

Perinatal Center." It involved a comprehensive review of outpatient records for patients born with Down, Edwards, and Patau syndromes, aimed at understanding the clinical condition of the infants and the course of pregnancy in their mothers.

The analysis revealed that a total of 50,475 babies were born in the region over the course of five years. However, an annual decrease in the birth rate was observed, with an average reduction of 705 children per year. The incidence rate of newborns with Down syndrome, Edwards syndrome, and Patau syndrome ranged from 0.10% to 0.13%. During the research period, 45 children with Down syndrome were born in the Khmelnytskyi region. Cytogenetic analysis indicated that 39 of these children (87 %) had a complete trisomy, 4 had a mosaic form (9 %), and 2 (4 %) had a translocation form. Children with complete trisomy exhibited four or more phenotypic features simultaneously. In the region, 12 children were born with Edwards syndrome, including 9 with complete trisomy and 3 with a mosaic form. No newborns were identified with partial trisomy. Cases included both full-term and premature births, as well as instances of infant mortality. Two children with Patau syndrome were born (1 boy in 2017 and 1 girl in 2019), both with complete trisomy. They were born full-term but with low birth weight and multiple developmental disabilities, with one child surviving for 12 hours and the other for 31 hours.

Upon analyzing the age of the parents of the probands, it was discovered that the majority (38 mothers, 64 %) were not within the age risk group for having a child with trisomy. This suggests that women of any age can be at risk of having a child with trisomy. Thus, there is a clear need for medical-genetic counseling and prenatal screening for every pregnant woman during the first trimester of pregnancy.

*Key words: autosomal trisomy, fluctuations in the birth rate of infants, Edwards syndrome, Down syndrome, Patau syndrome.*

Надійшла 05.03.2023.

УДК 636.2;575.113.2(477)

doi: 10.25128/2078-2357.23.1-2.7

Н. Б. МОХНАЧОВА

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН  
вул. Погребняка 1, с. Чубинське, Бориспільський район, Київська область, 08321  
e-mail: nataliia.mokhnachova82@gmail.com

## **ПОРОДНІ ОСОБЛИВОСТІ АЛЕЛЬНОГО ПРОФІЛЮ ГЕНІВ *PIT1* ТА *GH* УКРАЇНСЬКОЇ АБОРИГЕННОЇ ЛЕБЕДИНСЬКОЇ ПОРОДИ КОРІВ**

У статті представлені результати дослідження структурних генів у популяції української аборигенної лебединської породи корів, які асоціюються з молочною продуктивністю: *PIT1* (гіпофізарний фактор транскрипції) та *GH* (гормон росту). Ці гени є ключовими для розвитку великої рогатої худоби та їх продуктивності. Гіпофізарний фактор транскрипції є геном, який регулює вироблення гормону росту у корів, що впливає на їх ріст та розвиток м'язів. Ген гормону росту, зі свого боку, впливає на ріст скелету та м'язів, а також на молочну продуктивність та відкладення жиру у корів. Тому вивчення цих генів необхідне для покращення продуктивності ВРХ, розвитку генетичних технологій і розуміння впливу генетичних факторів на продуктивність тварин.

Усього було досліджено поліморфізм 2 генів (*PIT1* та *GH*). Для аналізу використали 32 зразки ДНК, виділеної із венозної крові корів лебединської породи за допомогою набору «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Генотипування проводили, використовуючи аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-ПДРФ). Для вивчення гена *PIT1* ампліфікований фрагмент 451 п.н. обробляли ферментом *HinfI*. Отримані

такі частоти алелів: *A* (0,38) та *B* (0,62). Серед генотипів переважав гетерозиготний генотип *AB* (0,45), кількість гомозигот за *A* алелем становила 0,15. Продукт ампліфікації фрагмента гена *GH* (223 п.н.) гідролізували ферментом рестрикції *AluI*. Аналіз характеру розподілу частот алелів показав, що вивчені тварини характеризуються високою частотою алеля *L* (0,85). Тварини з гомозиготним генотипом *GH<sup>VV</sup>* не траплялися, частка тварин із генотипом *GH<sup>LL</sup>* становила 0,7. Виявлені особливості алельного спектру генів *PIT1* (*B*-0,62) та *GH* (*L*-0,85), які характерні для дослідженої популяції української аборигенної лебединської породи корів. Результати дослідження є цінними у зв'язку з різким скороченням чисельності місцевих аборигенних популяцій і виникненням загрози зникнення власних генетичних ресурсів сільськогосподарських видів.

*Ключові слова:* корови, аборигенна порода корів, лебединська порода, поліморфізм, гени, гормон росту, гіпофізарний фактор транскрипції, алель.

Збереження генетичного різноманіття займає основне місце серед глобальних проблем сучасності. Фундаментом біологічної різноманітності є її генетичний елемент. Втрата видової і генетичної диверсифікації – реальна загроза для біосфери, бо стійкість відтворення природних екосистем й агроекосистем прямо пов'язана з їхньою генетичною здатністю пристосовуватися до умов зовнішнього середовища [3].

Досягнення молекулярної генетики дають можливість ідентифікувати гени, пов'язані з господарсько-корисними ознаками, що дозволяє визначати генетичний потенціал тварин, а також прискорюють селекційно-племінну роботу. Поширеними генами, які пов'язують з молочною продуктивністю, є гени білків молока та гормонів. Серед них можна виділити ті, які найбільше впливають на формування і функціонування цієї якісної ознаки, – гіпофізарно-специфічний фактор транскрипції (*PIT1*) та гормон росту (*GH*) [2].

Гіпофізарний фактор транскрипції (*PIT-1*) синтезується в гіпофізі, має вплив на гени гормону росту та пролактину. За літературними даними, продуктивність тварин, гомозиготних за алелем *PIT-1<sup>B</sup>*, вища за такими показниками: надій, вихід жиру та протеїну в молоці. Гормон росту (*GH*) впливає на лактогенез та має жиромобілізуючу дію. Встановлено зв'язок поліморфних варіантів гену з молочними показниками. Алель *GH<sup>L</sup>* пов'язують з більшою кількістю молока, жиру і білку [1, 4, 5].

Метою роботи було дослідити поліморфізм генів: гіпофізарно-специфічний фактор транскрипції (*PIT1*) та гормон росту (*GH*) в популяції лебединської аборигенної породи великої рогатої худоби.

#### Матеріали та методи досліджень

Було досліджено зразки крові від дійних корів лебединської породи з господарства ПГ «Голосієво» (*n*=32) Київської області, Україна (рис. 1). Молекулярно-генетичні дослідження проводили на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН.



Рис. 1. Корова лебединської породи ПГ «Голосієво» Київська область.

## ГЕНЕТИКА

Зразки крові відбирали з яремної вени в об'ємі 5 мл у вакуумні пробірки з сухим ЕДТА. Геномну ДНК виділяли згідно з стандартною методикою, використовуючи комерційний набір «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Концентрацію ДНК доводили до 50 нг/мкл. Поліморфізм генів CSN2, CSN3 та BLG досліджували методом ПЛР-ПДРФ (полімеразної ланцюгової реакції – поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів). Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації та назви рестриктаз для рестрикції продуктів ампліфікації показано в табл. 1.

Таблиця 1

Нуклеотидні послідовності праймерів та рестриктази

Послідовність праймера	Ампліфікат, (п.н.)	Рестриктаза	Посилання
<b><i>PIT1</i></b>			
F:5'-AAACCATCATCTCCCTTCTT-3' R:5'-AATGTACAATGTGCCTTCTGAG-3'	451	<i>HinfI</i>	Wollard et al. (1994)
<b><i>GH</i></b>			
F:5'-GCTGCTCCTGAGGGCCCTTC-3' R:5'-GCGGCGGCACTTCATGACCC-3'	223	<i>AluI</i>	Lucy et al., 1993

Умови ПЛР та схеми рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації поліморфних ділянок досліджуваних генів у табл. 2.

Таблиця 2

Характеристика умов ПЛР та схеми ПДРФ-аналізу продуктів ампліфікації

Поліморфізм	Умови ампліфікації	Генотипи та відповідні довжини рестрикційних фрагментів
<i>PIT1- HinfI</i>	95°C-4 хв; (95°C- 45с; 58°C- 30с;72°C- 60с)х35; 72° -10 хв	<i>Pit-1-HinfI<sup>AA</sup></i> : 451; <i>Pit-1- HinfI<sup>BB</sup></i> : 244+207; <i>Pit-1-HinfI<sup>AB</sup></i> : 451+244+207;
<i>GH- AluI</i>	94°C-4 хв; (95°C- 45с; 65°C- 30с;72°C- 60с)х35; 72° -10 хв	<i>GH-AluI<sup>VV</sup></i> : 223; <i>GH-AluI<sup>LL</sup></i> : 171+52; <i>GH-AluI<sup>LV</sup></i> : 223+171+52;

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 2,0 мкл буфера для ДНК полімерази, 1,0 мкл суміші дНТФ («Амплісенс»), 1,0 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази («*Fermentas*» Литва). Геномна ДНК додавалась у кількості 2,0 мкл, решта ddH<sub>2</sub>O. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію ДНК проводили на програмованому чотириканальному термоциклері ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ДНК-технологія). Прилад виконаний у вигляді єдиного модуля, що об'єднує 4 незалежно керованих термоблоки. У кожному термоблоці встановлена матриця на 10 пробірок об'ємом 0,5 мл.

Продукти ПЛР обробляли специфічними рестрикційними ферментами: до 10 мкл ПЛР-продукту додавали 5 од./мкл рестриктази та 1,5 мкл рестрикційного буферу, інкубували при 37°C 12 год. Візуалізацію результатів проводили в 2–3 % агарозному гелі з бромистим етидієм у 1хТВЕ-буфері за постійної напруги 100 В протягом 90 хв, з наступною детекцією за допомогою транслюмінатора ТУВ-1 в ультрафіолетовому світлі 312 нм. У якості маркерів молекулярних мас використовували *GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder* та *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*. Гелі фотографували цифровою камерою та проводили аналіз отриманих результатів.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакету Statistica 6.0 та Exel (Microsoft Office 2007).

### Результати досліджень та їх обговорення

У популяції лебединської аборигенної породи ВРХ було досліджено 2 локуси (*PIT-1* та *GH*), які є генами-кандидатами молочної продуктивності. Гени вибрані так, щоб проаналізувати молочну характеристику як одну з найголовніших господарсько-корисних ознак.

Популяційні особливості генетичної структури лебединської породи ВРХ за геном гіпофізарного фактору транскрипції

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		$\chi^2$	F <sub>is</sub>
		AA	AB	A	B	H <sub>0</sub>	H <sub>E</sub>		
Лебединська	32	AA	0,15	0,38±0,015	0,62±0,024	0,450	0,469	0,03	0,040
		AB	0,45						
		BB	0,4						

**Локус *PIT1***

У результаті проведення ПЛР відбулася ампліфікація фрагмента ДНК довжиною 451 п.н. Після його розчеплення рестриктазою *HinfI* на електрофореграмі відзначали характерні набори смуг (рис. 2), які відповідали генотипам: AA, AB і BB.

Дослідження популяції корів лебединської породи за геном *PIT1* показали наступні результати: так, у 32 корів розподіл генотипів був наступний: AA – 5 (15 %), AB – 14 (45 %) і BB – 13 (40 %). При цьому частота алелей A і B відповідно склала 0,38 і 0,62.

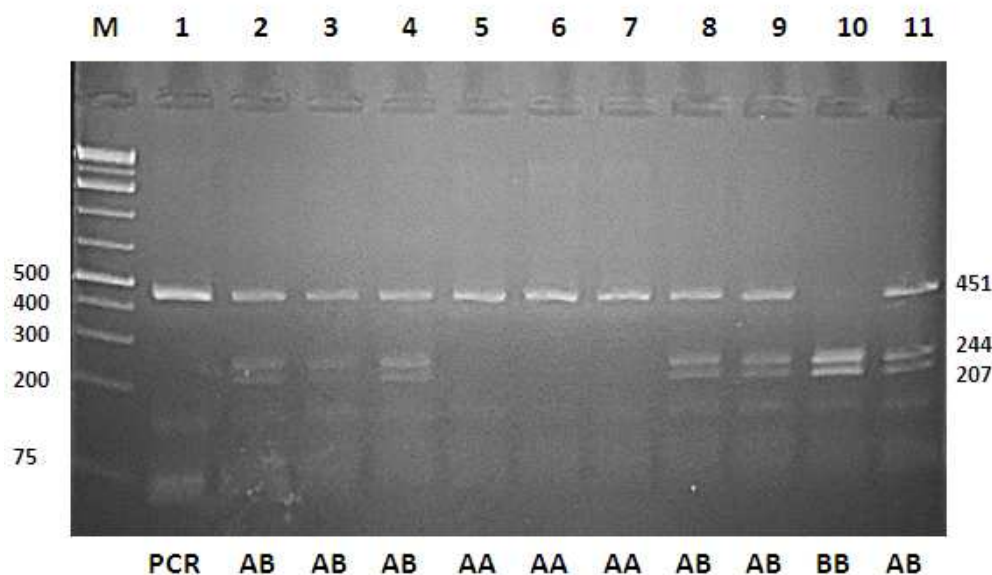
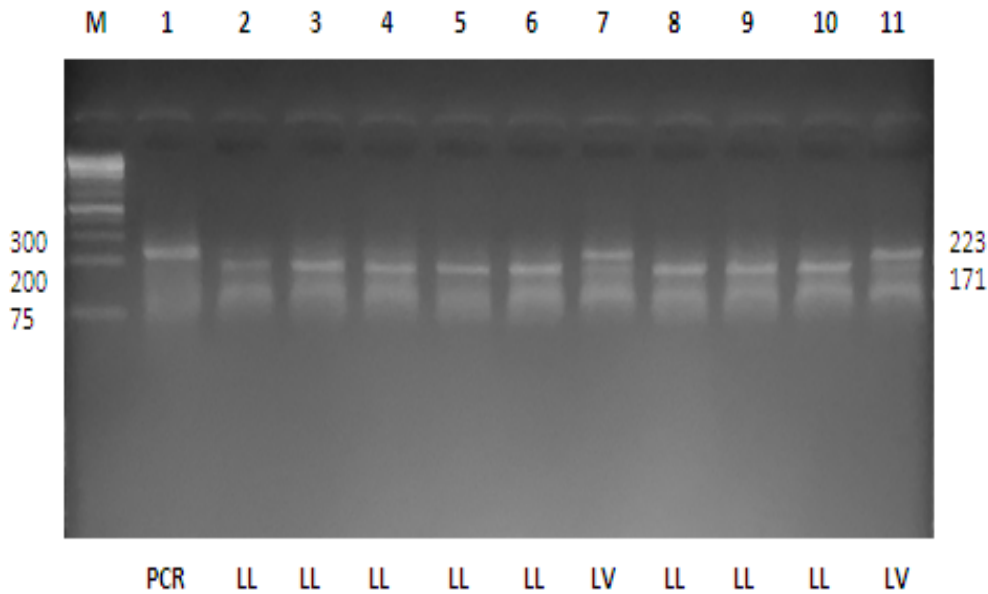


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном *PIT1*: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото.

Аналіз таблиці 3 показав, що у тварин лебединської породи очікувана гетерозиготність дещо вища за фактичну гетерозиготність, а доля гомозиготних генотипів становила 55 %. Розподіл генотипів за законом Харді-Вайнберга виявив генетичну рівновагу в дослідженій популяції корів за геном *PIT1*.

**Локус *GH***

За допомогою рестриктази *Alu I* визначили поліморфізм гена гормону росту в корів лебединської породи. За наявності або відсутності сайтів рестрикції було виявлено два алельних варіанти L та V і наявність двох генотипів (LL, LV) із трьох теоретично можливих: LL, LV, VV (рис. 3).



Ри

с. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном *GH*: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото.

Більшість досліджених тварин є носіями гомозиготного генотипу LL гена гормону росту. Частота переважаючого генотипу склала 70 % або 22 особини. Гетерозиготами виявилися 30 % або 10 голів. Генотип VV не був виявлений у жодної з досліджених нами тварин (табл. 4). Частота «бажаної» алелі L у тварин лебединської породи досягла 85 %, що у 5,67 раза більше за показник алелі V.

Переважання фактично отриманого рівня гетерозиготності над теоретично очікуваним виявилось не суттєвим, про що свідчить низьке значення  $\chi^2=0,62$ . Показник гомозиготності за геном гормон росту (*GH*) виявився високим і склав 70 %.

Таблиця 4

Популяційні особливості генетичної структури лебединської породи ВРХ за геном гормону росту

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		$\chi^2$	F <sub>IS</sub>
				L	V	H <sub>0</sub>	H <sub>E</sub>		
Лебединська	32	LL	0,7	0,85±0,018	0,15±0,018	0,300	0,255	0,62	-0,176
		LV	0,3						
		VV	-						

### Висновки

Аналізом результатів генотипування корів лебединської породи встановлено, що поліморфізм генів *PIT1* та *GH* представлений двома алелями *PIT1<sup>A</sup>* і *PIT1<sup>B</sup>*, *GH<sup>L</sup>* і *GH<sup>V</sup>*. Кількість селекційно-значущих генотипів склала *PIT1<sup>AA</sup>* = 15 % та *GH<sup>LL</sup>* = 70 %, а носіїв гетерозигот, які забезпечують генетичну різноманітність популяції, було, відповідно, 45 % та 30 %. Генетична структура лебединської породи характеризувалася високою концентрацією цінних з селекційної точки зору алельних варіантів *PIT1<sup>A</sup>* (0,38) і *GH<sup>L</sup>* (0,85).

Отримані нами результати свідчать про особливість популяційного генофонду лебединської породи корів та можуть бути використані як додатковий інструмент у селекційних програмах та програмах із збереження генофонду лебединської породи великої рогатої худоби.

1. Ebrahimi Hoseinzadeh Z., Mohammadabadi M., Esmailizadeh Koshkuieh A., Khezri A., Najmi Noori A. Association of PIT1 Gene with Milk Fat Percentage in Holstein Cattle. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2015. 5 (3), 572–582.
2. Fontanesi L., Calo D. G., Galimberti G., Negrini R., Marino R., Nardone A., Ajmone-Marsan P., Russo V. A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle. *Anim Genet.*, 2014. 45 (4), 576–580. doi: 10.1111/age.12164.
3. Glazko V. I., Erkenov T. A., Glazko T. T., Dzatoev K. M. Genetic structure of Karachai horses on ISSR-PCR markers. *Biogeosys. Tech.* 2016; 9 (3): 195–204. DOI: 10.13187/bgt.2016.9.195.
4. Heidari M., Azari M. A., Hasani S., Khanahmadi A., Zerehdaran S. Effect of polymorphic variants of GH, PIT-1 and BLG genes on milk production of Holstein cows. *Russian Journal of Genetics*, 2012. 48, 417–421. doi:10.1134/S1022795412040060.
5. Ünal E. Ö., Kepenek E. Ş., Dinç H., Özer F., Sönmez G., Togan I., Soysal M. I. Growth hormone (GH), prolactin (PRL), and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene polymorphisms in Turkish native cattle breeds. *Turkish Journal of zoology*, 2015. 39, 734–748. doi: 10.3906/zoo-1409-9.

*N. B. Mokhnachova*

Institute of Animal Breeding and Genetics and. a. M. V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine

#### BREED CHARACTERISTICS OF THE ALLELIC PROFILE OF THE PIT1 AND GH GENES OF THE UKRAINIAN INDIGENOUS LEBEDYN BREED OF COWS

The preservation of genetic diversity is a paramount concern in addressing global challenges today. The foundation of biological diversity hinges on its genetic components, and the loss of species and genetic variability poses a genuine threat to the biosphere. This is because the sustainability of natural ecosystems and agroecosystems depends directly on their genetic adaptability to changing environmental conditions.

In cattle, genes associated with milk yield play a crucial role, including genes related to milk proteins and hormones. Among these, the pituitary-specific transcription factor (PIT1) and growth hormone (GH) genes are of particular significance. In this study, we investigated the polymorphism of these genes in the Lebedyn breed of cattle.

A total of 2 gene polymorphisms, PIT1 and GH, were examined through molecular and genetic research conducted at the genetics laboratory of the Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets, part of the National Academy of Agrarian Science of Ukraine. The study utilized 32 DNA samples extracted from the venous blood of Lebedyn breed cows using the 'DNA Sorb-B' kit from AmpliSens. Genotyping was carried out through polymerase chain reaction (PCR-RFLP) analysis of restriction fragment length polymorphism, employing the “Tertsyk” amplifier for PCR. The resulting DNA restriction analysis products were assessed via electrophoresis in a 2–3% agarose gel containing ethidium bromide, with DNA fragment lengths determined using the GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder and Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder markers.

For the PIT1 gene analysis, a 451 bp amplified fragment was treated with the enzyme *Hinf*I, yielding the following allele frequencies: A (0.38) and B (0.62). The heterozygous AB genotype was the most prevalent (0.45), while homozygotes for the A allele constituted 0.15 of the population. In the case of the GH gene fragment (223 bp), hydrolysis was performed using the restriction enzyme *Alu*I. Analysis of allele frequency distribution indicated a high frequency of the L allele (0.85), with no animals exhibiting the homozygous GHVV genotype, and the GHLL genotype was present in 0.7 of the population.

These findings reveal unique features of the allelic spectrum of the PIT1 (V-0.62) and GH (L-0.85) genes specific to the Ukrainian indigenous Lebedyn breed of cows. Selectionally significant genotypes include PIT1AA (15%) and GHLL (70%), while heterozygote carriers, which contribute to genetic diversity within the population, account for 45% and 30%, respectively.

This study's results hold particular value due to the alarming decline in the population of local indigenous breeds and the imminent threat to the preservation of agricultural genetic resources.

*Key words: cows, indigenous breed of cows, Lebedyn breed, polymorphism, genes, growth hormone, pituitary transcription factor, allele.*

Надійшла 19.04.2023.