

# ЗООТЕХНИЯ

УДК 577.21:599.735.51:577.122.38

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ КОРОВ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ ПРИ НОСИТЕЛЬСТВЕ МУТАЦИИ ГЕНА SLC35A3

А. А. Глазев<sup>1</sup>, О. А. Епишко<sup>2</sup>, С. Д. Клиса<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»  
г. Гродно, Республика Беларусь  
(Республика Беларусь, 230023, г. Гродно, ул. Ожешко, 22  
e-mail: mail@grsu.by)

<sup>2</sup> – УО «Гродненский государственный аграрный университет»  
г. Гродно, Республика Беларусь  
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28  
e-mail: ggau@ggau.by)

**Ключевые слова:** генетические дефекты, крупный рогатый скот, метаболизм аминокислот, диагностика.

**Аннотация.** В данной работе исследовался аминокислотный профиль хрящевой ткани коров голштинской породы в норме и при носительстве мутации гена SLC35A3, приводящей к развитию комплексного порока позвоночника (СVM-синдром). ДНК-диагностику носительства мутации гена SLC35A3 у сельскохозяйственных животных проводили методом ПЦР-анализа с использованием специальных праймеров. Определение 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 носительстве мутации гена SLC35A3 показал достоверное увеличение концентраций основных биологически активных групп свободных аминокислот более чем в 10 раз по сравнению с генетически здоровым контролем, что обусловлено влиянием мутации гена на промежуточный обмен свободных аминокислот в клетках хрящевой ткани крупного рогатого скота голштинской породы.

## AMINO ACID PROFILE OF CARTILAGINOUS TISSUE IN HOLSTEIN COWS WITH MUTATION OF THE GENE SLC35A3

А. А. Glazev<sup>1</sup>, О. А. Epishko<sup>2</sup>, S. D. Klisa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – EI «Yanka Kupala State University of Grodno»  
(Belarus, Grodno, 230023, 22 Ozheshko st.; e-mail: mail@grsu.by)

<sup>2</sup> – EE «Grodno state agrarian University»

Grodno, Republic of Belarus  
(Republic of Belarus, 230008, Grodno, Tereshkova str., 28  
e-mail: ggau@ggau.by)

**Key words:** genetic defects, cattle, metabolism of amino acids, diagnostics

**Summary.** *In this task, an amino acid profile was investigated in cartilaginous tissue of the Holstein cows in normal, and with mutation of the gene SLC35A3, which leads to a development of complex vertebral malformation (CVM-syndrome). The DNA-diagnostics of the mutation of the gene SLC35A3 in farm animals was carried out by the PCR-analysis with special primers. Determination of amino acid profile of the animal cartilaginous tissue was carried out by reverse phase liquid chromatography with the fluorescence detection. The comparative analysis of the content of free amino acids and their metabolites in the cartilaginous tissue in cows with mutation of the gene SLC35A3 have shown a reliable increase in concentration of the main biologically active groups of free amino acids by more than 10 times in comparison with genetically healthy control. This is caused by the influence of the mutation of the gene SLC35A3 in the processes of intermediate exchange of the free amino acids in the cells of cartilaginous tissue in Holstein cows.*

(Поступила в редакцию 01.06.2017 г.)

**Введение.** Комплексный порок позвоночника (complex vertebral malformation, CVM) – сложный тератологический синдром телят голштинской породы, заключающийся, прежде всего, в резорбции плода, выкидышах на поздних стадиях внутриутробного развития, преждевременных родах, мертворождении или смерти телят в первые дни жизни.

Причиной возникновения данной патологии является миссенс-мутация гена SLC35A3, состоящая в замещении гуанина на тимин (G559T), в результате которой в синтезируемом белке происходит замена аминокислоты валина на фенилаланин в 180 позиции (V180F).

Данная генетическая аномалия развития определяет значительную долю смертности молодняка крупного рогатого скота, отрицательно влияет на его воспроизводительные способности и снижает экономическую эффективность животноводства [1, 2].

В связи с интенсивной голштинизацией молочного скота в Республике Беларусь выявление скрытых носителей различных наследственных аномалий развития крупного рогатого скота, вследствие генетических мутаций, является актуальной проблемой современного животноводства.

В настоящее время использование только генетических методов диагностики данных типов патологий не дает 100% эффекта. Проблема может быть решена при совместном использовании молекулярно-генетических и биохимических скрининг-тестов, позволяющих комплексно

оценить наличие характерных генетических и метаболических изменений при исследуемом типе патологии.

**Цель работы:** исследовать аминокислотный профиль хрящевой ткани коров голштинской породы при носительстве мутации гена SLC35A3, обуславливающей развитие CVM-синдрома у животных.

**Материал и методика исследований.** Молекулярно-генетические исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» ГГАУ и НИЛ биохимии биологически активных веществ ГрГУ им. Янки Купалы.

В качестве объекта исследований использовали коров голштинской породы, разводимых в СПК «Свислочь», ОАО «Агро-сад расцвет», 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 SLC35A готовилась в объеме 25 мкл путем смешивания следующих компонентов: 1xTaq-буфер – 2,5 мкл; MgCl<sub>2</sub> (в концентрации 25 ммоль/л) – 1 мкл; dNTP (в концентрации 10 – 12 ммоль/л – 0,2 мл; праймеры – 15 – 25 мкл; Taq-полимераза – 0,5 мкл; ДНК (100 – 200 нг/мкл) – 1 мкл.

Для проведения амплификации использовались праймеры:

– 5'-GCTCTCCTCTGTAATCCCCA- 3';

– 5'-CCACTGGAAAACTAGCTGTGAGTA-3'.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе C100 Touch Thermal Cycler. Режим амплификации состоял из следующих этапов: «горячий старт» – 10 мин при температуре 94 °С; 34 цикла: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при температуре 60 °С, синтез – 30 с при 72 °С; достройка – 5 мин при температуре 72 °С.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле (при напряжении 110 В). Длина амплифицированного фрагмента ДНК составляла – 225 п.н.

Для рестрикции амплифицированного участка гена SLC35A3 использовали эндонуклеазу RsaI. Реакцию проводили при температуре 37 °С.

Продукты рестрикции генов разделяли электрофоретически в 3% агарозном геле (при напряжении 130 В) в 1×TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования Gel Doc RX+ (Biorad).

При расщеплении продуктов амплификации рестриктазой RsaI идентифицируются следующие генотипы:

– SLC35AGG – 201 и 24 п.н. (свободный от мутации);

- SLC35ATT – 225 п.н. (гомозиготный носитель мутации);
- SLC35AGT – 225, 201 и 24 п.н. (гетерозиготный носитель мутации) [3].

Количественное определение свободных аминокислот и их производных выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в безбелковых хлорноокислых экстрактах образцов хрящевой ткани животных на аналитической колонке, заполненной обращенно-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub>, в режиме градиентного элюирования подвижной фазой на основе натрий-ацетатного буфера и органического модификатора ацетонитрила, при скорости потока элюента – 0,2 мл/мин, температуре анализа 38 °С и флуориметрическим детектированием при длине волны возбуждения – 231 нм и длине волны эмиссии – 445 нм, по методу внутреннего стандарта [4].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Анализ результатов ДНК-типирования популяции крупного рогатого скота голштинской породы (n=21) в представленных хозяйствах на носительство мутации в гене SLC35A3 показал наличие 2-х гетерозиготных носителей мутации гена в исследуемых популяциях коров.

Для изучения влияния мутации гена SLC35A3 на биохимические процессы в клетках сельскохозяйственных животных были проведены исследования содержания спектра низкомолекулярных эндогенных биорегуляторов – свободных аминокислот и их метаболитов как интегральных показателей метаболического гомеостаза клетки, включая биохимическую трансформацию широкого круга физиологически 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 SLC35A3, приводящего к развитию CVM-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-носителей мутации гена SLC35A3 (CVM-синдром)

Наименование аминокислот и их метаболитов	Молярная концентрация аминокислот, мкмоль/г ткани	
	Здоровый контроль	CVM-синдром
1	2	3
Цистеиновая кислота	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,02
Фосфосерин	0,03 ± 0,01	0,62 ± 0,20*
Аспарагиновая кислота	0,66 ± 0,26	14,75 ± 9,44*

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Глутаминовая кислота	3,46 ± 1,71	47,77 ± 16,12*
Аспарагин	0,05 ± 0,06	3,29 ± 2,02*
Серин	2,50 ± 0,91	94,05 ± 34,58*
Глутамин	0,51 ± 0,31	13,81 ± 2,59*
Гистидин	0,24 ± 0,08	11,45 ± 4,63*
Глицин	1,41 ± 0,53	154,51 ± 18,53*
Фосфоэтаноламин	0,09 ± 0,05	0,73 ± 0,31*
Треонин	0,67 ± 0,26	25,80 ± 10,51*
Цитруллин	0,27 ± 0,22	3,06 ± 1,00*
Аргинин	0,58 ± 0,20	11,39 ± 4,91*
β-аланин	0,69 ± 0,49	не опр.
Аланин	2,09 ± 0,82	72,12 ± 6,09*
Таурин	4,44 ± 2,69	30,54 ± 2,95*
γ-аминомасляная кислота	0,13 ± 0,05	4,11 ± 2,42*
Тирозин	0,19 ± 0,05	5,44 ± 2,46*
α-аминомасляная кислота	0,09 ± 0,08	1,30 ± 0,47*
Этаноламин	6,90 ± 2,76	11,87 ± 4,70
Валин	0,69 ± 0,23	13,67 ± 5,01*
Метионин	0,04 ± 0,04	2,37 ± 1,12*
Цистатионин	0,22 ± 0,21	2,00 ± 1,30*
Триптофан	0,05 ± 0,02	0,63 ± 0,20*
Изолейцин	0,20 ± 0,65	6,95 ± 2,91*
Фенилаланин	0,18 ± 0,06	3,42 ± 1,54*
Лейцин	0,29 ± 0,12	12,60 ± 5,33*
Гидроксипролин	7,74 ± 0,04	0,50 ± 0,19*
Орнитин	5,13 ± 1,42	5,15 ± 1,61
Лизин	0,47 ± 0,17	15,42 ± 5,44*
Пролин	0,92 ± 0,26	4,95 ± 0,70*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении животных с CVM-синдромом и здорового контроля по  $t$ -критерию Стьюдента.

Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров-носителей мутации гена SLC35A3, приводящей к развитию комплексного порока позвоночника, показал значительные увеличения их концентрации по сравнению с генетически здоровым контролем (таблица 1).

Так, концентрация аспарагиновой и глутаминовой кислот в хрящевой ткани коров с мутацией гена SLC35A3 увеличилась более чем в 13 раз, их амидных производных – аспарагина и глутамина – более чем в 25 раз по сравнению со здоровым контролем. Концентрация алифатических аминокислот с неразветвленной углеводородной цепью (глицина и аланина), а также алифатических аминокислот с гидроксильной группировкой в радикале (серина и треонина) увеличилась более чем в 35 раз, а содержание биологически значимых ароматических амино-

кислот (тирозина, фенилаланина и триптофана) – более чем в 10 раз по сравнению с контрольными значениями (таблица 1).

Следует отметить, что одновременное увеличение концентраций как фенилаланина, так и его гидроксиглированного метаболита – тирозина свидетельствует о возможной активации процессов их биосинтеза в хрящевой ткани коров-носителей CVM-синдрома.

Концентрации основных аминокислот (аргинина, гистидина и лизина), а также аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (валина, лейцина и изолейцина) увеличилась более чем в 19 раз. Одновременно молярная концентрация производного вторичного амина-гидроксипролина у коров-носителей мутации гена SLC35A3 снизилась в 15 раз, по сравнению со здоровым контролем, при том, что концентрация его предшественника – пролина, наоборот, увеличилась в 5 раз, что может свидетельствовать об ингибировании реакций гидроксиглирования пролина в хрящевой ткани коров при носительстве мутации гена SLC35A3 (таблица 1).

Вместе с тем, содержание таких продуктов метаболизма свободных аминокислот как орнитин, этаноламин и цистеиновая кислота не претерпело достоверных изменений (таблица 1).

Параллельно, с определением спектра индивидуальных свободных аминокислот был произведён расчёт содержания основных функциональных групп аминокислот, характеризующих метаболическое состояние клеток хрящевой ткани генетически здоровых коров и коров-носителей мутации гена SLC35A3, приводящей к возникновению CVM-синдрома (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание основных функциональных групп аминокислот в хрящевой ткани генетически здоровых коров голштинской породы и коров-носителей мутации гена SLC35A3 (CVM-синдром)

Наименование функциональных групп аминокислот	Молярная концентрация, мкмоль/г ткани	
	Здоровый контроль	CVM-синдром
Незаменимые	2,56 ± 0,78	80,86 ± 30,84*
Заменимые	9,53 ± 2,97	433,54 ± 95,84*
Гликогенные	13,81 ± 4,21	469,94 ± 109,82*
Кетогенные	1,35 ± 0,85	44,46 ± 16,70*
Серосодержащие	4,76 ± 2,74	35,00 ± 1,01*
Ароматические	0,43 ± 0,10	9,49 ± 4,20*
Основные	2,39 ± 0,33	38,26 ± 13,94*
Кислые	4,12 ± 1,93	62,52 ± 25,50*
Протеиногенные	15,16 ± 4,50	514,40 ± 126,48*
Непротеиногенные	6,61 ± 1,88	16,12 ± 6,50*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  при сравнении животных с CVM-синдромом и здорового контроля по  $t$ -критерию Стьюдента.

Сравнительный анализ содержания основных и специальных функциональных групп аминокислот в хрящевой ткани коров – носителей мутации гена SLC35A3 показал достоверное увеличение их концентраций (более чем в 7 раз) по сравнению с генетически здоровым контролем (таблица 2).

Следует отметить более чем 30-кратное увеличение концентраций группы заменимых, незаменимых, гликогенных и протеиногенных аминокислот в клетках хрящевой ткани сельскохозяйственных животных-носителей генетической патологии, обусловленной мутацией гена SLC35A3 (таблица 2).

Указанные изменения, по-видимому, обусловлены развитием существенного метаболического дисбаланса за счет сдвигов в реакциях промежуточного обмена свободных аминокислот и их биологически активных производных, поскольку у исследуемых пород крупного рогатого скота отсутствуют иные, гистологически и биохимически выявляемые патологии, которые могли бы стать причиной развития установленного дисбаланса в содержании свободных аминокислот в клетке.

**Заключение.** Таким образом, сравнительный анализ содержания широкого спектра низкомолекулярных эндогенных биорегуляторов – свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров при носительстве мутации гена SLC35A3 показал многократное увеличение их концентраций по сравнению с генетически здоровым контролем.

Значимое изменение содержания исследуемых соединений в хрящевой ткани крупного рогатого скота голштинской породы, при отсутствии иных диагностируемых соматических патологий, объясняется возможным влиянием мутации гена SLC35A3, ответственного за возникновение и развитие комплексного порока позвоночника, на интенсивность и направленность метаболических процессов, протекающих в клетках хрящевой ткани сельскохозяйственных животных и, в первую очередь, непосредственным влиянием на промежуточный обмен свободных аминокислот-интеграторов клеточного метаболизма, определяющих функциональную активность и физиологическое состояние всего организма животного.

Выявленные метаболические особенности клеток хрящевой ткани крупного рогатого скота голштинской породы, разводимого в Республике Беларусь, дают дополнительную информацию для исследования влияния генетических патологий на обменные процессы низкомолекулярных эндогенных соединений в клетке и могут быть использованы в программах по разработке новых алгоритмов молекулярно-генети-

ческого скрининга и оценке метаболических последствий генетических дефектов у хозяйственно ценных пород животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDPN-acetylglucosaminetransporter, causes complex vertebral malformation / B. Thomsen [et al.] // J. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 16. – P. 97-105.
2. Complex vertebral malformation in Holstein calves / J. S. Agerholm [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2001. – Vol. 13. – P. 283-289.
3. 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.
4. МВИ.МН 3201-2009 «Определение содержания свободных аминокислот и их производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» / Л. И. Нефёдов, А. А. Глазев, Е. М. Дорошенко. – Гродно: ГрГУ, 2009. – 18 с.

УДК 636.52/.58.034(043.3)

### ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ РЕМОНТНОГО МОЛОДНЯКА ДЕБИКИРОВАННЫХ КУР

**О. И. Горчакова**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»  
г. Гродно, Республика Беларусь  
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул Терешковой, 28  
e-mail: ggau@ggau.by)

*Ключевые слова:* молодняк кур, дебикирование, кровь, сохранность.

*Аннотация.* В результате проведенных исследований по изучению влияния сроков дебикирования ремонтного молодняка кур на интенсивность обмена веществ в их организме и сохранность поголовья за период выращивания установлено, что сохранность поголовья за период выращивания в опытных группах составила 97-100%, что на 3,0-5,0 п. п. выше показателей контроля. Оптимальным сроком дебикирования молодняка яичных кур является подрезка обеих частей клюва с удалением 2/3 верхней и 1/3 нижней частей клюва в возрасте 70 дней.

### HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD OF YOUNG CHICKENS DEBICIR

**O. I. Gorchakova**

EU «Grodno State Agrarian University»  
(Belarus, Grodno, 230008, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

*Key words:* young chickens, beak trimming, blood, safety.