

РЕПРОДУКТИВНАЯ ФУНКЦИЯ КОРОВ С РАЗНЫМ ГЕНОТИПОМ ПО ЛОКУСУ *TNF α* И ОЦЕНКА ФЕРТИЛЬНОСТИ СПЕРМИЕВ МЕТОДОМ ДНК ФРАГМЕНТАЦИИ

Ж.Ж. БИМЕНОВА^{1,1}, Е.С. УСЕНБЕКОВ^{1,2}, В.П. ТЕРЛЕЦКИЙ^{2,3,3},
Е.К. МАКАШЕВ^{4,4}, ТЫЩЕНКО В.И.^{3,5}, Ш.Н. КАСЫМБЕКОВА^{1,6}

¹ Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный университет», Алматы, 050013

² Государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Ленинградской области «Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина», Санкт-Петербург – Пушкин, 196601

³ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»,

⁴ Республиканское государственное предприятие Институт физиологии человека и животных Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, г Алматы, Республика Казахстан, 050060

E-mail: zhan_225@mail.ru¹, usen03@mail.ru², valeriter@mail.ru³, e_makashev@mail.ru⁴, tinatvi@mail.ru⁵, kasyzbekova-s@mail.ru⁶

SNP полиморфизм промоторной части гена *TNF α* в позиции 824 А→G у коров голштинской породы ТОО «Байсерке-Агро» представлены следующими генетическими вариантами: AA – 22,4 %, AG – 63,8 %, GG – 13,8 %, частота аллелей А и G составила 0,54 и 0,46. У исследуемой популяции выявлена избыточная встречаемость гетерозиготного генотипа AG на 21,49 индивидуумов, по другим генотипам отмечается дефицит гомозиготных вариантов GG и AA, соответственно на 11,16 и 10,32 особей. Показатели репродуктивной функции были высокими у коров с генотипом GG: интервал между отелом и плодотворным осеменением составил 259 дней, индекс осеменения 2,63, доля животных, осемененных по истечении более 91 день была минимальной (47,36 %) у особей гомозиготного генотипа GG. В качестве дополнительного критерия оценки фертильности спермы быков рекомендуется использовать метод ДНК фрагментации, максимальный допустимый уровень содержания спермиев с фрагментацией ДНК в замороженных спермодозах колеблется от 13,0 % до 17,15 %.

Ключевые слова: промоторная часть гена *TNF α* , ПЦР-ПДРФ, репродуктивная функция коров, ДНК фрагментация, фертильность спермиев быков.

Введение. Исследованиями ученых в 1996 г. были установлены локализация гена *TNF α* (tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли) на 23 хромосоме и выявлены 4 аллеля гена *TNF α* у крупного рогатого скота шести пород из различных географических регионов. Частота аллелей гена *TNF α* колебалась от 0 до 0,61 у разных пород представителей *B. tau-*

rus и *B. indicus*, уровень гетерозиготности был высоким (0,80) у особей локальных пород, и низким (0,22) у особей фризской породы. Авторами для детекции аллелей гена *TNF α* были использованы праймеры: прямой F 5'-AG-CCTCAAGTAACAAGCCG-3', обратный R 5'-TCTACTCTCCACATCCTGG-3' [1].

Исследованиями японских ученых установлено влияние полиморфизма в промоторной части гена *TNF α* и SNP замена одного нуклеотида в экзонной части названного гена на иммунный статус и репродуктивную функцию у коров. Авторами работы у исследуемой популяции молочных коров по локусу *TNF α* были выявлены следующие генетические варианты: А/А, А/Г, Г/Г и Т/Т, Т/С, С/С в промоторной и экзонной части гена, соответственно. Интервал между отелом и первой овуляцией был коротким у коров с гетерозиготным генотипом А/Г и гомозиготным генотипом Г/Г, по сравнению с животными с гомозиготным генотипом А/А. Полиморфизм промоторной части гена *TNF α* у коров не оказывает влияния на скорость апоптоза полиморфно ядерных лейкоцитов, однако скорость трансмиграции была значительно выше у животных с генотипом А/А и А/Г, по сравнению с животными с гомозиготным генотипом Г/Г. Выявлена корреляция между уровнем экспрессии мРНК промоторной части гена *TNF α* и образованием интерлейкина 8 (IL-8), который выполняет в организме защитную функцию. Так, экспрессия мРНК полиморфно ядерных лейкоцитов и мононуклеарных клеток периферической крови была выше у коров с генотипом

© Ж.Ж. БИМЕНОВА, Е.С. УСЕНБЕКОВ,
В.П. ТЕРЛЕЦКИЙ, Е.К. МАКАШЕВ,
ТЫЩЕНКО В.И., Ш.Н. КАСЫМБЕКОВА, 2019

А/А по сравнению с генотипом G/G. Полученные результаты свидетельствуют, что полиморфизм аллелей гена *TNFA* оказывает существенное влияние на иммунную функцию и репродуктивные показатели у коров [2].

ПЦР и Реал-Тайм ПЦР методы диагностики были использованы для генотипирования особей по локусу гена *TNFA* и изучения влияния SNP полиморфизма в позиции 824 А→G на уровень экспрессии данного гена у больных вирусной лейкемией коров (BLV) и резистентных к этой болезни животных. Установлено, что полиморфизм в положении 824 А→G оказывал комплексное влияние на экспрессию гена *TNFA* у коров, инфицированных BLV. У здоровых коров существенные различия в экспрессии гена не были обнаружены. Наоборот, инфицирование вирусом лейкемии (BLV) и прогрессирование энзоотического лейкоза крупного рогатого скота (EBL) приводили к дифференцировке экспрессии гена *TNFA* на уровне мРНК и белка. Идентификация аллелей гена *TNFA* осуществлялась методом ПЦР-ПДРФ анализа с использованием рестриктазы *SacI*, были идентифицированы три группы генотипов: AA (168 п.н., 81 п.н.), AG (249 п.н., 168 п.н., 81 п.н.) и GG. (249 п.н.) [3]. Ассоциативные данные и некоторые исследования свидетельствуют, что ингибирование экспрессии гена *TNFA* способствует ожирению печени при дефиците энергии у молочного скота [4].

Первоначальная защита эндометрия матки коровы против патогенного воздействия микробов осуществляется благодаря трем врожденным иммунным системам: Toll-подобные рецепторы (TLR), антимикробные пептиды (AMP) и белки острой фазы (APP). Эндометрий матки у коров инфицирован бактериями, которые часто являются основным этиологическим фактором патологии матки. Эпителий эндометрия матки является первой защитной линией против патогенных агентов и Toll-подобный рецептор (TLR) является важным компонентом врожденной иммунной системы для обнаружения связанных с патогенами молекулярных структур (pathogen associated molecular patterns – PAMP) [5].

Муцин-1 (MUC-1) представляет собой гликозилированный трансмембранный белок эпителиальной клетки слизистой матки, который

также играет большую роль в микробной защите эндометрия [6].

Учеными Бразилии в условиях *in vitro* культивирования гранулезных ооцит-кумуляных клеток проведена оценка влияния препарата GnRH на уровень экспрессии мРНК систем *TNFA*, *TNFR1* и *TNFR2* у крупного рогатого скота. Так, добавление в питательную среду гормона GnRH активизирует уровень экспрессии мРНК систем *TNFA*, *TNFR1* и *TNFR2* по истечении 3, 6, 12-часового культивирования, по сравнению с 0 и 24 ч после культивирования [9]. Разработка и внедрение в селекционную практику ДНК маркеров репродуктивной функции животных, молочной и мясной продуктивности, создание популяции животных, устойчивых к заболеваниям, прогнозирование полезных признаков является актуальной проблемой молекулярной и популяционной генетики [7].

Анализ литературных данных показывает, что результаты искусственного осеменения молочных коров зависят не только от их репродуктивного состояния, но и в значительной степени от оплодотворяющей способности спермиев быков производителей. Около 40 % производителей имеют пониженную фертильность, незначительная часть бесплодна. В связи с этим определение фертильности спермиев самцов производителей имеет большое экономическое и биологическое значение [8].

В настоящее время традиционные методы оценки качества спермы быков – определение концентрации, морфологии, подвижности спермиев не всегда являются информативными способами диагностики фертильности спермиев. Применение современных молекулярно-генетических методов оценки оплодотворяющей способности спермиев быков, как ДНК фрагментация спермиев (Sperm DNA fragmentation, SDF), тест депрессии хроматина спермиев (Sperm chromatin dispersion test, SCD) позволяет повысить результативность искусственного осеменения коров [9]. Авторы рекомендуют в качестве дополнительного параметра оценки качества спермы быков производителей использовать TUNEL индекс [10].

Необходимо отметить, что все существующие тест-системы SCSA, COMET, SCD, AOT,

TUNEL являются чувствительными, специфичными и позволяют определить состояние хроматина и степень фрагментированности ДНК спермиев, однако, пороговые значения переменны [11].

Цель исследования – генотипирование коров голштинской породы по локусу гена *TNFA* методом ПЦР-ПДРФ анализа, изучение влияния аллелей изучаемого гена на проявление репродуктивной функции, а также исследование фертильности спермиев быков производителей методом ДНК фрагментации.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 152 коровах голштинской породы Канадской селекции в 2015-2017 годах племенного хозяйства ТОО «Байсерке-Агро» Алматинской области. Кровь для исследования брали из яремной или хвостовой вены в вакуумную пробирку с ЭДТА. Выделение ДНК проводили фенольным методом, к 1 см³ образца крови прибавляли равный объем буфера 100 мМ трис-20 мМ ЭДТА-10 мМ NaCl, pH 8,0 и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 г. Осадок отмывали таким же образом еще раз и суспендировали в 400 мкл буфере. Затем вносили в суспензию 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и 25 мкл 10%-ного раствора додецилсульфата натрия (ДСН). Осторожно перемешивали. Инкубировали при 55 °С в течение трех часов. Затем добавляли фенол (pH = 8,0) в равном объеме и полученную смесь встряхивали 15 мин, затем центрифугировали при 10000 g 15 мин и осторожно отбирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК. К полученному водному раствору ДНК прибавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия и два объема холодного этанола. ДНК переходит в видимое состояние, которое промывали 70 ° этанолом для удаления остатков солей и фенола. ДНК слегка подсушивали при комнатной температуре и растворяли в буфере TE.

Аmplификацию участка гена *TNFA* проводили на амплификаторе «Эффендорф» (Германия) с помощью праймеров: F 5'-GAGA-AATGGGACAACCTCCA-3', R: 5'-CCAGGAA-CTCGCTGAAACTC-3' [12].

Состав реакционной смеси был: 2,5 мкл 10 × буфера для ПЦР, 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂, 1,25 мкл 25 мкМ прямого и обратного прай-

меров, 2 мкл 0,2 мМ концентрации каждого dNTP, 0,2 мкл *Taq* полимеразы активностью 5 u/μl, 3 мкл ДНК и 13,3 мкл дистиллированной воды. Конечный объем смеси составил 25 мкл, количество циклов – 35, каждый цикл: 30 с – 94 °С, 30 с – 60 °С, 30 с – 72 °С. Длина полученного амплификата гена фактора некроза опухоли (*TNFA*) была 249 п.н., для детекции SNP полиморфизма в позиции 824 А→G использовали рестриктазу *SacI*, которая имеет сайт рестрикции GAGCT/C, после рестрикции ПЦР продукта в зависимости от генотипа животных на электрофореграмме появляются фрагменты: у особей с гетерозиготным генотипом AG – 249, 168 и 81 п.н., у гомозиготных AA и GG, соответственно 168, 81 и 249 п.н. [12]. Для визуализации результатов электрофореза использовали геледокументирующую систему Infinity VX2 3026, WL/LC/26M X-Press, «Vilber Lourmat» (США), в качестве ДНК маркера плазмиду pUC19/MspI (Thermo Fisher Scientific).

Техника определения ДНК фрагментации спермиев. Определение уровня ДНК фрагментации в спермиях 14 быков производителей голштинской породы проводили с использованием набора «Nuclear Protein Assay» sperm nuclear protein assay using «Aniline Blue» Индийской компании «Sperm Processor Pvt. Ltd» согласно протокола. Ставили пробирку с агарозой на водяную баню (+70 °С) экспозиция 15–20 мин, затем пробирку на 5 мин поместили в термостат (+37 °С), параллельно готовили образец спермы, доводили концентрацию спермы до 10–15 млн спермиев в 1 мл путем разбавления спермы физиологическим раствором, добавляли в пробирку 60 мкл спермы, несколько раз пипетировали, затем ставили пробирку в термостат и наносили с помощью пипетки 15–20 капель смеси спермы с агарозой на предметное стекло, ставили аккуратно на образец покровное стекло, чтобы не образовались пузырьки воздуха, помещали предметное стекло в холодильник (+2+8 °С) на 5 мин, по истечении времени аккуратно убрали покровное стекло. Затем предметное стекло помещали в специальный лоток и добавляли 8–10 мл реагента I, экспозиция 7 мин, сливали реагент I, высушивали предметное

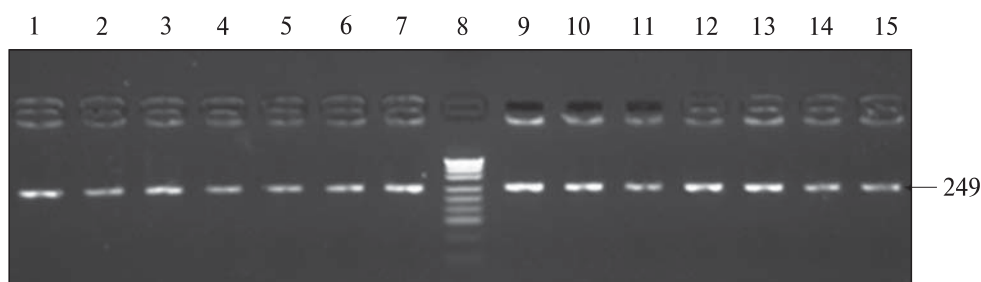


Рис. 1. Электрофореграмма амплификата гена *TNFα*, агароза 3 %, дорожки 1–7, 9–15 ПЦР продукт, дорожка 8 – ДНК маркер рUC19/MspI

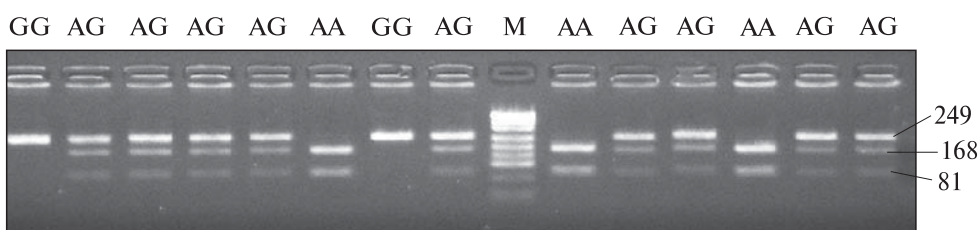


Рис. 2. Электрофореграмма рестрицированного рестриктазой *SacI* ПЦР продукта гена *TNFα*, агароза 3 %, М – ДНК маркер рUC19/MspI, генетические варианты GG, AG, AA

стекло с помощью фильтровальной бумаги и помещали предметное стекло в лоток, добавляли 8–10 мл реагента II, экспозиция 20 мин, сливали реагент II, промывали дистиллированной водой, высушивали предметное стекло, ставили предметное стекло в горизонтальное положение и добавляли 1 мл 70%-ного этилового спирта, экспозиция 2 мин, сливали спирт и затем эту же процедуру повторяли с 96%-ным, 100%-ным этиловым спиртом.

На предметное стекло наносили 500 мкл красителя I, экспозиция 2 мин и добавляли на мазок 1 мл красителя II, экспозиция 10–15 мин, высушивали мазок на воздухе в течение 7–10 мин. Мазок исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 40. По результатам микроскопии спермии разделили на три группы: спермии без фрагментации ДНК ($R_1/R_2 \leq 1,4$), спермии с фрагментацией ДНК ($R_1/R_2 =$ от 1,0 до 1,4) и дегенерированные спермии ($R_1/R_2 \geq 1,0$).

Результаты исследований и их обсуждение.

Проведение ПЦР в образцах привело к амплификации фрагмента ДНК размером 249 п.н. (рис. 1). Расщепление этого продукта эндонуклеазой рестрикции *SacI* позволяет визу-

ализировать гомозиготные генотипы AA размером 168 п.н. и 81 п.н., GG – 249 п.н. Гетерозиготы AG имели все три фрагмента ДНК – 249 п.н., 168 п.н. и 81 п.н. (рис. 2).

Результаты идентификации SNP полиморфизма промоторной части гена *TNFα* в позиции 824 А→G у коров голштинской породы в количестве 152 голов племенного хозяйства ТОО «Байсерке-Агро» свидетельствуют о сдвиге частоты аллеля А по сравнению с G, 0,54 и 0,46, соответственно. Анализ литературы показывает, что большинство авторов изучают полиморфизм промоторной части гена, так как уровень экспрессии гена зависит от функциональной активности промоторной части соответствующего гена [2]. У исследуемой группы животных преобладает гетерозиготный генотип AG и его распространенность составляет 63,8 %, встречаемость гомозиготных генотипов была: GG – 13,8 % и AA – 22,4 %.

Нами установлено, что по всем трем генетическим вариантам у коров наблюдается несоответствие фактического распределения генотипов с теоретически ожидаемым числом генотипов, выявлена избыточная встречае-

мость гетерозиготного генотипа AG на 21,49 особей, наоборот, по другим генотипам отмечается дефицит гомозиготных вариантов GG и AA, соответственно на 11,16 и 10,32 особей (табл. 1). Аналогичные результаты получены и зарубежными авторами, так распределение генетических вариантов промоторной части гена *TNFα* у коров молочной породы Японии было: AA – 36 (16 %), AG – 108 (48 %), GG 80 (36 %) голов [2]. Исследование SNP полиморфизма промоторной части гена *TNFα* в позиции 824 A→G у коров ($n = 127$) голштинской породы Польши показывает более равномерное распределение генетических вариантов: AA – 26,0 %, AG – 37,8 % и GG – 36,2 % [3].

Известно, что степень патогенного действия микрофлоры на эндометрий матки коров зависит от уровня экспрессии генов: *TNFα*, (фактор некроза опухоли), *TLR* (Toll-подобные рецепторы), *AMP* (антимикробные пептиды), *APP* (белки острой фазы). Эксперименты по генотипированию 152 коров голштинской породы ТОО «Байсерке-Агро» проводили в период с 2015 по 2017 годы, за этот интервал из опытной группы выбыли 56 коров по различным причинам (падеж и забой животного, выбраковка, отсутствие информации о ре-

продуктивной функции). Проведен анализ воспроизводительной функции коров с разным генотипом по локусу промоторной части гена *TNFα* по следующим параметрам: продолжительность интервала между отелом и плодотворным осеменением, индекс осеменения, число коров плодотворно осемененных по истечении более 91 день после отела (табл. 2).

В настоящее время установлено влияние аллелей генов семейства Toll-подобных рецепторов *TLR1-TLR10*, фактора некроза опухоли *TNFα*, *AMP*, *APP* на иммунную функцию клеток (апоптоз и миграция), индекс осеменения и репродуктивную функцию коров. Функциональная активность мРНК у животных с различными генотипами *TNFα* является стабильной, но как показывают результаты иммунофенотипического анализа экспрессии гена существенные различия были отмечены в процентах выхода мононуклеарных клеток крови (РВМС) из периферической крови, экспрессирующий мембранный белок mTNFα.

У коров с гомозиготным генотипом GG ($n = 19$) интервал между отелом и плодотворным осеменением составил 259 дней, у особей с гетерозиготным генотипом AG ($n = 50$) данный показатель имел значение 378

Таблица 1. Степень соответствия фактического распределения генотипа SNP полиморфизма промоторной части гена *TNFα* у коров с теоретическим распределением, частота аллелей ($n = 152$)

Показатели	Генетические варианты <i>TNFα</i>			Частота аллелей	
	GG	AG	AA	A	G
Фактическое количество особей (Р эмп.)	21/13,8 %	97/63,8 %	34/22,4 %		
Теоретическое ожидаемое количество особей (Р теор.)	32,16	75,51	44,32	0,54	0,46
Разность генотипа (Р эмп. – Р теор.)	-11,16	+21,49	-10,32		

Таблица 2. Показатели репродуктивной функции коров с разным генотипом по локусу гена *TNFα* у коров ($n = 96$)

Животные с генотипом <i>TNFα</i> ($n = 96$)	Интервал между отелом и плодотворным осеменением (дней)	Индекс осеменения коров	Число плодотворно осемененных коров в срок более 91 день после отела
GG ($n = 19$)	259	2,63	9/47,36 %
AG ($n = 50$)	378	3,76	43/86,0 %
AA ($n = 27$)	290	2,85	17/62,96 %

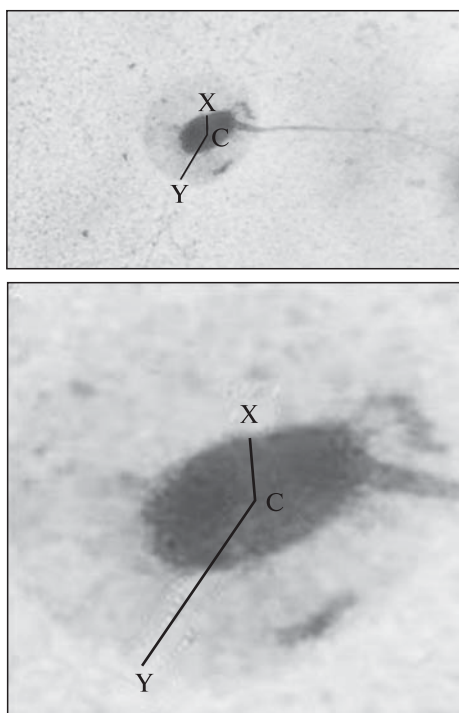


Рис. 3. Критерий определения уровня фрагментации ДНК спермиев, R_1 – радиус от центра ядра спермиев до оболочки спермиев (C→X), R_2 – радиус от центра ядра спермиев до внешнего края ореола спермиев (C→Y)

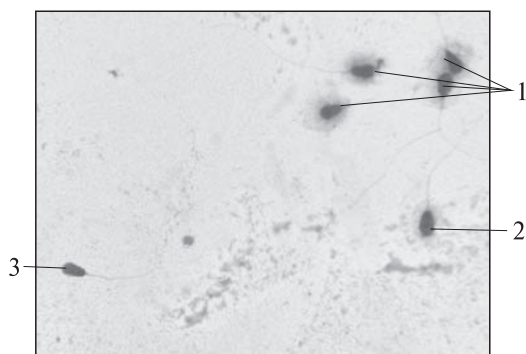


Рис. 4. Сpermий без фрагментации ДНК – 1, spermий с фрагментацией ДНК – 2, spermий с дегенерацией – 3

дней, промежуточную позицию (290 дней) занимали животные с генотипом AA ($n = 27$). Наблюдается корреляция между интервалом от отела до плодотворного осеменения и индексом осеменения у животных всех трех групп, низкий индекс осеменения (2,63)

был у коров с гомозиготным генотипом GG (продолжительность интервала 259 дней), высокий индекс осеменения (3,76) был у гетерозиготных животных (продолжительность интервала 378 дней). У гомозиготных особей с генотипом AA индекс осеменения имел значение 2,85, продолжительность интервала между отелом и плодотворным осеменением составил 290 дней.

Наблюдается ассоциация гомозиготного генотипа GG с показателями репродуктивной функции у исследуемой группы животных (минимальный интервал между отелом и плодотворным осеменением, низкий индекс осеменения, минимальное число коров (47,36 %), плодотворно осемененных в период более 91 день после отела). Так, по результатам японских ученых доля коров, у которых проявилась овуляция в течение трех недель после отела, у особей с гомозиготным GG и гетерозиготным AG генотипом по локусу SNP полиморфизма промоторной части гена *TNFA* была одинаковой, 59,5 и 57,1 % соответственно, аллели данного гена не оказывали влияние на количество осеменений [2].

Как видно на рис. 4, spermий в зависимости от сохранности хроматина были разделены на три группы: spermий без фрагментации ДНК, spermий с фрагментацией ДНК и дегенерированные spermий (рис. 3 и рис. 4).

Оплодотворяемость у коров зависит от фертильности половых клеток. У коров голштинской породы в настоящее время известны 10 гаплотипов: HCD, HH0, HH1, HH2, HH3, HH4, HH5, HNV, HNS, HND, которые влияют на результативность искусственного осеменения. Для оценки оплодотворяющей способности spermиев используются такие молекулярно-генетические методы, как ДНК фрагментация и определение протамина и гистона в spermиях [13].

Различают внутренние и внешние причины ДНК фрагментации spermиев млекопитающих – к внутренним относятся окислительный стресс, эндогенная активация эндонуклеазы, изменение в ремоделировании хроматина во время спермиогенеза. Внешние факторы, влияющие на целостность ДНК spermиев: компоненты разбавителя spermы, криоконсер-

вация спермы, техника оттаивания замороженной спермы [11].

Нами была установлена существенная взаимосвязь оплодотворяемости коров с фертильностью спермы, определяемой по уровню ДНК фрагментации. Были протестированы образцы спермы 14 быков производителей голштинской породы с процентом оплодотворяемости не менее 70 %, доля спермиев без фрагментации ДНК в первой группе была 80,65 %, во второй группе 86,10 %. Таким образом, максимальный допустимый уровень содержания спермиев с фрагментацией ДНК в замороженных спермодозах колеблется от 13,0 % до 17,15 % (табл. 3).

Выводы. В заключение следует отметить, что локус промоторной части гена *TNF α* у исследуемой популяции является полиморфным, распространенность генетических вариантов составляет: AA – 22,4 %, AG – 63,8 % и GG – 13,8 %. Установлено положительное влияние генотипа GG коров голштинской породы на репродуктивную функцию, у гетерозиготных животных воспроизводительные способности были низкими. Анализ репродуктивной функции коров с разными генетическими вариантами по исследуемому локусу свидетельствует, что доля коров плодотворно оплодотворенных в срок более 91 день после отела была низкой у особей с гомозиготным генотипом GG (47,36 %) по сравнению с другими генетическими вариантами (AA – 62,96 %, AG – 86,0 %). Известно, что процесс криоконсервации спермы отрицательно влияет на сохранность хроматина спермиев, так по результатам наших экспериментов процентное содержание спермиев с фрагментацией ДНК колебалось от 13,0 % до 17,15 %. С целью повышения результативности искусственного осеменения коров и в качестве критерия оценки фертильности следует использовать генотипирование животных по локусу промоторной части гена *TNF α* методом ПЦР-ПДРФ и тестирование спермы быков производителей способом ДНК фрагментации.

Исследование в части пробоподготовки и анализа результатов выполнено при поддержке Государственного задания ФАНО номер ГЗ АААА-А18-118021590138-1

Таблица 3. Содержание спермиев без фрагментации ДНК, с фрагментацией ДНК и с дегенерацией в замороженных спермодозах быков производителей оплодотворяемостью не менее 70 %

Опытные группы и количество быков производителей	Процент оплодотворяемости спермы быков при искусственном осеменении коров не менее 70%		
	Спермий без фрагментации	Спермий с фрагментацией ДНК	Спермий с дегенерацией
<i>n</i> = 10	80,65 %	17,15 %	2,20 %
<i>n</i> = 4	86,10 %	13,0 %	0,90 %

Работа по исследованию фертильности спермиев выполнена за счет грантового финансирования МОН РК по теме проекта: «Интенсификация селекционного процесса в животноводстве на основе использования клеточных репродуктивных технологии», № госрегистрации 0115PK00728.

REPRODUCTIVE FUNCTION OF COWS WITH DIFFERENT GENOTYPE BY LOCUS *TNF α* AND ESTIMATING THE FERTILITY OF SPERM CELLS BY DNA FRAGMENTATION METHOD

Zh.Zh. Bimenova, Ye.S. Ussenbekov, V.P. Terletskiy, Ye.K. Makashev, V.I. Tyshchenko, Sh.N. Kassymbekova

Non-commercial joint-stock company «Kazakh National Agrarian University», Abai Str., 8, Almaty, 050013 Kazakhstan
 State autonomous educational institution of higher education in Leningrad Region «Pushkin Leningrad State University», 10, Peterburgskoe sh., St. Petersburg, Russia
 Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 55a, Moscovskoe sh., Pushkin, Russia, 196601
 Republican State Enterprise «Institute of Physiology of Humans and Animals» of the Committee of Science of the Ministry of Education and Science, the Republic of Kazakhstan, 93, Al-Farabi, Almaty, Kazakhstan, 050060
 E-mail: zhan_225@mail.ru, usen03@mail.ru, valeriter@mail.ru, e_makashev@mail.ru, tinatvi@mail.ru, kassymbekova-s@mail.ru

SNP polymorphism of the promoter region of the *TNF α* gene at position 824 A→G in the Holstein cows

of Baysyerke-Agro LLP is represented by the following genetic variants: AA – 22,4 %, AG – 63,8 %, GG – 13,8 %, the frequency of alleles A and G was 0,54 and 0,46, respectively. In population under this study, the excessive number of the heterozygous genotype AG reached the value of 21,49, and in other genotypes there was a deficit of homozygous variants of GG and AA, by 11,16 and 10,32 individuals respectively. The traits of reproductive function were high in cows with GG genotype: the interval between calving and productive insemination was 259 days, the insemination index was 2,63, the proportion of animals inseminated after more than 91 days was at minimum value of 47,36 % in individuals with homozygous genotype GG. As an additional criterion for assessing the fertility of bull sperm, the DNA fragmentation method is recommended, the maximum permissible level of sperm cells with DNA fragmentation in frozen sperm is between 13,00 % and 17,15 %

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agaba, M., Kemp, S.J., Barendse, W., and Teale, A.J., Polymorphism at the bovine tumor necrosis factor alpha locus and assignment to BTA 23, *Mammalian Genome*, 1996, vol. 7, pp. 186–7. doi: 10.1007/s003359900051.
2. Kawasaki, Y., Aoki, Y., Magata, F., Miyamoto, A., Kawashima, C., Hojo, T., Okuda, K., Shirasuna, K., and Shimizu, T., The Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor- α Gene on Reproductive Performance and Immune Function in Dairy Cattle, *Journal of Reproduction and Development*, 2014, vol. 60, no. 3, pp. 173–8. doi: 10.1262/jrd.2013-140.
3. Bojarojc-Nosowicz, B., Brym, P., Kaczmarczyk, E., Stachura, A., and Habel, A.K., Polymorphism and expression of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in non-infected cows and in cows naturally infected with the bovine leukaemia virus (BLV), *Veterinarni Medicina*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.17221/8676-VETMED.
4. Martel, C.A., Mamedova, L.K., Minton, J.E., Garcia, M., Legallet C., and Bradford, B.J., Effects of TNF receptor blockade on *in vitro* cell survival and response to negative energy balance in dairy cattle, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, vol. 9, pp. 6. doi: 10.1186/s40104-017-0224-y.
5. Darren Davies, Kieran G. Meade, Shan Herath, P. David, Eckersall, Deyarina Gonzalez, John O. White, R. Steven Conlan, Cliona O'Farrelly, and I. Martin Sheldon, Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2008, vol. 6, pp. 53. doi: 10.1186/1477-7827-6-53.
6. Brayman, M., Thathiah, A. and Carson, D.D. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004, vol. 2, pp. 1–9. doi: 10.1186/1477-7827-2-4.
7. Silva, A.W.B., Bezerra, F.T.G., Glanzner, W.G., dos Santos, J.T., Dau, A.M.P., Rovani, M.T., Ilha, G.F., Costa, J.J.N., Cunha, E.V., Donato, M.A.M., Peixoto, C.A., Gonzalves, P.B.D., Bordignon, V., and Silva, J.R.V., mRNA expression profile of the TNF- α system in LH-induced bovine preovulatory follicles and effects of TNF- α on gene expression, ultrastructure and expansion of cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro*, *Theriogenology*, 2017, vol. 90, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.01
8. Flowers, W.L., Sperm characteristics that limit success of fertilization, *J. Anim.*, 2013, vol. 91, no. 7, pp. 3022–9. doi: 10.2527/jas2012-5945.
9. Karoui, S., Díaz, C., González-Marín, C., Amenabar, M.E., Serrano, M., Ugarte, E., Gosálvez, J., Roy, R., Lypez-Fernández, C., and Carabaco, M.J., Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility, *J. Anim. Sci.*, 2012, vol. 90, pp. 2437–49. doi: 10.2527/jas.2011-4492.
10. Takeda, K., Uchiyama, K., Kinukawa, M., Tagami, T., Kaneda, M., and Watanabe, S., Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality, *Journal of Reproduction and Development*, 2015, vol. 61, no. 3, pp. 185–90. doi: 10.1262/jrd.2014-140
11. Evenson, D.P., The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility, *Animal Reproduction Science*, 2016, vol. 169, pp. 56–75. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.017.
12. Bojarojc-Nosowicz, B., Kaczmarczyk, E., Stachura, A., and Kotkiewicz, M., Polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene in cattle herds naturally infected and uninfected with the Bovine Leukemia Virus, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2011, vol. 14, pp. 671–3. doi: 10.2478/v10181-011-0101-0.
13. Cole, J.B., Null, D.J., and Van Raden, P.M., Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility, *J. Dairy Sci.*, 2016, vol. 99, no. 9, pp. 7274–88. doi: 10.3168/jds.2015-10777.

Поступила 06.04.18