

---

**ГЕНЕТИКА И РАЗВЕДЕНИЕ**

---

УДК 619:577.21:001.891.53:636.2

DOI:10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2024.2.45-55

**ОЦЕНКА АЛЛЕЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНА ЛЕПТИНА И СТЕПЕНИ  
АССОЦИИ ЕГО ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ  
С БИОХИМИЧЕСКИМИ МАРКЕРАМИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ  
К РАЗВИТИЮ КЕТОЗА У КОРОВ**Зайцева О.С., Бытов М.В., Вольская С.В., Мартынов Н.А.,  
Осипова Ю.А., Юсупова Ч.Р.*Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского  
отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Российская Федерация*

В современной селекционной работе актуальным является разведение высокопродуктивных животных, устойчивых к различным заболеваниям, в том числе связанным с нарушением метаболических процессов. Цель данной работы – оценка аллельного разнообразия гена лептина и степени ассоциации его однонуклеотидных полиморфизмов с биохимическими маркерами предрасположенности к развитию кетоза у коров Уральской популяции крупного рогатого скота. Исследованы 3 однонуклеотидных полиморфизма гена *LEP* крупного рогатого скота: Y7F (n=245), R25C (n=224), A80V (n=245). Выявлено распределение частот встречаемости аллелей и генотипов для R25C: C\* – 0,49 и T\* – 0,51; C/C – 20,1%, T/C – 58,9%, T/T – 21%; для A80V: A\* – 0,68 и V\* – 0,32; A/A – 43,27%, A/V – 49,39%, V/V – 7,34%. Для этих двух полиморфизмов в исследованной популяции наблюдается равновесное сцепление. При изучении полиморфизма Y7F (n=245) гомозигот по аллелю T\* не обнаружено. На основании клинического анамнеза и исследования показателей биохимического состава крови, животные были ранжированы по фенотипическим группам по отношению к предрасположенности к развитию метаболических расстройств, протекающих по типу кетоза: «устойчивые», «предрасположенные» и «нейтральные». В группе с фенотипом «предрасположенный» аллельной комбинации T\*/T\* (R25C/A80V) соответствуют наименьшие значения различия в уровне НЭЖК по отношению к нейтральному фенотипу, что может свидетельствовать о преимуществе комбинации данных аллелей.

*Ключевые слова: крупный рогатый скот, ген лептина, аллельное разнообразие, однонуклеотидные полиморфизмы, предрасположенность к кетозу.*

*Проблемы биологии продуктивных животных. 2024. 2: 45-55.*

**Введение**

Интерес к разведению крупного рогатого скота, более устойчивого к кетозу, является глобальным, а поиск мутаций, аллельных вариантов генов и изучение молекулярно-генетических процессов, формирующих тот или иной фенотип, являются ключевыми этапами в понимании этиологии, степени предрасположенности к заболеванию и разработке успешных селекционных программ. Научными группами разных стран уже много лет проводятся поисковые

ассоциативные исследования, направленные на определение генов, влияющих на развитие кетоза у высокопродуктивных коров (Kroezen, 2018; Nayeri, 2019; Soares, 2021; Соколова, 2023; Bauer, 2023). У крупного рогатого скота ген *LEP* расположен на 4 аутосоме, и ранее было показано, что его однонуклеотидные полиморфизмы ассоциированы с продуктивностью животных (Szyda, 2007) и развитием кетоза (Якушева, 2019; Nayeri, 2019; Ковалюк, 2020).

Лептин представляет собой белковый гормон, секретируемый преимущественно белой жировой тканью (Houseknecht, 1998). Физиологические функции лептина включают в себя регуляцию потребления корма и расхода энергии. Этот гормон также участвует во многих других физиологических процессах, в том числе в регуляции репродуктивных функций, секреции гормонов, иммунных и стрессовых реакций, а также дифференциации и пролиферации клеток (Frühbeck, 2001). Многие эффекты лептина опосредуются центрально, на уровне гипоталамуса. Описано несколько периферических эффектов, например, ангиогенез и регуляция артериального давления (Frühbeck 2001). Широко распространенная по всему организму экспрессия рецептора лептина, наблюдаемая и у крупного рогатого скота, позволяет предположить о схожем плейотропном эффекте гормона у данного вида (Silva, 2002) Было показано, что во время лактации лептин взаимодействует с лактогенными гормонами, такими как пролактин, стимулируя синтез молочного жира и белка (Feuermann, 2004), что сопровождается сдвигами в состоянии метаболических процессов, которые отражаются на показателях биохимического состава сыворотки крови (Белоусов, 2018). Таким образом, представляют интерес исследования ассоциаций полиморфизма аллельных вариантов гена лептина не только с показателями надоев молока, но и с биохимическими маркерами развития кетоза у коров молочного направления продуктивности.

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) Y7F, A80V, R25C гена лептина были ранее протестированы на связь с частотой возникновения кетоза у коров (Szyda, 2007). Нами проведены оценка аллельного разнообразия гена лептина и ассоциативные тесты на Уральской популяции крупного рогатого скота голштинской породы.

Такой подход обусловлен тем, что маркер-ориентированная селекция имеет высокую эффективность только при оценке животных в конкретных хозяйствах (низкий экономический выход при неадекватной экстраполяции геномных индексов).

## **Материал и методы**

Работа выполнена в отделе геномных исследований и селекции животных Уральского научно-исследовательского ветеринарного института – структурного подразделения УрФНИЦ УрО РАН. Объект исследований – Уральская популяция крупного рогатого скота голштинской породы.

Выделение ДНК из цельной крови коров осуществляли с использованием набора «Diatom DNA Prep 200» (ООО «ИзоГен», Россия). Для постановки ПЦР и рестрикции использовали реагенты производства Сибэнзим (Россия). Амплификацию проводили с детекцией в реальном времени на CFX96 Touch (Bio-Rad, США). В работе использовали термоциклеры: SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, США) и GeneExplorer 96G (Bioer, Китай). Количественное измерение ДНК проводили на приборе Qubit 4 (Invitrogen, США). Электрофоретическое разделение ампликонов проводили с применением агарозного геля с визуализацией в камере CHEMIDOC XRS+ с интерпретацией полиморфизма длины рестрикционных фрагментов с помощью геледокументации Gel Quant Express (Thermo Fisher Scientific, США).

Выборка для биохимических исследований включала в себя 245 коров из трёх сельскохозяйственных организаций. Животные были разделены по группам по биохимическому профилю: «устойчивые», «нейтральные» и «предрасположенные» к метаболическим расстройствам на основании клинического анамнеза и по показателям биохимического состава крови: кетоновые тела, неэтерифицированные жирные кислоты, глюкоза, альбумин, кальций, холестерин, аспартатаминотрансфераза (Белоусов, 2021). Отбор проб крови был выполнен однократно; в рамках проведения клинического анамнеза учтено количество случаев кетоза у коров. Данные по уровню НЭЖК в сыворотке крови были протестированы на наличие ассоциаций с полиморфизмами гена лептина. При содержании коров в одинаковых условиях отмечаются разные уровни НЭЖК, что даёт основание для поиска генетических детерминант данного явления. Уровень НЭЖК ранее уже был использован в качестве маркера клинического и субклинического кетоза крупного рогатого скота для полногеномных ассоциативных исследований (Soares, 2021). Тестирование ассоциаций генотипа с предрасположенностью к развитию кетоза проведено с использованием уровня НЭЖК в качестве маркера заболевания (количественный показатель), а также с помощью ранжирования животных по биохимическому профилю (категориальная переменная).

*Исследование гена лептина (LEP) по маркеру R25C.* Полиморфизм гена лептина (*LEP*) по маркеру R25C, ассоциированному с предрасположенностью к развитию метаболических расстройств, у коров изучали с применением адаптированного протокола (Szyda et al., 2007) проведения ПЦР с последующим определением ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Протипировано 224 образца крови голштинских коров из трёх племенных сельскохозяйственных организаций.

Для типирования особей по данному генетическому маркеру использовали метод ПЦР-ПДРФ с праймерами: F: 5-CCAGGGAGTGCCTTTCATTA-3; R: 5-GGTGTCATCCTGGACSTTCC-3 (ПЦР-продукт длиной 258 п.н).

Состав реакционной смеси для ПЦР: SE-буфер производства SibEnzyme (60 mM Трис-HCl (pH 8,6), 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1% трион X-100); 0,18 mM каждого dNTP, по 0,35 мкМ каждого праймера; 1,7 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,31 ед. Taq-полимеразы (SibEnzyme); 30-80 нг ДНК. Амплификацию проводили по схеме: начальная денатурация 95°C в течение 5 минут, затем 35 циклов при 94°C - 20 с., температура отжига 61°C - 20 с., 72°C - 20 с., заключительная элонгация 72°C в течение 10 минут. Амплифицированные фрагменты на следующем этапе обрабатывали 5 ед. эндонуклеазы рестрикции Bsp13I с последующим термостатированием при 50 °C в течение 12 ч.

Для разделения полученного продукта рестрикции использовали 5% агарозный гель с бромистым этидием в течение 1,5 ч. при напряжении 190 В. Анализ полученных результатов проводили при помощи системы геледокументирования Gel Quant Express (Thermo Fisher Scientific, США).

*Исследование гена лептина (LEP) по маркеру A80V.* Полиморфизм гена лептина (*LEP*) по маркеру A80V изучали с применением протокола ПЦР-ПДРФ (Szyda et al., 2007) с использованием праймеров: F: 5-CAAGCAGGAAATAGGGAGTCATGG-3; R: 5-CTGGTGAGGATCTGTTGGTAGGYTC-3 (ПЦР-продукт длиной 424 п.н). Протипировано 229 голштинских коров из трёх племенных сельскохозяйственных организаций.

Состав реакционной смеси для ПЦР: SE-буфер производства SibEnzyme (60 mM Трис-HCl (pH 8,6), 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1% трион X-100); 0,18 mM каждого dNTP,

по 0,35 мкМ каждого праймера; 1,7 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,31 ед. Taq-полимеразы (SibEnzyme); 30-80 нг ДНК. Амплификацию выполняли по схеме: начальная денатурация 95°C в течение 5 минут, затем 35 циклов при 94°C - 20 с., температура отжига 60°C - 20 с., 72°C - 20 с., финальная элонгация 72°C в течение 10 минут. Амплифицированные фрагменты на последующем этапе обрабатывали 5 единицами эндонуклеазы рестрикции Psp13I с последующим термостатированием при температуре 37°C в течение 12 ч. Для разделения полученного продукта рестрикции использовали 5% агарозный гель с бромистым этидием в течение 1,5 ч. при напряжении 190 В. Анализ полученных результатов проводили при помощи системы геледокументирования Gel Quant Express (Thermo Fisher Scientific, США).

Определяли частоту встречаемости генотипов по гену *LEP* и частоту отдельных аллелей. На основании полученных данных выполнен аллельный анализ с использованием Microsoft Office Excel 2010. Ожидаемые частоты генотипов в исследуемой выборке рассчитывали согласно закону Харди-Вайнберга. Для сопоставления наблюдаемого и ожидаемого распределения частот генотипов использовали критерий соответствия «хи-квадрат» ( $\chi^2$ ).

Ассоциативные тесты проводили только для тех животных, у которых генотип и фенотип были достоверно определены. Для ассоциативных исследований использован веб-инструмент SNPStats (Solé, 2006); тестирование SNP по отдельности – с помощью моделей поиска ассоциаций пяти типов: кодоминантной, доминантной, рецессивной, овердоминантной и аддитивной (мультипликативной). Тестирование на гаплотипы наследования и ассоциации с фенотипом выполнено по аддитивной (мультипликативной), доминантной и рецессивной моделям.

### Результаты и обсуждение

*Оценка аллельного полиморфизма гена лептина (LEP) по маркеру R25C.* Выявление SNP полиморфизма в гене *LEP* проводили в локусе R25C. Размер ПЦР-продуктов после обработки эндонуклеазой составил 305/283/22 п.н. Результаты электрофоретического разделения фрагментов рестрикции по маркеру R25C представлены на рис. 1.



Рис. 1. Электрофореграмма результатов генотипирования особей по гену *LEP*. Обозначения: K – отрицательный контроль; M – размерный стандарт с шагом 100 п.н.; генотипы T/T (305 п.н.), T/C (305/283/22 п.н.), C/C (283/22 п.н)

По итогам генотипирования полиморфизма гена лептина было выявлено следующее распределение частоты встречаемости аллелей и генотипов:  $C^*$  – 0,49 и  $T^*$  – 0,51;  $C/C$  – 20,1%,  $T/C$  – 58,9%,  $T/T$  – 21% (табл. 1).

*Оценка аллельного полиморфизма гена лептина (LEP) по маркеру A80V.* Для изучения полиморфизма гена *LEP* по маркеру A80V генотипировано 245 животных. Размер рестрикционных фрагментов после обработки эндонуклеазой рестрикции Psp13I составил 424/398/26 п.н. Результаты разделения фрагментов рестрикции по маркеру A80V представлены на рис. 2 (:Н и О – наблюдаемые и ожидаемые значения для гомозигот и гетерозигот.

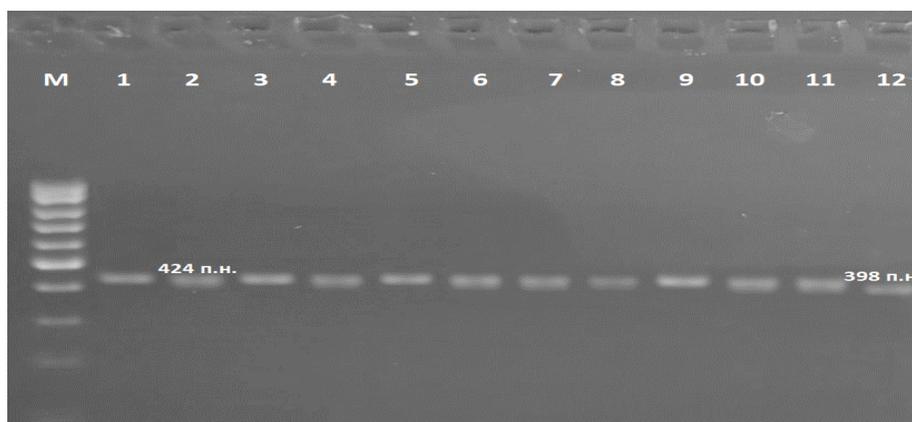


Рис. 2. Электрофореграмма результатов генотипирования особей по гену *LEP*. Обозначения: М – размерный стандарт с шагом 100 п.н. Генотипы А/А (424 п.н.), А/В (424/398/26 п.н.), В/В (398/26 п.н.)

По результатам исследований было выявлено следующее распределение по частоте встречаемости аллелей и генотипов:  $A^*$  – 0,68 и  $V^*$  – 0,32;  $A/A$  – 43,27%,  $A/V$  – 49,39%,  $V/V$  – 7,34 % (табл. 2). В результате проверки данных генотипирования исследованной выборки ( $n=245$ ) на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с применением точного теста Фишера показано, что полиморфизм Y7F не соответствует равновесию (гомозигот по аллелю  $T^*$  не обнаружено). Поэтому полиморфизм Y7F в дальнейших ассоциативных тестах не использовали.

Таблица 2. Результаты генотипирования по полиморфизму A80V

n = 245	Частота встречаемости						аллелей		$\chi^2$
	Генотипов								
	A/A		A/V		V/V		A*	V*	
n	%	n	%	n	%				
Н	106	43,3	121	49,4	18	7,34	0,68	0,32	4,40
О	113	46,2	107	43,5	25	10,2			

Примечание: Н и О – наблюдаемые и ожидаемые значения частоты встречаемости гомозигот и гетерозигот.

*Изучение генетической устойчивости к развитию кетозу.* С помощью веб-инструмента SNPstats выполнены ассоциативные тесты по каждому изучаемому полиморфизму в гене лептина по отдельности. Так, для R25C проведено тестирование по всем пяти возможным моделям наследования высокого и низкого уровня НЭЖК в сыворотке крови. Из всех моделей наименьшее значение P-value было получено для модели рецессивного наследования признака. Несмотря на то, что статистическая достоверность не наблюдается, относительный критерий оценки Акаике для данной модели был наименьшим, так же, как и Байесовский информационный критерий. Эти значения указывают на наименьшую потерю информации в модели для применяемых генотипов и фенотипов (табл. 3).

*Таблица 3. Результаты ассоциативных тестов по R25C отдельно (n=194), без поправки на биохимическое ранжирование)*

Модель	Генотип	n	НЭЖК, M±2σ *	Различие с генотипом C/C, D (95%-ый довер. интервал)	P- value	AIC	BIC
Кодоминантная	C/C	41	0.24±0.03		0.17	-72.2	-52.6
	T/C	116	0.24±0.02	0.01(-0.06 - 0.08)			
	T/T	37	0.17±0.03	0.06(-0.15 - 0.03)			
Доминантная	C/C	41	0.24±0.03		0.86	-70.5	-54.2
	T/C-T/T	153	0.22±0.02	-0.01(-0.08 - 0.06)			
Рецессивная	C/C-T/C	157	0.24±0.02		<b>0.06</b>	<b>-74.1</b>	<b>-57.7</b>
	T/T	37	0.17±0.03	-0.07(-0.14 - 0.00)			
Овердоминантная	C/C-T/T	78	0.21±0.02		0.18	-72.4	-56
Мультипликативная	T/C	116	0.24±0.02	0.04(-0.02 - 0.10)	0.2	-72.2	-55.8
Мультипликативная	-	-	-	-0.03(-0.07 - 0.02)			

Примечание: \* M – среднее значение; σ – стандартное отклонение (2σ – односторонний 95-ый доверительный интервал)

При проведении ассоциативного теста с использованием ранжирования групп по фенотипическим признакам «устойчивые», «предрасположенные» и «нейтральные» с учётом показателей биохимического состава крови выявлен повышенный уровень СЖК у животных с генотипом T/C в группе «предрасположенные». Несмотря на отсутствие статистической значимости по общему тесту, конкретная комбинация аллелей имеет отрицательный вклад в группе «предрасположенные» к кетозу (табл. 4). Оценка эффекта взаимодействия в общем тесте – 0.089.

Для полиморфизма A80V модель рецессивного наследования признака также оказалась наиболее близкой к полученным данным. На это указывают низкие значения P-value, критерия информационной оценки Акаике, Байесовский информационного критерия. Для достижения статистически значимого уровня P-value требуется увеличение выборки.

При проведении ассоциативного теста с использованием биохимического ранжирования животных по фенотипическим группам для A80V обнаружено, что животные с самым распространённым генотипом (гетерозиготы по данному локусу) в группе предрасположенных к кетозу имели самый большой уровень СЖК в крови (табл. 5, 6).

Таблица 4. Результаты ассоциативных тестов по R25C отдельно (n=194, с поправкой на биохимическое ранжирование)

Генотипы	Группы биохим. профиля*	n	НЭЖК, М±2σ	Различие с группой 1, D (95%-ый довер. интервал)
C/C	1	32	0.23±0.03	
	2	2	0.30±0.20	0.07 (-0.21 - 0.36)
	3	7	0.31±0.11	0.09 (-0.07 - 0.25)
T/C	1	100	0.20±0.02	
	2	7	0.30±0.06	0.10 (-0.05 - 0.25)
	3	9	0.53±0.12	<b>0.33 (0.20 - 0.46)</b>
T/T	1	31	0.15±0.02	
	2	3	0.23±0.15	0.08 (-0.15 - 0.32)
	3	3	0.30±0.21	0.15 (-0.08 - 0.38)

Примечания: здесь и в табл. 5 обозначения групп: \* 1 - нейтральный фенотип, 2- устойчивый фенотип, 3-предрасположенный фенотип.

Необходимо отметить, что для гомозигот по аллелю T\* не обнаружены значимые ассоциации, что указывает на необходимость увеличения выборки, а также на возможный низкий уровень вклада данного генотипа в формирование фенотипа.

Таблица 5. Результаты ассоциативных тестов по A80V отдельно (n=243, с поправкой на биохимическое ранжирование)

Генотип	Группы биохим. профиля	n	НЭЖК, М±2σ	Различие с группой 1, D (95%-ый довер. интервал)
C/C	1	91	0.19±0.02	
	2	7	0.23±0.06	0.03 (-0.11 - 0.18)
	3	7	0.34±0.12	<b>0.15 (0.00 - 0.29)</b>
C/T	1	95	0.19±0.01	
	2	11	0.24±0.05	0.05 (-0.07 - 0.17)
	3	14	0.46±0.09	<b>0.27 (0.16 - 0.38)</b>
T/T	1	16	0.13±0.03	
	2	0	-	-
	3	2	0.35±0.25	-

Значения параметров при проверке на неравновесное сцепление для полиморфизмов R25C и A80V отражает их равновесное сцепление: значение  $D = -0,055$ ,  $r^2 = 0,057$ . Показателем того, что пара полиморфизмов находится в равновесном сцеплении, является диапазон D от -0,5 до 0,5, где 0 указывает на равновесное сцепление, а отрицательное значение объясняется тем, что комбинация двух аллелей встречается реже, чем ожидалось, и наоборот при положительном значении (Чесноков, 2011; Devlin, 1995; Smith, 2020). Значения  $r^2$ , приближающиеся к 0, свидетельствуют о статистически значимом равновесном сцеплении.

Таблица 6. Результаты ассоциативных тестов по A80V отдельно (n=243, без поправки на биохимическое ранжирование).

Модель	Генотип	n	НЭЖК, M±2σ	Различие с генготипом C/C (D)	P- value	AIC	BIC	
Кодоминантная-	C/C	105	0.21± 0.02					
	C/T	120	0.22±0.02	(-0.05 - 0.05)	0.42	-	-96.1	
	T/T	18	0.16 (0.04)	-0.06 (-0.15 - 0.04)		117.1		
Доминантная	C/C	105	0.21 (0.02)			0.87		-
Рецессивная	C/T-T/T	138	0.21 (0.02)	0.00 (-0.05 - 0.04)	<b>0.19</b>	117.3	<b>-119</b>	<b>-101.6</b>
	C/C-C/T	225	0.22 (0.01)	0.00				
	T/T	18	0.16 (0.04)	-0.06 (-0.15 - 0.03)				
Овердоминантная	C/C-T/T	123	0.2 (0.02)	0.00	0.6	-	-100.1	
	C/T	120	0.22 (0.02)	0.01 (-0.03 - 0.06)				
Мультипликативная	-	-	-	-0.01 (-0.05 - 0.02)	0.49	-	-100.3	

Примечания: общий тест на взаимодействие – 0.41.

Исходя из полученных данных по обоим критериям, сцепление для полиморфизмов R25C и A80V является равновесным. Равновесное сцепление в исследованной популяции позволяет тестировать полиморфизмы на возможную связь в развитии фенотипа. Проверка частоты встречаемости гаплотипов в выборке указывает на возможное наличие редкого гаплотипа T\*/T\* (R25C/A80V) (табл. 7).

Таблица 7. Проверка на наличие гаплотипов по гену LEP.

	Полиморфизм		Общая частота
	R25C	A80V	
Аллели	T*	C*	0.3937
	C*	C*	0.2859
	C*	T*	0.2169
	T*	T*	<b>0.1035</b>

Судя по данным табл. 8, в группе с фенотипом «предрасположенный» к развитию метаболических расстройств, в том числе кетоза, аллельной комбинации T\*/T\* (R25C/A80V) соответствуют наименьшие различия в уровне НЭЖК по отношению к нейтральному фенотипу, что может свидетельствовать о преимуществе комбинации данных аллелей.

Таблица 8. Анализ взаимосвязи гаплотипов и биохимического фенотипа (n=243)

Гаплотипы (R25C/A80V)	Частота	Фенотипы		
		Нейтральный	Устойчивый	Предрасположенный
		Различие в уровне СЖК (D, 95%-ный доверительный интервал)		
T*/C*	0.4041	0.00	0.10 (-0.11 - 0.31)	0.41 (0.24 - 0.59)
C*/C*	0.275	0.04 (-0.01 - 0.09)	0.06 (-0.09 - 0.21)	0.16 (0.01 - 0.31)
C*/T*	0.2288	0.01 (-0.04 - 0.06)	0.14 (-0.02 - 0.31)	0.41 (0.28 - 0.53)
T*/T*	0.0922	-0.02 (-0.10 - 0.05)	-0.02 (-0.23 - 0.20)	<b>0.01 (-0.44 - 0.46)</b>

В целом, количественные соотношения и закономерности, выявленные в проведенном исследовании, могут быть использованы в исследованиях, направленных на повышение устойчивости к развитию метаболических расстройств у коров молочного направления продуктивности.

### Заключение

Проведено генотипирование коров голштинской породы по гену *LEP*; исследованы 3 однонуклеотидных полиморфизма гена *LEP* крупного рогатого скота: Y7F (n=245), R25C (n=224), A80V (n=245). Выявлено распределение частот встречаемости аллелей и генотипов для R25C: C\* – 0,49 и T\* – 0,51; C/C – 20,1%, T/C – 58,9%, T/T – 21%; для A80V: A\* – 0,68 и V\* – 0,32; A/A – 43,27%, A/V – 49,39%, V/V – 7,34%. Для этих двух полиморфизмов в исследованной популяции наблюдается равновесное сцепление. При изучении полиморфизма Y7F (n=245) гомозигот по аллелю T\* не обнаружено. В результате проверки данных генотипирования исследованной выборки на соответствие равновесию Харди-Вайнберга определено, что равновесию соответствуют полиморфизмы R25C и A80V. Значения полученных параметров для SNP R25C и A80V отражают их равновесное сцепление: значение  $D = -0,0555$ ,  $r^2 = 0,057$ . Проверка на наличие гаплотипов в выборке указывает на существование возможного редкого гаплотипа T\*/C\* (R25C/A80V). В группе с фенотипом «предрасположенный» к развитию метаболических расстройств, протекающих по типу кетоза, аллельной комбинации T\*/T\* (R25C/A80V) соответствуют наименьшие различия в уровне НЭЖК по отношению к нейтральному фенотипу, что может свидетельствовать о преимуществе комбинации данных аллелей.

### Список литературы

1. Белоусов А.И. Иммунобиохимическая и морфофункциональная характеристика высокопродуктивных коров при разной эпизоотической и микотоксикологической нагрузке: автореф. дисс... д.вет.н.: 06.02.02 Екатеринбург. 2021. 30 с.
2. Белоусов А.И., Красноперов А.С., Опарина О.Ю., Суздальцева М.А. Метаболические признаки алиментарного кетоза у высокопродуктивных коров. // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии. 2018. Т. 80. № 1. С. 88-100. DOI: 10.30917/ATT-PRINT-2018-1.
3. Ковалюк Н.В., Якушева Л.И., Кузьминова Е.В., Ширяева Е.В., Абрамов А.А., Семенов М.П. Связь полиморфизмов гена лептина с предрасположенностью крупного рогатого скота к кетозу. // Генетика и разведение животных. 2020. № 3. С. 20-26. DOI: 10.31043/2410-2733-2020-3-20-26.
4. Соколова О.В., Бытов М.В., Белоусов А.И. и др. Генетическая предрасположенность к кетозу у крупного рогатого скота: современное состояние. // Генетика. 2023. Т. 59. № 3. С. 294-307. DOI: 10.31857/S0016675823030116
5. Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Ассоциативное картирование у растений (обзор). // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 5. С. 3-16.
6. Якушева Л.И., Абрамов А.А., Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф. Связь полиморфизмов R25C и A80V гена лептина быков-производителей с оценкой их дочерей на предрасположенность к возникновению кетоза. // Сборник трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. 2019. Т. 8. № 3. С. 24-27. DOI: 10.34617/y47d-6h82.
7. Bauer EA, Kułaj D, Sawicki S, Pokorska J. Gene association analysis of an osteopontin polymorphism and ketosis resistance in dairy cows. // Sci. Rep. 2023. Vol. 13. nr 1. P. 21539. DOI: 10.1038/s41598-023-48771-5.

8. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. // *Genomics*. 1995. Vol. 29. nr 2. P. 311-22. DOI: 10.1006/geno.1995.9003.
9. Feuermann Y., Mabweesh S.J., Shamay A. Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland. // *J. Dairy Sci.* 2004. Vol. 87. № 9. P. 2941–2946. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73425-6.
10. Frühbeck G.A. heliocentric view of leptin. // *Proc. Nutr. Soc.* 2001. Vol. 60. nr 3. P. 301–318. DOI: 10.1079/pns200196.
11. Houseknecht K.L., Baile C.A., Matteri R.L., Spurlock M.E. The biology of leptin: a review. // *J. Anim. Sci.* 1998. Vol. 76. nr 5. P. 1405-1420. DOI: 10.2527/1998.7651405x.
12. Kroezen V, Schenkel F.S, Miglior F, Baes C.F, Squires E.J. Candidate gene association analyses for ketosis resistance in Holsteins. // *J. Dairy Sci.* 2018. Vol. 101. nr 6. P. 5240-5249. DOI: 10.3168/jds.2017-13374.
13. Nayeri S, Schenkel F, Fleming A et al. Genome-wide association analysis for  $\beta$ -hydroxybutyrate concentration in Milk in Holstein dairy cattle. // *BMC Genet.* 2019. Vol. 20. nr 1. P. 58. DOI: 10.1186/s12863-019-0761-9.
14. Silva L.F., VandeHaar M.J., Weber Nielsen M.S., Smith G.W. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. // *J. Dairy Sci.* 2002. Vol. 85. nr 12. P. 3277-3286. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74416-0.
15. Smith R.D. The nonlinear structure of linkage disequilibrium. // *Theor Popul Biol.* 2020. Vol. 134. P. 160-170. DOI: 10.1016/j.tpb.2020.02.005.
16. Soares RAN, Vargas G., Duffield T., Schenkel F., Squires E.J. Genome-wide association study and functional analyses for clinical and subclinical ketosis in Holstein cattle. // *J Dairy Sci.* 2021. Vol. 104. nr 9. P. 10076-10089. DOI: 10.3168/jds.2020-20101.
17. Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2006. Vol. 22. nr 15. P. 1928-1929. I: 10.1093/bioinformatics/btl268.
18. Szyda J., Komisarek J. Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. // *J. Dairy Sci.* 2007. Vol. 90. nr 6. P. 2971-2979. DOI: 10.3168/jds.2006-724.

#### References (for publications in Russian)

1. Belousov A.I. *Immunobiokhimicheskaya i morfofunktsional'naya kharakteristika vysokoproduktivnykh korov pri raznoi epizooticheskoi i mikotoksikologicheskoi nagruzke: avtoref. diss... d.vet.n.:* 06.02.02 [Immunobiochemical and morphofunctional characteristics of highly productive cows under different epizootic and mycotoxicological loads]: Extended abstract of Diss. Dr. Vet. Sci. Ekaterinburg. 2021. 30 pp.
2. Belousov A.I., Krasnoperov A.S., Oparina O.Yu., Suzdal'tseva M.A. [Metabolic signs of nutritional ketosis in highly productive cows]. *Proc. Inst. Exper. Veter. Med.* 2018. 80(1): 88-100. DOI: 10.30917/ATT-PRINT-2018-1.
3. Chesnokov Yu.V., Artem'eva A.M. [Association mapping in plants: a review]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya (Agricultural biology)*. 2011. 5: 3-16.
4. Kovalyuk N.V., Yakusheva L.I., Kuz'minova E.V., Shiryaeva E.V., Abramov A.A., Semenenko M.P. [Association of leptin gene polymorphisms with the susceptibility of cattle to ketosis] *Genetika i razvedenie zhivotnykh (Genetics and animal breeding)*. 2020. 3: 20-26. DOI: 10.31043/2410-2733-2020-3-20-26.
5. Sokolova O.V., Bytov M.V., Belousov A.I. et al. [Genetic predisposition to ketosis in cattle: current state]. *Genetika (Genetics)*. 2023. 59(3): 294-307. DOI: 10.31857/S0016675823030116
6. Yakusheva L.I., Abramov A.A., Kovalyuk N.V., Satsuk V.F. [Association of polymorphisms R25C and A80V of the leptin gene in sires with the assessment of their daughters for predisposition to ketosis]. *Sbornik nauchnykh trudov KNTsZV (Works of the Krasnodar Center for Animal Science and Veterinary Medicine)*. 2019. 8(3):24-27. DOI: 10.34617/y47d-6h82.

UDC 619:577.21:001.891.53:636.2

**Assessment of allelic diversity of the leptin gene and associations of its single nucleotide polymorphisms with biochemical markers of predisposition to ketosis in cows**

Zaitseva O.S., Bytov M.V., Volskaya S.V., Martynov N.A.,  
Osipova Yu.A., Yusupova Ch.R.

*Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of RAS,  
Ekaterinburg, Russian Federation*

**ABSTRACT.** In modern breeding programs, it is important to select highly productive animals that are resistant to various diseases, including those associated with metabolic disorders. The purpose of this study is to assess the allelic diversity of the leptin gene in the Ural population of Holstein cows and the degree of association of its polymorphisms with biochemical parameters. In this paper, 3 single nucleotide polymorphisms of the bovine *LEP* gene were studied: Y7F (n=245), R25C (n=224), A80V (n=243). The following distribution of frequencies of occurrence of alleles and genotypes for R25C was revealed:  $C^*$  – 0.49 and  $T^*$  – 0.51;  $C/C$  – 20.1%,  $T/C$  – 58.9%,  $T/T$  – 21%; for A80V:  $A^*$  – 0.68 and  $V^*$  – 0.32;  $A/A$  – 43.27%,  $A/V$  – 49.39%,  $V/V$  – 7.34%. For these two polymorphisms, linkage equilibrium is observed in the studied population. No homozygotes for the  $T^*$  allele were found, when studying the Y7F polymorphism (n=245). Based on a biochemical study of the level of NEFA, ketone bodies and glucose in the blood, the animals has been ranked into phenotypic groups in relation to the predisposition to the development of metabolic disorders occurring as ketosis: “resistant”, “predisposed” and “neutral”. In the group with a phenotype “predisposed”, the allelic combination  $T^*/T^*$  (R25C/A80V) corresponds to the smallest differences in NEFA levels relative to the neutral phenotype, which may indicate an advantage of this allele combination.

*Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* (Productive Animal Biology), 2024. 2: 45-55.

*Keywords:* cattle, leptin gene, allele frequencies, single nucleotide polymorphisms, susceptibility to ketosis.

Поступило в редакцию: 31.05.2024

Получено после доработки: 05.06.2024

Сведения об авторах:

**Зайцева Ольга Сергеевна**, к.вет.н., с.н.с., 8(343)257-20-44; bodrova-zaizeva@mail.ru;

**Бытов Максим Владимирович**, м.н.с., 8(343)257-20-44; bytovmaks@mail.ru;

**Вольская София Витальевна**, лаб., 8(343)257-20-44; info@urfanic.ru;

**Мартынов Николай Александрович**, лаб., 8(343)257-20-44; martynov\_kolya98@mail.ru;

**Осипова Юлия Алексеевна**, лаб., 8(343)257-20-44, osipova.j2003@gmail.com;

**Юсупова Чулпан Рифовна**, д.б.н., с.н.с., 8(937)164-45-16, chulpan-galina@mail.ru