sztuczna inseminacja”, „transplantacja zarodków”, „klon”, i etap trzeci – pełna akceptacja.

### Piśmiennictwo

- Allen W., Pashen R.: Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J. Reprod. Fertil.* 1984, **71**, 607–613.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997, **385**, 810–813.
- Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G.: Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003, **425**, 680.
- Woods G.L., White K.L., Vanderwall D.K., Li G.P., Aston K.L., Bunch T.D., Meerdo L.N., Pate B.J.: A male cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science.* 2003, **301**, 1063–1065.

- Clonage du cheval – Wikipédia. 2014.
- Loi P., Clinton M., Barboni B., Fulka J., Jr. Cappel P., Feil R., Moor R.M., Ptak G.: Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 2002, **67**, 126–132.
- Wakayama S., Ohta H., Hikichi T., Mizutani E., Iwaki T., Kanagawa O., Wakayama T.: Production of healthy cloned mice from bodies frozen at –20°C for 16 years. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008, **105**, 17318–17322.
- Hoshino Y., Hayashi N., Taniguchi S., Kobayashi N., Sakai K., Otani T., Akira Iritani A., Saeki K.: Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a –80°C freezer for a decade. *PLoS One.* 2009, **4**, e4142.
- Saeki K., Hoshino Y., Taniguchi S.: Biological age of cloned animals. *Principles of Cloning* (Second Edition). 2014, **33**, 419–428.
- Młodawska W.: Zdolność oocytów klaczy do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro*. *Med. Weter.* 2014, **70**, 11–14.
- Bordignon V., Smith L. C.: Telophase-stage host ooplasts support complete reprogramming of roscovitine-treated somatic cell nuclei in cattle. *Cloning Stem Cells.* 2006, **8**, 305–317 (abstr).
- Maserati M., Mutton A.: In vitro production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. *J. Equine Vet. Sci. Proceedings International Equine Embryo Symposium.* 2016, **41**, 42–50.
- Kimura Y., Yanagimachi R.: Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 1995, **52**, 709–720.
- Oback B., Wiersema A.T., Gaynor P., Laible G., Tucker F.C., Oliver J.E., Miller A.L., Troskie H.E., Wilson K.L., Forsyth J.T., Berg M.C., Cockrem K., McMillan V., Tervit H.R., Wells D.N.: Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells.* 2003, **5**, 3–12.
- Hinrichs K., Choi Y.H., Love C.C., Chung Y.G., Varner D.D.: Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract. *Reproduction.* 2006, **131**, 1063–1072.
- Galli C., Lagutina I., Duchi R., Colleoni S. and Lazzari G.: Cloning of Equines. *Principles of Cloning* (Second Edition), 2014, **22**, 287–297.
- Olivera R., Moro L.N., Jordan R., Luzzani C., Miriuka S., Radrizzani M., Donadeu F.X., Vichera G.: *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.* 2016, **12**, 1–14.
- Gambini A., Jarazo J., Olivera R., Salamone D.F.: *Equine Cloning: In Vitro and In Vivo Development of Aggregated Embryos. Biology of Reproduction.* 2012, **87**, 1–9.
- Gambini A., De Stefano A., Jarazo J., Buemo C., Karlanian F., Salamone D.F.: Embryo aggregation does not improve the development of interspecies somatic cell nuclear transfer embryos in the horse. *Theriogenology*, 2016, **86**, 1081–1091.
- Wakayama S., Kohda T., Obokata H., Tokoro M., Li Ch., Terashita Y., Mizutani E., Van Thuan Nguyen V.T., Kishigami S., Fumitoshi Ishino E.: Successful Serial Recloning in the Mouse over Multiple Generations. *Cell Stem Cell.* 2013, **12**, 293–297.
- Joudrey E.M., Pinton A., Coppola G., Rho G.J., King W.A.: X-chromosome inactivation in somatic cell nuclear transfer clones derived from an animal carrying an X-pautosome reciprocal translocation (9Xp+;23q-). *Proceedings of the Seventeenth European Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping.* Lisbon, 2006, p. 27 (abstr).
- Palmer E., Reis.: Horse clones registration: historic, scientific, and rationale basis. EAAP-53<sup>rd</sup> Annual Meeting Bratislava, 2012, p. 258 (abstr).
- Palmer E., Tischner M. jr.: Klonowanie koni – fakty i podstawy naukowe. PAU. Komisja Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych, 2008, **10**, 77–93.
- Tischner M., Allen W.R.: Wpływ klaczy-matki na rozwój źrebiąt i wielkość dorosłych koni. *Med. Weter.* 2000, **56**, 283–287.

Prof. zw. dr hab. Marian Tischner,  
e-mail: rztischn@cyf-kredu.pl