

Metody klonování savců

Lucie Minaříková

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie MINAŘÍKOVÁ**
Osobní číslo: **T08346**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Metody klonování savců**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizujte obecně klonování.
2. Rozdělte klonování a blíže charakterizujte klonování embryí, reprodukční klonování a terapeutické klonování.
3. Blíže se zaměřte na klonování člověka.
4. Pojednejte o nevýhodách a omezení klonování.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1]PETR J. Klonování ? Hrozba, nebo naděje, Praha: Fénix, 2003. 362s. ISBN 80-7185-469-7.

[2]FULKA J., KAŇKA J. FULKA J. JR. Klonování savčího embrya ? Současný stav a perspektivy, Vesmír 10, 77, 1998, s. 567-572.

[3]FULKA J. Klonování savčího embrya I, Živa 4, 2004, s. 146.

[4]CIBELLI, J., LANZA, R.P., CAMPBELL, K.H.S., WEST, M.D. Principles of Cloning, Burlington: Academic Press, 2002. 531 s. ISBN 978-0-12-174597-4.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Zuzana Lazárková, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. května 2011

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
veditel ústavu

Příjmení a jméno: MINARIKOVÁ LUCIE Obor: CHEMIE A TECHNOLOGIE POTRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby

1)

;

- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen v příruční knihovně Fakulty aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;

- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3

2)

;

- beru na vědomí, že podle § 60

3)

odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;

- beru na vědomí, že podle § 60

3)

odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);

- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;

- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16.5.2011

Lucie Minariková

1) zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá klonováním savců a jednotlivými metodami klonování. V první části je charakterizováno klonování embryí, dále reprodukční klonování a terapeutické klonování. Podrobně je popsáno zejména reprodukční klonování, kdy jsou v chronologickém pořadí uvedeny jednotlivé úspěchy. V kapitole terapeutické klonování jsou popsány jednotlivé druhy kmenových buněk a jejich využití při buněčné terapii. Další kapitola je věnována klonování člověka, etice klonování a právním předpisům o klonování. Poslední kapitola pojednává o nevýhodách a omezeních klonování.

Klíčová slova: klonování embryí, reprodukční klonování, terapeutické klonování, kmenové buňky, embryo

ABSTRACT

Bachelor thesis deals with the cloning of mammals and various methods of cloning. In the first part there is characterized embryo cloning, reproductive cloning and therapeutic cloning. Particular achievements in reproductive cloning are highlighted in chronological order. In the chapter therapeutic cloning there are described different types of stem cells and their use in cell therapy. Another chapter is devoted to human cloning, ethics and legislation of cloning. The last chapter deals with the disadvantages and limitations of cloning.

Keywords: embryo cloning, reproductive cloning, therapeutic cloning, stem cells, embryo

Chtěla bych tímto poděkovat Ing. Zuzaně Lazárkové, Ph.D. za její cenné odborné rady, čas, který mi věnovala a především ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali během celého studia.

Motto: „Každý člověk je architektem své vlastní budoucnosti.“

Sallustius Crispus

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KLONOVÁNÍ	13
2 DRUHY KLONOVÁNÍ	14
2.1 KLONOVÁNÍ EMBRYÍ	14
2.1.1 Počátky klonování embryí.....	15
2.1.2 Další úspěchy klonování embryí	15
2.2 KLONOVÁNÍ REPRODUKČNÍ	16
2.2.1 Počátky reprodukčního klonování.....	16
2.2.2 První úspěchy reprodukčního klonování – klony z embryonálních buněk	17
2.2.3 Roslinská metoda klonování přenosem jader – ovečka Dolly	17
2.2.4 Honolulská technika přenosu jader – myš Kumulína.....	20
2.2.5 První klonovaný samec – myšák Fibro	20
2.2.6 Dvoustupňové klonování prasat	21
2.2.7 Klonování prasat honolulskou technikou – prasátko Xena.....	23
2.2.8 Mezidruhové klonování – klon muflona	23
2.2.9 Klonovaný gaur	23
2.2.10 První kočičí klon – CopyCat	24
2.2.11 První klon bantenga.....	25
2.2.12 První králičí klon.....	25
2.2.13 Mezidruhový hybrid – mula Idaho Gem	26
2.2.14 Klisna Prométhea	27
2.2.15 První klon divoké kočky	27
2.2.16 První klonovaný jelen.....	28
2.2.17 Klonovaný potkan z dlouhodobě zmrazených buněk.....	28
2.2.18 První klonovaný pes	29
2.2.19 Klonované fretky.....	30
2.2.20 První klonovaný buvol – „Handguided“ klonovací technika.....	31
2.2.21 První klonovaný velbloud	32
2.3 KLONOVÁNÍ TERAPEUTICKÉ	32
2.3.1 Kmenové buňky	33
2.3.2 Vznik a typy kmenových buněk	33
2.3.3 Buněčná terapie a její úskalí.....	35
2.3.4 Terapeutické klonování – řešení problémů?	37
3 KLONOVÁNÍ ČLOVĚKA	40
3.1 POKUSY O KLONOVÁNÍ ČLOVĚKA	40
3.2 ETICKÁ OTÁZKA KLONOVÁNÍ.....	41
3.3 PRÁVNÍ PŘEDPISY TÝKAJÍCÍ SE KLONOVÁNÍ.....	42
4 NEVÝHODY A OMEZENÍ KLONOVÁNÍ SAVCŮ	45

4.1	VÝVOJOVÉ DEFEKTY	45
4.2	ZKRACOVÁNÍ TELOMER	46
4.3	MITOCHONDRIE	47
	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58

ÚVOD

Klonování je zjednodušeně řečeno množení či kopírování genetického materiálu z jednoho konkrétního organismu. Jedná se o nepohlavní rozmnožování. V přírodě se s ním můžeme běžně setkat při vegetativním rozmnožování organismů (např. nezmar nebo jahodník).

Od poloviny 90. let 20. století se objevila možnost vyrábět klony za použití vědeckých technologií. Toto téma rozpoutalo bouřlivou debatu, ale je nutné si uvědomit, že existují tři různé typy klonování, které vedou k rozdílným výsledkům.

Prvním typem je proces klonování embryí. Klonování embryí je proces podobný vzniku jednovaječných dvojčat. Dochází při něm k rozdělení velmi raného embrya na jednotlivé buňky, které se nechají samostatně vyvíjet. Vzniká tak několik geneticky shodných jedinců.

Dalším typem klonování, které vzbuzuje u veřejnosti největší obavy, je klonování reprodukční, které má za cíl vytvořit kopii živého organismu. DNA je vyňata z vajíčka a je nahrazena DNA dospělého zvířete. Poté je vzniklé klonované embryo implantováno do dělohy náhradní matky, kde se vyvíjí v nového jedince. Asi největší celebritou v říši klonů je bezpochyby rostlinná ovečka Dolly. Jednalo se o prvního klonovaného savce metodou přenosem jader z dospělé somatické buňky. S tímto úspěchem jsou spojeny i obavy naklonování člověka. Široká veřejnost měla obavy z naklonování nového Hitlera, armády zabijáků apod. Dnes již víme, že nového diktátora se obávat nemusíme, jelikož se zatím klonovat člověka nepodařilo. I kdyby byly pokusy s o naklonování člověka úspěšné, nikdy by se nejednalo o identickou kopii jedince vzhledem k tomu, že člověk není utvářen pouze genotypově, ale i fenotypově. Klonování reprodukční je kontroverzním tématem především z hlediska etického. Hovoří se o zahrávání si s lidskou důstojností a hodnotou lidského života.

Méně kontroverzí vyvolává klonování terapeutické. Terapeutické klonování probíhá v prvních fázích stejně jako klonování reprodukční s tím rozdílem, že vědci embryo likvidují v okamžiku, kdy vyprodukuje své kmenové buňky. Kmenové buňky jsou univerzální a mohou se vyvinout (diferencovat) v různé typy buněk. Znamená to mocnou zbraň proti nemocem, které se využívá při buněčné terapii.

Tato práce se snaží obecně přiblížit téma klonování, jeho jednotlivé metody a mezní úspěchy při bádání na poli klonování. Dále se tato práce zabývá využitím kmenových buněk jako zdrojem náhradních buněk a tkání při léčbě nemocí a využití terapeutického klonování

jako jedné z možností přípravy a izolace kmenových buněk. Obecně zde je pojednáno o klonování člověka, etice a právní úpravě klonování. V poslední části se práce zabývá otázkou nevýhod a současných omezení klonování.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KLONOVÁNÍ

Při slově klonování se mnoha lidem vybaví filmové příběhy o nestvůrách, navzájem se vraždících armádách naklonovaných zabijáků a spousta knih žánru science fiction. Klonování se stalo v poslední době žhavou tematikou a mnoho lidí nedokáže rozlišit realitu od fantazie filmových režisérů a spisovatelů [1].

Jako klonování můžeme označit proces vytváření jednoho či většího počtu kopií nějaké předlohy. Tyto kopie jsou pak označovány jako klony, z řeckého slova „klón“ (větev) [2,3].

Jak již bylo řečeno, produkovány jsou identické organizmy, to znamená organizmy s tímž genetickým vybavením, jaké má organizmus, z něhož pocházejí. Genetická identita však neznamená úplnou identitu, ale pouze identitu genotypu, přičemž fenotyp dvou klonovaných organismů se může lišit. Není proto možné, uvažujeme-li například o klonovaném člověku, získat z buněk génia procesem klonování dalšího skutečného génia [3].

Přestože je klonování stále obestřeno rouškou tajemství a pro mnoho lidí je toto téma značně eticky kontroverzní, nesetkáváme se s ním v poprvé. Vyskytuje se běžně v přírodě například při reprodukci bakterií a řas nebo rostlin jako je jahodník (tzv. vegetativní rozmnožování u rostlin). Známe i organizmy s velkou regenerační schopností, které jsou schopné z každé své izolované části dát vzniknout novému geneticky identickému jedinci – klonu. Mezi takové organizmy patří například nezmar. Může se to zdát neuvěřitelné, ale i my jsme se již mohli setkat s „lidskými klony“, takovým příkladem jsou lidská jednovaječná dvojčata. [3,4].

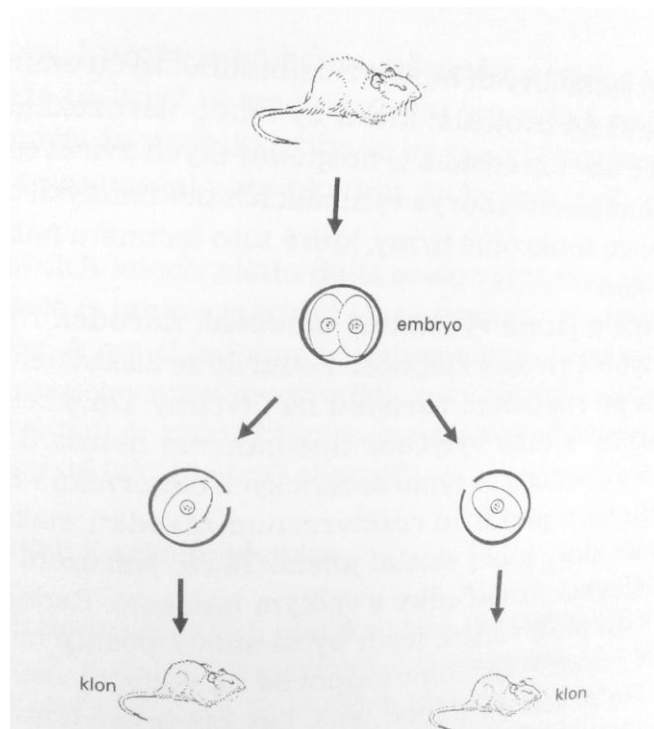
Genetický zásah do rozmnožování organismů metodou klonování se může týkat všech organismů od mikroorganismů až k člověku. Celkově lze říct, že klonování živočichů je mnohem obtížnější a složitější než klonování rostlin. Přesto se v posledních desetiletích setkáváme s mnoha úspěchy i v této oblasti vědy [3].

2 DRUHY KLONOVÁNÍ

Klonování můžeme rozdělit do tří skupin, a to na klonování embryí, reprodukční klonování a klonování terapeutické [1]. Všechny metody jsou přiblíženy v následujících kapitolách.

2.1 Klonování embryí

Klonování embryí je podobné procesu, při kterém vznikají dvojčata. Ke vzniku identických dvojčat dochází ve stádiu zygoty, kdy může dojít k jejímu náhodnému rozdělení. Vzniknou tak dvě samostatné buňky, které pak pokračují samostatně ve vývoji, jelikož podstupují každá svou segmentaci. Nakonec se pak obě samostatně uhnízdí v děloze. Výsledkem je těhotenství s dvojčaty. Vzhledem k tomu, že obě dvojčata pochází ze stejného vajíčka a ze stejné spermie, budou identická, tedy budou mít stejné pohlaví a budou si podobná i ve všech ostatních ohledech [5]. Metoda klonování embryí používá stejný přístup, jen s tím rozdílem, že se vše neodehrává v těle matky, ale na Petriho misce. Je toho dosaženo tak, že se ručně oddělí velmi rané embryo na jednotlivé buňky a těm se pak dovolí dále samostatně dělit a vyvíjet. Výsledná embrya jsou pak umístěna do těla náhradní matky. Protože všechna embrya pocházejí z téže zygoty, opět platí, že vzniklí jedinci jsou geneticky identičtí (obr.1) [4].



Obrázek 1 Klonování dělením embryí [4]

2.1.1 Počátky klonování embryí

První, komu se touto metodou podařilo naklonovat zvíře, byl Hans Driesch roku 1892. Tento německý biolog a filozof se proslavil právě svými ranými pokusy v oboru embryologie. Driesch prováděl své experimenty na zárodku mořské ježovky tvořené dvěma nebo čtyřmi buňkami. Podařilo se mu zárodek rozdělit na jednotlivé buňky a očekával, že se budou dál samostatně vyvíjet do odpovídající části zvířete. Zjistil však, že oddělené buňky se vyvinuly do úplného mořského ježka. Z každé buňky tak vznikl normální jedinec – klon [4,6].

Dalším kdo provedl stejný experiment, ale na dvoubuněčném zárodku žáby, byl německý embryolog Hans Spemann. Ten zárodek rozděлил vlastním vlasem na dvě části (dvě buňky). Právě Spemann předznamenal další vývoj klonování, při kterých jádro změní své původní uložení, ale o tom podrobněji až v následující kapitole [4].

2.1.2 Další úspěchy klonování embryí

V roce 1924 se narodil laboratorní potkan, jehož embryo vzniklo z buňky odebrané dvoubuněčnému zárodku. Roku 1968 přišli na svět králíci z embryí vzniklých oddělením jedné buňky z osmibuněčného zárodku [4].

Tato jednoduchá forma klonování, uskutečněná v laboratoři, namísto v těle matky si našla rychle cestu do praxe. Už koncem 70. let dokázali vědci speciálními přístroji rozdělit časné zárodky hospodářských zvířat na dvě části. Mezi první vědce, kteří tuto techniku zvládli, patří dánský biolog Steen Willadsen. Ten nechal vyvíjet zárodky ovcí a skotu vzniklé oddělením jednotlivých buněk z osmibuněčných embryí. Narodila se tak identická dvojčata k nerozeznání od dvojčat vzniklých přirozenou cestou. S tímto objevem je spojena možnost využití této metody v klonování vynikajících plemenných zvířat [4,7].

Velký ohlas vzbudilo oznámení, že se týmu Geralda Schatenna v roce 2000 podařilo touto cestou přivést na svět mládě makaka, slavnou opičku jménem Tetra [8].

Neuvěřitelný je i fakt, že lidské zárodky byly naklonovány již počátkem 90. let 20. století. V roce 1993 americký lékař Jerry Hall vzal do experimentu 17 lidských zárodků, které by jinak nebyly schopné přežít v důsledku těžkých vývojových vad. Na těchto zárodcích provedl umělé dělení na jednotlivé buňky. Takto oddělené buňky byly schopny dalšího

vývoje až do stádia kdy by se v těle matky začaly spojovat s dělohou a tvořit placentu. Hall viděl přínos této metody především v další šanci pro neplodné páry. Při umělém oplodnění jsou zárodky, které vznikly mimo tělo matky v laboratorních podmínkách, z předem odebraných vajíček a spermií, později vráceny do dělohy matky. Problémem je, že většina takto připravených zárodků uhynie již v raných stádiích vývoje. Právě proto je matce přenášeno do těla více embryí najednou. Komplikace však nastanou, jestliže se podaří připravit pouze jediné embryo. Právě v této situaci by měla uplatnění metoda dělení embryí. Získalo by se více embryí a tím by zvýšila i šance páru na potomka [4].

2.2 Klonování reprodukční

Reprodukční klonování se snaží vytvořit duplikát živého zvířete. Zjednodušeně, DNA (jádro) je vyňata z vajíčka a je nahrazena DNA z dospělého zvířete, čímž vzniká geneticky shodný jedinec. Poté je vajíčko, nazývané pre-embryo, implantováno do dělohy a vyvíjí se v nového jedince. V počátcích klonování touto metodou bylo hlavní otázkou, jak moc specializované buňky lze použít [1,2].

2.2.1 Počátky reprodukčního klonování

Prvním, kdo položil základy pro tuto metodu, byl již zmíněný Hans Spemann. Ten uvažoval o tom, jak specializovanou tělní buňku znovu přesvědčit, že je zygota a donutit ji k opětovnému dělení a vývoji. Spemann došel k závěru, že by mělo postačit, když by se spojila buňka s vajíčkem, z něž byla odstraněna jeho vlastní dědičná informace. Své závěry však již nestihl potvrdit, jelikož roku 1941 zemřel [4,7].

Na Spemannovi myšlenky navázal v padesátých letech tým amerických vědců vedených Thomasem Kingem a Robertem Briggsem. Pokusy prováděli na severoamerickém skokanu levhartím. Z neoplozených vajíček vyňali chromozomy a nahradili je chromozomy ze zárodečných buněk. Postupně zkoušeli používat stále specializovanější buňky a zjistili, že rostoucí specializací buněk klesá schopnost vývoje takto vzniklého zárodku a tím i šance na zdravý klon. Celkově se však jejich zárodky nevyvíjely dál než do stádia pulce [4,7].

V padesátých letech pracoval v Oxfordu na tomto experimentu také další tým vědců pod vedením švýcarského embryologa Michaela Fishberga. Na rozdíl od amerických vědců však pracovali s africkou žábou drápatkou. V počátcích zopakovali pokusy amerického týmu a setkali se s prvními úspěchy. Jejich připravené zárodky se vyvíjely do stádia pulce

a pak dokonce až do dospělého jedince. Dále se podařilo zjistit, že specializace tělních buněk není definitivní a za vhodných podmínek se dokážou vrátit do původního stavu, a jakoby se rozpomenout na chvíle, kdy byly zygotou, z níž se následně vyvine zdravý jedinec [4].

2.2.2 První úspěchy reprodukčního klonování – klony z embryonálních buněk

V dalších letech se tyto pokusy podařilo zopakovat biologovi Ericu Bromhallovi. Do králíčího vajíčka zbaveného vlastní genetické informace se mu podařilo zavést jádro z buňky časného králíčího zárodku. Takto vzniklý zárodek byl schopný se vyvíjet až do stádia, kdy by se začal spojovat s dělohou matky a tvořit placentu [4].

Průlomem pro klonování savců se stal rok 1989, kdy se podařilo Steenu Willadsenovi rozdělit časný ovčí zárodek na jednotlivé buňky a každou z nich spojil s ovčím vajíčkem zbaveným vlastní dědičné informace. Pro spojení buňky s enukleovaným vajíčkem (cytoplastem) využil metodu elektrofúze. Při ní je elektrickým výbojem zrušen elektrický náboj na membránách buňky a cytoplastu a oba útvary splynou v jeden, který se pak chová jako jednobuněčný zárodek. Po přenosu do těla náhradní matky se narodilo několik jehňat [4,7].

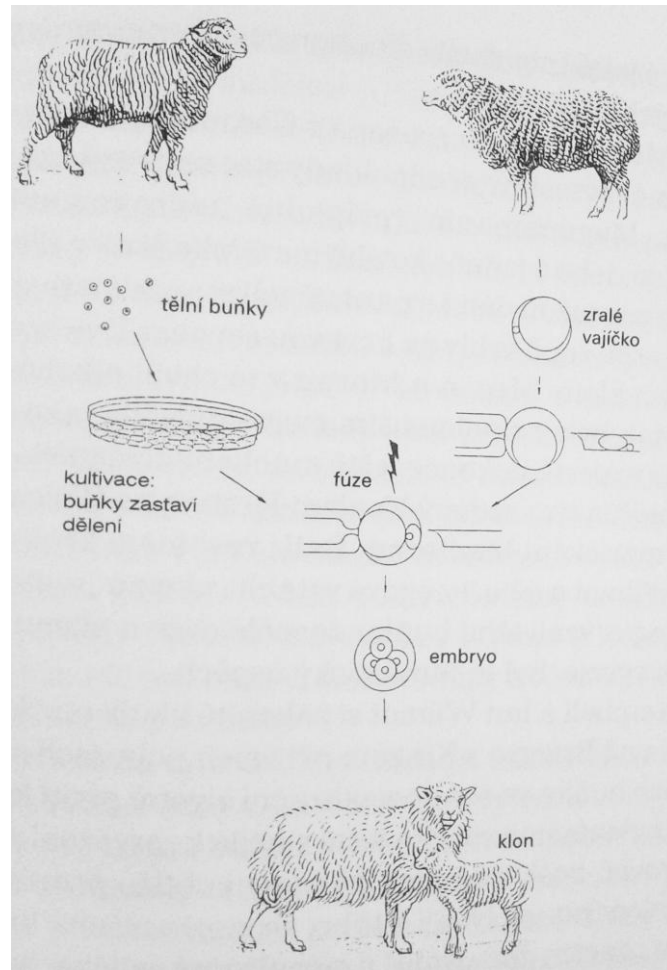
Jelikož metoda klonování embryí byla velmi finančně náročná, spotřebovalo se při ní velké množství embryí a měla nízkou úspěšnost, snažili se vědci vytvořit kmenové embryonální buňky. Jedním z těchto vědců byl i Keith H. S. Campbell. V laboratořích se snažil vytvořit právě takové podmínky, aby se buňky zárodku neomezeně množily, aniž by ztrácely charakter embryonálních buněk a dále se diferencovaly. To se mu však nepodařilo. Campbell přesto kultivoval buňky ovčího embrya dál až do stádia, kdy masa buněk již zárodek ničím nepřipomínala. Jádra těchto buněk pak fúzí zaváděl do ovčích vajíček zbavených vlastní dědičné informace. Vzniklé zárodky přenášel do těla náhradních matek. Nakonec se v Roslinu z těchto embryonálních buněk množených v laboratoři, narodila jehňata Megan a Morag. Padla tak představa, podle které jsou ke klonování vhodné pouze málo specializované buňky embrya [4].

2.2.3 Roslinská metoda klonování přenosem jader – ovečka Dolly

Mezi nejznámější klony planety patřila bezesporu roslinská ovečka Dolly. Za jejím zrozením stál embryolog Ian Wilmut a jeho tým, jehož členem byl i Keith H. S. Campbell, a jemuž je i přisuzován hlavní podíl na roslinském úspěchu (66 %) [9,10]. Rok 1997 se

zapsal do paměti jak laické, tak především odborné společnosti. Veřejnost se nezajímala ani tak o podstatu problému, jak o jeho možné využití na člověka, ale mezi odborníky do té doby nikdo nepředpokládal, že je možné, aby z diferenciované somatické buňky sloužící jako zdroj jádra mohl vzniknout nový jedinec identický s dárcem, z něhož byla buňka získána. Ovečka Dolly byla prvním savcem klonovaným metodou přenosu jader z dospělé somatické buňky. Buňka, která byla použita u Dolly, byla odebrána z vemene šestileté ovce. Ta pak byla spojena se zralým ovčím vajíčkem zbaveným vlastní dědičné informace procesem elektrofúze. Ještě předtím však bylo ze zralého vajíčka jemnou skleněnou kapilárou odsáto pólové tělísko a cytoplazma se zbytkem chromozomů, které obsahují až polovinu dědičné informace [4,11]. Zárodek tak v sobě obsahuje pouze dědičnou informaci od své předlohy, která poskytla buňku mléčné žlázy. Tento zárodek byl vložen do těla náhradní matky a ta po 148 dnech březosti porodila nevlastní jehňátko – Dolly (obr.2). Dolly se narodila 5. července 1996 [9]. K tomuto experimentu bylo však použito více typů buněk. Z počátku se jednalo pouze o opakování experimentů Steena Willandsena z roku 1986 a byly použity buňky z časných vývojových stádií ovčího zárodku. Pak byly vybrány buňky z ovčího plodu a až nakonec byly využity buňky z mléčné žlázy. Dále pokus probíhal stejně jako u ovce Dolly. Největší účinnost měla metoda, při které byly použity buňky z časných embryí – 1,75 %. Účinnost metody, při které byly použity buňky z ovčího plodu, přesáhla 1 %. Účinnost metody, kterou byla na svět přivedena ovečka Dolly, byla pouhých 0,36 %. Z toho plyne, že klonování z buněk plodu má největší vyhlídky do budoucna. V roce 1998 přivedla Dolly na svět svého prvního potomka jménem Bonnie (obr.3). Dolly umřela 14. února 2003 na onemocnění plic a těžkou artritidu. [4,9].

I přes úspěch klonování z diferenciovaných somatických buněk u ovečky Dolly se dlouho nikomu nepodařilo tento pokus zopakovat. Smůlu se podařilo prolomit v létě roku 1998 japonskému týmu vedenému Yukiem Tsunodou. Byla použita embrya připravena z granulóznic buněk (buňky obklopující vyvíjející se vajíčka ve vaječnicích) a z buněk vejcovodu. Celkově se podařilo kultivovat 10 embryí, která pak byla přenesena do těl náhradních matek. Narodilo se 8 telat (80% úspěšnost), z nichž čtyři umřela hned po narození. Posmrtná analýza však neodhalila žádné abnormality. První jalůvka se jmenovala OVI1 [12].



Obrázek 2 Roslinná metoda klonování [4]



Obrázek 3 Ovečka Dolly a její dcera Bonnie [13]

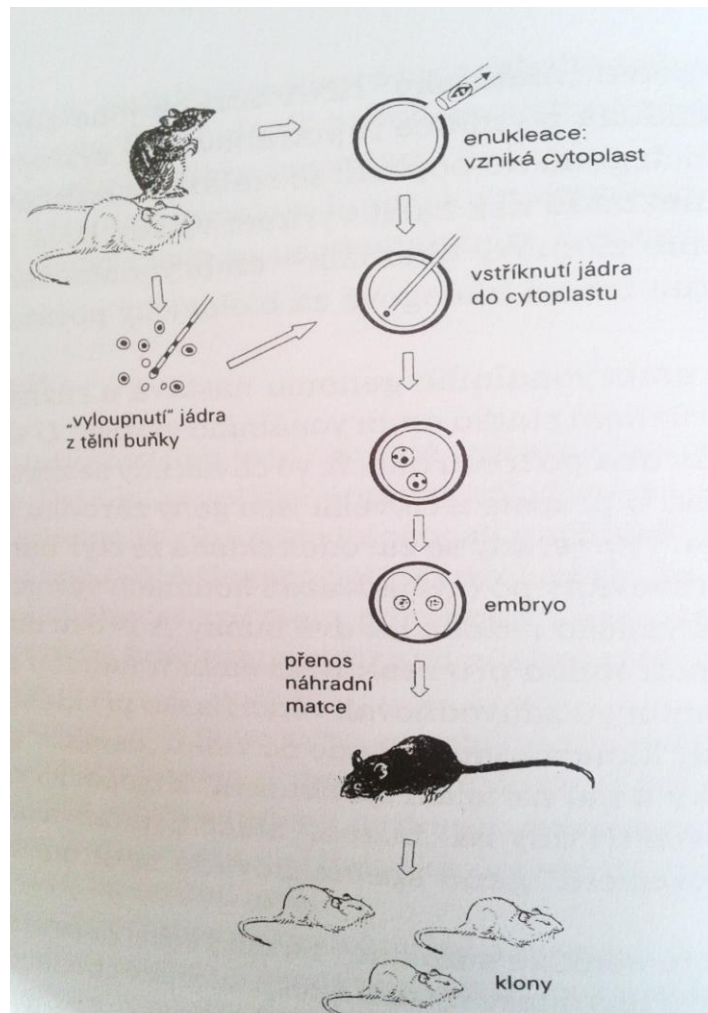
2.2.4 Honolulská technika přenosu jader – myš Kumulína

Další úspěchy na sebe nenechaly dlouho čekat a týmu japonských, amerických, britských a italských vědců z výzkumných laboratoří v Honolulu se podařilo přivést na svět první klon myši metodou přenosu jader. Klonování myši se dlouho setkávalo s mnoha překážkami a vědci se dlouho domnívali, že rostlinskou technikou přenosu jader z diferenciovaných somatických buněk nelze myš naklonovat. Tým vedený Rjuzem Janagimačim použil podobnou techniku jako jeho kolegové v Roslinu, bývá označována také jako honolulská (přenos jader honolulskou technikou) [4,7]. První kroky probíhají stejně. Je potřeba vajíčko zbavené vlastní dědičné informace a jádro odebrané z těla dospělého zvířete. V Honolulu byly použity granulózní buňky. Především metody odebrané jádro vnášely do cytoplasmu procesem elektrofúze. Zde se však honolulská technika výrazně liší. Pomocí speciální velmi tenké pipety jsou granulózní buňky nasávány dovnitř. Pipeta má však právě takový průměr, aby neprošla celá buňka, ale pouze její jádro. Holá jádra jsou pak pomocí speciálních mikropipet vstříkována do vajíčka, jejíž jádro bylo předtím odstraněno. Vývoj zárodku je po určité době odstartován umělým stimulem. Výzkumníci výsledné kultivované buňky přenesli do těla náhradních myši a dovolili jim dále se rozvíjet [14,15]. Narodila se první klonovaná myš pomocí této metody (obr.4). Protože byly při jejím vzniku použity granulózní buňky (neboli buňky kumulativní či folikulární), byla pojmenována jako Kumulína. Opakováním postupu vytvořil tým druhé a třetí generace myši, které byly identické s původní předlohou. Sama myš Kumulína prožila zdravý a aktivní život a stihla vrhnout hned dvakrát mláďata. Později jí byl odstraněn kožní nádor, který není u myši ničím neobvyklý. Zemřela na stáří v ctihodném věku 34 měsíců. Vědci dokázali, že klonování honolulskou technikou je mnohonásobně úspěšnější než klonování technikou rostlinskou [4,15].

2.2.5 První klonovaný samec – myšák Fibro

Je to až neuvěřitelné, ale až do roku 1998 byly známé pouze klony samičího pohlaví. Vysvětlení je velmi jednoduché. Většina těchto pokusů měla za cíl získat zvířata, která by v sobě nesla lidský gen, který by byl produkován například v mléce a byl by pak využitelný při léčbě závažných lidských onemocnění. Klonováním samců by se tato produkce značně oddálila. První samčí klon se pokusili vytvořit opět v laboratořích v Honolulu a podařilo se jim to asi rok po velkém úspěchu s myší Kumulínou [4]. Byla použita stejná metoda jako dříve. Místo granulózních buněk však byly použity fibroblasty ze špičky

ocásku dospělého myšího samce. Připravili tak více než 700 zárodků, z nichž vybrali 272 a ty po kultivaci aplikovali do těl náhradních matek. Touto technikou se podařilo přivést na svět tři myší samce. Dva z nich zemřeli ihned po narození. Přeživší klon byl pojmenován Fibro. Fibro se vyvíjel normálně a pářil se úspěšně, produkoval dva zdravé vrhy [16].

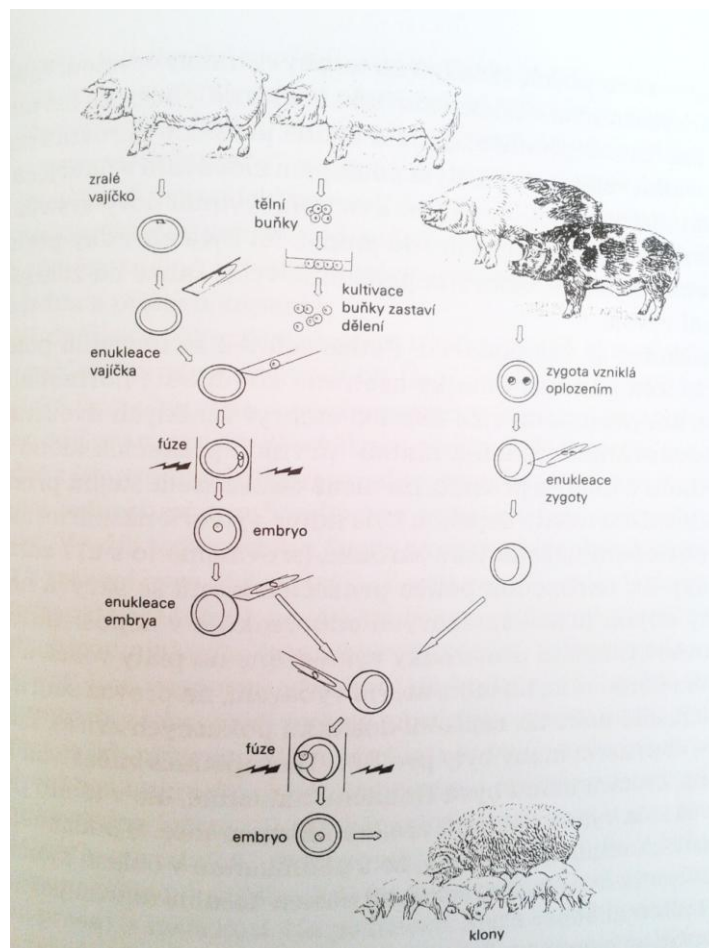


Obrázek 4 Honolulu metoda přenosu jader [4]

2.2.6 Dvoustupňové klonování prasat

Mezi největší úspěchy klonování můžeme s jistotou zařadit i první úspěšné klonování prasat. Klonování prasat se od začátku potýkalo s mnoha problémy. Obecně se jedná o mnohem složitější proces, ve srovnání s rostlinným klonováním ovce. První kroky jsou totožné. Byl připraven jednobuněčný zárodek z cytoplastu a granulózní buňky. Ten byl po dobu jednoho dne kultivován v laboratorních podmínkách. Mezitím bylo odebráno prasnici

oplozené vajíčko. Z oplozeného vajíčka byla odstraněna mateřská i otcovská dědičná informace. Do takto připraveného cytoplastu bylo vloženo jádro z připraveného jednobuněčného embrya. Tento proces je označován jako dvoustupňové klonování a je velmi náročný. Další z příčin nízké úspěšnosti klonování prasat je to, že prasnice je schopná plod donosit jen v případě, pokud se v jejím těle vyvíjí společně více zárodků, nejméně pět. Celý proces byl vzhledem ke složitosti procesu přípravy embryí, jejich nízké životaschopnosti a nutnosti aplikovat jich do těla matky obrovské množství v naději, že některá přežijí, velmi časově náročný. Aby se zvýšila šance na uchycení zárodku v těle a zdárný vývoj plodu, vyvinuli vědci speciální hormonální léčbu, která byla prasnicím po dobu těhotenství aplikována [4,17]. I přes velké nesnáze se podařilo týmu v americkém Blackburgu v březnu roku 2002 (pod záštitou britské firmy PPL Therapeutics), na svět přivést pět zdravých selat jménem Millie, Christa, Alexis, Carrel a Dotcom (obr.5) [17,18].



Obrázek 5 Dvoustupňové klonování prasat [4]

2.2.7 Klonování prasat honolulskou technikou – prasátko Xena

Souběžně s americkým týmem se podařilo i japonskému týmu vědců pod vedením Akira Onishiho z Národního ústavu živočišného průmyslu naklonovat prasátko, které dostalo jméno Xena. Jméno Xena podtrhává jednu naději pro budoucnost, kterou je xenotransplantace, kde by prasata mohla být používána jako dárce geneticky modifikovaných orgánů člověku. Japonští vědci na rozdíl od týmu z Blackburgu použili honolulskou techniku klonování. To znamená, že do cytoplazmy vstříkli jemnou kapilárou jádro buňky z prasečího plodu. Oproti první metodě klonování prasat je tento proces jednodušší [4, 19].

2.2.8 Meزيدruhové klonování – klon muflona

Možnost mezidruhového klonování vystupuje do popředí především s myšlenkou záchrany ohrožených druhů zvířat. V těchto případech jsou buňky z těla příslušníků ohrožených živočichů vnášena do vajíček blízce příbuzných druhů hospodářských zvířat [20].

První zvíře úspěšně naklonované touto metodou se narodilo na Sardinii. Jednalo se o mládě muflona. Domovinou evropského muflona je právě Sardinie, Korsika a Kypr. V středomoří je muflon chráněný, jelikož před sto lety téměř vymřel. Od té doby žije v rezervacích. Pro tento pokus byla použita dvě nalezená těla uhynulých muflonek. Z nich odoperovali vaječníky a z těch následně získali mufloní vajíčka a granulózní buňky, které vajíčko obklopují. Bohužel vědci zjistili, že získaná vajíčka i granulózní buňky jsou již mrtvé. Pokusili se proto použít náhradní vajíčka od hormonálně stimulovaných ovcí a doufali, že genetický materiál v granulózních buňkách není příliš poškozený. Ve vhodný okamžik byla vajíčka z těla ovcí odebrána a následně z nich byly rostlinskou technikou připraveny cytoplasty. Po splynutí s jádry granulózních buněk a následné kultivaci byla vzniklá embrya přenesena do těl hormonálně stimulovaných domácích ovcí. Celkem vědci aplikovali náhradním matkám sedm embryí. Přežilo jedno embryou z něhož se listopadu 2000 narodilo těžké mufloní mládě. Muflonek byl zcela zdravý a netrpěl žádnými vývojovými vadami [4,20].

2.2.9 Klonovaný gaur

V říjnu roku 2000 oznámili vědci z americké biotechnologické firmy Advanced Cell Technology, že koncem listopadu přijde na svět první klonovaný živočich náležející k ohroženému druhu. Malý býček Noah se narodil holštýnské krávě Bessie, ale on sám byl zástup-

cem gaurů. Kdysi obývali gauři rozsáhlé končiny Nepálu, Ásamu, Barmy, Indočíny, Malajska a Přední Indie. Dnes jsou tu velice vzácní. Ničení přirozeného životního prostředí a intenzivní lov zatlačily gaury do vysokohorských lesů, kde jich přežívá asi 36 000. Gaur se proto ocitl na seznamu ohrožených druhů [4].

Noah vznikl ze zmrazených buněk uhynulého gauřího býka. Konkrétně se jednalo o kožní buňky, které vědci spojili elektrofúzí s cytoplasty získanými z vajíček domácího skotu. Vzniklá embrya byla kultivována a z nich bylo následně 42 vybráno, aby byla implantována do těl náhradních kravských matek. Životaschopný plod se vyvíjel pouze u krávy jménem Bessie. Klon gaura byl nakonec přiveden na svět císařským řezem v prvních dnech roku 2001. Opožděný porod zavinila prodloužená březost, která se řídila spíše březostí gaurů, která je o něco delší než březost u domácího skotu. Noah měl od narození mnoho zdravotních problémů. Musel dýchat kyslík a na nohy se postavil až po dvanácti hodinách. Nakonec, po 48 hodinách, Noah umřel na silnou střevní infekci [4,21].

2.2.10 První kočičí klon – CopyCat

První kočičí klon se narodil 22. prosince roku 2001 v Texasu. Celý projekt byl financován soukromě v rámci projektu CopyCat pod vedením Marka Westhusina a týmu vědců z Texaské A&M Univerzity. Projekt CopyCat je vlastně součástí mnohem většího projektu, který má za cíl naklonovat psa. Z velké části ho financuje arizonský finančník John Sperling, který chce naklonovat svého zastřeleného psa border-kolii jménem Missy [22].

Klonování kočky je podobně úspěšné jako klonování myši, krávy, ovcí či prasat. První naklonovaná kočka přišla na svět klasickou rostlinskou metodou. Vajíčka z vaječníků vědci získali z veterinárních klinik od kastrovaných koček. Z těch pak odstranili dědičnou informaci a elektrofúzí je spojili s jádry buněk. Westhusinův tým nejprve používal kožní buňky fibroblasty. Ačkoliv se podařilo sedmi náhradním matkám implantovat 82 embryí, pouze jedna z nich otěhotněla. Plod však brzy zemřel. V dalším pokusu vědci použili granulózní buňky strakaté kočky jménem Rainbow. Z 83 embryí se podařilo jednomu v těle náhradní matky, kočky Allie, uchytit a na svět pak císařským řezem přišla první klonovaná kočička jménem CC (podle jména projektu CopyCat) [18,22].

2.2.11 První klon bantenga

Bantengové obývají pralesy jihovýchodní Asie. Jejich populace byla však téměř vyhlazena především kvůli ničení jejich přirozených stanovišť a pytláčení. Dnes žije na světě asi 8000 bantengů, a proto se již ocitli na seznamu ohrožených druhů. Proto když v roce 1980 uhybnul v zoologické zahradě v americkém San Diegu býček bantenga, byla to pro všechny velká ztráta. Zoo v kalifornském San Diegu má však jednu netradiční pobočku. Jedná se o takzvanou Zmrzlou Zoo (Frozen Zoo). V tekutém dusíku, zamrazené na teplotu minus 196 °C, jsou zde uloženy buňky nejvzácnějších živočichů planety [23].

Oživit mrtvého býčka se pokusili ve firmě Advanced Cell Technology pod vedením Roberta Lanzy. Zamrazené buňky nebyly nijak poškozeny, a proto je vědci mohli následně použít. Nejprve byly opatrně rozmrazeny. Vajíčka odebraná domácím stračenám byla zbavena vlastní dědičné informace. Ta byla nahrazena dědičnou informací z buněk bantenga. Vzniklá embrya byla implantována do těl náhradních kravských matek. Celkově se narodili dva býčci, z nichž jeden zemřel následkem těžkých postižení ihned po narození. Druhý býček se však narodil zcela zdrav [24].

2.2.12 První králičí klon

O velikonocích roku 2002 se podařilo na svět přivést první králičí klon. Za tímto úspěchem stojí tým francouzských vědců vedených Jean-Paulem Renardem z Francouzského agronomického výzkumného ústavu (INRA) [25]. Z počátku se vědci setkávali hlavně s neúspěchy a králíci tak patřili na seznam mnoha zvířat, která dosud odolávala klonování. Vědci použili rostlinskou techniku. Byly použity dospělé somatické buňky, které byly sloučeny s vajíčkem zbaveným vlastní genetické informace. Problém s klonováním králíků byl především ve vysoké citlivosti králičích vajíček. Pro navození určitých procesů při klonování je nutné použít některé chemikálie. Francouzským tým vědců přišel právě na to, že tyto chemikálie se mohou používat pouze v co nejmenších účinných koncentracích a v co nejkratším čase, aby králičí vajíčka nebyla poškozena. Dále se jim podařilo určit přesný čas, kdy je možné implantovat připravená embrya do těl náhradních matek, aby bylo zajištěno normální těhotenství. I tak byla práce francouzského týmu vědců velmi neefektivní. Ze stovky připravených embryí se podařilo na svět přivést pouze šest králičích mláďat a z toho dvě zemřela krátce po narození. Zbývající čtyři králičí klony se měly čile k světu a dvěma z nich se dokonce podařilo na svět přivést zdravá mláďata [25]. Vědci se

pokoušeli tak dlouho o naklonování králíka především kvůli využití králíčích klonů při léčbě a hledání příčin nemocí u člověka. V současné době věda inklinuje při výzkumu k používání myši nebo potkanů. Králík však může představovat lepší alternativu především proto, že jejich fyziologie a nemoci se více podobají těm lidským [25,26].

2.2.13 Mezidruhový hybrid – mula Idaho Gem

4. května roku 2003 se narodil první klon muly pojmenovaný Idaho Gem. Mula je kříženec osla a kobyly a její dědičná informace obsahuje 63 chromozomů. Dědí od rodičů 32 chromozomů koně a 31 chromozomů osla. Výsledná konstelace sice zajišťuje mulám jejich výborné užitkové vlastnosti, ale zároveň jim brání v reprodukci. A proč se vědci pokoušeli naklonovat zrovna zvíře, které je sterilní a proto nemůže mít žádné potomky? Proč když usilovali o klon lichokopytníka, se nezaměřili rovnou na koně? Odpověď je jednoduchá. Prezident Americké asociace mulích závodů Donald Jacklin se dlouho snažil sehnat tým, který by se pokusil mulu naklonovat. Klisna, která již dříve porodila mnohonásobného šampiona, potratila a Jacklin se s tím nehodlal smířit. Od nenarozeného zvířete odebral živé buňky a ty nechal zamrazit. Potom se snažil přesvědčit některý z vědeckých týmů, které se zabývaly klonováním, aby se pokusili jeho potencionálního šampiona naklonovat. Uspěl až u týmu Gordona Woodse z Moskevské univerzity v Idahu. Rozhodujícím faktorem pro Woodsův tým byl především tučný finanční příspěvek od Donalda Jacklina. Od počátku se jednalo o nelehký úkol, na kterém pohořelo již mnoho vědeckých týmů z USA, Británie i Austrálie. Vědci použili vajíčka odebraná klisnám a dále pokračovali rostlinskou technikou. Z vajíček odstranili jejich vlastní dědičnou informaci a místo nich vpravili dědičnou informaci rozmražených buněk nedonošeného plodu muly. Problém nastal v okamžiku kultivace embryí. Vědci zjistili, že koncentrace vápníku v koňských buňkách je nižší než u jiných živočichů, například ovce či skotu. Přitom zvýšení koncentrace vápníku slouží většině živočichů jako signál pro zahájení embryonálního vývoje po oplození. Zkoušeli embrya kultivovat v různých prostředích. Přežila pouze ta, která byla ponechána v médiu s vyšší koncentrací vápníku. Celkově bylo získáno 305 embryí, která byla implantována náhradním klisnám [27,28]. Z nich se narodil první klon muly Idaho Gem a rok poté ještě dva jeho bratři Idaho Star a Utah Pioneer. Idaho Gem a Idaho Star se společně v následujících letech zúčastnili několika závodů. Pro srovnání, Idaho Gem skončil třetí a Idaho Star sedmý; je tak zřejmé, že i když jsou klony geneticky totožné, jejich výko-

ny totožné nejsou. Rozhoduje o tom celý komplex faktorů jako výživa, trénink, momentální forma, výkon jezdce a podobně [29]. Celkový výzkum zabral dlouhých pět let a jeho úspěšnost byla pouhé 1 %. Woods se domníval, že pochopení toho, jak je upravena hladina vápníků v buňce koně, by mohlo přispět k pochopení a léčbě nemocí jako je cukrovka nebo rakovina prostaty, které jsou typické vysokými hladinami vápníku, a dále se tímto výzkumem zabýval. Bohužel, nečekaně zemřel 29. května 2009 ve věku 57 let [27,28].

2.2.14 Klisna Prométhea

Další klonované zvíře, kterému můžeme dát přívlastek první, byl kůň. Stalo se tak pár měsíců po úspěchu Woodsova týmu s klonováním muly. Klisnu Prométheu přivedli na svět v laboratořích reprodukčních technologií v Cremoně, vedených Cesarem Gallim [30]. Prométhea byla klonována klasickou rostlinskou metodou a použity byly kožní buňky. Kožní buňky byly odebrány klisně plemene hafling a hřebci arabského plnokrevníka. Vajíčka získávali Italové na jatkách z těl poražených klisen. Úspěch, ale nebyl zaručen. Z 841 úspěšně rekonstruovaných embryí, se do fáze blastocysty podařilo přežít jen osmi embryím pocházejících od hřebce a čtrnácti od klisny. Nakonec se podařilo připravit pouze 17 embryí, která byla vhodná pro implantaci do těl náhradních matek. Pouze čtyři vedli k těhotenství a Prométhea, narozená po 336 dnech, jako jediná přežila. Shodou okolností ji donosila stejná klisna, která pro pokus poskytla kožní buňky. DNA testy potvrdily, že byla genetickým dvojčetem své matky. Tato skutečnost zpochybnila myšlenku, že mateřské imunologické rozpoznávání antigenu plodu má vliv na úspěšný vývoj plodu a zdárné ukončení těhotenství [18,31]. Prométhea byla v dobrém zdravotním stavu a v roce 2005 na svět přivedla hříbě jménem Pegaso. Z klonování koní se ve světě stává úspěšný byznys. Ve Spojených státech lze komerčně klonovat koně. Náklady se pohybují kolem 150000 dolarů, ale jsou velmi variabilní. Stoprocentní úspěch totiž nelze zaručit. I přesto, že klonovaná hříbata nelze na mnoha sportovních akcích registrovat, je o tyto služby stále zájem [30,31].

2.2.15 První klon divoké kočky

Jako prvním na světě se podařilo naklonovat africkou divokou kočku v New Orleansu, v Louisianě. Jednalo se o výsledek převratných výzkumů prováděných v přírodním ústavu

v Audubonu, vědci z Audubonského centra pro výzkum ohrožených druhů a Louisianské státní univerzity. Narozené kotě bylo prvním klonovaným divokým masožravcem [32].

Doktoři Pope a Gomez odebrali vzorky tkáně z afrického divokého kocoura jménem Jazz. Tyto buňky byly kultivovány v laboratorních podmínkách a poté zamrazeny. Poté byla z vajíček odebraných kočky domácí odstraněna vlastní DNA. Rozmrazené buňky Jazz byly aplikovány do připravených buněk domácí kočky a spojeny metodou elektrofúze. Přípravná embrya byla aplikována do těl náhradních matek, kde měla pokračovat v normálním vývoji. Kotě pojmenované Ditteaux se narodilo kočky domácí jménem Brooke. Koťátko bylo ošetřováno a opečováváno náhradní matkou, domácí kočkou Cayenne, kterou později adoptoval doktor Pope. Jedná se vlastně o první mezidruhový klon ze zmrazených buněk. Vědci z louisianského týmu specializujících se na záchranu ohrožených druhů vidí v tomto experimentu cestu jak zachránit jiná zranitelnější zvířata, které jsou již před vyhubením [32,33].

2.2.16 První klonovaný jelen

Toto prvenství náleží týmu z Texaské A&M Univerzity, který má již za sebou další úspěchy s klonováním dobytka, koz, prasat a koček. Klon byl vyroben za použití fibroplastů, které byly izolovány z kůže uhynulého jelena běloocasého jménem Buck. Následně byly kultivovány a uloženy v tekutém dusíku. Oocyty byly použity z buněk vaječníku. Dva týmy vědců pod vedením Dr. Marka Westhusina a Dr. Duane (Dewey) Kraemera z Texaské A & M Univerzity a Dr. Charlese Longa z klonovací společnosti Viagen provedli další procedury nukleárního převodu a přenesli připravená embrya do těl náhradních matek. Koloušek Dewey se narodil náhradní matce Sweet Pea 23. května 2003. Vyvíjel se normálně pod lékařským dohledem doktorky Alice Blue-McLendonové, veterinářky z Texaské A&M Univerzity. I když běloocasý jelen se hojně vyskytuje v divočině, Westhusin uvedl v prohlášení o vytvoření Deweyho, že získané poznatky by se mohly ukázat jako užitečné v ochraně ohrožených druhů zvířat [18,34].

2.2.17 Klonovaný potkan z dlouhodobě zmrazených buněk

Roku 2003 se týmu francouzských vědců z Národního institutu pro zemědělský výzkum v Jouy en Josas, podařilo úspěšně naklonovat potkana. Mezinárodní tým vedený Jeanem-Paulem Renardem se však od počátku potýkal s nepříjemným problémem. Vajíčko potkana

se ihned po opuštění vaječnicků začne velmi rychle vyvíjet v neživotaschopné embryo a nebylo proto možné provést v tak krátkém čase všechny kroky důležité pro přípravu klonovaného embrya. Vědci z Ranardova týmu tento problém vyřešili použitím chemikálie MG 132, která pozastavuje dělení buňky a brání tak vajíčku v jeho nežádoucím dělení. Pro klonování potkanů vědci zvolili rostlinskou metodu a použity při ní byly jádra somatických buněk potkana, která byla vnesena do vajíček zbavených vlastní dědičné informace. Podařilo se připravit 129 klonovaných embryí, která byla implantována dvěma náhradním matkám. Přežila tři embrya, z kterých se narodila tři potkaní mláďata. První klon byl pojmenován Ralph. Jeho další dva bratříčci už jméno nedostali a jeden z nich navíc velmi záhy uhynul. I přes velmi malou úspěšnost klonování a mnoho problémů s ním spojených se Ralph vyvíjel velmi dobře a úspěšně se pářil [35,36]. Důvod pro klonování potkanů byl především fakt, že patří mezi zvířata, na kterých se provádí lékařský výzkum, a dále možnost klonovat upravené potkany, kteří by se svou fyziologií více podobali člověku [35].

2.2.18 První klonovaný pes

Afgánský chrt jménem Snuppy se narodil 24. dubna 2005 v korejském Soulu. Za jeho narozením se skrývá dva a půl roční práce patnáctičlenného týmu vedeného Woo Suk Hwangem, jehož členem byl i Gerald Schatten z Univerzity v Pittsburgu. Jedním z největších problémů při klonování psa bylo problematické zrání psích vajíček v umělém prostředí a jejich odebrání. Psí vejce opouští vaječnick ve velmi rané fázi vývoje a pak zralé putují směrem k děloze. Vědci se snažili odebrat vajíčka v okamžiku ovulace, ale to se jim nezdařilo. Proto se rozhodli vajíčka získat proplachováním vaječnicků. Po několika neúspěšných pokusech se jim to podařilo. Dále odebrali buňky z ucha psa, který patřil jednomu z profesorů z místní veterinární fakulty. Z nich byla připravena klonovaná embrya opět rostlinskou metodou. Celkem se podařilo připravit neuvěřitelných 1095 embryí, která následně putovala do děloh 123 náhradních matek. Feny, které byly pro pokus použity, musely podstoupit hormonální léčbu, aby se v nich vložené embryo uhnízilo a zabřezly. Pouze tři embrya se uchytila a vedla k těhotenství. Jedno z nich bylo bohužel potráceno. Z dalších dvou se narodila štěňata, ale jedno z nich dva týdny po porodu umřelo na zápal plic. Jediným přeživším byl právě Snuppy, kterého se podařilo přivést na svět fence Labradorského retrívra [18,37].

Snuppy byl pojmenován podle iniciál Národní univerzity v Soulu (Soul National University) a slova štěně (puppy). Snuppymu byly odebrány spermie, z kterých bylo metodou umělého oplodnění přivedeno na svět 10 štěňátek, z nichž devět přežilo. Jedinou skvrnou na jejich úspěchu je falšování některých výsledků doktorem Woo Suk Hwangem. Byl proto z ústavu následně vyloučen a výsledky jejich práce musely být překontrolovány komisí [37]. Přesto korejský tým dál úspěšně pokračuje v klonování psů a dokonce i vlků. V březnu 2005, již pod vedením Lee Byung-chuna a Shin Nam-Shika, se podařilo naklonovat dvě vlčice jménem Snuwolf a Snuwolffy [37,38].

2.2.19 Klonované fretky

Pro klonování fretek se vědci rozhodli zejména kvůli podobnosti jejich dýchací soustavy s lidskou. Fretka se používá jako modelový živočich při výzkumu mechanismů infekce chřipkovým virem, včetně viru H5N1 vyvolávajícího ptačí chřipku, či při studiu cystické fibrózy. Tvorba fretek postižených různými typy mutací genu způsobujícího například cystickou fibrózu by tak byla obrovským přínosem při výzkumu nemoci a jejich následné léčbě. Takto upravená zvířata by bylo možné získat právě klonováním [39].

Této výzvy se chopil tým amerických, francouzských a čínských vědců vedený Johnem Engelhardtem z Iowské univerzity. Engelhardtův tým se nejprve pokoušel vyvinout hormonální léčbu samic, aby zajistil dostatečné množství vajíček. Následně se pokoušeli získaná embrya kultivovat a vyvinout techniku pro přenos náhradním matkám. Vyvinutá hormonální stimulace se ale později ukázala jako naprosto nevhodná, jelikož vajíčka získaná od samic, které nebyly podrobeny hormonální léčbě, se vyvíjela lépe než ta, která byla získána od samic hormonálně ošetřených [39,40]. Kvůli odběru vajíček byly fretky následně utraceny a vaječníky jim byly poté odebrány. Z nich vědci získali vajíčka, která nechali dozrát v laboratorních podmínkách. Problémy nastaly i při pokusech spojit vajíčko zbavené vlastní dědičné informace s tělní buňkou fretky. Proto vědci připravili pro splynutí hned dvě buňky a doufali, že aspoň jedné z nich se podaří splynout s vajíčkem. Pro pokus byly použity buňky fibroblastů a granulózní buňky. Nakonec se podařilo metodou elektrofúze připravit 430 embryí z buněk fibroblastů a 487 embryí z granulózních buněk. Z fibroblastů se podařilo v těle náhradní matky uchytit a následně vyvinout jednomu embryu. Na svět přišel samec fretky, který ale zemřel tři dny po narození. Úspěšnost se tak pohybovala kolem 0,96 %. Z granulózních buněk se podařilo přivést na svět dvě zdravá mláďata jménem

Libby a Lilly. Úspěšnost tak již byla o něco vyšší, asi 1,8 %. Obě fretky byly zcela zdravé a obě přivedly na svět mláďata. Lilly šest a Libby dokonce deset [40].

2.2.20 První klonovaný buvol – „Handguided“ klonovací technika

Buvoli jsou v Asii velmi důležitá hospodářská zvířata, která se chovají nejen jako tažná zvířata, ale také kvůli jejich masu, mléku a kůži. Celkově na světě žije populace asi 174 milionů buvolů, z toho zhruba 167 milionů buvolů se nachází v asijském regionu. I přesto je zaznamenán velký pokles populace buvolů, který je způsoben především rostoucí urbanizací, industrializací, z toho plynoucí nárůst porážky buvolů kvůli uspokojení potřeby masa, dále špatné reprodukční schopnosti buvolů a nezáměr politických stran tento problém nějakým způsobem řešit [41].

Touto problematikou se zabývali vědci z Národního výzkumného ústavu mléka (NDRI) v Karnalu a snažili se najít řešení jak uspokojit rostoucí poptávku po mléku a mase buvolů v zemi, spojenou především s rostoucí populací lidí. Jedním z řešení bylo klonování. Produkci elitních zvířat s vysokou doživostí, rychlým nárůstem svalové hmoty a výbornými reprodukčními schopnostmi by se dala vyplnit mezera na současném trhu. Členům týmu doktora S. K. Singla, doktorům R. S. Manikovi, M. S. Chauhanovi, P. Paltovi, R. A. Shahovi a A. Georgeovi se podařilo první buvolí mládě naklonovat 6. února roku 2009. Při tomto pokusu si vědci poněkud zjednodušili a vylepšili rostlinskou metodu klonování. Tato technika bývá označována jako „Handguided“ klonovací technika. Klasická metoda klonování si vyžaduje drahá zařízení jako jsou mikromanipulátory a podobně, navíc je velmi náročná na čas a dovednosti laboratorních pracovníků. Vědci z Karnalu si tuto metodu ve svých podmínkách trochu přizpůsobili. Při tomto pokusu byly oocyty izolované z vaječníku jatečných zvířat kultivovány a poté byla jejich jádra odstraněna pomocí velmi jemného ostří. Somatické buňky byly odebrány z ucha právě narozeného buvolího mláděte a následně byla použita jejich jádra. Ta byla spojena s oocyty metodou elektrofúze a výsledná embrya byla následně převedena do těl náhradních buvolích matek. Podařilo se tak na svět přivést prvního klonovaného buvola. Vědci z Karnalu se dále zabývali metodami klonování buvola a experimentovali i s embryonálními kmenovými buňkami, se zamrazenými embryi a podobně. První buvolí mládě tak rychle následoval druhý klon narozený 6. června 2009 a třetí 22. srpna 2010 [18,42].

2.2.21 První klonovaný velbloud

První klonovaný velbloud přišel na svět ve Spojených arabských emirátech v hlavním městě Dubaji. Tomuto úspěchu předcházelo pět let tvrdé práce týmu vědců vedených doktorem jménem Ahmad Nisar Wani, jenž je vedoucím laboratoří reprodukční biologie v centru zabývající se reprodukcí velbloudů v Dubaji. Injaz, první klonovaná samice dromedára, se narodila 8. dubna 2009 [43]. Vajíčka byla získána z vaječníků velbloudů poražených na jatkách. Jádra byla použita z několika typů buněk a to z fibroblastů získaných z kůže, z granulóznic buněk a z fetálních fibroblastů. Buňky byly pěstovány v tkáňové kultuře a poté zamrazeny v tekutém dusíku. Buňky vaječníků zbavené své vlastní dědičné informace byly spojeny s jádry použitých buněk spojeny metodou elektrofúze a následně chemicky aktivovány k dělení. Rekonstruovaná embrya byla po dobu sedmi dnů kultivována téměř až do stádia blastocysty a poté převedena do těl náhradních velbloudích matek, které byly právě šest dní po ovulaci. Těhotenství bylo dosaženo téměř ze všech druhů připravených embryí, ale zdravé velbloudí mládě se narodilo z embrya připraveného z granulóznic buněk. Injaz se narodila po 378 denním těhotenství s porodní váhou 30 kilogramů a následnými genetickými testy byla potvrzena její totožnost s dárce granulóznic buněk. Tímto pokusem byla také demonstrována schopnost klonování z kultivovaných, pomnožených a následně zamrazených dospělých buněk fibroblastů a fetálních fibroblastů bez ztráty jejich schopnosti podporovat rozvoj jaderného přenosu embryí. Největší úspěch vidí vědci v možnosti zachování geneticky cenných druhů zvířat jako například vysokých producentů mléka, závodních šampiónů a záchraně ohrožených druhů [44].

2.3 Klonování terapeutické

Problémem dnešní populace je mnoho nevléčitelných onemocnění, mezi které patří například Parkinsonova choroba, demyelinizační poruchy (např. roztroušená skleróza, *sclerosis multiplex*), Duchennova svalová dystrofie, ale i infarkt myokardu, *diabetes mellitus*, autoimunitní onemocnění a jiné. Velký potenciál pro léčbu těchto chorob je skryt v kmenových buňkách [45].

2.3.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou buňky, které se mohou samy stále obnovovat a kromě toho dávají vzniknout i jednomu nebo více druhům vysoce diferencovaných (specializovaných) buněk, které mají v těle charakteristické funkce [45,46].

Kmenové buňky jsou prvními buňkami, které vznikají při vývoji nového organismu. Jsou určeny svým vývojovým potenciálem. Pojem kmenové buňky má význam v souvislosti se zárodečnou linií: vajíčka a spermie, které po splnutí vytvoří celý organismus, jsou produktem zárodečných linií [45,46].

2.3.2 Vznik a typy kmenových buněk

Oplozené vajíčko (zygota) je totipotentní kmenová buňka vytvářející všechny buňky organismu. Během vývoje jsou buňky směřovány k jednotlivým vývojovým drahám a jejich vývojový potenciál se mění, ale je stále ještě široký. Tyto multipotentní buňky již mohou vytvářet jen omezený počet buněk. Kmenové buňky multipotentní, ale často i unipotentní, se vyskytují také v dospělých tkáních. Ve fetálním období s vyžíváním tkání přibývá ve tkáních specializovaných buněčných typů, ale kmenové buňky již nově nevznikají (jejich absolutní počet však zůstává díky schopnosti sebeobnovy zachován) a s postupujícím vývojem se jejich počet snižuje. V dospělých tkáních se odhaduje, že jedna kmenová buňka připadá na zhruba 10 000 zralých buněk. Kmenové buňky ve tkáních tedy setrvávají po celou dobu života [46,47].

Z výše uvedených informací vyplývá, že v různých etapách vývoje vznikají různé kmenové buňky a ty vedle sebe mohou přetrvávat i v dalších etapách vývoje, navíc při vzniku orgánů dochází k interakcím mezi různými typy tkání a proto se v jednom orgánu nachází více typů kmenových buněk [46].

Kmenové buňky se podle svého diferenciačního potenciálu rozdělují na různé typy:

- Progenitorové (unipotentní) kmenové buňky se mohou specializovat pouze v jeden buněčný typ. Jsou to například epidermální kmenové buňky, které regenerují kůži.
- Multipotentní kmenové buňky se mohou diferencovat v několik buněčných typů, například hematopoietické kmenové buňky, které dávají vzniknout téměř všem typům krevních buněk nebo kmenové buňky v pupečníku.

- Pluripotentní kmenové buňky se mohou diferencovat v téměř všechny typy buněk v těle (svalové, nervové, srdeční a krevní). Pouze kmenové buňky z embryí (blastocyst) a plodu jsou označovány jako skutečně pluripotentní.
- Totipotentní kmenové buňky se mohou diferencovat ve všechny typy buněk v těle a dát tak vzniknout celému organismu. Jen velmi časná embrya (maximálně do stádia 8 – 16 buněk) se skládají z totipotentních kmenových buněk [48].

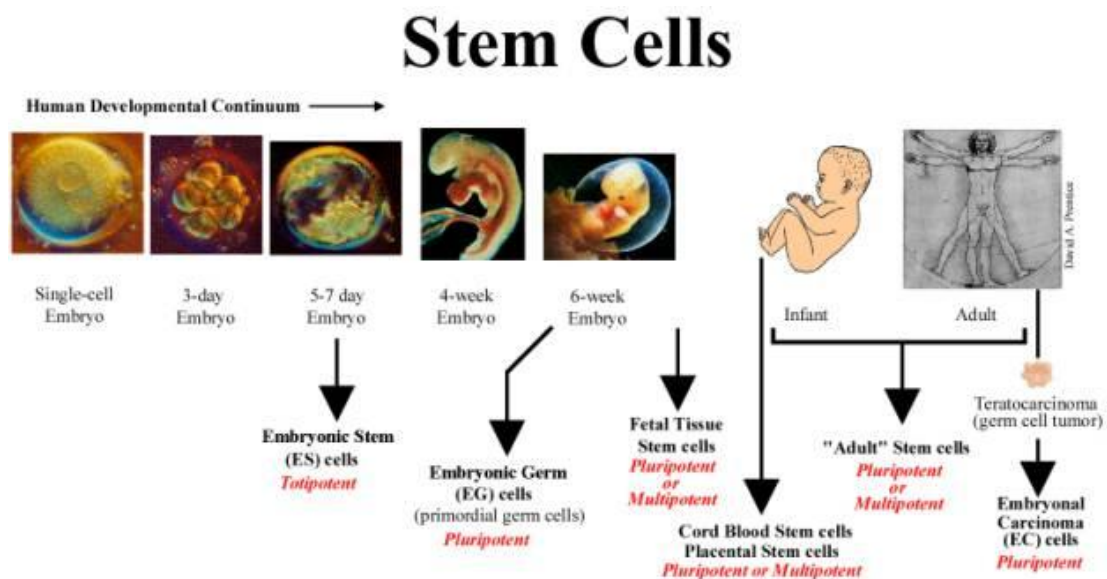
Častěji se však setkáváme s rozdělením kmenových buněk na pluripotentní a dospělé (adultní). Mezi buňky pluripotentní se řadí embryonální zárodečné buňky, dále embryonální kmenové buňky a embryonální nádorové buňky [45].

Embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ESC) lze vypěstovat z lidského embrya starého asi jeden týden. Tento zárodek se skládá z několika desítek buněk a má tvar duté koule. Jeho stěny tvoří tenká vrstva trofoblastu předurčená k tvorbě placenty a plodových obalů. V jednom místě k němu přisedá malý shluk embryoblastů, z kterých by se formoval budoucí plod. Pro přeměnu buněk embryoblastu na embryonální kmenové buňky je nutné zajistit dokonalé podmínky, aby se buňky intenzivně dělily a zároveň zabránit jejich nežádoucí specializaci. Změnou kultivačních podmínek se mohou proměnit na jakýkoli z více než 200 typů buněk lidského těla. ESC buňky se poprvé podařilo izolovat z pokusných myši až v roce 1981 vědcům Martinu Evansovi a Mathew Kaufmanovi. Lidské ECS se podařilo izolovat až po 17 letech a to týmu Jamese Thomsona [4,18,49].

Embryonální zárodečné buňky (primordia germ cell, PGC), v češtině označovány také jako prapohlavní buňky, se získávají z primárních zárodečných buněk vzniklých v rozmezí 8,5 -12,5 dne od počátku embryonálního vývoje. Zakládají se ve vyvíjejícím savčím plodu a v průběhu vývoje dávají základ budoucím pohlavním buňkám. Jejich počet je silně omezený, jejich kultivace náročná a výtěžnost malá. Avšak při kultivaci ve vhodných podmínkách se chovají podobně jako embryonální kmenové buňky a mohou z nich vznikat specializované buňky těla v prakticky neomezeném repertoáru [4,50].

Embryonální nádorové buňky (embryonal carcinoma cells, ECC) se získávají z maligních nádorových buněk embryonálního původu, tzv. teratokarcinomů. U lidí vznikají spontánně z defektních zárodečných buněk [49].

Dospělé kmenové buňky (adult stem cells, ASC), někdy označovány také jako orgánové kmenové buňky, jsou nediferencované buňky, které se nachází mezi diferenciovanými buňkami v tkáni či orgánu. Mohou se obnovovat a diferencovat v hlavní specializované buněčné typy tkáně či orgánu. Primárními úkoly dospělých kmenových buněk v živém organismu jsou údržba a oprava tkáně, ve které se nacházejí. Tyto buňky jsou také schopné přizpůsobovat se prostředí, do kterého byly vloženy a působením růstových faktorů se diferencovat do úplně jiného typu než je jejich původní směr vývoje. Patří sem například krve tvorné kmenové buňky, mezenchymální kmenové buňky nebo nervové kmenové buňky (obr.6) [4, 49].



Obrázek 6 Vznik a typy kmenových buněk [51]

2.3.3 Buněčná terapie a její úskalí

Velkého potenciálu kmenových buněk je využíváno právě prostřednictvím buněčné terapie. Kmenové buňky nabízí obnovitelný zdroj náhradních buněk a tkání k léčbě nemocí způsobených špatnou funkcí nebo předčasnou smrtí specifických typů buněk, v kombinaci se selháním organismu v jejich nápravě. Dále představují naději i pro pacienty, kteří utrpěli poranění míchy, popáleniny či trpí onemocněním jako diabetes nebo artritida. V současné době se již s terapií kmenovými buňkami běžně setkáváme při léčbě pacientů s leukémií a dalšími onemocněními krve. Při této léčbě se využívají dárcovské buňky či tkáně a to kmenové buňky kostní dřeně, periferní krevní kmenové buňky, či kmenové buňky

pupečnickové krve. Tyto terapie jsou lékařskou komunitou obecně přijímány jak bezpečné a účinné. Další terapie, jako například léčba poranění míchy embryonálními kmenovými buňkami, či léčba cévní mozkové příhody nervovými kmenovými buňkami, je ještě na úrovni klinických studií [47,49].

Kmenové buňky lze získat různými technikami. Mezi nejběžnější metody získávání ASC patří odběr pupečnickové krve či kostní dřeně. ASC lze kromě těchto dvou hlavních způsobů získat i z tukové tkáně, čichového epitelu apod. Můžeme je najít prakticky v celém těle, v játrech, kosterních svalech, střevě, slinivce břišní, sítnici oka či mozku. Na rozdíl od dalších metod získávání kmenových buněk nejsou z etického hlediska problematické.

Eticky nejspornější je získání kmenových buněk z lidských embryí. K tomuto účelu vědci využívají embrya, která na klinikách asistované reprodukce zbyla po oplodnění ve zkumavce (*in vitro* fertilizace, IVF), a která jsou odsouzena k zániku, protože nikdy nebudou vnesena do matčiny dělohy. Nepoužitá embrya se obvykle zamrazí a uskladní v tekutém dusíku. Speciálními postupy nejsou embrya zmrazením poškozena a po opětovném rozmrazení jsou plně životaschopná. Mohou se však skladovat jen omezeně dlouho dobu, která je dána legislativou jednotlivých států. Možným zdrojem embryí pro tvorbu ESC jsou lidské zárodky vytvořené po dohodě s dárci pohlavních buněk oplozením *in vitro* zcela cíleně jen pro tento účel. Tento postup byl již uplatněn na některých soukromých klinikách ve USA. Ojedinelé přístupy se snaží využít k produkci lidských buněk oocyty jiných živočišných druhů, například kravské [4,49,50].

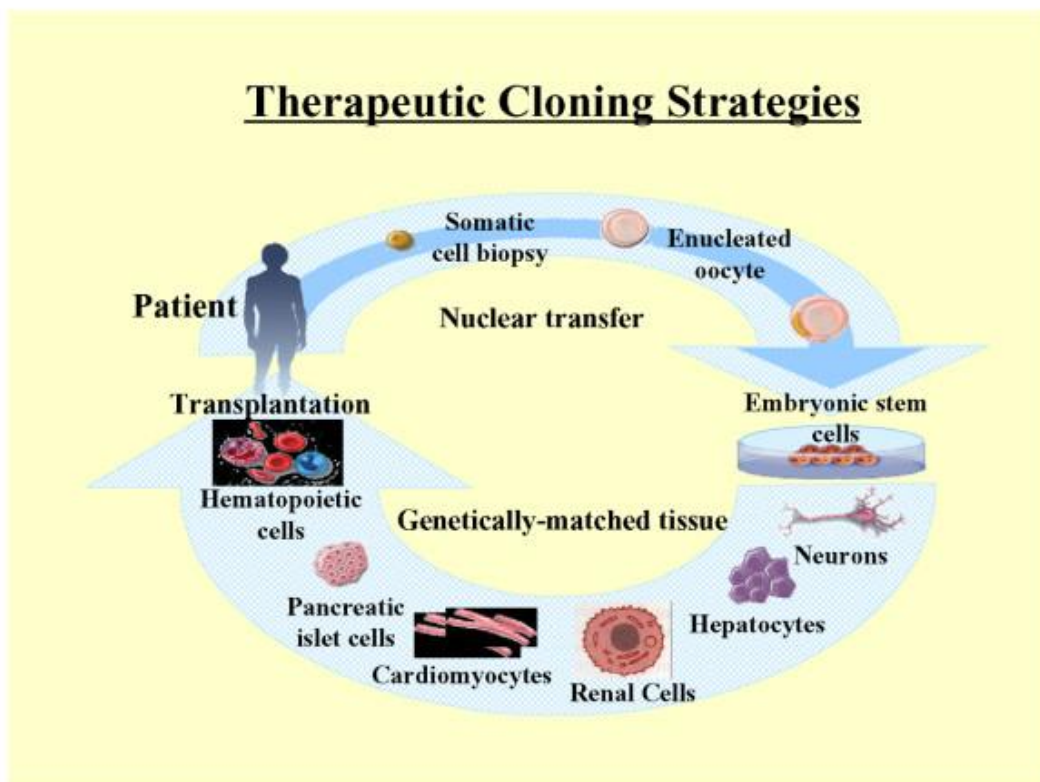
Kromě etické problematiky je však třeba řešit i další závažný problém, kterým je imunitní reakce organismu na transplantovanou tkáň vzniklou z ESC nebo PGC. Pokud tělo transplantovanou tkáň nepřijme za svou, zničí ji a celý náročný proces získávání kmenových buněk je pak zbytečný.

Východiskem z této situace by mohlo být vytvoření dostatečně pestrého sortimentu ESC, tak aby se pro každého pacienta našla vhodná linie, kterou tělo bez potíží přijme. Další možností je vytvořit takové ESC, aby je byl schopen přijmout každý pacient nebo úprava jejich dědičné informace konkrétnímu příjemci. Jednou z dalších možností nabízeného řešení je i tzv. terapeutické klonování [4,18].

2.3.4 Terapeutické klonování – řešení problémů?

Terapeutické klonování je strategií buněčné terapie, která používá kmenové buňky k vytváření zdravých kopií buněk či tkání nemocného člověka. Původní genetický materiál kmenových buněk je nahrazen genetickým materiálem pacienta. Tak mohou výsledné modifikované kmenové buňky růst a být transplantovány, aby opravily poškozenou tkáň bez spuštění imunitní reakce.

Při této strategii je vyjmuto jádro z vaječné buňky a nahrazeno jádrem buňky, která byla odebrána dospělému člověku (pacientovi). Modifikovaná kmenová buňka pak obsahuje genetický materiál pacienta. Buňka je stimulována k tomu, aby se množila a vytvořila embryo. Toto embryo není přeneseno do dělohy jako je tomu u reprodukčního klonování, ale slouží jako zdroj ESC (obr.7). Cílem je získat specializované buňky a tkáně, které jsou geneticky identické s pacientovými buňkami. Díky tomu odpadají problémy spojené s odmítnutím transplantované tkáně [3,4,52].



Obrázek 7 Terapeutické klonování [53]

Terapeutické klonování se setkává s mnoha legislativními omezeními. První země, ve které bylo povoleno klonování lidských embryí pro získávání kmenových buněk, byla v roce 2001 Velká Británie. Klonovaná embrya se však musela zničit ve stádiu blastocysty a to do věku maximálně 14 dní. Americké společnosti Advanced Cell Technology Inc. se v listopadu 2001 podařilo poprvé naklonovat lidské embryo k lékařským účelům. Američtí vědci použili metodu zvanou partenogeneze (vývoj vajíček bez přidání genetického materiálu z buněk spermie až do stadia dospělých jedinců, doslova "panenské početí"). Ve stejném roce se administrativa bývalého amerického prezidenta Bushe stavěla proti financování výzkumu kmenových buněk, při kterých docházelo ke zničení lidského zárodku [4,54,55].

Z Číny přišly v polovině roku 2002 zprávy o desítkách lidských embryí vytvořených přenosem jader tělních buněk do vajíčka zbaveného vlastní dědičné informace. Tato embrya se dělila na stovky buněk a tým vedený bioložkou Luovou z nich dokázal vytvořit ESC. Pro výzkum získali vajíčka od dobrovolnic, které se podrobily léčbě neplodnosti plozením ve zkumavce.

V roce 2003 vytvořili vědci z londýnské Královské akademie svou první linii lidských embryonálních kmenových buněk. V roce 2003 také vyšla publikace týmu amerického biologa Geralda Schattena, která dokazovala, že při odstraňování jaderné dědičné informace z vajíčka určeného ke klonování mizí u primátů zároveň i bílkoviny nutné pro další zdárný vývoj zárodku. Vytvořená opičí embrya díky tomu svou dědičnou informaci dělí mezi nově vznikající buňky s mnoha chybami. O něco později vědec Mitalipov prokázal, že u makaka se lze těmto problémům vyhnout [54,56].

Jako jeden z nejvýznamnějších roků v souvislosti s terapeutickým klonováním bylo možné označit rok 2004. Jihokorejští vědci pod vedením Woo Suk Hwanga prohlašovali, že vyprodukovali první lidskou embryonální kmenovou buněčnou linii z neoplodněného lidského vajíčka. Linie se však nakonec ukázala jako nepoužitelná a Woo Suk Hwang byl usvědčen z vědeckých podvodů. Velký mezinárodní skandál zanechal ve veřejnosti pochybnosti a nedůvěru ve vědeckou společnost [54]. Tým amerických vědců vedený Shoukratem Mitalipovem z Oregonského národního centra pro výzkum primátů vnesl jádra opičích buněk do 304 vajíček zbavených vlastní jaderné dědičné informace. Z těchto vajíček tak získal 35 embryí, která dosáhla stadia vhodného pro tvorbu embryonálních kmenových buněk. Z nich se podařilo získat dvě linie těchto buněk. Poprvé tak byl ověřen princip

terapeutického klonování u primátů. Terapeutické klonování se tímto objevem posunulo vpřed, přestalo být u primátů hypotetickou možností a mezinárodní soutěžení ve vývoji nových terapií dostalo nový impuls [54,56].

Ve stejném roce se ISCF (International stem cell forum) začalo zabývat etikou a předpisy týkající se výzkumu kmenových buněk. Pokusy na terapeutickém klonování s lidskými buňkami zahájila britská biologka Mary Herbertová z Univerzity v Newcastlu ve spolupráci s Mitalipovem.

V roce 2008 pokračoval výzkum klonování lidských zárodků. Výrazně se také posunula legislativa týkající se výzkumu kmenových buněk v některých vyspělých zemích [54,56].

Kromě legislativních omezení a etických problémů, které souvisí především se zničením lidského zárodku kvůli získání kmenových buněk, se však terapeutické klonování setkává s další řadou problémů. Obecně je proces získávání kmenových buněk terapeutickým klonováním velmi časově náročný, neefektivní a drahý [3,4].

3 KLONOVÁNÍ ČLOVĚKA

Jedním z nejkontroverznějších témat dneška je nepochybně otázka klonování lidské bytosti. Již od prvních úspěchů reprodukčního klonování vyvstala otázka, je-li možno obdobným způsobem naklonovat i člověka. Na rozdíl od terapeutického klonování, které je pro většinu společnosti ještě přijatelné, se reprodukční klonování setkává hlavně s odporem [57,58].

Tvorba klonů z buněk lidských zárodků již byla teoreticky možná kdykoliv po Willandsonově úspěchu v roce 1986. Klonování člověka dělením časných zárodků již bylo zvládnuto dříve týmem vědců Jerryho Halla. V tomto případě se však jednalo o proces podobný spontánnímu vzniku jednovaječných dvojčat a zárodky byly následně zničeny [4,57].

3.1 Pokusy o klonování člověka

O klonování člověka rostlinnou technikou se pokusil až o několik let později americký biolog Richard Seed. O jeho skutečné činnosti však kolují pouze neověřené zprávy a sám Seed nakonec uznal, že po technické a finanční stránce nedokáže klonování provést [4].

Dalším vědcem, který se pokusil o klonování člověka, je biochemička Brigitte Boisselierová ze společnosti Clonaid. Organizace Clonaid je řízena náboženskou sektou raeliánů, kteří věří, že jsou potomky mimozemšťanů a klonováním mohou dosáhnout nesmrtelnosti. Jsou přesvědčeni o tom, že prvním žijícím klonem byl Ježíš Kristus a klonování je tedy posvátná věc. První informace o úspěšném klonování člověka podala společnost Clonaid v prosinci roku 2002. Oznámili, že na svět přišla císařským řezem holčička jménem Eva a že matka i dítě byli oba zdraví. Nikdo však nepředložil vzorky DNA, které by mohly být podrobeny genetické analýze a mohla by tak být potvrzena pravost klonu. Dnes lze říct, že toto oznámení bylo jen dobře načasovanou mediální senzací, která měla především přitáhnout pozornost k sektě raeliánů [4,56,58].

O klonování člověka se pokusil i tým italského lékaře Severina Santoriniho a Američana kyperského původu Panayiotise Zavose z univerzity v Kentucky. Doktor Zavos a Santorini se pokoušeli pomoci neplodným ženám mít dítě. V dubnu roku 2002 se médií šířila zpráva, že doktor Santorini implantoval embrya vzniklá klonováním do těla náhradních matek. Jeho výsledky však byly zpochybňovány širokou vědeckou společností i samotným kolegou doktorem Zavosem. Ten oznámil v lednu 2004, že se mu podařilo klonovaná embrya

implantovat do těla náhradní matky. Dva týdny na to přiznal, že jeho pokusy byly neúspěšné [4,57].

3.2 Etická otázka klonování

Navzdory obecnému mínění, že je klonování zvládnutá věc, funguje tato technika jen v rukou velmi úzké skupiny specialistů a člověk reprodukčnímu klonování zatím odolává. Pustit se do klonování člověka je velmi riskantní [59]. Především efektivnost klonování je velmi nízká. Ze sta pokusů (úspěšného přenosu jádra) se narodí jedno až tři mláděta. Analogicky to znamená mít od dárkyň (žen) 100 vajíček na jedno naklonované dítě. Získat 100 vajíček není vůbec jednoduché. To by ale nemusela být hlavní překážka. Mnohem závažnější komplikací je to, že většina klonovaných embryí zanikne u zvířat během březosti. Bylo by totéž akceptovatelné i u žen? Určitě nejzávažnější je ale to, že se klony velmi často rodí s různými abnormalitami, mají až dvojnásobnou váhu oproti kontrolním jedincům (syndrom velkých mláďat) a bezprostředně po narození umírají na různé komplikace. I v případě, že naklonovaní jedinci vypadají po porodu zcela normálně a ani počáteční období jejich života neukazuje na žádné problémy, mohou se komplikace projevit mnohem později. Nedávná studie japonských vědců ukázala, že délka života klonovaných myší je oproti jedincům kontrolní skupiny přibližně poloviční. Pak začaly zvířatům selhávat různé orgány. To by bylo u lidí absolutně neakceptovatelné [60].

Nejzazší hranici pro klonování vymezuje podle filozofů kategorie lidské důstojnosti. Vytváření klonů člověka, aby posloužil jen určitému záměru, je nepřijatelné. Přesto se setkáváme s představami na vytvoření například vlastního klonu jako zdroje orgánů pro transplantaci apod. Z morálního hlediska je tato možnost naprosto nepřijatelná. Zmíněna již byla i možnost, kdy by si rodiče mohli naklonovat umírající dítě a vytvořit tak nové, geneticky shodné s původním. Pravdou je, že dokonalého dvojníka bychom klonováním nepořídili. Navíc by se klon vyvíjel vlastní cestou, měl jiné životní zkušenosti, názory,

zájmy apod. Vyrůstal by v odlišných podmínkách než jeho předloha a proto by se jeho povahové rysy lišily. Naklonováním dítěte z buněk matky mohou vznikat obavy z toho, že by byly na dítě přenášeny vlastní nenaplněné ambice rodičů a vnucovány mu vlastní názory. Chápali by ho jako kopii jednoho z nich a omezovali by jeho samostatný vývoj. Otázkou je, nakolik je dopřáno absolutní svobody normálně počatým dětem. Objevují se

i otázky, jak by klonované děti přijala společnost. Viděla by v nich pouze monstra a do konce života by nesla svůj původ jako cejch? Ani tento problém není spjat pouze s klonováním. Narození prvního dítěte ze zkumavky bylo provázeno obrovským zájmem veřejnosti, který ale následně opadl a dnes žije Louise Brownová normálním životem. Jiné klony by mohly být produkovány s neobvykle vysokou nebo nízkou duševní schopností a byly by tak vhodné pro řešení náročných situací či podřadné práce. Hodně se hovoří o vizi armády naklonovaných výkonných zabijáků a podobně. V dnešní době lze však tyto lidi sehnat mnohem snáze patřičnou finanční nabídkou než klonováním [4,61].

I věřící se ke klonování nestaví kladně. Jsou tu otázky spojené např. s hinduismem nebo křesťanstvím. Hinduisté věří v reinkarnaci. Vytvořením klonu by tento proces byl výrazně narušen. Jedno tělo by sice zemřelo, druhé by ale stále žilo. Křesťané věří, že člověk vzniká pouze okamžikem početí a lidé do tohoto procesu nemají zasahovat. Církev označuje jakýkoli pokus o klonování člověka za hříšný. Katolická církev neuznává klonování ani v případě, že by se jednalo o pár, který by jinou cestou nemohl mít potomka [4].

3.3 Právní předpisy týkající se klonování

Vytváření podrobné právní úpravy, která reguluje rozvoj a realizaci medicínských a biologických věd, je vymezeno rámcem několika základních lidských práv, vyjádřených na celosvětové i evropské mezinárodní úrovni i úrovni ústavní v jednotlivých státech. Zatímco celosvětový standard lidských práv je zatím z důvodu rozdílnosti poměrů v jednotlivých státech minimální, evropská ochrana lidských práv dosáhla díky společnému kulturně civilizačnímu dědictví a integračním procesům vysokého stupně ochrany. Garance základních práv a svobod je také podstatnou součástí našeho ústavního práva. Ústava ČR vychází z existence Listiny základních práv a svobod a činí z ní součást našeho ústavního pořádku. Listina se opírá o přirozenoprávní pojetí těchto práv a v obecné rovině vymezuje vztah státní moci k jednotlivci a určuje jeho autonomní prostor. Jako základní principy proklamuje svobodu a rovnost v důstojnosti a právech [62,63].

Jednou z nejdůležitějších v souvislosti s daným tématem je Úmluva na ochranu lidských práv a důstojnosti lidské bytosti v souvislosti s aplikací biologie a medicíny z roku 1997 (Úmluva o lidských právech a biomedicíně) a Dodatkový protokol o zákazu klonování lidských bytostí z roku 1998. Potřeba zajistit ochranu lidských práv v souvislosti s aplikací

biologie a medicíny nalezla na evropské úrovni své speciální vyjádření v Úmluvě Rady Evropy č. 164 ETS, o lidských právech a biomedicině z r. 1997 [62]. Tato Úmluva navazuje na řadu mezinárodních smluv o lidských právech, jež vyjmenovává ve své preambuli a vůči nimž je v postavení *lex specialis* a snaží se je doplnit tak, aby byly právně podchyce-ny možné důsledky vědeckých aktivit.

Základními principy, z nichž Úmluva o lidských právech a biomedicině (dále jen Úmluva) vychází, jsou respektování člověka a lidské důstojnosti, rovnost všech lidí při poskytování zdravotní péče a při provádění výzkumu a ochrana integrity jednotlivce. Blaho člověka je nadřazeno nad společenský i vědecký zájem. Zdůrazňuje se odpovědnost za hodnocení a aplikaci výsledků biologických a medicínských věd, které by měly být využívány výhradně ku prospěchu současných a budoucích generací. Úmluva zakazuje používat lidské tělo nebo jeho části ke komerčním účelům. I přesto, že Úmluva neobsahuje formulaci postojů k některým složitým otázkám, k nimž jednotlivé evropské státy přistupují rozdílně, je jasným odrazem shodného pojetí postavení člověka a respektu k jeho lidské důstojnosti [62,63].

V souladu s čl. 31 Úmluvy se počítá s postupným rozvíjením Úmluvy prostřednictvím dodatkových protokolů, které se zaměřují na konkrétní obory. V České republice vstoupila Úmluva o lidských právech a biomedicině (č. 96/2001 Sb.m.s.) společně se svým Dodatkovým protokolem o zákazu klonování lidských bytostí (č. 97/2001 Sb.m.s.) v platnost dne 1. 10. 2001 [63]. Je mezinárodní smlouvou, která splňuje podmínky čl. 10 Ústavy, podléhá jeho režimu a je tedy součástí našeho právního řádu. Ponechává si však svou mezinárodně právní kvalitu a musí být interpretována jako pramen mezinárodního práva [62,63].

Dodatkový protokol k Úmluvě o lidských právech a biomedicině o zákazu klonování lidských bytostí, sjednaný v Paříži v roce 1998 uznává, že některé způsoby klonování přispívají k vědeckému poznání, a že jejich aplikace v oblasti medicíny je možná. Klonování lidských buněk a tkání pro výzkumné účely s cílem lékařského využití je celosvětově považováno za přijatelný a přínosný biomedicínský postup. Další rozvoj klonovacích technik v buněčné biologii tedy Dodatkový protokol nijak neomezuje. Opačný postoj ovšem zaujímá k možným pokusům vytvořit geneticky shodné lidské bytosti. I přesto, že k dělení embrya někdy dochází přirozeně a výsledkem pak může být narození geneticky (téměř) shodných dvojčat, trojčat apod., považuje se umělé úmyslné vytvoření geneticky shodných lidských jedinců za zneužití biologie a medicíny. Má se za to, že takto cílené

biomedicínské aktivity mohou mít závažné medicínské, psychologické a sociální důsledky pro všechny zúčastněné a že je v zájmu všech lidí, aby byl zachován v podstatě náhodný charakter složení jejich vlastních genů. Jakýkoliv zákrok, jehož účelem je vytvoření lidské bytosti geneticky shodné s jinou lidskou bytostí, lhostejno zda živou či mrtvou, je zakázán (čl. 1 Dodatkového protokolu). Není rozhodné, zda se jedná o štěpení embrya či o přenos genů buněčného jádra – tzv. nukleární transfer. Za „geneticky shodnou“ lidskou bytost je podle čl. 2 Dodatkového protokolu pro účely čl. 1 považována taková lidská bytost, která má s jinou společný jaderný soubor genů [62,63].

Dodatkový protokol navazuje na ustanovení Úmluvy o lidských právech a biomedicíně, která ve svém čl. 1 chrání vedle důstojnosti, integrity, ostatních práv a základních svobod při aplikaci biologie a medicíny také svébytnost všech lidí. Čl. 13 Úmluvy zakazuje takové zásahy do lidského genomu, jejichž cílem je změna genomu některého z potomků [62,63].

4 NEVÝHODY A OMEZENÍ KLONOVÁNÍ SAVCŮ

4.1 Vývojové defekty

Pravděpodobně primárním problémem technologií spojených s klonováním je nízká efektivita těchto postupů, jež se projevuje tím, že jen velmi malé procento klonovaných embryí je schopno dát vzniknout zdravému jedinci. Tyto defekty jsou často neslučitelné s vývojem plodu nebo životem narozeného mláděte. Velmi často není postiženo přímo embryo, ale plodové obaly a placenta. Navíc trpí naklonovaná zvířata výrazně sníženou životaschopností [64,65]. Naklonovaná mláďata bývají příliš velká, jejich porod musí být vyvolán uměle a často musí být proveden chirurgicky, tzn. císařským řezem. To s sebou nese pochopitelně výrazná rizika. Naklonovaní jedinci bývají postiženi i vývojovými vadami. Často se střetneme u novorozených naklonovaných mláďat se špatně vyvinutými plícemi. Některá naklonovaná zvířata musí být bezprostředně po narození utracena, aby se v důsledku těžkých defektů netrápila. Tyto defekty se mohou projevit i v pokročilejším věku. Nejnovější výzkumy naznačily, že i na první pohled zcela normální a zdravé klony nesou řadu genetických defektů [4,65].

Výzkum genetické „normálnosti“ klonů provedla dvě přední světová pracoviště. Prvním je Whitehead Institute for Biomedical Research, kde se práce ujal tým odborníků vedený Rudolfem Jaenischem. Druhým zúčastněným centrem pak byla Havajská universita v Honolulu, kde práci řídil legendární profesor Ryuzo Yanagimachi [4].

Vědci se přednostně soustředili na klonování z tzv. embryonálních kmenových buněk. Hledali především změny v tzv. imprintingu genů. Tomu sice podléhají asi jen dvě stovky z celkového počtu 30 000 savčích genů, ale přesto se imprinting významnou měrou podílí na časném vývoji každého savce. Imprintovaný gen nese jakousi molekulární značku, která určuje, zda bude gen aktivní či nikoli. Důležité je, že v těle živočicha se musí sejít vždy dvojice příslušných genů s opačnou značkou. Jestliže je jedna kopie genu aktivní, druhá musí být příslušnou značkou „uspána“. Pokud se v těle živočicha objeví imprintované geny v nevhodných kombinacích (oba aktivní nebo oba „spící“), vyvstávají problémy. Nastávají poruchy, které velmi často trápí i klonované zárodky nebo mláďata [4,64,65].

Embryonální kmenové buňky jsou pro klonování na první pohled velice výhodné. Nejsou totiž ještě specializovány a jejich proměna v zárodek probíhá o poznání snáze

než v případě, že je pro klonování použita buňka odebraná z těla dospělého zvířete, která je už vyhraněným specialistou na plnění jen vybraných funkcí v těle. Tyto vysoce specializované buňky (např. buňky mléčné žlázy, pokožky, svalů nebo krvinčičky) mívají zpřístupněnu jen malou část svých genů a geny, které nepotřebují pro plnění svých vyhraněných funkcí, mají „hluboce uspané“. S „buzením“ takto uspaných genů v klonovaném zárodku bývají potíže [4,64,65].

Jak ale ukázal výzkum týmů vedených Jaenischem a Yanagimachim, mívají embryonální kmenové buňky už samy o sobě notně „pomíchané“ příslušné „značky“ pro imprinting genů. Pokud je z nich naklonována myš, nese si klonované zvíře tento zmatek v genetických „značkách“ s sebou. Američtí vědci sledovali jen šest genů, které podléhají imprintingu, a zjistili, že ani u jednoho klonovaného zvířete nejsou genetické „značky“ v pořádku. To vyvolává vážné poruchy ve vývoji. Mnoho klonovaných zárodků se nevyvíjí, řada plodů odumírá, mnoho mláďat se rodí mrtvých nebo s těžkým tělesným postižením. Vyhráno, ale nemají ani klonovaná mláďata, která přijdou na svět na první pohled zcela zdravá. Nepořádek ve „značkách“ pro imprinting genů se u nich může projevit v pozdějším věku. Některé klonované myši například propadly v druhé polovině života těžké obezitě, i když jim „v mládí“ sloužilo zdraví přímo dokonale. Rozbory však ukázaly, že hlavním zdrojem těchto problémů se „značkami“ po imprinting genů je kvalita embryonálních kmenových buněk a nikoli samotný postup klonování [4,18,64,65].

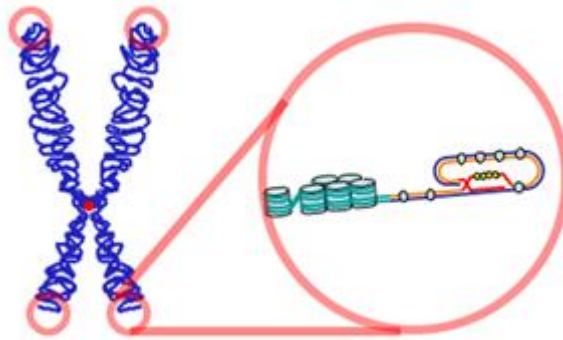
4.2 Zkracování telomer

Telomery jsou specializované nukleoproteinové struktury, které kryjí konce eukaryotických chromozomů (obr.8). Jejich integrita a funkce jsou rozhodujícími faktory pro délku života eukaryotických buněk. Telomery zajišťují stabilitu chromozomů a tím i celého genomu. Po oplození přichází živočich na svět s nezkrácenými telomery. S každým buněčným dělením jsou ale telomery jen kratší. Pokud se telomery zkrátí pod kritickou mez, buňka zastaví další dělení a umírá. Je nutné říci, že za celý život zvířete se telomery v jeho buňkách zřejmě nezkrátí natolik, aby něco podobného hrozilo. Jinak je tomu, ale u buněk, které ztratily kontrolu nad vlastním osudem a začnou se překotně množit (rakovinné buňky). Většina z nich brzy zkrátí své telomery natolik, že zahynou [66].

Při klonování se však nově narozené klony nerodí s kompletními telomery. Jejich telomery jsou zkráceny na takovou délku, která odpovídá stáří zvířete, ze kterého klon vzešel.

Zkracování telomer má přímou souvislost se stárnutím zvířete. Důsledkem toho jsou choroby typické pro stáří. Zkrácení telomer ovšem samozřejmě není jedinou příčinou stárnutí [4,65].

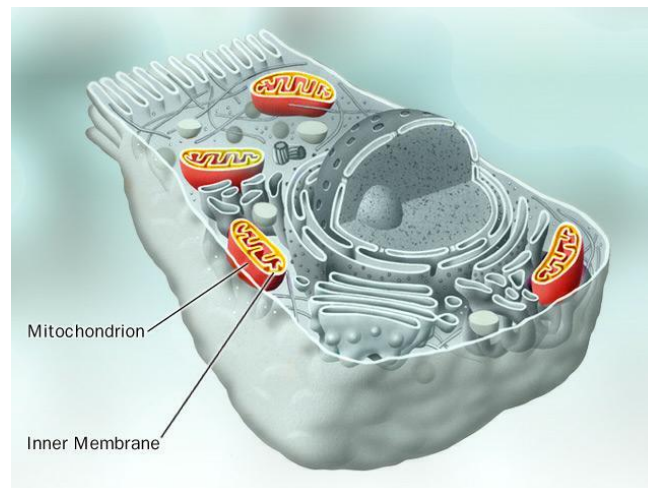
Zkracování telomer v souvislosti se stárnutím však může být o něco složitější. Ve firmě Advanced Cell Technology byla naklonovaná jalůvka Persefona, u které byly použity buňky, které prodělaly v laboratorních podmínkách tolik dělení, že se jejich telomery zkrátily téměř na kritickou mez. Překvapivé proto bylo samotné narození Persefony. O to víc šokující bylo zjištění, že Persefona má telomery delší než novorozené tele. Měla by tak žít o mnohem déle než je u skotu typické. Na odpověď si však budeme muset ještě několik let počkat, jelikož Persefona stále žije, ale délka jejího života ještě nepřekračuje věk typický pro skot [4].



Obrázek 8 Chromozom s vyznačenou telomerou [67]

4.3 Mitochondrie

V eukaryotických buňkách není jádro jediným nositelem dědičné informace. Kromě jádra obsahují malé množství genetického materiálu i mitochondrie a plastidy. Zde je informace uložena stejně jako v jádře, ve dvoušroubovicovém řetězci deoxyribonukleové kyseliny (obr.9). Tato DNA obsahuje také geny pro určité znaky, které se v populaci dědí. Nazývá se mimojadernou dědičností. To, že se geny nenachází v jádře, nemá žádný vliv na jejich důležitost a rozhodně nekódují bezvýznamné znaky. Velice často hrají důležitou roli při šlechtění zvířat a rostlin a v medicíně se s nimi setkáváme u pacientů s chorobami vyvolanými mutacemi mitochondriální DNA [65,66].



*Obrázek 9 Eukaryotická buňka s vyznačenými
mitochondriemi [68]*

Mimojaderná dědičnost hraje významnou roli i při klonování živočichů. Klonovaný jedinec obsahuje většinu mitochondrií z cytoplasmu a jádro, které je do něj přenášeno, se tak dostává mezi cizí mitochondrie. V důsledku toho není klonovaný živočich zcela totožný s předlohou [4,65].

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout současné vědecké poznatky o klonování, charakterizovat jeho jednotlivé metody, přiblížit situaci na vědeckém poli klonování a současný pohled veřejnosti ať již vědecké či veřejné. Dále se práce zabývala klonováním člověka a etikou klonování, právními předpisy a současnými omezeními a problémy, které klonování provází. Toto téma je velmi bohaté na data a fakta, pokusila jsem se podat ucelenou informaci o tom, co se v souvislosti s klonováním objevilo, tak abychom klonování pochopili a mohli se orientovat v této problematice.

Klonování se setkává neustále s mnoha problémy a omezeními. Nejdiskutovatelnějším tématem je etika klonování, a zda je vůbec klonování přípustné. Jednoznačná odpověď na tuto otázku neexistuje. Musíme rozlišovat mezi klonováním, které má za cíl vytvoření duplikátu živého organismu a klonováním pro léčebné účely. Je však nutné, aby výzkum podléhal striktním pravidlům, která budou regulovat používání vybraných technologií, zacházení s embryi a zachování lidské důstojnosti.

Názor současné veřejnosti na klonování je ve většině případů negativní. Souvisí především s nerozlišováním jednotlivých druhů klonování a neinformovaností. Současná média podávají nepřeborné množství informací o zaručeně ověřených zprávách o klonování a lidé tak nabývají mylného dojmu. Častokrát tomu nenapomáhá ani vědecká společnost, v souvislosti s podvody s klonováním lidských embryí či člověka (vědec Woo-suk Hwang, doktor Santorini, doktor Zavos, společnost Clonaid apod.), s jediným cílem zviditelnit sebe či svou organizaci. Domnívám se, že větší informovanost by vedla i ke změně postoje veřejnosti ke klonování.

Klonování může mít své uplatnění například v zemědělství při množení vynikajících plemenných zvířat, krav s vysokou doživostí či zvířat s vysokou zmasilostí. Dále klonování dává naději i živočišným druhům, kterým hrozí vyhubení. Klonování může být i východiskem pro neplodné páry. Asi největší potenciál se skrývá v terapeutickém klonování a terapii kmenovými buňkami, která dává naději lidem s dosud nevléčitelnými chorobami jako je například Alzheimerova choroba, mozkovou mrtvicí, poraněním míchy, popáleninami apod.

Vzhledem k etickým a legislativním problémům je klonování člověka v mnoha zemích zakázáno nebo omezeno. Pokusy s klonováním savců jsou zatím úspěšné jen v malém

počtu případů, takže i jejich praktické využití je tím značně omezeno. Současné poznatky o reprodukčním klonování zvířat mluví jasně proti aplikaci tohoto postupu u lidí. Riziko je příliš velké.

Klonování je perspektivním oborem, který se neustále vyvíjí a zdokonaluje. S dalším rozvojem se zvyšuje i možnost jeho uplatnění a možnosti snižování rizik při klonování. Možnosti využití a další vývoj na poli klonování však ukáže jen čas.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ANONYM. *Rychlý průvodce: klonování* [online]. [cit. 2011-01-10]. Dostupné z WWW: <http://www.bbc.co.uk/czech/specials/1357_cloning/index.shtml>
- [2] ANONYM. *What is cloning?* [online]. [cit. 2011-01-26]. Dostupné z WWW: <<http://learn.genetics.utah.edu/content/tech/cloning/whatiscloning/>>
- [3] ONDOK, J.P. *Bioetika, biotechnologie a biomedicína*. Praha: Triton, 2005. 214 s. ISBN 80-7254-486-1
- [4] PETR, J. *Klonování? Hrozba, nebo naděje*. Praha: Fénix, 2003. 362 s. ISBN 80-7185-469-7
- [5] VACEK, Z. *Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka*. Praha: Grada Publishing a.s., 2006. 255 s. ISBN 80-247-1267-9
- [6] ANONYM. *Hans Adolf Eduard Driesch* [online]. [cit. 2011-01-29]. Dostupné z WWW: http://findarticles.com/p/articles/mi_gx5229/is_2003/ai_n19146146/
- [7] JOSELET, M. *Human Cloning: Bioethical & Theological Perspectives*, [online]. [cit. 2011-01-26]. Dostupné z WWW: <<http://www.metanexus.net/conferences/pdf/conference2006/Mathew.pdf>>
- [8] PETR, J. *Severino Antinori – světec, lhář, a nebo zločinec?* [online]. [cit. 2011-01-24]. Dostupný z WWW: <<http://akademon.cz/article.asp?source=atnr>>
- [9] ANONYM. *Dolly the sheep* [online]. [cit. 2011-02-24]. Dostupné z WWW: <<http://www.roslin.ed.ac.uk/public-interest/dolly-the-sheep/&prev=/search%3Fq%3D%3E>>
- [10] CRAMB, C. *I didn't clone Dolly the sheep, says prof.* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.telegraph.co.uk/news/uknews/1512377/I-didnt-clone-Dolly-the-sheep-says-prof.html>>
- [11] FULKA, J., KAŇKA, J., FULKA J. Klonování savčího embrya: Současný stav a perspektivy. *Vesmír*, 1998, 77, s. 567-572
- [12] KATO, Y. *et al.* Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. *Science*, 1998, 282, 5396, s. 2095-2098

- [13] JACKSON, E. *Reproduction, Genetics and Rule of Law* [online]. [cit. 2011-05-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.fathom.com/course/21701786/session4.html>>
- [14] HENAHAN, S. *Mice Join Clone Club* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.accessexcellence.org/WN/SUA12/mouseclub798.php>>
- [15] ANONYM. *World's First Cloned Mouse Dies* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.grg.org/cumulina.htm>>
- [16] ANONYM. *University Of Hawaii Scientists Announce First Male Clone* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencedaily.com/releases/1999/06/990601081911.htm>>
- [17] ANONYM. *PPL produces world's first cloned pigs* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <http://xenotransplant.ineu.org/xenotrans/news/20000314.htm>
- [18] LEVINE, A.D. *Cloning*. New York: Rosen Publishing Group, 2009. 196 s. ISBN 9781435851689
- [19] ANONYM. *Cloned Pig Debuts In Science, Sets The Stage For Organ Transplants* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.sciencedaily.com/releases/2000/08/000817080251.htm>>
- [20] PETR, J. *Když se zvířata spustí*. [online]. [cit. 2011-03-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.21století.cz/view.php?cislocclanku=2004102017>>
- [21] PETR, J. *Záchrana ohrožených živočišných druhů klonováním* [online]. [cit. 2011-03-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.akademon.cz/source/ohroz.htm>>
- [22] HOLDEN, C. Cloning: Carbon-Copy Clone Is the Real Thing. *Science*, 2002, 295, 5559, s. 1443-1444
- [23] PETR, J. *Divoký tur* [online]. [cit. 2011-03-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.21století.cz/view.php?cislocclanku=2003061802>>
- [24] SANSINENA, M. J. et al. Banteng embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology*, 2005, 63, 4, s. 1081-1091.
- [25] ARNOLD, P. *How to Clone a Rabbit* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/13329.aspx>>

- [26] ANONYM. *Rabbits join the cloning club* [online]. [cit. 2011-03-08]. Dostupné z WWW: <<http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/1899477.stm>>
- [27] WOODS, G. L. et al. A Mule Cloned from Fetal Cells by Nuclear Transfer. *Science*, 2003, 301, 5636, s. 1063.
- [28] PETR, J. *50% klonu osla* [online]. [cit. 2011-03-06]. Dostupné z WWW: <<http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=329>>
- [29] PETR, J. *Klon osla doběhl pátý* [online]. [cit. 2011-03-06]. Dostupné z WWW: <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=1945>>
- [30] NICKEL, P. *Horse Lover's Guide to Kentucky*. Lexington: Eclipse Press, 2009. 260 s. ISBN 978-158150216-9
- [31] GALLI, C. et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 2003, 424, s. 635.
- [32] ANONYM. *Reproductive Biology* [online]. [cit. 2011-03-20]. Dostupné z WWW: <http://www.auduboninstitute.org/nuclear-transfer-faq>
- [33] GÓMEZ, M. C. et al. Birth of African Wildcat Cloned Kittens Born from Domestic Cats. *Cloning and stem cells*. 2004, 6, 3, s. 247-258.
- [34] CLENDENIN, A. G. *CVM Researchers First to Clone White-tailed Deer* [online]. [cit. 2011-03-20]. Dostupné z WWW: <<http://vetmed.tamu.edu/wildlife/featured-animals>>.
- [35] PETR, J. *Ralph – první klon potkana* [online]. [cit. 2011-03-06]. Dostupné z WWW: <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=410>>
- [36] RENARD, J. P. et al. Generation of Fertile Cloned Rats by Regulating Oocyte Activation. *Science*, 2003, 302, s. 1179
- [37] LEE, C. L. et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, 436, s. 641
- [38] MOTT, M. *Wolf-Clone Claims Under Investigation* [online]. [cit. 2011-03-13]. Dostupné z WWW: <<http://news.nationalgeographic.com/news/2007/04/070411-wolf-clones.html>>.
- [39] PETR, J. Klon fretky v roce 10 po Dolly, *Vesmír*, 2006, 85, s. 511

- [40] LI, Z. *et al.* Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Developmental biology*, 2006, 293, s. 439-448
- [41] DEB, R., SINGH, V. K., Advances in Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryo production in India, *Livestock line*, 2010, 11, s. 28-30
- [42] SHAN, R. A. *et al.* Hand-Made Cloned Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos: Comparison of Different Media and Culture Systeme. *Cloning and stem cells*, 2008, 4, s. 435-442
- [43] SCOTT, K. *World's first cloned camel Injaz turns one* [online]. [cit. 2011-03-27]. Dostupné z WWW: <<http://gulfnews.com/news/gulf/uae/general/world-s-first-cloned-camel-injaz-turns-one-1.609310>>
- [44] WANI, N.A. *et al.* Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *PubMed*, 2009, 82, s. 373-379
- [45] ANONYM. *Kmenové buňky* [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: <http://www.lfhk.cuni.cz/histologie/web/kmenove_bunky/kmenove_bunky.asp>
- [46] ANONYM. *Stem Cell Basics* [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1.asp>>
- [47] SYKOVÁ, E. *Pokroky v transplantacích a výzkumu kmenových buněk* [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.hpb.cz/index.php?pId=01-sup>>
- [48] KIRCH, W. *Encyclopedia of Public Health*. New York: Springer, 2008. 1601 s. ISBN 978-1-4020-5613-0
- [49] FILIP, S. *Kmenové buňky: biologie, medicína, filozofie*. Praha: Galén, 2006. 223 s. ISBN 80-7262-401-6
- [50] ANONYM. *Playing God?* [online]. [cit. 2011-05-20]. Dostupné z WWW: <<http://byebyeproblem.com/?p=721> >
- [51] FILIPCZYK, A.A. Cardiovascular development: towards biomedical applicability, *PubMed*, 2007, 64, s. 704-718
- [52] ANONYM. *Stem cell information* [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.cryoclinic.co.za/stemcell.htm>>

- [53] ANONYM. *Therapeutic cloning strategies* [online]. [cit. 2011-05-20]. Dostupné z WWW: <http://www.biology-online.org/articles/tissue_engineering_stem_cells/figures.html>
- [54] KFOURY, C. Therapeutic cloning: promises and issues. *PubMed*, 2007, 10, s. 112-120
- [55] PETR, J. Kmenové buňky v roce 2007. *Vesmír*, 87, 2008. s. 19-20
- [56] ANONYM. *A brief history of the stem cell research* [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: < <http://www.scienceprogress.org/2009/01/timeline-a-brief-history-of-stem-cell-research/>>
- [57] JOHNSON, J.A. *Human Cloning*. Pennsylvania: Diane Publishing, 2006. 24 s. ISBN 800-782-3833
- [58] PENCE, G.E. *Who is afraid of human cloning?* Lanham: Rowman & Littlefield, 1998. 181 s. ISBN 0847687821
- [59] YOUNG, E. *First cloned baby born on 26 December* [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: < <http://www.newscientist.com/article/dn3217>>
- [60] FULKA, J. F., FULKOVÁ, H. Klonování lidí. *Vesmír*, 82, 2003. s. 127-128
- [61] KILNER, J.F. *Human Cloning* [online]. [cit. 2011-05-15]. Dostupné z WWW: <<http://cbhd.org/content/human-cloning>>
- [62] BURDOVÁ, E. *Klonování – etické aspekty a právní úprava* [online]. [cit. 2011-05-15]. Dostupné z WWW: < <http://www.solen.cz/pdfs/pr/2004/01/04.pdf>>
- [63] ANONYM. *Sbírka zákonů a mezinárodních smluv* [online]. [cit. 2011-05-15]. Dostupné z WWW: <http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2001/smlou_10.html>
- [64] RHODES, R. *The Blackwell guide to medical ethics*. Victoria: Wiley-Blackwell, 2007. 448 s. ISBN 1405125837
- [65] CIBELLI, J., LANZA, R.P., CAMPBELL, K.H.S., WEST, M.D. *Principles of Cloning*. Burlington: Academic Press, 2002. 531 s. ISBN 978-0-12-174597-4
- [66] SNUSTAD, D.P. *Principles of Genetics*. New Jersey: Wiley, 2008. 848 s. ISBN 978-0-470-38825-9

[67] ANONYM, *Telomeres, Aging, and Science Fiction* [online]. [cit. 2011-05-20]. Dostupné z WWW: <<http://sciencefictionbiology.blogspot.com/2009/10/telomeres-and-aging.html>>

[68] ANONYM, *Buňka* [online]. [cit. 2011-05-20]. Dostupné z WWW: <http://img4.rajsce.idnes.cz/d0409/2/2967/2967695_fe65884ae1e55dbbdc9b8f228881e5ad/images/006-mitochondrie.jpg>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ASC Dospělé kmenové buňky (Adult stem cells)

ECC Embryonální nádorové buňky (Embryonal carcinoma cells)

ESC Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cells)

DNA Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)

NDRI Národní výzkumný ústav mléka (National Dairy Research Institute)

INRA Francouzský agronomický výzkumný ústav (Institut National de la Recherche Agromique)

ISCF Mezinárodní fórum kmenových buněk (International stem cell forum)

IVF umělé oplodnění (*in vitro* fertilisation)

PGC Embryonální zárodečné buňky (Primordia germ cell)

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 Klonování dělením embryí [4]</i>	14
<i>Obrázek 2 Roslinská metoda klonování [4]</i>	19
<i>Obrázek 3 Ovečka Dolly a její dcera Bonnie [13]</i>	19
<i>Obrázek 4 Honolulská metoda přenosu jader [4]</i>	21
<i>Obrázek 5 Dvoustupňové klonování prasat [4]</i>	22
<i>Obrázek 6 Vznik a typy kmenových buněk [51]</i>	35
<i>Obrázek 7 Terapeutické klonování [53]</i>	37
<i>Obrázek 8 Chromozom s vyznačenou telomerou [67]</i>	47
<i>Obrázek 9 Eukaryotická buňka s vyznačenými mitochondriemi [68]</i>	48