

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОФИЗМА ГЕНА ЛЕПТИНА (LEP) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭНДОКРИННЫХ НАРУШЕНИЙ У ТЕЛЯТ КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ

Аннотация

Животноводство республики является основной отраслью сельского хозяйства, перед которой стоят важные задачи – обеспечение населения продуктами питания легкую промышленность сырьем. Для этого нужно не только улучшить условия кормления животных и технология приготовления кормов, а также разработать и внедрить новые перспективные методы повышения продуктивности животных, привести их в соответствие с теми требованиями, которые предъявляют к ним новые типы животных, физиология которых обусловлена более высокой продуктивностью и приспособленностью к интенсивным условиям среды и эксплуатации.

Ключевые слова: тиреоглобулина, полиморфизм, тиреотропный, гормон, гипофиз.

Введение

Важным резервом в производстве говядины в РК следует считать повышение продуктивности животных разводимых местных пород. Специфические особенности животных казахской белоголовой породы и хорошая приспособленность к природно-климатическим условиям определили значимость этой породы во многих регионах СНГ от берегов Волги до Тихого океана. Казахская белоголовая порода является основой специализированного мясного скотоводства. От ее совершенствования во многом зависят увеличение производства говядины, улучшение ее качества и снижение себестоимости. Достижения современной молекулярной генетики позволяют исследовать гены, связанные с хозяйственно полезными признаками сельскохозяйственных животных. В качестве потенциальных маркеров молочной и мясной продуктивности крупного рогатого скота могут рассматриваться аллели генов соматотропина (GH), пролактина (PRL), лептина (LEP), тиреоглобулина (TG). Это подтверждается данными многих исследований. Аллельный полиморфизм генов GH, LEP, TG влияет на качество мяса, а также на толщину жировой прослойки между волокнами мышечной ткани у крупного рогатого скота. Все выше сказанное говорит о важности изучения полиморфизма генов GH, PRL, LEP, TG у крупного рогатого скота.

Разводимые в Республике Казахстан и сопредельных странах породы КРС не полностью охарактеризованы по генам, ответственным за качество мяса в условиях нарушения эндокринного метаболизма.

Показать и оценить полиморфизм гена лептина (LEP1, LEP2, LEP3), определить возможность его использования в повышении продуктивности на моделях с эндокринной коррекцией метаболизма у телят породы - казахская белоголовая.

Материал и методы

Объектом исследования являлись 20 телок породы казахская белоголовая 9 месячного возраста с средней массой тела $172,7 \pm 5,7$ кг. Распределение животных в опытных и контрольных группах приведено в таблице 1. Кормление и условия содержания подопытных животных соответствовали технологии, принятой в ИП «Мади». Общий уровень кормления определялся с учетом их продуктивности, возраста и физиологического состояния, согласно нормам. Рационы подопытных животных были сбалансированы по нормам ВАСХНИЛ (Калашников А.П. и др., 2003) с учетом физиологического состояния животных, их живой массы, предполагаемой продуктивности и были практически уравнены по общей питательности, которая составила 10,36-10,46 к.ед.. Для опыта были отобраны здоровые,

нормально развитые, имеющие хороший аппетит животные по 5 голов на каждую группы. Опыты проводили с сентября месяца по октябрь в течение 60 дней (заключительный откорм). В переходный период животных опытных групп приучали к поеданию испытуемых рационов, включающих добавку мерказолила и глутамата натрия (таблица 1,2).

Таблица 1 - Схема научно-производственного опыта

Группы	Условия проведения опыта
Контрольная	Условия содержания животных, принятые в хозяйстве (ИП «Мади»)
Опытная	ИП «Мади» + препарат мерказолил и глутамат натрия в дозе 20 мг/кг и 10мг/кг массы тела ежедневно

Таблица 2 - Схема эксперимента

Группа	Количество голов	Характеристика кормления
I	5	ОР + мерказолил
II	5	ОР + глутамат натрия
III(контроль)	10	Основной рацион (ОР)

Состав и количество кормов для коров всех групп были одинаковыми. Основными кормами в этот период были: сено люцерны – 5,4, сенаж пшеничный – 8,4, силос кукурузный – 8,5, ячмень дробленый и пшеница – 3,0, соя – 2,0, жмых подсолнечный – 1,0, патока кормовая – 1,5, барда – 2,0, соль поваренная – 0,12, монокальцийфосфат – 0,04 кг.

В ходе эксперимента у животных были изучены показатели крови, метаболизма белков, жиров и углеводов, состояние гуморального и клеточного иммунитета. Уровень эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина определяли с использованием автоматического гематологического анализатора MS4/5 (Франция). Содержание в крови общего белка, альбуминов, глюкозы, холестерина, мочевины, хлоридов, креатинина, общего билирубина, кальция, неорганического фосфора, активность сывороточных аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) определяли с использованием готовых наборов реагентов производства «Вектор-Бест» (Россия) с использованием биохимического анализатора ScreenMaster, Италия). Гормональный профиль щитовидной железы (Т3 и Т4) и гипофиза (ТТГ) определяли методом ИФА на анализаторе StatFax 2100, (США) с использованием наборов реагентов «Вектор-Бест» (Россия).

Для проведения ДНК-диагностики по генам *LEP* у 5 коров казахской белоголовой породы (контрольная группа) и 5 коров опытной группы отобраны пробы крови. Кровь, полученную из яремной вены животных, вносили в пробирки с 100 мМ ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ. ДНК из крови выделяли комбинированным щелочным способом. 100 мкл крови смешивали с 1 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадку добавляли 50 мкл 0,2 М NaOH, тщательно встряхивали смесь на вортке при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 60 .С в течение 10 мин. К лизату добавляли равный объем (50 мкл) 1 М Трис- HCl (pH=8,0) и тщательно встряхивали смесь на вортке при комнатной температуре. К полученному гомогенату добавляли 500 мкл 96 %-го этанола и выдерживали полученную смесь при –20.С в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 12 тыс. об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при 60 .С в течение 12 мин с открытой пробиркой. К высушенному осадку добавляли 100 мкл 10 %-го аммиака, тщательно встряхивали смесь на вортке при комнатной температуре и выдерживали в термостате при 60 .С в течение 10 мин, затем повторно встряхивали на вортке и выдерживали в термостате при 60 .С в течение 10 мин. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95 .С в течение 15 мин с открытой пробиркой. Генотипирование по генам *LEP* проводили методом ПЦР-ПДРФ и АС-ПЦР соответственно

ПЦР RealTime. Для амплификации фрагментов генов *LEP* использовали следующие праймеры: LEP-F1: 5'-GAC-GAT-GTG-CCA-CGT-GTG-GTT-TCT-TCT-GT-3', LEP-R1: 5'-CGG-TTC-TAC-CTC-GTC-TCC-CAG-TCC-CTC-C-3', LEP-F2: 5'- TGT-CTT-ACG-TGG-AGG-CTG-TGC-CCA-GCT-3', LEP-R2: 5'-AGG-GTT-TTG-GTG-TCA-TCC-TGG-ACC-TTT-CG-3' (Corvaetal., 2009).

Для визуализации фрагментов ДНК пробы вносили в лунки 2,5-4,0 % агарозного геля с содержанием этидия бромид (0,5 мкг/мл) и проводили горизонтальный электрофорез при 15 В/см в течение 40 мин в 1 × TBE буфере. После электрофореза гель просматривали в УФ-трансиллюминаторе при длине волны 310 нм. Идентификацию генотипов определяли по количественным и качественным признакам. Частоту встречаемости генотипов определяли по формуле: $p = n / N$, где p – частота определения генотипа, n – количество особей, имеющих определенный генотип, N – число особей. Частоту отдельных аллелей определяли по формуле: $P_A = (2n_{AA} + n_{AB}) : 2N$, $q_B = (2n_{BB} + n_{AB}) : 2$, где P_A – частота аллеля А, q_B – частота аллеля В, N – общее число аллелей. По закону Харди–Вейнберга рассчитывали ожидаемые результаты частот генотипов в исследуемой популяции. Статистический анализ (компьютерная программа MicrosoftOfficeExcel 2007).

Результаты исследования

Подопытных животных через каждые 10 дней в учетный период подвергали клиническому осмотру: измеряли температуру тела, устанавливали частоту пульса и дыхательных движений. Нами установлено, что температура тела и другие физиологические показатели у подопытных животных были в пределах нормы (таблица 3).

Таблица 3 – Клинические показатели животных

Показатель	Группы животных		
	I	II	III
Частота: пульса в 1 мин.	73,1±0,33	72,1±0,40	72,5±0,48
Частота дыхательных движений в 1 мин.	25,8±0,47	24,3±0,34	23,8±0,49
Температура тела, °C	38,43±0,13	38,28±0,12	38,33±0,10

Частота пульса у 1 группы была выше, чем у 2-группы, всего на 0,79%, а частота дыхания проявилась интенсивнее на 2,14% ($P \geq 0,05$). Температура тела подопытных животных изменялась незначительно, диапазон колебаний варьировал в пределах 0,13-0,17°C. Незначительные изменения основных клинических параметров в зависимости от условий содержания у животных обеих групп указывает на хорошие приспособительные качества и высокую реактивность организма.

Величина живой массы является показателем развития упитанности, физиологического состояния, а так же уровня обеспеченности организма животных питательными веществами (Таблица 4).

Таблица 4 – Динамика среднесуточного прироста живой массы у подопытных телок, ($M \pm m$).

Возрастной период, мес.	Группа		
	1 опытная	2 опытная	3 контрольная
9	1028,9±14,8	1053,3±15,2	992,2±14,3 *
10	942,6±17,3	1017,5±16,2	890,6±18,4 **
11	921,3±12,1	975,5±13,0	817,2±10,2 **
За период опыта	964,2±12,9	1015, ±12,4	899,9±13,2 **

Гормональный статус животных отражает уровень их метаболизма и находится под влиянием внешней и внутренней среды: кормления, сезона года, породы, живой массы, возраста (Радченков В.П. и др., 2002) и во многом зависит от потребностей тканей в гормонах, возможностей их депонирования, глубоких перестроек в органах и организме в целом. Проведенными исследованиями установлено, что концентрация изучаемых гормонов

изменялась у животных в различные фазы эксперимента при введении и глутамата натрия (таблица 5).

Таблица 5 – Изменения содержания тиреотропного гормона гипофиза и гормонов щитовидной железы Т4 (тироксина) и Т3 (трийодтиронина) в сыворотке крови опытных и контрольных животных ($M \pm m$)

Эксперимент/контроль	Т4 нмоль/л	Т3 нмоль/л	ТТГ нмоль/л
I группа (опыт)			
Время исследования:			
1 неделя	81,53±4,51	2,06±0,07	27,4±7,3
3 неделя	90,40±5,00	2,12±0,07	32,7±4,8
4 неделя	97,79±3,40	2,37±0,01	38,2±5,4
6 неделя	80,7±2,31	2,90±0,05	10,6±2,5
7 неделя	67,8±3,70	2,31±0,12	9,7±1,9
8 неделя	85,8±2,89	2,26±0,13	18,1±2,2
II группа (опыт)			
Время исследования:			
1 неделя	92,6±5,1	2,01±0,13	26,7±6,8
3 неделя	107,5±4,3	2,09±0,07	38,4±4,7
4 неделя	126,5±3,5	2,45±0,15	43,5±6,8
6 неделя	67,8±3,69	2,33±0,14	10,7±3,1
7 неделя	54,6±1,81	1,98±0,46	10,8±1,0
8 неделя	84,5±5,80	2,09±0,12	17,8±2,8
III группа (контроль)			
Время исследования:			
1 неделя	86,7±4,7	2,13±0,12	27,8±5,6
3 неделя	127,1±6,3	2,73±0,07	46,3±4,7
4 неделя	139,7±4,98	2,99±0,15	54,3±3,89
6 неделя	72,1±3,21	2,71±0,15	13,2±3,7
7 неделя	57,6±2,09	2,23±0,09	13,0±3,3
8 неделя	80,7±4,30	2,13±0,03	16,1±4,4

Выявлено, что у животных всех трех групп уровень тироксина составил в среднем 86,9±4,77 нмоль/л, трийодтиронина – 2,07±0,10 нмоль/л. Трийодтиронина по этим периодам в большей степени на 22,0-30,6% ($p < 0,001$) содержалось в сыворотке крови животных III.

Таким образом, изменение гормонального фона в организмах опытных групп животных соответствуют клинически протекающему гипотиреозу. Исследования гормонов показали, что при введении мерказолила и глутамата натрия изменяются функции ЩЖ и аденогипофиза. Таким образом, существует не только зависимость функции ЩЖ от дефицита или избытка ТТГ, но и сама щитовидная влияет на клеточные элементы аденогипофиза. Кроме этого выявлено, что гипофункция ЩЖ влияет на уровень гематологических показателей в условиях эксперимента идет подавление активности костного мозга у животных 1-ой опытной группы.

Исследования телок породы казахская белоголовая во всех 3-х группах по гену *LEP* показали следующее распределение генотипов: *CC* – 7 (35%), *CT* – 11 (55 %) и *TT* – 2 (10 %). При этом частота аллелей *C* и *T* соответственно составила 63,1% и 36,9%.

Таблица 6 - Полиморфизм генов *LEP* у телок породы казахская белоголовая.

Генотип	n	Частота генотипов, %		Частота аллелей (%)	X ²
		наблюдаемая	ожидаемая		
СС	7	35	37	С- 63,1 Т- 36,9	0,56
СТ	11	55	51		
ТТ	2	10	12		

Доля животных с презумптивно желательным генотипом СС составляла до 35% от общего числа животных. Частота аллеля С гена *LEP* составляла 63,1% и находилась на достаточно высоком уровне аналогичных показателей, сравнимых с литературными данными.

Литература

1. В. Л. Петухов А. И. Жигачев Г. А. Назарова. Ветеринарная генетика -М.:Колос,1996:384 с.
2. Хабибрахманова Я.А. Полиморфизм генов молочных белков и гормонов крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. ВНИИплем. Лесные Поляны Московской обл., 2009-19 с.
3. Buchanan F.C., Futzsimmons C.J., Van Kessel A.G.et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels // Genet. Sel. Evol. 2002. V. 34. P. 105–116.
4. Corva P.M., Macedo G.V.F., Soria L.A. et al. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers // Genet. Mol. Res. 2009. V. 8. No. 1. P. 105–116.
5. KaplanovaK., Dvořak J., Urban T. Association of single nucleotide polymorphisms in *TG*, *LEP* and *TFAM* genes with carcass traits in cross-breed cattle// Mendel Net Agro. 2009. P. 139.
6. Lee B.K., Lin G.F., Crooker B.A. et al. Association of somatotropin (*bst*) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows // Domestic Anim. Endocrinol. 1996. V. 13. No. 4. P. 373–381.

Молдакаримов А. Буралхиев Б.А

ҚАЗАҚТЫҢ АҚБАС БҰЗАУЛАРЫНЫҢ ЭНДОКРИНДІК ЖҮЙЕСІН МОДЕЛЬДЕУМЕН ЭКСПЕРИМЕНТТІК ГЕНДІК ЛЕПТИНДІ АНЫҚТАУ

Аңдатпа: Республикамызда ауыл шаруашылық саласына мал шаруашылығының атқаратын орны өзгеше және манызды міндеттер қойылып отыр, себебі халқымызды бағамен, ал жеңіл өнеркәсіпті шикізатпен қамтамасыз ету. Осы міндеттерді орындау үшін малды азықтандыру, жем-шөп дайындау технологиясын жетілдеру және мал өнімдерін арттыруда оның технологияларды қолданып жаңа талаптарға сай келтіру.

Кілт сөздер: тиреоглобулин, полиморфизм, тиреотроптық, гормон, гипофиз.

Moldakarimov A. Buralkhiev B.A.

STUDY OF GENE POLIMOFIZMA LEPTIN (LEP) IN EXPERIMENTAL MODELING OF ENDOCRINE DISORDERS CALVES KAZAKH WHITE BREED

AbstractIn these issues use principal new approach for hi production from agricultural area. The works has new problems in production meat and milk from cow.

Key words: Lep gen polymorphism, meat, cattle, thyroglobulin, hypophysis.