

ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CAPN1 С ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ И ХАРАКТЕРИСТИКОЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Мирошников С.А.¹, Косян Д.Б.¹, Сурундаева Л.Г.¹, Русакова Е.А.²

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства», Оренбург, e-mail: vniims.or@mail.ru;

²ФГБНУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: elenka_rs@mail.ru

Проведен анализ влияния полиморфизма гена CAPN1 на гематологические показатели и характеристику неспецифического иммунитета бычков калмыцкой породы. В результате проведенных исследований выявлено, что наличие полиморфизма по гену CAPN1 оказывает влияние на гематологические параметры крови, однако колебания данных показателей находятся в пределах физиологической нормы. Анализ данных показал, что преимущество по содержанию гемоглобина в крови бычков III группы составляло 0,05-0,14·10¹²/л по сравнению с аналогами из I и II групп. Значительных межгрупповых различий относительно содержания лейкоцитов в крови подопытных животных не установлено. Содержание макроэлементов (кальция и фосфора) в крови в большей степени зависело от концентрации их в кормах. Отмечено высокое содержание альбуминов и глобулинов в сыворотке крови бычков III группы. Высокая активность ферментов переаминирования была отмечена в сыворотке крови бычков III группы. По аспартат-аминотрансферазе (АСТ) различие составило 0,02 и 0,004 мкмоль/ч·л по сравнению с данным показателем в I и II группах; по аланин-аминотрансферазе (АЛТ) – 0,01-0,03 ммоль/ч·л соответственно.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, полиморфизмы, гематологические показатели, лизоцим, β-лизины, полиморфизм гена CAPN1.

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISM OF CAPN1 GENE WITH HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND CHARACTERISTICS OF NONSPECIFIC IMMUNITY OF CATTLE

Miroshnikov S.A.¹, Kosyan D.B.¹, Surundaeva L.G.¹, Rusakova E.A.²

¹All-Russian research Institute of meat cattle breeding, Orenburg, e-mail: vniims.or@mail.ru;

² Orenburg State University, Orenburg, e-mail: elenka_rs@mail.ru

The analysis of the effect of the polymorphism of the CAPN1 gene on hematological indices and the characteristics of the nonspecific immunity of the calves of the Kalmyk breed. The result of the research revealed that the presence of a polymorphism in the CAPN1 gene has an influence on the hematological parameters of the blood, however, the fluctuations of these indicators is within the limits of physiological norm. Data analysis showed that the advantage of the content of hemoglobin in the blood of calves of group III were 0,05-0,14·10¹²/l, compared with the counterparts of groups I and II. Significant intergroup differences regarding the content of leukocytes in blood of experimental animals has not been established. The content of macronutrients (calcium and phosphorus) in the blood, in a greater degree, depended on their concentration in the feed. Marked the high content of albumins and globulins in the blood serum of calves of group III. High activity of enzymes of transamination was observed in blood serum of calves of group III. For aspartate-aminotransferase (AST) the difference amounted to 0,02 and 0,004 mol/h·l in comparison with the indicator in the I and II groups; for alanine aminotransferase (ALT) – 0,01-0,03 mmol/h·l, respectively.

Keywords: cattle, polymorphisms, hematological parameters, lysozyme, β-lysine, polymorphism CAPN1 gene.

Мясная продуктивность крупного рогатого скота имеет важное значение в отрасли животноводства, особенно в получении качественной продукции.

Развитие молекулярной биологии предопределило развитие такой отрасли, как маркерная селекция. Этому способствовал прогресс в понимании представлений о путях и методах исследования различных процессов в организме животного, которые обусловлены

не только действием генов, но и факторами внешней среды [1-3]. Так, правильное выращивание и откорм молодняка определяют уровень мясной продуктивности в равной степени с активностью генов. Особое значение данные процессы играют в селекции, которая направлена на получение животных с хозяйственно-ценными признаками.

Использование ДНК-маркеров позволяет оценить гены, играющие значительную роль в формировании и регуляции ряда физиологических процессов. Поскольку ген обладает различными аллельными вариантами (полиморфизмы), связанными с вариативностью уровня продуктивности, то «считывание» этих вариантов позволит выявить желательные сочетания аллелей и позволят провести селекцию животных по генотипам [4].

Важным показателем физиологического состояния организма при изучении влияния факторов эндо- и экзогенной природы является кровь. Состояние показателей крови определяет обеспеченность организма необходимыми питательными веществами, дает объективный анализ физиологического статуса организма в целом. Количество общего белка в сыворотке крови выступает показателем интенсивности процесса роста, имеет ключевое значение в силу того, что определяет скорость процесса образования мышечной ткани и, как следствие, энергию роста организма. При этом белковый обмен диктует интенсивность углеводного и липидного. Кроме того, возникла необходимость многогранного изучения взаимосвязей, перспективных в области сельского хозяйства, генетических маркеров, отражающих показатели здоровья животных, их иммунитет [5; 6].

Таким образом, изучение биологических и генетических закономерностей, влияющих на гематологические показатели, характеристику неспецифического иммунитета в процессе развития животных крупного рогатого скота, позволит в полной мере описать данного рода взаимодействия с последующей возможностью применения полученных знаний в практике современного животноводства и селекционного процесса [7].

Исходя из вышесказанного целью нашего исследования была оценка влияния наличия полиморфизма гена CAPN1 на гематологические показатели и неспецифический иммунитет животных при условиях стандартного кормления.

Материалы и методы исследования

В ходе работы была проведена серия экспериментальных исследований по выявлению биологической взаимосвязи наличия гена CAPN1 с хозяйственно-полезными характеристиками бычков калмыцкой породы с целью дальнейшей разработки инновационных методов комплексного анализа и ранней диагностики продуктивных качеств КРС.

Для реализации поставленных задач в условиях ОАО «Агробизнес» Республики Калмыкия с использованием метода пар-аналогов было отобрано и генетически

проанализировано 70 голов бычков калмыцкой породы в возрасте 1 месяца. Исходя из полученных данных были сформированы три группы животных (n=15) с различным сочетанием аллелей. I группа – гомозиготные по аллелю G гена CAPN1; II группа – гетерозиготные по аллелю C; III группа – гомозиготные по аллелю C.

Животные находились в одинаковых условиях на протяжении всего периода экспериментального исследования. На подсосе – до возраста 7 месяцев; перевод бычков на стойловое содержание был осуществлен после отбивки. Осуществлялось беспривязное содержание, доступ к воде был свободным. В стойловый период кормление животных производилось несколько раз в день, учет поедаемости кормов (в два смежных дня) производился 1 раз в течение двух недель. При достижении животными возраста 14 месяцев эксперимент был завершен.

В ходе проведения экспериментальных работ кормление скота проводилось соответственно нормам [8].

На этапе лабораторного исследования образцы крови, из которых была выделена ДНК, использовались в роли анализируемого биологического материала. Забор образцов крови осуществлялся с применением одноразового инструмента и антикоагулянта (1,5 М ЭДТА). Процесс выделения ДНК происходил с использованием специального набора – «ДНК-Экстран 1» («Синтол», Россия). Для процесса амплификации участка гена CAPN1 использовали праймеры:

5'-AGCAGCCCACCATCAGAGAAA – 3'

5'- TCAGCTGGTTCGGCAGAT – 3'

ПЦР в реальном времени проводилась с использованием программируемого амплификатора АНК-32 («Синтол», Россия) в объеме рабочего раствора 25 мкл, который содержал: KCl – 25,0 мМ; хлорид магния (MgCl₂) – 1,5 мМ; трис-HCl (8,5 рН) – 60,0 мМ; меркаптоэтанол (C₂H₆SO) – 10 мМ; дНТФ – 0,2 мМ; тритонX-100 – 0,1 мМ; Taq ДНК полимеразы – 1 ед. и каждый из праймеров по 0,5 мкМ. Процесс амплификации гена CAPN1 производился по следующему режиму (табл. 1).

Таблица 1

Схема проведения амплификации ДНК

№	Температура, °С	Режим
1	95	120 сек x 1
2	64	40 сек x 40
3	95	20 сек x 40

Синтез праймеров был осуществлен на основе нуклеотидной последовательности ДНК гена CAPN1 КРС.

С целью контроля физиологического состояния подопытных животных, их здоровья на протяжении исследования производился забор крови с дальнейшим определением гематологических показателей: количество эритроцитов ($10^{12}/л$) и гемоглобин (г/л) с использованием камеры Горяева и гемометра Сали соответственно. Методом электрофореза определяли общий белок (г/л) в сыворотке крови; по методу Неводова – резервную щелочность; по методу В.Г. Колба, В.С. Камышникова – содержание кальция (ммоль/л); по методу Бригса (Г.Т. Лебедев, А.Т. Усович, 1976) – содержание фосфора (ммоль/л); по методу Райтмана-Френкеля, который был описан В.Г. Колбом и др. (1982) [9] – активность АСТ (мкмоль/ч·л) и АЛТ (мкмоль/ч·л).

При исследовании неспецифического иммунитета была оценена бактерицидная активность сыворотки крови (%), определено содержание β -лизинов (%) и лизоцима (мкг/мл) в сыворотке крови, используя методики О.В. Бухарина и др. (1971; 1972).

Используя общепринятые методики и приложение Excel в составе программного пакета Statistica 6.0 и Office XP, был проведен статистический анализ полученного материала, с определением величины средней арифметической (M), средней стандартной ошибки (m).

Результаты исследования

Гематологические показатели бычков. Анализ данных морфологического состава крови показал, что максимальное содержание эритроцитов в крови было характерно для III группы. Так, преимущество бычков III группы по данному показателю составляло 0,05-0,14· $10^{12}/л$ по сравнению с аналогами из I и II групп. По концентрации гемоглобина преимущество имели животные III группы. Так, данный показатель был выше в III группе на 4,30 и 6,50 г/л относительно II и I групп. При этом минимальное содержание гемоглобина в крови было характерно для бычков I группы.

Значительных межгрупповых различий относительно содержания лейкоцитов в крови подопытных животных не установлено. Содержание макроэлементов (кальция и фосфора) в крови в большей степени зависело от концентрации их в кормах. Анализ полученных результатов показал, что данные показатели находились в интервале, установленном пределами нормы физиологических параметров, для данной группы мясного скота соответствующего пола и возраста и достоверных межгрупповых различий не было обнаружено (табл. 2).

Таблица 2

Гематологические показатели крови бычков калмыцкой породы

Показатель	I группа	II группа	III группа
Возраст 8 месяцев			

Эритроциты (RBC), $10^{12}/л$	6,12±0,29	6,32±0,48	6,35±0,63
Гемоглобин (Hb), г/л	108,2±0,66	112,6±1,17	115,2±1,30
Лейкоциты (WBC), $10^9/л$	7,27±0,52	7,43±0,83	7,32±1,01
Ca, ммоль/л	2,02±0,20	1,99±1,20	2,06±0,30
P, ммоль/л	2,48±0,03	2,19±0,33	2,22±0,40
Кислотная емкость, ммоль/л	114,5±0,23	115,0±1,50	111,2±1,60
Возраст 14 месяцев			
Эритроциты (RBC), $10^{12}/л$	5,92±0,04	6,07±0,04	6,78±0,06
Гемоглобин (Hb), г/л	125,3±0,57	127,6±0,82	131,9±1,04
Лейкоциты (WBC), $10^9/л$	8,15±0,06	8,02±0,05	8,12±0,07
Ca, ммоль/л	2,47±0,02	2,56±0,03	2,62±0,01
P, ммоль/л	2,32±0,03	2,29±0,03	2,34±0,024
Кислотная емкость, ммоль/л	110,5±0,63	113,0±1,50	113,2±1,60

Резистентность организма характеризует кислотная емкость, которая отражает его приспособленность к окружающим условиям и определяет постоянство кислотно-щелочного состояния внутренней среды. При сдвиге этого равновесия возникают патологии. В ходе анализа полученных результатов было установлено, что данный показатель находился в интервале, установленном пределами нормы физиологических параметров.

Наиболее значимой составляющей сыворотки крови являются белок с его фракциями. Анализ содержания общего белка показывает, что преимущество по данному показателю находилось на стороне животных II группы. Так, данный показатель был выше во II группе на 2,85 и 1,07 г/л относительно бычков I и III групп (табл. 3).

Таблица 3

Белковый состав сыворотки крови бычков в 14-месячном возрасте

Показатель	Группа		
	I	II	III
Белок общий, г/л	71,8±1,43	74,6±1,95	73,5±1,11
Альбумины, %	44,7±1,80	45,9±0,91	49,6±1,66
Глобулины всего, %	55,3±0,82	54,1±1,15	50,4±0,62
α	12,4±0,35	13,0±0,47	13,5±0,19
β	16,4±0,38	17,9±0,63	18,0±0,21
γ	26,5±1,34	23,3±0,67	18,9±0,58

Альбумины и глобулины – белки, играющие ключевую роль в процессе обмена веществ в организме. Показатель скорости роста определяется оценкой фракции альбуминов. Установлено, что высокий среднесуточный прирост живой массы животного характеризуется высоким уровнем альбуминов в сыворотке крови. Отмечено высокое содержание альбуминов в сыворотке крови бычков III группы. Так, данный показатель в III

группе был выше на 2,76 и 2,70% относительно аналогов I и III групп соответственно.

Фракция глобулинов участвует в процессе переноса кальция, железа, холестерина, лецитина, токоферола, витамина А и ряда других биологически активных веществ.

Максимальное содержание глобулинов было отмечено в сыворотке крови животных III группы. Так, они превосходили аналогов из I и II групп на 4,43-4,58% соответственно.

В ходе процессов белкового обмена, которые протекают в организме, ключевую роль занимает группа ферментов переаминирования – аспартат-аминотрансферазы (АсАТ) и аланин-аминотрансферазы (АлАТ), активирующих обратный переход NH-групп с аминокислоты на кетокислоту.

Различия, которые были выявлены относительно активности данных ферментов, определяются характером процессов обмена, протекающих с разной скоростью у подопытных бычков экспериментальных групп (табл. 4).

Таблица 4

Активность ферментов переаминирования в крови подопытных бычков (14 месяцев)

Показатель	Группа		
	I	II	III
Аспартат-аминотрансфераза, мкмоль/ч·л	1,29±0,11	1,31±0,11	1,31±0,01
Аланин-аминотрансфераза, мкмоль/ч·л	0,96±0,32	0,98±0,01	0,99±0,01

Высокая степень активности ферментов переаминирования была отмечена в III группе. По аспартат-аминотрансферазе различие было 0,020 и 0,004 мкмоль/ч·л по сравнению с данным показателем в I и II группах; по аланин-аминотрансферазе – 0,01-0,03 ммоль/ч·л соответственно. При этом установленное превосходство было статистически недостоверным.

Характеристика неспецифического иммунитета подопытных животных. В настоящее время возникла необходимость многогранного изучения всевозможных связей, которые являются перспективными в сфере сельского хозяйства, генетических маркеров, отражающих показатели здоровья животных, их иммунитет. Наиболее масштабно это было изучено для голштинского скота. Для данной породы был выявлен комплексный порок позвоночного столба (СМV), который определяет высокую смертность скота в эмбриональную фазу [10]. В конце 80-х годов прошлого века было обнаружено и в дальнейшем описано такое заболевание, как Такахаши-Хагемозера, другими словами – установление дефицита лейкоцитарной адгезии BLAD [11]. В дальнейшем получили развитие исследования о взаимосвязи выявленных ранее генетических маркеров, отвечающих за хозяйственно-эффективное производство, со здоровьем животного.

Анализ полученного материала позволил нам провести исследования по оценке

характеристики неспецифического иммунитета подопытных бычков, учитывая наличие мутации CAPN1. Как показали результаты исследования, значимых различий по величине оцениваемых характеристик не было выявлено. Однако была установлена высокая бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) бычков II и III групп, которая была выше на 4,5 и 1,6% относительно значения данного показателя в I группе. Эти различия носили недостоверный характер (табл. 5).

Таблица 5

Характеристики неспецифического иммунитета подопытных бычков калмыцкой породы

Показатель	Группа		
	I	II	III
БАСК, %	64,2±1,73	67,1±0,92	65,2±2,15
Лизоцим, мкг/мл	2,42±0,28	2,65±0,31	2,68±0,14
β-лизины, %	16,3±1,17	18,8±0,92	16,2±0,72

Кроме БАСК, была проведена оценка лизоцимной активности сыворотки крови. Результаты исследования указали на тенденцию к увеличению активности лизоцима в группе носителей мутации. Так, значение данного показателя во II и III группах было 2,65 и 2,68 мкг/мл соответственно, что на 9,5% и 10,7% было выше аналогичного уровня активности лизоцима в сыворотке крови бычков I группы. Однако, ввиду ряда расхождений между величинами данного показателя внутри групп, различия между группами носили недостоверный характер. При анализе термостабильной составляющей антимикробного начала сыворотки крови бычков по значению β-лизины не было выявлено значимых различий.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что данные по гематологическим параметрам находились в интервале, установленном пределами нормы физиологических параметров для данной группы мясного скота соответствующего пола и возраста. Кроме того, при проведении исследований не установлено достоверных различий в характеристиках неспецифического иммунитета молодняка КРС калмыцкой породы - носителя различных аллелей CAPN1.

Исследования выполнены в рамках тематического плана по госзаданию № 0761-2014-0002.

Список литературы

1. Bonfatti V., Di M.G., Cecchinato A. Effects of β-kappa-casein (CSN2-CSN3) haplotypes, betalactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of

- individual milk of Simmental cows // *J. Dairy Sci.* – 2010. – V. 93 – No. 8. – P. 3809-3817.
2. Гетманцева Л.Н. Молекулярно-генетические аспекты в селекции животных // *Молодой ученый.* – 2010. – № 12. - Т. 2. – С. 199-201.
 3. Gallinat J.C., Qanbari S. DNA-based identification of novel bovine casein gene variants // *J. Dairy Sci.* – 2012. – V. 34. – No. 4. – P. 233-245.
 4. Косян Д.Б., Сурундаева Л.Г., Русакова Е.А. и др. Ранняя диагностика аминокислотного состава мяса КРС по носительству мутации гена CAPN1 // *Современные проблемы науки и образования.* – 2014. – № 2. - URL: <http://www.science-education.ru/116-12561> (дата обращения: 21.10.2017).
 5. Tang L., Yang D., Ouyang W. et al. Association of polymorphisms in the Pit-1 intron 5 with body measurements in Chinese Cattle // *Afr. J. Biotech.* – 2012. – 11 (42). – P. 9906–9910.
 6. Bonilla C.A., Rubio M.S. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico // *Genet. Mol. Res.* – 2010. – V. 9. – No. 4. – P. 2395-2405.
 7. Shi M., Gao X., Ren H. et al. Association analysis of CAPN1 gene variants with carcass and meat quality traits in Chinese native cattle // *African Journal of Biotechnology.* – 2014. – V. 10, No. 75. – P. 17367-17371.
 8. Калашников А.П. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: учебное пособие. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 352.
 9. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – М.: Медицинская литература, 1982. – С. 451.
 10. Rempel L.A., E. Casas Relationship of polymorphisms within metabolic genes and carcass traits in crossbred beef cattle // *J. Anim Sci.* – 2012. – V. 90. – No. 4. – P. 1311-1316.
 11. Zhang A.L. Effects of ghrelin gene genotypes on the growth traits in Chinese cattle / A.L. Zhang, L. Zhang // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – V. 39. – No. 6. – P. 6981-6986.