

УДК: 636.082

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.415

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА *LEP* R25C В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ КОРОВ К КЕТОЗУ

Сабетова К.Д.* – к. вет. наук, зав. лабораторией генетики и ДНК технологий (ORCID 0000-0003-3282-4779); **Лемякин А.Д.** – селекционер-зоотехник регионального информационно-селекционного центра (ORCID 0000-0002-7737-6351); **Чаицкий А.А.** – канд. биол. наук, преподаватель кафедры частной зоотехнии, разведения и генетики (ORCID 0000-0002-5853-3809); **Щеголев П.О.** – селекционер-зоотехник регионального информационно-селекционного центра (ORCID 0000-0003-3552-8457); **Баданина Л.С.** – студ. (ORCID 0000-0002-1286-3714), **Метляев Н.Ю.** – асп. (ORCID 0009-0002-5696-1567); **Дудихин А.С.** – асп. (ORCID 0009-0008-2658-0441); **Кочуева Н.А.** – д-р биол. наук, проф. кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства (ORCID 0000-0002-6637-4924).

ФГБОУ ВО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия»

* kseniyasabetova@mail.ru

Ключевые слова: ген лептина, кетоз, коровы, метаболизм.

Key words: leptin gene, ketosis, cows, metabolism.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №22-76-00006, <https://rscf.ru/project/22-76-00006/>.

Поступила: 18.02.2024

Принята к публикации: 25.03.2024

Опубликована онлайн: 02.04.2024



РЕФЕРАТ

В условиях интенсификации отрасли молочного скотоводства стойкое напряжение обменных процессов в организме коровы может приводить к нарушению метаболизма и развитию кетоза. Учеными установлена генетическая предрасположенность коров к кетозу. Имеющиеся данные позволяют рассматривать ген лептина (*LEP*) в качестве одного из генов-кандидатов. Цель исследования: провести ассоциативный анализ предрасположенности к кетозу коров костромской породы разных генотипов по гену лептина. Исследования выполняли в 2022-2023 гг. на клинически здоровых полновозрастных новотельных высокопродуктивных коровах костромской породы ($n=167$), разводимых в племенных хозяйствах Костромской области. У животных в послеродовой период экспресс-методом определяли содержание кетоновых тел в крови и методом ПЦР-РВ – генотипы по локусу *R25C* гена *LEP*. Были сформированы группы коров в зависимости от содержания кетоновых тел в крови: 1-я – 0-1,2 ммоль/л (здоровые), 2-я – выше 1,2 ммоль/л (субклинический кетоз). Установлено, что среди подопытных коров костромской породы наибольшей частотой характеризуется генотип *СТ*. Определено практически полное отсутствие различий по концентрации кетоновых тел в крови между носителями различных генотипов *LEP* из 1-й группы. В то же время, среди животных 2-й группы наибольший уровень кетоновых тел в крови наблюдался у гетерозиготных животных, тогда как носители генотипов *СС* и *ТТ* по данному показателю почти не различались между собой. У гетерозиготных живот-

ных, отнесенных к группе с субклиническим кетозом, наблюдался наивысший средний показатель концентрации кетонов в крови при наибольшем коэффициенте вариации ($C_v=51,6\%$), что говорит о выраженном влиянии других генетических факторов. Таким образом, роль полиморфизма *LEP R25C* в предрасположенности коров к заболеванию кетозом на данной выборке животных не была установлена, что возможно дополняется влиянием других факторов, данные гипотезы необходимо проверить на большей выборке и на других породах крупного рогатого скота. Эти данные могут быть использованы для проведения таких поисковых исследований, как например, изучение комплексных генотипов генов, обуславливающих предрасположенность крупного рогатого скота к кетозу.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Молочное скотоводство является одним из важнейших жизнеобеспечивающих секторов аграрного производства, оказывающих влияние на уровень продовольственного обеспечения страны. В связи с этим, селекционная работа с крупным рогатым скотом в настоящее время преимущественно ориентируется на увеличение удоя и повышения качества молочной продукции. В результате этого на протяжении последних нескольких лет производство молока в России стало находиться на стабильных и относительно высоких отметках. Однако наблюдается сокращение численности поголовья, в том числе по причине возникновения заболеваний обмена веществ, что в свою очередь является результатом интенсивного отбора высокопродуктивных животных [1].

В условиях интенсификации отрасли молочного скотоводства все системы организма коровы находятся в состоянии максимальной физиологической нагрузки. При этом высокопродуктивные животные оказываются более восприимчивыми к различным неблагоприятным факторам, так как у них выше потребность в питательных веществах в связи с обильной лактацией и выделением большого количества белков, жиров, минеральных веществ с молоком. Стойкое напряжение обменных процессов в организме может привести к серьезным заболеваниям, одним из которых является кетоз [2].

Кетоз характеризуется как полиэтиологическое заболевание, связанное с нарушением углеводного, липидного и белкового метаболизма, сопровождается накоплением большого количества кетоновых тел в

крови, моче и молоке, снижением содержания глюкозы в крови. При кетозе крупного рогатого скота сокращаются сроки использования этих животных, снижается уровень и качество молочной продуктивности, нарушается функция воспроизводства коров. Потребление молока от коров с субклиническим кетозом ведет к ухудшению здоровья новорожденных телят, развитию гастроэнтеритов и диспепсий различного характера у них. Учеными выявлено, что предрасположенность к кетозу у коров имеет генетическую обусловленность [3, 4].

Н. Huang с соавторами (2019), чтобы лучше понять генетическую основу кетоза, было проведено полногеномное исследование ассоциации с использованием чипа *Illumina Bovine SNP50*. Было установлено, что несколько генов-кандидатов, включая гены *BMP4*, *HNF4A*, *APOBR*, *SOCS4*, *GCH1*, *ATG14*, *RGS6*, *CYP7A1* и *MAPK3*, участвуют в метаболизме инсулина или метаболизме липидов и энергетическом обмене [5].

В России данной проблематикой занималась группа ученых в рамках гранта РФФИ № 19-416 233016. Исследователями была выдвинута гипотеза, что генотип гена *LEP* может выступать как регулятор обмена веществ и пищевого поведения у коров. Так, в публикации Л.И. Якушевой и др. (2019) указано, что группу быков-производителей голштинской породы с генотипом *CC* локуса *LEP R25C* отличает более низкий средний показатель индекса «устойчивости дочерей к кетозу». Это может косвенно свидетельствовать, что генотип *CC* у крупного рогатого скота является одним из факторов риска развития кетоза [6].

В статье Н.В. Ковалюк и др. (2020) отмечено, что в разрезе комплексных генотипов полиморфизмов *R25C*, *Y7F*, *A80V* гена лептина генотип отцов *AAR-RYY* для дочерей и генотип *AARCYU* для коров голштинской породы обладают ценностью в плане устойчивости к кетозу [7].

В обзорной статье О.В. Соколовой с соавторами (2023) на данный момент особенно выделены исследования *S. Nayeri* (2019) на коровах голштинской породы, в которых был проведен полногеномный анализ ассоциаций, в результате чего были обнаружены гены *TNF*, *IFNG*, *LEP*, достоверно связанные с субклиническим кетозом как во время первой лактации, так и для последующих [8, 9].

ДНК-диагностика кетоза позволит в самом раннем возрасте выявить генетически предрасположенных к заболеванию коров и своевременно принять необходимые меры, что в свою очередь положительно отразится на эффективности производства молочной продукции. Имеющиеся данные позволяют рассматривать ген лептина (*LEP*) в качестве одного из генов-кандидатов, определяющих предрасположенность коров к кетозу. Однако этих сведений недостаточно для однозначного определения взаимосвязи, необходимо провести подобные исследования на примере других популяций крупного рогатого скота молочных пород, разводимых в России.

У крупного рогатого скота ген лептина локализован в 4-й хромосоме. Он контролирует проявление физиологических функций гормона лептина. Лептин вырабатывается клетками жировой ткани (адипоцитами). Экспрессия гормона реализуется на уровне гипоталамо-гипофизарной системы. Лептин участвует в регуляции пищевого поведения, контролируя потребление корма, а также в выработку и накопление энергии для лактогенеза. По данным многих авторов, лептин достоверно влияет на жировой обмен, регулирует эндокринные процессы, тесно связан с функцией репродуктивной системы. Это подтверждается ассоциациями

между полиморфизмами гена лептина и интервалом отела, временем первой овуляции после отела, темпом роста животного, содержанием жировой ткани в организме и мраморностью мяса, убойным выходом [10-14]. Ген лептина определяет уровень молочной продуктивности коров, содержание белка и жира в молоке, а также связан с продуктивным долголетием, что имеет большую практическую значимость в селекционно-племенной работе [15].

Цель исследования: провести ассоциативный анализ предрасположенности к кетозу коров костромской породы разных генотипов по *LEP R25C*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования выполняли в 2022-2023 гг. в условиях лаборатории генетики и ДНК технологий ФГБОУ ВО Костромской ГСХА. Объектом исследования были полновозрастные новотельные высокопродуктивные племенные коровы костромской породы ($n=167$), разводимые в АО «ПЗ «Караваяево» ($n=107$) и ООО «Минское» ($n=60$) Костромской области. Данные зоотехнического учета были получены с помощью ИАС «СЕЛЭКС» (ООО «РЦ «ПЛИНОР», Россия), данные ветеринарного учета – из программного обеспечения «М-комплекс» (ООО «МКС», Россия).

У клинически здоровых коров в послеродовой период (с 1-го по 10-й день после отела) экспресс-методом с использованием прибора «*TIADOC 4235E*» («*Taidoc Technology Corporation*», Тайвань) и тест-полосок к нему определяли содержание кетоновых тел в цельной периферической крови. С учетом этого были сформированы группы коров: 1-я – 0-1,2 ммоль/л (здоровые), 2-я – выше 1,2 ммоль/л (субклинический кетоз).

С соблюдением правил асептики и антисептики проводили отбор крови из хвостовой вены коров в индивидуальные стерильные промаркированные вакуумные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА K2 («*IMPROVE*», Германия). Из крови

сорбентным методом получали очищенную ДНК с помощью набора реактивов ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы ДНК были промаркированы в соответствии с шифром пробы. Условия хранения ДНК: в морозильной камере при температуре -40°C .

Для молекулярно-генетических исследований выполнен поиск последовательностей генов с помощью биоинформационных баз данных *NCBI* и *Ensembl*. Анализ нуклеотидных последовательностей, подбор праймеров и зондов проводили с помощью компьютерной программы *Oligo 6.0*. Праймеры и зонды синтезированы ООО «НПО ДНК-технология» (Россия).

Контроль качества праймеров осуществляли методом агарозного гелеэлектрофореза. Условия проведения электрофореза выставляли в соответствии с инструкцией производителя камеры «Mupid-exU», Япония.

Полиморфизм *R25C* гена *LEP* (*rs29004488*) определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с детекцией результатов гибридизационно-флуоресцентным способом.

Амплификацию образцов ДНК проводили с использованием амплификатора «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) по стандартной схеме при температуре отжига праймеров 59°C . Плавление реализовано методом примыкающих проб. Для повышения качества и специфичности *SNP*-типирования применяли модифицированные типизирующие зонды, маркированные двумя разными флуорофорами, и универсальный тугоплавкий зонд с гасителем флуоресценции.

В состав смеси для постановки ПЦР (на 1 образец ДНК) входило 5 мкл образца ДНК, 20 мкл ПЦР-смеси, 0,24 мкл 25мМ дезоксинуклеозидтрифосфат (*dNTP*), 10 мкл раствора полимеразы (0,5 мкл *Taq* полимеразы и 9,5 мкл ПЦР-буфера). В состав ПЦР-смеси входили следующие компоненты: зонд (по каналам *FAM* и *HEX*)

по 0,1 мкл, зонд *BHQ* – 0,3 мкл, праймер *rev* – 0,6 мкл, праймер *for* – 0,1 мкл.

LEP_for 5'-CgT gTg gTT TCT TCT gTT TTC Agg C-3'

LEP_rev 5'-CCC AgT CCC TCC CTA CCg TgT g-3'

LEP_BHQ(BHQ1)-5'-gAT gAC ACC AAA ACC CTC AT-3'-(P)

LEP_C5'-CAT CCg CAA ggT CCA g-3'-(FAM)

LEP_T5'-CAT CTg CAA ggT CCA g-3'-(HEX)

Определение генотипа проводили с помощью анализа кривых плавления.

Частоту встречаемости генотипов *LEP* рассчитывали по формуле 1:

$$P = \frac{m}{N}, \quad (1)$$

где P – частота встречаемости генотипа в группе;

m – количество носителей определенного генотипа,

N – общее число особей.

Частоту встречаемости аллельных вариантов гена *LEP* в группах подопытных животных вычисляли по формуле 2:

$$p = \frac{2n_{CC} + n_{CT}}{2N} \quad q = \frac{2n_{TT} + n_{CT}}{2N}, \quad (2)$$

где p – частота встречаемости аллеля *C*,

q – частота встречаемости аллеля *T*,

n_{CC} , n_{CT} , n_{TT} – число носителей генотипов *CC*, *CT* и *TT* соответственно,

N – общее число животных в группе.

Генное равновесие оценивали при помощи уравнения Харди-Вайнберга (3):

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1, \quad (3)$$

где p и q – частоты аллелей *C* и *T* соответственно.

Оценку шанса возникновения кетоза при наличии того или иного аллельного варианта гена проводили по модели «случай-контроль» с расчетом показателя отношения шансов (ОШ) по формуле 4:

$$ОШ = \frac{A \times D}{B \times C}, \quad (4)$$

где A , B , C , D – левое верхнее, правое верхнее, левое нижнее и правое нижнее поля таблицы соответственно.

Доверительный интервал (ДИ) для ОШ рассчитывали по формуле 5:

$$ДИ = e^{\ln(ОШ) \pm 1,96 \sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}}}, \quad (5)$$

Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи *MS Excel 2019*. Тестирование статистической значимости разности между группами животных проводили путем расчета t -критерия Стьюдента, уровень статистической значимости считался достигнутым при значении $P < 0,05$. Проверку гипотезы независимости распределения аллелей в подопытных группах животных осуществляли с помощью критерия «хи-квадрат» (χ^2), различие между наблюдаемым и ожидаемым частотным распределением считали статистически значимым при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате генотипирования по гену лептина было выявлено следующее распределение генотипов в исследуемых выборках коров (таблица 1).

В результате анализа таблицы 1 установлено, что на предприятии АО «ПЗ «Каравасово» в первой подопытной группе чаще остальных регистрировали аллельный вариант C гена лептина. Во второй группе наблюдалась аналогичная тенденция, где частота встречаемости носителей CC и CT генотипов была высокой и находилась на одном уровне – 0,469. Особи с генотипом TT встречались редко в обеих исследованных группах, в пределах 0,063–0,091.

В ООО «Минское» в первой опытной группе было зарегистрировано только одно животное гомозиготного генотипа

CC (100%). Между тем, во второй группе частота встречаемости гетерозиготных по генотипу CT коров была высокой и составляла 0,508, а гомозигот CC и TT – 0,407 и 0,085 соответственно.

Итого в соответствии с выше представленными данными следует, что в обоих племпредприятиях по костромской породе чаще других встречаются коровы генотипа CT – 0,485, что выше по сравнению с частотой генотипов CC и TT соответственно.

Генотип TT при этом регистрировался реже, чем другие генотипы, в стадах обоих племпредприятий, что, вероятно, обусловлено невысокой жизнеспособностью его носителей, либо низкой концентрацией в геноме породы. Однако при этом доля носителей генотипа LEP^{TT} в стаде АО «ПЗ «Каравасово» и в объединенной выборке 1-й группы заметно больше, чем во второй.

Сравнение распределения генотипов LEP среди подопытных животных показало, что между коровами 1 и 2 группы в АО «ПЗ «Каравасово» присутствуют статистически значимые различия ($P < 0,001$). Однако при сравнении частот встречаемости генотипов LEP между 1 и 2 группами по всем подопытным животным без учета хозяйств разница в распределении генотипов была недостоверной ($P > 0,05$). Из-за наличия только одного животного в 1-й группе в ООО «Минское» сравнить частоты генотипов между подопытными группами не представляется возможным.

В силу заметного уменьшения доли генотипа TT в группах коров с повышенным уровнем кетоновых тел относительно групп с «нормальным» уровнем имело смысл проанализировать частоту аллельных вариантов локуса $LEP R25C$ (таблица 2).

Согласно данным таблицы 2 следует, что в стаде АО «ПЗ «Каравасово» в разрезе гена лептина в первой исследуемой группе чаще всего определяли аллель C – 0,688, тогда как аллель T встречался в 2,2 раза реже (0,312). Во второй группе носители аллельного варианта C встречались чаще на 2,1% (0,703), при более низком

Таблица 1 – Частота генотипов *LEP* в выборках коров костромской породы

Группы	N, голов	Генотип					
		CC		CT		TT	
		<i>n</i>	частота	<i>n</i>	частота	<i>n</i>	частота
АО «ПЗ «Караваево»							
всего в выборке	107	48	0,449	51	0,477	8	0,074
1	77	36	0,468	34	0,442	7	0,090
2	32	15	0,469** *	15	0,469** *	2	0,062** *
ООО «Минское»							
всего в выборке	60	25	0,417	30	0,500	5	0,083
1	1	1	1,000	-	-	-	-
2	59	24	0,407	30	0,508	5	0,085
итого по костромской породе							
всего в выборке	167	73	0,437	81	0,485	13	0,078
1	78	37	0,474	34	0,436	7	0,090
2	91	39	0,429	45	0,494	7	0,077

Примечание. В таблице обозначена статистическая значимость теста согласия Пирсона (критерий «хи-квадрат») между распределением генотипов *LEP* в 1 и 2 группах: *** – $P < 0,001$.

Таблица 2 – Частота аллелей *LEP* в выборках коров костромской породы

Группы	N, голов	Аллели	
		C	T
АО «ПЗ «Каравасво»			
всего в выборке	107	0,687	0,313
1	77	0,688	0,312
2	32	0,703	0,297
ООО «Минское»			
всего в выборке	60	0,667	0,333
1	1	1,000	-
2	59	0,661	0,339
итого по костромской породе			
всего в выборке	167	0,680	0,320
1	78	0,692	0,308
2	91	0,676	0,324

уровне T (0,297). У коров ООО «Минское» так же во второй группе частота аллеля C на встречалась чаще, чем аллель T .

Итого по костромской породе в разрезе разных аллельных вариантов LEP в АО «ПЗ «Каравасово» и ООО «Минское» у генотипированных коров наибольшей частотой отличался аллельный вариант C .

Данные по частоте встречаемости аллелей гена LEP у коров подопытных групп были дополнительно проанализированы с использованием модели «случай-контроль». Поскольку ни одно животное из ООО «Минское» не было отнесено к первой группе, рассчитать отношение шансов для данной популяции не удалось (таблица 3).

Анализ данных таблицы 3 показал, что отношение шансов носительниц аллелей LEP^C и LEP^T попасть в группу с субклиническим кетозом распределяется почти поровну – 0,93:1,07 среди коров АО «ПЗ «Каравасово» (ДИ 0,59-1,47), как и в целом по костромской породе без учета хозяйства – 1,08:0,92 (ДИ 0,79-1,48). Таким образом, гипотеза о более низком риске возникновения кетоза у носительниц аллельного варианта LEP^T в нашем случае не нашла статистического подтверждения.

Было проведено сравнение содержания кетоновых тел в крови коров с разными генотипами по гену LEP (таблица 4).

Анализ данных таблицы 4 показывает практически полное отсутствие статисти-

Таблица 3 – Модель «случай-контроль» по количеству носителей аллельных вариантов гена LEP в первой и второй опытных группах

Аллель <i>LEP</i>	Группа		Всего
	1	2	
АО «ПЗ «Каравасово»			
<i>C</i>	52,980	22,496	73,509
<i>T</i>	24,024	9,504	33,491
Всего	77,000	32,000	107,000
ОШ	2,205	2,367	0,932 (0,589...1,473)
Итого по костромской породе			
<i>C</i>	53,980	61,516	113,560
<i>T</i>	24,024	29,484	53,440
Всего	78,000	91,000	167,000
ОШ	2,247	2,086	1,077 (0,786...1,476)

Примечание: для отношения шансов появления носителей аллеля C оказаться в первой группе к появлению носителей аллеля T – во второй, указан доверительный интервал (ДИ1...ДИ2).

Таблица 4 – Уровень кетоновых тел в крови коров костромской породы разных генотипов LEP

Генотип	АО «ПЗ «Каравасово»		ООО «Минское»		в среднем по породе	
	1	2	1	2	1	2
CC	1,08±0,01	1,62±0,09	0,90	1,62±0,08	1,07±0,01	1,59±0,05
CT	1,09±0,01	1,91±0,31	-	1,81±0,15	1,08±0,01	1,82±0,14
TT	1,09±0,03	1,60±0,00	-	1,64±0,05	1,09±0,03	1,63±0,04

ческие значимых различий по концентрации кетоновых тел в крови между носителями различных генотипов *LEP* из первой группы. В то же время, среди животных второй группы из АО «ПЗ «Каравасово» наибольший уровень кетоновых тел в крови наблюдался у гетерозиготных животных (*LEP^{CT}*), тогда как носители гомозиготных генотипов *CC* и *TT* по данному показателю почти не различались между собой. Аналогичная тенденция наблюдалась во второй выборке коров из ООО «Минское», но ни в одном из хозяйств разница между гетерозиготными коровами и их гомозиготными сверстницами не была статистически значимой.

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий между средними показателями концентрации кетоновых тел в крови коров разных генотипов *LEP*, коэффициент вариации (*Cv*) в группах коров с «нормальным» уровнем кетоновых тел колебался в пределах 5,3-7,3%, тогда как группы коров с субклиническим кетозом характеризовались высоким *Cv* – от 19,6 до 62,9%, причем наибольшая дисперсия наблюдалась среди гетерозиготных (*LEP^{CT}*) животных (*Cv*=45,4%... 62,9%). Высокая изменчивость концентрации кетоновых тел в крови гетерозиготных животных свидетельствует о значимом действии других факторов на данный признак.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Исследуемая популяция коров костромской породы характеризуется низким распространением генотипа *TT* полиморфизма *LEP R25C* (0,078) при соблюдении генного равновесия.

Среди коров АО «ПЗ «Каравасово» с повышенным уровнем кетоновых тел в крови на 2,84% меньше носителей генотипа *TT*, чем среди животных с «нормальной» концентрацией кетонов ($P<0,001$), но статистически значимой связи между наличием аллеля *T* в генотипе и риском заболевания кетозом не обнаружено.

В группе коров с повышенным уровнем кетоновых тел в крови АО «ПЗ «Каравасово» на 2,72% больше гетерози-

готных животных по гену лептина, чем в группе с «нормальной» концентрацией кетонов ($P<0,001$). При этом в стадах обоих хозяйств, у гетерозиготных животных, отнесенных к группе с субклиническим кетозом, наблюдался наивысший средний показатель концентрации кетонов в крови при наибольшем коэффициенте вариации (*Cv*=51,6%), что говорит о выраженном влиянии других генетических факторов.

Таким образом, роль полиморфизма *LEP R25C* в предрасположенности коров к заболеванию кетозом на данной выборке животных не была установлена, что возможно дополняется влиянием других факторов, данные гипотезы необходимо проверить на большей выборке и на других породах крупного рогатого скота. Эти данные могут быть использованы для проведения таких поисковых исследований, как например, изучение комплексных генотипов генов, обуславливающих предрасположенность крупного рогатого скота к кетозу.

THE ROLE OF *LEP R25C* POLYMORPHISM IN THE SUSCEPTIBILITY OF COWS TO KETOSIS

Sabetova K.D.* – Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Laboratory of Genetics and DNA Technologies (ORCID 0000-0003-3282-4779); **Lemyakin A.D.** – Livestock Breeder of the Regional Information and Breeding Center (ORCID 0000-0002-7737-6351); **Chaitskiy A.A.** – Candidate of Biological Sciences, Lecturer at the Department of Private Animal Science, Breeding and Genetics (ORCID 0000-0002-5853-3809); **Schiogolev P.O.** – Candidate of Agricultural Sciences, Livestock Breeder of the Regional Information and Breeding Center (ORCID 0000-0003-3552-8457); **Metlyayev N.Yu.** – Postgraduate Student of the 2st years 1.5.17. Parasitology (ORCID 0009-0002-5696-1567); **Badanina L.S.** – Master's Student of the 2st year of 36.04.02 Zootechnics (ORCID 0000-0002-1286-3714); **Dudikhin A.S.** – Postgraduate Student of the 3st years of 4.2.1. Animal Pathology, Morphology, Physiology, Pharmacolo-

gy and Toxicology (ORCID 0009-0008-2658-0441); **Kochueva N.A.** – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Internal Non-Communicable Diseases, Surgery and Obstetrics (ORCID 0000-0002-6637-4924).

FSBEI HE Kostroma SAA

* kseniyasabetova@mail.ru

Financing: The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-76-00006, <https://rscf.ru/project/22-76-00006/>.

ABSTRACT

In conditions of intensification of the dairy cattle industry, persistent stress of metabolic processes in the cow's body can lead to metabolic disorders and the development of ketosis. Scientists have established the genetic susceptibility of cows to ketosis. The available data allow us to consider the leptin gene (LEP) as one of the candidate genes. The purpose of the study is to carry out an associative analysis of the predisposition to ketosis of Kostroma cows of different genotypes according to the leptin gene. The research was carried out in 2022-2023 yy on clinically healthy and highly productive fresh cows of third lactation and higher of the kostroma breed (n=167) in pedigree farms of the Kostroma region. In animals in the postpartum period, the content of ketone bodies in the blood was determined by express method and the RT-PCR genotypes were determined by the R25C locus of the LEP gene. Groups of cows were formed depending on the content of ketone bodies in the blood: 1st – 0-1.2 mmol/l (healthy), 2nd – above 1.2 mmol/l (subclinical ketosis). It was found out that among the experimental cows of the Kostroma breed, the CT genotype is characterized by the highest frequency. The almost complete absence of differences in the concentration of ketone bodies in the blood between carriers of different LEP genotypes from group 1 was determined. At the same time, among the animals of the 2nd group, the highest level of ketone bodies in the blood was observed in hetero-

zygous animals, whereas carriers of the CC and TT genotypes did not differ from each other in this indicator. Heterozygous animals classified as subclinical ketosis had the highest average ketone concentration in the blood with the highest coefficient of variation (Cv=51.6%), which indicates a pronounced influence of other genetic factors. Thus, the role of LEP R25C polymorphism in the predisposition of cows to ketosis disease has not been established in this sample of animals, but may be supplemented by the influence of other factors, these hypotheses need to be tested in a larger sample and in other breeds of cattle. These data can be used to conduct such exploratory studies, such as the research of complex genotypes of genes that cause predisposition of cattle to ketosis.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гусев, А.Ю. Состояние и перспективы развития отрасли молочного скотоводства / А.Ю. Гусев, К.С. Терновых, А.Л. Маркова // Теория и практика инновационных технологий в АПК: Материалы национальной научно-практической конференции, Воронеж, 19–21 апреля 2022 года. Том Часть II. – Воронеж: Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I, 2022. – С. 439-449.
2. Иль, Е.Н. Выявление нарушений обмена веществ у высокопродуктивных коров / Е.Н. Иль, М.В. Заболотных // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 2. – С. 83-89.
3. Симонова, Л.Н. Эффективность диагностики и разных способов лечения кетоза у коров / Л.Н. Симонова // Актуальные проблемы ветеринарии и интенсивного животноводства : Материалы национальной научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти доктора биологических наук, профессора Е.П. Ващекина, Заслуженного работника Высшей школы РФ, Почетного работника высшего профессионального образования РФ, Почетного гражданина Брянской области, Брянск, 22 января 2021 года. Том Часть I. – Брянск: Брянский государственный аграрный университет, 2021. – С. 172-177.

4. Кашеев, А.А. Кетоз как зоотехническая и ветеринарная проблема высокопродуктивного молочного скотоводства / А.А. Кашеев, А.Н. Котова, Ю.А. Шевкун // Научные проблемы производства продукции животноводства и улучшения ее качества: Материалы XXIX научно-практической конференции студентов и аспирантов, Брянск, 20–23 мая 2013 года. – Брянск: Брянская государственная сельскохозяйственная академия, 2014. – С. 81–84.
5. Huang, H. Genome-wide association study identifies energy metabolism genes for resistance to ketosis in Chinese Holstein cattle. / H. Huang, J. Cao, Q. Hanif, Y. Wang, Y. Yu, S. Zhang, Y. Zhang // *Animal Genetics*. – 2019. – №50(4). – P.376–380. – doi: 10.1111/age.12802. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31179571.
6. Якушева, Л.И. Связь полиморфизмов R25C и A80V гена лептина быков-производителей с оценкой их дочерей на предрасположенность к возникновению кетоза / Л.И. Якушева, А.А. Абрамов, Н.В. Ковалюк, В.Ф. Сапук // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 24–27. – DOI 10.34617/y47d-6h82.
7. Ковалюк, Н.В. Связь полиморфизмов гена лептина с предрасположенностью крупного рогатого скота к кетозу / Н.В. Ковалюк, Л.И. Якушева, Е.В. Кузьмина, Е.В. Ширяева, А.А. Абрамов, М.П. Семененко // *Генетика и разведение животных*. – 2020. – № 3. – С. 20–26. – DOI 10.31043/2410-2733-2020-3-20-26.
8. Соколова, О.В. Генетическая предрасположенность к кетозу у крупного рогатого скота: современное состояние / О.В. Соколова, М.В. Быгов, А.И. Белоусов, Н.А. Безбородова, В.Д. Зубарева, Н.А. Мартынов, О.С. Зайцева, И.А. Шкуратова // *Генетика*. – 2023. – Т. 59, № 3. – С. 294–307. – DOI 10.31857/S0016675823030116.
9. Nayeri, S. Genome-wide association analysis for β -hydroxybutyrate concentration in Milk in Holstein dairy cattle / S. Nayeri, F. Schenkel, A. Fleming, V. Kroezen, M. Sargolzaei, C. Baes, A. Cánovas, J. Squires, F. Miglior // *BMC Genetics*. – 2019. – V. 20. – № 58. – P. 1–17. – DOI: 10.1186/s12863-019-0761-9
10. Щеголев, П.О. Связь полиморфизма гена лептина (LEP) с хозяйственно полезными признаками крупного рогатого скота / П.О. Щеголев, К.Д. Сабетова, А.А. Чаицкий, А. Сорокина // *Аграрный вестник Черноземья*. – 2021. – № 1(1). – С. 25–32. – DOI 10.52025/2712-8679_2021_01_25.
11. Лемякин, А.Д. Воспроизводительная способность коров отечественных молочных пород с различными аллельными вариантами гена лептина / А.Д. Лемякин, А.Н. Тяжченко, К.Д. Сабетова, А.А. Чаицкий, П.О. Щеголев, А.А. Королев // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. – 2022. – Т. 23, № 6. – С. 884–895. – DOI 10.30766/2072-9081.2022.23.6.884-895.
12. Brickell, J.S. Polymorphisms in the bovine leptin gene associated with perinatal mortality in Holstein-Friesian heifers / J.S. Brickell, G.E. Pollott, A.M. Clempson, N. Otter, D.C. Wathes // *Journal of Dairy Science*. – 2010. – №93. – P. 340–347.
13. Banos, G. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows / G. Banos, J.A. Woolliams, B.W. Woodward, A.B. Forbes, M.P. Coffey // *Journal of Dairy Science*. – 2008. – №91. – P.3190–3200.
14. Гайнутдинова, Э.Р. Влияние полиморфизма гена лептина (LEP) на молочную и мясную продуктивность коров-первотелок голштинской породы / Э.Р. Гайнутдинова, Н.Ю. Сафина, Ш.К. Шакиров, М.И. Варламова // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. – 2021. – Т. 245, № 1. – С. 24–28. – DOI 10.31588/2413-4201-1883-245-1-24-28.
15. Чиждова, Л.Н. Полиморфизм гена лептина у коров молочного направления продуктивности / Л.Н. Чиждова, Л.В. Кононова, Г.Н. Шарко, Г.П. Ковалева // *Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства*. – 2017. – Т. 2. – № 10. – С. 113–117.

REFERENCES

1. Gusev, A.Yu. The state and prospects of development of the dairy cattle industry / A.Yu. Gusev, K.S. Ternov, A.L. Markova // Theory and practice of innovative technologies in agriculture: Proceedings of the National Scientific and Practical Conference, Voronezh, April 19-21, 2022. Volume Part II. – Voronezh: Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I, 2022. – pp. 439-449. (In Russ.)
2. Il, E.N. Identification of metabolic disorders in highly productive cows / E.N. Il, M.V. Zabolotnykh // Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy. – 2019. – No. 2. – pp. 83-89. (In Russ.)
3. Simonova, L.N. The effectiveness of diagnosis and different methods of treatment of ketosis in cows / L.N. Simonova // Actual problems of veterinary medicine and intensive animal husbandry : Materials of the national scientific and practical conference with international participation dedicated to the memory of Doctor of Biological Sciences, Professor E.P. Vashchekin, Honored Worker of Higher Education of the Russian Federation, Honorary Worker of Higher Professional Education of the Russian Federation, Honorary Citizen of the Bryansk region, Bryansk, January 22, 2021. Volume Part I. – Bryansk: Bryansk State Agrarian University, 2021. – pp. 172-177. (In Russ.)
4. Kashcheev, A.A. Ketosis as a zootechnical and veterinary problem of highly productive dairy cattle breeding / A.A. Kashcheev, A.N. Kotova, Yu.A. Shevkun // Scientific problems of livestock production and improvement of its quality: Materials of the XXIX scientific and practical conference of students and postgraduates, Bryansk, May 20-23, 2013. – Bryansk: Bryansk State Agricultural Academy, 2014. – pp. 81-84. (In Russ.)
5. Huang, H. Genome-wide association study identifies energy metabolism genes for resistance to ketosis in Chinese Holstein cattle. / H. Huang, J. Cao, Q. Hanif, Y. Wang, Y. Yu, S. Zhang, Y. Zhang // Animal Genetics. – 2019. – №50(4). – p.376-380. – doi: 10.1111/age.12802. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31179571. (In Engl.)
6. Yakusheva, L.I. The relationship of polymorphisms R25C and A80V of the leptin gene of breeding bulls with the assessment of their daughters for predisposition to ketosis / L.I. Yakusheva, A.A. Abramov, N.V. Kovalyuk, V.F. Satsuk // Collection of scientific papers of the Krasnodar Scientific Center for Animal Science and Veterinary Medicine. – 2019. – Vol. 8. – No. 3. – pp. 24-27. – DOI 10.34617/y47d-6h82. (In Russ.)
7. Kovalyuk, N.V. The connection of polymorphisms of the leptin gene with the predisposition of cattle to ketosis / N.V. Kovalyuk, L.I. Yakusheva, E.V. Kuzminova, E.V. Shiryayeva, A.A. Abramov, M.P. Semenenko // Genetics and animal breeding. - 2020. – No. 3. – pp. 20-26. – DOI 10.31043/2410-2733-2020-3-20-26. (In Russ.)
8. Sokolova, O.V. Genetic predisposition to ketosis in cattle: current state / O.V. Sokolova, M.V. Bytov, A.I. Belousov, N.A. Bezborodova, V.D. Zubareva, N.A. Martynov, O.S. Zaitseva, I.A. Shkuratova // Genetics. - 2023. – Vol. 59, No. 3. – pp. 294-307. – DOI 10.31857/S0016675823030116. (In Russ.)
9. Nayeri, S. Genome-wide association analysis for β -hydroxybutyrate concentration in Milk in Holstein dairy cattle / S. Nayeri, F. Schenkel, A. Fleming, V. Kroezen, M. Sargolzaei, C. Baes, A. Cánovas, J. Squires, F. Miglior // BMC Genetics. – 2019. – V. 20. – № 58. – P. 1-17. – DOI: 10.1186/s12863-019-0761-9. (In Engl.)
10. Shchegolev, P.O. The connection of leptin gene polymorphism (LEP) with economically useful signs of cattle / P.O. Shchegolev, K.D. Sabetova, A.A. Chaitsky, A. Sorokina // Agrarian bulletin of the non-Chernozem region. – 2021. – № 1(1). – Pp. 25-32. – DOI 10.52025/2712-8679_2021_01_25. (In Russ.)
11. Lemyakin, A.D. Reproductive ability of cows of domestic dairy breeds with various allelic variants of the leptin gene / A.D. Lemyakin, A.N. Tyazhchenko, K.D. Sabetova, A.A. Chaitsky, P.O. Shchegolev, A.A. Korolev // Agrarian science of the Euro-North-East. – 2022. – Vol. 23, No. 6. – pp. 884-895. – DOI 10.30766/2072-9081.2022.23.6.884-895. (In Russ.)
12. Brickell, J.S. Polymorphisms in the bovine leptin gene associated with perinatal mortality

- in Holstein-Friesian heifers / J.S. Brickell, G.E. Pollott, A.M. Clempson, N. Otter, D.C. Wathes // *Journal of Dairy Science*. – 2010. – №93. – P. 340-347. (In Engl.)
13. Banos, G. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows / G. Banos, J.A. Woolliams, B.W. Woodward, A.B. Forbes, M.P. Coffey // *Journal of Dairy Science*. – 2008. – №91. – P.3190-3200. (In Engl.)
14. Gainutdinova, E.R. Influence of leptin gene polymorphism (LEP) on dairy and meat productivity of Holstein heifer cows / E.R. Gainutdinova, N.Y. Safina, Sh.K. Shakirov, M.I. Varlamova // *Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman*. - 2021. – Vol. 245, No. 1. – pp. 24-28. – DOI 10.31588/2413-4201-1883-245-1-24-28. (In Russ.)
15. Chizhova, L.N. Polymorphism of the leptin gene in dairy cows / L.N. Chizhova, L.V. Kononova, G.N. Sharko, G.P. Kovaleva // *Collection of scientific papers of the All-Russian Scientific Research Institute of Sheep and Goat breeding*. - 2017. – vol. 2. – No. 10. – pp. 113-117. (In Russ.)