

Н. В. Ковалюк¹, Л. И. Якушева¹, Е. В. Кузьминова², Е. В. Ширяева¹, А. А. Абрамов²,
М. П. Семененко²

Связь полиморфизмов гена лептина с предрасположенностью крупного рогатого скота к кетозу

Аннотация. Лептин — гормон, вырабатываемый адипоцитами — клетками жировой ткани, вовлечённый в регуляцию пищевого поведения, влияющий на репродуктивную функцию, а также на рост и конституцию животных. В определенных физиологических состояниях у коров интенсивное использование собственных запасов жира приводит к избыточному появлению в крови летучих жирных кислот, которые, в свою очередь, становятся «сигнализаторами сытости» и влекут за собой сокращение потребления корма. В этот момент особую значимость приобретают генетические особенности животного, связанные с регулированием обмена веществ, пищевым поведением, способствующие или препятствующие возможному развитию кетоза. Цель проведенных исследований — установить возможное влияние генотипа по локусу лептина (полиморфизмы Y7F, A80V, R25C) на частоту возникновения кетоза у крупного рогатого скота.

Нами по локусам A80V, R25C, Y7F гена лептина генотипированы голштинские быки-производители (ПЦР/ПДРФ), принадлежащие компании WWS (США), у которых проведена оценка по дочерям и с высоким уровнем достоверности определены «коэффициенты устойчивости к кетозу» (Wellness trait index (WT\$) ketosis). Установлено, что группу быков-производителей с генотипом AARRY отличается достоверно более высокий средний показатель индекса «устойчивости дочерей к кетозу» по сравнению с группами AARCY и AVCCY, что может свидетельствовать о том, что генотип AARRY у быков — производителей является одним из генетических факторов, защищающих их дочерей от развития кетоза.

Кроме того, по тем же локусам генотипированы 150 коров голштинской породы, из которых 50 имели проявления кетоза, а 100 были здоровы. В группе здоровых коров голштинской породы, по сравнению с группой животных с кетозом и гепатопатологией, генотип AARCY встречался в три раза чаще.

Ключевые слова: ген лептина, локус A80V, локус R25C, локус Y7F, частота встречаемости, кетоз.

Авторы:

Ковалюк Наталья Викторовна — доктор биологических наук, e-mail: nvk1972@yandex.ru;

Якушева Людмила Ивановна — кандидат биологических наук, e-mail: lydmila.yakusheva@mail.ru;

Кузьминова Елена Васильевна — доктор ветеринарных наук, e-mail: niva1430@mail.ru;

Ширяева Елена Витальевна — кандидат биологических наук, e-mail: mellen14@yandex.ru;

Абрамов Андрей Андреевич — научный сотрудник, e-mail: labfarm2017@mail.ru;

Семененко Марина Петровна — доктор ветеринарных наук, e-mail: sever291@mail.ru.

¹ ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»; 350055, Россия, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская, 4,

² Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»; 350004, Россия г. Краснодар, ул. 1-я Линия, 1.

Введение. Лептин — гормон, вырабатываемый клетками жировой ткани, играет важную роль в метаболизме, в частности, регулирует аппетит и липидный обмен у животных [1].

Для гена лептина, расположенного в 4 хромосоме крупного рогатого скота, описано более 60 полиморфизмов (SNP). Структура гена представлена промоторной областью, 3 экзонами, 2 интронами и 3'UTR областью [2].

Ген лептина и его полиморфизм изучался в связи с энергообменом у мясного скота, молочной продуктивностью [3, 4, 5, 6, 7] и откормочными качествами [8] у голштинских животных. Китайскими исследователям удалось установить, что ряд *LEP* полиморфизмов связан с весом тела, обхватом сердца, среднесуточным приростом и длиной тела у аборигенного китайского скота [9]. Показано, что *LEP* полиморфизм ассоциирован с со-

держанием белка [10], жира в молоке и лёгкостью отёлов [1,11]. В более поздних исследованиях удалось установить связь двух *LEP* SNPs (g.-963C>T и c.357C>T) с возрастом при первом отеле, частотой наступления беременности после первого отела и интервалом между отёлами [12].

Возможно, что полиморфизмы R25C, Y7F (расположенные во 2 экзоне) и A80V (расположенный в 3 экзоне) ассоциированы с продуктивным долголетием [5,13]. Полиморфизм гена лептина связывают с содержанием соматических клеток в молоке [14], характеристиками роста и развития скота [10, 15]. Интересные ассоциации выявлены между полиморфизмом гена лептина и поведенческими особенностями скота. Так, японскими учёными установлено, что «дикий» полиморфизм лептина может быть полезен для выбора коров с более спокойным темпераментом [16].

Нами ранее генотипированы по локусам Y7F, A80V, R25C гена лептина 410 животных голштинской породы и установлено отсутствие полиморфизма аллелей SNP Y7F (сайт Y7F A→T в позиции 95689996 п.н. *LEP*), а также то, что генотип VV (сайт A80V) встречается в сочетании с генотипом YYCC (сайты Y7F, R25C) в 100% случаев из возможных сочетаний генотипов YYRCVV, YYRRVV, YYCCVV. Для SNP *LEP* — A80V у голштинского скота выявлена низкая частота встречаемости (0,07–0,09) гомозиготных животных с генотипом VV, при достаточно высокой частоте встречаемости гетерозиготных животных AV (0,43–0,45) [17].

Наличие разноплановых ассоциаций и высокой степени полиморфизма локуса свидетельствует о важной роли гена лептина в регуляции различных метаболических процессов в организме.

Кетоз представляет собой часто наблюдаемое нарушение обмена веществ лактирующих коров, для которого характерно повышение содержания кетоновых тел в жидкостях тела и снижение уровня глюкозы в крови. Кетоз отрицательно влияет на здоровье, воспроизводительные качества и молочную продуктивность коров [18, 19].

Рабочая гипотеза заключалась в том, что в начале лактации у высокопродуктивных животных интенсивное использование собственных запасов жира приводит к избыточному появлению в крови летучих жирных кислот (ЛЖК), которые в свою очередь становятся «сигнализаторами сытости» и влекут за собой сокращение потребления корма. В этот момент особую значимость приобретают генетические особенности животного (в частности, генотип по локусу лептина), связанные с регулированием обмена веществ, пищевым поведе-

нием, способствующие или препятствующие возникновению кетоза.

Цель исследований — попытка связать генотип по локусу лептина (полиморфизмы Y7F, A80V, R25C) с частотой возникновения кетоза у крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. В ходе исследований с использованием молекулярно-биологических методов проанализировано по локусам гена Y7F, A80V, R25C лептина 63 образца спермы быков — производителей голштинской породы World Wide Sires Russia (образцы предоставлены ООО НПО «Юг-Плем» — представителем WWS Russia в ЮФО) и 150 образцов крови коров голштинской породы, из которых 50 имели сочетанный диагноз — кетоз и жировая дистрофия печени, а 100 были здоровы.

Исследования на коровах голштинской породы проведены в условиях ООО «Хуторок» Тимашевского района Краснодарского края, из которых по принципу парных аналогов было сформировано две группы. Первая группа (n=50) — с субклинической формой кетоза и признаками патологии печени по типу жировой дистрофии и вторая (n=100) — здоровое поголовье. В группы отбирались коровы, ранжированные по физиологическому состоянию (2–3 лактация, 6–12 недель после отёла), результатам клинического обследования, биохимическому профилю крови, а также по показателям ультразвуковой диагностики печени. Формирование групп осуществлялось по мере поступления животных.

Биохимические исследования крови проводились на автоматизированном анализаторе Vitalab Selectra Junior, УЗИ-диагностику проводили при помощи ветеринарного ультразвукового сканера PS-380V. Диагноз на кетоз ставился на основании лабораторных исследований при концентрации общих кетоновых тел в крови выше 1,033 ммоль/л.

Для выделения ДНК из спермы и крови использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва.

Генотипирование по SNPs сайтам R25C, Y7F, A80V проводили с использованием ПЦР/ПДРФ [5]. ПЦР — продукты подвергались обработке соответствующими эндонуклеазами (Bsp13I, Bpu14I, PspEI) без предварительной очистки.

Последовательности праймеров, размер ПЦР — продуктов, необходимые эндонуклеазы рестрикции и величина фрагментов рестрикции приведены в таблице 1.

Фактические частоты встречаемости отдельных генотипов определяли путем соотношения количества особей, носителей генотипа, к общему количеству особей в анализируемой группе.

Достоверность различий сравниваемых показателей оценивали по критерию Стьюдента:

$$t_d = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S\bar{x}_1^2 + S\bar{x}_2^2}},$$

где t_d — критерий достоверности разности, $\bar{X}_1$ и $\bar{X}_2$ — средние значения двух сравниваемых групп, $S\bar{x}_1$ и $S\bar{x}_2$ — ошибки репрезентативности средних значений. Статистический анализ проведен при помощи программы Microsoft Excel.

Пользуясь тем, что в США создана база данных по крупным молочным коммерческим предприятиям, включающая несколько миллионов случаев кетоза, мы проанализировали находящиеся в свободном доступе данные о коэффициентах предрасположенности к кетозу дочерей генотипированных быков — производителей. Оценка по дочерям на устойчивость к кетозу (Wellness trait index (WT\$) ketosis) предоставляется WWS компанией Zoetis Genetics и размещена на сайте ct.wwsires.com (<http://ct.wwsires.com/sire-directory>). Компания Zoetis Genetics выпускает коммерческую генетическую систему оценки признаков здоровья молочного скота (в том числе и устойчивости к кетозу) с 2016 года. Чем выше значение индекса устойчивости к кетозу, тем меньшее количество дочерей быка сталкивается в течение жизни с возникновением подобной проблемы. На первоначальном этапе создания оценочных ин-

дексов здоровья уровни достоверности оценки были низкими, в настоящее время ситуация изменилась в лучшую сторону. Так, нами были учтены индексы «устойчивости к кетозу» только тех быков-производителей ($n=52$), уровень достоверности оценки которых по этому показателю был выше 80%. Общее количество дочерей таких производителей (согласно данным оценки 19.12.2019) составило 71520 из 20080 стад.

Установленные частоты встречаемости генотипов, а также средние значения Wellness trait index (WT\$) ketosis для каждого из генотипов представлены в таблице 2.

Группу быков-производителей с генотипом AARRYU отличает достоверно более высокий средний показатель индекса «устойчивости дочерей к кетозу» по сравнению с группами AARCYU и AVCCYU, что может свидетельствовать о том, что генотип AARRYU у быков — производителей позволяет снизить риски развития кетоза у их дочерей.

Установленные по результатам генотипирования частоты встречаемости полиморфизмов гена лептина R25C, Y7F и A80V у коров приведены в таблице 3.

Анализ таблиц 2–3 показывает, что в группах животных голштинской породы отсутствует полиморфизм по локусу Y7F, отмечается дефицит гомозигот VV по локусу A80V при значительном количестве гетерозигот.

Таблица 1. Некоторые компоненты и параметры ПЦР/ПДРФ для генотипирования по локусу лептина

SNP	Размеры ПЦР-продуктов, п.н.	Рестриктаза	Величина фрагментов рестрикции, п.н.	Последовательность праймеров
R25C2 экзонТ→С	305	Bsp13I	RR — 305 CR — 305,283 и 22* CC -283 и 22	F:CCAGGGAGTGC-CTTTCATTA R:GGTGTCTATCCTG-GACCTTCC
Y7F2 экзонА→Т	310	Bpu14I	YY — 310* YF — 310, 288 и 22 FF — 288 и 22	F:CTGCGTGGTC-TACAGCACACCTC R:AGGGCCAAAGC-CACAGGATTCTGA
A80V3 экзонС→Т	424	PspEI	AA — 424* AV- 424,398 и 26 VV- 398 и 26	F:CTGCGTGGTC-TACAGCACACCTC R:AGGGCCAAAGC-CACAGGATTCTGA

Таблица 2. Связь «Wellness trait index ketosis» дочерей с различными генотипами лептина (SNPs: Y7F, A80V, R25C) их отцов

Генотип быков-производителей	1	2	3	4	5	6
	AACCYY	AARCYU	AVRCYY	AARRYU	VVCCYY	AVCCYY
Частота встречаемости генотипа	0,13	0,19	0,25	0,21	0,06	0,16
Wellness trait index (WT\$) ketosis	101,5	101,0	101,6	108,0*(2,4)	—	99,5**(4,6)

Примечание: * $P \leq 0.05$

В группе здоровых коров голштинской породы, по сравнению с группой животных с кетозом и гепатопатологией, генотип AARCYU встречался в три раза чаще.

Анализ и обсуждение результатов. Подтверждены закономерности, установленные нами ранее: у генотипированных быков — производителей ($n=63$) и у коров голштинской породы ($n=150$) отсутствует полиморфизм аллелей SNP Y7F, также выявлены только комплексные LEP генотипы VVCCYY (SNP: R25C, Y7F, A80V), хотя теоретически должны были бы образовываться генотипы VVRCYY и VVRRYY, кроме того, частота встречаемости генотипа VV (SNP A80V) составляет лишь 0,06, в то время как генотип AV встречается в генотипированной группе голштинского скота с частотой 0,46.

Интерес к разведению молочного скота с повышенной устойчивостью к болезням является глобальным, и генетические оценки кетоза выиграли бы от дополнительной информации, предоставляемой генетическими маркерами.

Исследователями [19] была разработана панель для тестирования ассоциаций 998 предполагаемых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с риском возникновения кетоза. В состав панели вошли последовательности, выявляющие полиморфизм генов-кандидатов, по мнению авторов, связанных с развитием кетоза (на основании их роли

в метаболических путях, например, гены печёчных ферментов ACSL1 и CPT1A и др.). Результаты смешанной модели наследования для анализа одиночных ассоциаций SNP показали, что с исследуемым признаком ассоциированы 15 маркеров в 6 уникальных генов-кандидатов [19]. Ассоциации полиморфизма гена лептина в данном исследовании не рассматривались. Также нет упоминания о локусе лептина и связи его полиморфизма с устойчивостью к кетозу в другом GWAS исследовании [20], в котором подобные ассоциации выявлены для генов BMP4, HNF4A и APOBR, SOCS4, GCH1, ATG14, RGS6, CYP7A1 и MAPK3, участвующих в метаболизме инсулина или липидном обмене.

Заключение. Как метаболическое заболевание, кетоз развивается в результате взаимодействия многих факторов, поэтому, видимо, невозможно выделить какой-то конкретный полиморфизм, значимо влияющий на риск его возникновения, однако проведенные нами исследования указывают на то, что полиморфизм гена лептина имеет смысл рассматривать в данной связи (в доступной нам литературе подобная связь выявлена не была). В результате проведенных исследований установлено, что генотип отцов AARRYU для дочерей и генотип AARCYU для коров обладают определенной защитной ценностью в плане развития кетоза крупного рогатого скота.

Таблица 3. Частоты встречаемости LEP генотипов в группах коров голштинской породы

Частота встречаемости генотипа в группе	Генотип по локусу LEP					
	AACCYU	AARCYU	AVRCYY	AARRYU	VVCCYY	AVCCYY
С установленным кетозом	0,04	0,08	0,28	0,32	-	0,28
Здоровых животных	0,04	0,24	0,24	0,24	0,04	0,20

Исследования выполнены при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 19-416 233016)

Литература

1. Komisarek J. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle / J. Komisarek // Animal Science Papers and Reports. — 2010. — V.10. — P. 133–141.
2. Yoon D. H. Highly Polymorphic Bovine Leptin Gene / D. H. Yoon, B. H. Cho, B. L. Park et al. // J. Anim. Sci. — 2005. — V. 18. — № 11. — P. 1548–1551.
3. Kononoff P. J. Impacts of a leptin SNP on growth performance and carcass characters in finishing steers studied over time / P. J. Kononoff, P. J. Defoor, M. J. Engler et al. // J Anim Sci. — 2017. — № 95 (1). — P. 194–200. doi: 10.2527/jas.2016.0926.
4. Komisarek J. Impact of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits in cattle / J. Komisarek, J. Szyda, A. Michalak, Z. Dorynek // J. Anim. Feed Sci. — 2005. № 14. — P. 491–500.
5. Szyda J. Statistical Modeling of Candidate Gene Effects on Milk Production Traits in Dairy Cattle / J. Szyda, J. Komisarek // J. Dairy Sci. — 2007. — № 90. — P. 2971–2979.

6. Trakovická A. Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle / A. Trakovická, N. Moravčňková, R. Kasarda // *Acta Biochim Pol.* — 2013. — № 60(4). — P. 783–787.
7. Fontanesi L. A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle / L. Fontanesi, D. G. Calzani et al. // *Anim. Genet.* — 2014. — № 45(4). — P. 576–80. doi: 10.1111/age.12164.
8. Ardicli S. Comprehensive assessment of candidate genes associated with fattening performance in Holstein-Friesian bulls / S. Ardicli, H. Samli et al. // *Arch Anim Breed.* — 2019. — № 62(1). — P. 9–32. doi: 10.5194/aab-62-9-2019.
9. Fu W. Tissue expression and variation analysis of three bovine adipokine genes revealed their effect on growth traits in native Chinese cattle / W. Fu, N. Chen et al. // *Reprod Domest Anim.* — 2018. — P. 1227–1234. doi: 10.1111/rda.13244.
10. Citek J. Gene polymorphisms influencing on yield, composition and technological properties of milk from Czech Simmental and Holstein cows / Citek J., M. Brzakova, L. Hanusova et al // *Asian-Australas J Anim Sci.* — 2020. doi: 10.5713/ajas.19.0520.
11. Giblin L. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires / L. Giblin, S. Butler, B. Kearney, S. Waters et. al. // *BMC Genetics.* — 2010. — № 11. — P. 73. doi: 10.1186/1471-2156-11-73.
12. Jecminkova K. Association of leptin, toll-like receptor 4, and chemokine receptor of interleukin 8 C-X-C motif single nucleotide polymorphisms with fertility traits in Czech Fleckvieh cattle / K. Jecminkova, U. Müller et. al. // *Asian-Australas J Anim Sci.* — 2018. — №31(11). — P. 1721–1728. doi: 10.5713/ajas.17.0900.
13. Szyda J. Evaluation markers in selected genes for association with functional longevity of dairy cattle / J. Szyda, M. Morek-Kopec, J. Komisarek, A. Zarnecki // *BMC Genetics.* — 2011. — № 10. — P. 12–30. doi: 10.1186/1471-2156-12-30.
14. Metin Kiyici J. LEP and SCD polymorphisms are associated with milk somatic cell count, electrical conductivity and pH values in Holstein cows / J. Metin Kiyici, B. Akyüz et. al. // *Anim Biotechnol.* — 2019. — P. 1–6. doi: 10.1080/10495398.2019.1628767
15. Nkrumah J. D. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition / J. D. Nkrumah, C. Li et al. // *Can J Anim Sci.* — 2004. — № 84. — P. 211–219. <https://doi.org/10.4141/A03-033>.
16. Aierqing S. Association between temperament and polymorphisms of CRH and leptin in Japanese Black Cattle / S. Aierqing, A. Nakagawa, T. Bungo // *J Adv Vet Anim Res.* — 2019. — № 17. — P. 1–5. doi: 10.5455/javar.2020.g386.
17. Ковалюк Н. В. Возможные причины и последствия распространения отдельных аллельных вариантов локуса LEP в группах айрширского и голштинского скота / Н. В. Ковалюк, В. Ф. Сацук, Е. В. Мачульская, Ю. Ю. Шахназарова // *Генетика.* — 2018. — № 12. — С. 1-6. DOI: 10.1134/S0016675818120068 // DOI: 10.1134/S1022795418120062.
18. Фомичёв Ю. П., Довыденков Г. В. Комплексное применение холинхлорида, L-карнитина и экости-мула-2 в профилактике кетоза у высокопродуктивных молочных коров / Ю. П. Фомичёв, Г. В. Довыденков // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* — 2010. — № 4. — С. 244–248.
19. Kroezen V. Candidate gene association analyses for ketosis resistance in Holsteins / V. Kroezen, F. S. Schenkel, F. Miglior et. al. // *J Dairy Sci.* — 2018. — №101(6). — P. 5240–5249. doi: 10.3168/jds.2017-13374.
20. Huang H. Genome-wide association study identifies energy metabolism genes for resistance to ketosis in Chinese Holstein cattle / H. Huang, J. Cao, et. al. // *Anim Genet.* — 2019. — № 50(4). — P. 376–380. doi: 10.1111/age.12802.

Kovalyuk N.¹, Yakusheva L.¹, Kuzminova E.², Shiryayeva E.¹, Abramov A.², Semenenko M.²

Association of leptin gene polymorphisms with predisposition of cattle to ketosis

Abstract. *Leptin is a hormone produced by adipocytes — cells of adipose tissue, involved in the regulation of eating behavior, affecting the reproductive function, as well as the growth and Constitution of animals. In certain physiological conditions in cows, intensive use of their own fat reserves leads to excessive appearance of volatile fatty acids in the blood, which, in turn, become «satiety signals» and lead to a reduction in feed consumption. At this point, the genetic characteristics of the animal associated with the regulation of metabolism, eating behavior, contributing to or preventing the possible development of ketosis become particularly important. The aim of the research is to determine the possible influence of the leptin locus genotype (y7f, a80v, R25C polymorphisms) on the frequency of ketosis in cattle.*

We have genotyped Holstein breeding bulls (PCR/RFLP) belonging to WWS (USA) based on the A80V, R25C, and Y7F loci of the leptin gene, which were evaluated by their daughters and «ketosis resistance coefficients» (Wellness trait index (WT\$) ketosis) were determined with a high level of confidence. It was found that the group of breeding bulls with the AARRY genotype is distinguished by a significantly higher average index of «daughters' resistance to ketosis» compared to the AARCY and AVCCY groups, which may indicate that the AARRY genotype in breeding bulls is one of the genetic factors protecting their daughters from the development of ketosis.

In addition, 150 Holstein cows were genotyped using the same loci, of which 50 had ketosis and 100 were healthy. In the group of healthy Holstein cows, compared with the group of animals with ketosis and hepatopathology, the AARCY genotype was three times more common.

Keywords: leptin gene, A80V locus, R25C locus, Y7F locus, frequency of occurrence, ketosis.

Authors:

Kovalyuk N. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), e-mail: nvk1972@yandex.ru;

Yakusheva L. — PhD (Biol. Sci.), e-mail: lydmila.yakusheva@mail.ru;

Kuzminova E. — Dr. Habil. (Vet. Sci.), e-mail: niva1430@mail.ru;

Shiryayeva E. — PhD (Biol. Sci.), e-mail: mellen14@yandex.ru;

Abramov A. — researcher, e-mail: labfarm2017@mail.ru;

Semenenko M. — Dr. Habil. (Vet. Sci.), e-mail: sever291@mail.ru.

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution Krasnodar Scientific Center for Animal Science and Veterinary Medicine; 350055, Russia, Krasnodar, Znamenskiy, st. Pervomayskaya, 4,

² Krasnodar Scientific Research Veterinary Institute — a separate structural subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Krasnodar Scientific Center for Animal Science and Veterinary Medicine»; 350004, Russia Krasnodar, st. 1st Line, 1.

References

1. Komisarek J. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle / J. Komisarek // Animal Science Papers and Reports. — 2010. — V.10. — P. 133–141.
2. Yoon D. H. Highly Polymorphic Bovine Leptin Gene / D. H. Yoon, B. H. Cho, B. L. Park et al. // J. Anim. Sci. — 2005. — V. 18. — № 11. — P. 1548–1551.
3. Kononoff P. J. Impacts of a leptin SNP on growth performance and carcass characters in finishing steers studied over time / P. J. Kononoff, P. J. Defoor, M. J. Engler et al. // J Anim Sci. — 2017. — № 95(1). — P. 194–200. doi: 10.2527/jas.2016.0926.
4. Komisarek J. Impact of leptin gene polymorphism on breeding value for milk production traits in cattle / J. Komisarek, J. Szyda, A. Michalak, Z. Dorynek // J. Anim. Feed Sci. — 2005. №14. — P. 491–500.
5. Szyda J. Statistical Modeling of Candidate Gene Effects on Milk Production Traits in Dairy Cattle / J. Szyda, J. Komisarek // J. Dairy Sci. — 2007. — № 90. — P. 2971–2979.

6. Trakovická A. Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle / A. Trakovická, N. Moravčňková, R. Kasarda // *Acta Biochim Pol.* — 2013. — № 60(4). — P. 783–787.
7. Fontanesi L. A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle / L. Fontanesi, D. G. Calzani et al. // *Anim. Genet.* — 2014. — № 45(4). — P. 576–80. doi: 10.1111/age.12164.
8. Ardicli S. Comprehensive assessment of candidate genes associated with fattening performance in Holstein-Friesian bulls / S. Ardicli, H. Samli et al. // *Arch Anim Breed.* — 2019. — № 62(1). — P. 9–32. doi: 10.5194/aab-62-9-2019.
9. Fu W. Tissue expression and variation analysis of three bovine adipokine genes revealed their effect on growth traits in native Chinese cattle / W. Fu, N. Chen et al. // *Reprod Domest Anim.* — 2018. — P. 1227–1234. doi: 10.1111/rda.13244.
10. Citek J. Gene polymorphisms influencing on yield, composition and technological properties of milk from Czech Simmental and Holstein cows / Citek J., M. Brzakova, L. Hanusova et al // *Asian-Australas J Anim Sci.* — 2020. doi: 10.5713/ajas.19.0520.
11. Giblin L. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires / L. Giblin, S. Butler, B. Kearney, S. Waters et. al. // *BMC Genetics.* — 2010. — № 11. — P. 73. doi: 10.1186/1471-2156-11-73.
12. Jecminkova K. Association of leptin, toll-like receptor 4, and chemokine receptor of interleukin 8 C-X-C motif single nucleotide polymorphisms with fertility traits in Czech Fleckvieh cattle / K. Jecminkova, U. Müller et. al. // *Asian-Australas J Anim Sci.* — 2018. — №31(11). — P. 1721–1728. doi: 10.5713/ajas.17.0900.
13. Szyda J. Evaluation markers in selected genes for association with functional longevity of dairy cattle / J. Szyda, M. Morek-Kopec, J. Komisarek, A. Zarnecki // *BMC Genetics.* — 2011. — № 10. — P. 12–30. doi: 10.1186/1471-2156-12-30.
14. Metin Kiyici J. LEP and SCD polymorphisms are associated with milk somatic cell count, electrical conductivity and pH values in Holstein cows / J. Metin Kiyici, B. Akyüz et. al. // *Anim Biotechnol.* — 2019. — P. 1–6. doi: 10.1080/10495398.2019.1628767.
15. Nkrumah J. D. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition / J. D. Nkrumah, C. Li et al. // *Can J Anim Sci.* — 2004. — № 84. — P. 211–219. <https://doi.org/10.4141/A03-033>.
16. Aierqing S. Association between temperament and polymorphisms of CRH and leptin in Japanese Black Cattle / S. Aierqing, A. Nakagawa, T. Bungo // *J Adv Vet Anim Res.* — 2019. — № 17. — P. 1–5. doi: 10.5455/javar.2020.g386.
17. Kovalyuk N. V. Possible causes and consequences of the spread of individual allelic variants of the LEP locus in groups of Ayrshire and Holstein cattle / N. V. Kovalyuk, V. F. Satsuk, E. V. Machulskaya, Yu. Yu. Shakhnazarova // *Genetics.* — 2018. — №12. — P. 1–6. DOI: 10.1134 / S0016675818120068 // DOI: 10.1134 / S1022795418120062.
18. Fomichev Y. P. Complex use of choline chloride, L-carnitine and eco-stimulus-2 in the prevention of ketosis in highly productive dairy cows / Y. P. Fomichev, G. V. Dovydenkov // *Bulletin of the Orenburg State Agrarian University.* — 2010. — №4. — P. 244–248.
19. Kroezen V. Candidate gene association analyses for ketosis resistance in Holsteins / V. Kroezen, F. S. Schenkel, F. Miglior et. al. // *J Dairy Sci.* — 2018. — № 101(6). — P. 5240–5249. doi: 10.3168/jds.2017-13374.
20. Huang H. Genome-wide association study identifies energy metabolism genes for resistance to ketosis in Chinese Holstein cattle / H. Huang, J. Cao, et. al. // *Anim Genet.* — 2019. — № 50(4). — P. 376–380. doi: 10.1111/age.12802.