

Молекулярная генетика

Рубрика

doi.org/10.31043/2410-2733-2022-4-5-13

УДК 636.2: 575.224.22: 591.1

О. С. Митяшова, О. В. Костюнина, О. В. Алейникова, Н. В. Бардуков, И. Ю. Лебедева

Ассоциация SNP, локализованного вблизи гена *DIO2*, с гормональными профилями тиреоидной оси и показателями фертильности у коров черно-пестрой породы**Аннотация.**

Тиреоидные гормоны могут влиять на воспроизводительную функцию коров посредством регуляции различных метаболических путей. Активность тиреоидной системы находится под контролем дейодиназ (*DIO*) трех типов. У крупного рогатого скота существует несколько генетических вариантов по генам *DIO1* и *DIO3*, однако нет никакой информации о полиморфизме гена *DIO2*.

Цель: провести поиск генетических вариантов по SNP в гене *DIO2* и в близлежащих регионах и исследовать их ассоциацию с предродовым и послеродовым тиреоидным профилем и показателями репродуктивной способности у коров молочного типа.

Материалы и методы. В экспериментах использовали коров черно-пестрой породы 2-4 отела. Перед отелом и после отела у животных брали кровь для определения концентрации гормонов методом ИФА. Оценку лютеальной активности яичников проводили на основании УЗ-исследования и содержания прогестерона в крови. Генотипирование было выполнено на 48 образцах ДНК коров с помощью биочипа Bovine GGP 150K.

Результаты. В пределах целевого гена не было найдено SNP, имеющих на чипе Bovine GGP 150K. Для исследований был отобран SNP BovineHD1000026761, локализованный перед геном *DIO2*, с частотой генотипов AA – 45,83%, AG – 47,92%, GG – 6,25%. Обнаружено снижение концентрации общего тироксина (Т4) в крови коров с генотипом AA и AG в 1,4 раза ($p < 0,01$) за 2 недели до отела, по сравнению с таковой за 4 недели, и ее дальнейшее понижение в 1,5-1,9 раза ($p < 0,001$ – $p < 0,05$) к 1-й неделе лактации. С 6-й по 2-ю неделю до родов этот показатель был в 1,5-1,6 раза выше у особей с генотипом AG, чем у особей с генотипом AA ($p < 0,001$ – $p < 0,05$). У животных с генотипом AG было выявлено снижение концентрации реверсивного Т3 в крови (в 1,4 раза, $p < 0,05$) между 4-й неделей до отела и 1-й неделей лактации. В то же время эта концентрация была относительно постоянной у животных двух других групп. Кроме того, у животных с генотипом AG содержание гТ3 в крови было в 1,3 раза ниже, чем у животных с генотипом AA с 3-й по 7-ю неделю лактации. У коров с гетерозиготным генотипом соотношение Т4/Т3 возрастало в 2,1 раза ($p < 0,001$) между 2-й неделей до отела и 1-й неделей после отела, а затем снижалось в 2,2 раза ($p < 0,001$) к 3-й неделе. Через 1 неделю лактации данное соотношение было в 1,9 раза выше ($p < 0,001$), чем у животных с генотипом AA. При этом частота встречаемости особей с наиболее коротким периодом восстановления функции яичников и сервис-периодом была самой низкой в группе с генотипом AA.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что SNP BovineHD1000026761, локализованный перед геном *DIO2*, ассоциирован с длительными изменениями уровней тиреоидных гормонов в предотельный и послеотельный периоды.

Ключевые слова: коровы черно-пестрой породы, тиреоидные гормоны, дейодиназа второго типа, репродуктивная функция, полиморфизм, генотип.

Авторы:

Митяшова Ольга Сергеевна — кандидат биологических наук; e-mail: mityashova_o@mail.ru;

Костюнина Ольга Васильевна — доктор биологических наук; e-mail: kostolan@yandex.ru;

Алейникова Ольга Викторовна — младший научный сотрудник; e-mail: 68ovk@mail.ru;

Бардуков Николай Владимирович — научный сотрудник; e-mail: bardukv-nikolaj@mail.ru;

Лебедева Ирина Юрьевна — доктор биологических наук; e-mail: irltdv@mail.ru.

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста; 142132, Российская Федерация, Московская область, Городской округ Подольск, п. Дубровицы, 60.

Введение. В послеродовой период у коров молочного направления продуктивности наблюдаются различные нарушения воспроизводительной функции, в основе которых лежат причины метаболического характера [1]. Во время завершающего этапа подготовки к лактации и на ее ранней стадии организм таких животных испытывает повышенную потребность в энергетических и пластических ресурсах, что приводит к формированию отрицательного энергетического баланса (ОЭБ), ухудшающего состояние репродуктивной системы. Для частичного восполнения дефицита энергии и нутриентов мобилизуются внутренние резервы организма, главным образом, жировые запасы [2], вследствие чего в крови коров повышается содержание неэстерифицированных жирных кислот и кетоновых тел [3, 4]. В свою очередь, эти метаболиты оказывают негативное влияние на репродуктивную функцию и снижают общий иммунитет, ухудшая тем самым здоровье животных [1, 4, 5].

Тиреоидные гормоны участвуют в регуляции обмена веществ, а их концентрация в крови крупного рогатого скота связана с энергетическим балансом [6-8]. Показано, что у голштинских и голштинизированных коров сывороточное содержание тироксина снижается через 1 неделю после родов [9, 10], что рассматривается как один из способов адаптации к ОЭБ, вызывающий замедление обмена веществ при недостатке питательных ресурсов [11]. Кроме того, гормоны щитовидной железы служат ключевыми регуляторами липидного обмена [6]. У крупного рогатого скота соотношение между тироксином и трийодтиронином ассоциировано с ожирением печени и концентрацией неэстерифицированных жирных кислот в крови [12, 13]. Таким образом, тиреоидные гормоны могут влиять на воспроизводительную функцию коров, особенно во время перехода от беременности к лактации, посредством регуляции различных метаболических путей. Это подтверждается данными о том, что концентрация тироксина и трийодтиронина в крови голштинских и голштинизированных коров в послеродовой период связана с состоянием их репродуктивной системы [10, 14, 15].

Активность тиреоидной системы зависит от метаболизма тиреоидных гормонов, который находится под контролем дейодиназ трех типов [6]. Активацию тироксина (Т4) путем конверсии в более биологически активную форму трийодтиронин (Т3) катализируют дейодиназы 1-го (*DIO1*) и 2-го типа (*DIO2*). Инактивация тироксина посредством превращения его в реверсивный трийодтиронин (rT3) находится под контролем *DIO1*

и дейодиназы 3-го типа (*DIO3*), в то время как последняя также инактивирует трийодтиронин, превращая его в дийодтиронин [16]. Исследования на свиньях показали наличие ассоциаций между однонуклеотидным полиморфизмом гена *DIO3* и репродуктивными качествами свиноматок [17, 18]. Кроме того, у человека обнаружена связь мутации Thr92Ala в гене *DIO2* с повышенным риском развития инсулиновой резистентности [19], которая служит одной из причин ухудшения репродуктивной функции в послеродовой период у коров молочных пород [1]. У крупного рогатого скота, как и у других млекопитающих, существует несколько генетических вариантов по генам *DIO1* и *DIO3* [20, 21], однако нет никакой информации о полиморфизме гена *DIO2*.

Цель исследований — провести поиск генетических вариантов по SNP в гене *DIO2* и в близлежащих регионах и исследовать их ассоциацию с предродовым и послеродовым тиреоидным профилем и показателями репродуктивной способности у коров молочного типа.

Материалы и методы. При проведении исследований использованы коровы черно-пестрой голштинизированной породы 2-4 отела с продуктивностью от 5,5 до 7,5 тыс. кг молока за 305 дней лактации, содержащиеся в ЭХ "Клёново-Чегодаево". Перед отелом (за 6, 4 и 2 недели) и после отела (через 1, 3, 7 и 13 недель) у опытных животных брали кровь для определения концентрации тиреоидных гормонов и прогестерона. Для дальнейшего анализа отобрали 48 особей, не имевших клинических признаков послеродовых гинекологических заболеваний. Оценку лютеальной активности яичников проводили на основании УЗИ-исследования (наличие, размер или отсутствие фолликулов и желтых тел на обоих яичниках) и содержания прогестерона в крови коров через 3, 7 и 13 недель после отела. При этом минимальная концентрация прогестерона в крови коров, соответствующая наличию функционального желтого тела, составляла не менее 1 нг/мл [22]. Продолжительность сервис-периода животных устанавливали через 12 месяцев после отела, основываясь на данных зоотехнического и племенного учета.

Концентрацию гормонов в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов ООО «Хема», Россия (прогестерон), «DRG Instruments GmbH», Германия (Т4, Т3) и «Diagnostics Biochem Canada, Inc.», Канада (rT3). Измерение показателей проводили на планшетном спектрофотометре Униплан («Пикон», Россия). Чувствительность ИФА составляла 0,25 нмоль/л для про-

гестерона, 6,4 нмоль/л для Т4, 0,31 нмоль/л для Т3, 0,03 нмоль/л для гТ3; коэффициент вариации во всех анализах не превышал 19 %.

Генотипирование было выполнено на 48 образцах ДНК коров экспериментальной группы. Для выделения ДНК использовали коммерческий

набор Экстран-1 (ООО «Синтол», Россия). Оценку качества ДНК проводили с помощью спектрофотометра NanoDrop8000 («ThermoFisher Scientific», США). Соотношение А260/280 для выделенной ДНК находилось в диапазоне 1,8–2,0. Измерение концентрации ДНК проводили с помощью флуориметра Qubit 4.0 («Invitrogen / Life Technologies», США). Для процедуры генотипирования коров был использован биочип Bovine GGP 150K («Neogen», США) плотностью покрытия нуклеотидными мутациями (SNP) около 140 тыс. ед. и ридер чипов Iscan (Illumina, США). Данные генотипирования были интерпретированы в программе GenomeStudio v2.0 («Illumina», San Diego, CA, USA). Качество генотипирования (Call Rate) исследованных образцов составило более 0,99. По результатам генотипирования был сформирован финал-репорт. С использованием базы данных NCBI определяли локализацию гена *DIO2* (хромосома, позиции). На основании манифест-файла определяли SNP, имеющиеся на чипе, лежащие в пределах гена *DIO2* или в непосредственной близости от него.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы SigmaStat 4.0. Данные по содержанию тиреоидных гормонов в крови подвергали однофакторному и двухфакторному дисперсионному анализу с повторными измерениями. В качестве внутригруппового фактора служило время относительно отела, межгруппового – генотип животных. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки. Для анализа различий по частоте встречаемости коров с разными признаками фертильности в группах с разным генотипом был использован критерий Фишера.

Результаты и обсуждение. Согласно базе данных NCBI ген *DIO2* локализован на BTA 10 AC_000167.1 (92623797..92632934, complement), сборка генома Bos_taurus_UMD_3.1.1 (GCF_000003055.6). По результатам генотипирования в пределах целевого гена не было найдено SNP, имеющихся на чипе Bovine GGP 150K. Для дальнейших исследований был отобран SNP BovineHD1000026761 в позиции 92614676, локализованный перед геном *DIO2*, с частотой аллелей А – 0,70, G – 0,30 и генотипов

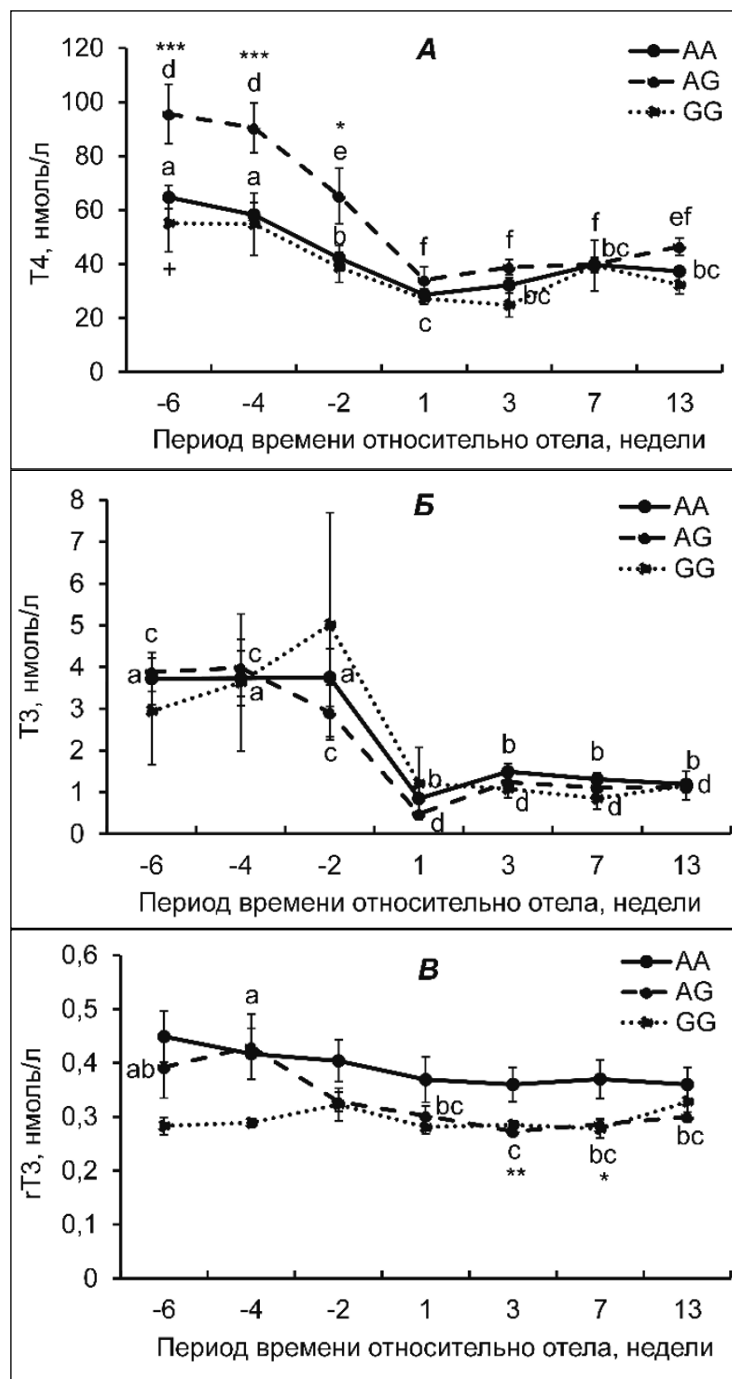


Рис. 1. Концентрация тиреоидных гормонов в различные периоды до и после отела в крови коров с полиморфными вариантами SNP BovineHD1000026761, локализованного вблизи гена *DIO2*. А: концентрация общего тироксина [Т4]. Б: концентрация общего трийодтиронина [Т3]. В: концентрация реверсивного трийодтиронина [гТ3]. Средние значения, помеченные разными буквенными индексами, достоверно различаются внутри одной группы ($p < 0,05$ – $p < 0,001$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (по сравнению с группой AA); + $p < 0,05$ (по сравнению с группой AG).

AA – 45,83%, AG – 47,92%, GG – 6,25%.

В целом, только 3 из 48 особей были носителями генотипа GG, что приводило к невозможности выявить статистически значимые различия в этой группе вследствие недостаточности выборки и высокой вариабельности гормональных данных.

Обнаружено снижение концентрации общего Т4 в крови коров с генотипом AA и AG в 1,4 раза ($p < 0,01$) за 2 недели до отела, по сравнению с таковой за 4 недели, и ее дальнейшее понижение в 1,5-1,9 раза ($p < 0,001$ – $p < 0,05$) к 1-й неделе лактации (рис. 1 А). При этом с 6-й по 2-ю неделю до родов этот показатель у особей с гетерозиготным по аллелю А генотипом был в 1,5-1,6 раза выше, чем у особей с гомозиготным генотипом ($p < 0,001$ – $p < 0,05$). У животных с генотипом GG содержание Т4 в динамике сухостойного и послеотельного периодов было сходно с таковым в группе AA и за 6 недель до отела было в 1,7 раза ниже ($p < 0,05$), чем в группе AG.

Содержание общего Т3 в крови коров с генотипом AA и AG снижалось в 4,4-6,1 раза между 2-й неделей до отела и 1-й неделей лактации ($p < 0,001$) и затем не изменялось (рис. 1 Б). У носителей генотипа GG паттерн изменения уровня Т3 в течение исследуемого периода был аналогичен.

Снижение концентрации реверсивного Т3 в крови (в 1,4 раза, $p < 0,05$) было выявлено только у животных с гетерозиготным генотипом между 4-й неделей до отела и 1-й неделей лактации (рис. 1 В). В то же время эта концентрация была относительно постоянной у животных двух других групп. Кроме того, у животных с генотипом AG содержание rТ3 в крови было в 1,3 раза ниже, чем у животных с генотипом AA с 3-й по 7-ю неделю лактации.

У коров с генотипом AG соотношение Т4/Т3 возрастало в 2,1 раза ($p < 0,001$), т.е. сдвигалось в сторону менее активного гормона, между 2-й неделей до отела и 1-й неделей после отела, а затем снижалось в 2,2 раза ($p < 0,001$) к 3-й неделе (рис. 2 А). Тогда как у особей с генотипом AA данное соотношение не изменялось на протяжении всего периода наблюдений и через 1 неделю лактации было в 1,9 раза ниже ($p < 0,001$), чем у особей с гетерозиготным генотипом.

Динамика изменений в соотношении Т3/rТ3 была сходной в группах AA и AG при переходе от поздней стельности к лактации (рис. 2 Б). Этот показатель понижался в 3,8-6,0 раз ($p < 0,001$) между 2-й неделей до отела и 1-й неделей лактации, что указывало на сдвиг баланса в сторону неактивного тиреоидного гормона у коров обоого генотипа. Временной профиль для Т3/rТ3 в группе GG был подобен таковому в двух других группах, но высокая вариабельность средних значений не позволяла статистически сравнить изменения.

Анализ частоты встречаемости коров с различными признаками фертильности в группах с полиморфными вариантами SNP, локализованного вблизи гена *DIO1*, не выявил прямую связь показателей воспроизводительной способности с генотипом животных (табл. 1). Тем не менее частота встречаемости особей с наиболее коротким периодом восстановления функции яичников и сервис-периодом была самой низкой у коров с генотипом AA.

Ранее были опубликованы результаты исследований, продемонстрировавшие ассоциацию различных мутаций в гене *DIO1* с изменением концентрации сво-

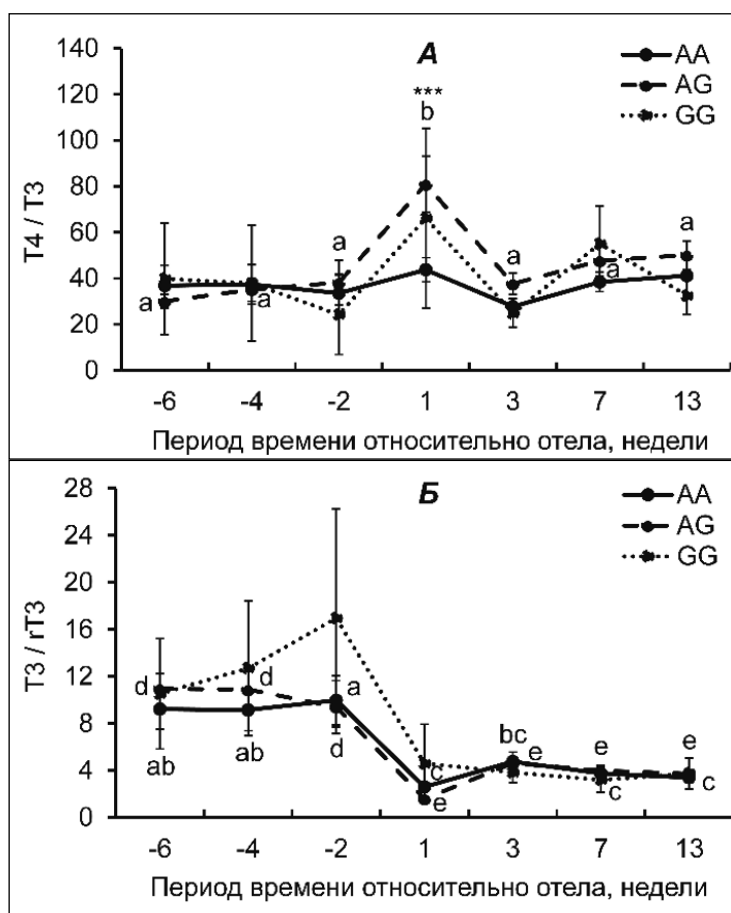


Рис. 2. Соотношение концентраций тиреоидных гормонов в различных периоды до и после отела в крови коров с полиморфными вариантами SNP BovineHD1000026761, локализованного вблизи гена *DIO2*. А: соотношение общего тироксина и общего трийодтиронина (Т4/Т3). Б: соотношение общего трийодтиронина и реверсивного трийодтиронина (Т3/rТ3). Средние значения, помеченные разными буквенными индексами, достоверно различаются внутри одной группы ($p < 0,05$ – $p < 0,001$). *** $p < 0,001$ (по сравнению с группой AA).

бодного Т4, свободного Т3 и реверсивного Т3, а также баланса между этими концентрациями в крови человека [23, 24]. Показано также, что SNP Thr92Ala в гене *DIO2* обуславливает снижение конверсии Т4 в Т3 [25]. Кроме того, у пациентов с метаболическим синдромом и с диабетом второго типа обнаружена связь полиморфных вариантов генов *DIO1* и *DIO2*, соответственно, с повышением индекса инсулинорезистентности [19, 26]. Следовательно, различные мутации в генах *DIO1* и *DIO2* могут детерминировать тиреоидный статус и патологические функциональные изменения в организме человека.

В нашем исследовании у коров не было выявлено однонуклеотидного полиморфизма гена *DIO2*. Поскольку близлежащие к гену регионы, содержащие некодирующие последовательности, могут участвовать в регуляции генной экспрессии [27], нами был выбран SNP BovineHD1000026761 в позиции 92614676, локализованный перед геном *DIO2*. Генотип AA этой SNP-мутации был ассоциирован с пониженной концентрацией общего Т4 с 6-й по 2-ю неделю до отела, повышенной концентрацией rТ3 с 3-й по 7-ю неделю лактации и сдвигом баланса Т4/Т3 в сторону более активного гормона через 1 неделю после отела, по сравнению с генотипом AG. Для генотипа AA также была характерна пони-

женная частота встречаемости коров с высокой фертильностью, однако различия по этому показателю с генотипом AG не были достоверными.

Как известно, *DIO2* катализирует в гипофизе конверсию Т4 в Т3, тогда как последний оказывает ингибирующее влияние на секрецию тиреотропного гормона, стимулирующего синтез Т4 в щитовидной железе [28]. Кроме того, *DIO2* способна образовывать гетеродимеры с *DIO3*, которая отвечает за превращение Т4 в rТ3, и таким образом ингибировать ее активность [29]. Таким образом, модуляция экспрессии гена *DIO2* могла бы приводить к изменению секреции Т4 щитовидной железой и конверсии Т4 в rТ3 в печени, что обуславливало бы изменение концентрации данных гормонов в крови. Это позволяет предположить, что исследованный нами SNP, локализованный вблизи гена *DIO2*, оказывает регуляторное влияние на его транскрипцию.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что SNP BovineHD1000026761, локализованный перед геном *DIO2*, ассоциирован с длительными изменениями уровней тиреоидных гормонов в предотельный и послетельный периоды. Тем не менее, эти изменения не были связаны с существенным изменением показателей фертильности у черно-пестрых голштинизированных коров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-016-00266).

Таблица 1. Частота встречаемости коров с разными признаками фертильности в группах с полиморфными вариантами SNP BovineHD1000026761, локализованного вблизи гена *DIO2*

Признаки фертильности	Генотип		
	AA, n=22	AG, n=23	GG, n=3
Период восстановления функции яичников:			
< 7 недель после отела	45,45%	52,17%	66,67%
7-13 недель после отела	27,27%	8,70%	33,33%
> 13 недель после отела	27,27%	39,13%	0%
Сервис-период:			
< 120 дней	27,27%	39,13%	66,67%
120-240 дней	40,91%	26,09%	33,33%
240-370 дней	31,82%	34,78%	0%

Литература

1. Chagas L. M. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows / L. M. Chagas, J. J. Bass, D. Blache, et al. // J. Dairy Sci. — 2007. — V. 90. — P. 4022-4032. doi: 10.3168/jds.2006-852.
2. Wathes D.C. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow/ D.C. Wathes, A.M. Clempson, G.E. Pollott // Reprod. Fertil. Dev. — 2012. — V. 25. — P. 48-61. doi: 10.1071/RD12272.
3. Gonzalez F.D. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows / F.D. Gonzalez, R. Muico, V. Pereira et al. // J. Vet. Sci. — 2011. — V. 12. — P. 251-255. doi: 10.4142/jvs.2011.12.3.251.

4. Shin E. K. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows / E. K. Shin, J. K. Jeong, I. S. Choi et al. // *Theriogenology*. – 2015. – V. 84. – P. 252-260. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.014.
5. Wathes D. C. Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow / D. C. Wathes // *Reprod. Domest. Anim.* – 2012. – V. 47. – Suppl. 4. – P. 304-312. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02090.x.
6. Mullur R. Thyroid hormone regulation of metabolism / R. Mullur, Y.Y. Liu, G.A. Brent // *Physiol. Rev.* – 2014. – V. 94. – P. 355-382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013.
7. Capuco A. V. Effect of somatotropin on thyroid hormones and cytokines in lactating dairy cows during ad libitum and restricted feed intake / A. V. Capuco, D. L. Wood, T. H. Elsasser et al. // *J. Dairy Sci.* – 2001. – V. 84. – P. 2430-2439. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74693-0.
8. Mohebbi-Fani M. Thyroid hormones and their correlations with serum glucose, beta hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, cholesterol, and lipoproteins of high-yielding dairy cows at different stages of lactation cycle / M. Mohebbi-Fani, S. Nazifi, E. Rowghani et al. // *Comp. Clin. Pathol.* – 2009. – V. 18. – P. 211-216. doi: 10.1007/s00580-008-0782-7.
9. Fiore E. Serum thyroid hormone evaluation during transition periods in dairy cows / E. Fiore, G. Piccione, M. Ganesella et al. // *Arch. Anim. Breed.* – 2015. – V. 58. – P. 403-406. doi:10.5194/aab-58-403-2015.
10. Митяшова О. С. Липидный обмен и тиреоидный статус у коров-первотелок с разным функциональным состоянием яичников / О. С. Митяшова, А. А. Соломахин, и др. // *Достижения науки и техники АПК*. – 2020. – Т. 34. – № 2. – С. 69-74. doi: 10.24411/0235-2451-2020-10215.
11. Vernon R. G. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants / R. G. Vernon, R. G. Denis, A. Sorensen, G. Williams // *Horm. Metab. Res.* – 2002. – V. 34. – P. 678-685. doi: 10.1055/s-2002-38258.
12. Samanc H. Thyroid hormones concentrations during the mid-dry period: an early indicator of fatty liver in Holstein-Friesian dairy cows / H. Samanc, Stojić V., Kirovski D. et al. // *J. Thyroid Res.* – 2010. – V. 2010. – ID 897602. doi: 10.4061/2010/897602.
13. Piechotta M. Antepartal insulin-like growth factor concentrations indicating differences in the metabolic adaptive capacity of dairy cows / M. Piechotta, L. Holzhausen, M.G. Araujo et al. // *J. Vet. Sci.* – 2014. – V. 15. – P. 343-352. doi: 10.4142/jvs.2014.15.3.343.
14. Kafi M. Relationships between thyroid hormones and serum energy metabolites with different patterns of postpartum luteal activity in high-producing dairy cows / M. Kafi, A. Tamadon, M. Saeb et al. // *Animal*. – 2012. – V. 6. – P. 1253-1260. doi: 10.1017/S1751731112000043.
15. Лебедева И. Ю. Репродуктивная способность коров-первотелок в связи с динамикой содержания в крови тиреоидных гормонов в первый триместр лактации / И. Ю. Лебедева, О. С. Митяшова // *Достижения науки и техники АПК*. – 2020. – Т. 34. – № 10. – С. 91-96. doi: 10.24411/0235-2451-2020-11014.
16. Артыкбаева Г. М. Роль дейодиназ 1-го и 2-го типа в метаболизме тиреоидных гормонов (обзор литературы) / Г. М. Артыкбаева // *Проблемы эндокринологии*. – 2016. – Т. 62. – № 2. – С. 46-51. doi: 10.14341/probl201662246-52.
17. Coster A. The imprinted gene *DIO3* is a candidate gene for litter size in pigs / A. Coster, O. Madsen, H. C. Heuven et al. // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – P. e31825. doi: 10.1371/journal.pone.0031825.
18. Oczkowicz M. Associations between polymorphisms in the *DIO3* gene and reproductive traits and carcass performance in pigs / M. Oczkowicz, A. Dunkowska, K. Piyrkowska et al. // *Ann. Anim. Sci.* – 2016. – V. 16. – P. 399-413. doi: 10.1515/aoas-2015-0073.
19. Zhang X. The type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism is associated with worse glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis / X. Zhang, J. Sun, W. Han et al. // *J. Diabetes Res.* – 2016. – V. 2016. – P. 5928726. doi: 10.1155/2016/5928726.
20. Connor E. E. The bovine type I iodothyronine deiodinase (*DIO1*) gene maps to chromosome 3 / E. E. Connor, T. S. Sonstegard, S. Kahl et al. // *Anim. Genet.* – 2003. – V. 34. – № 3. – P. 233-234. doi: 10.1046/j.1365-2052.2003.00997.x.
21. Yang W. Expression and imprinting of *DIO3* and *DIO3OS* genes in Holstein cattle / W. Yang, D. Li, G. Wang et al. // *J. Genet.* – 2017. – V. 96. – P. 333-339. doi: 10.1007/s12041-017-0780-0.
22. Shrestha H. K. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows / H. K. Shrestha, T. Nakao, T. Suzuki et al. // *Theriogenology*. – 2004. – V. 61. – P. 1559-1571. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.09.007.
23. Panicker V. A common variation in deiodinase 1 gene *DIO1* is associated with the relative levels of free thyroxine and triiodothyronine / V. Panicker, C. Cluett, B. Shields et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – V. 93. – P. 3075-3081. doi: 10.1210/jc.2008-0397.
24. de Jong F.J. The association of polymorphisms in the type 1 and 2 deiodinase genes with circulating thyroid hormone parameters and atrophy of the medial temporal lobe / F.J. de Jong, R.P. Peeters, T. den Heijer et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – V. 92. – P. 636-640. doi: 10.1210/jc.2006-1331.

25. Castagna M. G. *DIO2* Thr92Ala reduces deiodinase-2 activity and serum-T3 levels in thyroid-deficient patients / M. G. Castagna, M. Dentice, S. Cantara et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2017. — V. 102. — P. 1623-1630. doi: 10.1210/jc.2016-2587.
26. Abramova N.O. Peculiarities of carbohydrate metabolism in patients with metabolic syndrome depending on C/T polymorphism in the *DIO1* gene / N.O. Abramova, N.V. Pashkovska // Pathologia. — 2019. — V. 16. — P. 345–349. doi: 10.14739/2310-1237. 2019.3.188838.
27. Ameur A. Identification of candidate regulatory SNPs by combination of transcription-factor-binding site prediction, SNP genotyping and haploChIP / A. Ameur, A. Rada-Iglesias, J. Komorowski, C. Wadelius // Nucleic Acids Res. — 2009. — V. 37. — P. e85. doi: 10.1093/nar/gkp381.
28. Arrojo e Drigo R. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action / R. Arrojo e Drigo, A.C. Bianco // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2011. — V. 43. — P. 1432-1441. doi: 10.1016/j.bio-cel.2011.05.016.
29. Sagar G. D. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer / G. D. Sagar, B. Gereben, I. Callebaut et al. // Mol. Endocrinol. — 2008. — V. 22. — P. 1382-1393. doi: 10.1210/me.2007-0490.

Mityashova O., Kostyunina O., Aleinikova O., Bardukov N., Lebedeva I.

Association of SNP localized near *DIO2* gene with hormonal profiles of the thyroid axis and fertility indicators in black-and-white cows

Abstract.

Thyroid hormones can affect the reproductive function of cows through the regulation of various metabolic pathways. The activity of the thyroid system is under the control of three types of deiodinases (DIO). In cattle, there are several genetic variants for the DIO1 and DIO3 genes, but there is no information on the polymorphism of the DIO2 gene.

Purpose: to conduct a search for genetic variants for SNPs in the *DIO2* gene and in nearby regions and investigate their association with prepartum and postpartum thyroid profiles and reproductive performance in dairy cows.

Materials and methods. Black-and-white cows of calving 2-4 were used in the experiments. Before calving and after calving, blood was taken from the animals to determine the concentration of hormones by ELISA. The assessment of the luteal activity of the ovaries was performed on the basis of an ultrasound study and the content of progesterone in the blood. Genotyping was performed on 48 samples of cow DNA using a Bovine GGP 150K biochip.

Results. No SNPs present on the Bovine GGP 150K chip were found within the target gene. The SNP Bovine-HD1000026761, localized upstream of the *DIO2* gene, was selected for research, with a frequency of genotypes being 45.83% (AA), 47.92% (AG), and 6.25% (GG). In cows with the AA and AG genotypes, a decrease of 1.4 times ($p < 0.01$) in the blood concentration of total thyroxine (T_4) 2 weeks before calving, compared with that for 4 weeks, and its further decrease by 1.5–1.9 times ($p < 0.001$ – $p < 0.05$) by the 1st week of lactation were found. From the 6th to the 2nd week before parturition, this indicator was 1.5–1.6 times higher ($p < 0.001$ – $p < 0.05$) in individuals with the AG genotype than in ones with the AA genotype. In animals with the AG genotype, a decrease in the blood concentration of reverse T_3 (1.4 times, $p < 0.05$) between the 4th week before calving and the 1st week of lactation was revealed. At the same time, this concentration was relatively constant in the animals of the other two groups. Furthermore, in animals with the AG genotype, the content of rT_3 in the blood was 1.3 times lower than in animals with the AA genotype from the 3rd to the 7th week of lactation. In cows with a heterozygous genotype, the T_4/T_3 ratio increased 2.1 times ($p < 0.001$) between the 2nd week before calving and the 1st week after calving, and then decreased 2.2 times ($p < 0.001$) to the 3rd week. After 1 week of lactation, this ratio was 1.9 times higher ($p < 0.001$) than in animals with the AA genotype. Meanwhile, the frequency of occurrence of individuals with the shortest period of recovery of the ovarian function and open days period was the lowest in the group with the AA genotype.

Conclusions. The data obtained indicate that the SNP BovineHD1000026761, located upstream of the *DIO2* gene, is associated with long-term changes in thyroid hormone levels in the prepartum and postpartum periods.

Keywords: *black-and-white cows, thyroid hormones, type 2 deiodinase, reproductive function, polymorphism, genotype.*

Authors:

Mityashova O. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: mityashova_o@mail.ru;

Kostyunina O. — Dr. Habil. (Biol. Sci.); e-mail: kostolan@yandex.ru;

Aleinikova O. — junior researcher; e-mail: 68ovk@mail.ru;

Bardukov N. — researcher; e-mail: bardukv-nikolaj@mail.ru;

Lebedeva I. — Dr. Habil. (Biol. Sci.); e-mail: irledv@mail.ru.

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 142132, Russian Federation, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement, 60.

References

1. Chagas L. M. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows / L. M. Chagas, J. J. Bass, D. Blache, et al. // *J. Dairy Sci.* — 2007. — V. 90. — P. 4022-4032. doi: 10.3168/jds.2006-852.
2. Wathes D. C. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow / D. C. Wathes, A. M. Clempson, G. E. Pollott // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2012. — V. 25. — P. 48-61. doi: 10.1071/RD12272.
3. Gonzalez F. D. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows / F. D. Gonzalez, R. Muico, V. Pereira et al. // *J. Vet. Sci.* — 2011. — V. 12. — P. 251-255. doi: 10.4142/jvs.2011.12.3.251.
4. Shin E. K. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows / E. K. Shin, J. K. Jeong, I. S. Choi et al. // *Theriogenology.* — 2015. — V. 84. — P. 252-260. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.014.
5. Wathes D. C. Mechanisms linking metabolic status and disease with reproductive outcome in the dairy cow / D. C. Wathes // *Reprod. Domest. Anim.* — 2012. — V. 47. — Suppl. 4. — P. 304-312. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02090.x.
6. Mullur R. Thyroid hormone regulation of metabolism / R. Mullur, Y.Y. Liu, G.A. Brent // *Physiol. Rev.* — 2014. — V. 94. — P. 355-382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013.
7. Capuco A. V. Effect of somatotropin on thyroid hormones and cytokines in lactating dairy cows during ad libitum and restricted feed intake / A. V. Capuco, D. L. Wood, T. H. Elsasser et al. // *J. Dairy Sci.* — 2001. — V. 84. — P. 2430-2439. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74693-0.
8. Mohebbi-Fani M. Thyroid hormones and their correlations with serum glucose, beta hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, cholesterol, and lipoproteins of high-yielding dairy cows at different stages of lactation cycle / M. Mohebbi-Fani, S. Nazifi, E. Rowghani et al. // *Comp. Clin. Pathol.* — 2009. — V. 18. — P. 211-216. doi: 10.1007/s00580-008-0782-7.
9. Fiore E. Serum thyroid hormone evaluation during transition periods in dairy cows / E. Fiore, G. Piccione, M. Ganesella et al. // *Arch. Anim. Breed.* — 2015. — V. 58. — P. 403-406. doi:10.5194/aab-58-403-2015.
10. Mityashova O. S. Lipid metabolism and thyroid status of heifers with different functional conditions of the ovaries / O. S. Mityashova, A. A. Solomakhin, N. V. Bogolyubova et al. // *Dostizheniya nauki i tekhniki APK.* — 2020. — V. 34. — № 2. — P. 69-74. [in Russian] doi: 10.24411/0235-2451-2020-10215.
11. Vernon R. G. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants / R.G. Vernon, R.G. Denis, A. Sorensen, G. Williams // *Horm. Metab. Res.* — 2002. — V. 34. — P. 678-685. doi: 10.1055/s-2002-38258.
12. Samanc H. Thyroid hormones concentrations during the mid-dry period: an early indicator of fatty liver in Holstein-Friesian dairy cows / H. Samanc, Stojić V., Kirovski D. et al. // *J. Thyroid Res.* — 2010. — V. 2010. — ID 897602. doi: 10.4061/2010/897602.
13. Piechotta M. Antepartal insulin-like growth factor concentrations indicating differences in the metabolic adaptive capacity of dairy cows / M. Piechotta, L. Holzhausen, M.G. Araujo et al. // *J. Vet. Sci.* — 2014. — V. 15. — P. 343-352. doi: 10.4142/jvs.2014.15.3.343.
14. Kafi M. Relationships between thyroid hormones and serum energy metabolites with different patterns of postpartum luteal activity in high-producing dairy cows / M. Kafi, A. Tamadon, M. Saeb et al. // *Animal.* — 2012. — V. 6. — P. 1253-1260. doi: 10.1017/S1751731112000043.
15. Lebedeva I.Yu. Dependence of reproductive ability of first-calf heifers on the dynamics of the content of thyroid hormones in the blood in the first trimester of lactation / I.Yu. Lebedeva, O.S. Mityashova // *Dostizheniya nauki i tekhniki APK.* — 2020. — V. 34. — № 10. — P. 91-96. [in Russian] doi: 10.24411/0235-2451-2020-11014.

16. Artykbaeva G.M. Role of type 1 and 2 deiodinases in thyroid metabolism (review) / G.M. Artykbaeva // Problemy Endokrinologii. — 2016. — V. 62. — № 2. — P. 46–51. [In Russian] doi: 10.14341/probl201662246-52.
17. Coster A. The imprinted gene *DIO3* is a candidate gene for litter size in pigs / A. Coster, O. Madsen, H.C. Heuven et al. // PLoS One. — 2012. — V. 7. — P. e31825. doi: 10.1371/journal.pone.0031825.
18. Oczkowicz M. Associations between polymorphisms in the *DIO3* gene and reproductive traits and carcass performance in pigs / M. Oczkowicz, A. Dunkowska, K. Piyrkowska et al. // Ann. Anim. Sci. — 2016. — V. 16. — P. 399–413. doi: 10.1515/aoas-2015-0073.
19. Zhang X. The type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism is associated with worse glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis / X. Zhang, J. Sun, W. Han et al. // J. Diabetes Res. — 2016. — V. 2016. — P. 5928726. doi: 10.1155/2016/5928726.
20. Connor E.E. The bovine type I iodothyronine deiodinase (*DIO1*) gene maps to chromosome 3 / E.E. Connor, T.S. Sonstegard, S. Kahl et al. // Anim. Genet. — 2003. — V. 34. — № 3. — P. 233–234. doi: 10.1046/j.1365-2052.2003.00997.x.
21. Yang W. Expression and imprinting of *DIO3* and *DIO3OS* genes in Holstein cattle / W. Yang, D. Li, G. Wang et al. // J. Genet. — 2017. — V. 96. — P. 333–339. doi: 10.1007/s12041-017-0780-0.
22. Shrestha H.K. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows / H.K. Shrestha, T. Nakao, T. Suzuki et al. // Theriogenology. — 2004. — V. 61. — P. 1559–1571. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.09.007.
23. Panicker V. A common variation in deiodinase 1 gene *DIO1* is associated with the relative levels of free thyroxine and triiodothyronine / V. Panicker, C. Cluett, B. Shields et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2008. — V. 93. — P. 3075–3081. doi: 10.1210/jc.2008-0397.
24. de Jong F.J. The association of polymorphisms in the type 1 and 2 deiodinase genes with circulating thyroid hormone parameters and atrophy of the medial temporal lobe / F.J. de Jong, R.P. Peeters, T. den Heijer et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2007. — V. 92. — P. 636–640. doi: 10.1210/jc.2006-1331.
25. Castagna M. G. *DIO2* Thr92Ala reduces deiodinase-2 activity and serum-T3 levels in thyroid-deficient patients / M. G. Castagna, M. Dentice, S. Cantara et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2017. — V. 102. — P. 1623–1630. doi: 10.1210/jc.2016-2587
26. Abramova N.O. Peculiarities of carbohydrate metabolism in patients with metabolic syndrome depending on C/T polymorphism in the *DIO1* gene / N.O. Abramova, N.V. Pashkovska // Pathologia. — 2019. — V. 16. — P. 345–349. doi:10.14739/2310-1237.2019.3.188838.
27. Ameer A. Identification of candidate regulatory SNPs by combination of transcription-factor-binding site prediction, SNP genotyping and haploChIP / A. Ameer, A. Rada-Iglesias, J. Komorowski, C. Wadelius // Nucleic Acids Res. — 2009. — V. 37. — P. e85. doi: 10.1093/nar/gkp381.
28. Arrojo e Drigo R. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action / R. Arrojo e Drigo, A. C. Bianco // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2011. — V. 43. — P. 1432–1441. doi: 10.1016/j.biocel.2011.05.016.
29. Sagar G. D. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer / G. D. Sagar, B. Gereben, I. Callebaut et al. // Mol. Endocrinol. — 2008. — V. 22. — P. 1382–1393. doi: 10.1210/me.2007-0490.