

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

РИК ТЕТЯНА МИКОЛАЇВНА

УДК 575.113:577.213.3:636.4(043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ
ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ
СВИНЕЙ РІЗНИХ ПОРІД

Спеціальність 091 - Біологія

Галузь знань 09 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Т.М. Рик

Науковий керівник: Валентина ДЗІЦЮК,
доктор сільськогосподарських наук, професор

с. Чубинське, Київська область – 2023

АНОТАЦІЯ

Рик Т.М. Особливості генетичної структури свиней різних порід. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 «Біологія») – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, с. Чубинське, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню генетичних особливостей свиней різних порід української і зарубіжної селекції з метою обґрунтування перспективи їх використання у якості лабораторних тварин для біомедичних цілей.

Експериментальна робота виконана протягом 2016-2022 років у відділі генетики і біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Дослідження здійснені на вибірках свиней порід, які розводяться у господарствах України: миргородська, велика біла, полтавська м'ясна, українська м'ясна, українська степова ряба, ландрас, п'єтрен, в'єтнамська вислобрюха, в'єтнамський мейшан та дика свиня.

Для молекулярно-генетичного аналізу від піддослідних тварин відібрані зразки біоматеріалу (венозна кров, щетина з волосяними цибулинами). Виділення геномної ДНК зі зразків здійснювали сольовим методом та з використанням йонообмінної смоли «Chelex-100». Генотипування проводили методом алель-специфічної (ПЛР-SSP) мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів, комплементарних ділянкам локусів генів RYR1, PERV-C, PERV-A. В якості внутрішнього контролю ПЛР використовували фрагмент локусу альфа-актину свині свійської (α -Actin). Ампліфікацію проводили в термоциклері «Терцик-2» («ДНК-технологія», РФ). Електрофоретичне розділення ампліфікованих ділянок ДНК у форматі

мультиплекс ПЛР проводилось у 2%-му агарозному гелі у тріс-боратному електрофорезному буфері. Імуногенетичні дослідження здійснені на вибірках свиней миргородської породи (ДП «ДГ імені Декабристів Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН») (n=80) та української м'ясної породи (ДП «ДГ «Гонтарівка» Інституту тваринництва НААН») (n=48). Імуногенетичні дослідження здійснені у лабораторії генетики Інституту тваринництва НААН України та залученням банку імунодіагностикумів, які відповідають міжнародним вимогам. Групи крові свиней визначали за загальноприйнятими методиками з постановкою реакції аглютинації і гемолізу з використанням реагентів груп крові за 9 основними системами груп крові A, B, D, E, F, G, H, K, L, а також непрямой проби Кумбса і гемолітичного тесту. Антигени еритроцитів свиней A, B, D, E, F, G, H, K, L визначали за допомогою специфічних імунних сироваток із залученням банку імунодіагностикумів, які відповідають міжнародним вимогам. Статистична обробка результатів генетичних досліджень проводилась методами математичної статистики за використанням комп'ютерної програми GenAlex 6.0.

В результаті досліджень розроблено алгоритм системи лабораторного оцінювання придатності свиней певних порід для потреб біомедицини, складовими якого є: визначення їх стійкості тварин до стресових факторів (тестування за системою ріанодинового рецептора – RYR-1), наявності/відсутності в їх геномі елементів ретровірусів, насамперед PERV типів C і A, оцінки імунологічного статусу з визначенням тварин бажаного генотипу та пошук особин з високим ступенем гомозиготності за цільовими генотипами для мінімізації фенотипової гетерогенності в медичних експериментах.

Вивчено генетичну структуру окремих популяцій свиней за локусом гена RYR1, відповідального за стрес-чутливість. Проведено ДНК-тестування 102 свиней 8 порід: миргородської, великої білої, полтавської м'ясної, української м'ясної, української степової рябої, ландрас, п'єтрєн, в'єтнамської

вислобрюхої. В результаті молекулярного дослідження свиней різних порід виявлений поліморфізм гена ріанодинового рецептора *RYR1*. Кількість тварин, що є носіями рецесивного алеля гена *RYR1ⁿ*, який відповідає за чутливість свиней до стресових факторів, коливається у значних межах: від повної його відсутності у представників в'єтнамської вислобрюхої, української м'ясної та великої білої порід до 100% кількості тварин гомозиготного *RYR1ⁿⁿ* генотипу в породі п'єтрен. Гетерозиготний генотип *RYR1^{Nn}* виявлений у свиней порід полтавська м'ясна (10%), миргородська (15%), ландрас і українська степова ряба (50%). У всіх досліджених свиней порід велика біла, в'єтнамська вислобрюха і українська м'ясна виявлено гомозиготний генотип *RYR1^{NN}*, який свідчить про відсутність у них стрес-синдрому.

Отже, отримані результати дослідження за геном ріанодинового рецептора *RYR1* свідчать, що бажаними для розведення з метою використання у біомедичних цілях є свині порід великої білої, в'єтнамської вислобрюхої та української м'ясної. Розведення свиней породи п'єтрен та будь-яких поєднань з цією породою унеможлиблює використання таких тварин для біомедичних експериментальних робіт.

Розроблена діагностична система скринінгу ендогенних ретровірусів свиней підтипу С (PERV-C) і підтипу А (PERV-A) за допомогою мультиплексної ПЛР-SSP для виявлення особин із зниженим ризиком біологічної небезпеки при їх застосуванні для біомедичних цілей. Проведена лабораторна оптимізація методики виділення ДНК, визначено оптимальні параметри реакційної суміші і режиму ампліфікації для забезпечення специфічного синтезу цільових фрагментів ПЛР і встановлено чутливість та специфічність розробленої тест-системи PERV-C – α -Actin. Оптимізація техніки генотипування відпрацьована на свинях порід в'єтнамський мейшан та велика біла.

Проведено аналіз розповсюдження підтипу С ретровірусу *PERV* у свиней з використанням власної методики визначення генетичного матеріалу

ретровірусу свиней. Найменшою частотою носіїв геномів ретровірусів PERV-C характеризуються свині досліджених груп української м'ясної і миргородської порід та породи п'єтрен. 50-відсотковий рівень розповсюдження цього підтипу ретровірусу виявили у групі свиней порід ландрас і велика біла, 75-відсотковий – у свиней породи полтавська м'ясна і 100-відсотковий – у в'єтнамської вислобрюхої. Повністю вільними від ретровірусу *PERV-C* є дикі свині.

Отримані результати досліджень свідчать про відсутність ендогенного ретровірусу *PERV-C* у тварин окремих порід, що створює сприятливі передумови для їхнього використання для біомедичних цілей. Такими є породи українська м'ясна, миргородська та п'єтрен.

Аналіз наявності геному ретровірусів *PERV* підтипу А у свиней досліджуваних порід також виявив різну частоту. Найбільшою часткою тварин із ретровірусом *PERV-A* характеризується полтавська м'ясна, п'єтрен та українська м'ясна породи свиней із 95%, 80% та 73% відповідно. У всіх досліджених тварин в'єтнамської вислобрюхої породи встановлено наявність ретровірусу *PERV* підтипу А.

Наряду з цим, тварини вільні від обох підтипів ретровірусу PERV, виявлені у досліджених породах як української, так і зарубіжної селекції. Найбільша частка вільних від геномів обох вірусів тварин ідентифікована у дослідженій групі диких свиней (86%), у порід ландрас (35%) і українська степова ряба, велика біла (30%) і 23% – миргородська. Стовідсоткова наявність ретровірусів *PERV* обох підтипів встановлена у групі в'єтнамської вислобрюхої, дещо менша (75%) – полтавської м'ясної.

Розглядається гіпотеза щодо збільшення в процесі доместикації свиней, в геномі яких присутній ретровірус *PERV*. Інтеграція останнього стала причиною мутації в генах, відповідальних за жировідкладання, що призвело до збільшення осаленості туш і могло бути підхопленим селекцією в процесі створення порід. Однак, очевидного зв'язку між показниками осаленості туш і присутністю в геномі особин PERV не встановлено.

Імуногенетичними дослідженнями виявлено 24 особини (30%) миргородської та 13 особин (27%) української м'ясної породи із наявністю генотипів $A^{-/-}$ та $E^{bdgkmp/bdgkmp}$, що визначають придатність тварин до ксенотрансплантації. За розподілом алелів за В, Е, F, К, L системами груп крові у свиней української м'ясної та миргородської порід встановлені відмінності ($p < 0,05$).

Отже, в результаті досліджень встановлено, що найперспективнішими тваринами, які придатні для біомедичних цілей є досліджена група свиней української м'ясної породи, у яких виявлено найбільшу кількість особин, вільних від ретровірусів *PERV-C* і *PERV-A* (82%), стресостійких тварин – 100% та найбільша кількість тварин з наявністю генотипів $A^{-/-}$ та $E^{bdgkmp/bdgkmp}$, що відповідають системи груп крові АВО людини. Перспективною також для потреб біомедицини за імуногенетичним статусом та із достатньо високим відсотком тварин (75%), вільних від ретровірусу *PERV-C* і на 23% вільними від обох підтипів С і А ретровірусу *PERV* може вважатися порода свиней – миргородська.

Ключові слова: породи свиней, ДНК-типування, ген ріанодинового рецептора RYR1, ендогенні ретровіруси *PERV* типів А і С, імуногенетичний профіль.

ABSTRACT

Ryk T.M. – Peculiarities of the genetic structure of pigs of different breeds. – Qualificative research paper as a manuscript. The thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 – Biology (09 Biology) – Institute of Animal Breeding and Genetics named after M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, village Chubynske, 2023.

The dissertation highlights the research of the use of pigs of different breeds of Ukrainian and foreign selection as initial forms in the creation of specialized lines and breeds of laboratory animals intended for biomedical purposes, in particular for xenotransplantation.

The entire scope of the research was carried out on samples of pigs of breeds bred in farms of Ukraine: pigs of the Myrgorod breed (M), the Poltava meat breed (PM), Large White (LW), the Ukrainian meat breed (UM), pigs of the Ukrainian spotted steppe (USS), the Landras breed (L), the Pietren breed (P), the Vietnamese pot-bellied breed (V), the Vietnamese Meishan breed (VM), Wild Pigs (WP).

Samples of biomaterial (venous blood, bristles with hair follicles) were selected from experimental animals for molecular genetic analysis. Isolation of genomic DNA from samples was performed by salt method and using ion exchange resin “Chelex-100”. Genotyping was performed by allele-specific (PCR-SSP) multiplex polymerase chain reaction using primers complementary to the loci of RYR1, PERV-S, PERV-A gene loci. A fragment of the pig’s alpha-actin locus (α -Actin) was used as an internal PCR control. Amplification was performed in a thermocycler “Tertsyk -2” (“DNA technology”, RF). Electrophoretic separation of amplified DNA plots in multiplex PCR format was performed in 2% agarose gel in tris-borate electrophoresis buffer.

Immunogenetic studies were performed on samples of pigs of Myrhorod breed (SE EF “Decabrist” of the Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production of NAAS) (n = 80) and Ukrainian meat breed (SE “EF Gontarivka” of the Institute of Animal Science of NAAS) (n = 48). Pig blood groups were determined by

conventional methods with agglutination and haemolysis reactions using blood group reagents on 9 main blood groups A, B, D, E, F, G, H, K, L, as well as indirect Coombs test and haemolytic test. Pig erythrocyte antigens A, B, D, E, F, G, H, K, L were determined using specific immune sera with the involvement of a bank of immunodiagnostics that meet international requirements. Statistical processing of genetic research results was performed using mathematical statistics using the computer program GenAlex 6.0.

As a result of the research, the algorithm of the system of laboratory assessment of suitability of pigs of certain breeds for biomedical needs was developed, the components of which are: determination of resistance of animals to stress factors (testing by ryanodine receptor system - RYR-1), the presence of the elements of porcine endogenous retroviruses, primarily PERV-C and PERV-A in their genome, assessment of immunological status with determination of animals of the desired genotype and search for animals with a high degree of homozygosity for target genotypes to minimize phenotypic heterogeneity in medical experiments.

The genetic structure of individual pig populations by the locus of the RYR1 gene, responsible for stress sensitivity was studied. DNA testing of 102 pigs of 8 breeds was carried out: the Myrgorod breed (M), Large White (LW), the Poltava meat breed (PM), the Ukrainian meat breed (UM), the Ukrainian spotted steppe (USS), the Landras breed (L), the Pietren breed (P), the Vietnamese pot-bellied breed (V). A molecular study of pigs of different breeds a polymorphism of the ryanodine receptor gene (RYR1) was revealed.

The number of animals carrying the recessive allele of the RYR1ⁿ gene, which is responsible for the sensitivity of pigs to stress factors, varied considerably: from its complete absence in pigs of the Vietnamese pot-bellied breed, the Ukrainian meat and Large White breeds to 100% of animals homozygous RYR1ⁿⁿ genotype in pigs of the Pietren breed. Heterozygous genotype RYR1^{Nn} was found in pigs of the Poltava meat breed (10%), Myrhorod breed (15%), Landras and Ukrainian spotted steppe breeds (50%). Homozygous RYR1^{NN} genotype was detected in all tested pigs

of the Large White, Vietnamese pot-bellied and Ukrainian meat breeds and indicated the absence of stress syndrome in these pigs.

Thus, the results of a study by the RYR1 ryanodine receptor gene (RYR1) indicate that pigs of the Large White, Vietnamese pot-bellied and Ukrainian meat breeds are desirable for breeding for biomedical purposes. Breeding of pigs of the Pietren breed and any combinations with this breed makes it impossible to use such animals for biomedical experimental work.

A diagnostic system for screening porcine endogenous retroviruses of subtype C (PERV-C) and subtype A (PERV-A) using multiplex PCR-SSP was developed to detect animals with the reduced risk of biological hazard when used for xenotransplantation. Laboratory optimization of the DNA isolation technique was performed, the optimal parameters of the reaction mixture and amplification regime were determined to ensure specific synthesis of target PCR fragments and the sensitivity and specificity of the developed PERV-C test system - α -Actin were established. Optimization of genotyping technique was performed on pigs of the Vietnamese Meishan and Large White breeds.

The frequency of the spread of the porcine endogenous retrovirus (PERV) of subtype C in pigs was analyzed using the own method of retrovirus detection in pigs. The lowest frequency of carriers of PERV-C genomes was characterized by subpopulations of pigs of the Ukrainian meat and Myrhorod and Pietren breeds. The spread of this retrovirus subtype was 50 percent in pigs of the Landras and Large White breeds, 75 percent in pigs of the Poltava meat breed, and 100 percent in pigs of the Vietnamese pot-bellied breed. Wild pigs were completely free of PERV-C retrovirus.

The obtained research results indicate the absence of the porcine endogenous retrovirus (PERV) of subtype C in animals of certain breeds, which creates favourable conditions for their use in xenotransplantation. These are the Ukrainian meat, Myrhorod and Pietren breeds.

The analysis of the presence of the genome of porcine endogenous retrovirus (PERV) of subtype A in pigs of the tested breeds also revealed different frequencies.

Pigs of the Poltava meat, Pietren and Ukrainian breeds have the largest share of animals with PERV-A with 95%, 80% and 73%, respectively. The presence of the porcine endogenous retrovirus (PERV) of subtype A was found in all tested pigs of the Vietnamese pot-bellied breed.

In addition, the animals are free from both subtypes of the porcine endogenous retrovirus (PERV), found in the tested breeds of both the Ukrainian and foreign selection. The largest share of animals free from the genomes of both viruses was identified in the group of Wild pigs (86%), in pigs of the Landras (35%), the Ukrainian steppe spotted and Large White (30%) and the Myrhorod (23%) breeds. One hundred percent presence of the porcine endogenous retrovirus (PERV) of both subtypes was found in pigs of the Vietnamese pot-bellied breed, slightly less (75%) in pigs of the Poltava meat breed.

The hypothesis of increasing the frequency of pigs, in the genome of which the porcine endogenous retrovirus (PERV) is present, in the process of their domestication has been considered. The integration of the latter caused mutations in the genes responsible for fat deposition, which led to increased salinity of carcasses and could be picked up by selection in the process of creating breeds. However, there is no obvious correlation between the spread of the virus in modern breeds. There is also no correlation between the level of fat deposition of the carcass and the presence of PERV in the genome of pigs.

Immunogenetic studies were performed in the laboratory of genetics of the Institute of Animal Science of NAAS of Ukraine and the involvement of a bank of immunodiagnostics that meet international requirements.

24 pigs (30%) of the Myrhorod and 13 pigs (27%) of the Ukrainian meat breeds with genotypes $A^{-/-}$ and $E^{bdgkmp/bdgkmp}$ have been identified, which determine the suitability of animals for xenotransplantation. Differences have been found by the distribution of alleles by B, E, F, K, L blood groups in pigs of the Ukrainian meat and Myrhorod breeds ($p < 0.05$).

Thus, the largest number of animals free of the retrovirus PERV-C has been found in pigs of the Ukrainian meat breed - 82%. Also, pigs of this breed are one

hundred percent stress-resistant animals (100% with genotype RYR1^{NN}) and according to the immunogenetic status - the presence of genotypes A - / - and Ebdgkmp / bdgkmp, which correspond to the human ABO blood group system, this domestic breed of pigs should be considered as one of the most promising genotypes for xenotransplantation. Pigs of the Myrhorod breed can also be suitable for the needs of xenotransplantation in terms of immunogenetic status and because of a sufficiently high percentage of pigs (75%) of this breed free of PERV-C retrovirus and 23% free of PERV of both subtypes C and A.

Key words: breeds of pigs, DNA typing, ryanodine-receptor gene (RYR1), porcine endogenous retrovirus (PERV) of subtypes A and C, immunogenetic profile.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. **Рик Т.М.**, Метлицька О.І., Нор В.Ю. Розробка методу ідентифікації ендогенного ретровірусу свиней PERV-C. *Розведення і генетика тварин*. 2018. Т. 55. С.167-178. (Здобувач здійснила літературний пошук, брала участь у експерименті та підготовці матеріалів до друку).

2. Метлицька О.І., **Рик Т.М.**, Россоха В.І., Сасенко А.О. Особливості імуногенетичної структури свиней вітчизняних порід, придатних для ксенотрансплантації. *Розведення і генетика тварин*. 2020. Т. 59. С. 105-114. (Здобувач брала участь у експерименті та підготовці матеріалів до друку).

3. **Рик Т.М.** Ендогенні ретровіруси PERV A/C у геномах свиней українських порід та їх зв'язок з рівнем осалюваності туш. *Біологія тварин*. 2021. № 3. С. 26-31. <https://doi.org/10.15407/animbiol23.02.026>

4. **Рик Т.М.** Генотипова структура мікропопуляцій свиней українських порід за локусом ріанодинового рецептора RYR1. *Біологія тварин*. 2022. Т. 24. № 1. С. 40-44. <https://doi.org/10.15407/animbiol24.01.040>

5. **Рик Т.М.** Імуногенетична структура свиней українських порід, придатних для ксенотрансплантації. *Наукові доповіді НУБіП України*, [S.l.], п. 1(95), лют. 2022. ISSN 2223-1609. Доступно за адресою: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/dopovidi2022.01.002/14369>. Дата доступу: 08 січ. 2023. <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2022.01.002>.

6. **Рик Т.М.** Analysis of spread of endogenous retroviruses (PERVs) of subtypes A and C in genomes of pigs of Ukrainian breeds and their correlation with fat deposition in carcasses. *Bulgarian Journal of Animal Husbandry (Zhivotnovadni Nauki)*. 2021, V. 58. No. 6. P. 60-67. [https://animalscience-](https://animalscience-bg.org/page/en/details.php?article_id=703) bg.org/page/en/details.php?article_id=703

Наукові праці апробаційного характеру

7. **Рик Т.М.** *Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи збереження, поліпшення і використання генофонду тварин*: мат. XV Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та аспірантів, с. Чубинське, 19 травня 2017 р.

8. **Рик Т.М., Нор В.Ю.** Генетико-популяційна характеристика свиней різних порід за локусом PERV-C. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини*: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених (м. Львів, 8-9 грудня 2017 р.). *Біологія тварин*. 2017. Т. 19. № 4. С. 142.

9. **Рик Т.М.** Генетичні особливості свиней різних порід за маркерами PERV-C та RYR1. *Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини*: матеріали XVII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених (м. Львів, 6-7 грудня 2018 р.). «*Біологія тварин*». 2018. 20 (4):131.

10. **Рик Т.М., Нор В.Ю.** Скринінг ендемічного ретровірусу свиней підтипу С за допомогою мультиплексної ПЛР-SSP. *Актуальні дослідження з проблем розведення, генетики та біотехнології в тваринництві*: мат. XVI Всеукр. наук. конф. молодих вчен. та асп., присвяч. вшануванню 80-ї річн. від дня народж. акад. НААН Михайла Васильовича Зубця (с. Чубинське. 24 трав. 2018 р.). С. 35–36.

11. **Рик Т.М.** Генетичний моніторинг свиней різних порід за PERV-C та RYR1 для оцінки придатності їх використання у ксенотрансплантації. *Актуальні дослідження з проблем розведення, генетики та біотехнології у тваринництві*: мат. XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених і аспірантів з міжнародною участю, присвяченій 80-й річниці від дня народження академіка УААН В.П. Бурката (с. Чубинське, травень 2019). С. 37.

12. **Рик Т.М.** Лабораторні алгоритми оцінювання придатності свиней для використання у біомедичних дослідженнях. *Актуальні дослідження з проблем розведення, генетики та біотехнології у тваринництві*: мат. XVIII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених і аспірантів з міжнародною участю, присвяченої 95-й річниці від дня народження професора В.Ю. Недави (с. Чубинське, травень 2020). С. 37-38.

13. **Рик Т.М.** Ендогенні ретровіруси *PERV A / C* У геномах свиней українських порід. *Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві*: мат. XV Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених, присвяч. 90-річ. від дня народження д-ра екон. наук, проф., акад. УААН Омеляненко Андрія Оксентійовича (м. Харків, 26–27 серп. 2021 р.). С. 96-99.

14. **Рик Т.М.** Ідентифікація ендогенного ретровірусу свиней *PERV-C*. Сучасна наука: стан та перспектива розвитку: мат. IV Всеукраїнської наук.-практ. конф. Молодих вчених з нагоди Дня працівників сільського господарства (м. Херсон, 17 листопада 2021 р.). С. 206-208.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Досвід і перспективи використання свині свійської (<i>Sus scrofa domestica</i>) у біомедичних експериментах	24
1.2. Стрес-синдром у свиней як наслідок мутації в ріанодин-рецепторному гені RYR1	27
1.3. Ендогенні ретровіруси у свиней	30
1.4. Імунологічні бар'єри у використанні свиней для біомедичних цілей	37
1.5. Імунологічні маркери у комплексі гістосумісності	39
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	44
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	60
3.1. Генотипова структура свиней вітчизняних порід за локусом ріанодинового рецептора RYR1	60
3.2 Ідентифікація едогенних ретровірусів свиней PERV-C та PERV-A	64
3.2.1. Створення діагностичної системи для визначення носіїв ендогенного ретровірусу <i>PERV-C</i>	64
<i>Оптимізація техніки генотипування свиней в мультиплексній ПЛР-SSP системі PERV-C – α- Actin (LAPC)</i>	64

<i>Визначення чутливості та специфічності системи PERV-C – α-Actin</i>	69
3.2.2. Створення діагностичної системи для визначення носіїв ендogenous ретровірусу PERV-A	73
3.3. Розповсюдження ендogenous ретровірусів PERV A / C у геномах свиней різних порід	75
3.3.1 Генотипова структура свиней різних порід за локусом PERV-C	75
3.3.2 Генотипова структура свиней різних порід за локусом PERV-A	78
3.3.3 Ендogenous ретровіруси PERV A / C у геномах свиней та їх зв'язок з рівнем осалюваності туш	80
3.4 Імуногенетична структура свиней різних порід	86
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	94
ВИСНОВКИ	104
ПРОПОЗИЦІЇ	106
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	107
ДОДАТКИ	126

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВБ – велика біла порода свиней;
М – миргородська порода свиней;
ПМ – полтавська м'ясна порода свиней;
УСР – українська степова ряба порода свиней;
В – в'єтнамська вислобрюха порода свиней;
УМ – українська м'ясна порода свиней;
П – порода свиней п'єтрен;
Л – порода свиней ландрас;
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
Мкл - мікролітри;
ПДРФ – поліморфізм довжини рестриктних фрагментів;
п .н. – пари нуклеотидів;
УФ – ультрафіолетове опромінювання;
рН – зворотній логарифм концентрації іонів водню, потенціал водню;
RYR1 – ген ріанодинового рецептора;
МН – (від англ. Malignant hyperthermia) злоякісна гіпертермія;
PSE – порок м'яса: бліде м'яке ексудативне;
PSS – (від англ. porcine stress syndrome) стрес-синдром свині;
QTL – (від англ. quantitative trait loci) локуси кількісних ознак;
SNP – одонуклеотидний поліморфізм;
PERV-C - porcine endogenous retrovirus (ендогенний ретровірус свиней тип С);
PERV-A - porcine endogenous retrovirus (ендогенний ретровірус свиней тип А);
α-Actin - альфа-актин;
Sus scrofa domestica - свиня свійська.

ВСТУП

У результаті багатовікової селекції у світі нині існує більше сотні порід свині свійської (*Sus scrofa domestica*) різного напрямку продуктивності. Основною продукцією свинарства є продукти харчування (високоякісне м'ясо, сало), продукція для промисловості (шкіра, щетина) і медицини (ферментні препарати).

Однак використання свиней не обмежується отриманням від них продуктів харчування і промислової продукції. У багатьох розвинутих країнах свині вже давно привертають увагу в якості лабораторних тварин [1, 2]. Свиня (*Sus scrofa domestica*) анатомічно і фізіологічно схожа із організмом людини [3, 4] і її все частіше використовують у біологічних, медичних і ветеринарних експериментах. Біологічні продукти свині вже багато років задіяні у терапії хвороб людини: інсулін - для лікування діабету і свиний чинник VIII - для лікування гемофілії [5, 6] тощо.

Схожість свині до людини за багатьма ознаками свідчить, що цей вид тварин може бути ідеальним донором органів і тканин у біомедичному використанні [7, 8]. Однак вибір породи свиней для медико-біологічних потреб не є простим, оскільки висуває низку вимог до тварин. Свині мають бути максимально гомозиготними за якомога більшою кількістю генів, володіти високою резистентністю, бути стресостійкими і адаптованими до умов утримання та годівлі в межах віварію, а також бути вільними від ретровірусів, щоб уникнути інфікування реципієнтів. Проблемою також є існування імунологічного бар'єру у сумісності органів свині і людини, що спонукає дослідників до пошуку тварин із імуногенетичною подібністю між антигеном А системи АВО у людини і антигеном Аа системи А у свиней, а також між антигеном е (hr') системи Rh у людини і антигенами Еа и Ес системи Е у свиней [9].

Наразі в Україні не існує жодної породи свиней, яка б використовувалася для біомедичних цілей. Проте через попит біомедичних концернів на модельні біологічні об'єкти актуальною є потреба використання цього виду тварин для дослідження механізмів дії сучасних медичних препаратів, відпрацювання методик проведення хірургічних операцій, а у перспективі і для ксенотрансплантаційних маніпуляцій.

Виходячи з вищенаведеного, обґрунтування перспективи використання свиней для біомедичних потреб і зумовило спрямованість даної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконувались відповідно до програми науково-дослідних робіт Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН «Теоретичні та методологічні основи тривалого збереження на клітинному рівні генетичних ресурсів автохтонних порід сільськогосподарських тварин» (номер держреєстрації 0116U000516), «Дослідження генетичних популяцій аборигенних, локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин України для визначення молекулярно-генетичних маркерів продуктивності та адаптації» (номер держреєстрації 0116U000524).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є визначення імуногенетичних і молекулярних особливостей свиней різних порід для потенційної придатності їх використання у біомедичних дослідженнях.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

- 1) дослідити генотипову структуру окремих мікропопуляцій свиней вітчизняної і зарубіжної селекції за локусом ріанодинового рецептора RYR1;
- 2) розробити, оптимізувати та відпрацювати методику ідентифікації ендогенних ретровірусів PERV A/C свиней в мультиплексній ПЛП-SSP системі PERV-C – α -Actin (LAPC) для оцінки рівня біологічної безпеки потенційного донорського матеріалу;

3) створити тест-систему для визначення типів ендемічних ретровірусів PERV A/C у геномах свиней в технології мультиплекс;

4) дослідити розповсюдження ендемічних ретровірусів PERV підтипів C і A у геномах свиней різних порід української і зарубіжної селекції;

5) провести імуногенетичне дослідження за еритроцитарними системами антигенів (факторів груп крові) у контексті визначення певних генотипів, подібних до груп крові людини.

Об'єкт досліджень – генотипи свиней вітчизняних порід.

Предмет досліджень – особливості молекулярних та імуногенетичних ознак свиней українських і зарубіжних порід.

Методи досліджень: молекулярно-генетичні (екстракція нуклеїнових кислот, метод ПЛР-ПДРФ – поліморфізм довжин рестриктних фрагментів, що включає: ампліфікацію фрагментів ДНК методом сайт-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим рестриктним аналізом), метод горизонтального електрофорезу ДНК в агарозному гелі; імуногенетичний аналіз – визначення антигенів еритроцитів свиней за допомогою специфічних імунних сироваток, *біометричний* – визначення частот алелів і генотипів; *зоотехнічні* – оцінка тварин за продуктивними якостями.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше розроблено алгоритм системи лабораторного оцінювання придатності свиней окремих порід для потреб біомедицини, який складається із визначення стійкості тварин до стресових чинників (тестування за системою ріанодинового рецептора RYR1), наявності у їх геномі елементів ретровірусів, насамперед PERV, оцінки імунологічного статусу з визначенням тварин бажаного генотипу і виявлення особин з високим ступенем гомозиготності за цільовими генотипами для мінімізації фенотипової гетерогенності.

Вперше проведено оптимізацію техніки генотипування свиней у мультиплексній ПЛР-SSR-системі PERV-C- α -Actin (LAPC), суть якої заключається у визначенні оптимальних режимів ампліфікації, зокрема

зменшення концентрації праймерів, коригування температурного режиму, визначення оптимуму компонентного складу реакційної суміші і удосконалення режиму детекції продуктів ПЛР. Встановлено, що для системи PERV-C- α -Actin гранично допустима концентрація ДНК для ПЛР складає 15,2 пг/мкл, а мінімально необхідна кількість копій ПЛР-продукту для візуалізації методом електрофорезу у 2% агарозному гелі – 5×10^3 копій.

Розроблена діагностична система скринінгу ендогенного ретровірусу свиней підтипу C (PERV-C) за допомогою мультиплексної ПЛР-SSP для виявлення особин зі зниженим ризиком біологічної небезпеки при їх застосуванні для біомедичних цілей.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена та відпрацьована методика ідентифікації ендогенного ретровірусу свиней підтипу C, що дає можливість оцінити рівень біологічної безпеки потенційного донорського матеріалу для біомедичного використання.

За результатами молекулярно-генетичного аналізу встановлено, що за маркерами RYR1 та PERV-C свині спеціалізованих м'ясних порід, за виключенням полтавської м'ясної породи, є найпридатнішими для розведення з метою використання у біомедичних цілях. Встановлено, що за параметрами імуногенетичного статусу – наявністю генотипів A-/- та Ebdgkmp/ bdgkmp, які відповідають системі груп крові ABO людини, відсутністю алеля стресочутливості та PERV-C ретровірусу – свині української м'ясної та миргородської порід можуть слугувати потенційними фундаторами спеціалізованої вітчизняної лабораторної лінії свиней для медичних потреб. Натомість свині породи п'єтрен та будь-якого поєднання з цією породою не придатні для використання у біомедичних цілях через гомозиготність генотипу за геном стресочутливості.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем спільно з науковим керівником розроблено загальну схему та вибір напрямку досліджень, визначено мету і завдання, проаналізовано та опрацьовано наукову літературу вітчизняних та зарубіжних учених, освоєно методики досліджень, проведено

увесь обсяг лабораторних досліджень, узагальнено первинні матеріали досліджень, виконано статистичну обробку всіх результатів, на підставі яких сформовано висновки і пропозиції виробництву. Здобувачем підготовлено статті для публікацій. Із матеріалів наукових експериментів та публікацій дисертантка використала за узгодженням із співавторами частину спільно одержаних результатів.

Одержані наукові результати, що виносяться на захист, є особистим досягненням здобувача.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення результатів досліджень було представлено на XV-XVIII міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях молодих учених та аспірантів Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (с. Чубинське, 2017-2020 роки), XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини». (Львів, 8 грудня 2017 р.); XVII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 6-7 грудня 2018 р.); IV Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції «Актуальні питання технології продукції тваринництва» (м. Полтава, 30-31 жовтня 2019 р.); студентській науковій конференції (м. Полтава, 16-17 квітня 2020 року), XV Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених, присвяч. 90-річ. від дня народження д-ра екон. наук, проф., акад. УААН Омеляненка Андрія Оксентійовича (м. Харків, 26–27 серпня 2021 р.); IV Всеукраїнській наук.-практ. конф. Молодих вчених з нагоди Дня працівників сільського господарства «Сучасна наука: стан та перспектива розвитку» (м. Херсон, 17 листопада 2021 р.).

Публікації. За темою дисертаційного дослідження опубліковано 14 наукових праць у наукових збірниках, матеріалах і тезах конференцій. З них 5 статей – у фахових виданнях України, 1 стаття – у зарубіжному науковому виданні, 8 – у збірниках матеріалів вітчизняних та зарубіжних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Матеріали дисертаційного дослідження викладено на 137 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація складається зі змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду наукової літератури, об'єктів та методів досліджень, результатів власних досліджень, їх аналізу та узагальнення, висновків, практичних пропозицій виробництву, списку використаної наукової літератури і додатків. Робота проілюстрована 12 таблицями і 16 рисунками. Перелік цитованої літератури містить 188 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Досвід і перспективи використання свині свійської (*Sus scrofa domestica*) у біомедичних експериментах. Велике значення для вирішення проблем біології і медицини мають експерименти на тваринах, які дають змогу змодельовати необхідний стан і дослідити динаміку тонких метаболічних змін. В якості експериментальних об'єктів вченими використовуються різні тварини: від морських свинок до коней [10].

Свині до медико-біологічних експериментів були залучені ще із часів Гіппократа [11]. Перевага використання свиней як модельних тварин полягає в тому, що вони подібні до людини з точки зору фізіологічно-анатомічних особливостей, метаболізму, фізіології, травлення [12]. Окрім цього, останніми десятиліттями у світі спостерігається зростання інтересу до свині як до моделі для дослідження складних психічних процесів. Дослідники Маркузе і Муром вважали, що «свиня є ідеальним об'єктом для вивчення пристосувальної поведінки» і, використовуючи свиней у фізіологічних дослідках, дослідили і описали їх поведінку. Зокрема, у результаті досліджень, ними була помічена цікава особливість: не дивлячись на підвищену активність та, іноді, нервовість свиней, частота серцевих ударів у них не підвищувалась. Також аргументами на користь використання свиней як моделі у біомедичних дослідженнях були факти, що вони здатні швидко засвоювати класичні умовні задачі за методиками Б.Ф. Скіннера [13].

Однак, не зважаючи на збільшення публікацій з цього питання [14], досвід і знання відносно цього виду в якості модельного біооб'єкту все ще обмежені. Використання свиней для наукових цілей складає приблизно 1% від загальної кількості тварин різних видів [15]. Однак свині мають низку переваг, які роблять їх привабливішими для використання у дослідженнях, які включають екстраполяцію експериментальних результатів на людину.

Свиня подібна до людини за особливостями зубної системи, морфології і фізіології нирок, будови ока, морфології і фізіології шкіри, серцево-судинної і травної систем [16]. Свиня також є ідеальною модельною твариною для імунологічних досліджень. Плацента свині блокує проникнення антитіл з кровотоку матері до плоду, тому новонародженого поросяти немає імунних антитіл. Ця особливість була використана дослідниками для вивчення всмоктування антитіл, а також для дослідження фізіології травлення [17]. Свині використовуються як доклінічні моделі у відкритті і випробуванні ліків Swindle [18].

Успішним є досвід використання свиней для окремих розповсюджених захворювань людини [19]. Отримані дані виявились стимулом для використання свині як моделі в біологічних і медичних дослідженнях з метою профілактики атеросклерозу в людини. Гістологічні дослідження показали, що атеросклеротичні порушення у всіх свиней не однакові, а залежать від тяжкості захворювання і породи свиней [20]. Кілька груп дослідників вивчали фізіологічні наслідки повної чи часткової закупорки різних артерій у свині [21, 22].

Дослідниками 12 країн представлений звіт про проведені дослідження, за результатами яких встановлено високу частоту (до 35%) виникнення виразки шлунку у свиней. Такий симптомокомплекс привернув увагу вчених частково як результат існування зв'язку між частотою захворювання і типом раціону, що, очевидно, є схожим і у людини [23].

З появою технологій рекомбінації ДНК і редагування генів модифікації геному свині стало можливим використання їх як генетичної моделі для вивчення раку, м'язової дистрофії, аутосомного полікістозу нирок, муковісцидозу, гемофілії, хвороби Альцгеймера, цукрового діабету тощо [24, 25, 26].

На людський і свинячий організми однаково діють багато різних біологічних і медичних препаратів, в тому числі і наркотичних, антиалкогольних і радіоактивних речовин. Встановлено, що вуглеводний

обмін у свиней змінювався при введенні у організм етанолу, що було подібним до організму людини. Морфологічна оцінка внутрішніх органів дослідних тварин показала, що через 2-3 роки вживання алкоголю як дорослих тварин, так і їх потомства виявляються патологічні зміни, що характеризуються змінами у мембранах клітин з ураженням мітохондрій та розвитком тотального чи парціального некрозу клітин [27].

Аналог злоякісної гіпотермії, що спостерігається у свиней, очевидно існує і у людини. Дані отримані в експериментах зі стресочутливими свиньми мають велике значення для характеристики і правильного лікування цього синдрому у людини.

Свині – ідеальна модель для вивчення ожиріння у людини. Є повідомлення про спадкові метаболічні порушення у свиней сального напрямку продуктивності [28].

Свиней-гнотобіотиків використовують у експериментальних дослідженнях патогенезу мікроорганізмів, вилучених із дихальних шляхів чи кишківника, а також для вивчення окремих аспектів респіраторних хвороб у людини, приготування стандартних моноспецифічних сироваток, а також для дослідження ефекту зміни кишкової флори [29].

У трансплантаційній медицині свиня використовується як донор ксенотрансплантанта. Зокрема, протягом останніх десятиліть - як експериментальна модель для трансплантації печінки, легенів, серця, підшлункової залози і нирок [30]. Це спонукало кілька дослідницьких груп редагувати геном свині, щоб усунути головні ксеноантигени, які розпізнаються природними антитілами людини [31]. Якщо ці процедури будуть реалізовані, то стає можливим майбутня ксенотрансплантація органів свині людині як основний підхід до ксенотрансплантаційної медицини. Наразі актуальними є дослідження щодо зниження ризику вірусного зоонозу від ендемічного ретровірусу свиней (PERV) [32].

Нині проблема недостатньо широкого використання свиней у біомедичних дослідженнях полягає в тому, що відсутні стандартизовані й перевірені методики, які визначають необхідні параметри [33].

У виборі свиней для біомедичних цілей слід враховувати певні умови, зокрема такі: тварини мають бути здоровими, тварини мають бути вільні від стресу, використання свиней має бути стандартизованим для внутрілабораторної і міжлабораторної відтворюваності.

Нині існують оптимістичні передбачення щодо успішного використання свиней в якості донорів органів для пересадки їх людині, оскільки свиня схожа з людиною анатомічно і фізіологічно. Однак свиня представляє небезпеку геному людини через ризик її ретровірусами. Тому зусилля вчених спрямовані на отримання тварин, вільних від специфічних антигенів і широкий фронт досліджень останніми десятиліттями приніс багато варіантів захисту реципієнтів від патогенів, якими заражені свині, що є основою обладдйливих прогнозів успішності ксенотрансплантації за використання свиней як донорів органів і тканин.

1.2. Стрес-синдром у свиней як наслідок мутації в ріанодин-рецепторному гені RYR1. Основними вимогами до спеціалізованих порід і ліній свиней, призначених для біомедичних цілей, є висока пристосованість до утримання в умовах віварію.

Підвищена чутливість свиней окремих порід до стресів (стресочутливість) стає все гострішою проблемою і у селекційній роботі, оскільки супроводжується значними економічними збитками для господарств [34]. За повідомленнями дослідників, спостерігається різний ступінь прояву стрес-синдрому у тварин різних порід, залежно від напряму їх продуктивності [35].

Стресонестійкі тварини характеризуються високою смертністю тварин під час транспортування, гіперчутливістю до дії негативних факторів

оточуючого середовища, що призводить до зниження рівня відтворювальних ознак, показників росту та розвитку [36].

У свиней за контроль такої важливої господарської ознаки, як чутливість до стресу, проявом якої є стрес-синдром як наслідок мутації в ріанодін-рецепторному гені RYR1 – синдром PSS (Porcine Stress Syndrom) [37]. PSS – це генетично обумовлена аномалія, яка має аутосомно-рецесивний тип успадкування. Причиною її виникнення є точкова мутація в екзоні 17 гена ріанолинового рецептора, який кодує в скелетних м'язах білок кальцієвого каналу [38]. Ця транзиція у позиції 1843 (C → T) призводить до заміни аргініна на цистеїн у позиції 615 ріанодін-рецепторного білку, який знаходиться у саркоплазматичному ретикулумі м'язового волокна, що призводить до порушення основної функції цього білку і в результаті відбувається низка біохімічних змін і розвитку злаякісної гіпертермії [39].

Мутація в гені RYR1 у положенні 1843 обумовлює порушення в регуляції обміну кальцію скелетних м'язів і пов'язана з проявом злаякісної гіперемії й супровідних симптомів, які проявляються в окремих порід свиней, особливо м'ясного напрямку продуктивності.

MacLennan et al. [40] висловили припущення, що ріанодін-рецепторний ген пов'язаний із виникненням злаякісної гіперемії. Пізніше Fujii et al. [41] з'ясували молекулярну основу розвитку цього синдрому – одонуклеотидну заміну в гені рецептора ріанодіна, що контролює синтез білка, діючого як регулятор транспорту кальцію через канали саркоплазматичного ретикулуму скелетних м'язів. Внаслідок мутації в положенні 1843 пари нуклеотидів гену рецептора ріанодіну відбувається зміна цитозинового нуклеотиду на тиміновий. Нуклеотидна заміна в зазначеному положенні змінює сайт впізнавання для ендонуклеази Hha I, і тому генна аномалія може бути ідентифікована в полімеразній ланцюговій реакції з наступним рестриктивним аналізом.

Білок, що кодується геном RYR1, діє як регулятор транспорту кальцію через канали саркоплазматичного ретикулуму скелетних м'язів. Свині, чутливі

до стресу, мають бліде м'яке або темне жорстке, сухе м'ясо, проявляють схильність до синдрому злоякісної гіпертермії (MHS – Malignant Hyperthermic Syndrome), характерними симптомами якої є тахікардія, яскраво виражена гіперемія шкіри, підвищення температури тіла та довготривала ригідність м'язів після галатанового наркозу [42, 43].

Виведення спеціалізованої лінії свиней для медико-біологічних потреб не є простим, оскільки висуває ряд вимог для тварин. Свині повинні бути максимально гомозиготними за якомога відповідними генами, мати високу резистентність, бути стресостійкими і адаптованими до умов утримання та годівлі в межах віварію [44, 45].

Тварин-носіїв мутантного алелю T за локусом *RYR1* не варто розводити для біомедичних цілей, а скринінг таких свиней потрібно здійснювати за допомогою ДНК-типуювання. Популяційні дослідження виявили відсутність алеля g.1843T або дуже низьку його концентрацію у породах сального і комбінованого напрямків продуктивності [46].

Виявлення даної мутації дало змогу розробити молекулярно-генетичний тест, який дозволяє чітко ідентифікувати генотипи свиней за геном *RYR1*: RYR^{NN} – стресостійкі, не носії; RYR^{Nn} – стресостійкі, приховані носії; RYR^{nn} – стресочутливі носії [47].

Rodriguez et al. [48] проводили дослідження, спрямовані на вивчення генетичної структури окремих популяцій свиней, а саме: порід велика біла, білоруська м'ясна, ландрас, дюрок, йоркшир, п'єтрен за локусом гену *RYR1*. Результати дослідження 482 голів кнурів, свиноматок та ремонтного молодняку показали, що стресочутливих тварин-носіїв мутації в гомозиготному рецесивному стані (генотип nn) не було виявлено взагалі, гетерозиготна форма генотипу (Nn) зустрічалася з частотою в середньому 3,79%. Мутантний алель RYR^n у всіх досліджених господарствах зустрічався приблизно з однаковою частотою (0,02-0,03). Найбільшою була кількість прихованих носіїв мутації (Nn-генотип). Серед чистопородних кнурів порід естонська беконна, ландрас, білоруська м'ясна, йоркшир та помісних тварин поліморфізму за *RYR*-геном

не було виявлено. З досліджених порід дюрок, великої білої та п'єстрен 4,4%, 6,7% та 50% тварин, відповідно, були гетерозиготними носіями злаякісної гіпертермії. Такий високий відсоток носіїв мутації серед тварин породи п'єстрен з одного боку може бути пов'язано з недостатністю вибірки, проте такі показники добре узгоджуються з літературними даними [49], згідно яких наявність мутантного алеля у породи п'єстрен становить 31-100%.

У дослідженнях свиней порід п'єстрен, дюрок і великої білої білоруськими вченими [50] виявлено до 50% мутантного алелю у породи п'єстрен, 4,4% у дюрок і 6,7% у великої білої.

Дослідження Lawal et al. [51] показали, що у свиней порід скороспіла м'ясна, крупна біла, ландрас теж виявлений генетичний поліморфізм гена RYR1. Мутантний алель RYR1 в гетерозиготні формі виявлений у 2 - 15 % тварин-носіїв.

1.3. Ендогенні ретровіруси у свиней. Основною перепорою для широкого використання свиней у медико-біологічних експериментах, зокрема і у ксенотрансплантації, залишається ризик зоонозних інфекційних захворювань, що передаються людині від тварин – небезпека передачі людині ендогенних ретровірусів свині (Porcine Endogenous RetroVirus – PERV). PERV є РНК-вмістним ретровірусом, але в його циклі реплікації використовується також ДНК.

Відповідно до класифікації Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV), *PERV* належать до сімейства *Retroviridae*, підродини *Orthoretrovirinae*, роду *Gammaretrovirus* та онковірусів свиней типу С. Вперше їх описали в 1970 році як вірусоподібні частинки. Орієнтовний вік PERV становить приблизно 7,4–8,3 млн років [53, 54]. PERV здатні вбудовуватись в геном клітин в якості провірусів і не можуть бути еліміновані шляхом вирощування свиней у вільних від патогенів умовах [52]. Суттєво знизити ризик передачі інфекції можливо при вирощуванні свиней в спеціальних вільних від патогенів умовах.

Ретровіруси – це сімейство вірусів з одноланцюговими генами РНК (ssRNA), що характеризується наявністю зворотної транскриптази (RT). Цей фермент відіграє центральну роль у циклі реплікації ретровірусів, оскільки транскрибує геномну РНК у дволанцюжкову ДНК (dsDNA), звану провірусом, яка згодом інтегрується в геном клітин-господарів. Виходячи зі складності своїх геномів, ретровіруси можна класифікувати на дві групи: ті, що мають прості геноми (альфа-ретровіруси, бета-ретровіруси, гама-ретровіруси та епсилон-ретровіруси), і ті, що зі складними геномами (лентивіруси, дельтаретровіруси та спумаіруси). Клітини соматичних тканин є основними мішенями ретровірусної інфекції екзогенними ретровірусами, що циркулюють. PERV складають невід’ємну частину геному свиней і присутні в різних пропорціях залежно від породи свиней, типу тканини та підтипу ретровірусу [55, 56, 57].

За попередніми оцінками, геном свині може містити від 6 до 10 придатних до реплікації провірусів, від 30 до 50 повнорозмірних копій PERV і від 100 до 200 локусів, що містять їх часткову послідовність [58]. Це може спричинити розвиток інфекції PERV у реципієнтів ксенотрансплантантів, розповсюдження PERV від інфікованих пацієнтів до медперсоналу і далі на всю популяцію [59].

Існує три підтипи PERV, що відповідають реплікації: PERV-A, -B, -C. PERV-A та -B є політропними, здатними інфікувати свинячі та людські клітини [60] і схожих за послідовностями ДНК генів *gag* (group-specific antigens) і *pol* (polymerase), але таких, що суттєво розрізняються за послідовністю рецептор-зв’язуючого домена гена *env* (envelope), який кодує білок оболонки віруса [61]. PERV-C є екотропним і вражає лише свинячі клітини [62, 63].

Однак PERV-A / -C, як результат рекомбінації підтипів A і C, є більш інфекційним для клітин людини, ніж нерекомбінантний PERV-A [64]. Можливість зараження клітин людини (поки що лише *in vitro*) викликає занепокоєння, особливо в контексті можливого використання клітин свині,

тканин та органів при ксенотрансплантації. Дослідженнями хворих, яких лікували з використанням живих тканин або органів свині, досі не виявили інфекції PERV у людини *in vivo* [65].

Однак не ясно, чи ці дані є результатом реальної відсутності продукції вірусу у клітинах свині чи результатом ефективної інактивації вірусних частинок імунною системою. Тому потенційна небезпека перенесення PERV при ксенотрансплантації зберігається.

У геномі більшості сучасних свиней присутні ретровіруси PERV всіх трьох типів, що обумовлено, очевидно, їх внесенням від порід-засновників. Відомо, що дикий кабан має найменшу кількість копій PERV всіх типів в геномі порівняно із свиньми домашніх порід, в тому числі і великої білої [66].

Перші нуклеотидні послідовності PERV були отримані при дослідженні ліній клітин свині PK15 і МРК [67] та активованих моонуклеарних клітин периферійної крові свиней [68].

Аналіз PERV у порід домашніх свиней показав, що, хоча PERV типів А і В переважають у геномах всіх досліджених порід свиней, все ж часто зустрічаються тварини, у яких відсутні PERV типу С [69].

Встановлено існування відмінностей між особинами з носіями PERV у різних порід домашніх свиней, а також між дикими кабанами і домашніми свиньми [70].

Імунна система людини, очевидно, здатна елімінувати інфекцію PERV за участю, наприклад, білків АРОВЕС або тетерину [71]. Однак невідомо, чи може інфекція PERV призводити до зниження вродженого антивірусного імунітету пацієнтів із ксенотрансплантацією. Обнадійливим є те, що вже розробляються високоефективні технології, які дають змогу втручатись у роботу окремих генів свині [72]. Однак малоймовірно, що ці технології зможуть повністю запобігти експресії вірусної РНК або нейтралізувати функцію вірусних білків. Якщо у пацієнта з ксенотрансплантантом виникне інфекція, яка призведе до розвитку захворювання, одним із методів її лікування буде застосування антивірусної лікувальної терапії.

Таким чином, найперспективнішою є концепція використання свиней, які не мають PERV, тропного до людини. Такі свині мають гарантувати зниження існуючого незначного ризику інфекції PERV у реципієнтів ксенотрансплантантів.

Деякі тварини мають низьку кількість провірусів, низьку експресію на рівні РНК і не містять PERV-C. Відсутність PERV-C запобігає утворенню рекомбінантних варіантів PERV-A/C, які можуть реплікуватися з більшою швидкістю в порівнянні з материнським PERV-A [73]. Тому такі тварини є бажаними кандидатами для використання в ксенотрансплантації.

У той час як деякі дослідження показали ідентичну кількість провірусів у різних органах однієї свині [74], інші продемонстрували відмінності в кількості копій PERV між різними органами однієї тварини [75, 76, 77].

Отримані дані є досить несподіваними. З одного боку, технічні чинники, такі як спосіб виділення ДНК з різних органів, чистота ДНК, чутливість ПЛР і специфічні контамінації, що впливають на метод ПЛР, можуть сприяти різній кількості копій в окремій особини. Крім того, в одному органі можна знайти різні типи клітин, і, що більш важливо, велика кількість клітин крові в органі також може впливати на результат. З іншого боку, ці результати можуть свідчити про те, що PERV все ще активно реплікуються та інтегруються як нові провіруси. У міні-свиней Wapna були зареєстровані відмінності між 1,9 копіями в легенях і 6,3 в щитовидній залозі з використанням праймерів, специфічних для послідовності гена gag [78.]. Це говорить про те, що найменше число 1,9 вказує на кількість вихідних ендогенних послідовностей gag, а в щитовидній залозі кількість послідовностей gag збільшується втричі. Однак опубліковане число 0 для послідовностей PERV-A env у підшлунковій залозі на відміну від 11,2 у щитовидній залозі не можна пояснити без вивчення числа копій у зародковій лінії (ооцитах, спермі). Для вивчення кількості копій у різних органах однієї свині необхідні нові дослідження з використанням високоочищеної ДНК, чутливих методів виявлення. Краплинна цифрова ПЛР (ddPCR™) та секвенування з більшим охопленням будуть методами вибору

для визначення точної кількості копій провірусів PERV, однак остаточному визначенню буде перешкоджати ідентичність кількох послідовностей провірусів [79].

Очевидно, PERV може бути причиною змін фізіологічних функцій організму під час еволюції. Статистичний аналіз частот хромосом-носіїв типів та поєднань типів PERV показує, що мікроеволюційні процеси, пов'язані з частотою носія PERV у популяціях диких та домашніх форм свиней виду *S. scrofa*, мають два основних вектори: різної інтенсивності жировідкладення та негативні зміни розвитку продуктивних ознак [80, 81, 82].

Отож, важливим кроком є вибір відповідних свиней-донорів. Для запобігання спалаху ендогенних ретровірусів це насамперед скринінг на відсутність провірусів PERV-C у геномі свині, оскільки генетичні рекомбіанти між PERV-A та PERV-C демонструють високі титри реплікації [83]. Загалом слід уникати таких типів рекомбінації. Дослідженні тварини повинні демонструвати низьку експресію PERV-A, PERV-B, а також PERV-C або навіть її відсутність, оскільки вплив рекомбіантів PERV-A/C на здоров'я реципієнтів ксенотрансплантації неможливо повністю спрогнозувати. Якщо передбачувані PERV-C-позитивні тварини розглядаються як донори для трансплантації, як у дослідженні Wynyard S. et al. [84], тоді послідовності PERV-C слід оцінити за *gag*, *pol* (*ppt*, *int*, RT), *env* відкритими рамками зчитування та структури LTR. Функціональний PERV-C необхідно відрізняти від нефункціонального провірусу. Створено кілька підходів для контролю якості та характеристики інфекційного потенціалу PERV.

Інші відомі в даний час методи для виявлення та аналізу присутності PERV спрямовані на пряме виявлення (i) провірусу в клітинах, (ii) аналіз експресії вірусної мРНК, (iii) виявлення вірусних білків або (iv) вироблення власне інфекційних вірусів. Методика нуклеїнових кислот, яка вважалася дійсним методом тестування клінічних випробувань, заснована на методах ПЛР та ПЛР у реальному часі. Додатковими альтернативами є гібридизація Southern blot з використанням PERV-специфічних праймерів і зондів, melting

assays для кількісної оцінки кількості копій PERV, а також флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) для хромосомної локалізації. Вимірювання активності вірусної зворотної транскриптази (RT-тест) вказує на продукцію вірусу. Непряме виявлення PERV здійснюється шляхом аналізу імунної відповіді реципієнта на антитіла. Це в основному ґрунтується на ELISA, Western blot-аналізі, де досліджують сироватки реципієнта з очищеним вірусом, рекомбінантним білком або синтетичними пептидами [85, 86].

In vitro неодноразово демонструвалася передача PERV в різних лініях клітин людини. Це означає, що потенційний ризик може існувати, і його не слід ігнорувати. З цієї причини свиней потрібно ретельно відбирати, щоб виключити найменший ризик. У будь-якому разі, створення свиней без експресії функціонального PERV залишається основною метою, враховуючи, що відсутність ретровірусу є найкращою профілактикою [87].

Перші нуклеотидні послідовності PERV були отримані у дослідженні активованих моноклеарних клітин периферійної крові свині [88]. За структурою нуклеотидних послідовностей PERV підрозділяють на три типи – А, В і С. Аналіз ДНК PERV показав, що вони містять всі структурні ознаки здатних до реплікації ретровірусів [89, 90].

Здатність до реплікації відрізняє класичні PERV від інших родин гама- і бета-ретровірусів, які очевидно є дефектними щодо реплікації і тому не мають великого значення для оцінки ризику, що виникає при трансплантації тканин свині. Встановлено, що геном свині має не лише дефектні провіруси, яким слід рекомбінуватись, перш ніж вони набудуть здатності до продукування повноцінних віріонів і повнорозмірних копій PERV [91].

В результаті досліджень домашніх свиней порід велика біла, ландрас і диких кабанів встановлені асоціації ретровірусу PERV-A з локусами еритроцитарних антигенів EAE, EAK, LPB і статтю тварин. У різних типів і порід свиней ці асоціації можуть бути відсутніми. Доведено, що хромосоми-носії PERV-A, PERV-B, PERV-C у домашніх свиней зустрічаються частіше, ніж у диких кабанів [92].

Копії PERV в геномах свиней різних порід відрізняються за нуклеотидним складом, експресією і здатністю кодувати інфекційний вірус. Вважається, що геном свині може містити від 6 до 10 здатних до реплікації провірусів, від 30 до 50 повнорозмірних копій PERV і від 100 до 200 локусів, що містять їх часткову послідовність [93].

Аналіз PERV у порід домашніх свиней показав, що, хоча PERV типів А і В переважають у геномах досліджених різними авторами порід, однак часто зустрічаються тварини, у яких відсутні PERV типу С [94, 95].

За частотою особин з хромосомами-носіями PERV різних класів і їх поєднань існують відмінності між породами домашніх свиней, між дикими кабанами і домашніми свиньми [96].

PERV стали невід'ємною частиною геному виду *Sus scrofa*, очевидно, ще до виникнення роду *Sus*, про що свідчить їх присутність у кількох видів кистевуких свиней і бородавочників [97]. Можливість зараження клітин людини (поки що лише *in vitro*) викликає занепокоєння, особливо в контексті можливого використання свинячих клітин, тканин та органів при ксенотрансплантації. Точні знання про молекулярну структуру та цикл реплікації PERV необхідні для визначення ризику зараження та створення стратегій для виявлення PERV [98, 99].

В даний час ризик передачі PERV вважається низьким, якщо припускати, що за свинями здійснюється адекватний та постійний контроль. Щоб мінімізувати ризик передачі PERV під час ксенотрансплантації людини, слід відбирати свиней-донорів на основі відсутності PERV-С та найнижчої експресії PERV-А та -В. Для скринінгу слід використовувати такі біологічні матеріали, як слина тварин або кров. Однак, якщо кількість копій PERV в органі для ксенотрансплантації відрізняється порівняно з матеріалом, що використовується для скринінгу, слід провести дослідження всієї тварини або її сестер чи братів [100]. Точне знання структури та циклу тиражування PERV є необхідною умовою стратегій планування виявлення PERV [101]. Таке виявлення повинно проводитися на геномному, транскриптомом та

протеомічному рівнях із використанням методів з відповідною чутливістю та специфічністю. Ланцюгова реакція полімерази (ПЛР) із застосуванням праймерів, комплементарних збереженим регіонам генів *gag* та *pol*, дозволяє виявити провіруси PERV в аналізованому біологічному матеріалі. Підтип вірусу (PERV-A, -B або -C) можна визначити за допомогою праймерів, що доповнюють *env* ген. Одночасно можна оцінити потенційний ризик рекомбінації між підтипами (PERV-A / C). Праймери, які доповнюють LTR, можуть служити для ампліфікації всього геному провірусу PERV [102, 103]. RT-PCR, залежно від аналізованого біологічного матеріалу (клітини або супернатант), дозволяє виявити РНК, транскрибовану з провірусних генів, або наявність вірусного геному (у частинках). Визначення активності RT додатково підтверджує наявність вірусу. Поряд зі збільшенням кількості копій РНК PERV, активність RT може служити маркером активного циклу реплікації. Серологія в поєднанні з використанням вестерн-блот, ІФА та методів імунофлюоресценції доповнює діагностику та може підтвердити PERV-інфекцію.

1.4. Імунологічні бар'єри у використанні свиней для біомедичних цілей. Окремою проблемою, що перешкоджає нормальному функціонуванню пересаджених ксеногенних клітин, є відторгнення трансплантата. Відомо, що при пересадці органів від людини до людини (аллотрансплантація) важливу роль у розвитку реакції відторгнення грає сумісність за антигенами еритроцитів: реципієнт і донор повинні мати однакову групу крові. Це положення також є актуальним і при пересадці органів тварин людині. Роботи щодо вивчення сумісності за еритроцитарними антигенами свиней і людини практично відсутні.

Початок розвитку трансплантаційної імунології було покладено дослідниками груп крові. Відкриття еритроцитарних антигенів груп АВО людини, підбір донорів з урахуванням еритроцитарних антигенів дозволили

проводити переливання крові однієї групи, що з позиції сучасної трансплантології, можна розцінювати як пересадки антигенсумісної тканини.

Нині у США, Китаї та у інших країнах інтенсивно ведуться роботи на молекулярно-генетичному рівні щодо подолання гістонесумісності між організмом людини і органами свиней як найпридатніших донорів.

Використання ксенотрансплантації посилює проблему імунологічної відповіді реципієнта на пересадку. Навіть при використанні імуносупресивної терапії трансплантація свинячих органів приматам або людям закінчується гострим відторгненням. До гострого відторгнення призводять природні антитіла – високоспецифічні сахариди анти-Gal, які взаємодіють з α -galactosyl антигенними детермінантами і здатні розпізнавати вуглеводні антигени на ендотелії судин. Крім того, є несумісність в системі комплементу і згортання. У трансплантаті виникає пошкодження ендотелію, відбувається формування тромбоцитарних мас, руйнування ендотеліальних клітин і в результаті - крововилив в тканини і припинення функції [104, 105].

Подолання цієї проблеми можливе за допомогою застосування донорів органів і тканин з мінімальним антигенним набором, що досягається використанням філогенетично більш давніх тканин, з менш вираженим вмістом антигенів, а також методів трансплантації в середовищах, що виключають лімфоцитарний вплив на трансплантат і розвиток реакції відторгнення [106, 107].

Гостру реакцію відторгнення вчені пояснюють наявністю у крові природних антитіл до карбогідратних епітопів, які синтезуються α -1,3-галактозилтрансферазою (α -1,3-GalT), яка контролюється *GGTA1*. *GGTA1* функціонує у більшості тварин, включаючи свиней, але неактивний у людини і мавп [108]. Після пересадки органів свині людині «природні» антитіла зв'язуються із епітопами *GGTA1* на ендотелії трансплантата і активують систему комплементу і призводять активації коагуляційного каскаду і обумовлюють тим самим гостре відторгнення.

Вирішення існуючих проблем ксенотрансплантації стане можливим при створенні трансгенних свиней, коли в ембріон свині вдасться ввести 2-3 антигени гістосумісності людини. При цьому не буде відторгнення тканин (органів) свині організмом людини [109].

1.5. Імунологічні маркери у комплексі гістосумісності. Головний комплекс гістосумісності. Ключовими антигенами, які стимулюють відторгнення ксенотрансплантата є молекули, закодзовані головним комплексом гістосумісності (ГКГС, Major histocompatibility complex – *MHC*). У людини ці антигени називаються HLA (human leukocyte antigens), які виявляються на лімфоцитах периферійної крові. У ГКГС входить два класи генів, продукти яких експресуються на поверхні клітин:

- I клас генів складається із трьох локусів HLA-A, HLA-B, HLA-C, які кодують відповідні HLA-A, HLA-B, HLA-C антигени клітин;
- II клас складається із HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP субрегіонів, які кодують відповідні антигени. Більшість генів HLA поліморфні, експресуються кодомінантно.

Обидва класи HLA відіграють важливу роль в імунній відповіді. Молекули класу HLA I презентують для розпізнавання CD8⁺ Т-лімфоцитам внутріклітинні синтезовані пептидні антигени. І таким чином беруть участь у активації Т-лімфоцитами кіллерами клітинно-опосередкованого цитолізу CD4⁺. Молекули HLA II класу представлені для розпізнавання Т-лімфоцитами хелперам позаклітинні процесовані білки.

Обидва класи ГКГС є важливими у розвитку реакції відторгнення за алогенної пересадки. Вони кодують головні антигени гістосумісності.

Антигени груп крові за системою ABO – це антигени, які визначаються на поверхні еритроцитів і на багатьох тканинах організму. У сироватці крові людини є природні ізогемаглютинини проти еритроцитарних групових антигенів.

Під групою крові розуміють визначені поєднання еритроцитарних антигенів (одного або декількох), які передаються від батьків потомкам у вигляді генетично спільних спадкових комплексів. Еритроцитарні антигени,

які контролюються алелями одного гену, складають конкретну систему груп крові [110]. За кожен систему групи крові відповідає визначений локус у хромосомі. Завдяки цьому генетично-контрольовані алелоформними генами групи крові утворюють генетичні системи. На даний час добре вивчено 15 генетичних систем (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) груп крові свиней, які об'єднують більш ніж 80 еритроцитарних антигенних факторів. Завдяки великому різноманіттю та незмінності в процесі життя вони з успіхом використовуються для контролю достовірності походження, а також для вирішення багатьох інших питань: вивчення генетичних особливостей порід, ліній, встановлення їх подібності та відмінності, відслідкування напряму селекційних процесів в популяціях. Є наукові публікації про зв'язок груп крові свиней з їх кількісними ознаками продуктивності [111]. Так, наприклад, встановлений зв'язок між відгодівельними і м'ясними якостями свиней і антигенами Fa і Ma [112]. Свині з цими антигенами були більш скороспілими, ніж тварини, у яких були відсутні дані антигени. Встановлена кореляція між площею «м'язового вічка» і антигенами Ma і La. Краща оплата корму спостерігалася у свиней з антигенами Ma, Fa, Gb. Проте дещо пізніше, проведені аналогічні дослідження в тій же лабораторії не підтвердили отриманих результатів про кореляцію наведених вище антигенів з відгодівельною і м'ясною продуктивністю свиней.

Таким чином, в цілому результати досліджень вказують на неоднорідність і складність зв'язків груп крові з кількісними ознаками.

Багато дослідників протягом багатьох років вивчали групи крові свиней і їх зв'язок із окремими господарсько-корисними ознаками. Нині добре вивчені 16 генетичних систем груп крові свиней, які об'єднують більше 40 еритроцитарних факторів [113].

Система А є першою генетичною системою груп крові, яка була виявлена у свиней, однак і нині є найменш ясною. Антиген А свиней має певну схожість з антигеном А у людини. У свиней антигени цієї системи фіксовані не лише на еритроцитах, а і на лімфоцитах в різних тканинах.

Система В є диалельною і у свиней представлена лише одним із двох алелів – Va [114].

Система С теж є диалельною, її поліморфізм вивчений дуже мало.

Система D – диалельна, детермінується алелями D^a і D^b , які обумовлюють три генотипи Da/a , Da/b Db/b .

Система E є найскладнішою із усіх вивчених груп крові свиней. Це поліалельна генетична система, яка контролюється 18 спадковими факторами, 8 із яких утворюють в межах системи чотири пари за принципом альтернативності. Оскільки всі алелі складаються із трьох-восьми субодиниць, що складають чотири пари алелів, систему E можна розглядати як контрольовану чотирма тісно зчепленими локусами.

Система F груп крові свиней є триалельною. Є дані про генетичний зв'язок локусу F з локусами, що контролюють епістатичну білу масть і окремі продуктивні ознаки [115].

Система G є прикладом «закритої» системи груп крові свиней, що контролюється двома основними алелями.

Система H представлена великою кількістю алелів. Локус системи H генетично зчеплений з локусами, що контролюють ізоферменти P_{HI} та 6PGD, а також галотанчутливість і локус S, який контролює експресивність антигенів A і O. Локус галотанчутливості зв'язаний із стійкістю свиней до стресів і з якістю м'яса [116].

В системі H групи крові визначаються більш ніж двома алелями. В практичному сенсі важливим є те, що локус системи H генетично зчеплений із локусами, які контролюють ізоферменти P_{HI} та 6-PGD, а також галатаночутливість і локус S, який контролює експресивність антигенів A і O.

Система I є «закритою» системою, яка контролюється двома алелями a_i та Ib , які утворюють три генотипи.

Система J є диалельною системою. Є дані про тісне генетичне зчеплення цих систем з локусом гістосумісності свиней.

Система K є поліалельною і «відкритою» та дещо нагадує систему ABO у людини.

Система L також поліалельна і становить одну із найскладніших та включає в себе шість алелів – Lcgi, Lbdfi, Ladhi, Ladhjr, Ladhjl і Lagim, що контролюють антигени La, b, c, d, f, g, h, i,j, k, l, m.

В селекційній практиці свиней велике значення має не лише контроль достовірності походження, а і підтримка генетичної схожості продовжувачів із родоначальниками ліній. Без імуногенетичного контролю селекція ведеться практично всліпу, в результаті чого цінні генотипи родоначальників можуть губитись уже у 2-3 поколіннях.

У різних порід свиней спостерігається стійкий мономорфізм за системами H, G і F. У диалельних системах B і G зустрічались лише алелі Ba і Gb, а в системі F був відсутній антиген Fa.

Встановлено, що селекція за м'ясними якостями підвищує у популяції концентрацію алельних генів E^{def} , K^b , L і bdfi, в той час як селекція на життєздатність спричинює накопичення алелів E^{deg} [116].

Групи крові є важливим чинником, що визначає успіх трансплантології органів чи їх частин. Однак при ксенотрансплантації цей чинник вивчений недостатньо. Тому дослідження у даному контексті антигенної, імунологічної схожості типів крові донорів і реципієнтів, зокрема груп крові людини і свині є актуальним.

При проведенні біомедичних досліджень низкою науковців [117, 118, 119] встановлено, що інтенсивна реакція відторгнення органів свиней відбувається за їх певного імуногенетичного статусу. Необхідними параметрами трансплантаційного імунітету модельних свиней є відсутність A-алелів системи A груп крові та E^a , E^c -алелів системи E за результатами імуногенетичного маркування.

Висновок за розділом. Отже, наразі в Україні, як і у всьому світі, існує потреба в об'єктах для біомедичних досліджень. Результати досліджень

українській і зарубіжних науковців свідчать про важливість даного питання і необхідності пошуку його детального вивчення.

Наряду з цим, на сучасному етапі розвитку біомедицини, зокрема трансплантології, існує безліч перепон для створення цієї ефективної, прибуткової та доступної громадянам галузі, для подолання яких потрібні ефективні генетичні і біотехнологічні дослідження. Зважаючи на останні відкриття і активні дослідження в генетиці, молекулярній біології та медицині, є підґрунтя для формування реальних умов і для практичного впровадження впровадження методу ксенотрансплантації в Україні.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертаційної роботи проводили впродовж 2016-2020 років у лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця Національної академії аграрних наук України та лабораторії генетики Інституту свинарства і агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України на зразках біоматеріалу від тварин десяти порід свиней в загальній кількості 287 голів. Остання має статус лабораторії генетичного контролю (сертифікована для проведення генетичного аналізу на рівні ДНК свідоцтво про атестацію №021-19 від 31.01.2019 року Міністерство аграрної політики України, додаток 1).

Загальну схему експериментальних досліджень наведено на рис. 2.1.

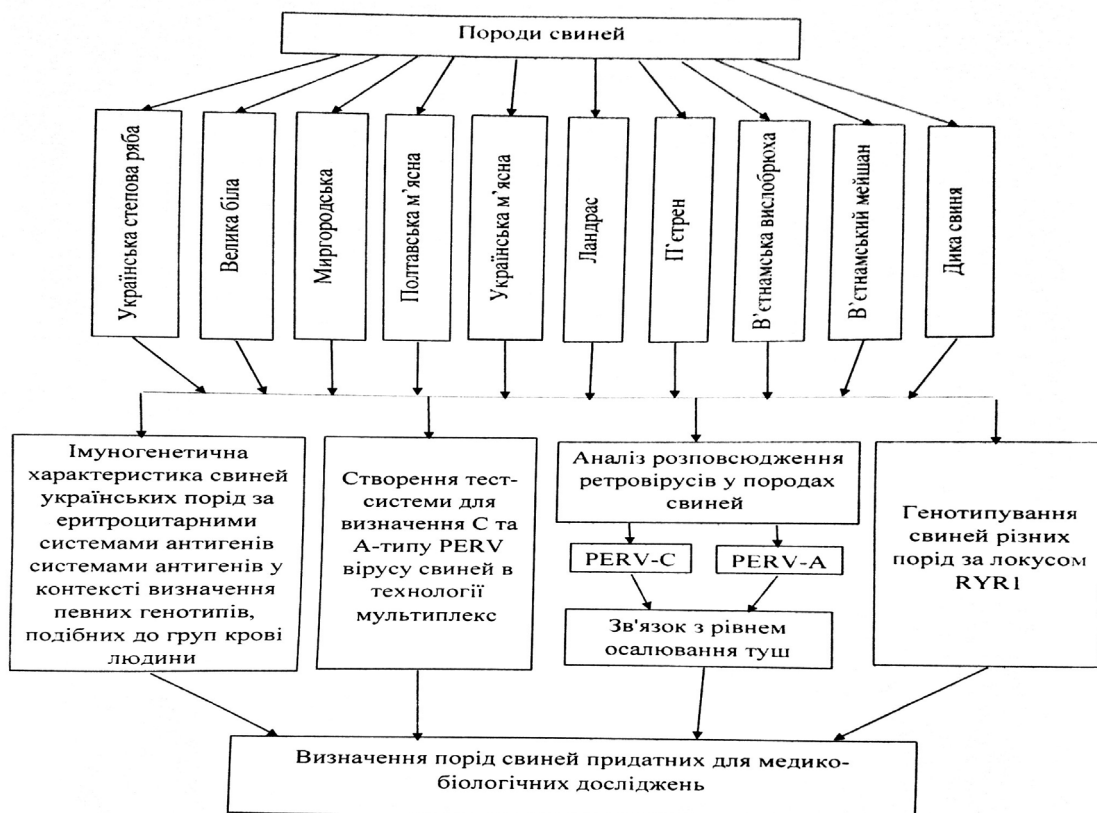


Рис. 2.1 Загальна схема досліджень

Характеристика об'єктів досліджень. Визначення частот генотипів за геном RYR1 здійснювали у свиней таких порід: полтавська м'ясна (10 гол.), велика біла (10 гол.), ландрас (20 гол.), п'єтрен (8 гол.), миргородська (54 гол.), в'єтнамська вислобрюха (10 гол.), українська м'ясна (22 гол.), українська степова ряба (20 гол.) (табл. 2.1.).

Ідентифікацію ендемічних ретровірусів свиней PERV-C та PERV-A провели на поголів'ї свиней таких порід: полтавська м'ясна (20 гол.), велика біла (20 гол.), ландрас (20 гол.), п'єтрен (20 гол.), миргородська (54 гол.), в'єтнамська вислобрюха (10 гол.), українська м'ясна (22 гол.), українська степова ряба (20 гол.) і дика свиня (7 гол.).

Імуногенетичні дослідження провели на поголів'ї свиней миргородської (80 гол.) та української м'ясної порід (22 гол.).

Таблиця 2.1

Породи свиней, використані у дослідженні

Породна належність	Місце утримання тварин	Кількість тварин
Миргородська	ДП «Дослідне господарство імені Декабристів» Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН, Полтавська обл., Миргородський р-н, с. Великий Байрак	80
Полтавська м'ясна	ДП «Деркульський кінний завод №63», Луганська обл., Біловодський р-н, с. Новодеркул ДП «Стрілецький кінний завод №60», Луганська обл., Міловський р-н, с. Новострільцівка	10
Українська степова ряба	ДП «Дослідне господарство Інституту тваринництва степових районів ім. Іванова «Асканія-Нова», Херсонська обл., с. Асканія-Нова 5	20
В'єтнамська вислобрюха	Дослідна станція Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН, м. Полтава	10

продовження табл. 2.1		
Мейшан, Велика біла	ДП «Дослідне господарство «Надія» Експериментальної бази Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН», м. Полтава	10 10
Велика біла	ДП «Дослідне господарство «Степне» Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН», Полтавської обл., Полтавський р-н, с. Степне	10
Українська м'ясна, Велика біла	ДП «Дослідне господарство «Гонтарівка» Інституту тваринництва НААН», Харківська обл., Вовчанський р-н, с. Гонтарівка	48 20
Українська м'ясна	Банк ДНК лабораторії генетики Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН, м. Полтава	22
Дика свиня, П'єтрен	Дослідна станція Гоенгаймського університету, Штутгарт, Німеччина	7 20
Ландрас	ТОВ «Хлібне», Харківська обл., Лозівський р-н, с. Царедарівка	20

Коротка характеристика порід свиней, що увійшли у дослідження:

Велика біла порода. Велику білу породу свиней вітчизняної селекції визнано в кінці 30-х років.

Велика біла порода вітчизняної селекції формувалась методом акліматизації тварин цієї породи, завезених з Англії, а також з використанням її в поглинальному схрещуванні у поєднанні з малопродуктивними місцевими свиньми.

Розповсюджена порода практично в усіх областях України. Частка її від чисельності свиней усіх порід становить більше 80% [121].

Імуногенетичний профіль свиней великої білої породи характеризується широким спектром генних частот окремих алелей груп крові (від 0 до 1). Найнижчий показник генних частот зафіксовано по системах Hb, Fa, Bb. Високий рівень імуногенетичної подібності є між різними стадами ($r=0,69-0,96$), що свідчить про інтенсивний обмін селекційним матеріалом між племінними господарствами різних категорій [121].

Свині великої білої породи - високопродуктивні, добре пристосовані до різних умов годівлі і утримання. Використовуються у селекції як материнська, так і батьківська форма для схрещування і гібридизації [122].

Недоліки породи: підвищена схильність до ожиріння, тварини мають дуже приємний вигляд (екстер'єр): звислі крижі, погано виражений окіст, масть біла, погано переносять сильні морози і спеку [123].

Українська м'ясна порода. Порода створена в результаті застосування нового методу складного відтворювального схрещення з максимальним використанням на всіх етапах селекційного процесу рекордних тварин, оцінки гено- і фенотипу, спадкових конституціональних властивостей, морфологічних, фізіологічних ознак та фізико-хімічних показників якості м'яса та сала.

У селекційній роботі при формуванні лінійної структури модельних тварин враховані рівень стресочутливості молодняку проміжних генерацій та їх імуногенетична характеристика за 27 антигенами 10 генетичних систем груп крові.

Свині української м'ясної породи білої масті, великорослі, мають довгий тулуб, глибокі груди, виповнені окости, міцну конституцію, добре пристосовані до місцевих кліматичних і кормових умов. Типи, лінії і родини використовуються в системах гібридизації як у материнській, так і в батьківській формах [121].

Українська степова ряба порода. Порода універсального напрямку продуктивності. Виведення породи розпочалося у 1938 році з відбору рябих поросят, що з'явилися як мутантні форми у багатоплідних опоросах маток української степової білої породи з гарним екстер'єром, міцною конституцією. Відібраних тварин вирощували в умовах повноцінної годівлі та нормального утримання. Кращих з вирощених кнурів визначали родоначальниками ліній, а кращих маток – родоначальницями родин.

Українські степові рябі свині мають міцну конституцію, довгий тулуб на міцних ногах, широкі груди, спину і попереки, добре розвинений окіст. Масть ряба різних відтінків: світла, темна, рудувата

Характерною ознакою української степової рябої породи є знижений рівень поліморфізму В-системи груп крові, майже повний мономорфізм за алелем Db та висока, у порівнянні з іншими породами півдня України, концентрація алеля Fa (0,475). За системою Е-груп крові виявлені 4 алеля (Eaeg — 0,003; Ebdg — 0,338; Eedg — 0,394; Eedth — 0,265) та 8 генотипів. Ефективне число алелей і середнє число фенотипів за сумою В, D, Е, F, V, генетичних систем груп крові для свиней цієї породи відповідно становить 8,9 та 14,1. Гетерозиготність за комплексом В, Е, F і V локусів – 45,7% [121].

Полтавська м'ясна порода. Є першою високопродуктивною м'ясною породою свиней в Україні, що відповідає сучасним вимогам споживача до високих смакових якостей м'яса і сала.

Створена порода новим розробленим методом складного відтворювального схрещування семи порід вітчизняної і зарубіжної селекції з широким, уже через 5 років, впровадженням у виробництво свиней нового генотипу. Характерною особливістю такого методу, крім розробки цільового стандарту і моделі, є поєднання селекційного процесу з вивченням морфологічних, фізіологічних особливостей, фізико-хімічних показників якості м'яса і сала, стресочутливості та імуногенетичної характеристики. При цьому вивчаються рівень перетравності поживних речовин і ефективність використання азоту корму.

Свині білої масті, добре розвинені, довгі, мають широкий і глибокий тулуб, пряму спину, масивні окости, пристосовані до кліматичних і кормових умов, стресостійкі, конкурентоздатні на світовому ринку.

Рівень гомозиготності стад свиней за їх оцінкою по 27 антигенах десяти генетичних систем груп крові високий і становить 61,7% [121].

Миргородська порода. Селекційний процес створення цієї породи свиней здійснювали методом складного відтворювального схрещування

місцевих чорно-рябих свиней Миргородщини (Полтавська область) з кнурами беркширської, середньої білої, частково великої білої, темворської та великої чорної порід. М'який клімат лісостепової зони України, значна питома маса зелених та соковитих кормів у раціонах дали змогу створити у свиней миргородської породи високу невибагливість, резистентність, стресостійкість і здатність використовувати випас.

Миргородська порода об'єднала схожих за напрямом продуктивності та тілобудовою кролевецьку, придніпровську та подільську породні групи свиней і стала нині породою переважно м'ясо-сального типу. Голова в цих свиней середнього розміру, не груба, рило помірної довжин, вуха здебільшого короткі, стоячі, інколи зустрічаються нахилені вперед. Тулуб глибокий, широкий, з добре виповненими окостами. Шкіра еластична, не груба, без складок. Щетина блискуча, довга, густа. Ноги помірної висоти, міцні. Масть свиней миргородської породи в переважній більшості чорно-ряба, з перевагою чорних плям, чорна з рудуватим забарвленням, а іноді трапляються свині з білим поясом за лопатками і на передніх кінцівках.

Ступінь гомозиготності основних кнурів становить 56,5%, а основних свиноматок – 64,4% що пояснюється використанням у селекції генотипів інших порід і, як результат, зниження рівня консолідації стад.

Генетико-популяційні дослідження, що виконувались шляхом аналізу високополіморфних локусів ДНК, свідчать, що миргородська порода свиней відзначається незначною генетичною диференціацією.

Біологічними особливостями миргородської породи є раннє відкладання жиру, особливо ниркового, ранній розвиток статеві системи, більша потреба в перетравному протеїні в молодому віці [21].

Порода ландрас української селекції. Порода ландрас – одна із стародавніх спеціалізованих беконних порід. Виведена в кінці XIX століття в Данії на базі місцевих ютландських і острівних свиней та завезених з Англії, Португалії, Індії і Китаю. Є найбільш розповсюдженою породою в світі. На базі цієї породи створено популяції бельгійської, французької, американської,

канадської, шведської, фінської, української та інших селекцій, які схожі за конституціонально-екстер'єрними особливостями та типом продуктивності.

Імуногенетичний аналіз спектра частот алелей виявив підвищену частоту окремих з них (Ba – 99%, A – 82, D/B – 77, Fbd – 78%), що характерно для цієї породи. Ступінь реалізації генетичної мінливості становить 35-57%. Показник середньої фактичної гомозиготності – 0,54-0,62. Індекс генетичної подібності за сімома поліморфними системами груп крові – в межах 0,53-0,9.

Із фізіологічних особливостей у ландрасів більша частка і в порівнянні з іншими породами краще розвинені внутрішні органи, підвищені обмін білка та інтенсивність нарощування м'язової тканини. Ландраси ефективніше засвоюють азот кормів, у них краще співвідношення жир:білок, за хімічними якостями м'яса вони мають перевагу щодо вмісту білка і незначно поступаються за фізичними властивостями великій білій породі.

Порода широко застосовується у міжпородному схрещуванні та гібридизації як батьківська [121].

Порода п'єтрен. Порода виведена в Бельгії шляхом схрещування свиней великої білої, йоркширської та беркширської порід.

Свині породи п'єтрен досить великі з коротким, масивним тулубом. Голова невеликого розміру, шия товста, вуха маленькі, тулуб циліндричної форми, широкий. Спина широка, обмускулена. Задня частина тулубу дуже добре виповнена. Ноги високі, міцні. Свині мають низькі материнські якості, повільно ростуть, але характеризуються високим виходом м'яса в туші і низьким – жиру. Тварини вибагливі до умов утримання та рівня годівлі. Характеризуються стресчутливістю.

Свині породи п'єтрен мають генотип *TT* за локусом *g.1843 C>T* гена ріанодин-рецептору (RYR1), що асоційований з чутливістю до стрес-синдрому [124, 125].

В'єтнамська вислобрюха порода. В'єтнамські вислобрюхі свині вперше були завезені в Східну Європу і Канаду в 1985 році з В'єтнаму [126]. В даний час триває активна робота щодо поліпшення цієї породи в бік збільшення

розмірів і відсотка м'язової маси. Найбільш активно племінна робота ведеться в Канаді, Угорщині та Україні.

В'єтнамська вислобрюха свиня відрізняється високою скоростиглістю, статевій зрілості свинки досягають у віці 4 місяців, а кабани - в 6. Добре використовують пасовище, володіють високим імунітетом. Свиноматки в'єтнамської вислобрюхої породи свиней відрізняються, високою молочністю, добре розвиненим материнським інстинктом і особливою охайністю. Порода добре пристосована як до вологого жаркого клімату Південно-Східної Азії, так і до досить суворих зим центральної Європи і Канади.

Порода мейшан. Сальна багатоплідна порода, походить з Китаю, одна з найстаріших порід свиней, які збереглися донині, її історія налічує понад 400 років. Вважають, що вона походить окремою гілкою від ще давнішої породи китайських свиней Тайху. Тварини цієї породи вирізняються високою резистентністю до низки захворювань, невибагливістю до годівлі, споживанням у великій кількості грубих кормів. Сьогодні свиней цієї породи розводять в США, Канаді, Великобританії та деяких інших європейських країнах. Окремі показники продуктивних якостей: 2 опороси за рік, багатоплідність 15-16 поросят, раннє статеве дозрівання, ріст тварин повільний, швидке ожиріння, товщина шпику 2,5-3,5 см, якість м'яса вважають високою [127].

Дика свиня. *Sus scrofa* є найпоширенішим диким предком домашньої свині, з яким вона вільно гібридизується [128]. Сімейство *Suidae* включає багато видів свиней і кабанів, які слугували одним з основних харчових ресурсів для людей протягом тривалої історії людського поселення [129].

Від домашніх свиней ця тварина відрізняється короткою і щільною статурою, товстими і високими кінцівками, довгою і тонкою головою, більш довгими, гострими і стоячими вухами. Верхні і нижні ікла постійно ростуть і стирчать з рота вгору.

Як широко поширений вид кабани мають багато підвидів: лише в Європі описано 16 [130]. Генетичне різноманіття та генетична структура є ключовими

компонентами виживання виду, оскільки великі та різноманітні популяції краще справляються з природними змінами [131]. Для вивчення генетики кабанів використовувалися різні методики. Добре встановленим методом є аналіз послідовностей мітохондріальної ДНК (мтДНК), особливо контрольної області, також званої D-петлею, для виявлення філогенетичних моделей. Ця частина мтДНК має відносно низький рівень мутації, тому зміни відбуваються в більшому часовому масштабі [132].

Відбір зразків крові для генетичних досліджень. Відбір крові проводили у клінічно здорових тварин з великих судин вушної раковини шляхом їх надрізання скальпелем. Можливий також відбір крові з очної чи яремної вен за допомогою шприца або із судин хвоста свині шляхом надрізання його кінчика. Перед відбором крові визначали номери тварин. Ділянку шкіри тварини в місці забору крові обробляли 70% етиловим спиртом. Кров забирали в ранкові години до годівлі у кількості 1–9 мл від кожної особини у пробірки з антикоагулянтом (співвідношення крові і антикоагулянту 6:1) ємністю 1,5 або 10 мл. Після перемішування з антикоагулянтом пробірку з кров'ю маркували порядковим номером і одночасно записували його у супровідну відомість забору крові, проставляючи відповідний номер свині. Зразки крові для виділення ДНК зберігали за температури $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$ не більше 7 діб. Для довготривалого зберігання зразки крові заморожували за температури -20°C , термін зберігання – кілька років [133, 134].

Виділення ДНК. Для отримання препаратів ДНК довготривалого зберігання застосовували метод виділення ДНК сольовим методом із крові [134].

Виділення ДНК сольовим методом із крові. 5 мл крові з антикоагулянтом змішували з 30 мл охолодженого до 4°C буферу для лізису клітин (0,32 М сахарози, 5 мМ MgCl_2 , 1 % Тритон X-100, 0,01 М трис- HCl (рН 7,6), інкубували 30 107 хв. за температури 4°C . Після інкубації ядра клітин осаджували центрифугуванням за швидкості 4000 об/хв. і 4°C , 30 хв. Для

лізісу ядер осад ресуспендували у розчині: 1,5 мл соль- ЕДТА (75 мМ NaCl, 25 мМ ЕДТА (pH 8,0), 200 мкл 10 % SDS, 25 мкл (10 мг/мл) протеїнази К та інкубували 16 годин за 37 °С. До одержаного лізату додавали 0,75 мл 5 М ацетату калію, pH 4,8, перемішували та інкубували 30 хв. за температури 4 °С і центрифугували (40 хв., 5000 об/хв.). До надосадової рідини додавали два об'єми охолодженого до 4°С 96 % етанолу та вимотували ДНК на скляну паличку. Після підсушування за кімнатної температури, ДНК двічі промивали 70 % етанолом та розчиняли в 0,5 мл буферу TE (10 мМ Ттріс-НСl (pH 7,4), 1 мМ ЕДТА (pH 8.0)). Отримані препарати ДНК зберігали за -20 °С упродовж декількох років.

Для виділення ДНК із крові для експрес-аналізу застосовували метод, що базується на використанні смоли «Chelex-100».

Виділення ДНК із крові за допомогою смоли «Chelex-100». В одноразові поліпропіленові пробірки типу «Eppendorf» ємністю 1,5 см³ вносили по 1000 мкл стерильної дистильованої води. В пробірки додавали зразки крові об'ємом не більш як 200 мкл. Суміш інкубували 15 хв за кімнатної температури. Пробірки центрифугували 1 хв за швидкості 8 тис. об/хв. Обережно видаляли надосадову рідину, залишивши приблизно 20 мкл рідини над осадом. У пробірки додавали по 1000 мкл стерильної дистильованої води суспендували і центрифугували, після чого видаляли надосадову рідину, залишивши приблизно 20 мкл рідини над осадом. Процедуру промивання осаду повторювали кілька разів до повного знебарвлення осаду. У пробірки додавали 180 мкл 5 % стерильного водяного розчину «Chelex-100» (готується безпосередньо перед використанням) та інкубували 30 хв за 5° С у термостаті. Вміст пробірки перемішували на центрифuzі-вортексі та витримували 8 хв у термостаті за 95 °С. Знов перемішували на вортексі та центрифугували 1 хв за швидкості 8 тис. об/хв. Для ампліфікації використовували 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Отримані зразки ДНК зберігали за мінус 20° С упродовж 6 місяців. Після кожного розморожування зразки ресуспендували та центрифугували 5 хв за швидкості 6000 об/хв.

Основні параметри отриманих нуклеїнових кислот (концентрація ДНК, ступінь її чистоти та нативності) вимірювались за допомогою приладу NanoDrop-219 (Інститут молекулярної біології і генетики НАН, Київ).

ДНК-типсування свиней за генами, що досліджувалися у роботі. Генотипування проводили методом алель-специфічної (ПЛР-SSP) мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції [134].

Використовували праймери, комплементарні ділянкам локусів RYR1, PERV-C, PERV-A, в якості внутрішнього контролю ПЛР використовували фрагмент локусу альфа-актину свині свійської (α -Actin).

Локус-специфічну ампліфікацію проводили з приготуванням реакційної суміші такого складу (25 мкл): 1 мкл ДНК, 1 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 5 мкл універсального 10×PCR-буферу (MBI Fementas, Литва), що містить 200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM KCl, 1 мкл прямого F-праймеру (5 мкМ), 1 мкл зворотного R-праймеру (5мкМ), 0,1мкл (5 од.активності) Taq - ДНК-полімерази (*Thermus aquaticus*, Thermoscientific, Литва), 19,4 мкл деіонізованої води. Суміш готували згідно рекомендацій для RYR1 [135], PERV-C [136], PERV - A [137] та α -Actin [138]. На зібрану реакційну суміш нашаровували 25 мкл мінерального масла.

Структура праймерів, температура відпалу праймерів, довжина амплікатів та фрагменти рестрикції вказані у таблиці 2.2.

Реакцію проводили в термоциклері “Терцик-2” («ДНК-технологія», РФ) (рис. 2.2).

Для ампліфікації фрагмента ріанодинрецепторного гена (RYR1) використовували програму: 94⁰С – 4 хв.; 30 циклів: 94⁰ С – 20 с, 69⁰ - 20 с, 72⁰С – 20 с, 72⁰С – 4 хв.

Генотипування свиней в мультиплексній ПЛР-SSP системі PERV-C – α -Actin (LAPC) проводили у емпірично створеній програмі ампліфікації: 95⁰С – 2 хв; 35 циклів: 95⁰ С – 30 с, 65⁰С - 30 с, 72⁰С – 3 хв, 72⁰С – 5 хв.

Таблиця 2.2

Структура праймерів, температура відпалу праймерів, довжина амплікатів та фрагменти рестрикції

Ген	Структура праймерів	Амплі кон / т-ра відпалу	Фрагменти рестрикції	Джерело
<i>PERV-C</i>	F: 5' - CTGACCTGGATTAGAACTGG -3' R: 5' - ATGTTAGAGGATGGTCCTGG -3'	281 п.н. / 65 ⁰ C	281	[140]
<i>PERV-A</i>	F: 5' - TCCGTGCTTACGGGTTTTAC -3' R: 5' - TTGCCAATCTTTCCATCTCC -3'	224 п.н. / 60 ⁰ C	224	[139]
<i>α- Actin-</i>	F: 5' - CGCCATGTGTGACGAAGACGAGACC -3' R: 5' - CACGTACATGGCGGGCACGTTGAAG -3'	516 п.н. / 62,5 ⁰ C	516	[138, 141]
<i>RYRI</i>	F: 5' - GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT -3' R: 5' - CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG -3'	137 п.н. / 69 ⁰ C	TT-137, TC-137, 4, 53, CC-84, 53	[142]

Електрофоретичне розділення ампліфікованих ділянок ДНК у форматі мультиплекс ПЛР проводилось у 2 %-му агарозному гелі у тріс-боратному електрофорезному буфері (ТВЕ: 0,0879 М Тріс, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА рН 8,0), згідно методичних рекомендацій [143]. Для контролю за розмірами отриманих в результаті ампліфікації фрагментів використовували маркер молекулярної розміру Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder, що дозволяє проводити контроль за розмірами ДНК-фрагментів у діапазоні молекулярних розмірів від 100 до 1000 п.н.



Рис.2.2 Термоциклер «Терцик – 2»

Фарбування гелів здійснювали розчином бромистого етидію (0,5мкг/мл) протягом 10хв з наступною їх багаторазовою відмивкою у дистильованій воді. Візуалізацію фрагментів ДНК проводили в УФ світлі.

Аналіз одержаних електрофореграм за визначеними локусами проводили за розміром смуг. Для орієнтації в розмірах одержаних смуг використовували специфічні маркери молекулярної маси: *pGEM® DNA Markes* (Promega, США), *pUC19ДНК/MspI* (НПО “СібЭнзим”, РФ), *pBR322/BsuRI*, (“Ферментас”, Литва), згідно рекомендацій фірми-виробника.

Для визначення алелів гена RYR1 проведено ДНК-тестування 154 свиней порід полтавської м'ясної, миргородської, великої білої, ландрас, п'єтрен, в'єтнамської вислобрюхої, української м'ясної та української степової. Дослідження проводили на зразках ДНК, отриманих із крові свиней. ДНК виділяли за допомогою реагенту Chelex 100 [144]. Гідроліз ампліфікованих послідовностей гену RYR1 здійснювали за схемою: реакційна суміш вміщувала: 10×рестрикційний буфер (оптимізований для даного ферменту) – 2,5 мкл, деіонізована вода – 7,3 мкл, ендонуклеаза рестрикції *HhaI* - 0,2 мкл. (4-5 од. акт.) та 15 мкл PCR-продукту. Реакційну суміш інкубували у термостаті при 37°C – 3 години.

Дослідження з пошуку асоціації між присутністю ДНК вірусів *PERV-C* і *PERV-A* в геномі свиней та товщиною шпику проводили на тваринах миргородської породи, 40 голів. Товщину шпику визначали на рівні 6-7 хребців прижиттєво за допомогою шпикоміру.

Імуногенетичний аналіз. Весь обсяг проведених імуногенетичних камеральних досліджень був здійснений на вибірках свиней миргородської породи (ДП «ДГ імені Декабристів Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН») (n=80) та української м'ясної породи (ДП «ДГ «Гонтарівка» Інституту тваринництва НААН») (n=48).

Групи крові свиней визначали за загальноприйнятими методиками з постановкою реакції аглютинації і гемолізу з використанням реагентів груп крові за 9 основними системами груп крові А, В, D, Е, F, G, H, K, L, а також непрямой проби Кумбса і гемолітичного тесту [145, 146].

Антигени еритроцитів свиней визначали за допомогою специфічних імунних сироваток (м. Армавір, РФ) у лабораторії генетики Інституту тваринництва НААН України та залученням банку імунодіагностикумів, які відповідають міжнародним вимогам [145].

Для проведення імуногенетичного тестування від кожної тварини з коловушної вени відбирали зразки крові у промарковані пробірки з антикоагулювальним розчином. Для приготування суспензії еритроцитів відбирали по 3 мл крові й переносили її у промарковані центрофужні пробірки, в які додавали фізіологічний розчин. Пробірки укладали в гнізда ротора центрифуги і центрифугували протягом 10 хв зі швидкістю 3000 об./хв. Після цього з пробірок відсмоктували надосадову рідину водоструминним насосом і для отримання чистої надосадової рідини, відмивали тричі фізіологічним розчином. З відмитих еритроцитів на фізіологічному розчині виготовляли 2,5%-ву суспензію. Моноспецифічні сироватки-реагенти перед постановкою реакції аглютинації доводили до робочої концентрації розбавленням фізіологічним розчином, враховуючи титр сироватки та кількість проб крові. Для визначення реакції аглютинації використовували серологічний планшет,

який підписували згідно із бланком відомості про тварину. У лунки планшета за допомогою крапельниць вносили відповідний реагент і суспензії еритроцитів кнурів, яких тестували, струшували планшет і ставили його в термостат за температури 27°C на 2 год. Після цього проводили першу читку реакції і планшет знову ставили в термостат на 4 год, після чого проводили другу (кінцеву) читку реакції. Ступінь реакції аглютинації та гемолізу оцінювали за 4-х бальною шкалою [147].

Статистична обробка результатів генетичних досліджень проводилась методами математичної статистики, за використання комп'ютерної програми GenAlex 6.0. [148]. Статистичний аналіз вірогідності різниці між представниками різних популяцій за частотами алелів проводили за алгоритмом Фішера [149].

Аналіз генетичної структури популяцій за молекулярно-генетичними маркерами передбачає оцінку наступних параметрів: частот алелей та генотипів [149, 150]. Головні формули, що використовували для обчислення основних популяційно-генетичних характеристик:

1. Розподіл генотипів (очікувана кількість) відповідно до формули Харді – Вайнберга: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, де p – частота гомозигот за одним алелем; q – частота альтернативного алеля.

2. 2. Розрахунок частот алелей у моногенних диалельних системах:

$$p(A) = \frac{2N(AA) + N(Aa)}{2N_{\text{заг.}}} \quad (2.1)$$

$$q(a) = \frac{2N(aa) + N(Aa)}{2N_{\text{заг.}}} \quad (2.2)$$

$$\text{або} \\ \underline{q(a) = 1 - p(A)} \quad (2.3)$$

Де $N_{\text{заг.}}$ – загальна чисельність особин.

Символом pA позначається відносна частота алеля A , символом qa – відносна частота алеля a .

3. Значення «Genome copy number» (мінімальна кількість копій фрагменту ДНК для можливості його візуалізації) розраховували за наступною формулою [145]:

$$\text{Genome copy number} = \frac{\text{amount of genome } (\mu\text{l}) \times \text{Avogadro constant } (\text{mol}^{-1})}{\text{length of DNA (bp)} \times 10^6 \times 650},$$

де Amount of genome (μl) – концентрація ДНК-зразка,

Avogadro constant (mol^{-1}) – константа Авогадро,

Length of DNA (bp) – довжина ДНК (свині свійської) – 2800 MB = $2,8 \times 10^9$ п.н.

Фотодокументацію здійснювали на цифрову фотокамеру Canon Power Shot IS – S3.

Статистичну обробку результатів ДНК-типування проводили на персональному комп'ютері за допомогою відповідних програм [151, 152].

Для розрахунків основних популяційних характеристик (частоти алелів, генотипів) використовували програму GENALEX 6 [153].

Окремі популяційно-генетичні характеристики обчислені за допомогою Excel 2007 з наступною побудовою дендрограм.

Аналіз первинної послідовності гену виконували за допомогою комп'ютерної програми Primer3 [154] для відповідної пари праймерів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Генотипова структура мікропопуляцій свиней вітчизняних порід за локусами ріанодинового рецептору RYR1. У досліджених тварин було ідентифіковано два алелі гена ріанодинового рецептора RYR1 (n і N) і три генотипи (NN, Nn, nn). Електрофоретичне розділення рестрикційних фрагментів показано на рисунках 3.1 і 3.2. Фрагменти довжиною 84 і 53 пари нуклеотидів вказують на домінантний гомозиготний генотип RYR1^{NN} і це означає, що мутація відсутня, а досліджувана тварина стресостійка. Фрагмент довжиною 137 п.н. класифікується як рецесивним гомозиготним генотипом RYR1ⁿⁿ і це означає, що тварина стресочутлива.

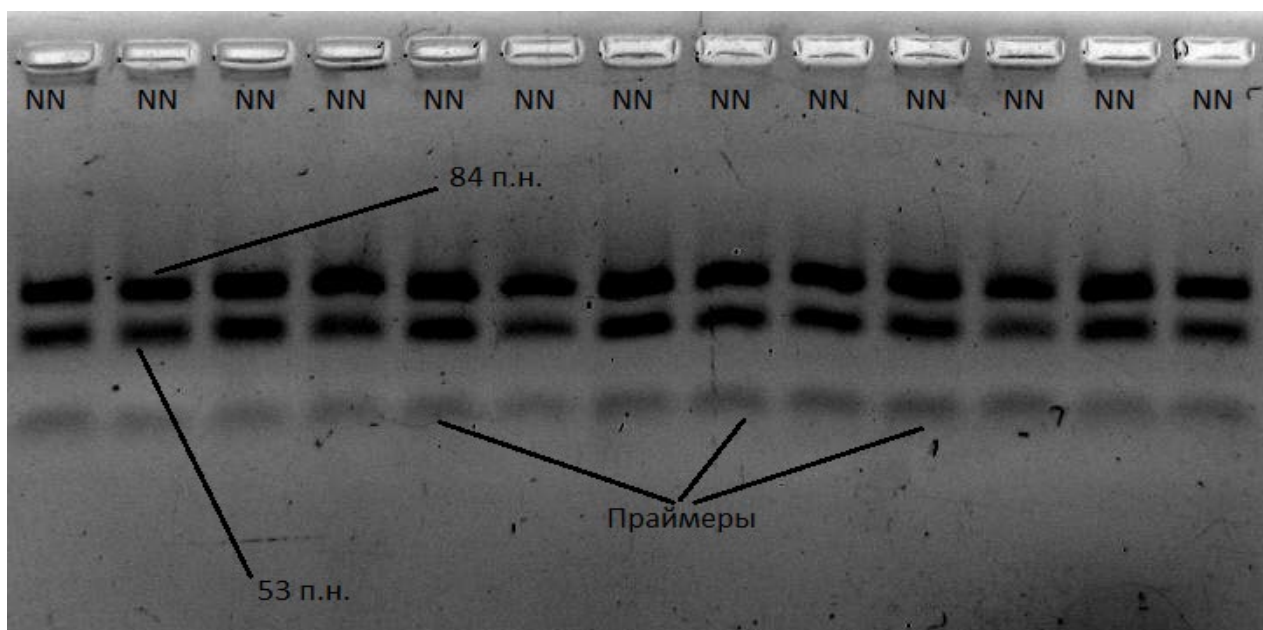


Рис. 3.1 Електрофореграма розділення продуктів рестрикції локусу RYR1 у 3%-у агарозному гелі. 1-14 – номери піддослідних свиней та відповідні їм генотипи, М - маркер молекулярного розміру PUC19.

Тварини з гетерозиготним генотипом RYR1^{Nn} – стресостійкі, але є носіями мутантного алеля.

Серед проаналізованих вибірок свиней різних порід, кількість тварин, що є носіями рецесивного алеля n гена ріанодинового рецептора *RYR1*, який відповідає за чутливість свиней до стресових факторів, коливалася у значних межах: від повної його відсутності у представників в'єтнамської вислобрюхої, української м'ясної та великої білої порід до 100% тварин гомозиготного *RYR1ⁿⁿ* генотипу в породі п'єтрен і 50% особин порід ландрас та української степової, що мали гетерозиготний *RYR1^{Nn}* генотип.

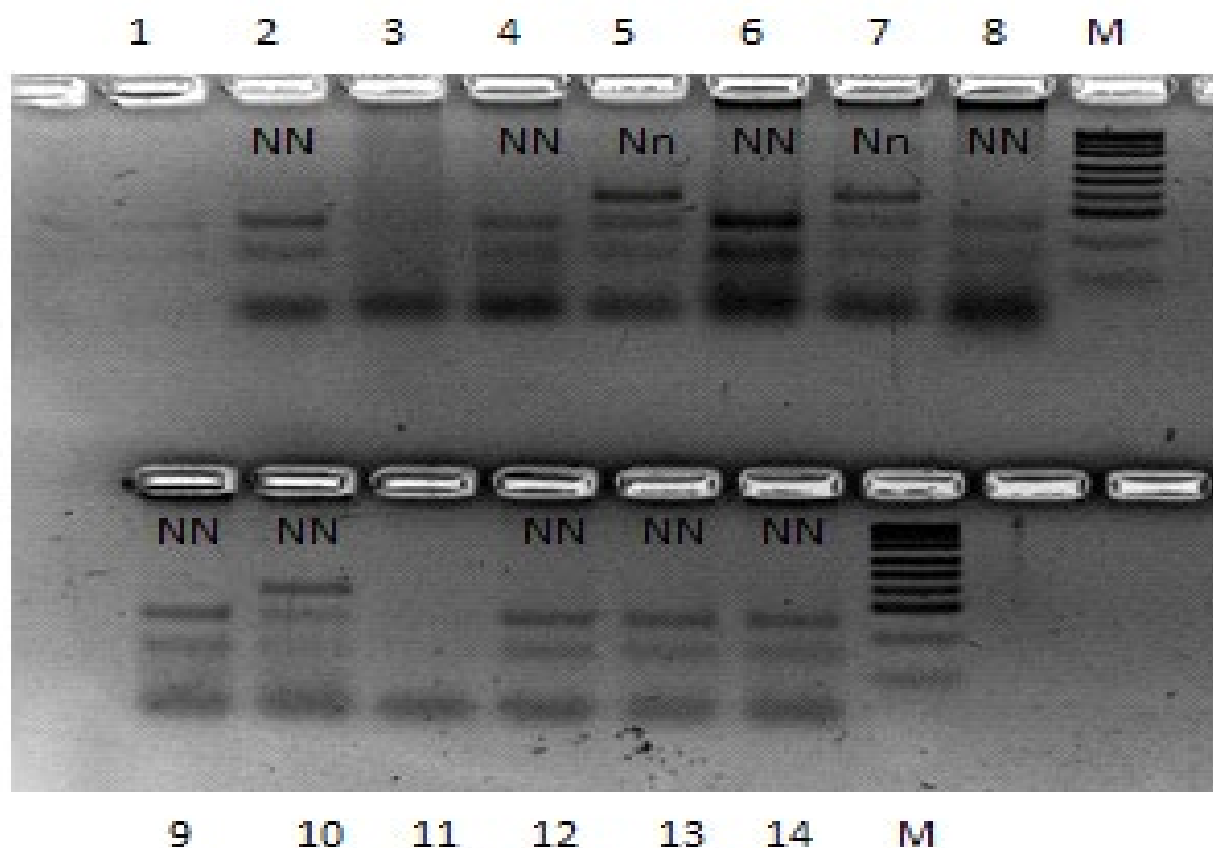


Рис. 3.2. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції локусу *RYR1* у 3%-у агарозному гелі. 1–14 — номери свиней та відповідні їм генотипи, М — маркер молекулярного розміру

Встановлено, що носіями алеля стресочутливості виявилися 20% тварин миргородської та 10% свиней полтавської м'ясної порід. Генетико-популяційний аналіз свиней за локусом *RYR1* показав, що у популяціях миргородської, великої білої та полтавської м'ясної порід частоти мутантного алеля *RYR1ⁿ* виявилися набагато нижчими, ніж у стадах порід ландрас та

п'єтрен. Вкотре показана тотальна гомозиготність чистопородних свиней породи п'єтрен за мутантним алелем *n* локусу *RYR1*, що пов'язано із надзвичайно високими показниками м'ясності цієї породи і негативним ефектом селекції на підвищену чутливість до стресових факторів, що супроводжується виникненням стрес-синдрому, органічними порушеннями з боку серцево-судинної системи, вадами якості м'яса: PSE (бліде, м'яке, ексудативне) та DFD (сухе, жорстке).

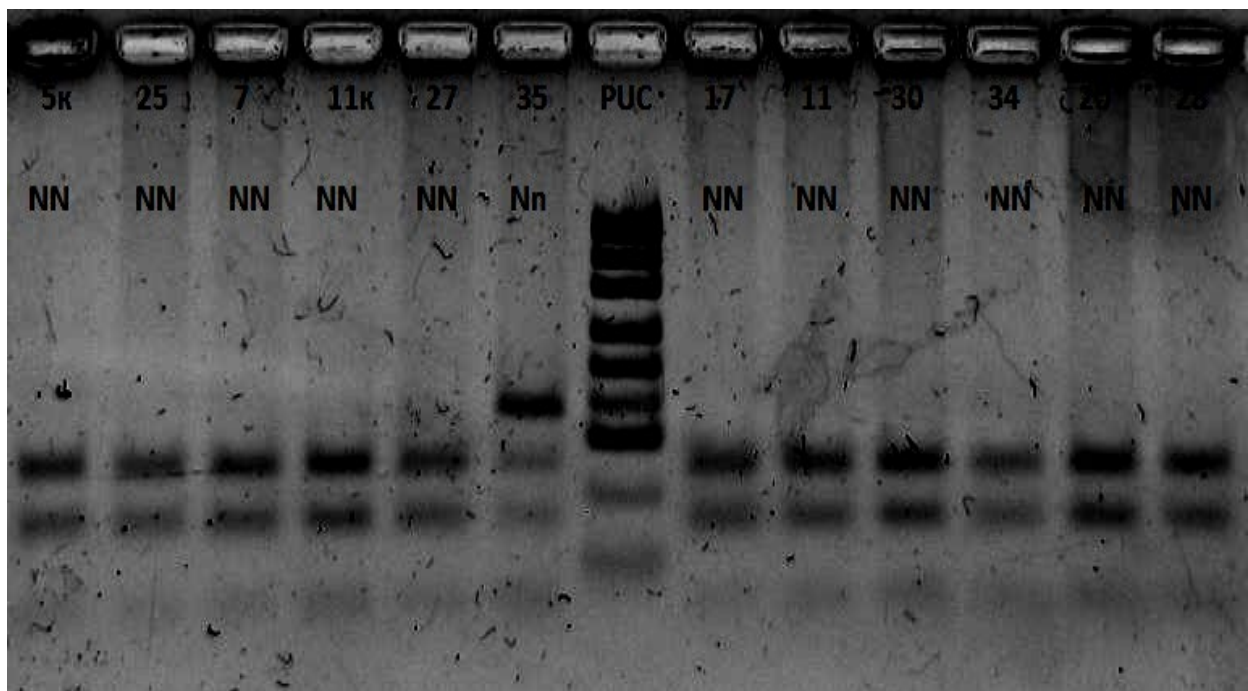


Рис. 3.3. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції локусу *RYR1* у 3%-у агарозному гелі. 5к, 25, 7, 11к, 27, 35, 17, 11, 30, 34, 20, 28 – номери тварин української м'ясної породи та відповідні їм генотипи, PUC – маркер молекулярного розміру.

Таким чином, розведення свиней породи п'єтрен та будь-яких поєднань з цією породою унеможливорює використання таких тварин для біомедичних експериментальних робіт. Найбільш оптимальними у цьому аспекті є породи, популяції яких повністю позбавлені алелю *RYR1ⁿ*, оскільки із наукових джерел відомо, що тварини гетерозиготного генотипу реагують на стрес менш інтенсивно, ніж *RYR1ⁿⁿ*, тобто успадкування схильності до

стресових факторів у свиней відбувається за неповного домінування нормального дикого алеля *RYR1*^N.

На рис. 3.4 наведені дані щодо розповсюдження мутантного алелю *p* локусу ріанодинового рецептору серед різних порід та генерацій свиней.

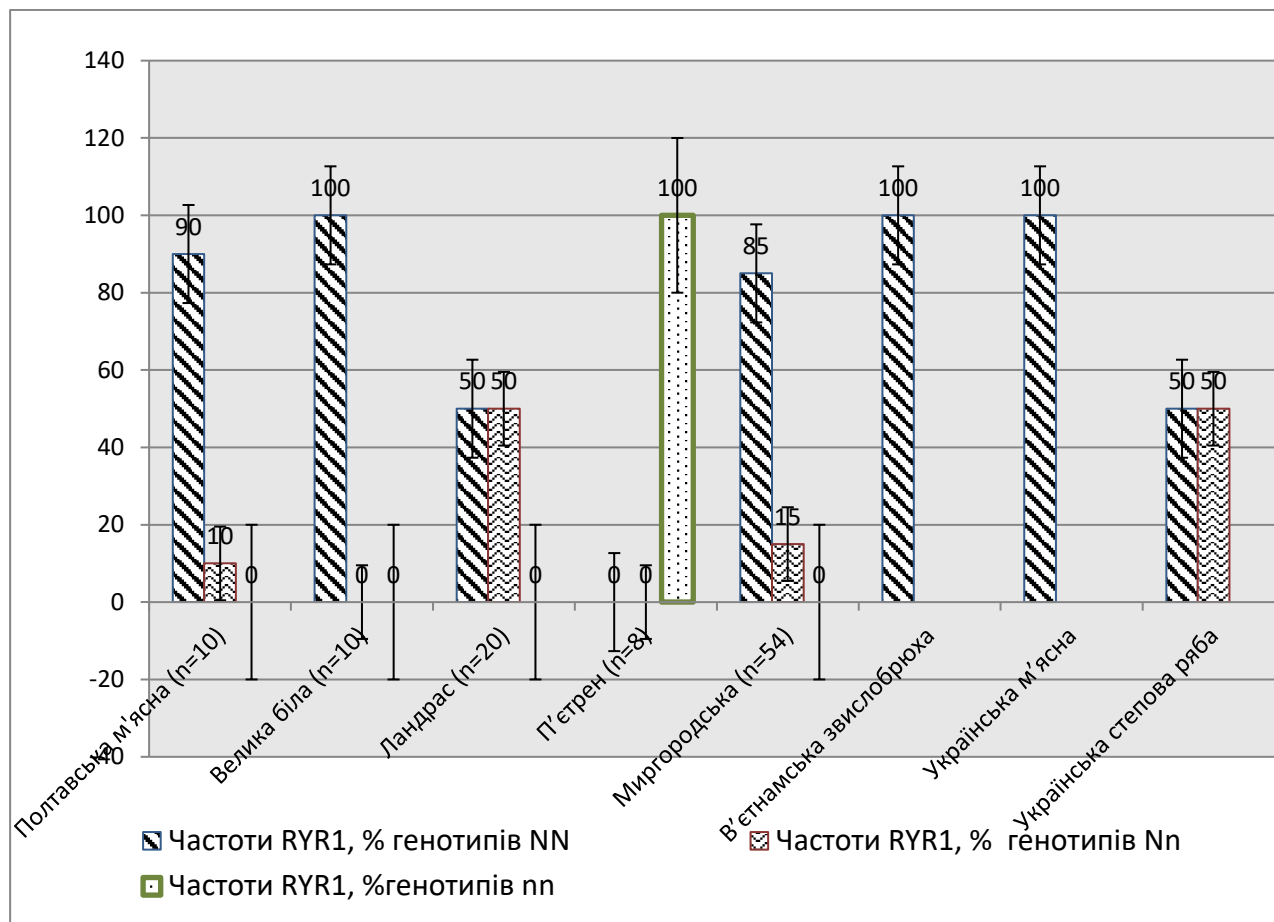


Рис. 3.4. Частота різних генотипів за геном *RYR1* серед свиней різних порід

Популяційні дослідження, проведені іншими дослідниками, виявили відсутність алеля *RYR1*ⁿ або дуже низьку його концентрацію у породах сального і комбінованого напрямів продуктивності [155, 156].

За повідомленням Топіхи В.С. і Стародубець О.О. [157] помісні свині, отримані від схрещування порід дюрок і великої білої англійської селекції є носіями мутантного алелю, що спричиняє стрес-синдром. У дослідженнях популяції свиней порід п'єтрен, дюрок і великої білої білоруськими вченими виявлено до 50% мутантного алелю у породи п'єтрен, 4,4% у дюрок і 6,7% у великої білої [158].

Висновок за підрозділом. Вивчено генетичну структуру окремих популяцій свиней за локусом гена *RYR1*, відповідального за стрес-чутливість. Проведено ДНК-тестування 102 свиней 8 порід: миргородської, великої білої, полтавської м'ясної, української м'ясної, української степової рябої, ландрас, п'єтрен, в'єтнамської вислобрюхої. В результаті молекулярного дослідження свиней різних порід виявлений поліморфізм гена ріанодинового рецептора *RYR1*. Кількість тварин, що є носіями рецесивного алеля гена *RYR1ⁿ*, який відповідає за чутливість свиней до стресових факторів, коливається у значних межах: від повної його відсутності у представників в'єтнамської вислобрюхої, української м'ясної та великої білої порід до 100% кількості тварин гомозиготного *RYR1ⁿⁿ* генотипу в породі п'єтрен. Гетерозиготний генотип *RYR1^{Nn}* виявлений у свиней порід полтавська м'ясна (10%), миргородська (15%), ландрас і українська степова ряба (50%). У всіх досліджених свиней порід велика біла, в'єтнамська вислобрюха і українська м'ясна виявлено гомозиготний генотип *RYR1^{NN}*, який свідчить про відсутність у них стрес-синдрому.

Результати досліджень, подані у даному підрозділі, опубліковані у наукових працях [178, 183].

3.2. Ідентифікація ендогенних ретровірусів свиней PERV-C та PERV-A

3.2.1 Створення діагностичної системи для визначення носіїв ендогенного ретровірусу *PERV-C*

Оптимізація техніки генотипування свиней в мультиплексній ПЛР-SSP системі PERV-C – α -Actin (LAPC). Початковим етапом у роботі було відпрацювання та доведення до максимально оптимальних умов процесу ПЛР. Нами емпірично створена програма ампліфікації шляхом теоретичного розрахунку середньої температури випалювання праймерів, згідно їх відомої нуклеотидної структури та співвідношення пуринів і пірамідинів: 95⁰C – 2 хв; 35 циклів: 95⁰C – 30 с, 65⁰C – 30 с, 72⁰C – 3 хв, 72⁰C – 5 хв. Більш висока чутливість переважної кількості комерційних лабораторних тест-систем визначення вірусного навантаження забезпечується високим загальним об'ємом реакційної суміші 25-40 мкл, проте для зниження собівартості одного, щоб визначити генотип свиней за геномним ретровірусом PERV-C проведено лабораторне дослідження можливості проведення ПЛР у 15 мкл загального об'єму реакційної суміші. Проведено паралельне дослідження діагностичної системи PERV-C у двох об'ємах реакційної ПЛР суміші – 15 мкл та 25 мкл з робочою концентрацією праймерів LAPC та PERV-C – 20 pMol/ μ l за наступними схемами (табл. 3.1).

У подальших дослідженнях використовували схему ПЛР з об'ємом реакційної суміші 15 мкл. Після візуалізації продуктів ампліфікації на електрофореграмі (рис. 3.5) було визначено, що робоча концентрація праймерів 20 pMol/ μ l виявилася зовеликою, оскільки значна їхня кількість не застосовується при синтезі необхідних ПЛР-продуктів і призводить до нераціонального використання реагентів.

Таблиця 3.1.

**Схема компонентного складу реакційної суміші
для проведення ампліфікації фрагменту ретровірусного
гена свиней PERV-C**

Компоненти реакційної суміші	Кількість, мкл	Компоненти реакційної суміші	Кількість, мкл
H ₂ O	8	H ₂ O	13,8
10xPCR-buf,	1,6	10xPCR-buf,	2,5
dNTP	1,6	dNTP	2,5
MgCl ₂ ,	1,3	MgCl ₂	2
PrLAPC-FW	0,6	PrLAPC-FW	1
PrLAPC-RV	0,6	PrLAPC-RV	1
PrPERV-C- FW	0,3	PrPERV-C- FW	0,5
PrPERV-C-RV	0,3	PrPERV-C-RV	0,5
TaqPol	0,1	TaqPol	0,2
DNA	0,6	DNA	1
Загальний об'єм	15	Загальний об'єм	25

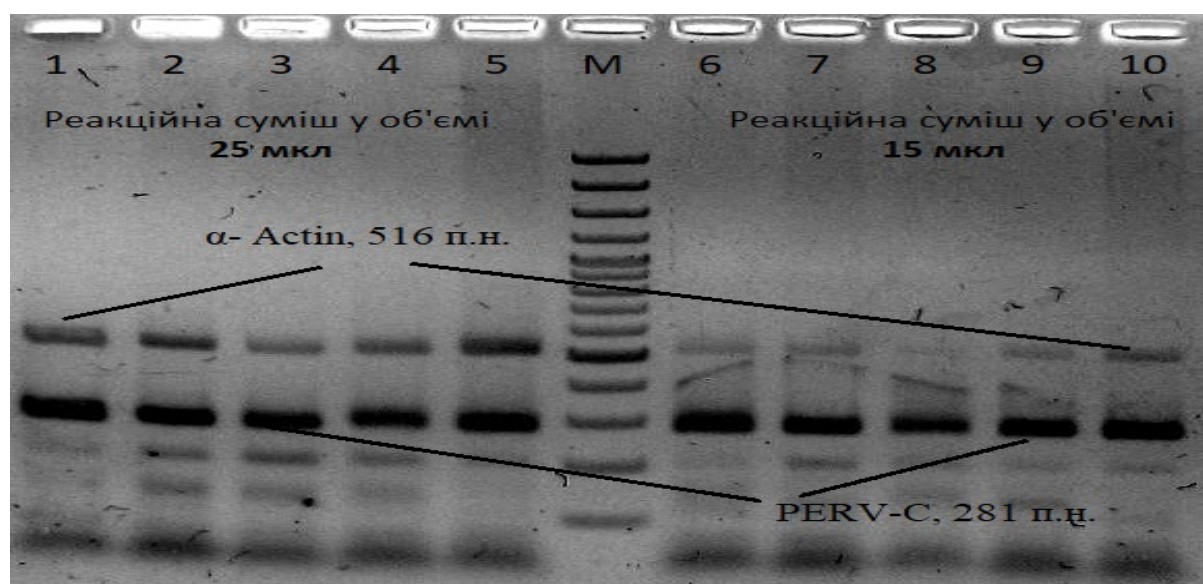


Рис. 3.5. Електрофореграма розділення у 2% агарозному гелі продуктів мультиплексної ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC) за схемою у 25 мкл об'ємі реакційної суміші. М – маркер молекулярного розміру, 1-5 – продукти мультиплекс ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC) ДНК свиней породи в'єтнамський мейшан за об'єму реакційної суміші 25 мкл; 6-10 - продукти мультиплекс ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC) ДНК свиней породи в'єтнамський мейшан за об'єму реакційної суміші 15 мкл.

Наступне завдання, яке потребувало вирішення – усунення неспецифічних продуктів ПЛР, що проявляються під час візуалізації електрофореграм, та ускладнюють точність діагностики за PERV-C. Одним з шляхів вирішення проблеми, на нашу думку, могло би бути підвищення температури випалювання праймерів з $+65^{\circ}\text{C}$ до $+67^{\circ}\text{C}$.

Підвищення температури випалювання праймерів до $+67^{\circ}\text{C}$ негативно позначилося на процесі мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin, оскільки фрагмент PERV-C (281 п.н.) не синтезувався у жодній пробі, на відміну від внутрішнього контролю ампліфікації - α -Actin (516 п.н.). Тому у подальшому використовувалася вихідна програма ампліфікації з температурою випалювання праймерів $+65^{\circ}\text{C}$.

Одним із способів підвищення специфічності гібридизації олігонуклеотидних послідовностей з тотальною ДНК є зміна концентрації такого компонента реакційної суміші ПЛР як MgCl_2 у бік її зменшення. Тому наступна серія дослідів стосувалася вибору оптимальної схеми ПЛР, де лімітуючим фактором була концентрація MgCl_2 . Ми зупинилися на трьох величинах кількості MgCl_2 у реакційній суміші – 1,3 мкл, 1 мкл та 0,6 мкл (рис 3.6).

Зменшення кількості MgCl_2 у реакційній суміші для ПЛР негативно вплинуло на синтез фрагменту PERV-C (281 п.н.), оскільки олігонуклеотидні послідовності не змогли гібридизуватися з геномною ДНК свині, амплікон зазначеного розміру не візуалізувався на електрофреграмі. Таким чином, емпіричним шляхом була визначена оптимальна кількість MgCl_2 (1,3 мкл) у реакційній суміші для проведення мультиплексної ПЛР PERV-C – α - Actin. Необхідно відмітити, що при створенні власних методик ідентифікації певних фрагментів генів будь-яких біологічних об'єктів, використання ПЛР-буфера, що містить у своєму складі MgCl_2 не є бажаним, оскільки не дає можливості варіювати із концентрацією іонів магнію для запобігання появи неспецифічних фрагментів синтезу.

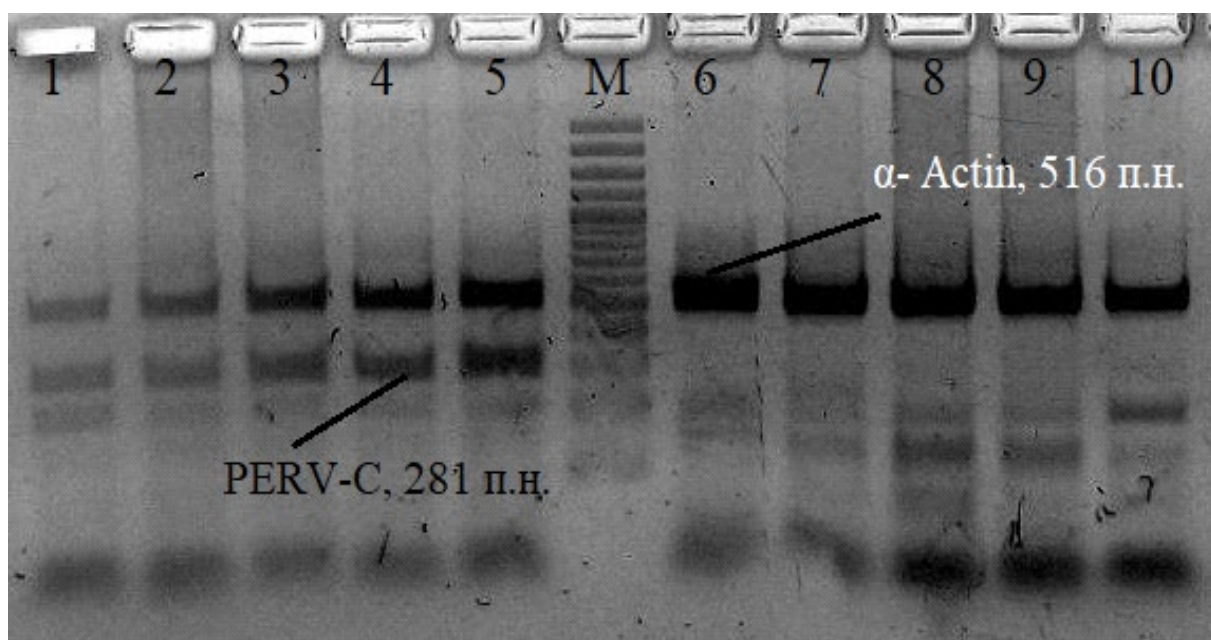


Рис. 3.6. Електрофорез у 2% агарозному гелі продуктів мультиплекс ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC). М – маркер молекулярної маси, 1-5 – продукти мультиплекс ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC) ДНК свиней породи в'єтнамський мейшан за кількості 1,3 мкл $MgCl_2$ у реакційній суміші; 6-10 - продукти мультиплекс ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC) ДНК свиней породи в'єтнамський мейшан за кількості 1 мкл $MgCl_2$ у реакційній суміші.

Таблиця 3. 2

**Компонентний склад реакційної суміші для визначення фрагменту
геномного ретровірусу PERV-C свиней**

Компоненти реакційної суміші	Концентрація, мкл
H ₂ O	7
buf	1,6
dNTP	1,6
MgCl ₂	1,3
PrLAPC-FW	0,6
PrLAPC-RV	0,6
PrPERV-C- FW	0,6
PrPERV-C-RV	0,6
TaqPol	0,1
DNA	1
Загальний об'єм	15

В результаті проведення серії лабораторних експериментів з визначення оптимальних режимів ампліфікації продуктів мультиплексної ПЛР PERV-C – α - Actin були виведені наступні методичні параметри:

1. Для отримання специфічних продуктів синтезу ДНК-мішені, реакційна суміш для проведення реакції ампліфікації загальним об'ємом 15 мкл повинна містити робочу концентрацію праймерів α - Actin LAPC - 20 pMol/ μ l и PERV-C – 10 pMol/ μ l.

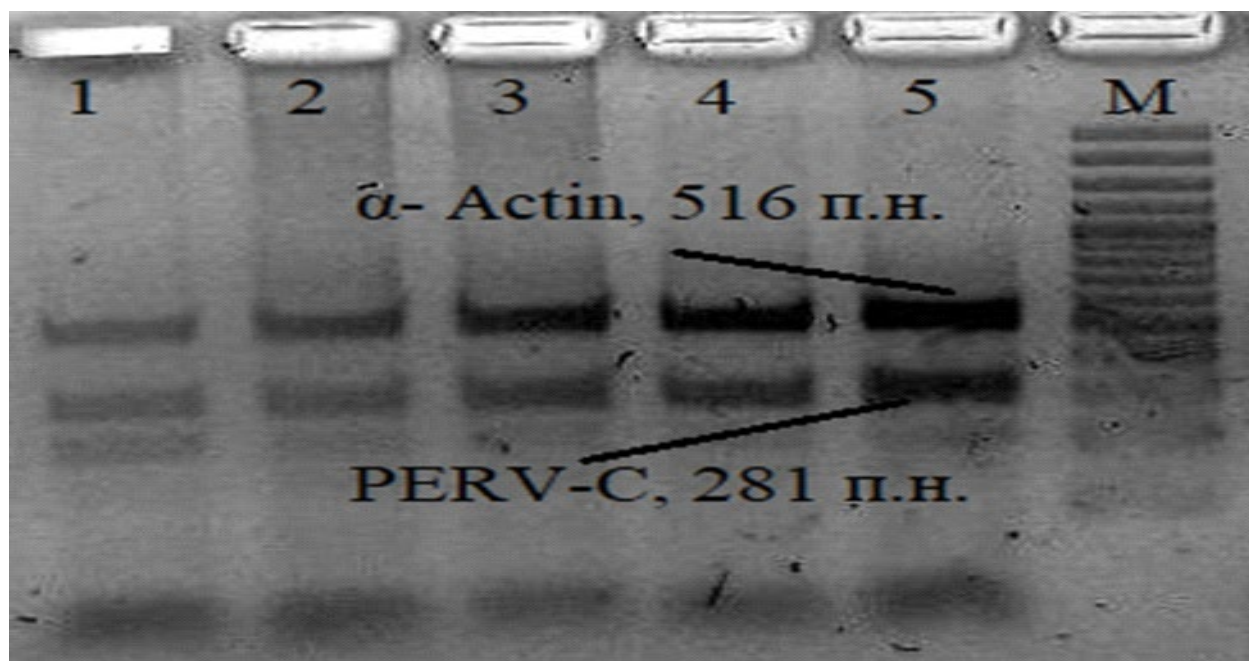


Рис. 3.7. Електрофорез у 2% агарозному гелі продуктів мультиплекс ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC) за оптимально підібраних умов ПЛР . М – маркер молекулярного розміру, 1-5 – продукти мультиплекс ПЛР PERV-C – α - Actin (LAPC) ДНК свиней породи в'єтнамський мейшан.

2. Програма ампліфікації для створеної тест-системи у форматі мультиплекс проводиться в температурному режимі: 950С – 2 хв; 35 циклів: 950 С – 30 с, 650С - 30 с, 720С – 3 хв, 720С – 5 хв.

3. Оптимум компонентного складу реакційної суміші із розрахунку на загальний об'єм 15 мкл наведений в табл.4.1.

4. Розділення продуктів ПЦР необхідно проводити у 2% агарозному гелі, з нанесенням 10 мкл ПЛР продукту та 3 мкл барвника (бромфеноловий

синій/ксилолціанол). Тривалість проходження електрофорезу становить близько 30 хв за потужності електричного поля у 12 Вт (рис. 3.7).

Визначення чутливості та специфічності системи PERV-C- α -Actin.

Експериментальним шляхом виявлена певна чутливість системи PERV-C на зразках ДНК свиней великої білої породи (особини якої за літературними даними переважно є носіями ретровірусу підтипу C) за використання вже оптимізованої та відпрацьованої схеми ПЛР в системі мультиплекс. Проведене визначення наявності фрагменту гена PERV-C у десяти особин великої білої породи у створеній системі мультиплекс, всі досліджені тварини виявилися носіями цього типу ендемічного ретровірусу. У подальшому ці ж самі зразки ДНК були взяті для ПЛР, де використовувалися лише праймери PERV-C без внутрішнього контролю ампліфікації, яким виступав локус α -Actin. Електрофоретичне розділення продуктів PERV-C ампліфікації показав, що усі піддослідні тварини виявилися носіями PERV-C, а різна інтенсивність забарвлення смуг фрагменту 281 п.н. вказує на кількість синтезованого ПЛР-продукту, що суттєво відрізнявся в залежності від обраної проби (рис. 3.8).

Очевидно, що інтенсивність флуоресценції ампліфікованого фрагменту PERV-C залежить від ступеня вірусного навантаження – кількості копій цільового фрагмента у геномній ДНК свині [159]. В подальших дослідженнях, безперечно, важливим методичним завданням буде не тільки створення системи ідентифікації ендемічних ретровірусів, що є лімітуючими факторами при ксенотрансплантації, але і вибір сучасних методів проведення полімеразної ланцюгової реакції із флуоресцентно міченими праймерами в режимі реального часу для визначення кількості синтезованої ДНК-мішені, а отже відносної кількості PERV-C в геномі свиней.

Для того, щоб продемонструвати чутливість і специфічність праймерів до ділянки ендемічного ретровірусу свиней підтипу C, проведено дослідження зі встановлення мінімально необхідної концентрації ДНК для можливості детекції ПЛР PERV-C (281 п.н.).

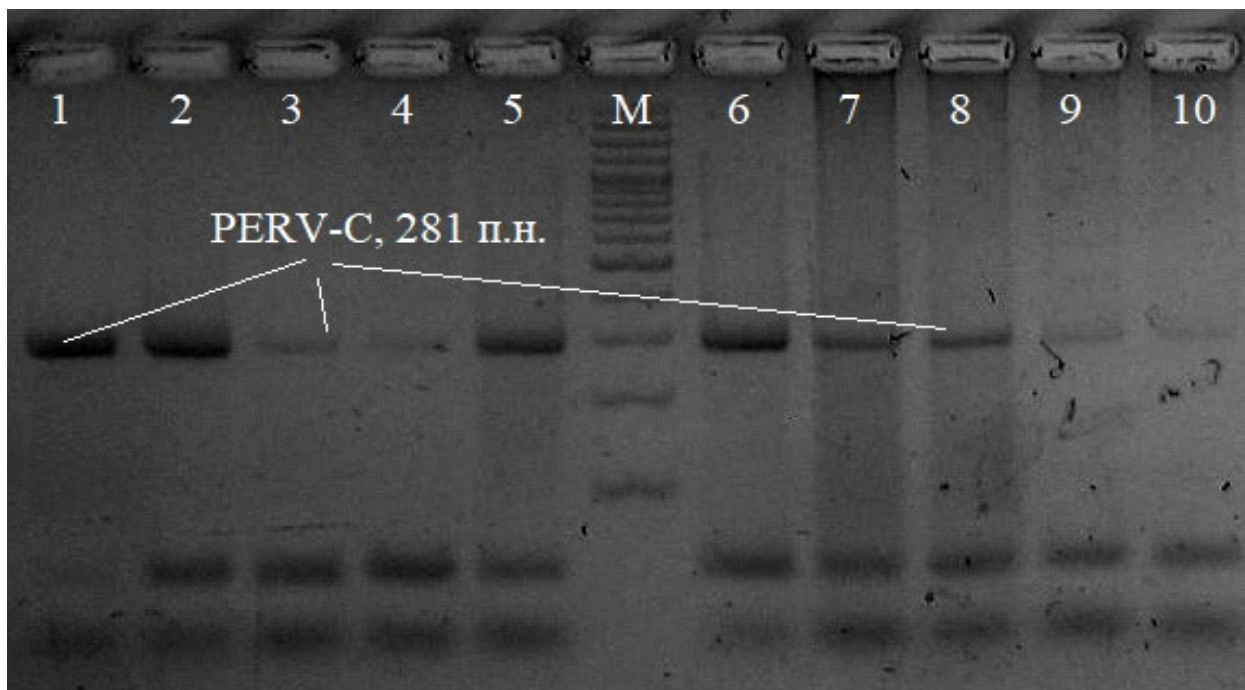


Рис. 3.8. Електрофорез у 2% агарозному гелі продуктів ПЛР PERV-C. М – маркер молекулярного розміру, 1-10 – продукти ПЛР PERV-C ДНК свиней великої білої породи за оптимально підібраних умов ПЛР.

Для цього був обраний зразок ДНК свині породи в'єтнамський мейшан, що містив у своєму складі фрагмент PERV-C (281 п.н.). За допомогою спектрофотометрії були виміряні основні параметри даного зразка у десяти повторностях, а саме: ступінь чистоти та нативності ДНК (табл. 3.3), проведене визначення середнього значення її концентрації у розчині.

Досліджений зразок ДНК мав високу ступінь чистоти та нативності, а його концентрація склала близько 152,16 нг/мкл. Оптимальним значенням чистоти ДНК і показником відсутності інгібіторів ПЛР реакції (солей, білків та РНК) є співвідношення 260/280, що дорівнює 1,8-1,9 [143]. В нашому дослідженні отримано значення 260/280 на рівні 1,92, що свідчить про високу якість отриманого розчину екстрагованої ДНК.

**Основні спектрофотометричні параметри
еталонного зразка ДНК свині породи в'єтнамський мейшан**

Номер проби	Дата і час	Концентрація	Одиниці виміру	A260	A280	260/280	260/230	Нуклеїнова кислота
1	23.03.2017 14:20:46	148,9	ng/μl	2,977	1,546	1,93	2,05	DNA
2	23.03.2017 14:21:46	151,3	ng/μl	3,026	1,584	1,91	1,99	DNA
3	23.03.2017 14:22:34	152,5	ng/μl	3,051	1,600	1,91	1,98	DNA
3	23.03.2017 14:23:15	150,0	ng/μl	3,000	1,562	1,92	2,02	DNA
4	23.03.2017 14:24:18	158,5	ng/μl	3,170	1,683	1,88	1,89	DNA
5	23.03.2017 14:25:01	151,4	ng/μl	3,028	1,579	1,92	2,01	DNA
6	23.03.2017 14:25:45	151,5	ng/μl	3,031	1,578	1,92	1,99	DNA
7	23.03.2017 14:26:47	150,1	ng/μl	3,002	1,565	1,92	1,96	DNA
9	23.03.2017 14:27:32	155,5	ng/μl	3,111	1,619	1,92	1,97	DNA
10	23.03.2017 14:28:08	151,9	ng/μl	3,038	1,584	1,92	2,00	DNA
В середньому		152,16	ng/μl	3,043	1,590	1,92	1,99	DNA

Виходячи з отриманих даних, нами розпочата робота з пошуку гранично допустимої (найменшої) концентрації ДНК, якою повинен володіти зразок, для можливості детекції мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin шляхом візуалізації електрофореграм. Для цього у дослідженому еталонному зразку ДНК свині породи в'єтнамський мейшан (умовно позначений як 1:1) знижували її концентрацію шляхом додавання дейонізованої води за наступними пропорціями: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, :10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:50000, 1:100000. У подальшому з усіма варіантами концентрацій досліджуваного зразка проводилась мультиплексна ПЛР PERV-C – α -Actin. Результати досліджень представлені на електрофореграмах (рис. 3.9, 3.10), де в якості позитивного контролю виступала проба 1:1.

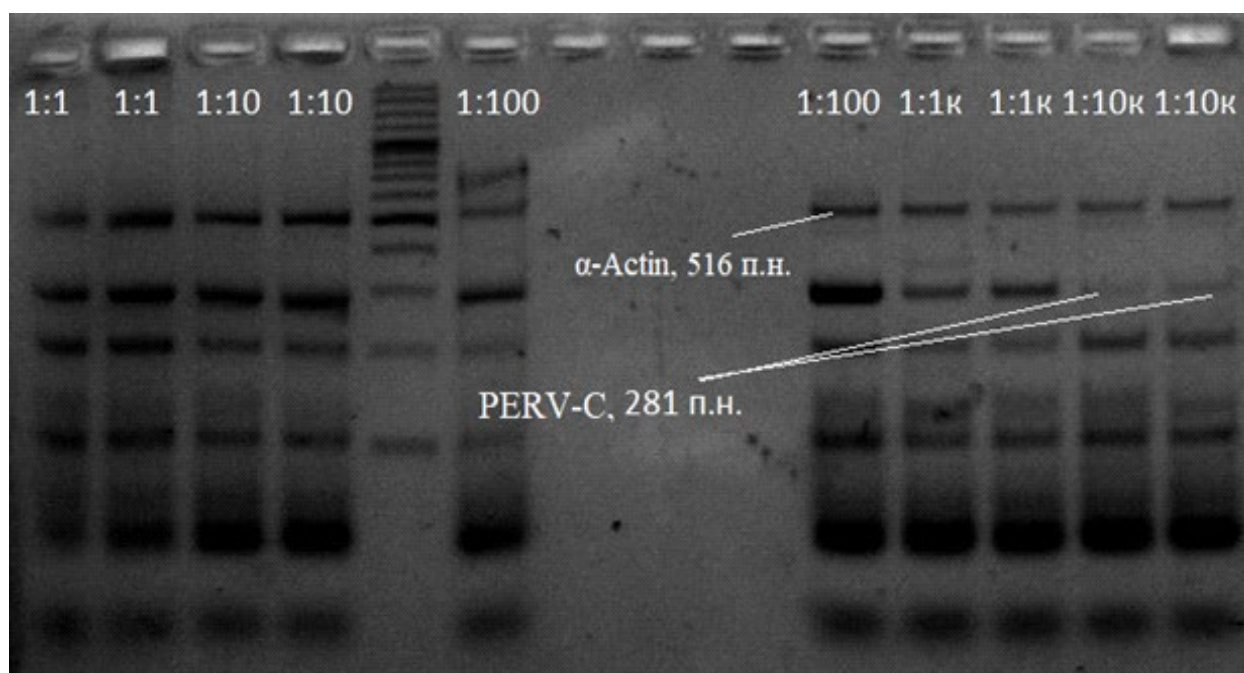


Рис. 3.9. Електрофорез у 2% агарозному гелі продуктів мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin. М – маркер молекулярного розміру, 1:1 – 1:10к – продукти мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin свиней породи в'єтнамський мейшан за різної концентрації ДНК.

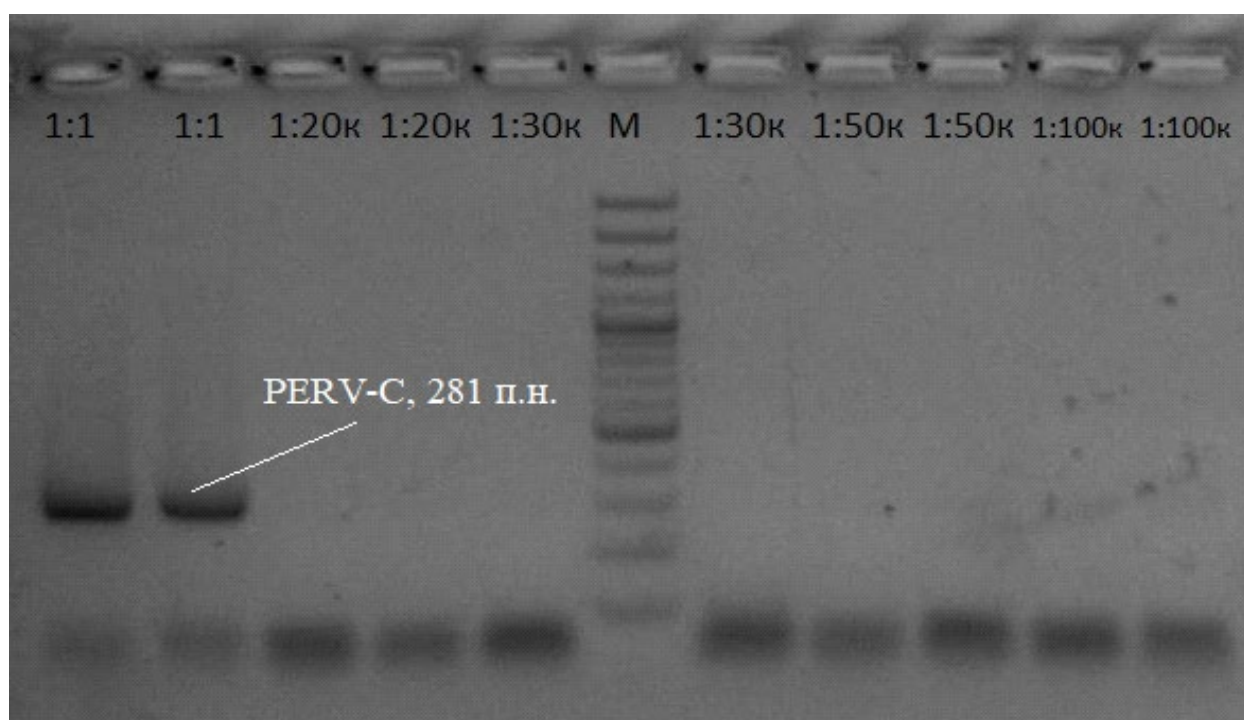


Рис. 3.10. Електрофорез у 2% агарозному гелі продуктів мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin. М – маркер молекулярного розміру, 1:1 – 1:100к – продукти мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin свиней породи в'єтнамський мейшан за різної концентрації ДНК.

Таким чином, показано, що розведення вихідного зразку ДНК (1:1-152 нг/мкл) до 1:10000 (152×10^{-4} нг/мкл або 15,2 пг/мкл) є гранично допустимим для можливості детекції мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin методом горизонтального електрофорезу у 2% агарозі.

На основі отриманого значення мінімально допустимої концентрації ДНК для мультиплекс ПЛР PERV-C – α -Actin було розраховано значення «Genome copy number» (мінімальна кількість копій ПЛР-продукту для його детекції):

$$\text{Genome copy number} = \frac{\text{amount of genome } (\mu\text{l}) \times \text{Avogadro constant } (\text{mol}^{-1})}{\text{length of DNA (bp)} \times 10^6 \times 650} =$$

$$\frac{152 \times 10^{-4} \times 6.022 \times 10^{23}}{2,8 \times 10^9 \times 10^6 \times 650} = 5 \times 10^3.$$

Отже, мінімально необхідна кількість копій ПЛР-продукту системи PERV-C – α -Actin для візуалізації методом електрофорезу у 2% агарозі складає - 5×10^3 .

3.2.2. Створення діагностичної системи для визначення носіїв ендогенного ретровірусу *PERV-A*. Використовуючи підхід щодо створення діагностичної системи для визначення носіїв ендогенного ретровірусу *PERV-C*, було також оптимізовано техніку ДНК-типування за визначення ретровірусу *PERV-A*. Тому далі будуть наведені остаточні дані та параметри щодо визначення носіїв ретровірусу *PERV-A*.

Відповідно до структури праймерів, що використовувались, F- TCCGTGCTTACGGGTTTTAC та R-TTGCCAATCTTTCCATCTCC розраховано середню температуру випалювання, яка становила 60°C. Виходячи з цього програма ампліфікації містила такі показники: 95°C – 2 хв.; 35 циклів: 95°C – 30 с, 60°C - 30 с, 72°C – 3 хв, 72°C – 5 хв.

На рисунку 3.11 наведено типовий результат електрофоретичного розділення у 2% агарозному гелі.

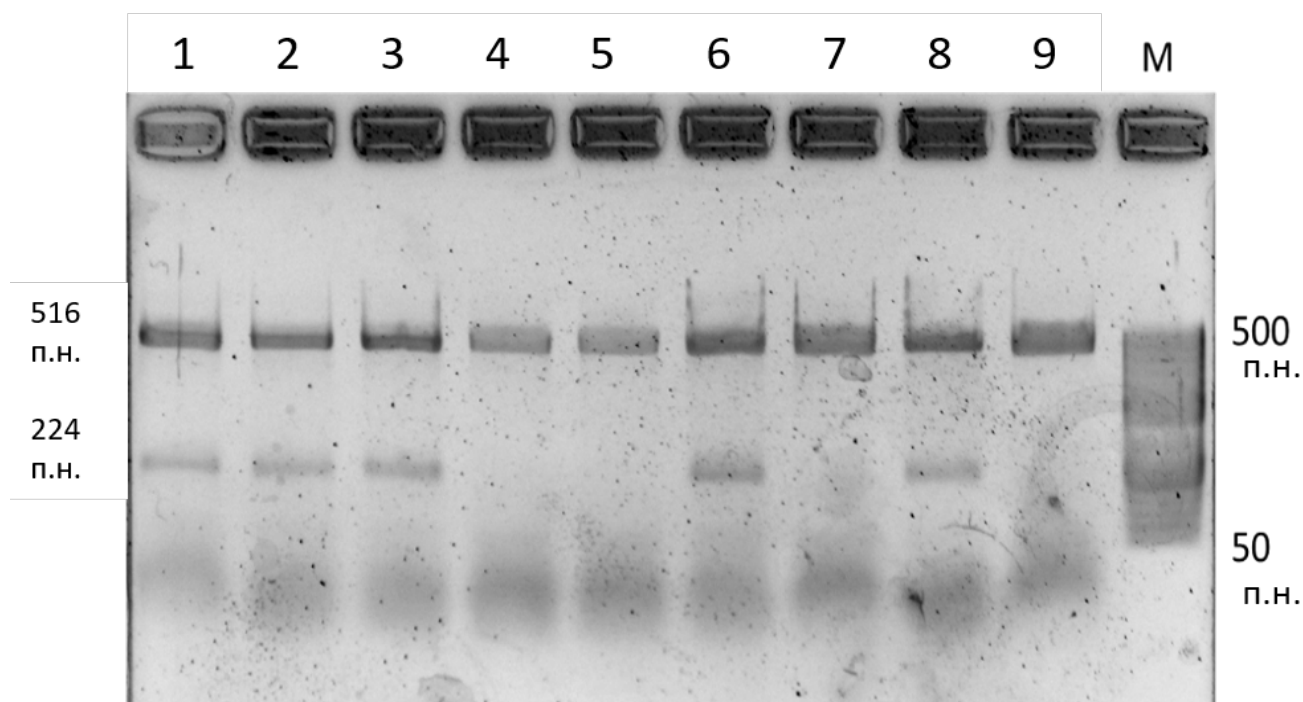


Рис. 3.11 Електрофорез у 2% агарозному гелі продуктів мультиплекс ПЛР *PERV-A* – α -Actin (LAPC). М – маркер молекулярної маси (50 bp DNA Ladder (from 50 to 500bp)), 1-3, 6, 8 – продукти мультиплекс ПЛР *PERV-A* + α -Actin (LAPC), 4, 5, 9 – зразки у яких відсутній ген *PERV-A*. ДНК свиней миргородської породи.

Схема компонентного складу реакційної суміші для проведення ампліфікації фрагменту 224 п.н. ретровірусного гена свиней *PERV-A* наведена для об'єму 15 мкл реакційної ПЛР суміші в якій в якості маркера ампліфікації використовувалися праймери для синтезу фрагменту 516 п.н. гену α -Actin (LAPC) (табл.3.4).

Розділення продуктів ПЦР як і в попередньому випадку проводили у 2% агарозному гелі, з нанесенням 10 мкл ПЛР продукту та 3 мкл барвника (бромфеноловий синій/ксилолціанол). Тривалість проходження електрофорезу становить близько 30 хв за потужності електричного поля у 12Вт.

Таблиця 3.4

**Компонентний склад реакційної суміші
для проведення ампліфікації фрагменту ретровірусного гена
свиней *PERV-A***

Компоненти реакційної суміші	Кількість, мкл
H ₂ O	7
10xPCR-buf,	1,6
dNTP	1,6
MgCl ₂ ,	1,3
PrLAPC-FW	0,6
PrLAPC-RV	0,6
PrPERV-A- FW	0,6
PrPERV-A-RV	0,6
TaqPol	0,1
DNA	1
Загальний об'єм	15

3. 3 Розповсюдження ендемічних ретровірусів PERV підтипів А і С у геномах свиней українських порід

3.3.1. Генотипова структура мікропопуляцій свиней вітчизняних порід за локусом PERV-C. Відомо, що використання тканин від свиней-носіїв вірусу *PERV-C* є небезпечним для людини у ксенотрансплантації. Нами проведено аналіз частоти розповсюдження С підтипу *PERV* у свиней з

використанням власної методики визначення *PERV-C* варіанту ретровірусу свиней (рис.3.12).

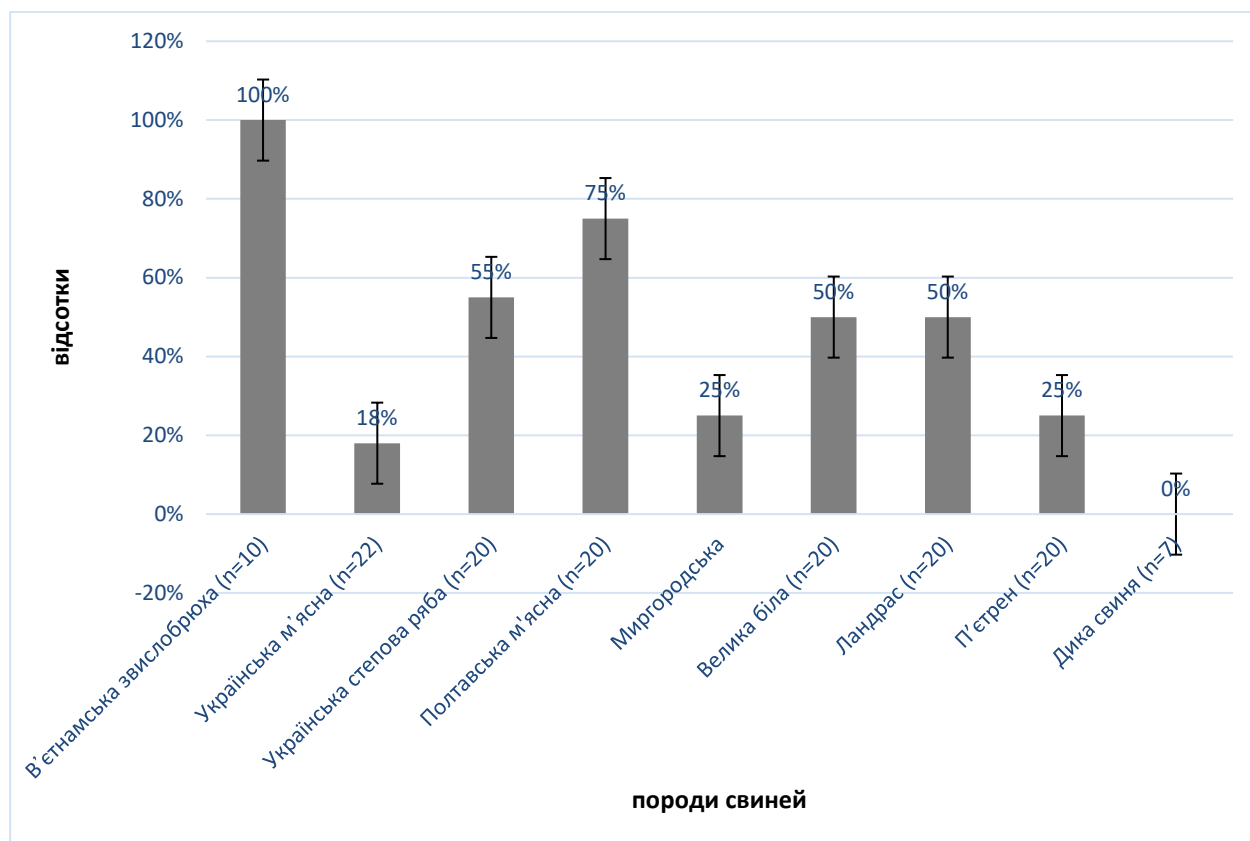


Рис. 3.12. Розповсюдження підтипу ретровірусу *PERV-C* у вибірках свиней вітчизняних і зарубіжних порід

Найменшою частотою носіїв геномів ретровірусів *PERV-C* характеризувалися субпопуляції свиней **української м'ясної** (18%) і **миргородської** (25%) порід та породи **п'єтрен** (25%). У той же час вірус *PERV-C* виявлено у всіх досліджених свиней в'єтнамської вислобрюхої породи. Високий рівень розповсюдження цього підтипу ретровірусу спостерігали у полтавській м'ясній породі; у половини свиней порід українська степова ряба, ландрас і велика степова біла виявлено геном *PERV-C*. Наші дані, загалом, підтверджують результати, отримані іншими авторами про розповсюдження *PERV-C* у популяціях свиней сальних порід [160] — у в'єтнамській вислобрюхій і українській степовій рябій, які належать

до порід зазначеного напрямку продуктивності, частота становила 100% та 55%, відповідно. Однак, слід зауважити, що різниця між частотами *PERV-C*, які зустрічаються в досліджуваних субпопуляціях, не завжди статистично підтверджувалася.

Високий відсоток тварин-носіїв ретровірусу С підтипу вище наведених порід свиней ускладнює відбір тварин, придатних для створення спеціалізованих ліній свиней для біомедичних цілей. На противагу у автохтонних малочисельних породах кількість тварин-носіїв ретровірусу С підтипу сягала: миргородській-25%, українській м'ясній-18% та п'єтрен-25%. Повністю вільними від ретровірусу *PERV-C* виявились дикі свині. Виявлена нами найбільша кількість тварин, вільних від ретровірусу *PERV-C*, у представників української м'ясної породи – 82%, що поряд із мінімальною кількістю схильних до стресу тварин (4,55% з генотипом *RYRI^{Nn}*) виводить саме цю вітчизняну породу у ряд найбільш перспективних генотипів для потреб ксенотрансплантації. Перспективними для потреб ксенотрансплантації також можуть вважатися породи свиней п'єтрен та миргородська зі достатньо високим відсотком тварин, вільних від ретровірусу *PERV-C*.

Очевидно, що висока частота підтипу С ретровірусу у полтавській м'ясній породі пов'язана із суттєвим впливом на формування її генофонду вихідної породи – великої білої, що використовувалася в якості як материнської, так і батьківської форм. Проведене нами дослідження також підтверджує тезис інших науковців про низьку розповсюдженість *PERV-C* у тварин спеціалізованих м'ясних генотипів та їх найбільшу наближеність за цим показником до дикого європейського кабана.

У породах великої білої та ландрас виявлено по 50% таких тварин. Високий відсоток тварин-носіїв ретровірусу С підтипу вище наведених порід свиней ускладнює відбір тварин, придатних для створення спеціалізованих ліній свиней для біомедичних цілей. На противагу в автохтонних малочисельних породах кількість тварин-носіїв ретровірусу С підтипу сягала: миргородській – 25%, українській м'ясній – 18% та п'єтрен – 25%. У

субпопуляції дикої свині носіїв ретровірусу PERV-C не виявлено, що погоджується з даними [160] про їх відсутність серед свиней «дикого типу».

Виходячи із отриманого результату дослідження розповсюдження гаплотипу *PERV-C* у свиней, що розводяться на території України, можна відмітити важливу закономірність – найвища концентрація гаплотипу ретровірусу була властива тваринам азійського походження (в'єтнамська вислобрюха) та українській степовій рябій, великій білій, ландрас і полтавській м'ясній породам.

Отже, виходячи з результатів молекулярно-генетичного аналізу за маркерами *PERV-C* найбільш придатними для розведення з метою використання у біомедичних цілях виявилися свині спеціалізованих м'ясних порід, за виключенням полтавської м'ясної та ландрас.

3.3.2 Генотипова структура мікропопуляцій свиней вітчизняних порід за локусом PERV-A. Аналіз наявності геному вірусів *PERV* підтипу А у субпопуляціях свиней досліджуваних порід також виявив різну їх частоту (рис. 3.13).

Так, встановлено, що найбільшою часткою тварин із ретровірусом *PERV-A* характеризувалися полтавська м'ясна, п'єтрен та українська м'ясна породи свиней із 95%, 80% та 73%, відповідно. Приблизно на однаковому рівні була кількість тварин із наявністю ретровірусу підтипу А у свиней порід миргородська та велика біла, з частотою 68% та 65%, відповідно. Це постійно підкреслює вплив великої білої породи на формування у селекційному процесі миргородської. У свиней породи в'єтнамська вислобрюха стовідсотково виявили ретровірус *PERV-A*.

У особин, що представляють групу **дикого кабана, породи ландрас і українську степову рябу** *PERV-A* зустрічається з відносно низькою частотою, у той час, коли всі свині в'єтнамської вислобрюхої породи були носіями цього вірусу. У полтавській м'ясній породі його частка сягала 90%,

дещо меншою вона встановлена у субпопуляціях миргородської і великої білої порід.

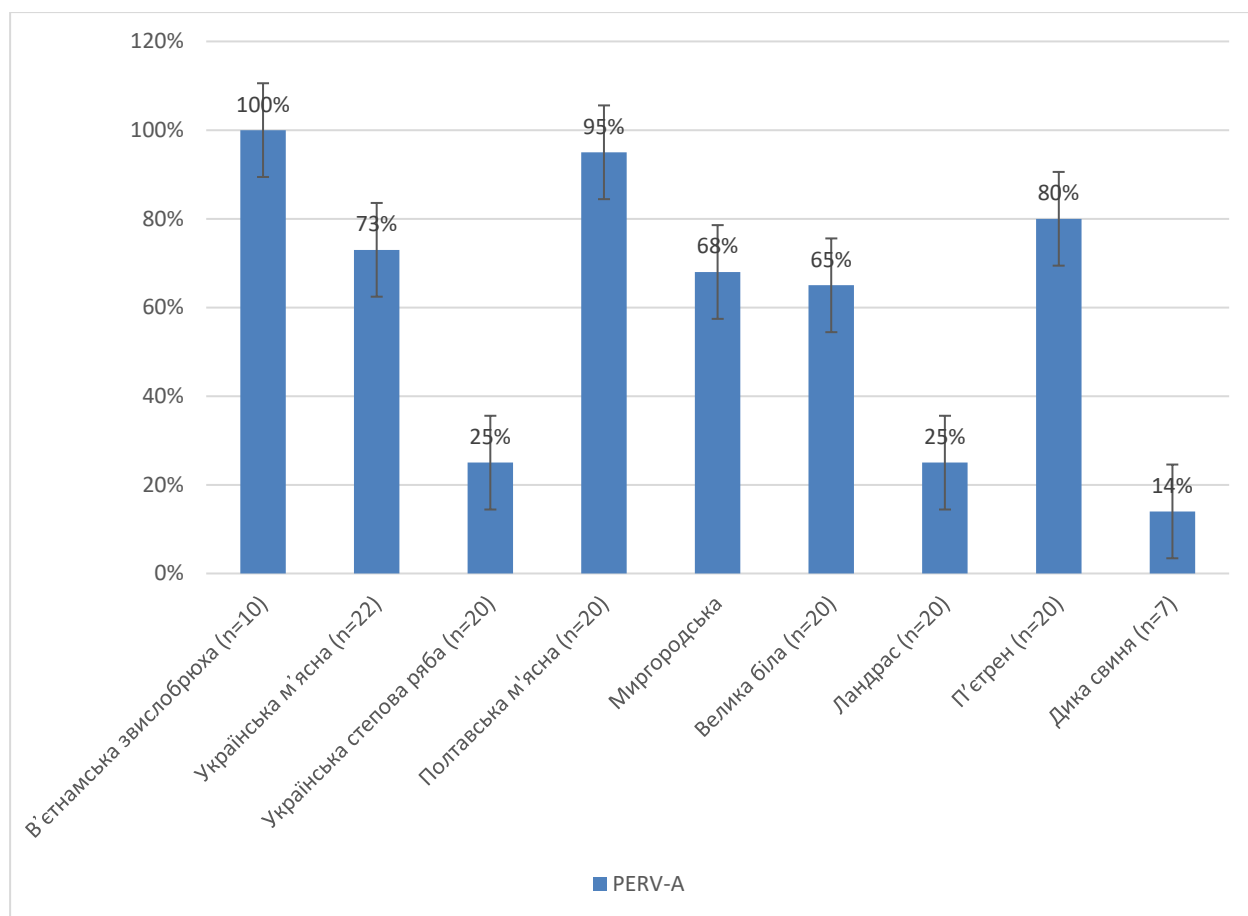


Рис. 3.13 Розповсюдження підтипу ретровірусу *PERV-A* у вибірках свиней вітчизняних і зарубіжних порід

Виходячи з результатів молекулярно-генетичного аналізу за маркером *PERV-A* не прослідковується тенденція до використання у біомедичних цілях свиней спеціалізованих м'ясних порід. Найбільш придатними для розведення у біомедичних цілях виявилися свині породи **українська степова ряба та ландрас**, що належать до різних напрямків продуктивності.

Примітно, що найменшою частотою носіїв обох підтипів вірусу характеризувалися дикі свині. Навпаки, у в'єтнамській вислобрюхій породі всі тварини несли обидва геноми. Також з високими частотами зустрічались віруси *PERV* обох підтипів у геномах тварин із субпопуляції полтавської м'ясної породи.

3.3.3. Ендогенні ретровіруси *PERV* A/C у геномах свиней українських порід та їх зв'язок з рівнем осалюваності туш. Стовідсоткова наявність ретровірусів *PERV* двох підтипів встановлено в проді в'єтнамська вислобрюха, дещо менша (75%) – у свиней породи полтавська м'ясна. Повністю вільними від обох підтипів ретровірусу є дикі свині, 35 % вільних – ландрас і 30% – велика біла і українська степова ряба (табл. 3. 5).

Згідно наукової гіпотези [160], підвищене відкладення жиру у свійських свиней, порівняно із дикими чи ранніми domestикованими формами – генетична аномалія, яка могла бути викликана порушенням структури генів кількісних ознак внаслідок вставки ретровірусу *PERV*.

Таблиця 3.5

Тварини з ретровірусом *PERV* типів А та С

Породи свиней	З обома типами		Повністю вільні	
	Частка від загальної кількості	%	Частка від загальної кількості	%
Миргородська	6/40	15	9/40	23
В'єтнамська вислобрюха	10/10	100	0/10	-
Українська м'ясна	3/22	14	5/22	23
Українська степова ряба	2/20	10	6/20	30
Полтавська м'ясна	15/20	75	1/20	5
Велика біла	9/20	45	6/20	30
Ландрас	2/20	10	7/20	35
П'єтрэн	3/20	15	1/20	5
Дика свиня	0/7	-	6/7	86

Для перевірки цієї гіпотези було проведене визначення наявності гаплотипу *PERV-C* у тварин миргородської породи племзаводу ім. Декабристів Миргородського району Полтавської області із визначеною зажиттєво товщиною шпику за допомогою шпикоміру (табл.3.5) на рівні 6-7 хребців.

Групи формувалися за принципом пар-аналогів із рівномірним вибором до груп досліду представників різних генеалогічних родин, свині перебували в однакових умовах контрольного вирощування, товщина шпику вимірювалася при досягненні тваринами ваги 100 кг.

Таблиця 3.5.

Результати визначення товщини шпику у свиней миргородської породи, залежно від *RYR-1* генотипу та гаплотипу *PERV-C*, *PERV-A*

Кличка	№	Товщина шпику	<i>PERV-C</i>	<i>PERV-A</i>	<i>RYR-1</i>
1.Сорока	1280	29	-	+	NN
2.Цитрина	1120	28	-	+	NN
3.Цитрина	12	28	-	+	NN
4.Сорока	32	30	-		NN
5.Елла	640	28	+	+	NN
6.Сойка	748/644	29	-	+	NN
7.Сойка	502	26	-		NN
8.Русалка	72	<u>26</u>	+	+	NN
9.Сойка	420	30	-	+	NN
10.Ласкава	62	28	-		NN
11.Сорока	220	29	-	+	NN
12.Сойка	434	27	-	+	NN
13.Русалка	570	28	-	+	NN
14.Сорока	908	28	+		NN
15.Сорока	894	28	-	+	NN
16.Сойка	270	31	-	+	NN
17.Зорька	1010	<u>25</u>	-	+	NN
18.Сорока	590	27	+	+	NN
19.Цитрина	14	29	-	+	NN
20.Ласкава	2668	30	-		NN
21.Русалка	296	<u>45</u>	+		NN
22.Русалка	302	38	-		NN
23.Смородина	308	36	-	+	NN

Продовження таблиці 3.5					
24.Елла	602	34	+	+	NN
25.Ласкава	328	33	-	+	NN
26.Смородина	164	34	-	+	NN
27.Зорька	168	39	-		NN
28.Сойка	236	39	-	+	NN
29.Сойка	238	34	-		NN
30.Сорока	142	34	-	+	NN
31.Ласкава	154	<u>40</u>	-	+	NN
32.Зорька	436	35	+		NN
33.Цитрина	374	38	-		NN
34.Сойка	450	33	-	+	NN
35.Сорока	386	35	-		NN
36.Конвалія	400	34	+	+	NN
37.Сорока	904	36	+	+	NN
38.Русалка	32	37	-	+	NN
39.Смородина	1216	37	+		NN
40.Смородина	1242/1201	34	-	+	NN

Після встановлення гаплотипу тварин за присутності чи відсутності ретровірусу підтипу С, визначення генотипу за геном рецептора ріанодину, вибірка свиней із 40 голів була розподілена на дві групи дослідів – І група, тварини із наявністю в геномі *PERV-C*, ІІ група – тварини у яких даний підтип ретровірусу відсутній (табл.3.6).

Таблиця 3.6.

Порівняння значення зажиттєвого вимірювання товщини шпику у тварин миргородської породи, залежно від присутності *PERV-C* у їх геномі

Групи дослідів	N	Генотип <i>PERV-C</i>	Товщина шпику, мм	P-значення
I	10	+	33,00 ± 1,96	0,5
II	30	-	31,97 ± 2,57	

Згідно отриманих середніх значень, показник товщини шпику для тварин І групи дослідів склав 33,00 ± 1,96мм проти 31,97 ± 2,57мм. Середнє значення товщини шпику у тварин другої групи дослідів був несуттєво

нижчим, а різниця між порівнюваними величинами була статистично не вірогідною. Причиною такого результату, безперечно, є надале розподілення тварин між двома групами дослідів, що було можливим лише після проведення визначення *PERV-C* гаплотипу. Привертає увагу і доволі високе значення статистичного відхилення від середнього, яке складало $\pm 1,96$ для тварин першої і $\pm 2,57$ для другої групи дослідів.

Отже, відсутність вірогідної різниці між тваринами дослідних груп може бути наслідком обмеженої кількості тварин та нерівноваги за зчепленням внаслідок тривалого використання тварин іншої породи (переважно – п'єтрен) для поліпшення м'ясних якостей миргородської породи свиней. Для остаточного визначення існування зв'язку *PERV*-гаплотипів із продуктивними та адаптивними якостями свиней необхідне проведення подальших досліджень на більш розширених вибірках тварин, із залученням представників інших порід та генотипуванням особин за іншими підтипами ретровірусу – *PERV-A*, *PERV-B* та комбінаціями різних гаплотипів (A, B, C).

Асоціативний аналіз проведено на групі свиней миргородської породи. Його метою було встановлення зв'язку між наявністю в геномі тварин ДНК ретровірусу *PERV* і товщиною спинного жиру. Результати аналізу представлені у таблиці 3.7.

Відзначимо, що серед тварин із *PERV-C* значення товщини шпику коливалися від 26 до 45 мм у свинок родини Русалки. Серед свиней із відсутністю *PERV-C*, товщина шпику варіювала від 25 мм у тварини №1010 з родини Зорьки до 40 мм — в особини №154 з родини Ласкавої. Таким чином, можна відзначити значні межі варіювання досліджуваної ознаки навіть в межах однієї родини, що свідчить про формальне віднесення тварин до певної родини і відсутності спрямованої селекції всередині генеалогічних родин та їх генетичну гетерогенність.

Таблиця 3.7.

**Корелятивний зв'язок між наявністю вірусів у геномі свиней
миргородської породи і товщиною спинного жиру**

Присутність вірусів в геномі тварин	Номер групи	Товщина шпику, мм	Коефіцієнт кореляції (r)
<i>PERV-C</i> ⁺	10 (I)	33,00 ± 1,96	0,153
<i>PERV-C</i> ⁻	30(II)	31,97 ± 2,57	
<i>PERV-A</i> ⁺	27(III)	31,33 ± 0,78	0,083
<i>PERV-A</i> ⁻	13(IV)	34,08 ± 1,51	
<i>PERV-A</i> ⁺ чи <i>C</i> ⁺	31(V)	31,97 ± 1,72	0,127
<i>PERV-A</i> ⁻ / <i>C</i> ⁻	9(VI)	33,11 ± 1,59	
<i>PERV-A</i> ⁺ + <i>C</i> ⁺	6(VII)	30,83 ± 1,23	0,010
<i>PERV-A</i> ⁻ / <i>C</i> ⁻	8(VIII)	32,50 ± 1,28	

Аналіз асоціації товщини шпику у тварин миргородської породи з присутністю в їх геномі *PERV-C*, *PERV-A* не виявило статистично підтверджених результатів. Можна вести мову лише про певну тенденцію до такої асоціації щодо *PERV-A*. У цьому випадку свині, в геномі яких був відсутній *PERV-A*, характеризувалися більшою товщиною шпику. Можливо, при збільшенні кількості дослідних тварин цей зв'язок буде мати статистичне підтвердження. Але це протирічить з припущенням про позитивний зв'язок між присутністю в геномі вірусу і рівнем осаленості туші.

Отримані нами результати дослідження підтверджують гіпотезу про збільшення товщини шпику у процесі доместикації свиней, у геномі яких присутній ретровірус *PERV*. Інтеграція останнього стала причиною мутації в QTL жировідкладання, що призвело до збільшення осаленості туш і ця ознака могла бути підхоплена селекцією у процесі створення порід. Однак очевидного зв'язку розповсюдження вірусу в сучасних породах різного

напрямую продуктивності не встановлено. Також відсутній зв'язок між одним з основних показників осаленості туші і присутністю в геномі особини ДНК *PERV*.

Висновок за підрозділом. Проведено аналіз розповсюдження підтипу С ретровірусу *PERV* у свиней з використанням власної методики визначення генетичного матеріалу ретровірусу свиней. Найменшою частотою носіїв геномів ретровірусів PERV-C характеризуються свині досліджених груп української м'ясної і миргородської порід та породи п'єтрен. Тварин із ретровірусом *PERV* -A найбільше виявлено у породах полтавська м'ясна, п'єтрен та українська м'ясна (95%, 80% та 73%).

Розроблена діагностична система скринінгу ендемічних ретровірусів свиней підтипу С (PERV-C) і підтипу А (PERV-A) за допомогою мультиплексної ПЛР-SSP для виявлення особин із зниженим ризиком біологічної небезпеки при їх застосуванні для біомедичних цілей. Проведена лабораторна оптимізація методики виділення ДНК, визначено оптимальні параметри реакційної суміші і режиму ампліфікації для забезпечення специфічного синтезу цільових фрагментів ПЛР і встановлено чутливість та специфічність розробленої тест-системи PERV-C – α -Actin. Оптимізація техніки генотипування відпрацьована на свинях порід в'єтнамський мейшан та велика біла.

Результати досліджень, подані у даному підрозділі, опубліковані у наукових працях [175, 180, 182, 183, 184, 185, 187, 188].

3.4. Імуногенетична структура свиней вітчизняних порід

З метою вивчення генетичної структури свиней вітчизняних порід нами проведені імуногенетичні дослідження за групами крові. Завданням дослідження було виявлення маркерних алелів і рівня гомозиготності за системами груп крові, що мало б значення для моделювання різних процесів при ксенотрансплантації.

Нами проведено дослідження референтної групи тварин за комплексом імуногенетичних маркерів з метою виявлення придатності для використання окремих особин у біомедичних цілях. Для експерименту були обрані популяції свиней української м'ясної породи свиней племінного репродуктора Державне підприємство «Дослідне господарство «Гонтарівка» Інституту тваринництва НААН» та свиней миргородської породи Державне підприємство «Дослідне господарство імені Декабристів Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН».

За результатами проведеного імуногенетичного аналізу двох порід було визначено, що кожна з них характеризується своєрідним імуногенетичним профілем, що пов'язано як з породними особливостями та відмінностями, так і методами їх розведення. Різниця між розподілом переважної кількості алелів груп крові є статистично значущою, що наочно відбивається на побудованих діаграмах. Діаграми порівняльної характеристики імуногенетичного профілювання миргородської та української м'ясної порід наведені на рисунку 3.14 а, б.

За системою А груп крові, що є аналогом системи АВО людини, частота алеля А-, яка визначає придатність свиней для біомедичного використання, у тварин обох порід сягала суттєвих значень 88,75-86,88% (для української м'ясної та миргородської відповідно) із незначущим переважанням цього показника у свиней української м'ясної породи (табл. 3.8). Привертає увагу суттєва різниця у розподілі алеля В^b, частота якого у свиней української

м'ясної породи не перевищує значення 0,0250 проти 0,1437 у представників миргородської породи ($p < 0.01$) (рис. 3.14а).

Частота F^a алеля, за численними літературними даними, пов'язана із впливом генотипу дикого кабана і сучасної породи ландрас на формування генетичної структури досліджуваних порід [145].

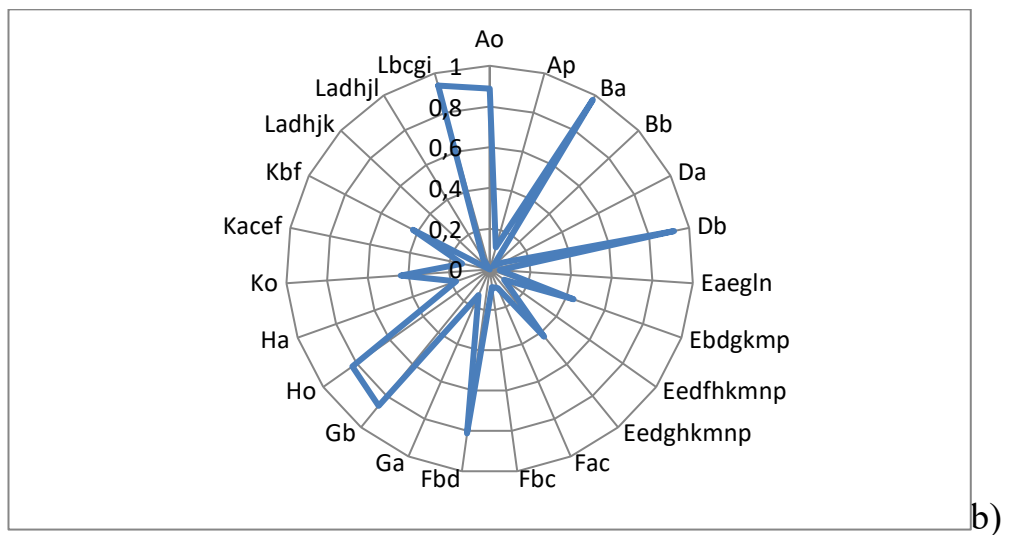
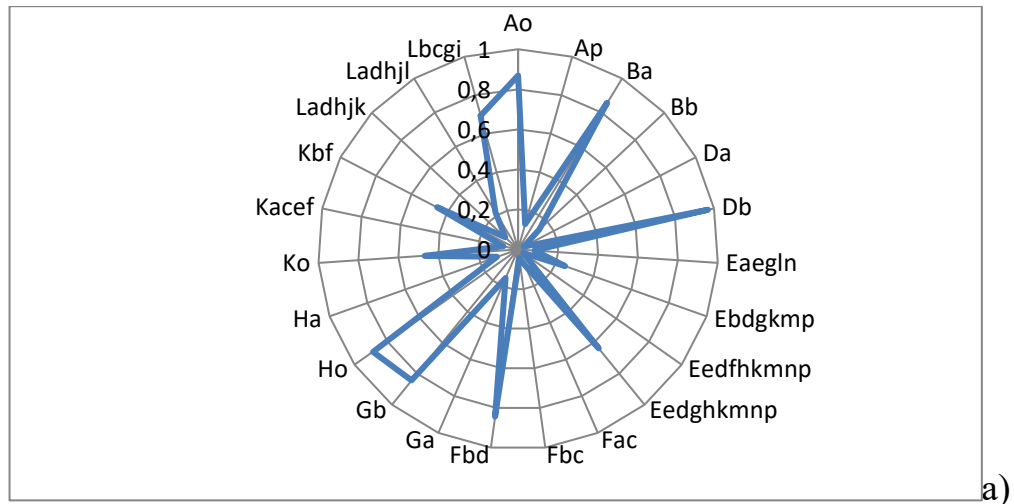


Рис. 3.14. Діаграми імуногенетичних профілів миргородської (а) та української м'ясної порід свиней (b)

Проте для тварин української м'ясної породи більш властиве розповсюдження альтернативного варіанту алеля – F^{bd} , а алельний варіант F^{bc} у особин цієї породи зустрічається вдвічі частіше (0,0875), ніж у миргородських свиней (0,0437) ($p < 0.05$).

Порівнювані породи свиней вирізняються і своєрідним розподілом алелів за системою груп крові К. За частотами розподілу K^- і K^{bf} свині миргородської і української м'ясної порід майже не відрізняються, проте частота алеля K^{acef} у особин української м'ясної породи зустрічається вдвічі частіше (0,1375), ніж у свиней миргородської породи (0,0750) ($p < 0.05$).

Система Н груп крові переважною кількістю імуногенетиків і практичних селекціонерів асоціюється з продуктивними якостями свиней, насамперед плодючістю. У практичному відношенні важливим є факт генетичного зчеплення локусу Н системі груп крові, з ізоферментами ланки жирового обміну РНІ и 6-PGD, а також стресочутливістю (ген рецептора ріанодину) та якістю м'яса [145]. Частота важливого з селекційної точки зору алеля Н є високою для української м'ясної та миргородської порід із несуттєвим, статистично невірогідним, переважанням цього показника у особин миргородської породи (0,8875 проти 0,8250).

Найсуттєвішою різницею між миргородською та українською м'ясною породами спостерігалася за високополіморфними системами груп крові – L та E. Система L є однією з найскладніших поліалельних систем, за якою простежується наявність неоднорідності концентрації алелів. Алель L^{adhjk} можна вважати маркерною для миргородської породи свиней, оскільки її концентрація в дослідженій популяції тварин складає майже 8,75% при повній його відсутності в особин української м'ясної породи ($p < 0.05$).

**Розподіл алелів у локусах груп крові української м'ясної та
миргородської порід**

Локус	Алелі	Частота	
		Українська м'ясна	Миргородська
A	-	0,8875	0,8688
	p	0,1125	0,1313
B	a	0,9750	0,8562
	b	<u>0,0250</u>	<u>0,1437**</u>
D	a	0,0750	0,0313
	b	0,9250	0,9688
E	aegln	0,0500	0,0813
	bdgkmp	<u>0,4375</u>	<u>0,2500*</u>
	edfhkmnp	<u>0,0875</u>	<u>0,0313*</u>
	edghkmnp	<u>0,4250</u>	<u>0,6375*</u>
F	ac	0,1000	0,0875
	bc	<u>0,0875</u>	<u>0,0437*</u>
	bd	0,8125	0,8438
G	a	0,1375	0,1563
	b	0,8625	0,8438
H	-	0,8250	0,8875
	a	0,1750	0,1125
K	-	0,4375	0,4688
	acef	<u>0,1375</u>	<u>0,0750*</u>
	bf	0,4250	0,4562
L	adhjk	0,0000	<u>0,0875*</u>
	adhjl	<u>0,0625</u>	<u>0,2188**</u>
	bcbgi	<u>0,9375</u>	<u>0,6937*</u>

Примітка: різниця частот розподілу алелів вірогідна за критерієм Фішера: $p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$

Це може бути пов'язане з адаптивними властивостями даного алелю і асоціативним залученням його в селекційний процес, або ж із використанням обмеженої кількості плідників, гомозиготних за цим алелем. За частотою алеля L^{adh1} різниця між порівнюваними породами була значною і статистично значущою: 0,0625 у особин української м'ясної проти 0,2188 у свиней миргородської породи ($p < 0.01$).

Система E груп крові відповідає більш ніж за 50% реалізації генетичної інформації, пов'язаної з поліморфізмом локусів еритроцитарних антигенів. Поліморфна E-система груп крові представлена 4 алелями. Пріоритетним є алель E^{bdgkmp} , що визначає придатність свиней до ксенотрансплантації і відповідає системі резус-фактора Rh людини. Частота алеля E^{bdgkmp} є найбільшою серед спектру антигенів цієї генетичної системи і дорівнює у свиней української м'ясної породи 0,4375, що вірогідно переважає цей показник у миргородської (0,2500, $p < 0.05$).

Відомо, що селекція за м'ясними якостями підвищує у популяції концентрацію алельних генів E^{def} , проте селекція на життєздатність і резистентність призводить до накопичення E^{deg} алелів [160]. Частоти E^{def} алеля є доволі низькими у вибірці свиней миргородської породи (0,0313), а в особин української м'ясної породи, у зв'язку з інтенсивною селекцією на м'ясність, значення цього показника майже вдвічі вище і становить 0,0875 ($p \leq 0,05$).

Показником кращої життєздатності та адаптивності свиней миргородської породи є висока частота E^{deg} алеля – 0,6375, що статистично вірогідно переважало значення частоти цього антигена у тварин української м'ясної породи – 0,4250 ($p \leq 0,05$). Даний алель може розглядатись як генетичний маркер, який визначає підвищену життєздатність тварин.

Привертає увагу дещо вища частота алелю $aegl n$ (0,0813) у свиней миргородської породи порівняно із таким показником у свиней української м'ясної, що свідчить про присутність в генотипі предків з інших порід.

Відмітимо, що відбір свиней за бажаними для ксенотрансплантації алелями груп крові з переведенням їх до гомозиготного стану: $A^{-/-}$ та $E^{bdgkmp/}$

bdgkmp неминуче призведе до погіршення адаптивних, насамперед, репродуктивних якостей тварин і створить суттєві проблеми щодо вирощування таких особин в умовах спеціалізованих віваріїв.

За моноалельною системою А різниця між групами свиней української м'ясної і миргородської була незначною.

Встановлено [161], що свиноматки з A^{cp} аллелем за першим опоросом поступаються за кількістю живих поросят маткам з негативним генотипом за цією системою в середньому на 0,5 поросяти ($p < 0,05$). Кнури з $A^{cp/-}$ генотипом мали більш високі показники об'єму еякуляту на 18 мл ($p < 0,01$), концентрації спермій у еякуляті на 4,4 млрд ($p < 0,001$), концентрацію спермій у 1 мл на 4,2 млн., порівняно із негативним генотипом за цією системою [161]. Таким чином, відбір свиней за $A^{-/-}$ генотипом при створенні спеціалізованих ліній для біомедичних цілей може привести до погіршення репродуктивних якостей кнурів, насамперед показників спермопродукції, а переведення в гомозиготний стан алелів bdgkmp Е системи груп крові – до зниження загального рівня адаптивності.

Групи крові входять до єдиного коадаптованого комплексу генів, що формується при спрямованому доборі. Зв'язок буде посилюватися при зменшенні відстані між генами кількісних ознак і групами крові. Селекційний процес призводить до зміни частот алелів і генотипів та втрат встановлених між ними генних комплексів, порушення негативних ефектів коселекції, що може бути використано і при створенні спеціалізованих ліній свиней – біомедичних моделей.

Молекулярно-генетична характеристика тварин за поліморфними системами груп крові дозволяє перед проведенням селекційних заходів оцінити ступінь генетичної гетерогенності популяцій, що, власне, і створює можливості для добору. Результати популяційно-генетичного аналізу свиней української м'ясної і миргородської порід наведені в таблиці 3.9. Відзначимо, що найвищі рівні гомозиготності тварин української м'ясної породи спостерігалися за В, К і L системами груп крові, а найвищі ступені реалізації

генетичної інформації реалізовувалися за рахунок поліморфізму E і K систем локусів еритроцитарних антигенів (63% і 62%, відповідно).

Найбільш генетично мономорфною миргородська порода була за D, H і K системами груп крові (із рівнями фактичної гомозиготності – 0,9375, 0,7750, 1,000, відповідно), а висока ступінь реалізації генетичної інформації для вибірки тварин цієї породи була забезпечена поліморфізмом локусів E, K і L груп крові (53, 57, 47%, відповідно). Відзначимо, що фактичний рівень гомозиготності загалом за 9 дослідженими системами груп крові у свиней обох порід майже оптимальний і, незважаючи на інтенсивну селекцію, обмежену ефективну чисельність популяцій, наявність помірного інбридингу складає 53,89% для української м'ясної та 49,44% для миргородської.

Серед 80 протестованих за імуногенетичними маркерами тварин миргородської породи лише 24 особини були відповідні встановленим критеріям відбору – гомозиготи $A^{-/-}$ та $E^{bdgkmp/bdgkmp}$. Діапазон визначених показників фактичної гомозиготності для відібраних за певними параметрами генотипу тварин коливався від 55,56% до максимального значення – 88,89%, переважно у свиноматок з родини Смородини, Русалки, Сороки і Сойки. Найвищий показник гомозиготності за 9 системами груп крові з урахуванням наявності модельного для біомедицини імуногенетичного профілю має кнур №303 з лінії Дніпра.

За даними молекулярно-генетичного аналізу визначено, що встановленим критеріям біомедичної моделі відповідають лише 13 особин української м'ясної породи. Серед тварин із максимальним показником фактичної гомозиготності виділено представників Церери і Цілини, причому Цілина 4092 була гомозиготною за всіма дослідженими системами груп крові – 100%. Кнури 8829721 Імперіал та 8829724 Рекс із значеннями фактичної гомозиготності за 9 системами груп крові 77,78 та 88,89% відповідно можуть бути потенційними плідниками в селекційних схемах із створення спеціалізованих ліній для біомедичного, а саме ксенотрансплантаційного призначення.

Таблиця 3.9

Показники генетичної мінливості свиней двох порід за локусами груп крові

Локус	Теоретично очікувана ступінь гомозиготності (Ca)	Фактична ступінь гомозиготності (H)	Ступінь реалізації генетич. мінливості (V, %)	Гомозиготність (%)	Теоретично очікувана ступінь гомозиготності (Ca)	Фактична ступінь гомозиготності (H)	Ступінь реалізації генетич. мінливості (V, %)	Гомозиготність, %
	Українська м'ясна				Миргородська			
A	0,8003	0,7750	20	78	0,7721	0,7375	23	74
B	0,9512	0,9500	5	95	0,7537	0,7125	25	71
D	0,8613	0,8500	14	85	0,9396	0,9375	6	94
E	0,3822	0,4000	63	40	0,4765	0,5000	53	50
F	0,6778	0,6250	33	63	0,7216	0,7125	28	71
G	0,7628	0,7250	24	73	0,7364	0,6875	27	69
H	0,7112	0,6500	29	65	0,8003	0,7750	20	78
K	0,3909	-1,000	62	0	0,4335	-1,000	57	0
L	0,8828	0,8750	12	88	0,5367	0,3875	47	39
Середнє	0,7134	0,5389	-	-	0,6856	0,4944	-	-

Нами досліджено поліморфізм 9 систем еритроцитарних антигенів і визначено специфіку імуногенетичних профілів української м'ясної та миргородської порід свиней. Отримані дані свідчать, що свині української м'ясної та миргородської порід мали найбільші відмінності у розподілі алелів за B, E, F, K, L системами груп крові із наявністю маркерного алеля L^{adhjk} у особин останньої ($p < 0,05$). Встановленим критерієм добору тварин за A і E системами груп крові, за результатами імуногенетичного аналізу відповідали 24 особини свиней миргородської та 13 особин української м'ясної породи.

Висновок за підрозділом. Імуногенетичними дослідженнями виявлено 24 особини (30%) миргородської та 13 особин (27%) української м'ясної породи із наявністю генотипів $A^{-/-}$ та $E^{bdgkmp/bdgkmp}$, що визначають придатність тварин до біомедичних досліджень, зокрема до ксенотрансплантації. За розподілом алелів за В, Е, F, К, L системами груп крові у свиней української м'ясної та миргородської порід встановлені відмінності ($p < 0,05$).

Результати досліджень, подані у даному підрозділі, опубліковані у наукових працях [176, 179].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Одним з перспективних напрямків трансплантології останнім часом вважається ксенотрансплантація – пересадка органів і тканин людині від тварини іншого біологічного виду. Найбільш імунологічно, фізіологічно та генетично близькими до людини є вищі примати і свині. Перевагами свиней для названої цілі, у порівнянні з приматами, є її широке розповсюдження, безпроблемне вирощування і утримання, схожість свинячих органів з людськими за розмірами і фізіологією, а також фінансові та етичні питання, що пов'язані з вилученням донорських органів [162]. В останні роки в багатьох країнах світу намітилася певна тенденція до швидкого розширення масштабів використання свиней в якості лабораторних тварин. Для зручності проведення досліджень в лабораторних умовах були виведені міні-свині, які не відрізняються від звичайних свиней за основними анатомо-морфологічними ознаками. Міні-свині є зручною моделлю у дослідженнях з фармакології, імунології, токсикології, дерматології, стоматології, радіобіології, лікування алкоголізму, ожиріння і вірусних захворювань [163].

Досягнення сучасної науки дозволяють сподіватися на те, що ксенотрансплантація через деякий період часу стане рутинним, звичайним методом медичної практики. У США, в лабораторії штату Міссурі уже в 2003 році було отримано клоновану міні-свиню із кличкою Голді [164]. Її поява є справжнім проривом у галузі генетики і трансплантології, оскільки ця тварина не містить генів, що призводять до відторгнення чужорідних тканин. Подальші експерименти з нокаутування генів гістосумісності у свиней дозволять подолати міжвидовий бар'єр і дають надію на продовження повноцінного життя мільйонам людей в усьому світі.

У світовій практиці при застосуванні свиней в медико-біологічних цілях використовують спеціально виведені лабораторні породи (в США –

гормельські, генфордські, пітманмурські, небраські, белтсвіллські білі, у Німеччині – геттенгенські, міні-леве, в Японії – оміні, в Китаї – XENO-1, в Росії – мінісибс та світлогірські міні-свині та ін.) [165, 166, 167]. Для медико-біологічного моделювання широко використовують дрібних аборигенних свиней різних країн (в США – юкатанських і американо-ессекських, у Франції – корсиканських, в країнах південно-східної Азії – кангаруських, китайських Лі Санг і ассамських) [168]. Через дефіцит лабораторних дрібних свиней часто доводиться вдаватися до використання звичайних домашніх свиней різних порід. Окрім цього, величина органів, структура тканин свійських свиней та їх функціональні особливості максимально наближені до анатомо-фізіологічних характеристик людини.

Наразі в Україні не існує жодної породи свиней, яка б використовувалася для біомедичних цілей. Проте склалася сприятлива ситуація для створення такої породи чи виведення спеціалізованої лінії через попит фармакологічних концернів на модельні біологічні об'єкти для дослідження механізмів дії сучасних медичних препаратів, відпрацювання методик проведення безкровних хірургічних операцій тощо. Виведення спеціалізованої лінії свиней для медико-біологічних потреб не є простим, оскільки пред'являє ряд вимог до відбору тварин. Свині повинні бути максимально гомозиготними за якомога більшою кількістю генів, володіти високою резистентністю, бути стресостійкими й адаптованими до умов утримання та годівлі в межах віварію. В Україні в якості вихідних форм при селекції спеціалізованих ліній і порід лабораторних тварин, призначених для біомедичних цілей, має місце використання аборигенних свійських порід свиней.

Нами розроблено алгоритм системи лабораторного оцінювання придатності свиней певних порід для потреб біомедицини, який складається із таких складових:

а) визначення стійкості свиней до стресових чинників (тестування за системою ріанодинового рецептора – RYR-1);

б) визначення наявності в їх геномі елементів ретровірусів, насамперед PERV;

в) оцінки імунологічного статусу з визначенням тварин бажаного генотипу;

г) пошук особин з високим ступенем гомозиготності за цільовими генотипами для мінімізації фенотипової гетерогенності в медичних експериментах.

Відомо, що підвищена чутливість свиней окремих порід до стресів (стресчутливість) стає все гострішою проблемою і в селекційній роботі, оскільки супроводжується значними економічними збитками для господарств [169]. За повідомленнями дослідників, спостерігається різний ступінь прояву стрес-синдрому у тварин різних порід, залежно від напрямку їх продуктивності [170].

Наше дослідження за ріанодинрецепторним геном показало, що свині великої білої, миргородської та полтавської м'ясної порід відповідають вимогам до спеціалізованих лабораторних об'єктів, що будуть утримуватися для проведення біомедичних процедур.

А розведення свиней породи п'єтрен та будь-яких поєднань з цією породою унеможлиблює використання таких тварин для біомедичних експериментальних робіт. Найбільш оптимальними у цьому аспекті є породи, популяції яких повністю позбавлені алелю *RYR1ⁿ*, оскільки із наукових джерел відомо, що тварини гетерозиготного генотипу реагують на стрес менш інтенсивно, ніж *RYR1ⁿⁿ*, тобто успадкування схильності до стресових факторів у свиней відбувається за неповного домінування нормального дикого алеля *RYR1^N*.

Виходячи з результатів нашого молекулярно-генетичного аналізу за маркерами *RYR1* встановлено, що бажаними для розведення з метою використання у біомедичних цілях є свині порід великої білої, в'єтнамської вислобрюхої та української м'ясної.

Міжнародна асоціація ксенотрансплантологів створила спеціальні керуючі принципи для застосування при пересадці клітин свиней у клінічних дослідженнях: ретельний скринінг вихідного стада свиней у відношенні PERV, вибір тварин із низькими рівнями експресії PERV-A, PERV-B і, найголовніше, ідентифікація особин, які не є носіями PERV-C [171]. Аналіз PERV у різних порід свійських свиней продемонстрував високу частоту виявлення PERV типів A і B в геномах переважної більшості досліджених тварин, проте досить часто виявляються свині у яких відсутній PERV типу C. Особливо це стосується аборигенних свійських порід свиней і диких кабанів [172], що може бути застосовано у програмах зі збереження їх генофонду шляхом використання в якості вихідних форм при селекції спеціалізованих ліній і порід лабораторних тварин, призначених для біомедичних цілей.

Експресія РНК PERV виявлена практично у всіх порід свійських свиней. Проте секвенування ДНК повного геному свині дозволить проводити відбір тварин-донорів зі зниженою інфекційною здатністю. Контроль за здатними до реплікації PERV може бути досягнутий за використання технологій ідентифікації критичних локусів ретровірусів свиней, визначення інтенсивності експресії та розробки методів їх нокауту.

Щоб виключити чи мінімізувати будь-який ризик інфекції PERV під час ксенотрансплантації людині, бажано відбирати свиней-донорів, у яких будуть відсутні всі тропні для людини PERV-C та найнижча експресія PERV-A. Експресія РНК PERV знайдена практично у всіх порід домашніх свиней [168]. Однак проведення полігеномного секвенування ДНК може допомогти охарактеризувати і відібрати тварин-донорів зі зниженою PERV.

Молекулярно-генетичний аналіз з визначення тварин-носіїв PERV-C показав суттєву відмінність досліджених порід за обраним маркером. Нашими дослідженнями становлено, що більшість тварин з **відсутністю ендogenous ретровірусу** свиней PERV-C характерна для порід м'ясного напрямку продуктивності. Так, вільними від вірусу виявились: в українській м'ясній породі — 82 % тварин, у породі п'єтрен — 75 %, ландрас — 50 %. На відміну

від свиней універсального (велика біла — 50 %, українська степова ряба — 45 %) та сального напрямів продуктивності (миргородська — 75%, в'єтнамська вислобрюха — 0 %).

Отримані результати досліджень показують, що серед вітчизняного поголів'я свиней є тварини, які не є носіями ендемічного ретровірусу свиней PERV-C, що створює сприятливі передумови для їхнього використання у ксенотрансплантації. Це такі породи як українська м'ясна, п'єтрен і миргородська.

Проведений нами молекулярно-генетичний аналіз за маркерами *PERV-A* та *PERV-C* показав різний розподіл частот із позитивним результатом на присутність ретровірусу свиней підтипу А та С, що ускладнює можливість відбору окремих порід свиней одразу за обома підтипами. Однак окремо за кожним маркером така можливість існує. Тому відбір тварин визначених кандидатних порід свиней направлений на елімінацію генів ретровірусу свиней підтипу А та С в перспективі надасть можливість створити спеціалізовані лінії свиней придатних до ксенотрансплантації.

Відпрацьована нами методика ідентифікації ендемічного ретровірусу свиней підтипів С і А для оцінки рівня біологічної безпеки потенційного донорського матеріалу, придатного для ксенотрансплантації від свиней до людини засвідчила такі результати: вільні від обох підтипів вірусу тварини виявляються в усіх досліджуваних групах. Найбільша їх відносна кількість спостерігалася в групі диких свиней (86%), найменша – в групах порід полтавської м'ясної і п'єтрен. Цей результат частково узгоджується з твердженнями про те, що підвищене відкладення жиру у свійських свиней, порівняно із дикими чи ранніми domestикованими формами, є генетичною аномалією, до виникнення якої призвело порушенням структури генів кількісних ознак внаслідок вставки ретровірусу *PERV*. Однак, селекція свиней на покращення м'ясних якостей, як це витікає з результатів аналізу полтавської м'ясної породи і п'єтрен (ультрам'ясна порода), не призвела до зменшення частоти геномів ретровірусів *PERV* обох підтипів у їх популяціях.

В той же час в інших м'ясних породах – ландрас і українська м'ясна – частка тварин, вільних від геномів обох вірусів, значно вища і сягає 23 і 35%, відповідно. Частка таких особин в українській степовій рябій породі, яка характеризується значною осаленністю туш, перебуває на такому ж рівні (30%). Можна припустити, що у селекційний процес, який спрямований на зменшення осаленності туш і збільшення виходу м'яса, залучені й інші локуси геному, а не лише ті, де мала місце інтеграція вірусної ДНК. Адже відомо, що ознака відкладання жиру в тварини має полігенну природу і залежить від дії багатьох генів.

Існує гіпотеза про те, що поширення PERV у популяціях свійських свиней виникло внаслідок їхньої селекції на поліпшення м'ясних якостей. Таким чином чистопорідні свині сального напрямку продуктивності, до яких відноситься миргородська порода, очевидно повинні мати значно меншу частку носіїв ендегенного ретровірусу в своїх популяціях у порівнянні з породами м'ясного та комбінованого типу. Розробка та впровадження молекулярно-генетичної тест-системи з виявлення свиней-носіїв ендегенного ретровірусу підтипу С дозволить проводити відбір тварин-донорів із зниженою інфекційною здатністю.

Перевірка гіпотези щодо зв'язку вставки ретровірусу *PERV* у геном тварин із підвищенням відкладення жиру у свійських свиней, порівняно із дикими чи ранніми доместикованими формами не підтвердилася статистично, але для генетичного маркеру *PERV-A* значення були дуже близькими до статистично достовірних. Тому для остаточного визначення існування зв'язку *PERV*-гаплотипів із продуктивними та адаптивними якостями свиней необхідне проведення подальших досліджень на більш розширених вибірках тварин, із залученням представників інших порід та генотипуванням особин за іншими підтипами ретровірусу – *PERV-B* та комбінаціями різних гаплотипів (A, B, C).

Отже, наші дані вписуються у контекст гіпотези про збільшення в процесі доместикації свиней частоти зустрічальності особин, в геномі яких

присутній ретровірус *PERV*. Це твердження витікає з аналізу геномів особин із субпопуляцій диких свиней і низки сучасних порід. Але, щодо зв'язку залежності частоти розповсюдження *PERV* в породах від напрямку їх продуктивності і, відповідно, від характерного для породи рівня осаленості туш, отримані дані не свідчать на користь такого зв'язку. Однак, це не виключає його існування на індивідуальному рівні в межах окремої субпопуляції. Останнє може бути перевірено в асоціативному аналізі, проведеному в групі тварин, оцінених за одним із основних показників відкладання жиру – товщиною спинного жиру. Отримані нами результати дослідження підтверджують гіпотезу про збільшення, в процесі domestикації, свиней, у геномі яких присутній ретровірус *PERV*.

Інтеграція останнього стала причиною мутації в QTL жировідкладання, що призвело до збільшення осаленості туш і ця ознака могла бути підхоплена селекцією в процесі створення порід. Однак, очевидного зв'язку розповсюдження вірусу в сучасних породах різного напрямку продуктивності не встановлено. Також відсутній зв'язок між одним з основних показників осаленості туші й присутністю в геномі особини ДНК *PERV*.

Встановлене розповсюдження *PERV* двох підтипів в породах свиней, яких розводять в Україні, надає інформацію про можливість і доцільність використання кожної з них для потреб ксенотрансплантації. З іншого боку, ця інформація може бути в основі підбору порід-засновників для створення ліній свиней, вільних від геному ендемічного ретровірусу. Крім того, відсутність або незначне розповсюдження *PERV* в популяціях диких свиней і в аборигенних породах є додатковим важливим аргументом на користь їх збереження і використання.

Визначення особин, вільних від *PERV-C*, позбавить науковців необхідності проведення складних генно-інженерних маніпуляцій з нокаутування ДНК даного вірусу, а відомості щодо його відсутності у дикого європейського кабана [174] можуть бути підставою до виявлення бажаних генних комбінацій в аборигенних українських порід свиней. Тому

обов'язковими завданнями перед проведенням селекційних заходів має бути генетичний моніторинг вихідних порід тварин на предмет їх спадково обумовленої стійкості до стресових факторів та наявності бажаних комбінацій алелів, максимально переведених у гомозиготний стан.

Суттєвим бар'єром у трансплантації органів від свиней до людини є їхня сумісність за імунологічними показниками. Була встановлена суттєва імуногенетична подібність між антигеном А системи АВО у людини та антигеном Аа системи А у свиней, а також між антигеном Е (hr') системи Rh у людини та антигенами Еа й Ее системи Е у міні-свиней. Проте решта антигенів людини і свиней мають суттєві відмінності.

Дослідженнями російських вчених встановлений високий ступінь подібності еритроцитарних систем АВО у людини і А у свиней, також Rh у людини і У в свиней. За іншими дослідженими системами людини і свиней імунологічної подібності не встановлено. Бажаною характеристикою свиней-донорів також є високий рівень гомозиготності сумарно за всіма системами груп крові [174].

Нашими дослідженнями встановлено, що лише 30% протестованих за імуногенетичними маркерами тварин миргородської породи відповідали встановленим критеріям відбору – гомозиготи А-/- та $E^{bdgkmp/bdgkmp}$. У дослідженій групі **свиней української м'ясної породи** 13 особин мали бажаний генотип. Серед тварин із максимальним показником фактичної гомозиготності виділено представників Церери і Цілини, причому Цілина 4092 була гомозиготою за всіма дослідженими системами груп крові – 100%. Кнури 8829721 Імперіал та 8829724 Рекс із значеннями фактичної гомозиготності за 9 системами груп крові 77,78 та 88,89% відповідно можуть бути потенційними плідниками в селекційних схемах із створення спеціалізованих ліній для біомедичного, а саме ксенотрансплантаційного призначення.

Однак в результаті проведеного аналізу виявилось, що відбір свиней за бажаними для ксенотрансплантації алелями груп крові з переведенням їх до гомозиготного стану: А-/- та $E^{bdgkmp/bdgkmp}$ може призвести до погіршення

адаптивних, насамперед, репродуктивних якостей тварин і створити суттєві проблеми щодо вирощування таких особин в умовах спеціалізованих віваріїв.

В той же час відсутність тісного зчеплення груп крові з ключовими генами адаптивності свиней, за умов направленої селекції може сприяти створенню ліній свиней з високими адаптивними якостями для біомедичних цілей і потреб ксенотрансплантації.

В нашій роботі були вирішені задачі визначення імуногенетичних особливостей свиней українських порід як за ознаками їх кращої адаптивності, резистентності, репродукції, так і генетичної гомогенності, наявності алелів, що визначають потенційну придатність для використання у ксенотрансплантації (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Номери тварин української м'ясної породи, придатних для використання у ксенотрансплантації за даними генетичного аналізу

Індивідуальний № тварин	Кличка тварини	PERV-A	Генотип системи E	Фактична гомозиготність	PERV-C	RYR1
4610	Цензура	-/-	bdgkmp/bdgkmp	55,56%	-	NN
2618	Церера	-/-	bdgkmp/bdgkmp	66,67%	+	NN
4590	Церера	-/-	bdgkmp/bdgkmp	77,78%	-	NN
4092	Цілина	-/-	bdgkmp/bdgkmp	100,0%	-	NN
4204	Цілина	-/-	bdgkmp/bdgkmp	77,78%	-	NN
4004	Церера	-/-	bdgkmp/bdgkmp	77,78%	+	NN
2582	Цапля	-/-	bdgkmp/bdgkmp	88,89%	+	NN
4158	Цілина	-/-	bdgkmp/bdgkmp	77,78%	+	NN
4002	Церера	-/-	bdgkmp/bdgkmp	77,78%	-	NN
4610	Цензура	-/-	bdgkmp/bdgkmp	88,89%	-	Nn
8829721	Імперіал	-/-	bdgkmp/bdgkmp	77,78%	-	NN
8829720	Центуріон	-/-	bdgkmp/bdgkmp	77,78%	-	
8829724	Рекс	-/-	bdgkmp/bdgkmp	88,89%	-	NN

Створено діагностичну систему для визначення носіїв ендемічного ретровірусу *PERV-C* та *PERV-A*. Проведено аналіз свиней за імуногенетичними маркерами та ДНК-маркерами.

Отже, молекулярно-генетичним аналізом за маркерами *RYR1* та *PERV-C* виявив, що найбільш придатними для розведення з метою використання у біомедичних цілях виявилися свині спеціалізованих м'ясних порід, за виключенням полтавської м'ясної та ландрас. За маркером *PERV-A* найбільш придатними для розведення у біомедичних цілях виявилися свині породи українська степова ряба та ландрас.

Отже, використання аборигенних свійських порід свиней України в якості вихідних форм при селекції спеціалізованих ліній і порід лабораторних тварин, призначених для біомедичних цілей має місце, в тому числі і в контексті збереження генофонду цих зникаючих популяцій.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено генотипову структуру окремих порід свиней української і зарубіжної селекції та розроблено комплекс оцінювання їх за цільовими генотипами, до складу якого входять: а) визначення стійкості тварин до стресових чинників, б) виявлення наявності у геномі ендемічних ретровірусів PERV типів C і A, в) оцінка імунологічного статусу.

2. Встановлено частоту мутантного алелю RYR1ⁿ у свиней порід: п'єтрен – із 100%, полтавська м'ясна – 10%, ландрас – 50%, миргородська – 15%, українська степова ряба – 50%. Гомозиготний генотип RYR1^{NN} виявлено у всіх досліджених свиней порід велика біла, в'єтнамська вислобрюха та українська м'ясна.

3. Розроблена методика ідентифікації ендемічних ретровірусів PERV A/C свиней в мультиплексній ПЛР-SSP системі PERV-C- α -Actin (LAPC). Проведена лабораторна оптимізація методики виділення ДНК, визначено оптимальні параметри реакційної суміші і режиму ампліфікації для забезпечення специфічного синтезу цільових фрагментів ПЛР і встановлено чутливість та специфічність розробленої тест-системи PERV-C- α -Actin.

4. Проведено аналіз частоти розповсюдження у свиней ретровірусу PERV підтипів C/A. Найменшою кількістю носіїв геномів ретровірусу PERV- C характеризуються досліджені групи свиней порід української м'ясної, миргородської, п'єтрен; ретровірусу PERV-A – української степової рябої і ландрас. У дослідженій групі диких свиней виявлено 14% особин-носіїв ретровірусу PERV-A і відсутні носії ретровірусу PERV-C.

5. За результатами імуногенетичного аналізу встановлено відмінності у розподілі алелів за B, E, F, K, L системами груп крові з наявністю маркерного алеля Ladhjk у досліджених групах свиней української м'ясної та миргородської порід. Критеріям добору тварин за A і E системами груп крові відповідали 30% свиней миргородської та 59% – української м'ясної породи.

6. Встановлено, що за комплексом ознак, а саме: стресостійкістю, відсутністю/наявністю у геномі свиней ретровірусу PERV-C, наявністю генотипів A-/- та Ebdgkmp/ bdgkmp, що відповідають системі груп крові ABO людини *українська м'ясна* порода свиней є найперспективнішою для потреб біомедицини. Перспективною також за стресостійкістю, імуногенетичним статусом та відсутністю у 23% досліджених тварин ретровірусу PERV-C/A є *миргородська* порода свиней.

ПРОПОЗИЦІЇ

Для відбору тварин з метою використання їх у біомедичних дослідженнях доцільно враховувати результати молекулярно-генетичного аналізу за маркерами стресостійкості (*RYR1*), відсутності ретровірусів *PERV-C* і *PERV-A* та імуногенетичного статусу.

На основі отриманих результатів дослідження пропонуємо використовувати для біомедичних цілей вільних від ретровірусу *PERV-C* та *PERV-A* свиней порід: миргородської, української степової рябої та ландрас.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bustad LK, McClellan RO. Swine in biomedical research. *Science*. 1966; 10.152(3728):1526-30. doi: 10.1126/science.152.3728.1526
2. Swindle MM. Swine in the laboratory. CRS Press Taylor & Francis Group. 2007; 494 pp. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.01.054
3. Smith CP. Animal models in biomedical research: swine. USDA. AnimalWelfare Information Center. 2000; 194. 142 p. <http://www.nal.usda.gov/awic/databases/database.html>
4. Smith CP. Information Resources on Swine in Biomedical Researches. 1990-2000. USDA. AWIC Researches Series. 2000; 11. P. 136. <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/swine/swine.htm>
5. Calafiore R. Alginate microcapsules for pancreatic islet cell graft immunoprotection: struggle and progress towards the final cure for type 1 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2003; 3(2):201-5.
6. Morrison AE, Ludlam CA, Kessler C. Use of porcine factor VIII in the treatment of patients with acquired hemophilia. *Blood*. 1993. 15. 81(6):1513- 20.
7. Wellin S. Starting clinical trials of xenotransplantation – reflections on the ethics of the early phase. *J. Med. Ethics*. 2000; 26:231- 6.
8. Cozzi E, Ancona E. Xenotransplantation, where do we stand? *Nephrol*. 2003; 16 (17):16-21.
9. Cooper DKC, Ekser B, Tector AJ. Immunobiological barriers to xenotransplantation. *Int. J. Surg*. 2015; 23(PtB):211-6. doi: 10.1016/j.ijssu.2015.06.068.
10. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab. Anim. Res*. 2022; 38(1):18. doi: 10.1186/s42826-022-00128-1.

11. Hippocrates. Tome II, 1re partie: L'Ancienne médecine. Texte établi et traduit par. J. Jouanna. 2e tirage 2003. 272.
12. Gandarillas M, Bas F. The domestic pig (*Sus scrofa domestica*) as a model for evaluating nutritional and metabolic consequences of bariatric surgery practiced on morbid obese humans. *Cienc. Inv. Agr.* 2009; 36(2):163-76. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202009000200002>.
13. Skinner B F. *Verbal Behavior*. New York: Appleton-Century-Crofts. 1957. <https://doi.org/10.1037/11256-000>.
14. Ferguson SA, Gopee NV, Paule MG. Female Mini-pig performance of temporal response differentiation, incremental repeated acquisition, progressive ratio operant tasks. *Behav. Processes.* 2009; 80 (1):28–34. doi: 10.1016/j.beproc.2008.08.00.
15. Makarova MN, Matichin AA, Maticina AA, Makarov VG. Animal choice strategy for research. Report 1: animal choice based on phylogenetic relationships. *Laboratory Animals for Science.* 2022; 2:58-70. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2022-02-07>.
16. Lunney J, Van Goor A, Walker K, Hailstock T, Franklin J, Dai C. Importance of the pig as a human biomedical model. *Sci Transl Med.* 2021; 11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd5758>
17. Liara M. Gonzalez AJ, Moeser AT. Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research, *Translational Research.* 2015; 166 (1):12-27. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.01.004>.
18. Segatto NV, Remiao MH, Schachtschneider KM, Seixas FK, Schook LB, Collares T. The oncopig cancer model as a complementary tool for phenotypic drug discovery. *Front. Pharmacol.* 2017; 8:894. DOI: 10.3389/fphar.2017.00894.
19. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet. Pathol.* 2012; 49: 344- 56. DOI:10.1177/0300985811402846.

20. Anderson JJ, Milin L, Crackel WC. Effect exercise on mineral and organic bone turnover in swine. *J.Appl. Physiol.* 1971; 30:810.
21. Uzoukwu M, Sleight SD. Effects of dieldrin in pregnant sows. *Am.Vet.Med.Ass.* 1972; 160:1641.
22. Platt J, DiSesa V, Gail D. et al. Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Heart and Lung Xenotransplantation Working Group . *Circulation.* 2002; 106:1043-47.
23. Peralvo-Vidal JM, Weber NR, Nielsen JP, Bache JK, Haugegaard S, Pedersen A. Risk factors for gastric ulceration in nursery pigs. *Prev Vet Med.* 2021; 189:105-298. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105298.
24. Flisikowska T, Kind A, Schnieke A. Genetically modified pigs to model human diseases. *J. Appl. Genet.* 2014; 55: 53-64. DOI: 10.1007/s13353-013-0182-9.
25. Rogers CS. Genetically engineered livestock for biomedical models. *Transgenic Res.* 2016; 25: 345-59. DOI: 10.1007/s11248-016-9928-6
26. Perleberg C., Kind A., Schnieke A. Genetically engineered pigs as models for human disease. *Dis. Model. Mech.* 2018. DOI:11:dmm030783. 10.1242/dmm.030783
27. Föger-Samwald U, Knecht C, Stimpfl T, Szekeres T, Kersch-Schindl K, Mikosch P, Pietschmann P, Sipos W. Bone Effects of Binge Alcohol Drinking Using Prepubescent Pigs as a Model. *Alcohol Clin Exp Res.* 2018; 42(11):2123-35. DOI: 10.1111/acer.13874.
28. Martin RJ, Gobble JL, Hartsock TH, Graves HB, Zigler JH. Characterization of an obese syndrome on the pig. *Proc. Soc. Exp. Biol.Med.* 1973; 143:198-284
29. Podoprigora GI, Kafarskaya LI, Bainov NA. Gnotobiology in modern bio-medical research] *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2012; 5:63-70.

30. Marubayashi S., Asahara T., Ono E., Tashiro H., Okugawa K., Okimoto T et al. Auxiliary heterotopic partial liver transplantation in pigs with acute liver failure. *Surg. Today*. 1995; 25: 429-32. DOI:10.1007/bf00311820.
31. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002; 295:1089-92. DOI:10.1126/science.1068228.
32. Denner J. . Can antiretroviral drugs be used to treat porcine endogenous retrovirus (PERV) Infection after Xenotransplantation? *Viruses*. 2017; 9:213. DOI:10.3390/v9080213.
33. van der Staay FJ. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res.Rev*. 2006; 52(1):131-59.
34. Loban NA, Vasilyuk OYa, Zinovieva NA, Gladyr UF. Evaluation of the stress resistance of pigs by various methods. *Math. Scientific-theoretical fach journal. Bulletin of Agrarian Science of the Black Sea*. 2003; 3:146-50.
35. Kuznetsov AI., Simngatulin F.A. A method for evaluating pigs for stress sensitivity. Intensification of the selection process in animal husbandry: *Mat. Conf. Persianovka*. 1986; 76-78.
36. Fisher P, Mellett FD, Hoffman LC. Halothane genotype and pork quality. 2. Cured meat products from the three halothane genotypes. *Meat Science*. 2000; 54:107-11.
37. Stanišić N, Aleksić S, Di L, Stanimirović Z, Zhenhua G, Petrović M, et al. Porcine stress syndrome (PSS) in Mangalitsa pigs. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2012; 28(4):873.
38. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 1991; 253(5018): 448-51.

39. Hardge T, Scholz A. The influence of RYR1-genotype and breed on fattening performance carcass value and meat quality. 45th Annual Meeting of the EAAP. Edinburg. 1994; 4-7:1-5.
40. MacLennan DH, Duff C, Zorzato F et al. Ryanodine receptor gene is candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*. 1990; 343 (6258):559-61. doi: 10.1038/343559a0.
41. Fletcher JE, Calvo PA, Rosenberg H. Phenotypes associated with malignant hyperthermia susceptibility in swine genotyped as homozygous or heterozygous for the ryanodine receptor mutation. *Br J Anaesth*. 1993; 71(3):410-7. doi: 10.1093/bja/71.3.410. PMID: 8398525.
42. Елишко ТЕ, Курак ОП и др. Полиморфизм гена RYR1 в популяции белорусской мясной породы свиней и его ассоциация с процессами метаболизма и продуктивными качествами. Доклады Рос. Акад. сельскохозяйственных наук. 2004; 5:30-2.
43. Балацкий ВН, Метлицкая ЕИ. ДНК-диагностика стресс-синдрома свиней и ассоциация RYR1- генотипов с жизнеспособностью поросят раннего возраста. *Цитология и генетика*. 2001; 3:43-9.
44. O'Brien PJ, Shen H, Cory CR, Zhang X. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1993; 203(6):842-51. PMID: 7901188.
45. Wendt M, Bickhardt K, Herzog A, Fischer A, Martens H, Richter T. Porcine stress syndrome and PSE meat: clinical symptoms, pathogenesis, etiology and animal rights aspects. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2000; 113(5) 173-90. PMID: 10846811.
46. Houde A, Pommier SA, Roy R. Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in purebred swine populations. *Journal of Animal Science*. 1993; 71(6):1414-8. DOI: 10.2527/1993.7161414x.

47. Топіха ВС, Лихач ВЯ, Луговий СІ та ін. Технологія виробництва продукції свинарства : навч. посіб.; за ред. В. С. Топіхи. Миколаїв: МДАУ; 2012. 486 с.

48. Rodriguez VR, Maffioly JI, LA Zdanovicz, Fabre RM, Barrandeguy ME, García MV, Lagadari M. Genetic diversity of meat quality related genes in Argentinean pigs. *Veterinary and Animal Science*. 2022; 15:100237. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100237>,

49. Камыш НА, Михайлова МЕ, Волчок НМ, Тиханович НИ. Исследование генетической структуры популяций свиней по гену рианодинового рецептора RYRI, ассоциированному с повышенной стрессчувствительностью. *Зб. наук. пр. Фактори експериментальної еволюції організмів*: 2010; 9:39-43.

50. Kapelański W, Wilkanowska A, Cebulska A, Biegniewska M. The effect of clps and ryr1 gene polymorphism on meat quality of złotnicka spotted pigs J. *Central Eupropean Agriculture*. 2010; 11(1):93-8 DOI: <https://doi.org/10.5513/JCEA01/11.1.817>

51. Lawal TA, Wires ES, Terry NL et al. Preclinical model systems of ryanodine receptor 1-related myopathies and malignant hyperthermia: a comprehensive scoping review of works published 1990–2019. *Orphanet J Rare Diseases*. 2020; 15:113. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01384-x>

52. Yudin NS, Aitnazarov RB, Ermolaev VI. Porcine endogenous retroviruses: what are the risks of infection transmission in xenotransplantation? *Rus. J. Genet. Appl. Res*. 2011; 1(6):532-9. DOI 10.1134/S207905971106013X.

53. Tonjes RR, Niebert M. Relative age of proviral porcine endogenous retrovirus sequences in *Sus scrofa* based on the molecular clock hypothesis. *J. Virol*. 2003; 77: 12363-8.

54. Tang HB, Ouyang K, Rao GB, Ma L, Zhong H et al. Characterization of complete genome sequences of a porcine endogenous retrovirus isolated from China Bama Minipig reveals an evolutionary time earlier than that of isolates from

European Minipigs. Transplant. Proc. 2016; 48:222-8.
DOI:10.1016/j.transproceed.2015.12.005.

55. Sypniewski D, Machnik G, Mazurek U, Wilczok T et al. Distribution of porcine endogenous retroviruses (PERVs) DNA in organs of a domestic pig. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 2005; 10:46-51.

56. Yu P, Zhang L, Li SF, Cheng JQ, Lu YR, Zeng YZ et al. A rapid method for detection of the copy number of porcine endogenous retrovirus in swine. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 2007; 15:199-205.
DOI: 10.1007/s11626-009-9264-8.

57. Zhang P, Yu P, Wang W, Zhang L, Li S, Bu H. (). An effective method for the quantitative detection of porcine endogenous retrovirus in pig tissues. *Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2010; 46:408-10. DOI: 10.1007/s11626-009-9264-8.

58. Niebert M, Tonjes RR. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in suiformes. *J. Virology.* 2005;79(1): 649-54.

59. Denner J. How active are porcine endogenous retroviruses (PERVs)? *Viruses.* 2016; 8(8):215. DOI 10.3390/v8080215.

60. Denner J. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? *Arch. Virol.* 2008; 153:1421-6.
DOI:10.1007/s00705-008-0141-7.

61. Le Tissier P, Stoye JP, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature.* 1997; 389(6652):681-2.

62. Kimsa MC, Strzalka-Mrozik B, Kimsa MW, Gola J, Nicholson P, Lopata K, Mazurek U. Porcine endogenous retroviruses in xenotransplantation – molecular aspects. *Viruses.* 2014; 6(5):2062-83. DOI 10.3390/v6052062.

63. Takeuchi Y, Patience C, Magre S, Weiss RA, Banerjee PT et al. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 1998; 72:9986-91.

64. Harrison I, Takeuchi Y, Bartosch B, Stoye JP. Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses. *J. Virol.* 2004; 78:13871-9.
doi: 10.1128/JVI.78.24.13871-13879.2004.

65. Godehardt AW, Rodrigues Costa M, Tönjes RR. Review on porcine endogenous retrovirus detection assays—impact on quality and safety of xenotransplants. *Xenotransplantation*. 2015; 22(2):95-101. DOI: 10.1111/xen.12154
66. Mang R, Maas J, Chen X, Goudsmit J, van der Kuyl AC. Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding. *J. General Virology*. 2001; 82(8):1829-34.
67. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med*. 1997; 3(3):282-6.
68. Wilson CA, Wong S, Muller J et al. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol*. 1998; 72(4):3082-7. DOI: 10.1128/JVI.72.4.3082-3087.1998.
69. Bosch S, Arnauld C, Jestin A. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific pathogen-free Large White swine herd. *J. Virol*. 2000; 74(18):8575-81.
70. Jin H, Inoshima Y, Wu D et al. Expression of porcine endogenous retrovirus in peripheral blood leucocytes ten different breeds. *Transplant. Infectious Disease*. 2000; 2:11-4.
71. Mattiuzzo G, Ivol S, Takeuchi Y. Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins. *J. Virol*. 2010; 84(5):2618-22.
72. Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K et al. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res*. 2001; 10(6): 577-82.
73. Denner J. The origin of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Arch Virol*. 2021; 166:1007-13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04925-8>.
74. Yoon JK, Choi J, Lee HJ, Cho Y, Gwon YD, Jang Y, Kim S, Choi H, Lee JH, Kim YB. Distribution of Porcine Endogenous Retrovirus in Different

Organs of the Hybrid of a Landrace and a Jeju Domestic Pig in Korea. Transplant. Proc. 2015; 47:2067-71. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.05.023

75. Gola J, Mazurek U. Detection of porcine endogenous retrovirus in xenotransplantation. Reprod Biol. 2014; 14(1):68-73. doi: 10.1016/j.repbio.2014.01.006. Epub 2014 Feb 5. PMID: 24607257.

76. Sypniewski D, Machnik G, Mazurek U, Wilczok T, Smorag Z, Jura J, Gajda B. Distribution of porcine endogenous retroviruses (PERVs) DNA in organs of a domestic pig. Ann. Transplant. 2005; 10:46-51.

77. Mazurek U, Kimsa MC, Strzalka-Mrozik B, Kimsa MW, Adamska J, Lipinski D, Zeyland J, Szalata M et al. Quantitative analysis of porcine endogenous retroviruses in different organs of transgenic pigs generated for xenotransplantation. Cit Microbiol. 2013; 67:505-14. doi: 10.1007/s00284-013-0397-3.

78. Kaulitz D, Mihica D, Dorna J, Costa MR, Petersen B, Niemann H, Tönjes RR, Denner J. Development of sensitive methods for detection of porcine endogenous retrovirus-C (PERV-C) in the genome of pigs. J Virol Methods. 2011; 175(1):60-5. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.04.017.

79. Seong-Lan Yu, Woo-Young Jung, Kie-Chul Jung, In-Cheol Cho, Hyun-Tae Lim, Dong-Il Jin, Jun-Heon Lee. Characterization of Porcine Endogenous Retrovirus Clones from the NIH Miniature Pig BAC Library. BioMed Research International. 2012; 10 p. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/482568>.

80. Юдин НС, Айтназаров РБ, Князев СП и др. Дифференциация популяций диких и домашних свиней по частоте хромосом, содержащих эндогенные ретровирусы. Информ. вестник ВОГиС. 2009; 13(4):741-50.

81. Nikitin SV, Yudin NS, Knyazev SP et al. Differentiation of wild boar and domestic pig populations based on the frequency of chromosomes carrying endogenous retroviruses. Nat. Sci. 2010; 2(6):527-34.

82. Юдин НС, Айтназаров РБ, Ермолаев ВИ. Эндогенные ретровирусы свиньи: насколько велик риск инфекции при ксенотрансплантации? Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011; 15(2):340-50.

83. Kim JH, Jung ES, Park CG, Kim SJ, Hwang ES. No Evidence of the Productive Replication of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) from SNU Miniature Pigs in Human Cell Line. *Infect Chemother.* 2010; 42(3):175- 80. <https://doi.org/10.3947/ic.2010.42.3.175>
84. Wynyard S, Nathu D, Garkavenko O, Denner J, Elliott R. Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation.* 2014; 21: 309–323.
85. Zhang L, Li M, Cui Z, Chai D, Guan Y, Chen C, Wang W. Systematic analysis of the role of SLC52A2 in multiple human cancers. *Cancer Cell International.* 2022; 22. 1. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02432-7>.
86. Moon HJ, Kim HK, Park SJ. Comparison of the age-related porcine endogenous retrovirus (PERV) expression using duplex RT-PCR. *J Vet Sci.* 2009; 10(4):317-22. DOI: 10.4142/jvs.2009.10.4.317
87. Matczyńska D, Sypniewski D, Gałka S, Sołtysik D, Loch T, Nowak E, Smorąg Z, Bednarek I. Analysis of swine leukocyte antigen class I gene profiles and porcine endogenous retrovirus viremia level in a transgenic porcine herd inbred for xenotransplantation research. *J Vet Sci.* 2018; 19(3):384- 92. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.3.384>.
88. Tacke SJ, Reinhard K., Denner J. Porcine Endogenous Retroviruses Inhibit Human Immune Cell Function: Risk for Xenotransplantation? *Virology.* 2000; 268(1):87-93. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0149>.
89. Park SJ, Huh JW, Kim DS et al. Analysis of the molecular and regulatory properties of active por-cine endogenous retrovirus gamma-1 long terminal repeats in kidney tissues of the NIH-Miniature pig. *Mol. Cells.* 2010; 30(4): 319-25.
90. Lee D, Lee J, Kim H, ParkH, Kim Y. Detection and Classification of Porcine Endogenous Retroviruses by Polymerase Chain Reaction. *J. Anim. Sci. Technol.* 2007; 49:405-14.

91. Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A et al. Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet. Cell Genet.* 1999; 85(3/4):205-11.
92. Никитин СВ, Юдин НС, Князев СП и др. Оценка частоты хромосом, содержащих свиные эндогенные ретровирусы, в популяциях домашней свиньи и дикого кабана. *Генетика.* 2008; 44(6):789-97.
93. Niebert M, Tonjes RR. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in suis-formes. *J. Virology.* 2005; 79(1):649-54.
94. Nikitin SV, Iudin NS, Kniazev SP, Aĭtnazarov RB, Kobzev VF, Bekenev VA, Savvina MA, Ermolaev VI. Frequency of chromosomes carrying endogenous retroviruses in the populations of domestic pig and wild boar. *Genetika.* 2008; 44(6):789-97.
95. Morozov VA; Wynyard S; Matsumoto S, Abalovich A; Denner J, Elliott R. No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation. *Virus. Res.* 2017; 227:34-40.
96. Sypniewski D, Machnik G, Mazurek U, Wilczok T, Smorag Z, Jura J, Gajda B. Distribution of porcine endogenous retroviruses (PERVs) DNA in organs of a domestic pig. *Ann Transplant.* 2005; 10(2):46-51.
97. Patience C, Switzer M, Takeuchi Y, Griffiths D, Goward M et al. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* 2001; 75:2771-5.
98. Argaw T, Wilson CA. Methods and Tools for Detection and Evaluation of the Risks of Porcine Endogenous Retrovirus in Porcine to Human Xenotransplantation [Internet] . 2012. DOI:10.5772/28799.
99. Prabha MS, Verghese S. Polymerase chain reaction in detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) from porcine tissues. *Indian J. Microbiol.* 2009; 49:68-71. DOI: 10.1007/s12088-009-0002-4.
100. Denner J. How active are porcine endogenous retroviruses (PERVs)? *Viruses.* 2016; 8:215. DOI:10.3390/v8080215.

101. Czauderna F, Fischer N, Boller K, Kurth R, Tonjes RR. Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J. Virol.* 2000; 74:4028-38. doi: 10.1128/JVI.74.9.4028-4038.2000.
102. Machnik G, Sypniewski D, Wydmuch Z, Cholewa K, Mazurek U, Wilczok T et al. Sequence analysis of proviral DNA of porcine endogenous retroviruses. *Transplant. Proc.* 2005; 37:4610-14. DOI: 10.1016/j.transproceed.2005.10.115.
103. Quane K, Healy J, Keating K et al. Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nat Genet.* 2003; 5:51-55. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng0993-51>.
104. Huai G, Qi P, Yang H, Wang Y. Characteristics of α -Gal epitope, anti-Gal antibody, α 1,3 galactosyltransferase and its clinical exploitation (Review). *Int J Mol Med.* 2016; 37(1):11-20. doi: 10.3892/ijmm.2015.2397.
105. Andrew JL, Ping L, Jose L et al. Original Article. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and Galactose α – 1,3 – Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Journal Xenotransplantation.* 2013; 20:27-35.
106. Хацко ВВ, Потапов ВВ, Пархоменко АВ и др. Применение ксеноорганов в современной медицине. *Актуальні проблеми сучасної медицини.* 2013; 13:31-3.
107. Cooper DK, Burcin E, Ayares D. The role of genetically – engineered pigs in xenotransplantation research. *J. Pathol.* 2016; 2:288-99.
108. Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: Current status and a perspective on the future. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7:519-31.
109. Gutierrez K, Dicks N, Glanzner WG, Agellon LB, Bordignon V. Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Front Genet.* 2015; 6:293. doi: 10.3389/fgene.2015.00293.

110. Герасименко ВВ. Иммуногенетическая структура стада свиней украинской степной белой породы по частоте комплексных генотипов в связи с некоторыми параметрами продуктивности. Цитология и генетика. 2002; 36(2):44-52.
111. Новгородов АА. Влияние уровня гомозиготности и генотипов групп крови на продуктивность свиней породы ландрас. Свиноводство. 2004; 5: 11-2.
112. Evdokimov NV et al. The possibility of using immunogenetic criteria for the characterization of the breed, to predict the productive qualities and results of the selection of pigs of the tsivilsky breed. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2019; 346:1-10. DOI:10.1088/1755-1315/346/1/012052.
113. Тихонов ВН. Использование групп крови при селекции животных. Москва: Колос; 1967. 191 с.
114. Swindle MM, Makin A, Herron AJ et al. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. Veterinary Pathology. 2012; 49(2):344-56.
115. B. Gahne. Immunogenetics and Biochemical Genetics as a Tool in Pig Breeding Programmes, Acta Agriculturae Scandinavica. 1978. 28:sup21:185-97, DOI: [10.1080/09064702.1978.11884486](https://doi.org/10.1080/09064702.1978.11884486).
116. Kim KI, Lee JH, Li K, Zhang YP, Lee SS, Gongora J, Moran C. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. Anim Genet. 2002; 33(1):19- 25. doi: 10.1046/j.1365-2052.2002.00784.x.
117. Carvalho-Oliveira M, Valdivia E, Blasczyk R, Figueiredo C. Immunogenetics of xenotransplantation. Int J Immunogenet. 2021; 48(2):120-134. doi: 10.1111/iji.12526
118. Zhou Q, Li T, Wang K, Zhang Q, Geng Z, Deng S, Cheng C, Wang Y. Current status of xenotransplantation research and the strategies for preventing

xenograft rejection. Front Immunol. 2022; 28(13):928173. DOI: 10.3389/fimmu.2022.928173.

119. Cooper, DKC. Introduction: The Present Status of Xenotransplantation Research. In: Costa, C. (eds) Xenotransplantation. Methods in Molecular Humana, New York, NY. Biology. 2020; 2110:1-25. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0255-3_1.

120. Suprun OM, Sverhunova AO, Sverhunov AO. Місце ксенотрансплантації серед існуючих інших видів трансплантації. АПСМ [інтернет]. 2018; 21. <https://periodicals.karazin.ua/apmm/article/view/10526>.

121. Племінні ресурси України. Упоряд. Мельник ЮФ, Агофонов МІ. Київ: Аграрна наука; 1998. 336 с.

122. Березовський МД. Стан і перспективи селекції свиней великої білої породи в Україні. Вісник аграрної науки. 1999; 10:49-51.

123. <http://www.groni.ru/zhivotnovodstvo/svini/porody-svinej-opisanie-foto-video.html>

124. Рудоман ГС, Балацький ВМ, Саєнко АМ. Поширення мутантного алелю Т гену RYR1 у породах свиней вітчизняної та закордонної селекції. Свинарство. 2017; 69: 114-22.

125. Войтенко СЛ, Сидоренко ОВ, Джус ПП. Католог генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин України. Київ: ТОВ «Інтерконтиненталь-Україна». 2020; 96 с.

126. В'єтнамська вислобрюха свиня. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agromega.in.ua/svyni/porody-svynej/vyetnamska-vysljobryukha-svynja-341.html>

127. Балацький ВМ. Методологічне обґрунтування маркер-асоційованої селекції в свинарстві України [дисертація]. Чубинське: ІРГТ ім. МВ Зубця НААН. 2018. 350 с.

128. Oliver WLR, Brisbin IL, Takahashi S: The Eurasian Wild Pig (*Sus scrofa*). Status Survey and Conservation Action Plan: Pigs, Peccaries and Hippos. Chapter 5.2. Edited by: Oliver WLR. 1993. Gland, Switzerland: IUCN. 112-21.

129. Randi E. Conservation genetics of the genus *Sus*. *Journal of Mountain Ecology*. 1995; 3:6-12.
130. Groves CP, Grubb P. The Eurasian Suids: *Sus* and *Babirusa*. In *Peccaries and Hippos Pigs*. Oliver WLR. Ed. IUCN: Gland. Switzerland. 1993; 107- 21.
131. Giuffra E, Kijas JMH; Amarger V; Carlborg Ö, Jeon JT, Andersson L. The origin of domestic pig: Independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*. 2000; 154:1785-91.
132. Mihalik B, Frank K, Kusuma P, Szemethy D, Szendrei L, Szemethy L, Kusza S, Stéger V. Population Genetic Structure of the Wild Boar (*Sus scrofa*) in the Carpathian Basin. *Genes*. 2020; 11:1194. DOI:10.3390/genes11101194.
133. Балацький ВМ. Молекулярно-генетичні аспекти впровадження маркер-асоційованої селекції у свинарстві. *Свинарство*. 2017; 69:108-14.
134. Глазко ВИ, Шульга ЕВ, Дымань ТН, Глазко ГВ. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. *Белая Церковь*. 2001. 488 с.
135. Quane K, Healy J, Keating K et al. Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nat. Genet*. 1993. 5:51-55. <https://doi.org/10.1038/ng0993-51>.
136. Guo F, Xing X, Hawthorne WJ, Dong Q, Ye B, Zhang J, Liang Q, Nie W. Characterization of PERV in a new conserved pig herd as potential donor animals for xenotransplantation in China. *Virology Journal*. 2014; 11:212-21.
137. Yu SL, Jung WY, Jung KC, Cho IC, Lim HT, Jin DI, Lee JH. Characterization of porcine endogenous retrovirus clones from the NIH miniature pig BAC library. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:482568. doi: 10.1155/2012/482568.
138. Brock DP, Marty-Roix R, Spector M. Alpha-smooth-muscle actin in and contraction of porcine dental pulp cells. *J Dent Res*. 2002; 81(3):203-8.

139. Tanihara F, Hirata M, Otoi T. Current status of the application of gene editing in pigs. *Journal of Reproduction and Development*. 2021; 67(3):177-87. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-025>.
140. Chung HC, Nguyen VG, Oh WT, Huynh TM, Moon HJ, Lee JH, Kim HK, Park SJ, Park BK. Inhibition of porcine endogenous retrovirus by multi-targeting micro RNA against long terminal region. *Transplant Proc*. 2017; 49:2225-32.
141. Chak-Sum H, Erin P, Gregory R et al. Characterization of swine leukocyte antigen polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Meishan pigs. *Immunogenetics*. 2006; 58(11):873-82.
142. Lawal TA, Wires ES, Terry NL et al. Preclinical model systems of ryanodine receptor 1-related myopathies and malignant hyperthermia: a comprehensive scoping review of works published 1990–2019. *Orphanet J Rare Dis*. 2020; 15:113. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01384-x>.
143. Маниатис Т, Фрич Э, Сембрук Дю Молекулярное клонирование: Пер. с англ. Под ред. Баева АА. М.: Мир; 1984. 479 с.
144. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex-100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. 1991; 10: 506-9. DOI: 10.2144/000114018.
145. Подоба БЄ, Качура ВС, Дідик МВ. Генетична експертиза у скотарстві. Київ: Урожай; 1991. 120 с.
146. Рибалко ВП, Березовський МД, Богданов ГА та ін. Сучасні методики досліджень у свинарстві. Полтава: Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького УААН. 2005. 228 с.
147. Войтенко СЛ, Сидоренко ОВ. Створення інформаційної бази про кнурів миргородської породи, кріоконсервована сперма яких зберігається у банку генетичних ресурсів тварин. *Вісник аграрної науки*. 2020; 6 :37-46.
148. Peacall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetican alisys in Excel Population genetics of twarean dresearch. *Molecula Ecology Notes*. 2006; 6:288-95.

149. Крамаренко СС, Луговий СІ, Лихач АВ. Крамаренко ОС. Аналіз біометричних даних у розведенні і селекції тварин: навч.посібник. Миколаїв: МНАУ; 2019. 211 с.
150. Плохинский НА. Руководство по биометрии для зоотехников. Москва: Колос; 1969. 255 с.
151. Luo Q, Hu K, Liu W, Wu H. Scientometric Analysis for Spatial Autocorrelation-Related Research from 1991 to 2021. International Journal of Geo-Information. 2022; 11(5):309. DOI: 10.3390/IJGI11050309.
152. Stephenson FH. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology A Guide to Mathematics in the Laboratory. Elsevier Inc. 2016; 302.
153. Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 2006; 6:288-95.
154. A Portal to Free Molecular Biology and Bioinformatics Tools Primer 3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.simgene.com/Primer3>.
155. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science. 1991; 253(5018):448-51.
156. Метлицька ОІ, Ревенко О, Копилова К.В. ДНК-маркерні системи в селекції свиней. Тваринництво України. 2008; 2: 22 – 24
157. Топіха ВС, Стародубець ОО. Стресчутливість свиней породи дюрок внутрішньопородного типу «Степовий». Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2008; 2:149-53.
158. Mikhailova MU, Romanishko EL, Kamysh NA. Study of the genetic structure of pig populations by the RYR1 gene locus. Bulletin of MDPU named after IP Shamyakina. 2011; 1(30):20-4.

159. Айтназаров РБ, Юдин НС, Кирильчук РС и др. Определение числа копий эндогенных ретровирусов типа А у домашних свиней и диких кабанов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(6):756-61.
160. Сухова НО, Бекенев ВА, Коломников ВА и др. Связь групп крови с откормочными и мясными качествами свиней. Доклады ВАСХНИЛ. 1989; 2:24- 6.
161. Гончаренко ГМ. Структура популяций сельскохозяйственных животных в Западной Сибири по генетическим маркерам и их использование в селекции [диссертация] Новосибирск: ИЦиГ. 2009. 318 с.
162. Мартыненко НА. Свинья как модель в биомедицинских исследованиях. Ксенотрансплантация (обзор). Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2006; 2:181-8.
163. Шатохин КС. Морфогенетические особенности мини-свиней [диссертация]: Новосибирск: ИЦиГ. 2017. 165 с.
164. Guo Q, Zhu HY, Jin L, Gao QS, Kang JD, Cui CD, Yin XJ. Production of Cloned Wuzhishan Miniature Pigs and Application for Alloxan Toxicity Test. Anim Biotechnol. 2015; 26(4):292-7. doi: 10.1080/10495398.2015.1025957.
165. Тихонов ВН. Формирование генофонда миниатюрных сибирских свиней Минисибс и их использование в медико-генетических исследованиях. Генетика. 2000; 36(6):829-36.
166. Irgang M, Karlas A, Laue C, Specke V, Tacke S, J, Kurth R, Schrezenmeir J, Denner J. Porcine Endogenous Retroviruses PERV-A and PERV-B Infect neither Mouse Cells in vitro nor SCID Mice in vivo. Intervirology. 2005; 48:167-73. doi: 10.1159/000081745.
167. Komoda H, Miyagawa S, Kubo T et al. A study of the xenoantigenicity of adult pig islets cells. Xenotransplantation. 2004; 11(3):237.
168. Волощук ВМ, Рибалко ВП, Березовський МД, Костенко ОІ, Іванов ВО. Свинарство. Київ: Аграрна наука; 2014. 587 с.

169. Heinze PH, Mitchell G. Stress resistant and stress susceptible landrace pigs: comparison of blood variables after exposure to halothane or exercise on a treadmill. *Vet Rec.* 1989; 18. 124(7):163-8. doi: 10.1136/vr.124.7.163.
170. Schouten WG, Wiegant VM. Individual responses to acute and chronic stress in pigs. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1997; 640:88-91.
171. Nikitin SV, Yudin SV, Knyazev SP. Differentiation of wild boar and domestic pig populations based on the frequency of chromosomes carrying endogenous retroviruses. *Nat. Sci.* 2010; 2(6):527-34.
172. Юдин НС. Айтназаров РБ, Ермолаев ВИ. Эндогенные ретровирусы свиньи: насколько велик риск инфекции при ксенотрансплантации? *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2011; 15(2):340-50.
173. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medicine.* 1997; 3:282-6.
174. Guo F, Xiaowei X, Wayne J, Hawthorne, Qiong Dong, Bin Ye, Juan Zhang, Qi Liang, Wei Nie. Characterization of PERV in a new conserved pig herd as potential donor animals for xenotransplantation in China. *Virology Journal.* 2014; 11: 212-21.
175. Рик ТМ, Метлицька ОІ, Нор ВЮ. Розробка методу ідентифікації ендогенного ретровірусу свиней PERV-C. *Розведення і генетика тварин.* 2018; 55:167-78.
176. Метлицька ОІ, Рик ТМ, Россоха ВІ, Саєнко АО. Особливості імуногенетичної структури свиней вітчизняних порід, придатних для ксенотрансплантації. *Розведення і генетика тварин.* 2020; 59:105-14.
177. Рик ТМ. Эндогенні ретровіруси PERV А/С у геномах свиней українських порід та їх зв'язок з рівнем осалюваності туш. *Біологія тварин.* 2021; 3: 26-31. <https://doi.org/10.15407/animbiol23.02.026>.
178. Рик ТМ. Генотипова структура мікропопуляцій свиней українських порід за локусом ріанодинового рецептора RYR1. *Біологія тварин.* 2022; 24(1):40-4. <https://doi.org/10.15407/animbiol24.01.040>.

179. Рик ТМ. Імуногенетична структура свиней українських порід, придатних для ксенотрансплантації. Наукові доповіді НУБіП України, [S.l.], n. 1(95), лют. 2022. ISSN 2223-1609. Доступно за адресою: <<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/dopovidi2022.01.002/14369>>. Дата доступу: 08 січ. 2023. <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2022.01.002>.

180. RYK TM. Analysis of spread of endogenous retroviruses (PERVs) of subtypes A and C in genomes of pigs of Ukrainian breeds and their correlation with fat deposition in carcasses. Bulgarian Journal of Animal Husbandry (Zhivotnovadni Nauki). 2021; 58(6):60-7. https://animalscience-bg.org/page/en/details.php?article_id=703.

181. Рик ТМ. Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи збереження, поліпшення і використання генофонду тварин. мат. XV Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та аспірантів, Чубинське, 19 травня 2017 р.

182. Рик ТМ, Нор ВЮ. Генетико-популяційна характеристика свиней різних порід за локусом PERV-C. Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених (м. Львів, 8-9 грудня 2017 р.). Біологія тварин. 2017. Т. 19. № 4. С. 142.

183. Рик ТМ. Генетичні особливості свиней різних порід за маркерами PERV-C та RYR1. Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: матеріали XVII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених (м. Львів, 6-7 грудня 2018 р.). «Біологія тварин». 2018. 20 (4):131.

184. Рик ТМ, Нор ВЮ. Скринінг ендегенного ретровірусу свиней підтипу С за допомогою мультиплексної ПЛР-SSP. Актуальні дослідження з проблем розведення, генетики та біотехнології в тваринництві: мат. XVI Всеукр. наук. конф. молодих вчен. та асп., присвяч. вшануванню 80-ї річн. від

дня народж. акад. НААН Михайла Васильовича Зубця (с. Чубинське. 24 трав. 2018 р.). 35-6.

185. Рик ТМ. Генетичний моніторинг свиней різних порід за PERV-C та RYR1 для оцінки придатності їх використання у ксенотрансплантації. Актуальні дослідження з проблем розведення, генетики та біотехнології у тваринництві: мат. XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених і аспірантів з міжнародною участю, присвяченій 80-й річниці від дня народження академіка УААН В.П. Бурката (с. Чубинське, травень 2019). 37.

186. Рик ТМ. Лабораторні алгоритми оцінювання придатності свиней для використання у біомедичних дослідженнях. Актуальні дослідження з проблем розведення, генетики та біотехнології у тваринництві: мат. XVIII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених і аспірантів з міжнародною участю, присвяченої 95-й річниці від дня народження професора В.Ю. Недави (с. Чубинське, травень 2020). 37-8.

187. Рик ТМ. Ендогенні ретровіруси PERV A / C У геномах свиней українських порід. Науковий прогрес у тваринництві та птахівництві: мат. XV Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених, присвяч. 90-річ. від дня народження д-ра екон. наук, проф., акад. УААН Омеляненко Андрія Оксентійовича (м. Харків, 26–27 серп. 2021 р.). 96-9.

188. Рик ТМ. Ідентифікація ендогенного ретровірусу свиней PERV-C. Сучасна наука: стан та перспектива розвитку: мат. IV Всеукраїнської наук.-практ. конф. Молодих вчених з нагоди Дня працівників сільського господарства (м. Херсон, 17 листопада 2021 р.). 206-8.

ДОДАТКИ

Державне підприємство «Полтавський регіональний науково-технічний
центр стандартизації, метрології та сертифікації»

СВІДОЦТВО

ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ СТАНУ СИСТЕМИ ВИМІРЮВАНЬ

№ 021-19

Видає 31 січня 2019 р.

Чинне до 31 січня 2022 р.

Це свідоцтво засвідчує, що за результатами оцінювання
лабораторія генетики Інституту свинарства і агропромислового виробництва
Національної академії аграрних наук України

м. Полтава, вул. Шведська Могила, 1
тел. (0532) 52-74-24

є технічно компетентною та стан її системи вимірювань відповідає вимогам
ДСТУ ISO 10012:2005 Системи керування вимірюванням. Вимоги до процесів
вимірювання та вимірювального обладнання.

Сфера процесів вимірювань лабораторії наведена в додатку до цього свідоцтва
і є його невід'ємною частиною.

В.о. генерального директора

А.В. Горбань



Без додатку свідоцтво про відповідність стану системи вимірювань не дійсне



001837

Порода	Господарство	Лабораторний номер зразка	PERV-C, 281 п.н.	RYR1
В'єтнамська звислобрюха	Дослідна станція ІСв і АПВ 100%%	BB 2	+	NN
		BB 5	+	NN
		BB 6	+	NN
		BB 7	+	NN
		BB 12	+	NN
		BB 8	+	NN
		BB 10	+	NN
		BB 11	+	NN
		BB 13	+	NN
		BB 1	+	NN
Українська м'ясна	к/з «Деркульський» Луганська обл. 0	УМ 19.124	-	NN
		УМ 24.50	-	NN
		УМ 18.544	-	NN
		УМ 25	-	NN
		УМ 13	-	NN
		УМ 41	-	NN
		УМ 12	-	NN
		УМ 16	-	NN
		УМ 22	-	NN
		УМ 14	-	NN
Українська степова ряба	Асканія Нова 30%	5	+	NN
		146	-	NN
		13	-	NN
		12	+	NN
		156	+	NN
		30	+	NN
		136	+	NN
		186	-	NN
		306	+	NN
		126	+	NN
		6	+	
		9	-	
		4	+	
		8	+	
		10	-	
		1	-	
		16	-	
		3	+	
		7	-	
		11	-	

Полтавська м'ясна	к/з «Стрілецький», Луганська обл 100%	41	+	NN
		45	+	NN
		37	+	NN
		62	+	NN
		44	+	NN
		40	+	Nn
		35	+	NN
		38	+	NN
		42	+	NN
		36	+	NN
		1	-	NN
		27	+	NN
		24	-	NN
		9	-	NN
		22	-	NN
		3	+	NN
		13	-	NN
		47	+	NN
		20	+	NN
		23	+	NN
Миргородська	ДП ДГ «імені Декабристів», Полтавська обл. 60%	594	-	Nn
		608	+	NN
		622	+	NN
		719	+	NN
		715	+	Nn
		628	-	NN
		56	-	NN
		46	-	NN
		606	-	NN
		616	+	NN
Велика біла	ПЗ «Степний», Запорізька обл. 100%	1207	+	NN
		167	+	NN
		0837	+	NN
		7301	+	NN
		5131	+	NN
		2993	+	NN
		545	+	NN
		0601	+	NN
		9591	+	NN
		136	+	NN
Велика біла (української селекції)	ДП ДГ «Степне»	6	-	
		50	-	
		10	-	

	Полтавської обл.	14	-	
		46	-	
		3	-	
		58	-	
		13	-	
		16	-	
		18	-	
Ландрас	ТОВ «Хлібне», Лозівський р-н, Харківська обл. 50%	39	-	Nn
		35	-	Nn
		31	-	Nn
		48	+	Nn
		42	+	Nn
		43	+	Nn
		47	+	Nn
		19	+	Nn
		23	+	Nn
		21	-	Nn
		28	-	NN
		49	+	NN
		45	-	NN
		30	+	NN
		46	-	NN
		26	+	NN
		32	-	NN
		41	-	NN
		44	+	NN
		34	-	NN
П'єтрен	Дослідна станція Хоенхаймського університету, Німеччина 50%	102	-	nn
		244	+	nn
		181	-	nn
		107	-	nn
		119	-	nn
		мікс	+	nn
		448	+	nn
		245	+	nn
	Арцизька м'ясна компанія, м. Арциз, Одеська обл.	21	-	
		19	-	
		33	-	
		22	-	
		23	-	
		24	-	
		25	-	
		26	-	

		28	+	
		27	+	
		29	-	
		30	-	
		31	-	
Українська м'ясна	Племінний репродуктор ДП ДГ «Гонтарівка» Інституту тваринництва НААН, Вовчанський р- н, Харківська обл 33,34%	7 (4610) СВ	-	NN
		11 (2618) СВ	+	NN
		17 (4590) СВ	-	NN
		20 (4092) СВ	-	NN
		25 (4204) СВ	-	NN
		27 (4004) СВ	+	NN
		28 (2582) СВ	+	NN
		30 (4158) СВ	+	NN
		34 (4002) СВ	-	NN
		35 (4610) СВ	-	Nn
		5 (8829721) КН	-	NN
		10 (8829720) КН	Зразок відсутній	
		11 (8829724) КН	-	NN
Дика свиня		1	-	
		2	-	
		3	-	
		4	-	
		5	-	
		6	-	
		7	-	



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор з наукової роботи
та інноваційного розвитку
Поліського національного
університету

Д. Романчук
2021 р.

АКТ

про впровадження результатів дисертаційної роботи
Рик Тетяни Миколаївни на тему «Молекулярно-генетичний статус свиней
українських порід для використання у ксенотрансплантації»
у навчальний процес технологічного факультету Поліського національного
університету

Члени комісії у складі в. о. декана технологічного факультету, доцента В.
Ф. Андрійчука, гарантів освітніх програм ос бакалавр та ос магістр
спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції
тваринництва» доцентів І. В. Ковальчука та Л. М. Піддубної

Розглянувши низку важливих наукових результатів, що отримані в ході
виконання дисертаційної роботи Рик Т. М., склали цей акт про те, що у
Поліському національному університеті у навчальний процес кафедри
розведення, генетики тварин та біотехнології у вивчення дисципліни
«Біотехнологія» при підготовці бакалаврів та «Генетика популяцій» при
підготовці магістрів за спеціальністю 204 «Технологія виробництва і переробки
продукції тваринництва» впроваджені результати наукових досліджень Рик Т.
М. з молекулярного і імуногенетичного дослідження свиней українських і
зарубіжних порід.

В. о. декана, доцент

В. Ф. Андрійчук

Гарант освітньої програми ос
бакалавр спеціальності 204
«Технологія виробництва і
переробки продукції тваринництва»,
доцент

І. В. Ковальчук

Гарант освітньої програми ос
магістр спеціальності 204
«Технологія виробництва і
переробки продукції тваринництва»,
доцент

Л. М. Піддубна



ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор
ТОВ "ФГ" "ШУБСЬКЕ"
Агафонов Олег Олександрович
«14» листопада 2021 р.

АКТ

про впровадження результатів науково-дослідної роботи з дослідження молекулярно-генетичного статусу свиней

Даним актом стверджується, що результати науково-дослідної роботи з дослідження молекулярно-генетичного статусу свиней впроваджені ТОВ "ФГ" "Шубське" Харківської області, Богодухівського району, село Шуби.

1. Вид впровадження – індивідуальна імуногенетична ідентифікація тварин стада.
2. Обсяг впровадження – 50 голів свиней.
3. Форма впровадження – імуногенетична характеристика свиней за А і Е еритроцитарними системами антигенів. Проведено індивідуальний імуногенетичний аналіз та проаналізовано популяційний рівень мінливості в стаді господарства ТОВ "ФГ" "Шубське".
4. Економічний і науково-технічний ефект – проведений імуногенетичний аналіз тварин стада дозволяє встановити достовірність реєстрації походження племінних тварин, що підвищить ефективність селекційно-племінної роботи у господарстві.

Члени комісії:

Від Інституту розведення і генетики
тварин імені М.В.Зубця НААН:

Перший заступник директора
ІРГТ ім. М.В.Зубця НААН,
доктор сільськогосподарських наук,
академік НААН

С.І. Ковтун

Завідувач відділу генетики і
біотехнології тварин,
доктор сільськогосподарських наук

В.В. Дзішок

Від ТОВ "ФГ" "ШУБСЬКЕ"
Директор



О. О. Агафонов