

Е. В. Никиткина, А. А. Мусидрай, С. С. Богданова, А. А. Крутикова

Поиск ассоциаций качества спермы быков с полиморфизмом гена *ESR1*

Аннотация.

Цель: поиск ассоциаций качества спермы быков с полиморфизмом гена *ESR1*.

Материалы и методы. Сперму 53 быков получали в ОАО «Невское». Всего было проанализировано 110 образцов спермы быков. Качество спермы определяли с помощью Аргус-САSA (АргусСофт, Россия). Целостность мембран определяли при помощи окрашивания образцов красителем нигрозин-эозин (Диаэм, Россия) и микроскопа Motic BA 410. Дыхание сперматозоидов определяли на приборе Эксперт-001. Функциональное состояние энергетической системы оценивали по реакции дыхания на добавление разбавителя дыхания и фосфорилирования – 2,4 динитрофенола (2,4-ДНФ). ДНК для проведения генетического анализа выделена из спермы фенольно-хлороформным методом. Секвенирование по Сенгеру проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer с помощью коммерческих наборов Kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя.

Результаты. Все показатели качества спермы характеризовались высокой индивидуальной изменчивостью. Так, объем эякулята был от 2 до 15 мл, концентрация сперматозоидов от 0,6 до 1,7 млрд/мл, общее количество сперматозоидов в эякуляте от 1,6 до 15 млрд, прогрессивная подвижность от 0 до 85 %. Было выявлено 4 SNP по гену *ESR1*. Достоверных ассоциаций полиморфизма гена *ESR1* выявлено не было, кроме достоверной связи *ESR1* 665 G>C с концентрацией сперматозоидов и количеством набухших акросом.

Ключевые слова: сбыки, качество спермы, SNP, генотипы, *ESR1*

Авторы:

Никиткина Елена Владимировна – кандидат биологических наук; email: nikitkinae@mail.ru;

Мусидрай Артем Алексеевич – кандидат биологических наук; email: 13linereg@mail.ru;

Богданова София Сергеевна – аспирант; email: sonikbogdanova@mail.ru;

Крутикова Анна Алексеевна – кандидат биологических наук; email: anntim2575@mail.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 196625, г. Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, д. 55а.

Введение. Быки производители являются основой в селекционных программах молочного скотоводства. Важным параметром реализации племенного потенциала быка является фертильность, представляющая способность спермы оплодотворять и активировать яйцеклетку для нормального развития эмбриона [1]. На сперматогенез могут влиять как фенотипические факторы – возраст, условия кормления и содержания, здоровье производителя, так и генетические факторы. Созревание сперматозоидов у млекопитающих обусловлено многими генами и типами клеток, включая зародышевые клетки, клетки Лейдига и клетки Сертоли [2].

Мутации в генах, связанных со сперматогене-

зом и созреванием сперматозоидов, могут привести к снижению качества спермы и фертильности [3-5]. Отбирать производителей только по фенотипу нецелесообразно из-за низкой наследуемости качества спермы – (0,04–0,30) [6,7]. Поэтому представляет актуальность поиск генов и генетических маркеров сперматогенеза и качества спермы производителей.

Нами ранее был проведен поиск геномных ассоциаций с качеством спермопродукции быков. Генотипы были определены на чипах Illumina Bovine IBDv3, и были найдены потенциальные SNP. Среди них был ген *ESR1*. Ген *ESR1* кодирует рецептор эстрогена и фактор транскрипции, активируемый лигандом. Канонический белок

содержит N-концевой лиганд-независимый домен трансаактивации, центральный ДНК-связывающий домен, шарнирный домен и C-концевой лиганд-зависимый домен трансаактивации. Белок, кодируемый этим геном, регулирует транскрипцию многих индуцируемых эстрогеном генов, которые играют роль в росте, метаболизме, половом развитии, беременности, и другие репродуктивные функции и экспрессируется во многих не репродуктивных тканях. Рецептор, кодируемый этим геном, играет ключевую роль в развитии рака молочной железы, рака эндометрия и остеопороза. Сообщается, что этот ген имеет десятки вариантов транскриптов из-за использования альтернативных промоторов и альтернативного сплайсинга, однако полноразмерная природа многих из этих вариантов остается неопределенной.

Цель исследований — поиск ассоциаций качества спермы быков с полиморфизмом гена *ESR1*.

Материалы и методы. Сперму 53 быков получали в ОАО «Невское». Всего было проанализировано 110 образцов спермы быков.

Объем эякулята определяли мерным стаканом. Концентрацию и прогрессивную подвижность сперматозоидов определяли с помощью Аргус-CASA (АргусСофт, Россия) — методика «Подвижность» и микроскопа Motic BA 410 (Motic, Китай). Морфологию сперматозоидов изучали, используя набор для дифференцированного окрашивания биопрепаратов Дифф-Квик («АБРИС+», Россия) с помощью Аргус-CASA — методика «Морфология» микроскопа Motic BA 410. Целостность мембран определяли при помощи окрашивания образцов красителем нигрозин-эозин (Диаэм, Россия) и микроскопа Motic BA 410.

Дыхание сперматозоидов определяли на приборе Эксперт-001 с помощью амперометрического датчика для измерения скорости клеточного дыхания. Функциональное состояние энергетической системы оценивали по реакции дыхания на добавление разобщителя дыхания и фосфорилирования — 2,4 динитрофенола (2,4-ДНФ) [8].

Полярнографический метод оценки сперматозоидов основан на способности 2,4-ДНФ усиливать дыхание в сперме с хорошо сопряженным дыханием и фосфорилированием и отсутствием стимуляции дыхания в разобщенной системе.

Для анализа связи показателей качества спермы с полиморфизмом SNP выбирали образцы с лучшим качеством от каждого самца. ДНК для проведения генетического анализа выделена из спермы фенольно-хлороформным методом. При выделении использовался меркаптоэтанол. Дизайн праймеров для амплификации анализируемого фрагмента и последующего секвенирования проводился с помощью онлайн-инструмента BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для анализа участка гена *ESR1* использовали праймеры: F: CATGGTCTGGAATTGGAATGAGC и R: CCATCCCCCAATCATGGCAC. Секвенирование по Сенгеру проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer с помощью коммерческих наборов Kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Выравнивание и обработка сиквенсов проводились с помощью программного обеспечения Mega-6. Анализ связи показателей качества спермы с SNP проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе IBM Statistics.

Результаты и обсуждение. Все показатели качества спермопродукции характеризуются высокой индивидуальной изменчивостью. Так, объем эякулята был от 2 до 15 мл, концентрация сперматозоидов от 0,6 до 1,7 млрд/мл, общее количество сперматозоидов в эякуляте от 1,6 до 15 млрд, прогрессивная подвижность от 0 до 85 %. Морфологические показатели качества спермы и сопряженность дыхания и фосфорилирования представлены в таблице 1. Из данных таблицы видно, что в нашей выборке были животные как

Таблица 1. Морфологические показатели спермы жеребцов и быков

Показатель	Нормальные клетки, %	Повреждения акросом, %	Повреждения в области хвоста и шейки, %	Повреждения мембран, %	Стимуляция дыхания 2,4 ДНФ, раз
Кол-во образцов	110	110	110	67	78
m±Sd	86,0±1,01	3,9±1,77	8,3±0,87	26,2±7,46	1,95±0,34
Max	91,2	16,3	51,2	59,1	3,7
Min	53,6	0,17	0,2	1,9	1

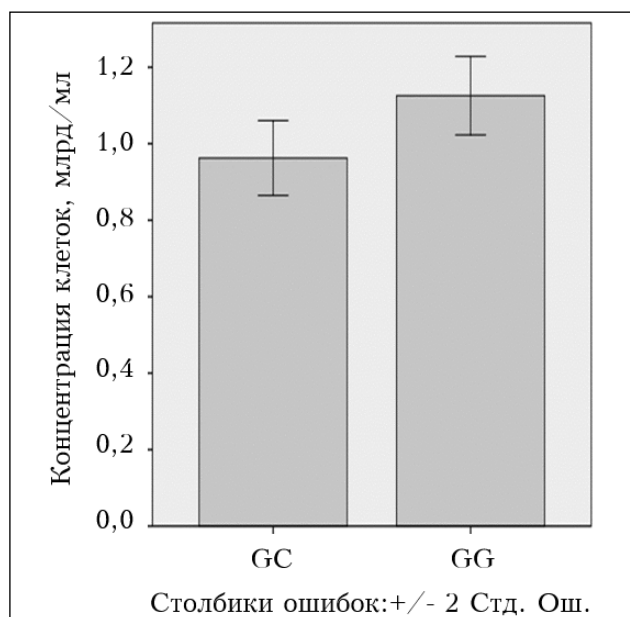


Рис. 1. Эффект замещения аллеля G на C в SNP *ESR* 665 G>C на концентрацию сперматозоидов быков

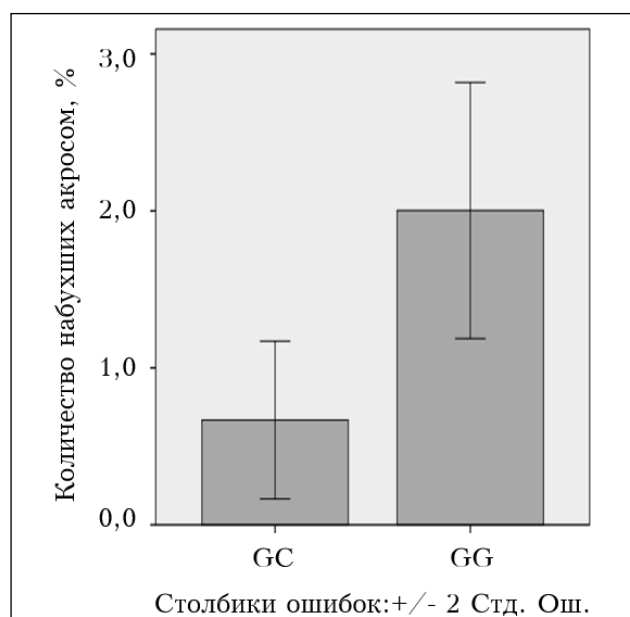


Рис. 1. Эффект замещения аллеля G на C в SNP *ESR* 665 G>C на количество набухших акросом в сперме быков

с очень хорошим качеством спермы, так и с плохим. Были животные, у которых качество спермы сильно варьировало от эякулята к эякуляту. Полученные данные позволили провести первоначальную оценку влияния генов на сперматогенез и качество спермы.

Частота генотипов и аллелей по гену *ESR1* приведена в таблице 2. Видно отсутствие генотипов AA по *ESR* 616 T>A и *ESR* 623 C>A, а также генотипа CC по *ESR* 665 G>C.

Достоверных связей таких показателей качества спермы быков как объем эякулята, концентрация и общее количество сперматозоидов, подвижность сперматозоидов быков с анализируемыми SNP не обнаружено. Исключение *ESR1* 665 G>C, по которым обнаружена достоверная связь с концентрацией сперматозоидов быков ($p < 0,05$) (рис.1.). По SNP *ESR* 665 G>C обнаружена достоверная связь генотипа с набухшими акросомами ($p < 0,05$) (рис.2). По *ESR* 696 G>C, *ESR1* 616 T>A, *ESR1* 623 C>A достоверной связи с качеством спермы быков не выявлено.

Ген *ESR1* кодирует рецептор эстрогена (ER). Данный рецептор регулирует транскрипцию многих индуцируемых эстрогенами генов, которые играют роль в росте, метаболизме, половом развитии, течении беременности и выполняют другие репродуктивные функции [9]. Экспрессия гена *ESR1* выявлена во влагалище, матке и яичниках. Также *ESR1* влияет на активность животных во время периода охоты из-за его присутствия в яичнике (Schams and Berisha, 2002). Скорее всего, исследуемый ген ассоциирован в большей степени с репродуктивной функцией самок, а не самцов. Хотя нами и была обнаружена достоверная ассоциация с концентрацией сперматозоидов в эякуляте быков по SNP *ESR* 665 G>C. Возможно, это связано с небольшим исследованным поголовьем и отсутствием генотипов AA по *ESR1* 616 T>A и по *ESR1* 623 C>A, CC

Таблица 2. Частота генотипов гена *ESR1*

Генотип	Частота генотипов, %		
	ТА	ТТ	АА
<i>ESR1</i> 616 T>A	27,8	72,2	0
<i>ESR1</i> 623 C>A	СА	СС	АА
	19,4	80,6	0
<i>ESR1</i> 665 G>C	GG	GC	CC
	66,7	33,3	0
<i>ESR1</i> 696 G>C	CC	GC	GG
	2,9	31,4	65,7

по *ESR1* 665 G>C.

Заключение. Таким образом, найдены достоверные ассоциации полиморфизма гена *ESR1*

665 G>C с качеством спермы быков. Достоверных ассоциаций полиморфизма других SNP гена *ESR1* не выявлено.

Работа выполнена по теме государственного задания № AAAA-A18-118021990006-9

Литература

1. Kaya A. Sperm macromolecules associated with bull fertility / A. Kaya, E. Memili // *Animal Reproduction Science*. — 2016. — № 169. — P. 88-94. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.015.
2. Sarkar H. A study of differential expression of testicular genes in various reproductive phases of hemidactylus flaviviridis (wall lizard) to derive their association with onset of spermatogenesis and its relevance to mammals / H. Sarkar, S. Arya, U. Rai, S. Majumdar // *PLoS One*. — 2016. — № 11. — P. e0151150. DOI: 10.1371/journal.pone.0151150.
3. Ballow D. Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. / D. Ballow, M. Meistrich, L. Matzuk, A. Rajkovic // *Dev. Biol.* — 2006. — № 294. — P. 161-167. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.027.
4. Zhang T. DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment / T. Zhang, J. Oatley, V. Bardwell, D. Zarkower // *PLoS Genet.* — 2016. — № 12. — P. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006293.
5. Yin H. Weighted Single-Step Genome-Wide Association Study of Semen Traits in Holstein Bulls of China / H. Yin, C. Zhou, S. Shi, L. Fang, J. Liu, D. Sun, L. Jiang, S. Zhang // *Front. Genet.* — 2019. — № 10. — P. 1053. DOI: 10.3389/fgene.2019.01053.
6. Gredler B. Genetic parameters for semen production traits in austrian dual purpose simmental bulls / B. Gredler, C. Fuerst, B. Fuerst-Waltl, H. Schwarzenbacher, J. Sülkner // *J. Reprod. Domestic Anim.* — 2007. — № 42. — P. 326-328. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00778.x
7. Druet T. Estimation of genetic parameters and genome scan for 15 semen characteristics traits of Holstein bulls / T. Druet, S. Fritz, E. Sellem, B. Basso, O. Gerard, L. Salas-Cortes // *J. Anim. Breed. Genet.* — 2009. — № 126. — P. 269-277. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2008.00788.x.
8. Мороз Л. Г. Полярографический метод оценки энергетического обмена в сперме по стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом / Л. Г. Мороз, И. Ш. Шапиев // *Бюллетень государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных*. — 1978. — № 33. — С. 28-30.
9. Бровкина О.И. Ген *ESR1*: [Электронный ресурс] // *Генокарта Генетическая энциклопедия*. 2021. — URL: <https://www.genokarta.ru/gene/ESR1>. (Дата обращения: 04.07.2023).

Nikitkina E., Musidray A., Bogdanova S., Krutikova A.

Search for associations of bull sperm quality with *ESR1* gene polymorphism

Abstract.

Purpose: search for associations of bull semen quality with *ESR1* gene polymorphism.

Materials and methods. The semen of 53 bulls was collected at OJSC Nevskoe. A total of 110 bull semen samples were analyzed. Sperm quality was determined using Argus-CASA (ArgusSoft, Russia). Membrane integrity was determined by staining the samples with nigrosine-eosin dye (Diam, Russia) and a Motic BA 410 microscope. Spermatozoa respiration was determined using an Expert-001 instrument. The functional state of the energy system was assessed by the reaction of respiration to the addition of the uncoupler of respiration and phosphorylation, 2,4 dinitrophenol (2,4-DNF). DNA for genetic analysis was isolated from semen by the phenol-chloroform method. Sanger sequencing was performed on an Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer using commercial BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kits (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol.

Results. Sperm quality were characterized by high individual variability. Thus, the volume of the ejaculate was from 2 to 15 ml, the concentration of spermatozoa was from 0.6 to 1.7 billion/ml, the total number of spermatozoa in the ejaculate was from 1.6 to 15 billion, and progressive motility was from 0 to 85%. Four SNPs were identified for the *ESR1* gene. No significant associations of *ESR1* gene polymorphism were found, except for a significant association of *ESR1* 665 G>C with spermatozoa concentration and the number of swollen acrosomes

Key words: bulls, sperm quality, SNP, genotypes, *ESR1*.

Authors:

Nikitkina E. – PhD (Biol. Sci.); email: nikitkinae@mail.ru;

Musidray A. – PhD (Biol. Sci.); email: 13linereg@mail.ru;

Bogdanova S. – email: sonikbogdanova@mail.ru;

Krutikova A. – PhD (Biol. Sci.); email: anntim2575@mail.ru.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 196625, St. Petersburg, pos. Tyarlevo, Moscow highway, 55a.

References

1. Kaya A. Sperm macromolecules associated with bull fertility / A. Kaya, E. Memili // Animal Reproduction Science. — 2016. — № 169. — P. 88-94. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.015.
2. Sarkar H. A study of differential expression of testicular genes in various reproductive phases of hemidactylus flaviviridis (wall lizard) to derive their association with onset of spermatogenesis and its relevance to mammals / H. Sarkar, S. Arya, U. Rai, S. Majumdar // PLoS One. — 2016. — № 11. — P. e0151150. DOI: 10.1371/journal.pone.0151150.
3. Ballow D. Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. / D. Ballow, M. Meistrich, L. Matzuk, A. Rajkovic // Dev. Biol. — 2006. — № 294. — P. 161-167. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.02.027.
4. Zhang T. DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment / T. Zhang, J. Oatley, V. Bardwell, D. Zarkower // PLoS Genet. — 2016. — № 12. — P. e1006293 doi: 10.1371/journal.pgen.1006293
5. Yin H. Weighted Single-Step Genome-Wide Association Study of Semen Traits in Holstein Bulls of China / H. Yin, C. Zhou, S. Shi, L. Fang, J. Liu, D. Sun, L. Jiang, S. Zhang // Front. Genet. — 2019. — № 10. — P. 1053. DOI: 10.3389/fgene.2019.01053.
6. Gredler B. Genetic parameters for semen production traits in austrian dual purpose simmental bulls / B. Gredler, C. Fuerst, B. Fuerst-Waltl, H. Schwarzenbacher, J. Sulkner // J. Reprod. Domestic Anim. — 2007. — № 42. — P. 326-328. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00778.x.

7. Druet T. Estimation of genetic parameters and genome scan for 15 semen characteristics traits of Holstein bulls / T. Druet, S. Fritz, E. Sellem, B. Basso, O. Gerard, L. Salas-Cortes // J. Anim. Breed. Genet – 2009. – № 126. – P. 269-277. doi: 10.1111/j.1439-0388.2008.00788.x.
8. Moroz L. G. The polarographic method for assessing energy exchange in sperm to stimulate breathing 2,4-dinitrophenol/ L. G. Moroz, I. Sh. Shapiev // Bulletin of the State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Genetics and Divorced Agricultural Animals. – 1978. – № 33. – P. 28-30.
9. Brovkana O.I. ESR1 gene: [Electronic resource] // Genocact Genetic Encyclopedia. 2021. - URL: <https://www.genokarta.ru/gene/esr1>. (Date of circulation: 04.07.2023)