

Оценку доброкачественности мяса проводили по комплексу сенсорной оценки и биохимических исследований, включая аминокислотный состав мышечной ткани. Существенных отличий мяса опытных и контрольных птиц нами не установлено. Отдельные показатели колебались преимущественно в положительную сторону, но все они укладывались в нормы, характеризующие доброкачественность мяса.

Также мы проводили лабораторную оценку доброкачественности мяса кур при хранении в течение одного месяца. По результатам органолептических исследований тушки кур, в рацион которых входил ДАФС-25, не отличались от тушек кур контрольной группы. Так, с поверхности тушки были сухими, в некоторых местах слегка влажные (это связано с оттаиванием и недостаточным высыханием поверхности тушек), бледно-желтого цвета, жировая ткань желтоватого цвета (причем у кур опытной группы степень желтизны более выражена), серозные оболочки блестящие, без признаков плесени и слизи, запах тушек специфический, свойственный дефростированному мясу, мышцы на разрезе слегка влажные, без признаков порчи.

При бактериоскопии мазков отпечатков из мышечной ткани обнаруживаются единичные кокки и палочки, следов распада мышц не отмечалось у кур как опытной, так и контрольной групп. При постановке реакции с реактивом Несслера в мясе кур опытной и контрольной групп не обнаружено аммиака и солей аммония. Во всех образцах мышечной ткани кур обеих групп обнаружена активность фермента пероксидазы. Количество летучих жирных кислот в мясе кур обеих групп было практически одинаковым и соответствовало требованиям ГОСТа для свежего мяса (до 4.5 мг КОН). При химическом исследовании жировой ткани выявлено, что кислотное число жира кур опытной группы было достоверно ниже аналогичного показателя кур контрольной группы на 11,5% ($P < 0.05$), но необходимо отметить, что данный показатель соответствовал требованиям ГОСТа для категории «свежее мясо» как в опытной, так и в контрольной группе кур (до 1 мг КОН).

Перекисное число жира также отвечало требованиям ГОСТ для свежего жира (до 0.01%) как в тушках опытной, так и контрольной групп, причем жир от тушек опытной группы имел перекисное число на 50,0% ($P < 0,01$) ниже, по сравнению с жиром тушек контрольной группы. Концентрация водородных ионов в вытяжке из мяса опытной группы ниже в белом мясе на 0,86% и в красном на 0,99%, по сравнению с вытяжкой мяса контрольной группы.

В заключении можно сказать что применение биологически активных веществ, в частности ДАФС-25 для повышения продуктивности и продление срока рентабельной эксплуатации кур-несушек целесообразно, так как без лишних экономических затрат на выращивание птиц можно получить дополнительную яичную продукцию. При этом не снижается, а по некоторым показателям улучшается качество яиц и мяса кур после их убоя.

Библиографический список:

1. Житенко П.В. Ветеринарно-санитарная экспертиза и технология переработки птицы / П.В. Житенко, И.Г.Серегин, В.С.Никитченко // Учебное пособие. – М.: ООО «Аквариум ЛТД», - 2001. – 252 с.
2. Кочиш И.И. Птицеводство / И.И.Кочиш, М.Г.Петраш, С.Б.Смирнов. - М.: Колос, 2004. - 407 с.
3. Степанов Д.В. практические занятия по животноводству / Д.В.Степанов.- М.: Мир, 2004.- 304с., ил.

УДК 575.224.22:636.4

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МУТАЦИИ С3469Т У СВИНЕЙ

А.М. Орешин, аспирант

тел. 8(8342)351854, oreshin-aleksandr@yandex.ru

Л.П. Тельцов, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8342)25.41.85 agro-inst@adm.mrsu.ru

В.А. Трофимов, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8342)351854, genetikLab@yandex.ru

ГОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева»

Ключевые слова: свинья, лептин, мутация, гены.

Работа посвящена проблеме разработки методов совершенствования существующих и выведения новых высокопродуктивных пород сельскохозяйственных животных.

Введение. Основная стратегия развития свиноводства связана с получением животных с мясом высокого качества и низким содержанием жира. Перспективным геном-кандидатом для оценки «постности» мяса является ген лептина (*ob*), белковый продукт которого гормон лептин участвует в регуляции липидного обмена.

Лептин – это белковый гормон, образуемый преимущественно адипоцитами. Лептин выступает как центральный регулятор массы жира в организме, функционирующий путем снижения количества потребляемой пищи и увеличения расхода энергии. Он также вовлечен в индукцию резистентности к инсулину, что приводит в дальнейшем к модификации метаболических эффектов инсулина [1, 2].

Липидный обмен представляет собой сложный комплекс переплетающихся реакций, находящихся под влиянием различных регуляторных факторов. Ключевая роль лептиновой регуляции липидного обмена на организменном уровне позволяет выявлять четкие ассоциации между наличием различных аллельных вариантов гена лептина и параметрами липидного обмена, связанными с избыточным накоплением жира в подкожной клетчатке [3, 4].

В свиноводстве ген лептина рассматривается как перспективный ген-кандидат для оценки эффективности роста, жирности и использования кормов [5, 6]. Ген, кодирующий лептин, называется геном ожирения [7, 8, 9]. Мутации в гене *ob* вызывают нарушение обмена веществ и приводят к накоплению избыточного веса у свиней. Они характеризуются повышенным отложением липидов в жировой ткани, чрезмерным потреблением пищи, низкой физической активностью, снижением энергетического обмена, нарушением баланса энергии, изменением в сторону увеличения толщины шпика [10, 11]. Однако выявленные мутации в гене лептина не отражают всего разнообразия известных мутаций в этом гене, у хорошо изученных в генетическом плане, организмов человека и мыши. Сведений о влиянии на фенотип свиньи мутаций в гене лептина явно недостаточно, поскольку существуют проблемы в знаниях о геноме этого организма и взаимосвязи мутаций с конкретными фенотипическими признаками. Изучение структурных особенностей и регулируемости гена лептина как элемента генома свиньи и влияние мутаций в гене на фенотип свиньи является актуальным направлением для биологических, сельскохозяйственных наук и практики [12].

Целью исследования являлось изучение структурно-функциональной организации гена лептина и влияние точковой мутации С3469Т на липидный компонент плазмы крови и некоторые показатели жирового обмена у свиней [13]. В задачи исследования входило изучение влияния точковой мутации С3469Т в гене *ob* на липидный компонент плазмы крови и на показатели фенотипа жирового обмена у свиней.

Материалы и методы исследований. Материалом исследования служила периферическая кровь животных. Объектом исследования являлись ядросодержащие клетки крови (моноциты) для дальнейшего молекулярно-генетического анализа, а также свежая плазма крови. В качестве объекта исследования выступала выборка свиней со свиноводческих комплексов агрохолдинга «Талина» РМ. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, которые получали из ядросодержащих клеток (моноциты), выделенных из цельной венозной крови и липиды плазмы крови *Sus scrofa*. Выделение ДНК для проведения ПЦР анализа из образцов крови проводили с использованием набора реактивов «МИНИПРЕП» производства НП АО «Силекс М».

Для анализа точковой мутации использовали ПЦР-анализ с последующим рестрикционным гидролизом образующихся фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Суть метода заключается в амплификации определенного фрагмента ДНК, содержащего анализируемую точковую мутацию, с последующим расщеплением его соответствующей рестрикционной эндонуклеазой. По длине фрагментов (ПДРФ) судили о наличии точковой мутации, гомозиготности или гетерозиготности животных по данному аллелю.

Электрофорез проводили в 30% полиакриламидном геле при 200 В в течение 45 мин. Для обработки результатов анализа электрофореза использовали пакет программ Gel Explorer (Copyright 2000, версия 1.0), содержащий программу Gel Imager, предназначенную для ввода и обработки изображений с устройства видеоввода и программу Gel Analysis, предназначенную для анализа изображений гелей и оценки количества и молекулярной массы нуклеиновых кислот и белков. Липиды выделяли методом Блая-Дайера из свежей не замороженной периферической крови животных, взятой в ранние утренние часы. Липиды фракционировали на силикагелевых пластинах для обращенно-фазной тонкослойной хроматографии. Тонкослойную хроматографию проводили одномерно в системе растворителей гептан: диэтиловый эфир: уксусная кислота (в соотношении по объему). Липиды проявляли фосфорномолибденовой кислотой и идентифицировали с помощью свидетелей и значений величин R_f .

Количественное определение липидов проводилось непосредственно на хроматограммах денситометрическим методом после их проявления 5%-ной фосфорнованилиновой кислотой в этаноле. Молекулярный анализ проводили на денситометре Model GS-670 (BIO-RAD, США) с соответствующим программным обеспечением (Phosphor Analyst/PS Software). Диеновые и триеновые конъюгаты анализировали спектрофотометрическим методом как отношение индекса окисленности диеновых конъюгатов ($IO_{ДК} A232/A215$) и отношение индекса окисленности триеновых конъюгатов ($IO_{ТК} A275/A215$). Определение концентрации малонового диальдегида проводили в свежей плазме крови без гемолиза, в кислой среде и при нагревании, где он реагирует с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием окрашенного триметинового комплекса, регистрируемого спектрофотометрически при 532 нм (Андреева Л.И. и др., 1988). Молекулярное моделирование взаимодействия липидов с ДНК проводили путем расчета методом молекулярной механики MM+ с применением программы HyperChem TM 7.0 Molecular Modeling System фирмы Hypercube (USA).

Результаты исследований и их обсуждение. В результате анализа липидного состава плазмы крови хряков с генотипами ТТ, ТС и СС (ТТ – желательный генотип, ТС – промежуточный генотип, СС – нежелательный генотип) были выявлены отличительные особенности. Общее количество животных в выборке составило 79 хряков. Из них хряки породы «Дюрок» имеют желательный генотип ТТ у 15 животных, промежуточный ТС – у 9 животных и нежелательный СС – у 4 животных. Хряки породы «Ландрас» имеют желательный генотип ТТ у 14 животных, промежуточный ТС – у 7 животных и нежелательный генотип СС – у 4 животных. Хряки породы «Йоркшир» представлены с желательным генотипом ТТ 15 животными, промежуточным ТС – 6 животными и нежелательным генотипом СС – 5 животными. Для хряков генотипа СС следует отнести уменьшение содержания суммарных фосфолипидов на 5,2% для генотипа ТТ и очень малое значение (следы) для генотипа ТС. Наблюдается незначительное увеличение уровня холестерина, увеличение доли эфиров холестерина на 20% и 7,4%, незначительное уменьшение доли триацилглицеролов по отношению к генотипам ТТ и ТС соответственно. Выявлено снижение уровня диацилглицеролов на 4,3% для генотипа ТТ и следы диацилглицеролов в крови хряков с генотипом ТС. Уменьшение содержания свободных жирных кислот на 4,8% и их следы для генотипа ТС, уменьшение фосфолипидов на 14,7% и 10,5% по отношению с генотипами ТТ и ТС соответственно (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание липидов (%) в плазме крови свиней

Липиды, %	Генотип		
	ТТ	ТС	СС
ДАГ	4,26±1,09	0,1±0,02***	следы
ЭХС	17,69±0,84	30,36±1,86***	37,71±1,38***
ТГЛ	9,6±0,66	10,27±0,63	8,29±1,73
СЖК	5,2±0,91	0,36±0,36***	следы
ХС	22,6± 1,24	23,45±1,38	21,0±3,71
ФСЛ	38,0±1,50	33,82±2,8**	23,29±4,17***

p<0,01, *p<0,001 – к показателю ТТ

(ДАГ – диацилглицеролы; ЭХС – эфиры холестерина; ТГЛ – триацилглицеролы; СЖК – свободные жирные кислоты; ХС – холестерин; ФСЛ – суммарные фосфолипиды).

Липидный обмен в организме находится под множественным регуляторным контролем со многими прямыми и обратными связями регуляции [14]. Поэтому изменение одного из компонентов системы, а в данном случае это касается важнейшего регулятора - гормона лептина, должно неизбежно вести к каскадным изменениям в спектре липидов клеток и тканей. Важнейшей характеристикой липидов является их окисляемость, которая отражает изменение содержания начальных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых и триеновых конъюгатов (Андреева Л.И., 1988). Проведенные опыты по определению индекса окисленности липидов показали, что индекс окисленности диеновых конъюгатов для генотипа СС составляет 1,0, что на 59% и 69,7% превышает значения для животных с генотипами ТТ и ТС (рис.1).

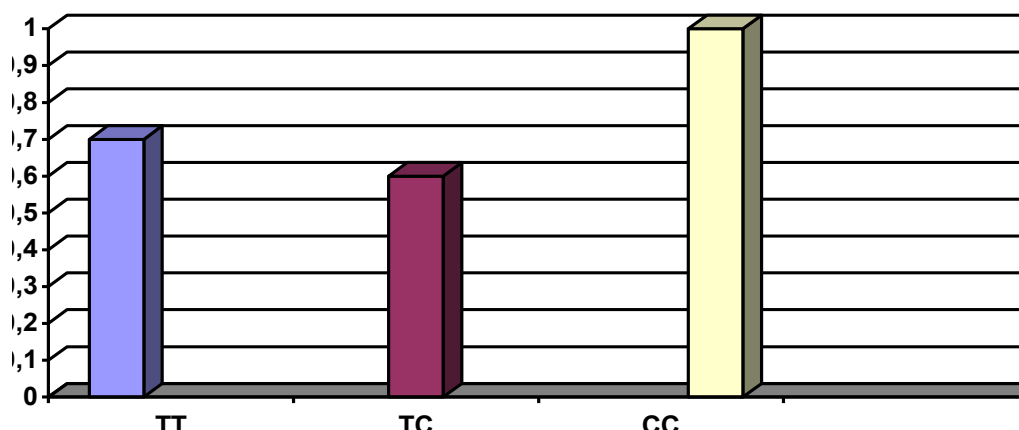


Рисунок 1. Индекс окисленности липидов плазмы крови свиней с различными генотипами

Малоновый диальдегид является вторичным продуктом процесса перекисного окисления липидов и обладает токсичным действием. Поэтому накопление малонового диальдегида является деструктивным фактором, приводящим к дестабилизации биологических процессов при различных заболеваниях. Содержание малонового диальдегида (МДА) превышало контрольные показатели на 98,76 % у животных с генотипом ТС и на 272,67 % у животных с генотипом СС (табл. 2). Измерение Fe^{2+} -индуцированного уровня ТБК-активных продуктов показало, что в этих условиях отмечается увеличение их на 10,5 % у животных с генотипом ТС и на 59,6 % у животных с генотипом СС (см. табл.2).

Таблица 2 – Содержание ТБК-активных продуктов в плазме крови хряков с различными генотипами по точковой мутации С3469Т в гене *ob*

Генотип свиней	Концентрация МДА, мкмоль/л	
	Спонтанное ПОЛ	Fe^{2+} - индуцированное ПОЛ
ТТ	0,16±0,07	1,62±0,16
ТС	0,32±0,02*	1,8±0,2*
СС	0,60±0,06*	2,6±0,2*

$p < 0,05$ – к показателю ТТ

Полученные данные свидетельствуют об изначально высоком уровне вторичных, наиболее токсичных продуктов перекисного окисления липидов у животных – носителей точковой мутации С3469Т в гене *ob*.

Подчеркнем, что в плазме крови свиней – носителей мутации С3469Т в гене *ob*, выявлено повышенное содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Отметим, что липидный компонент крови обладает высокой информативностью и наглядностью по отношению к протекающим в организме процессам. В связи с чем, динамика молекулярных изменений в составе липидов плазмы крови может служить одним из важнейших критериев оценки глубины метаболических перестроек в организме, в том числе и патологической направленности мутационной изменчивости.

Моделирование взаимодействий ДНК-липид с промотором гена *ob* свиньи проводили методом молекулярной механики. Целью нашего исследования являлось компьютерное моделирование взаимодействия липидов с промоторной областью гена *ob* свиньи, а также исследование взаимодействия липидов с ключевыми элементами промоторной области гена. В качестве таковых были выбраны сайты связывания с TBP, sp2, C/EBP белками. При исследовании были использованы следующие липиды: линолевая кислота, пальмитиновая кислота, арахидоновая кислота, холестерин, ТАГ (1- пальмитоил-2-линолеил-3-арахидонат). В ходе анализирующего моделирования удалось выяснить, что при взаимодействии липидов с большинством сайтов транскрипции минимальное значение E(связи) характерно для связи холестерина с GC-2 сайтом, а максимальное для связывания линолевой кислоты с GC-2 сайтом.

Установлено, что неспецифично с сайтами транскрипции лучше взаимодействует холестерин, затем пальмитиновая кислота, а в след за ними арахидоновая кислота, линолевая кислота и триацилглицеролы. Но при этом E(конф) взаимодействия исследуемых липидов для различных сайтов может не совпадать с приведенной выше схемой, что объясняется различным составом сайтов связывания, поэтому липиды могут рассматриваться в качестве специфических регуляторов транскрипции гена *ob*.

Заключение. 1. Анализ точковой мутации С3469Т показал, что частота встречаемости аллелей гена *ob* лептина свиней хозяйств ЗАО «Талина» РМ составляет: желательного аллеля Т – 79% и нежелательного аллеля С – 21%. Частота встречаемости генотипов ТТ, ТС и СС составляет 62%, 34%, 4% соответственно.

2. Для носителей нежелательного генотипа СС и промежуточного генотипа СТ характерно уменьшение содержания в плазме крови хряков суммарных фосфолипидов, триацилглицеролов, а также увеличение уровня свободного холестерина и его эфиров. Выявлено резкое падение уровня диацилглицеролов и свободных жирных кислот в плазме крови хряков по сравнению с животными – носителями желательного генотипа ТТ.

3. В плазме крови хряков, являющихся носителями точковой мутации С3469Т, отмечается изначально высокий уровень вторичных, наиболее токсичных продуктов перекисного окисления липидов. При этом индекс окисленности липидов имеет наиболее высокие показатели у хряков с генотипами ТС и СС. Количественные изменения фондов основных липидов и высокий уровень перекисацции липидов свидетельствуют о нарушении регуляции липидного метаболизма в связи с наличием мутантного аллеля гена лептина.

4. С помощью компьютерного моделирования выявлен приоритет связывания липидов с ключевыми последовательностями регуляторно-промоторной области гена *ob* лептина свиней, что позволяет предположить о влиянии липидов на транскрипцию гена.

Полученные данные о влиянии мутации С3469Т в гене *ob* лептина на метаболизм жиров, формирование фенотипа, осаленность туш хряков рекомендуем учитывать при проведении селекционной работы на свиноводческих комплексах ЗАО «Талина» и в других хозяйствах.

Библиографический список:

1. Tritos N. Leptin: Its role in obesity and beyond // N. Tritos, C. S. Mantzoros // *Diabetologia*. – 1997. – V. 4. – P. 36-40.
2. Urbanski H. F. Leptin and puberty / H. F. Urbanski // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2001. – Vol. 12. – P. 428-429.
3. Панков Ю. А. Лептин в регуляции нейроэндокринной системы / Ю. А. Панков // III Всероссийская Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы нейроэндокринологии». – 2003. – С. 27-40.
4. Панкрушина А. Н. Лептин: новые перспективы и подходы к коррекции ожирения / А. Н. Панкрушина, К. Ю. Толстых // *Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология»*. – 2008. – Вып. 10. – С. 91-97.
5. Трофимов В.А. Компьютерный анализ структуры гена с помощью базы данных NCBI: метод. рекомендации / сост.: В.А. Трофимов, С.Н. Палаев, А.М. Орешин, А.В. Никулин. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2009. –16 с.
6. Trofimov V. A. The bioinformatical analysis of promoter region *p53* and *ob* genes at mammals / V. A. Trofimov, S. N. Palaev, A. V. Nikulin, A. M. Oreshin // *Molecular phylogenetics: Contributions to the 2nd Moscow International conference “Molecular phylogenetics” (MolPhy)* – Moscow: TORUS PRESS, 2010. – P. 171.
7. Аметов А. С. Ожирение и сердечно-сосудистые заболевания / А. С. Аметов, Т. Ю. Демидова, А. Л. Целиковская // *Терапевтический архив*. – 2001. – №8. – С. 69-72.
8. Бубнова М. Г. Ожирение: причины и механизмы нарастания массы тела, подходы к коррекции / М. Г. Бубнова // *Consilium medicum: Журнал доказательной медицины для практикующих врачей*. – 2005. – Т. 7. – № 5. – С. 409-415.
9. Кучер А. Г. Лептин – новый гормон жировой ткани: значение в развитии ожирения, патологии сердечно-сосудистой системы и почек / А. Г. Кучер, А. В. Смирнов, И. Г. Каюков, В. А. Добронравов // *Нефрология*. – 2005. – Т. 9. – № 1. – С. 9-19.
10. Зиновьева Н. А. Применение ДНК-диагностики для анализа генов - кандидатов локусов количественных признаков сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева, Е. А. Гладырь, Л. К. Эрнст // *Сборник научных трудов ВИЖ «Животноводство – XXI век»*. – 2001. – Вып. 61. – С. 225–228.
11. Фильченков А. А. Лептин, адипоциты и ожирение организма / А. А. Фильченков, В. Н. Залесский // *Российский биотерапевтический журнал*. –2007. – Т. 6. – № 3. – С. 30-37.
12. Трофимов В.А. Мутация С3469Т гена лептина в геномах свиней различных пород / В.А. Трофимов, А.М. Орешин, Е.С. Кузьмина, С.Н. Палаев // *Материалы научной конференции XXXVII Огаревские чтения. Естественные науки. Ч. II. 2009.* – С. 25.
13. Орешин А.М. Особенности липидов плазмы крови у свиней с различными генотипами по точковой мутации С3469Т в гене *ob* / А.М. Орешин, В.А. Трофимов, Е.С. Кузьмина // *Естественные и технические науки*. – М.: Изд-во «Компания спутник» № 2, 2010. – С. 175–178.
14. Алимова Е. К. Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических заболеваний / Е. К. Алимова, А. Т. Аствацатурянц, Л. В. Шаров // *М.: Медицина*. – 1973. – 278 с.