УДК 619:616-097.3

*Машеро В.А., *кандидат ветеринарных наук, доцент*
**Михайлова М.Е., *кандидат биологических наук, доцент*
***Красочко П.А., *доктор ветеринарных наук, профессор*
**Белая Е.В., *аспирант*

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь*
***ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь*

ДНК-ДИАГНОСТИКА ВРОЖДЕННЫХ ИММУННЫХ ДЕФИЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ГЕННЫМИ МУТАЦИЯМИ

Современные молекулярно-генетические методы ДНК-диагностики играют важную роль в оценке особей по выявлению наследственных дефектов (ДНК-диагностика иммунодефицита КРС по гену BLAD). Установлено, что нетель, доставленная из Венгрии и ее приплод в количестве 2 телят, бык «Ребус» и молодняк от него, унаследовали мутации в гене CD18 (гетерозиготный генотип TL/BL). При исследовании иммунологических показателей крови носителей мутации BLAD отклонений не установлено, что подтверждает данные о том, что фенотипически болезнь проявляется только у гомозиготных по мутантному гену особей (рецессивный гомозиготный генотип BL/BL). Поскольку животные с гетерозиготным генотипом TL/BL являются скрытыми носителями мутации, необходимо индивидуально подходить к их использованию, а именно, при подборе родительских пар исключить возможность получения рецессивных BL/BL — гомозигот. Разработанная ДНК-диагностика выявила носителей гена BLAD иммунодефицита крупного рогатого скота в Республике Беларусь, что позволило избежать распространения гомозиготных по мутантному гену особей (рецессивный гомозиготный генотип BL/BL) среди продуктивного поголовья страны.

Modern malecularis-genetic methods of DNC-diagnostics play the important role in an estimation of individuals on revealing hereditary defects (DNC-diagnostics of immunodeficiency bovine on gene BLAD). It is established, that нетель, delivered of Hungary and iher issue in quantity 2 calfe, the bull "Rebus" and young growth from himit, have inherited mutations in gene CD18 (heterozygoty genotype TL/BL). At research immunology parameters of blood of carriers of mutation BLAD of deviations it is not established, that confirms the data that fenotypis illness is shown only at homozygous individuals on a mutant gene (recesive homozygous genotype BL/BL). As animals with heterozygoty genotype TL/BL are the latent carriers of a mutation, it is necessary to approach individually to their use, namely, at selection of parental pairs to exclude an opportunity of reception рецессивных BL/BL - gomozygoty. Developed DNC-diagnostics has revealed carriers of gene BLAD of an immunodeficiency of large horned livestock in Byelorussia, that has allowed to avoid distribution of homozygous individuals on a mutant gene (recesive homozygous genotype BL/BL) among a productive livestock of the country.

У сельскохозяйственных животных в зависимости от того, какого компонента иммунной системы не хватает или он слабо активен, иммунные дефициты делят на следующие виды: недостаточность клеточного иммунитета (Т-системы лимфоцитов); недостаточность гуморального иммунитета (В-системы лимфоцитов); недостаточность системы фагоцитов (макро- и микрофагов); недостаточность системы комплемента; комбинированная иммунная недостаточность. На фоне иммунной недостаточности могут появляться желудочно-кишечные, респираторные, септические, кожные и аутоиммунные болезни, а также может увеличиваться возможность появления опухолей.

Врожденные иммунные дефициты возникают вследствие генетически детерминированной неспособности организма животного реализовать иммунный ответ. Они, как правило, связаны с наследственно обусловленной неспособностью к полноценному иммунному ответу. В организме таких животных возникают морфологические функциональные расстройства клеточного и гуморального иммунитета на различных этапах развития популяций Т- и В-лимфоцитов, макро- и микрофагов, образования иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента [1].

Приобретенные иммунные дефициты развиваются при нарушениях кормления, тяжелых заболеваниях органов пищеварения, выделения, дыхания, кожи, радиоактивном облучении, длительном воздействии лекарственных веществ (иммунодепрессантов, антибиотиков, сульфаниламидов, нитрофуранов и др.) обширной хирургической травме, лейкозах, опухолях, многих инвазиях и инфекциях. Способствует развитию иммунной недостаточности дефицит в рационах белков, незаменимых аминокислот, витаминов А, Е, С и группы В, микроэлементов: железа, меди, кобальта, цинка, селена, йода и др.

Возрастные иммунные дефициты чаще встречаются в раннем и старческом возрасте. Иммунная недостаточность у новорожденного молодняка возникает при дефиците в молозиве лейкоцитов и иммуноглобулинов, несвоевременном его поступлении, нарушении усвоения защитных факторов молозива при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. На 2-3-й неделе жизни у молодняка может развиваться возрастной иммунный дефицит, обусловленный повышенным расходованием колостральных защитных факторов и недостаточностью собственного иммунопоэза. При хороших условиях кормления и содержания этот дефицит слабо выражен и может быть сдвинут на более позднее время. Возрастной иммунный дефицит возникает в период отъема при резком переводе молодняка на дефинитивный (обычный) корм. Вследствие кормового стресса истощаются механизмы местной и общей защиты, нарушается образование секреторного иммуноглобулина А. Ведущим в развитии возрастных иммунных дефицитов является недостаточность гуморального иммунитета. Если приобретенная иммунная недостаточ-ность связана только с потерей иммуноглобулинов и лейкоцитов, она бывает проходящей. В тех случаях, когда она обусловлена и поражением иммунной системы, особенно ее центральных органов (костного мозга и тимуса), приобретенный иммунный дефицит бывает стойким. Этот иммунный дефицит может возникнуть в любом звене системы иммунитета: Т- и В-лимфоцитарном, макро- и микрофагальном и комплементном. Он может касаться как общего, так и местного иммунитета.

Приобретенные иммунные дефициты, обусловленные потерей защитных факторов и структурными изменениями в иммунной системе, ведут к развитию повторных желудочно-кишечных, респираторных и других болезней. В крови при этом понижен уровень лимфоцитов, эозинофилов и иммуноглобулинов [2].

Достижения науки в изучении генома животных и разработка новых методов молекулярно-генетического анализа предоставили практическую возможность использования ДНК-маркеров в выявлении гена иммунного дефицита животных.

Тестирование генома значительно упростилось с появлением метода амплификации фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полиморфные последовательности ДНК используют для оценки генетической структуры популяций, диагностики наследственных и инфекционных заболеваний, для ускорения решения селекционных задач с помощью генетических маркеров MAS (marker assisted selection – селекция с помощью маркеров). ДНК-маркеры – это аллельные варианты генов, напрямую или косвенно связанные с продуктивными и адаптационными признаками животных, с устойчивостью или восприимчивостью к заболеваниям. Выявление предпочтительных с точки зрения селекции вариантов таких генов позволяет дополнительно к традиционному отбору животных, например, по содержанию жира в молоке, по уровню удоя и т.п., проводить селекцию по генотипу.

Ранее в основном генотип животных оценивали по полиморфным вариантам белков или изоферментам. Но анализ генотипов животных по маркерам полиморфных белков

ограничивается экспрессирующими генами кодирующих областей генома, то есть полиморфизм молочных белков можно оценить только у лактирующих коров. ДНК-маркеры позволяют идентифицировать генотипы животных любого возраста и пола и оценить полиморфизм некодирующих участков генома, в том числе и регуляторных [3,4].

Таким образом, современные молекулярно-генетические методы ДНК-диагностики играют важную роль в оценке особей по выявлению наследственных дефектов (ДНК-диагностика иммунодефицита КРС по гену *CD18* (BLAD).

BLAD — это болезнь дефекта иммунной системы (бычий дефицит лейкоцитарной адгезии). Так как молекулярной основой BLAD является точковая замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК *CD18*, что приводит к аминокислотной замене в молекуле белка (вместо аспарагиновой кислоты синтезируется глицин). В результате точковой мутации *CD18* нарушается вся цепочка экспрессии β-интегрина, поверхностного белка нейтрофилов (разновидность лейкоцитов) и как результат этого лейкоциты теряют активность и неспособны выполнять защитную фагоцитарную функцию [4,5].

Проявление иммунодефицита или BLAD-синдрома:

- Животные с мутантным аллелем (гетерозиготный генотип ***TL/BL***) — здоровые, но являются скрытыми носителями мутации.

- Болезнь фенотипически проявляется только у гомозиготных по мутантному гену особей (рецессивный гомозиготный генотип ***BL/BL***).

- Больные животные имеют замедленный рост, тусклую взъерошенную шерсть, язвы в ротовой полости, шаткость зубов, а из-за низкой резистентности и нарушения иммунитета телята гибнут в 2-7 месячном возрасте от инфекционных болезней (диарея, пневмония и др.).

Впервые это заболевание, сопровождающееся большой потерей телят от инфекций обнаружили при исследовании прямых потомков знаменитых американских быков – родоначальников голштинской породы: Осборндэйла Айвенго, Карлин М.Айвенго Белл, Пайсент Айвенго Стар. В США в 1992 г. носителями BLAD-синдрома было 15,6 % быков и 6 % маточного поголовья, а экономический ущерб был оценен в 5 млн. долларов. Интересно, что Япония буквально за 4 года (1992-1996 гг.) после проведения ДНК-диагностики иммунодефицита снизила частоту встречаемости мутации BLAD с 13,4 до 0,31 % [4]. В Россию и Украину BLAD был завезен с потомками его внука — Айвенго Белла [1,4-8]. Научных данных о распространении BLAD в Беларуси – очень мало, но так как в животноводстве республики используется искусственное осеменение, закупаемой за рубежом спермой и завозятся быки-производители, несомненно, что ситуацию по распространению мутации BLAD следует держать под контролем.

Единственным существующим к настоящему времени методом, позволяющим безошибочно выявить носительство мутаций, является ДНК-диагностика.

Генетический полиморфизм аллельных вариантов гена *CD18* представлен двумя аллелями: TL и BL. Идентифицированы генотипы TL/BL (здоровые животные, свободные от мутации) и TL/BL (гетерозиготный генотип животных – носители мутации).

Целью наших исследований явилось ДНК-диагностика наследственного заболевания крупного рогатого скота, обусловленного точковой мутацией в гене CD18 (врожденный иммунодефицит).

Материалы и методы.

Выделение ДНК из спермы быков-производителей, цитрированной крови крупного рогатого скота проводится фенольно-хлороформовым методом и в дальнейшем исследуется

по полиморфизму длин рестриктных фрагментов (ПДРФ) методом амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3].

Для амплификации фрагмента гена *CD18* (BLAD) использовали праймеры [5]:

BLAD-1: 5′- TGA GAC CAG GTC AGG CAT TGC GTT CA- 3′,

BLAD –2: 5′-CCC CCA GCT TCT TGA CGT TGA CGA GGT C- 3

ПЦР проводят в амплификаторе в конечном объеме 25 мкл в следующем режиме: «горячий старт» - 3 мин 93° С. Затем 35 циклов амплификации в режиме: 93° С – 1 мин-денатурация; 62° С – 1 мин – отжиг праймеров; 72° С – 1,5 мин – синтез. Элонгация — 5 мин при 72° С.

Амплификаты подвергаются рестрикции эндонуклеазой TagI. Рестриктаза расщепляет исследуемую ДНК на определенное количество фрагментов фиксированной длины. Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле. Если ДНК расщепляется рестриктазой на два фрагмента длиной 71 и 61 пн относительно маркера — мутация отсутствует, анализируемое животное свободно от мутации (гомозиготный генотип TL/TL). Вследствие точковой мутации в структуре ДНК происходят изменения, например, замена одного основания на другое, и при этом исчезает сайт узнавания для рестриктазы, то на электрофореграмме визуализируется одна яркая полоса длиной 132 пн, анализируемое животное диагностируется как больная особь, у которой проявляются признаки иммунодефицита, так называемый BLAD-синдром (гомозиготный генотип BL/BL). У скрытого носителя иммунодефицита, т.е. у особи с гетерозиготным генотипом TL/BL присутствуют два аллеля – нормальный (N аллель) и аллель, поврежденный мутацией (B аллель) и на электрофореграмме гетерозигота TL/BL имеет три полосы длиной 132, 71 и 61пн (Рисунок 1).

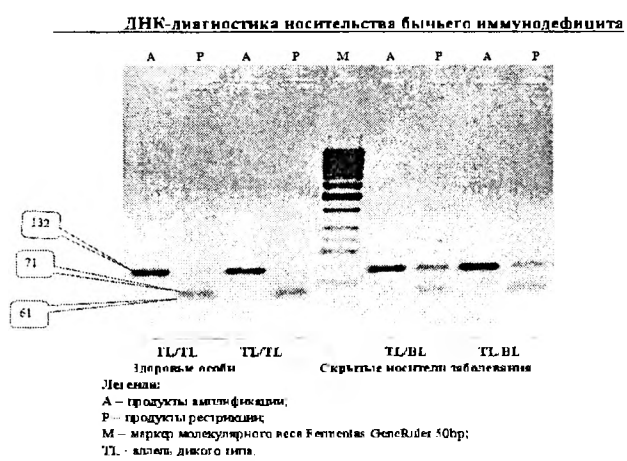

Рисунок 1 - Фореграмма продуктов амплификации и рестрикции в 2% агарозном геле по гену *CD18* (BLAD)

Помимо «исчезновения» сайта узнавания для определенных рестриктаз, в некоторых случаях вследствие мутации, в гене может возникнуть дополнительный сайт для рестриктаз. Молекулярной основой BLAD является точковая замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК CD18, что приводит к аминокислотной замене в молекуле белка (вместо аспарагиновой кислоты синтезируется глицин). Такая точковая мутация приводит к исчезновению сайта рестрикции для TagI и появлению дополнительного сайта для HaeIII [3,4]

(табл. 1). Рестрикционный анализ амплифицированного продукта, содержащего участок с нуклеотидной заменой, позволяет различить животных с нормальным генотипом и носителей мутантного BLAD-аллеля.

Таблица 1 - Схема определения генотипа крупного рогатого скота по точковой мутации в гене *CD18* после гидролиза амплификата эндонуклеазами TagI и HaeIII по длине рестрикционных фрагментов

Генотип по гену *CD18*	Длина фрагментов после рестрикции рестриктазами (пн)	
	TagI	HaeIII
TL/TL (нормальный генотип)	71, 61	87, 45
TL/BL (скрытый носитель BLAD-аллеля)	132, 71, 61	87, 68, 45, 19
BL/BL (генотип с BLAD-аллелями)	132	68, 45, 19

Результаты исследований.

Обмен генетическим материалом между разными странами сопровождается распространением различных заболеваний, вызываемых редкими мутациями, возникающими у выдающихся представителей коммерческих пород черно-пестрого скота. ДНК-диагностика BLAD рассматривается как хорошая модель эффективного контроля заболеваний крупного рогатого скота (КРС), вызванных генетическими нарушениями (точковая мутация в кодирующей части гена CD18 и имеющей аутосомно-рецессивный характер наследования). Проведено ДНК-тестирование на носительство мутации BLAD быков-производителей в областных племенных предприятиях: РУП «Витебское племпредприятие», РУП «Минское племпредприятие» и РУП «Гомельплемпредприятие», телят с комплекса по откорму крупного рогатого скота ЗАО «Липовцы» Витебского района с различным иммунным статусом, коров РУСП «Племзавод «Мухавец» Брестского района различного происхождения, как закупленных в Венгрии, так и собственного разведения от коров закупленных в Германии. Также проводили исследование дочерей быка Ребус (РУП «Витебское племпредприятие») в СПК «Калиновый Лог» Талочинского района, где использовалась сперма данного быка. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Анализ генетической структуры популяций крупного рогатого скота в Беларуси по локусу *CD18* (BLAD)

Принадлежность	Количество особей (n)	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей, %, + ошибка	
		TL/TL	TL/BL	*BL/BL*	TL	BL
РСУП «Витебск племпредприятие»	117	99.15	0,85	–	99,57±0,011	0.43±0.011
РСУП « Минское племпредприятие»	87	97.7	2.3	–	98.85±0.006	1.15±0.006
РУП «Гомельплемпредприятие»	89	97.75	2.25	–	98.88±0.011	1.12±0.011
ЗАО «Липовцы» Витебского района	120	95.84	4.16	–	97.92±0.013	2.08±0.013
СПК «Калиновый Лог» Талочинского района	20	65.0	35.0	–	82.5±0.085	17.5±0.085
ГУСП «Племзавод «Мухавец» Брестского района	80	96.25	3.75	–	98.125±0.015	1.875±0.015
среднее	513	91.9	8.05	–	95.97	4.03

В результате проведенных нами исследований быков-производителей РУСП «Несвижский филиал Минского племпредприятия» выявлен носитель мутации BLAD. Это бык Милан отечественной черно-пестрой породы. В Витебском племпредприятии также выявлен скрытый носитель мутации BLAD — бык «Ребус». Это представители линии Монтвик Чифгейна.

Прослежена родословная быка Милана, ведущего свое происхождение от знаменитого предка Карлин М.Айвенго Белл, носителя мутации BLAD (рис. 2). Построена генеалогическая схема линии Карлин М.Айвенго Белл, из которой следует, что современные потомки, в родословной которых присутствуют линии Лаусон, Вендег, Самуэл, должны обязательно подвергаться ДНК-диагностике на носительство мутации BLAD (рис. 3).

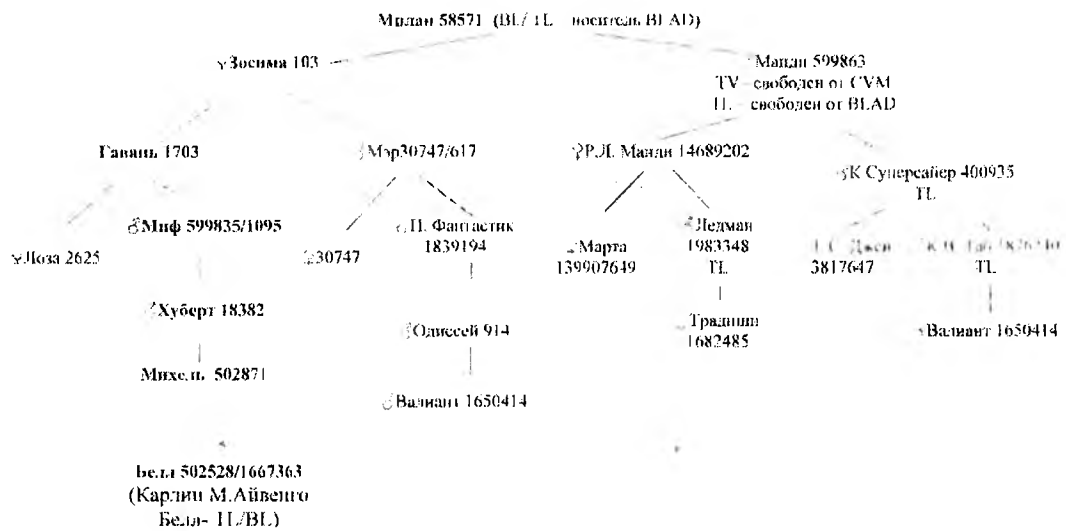

Рисунок 2 – Генеалогическая схема передачи аллеля BLAD быку Милану от знаменитого американского предка Карлин М.Айвенго Белл (TL/BL)

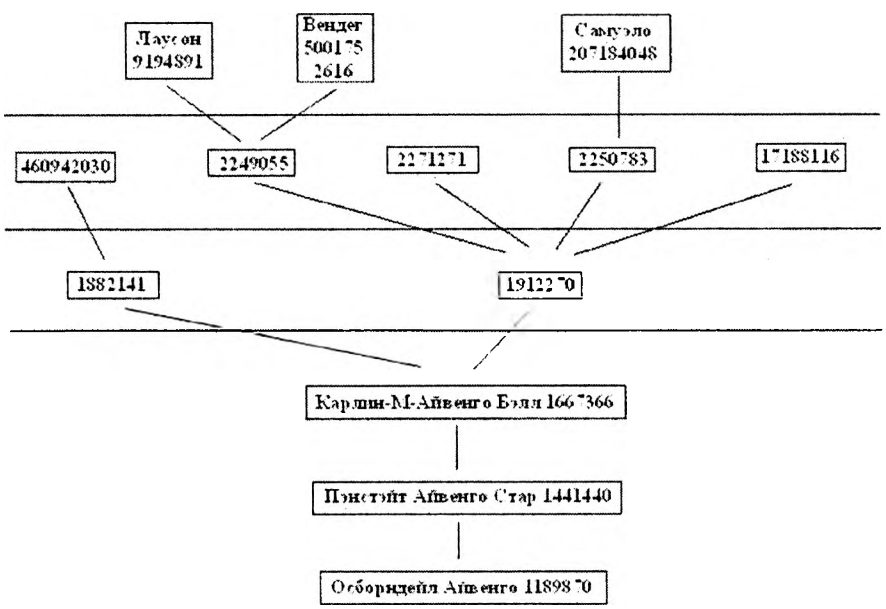

Рисунок 3 – Генеалогическая схема линии Карлин М.Айвенго Белл 1667366

В результате проведенных исследований было установлено, что нетель, доставленная из Венгрии и ее приплод в количестве 2 телят, бык «Ребус» и молодняк от него, унаследовали мутации в гене CD18 (гетерозиготный генотип TL/BL). При исследовании иммунологических показателей крови носителей мутации BLAD отклонений не установлено, что подтверждает данные о том, что фенотипически болезнь проявляется только у гомозиготных по мутантному гену особей (рецессивный гомозиготный генотип BL/BL). Таким образом, выявлены животные — носители мутации в гене CD18 (гетерозиготный генотип TL/BL). В СПК «Калиновый Лог» из 20 телят, рожденных от быка «Ребус» у 7-ми диагностировали мутацию BLAD. Также было установлено большое непроизводительное выбытие телят от быка «Ребус» в раннем возрасте. Телята пали по причине врожденного иммунодефицита, обусловленного гомозиготным генотипом BL/BL, которые элиминированы естественным отбором. Поскольку животные с гетерозиготным генотипом TL/BL являются скрытыми носителями мутации, необходимо индивидуально подходить к их использованию, а именно, при подборе родительских пар исключить возможность получения рецессивных BL/BL — гомозигот. Анализ генеалогической схемы линии Карлин М.Айвенго Белл, показал, что современные потомки, в родословной которых присутствуют линии Лаусон, Вендег, Самуэл, должны обязательно подвергаться ДНК-диагностике на носительство мутации BLAD. Разработанная ДНК-диагностика выявила носителей гена BLAD иммунодефицита крупного рогатого скота в Республике Беларусь, что позволило избежать распространения гомозиготных по мутантному гену особей (рецессивный гомозиготный генотип BL/BL) среди продуктивного поголовья страны. Наличие носителей мутации BLAD среди представителей линии Монтвик Чифтейна 95679 должно быть учтено при разработке схем скрещиваний для предотвращения дальнейшего распространении мутации в популяции. В связи с этим всем госплемпредприятиям республики даны соответствующие рекомендации по недопущению распространения генетической мутации BLAD.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency estimation of bovine bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Fresian cattle in Japan / H. Nagata [et al] // J. Vey. Med. Sci. – 1997/ – Vol. 59. – P. 233-238.
2. Карпуть, И. М. Иммунные дефициты: внутренние болезни животных / И.М. Карпуть; науч. ред. Г.Г. Щербаков и А.В. Коробов. – М.: Лань, 2002. – С. 374 – 379.
3. ДНК-технология оценки сельскохозяйственных животных. ВНИИплем, Лесные поляны / Л.А. Калашникова [и др.] – 1999. – 148 с.
4. Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency(BLAD) carriers in in Holstein and brown swiss al bulls in Iran / A. Norouzy [et al] // Генетика. – 2005. – Т. 41, №12. – С. 1697-1701.
5. Identification and prevalence of genetic defect that causes leukocytes adhesion deficiency in Holstein cattle / D.E. Shuster [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – Vol. 89. – P. 9225-9229.
6. Скрининг гена дефицита лейкоцитарной адгезии у черно-пестрого голштинизированного скота / Н.С. Марзанов [и др.]. // Сельхоз. биология. – 2003/ – № 6. – С. 23-36.
7. Глазко, В.И. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / В.И. Глазко, Е.В. Шульга. – Белая Церковь. – 2001. – 487 с.
8. Михайлова, М.Е. ДНК-технологии в животноводстве / М.Е. Михайлова // Наука и инновации. – 2007. – №1 (47). – С. 32-36.