

**UTVRĐIVANJE STATUSA GENA ZA MALIGNU
HIPERTERMIJU U FARMSKOM UZGOJU SVINJA U
HRVATSKOJ****V. Lacković, A. Gomerčić, Z. Tadić, A. Vitković, V. Sušić, T. Balenović,
D. Sabo, I. Bašić****Sažetak**

Istražili smo status gena za malignu hipertermiju (MH) na 637 svinja. Koristili smo molekularni test lančane reakcije polimerazom (PCR) u utvrđivanju genotipova četiriju pasmina i njihovih križanaca. Rezultati su pokazali da je najviša frekvencija recesivnih homozigota (n/n) u pasmini hempšir (0,138), a najniža u križanaca ♀ švedski landras x ♂ veliki jorkšir (0,031). Najviši postotak heterozigota našli smo također u pasmini hempšir (20,69), a najniži u križanaca ♀ švedski landras x ♂ veliki jorkšir (2,79). Istražili smo zastupljenost gena za MH s obzirom na spol i uzgojni status, a najviši postotak heterozigota i recesivnih homozigota utvrdili smo u nerastova. Uvid u status gena za MH pruža mogućnost selektivnog uzgoja s ciljem povećanja mesnatosti i poboljšanja kakvoće mesa.

Ključne riječi: Maligna hipertermija, stres sindrom, lančana reakcija polimerazom, genetički test.

Uvod

Maligna hipertermija (MH) je nasljedna neuromuskularna bolest koja se očituje poremećajem kontrakcije skeletnih mišića, povećanjem metabolizma i povišenjem tjelesne temperature (Mac Lenan i sur. 1992., Gillard i sur. 1991.). U ljudi genetički predodređenih za MH, anestezija kombinacijom jakih inhalacijskih anestetika i mišićnih relaksanata (halotan i sukcinilkolin) može prouzročiti grčenje skeletnih mišića, povećani metabolizam, visoku tjelesnu temperaturu i poremećenu koncentraciju iona u stanici, što može dovesti do oštećenja tkiva i smrti. Uočavanje ranih simptoma bolesti, trenutačno

V. Lacković, A. Gomerčić, Z. Tadić, I. Bašić, Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska; A. Vitković, Centar za reprodukciju u stočarstvu, Planinska 2b, 10000 Zagreb, Hrvatska; V. Sušić, T. Balenović, Zavod za stočarstvo, Veterinarski fakultet, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Hrvatska; D. Sabo "Sljeme" d.d. Kelekova bb, 10000 Zagreb, Hrvatska

prekidanje procesa anestezije i davanje infuzije protulijeka Dantrolena smanjuje smrtnost sa 80% na manje od 7% slučajeva (Nelson i sur. 1995.). MH je također bolest u svinja, pasa, mačaka i konja (Britt 1991.). Svinje se rijetko podvrgavaju anesteziji, ali na stres reagiraju na isti način kao i ljudi na anestetik. Smrt izazvana stresom u svinja naziva se stres sindrom (engl. porcine stress syndrome-PSS). Za pojavu MH u svinja odgovoran je gen RYR1 smješten na šestom kromosomu (Fletcher i sur. 1993.). Proizvod ovog gena je membranski protein sarkoplazmatskog retikuluma mišića koji kontrolira protok kalcijevih iona kroz membranu sarkoplazmatskog retikuluma tijekom mišićnih kontrakcija (Shomer i sur. 1993., Vögeli i sur. 1994.). U jedinki podložnih MH predhodnik iste je točkasta mutacija na poziciji 1843 u slijedu nukleotida gdje je timin (T) zamijenjen za citozin (C), što je dovelo do zamjene cisteina (Cys) za arginin (Arg) u aminokiselinskom slijedu (Richter i sur. 1992., Fujii i sur. 1991.). Metodama genetskog inženjerstva utvrđena je veza između nasljeđivanja mutacije i pojava simptoma bolesti. Radi utvrđivanja navedenog razvijen je halotan-kofein dijagnostički test koji se temelji na utvrđivanju reakcije mišića pri jednokratnom ili višekratnom izlaganju halotanu i kofeinu (Fletcher i sur. 1993.). U svinja je uočeno da ovaj test otkriva samo jedinke podložne bolesti (recesivni homozigoti n/n); on međutim ne upućuje na postojanje heterozigotnih jedinki "prenositelja" bolesti u uzgoju svinja. Stoga je razvijen novi test koji se temelji na lančanoj reakciji polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction PCR) (O'Brian i sur. 1993.). Ovoj metodi temelj je umnažanje dijela RYR1 gena, njegovo cijepanje restriktijskim enzimom, razdvajanje na agaroznom gelu i očitavanje rezultata pod UV-svjetlom. Test analize gena RYR1 metodom PCR je jednostavan, točan i brz, a u usporedbi s gore spomenutim halotan - kofeinskim dijagnostičkim testom omogućuje utvrđivanje tri moguće genske kombinacije: dominantno homozigotnu (N/N) neosjetljivu na stres, heterozigotnu (N/n) mogućeg prenositelja stres gena u uzgoju i recesivno homozigotnu (n/n) nositelja bolesti.

Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje statusa RYR1 gena primjenom PCR testa u farmskom uzgoju svinja u R. Hrvatskoj.

Materijali i metode

Izolacija stanične DNA

DNA smo izdvojili iz leukocita krvi. Krv smo uzimali venopunkcijom u sterilne plastične kivete koje su sadržavale antikoagulans (200 μ l EDTA 1,5 mg/ml). Uzorke smo držali u sterilnim uvjetima na temperaturi od -20°C . Otopili smo ih na sobnoj temperaturi te u 0,2 ml krvi dodali 500 μ l TE pufera

pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) da razorimo stijenke stanica leukocita. Zatim smo uzorke centrifugirali 13500 g/dvije minute, a dobiveni talog sa staničnom DNA isprali tri puta sa 500 μ l TE pufera. Talog smo resuspendirali u 100 μ l otopine koja sadrži: 10 X PCR pufer, 25 mM $MgCl_2$, koncentrirani Tween 20, proteinazu K (20 mg/ml), te inkubirali u vodenoj kupelji na 56°C/90 minuta. Proteinazu K inaktivirali smo zagrijavanjem na 96°C/10 minuta. Ohlađene uzorke centrifugirali smo nekoliko sekundi na 13500 g. Iz dobivenog supernatanta uzimali smo 5 μ l za lančanu reakciju polimerazom.

Lančana reakcija polimerazom

Dio DNA koji okružuje mjesto mutacije umnožili smo lančanom reakcijom polimerazom u 30 ciklusa na dvije temperature (Perkin Elmer Thermal Cycler). U prvom koraku DNA smo denaturirali na 94°C/13 sekundi. Drugi korak u kojem je došlo do vezanja klica i produženja lanca DNA odvijao se na 67°C/80 sekundi. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 25 μ l i sadržavao je 10 X PCR pufer II, 200 μ M svakog od četiri deoksinukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dvije klice (1mg/ml) (5'-TCCAGTTTGCCACAGGTC-CTACCA-3' i 5'-TTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAGT-3'), 0,5 μ l Taq polimeraze i 25 mM $MgCl_2$.

Cijepanje restrikcijskom endonukleazom

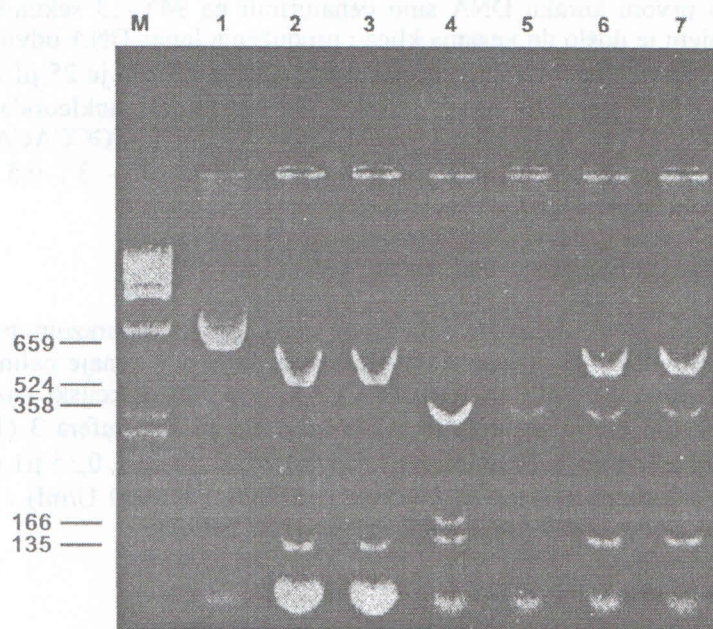
Fragmente DNA dobivene lančanom reakcijom polimerazom pocijepali smo Bsi HKA I restrikcijskom endonukleazom koja prepoznaje palindromski slijed nukleotida 5' - G(T ili A)GC(T ili A)C - 3'. Restrikcijski enzim smo dodali u smjesu od 10 μ l, koja je sadržavala: 3,5 μ l NE pufera 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DDT, pH 7,9), 0,35 μ l govedeg serumskog albumina (10 mg/ml), 0,5 μ l Bsi HKA I (10000 U/ml) i 5,65 ml redestilirane vode. Uzorke smo inkubirali dva sata na 60°C.

Gel elektroforeza

Za razdvajanje fragmenata DNA nastalih dijeljenjem i cijepanjem Bsi HKA I primijenili smo metodu elektroforeze na 3% agaroznom gelu u 1 X TAE puferu uz dodatak 5 μ l otopine etidijbromida (10 mg/ml). Na gel smo nanosili 20 μ l uzorka uz dodatak 5 μ l GLB-a (gel loading buffer). Kao marker koristili smo "Amplisize DNA" 50-2000 parova baza. Tijekom elektroforeze napon je iznosio 200 V, a jakost struje 25 mA. Nakon elektroforeze, gel smo analizirali na UV transiluminatoru.

Rezultati

U istraživanjima smo ispitali 637 svinja (151 nerast, 451 nazimica, 35 krmača) sa farme Sljeme. Uporabom PCR metode dobiveni su fragmenti DNA veličine 659 parova baza. Razgradnjom restrikcijskom endonukleazom i očitavanjem pod UV svjetlom otkrili smo tri genotipa svinja: dominantni homozigot (N/N), heterozigot (N/n) i recesivni homozigot (n/n). U dominantnih homozigota dobili smo dva fragmenta veličine 524 para baza i 135 parova baza. U heterozigota koji imaju jedan mutirani gen i jedan normalan nastala su četiri fragmenta veličine 524 para baza, 358 parova baza, 166 parova baza i 135 parova baza. Zbog mutacije nastalo je HgiAI restrikcijsko mjesto. U recesivnih homozigota nastaju tri fragmenta veličine 358 parova baza, 166 parova baza i 135 parova baza (Slika 1). U oko 5% uzoraka nije bilo moguće odrediti status gena zbog slabe umnoženosti DNA.



Slika 1. - RASPORED FRAGMENTA DNA U GELU NAKON UMNOŽAVANJA I RAZGRADNJE RESTRIKCIJSKOM ENDONUKLEAZOM: M - biljezi duljina fragmenata; 1 - umnožena DNA netretirana restrikcijskom endonukleazom; 2,3 - dominantni homozigoti (N/N); 4,5 - recesivni homozigoti (n/n); 6,7 - heterozigoti (N/n).

Figure 1. - DNA BANDS IN AGAROSE GEL AFTER PCR AMPLIFICATION AND DIGESTION WITH RESTRICTION ENDONUCLEASE: M - DNA size marker; 1 - amplified, undigested DNA; 2,3 - dominant homozygotes (N/N); 4,5 - recessive homozygotes (n/n); 6,7 - heterozygotes (N/n).

Zastupljenost gena za MH istražili smo na četiri pasmine svinja i njihovim križancima (Tablica 1). Najveću frekvenciju n/n gena našli smo u pasmini hempšir, a najnižu u križanaca ♀ švedski landras x ♂ veliki jorkšir. Najviši postotak heterozigota našli smo također u pasmini hempšir, a najniži u križanaca švedski ♀ landras x ♂ veliki jorkšir. Istražili smo i zastupljenost gena za MH s obzirom na spol i uzgojni status (Tablica 2). Postotak recesivnih homozigota najviši je u nerastova, dok ih u 35 ispitanih krmača nismo utvrdili.

Tablica 1. – ZASTUPLJENOST MUTACIJA ZA MALIGNU HIPERTERMIJU U RAZLIČITIH PASMINA SVINJA U HRVATSKOJ

Table 1. – PREVALENCE OF THE MALIGNANT HYPERTHERMIA MUTATION IN SWINE OF VARIOUS BREEDS

Pasmina	Broj testiranih svinja	Broj i % heterozigota ¹ (N/n)	Broj i % homozigota (n/n)	Frekvencija n/n gena ²
Veliki jorkšir	55	2(3,6)	1(1,81)	0,036
Švedski landras	217	13(5,9)	2(0,92)	0,039
Hempšir	29	6(20,69)	1(3,45)	0,138
Nizozemski landras	97	11(11,34)	1(1,03)	0,067
♀ Veliki jorkšir x ♂ Švedski landras	18	1(5,5)	1(5,55)	0,083
♀ Švedski landras x ♂ Veliki jorkšir	179	5(2,79)	3(1,67)	0,031
♀ Nizozemski landras x ♂ veliki jorkšir	42	2(4,76)	1(2,38)	0,048
UKUPNO	637	40(6,28)	10(1,57)	0,047

¹ - postotak je prikazan u zagradi

² - frekvencija = [(broj n/n homozigota x 2) + broj heterozigota]/broj testiranih svinja x 2

Tablica 2. – ZASTUPLJENOST MUTACIJA ZA MALIGNU HIPERTERMIJU U SVINJA S OBZIROM NA SPOL I UZGOJNI STATUS U HRVATSKOJ

Table 2. - PREVALENCE OF THE MALIGNANT HYPERTHERMIA MUTATION IN SWINE OF DIFFERENT SEX AND BREEDING STATUS

Spol i uzgojni status	Broj testiranih svinja	Heterozigoti (%)	n/n Homozigoti (%)
Nerasti	151	31.24	1.32
Nazimice	451	3.36	0.22
Krmače	35	14.3	0

Rasprava

Frekvencija mutiranog gena za MH u svinja ovisi o selekcijskoj strategiji i o prethodnom testiranju halotan testom. U našim istraživanjima pojavnost heterozigota za RYRI gen niža je od populacija testiranih u Kanadi, Sjedinjenim Američkim Državama i Engleskoj (Nelson i sur. 1995., O'Brian i sur. 1993.), dok je u recesivnih homozigota sličan. U R. Hrvatskoj nikad nije sustavno provedeno testiranje halotan testom, pa je bilo za očekivati da će broj heterozigota i recesivnih homozigota za RYRI gen biti znatno veći (Bašić i sur. 1997., Lacković i sur. 1997.). Međutim, zbog loših uvjeta u uzgoju životinja i čestih stresnih situacija (primjerice neprimjerena briga o životinjama, loši uvjeti transporta) svinje podložne bolesti najvjerojatnije su isključene uginućem u prvim mjesecima života, tako i nepostojanje recesivnih homozigota u krmača (Tablica 2), potvrđuje gore navedeno. Rezultati pokazuju da je uporabom testa koji se temelji na analizi DNA moguće točno, brzo i po zanemarivoj cijeni odrediti status jedinki za RYRI gen na reprodukcijским farmama i obiteljskim gospodarstvima. To omogućava izbjegavanje znatnih gubitaka u uzgoju svinja i kakvoći mesa, a ujedno prema rezultatima testa stvaranje modela uzgoja i selekcije s ciljem potpunog isključivanja recesivnih homozigota i povećanjem broja heterozigota. Uočeno je, naime, da heterozigotni nositelji RYRI gena imaju izražajniju mesnatost i potencijalno kvalitetnije toвне sposobnosti (poboljšana kakvoća mesa i manja potrošnja hrane) (Cheah i sur. 1994., Dovč i sur. 1996.). Stvaranjem dobrog modela selekcije na temelju uvida u stanje RYRI gena u uzgojima svinja moguće je znatno unaprijediti uzgoj, te tako smanjiti nekontrolirani i nepotrební uvoz genetski loših životinja koje ne pridonose kakvoći i isplativosti uzgoja. Zato je temeljeno na našim rezultatima hvale vrijedan Pravilnik o uzgoju valjanih rasplodnih životinja (dio: testiranje rasplodnih svinja u R. Hrvatskoj) u kojem se za utvrđivanje uzgojne vrijednosti muških i ženskih grla čistih pasmina predviđa njihovo obavezno testiranje osjetljivosti na stres (RYRI gen).

LITERATURA:

1. Bašić, I., Z. Tadić, V. Lacković, A. Gomerčić (1997): Stress syndrome: Ryanodine receptor (RYRI) gene in malignant hyperthermia in humans and pigs. *Periodicum Biologorum* 99: N° 3, 313-317.
2. Britt, B.A. (1991): Malignant Hyperthermia - A Review. In: *Thermoregulation: Pathology Pharmacology and Therapy* Eds: Schonbaum E and Lomax P, Pergamon Press, New York, pp 179-292.
3. Cheah, S.K., A.M. Cheah, I.D. Krausgrill (1994): Variations in meat quality in live halothane heterozygotes identified by biopsy samples of *M. Longissimus dorsi*. *Meat Science*, 39: 293-300.
4. Dovč, P., A. Šalehar, M. Kovač, M. Kastelic (1996): Frequency of the RYR1 n allele and its influence on fattening traits. *Arch. Tierz.* 39: 441-446.

5. Fletcher, J.E., P.A. Calvo, H. Rosenberg (1993): Phenotypes associated with malignant hyperthermia susceptibility in swine genotyped as homozygous or heterozygous for the ryanodine receptor mutation. *British Journal of Anesthesia* 71: 410-417.
6. Fletcher, J.E., L. Tripolitis, H. Rosenberg, J. Beech (1993): Malignant hyperthermia: halothane- and calcium- induced calcium release in skeletal muscle. *Biochemistry and Molecular biology international* 29: 763-772.
7. Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. DeLeon, V.K. Khanna, J.E. Weiler, P.J. O'Brian, D.H. MacLennan (1991): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451.
8. Gillard, E.F., K. Otsu, J. Fujii, V.K. Khanna, S. DeLeon, J. Derdemezi, B.A. Britt, C.L. Duff, R.G. Worton, D.H. MacLennan (1991): A substitution of Cysteine for Arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 11: 751-755.
9. Harbitz, I., T. Kristensen, M. Bosnes, S. Kran, W. Davies (1992): DNA sequence of the skeletal muscle calcium release channel cDNA and verification of the Arg⁶¹⁵Cys⁶¹⁵ mutation, associated with porcine malignant hyperthermia, in Norwegian Landrace pigs. *Animal Genetics* 23: 395-402.
10. Lacković, V., Z. Tadić, A. Vitković, P. Bosnić, T. Balenović, A. Pleli, I. Bašić (1997): Determination of the malignant hyperthermia (MH) gene status in swine in Croatia. *Periodicum Biologorum* 99: No 3 433-435.
11. MacLennan, D.H., M.S. Phillips (1992): Malignant Hyperthermia. *Science* 256: 789-794.
12. Nelson, T.E., M. Lin (1995): Abnormal function of porcine malignant hyperthermia calcium release channel in the absence and presence of halothane. *Cell Physiol. Biochem.* 5:10-22.
13. O'Brian, P.J., H. Shen, C.R. Cory, X. Zhang (1993): Use of a DNA - based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10000 breeding swine. *JAVMA* 203: No 6 842-851.
14. Richter, A., Gerdes, C. Löscher (1992): Atypical reactions to halothane in a subgroup of homozygous malignant hyperthermia (MH)-susceptible pigs: Indications of a heterogenous genetic basis for the porcine syndrome. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 99: 393-432.
15. Shomer, N.H., C.F. Louis, M. Fill, L.A. Litterer, J.R. Mickelson (1993): Reconstitution of abnormalities in the malignant hyperthermia-susceptible pig ryanodine receptor. *Am. J. Physiol.* 264 (Cell Physiol. 33): 125-135.
16. Vögeli, P., R. Bolt, R. Fries, G. Stranzinger (1994): Co-segregation of the malignant hyperthermia and the Arg⁶¹⁵-Cys⁶¹⁵ mutation in the skeletal muscle calcium release channel protein in five European Landrace and Pietrain pig breeds. *Animal Genetics* 25: supp.1 59-66.

DETERMINATION OF THE MALIGNANT HYPERTHERMIA GENE STATUS IN BREEDING SWINE IN CROATIA

Summary

The malignant hyperthermia (MH) gene status of 637 pigs was investigated using Polymerase Chain Reaction (PCR). Four breeds and crossbred pigs were tested. The results show the highest frequency of n/n gene in the Hampshire and the lowest in the crossbred ♂ Swedish Landras x ♂ Large White pigs. The highest percentage of N/n gene was found in the same breed and crossbred pigs. We also tested the swine of different breeding status and sex. The boars showed the highest percentage of N/n and n/n genotype. The assessed MH status gives an opportunity for selective breeding with better fattening traits and superior meat quality.

Primljeno: 20. 6. 1998.