

7. Anderson, S., M. H. De Bruijn, A. R. Coulson. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology*. 156:683–717.
8. Cymbron, T. R. T. Loftus, M. I. Malheiro, D. G. Bradley. 1999. Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences*. 266:597–603.
9. Ginja, C., C. T. Penedo, L. Melucci, 2010. Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y-chromosome polymorphisms. *Animal Genetics*. 41, 2:128–141.
10. Kantanen, J., C. J. Edwards, D. G. Bradley. 2009. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity*. 103:404–415.
11. Loftus, R. T., D. E. MacHugh, D. G. Bradley. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:2757–2761.
12. Lai, S. J., Y. P. Liu, Y. X. Liu. 2006. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38:146–154.
13. Mannen H., M. Kohno, Y. Nagata. 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32:539–544.
14. Miretti M. M., H. A. Pereira, M. A. Jr. Poli. 2002. African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): evidence of a new taurine mitochondrial lineage. *Journal of Heredity*. 93:323–330.
15. Troy C. S., D. E. MacHugh, J. F. Bailey. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*. 410:1088–1091.



УДК 636.1:575.17

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ ЛОШАДЕЙ ПО ГЕНАМ SCID И HYPР

¹Е. С. ЧЕБУРАНОВА, ¹О. А. ЕПИШКО, ²Т. И. КУЗЬМИНА

¹Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет» (Гродно, Республика Беларусь)

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных (Санкт-Петербург, Российская Федерация)
escheburanova@inbox.ru

Тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) – ауточомное рецессивное заболевание, проявляющиеся у людей, мышей, лошадей и собак. Данное заболевание тестировались с помощью ПЦР-анализа. В итоге носителей данной аномалии не выявлено. Гиперкалиемический периодический паралич (HYPР) – ауточомное доминантное заболевание, которое у лошадей проявляется в возрасте 2 лет, когда животное начинает усилено тренироваться. Для тестирования данного заболевания использовался метод ПЦР- ПДРФ-анализа. В результате исследования среди тестируемых животных носителей не обнаружено.

Ключевые слова: ген SCID, ген HYPР, арабская порода, верховая порода, генетическая диагностика, мутация, иммунодефицит

© Е. С. ЧЕБУРАНОВА, О. А. ЕПИШКО, Т. И. КУЗЬМИНА, 2017

Розведення і генетика тварин. 2017. Вип. 53

GENETIC STRUCTURE OF HORSES POPULATION FOR THE GENES OF SCID AND HYPP

¹E. S. Cheburanova, ¹O. A. Epishko, ²T. I. Kuzmina

¹Education institution «Grodno state agrarian university» (Grodno, Republic of Belarus)

²All-russian research institute of genetics and breeding farm animals (St. Petersburg, Russian Federation)

Severe combined immunodeficiency (SCID) is an autosomal recessive disease that occurs in humans, mice, horses and dogs. This disease was tested by PCR analysis. As a result, carriers of this anomaly were not detected. Hyperkaliemic periodic paralysis (HYPP) is an autosomal dominant disease that occurs in horses at the age of 2, when the animal begins, is strengthened to exercise. To test this disease, the PCR-RFLP method was used. As a result of the study, carriers were not found among the test animals.

Keywords: gene SCID, gene HYPP, the arabian breed, thoroughbred horse, genetic diagnosis, mutation, immunodeficiency

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЇ КОНЕЙ ЗА ГЕНАМИ SCID І HYPP

¹К. С. Чебуранова, ¹О. О. Епишко, ²Т. І. Кузьміна

¹Установа освіти «Гродненський державний аграрний університет» (Гродно, Республіка Беларусь)

²ФГБНУ Всеросійський науково-дослідний інститут генетики та розведення сільськогосподарських тварин (Санкт-Петербург, Російська Федерація)

Важкий комбінований імунodefіцит (SCID) – аутосомно рецесивне захворювання, які проявляються у людей, мишей, коней і собак. Дане захворювання тестувалися за допомогою ПЛР-аналізу. В результаті носіїв даної аномалії не виявлено. Гіперкаліємічна періодичний параліч (HYPP) - аутосомно домінантне захворювання, яке у коней проявляється у віці 2 років, коли тварина починає, посилено тренуватися. Для тестування даного захворювання використовувався метод ПЛР ПДРФ-аналізу. В результаті дослідження серед тестованих тварин носіїв не виявлено.

Ключові слова: ген SCID, ген HYPP, арабська порода, верхова порода, генетична діагностика, мутація, імунodefіцит

Вступление. В соответствии с международными стандартами и требованиями по сертификации племенной продукции обязательно проводится генотипирование сельскохозяйственных животных на выявление генетических аномалий. По статистике 1-2% сельскохозяйственных животных рождаются с наследственными аномалиями, которые могут нанести не поправимый урон сельскому хозяйству страны, если не выявлять и не выбраковывать таких животных.

Применение современных методов для генетической диагностики наследственных заболеваний сельскохозяйственных животных не только при рождении исключать из процесса воспроизводства животных-носителей наследственных аномалий, но также и позволяет сократить финансирование на их содержание и выращивание.

На сегодняшний день у лошадей описано более двухсот наследственных заболеваний и аномалий, основная часть которых в гетерозиготном состоянии фенотипически не проявляется. Одним из основных наследственных заболеваний является тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), которое проявляется у жеребят 2 месяца отроду, погибающих от лобой инфекции, так как нарушается защитная функция лейкоцитов[1]. Данное заболевание было описано не только у лошадей, но также и у собак, мышей и человека. Впервые SCID был описан у арабских лошадей Австралии [2]. В 1980 г. Perryman с соавторами показали, что комбинированный иммунодефицит у арабских и поместных лошадей имеет аутосомно-рецессивный тип наследования [3].

С 1997 по 2011 в лаборатории VetGen (США) было протестировано больше 10000 животных на наличие наследственной аномалии SCID, в результате данных исследований было

выявлено, что 15,73% являются носителями данного заболевания, а 0,30% - больными животными [4].

НУРР (Hyperkalemic periodic paralysis) – гиперкалиемический периодический паралич – наследственная аномалия, которая встречается у различных видов позвоночных животных, например у мышей, лошадей, а также человека. Первые сведения о данном заболевании у лошадей были описаны группой ученых в 1985-1986 годах. У лошадей проявляются периодические спазмы скелетных мышц, слабость, могут парализоваться дыхательные мышцы, в результате чего, не исключается смерть животного, без оказания своевременной помощи [5]. Так как данное заболевание имеет аутосомно-доминантное наследование и проявляется только верховых пород лошадей, то животные, которые являются доминантными гомозиготами или гетерозиготами по данному признаку должны отслеживаться, что бы ни допустить распространение болезни.

Группа американских исследователей Eric P. Hoffman, Sharon J. Spier et al. [6] разработали метод для выявления мутации НУРР среди американских верховых пород. Среди группы животных в количестве 227 лошадей, было выявлено 2 больных животных, а также 49 носителей данной мутации.

Цель нашей работы – выявление животных-носителей наследственной аномалии SCID и НУРР популяции лошадей, разводимых на племенных коневфермах Республики Беларусь.

Материалы и методика исследований. Нами было протестировано 50 лошадей различных пород, содержащихся на различных племенных коневфермах Белоруссии. ДНК выделяли из буккального эпителия перхлоратным методом с двойной очисткой (по методу Зиновьевой). Для диагностики мутаций у исследуемых животных был выбран метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) и ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью спектрофлуориметра Implen. Амплификацию проводили, используя термоциклер C1000 Touch (BioRad, USA). Для амплификации наследственной аномалии SCID мы использовали следующую ПЦР-программу: начальная денатурация – 95°C в течение 10 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 60°C – 30 секунд, 72°C – 1 минута; терминальная элонгация – 72°C в течение 5 минут.

Реакционная смесь для амплификации SCID общим объемом 10 мкл, включала: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 125 μM dNTP, 0,5 μM каждого праймера, 0,35 units Taq-полимеразы, 50-100 нг ДНК.

Для амплификации мутации SCID использовали праймеры [7]:

SCID – for AAGTTGGTCTTGTCATTGAGC;

SCID – rev TTTGTGATGATGTCATCCCAG;

Размер амплифицированных фрагментов:

163 пн – свободный от мутации;

158 пн – носитель мутации SCID;

Разделение ПЦР-продуктов проводили с помощью горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле при напряжении 110V в течение 35-45 минут. Визуализация геля проводилась с помощью гелъдокументирующей системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Для определения молекулярной массы амплифицированных фрагментов использовали ДНК-маркер 50 bp производства ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Реакционная смесь, необходимая для диагностики периодического паралича лошадей (НУРР), общим объемом 20 мкл, включала следующие компоненты: 67 mM Tris-HCl (pH 8,8); 17 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween-20; 0,2 mM dNTP; 10 units Taq-полимеразы; 50-100 нг ДНК; 0,2 mM MgCl₂ и по 0,3 μM каждого праймера.

Для амплификации изучаемого участка гена НУРР, использовали праймеры, предложенные авторами V. Riojas-Valdes, D.E. Zamora-Avila et al.[8]:

НУРР – for – GGGGAGTGTGTGCTCAAGATG;

НУРР – rev – AATGGACAGGATGACAACCAC;

Размер амплифицированного участка составляет – 92 пн.

Аmplификацию проводили, по следующему режиму: начальная денатурация проводилась при температуре в 94⁰С в течение 4 минут; 40 циклов: из них денатурация длится 30 секунд при 94⁰С, отжиг – 30 секунд при 63⁰С, элонгация – 30 секунд при 72⁰С; финальная элонгация проводится в течение 10 минут при температуре в 72⁰С.

Аmplифицированные продукты реакции разделяли с помощью горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле в течение 35-45 минут при напряжении в 110V. Визуализация полученных фрагментов проводилась с использованием гелъдокументирующие системы GelDoc XR+ (BioRad, США), предварительно обработанных бромистым этидием. Для корректной интерпритации полученных длин амплифицированных фрагментов использовали ДНК-маркер молекулярного веса (производство ОДО «Праймтех», Беларусь).

Рестрикция ПЦР-продуктов проводилась с помощью эндонуклеазной рестриктазы TaqI при температуре 65⁰С в течение одного часа. Рестрицированные фрагменты разделяли в 3% агарозном геле в течение 40-50 минут, используя напряжение 130V и ДНК-маркер молекулярного веса.

Генотипы:

N/N (свободный от мутации) – 92 пн.

N/N (гетерозигота, носитель мутации по гену NYPP) – 92, 64, 28 пн.

N/N (животное больное по гену NYPP) – 64, 28 пн.

Результаты исследований. По данным зарубежных авторов 8-9% лошадей арабской породы, а также пород с примесью арабской крови, носителей наследственной аномалии SCID, были выявлены с помощью ДНК-диагностики [9]. Во многих странах тестирование на генетические заболевания лошадей носят не обязательный, а рекомендательный характер. В 2005г. ученые из Словении проводили тестирование 128 лошадей арабской породы, среди которых не выявлено носителей наследственного заболевания SCID [10]. В 2008 в Марокко проводились исследования на наличие тяжелого комбинированного иммунодефицита среди 353 лошадей арабской породы, среди тестируемых животных было выявлено 21 животное, которые являются носителями данного заболевания [11].

На первом этапе исследований нами было протестировано 50 животных верховой и арабской пород, в числе которых лошади с примесью арабской крови. Среди протестированных 50-ти животных не было выявлено носителей наследственной аномалии SCID. В исследованиях использовался метод ПЦР-анализа, базирующийся на применении специфических олигонуклеотидов с помощью которых происходит амплификация необходимого фрагмента гена 163 – у здоровых особей и 158 – у носителей мутации, позволяющий выявить наследственное заболевание SCID.

С 1989 по 1991 гг. в США было протестировано более за 1 000 животных на наличие наследственного заболевания NYPP. В результате данных исследований не было выявлено ни одного больного животного, однако 4% исследуемых лошадей являются носителями данной наследственной аномалии. В Калифорнийском университете с 1992 по 1996 гг. продолжили проводить исследования, которые показали увеличение числа носителей (36%), в то же время были выявлено больные животные, которые составили 1% от общего количества тестируемых животных. Исходя из этих данных, можно сделать вывод, что на территории США в начале 90-х годов не шла целенаправленная селекция на исключения из воспроизводства лошадей, имеющих какие-либо наследственные аномалии, которые могут привести к мгновенной смерти животного.

В странах СНГ гиперкалиемический периодический паралич, также не является обязательным для тестирования и носит рекомендательный характер. На Украине были проведены исследования по выявлению у лошадей украинской верховой породы наследственного заболевания NYPP, в результате которых среди исследуемой группы животных не было выявлено ни одного носителя или больного. В 2007 г. в Румынии был секвенирован ген NYPP для установления животных-носителей в румынской популяции лошадей, в результате чего не было обнаружено ни одного носителя, ни одного больного животного [12].

В 2013-2014 гг. на территории Мексики, ученые проводили генотипирование 51 животного чистокровный верховый породы лошадей на наличие наследственного заболевания НУРР. В результате данных исследований было установлено, что 84,3% испытуемых являются здоровыми, 13,7% - оказались носителями гена НУРР и 2% - больными животными. Благодаря данным исследованиям больные лошади, а также носители исключались из процесса воспроизводства, а также не использовались на соревнованиях.

Вторым этапом исследований явилось тестирование животных на наличие наследственного заболевания НУРР. В исследованиях использовался метод ПЦР-ПДРФ анализа, базирующийся на применении отличительных праймеров благодаря которым происходит амплификация необходимого фрагмента гена, позволяющего выявить наследственное заболевание НУРР. Амплифицированные фрагменты подвергались действию рестрицирующих ферментов, с помощью которых возможно определить генотип исследуемого животного. Нами протестировано 50 животных верховой и арабской породы, а также лошадей с примесью арабской крови, среди которых не обнаружено носителей наследственной аномалии.

Выводы.

В итоге проведенных исследований среди 50-ти протестированных животных носителей наследственного заболевания SCID не выявлено. Предположительно, что в Республики Беларусь носителей тяжелого комбинированного иммунодефицита не выявлено, так как племенные хозяйства по разведению лошадей не использовали для осеменения биологический материал арабских и поместных пород лошадей. При последующем ввозе лошадей арабской породы, а также пород, у которых имеется примесь арабской крови, необходимо проводить ДНК-тестирование на наличие тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID).

По результат проведенных исследований по выявлению наследственного заболевания гиперкалиемического периодического паралича (НУРР) в популяции лошадей не обнаружено носителей, а также больных животных. Предположительно, что на территории республики носителей данного заболевания не было, о чем свидетельствуют параллельные исследования, проводимые в других странах Европы, где также не выявлено ни одного носителя или больного животного. Это говорит о том, что данное заболевание было во время локализовано, а также не покидало территорию американского континента.

Анализ полученных в результате проведенных исследований данных говорит о том, что белорусская популяция лошадей различных пород может использоваться не только для воспроизводства, но также и для международных соревнований, так как среди протестированных животных не выявлено ни одного больного или носителя основных наследственных заболеваний, встречающихся у спортивных пород лошадей.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Shin, E. K. Evaluation of a test for identification of Arabian horses heterozygous for the severe combined immunodeficiency trait / E. K. Shin, L. E. Perryman, K. Meek // Amer. Vet. Med. Assoc. – 1997. – Vol. 211. – № 10. – P. 1268-1270.
2. McGuire, T. C. Hypogammaglobulinemia and Thymic Hypoplasia in Horse: A Primary Combined Immunodeficiency Disorder / McGuire T. C., Poppie, M. J. // Infect. Immun. – Vol. 8. – P. 272-277.
3. Perryman, L. E. Combined immunodeficiency of Arabian horses: confirmation of autosomal recessive mode of inheritance / L. E. Perryman, R. L. Torbeck // Journal of the American Medical Association. – 1980. – Vol. 176. – P. 1250-1251.
4. Куриленко, Ю. Ф. ПЦР-диагностика жесткого комбинированного иммунодефицита (SCID) у лошадей / Ю. Ф. Куриленко, С. А. Костенко, А. В. Дубин, М. И. Жежер // The Animal Biology. – 2013. – Vol. 15. – № 3. – P. 49–53.
5. Cox, J. H. An episodic Weakness in Four Horses Associated with Intermittent Hyperkalemia Serum and the Similarity of the Disease to Hyperkalemic Periodic Paresis in Man / J. H. Cox // Proceedings of the American Association of Equine Practitioners. – 1985. – Vol. 21. – P. 383–391.

6. Hoffman, E.P. Methods of detecting periodic paralysis in horse / E.P. Hoffman, S.J. Spier, J.A. Rudolph et al. / US Patent number 5356777 (1994). – P. 7.
7. Swinburne, J. Estimation of The prevalence of severe combined immunodeficiency disease in UK Arab horses as determined by a DNA-based test – *The Veterinary Record*. – July 3, 1999. – P.22–23.
8. Riojas-Valdes, V. Allele frequency of hyperkalemic periodic paralysis (HYPP) in quarter horses from Mexico / V. Riojas-Valdes, D. Zamora-Avila, J. J. Hernandez-Escareno, A. Marroquin-Cardona, F. J. Picon-Rubio, J. P. Villarreal-Villarreal, R. Avalos-Ramirez // *African Journal of Biotechnology*. – 2014. – Vol. 13 (12). – P. 1323-1326.
9. Bercono, D. Frequency of the SCID gene among Arabian horses in the USA / D. Bercono, E. Bailey // *Animal Genetics*. – 1998. – Vol. 29. – P. 41–42.
10. Zavrtnic, J. Genetic monitoring for several combined immunodeficiency carries in horses in Slovenia / J. Zavrtnic, M. Mesaric, G. Majdic // *Slovenian veterinary research*. – 2005. – № 42 – P. 37–41.
11. Piro, M. Frequency of the severe combined immunodeficiency disease gene among horses in Morocco / M. Piro, A. Benjouad, N. S. Tligui et al. // *Equine Veterinary Journal*. – 2008. – Vol. 40. – P. 590–591.
12. Georgescu, S. E. Diagnostication of hyperkalemic periodic paralysis in horses / S. E. Georgescu, Manea Maria Adina et al. // *Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*. – 2007. – Vol. 40(1). – P. 96–99.

REFERENCES

1. Shin, E. K. L. E. Perryman, and K. Meek. 1997. Evaluation of a test for identification of Arabian horses heterozygous for the severe combined immunodeficiency trait. *Amer. Vet. Med. Assoc.* 211, 10:1268-1270.
2. McGuire T. C., and Poppie, M. J. Hypogammaglobulinemia and Thymic Hypoplasia in Horse: A Primary Combined Immunodeficiency Disorder. *Infect. Immun.* 8:272-277.
3. Perryman, L. E., and R. L. Torbeck. 1980. Combined immunodeficiency of Arabian horses: confirmation of autosomal recessive mode of inheritance. *Journal of the American Medical Association*. 176:1250-1251.
4. Kurilenko, Yu. F., S. A. Kostenko, A. V. Dubin, M. I. Zhezher. 2013. PTsR-diagnostika zhestkogo kombinirovannogo immunodefitsita (SCID) u loshadey – PCR diagnosis of severe combined immunodeficiency (SCID) in horses *The Animal Biology*. 15, 3:49–53.
5. Cox, J. H. 1985. An episodic Weakness in Four Horses Associated with Intermittent Hyperkalemia Serum and the Similarity of the Disease to Hyperkalemic Periodic Paresis in Man. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. 21:383–391.
6. Hoffman, E.P., S.J. Spier, and J.A. Rudolph. 1994. Methods of detecting periodic paralysis in horse. *US Patent number 5356777*, 7.
7. Swinburne, J. 1999. Estimation of The prevalence of severe combined immunodeficiency disease in UK Arab horses as determined by a DNA-based test. *The Veterinary Record*. 22–23.
8. Riojas-Valdes, V., D. Zamora-Avila, J. J. Hernandez-Escareno, A. Marroquin-Cardona, F. J. Picon-Rubio, J. P. Villarreal-Villarreal, R. Avalos-Ramirez. 2014. *Allele frequency of hyperkalemic periodic paralysis (HYPP) in quarter horses from Mexico*. 13 (12):1323-1326.
9. Bercono, D., and E. Bailey Frequency of the SCID gene among Arabian horses in the USA. 1998. *Animal Genetics*. 29:41–42.
10. Zavrtnic, J., M. Mesaric, G. Majdic. 2005. Genetic monitoring for several combined immunodeficiency carries in horses in Slovenia. *Slovenian veterinary research*. 42:37–41.
11. Piro, M., A. Benjouad, and N. S. Tligui. 2008. Frequency of the severe combined immunodeficiency disease gene among horses in Morocco. *Equine Veterinary Journal*. 40:590–591.
12. Georgescu, S. E., and Manea Maria Adina. 2007. Diagnostication of hyperkalemic periodic paralysis in horses. *Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*. 40(1):96–99.