

УДК 577.21:599.735.51:577.122.38

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ КОРОВ ПРИ BLAD-СИНДРОМЕ

А. А. Глазев, О. А. Епишко, С. Д. Клиса

УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230023, г. Гродно, ул. Ожешко, 22; e-mail:
mail@grsu.by)

Ключевые слова: наследственные заболевания, крупный рогатый скот, свободные аминокислоты, диагностика.

Аннотация. В данной работе исследовали аминокислотный профиль хрящевой ткани коров голштинской породы в норме и при наследственном заболевании – синдроме дефицита адгезивности лейкоцитов (BLAD-синдроме), обусловленного мутацией в гене CD18. ДНК-диагностику носительства мутации гена CD18 у сельскохозяйственных животных проводили методом ПЦР-анализа с использованием специальных праймеров. Скрининг аминокислотного профиля хрящевой ткани животных проводили методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с детектированием по флуоресценции. Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров при BLAD-синдроме показал значительное увеличение содержания большинства свободных аминокислот более чем в 10 раз по сравнению с генетически здоровым контролем, что обусловлено влиянием мутации гена CD18 на процессы промежуточного метаболизма основных низкомолекулярных биорегуляторов в клетках хрящевой ткани крупного рогатого скота.

AMINO ACID PROFILE OF CARTILAGINOUS TISSUE OF COWS AT THE BLAD-SYNDROME

A. A. Glazev, O. A. Epishko, S. D. Klisa

EI «Yanka Kupala State University of Grodno»
Grodno, Republic of Belarus
(Republic of Belarus, 230023, Grodno, 22 Ozheshko st.; e-mail:
mail@grsu.by)

Key words: hereditary disease, cattle, free amino acids, diagnostics.

Summary. In this work was investigated an amino acid profile of cartilaginous tissue of the cattle of Holstein in normal and in hereditary disease – bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD-syndrome), which caused by mutation of the gene CD18. DNA-diagnostics of a carriage of a mutation of a gene of CD18 at farm animals was carried out by the PCR-analysis with special primers. Screening of an amino acid profile of the cartilaginous tissue of animals was carried out by reverse phase liquid chromatography with detecting in fluorescence. The comparative analy-

sis of content of free amino acids and their metabolites in cartilaginous tissue of cows with BLAD-syndrome have shown a significant increase in the concentration of most free amino acids by more than 10 times compared to genetically healthy controls. It's caused by influence of mutations of the gene CD18 on processes of a intermediate metabolism of basic low-molecular bioregulators in cells of cartilaginous tissue of cattle.

(Поступила в редакцию 01.06.2018 г.)

Введение. В Республике Беларусь на протяжении длительного периода для совершенствования белорусской черно-пестрой породы крупного рогатого скота используется генофонд голштинской породы. Однако разнообразие в выборе импортируемых быков не всегда позитивно отражается на качестве улучшаемого отечественного поголовья. Поэтому при закупке импортных быков-производителей встает проблема получения, оценки и отбора животных, наиболее пригодных для использования в хозяйственных условиях [1].

Использование зарубежного племенного материала для совершенствования белорусской черно-пестрой породы крупного рогатого скота может сопровождаться передачей некоторых генетических патологий, которые могут привести к огромным экономическим потерям [2].

В настоящее время у крупного рогатого скота описано более 60 наследственных заболеваний, которые выявляются на уровне ДНК [3].

Одним из наиболее распространенных рецессивных генетических дефектов голштинской породы крупного рогатого скота является BLAD-синдром, или синдром дефицита адгезивности лейкоцитов – наследственное заболевание, обусловленное точечной мутацией в кодирующей части аутосомного гена CD18, контролирующего синтез гликопротеида (β 2-интегрин), играющего роль в миграции нейтрофилов к очагу воспаления [4, 5].

Организм животных, несущих в своем генотипе мутантный аллель в гомозиготном состоянии, не способен противостоять вирусным и бактериальным инфекциям, что приводит к снижению иммунитета животных и заканчивается летальным исходом.

В связи с этим возникает необходимость более полной генетической и метаболической оценки сельскохозяйственных животных-производителей среди пород крупного рогатого скота по устойчивости к наследственным заболеваниям, обусловленным мутациями различных генов и хромосом [1].

Цель работы – исследовать изменения содержания свободных аминокислот и их метаболитов в клетках хрящевой ткани коров голштинской породы при BLAD-синдроме.

Материал и методика исследований. Молекулярно-генетические исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий УО «Гродненский государственный аграрный университет» и НИЛ биохимии биологически активных веществ УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы».

В качестве объекта исследований использовали коров голштинской породы, разводимых в хозяйствах СПК «Свислочь», ОАО «Агро-сад рассвет», КСУП «Племенной завод «Красная звезда» и РСУП «Племенной завод «Муховец».

Геномную ДНК выделяли из ткани животных перхлоратным методом.

Реакционная смесь для проведения полимеразной реакции по гену CD18 готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: 1xTaq-буфер – 1,6 мкл; MgCl₂ (25 мМ) – 0,5 мкл; смесь dNTP (25 мМ) – 2 мкл; праймеры – 0,5 мкл; Taq-полимераза – 0,5 мкл; ДНК (100-200 нг/мкл) – 0,5 мкл; вода (дистиллированная) – 18,9 мкл.

Для проведения амплификации использовались праймеры:

- 5'-TGAGACCA GGTCA GGCATTGCGTTCA-3';
- 5'-CCCCCA GCTTCTTGACGTTGACGA GGTС-3'.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе C100 Touch Thermal Cycler. Режим амплификации состоял из следующих этапов: «горячий старт» – 5 мин при температуре 93°C; 35 циклов: денатурация – 1 мин при 93°C, отжиг – 1 мин при температуре 60°C, синтез – 1 мин при 72°C; достройка – 5 мин при температуре 72°C.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 1,5%-м агарозном геле (при напряжении 110 В). Длина амплифицированного фрагмента ДНК составляла – 132 п. н.

Для рестрикции амплифицированного участка гена CD18 использовали эндонуклеазу TaqI. Реакцию проводили при температуре 65 °С.

Продукты рестрикции генов разделяли электрофоретически в 4%-м агарозном геле (при напряжении 130 В) в 1×TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе геледокументирования Gel Doc RX+(Biorad).

При расщеплении продуктов амплификации рестриктазой TaqI идентифицируются следующие генотипы:

- CD18^{TL} – 71 и 61 п. н. (свободный от мутации);
- CD18^{TLBL} – 132, 71 и 61 п. н. (гетерозиготный носитель мутации);
- CD18^{BLBL} – 132 п. н. (гомозиготный носитель мутации, летальный) [6].

Количественный анализ свободных аминокислот и их метаболитов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии их ортофталевых и флуоренилметилхлороформатных производных в безбелковых хлорнокислых экстрактах биологических образцов на аналитической колонке, заполненной обращенно-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C₈, в режиме градиентного элюирования подвижной фазой на основе 0,1 М натрий-ацетатного буфера и органического модификатора ацетонитрила в объемной доле 70% при скорости потока элюента 0,2 мл/мин, температуре анализа 38°C и детектирования по флуоресценции 231/445 нм по методу внутреннего стандарта.

В качестве внутреннего стандарта использовали δ-аминовалериановую кислоту.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ результатов ДНК-типирования популяции крупного рогатого скота (n=80) в исследуемых хозяйствах показал наличие 4-х гетерозиготных носителей мутации данного гена.

Для изучения влияния мутации гена CD18 на метаболические процессы в клетках животных были проведены исследования содержания широкого спектра низкомолекулярных эндогенных биорегуляторов – свободных аминокислот и их производных как интегральных показателей метаболического гомеостаза клетки, отражающих изменение направленности основных метаболических потоков, функционирования систем транспорта и межорганного распределения, окислительно-восстановительных реакций, скорости синтеза и деградации широкого круга биологически активных соединений в животной клетке.

Определение закономерностей формирования фонда свободных аминокислот и их метаболитов проводили в образцах хрящевой ткани генетически здоровых сельскохозяйственных животных (коров) и животных-носителей мутации гена CD18, приводящего к развитию BLAD-синдрома. Основные результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани генетически здоровых коров голштинской породы и коров с BLAD-синдромом

Наименование аминокислот и их метаболитов	Молярная концентрация аминокислот, мкмоль/г ткани	
	Здоровый контроль	BLAD-синдром
Цистеиновая кислота	0,06±0,03	0,04±0,01
Фосфосерин	0,03±0,01	0,13±0,02*
Аспарагиновая кислота	0,66±0,26	1,29±0,42
Глутаминовая кислота	3,46±1,71	31,98±4,78*
Аспарагин	0,05±0,06	0,56±0,13*

Продолжение таблицы 1

Серин	2,50±0,91	40,49±4,49*
Глутамин	0,51±0,31	3,76±1,02*
Гистидин	0,24±0,08	7,33±2,39*
Глицин	1,41±0,53	62,69±3,25*
Фосфоэтаноламин	0,09±0,05	4,88±0,31*
Треонин	0,67±0,26	15,54±1,37*
Цитруллин	0,27±0,22	8,01±1,62*
Аргинин	0,58±0,20	8,99±1,32*
β-аланин	0,69±0,49	7,44±1,57*
Аланин	2,09±0,82	55,00±4,53*
Таурин	4,44±2,69	16,54±1,43*
γ-аминомасляная кислота	0,13±0,05	1,58±0,63*
Тирозин	0,19±0,05	2,18±0,14*
α-аминомасляная кислота	0,09±0,08	0,38±0,09*
Этаноламин	6,90±2,76	10,27±0,60*
Валин	0,69±0,23	9,33±0,88*
Метионин	0,04±0,04	1,63±0,14*
Цистатионин	0,22±0,21	1,07±0,27*
Триптофан	0,05±0,02	0,34±0,03*
Изолейцин	0,20±0,65	3,64±0,33*
Фенилаланин	0,18±0,06	1,83±0,15*
Лейцин	0,29±0,12	7,62±0,53*
Гидроксипролин	7,74±0,04	1,41±0,51*
Орнитин	5,13±1,42	3,48±0,98*
Лизин	0,47±0,17	0,81±0,18*
Пролин	0,92±0,26	2,16±0,83*

Примечание – * $P < 0,05$ при сравнении животных с BLAD-синдромом и здорового контроля по *t*-критерию Стьюдента

Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров, которые являются носителями мутации гена CD18 (BLAD-синдром), показал значительное увеличение содержания большинства исследуемых соединений по сравнению с генетически здоровым контролем (таблица 1).

Так, концентрация аспарагиновой кислоты, лейцина, лизина, пролина, а также основных продуктов метаболизма серосодержащих аминокислот (цистатионина и таурина) увеличилась более чем в 2 раза, содержание глутаминовой кислоты, глутамина, аспарагина и ароматической аминокислоты (триптофана) увеличилось более чем в 5 раз по сравнению с их содержанием в ткани генетически здорового контроля (таблица 1).

Концентрация серина, аргинина, ароматических аминокислот (тирозина и фенилаланина), а также аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (валина и изолейцина) увеличилась более чем в 10 раз, а содержание свободных аминокислот (аланина, метионина, трео-

нина, гистидина и глицина) – более чем в 15 раз по сравнению с контролем (таблица 1).

Молярная концентрация орнитина у коров с BLAD-синдромом снизилась в 1,5 раза, а содержание метаболита серосодержащих аминокислот (цистеиновой кислоты) не претерпело существенных изменений по сравнению с их содержанием в тканях здорового контроля (таблица 1).

Параллельно с определением широкого спектра индивидуальных аминокислот и их метаболитов был произведен расчет содержания основных функциональных групп свободных аминокислот, характеризующих метаболическое состояние клеток хрящевой ткани здоровых коров и коров с генетической патологией (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание основных функциональных групп аминокислот в хрящевой ткани генетически здоровых коров голштинской породы и коров с BLAD-синдромом

Наименование функциональных групп аминокислот	Молярная концентрация, мкмоль/г ткани	
	Здоровый контроль	BLAD-синдром
Незаменимые	2,56±0,78	40,74±3,16*
Заменимые	9,53±2,97	207,43±14,85*
Гликогенные	13,81±4,21	203,75±14,47*
Кетогенные	1,35±38,85	16,42±1,11*
Серосодержащие	4,76±2,74	156,10±13,3*
Ароматические	0,43±0,10	4,35±0,26*
Циклические	1,59±0,27	13,83±2,09*
Основные	2,39±0,33	17,12±2,47*
Кислые	4,12±1,93	33,26±4,55*
Протеиногенные	15,16±4,50	257,15±18,61*
Непротеиногенные	6,61±1,88	23,36±2,7*

*Примечание – * $P < 0,05$ при сравнении животных с BLAD-синдромом и здорового контроля по t -критерию Стьюдента*

Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани здоровых коров, а также коров, которые являются носителями генетической патологии (синдрома дефицита адгезивности лейкоцитов), показал достоверное увеличение концентраций большинства функциональных групп свободных аминокислот более чем в 10 раз по сравнению с генетически здоровым контролем (таблица 2).

Следует отметить более чем 15-кратное повышение концентраций незаменимых и гликогенных аминокислот в клетках хрящевой ткани животных с исследуемой генетической патологией (таблица 2).

Указанные изменения, по-видимому, обусловлены возникновением и развитием существенного метаболического дисбаланса в реакциях промежуточного обмена основных низкомолекулярных биорегулято-

ров, вызванного носительством мутации в гене CD18, поскольку у исследуемых пород сельскохозяйственных животных отсутствуют иные, гистологически и биохимически выявляемые патологии, которые могут быть объективной причиной возникновения и развития установленного дисбаланса в содержании свободных аминокислот в клетке.

Заключение. Таким образом, сравнительный анализ содержания широкого спектра свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров при синдроме дефицита адгезивности лейкоцитов показал многократное увеличение их концентраций по сравнению с генетически здоровыми особями.

Значимое увеличение концентраций основных биологически активных групп свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров при BLAD-синдроме по сравнению с генетически здоровым контролем обусловлено влиянием мутации гена CD18 на процессы промежуточного обмена свободных аминокислот и их производных в клетках хрящевой ткани крупного рогатого скота голштинской породы.

Выявленные метаболические особенности в организме исследованных сельскохозяйственных животных являются основой для дальнейшего изучения влияния различных генетических аномалий (патологий) на обменные процессы ключевых низкомолекулярных эндогенных соединений в животной клетке и могут быть использованы в программах по разработке новых алгоритмов молекулярно-генетического скрининга и оценке метаболических последствий развития (носительства) генетических дефектов у хозяйственно-ценных пород сельскохозяйственных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Епишко, Т. И. Молекулярно-генетические аспекты в решении задач животноводства предприятий ОАО «Агрокомбинат «Мачулищи» / Т. И. Епишко, Т. И. Кузьмина, О. А. Епишко // Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии: сборник научных трудов / редкол.: Т. И. Епишко (отв. ред.) [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2012. – С. 39-46.
2. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Сиб. унив. изд-во. – Новосибирск, 2004. – 496 с.
3. Jones, C. J. Perosomus elumbis (vertebral agenesis and arthrogyposis) in a stillborn Holstein calf / C. J. Jones // Veterinary Pathology. – 1999. – Vol. 36, № 1. – P. 64-70.
4. Марзанова, С. Н. Разработка генодиагностики комплекса аномалий позвоночника (СVM) и иммунодефицита (BLAD) у животных черно-пестрого голштинизированного скота: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / С. Н. Марзанова. – Москва, 2012. – 143 с.
5. Nagahata, H. Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD): A Review / H. Nagahata // J. Vet. Med. Sci. – 2004. – Vol. 66, № 12. – P. 1475-1482.
6. Методические рекомендации по проведению ДНК-тестирования племенных животных субъектов племенного животноводства по генам, определяющим продуктивные качества / В. К. Пестис [и др.]. – Гродно: ГГАУ, 2015. – С. 17-23.