

ГЕНЕЗИС СТРЕСУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

I. О. Супрун

Національний університет біоресурсів та природокористування України, м. Київ

У статті розглянуто проблему стресу сільськогосподарських тварин, механізми його виникнення та прояву. Проаналізовано питання необхідності визначення стресочутливості представників різних видів сільськогосподарських тварин. Зроблено узагальнення переваг та недоліків найбільш вживаних методів визначення стресочутливості сільськогосподарських тварин. Обґрунтовано перспективність використання молекулярно-генетичних досліджень для селекції на стресостійкість у тваринництві.

Ключові слова: СТРЕС, АДАПТАЦІЙНИЙ СИНДРОМ, СТАДІЇ СТРЕСУ, ГОРМОНАЛЬНА РЕГУЛЯЦІЯ, СТРЕС-ІНДУКОВАНІ ГЕНИ, ГОМЕОСТАЗ, СТРЕСОРИ, СТРЕСОЧУТЛИВІСТЬ, СТРЕСОСТІЙКІСТЬ, МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ, ГАЛОТАНОВИЙ МЕТОД, ДНК –ТЕСТУВАННЯ, RYR1, ЗЛОЯКІСНА ГІПЕРТЕРМІЯ

Визначення поняття стресу. Введення у біологічну практику терміну «стрес» і вчення про механізм його виникнення і закономірності розвитку належить канадському ученому-дослідникові Гансу Сельє, що уперше опублікував роботу з цього питання у 1936 р. під назвою «Синдром, що викликається різними ушкоджувальними діями» [25].

Останніми роками поняття і термін «стрес» дуже широко вживаються стосовно випадків, коли організм піддається певній дії, яка примушує включати його захисні механізми.

Клініка стресу включає три стадії, що послідовно змінюються: тривога, резистентність і виснаження. Стресори через нервову і ендокринну системи викликають морфологічні і функціональні зміни в органах і тканинах, посилений синтез та секрецію гормонів адаптації — кортикостероїдів кіркової зони надниркових залоз. Вони впливають на підвищений рівень у внутрішньому середовищі адренкортикотропного гормону (АКТГ). Підвищене утворення і виділення гормонів адаптації посилює резистентність організму на дію стресорів і сприяє подоланню зворотних порушень, які вже сталися у ньому. Стресори зазвичай впливають безпосередньо на деякі органи і тканини, а якщо така дія не дуже інтенсивна, то викликається захисна реакція в частині організму, що піддалася стрессорам. Незначні місцеві ушкодження, переважно або ушкодження окремих м'язів можуть відновлюватися у рамках локального адаптаційного синдрому. Але досить сильне локальне порушення і комплексна дія, що викликає реакцію в усій системі — це вже загальний адаптаційний синдром (ЗАС). Слід зазначити, що, вірогідність виникнення загального синдрому стресу тим вища, чим менш специфічним є той чи інший стресор і чим менше його вплив відносно певної ділянки організму. Неспецифічність стимулу і обумовлює його дію одночасно на багато органів збільшенням тривожних сигналів, що поступають у мозок для ухвалення рішення.

У мобілізації джерел енергії для відновлення нормальної реакції дуже важлива роль відводиться центральній нервовій системі (ЦНС). У відповідь на значення тривожної реакції органи чуття повідомляють у ЦНС про силу ушкоджувальних чинників. За допомогою специфічних відчуттів (слух, нюх, дотик) мозок отримує інформацію і включає захисні системи: соматомоторну, вісцеро-моторну і ендокринну. Зміна м'язового тону і різна рухова реакція, що забезпечує захист від несприятливих дій, відносяться до соматомоторних рефлексів. Вісцеромоторна реакція характеризується активізацією симпатичної нервової системи і блукаючого нерва, що призводить до зміни тону гладкої мускулатури, підвищення кров'яного тиску і прискорення серцевих скорочень. З мозкової речовини надниркових залоз вивільняються норадреналін і адреналін. Останній мобілізує запаси

глюкози з печінки шляхом розщеплювання глікогену, що міститься в ній, а з жирової тканини він вивільняє вільні жирні кислоти, — джерело енергії для міокарду. Глюкоза передусім потрібна для роботи ЦНС і поперечносмугатих м'язів.

Зв'язок гомеостазу та схильності до стресу. Відомо, що основною умовою існування живого організму є його здатність забезпечувати постійність, стабільність внутрішнього середовища — гомеостаз. Оскільки нормальна клітинна функція залежить від сталості позаклітинної рідини, то не дивно, що у багатоклітинних організмах для її підтримання розвинулася велика кількість регуляторних механізмів. Для того щоб описати «різноманітні фізіологічні процеси, що підпорядковані відновленню нормального стану, як тільки його було порушено», використовується термін «гомеостаз» [7].

Кожна пред'явлена організму вимога якоюсь мірою своєрідна або специфічна. На морозі ми тремтимо, щоб виробити більше тепла, при цьому кровоносні судини шкіри, особливо обличчя, звужуються, через що шкіра стає блідою, зменшуючи втрату тепла з поверхні тіла. Влітку, на сонці, навпаки, ми пітніємо і за рахунок випаровування води з поверхні шкіри охолоджуємося. Кожні ліки чи гормони також мають свою специфічну дію. Наприклад, сечогінні препарати збільшують виділення сечі, а гормон адреналін прискорює пульс і підвищує артеріальний тиск. Проте, незалежно від того, якого характеру зміни в організмі вони викликають, усі вищезгадані фактори мають дещо спільне. Вони пред'являють організму вимоги до перебудови. Ця вимога неспецифічна, вона полягає у пристосуванні або адаптації до труднощів, що виникли, якими б вони не були. Іншими словами, окрім специфічного ефекту, усі фактори впливу викликають також і неспецифічну вимогу здійснити пристосувальні функції і у такий спосіб відновити нормальний стан. Неспецифічні вимоги, що пред'являються організмові в будь-який спосіб, і є суттю стресу. Тобто стрес викликається стресором [8], під якими розуміють перш за все подразники, що загрожують гомеостазу — біль, голод, гіпоксію, антигенна агресію та величезну кількість інших надзвичайних факторів.

Прийнято розрізняти три групи стресорів: середовищні (фізичні, хімічні, біологічні); психоемоційні та соціальні.

Генетичні аспекти стресочутливості. Характер відповіді організму на різні фактори включає неспецифічні реакції, що виникають під дією будь-яких несприятливих умов та специфічні реакції, що залежать від особливостей впливу. Найважливішою неспецифічною реакцією клітин на дію стресорів є синтез особливих білків. Ряд подібних білків, пов'язаних із стресом, були ідентифіковані в 80–90-і роки. Встановлено гени, що кодують білки і показано, що стрес індукуює експресію цілого ряду генів. Це дозволяє зробити висновок, які саме гени відповідають за стійкість. Так, досліджено, що у рослин стресові білки синтезуються у відповідь на різні фактори: анаеробіоз, підвищені та знижені температури, обезводнення, високі концентрації солі, дію важких металів і т. д. Нині виявлено, що при кожному з цих стресів синтезуються як загальні, так і спеціальні, для кожного з них, білки. Стресові білки різноманітні і утворюють групи високомолекулярних і низькомолекулярних білків. Білки з однаковою молекулярною масою представлені різними поліпептидами. Це обумовлено тим, що кожену групу білків кодує не один ген, а сімейство близьких генів. Після завершення синтезу білку можуть відбуватися різні модифікації, наприклад, зворотне фосфорилування. Захисна роль стресових білків в рослині підтверджується фактами загибелі клітини при введенні інгібіторів синтезу білка у період дії стресора. З іншого боку, зміни у структурі гена, які пошкоджують синтез білків, призводять до втрати стійкості клітин. У результаті зміни дії чинника або кількох чинників відбувається зміна життя клітини на стресову програму. Це здійснюється одночасно на багатьох рівнях регуляції. Гальмується експресія генів, активність яких характерна для життя клітини у нормальних умовах, і активуються гени стресової відповіді. Активування генів стресу відбувається завдяки рецепції сигналу і відповідного сигнального ланцюга. Абіотичні стрес-фактори (надлишок солей, підвищена температура та ін.) очевидно, активують рецептори в плазматичній мембрані. Там починається сигнальний ланцюг, який через різні інтермедіати, такі як протеїнкінази, фосфатази приводить до утворення фактора транскрипції. Ці фактори у

ядрі активують гени шляхом зв'язування із специфічними промоторами. Послідовність реакцій наступна: стресс–сигнал–рецептор–сигнальний ланцюг–транскрипційний фактор в ядрі–промотор стрес-індукованого гена мРНК–білок–захисна роль в організмі. Нині досліджені промотори різних стрес-індукованих генів, і при цьому знайдено цілий ряд регуляторних послідовностей для різних стресорів. Припускають, що є послідовності, які активують декілька елементів. У результаті змін на рівні транскрипції в клітинах рослин через 5 хвилин від початку стресу з'являються мРНК, що кодують стресові білки. Відбуваються зміни і в білоксинтезуючому апараті. Розпадаються полісоми, що синтезують нормальні білки і формуються полісоми, що синтезують стресові білки. Спостерігається послаблення, а потім і припинення синтезу звичайних білків в клітині, і перемикання апарату білкового синтезу на синтез стресових білків. Показано, що вже через 15 хвилин після початку дії стрес-фактора (теплого) в клітинах виявляються стресові білки. Їхній синтез поступово наростає, досягаючи максимуму, а потім слабшає. Після закінчення дії синтез стресових білків припиняється і поновлюється синтез білків, характерних для клітини у нормальних умовах. При цьому при нормальній температурі мРНК стресових білків швидко руйнуються, тоді як самі білки можуть зберігатися істотно довше, забезпечуючи підвищення стійкості клітин до нагрівання.

Дію різних стресових чинників на організм тварин викликає напруга адаптаційних механізмів, що призводить до зниження неспецифічної резистентності організму, а також до пригнічення функцій, пов'язаних з відтворювальною і продуктивною здатностями. При тривалому стресі в організмі розвиваються функціональні зрушення, що призводять до глибоких дистрофічних порушень, некомпенсаторних змін процесів обміну речовин і, кінцем кінцем, загибелі тварини [6, 17, 20, 21].

Тому в сучасному тваринництві можливість прижиттєвого вияву схильних до стресу тварин є дуже важливим і необхідним заходом як з метою добору на плем'я стресочутливих особин, так і для відокремлення тварин, що знаходяться у стані стресу для спеціальних профілактичних заходів. Проте надійних експрес-методів для розпізнавання тварин на різних стадіях стресу до теперішнього часу практично немає.

Диференціація стресочутливих та стресостійких особин можлива на основі кількох методів діагностики:

- традиційний галотановий метод, за яким враховується лише ригідність м'язів [36];
- метод галотанової анестезії, модифікований в Інституті свинарства, в основу якого покладено об'єктивний показник — тривалість періоду від закінчення подачі наркотичного газу до повернення поросят у нормальний фізіологічний стан (НФС), а саме — відновлення їхньої здатності до координованого руху після наркозу [15, 16];
- галотановий метод, модифікований науково-дослідним інститутом сільського господарства центральних районів нечорноземної зони Росії, згідно з яким враховується тривалість тремору м'язів під час наркозу [5];
- ферментний (луциферазний) метод — визначення рівня активності ферментів сироватки крові КФК та ЛДГ, викликаючи стрес у поросят фізичним навантаженням (біг на відстань 100 м) — до та після нього (через 6 годин) [34];
- молекулярно-генетичний метод діагностики MHS (синдром прогресуючої гіпертермії) — ДНК-тест, принцип якого полягає у виявленні мутації RYR1-гена завдяки ампліфікації ДНК у полімеразній ланцюговій реакції [28].

Визначення стресочутливості з використанням наркотичної речовини галотану.

Наявний метод визначення стрес-чутливості свиней за допомогою реакції тварин на галотан досить трудомісткий. За допомогою медичного апарату для інгаляційного наркозу можна тестувати тварин за схильністю до стресу за реакцією на галотан, починаючи з 6 тижнів. Наркотична речовина галотан (наркотан, флюотан, бромхлор-трифтоетан) застосовується у формі інгаляції. Тварині за допомогою спеціальної маски дають подихати сумішшю галотану і кисню впродовж однієї хвилини при концентрації галотану 65 % або при 5 % газу впродовж двох хвилин, а потім спостерігають за її станом упродовж 4–5 хв.

У стрес-стійких поросят впродовж однієї хвилини відбувається викликана галотаном напруга м'язів. У стрес-чутливих тварин напруга м'язів не триває довго, поросята приймають напружену позу, вигинають спину, витягають кінцівки, на шкірі у них проявляються червоні плями, температура тіла підвищується, частішає частота пульсу і дихання, а деякі тварини можуть, не виходячи з наркотичного стану, загинути.

На основі генеалогічного аналізу поросят, що реагують на галотановий тест злоякісною гіпертермією, генетики побудували класичну модель стрес-чутливості, що базується на уявленні про моногенну алельну детерміацію ознаки стрес-чутливості [1, 2, 11, 13, 14, 18, 19, 24].

За наявності мутантного алеля у гетерозиготному стані (Nn), який свідчить про схильність до стресу, найбільше тварин виявлено при тестуванні методом розробленим Інститутом свинарства НААН — 65,22 %. Тобто, він більшою мірою співпадає з ДНК-тестом і відповідно забезпечує об'єктивне визначення стрессхильності у поросят.

Традиційним галотановим методом визначається найменше стрессхильних тварин з наявним у них алелем у гетерозиготному стані (Nn) — 33,30 %. Неможливо ним виявити і тих, які генетично визнані стресчутливими (nn). Відхилення результатів ДНК-діагностики від фенотипів, встановлених галотановим тестом, пояснюється неповною пенетрантністю рецесивного алеля у гомозиготному стані, суб'єктивністю оцінки реакції тварини на галотан та фізіологічним станом тварин у момент тестування наркотичною сумішшю.

Фізичний стрес (примусовий біг на відстань 100 м) у дослідженнях [3] викликав зростання активності КФК та ЛДГ у тварин різної стрессхильності — на 11,2–40,3 та 46,6–79,7 %, відповідно. Проте за абсолютними показниками активність ферментів сироватки крові тварин з різною реакцією на фторотан після фізичного навантаження відрізнялась неістотно (113,2 та 99,9 %). Менша варіабельність активності ферменту ЛДГ свідчить про можливість використання його як тесту визначення стрессхильності луциферазним методом.

У поросят різної чутливості до наркотичного стресора мало змінюється вміст загального білка і ліпідів у крові, тоді як концентрація кортикостероїдів у ній підвищується при зменшенні кількості еозинофілів у стрессхильних тварин. Фізичне навантаження підвищує активність креатинфосфокінази і лактатдегідрогенази в крові підсвинків.

Модифікований галотановий метод визначення стресчутливості у свиней, котрий включає показник тривалості періоду повернення їх до нормального фізіологічного стану, є найбільш інформативним у діагностиці стрессостійкості та стрессхильності тварин. Рівень ефективності застосування галотанового методу для діагностики стресчутливості залежить від віку свиней: серед 2-місячних поросят стрессхильних виявляється менше, ніж у 45-денних тварин.

ДНК-тест виявляє стресчутливих поросят, у котрих є мутація у положенні 1843 ріанодинрецепторного гена [11, 19].

Ензими, що відіграють стратегічну роль у забезпеченні свиней енергією, знаходяться у мітохондріях і контролюються мітохондріальним геномом, який успадковується лише за материнською лінією. Глікогенове депо забезпечує лише 7 % енергії, що витрачається при стресі. Поряд із значенням ензимів у відновленні енергетичного дефіциту у фазі «тривога-стрес», вони також відіграють тактичну роль в енергетичному балансі свиней [27].

Стресування тварин може бути пов'язане з пороговою чутливістю ряду рецепторів, наприклад, рецептори холоду.

На думку ряду дослідників [1, 3, 12, 16, 19, 20, 22], проблема стрес-чутливості повинна вирішуватися в трьох напрямках: створення спеціальних технологій для стрес-чутливих свиней; використання антистресових і зміцнюючих адрено-кортикоїдну сферу фармакологічних препаратів у «гарячих» точках технології (транспорт, групування і т. д.) та генетико-селекційне вирішення.

Дослідження стресчутливості у свинарстві. Спостереження свого часу за схильністю свиней до стресів якраз і дозволило зробити висновок про те, що ця ознака пов'язана з рецесивними генами, а селекція тварин на підвищену м'ясність туш і зниження товщини шпиків привела до того, що селекціонери до останнього часу не приділяли уваги

відбору стрес-стійких тварин. Це сталося ще і тому, що відсутні точні експрес-методи визначення стійкості тварин до стресів. Проте помічено, що найбільш чутливі до дії несприятливих чинників тварини з вкороченим тулубом, надмірно розвиненою мускулатурою і дуже тонким салом на спині. У таких тварин часто виражено тремтіння кінцівок (в області лопаток), а при забої виявляється блідий колір м'яса.

Поросята великої білої породи та помісі велика біла х дюрки більш стресостійкі, ніж помісі, одержані від схрещування свиноматок великої білої породи з кнурами порід ландрас, полтавської м'ясної, а також червоно-поясної спеціалізованої лінії.

Істотною відмінністю між стресостійкими і стресосхильними кнурами за тривалістю вироблення у них умовних рефлексів для одержання сперми не встановлено.

Стресостійкі кнури і свиноматки переважають стресосхильних за інтенсивністю росту і відтворювальною здатністю при менших затратах на їхнє утримання.

Вивчення питання про спадкову обумовленість чутливості свиней різних порід до стресу свідчить про високу успадковуваність цієї властивості, що в свою чергу вказує на великі селекційні можливості при цілеспрямованому доборі та підборі батьківського стада. Оскільки стресовий синдром успадковується як рецесивна ознака, ефективність спрямованої селекції може бути досить високою. Особливо це важливо мати на увазі зоотехнікам-селекціонерам, які працюють на великих свинофермах і комплексах з промисловою технологією, оскільки в умовах високої концентрації та інтенсивного виробництва вірогідність поширення різних вад значно вища.

Визначення стресочутливості за дослідженням етіології тварин. Визначення стрес-чутливості тварин можна робити на основі спостережень за формуванням у них етіологічних реакцій. Проведення комплексних етіологічних досліджень на широкому спектрі поведінкових показників свиней упродовж доби з наступним співставленням його з продуктивністю тварин дозволяє розділити тварин на три групи.

Незважаючи на високу ефективність транквілізаторів, що попереджають стрес у свиней при формуванні нових технологічних груп, завантаженні на транспорт і транспортуванні, перегонах тварин і т. д., вони діють короткочасно і не попереджають повністю його виникнення, а лише зменшують дію стресорів на організм. Навіть аміназин, що є одним з кращих нейролептичних засобів, не може бути повноцінним захисним засобом при стресах, а в окремих випадках він може бути причиною виникнення виразки шлунку. Тому регуляція стресу і профілактика його негативної дії на організм за допомогою адаптогенних препаратів має певні переваги порівняно з транквілізаторами. Адаптогенні препарати істотно підвищують опірність організму до різних несприятливих дій, незалежно від їх походження. Особливістю цих препаратів є те, що вони не впливають істотно на тварин за нормальних умов перебігу фізіологічних процесів. Захисні властивості адаптогенів позначаються лише при надмірних навантаженнях і захворюваннях організму [22].

Молекулярно-генетичні дослідження гена пов'язаного із стресочутливістю в свиначстві. У результаті молекулярно-генетичних досліджень отримано свідчення про те, що у тварин мутація в гені RYR1 асоціюється із спадковим захворюванням — злоякісною гіпертермією. Тобто у чутливих (RYR1nn) або схильних до стресу (RYR1Nn), у 43 % випадків захворювань йде ускладнення збудником колібактеріозу, що обтяжує перебіг хвороби [4, 11, 18].

Встановлена закономірність негативного впливу мутації в гені RYR1n, що виразилася у зниженні багатоплідності, кількості народжених живих поросят, маси гнізда при народженні, зниженні показників відгодівельної продуктивності. Виявлена тенденція зниження у тварин генотипу RYR1N вмісту еритроцитів в крові, гемоглобіну, лейкоцитів, Ca, β -лізисної та лізоцимної активності, м'ясної продуктивності, а також відтворювальної функції кнурів-плідників, підвищення відсотка мертвонароджених поросят і аварійних опоросів у маток погіршення якості м'яса. Скринінг гена RYR1 різних порід свиней виявив досить високий рівень частот рецесивного алеля RYR1n, який змінювався залежно від породної приналежності, популяції, лінії і статеві-вікової групи тварин [26]. Вказані дослідження виявили наявність досить високого відсотка тварин сприйнятливих до

колібактеріозу і злаякісної гіпертермії. Отримані дані [10], свідчать про негативний вплив мутації в генах ECR, F18, FUT1 і RYR1 на продуктивні якості племінних тварин і життєздатність молодняку, вказують на доцільність проведення маркер-супровідної селекції на збільшення у популяціях тварин генотипу ECRAA і RYR1NN, що дозволить розпочати створення селекційних стад резистентних до колібактеріозу і стресу [10]. Інтенсифікація виробництва і збільшення концентрації поголів'я, а також інтенсивна селекція великої рогатої худоби на м'ясність спричинили збільшення числа тварин, схильних до стресу, що привело до зниження продуктивності у частини тварин та істотного погіршення якості м'яса (появі вад PSE і DFD) [37].

Негативні наслідки стресу — злаякісна гіпертермія в конярстві як наслідок дії мутантного гена. Спортивне конярство також зіткнулося з проблемою стресу. Для участі у змаганнях високого рангу коней інтенсивно тренують, крім того, участь у них сама по собі є сильним стресом для тварин і в практиці нерідкі випадки загибелі коней не лише під час змагань, але й при транспортуванні та ветеринарному огляді. При тривалому транспортуванні у тварин розвивається виснаження адаптивно-компенсаторних можливостей організму, спостерігається послаблення і пригніблення основних функцій, втрата тренуваності. При цьому різко зростає загроза розвитку патологічних станів, захворювань, найяскравіше вираженою з яких є транспортна лихоманка коней, що нерідко закінчується загибеллю тварин [11, 12, 32].

Якщо проблемі стресу у свинарстві присвячена велика кількість досліджень, то у конярстві ця проблема практично не вивчена. У першу чергу це вказує на відсутність надійних способів діагностики спадкового захворювання злаякісною гіпертермією, асоційованого із стресочутливістю і такого, що є наслідком мутації в ріанодін-рецепторному гені RYR1. Крім того, висока вартість, тривалий процес дослідження, слабка співпраця селекціонерів, тривала вагітність коней обмежує у багатьох випадках вивчення їх спадкових захворювань. Щоб вивчати спадкові зміни коней, було б ідеальним, ідентифікувати стрес-чутливих особин для дослідження спадковості та скринінгу їхнього потомства. З розвитком молекулярної генетики і ПЛР-ПДРФ аналізу стала можливою ідентифікація мутації в гені RYR1 у різних сільськогосподарських тварин.

Генетична детермінація злаякісної гіпертермії, що асоціюється із стресостійкістю, підтверджена у людини, свиней і собак [30, 33]. Злаякісна гіпертермія (MHS) — спадковий синдром, що проявляється у результаті підвищених навантажень і стресів, як стан гострого гіперметаболізму скелетної мускулатури з підвищеним споживанням кисню, накопиченням лактату і продукуванням великої кількості вуглекислого газу і тепла. Цей синдром обумовлений мутацією в гені ріанодинового рецептора (RYR1), надійним способом ідентифікації якої є метод ПЛР-ПДРФ. Завдяки простоті і надійності метод ПЛР-ПДРФ отримав широке поширення і нині використовується для аналізу алельного поліморфізму генів у різних об'єктів [23, 31]. Наразі діагностика MHS у коней заснована на характерних клінічних проявах при використанні галотанового тесту, або спеціального теста на м'язову ригідність [32]. У біоптатах м'язів визначають порогову концентрацію кофеїну і галотану, що викликає скорочення м'яза та його максимальне скорочення у відповідь на дію вищезгаданих препаратів. Потрібно відмітити, що більшість гістологічних тестів не виявляють порушень при цьому захворюванні [32]. Таким чином, для швидкого і ефективного тестування коней на чутливість до стресу потрібний метод молекулярно-генетичної діагностики злаякісного синдрому (MHS).

У результаті досліджень в республіці Білорусь розроблені тест-системи для вивчення 46-го екзона гена RYR1 коней, оскільки саме у цій ділянці ДНК передбачається наявність точкової мутації [9].

Ця тест-система може бути основою розробки генетичних маркерів стійкості коней до стресу, використання яких у селекції дозволить значно підвищити генетичний потенціал тварин, здійснювати спрямоване розведення бажаних генотипів, виключивши з популяції генетичний тягар вже у ранньому віці, створити резистентні до стресу лінії. Дослідження галотанового локуса дозволяє виявити аналогічні ділянки кДНК гена RYR1 у коней, людини

і деяких ссавців і підібрати на їх основі послідовність 081 специфічних праймерів для ПЛР-аналізу гена RYR1 у тканинах коней. Оптимізований і відпрацьований метод ПДРФ для діагностування точкової мутації за геном RYR1 у коней. Для відпрацювання методу ПЛР-ПДРФ за типуванням алелів гена RYR1 коней, асоційованого зі стресчутливістю, в якості матриці було використано ДНК генома (гДНК), виділену з тканини вух. Для усунення неспецифічної ампліфікації оптимізували умови при різних концентраціях MgCl₂, при різних температурах відпалу і різних буферних системах. Оптимальними концентраціями MgCl₂ для праймера на 46 екзон є 2–2,5 мМ. Оптимальна t відпалу — 60 °C [9].

Точкова мутація у позиції 7360, яка замінює цитозин на гуанін (C→G), призводить до зміни амінокислотної послідовності, а саме заміни аргініну на гліцин (R2454G) [9, 12].

Мутація гена рианодинового рецептора (RYR1) викликає порушення функції рианодин-чутливого кальцієвого каналу саркоплазматичного ретикулула скелетних м'язів, що призводить до надмірного викиду кальцію в міоплазму і гіперметаболічного стану, що характеризується підвищенням температури, ацидозу, гіперкапнії і у багатьох випадках до смерті [29, 30, 31, 33, 35]. Білоруськими генетиками проведено ДНК-тестування за локусом гена RYR1 групи коней Білоруської запряжної та Латвійської верхової порід на стресчутливість у кількості 34 голів. Тестування кобил на носійство мутації в гені RYR1 виявило 2 особини Латвійської верхової, що несе мутантний аллель (генотип RYR1Nn).

Висновки

Використання методу ПЛР-ПДРФ для оцінки поліморфізму гена білка рианодинового рецептора RYR1 у коней для їх тестування на стресочутливість дозволить при підборі батьківських пар унеможливити отримання рецесивних (nn) гомозигот [9].

Перспективи подальших досліджень. Перспективним буде використання молекулярно-генетичних досліджень для селекції на стресостійкість у тваринництві на основі узагальнення переваг та недоліків найбільш вживаних методів визначення стресочутливості сільськогосподарських тварин.

I. Suprun

GENESIS OF AGRICULTURAL ANIMALS STRESS

S u m m a r y

The problem of agricultural animals stress, its origin and mechanisms of expressession is considered in the article. The question of necessity of determination of stress sensitiveness representatives of different types of agricultural animals is analysed. Generalization of advantages and lacks of such methods of determination is shown. Perspective of molecular-genetic researches using for stress resistable agricultural animals selection is reasonable in the artical.

И. А. Супрун

ГЕНЕЗИС СТРЕССА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

А н н о т а ц и я

В статье рассмотрена проблема стресса сельскохозяйственных животных, механизмы его возникновения и проявления. Проанализирован вопрос необходимости определения стрессочувствительности представителей разных видов сельскохозяйственных животных. Сделано обобщение преимуществ и недостатков некоторых методов определения стрессочувствительности животных. Обосновано перспективность использования молекулярно-генетических исследований для селекции на стрессоустойчивость в животноводстве.

1. Балацкий В. Генная диагностика гипертермического синдрома в популяциях свиней разных генотипов / В. Балацкий, Е. Метлицкая, А. Биндюг // Свиноводство. — 2000. — № 6. — С. 8–10.
2. Биндюг О. А. До оцінки методів визначення стрессхильності у свиней / О. А. Биндюг // Вісник Полтавської аграрної академії. — 2002. — № 5–6. — С. 120–121.
3. Биндюг О. А. Фізіологічний стан та продуктивність свиней різного рівня стрессхильності : афтореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю / О. А. Биндюг. — Полтава, 2004. — 23 с.
4. Болезни свиней : Эшерихиоз (колибактериоз) поросят / Сайт ведущего производителя ветеринарных препаратов.
5. Волощик П. Д. Интенсификация репродукторного свиноводства / П. Д. Волощик, В. Г. Пушкарский. — М. : Россельхозиздат, 1982. — 182 с.
6. Голиков А. Н. Адаптация сельскохозяйственных животных / А. Н. Голиков. — М. : Агропромиздат, 1985. — 216 с.
7. Горизонтов П. Д. Гомеостаз / П. Д. Горизонтов. — М. : Медицина. — С. 538–570.
8. Гуськов А. Н. Влияние стресс-фактора на состояние сельскохозяйственных животных / А. Н. Гуськов. — М. : Агропромиздат, 1994. — С. 38–41.
9. Емельянова В. П. Использование маркерного гена RYR1 для диагностики стрессустойчивости у лошадей : материалы Международной науч. конф, 3–6 декабря 2008 г. «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты» / В. П. Емельянова, Л. А. Баранова. — Минск : Центр БГУ, 2008. — С. 176–181.
10. Епишко О. А. Полигенный характер детерминации репродуктивных признаков свиноматок и воспроизводительных хряков-производителей Берорусской мясной породы : материалы Международной науч. конф, 3–6 декабря 2008 г. «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты» / О. А. Епишко, Т. И. Епишко, Д. Е. Мостовой. — Минск : Центр БГУ, 2008. — С. 181–183.
11. Епишко Т. И. Мониторинг генетической устойчивости пород свиней разводимых в Беларуси к наследственным заболеваниям : материалы Международной науч. конф, 3–6 декабря 2008 г. «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты» / Т. И. Епишко, М. А. Ковальчук, Н. В. Журина, О. А. Епишко. — Минск : Центр БГУ, 2008. — С. 183–185.
12. Журина Н. В. Разработка ДНК-технологии повышения устойчивости сельскохозяйственных животных к стрессу : материалы Международной науч. конф, 3–6 декабря 2008 г. «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты» / Н. В. Журина, Т. И. Епишко, Л. А. Баранова. — Минск : Центр БГУ, 2008. — С. 185–187.
13. Зиновьева Н. А. ПЦР-ПДРФ анализ гена рецептора свиней : Школа практики «Современные достижения и проблемы в биотехнологии сельскохозяйственных животных» / Н. А. Зиновьева, Е. Н. Гладырь, Е. Н. Коновалова. — ВИЖ, 2002. — С. 51–52.
14. Коновалова Е. Н. Изучение связи полиморфизма гена рецептора E/Coli F18/FUT с локусами количественных признаков свиней : Научные труды ВИЖА «Прошлое, настоящее и будущее зоотехнической науки» / Е. Н. Коновалова и др. — 2004. — Вып. 62, Т. 2. — С. 81–85. — (Серия «Свиноводство»).
15. Коваленко В. Ф. Динаміка вмісту макроелементів у тканинах свиноматки і плодів у взаємозв'язку зі стадіями відтворювального циклу : міжвід. темат. наук. зб. «Свинарство» / В. Ф. Коваленко, О. О. Титаренко. — 2009. — Вип. 57. — С. 72–79.
16. Коваленко В. Ф. Метод визначення схильності свиней до стресів / В. Ф. Коваленко, О. А. Биндюг // Наук.-інф. бюллетень завершених наукових розробок. — 2002. — № 3. — С. 19.
17. Ковальчикова М. Адаптация и стресс при содержании и разведении сельскохозяйственных животных / М. Ковальчикова. — М. : Колос, 1986. — 270 с.
18. Коновалова Е. Н. Изучение полиморфизма гена E/Coli F18/FUT 1 и его влияние на хозяйственно-полезные признаки свиней : материалы международной конференции

«Развитие ключевых направлений сельскохозяйственной науки в Казахстане» (Селекция, биотехнология, генетические ресурсы) / Е. Н. Коновалова и др. — Алматы : ТОО «Издательство Басту», 2004. — С. 81–86.

19. Лаломова Е. В. Полиморфизм свиней по генам эстрогенового, пролактинового и рианодинового рецепторов : автореферат дисс. канд. с.-х. наук / Е. В. Ломова. — Лесные Поляны, 2007. — 23 с.

20. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс, и профилактика / Ф. З. Меерсон. — М. : Наука, 1981. — 82 с.

21. Никитченко И. Н. Адаптация, стресс и продуктивность сельскохозяйственных животных / И. Н. Никитченко, С. И. Плященко, А. С. Зеньков. — Мн. : Урожай, 1988. — 107 с.

22. Преображенский Д. И. Стресс и патология размножения сельскохозяйственных животных. — М. : Наука, 1993. — С. 22–25

23. Рубцов А. М. Роль саркоплазматического ретикулума в регуляции сократительной активности мышц / А. М. Рубцов // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6. — С. 17–24.

24. Савельева Т. А. Методические указания по диагностике и профилактике репродуктивно-рецепитарного синдрома свиней (PPCC) / Т. А. Савельева. — Минск, 2007. — 27 с.

25. Селье Ганс. Стресс без дистресса / Ганс Селье. — М. : Прогресс, 1982. — 62 с.

26. Шейко И. П. Генетические методы интенсификации селекционного процесса в свиноводстве / И. П. Шейко, Т. И. Епишко. — Жодино, 2006. — 197 с.

27. Хайдерлиц С. Х. Функциональная и биохимическая адаптация / С. Х. Хайдерлиц. — Кишинев : Штиинца, 1984. — 269 с.

28. Brening B. Molecular cloning of the porcine «halothane» gene / B. Brening, G. Brem // Arch. Tierzucht. — 1992. — B. 35. — P. 129–135.

29. Fujii J. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia / J. Fujii, K. Ostu, F. Zorzato et al. // Science. — 1991. — V. 235. — P. 448–451.

30. Harriman D. G. Malignant hyperthermia myopathy — a critical review / D. G. Harriman // Br. J. Anaesth. — 1988. — V. 60. — P. 309–316.

31. Hill B. D. A bovine stress syndrome associated with exercise induced hyperthermia / B. D. Hill, A. C. Mc Manus, N. N. Brown et al. // Aust. vet. J. — 2008. — V. 78, N 1. — P. 38–43.

32. Gronek P. Newpoint mutation in exon 17 of horse / P. Gronek, A. Plawski, K. Nuc, A. Nowicka et al. // Gzech j. an sci. — 2000. — V. 45. — P. 445–448.

33. Hopkins P. M. Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis / P. M. Hopkins // Br. J. Anaesth. — 2000. — V. 85. — P. 118–128.

34. Lengerken G. Einfluss der Ausruh-zeit von der Schlachtung auf die Fleischbeschaffenheit / G. Lengerken, H. J. Stein, H. Pfeiffer // Mh. Veter. Med. — 1977. — Bd. 32, H. 10. — S. 376–380.

35. McCarthy T. V. Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19 q 12-13.2 / T. V. McCarthy, J. M. Healy, J. J. Heffron // Nature. — 1990. — V. 343. — P. 562–564.

36. Mitschell G. Porcine stress syndrome / G. Mitschell, J. J. Heffron // Adv. Food. Res. — 1982. — № 28. — P. 167.

37. Salak-Johnson J. L. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle / J. L. Salak-Johnson, J. J. McGlone // Animal science. — 2007. — V. 85. — P. 81–88.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії інтелектуальної власності та маркетингу інновацій, кандидат біологічних наук, с. н. с. Грабовська О. С.