

УДК 619:577.21:001.891.53:636.2

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2023.1.31-36

**ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЁННОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ
ГЕНА СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА *iNOS* В УРАЛЬСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

¹Безбородова Н.А., ¹Бытов М.В., ¹Мартынов Н.А., ²Кужебаева У.Ж.,
¹Петропавловский М.В., ¹Вольская С.В., ¹Зубарева В.Д.

¹Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург,
Российская Федерация; ²Западно-Казахстанский аграрно-технический
университет имени Жангир хана, Уральск, Казахстан

В настоящее время большое внимание исследователей уделяется изучению роли оксида азота (NO) в процессах защиты организма животных от инфекционных патогенов. Ген индуцибельной формы синтазы оксида азота *iNOS* экспрессируется после воздействия на них бактериальными агентами и медиаторами воспаления; он служит маркером врождённого иммунитета у молодняка крупного рогатого скота, а у взрослого поголовья его аллельные варианты ассоциированы со степенью восприимчивости к инфекционным агентам. Цель исследования – оценка аллельного полиморфизма гена *iNOS* по выбранным маркерам резистентности и восприимчивости крупного рогатого скота к лейкозу на территории Уральского региона. В ходе исследования протокол ПЦР-ПДРФ адаптирован для анализа вариантов гена *iNOS* по полиморфизму маркера АН13-1. Получены данные о частотах распространения аллельных вариантов гена *iNOS* по полиморфизму длин рестриктивных фрагментов: АА = 192/66 п.н.; АВ = 258/192/66 п.н.; ВВ = 258 п.н. В исследованной выборке коров (n=164) частота встречаемости генотипов АА составляла 47,6%, АВ – 42,7%; ВВ – 9,7%. Частота аллеля А составила 0,689, аллеля В – 0,311. Предварительная оценка распространённости аллельного полиморфизма гена *iNOS* в исследуемой популяции выявила наибольшее распространение у дойных коров аллеля А. В дальнейших исследованиях планируется изучить степень ассоциации между полиморфизмом гена *iNOS* и провирусной нагрузкой вируса лейкоза крупного рогатого скота для применения в селекционно-племенной работе.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, ген синтазы оксида азота *iNOS*, лейкоз, маркер АН13-1 *iNOS*

Проблемы биологии продуктивных животных, 2023, 1: 31-36

Введение

Оксид азота (NO) в организме животных вырабатывается в защитно-приспособительной реакции, в которой молекулярный кислород связывается с атомом азота в гуанидиновой группе аргинина под действием нитроксидсинтазы (NOS) (Тухватуллина, 2021; Tukhvatullina, 2021). Доказано, что NO, продуцируемый макрофагами и другими клетками иммунной системы, обладает противомикробным, противовоспалительным и цитотоксическим свойствами (Реутов, 2016; Гончаров, 2020; Bogdan, 2001; Hickey, 2001; Li, 2022). Бактерицидное действие обусловлено появлением реактивных промежуточных продуктов оксида азота, которые вызывают изменения активности белков, окислительный стресс и нарушение функции ДНК антигена (Галимова, 2016). Цитотоксический эффект NO увеличивается в результате взаимодействия с супероксидным

радикалом, образующим пероксинитрит, который обладает более высокой химической активностью, чем оксид азота или супероксидные агенты (Галимова, 2016).

Выявленные взаимосвязи между бактерицидной активностью сыворотки крови и уровнем метаболитов NO свидетельствуют о важной роли оксида азота в механизмах врождённого иммунитета у телят и при применении иммунобиологических препаратов (Тухватуллина, 2021; Tuxhvatullina, 2021). Показано, что эти эффекты в значительной степени обусловлены активностью индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) (Реутов, 2016; Гончаров, 2020; Bogdan, 2001). Известно, что активность iNOS существенно возрастает в злокачественных новообразованиях различной локализации и варьирует в зависимости от стадии заболевания при опухолях молочной железы, яичников, головного мозга (Дерягина, 2016). Кодированный участок гена iNOS состоит из трёх полиморфных маркеров (АН13-1, АН13-2, АН13-3) расположенных в третьем интроне. Проведен анализ аллельных вариантов полиморфного маркера АН13-1 гена iNOS и выявлена связь аллелей с наследуемой чувствительностью и резистентностью к BLV (Чичинаина и др., 2005). Установлено, что в гене iNOS за устойчивость к вирусу лейкоза отвечает аллель А (вариант АА), а за чувствительность – аллель В (вариант ВВ) (Гильманов, 2022). Доказана роль аллельной изменчивости *iNOS* при изучении резистентности и восприимчивости животных к FLK BLV (Kuzhebayeva, 2021).

Целью данного исследования была оценка аллельного полиморфизма гена iNOS по выбранным маркерам резистентности и восприимчивости крупного рогатого скота к лейкозу на территории Уральского региона с использованием адаптированного протокола ПЦР-ПДРФ.

Материал и методы

Объект исследований – Уральская популяция крупного рогатого скота молочного направления продуктивности. Предмет исследований – молекулярные маркеры iNOS, ассоциированные с резистентностью или восприимчивостью к лейкозу крупного рогатого скота. Исследования проведены на выборке дойных коров голштинской породы. (n =164) из трёх сельскохозяйственных предприятий.

Выделение ДНК из цельной крови проводили с применением набора «Diatom DNA Prep 200» (ООО «ИзоГен», Россия); для ПЦР использовали комплекс специфических праймеров (табл. 1). В состав реакционной смеси входили: SE-буфер производства SibEnzyme (60 мМ Трис-НСl (рН 8,6), 25 мМ КСl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100), 0,18 мМ каждого dNTP, по 0,35 мкМ каждого праймера, 1,7 мМ MgCl₂; 0,31 ед. Taq-полимеразы (SibEnzyme), 30-80 нг ДНК.

Термоциклирование осуществляли на амплификаторе SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, США), при следующих температурных режимах: предварительная денатурация при 95°C – 5 мин.; далее 35 циклов: денатурация 94 °C – 20 сек., отжиг 60 °C – 20 сек., синтез при 72°C – 20 сек.; элонгация при 72°C – 10 мин. ПЦР-ПДРФ осуществляли в конечном объёме 15 мкл, обрабатывали 5 ед. эндонуклеазы рестрикции *Hinf*I при температуре 37°C около 10-12 ч (Kuzhebayeva, 2021).

Детекцию образующихся ПЦР-ПДРФ-фрагментов проводили в 3%-ом агарозном геле в буфере ТБЕ, содержащем бромид этидия, при напряжении 210 В в течение 1 ч, с последующей визуализацией ДНК с помощью CHEMIDOC XRS+ (Bio-Rad, США).

Ожидаемые частоты генотипов рассчитывали согласно закону Харди-Вайнберга. Для сопоставления наблюдаемого и ожидаемого распределения частот генотипов использовали критерий соответствия «хи квадрат» (χ^2).

Результаты и обсуждение

Для первичного анализа аллельного полиморфизма гена *iNOS* в исследованных популяциях был использован протокол ПЦР-ПДРФ, адаптированный для генотипирования Уральской популяции крупного рогатого скота по аллелям А, В полиморфного маркера АН13-1.

Результаты оценки частоты распространения аллельных вариантов гена *iNOS* у исследуемых животных и электрофореграмма представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Таблица 1. Аллельное разнообразие гена *iNOS* у исследованных особей крупного рогатого скота (n=164)

	Частота встречаемости						аллели		χ^2
	генотипы								
	AA		AB		BB		A	B	
	n	%	n	%	n	%			
Н	78	47,6	70	42,7	16	9,7	0,689	0,311	0,008
О	78,064	47,6	70,356	42,9	15,9	9,7			

Примечание: Н – наблюдаемое распределение генотипов, О – ожидаемое распределение генотипов.



Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ по генотипированию крупного рогатого скота по аллелям А и В полиморфного маркера АН13-1 гена *iNOS*. Обозначения: генотип AA (192/66 п.н.); генотип BB (258 п.н.); генотип AB (258/192/66 п.н.). М – размерный стандарт с шагом 100 п.н.

Среди исследованного поголовья крупного рогатого скота частота встречаемости генотипов составляла для AA 47,6 %, AB – 42,7 %; BB – 9,7 %. Частота аллеля А составила 0,689, аллеля В – 0,311. Проведенная оценка аллельного разнообразия гена *iNOS* у коров молочного направления продуктивности показала превалирование аллеля А. Известно, что в гене *iNOS* аллель А (с генотипом AA) отвечает за устойчивость к вирусу лейкоза, а аллель В (с генотипом BB) – за восприимчивость к вирусу (Чижова, 2017; Kuzhebayeva, 2021). Индуцируемая синтаза оксида азота является сигнальной молекулой, которая синтезируется в клетках тканей и оказывает регулирующее воздействие на различные физиологические процессы, в том числе на нейротрансмиссию, иммунную защиту и апоптоз (Morales, 2020). В ранее проведенных работах был изучен аллельный полиморфизм полиморфного маркера АН13-1 гена *iNOS* и определены ассоциативные связи между полиморфными вариантами этого маркера и фенотипическими признаками резистентности и восприимчивости животных к вирусу лейкоза (Чичина, 2005; Гильманов, 2019, 2022).

При оценке аллельного полиморфизма гена *iNOS* ранее было выявлено, что телята с генотипом AA имели более высокую врожденную резистентность, в отличие от молодняка с генотипом AB (Тюлькин, 2019). Было установлено превалирование у быков-производителей молочного и мясного направления продуктивности аллеля А, отвечающего за устойчивость к вирусу лейкоза крупного рогатого скота, и при анализе полиморфизма генов у быков-

производителей с помощью ассоциативных тестов (*iNOS*, *BLG*) наибольшие показатели по молочной продуктивности были у животных с комплексным генотипом ВВ и АВ (Гильманов, 2018). Авторами была показана возможность использования гена *iNOS* в качестве SNP-маркера для маркер-ориентированной селекции (Гильманов, 2018; Morales, 2020).

В ходе проведенного исследования локусов, ассоциированных с хозяйственно ценными фенотипическими признаками устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота, проведена оптимизация протокола ПЦР-ПДРФ для анализа вариантов гена *iNOS* по полиморфизму маркера АН13-1 и были оценены частоты встречаемости аллельных вариантов гена *iNOS* по аллелям А, В полиморфного маркера АН13-1.

По результатам ПЦР-ПДРФ анализа аллельных вариантов гена *iNOS* выявлено три гено-специфичных фрагментов: АА = 192/66 п.н.; АВ = 258/192/66 п.н.; ВВ = 258 п.н. В исследованной выборке поголовья крупного рогатого скота частота встречаемости генотипов АА составляла 47,6%, АВ – 42,7%; ВВ – 9,7%. Частота аллеля А составила 0,689, аллеля В – 0,311. Из литературных источников известно, что аллель А отвечает за устойчивость к вирусу лейкоза, а аллель В – за восприимчивость к данному инфекционному агенту (Тюлькин, 2019; Kuzhebayeva, 2021). Проведенная первичная оценка аллельного полиморфизма гена *iNOS* выявила доминирование аллеля А.

Заключение

Предварительная оценка распространённости полиморфизма гена *iNOS* в популяции дойных коров на территории Уральского региона выявила наибольшее распространение аллеля А, отвечающего за резистентность к вирусу лейкоза крупного рогатого скота. Дальнейшее изучение аллельных вариантов гена *iNOS* позволит проводить генотипирование животных для дальнейшего селекционного отбора родительских пар, с целью получения от них потомства с желательными качествами.

Список литературы

1. Галимова Л.А. Образование No в организме разных видов животных в норме и патологии // Материалы межвузовского ежегодного конкурса среди студентов и молодых ученых по медико-биологическим и естественнонаучным дисциплинам. Казань: Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, 2016. С. 143-145.
2. Гильманов Х.Х. Оптимизация условий проведения ПЦР- амплификации локуса гена BoLA-DRB3. // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2017. Т. 232. № 4. С. 31-36.
3. Гильманов Х.Х., Вафин Р.Р., Каримова Р.Г., Тюлькин С.В. Способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам полиморфного маркера АН13-1 гена *iNOS*. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2018. № 4. С. 22-28.
4. Гончаров Н.П. Оксид азота (NO): физиология и метаболизм (лекция) // Андрология и генитальная хирургия. 2020. Т. 21. № 3. С. 75-79.
5. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В. и др. Экспрессия *iNOS* и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. // Успехи молекулярной онкологии. 2016. Т. 3. № 3. С. 73-80.
6. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Проблема оксида азота в биологических системах: от NO-синтазных и нитритредуктазных систем в организме млекопитающих к циклу оксида азота, принципу цикличности и механизмам, лежащим в основе многочисленных заболеваний. // Евразийское научное объединение. 2016. Т. 1. № 1. С. 49-55.
7. Тухватуллина Л.А., Каримова Р.Г. Влияние иммуномодуляторов на неспецифическую резистентность и образование оксида азота (II) в организме телят. // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2021. Т. 247. № 3. С. 267-272.
8. Тюлькин С.В., Шайдуллин Р.Р., Гильманов Х.Х. и др. Влияние породы и генотипа по гену лептина на молочную продуктивность и качество молока коров. // Ветеринарный врач. 2019. № 3. С. 52-56. DOI 10.33632/1998-698X.2019-3-52-56.

9. Чиждова Л.Н., Кононова Л.В., Шарко Г.Н., Ковалёва Г.П. Полиморфизм гена лептина у коров молочного направления продуктивности. // *Сельскохозяйственный журнал*. 2017. № 10. С. 113-117.
10. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. // *Nat. Immunol.* 2001. Vol. 2. nr 10. P. 907-916. DOI: 10.1038/ni1001-907. PMID: 11577346.
11. Hickey M.J. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. // *Clin. Sci. (London)*. 2001. Vol. 100, nr 1, P.1-12. PMID: 11115411. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11115411/>
12. Draganski A., Nosanchuk J.D., Abuzeid W.M. Nitric oxide-generating microparticles: an in vitro evaluation of anti-biofilm efficacy and sinonasal epithelial cell cytotoxicity. // *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2022. Vol. 8. DOI: 10.1002/alr.23096. PMID: 36208141.
13. Kuzhebaeva U.Zh., Donnik I.M., Petropavlovskiy M.V. et al. Nitric oxide as an indicator for assessing the resistance and susceptibility of cattle to leukemia. // *Agr. Bull. Urals.* 2021. Vol. 10. P. 48-54. DOI: 10.32417/1997-4868-2021-213-10-48-54.
14. Morales J.P.A., López-Herrera A., Zuluaga J.E. Association of BoLA DRB3 gene polymorphisms with BoHV-1 infection and zootechnical traits. // *Open Vet. J.* 2020. Vol. 10. nr 3. P. 331-339. DOI: 10.4314/ovj.v10i3.12. Sep 25. PMID: 33282705; PMCID: PMC7703619.
15. Tukhvatullina L.A., Kosarev M.A., Bogova Y.A., Safina G.M., Nasibullin R.Y., Gabbasova A.K., Karimova R.G. Comparative activity of the nitric oxide (II) system the process of developing of an immune response in guinea pigs after injection of anti-brucellosis vaccines. // *Biosci. Biotech. Res. Comm.* 2021. Vol. 14 nr 9. P. 15-19.

References (for publications in Russian)

1. Galimova L.A. [Formation of NO in the body of different animal species in normal and pathological conditions]. *Materials of the interuniversity annual competition among students and young scientists in biomedical and natural science discipline*, (Materials of the interuniversity annual competition among students and young scientists in biomedical and natural science disciplines), Kazan: Volga Region State Academy of Physical Culture, Sports and Tourism. 2016. P. 143-145.
2. Gil'manov Kh.Kh. [Optimization of conditions for PCR amplification of the BoLA-DRB3 gene locus]. Kazan: Volga Region State Academy of Physical Culture, Sports and Tourism. N.E.]. *Uchenye zapiski Kazanskoi gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny im. N.E. Baumana* (Scientific notes of Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine). 2017. 232(4): 31-36.
3. Gil'manov Kh.Kh., Vafin R.R., Karimova R.G., Tyul'kin S.V. [Method for performing PCR-RFLP for genotyping cattle according to allelic variants of the polymorphic marker AH13-1 of the iNOS gene]. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya* (Veterinary, zootechnics and biotechnology). 2018. 4: 22-28.
4. Goncharov N.P. [Nitric oxide (NO): physiology and metabolism (lecture)]. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya* (Andrology and genital surgery). 2020. 21(3): 75-79.
5. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V. et al. [Expression of iNOS and biosynthesis of nitric oxide metabolites during the growth of tumors of different histogenesis]. *Uspekhi molekulyarnoi onkologii* (Advances in molecular oncology), 2016. 3(3): 73-80.
6. Reutov V.P., Sorokina E.G. [The problem of nitric oxide in biological systems: from NO-synthase and nitrite reductase systems in mammals to the nitric oxide cycle, the principle of cyclicity and the mechanisms underlying numerous diseases]. *Evrasiiskoe nauchnoe ob'edinenie* (Eurasian Scientific Association). 2016. 1(1): 49-55.
7. Tukhvatullina L.A., Karimova R.G. [The effect of immunomodulators on nonspecific resistance and the formation of nitric oxide (II) in the body of calves]. *Uchenye zapiski Kazan State Academy of Veterinary Medicine imeni N.E. Baumana* (Scientific notes of Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine). 2021. 247(3): 267-272. .
8. Tyul'kin S.V., Shaidullin R.R., Gil'manov Kh.Kh. et al. [Influence of breed and leptin gene genotype on milk productivity and milk quality of cows]. *Veterinarnyi vrach* (Veterinarian). 2019. 3: 52-56. DOI 10.33632/1998-698X.2019-3-52-56.
9. Chizhova L.N., Kononova L.V., Sharko G.N., Kovaleva G.P. [Polymorphism of the leptin gene in dairy cows of productivity]. *Sel'skokhozyaistvennyi zhurnal* (Agricultural magazine). 2017. 10: 113-117.

UDC 619:577.21:001.891.53:636.2

Assessment of the prevalence of allelic variants of nitric oxide synthase bovine gene *iNOS* in the Ural population

¹Bezborodova N.A., ¹Bytov M.V., ¹Martynov N.A., ²Kuzhebaeva U.Zh.,
¹Petrovavlovskii M.V., ¹Volskaya S.V., ¹Zubareva V.D.

¹Ural Federal Agrarian Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation; ²West-Kazakhstan Agrotechnical Zhangir Khan University, Uralsk, Kazakhstan

ABSTRACT. At present, much attention of researchers is paid to the study of the role of nitric oxide (NO) in protecting animal from infectious pathogens. The gene for the inducible form of nitric oxide synthase *iNOS* is expressed after exposure to bacterial agents and inflammatory mediators; it serves as a marker of innate immunity in young cattle; in adult cattle, its allelic variants are associated with the degree of susceptibility to infectious agents. The aim of the study was to evaluate the allelic polymorphism of the *iNOS* gene for selected markers of resistance and susceptibility of cattle to leukemia in the Ural region. In the course of the study, the PCR-RFLP protocol was adapted for the analysis of *iNOS* gene variants for the polymorphism of the AH13-1 marker. Data of the distribution frequencies of allelic variants of the *iNOS* gene were obtained according to the restriction fragment length polymorphism: AA = 192/66 bp; AB = 258/192/66 b.p.; BB = 258 b.p. In the studied sample of cows (n=164), the frequency of occurrence of AA genotypes was 47.6%, AB - 42.7%; BB - 9.7%. The A allele frequency was 0.689, and the B allele frequency was 0.311. A preliminary assessment of the prevalence of allelic polymorphism of the *iNOS* gene in the study population revealed the greatest distribution of the A allele in dairy cows. In further studies, it is planned to determine the degree of association between the *iNOS* gene polymorphism and the proviral load of the bovine leukemia virus for use in breeding work.

Keywords: cattle, nitric oxide synthase gene *iNOS*, leukemia, AH13-1 *iNOS* marker, frequency of occurrence

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology), 2023, 1: 31-36

Поступило в редакцию: 06.02.2023

Получено после доработки: 13.08.2023

Сведения об авторах:

Безбородова Наталья Александровна, к.вет.н., с.н.с., 8(343)257-20-44; n-bezborodova@mail.ru.

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

Мартынов Николай Александрович, лаб., 8(343)257-20-44; martynov_kolya98@mail.ru.

Кужебаева Улболсын Жангазиевна, м.н.с., 8(747)926-12-32; usya_999@mail.ru.

Петропавловский Максим Валерьевич, к.вет.н., с.н.с., 8(343)257-20-44; petropavlovsky_m@mail.ru.

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

Зубарева Владлена Дмитриевна, ст. спец., 8(343)257-20-44; zzub97@mail.ru