

Możliwości wykorzystania technik klonowania we wspomaganym rozrodzie bydła, technologii żywności, przemyśle biofarmaceutycznym, biomedycynie oraz restytucji ginących lub wymarłych ras i gatunków zwierząt*

Maria Skrzyszowska¹ , Marcin Samiec¹ 

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa; maria.skrzyszowska@izoo.krakow.pl

Rozwój efektywnych metod pozaustrojowego dojrzwania i zapłodnienia oocytów bydłecy, a także technik niechirurgicznego pozyskiwania i transferu zarodków bydłecy skutecznie przyczynił się do opracowania nie tylko kompleksowej technologii produkcji zarodków bydłecy (IVP; ang. *in vitro embryo production*), ale także innych technologii wspomaganego rozrodu (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*) opartych na zastosowaniu nowoczesnych technik genomowej inżynierii embrionalnej, takich jak: klonowanie zarodkowe i somatyczne.

Przedmiotem tej pracy jest przedstawienie dotychczasowych osiągnięć w dziedzinie wspomaganego rozrodu bydła przy zastosowaniu technik klonowania zarodkowego i somatycznego. Kolejnym celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie poten-

cjalnych możliwości wykorzystania metod klonowania bydła w biotechnologii żywienia, przemyśle rolno-spożywczym, farmakologii, biomedycynie, a także w genetycznej ochronie ginących lub wymarłych ras i gatunków udomowionych oraz wolnożyjących ssaków parzystokopytnych (*Artiodactyla*) z rodziny krętorogich (*Bovidae*).

Klonowanie bydła techniką bisekcji zarodków

Mikrochirurgiczna metoda bisekcji zarodków jest sposobem podwajania ich liczebności, a tym samym relatywnie prostą metodą klonowania zarodków ssaków, umożliwiającą uzyskanie identycznych genetycznie par osobników, czyli monogenetycznych bliźniąt. Zabiegowi bisekcji mogą być poddawane zarodki we wszystkich stadiach brudkowania, nawet te, w których nie zostały jeszcze uformowane połączenia międzykomórkowe typu złączy szczelinowych (ang. *gap junctions*) między dzielącymi się blastomerami. Najprostszym przykładem tego rodzaju bisekcji jest izolacja blastomerów z bardzo wczesnych (tj. 2–4-komórkowych) zarodków, uprzednio pozbawionych ich własnych osłonek przejrzystych. Najczęściej jednak bisekcji są poddawane zarodki w zaawansowanych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego, takich jak stadium późnej moruli lub blastocysty (Ozil, 1983; Velásquez i in., 2017; Casser i in., 2019). W tych stadiach embriogenezy w zarodkach został już ukończony proces kompaktacji, czyli wytworzenia międzyblastomero-

* Prezentowana praca naukowa uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016) w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG jako projekt badawczy pt.: „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju”. Akronim: „BIODIFF”.

¹ Maria Skrzyszowska i Marcin Samiec przyczynili się do powstania tego artykułu naukowego w jednakowym stopniu (równy wkład autorski).

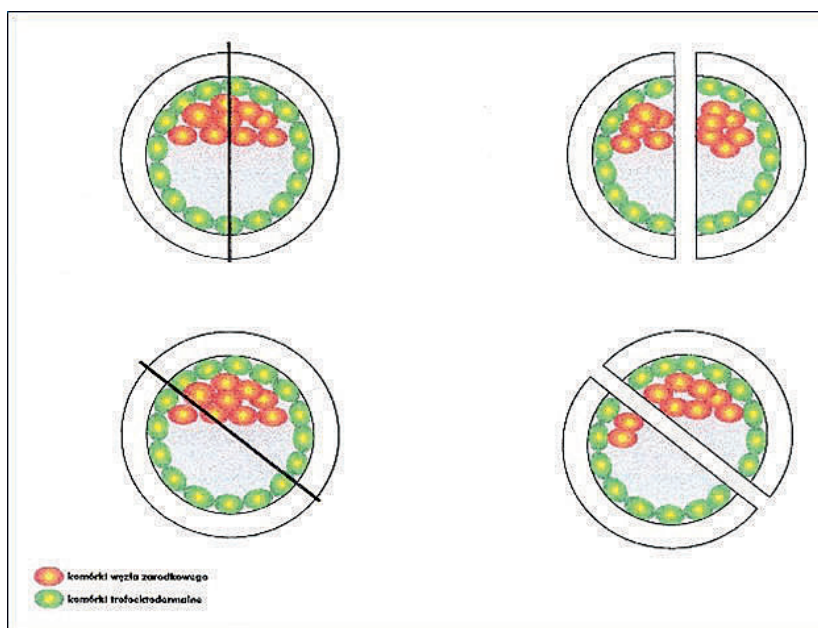
wych złączy szczelinowych, dzięki czemu podczas mikrochirurgicznego zabiegu przecinania zarodka nie dochodzi do jego dekompozycji i rozpadu na kilka części. Uzyskane w wyniku bisekcji dwa zbliżone do siebie wielkością fragmenty (tzw. „połówki”) zarodków zachowują pełny poimplantacyjny potencjał rozwojowy po przeniesieniu ich do dróg rodnych hormonalnie zsynchronizowanych samic-biorczyń. Dotąd, u bydła odnotowano narodziny licznych par monogenetycznego potomstwa w następstwie niechirurgicznego transferu domacicznego „połówek” zarodków otrzymanych wskutek bisekcji kompaktnej moruli lub blastocyst. W Polsce, pierwsze identyczne genetycznie cielęta uzyskano w Zakładzie Fizjologii Rozrodu Zwierząt (obecnie: Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji) Instytutu Zootechniki PIB w 1988 r. (Skrzyszowska i in., 1988). Prawidłowo przeprowadzony zabieg bisekcji pozwala na zachowanie poprawnej kompozycji obu „połówek”, nie tylko pod względem liczebności komórek, ale także stosunku procentowego komórek węzła zarodkowego do komórek trofektodermalnych, porównywalnego do występującego w całym zarodku (ryc. 1). Bisekcja jest relatywnie prostą i wydajną metodą podwajania liczby zarodków i produkcji monogenetycznych bliźniąt (efektywność na poziomie 25–30%). Jest to jednak technika dość inwazyjna, gdyż w trakcie zabiegu mikrochirurgicznego podziału zarodka w stadium kompaktnej moruli lub blastocysty dochodzi do zniszczenia i wyeliminowania części komórek zarodkowych. Szczególnie dotkliwe mogą być straty komórkowe ponoszone w obrębie węzła zarodkowego, które w istotny sposób wpływają na obniżenie potencjału rozwojowego uzyskanych „połówek” blastocysty (Skrzyszowska i Smorąg, 1989; Casser i in., 2019). Niewiele dotychczas wiadomo, w jaki sposób zabieg bisekcji wpływa na aktywność transkrypcyjną genów w „połówkach” zarodków. Z badań przeprowadzonych przez Velásqueza i in. (2017) na wydłużonych blastocystach, pozyskanych w dziewiątym dniu po transferze „połówek” i całych blastocyst bydłecych wynika, że bisekcja oddziałuje na transkryptom tych blastocyst, głównie poprzez obniżenie poziomu ekspresji kluczowych

genów kodujących białka zaangażowane w: 1) premodelowanie i degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej; 2) kontrolę wzrostu komórek; 3) wewnątrzkomórkową detoksykację produktów stresu oksydacyjnego, a także 4) transport metabolitów (produktów katabolizmu cukrów, nukleotydów i rybonukleotydów purynowych, białek, monoamin, lipidów, kwasów tłuszczowych) między poszczególnymi przedziałami (kompartimentami) i organellami wewnątrzkomórkowymi.

Rezultatem badań przeprowadzonych w kierunku poprawy efektywności dzielenia zarodków było opracowanie nowatorskiej technologii uzyskiwania monogenetycznych bliźniąt w oparciu o zmodyfikowaną bisekcję (Skrzyszowska i in., 1997, 1999; ryc. 2). Zaproponowany sposób bisekcji pozwala na znaczne ograniczenie strat komórkowych w porównaniu do tych, które powstają w trakcie standardowej bisekcji; redukuje je bowiem do poziomu kilku komórek. Istotą tej metody jest spowodowanie specyficznego sposobu wylęgania się blastocysty z osłonki przejrzystej, która została uprzednio poddana perforacji poprzez mikrochirurgiczne nakłucie, nacięcie, wytrawienie kwaśnym płynem Tyroda (pH 2) lub przewiercenie laserem (ang. *zona drilling*).

W warunkach hodowli *in vitro* około 50% perforowanych blastocyst ekspanduje przez szczelinę w osłonce przejrzystej, osiągając na pewnym etapie procesu wylęgania stan, w którym część blastocysty znajdująca się już poza osłonką przejrzystą jest zbliżona wielkością do części zarodka pozostającej w obrębie osłonki przejrzystej. Wylęgający się według tego schematu zarodek przypomina kształtem postać „ósemki”. Na tym etapie wylęgania obie części zarodka są połączone jedynie wąskim mostkiem komórkowym. Przecięcie owego mostka przy użyciu szklanej mikroigły lub metalowego ostrza jest zabiegiem o niewielkim stopniu inwazyjności.

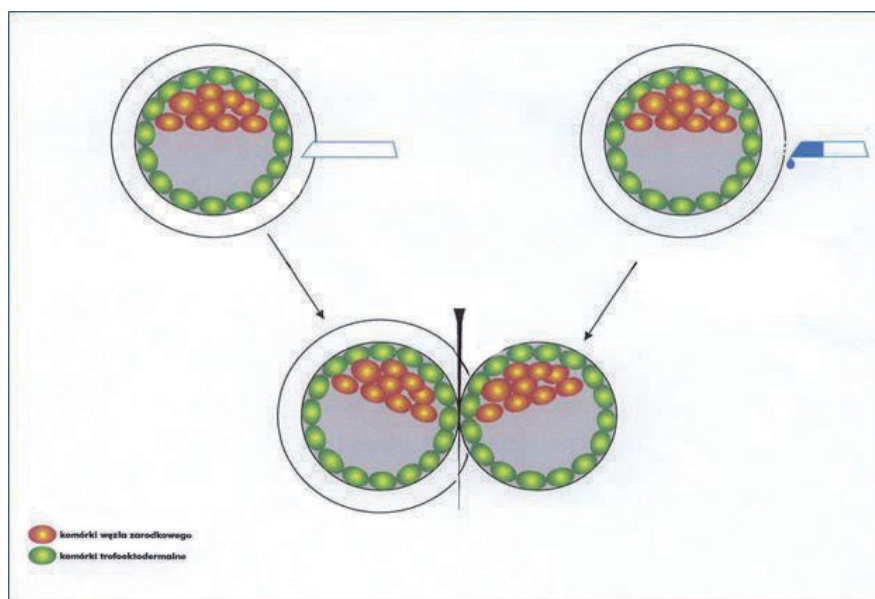
Skutkiem tego zabiegu jest uszkodzenie jedynie kilku komórek (ryc. 2). Uzyskane w następstwie zmodyfikowanej bisekcji „połówki” blastocyst po transferze do macicy jałówek- lub krów-biorczyń zachowują kompetencje do pełnego rozwoju *in vivo* (ryc. 3).



Ryc. 1. Schemat bisekcji zarodka w stadium blastocysty (szczegółowe objaśnienia w tekście artykułu oraz w odniesieniu do przypisu dolnego **)

Fig. 1. Schematic representation of bisecting embryo at the blastocyst stage (see the text and the footnote reference** for further details)

** W górnej części ryciny 1 jest zaprezentowany schemat prawidłowo przeprowadzonej bisekcji blastocysty. Pionowa płaszczyzna pośrodkowa (strzałkowa) mikrochirurgicznego podziału przebiega południkowo przez sam środek sferycznej figury zarodka (pionowa linia wzdłużnego cięcia zarodka na dwie symetryczne względem siebie „połówki” jest wykonana mikroostrzem prostopadle w stosunku do płaszczyzny poziomej przebiegającej poprzecznie przez zarodek). Przebieg symetrycznej płaszczyzny podziałowej został zorientowany w taki sposób, aby uzyskane w wyniku bisekcji „połówki” zarodka były ekwiwalentne i zawierały równomiernie rozdzielone dwie części zarodka, składające się zarówno z linii komórek wężła zarodkowego (embrioblastu), jak i z linii komórek trofoblastu (trofoektodermi). Z kolei, w dolnej części ryciny 1 jest przedstawiony schemat nieprawidłowo wykonanej bisekcji blastocysty. Pionowa płaszczyzna boczna mikrochirurgicznego podziału sferycznej figury zarodka ma przebieg skośny (pionowa linia ukośnego cięcia zarodka na dwie asymetryczne względem siebie „połówki” jest wykonana mikroostrzem w płaszczyźnie zorientowanej prostopadle w stosunku do płaszczyzny poziomej przebiegającej poprzecznie przez zarodek). Przebieg asymetrycznej płaszczyzny podziałowej został zorientowany w taki sposób, aby uzyskane w wyniku bisekcji „połówki” zarodka były nieekwiwalentne i zawierały nierównomiernie rozdzielone dwie części zarodka, składające się zarówno z linii komórek wężła zarodkowego, jak i z linii komórek trofoblastu. W jednej „połówce” zarodka pozostała przeważająca część komórek embrioblastu, a w drugiej – przeważająca część komórek pierścienia trofoblastycznego całej blastocysty sprzed zabiegu bisekcji.



Ryc. 2. Schemat zmodyfikowanej bisekcji zarodka w stadium blastocysty (szczegółowe objaśnienia w tekście artykułu oraz w odniesieniu do przypisu dolnego ***)
Fig. 2. Schematic representation of modified approach to bisecting embryo at the blastocyst stage (see the text and the footnote reference *** for further details)

*** W górnej części ryciny 2 jest zaprezentowany schemat nacięcia osłonki przejrzystej blastocysty poniżej przestrzennej lokalizacji komórek wężła zarodkowego. Przez wykonaną – w wyniku nacięcia metalowym mikroostrzem – perforację osłonki przejrzystej jest indukowany specyficzny sposób wylęgania się blastocysty, który jest przedstawiony w dolnej części ryciny 2. Wylęgający się zarodek przypomina kształtem postać „ósemki”. Dwie części wylęgającej się blastocysty (zarówno ta pozostająca wewnątrz osłonki przejrzystej, jak i ta znajdująca się poza nią) zawierają równomiernie rozdzielone subpopulacje linii komórek wężła zarodkowego oraz linii komórek pierścienia trofoektodermalnego i pozostają ze sobą połączone jedynie wąskim mostkiem komórkowym (blastomerowym). Przez uformowany – w wyniku prowokowanego sposobu wylęgania się blastocysty – mostek komórkowy jest dokonywane niewielkie nacięcie przy użyciu szklanej mikroigły, które powoduje podział blastocysty na dwie autonomiczne „połówki” – jedną otoczoną osłonką przejrzystą i drugą, która jest pozbawiona osłonki przejrzystej. Pionowa płaszczyzna mikrochirurgicznego podziału zarodka jest ograniczona tylko do mostka blastomerowego, który pozostawał uprzednio jedynym łącznikiem między obiema częściami wylęgającej się blastocysty, przez co odsetek strat komórkowych podczas zabiegu bisekcji został zredukowany do minimum.

Korzyści wynikające z produkcji monogenetycznych bliźniąt u bydła (ryc. 3) są wymierne zarówno w aspekcie praktycznym, jak i czysto poznawczym, zwłaszcza w kategorii eksperymentów embriologicznych ukierunkowanych na ocenę wczesnego rozwoju zarodkowego, śmiertelności embrionalnej oraz okołoinplantacyjnej sygnalizacji endokrynologicznej w układzie mat-

ka zastępcza-zarodek, a także w kategorii badań cytogenetycznych i fizjologicznych, szczególnie o charakterze żywieniowym.

Podczas zabiegu bisekcji możliwe jest także pobieranie komórek do analizy molekularnej w celu określenia płci zarodka, co także może mieć walor aplikacyjny, np. w kreowaniu postępu hodowlanego zwierząt użytkowych (Lopes

i in., 2001). Ograniczeniem tej metody jest możliwość uzyskania klonu składającego się jedynie z pary identycznych genetycznie osobników (monogenetyczne bliźnięta).

Włączenie efektywnej metody bisekcji za-

rodków do programu hodowlanego MOET (ang. *multiple ovulation and embryo transfer*) może poszerzyć ofertę programową tego przedsięwzięcia i odegrać ważną rolę w przyspieszeniu postępu hodowlanego u bydła.



Ryc. 3. Para monogenetycznych cieląt urodzonych po transferze „połówek” blastocysty do rogu macicy krowy-biorczyni. „Połówki” blastocysty uzyskano w wyniku zastosowania oryginalnej techniki zmodyfikowanej bisekcji zarodków, opracowanej w Zakładzie Fizjologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB w Balicach (szczegółowe objaśnienia w tekście artykułu)

Fig. 3. Pair of monogenetic calves born after transfer of blastocyst “halves” into the uterine horn of recipient cow. The blastocyst “halves” were generated using an original technique for modified embryo bisection that had been developed at the Department of Animal Reproduction Physiology, the National Research Institute of Animal Production in Balice (see the text for further details)

Klonowanie bydła techniką transferu jąder komórek zarodkowych lub somatycznych

Bardziej liczne klony są potencjalnie możliwe do uzyskania przy wykorzystaniu techniki transplantacji jąder komórek zarodkowych (ECNT; ang. *embryonic cell nuclear transfer*) lub techniki transplantacji jąder komórek somatycznych (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*) do cytoplazmy enukleowanych komórek jajowych. E nukleowane (wyjądrzone) komórki jajowe stano-

wią dojrzałe *in vivo* lub *in vitro* oocyty w stadium metafazy II podziału mejotycznego, z których został usunięty mikrochirurgicznie ich własny materiał genetyczny, tj. chromosomy skonfigurowane w postaci płytki metafazowej wrzeczona kariokinetycznego.

Klonowanie jako metoda rozrodu aseksualnego ma związek m.in. z możliwością produkcji i/lub multiplikacji monogenetycznego i jedнопłciowego potomstwa o wysokiej wartości hodowlanej i użyt-

kowej, którego identyczność genotypowa i fenotypowa z progenitorowym dawcą transkrypcyjnego aparatu jądrowego i mitochondrialnego komórki somatycznej dotyczy jedynie DNA genomowego. Osobniki, które są uzyskiwane na drodze klonowania zarodkowego lub somatycznego, różnią się bowiem pod względem cech fenotypowych, uwarunkowanych losową segregacją matczynego (oocytarnego) oraz embrionalnego lub somatogenicznego genomu mitochondrialnego (mtDNA) w następstwie pozajądrowego dziedziczenia materiału genetycznego (Samiec, 2005 a,b; Samiec i Skrzyszowska, 2018 a,b).

Jednym z najbardziej spektakularnych osiągnięć z zakresu klonowania somatycznego bydła było „przywrócenie do życia” buhaja-czempiona, który padł w 1993 r. ze starości w wieku 13,5 lat (Hoshino i in., 2009). Buhaj ten był przedstawicielem endemicznej populacji bydła japońskiej rasy *Wagyu*, której osobniki posiadają genotyp warunkujący wysokoodziedziczną cechę podwyższonej „marmurkowatości” (ang. *marbling*) mięsa. Dlatego też, buhajki i jałówki opasowe rasy *Wagyu*, którą klasyfikuje się do mięsnego typu użytkowego, charakteryzują się genetyczną predyspozycją do międzymięśniowego, śródmięśniowego i śródwłókienkowego odkładania tkanki tłuszczowej oraz do produkcji mięsa soczystego, kruchego o stosunkowo wysokiej zawartości jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach zakumulowanych w tłuszczu śródmięśniowym. Identyczną kopię genetyczną (klon) buhaja mięsnej rasy *Wagyu* uzyskano w wyniku zastosowania techniki SCNT z użyciem komórek wywodzących się z linii klonalnych i hodowli pierwotnych wyprowadzonych z bioptatów tkankowych, które zostały wyizolowane z organów moszny (jąder, najądrzy wraz z powrózkami nasiennymi), zamrożonych w temperaturze -80°C przez dekadę, a następnie przez 3 lata w ciekłym azocie (bez obecności jakichkolwiek krioprotektantów). Uściślając, źródłem dawców jąder w procedurze klonowania były w tym przypadku hodowane *in vitro* komórki fibroblasto-podobne (fibroblastoidalne) lub nabłonko-podobne (epite-

lioidalne), wyizolowane z długotrwałe kriokonserwowanych fragmentów głowy najądrza oraz powrózków nasiennych padłego buhaja-protoplasty (Hoshino i in., 2009). Na szczególną uwagę zasługuje również fakt sklonowania ostatniej żyjącej krowy rasy *Enderby Island* (endemicznej rasy bydła mlecznego z nowozelandzkiej wyspy *Enderby*) przy wykorzystaniu – jako dawców jąder – hodowanych *in vitro* komórek ściennej warstwy ziarnistej wyizolowanych z pęcherzyków jajnikowych. Z kolei, źródłem cytoplazm-biorców dla jąder komórek pęcherzykowych, wyizolowanych z jajników jedynej pozostałej przy życiu krowy rasy *Enderby Island*, były enukleowane komórki jajowe, które osiągnęły dojrzałość meiotyczną w warunkach hodowli *in vitro* oocytów pozyskanych poubojowo z jajników krów rzeźnych o zróżnicowanym pochodzeniu rasowym. Osiągnięcie to potwierdza, że wewnątrzgatunkowe klonowanie międzyrasowe może być skutecznym panaceum na drodze do restytucji i reintrodukcji zagrożonych wyginięciem ras zachowawczych bydła (Wells i in., 1998).

Czynniki determinujące efektywność klonowania somatycznego i status zdrowotny zwierząt klonalnych

Jednym z głównych czynników ograniczających efektywność klonowania somatycznego u bydła jest nieprawidłowa adaptacja epigenetyczna transferowanych jąder komórek somatycznych do warunków biochemicznych panujących w cytoplazmie oocyta, czyli niekompletne lub wadliwe przemodelowanie/przeprogramowanie ich aktywności transkrypcyjnej w cytoplazmie enukleowanych oocytów, a następnie w blastomerach rozwijających się zarodków klonalnych (Zhang i in., 2009, 2019 a; Niemann, 2016; Samiec i Skrzyszowska, 2018 a,b). Odstępstwa od prawidłowego przebiegu procesów epigenetycznego przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu komórek somatycznych w zarodkach klonalnych są przyczyną zaburzeń procesu placentacji oraz licznych wad anatomo-histologicznych łożyska płodów klonalnych u bydła (Hiendleder

i in., 2004; Su i in., 2011; Chavatte-Palmer i in., 2002, 2012; Biase i in., 2016). Błędy występujące podczas transkrypcyjnego przeprogramowania genomu komórek somatycznych przyczyniają się również do zwiększonej odpowiedzi immunologicznej ze strony układu odpornościowego matek zastępczych, dlatego też antygeny głównego układu zgodności tkankowej zarodków/płodów klonalnych są rozpoznawane przez środowisko wewnątrzmaciczne samicy-biorczyni jako antygeny przeszczepów allogenicznych (w przeciwieństwie do zarodków i płodów uzyskiwanych na drodze zapłodnienia, traktowanych przez system immunologiczny matki jako przeszczepy semiallogeniczne). Do innych skutków wadliwego przemodelowania/przeprogramowania jąder komórek somatycznych należy zaliczyć wysoką śmiertelność zarodków i płodów klonalnych, odpowiednio w periimplantacyjnym oraz perinatalnym okresie rozwoju ontogenetycznego, a także wysoki odsetek poronień (resorpcji płodów klonalnych) w I trymestrze ciąży (Hill i in., 2002). Należy zwrócić również uwagę na wady rozwojowe płodów i potomstwa klonalnego wynikające z letalnych lub subletalnych efektów anatomicznych i histopatologicznych w obrębie różnych narządów wewnętrznych (płuca, serce, wątroba, nerki), a także na często diagnozowany syndrom nadmiernej masy okołourodzeniowej cieląt klonalnych (ang. *large offspring syndrome*; LOS) oraz przerostu (hiperplazji i hipertrofii) komórek łożyska (ang. *large placenta syndrome*; LPS) w przypadku bydłych płodów klonalnych (Farin i in., 2006; Zhang i in., 2009; Su i in., 2011; Chavatte-Palmer i in., 2012; Smith i in., 2012; Biase i in., 2016).

W porównaniu z innymi technologiami wspomaganego rozrodu bydła wydajność klonowania somatycznego u tego gatunku ssaków, mierzona odsetkiem urodzonego potomstwa w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów, wciąż pozostaje na niskim poziomie oscylującym w przedziale 5–15%. Niemniej jednak, biotechnologiczne możliwości klonowania somatycznego bydła i innych gatunków zwierząt gospodarskich wyprzedziły znacznie zrozumienie biologicznych

uwarunkowań, a w szczególności aspektów molekularnych i epigenetycznych tej metody (Samiec i Skrzyszowska, 2018 a,b). Mimo to podstawy biologiczne, jakie zostały stworzone w zakresie genomowej inżynierii zarodkowej bydła, zwłaszcza w ciągu ostatnich 20 lat, umożliwiły opracowanie innowacyjnej technologii pozaustrojowej produkcji zarodków bydłych z wykorzystaniem procedury klonowania somatycznego, która może spełniać warunki dla jej zastosowania do realizacji celów laboratoryjnych lub w niektórych przypadkach tylko do realizacji ograniczonych celów praktycznych (Loi i in., 2016; Niemann, 2016). Dopiero zwiększenie efektywności klonowania somatycznego bydła co najmniej do poziomu adekwatnego z efektywnością zapłodnienia *in vitro* (30–40%) lub z efektywnością sztucznej inseminacji (60–80%) w ramach programu MOET (ang. *multiple ovulation and embryo transfer*), realizowanego u tego gatunku ssaków pozwoliłoby na wykorzystanie tej technologii wspomaganego rozrodu na większą skalę praktyczną. Jednakże, ze względu na stosunkowo wysoką (30–40-procentową) częstość występowania letalnych lub subletalnych anomalii rozwojowych bądź defektów anatomiczno-histologicznych u płodów i potomstwa klonalnego zastosowanie klonowania somatycznego bydła na skalę przemysłową nie jest możliwe, przynajmniej na obecnym etapie zaawansowania badań prowadzonych z tego zakresu na świecie, w tym również w Polsce.

Produkcyjność mleka i mięsa u bydła pochodzenia klonalnego

Wskutek rygorystycznej selekcji naturalnej eliminowane są cielęta obciążone wadami wrodzonymi, natomiast pozostające przy życiu zwierzęta klonalne, osiągające dorosłość nie wykazują żadnych zmian/anomalii klinicznych. Z badań Watanabe i Nagai (2011) wynika, że osobniki klonalne (ras bydła mlecznego i mięsnego) mają status zdrowotny ekwiwalentny do statusu zwierząt nieklonalnych. Ponadto, potwierdzono zasadniczą równowagę między obiema grupami zwierząt w zakresie produkcji mleka i mięsa

(Watanabe i Nagai, 2011). W produkcji mleka badano takie parametry, jak: 1) wydajność mleczną, 2) krzywą laktacji, 3) ogólny skład mleka, 4) całkowity poziom i strukturalno-funkcjonalny rozkład lipidów, 5) zawartość i udział procentowy poszczególnych grup oraz rodzajów kwasów tłuszczowych, 6) zawartość suchej masy beztłuszczowej (MSNF; ang. *milk solids-non-fat*), 7) całkowity poziom i strukturalno-funkcjonalny rozkład białek mleka, 8) koncentrację laktozy, a także 9) liczbę i gęstość komórek somatycznych w jednostce objętości. Stwierdzono znikome (nieistotne) różnice w zakresie właściwości biochemiczno-fizycznych mleka między osobnikami klonalnymi i nieklonalnymi. Statystycznie istotne różnice odnotowano jedynie w składzie występujących w mleku kwasów tłuszczowych (Heyman i in., 2007). Warto podkreślić, że wydajność mleczna krów w całym okresie laktacji zależy zarówno od ich profilu genetycznego, jak i od warunków środowiskowych, w których żyją. Oddziaływanie czynników środowiskowych w okresie między narodzinami a okresem laktacyjnym można najlepiej ocenić u osobników pochodzenia klonalnego, które z założenia mają identyczny profil genetyczny. Różnice w wydajności mlecznej w odniesieniu do pełnego okresu laktacji między zwierzętami klonalnymi i nieklonalnymi mogą być wówczas wyraźnie dostrzeżone. Wydajność mleczna krów klonalnych różni się tylko nieznacznie od wydajności krów nieklonalnych. Te różnice mogą być po części wynikiem częstszego występowania podklinicznych stanów zapalnych wymienia. Wyniki badań przeprowadzonych przez Montazer-Torbati i in. (2016) wykazały, że produkcja mleka nie różni się istotnie między osobnikami klonalnymi a nieklonalnymi, ale odnotowany poziom białek i zawartość tłuszczów w mleku były mniej zróżnicowane w populacji zwierząt klonalnych. Wykazano ponadto, że w pierwszym cyklu laktacji u krów klonalnych zawartość lipidów w mleku była niższa. W sześćdziesiątym siódmym dniu laktacji zawartość tłuszczów w mleku oraz stężenie białek mleka były również niższe u krów klonalnych. Autorzy

tych badań sugerują, że niższy poziom wyżej wymienionych parametrów biochemicznych może być skorelowany z wyższym indeksem apoptotycznym komórek gruczołu mlekowego.

Z kolei, u ras bydła należących do mięsnego typu użytkowego oceniano takie parametry produkcyjne, jak: 1) przyżyciową wydajność mięsną na podstawie wyników opasu i przyrostów masy ciała, 2) wydajność poubojową (rzeźną), czyli stosunek masy tuszy mięsnej do masy ciała żywca na podstawie procentowego udziału półtuszy oraz poszczególnych wyrębów tuszy, a także 3) właściwości fizykochemiczne mięsa, 4) zawartość i strukturalno-funkcjonalny rozkład aminokwasów oraz 5) profil kwasów tłuszczowych. Biorąc pod uwagę wymienione wcześniej parametry, stwierdzono jedynie niewielkie różnice między osobnikami klonalnymi i nieklonalnymi (Heyman i in., 2007; Watanabe i Nagai, 2009, 2011). Statystycznie istotny poziom różnic międzygrupowych dotyczył natomiast tylko profilu kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej szkieletowej (Yang i in., 2007; Heyman i in., 2007).

Klonowanie somatyczne jako sposób uzyskiwania transgenicznych osobników

Wartość aplikacyjna technologii klonowania somatycznego bydła jest związana z możliwością uzyskiwania identycznych genotypowo i fenotypowo zwierząt transgenicznych, czyli zwierząt o transformowanych genomach jądrowych, cennych ze względu na produkt ekspresji zmodyfikowanych genów (Samiec i Skrzyszowska, 2011). Warto zwrócić uwagę na niezwykle obiecujące wyniki badań Zhanga i in. (2019 b). Zespół ten wykorzystał – jako źródło dawców jąder komórkowych w procedurze klonowania bydła – transgeniczne komórki somatyczne, do genomu których wprowadzono konstrukcje cDNA bogate w eksony kodujące lizynę oraz zawierające sekwencje trzech genów kodujących białka strukturalno-funkcjonalne mleka (ligacja segmentów eksonowych genów β -kazeiny, α S2-kazeiny oraz laktoferryiny). Wykazano, że bogaty w eksony ko-

dujące lizynę transgen fuzyjny *pBC1-LR-NEO*, którego tkankowo-specyficzna ekspresja pozostawała pod kontrolą promotora genu β -kazeiny, nie tylko stabilnie integrował się z genomowym DNA komórek bydlęcych, lecz przede wszystkim wykazywał intensywną aktywność transkrypcyjną ukierunkowaną na komórki gruczołu mlekowego (wymienia). Bogaty w lizynę rekombinowany polipeptyd fuzyjny, zawierający połączone sekwencje aminoacylowe trzech strukturalno-funkcjonalnych białek – β -kazeiny, α S2-kazeiny oraz laktoferryiny – był w wysokim stopniu wykrywalny w mleku trzech transgenicznych krów. Z kolei, koncentracja cząsteczek polipeptydów lub białek polilizynowych utrzymywała się na istotnie wyższym poziomie w mleku zdajonym od zmodyfikowanych genetycznie krów w porównaniu do próbek mleka pozyskanego od zwierząt nietransgenicznych. Transgeniczne krowy dostarczające w mleku polipeptydy bogate w lizynę mogą być wykorzystane do wytwarzania na skalę przemysłową produktów nabiałowych wzbogaconych w białka zawierające liczne reszty tego aminokwasu egzogenego. Uniwersalne znaczenie lizyny dla prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych (m.in. metabolizmu lipidów czy laktacji), a także jej fundamentalna rola w organizmach ssaków jako egzogenego aminokwasu budulcowego łańcuchów polipeptydowych w cząsteczkach wielu białek (m.in. białek osocza krwi, strukturalnych białek skóry, kości czy ścięgien oraz białek tworzących hormony, enzymy i przeciwciała) pozostaje kwestią nie do przecenienia.

Wykorzystanie techniki SCNT w klonowaniu ras bydła należących do mięsnego typu użytkowego może być skutecznym sposobem uzyskiwania oraz powielania populacji transgenicznych buhajków i jałówek opasowych, których wydajność rzeźna charakteryzuje się parametrami podwyższonymi w wyniku genetycznej modyfikacji ukierunkowanej albo na inaktywację (unieczynnienie) genu kodującego miostatynę (Proudfoot i in., 2015) albo na potranskrypcyjną (przedtranslacyjną) supresję cząsteczek mRNA kodowanych przez allele genu miostatyny (Tessanne i in., 2012). Miostatyna

stanowi – specyficzne dla komórek tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej i gładkiej – inhibitorowe białko hormonalne, które hamuje na drodze regulacji parakrynej przyrost (hipertrofię i hiperplazję) mięśni szkieletowych i gładkich. Obecność znokautowanego pojedynczego allelu genu miostatyny (Proudfoot i in., 2015) lub obecność trwale wyciszzonego potranskrypcyjnie (przedtranslacyjnie) mRNA zsyntetyzowanego w następstwie ekspresji pojedynczego allelu genu miostatyny (Tessanne i in., 2012), które zostały potwierdzone technikami biologii molekularnej u heterozygotycznych osobników transgenicznych uzyskanych na drodze klonowania somatycznego, wydają się skutkować wyraźnym zwiększeniem mięsności buhajków i krów rzeźnych, wynikającym z hipertrofii i hiperplazji nie tylko tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej, lecz także tkanki mięśniowej gładkiej. Jednakże, kinetykę procesów hipertrofii i hiperplazji mięśni szkieletowych i gładkich można jeszcze bardziej przyśpieszyć u klonalnych buhajków i jałówek opasowych, będących homozygotycznymi osobnikami transgenicznymi, które cechuje obecność dwóch znokautowanych alleli genu miostatyny (Proudfoot i in., 2015) lub obecność dwóch potranskrypcyjnie „uśpionych” kopii cząsteczek mRNA zakodowanych przez obydwie transkrypcyjnie aktywne allele genu miostatyny (Tessanne i in., 2012). Z kolei, jakość i walory smakowe wołowiny mogą zostać podwyższone poprzez uzyskiwanie transgenicznego bydła klonalnego, wykazującego nadekspresję genów kodujących adipocytowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (*A-FABP*; ang. *adipocyte-type fatty acid-binding protein*). Uzyskane na drodze klonowania somatycznego cielęta transgeniczne mięsnego typu użytkowego, z potwierdzoną obecnością dodatkowych kopii genu *A-FABP*, charakteryzują się zdolnością do wzmożonej akumulacji tłuszczu śródmięśniowego o relatywnie wysokiej koncentracji nienasyconych kwasów tłuszczowych w obrębie mięśni szkieletowych, co warunkuje zwiększenie delikatności, soczystości i kruchości mięsa wołowego (Guo i in., 2017).

Atrakcyjność powielania transgenicznych

jałówek i buhajków w następstwie klonowania somatycznego jest zdeterminowana możliwościami aplikacyjnymi hormonalnego lub enzymatycznego produktu ekspresji zmodyfikowanego genu. Od tego bowiem zależy przede wszystkim skala i zasięg prowadzonych badań. Mimo że pierwszym uzyskanym ssakiem klonalnym była owca, to znacznie większy zasięg miały prace badawcze ukierunkowane na klonowanie somatyczne bydła. Transgeniczne krowy klonalne mogą stać się bowiem żywymi „fabrykami”, tj. bioreaktorami, dostarczającymi mleko o zhumanizowanym bądź ułatwiającym jego trawienie składzie dietetycznym (Yang i in., 2011; Lu i in., 2016; Wang i in., 2008, 2017) lub dostarczającymi w mleku ludzkie rekombinowane białka terapeutyczne (tzw. biofarmaceutyki lub nutraceutyki). Te ostatnie mogą znaleźć zastosowanie kliniczne w terapiach pacjentów cierpiących na choroby uwarunkowane genetycznie (Jang i in., 2006; Salamone i in., 2006; Monzani i in., 2013; Luo i in., 2015). Warto również podkreślić, że transgeniczne krowy klonalne produkujące mleko zawierające immunoenzymatyczne białka pochodzenia bakteryjnego lub ludzkiego (lizostafinę lub lizozym) charakteryzują się klinicznie potwierdzoną odpornością na bakteryjne zapalenie wymienia, czyli *mastitis* (Liu i in., 2013, 2014).

Potencjał aplikacyjny klonowania somatycznego bydła

Wydaje się, że po przejściu – z fazy badań podstawowych do fazy badań stosowanych – techniki wewnątrz- i międzygatunkowego klonowania somatycznego bydła, z uwagi na swoje potencjalne możliwości aplikacyjne dla rozwoju nauki i gospodarki w Polsce poprzez ich wykorzystanie w rolnictwie i w dziedzinach badań interdyscyplinarnych, mogłyby przyczynić się do: 1) ochrony zasobów genetycznych i tworzenia rezerw genetycznych zagrożonych wyginięciem rodzimych ras bydła (np. bydło polskie czerwone, bydło białogrzbiete); 2) restytucji (odtworzenia) oraz multiplikacji subpopulacji ginących i rzadkich ras zachowawczych bydła polskiego czerwonego

i bydła białogrzbietego w celu zachowania bioróżnorodności oraz podwyższenia stopnia wewnątrzpopulacyjnej i międzyosobniczej zmienności genetycznej; oraz 3) „wskrzeszania do życia” i reintrodukcji do środowiska naturalnego wymarłych, wolnożyjących gatunków z rodziny krętorogich (*Bovidae*), stanowiących protoplastów niektórych prymitywnych ras bydła domowego (*Bos taurus*), takich jak np. tur europejski (*Bos primigenius*), którego ostateczne wyginięcie na terenach polskich odnotowano w 1627 r. Warto podkreślić, że w Polsce były prowadzone na skalę laboratoryjną – pod patronatem Polskiej Fundacji Odtworzenia Tura, której prezesem był prof. dr hab. n. med. Mirosław Ryba, a także w ramach wielozadaniowego, interdyscyplinarnego projektu koordynowanego przez prof. dr hab. n. med. Ryszarda Słomskiego z Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego oraz Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu oraz realizowanego we współpracy z prof. dr hab. Zdzisławem Smorągim z Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki PIB oraz prof. dr hab. Jackiem A. Modlińskim z Zakładu Embriologii Doświadczalnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN – próby częściowej lub całkowitej rekonstrukcji genomu jądrowego i/lub mitochondrialnego, a następnie bankowania cząsteczek odtworzonego genomu mitochondrialnego (mtDNA) tura, które udało się wyizolować z tkanek mózgu (zawiązków rogów), kości i uzębienia, pochodzących z zachowanych eksponatów muzealnych rogów, mózgo- i trzewioczaszki tego gatunku (Zeyland i in., 2013). Ponadto, upowszechnione już na skalę praktyczną badania z zakresu klonowania bydła mogłyby posłużyć do osiągnięcia innych wymiernych korzyści, a wśród nich do: 4) poprawy wskaźników wartości hodowlanej (genetycznej) i użytkowej różnych ras bydła, w tym zwiększenia ich wydajności mlecznej, mięsnej i rozplodowej (plenności i płodności); jak również 5) przełożenia (translacji) wyników badań podstawowych na wdrożenia w dziedzinach nauk interdyscyplinarnych z zakresu tworzenia odzwierzęcych produktów biotechnologicznych (transgenicznych) dla

przemysłu biofarmaceutycznego, nutraceutycznego i technologii żywności (gruczoły mlekowe bydła jako bioreaktory wytwarzające mleko zhumanizowane lub mleko zawierające ludzkie rekombinowane białka terapeutyczne).

Generalnie, w porównaniu do konwencjonalnej hodowli i naturalnego rozrodu bydła, w rozwoju osobniczym (ontogenetycznym) płodów i potomstwa klonalnego stwierdza się zarówno wysoką częstość występowania spontanicznych/samoistnych poronień wśród samic-bioreczyn zarodków klonalnych (matek zastępczych), jak również wysoki odsetek przedwczesnych porodów u matek zastępczych, w tym urodzeń martwych płodów klonalnych oraz wysokie wskaźniki śmiertelności okołoporodowej i neonatalnej wśród cieląt klonalnych (Farin i in., 2006; Watanabe i Nagai, 2011). W następstwie ogólnokrajowych badań przeprowadzonych w Japonii (Watanabe i Nagai, 2009) oszacowano, że jedna trzecia nowo narodzonych cieląt klonalnych pada w okresie okołoporodowym wskutek martwych urodzeń (poronień) lub śmiertelności neonatalnej, spowodowanej występowaniem wrodzonych wad rozwojowych. Wady te są najczęściej efektem błędów o podłożu epigenetycznym, wykrywanych już na etapie rozwoju zarodkowego (Yamanaka i in., 2011), jak i płodowego (Liu i in., 2008 a,b; Niemann i in., 2008) oraz neonatalnego (Watanabe, 2013). Natomiast, częstość występowania upadków bydła klonalnego z powodu czynników sprzyjających zapadalności na różne jednostki chorobowe – wśród osobników żyjących dłużej niż 200 dni od momentu urodzenia – wydaje się być identyczna jak ta, którą odnotowuje się u bydła utrzymywanego w warunkach konwencjonalnej hodowli (Watanabe i Nagai, 2009). Warto ponadto zwrócić uwagę na fakt, że wśród potomstwa bydła klonalnego (uzyskanego w wyniku jego krycia naturalnego lub rozrodu wspomaganego, czyli sztucznej inseminacji) wskaźnik upadków, których czynnikiem etiologicznym była zachorowalność w ciągu całej długości życia osobniczego, utrzymywał się na takim samym poziomie, jak śmiertelność obserwowana wśród osobników pochodzących z hodowli trady-

cyjnej (Watanabe i Nagai, 2009).

Wykazano również, że potomstwo bydła klonalnego posiada prawidłowy status epigenetyczny, mierzony ilościowym profilem metylacji reszt cytozyny genomowego DNA; co więcej, jest on porównywalny ze statusem osobników uzyskanych w ramach konwencjonalnego rozrodu wspomaganego u bydła. Yamanaka i in. (2011) udowodnili bowiem, że profil metylacji DNA w komórkach blastocyst rozwijających się z zygot uzyskanych albo w następstwie sztucznej inseminacji samic klonalnych z użyciem nasienia pochodzącego od buhajów klonalnych lub nieklonalnych, albo w następstwie sztucznej inseminacji samic nieklonalnych z użyciem nasienia pochodzącego od buhajów klonalnych utrzymywał się na takim samym poziomie, jak profil metylacji DNA w komórkach blastocyst rozwijających się z zygot uzyskanych na drodze sztucznej inseminacji samic nieklonalnych z użyciem nasienia pochodzącego od buhajów nieklonalnych.

Potwierdzono ponadto, że profil metylacji DNA w blastocystach rozwijających się z zapłodnionych *in vivo* oocytów uzyskanych w wyniku sztucznej inseminacji przeprowadzonej u bydła pochodzenia nieklonalnego oraz klonalnego okazał się być znacząco niższy w porównaniu z grupą zarodków uzyskanych w wyniku klonowania techniką SCNT, u których utrzymywał się on na poziomie zbliżonym do profilu metylacji DNA, jaki wykazano w rezultacie analiz przeprowadzonych na komórkach somatycznych stanowiących źródło dawców jąder użytych w procedurze SCNT (Yamanaka i in., 2011). Z kolei, Long i in. (2014) zwracają uwagę na fakt, że potomstwo pochodzące od zwierząt klonalnych nie wykazuje żadnych zmian anatomo- i histopatologicznych charakterystycznych dla ich rodziców. Niemniej jednak, przyczyną niskiej efektywności samej technologii klonowania somatycznego (mierzonej nie tylko odsetkiem urodzeń zdrowego potomstwa klonalnego, lecz również wskaźnikami jego przeżywalności okołoporodowej/perinatalnej i poporodowej/neonatalnej) są wysokie współczynniki śmiertelności zarodków, płodów oraz nowo na-

rodzonego potomstwa. U podstaw tych ostatnich leżą zaś procesy nieprawidłowego lub niepełnego przeprogramowania pamięci epigenetycznej jąder komórek somatycznych w cytoplazmie zrekonstruowanych i sztucznie aktywowanych oocytów oraz w blastomerach zarodków klonalnych, czego skutkiem są zaburzenia w aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego i mitochondrialnego w embrionalnej, płodowej, a także postnatalnej fazie ontogenezy.

Perspektywy wykorzystania bydła klonalnego do celów konsumpcyjnych

Dotychczas, rozwijane technologie klonowania somatycznego bydła nie są ukierunkowane na wykorzystanie zwierząt klonalnych jako źródła do produkcji żywności. Chociaż brak jest merytorycznie uzasadnionych podstaw do zawieszania lub wstrzymywania stosowania techniki klonowania do produkcji zwierząt przeznaczonych na cele konsumpcyjne. Dotyczy to również hodowli zwierząt klonalnych i ich potomstwa, importu zwierząt i/lub zarodków klonalnych, a także produktów mięsnych i mlecznych pochodzących od zwierząt klonalnych. Opierając się na dostępnych badaniach naukowych, Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA; ang. *US Food and*

Drug Administration) oraz Europejski Urząd Bezpieczeństwa Żywności (EFSA; ang. *European Food Safety Authority*) i Japońska Komisja ds. Bezpieczeństwa Żywności (FSC; ang. *Food Safety Commission*) wnioskowoły w latach 2008–2009, że produkty żywnościowe otrzymane z mięsa i mleka pochodzącego od zwierząt klonalnych są równoważne z odpowiednimi produktami wytworzonymi z mięsa i mleka zwierząt uzyskanych za pośrednictwem konwencjonalnych technik wspomaganego rozrodu, takich jak: sztuczna inseminacja (AI; ang. *artificial insemination*) lub transfer zarodków (ET; ang. *embryo transfer*). Mimo to, komercyjne wykorzystanie tych produktów w przemyśle rolno-spożywczym jest zakazane w wielu państwach Unii Europejskiej nie tylko z przyczyn, które wynikają z braku społecznej akceptacji dla produktów żywnościowych takiego pochodzenia, lecz także z powodu niskiej efektywności samej technologii SCNT u zwierząt gospodarskich. Mając to na uwadze należy podkreślić, że dla realizacji komercyjnych celów konieczne jest upowszechnienie informacji o niskim ryzyku związanym z wykorzystywaniem nowoczesnych technologii wspomaganego rozrodu i prowadzenie dalszych badań ukierunkowanych na znaczącą poprawę skuteczności klonowania bydła.

Literatura

- Biase F.H., Rabel C., Guillomot M., Hue I., Andropolis K., Olmstead C.A., Oliveira R., Wallace R., LeBourhis D., Richard C., Champion E., Chaulot-Talmon A., Giraud-Delville C., Taghouti G., Jammes H., Renard J.P., Sandra O., Lewin H.A. (2016). Massive dysregulation of genes involved in cell signaling and placental development in cloned cattle conceptus and maternal endometrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113 (51): 14492–14501.
- Casser E., Israel S., Boiani M. (2019). Multiplying embryos: experimental monozygotnic polyembryony in mammals and its uses. *Int. J. Dev. Biol.*, 63 (3–4–5): 143–155.
- Chavatte-Palmer P., Heyman Y., Richard C., Monget P., LeBourhis D., Kann G., Chilliard Y., Vignon X., Renard J.P. (2002). Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol. Reprod.*, 66 (6): 1596–1603.
- Chavatte-Palmer P., Camous S., Jammes H., Le Cleac'h N., Guillomot M., Lee R.S. (2012). Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta*, 33 (Suppl.): S99–S104.
- Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 65 (1): 178–191.
- Guo Y., Li H., Wang Y., Yan X., Sheng X., Chang D., Qi X., Wang X., Liu Y., Li J., Ni H. (2017). Screening somatic

- cell nuclear transfer parameters for generation of transgenic cloned cattle with intragenomic integration of additional gene copies that encode bovine adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP). *Mol. Biol. Rep.*, 44 (1): 159–168.
- Heyman Y., Chavatte-Palmer P., Fromentin G., Berthelot V., Jurie C., Bas P., Dubarry M., Mialot J.P., Remy D., Richard C., Martignat L., Vignon X., Renard J.P. (2007). Quality and safety of bovine clones and their products. *Animal*, 1 (7): 963–972.
- Hiendleder S., Prelle K., Brüggerhoff K., Reichenbach H.D., Wenigerkind H., Bebbere D., Stojkovic M., Müller S., Brem G., Zakhartchenko V., Wolf E. (2004). Nuclear-cytoplasmic interactions affect *in utero* developmental capacity, phenotype, and cellular metabolism of bovine nuclear transfer fetuses. *Biol. Reprod.*, 70 (4): 1196–1205.
- Hill J.R., Schlafer D.H., Fisher P.J., Davies C.J. (2002). Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol. Reprod.*, 67 (1): 55–63.
- Hoshino Y., Hayashi N., Taniguchi S., Kobayashi N., Sakai K., Otani T., Iritani A., Saeki K. (2009). Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80°C freezer for a decade. *PLoS One*, 4 (1): e4142.
- Jang G., Bhuiyan M.M., Jeon H.Y., Ko K.H., Park H.J., Kim M.K., Kim J.J., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. (2006). An approach for producing transgenic cloned cows by nuclear transfer of cells transfected with human alpha 1-antitrypsin gene. *Theriogenology*, 65 (9): 1800–1812.
- Liu J., Liang X., Zhu J., Wei L., Hou Y., Chen D.Y., Sun Q.Y. (2008 a). Aberrant DNA methylation in 5' regions of DNA methyltransferase genes in aborted bovine clones. *J. Genet. Genomics*, 35 (9): 559–568.
- Liu J.H., Yin S., Xiong B., Hou Y., Chen D.Y., Sun Q.Y. (2008 b). Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol. Reprod. Dev.*, 75 (4): 598–607.
- Liu X., Wang Y., Guo W., Chang B., Liu J., Guo Z., Quan F., Zhang Y. (2013). Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat. Commun.*, 4: 2565.
- Liu X., Wang Y., Tian Y., Yu Y., Gao M., Hu G., Su F., Pan S., Luo Y., Guo Z., Quan F., Zhang Y. (2014). Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc. Biol. Sci.*, 281 (1780): 20133368.
- Loi P., Iuso D., Czernik M., Ogura A. (2016). A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? *Trends Biotechnol.*, 34 (10): 791–797.
- Long C.R., Westhusin M.E., Golding M.C. (2014). Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 81 (2): 183–193.
- Lopes R.F., Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L. (2001). Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, 56 (9): 1383–1392.
- Lu D., Liu S., Ding F., Wang H., Li J., Li L., Dai Y., Li N. (2016). Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows. *Sci. Rep.*, 6: 22947.
- Luo Y., Wang Y., Liu J., Lan H., Shao M., Yu Y., Quan F., Zhang Y. (2015). Production of transgenic cattle highly expressing human serum albumin in milk by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Transgenic Res.*, 24 (5): 875–883.
- Montazer-Torbati F., Boutinaud M., Brun N., Richard C., Neveu A., Jaffrézic F., Laloë D., LeBourhis D., Nguyen M., Chadi S., Jammes H., Renard J.P., Chat S., Boukadiri A., Devinoy E. (2016). Differences during the first lactation between cows cloned by somatic cell nuclear transfer and noncloned cows. *J. Dairy Sci.*, 99 (6): 4778–4794.
- Monzani P.S., Sangalli J.R., De Bem T.H., Bressan F.F., Fantinato-Neto P., Pimentel J.R., Birgel-Junior E.H., Fontes A.M., Covas D.T., Meirelles F.V. (2013). Breeding of transgenic cattle for human coagulation factor IX by a combination of lentiviral system and cloning. *Genet. Mol. Res.*, 12 (3): 3675–3688.
- Niemann H. (2016). Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning. *Theriogenology*, 86 (1): 80–90.
- Niemann H., Tian X.C., King W.A., Lee R.S. (2008). Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal develop-

- ment upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction*, 135 (2): 151–163.
- Ozil J.P. (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 69 (2): 463–468.
- Proudfoot C., Carlson D.F., Huddart R., Long C.R., Pryor J.H., King T.J., Lillico S.G., Mileham A.J., McLaren D.G., Whitelaw C.B., Fahrenkrug S.C. (2015). Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res.*, 24 (1): 147–153.
- Salamone D., Baraňao L., Santos C., Bussmann L., Artuso J., Werning C., Prync A., Carbonetto C., Dabsys S., Munar C., Salaberry R., Berra G., Berra I., Fernández N., Papouchado M., Foti M., Judewicz N., Mujica I., Muñoz L., Alvarez S.F., González E., Zimmermann J., Criscuolo M., Melo C. (2006). High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J. Biotechnol.*, 124 (2): 469–472.
- Samiec M. (2005 a). The role of mitochondrial genome (mtDNA) in somatic and embryo cloning of mammals. A review. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (2): 213–233.
- Samiec M. (2005 b). The effect of mitochondrial genome on architectural remodeling and epigenetic reprogramming of donor cell nuclei in mammalian nuclear transfer-derived embryos. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (3): 393–422.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011). Transgenic mammalian species, generated by somatic cell cloning, in biomedicine, biopharmaceutical industry and human nutrition/dietetics – recent achievements. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 317–328.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018 a). Intrinsic and extrinsic molecular determinants or modulators for epigenetic remodeling and reprogramming of somatic cell-derived genome in mammalian nuclear-transferred oocytes and resultant embryos. *Pol. J. Vet. Sci.*, 21 (1): 217–227.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018 b). Can reprogramming of overall epigenetic memory and specific parental genomic imprinting memory within donor cell-inherited nuclear genome be a major hindrance for the somatic cell cloning of mammals? – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 18 (3): 623–638.
- Skrzyszowska M., Smoraż Z. (1989). Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. *Theriogenology*, 32 (1): 115–122.
- Skrzyszowska M., Znaniecki R., Bychawski S., Smoraż Z. (1988). Przenoszenie dzielonych zarodków bydłowych (Transplantation of bisected cattle embryos). *Med. Weter.*, 44 (7): 412–414.
- Skrzyszowska M., Smoraż Z., Kątska L. (1997). Demi-embryo production from hatching of zona-drilled bovine and rabbit blastocysts. *Theriogenology*, 48 (4): 551–557.
- Skrzyszowska M., Smoraż Z., Kątska L., Bochenek M. (1999). Cattle twins after transfer of demi-embryos derived from zona-perforated blastocysts. *J. Anim. Feed Sci.*, 8 (2): 223–231.
- Smith L.C., Suzuki J.Jr., Goff A.K., Filion F., Therrien J., Murphy B.D., Kohan-Ghadr H.R., Lefebvre R., Brisville A.C., Buczinski S., Fecteau G., Perecin F., Meirelles F.V. (2012). Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, 47 (Suppl. 4): 107–114.
- Su J.M., Yang B., Wang Y.S., Li Y.Y., Xiong X.R., Wang L.J., Guo Z.K., Zhang Y. (2011). Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. *Theriogenology*, 75 (7): 1346–1359.
- Tessanne K., Golding M.C., Long C.R., Peoples M.D., Hannon G., Westhusin M.E. (2012). Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin. *Mol. Reprod. Dev.*, 79 (3): 176–185.
- Velásquez A.E., Manríquez J., Castro F.O., Cox J.F., Rodríguez-Alvarez L. (2017). Embryo splitting affects the transcriptome during elongation stage of *in vitro*-produced bovine blastocysts. *Theriogenology*, 87: 124–134.
- Wang J., Yang P., Tang B., Sun X., Zhang R., Guo C., Gong G., Liu Y., Li R., Zhang L., Dai Y., Li N. (2008). Expression and characterization of bioactive recombinant human α -lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows. *J. Dairy Sci.*, 91 (12): 4466–4476.
- Wang Y., Ding F., Wang T., Liu W., Lindquist S., Hernell O., Wang J., Li J., Li L., Zhao Y., Dai Y., Li N. (2017). Purification and characterization of recombinant human bile salt-stimulated lipase expressed in milk of transgenic cloned cows. *PLoS One*, 12 (5): e0176864.
- Watanabe S. (2013). Effect of calf death loss on cloned cattle herd derived from somatic cell nuclear transfer:

- clones with congenital defects would be removed by the death loss. *Anim. Sci. J.*, 84 (9): 631–638.
- Watanabe S., Nagai T. (2009). Death losses due to stillbirth, neonatal death and diseases in cloned cattle derived from somatic cell nuclear transfer and their progeny: a result of nationwide survey in Japan. *Anim. Sci. J.*, 80 (3): 233–238.
- Watanabe S., Nagai T. (2011). Survival of embryos and calves derived from somatic cell nuclear transfer in cattle: a nationwide survey in Japan. *Anim. Sci. J.*, 82 (2): 360–365.
- Wells D.N., Misica P.M., Tervit H.R., Vivanco W.H. (1998). Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10 (4): 369–378.
- Yamanaka K., Kaneda M., Inaba Y., Saito K., Kubota K., Sakatani M., Sugimura S., Imai K., Watanabe S., Takahashi M. (2011). DNA methylation analysis on satellite I region in blastocysts obtained from somatic cell cloned cattle. *Anim. Sci. J.*, 82 (4): 523–530.
- Yang B., Wang J., Tang B., Liu Y., Guo C., Yang P., Yu T., Li R., Zhao J., Zhang L., Dai Y., Li N. (2011). Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS One*, 6 (3): e17593.
- Yang X., Tian X.C., Kubota C., Page R., Xu J., Cibelli J., Seidel G.Jr. (2007). Risk assessment of meat and milk from cloned animals. *Nat. Biotechnol.*, 25 (1): 77–83.
- Zeyland J., Wolko L., Bocianowski J., Szalata M., Słomski R., Dzieduszycki A.M., Ryba M., Przystałowska H., Lipiński D. (2013). Complete mitochondrial genome of wild aurochs (*Bos primigenius*) reconstructed from ancient DNA. *Pol. J. Vet. Sci.*, 16 (2): 265–273.
- Zhang L., Wang S.H., Dai Y.P., Li N. (2009). Aberrant gene expression in deceased transgenic cloned calves. *Anim. Reprod. Sci.*, 112 (1–2): 182–189.
- Zhang L., Zhang Y., Han Z., Fang J., Chen H., Guo Z. (2019 a). Transcriptome analyses reveal effects of vitamin C-treated donor cells on cloned bovine embryo development. *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (11): pii: E2628.
- Zhang S., Ma X., Wang Z., Zhang P., Li Z. (2019 b). Production of transgenic cattle expressing lysine-rich polypeptide in milk by somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.*, 28 (3–4): 317–325.

THE POSSIBILITIES OF USING CLONING TECHNIQUES IN ASSISTED REPRODUCTION OF CATTLE, FOOD TECHNOLOGY, BIOPHARMACEUTICAL INDUSTRY, BIOMEDICINE AND RESTORATION OF ENDANGERED OR EXTINCT ANIMAL BREEDS AND SPECIES

Summary

Development of efficient methods used both for the *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) of bovine oocytes and for non-surgical collection and transfer of embryos has contributed not only to an optimization of comprehensive *in vitro* embryo production (IVP) technology, but also to an improvement of other assisted reproductive technologies (ARTs) such as cattle cloning by embryo bisection, embryonic cell nuclear transfer (ECNT) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). The objective of our paper is to demonstrate the progress and achievements in the strategies utilized for embryonic cell cloning and somatic cell cloning in cattle. Moreover, this paper is aimed to present the perspectives of applying cloning techniques not only for the purposes of nutritional biotechnology, agri-food industry, pharmacology and biomedicine but also for the purposes of genetic rescue of endangered or extinct breeds and species of domesticated or free-living artiodactyl mammals (even-toed ungulates) originating from the family *Bovidae*.

Key words: cattle, cloning, embryo bisection, embryonic cell nuclear transfer, somatic cell nuclear transfer, transgenesis, nutritional biotechnology, agri-food industry, pharmacology, biomedicine, endangered/extinct breed, endangered/extinct species