

УДК 636.082:591.11

DOI: 10.33284/2658-3135-102-3-46

Влияние полиморфизма гена фактора дифференциации роста 5 на морфологические и биохимические показатели крови

А.В. Харламов, А.Н. Фролов, О.А. Завьялов, Е.А. Тяпугин

Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук (г. Оренбург)

Аннотация. Проведены исследования на бычках калмыцкой породы (n=182) возрастом 12-14 месяцев, живой массой 343,7±6,4 кг, от которых для выявления одного нуклеотидного полиморфизма фактора дифференциации роста 5 (T586C в экзоне 1) были взяты пробы крови.

Образцы ДНК выделены из цельной крови с использованием набора реагентов «DIAAtom™DNAPrep 200» (IsoGeneLab, Москва). Для проведения полимеразной цепной реакции использовали набор GenePak™PCRCore («IsoGeneLab», Москва) и набор EncycloPCRkit (фирма «Evrogen», Москва). Праймеры синтезированы в НПФ «Литех» (Россия).

Установлена частота встречаемости аллелей ТТ в выборке, которая составила 48,9 %, ТС – 46,7 и СС – 4,4 %, χ^2 тест – 4,94.

На втором этапе исследований с целью изучения влияния полиморфизма в гене GDF5 на морфологические и биохимические показатели крови произведён отбор у 8 голов из каждой выявленной группы животных.

Морфологические показатели определяли с помощью автоматического гематологического анализатора модель URIT-2900 Vet Plus, биохимический анализ крови осуществлялся с помощью автоматического биохимического анализатора CS-T240. Всего было изучено 35 показателей крови.

Установлено, что в крови бычков с генотипом СС содержалось больше общего белка на 5,2 %, холестерина – на 15,5 %, трансфераз: АЛТ – на 6,9 % и γ -ГТ – на 20,2 %, при меньшем проценте моноцитов (MID) – на 5,6 % и среднем объёме тромбоцитов (MPV) – на 9,2 % по сравнению с генотипом ТТ.

Сделано заключение о влиянии полиморфизма по гену фактора дифференциации роста 5 на 6 показателей крови. Требуется дальнейшие исследования с увеличением группы животных по гомозиготному генотипу С.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, бычки, ген, GDF5, SNP, кровь.

UDC 636.082:591.11

The effect of gene polymorphism of growth differentiation factor 5 on morphological and biochemical parameters of blood

AV Kharlamov, AN Frolov, OA Zavyalov, EA Tyapugin

Federal Research Center for Biological System and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)

Summary. Studies were conducted on calves of the Kalmyk breed (n=182), age 12-14 months, body weight 343.7±6.4 kg. Blood samples were taken to identify one nucleotide polymorphism of growth differentiation factor 5 (T586C in exon 1).

DNA samples were isolated from whole blood using the «DIAAtom™DNAPrep 200» reagent kit (IsoGeneLab, Moscow). For the polymerase chain reaction, the GenePak™PCRCore kit («IsoGeneLab», Moscow) and the EncycloPCRkit kit («Evrogen», Moscow) were used. Primers are synthesized in NPF «Litekh» (Russia).

The incidence of TT alleles in sample was established, it amounted to 48.9%, TC – 46.7 and CC – 4.4%, χ^2 test – 4.94.

At the second stage of research, in order to study the effect of polymorphism in GDF5 gene on morphological and biochemical parameters of blood, 8 animals were selected from each identified group of animals.

Morphological parameters were determined using an automatic hematological analyzer model URIT-2900 Vet Plus, a biochemical blood test was performed using an automatic biochemical analyzer CS-T240. 35 blood counts were studied.

It was found that blood of bulls with CC genotype contained 5.2% more crude protein, cholesterol – 15.5%, transferases: ALT – 6.9% and γ -GT – 20.2%, at a lower percentage monocytes (MID) – by 5.6 % and the average platelet volume (MPV) – by 9.2% compared with the TT genotype.

It was concluded that the effect of polymorphism on growth gene for differentiation factor 5 on 6 blood indices. The further research need with increase of animal group with homozygous genotype C in this gene.

Key words: cattle, bulls, gene, GDF5, SNP, blood.

Введение.

Фактор дифференциации роста 5 (GDF5) является одним из генов, участвующих в развитии, поддержании и восстановлении костей и хрящей (Edwards CJ and Francis-West PH, 2001; Mikic B, 2004), известный как хрящевой морфогенетический белок 1 (CDMP1), являющийся членом суперсемейства трансформирующего фактора роста-b (TGF-b), тесно связан с подсемейством костных морфогенетических белков (BMPs) (Miyamoto Y et al., 2007).

GDF5 действует как внеклеточная сигнальная молекула, активируя экспрессию генов, участвующих в образовании хряща и кости (Francis-West PH et al., 1999), сухожилий и связок (Merino R et al., 1999), играя важную роль в восстановлении хряща после травм (Chhabra A et al., 2003; Tashiro T et al., 2006).

Мутации гена GDF5 могут способствовать проявлению тяжёлых заболеваний опорно-двигательного аппарата, сопровождающихся вывихами суставов (в основном встречающихся в коленях и бедрах), укорочением костей конечностей, нарушениями в развитии фаланговых суставов и брахидактилии (Storm EE and Kingsley DM, 1996; Thomas JT et al., 1996; Yang W et al., 2008). Полиморфизмы в гене GDF5 связаны с нарушениями в развитии скелета, в том числе различные формы хондродисплазии, симфалангизма (Farooq M et al., 2013; Leonidou A et al., 2016).

Основываясь на важной роли гена GDF5 в хондрогенезе и синтезе протеогликана, что было доказано на мышцах и человеке (Kellgren JH and Moore R, 1952; Oliveria SA et al., 1995; Wolfman NM et al., 1997), у крупного рогатого скота изучение гена может решить проблему не только отбора животных, устойчивых к развитию заболеваний в опорно-двигательном аппарате, и в качестве гена-кандидата, влияющего на интенсивность роста и характеристики тела.

Гематологические тесты широко используются для диагностики состояния животного, по концентрации форменных элементов можно косвенно судить о продуктивности животного (Bani Ismail ZA et al., 2008).

В этой связи изучение показателей крови, отражающих уровень общего обмена веществ, здоровье организма и др. в зависимости от различного полиморфизма в гене GDF5, позволит установить различия в интенсивности окислительно-восстановительных процессов в организме бычков калмыцкой породы.

Цель исследования.

Изучение влияния полиморфизма в гене GDF5 на морфологические, биохимические показатели крови у бычков калмыцкой породы.

Материал и методы исследования.

Объект исследования. Бычки калмыцкой породы, возраст – 12-14 мес., живая масса – 343,7±6,4 кг.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями и рекомендациями Russian Regulations, 1987 (Order No. 755 on 12.08.1977 the USSR Ministry of Health) and «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)». При выполнении исследований были предприняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества используемых образцов.

Схема эксперимента. Исследование проведено в 2019 году в условиях СПК колхоз «Красногорский» Оренбургской области.

На первом этапе исследований для выявления одного нуклеотидного полиморфизма (SNP) (T586C в экзоне 1) у бычков калмыцкой породы ($n=182$) были взяты пробы крови.

На втором этапе исследований произведён отбор крови для определения гематологических показателей у 8 голов из каждой выявленной группы животных.

Отбор проб крови производили утром до кормления и поения. Кровь брали из хвостовой вены на уровне средней трети тела 2-5 хвостовых позвонков в вакуумные пробирки.

Образцы ДНК выделены из цельной крови с использованием набора реагентов «DIAtom^{im} DNAprep 200». Для проведения полимеразной цепной реакции использовали набор GenePak^{im} PCRCore и набор EpcusloPCRkit. Праймеры синтезированы в НПФ «Литех» (Россия). Нуклеотидная последовательность праймера для гена маркера GDF5 представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика праймера, использованного в работе
Table 1. Primer characteristics, used in work

Ген-маркер/Marker gene	Последовательность праймера/Primer sequence	Размер продукта, п. н./Product size, bps	Источник информации/The source of information
GDF5	F: 5'-TGTCCGATGCTGACAGAAAGG-3' R: 5'-GAGTGAGGTTAATCCCAGATACCA-3'	235	Liu YF et al. (2010)

ПЦР-ПДРФ гена GDF5 проводили в термоцикле «MyCycler». Протокол ПЦР: иницирующая денатурация ДНК в течение 5 мин при температуре +95 °С, затем 32 цикла амплификации денатурация +94 °С (30 сек), отжиг +60 °С (30 сек) и элонгация +72 °С (30 сек), заключительный синтез – при температуре +72 °С в течение 10 мин.

Реакцию рестрикции полученных продуктов амплификации GDF5 проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции *MvaI* (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика эндонуклеазы и размеры продуктов рестрикции в зависимости от генотипа

Table 2. Characterization of endonuclease and sizes of restriction products depending on genotype

Ген/Gene	Рестриктаза/Restrictase	Замена нуклеотида/Nucleotide replacement	Температура инкубации, °С/Incubation temperature, °С	Размеры продуктов, п. н./Product sizes, bp
GDF5	<i>MvaI</i>	TC	37	ТТ – 235 п. н. СС – 181 и 54 п. н. СТ – 235, 181 и 54 п. н.

Для проведения реакции в пробирке смешивали 20 мкл ПЦР-продукта и 10 ед. *MvaI* с последующим инкубированием при $t +37$ °С в течение 5 часов. Полученный продукт разделяли методом горизонтального электрофореза (в 1х трис-боратном буфере при напряжении 80 В) в 2,5 %-ном агарозном геле с окрашиванием бромистого этидия. После чего гель анализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе «UVT-1», фотографировали с помощью системы «VItran v.1.0». Определение длины фрагментов проводили с помощью маркера молекулярных масс «GenePakR DNA Ladder M 50».

Кровь для морфологических и биохимических исследований отбирали в вакуумные пробирки APEXLAB с антикоагулянтом (EDTA) и с активатором свёртывания, иглы для забора крови Bodaywin. Морфологические показатели определяли с помощью автоматического гематологического анализатора URIT-2900 Vet Plus. Биохимический анализ крови осуществлялся с помощью автоматического биохимического анализатора CS-T240. Биохимический анализ проводился с использованием коммерческих биохимических наборов для ветеринарии ДиаВетТест и коммерческих биохимических наборов Randox.

Оборудование и технические средства. Исследования выполнялись на следующем оборудовании и наборах реагентов в условиях Испытательного центра ЦКП ФНЦ БСТ РАН (аттестат аккредитации № RA.RU.21ПФ59 от 02.12.2015 г.).

Набор реагентов «DIAtomtmDNAPrep 200», набор GenePaktmPCRCore, маркер молекулярных масс «GenePakR DNA Ladder M 50» (IsoGeneLab, г. Москва, Россия), термоцикл «MyCycler» («BioRad», США), набор EncycloPCRkit («Evrogen», г. Москва, Россия) гематологический анализатор URIT-2900 Vet Plus («URIT Medial Electronic Co., Ltd», Китай), биохимический анализатор CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd.», Китай), трансиллюминатор «UVT-1» (ООО Биоком, Россия), иглы для забора крови Bodaywin (Shandong Weigao Group Medical Polymer Co, China), коммерческие биохимические наборы для ветеринарии ДиаВетТест (АО «ДИАКОН-ДС», Россия).

Статистическая обработка. Для проверки гипотезы о нормальности распределения количественных признаков применяли критерий Шапиро-Уилка. Закон распределения исследуемых числовых показателей не отличался от нормального, поэтому достоверность различий проверяли с помощью общепринятого параметрического метода (t-критерий Стьюдента). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень значимости (P), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался меньшим или равным 0,05. В таблицах приведены средние значения показателей (M) и их стандартные отклонения (\pm STD). Для обработки данных использовали пакет прикладных программ «Statistica 10.0» («Stat Soft Inc.», США).

Результаты исследований.

Выявление SNP (T586C) в гене GDF5 показало три генотипа «мутации T>C» (рис. 1).

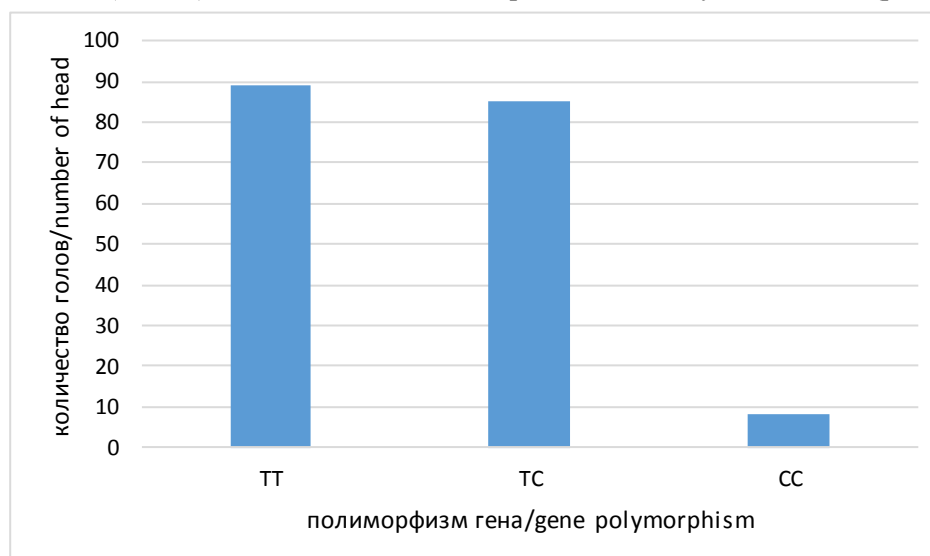


Рис. 1 – Частота встречаемости генотипов по маркеру GDF5, гол.

Figure 1 – The frequency of genotype occurrence according to marker GDF5, head

Частота встречаемости аллелей TT в выборке составила 48,9 %, TC – 46,7 и CC – 4,4 % (χ^2 тест равен 4,94, при частоте аллелей T=0,72; C=0,28).

Результаты биохимических показателей сыворотки крови бычков различных генотипов по гену GDF5 показали некоторые различия по исследуемым признакам (табл. 3).

Таблица 3. Биохимические показатели крови бычков различных генотипов
Table 3. Biochemical blood parameters of bulls with different genotypes

Показатель/Indicator	Генотип/Genotype		
	ТТ	ТС	СС
Глюкоза, ммоль/л/ Glucose, mmol/L	3,58±0,78	3,68±0,49	3,77±0,42
Общий белок, г/л/ Total protein, g/l	102,04±1,68	103,29±3,31	107,39±2,26*
Альбумин, г/л/Albumin, g/l	40,33±1,06	41,67±2,83	42,12±2,09
АЛТ, ед./л/ALT, units/l	33,82±1,80	39,10±3,14	36,15±2,07*
АСТ, ед./л/AST, units/l	144,0±27,57	173,2±36,01	146,4±30,12
Билирубин общ., мкмоль/л/ Bilirubin total., μmol/l	0,65±0,61	1,47±1,94	0,57±0,45
Билирубин прям., мкмоль/л/Bilirubin straight, μmol/l	1,76±0,19	1,89±0,54	1,66±0,27
Холестерин, ммоль/л/ Cholesterol, mmol/l	2,46±0,33	2,78±0,62	2,94±0,45*
Триглицериды (Тг), ммоль/л/Triglycerides (Tg), mmol/l	0,25±0,23	0,18±0,05	0,17±0,03
Мочевина, ммоль/л/ Urea, mmol/l	7,30±0,60	7,56±0,68	7,87±0,73
Креатинин, мкмоль/л/ Creatinine, μmol/l	49,34±8,94	57,01±8,65	56,10±6,10
Щелочная фосфатаза, ед./л/ Alkaline phosphatase, units/l	167,0±63,8	173,4±42,5	141,7±53,6
Гамма-глутамил- трансфераза (γ-ГТ), ед./л/ Gamma-glutamyltransferase (γ-GT), units/l	14,56±1,72	14,78±3,86	17,50±2,04*
Мочевая кислота, мкмоль/л/ Uric acid, μmol/l	78,41±11,44	86,00±14,26	88,53±7,67
ЛДГ, ед./л/LDH, units/l	3656,2±531,4	3882,1±562,27	3603,2±485,0
Fe, ммоль/л/ Fe, mmol/l	22,76±3,96	19,79±7,66	21,42±7,10
P, ммоль/л/P/mmol/l	2,67±0,33	2,67±0,50	2,46±0,32

Примечание: * – P≤0,05 по сравнению с генотипом ТТ

Note: * – P≤0.05 compared to TT genotype

В крови бычков с генотипом СС содержалось больше общего белка на 5,2 %, холестерина – на 15,5 %, трансфераз: АЛТ – на 6,9 % и γ-ГТ – на 20,2 % по сравнению с генотипом ТТ. Бычки с генотипом ТС по большинству показателей имели промежуточное значение по сравнению со сверстниками с генотипами СС, ТТ и не имели достоверных различий ни с одной из групп сверстников.

Результаты морфологических показателей крови не выявили существенных различий между бычками разных генотипов по исследуемым признакам (табл. 4).

Таблица 4. Морфологические показатели крови бычков различных генотипов
Table 4. Morphological blood parameters of bulls with different genotypes

Показатель	ТТ	ТС	СС
Число белых клеток (WBC), 10 ⁹ кл/л/ The number of white cells (WBC), 10 ⁹ c/l	10,56±4,28	10,66±2,13	10,03±3,15
Процент лимфоцитов (LYM), %/ The percentage of lymphocytes (LYM), %	33,95±9,98	35,63±7,81	32,20±10,91
Процент моноцитов (MID), %/ The percentage of monocytes (MID), %	15,33±4,97	12,28±4,45	9,70±4,59*
Процент гранулоцитов (GRAN), %/ The percentage of granulocytes (GRAN), %	50,48±13,05	52,09±8,11	58,10±15,27
Число лимфоцитов (LYM#), 10 ⁹ кл/л/ The number of lymphocytes (LYM#), 10 ⁹ c/l	3,56±1,74	3,74±0,90	3,14±1,10
Число моноцитов (MID#), 10 ⁹ кл/л/ The number of monocytes (MID#), 10 ⁹ c/l	2,31±1,20	1,91±0,51	1,55±0,51
Число гранулоцитов (GRAN#), 10 ⁹ кл/л/ The number of granulocytes (GRAN#), 10 ⁹ c/l	4,69±2,04	4,97±1,68	5,34±2,93
Число эритроцитов (RBC), 10 ¹² кл/л/ The number of red blood cells (RBC), 10 ¹² c/l	5,45±0,81	6,01±1,09	6,29±0,78
Концентрация гемоглобина (HGB), г/л/ Hemoglobin concentration (HGB), g/l	104,00±9,80	107,00±11,51	113,38±7,17
Гематокрит (HCT), %/Hematocrit (HCT), %	23,53±2,82	23,69±3,74	23,68±2,00
Средний объём эритроцитов (MCV), фЛ/ The average volume of red blood cells (MCV), fL	39,71±2,55	39,08±2,13	43,75±5,31
Среднее значение гемоглобина в клетке (MCH), пг/The average value of hemoglobin in the cell (MCH), pg	14,10±0,74	14,83±0,58	15,29±1,45
Средняя концентрация клеточного гемоглобина (MCHC), г/л/The average concentration of cellular hemoglobin (MCHC), g/l	357,13±11,15	355,67±14,63	351,88±12,63
Точность повторения ширины распределения эритроцитов (RDW_CV), %/ The accuracy of rotation of the width of the distribution of red blood cells (RDW_CV), %	18,24±1,09	18,06±0,90	18,11±1,49
Ширина распределения эритроцитов (RDW_SD), фЛ/The width of the distribution of red blood cells (RDW_SD), fL	26,81±1,54	26,87±1,30	29,71±6,37
Число тромбоцитов (PLT), 10 ⁹ кл/л/ Platelet Count (PLT), 10 ⁹ c/l	268,63±88,49	328,11±216,93	225,96±113,33
Средний объём тромбоцитов (MPV), фЛ/ Average platelet volume (MPV), fL	8,88±0,58	8,74±0,82	8,06±0,72*
Относительный объём тромбоцитов (PCT), % / Relative platelet volume (PCT), %	0,29±0,10	0,36±0,25	0,24±0,11

Примечание: * – P≤0,05 по сравнению с генотипом ТТ

Note: * – P≤0.05 compared to TT genotype

Исключением явились только показатели MID и MPV, концентрация которых была выше у бычков с генотипом TT на 3,05 и 5,63 % ($P \leq 0,05$); 1,6 и 10,17 % ($P \leq 0,05$) по сравнению со сверстниками TC и CC соответственно.

Обсуждение полученных результатов.

ДНК-маркеры на основе определения SNP (Djari A et al., 2013; Schenkel FS et al., 2004) рассматриваются как важный инструмент для генетического улучшения поголовья мясного скота. Отбор животных на основе генетической информации позволяет прогнозировать продуктивность полученных животных (Cole JB et al., 2011).

Полиморфизм многих генов-кандидатов ассоциируется с показателями роста и продуктивности скота, такие как парный гомеобокс 1 (PROP1) (Ekegbu UJ et al., 2019), фактор дифференциации роста 10 (GDF10) (Adoligbe C et al., 2012), сглаженный (SMO) (Zhang YR et al., 2015), тиреоглобулин (TG) (Hou GY et al., 2011), ген плеоморфной аденомы 1 (PLAG1) (Weedon MN et al., 2008; Karim L et al., 2011) и др.

Ограниченные исследования по влиянию гена GDF5 на продуктивные качества скота не позволяют в полной мере дать характеристику гена и целесообразность использования его в селекции мясного скота. При том, что впечатляющие результаты достигнуты в медицине, указывающие на влияние гена на рост (Weedon MN et al., 2008; Wu DD et al., 2012), скелетные мышцы (Hitachi K et al., 2019), развитие заболеваний в опорно-двигательном аппарате (Chen H et al., 2016; Capellini TD et al., 2017; Kiarour AM et al., 2018) и др.

Опираясь на результаты общегеномного подхода к человеку, мы применили результаты исследований человеческого GDF5 для анализа полиморфизма и генетического воздействия на locus гена GDF5 крупного рогатого скота.

Настоящее исследование показывает, что SNP (T586C) в гене GDF5 крупного рогатого скота связан с изменениями гематологических показателей крови. Мутации гена с TT к CC при невысокой их частоте встречаемости ($C=0,28$) сопровождалась увеличением общего белка ($P \leq 0,05$), холестерина ($P \leq 0,05$), трансфераз: АЛТ и γ -ГТ ($P \leq 0,05$), RBC ($P \geq 0,05$), HGB ($P \geq 0,05$), MCV ($P \geq 0,05$), что может свидетельствовать об интенсивности окислительно-восстановительных процессов в организме и косвенно указывает на продуктивные качества животного. Полученные данные принципиально не противоречат ранее проведённым исследованиям (Фаткуллин Р.Р., 2008; Баширов В.Д. и др., 2008; Liu YF et al., 2010). Эти данные показывают, что животные, обладающие генотипом TT, имеют сниженную экспрессию GDF5 в хондроцитах хряща, это приводит к снижению их роста и согласуется со снижением параметров крови, отвечающих за продуктивность (Chujo T et al., 2006).

Выводы.

Проведённые исследования указывают на влияние генотипа бычков по гену фактора дифференциации роста 5 на морфобиохимические показатели крови – из 35 изученных по 6 получены достоверные различия.

Необходимо проведение дальнейших исследований по изучению параметров продуктивности, пропорций тела и заболеваемости в опорно-двигательном аппарате в зависимости от полиморфизма по гену GDF 5.

Исследования выполнены в соответствии с планом НИР на 2019-2021 гг. ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (№ 0761-2019-0006)

Литература

1. Баширов В.Д., Фролов А.Н., Ерзиков В.И. Гематологические показатели крови бычков в зависимости от срока отъёма их от матерей в мясном скотоводстве // Вестник мясного скотоводства. 2008. Вып. 61. Т. II. С. 243-244. [Bashirov VD, Frolov AN, Erzikov VI. Gematologicheskie

pokazateli krvi bychkov v zavisimosti ot sroka ot"ema ikh ot materei v myasnom skotovodstve. Herald of Beef Cattle Breeding. 2008;61(II):243-244. (*In Russ*).

2. Фаткуллин Р.Р. Морфологические и биохимические показатели крови подопытных животных при применении биологически активной добавки Витартил // Аграрный вестник Урала. 2008. № 6(48). С. 56-59. [Fatkullin RR. Morfologicheskie i biokhimicheskie pokazateli krvi podopytnykh zivotnykh pri primenenii biologicheskoi aktivnoi dobavki Vitartil. Agrarnyi Vestnik Urala. 2008;6(48):56-59. (*In Russ*)].

3. Adoligbe C, Zan L, Farougou S, Wang H, Ujjan JA. Bovine GDF10 gene polymorphism analysis and its association with body measurement traits in Chinese indigenous cattle. Mol Biol Rep. 2012;39(4):4067-4075. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1188-1>

4. Bani Ismail ZA, Al-Majali AM, Amireh F, Al-Rawashreh OF. Metabolic profile in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. Vet Clin Pathol. 2008;37(4):434-437. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00076.x>

5. Capellini TD, Chen H, Cao J, Doxey AC, Kiapour AM, Schoor M, Kingsley DM. Ancient selection for derived alleles at a GDF5 enhancer influencing human growth and osteoarthritis risk. Nat Genetics. 2017;49(8):1202-1210. doi: 10.1038/ng.3911

6. Chen H, Capellini TD, Schoor M, Mortlock DP, Reddi AH, Kingsley DM. Heads, shoulders, elbows, knees, and toes: modular Gdf5 enhancers control different joints in the vertebrate skeleton. PLoS Genetics. 2016;12(11):e1006454. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006454>

7. Chhabra A, Tsou D, Clark RT, Gaschen V, Hunziker EB, Mikic B. Gdf-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing. J Orthop Res. 2003;21(5):826-835. doi: [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)00049-4)

8. Chujo T, An H, Akeda K, Miyamoto K, Muehleman C, Attawia M, Andersson G, Masuda K. Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc-*in vitro* bovine study and *in vivo* rabbit disc degeneration model study. Spine. 2006;31(25):2909-2917. doi: <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000248428.22823.86>

9. Cole JB, Wiggans GR, Ma L, Sonstegard TS, Lawlor TJ Jr, Crooker BA, Van Tassell CP, Yang J, Wang Sh, Matukumalli LK, Da Y. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. BMC Genomics. 2011;12:408. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-408>

10. Djari A, Esquerre D, Weiss B, Martins F, Meersseman C, Boussaha M, Klopp C, Rocha D. Gene-based single nucleotide polymorphism discovery in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. BMC Genomics. 2013;14:307. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-307>

11. Edwards CJ, Francis-West PH. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. Semin Arthritis Rheum. 2001;31(1):33-42. doi: <https://doi.org/10.1053/sarh.2001.24875>

12. Ekegbu UJ, Burrows L, Amirpour-Najafabadi H, Zhou H, Hickford JGH. Gene polymorphisms in PROP1 associated with growth traits in sheep. Gene. 2019;683:41-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.024>

13. Farooq M, Nakai H, Fujimoto A, Fujikawa H, Kjaer KW, Baig SM, Shimomura Y. Characterization of a novel missense mutation in the prodomain of GDF5, which underlies brachydactyly type C and mild Grebe type chondrodysplasia in a large Pakistani family. Human Genetics. 2013;132(11):1253-1264 doi: <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1330-3>

14. Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, Allen S, MacPherson S, Luyten FP, Archer CW. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. Development. 1999;126(6):1305-1315.

15. Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K. Long non-coding RNA myoparr regulates GDF5 expression in denervated mouse skeletal muscle. Non-Coding RNA. 2019;5:33. doi: <https://doi.org/10.3390/ncrna5020033>

16. Hou GY, Yuan ZR, Zhou HL, Zhang LP, Li JY, Gao X, Wang DJ, Gao HJ, Xu SZ. Association of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Mol Biol Rep.* 2011;38(7):4705-4708. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0605-1>
17. Karim L, Takeda H, Lin L, Druet T, Arias JA, Baurain D, Cambisano N, et al. Variants modulating the expression of a chromosome domain encompassing PLAG1 influence bovine stature. *Nat Genetics.* 2011;43:405-413. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.814>
18. Kellgren JH, Moore R. Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes. *Br Med J.* 1952;1:181-187. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4751.181>
19. Kiapour AM, Cao J, Young M, Capellini TD. The role of Gdf5 regulatory regions in development of hip morphology. *PLoS One.* 2018;13(11):e0202785. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202785>
20. Leonidou A, Irving M, Holden S, Katchburian M. Recurrent missense mutation of GDF5 (p.R438L) causes proximal symphalangism in a British family. *World. J. Orthop.* 2016;7(12):839-842. doi: [10.5312/wjo.v7.i12.839](https://doi.org/10.5312/wjo.v7.i12.839)
21. Liu YF, Zan LS, Li K, Zhao SP, Xin YP, Lin Q, Tian WQ, Wang ZW. A novel polymorphism of GDF5 gene and its association with body measurement traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. *Molecular Biology Reports.* 2010;37(1):429-434. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9604-5>
22. Merino R, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath KT, Varona P, Hurler JM. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol.* 1999;206(1):33-45. doi: <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9129>
23. Mikic B. Multiple effects of GDF5 deficiency on skeletal tissues: implications for therapeutic bioengineering. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):466-476. doi: <https://doi.org/10.1023/B:ABME.0000017549.57126.51>
24. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi DQ, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics.* 2007;39:529-533. doi: <https://doi.org/10.1038/2005>
25. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum.* 1995;38(8):1134-1141. doi: <https://doi.org/10.1002/art.1780380817>
26. Schenkel FS, Miller SP, Wilton JW. Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth and body composition traits of young beef bulls. *Can J Anim Sci.* 2004;84(2):177-184. doi: <https://doi.org/10.4141/A03-085>
27. Storm EE, Kingsley DM. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development.* 1996;122:3969-3979.
28. Tashiro T, Hiraoka H, Ikeda Y, Ohnuki T, Suzuki R, Ochi T, Nakamura K, Fukui N. Effect of GDF-5 on ligament healing. *J Orthop Res.* 2006;24(1):71-79. doi: <https://doi.org/10.1002/jor.20002>
29. Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF- β superfamily member. *Nature Genetics.* 1996;12:315-317. doi: <https://doi.org/10.1038/ng0396-315>
30. Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, Wallace C, Evans DM, Mangino M, Freathy RM, et al. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet.* 2008;40(5):575-583. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.121>
31. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- β gene family. *J Clin Invest.* 1997;100(2):321-330. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI119537>
32. Wu DD, Li GM, Jin W, Li Y, Zhang YP. Positive selection on the osteoarthritis-risk and decreased-height associated variants at the GDF5 gene in East Asians. *PLoS One.* 2012;7(8):e42553. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042553>
33. Yang W, Cao L, Liu W, Jiang L, Sun M, Zhang D, Wang S, Lo HYW, Luo Y, Zhang X. Novel point mutations in GDF5 associated with two distinct limb malformations in Chinese: brachydac-

tyly type C and proximal symphalangism. J Hum Genetics. 2008;53:368-374. doi: <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0253-7>

34. Zhang YR, Gui LS, Li YK, Jiang BJ, Wang HC, Zhang YY, Zan LS. Molecular characterization of bovine SMO gene and effects of its genetic variations on body size traits in Qinchuan cattle (*Bos taurus*). J Mol Sci. 2015;16(8):16966-16980. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms160816966>

References

1. Bashirov VD, Frolov AN, Erzikov VI. Hematological blood parameters of gobies, depending on the period of their weaning from mothers in beef cattle breeding. Herald of Beef Cattle Breeding. 2008;61(II):243-244.
2. Fatkullin RR. Morphological and biochemical blood parameters of experimental animals using the biologically active additive Vitartil. Agrarian Bulletin of the Urals. 2008;6(48):56-59.
3. Adoligbe C, Zan L, Farougou S, Wang H, Ujjan JA. Bovine GDF10 gene polymorphism analysis and its association with body measurement traits in Chinese indigenous cattle. Mol Biol Rep. 2012;39(4):4067-4075. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1188-1>
4. Bani Ismail ZA, Al-Majali AM, Amireh F, Al-Rawashreh OF. Metabolic profile in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. Vet Clin Pathol. 2008;37(4):434-437. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00076.x>
5. Capellini TD, Chen H, Cao J, Doxey AC, Kiapour AM, Schoor M, Kingsley DM. Ancient selection for derived alleles at a GDF5 enhancer influencing human growth and osteoarthritis risk. Nat Genetics. 2017;49(8):1202-1210. doi: [10.1038/ng.3911](https://doi.org/10.1038/ng.3911)
6. Chen H, Capellini TD, Schoor M, Mortlock DP, Reddi AH, Kingsley DM. Heads, shoulders, elbows, knees, and toes: modular Gdf5 enhancers control different joints in the vertebrate skeleton. PLoS Genetics. 2016;12(11):e1006454. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006454>
7. Chhabra A, Tsou D, Clark RT, Gaschen V, Hunziker EB, Mikic B. Gdf-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing. J Orthop Res. 2003;21(5):826-835. doi: [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)00049-4)
8. Chujo T, An H, Akeda K, Miyamoto K, Muehleman C, Attawia M, Andersson G, Masuda K. Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc-*in vitro* bovine study and *in vivo* rabbit disc degeneration model study. Spine. 2006;31(25):2909-2917. doi: <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000248428.22823.86>
9. Cole JB, Wiggans GR, Ma L, Sonstegard TS, Lawlor TJ Jr, Crooker BA, Van Tassell CP, Yang J, Wang Sh, Matukumalli LK, Da Y. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. BMC Genomics. 2011;12:408. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-408>
10. Djari A, Esquerre D, Weiss B, Martins F, Meersseman C, Boussaha M, Klopp C, Rocha D. Gene-based single nucleotide polymorphism discovery in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. BMC Genomics. 2013;14:307. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-307>
11. Edwards CJ, Francis-West PH. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. Semin Arthritis Rheum. 2001;31(1):33-42. doi: <https://doi.org/10.1053/sarh.2001.24875>
12. Ekegbu UJ, Burrows L, Amirpour-Najafabadi H, Zhou H, Hickford JGH. Gene polymorphisms in PRO1 associated with growth traits in sheep. Gene. 2019;683:41-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.024>
13. Farooq M, Nakai H, Fujimoto A, Fujikawa H, Kjaer KW, Baig SM, Shimomura Y. Characterization of a novel missense mutation in the prodomain of GDF5, which underlies brachydactyly type C and mild Grebe type chondrodysplasia in a large Pakistani family. Human Genetics. 2013;132(11):1253-1264. doi: <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1330-3>
14. Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, Allen S, MacPherson S, Luyten FP, Archer CW. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. Development. 1999;126(6):1305-1315.

15. Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K. Long non-coding RNA myoparr regulates GDF5 expression in denervated mouse skeletal muscle. *Non-Coding RNA*. 2019;5:33. doi: <https://doi.org/10.3390/ncrna5020033>
16. Hou GY, Yuan ZR, Zhou HL, Zhang LP, Li JY, Gao X, Wang DJ, Gao HJ, Xu SZ. Association of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Mol Biol Rep*. 2011;38(7):4705-4708. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0605-1>
17. Karim L, Takeda H, Lin L, Druet T, Arias JA, Baurain D, Cambisano N, et al. Variants modulating the expression of a chromosome domain encompassing PLAG1 influence bovine stature. *Nat Genetics*. 2011;43:405-413. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.814>
18. Kellgren JH, Moore R. Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes. *Br Med J*. 1952;1:181-187. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4751.181>
19. Kiapour AM, Cao J, Young M, Capellini TD. The role of Gdf5 regulatory regions in development of hip morphology. *PLoS One*. 2018;13(11):e0202785. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202785>
20. Leonidou A, Irving M, Holden S, Katchburian M. Recurrent missense mutation of GDF5 (p.R438L) causes proximal symphalangism in a British family. *World. J. Orthop*. 2016;7(12):839-842. doi: [10.5312/wjo.v7.i12.839](https://doi.org/10.5312/wjo.v7.i12.839)
21. Liu YF, Zan LS, Li K, Zhao SP, Xin YP, Lin Q, Tian WQ, Wang ZW. A novel polymorphism of GDF5 gene and its association with body measurement traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. *Molecular Biology Reports*. 2010;37(1):429-434. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9604-5>
22. Merino R, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath KT, Varona P, Hurler JM. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol*. 1999;206(1):33-45. doi: <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9129>
23. Mikic B. Multiple effects of GDF5 deficiency on skeletal tissues: implications for therapeutic bioengineering. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(3):466-476. doi: <https://doi.org/10.1023/B:ABME.0000017549.57126.51>
24. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi DQ, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nature Genetics*. 2007;39:529-533. doi: <https://doi.org/10.1038/2005>
25. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum*. 1995;38(8):1134-1141. doi: <https://doi.org/10.1002/art.1780380817>
26. Schenkel FS, Miller SP, Wilton JW. Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth and body composition traits of young beef bulls. *Can J Anim Sci*. 2004;84(2):177-184. doi: <https://doi.org/10.4141/A03-085>
27. Storm EE, Kingsley DM. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development*. 1996;122:3969-3979.
28. Tashiro T, Hiraoka H, Ikeda Y, Ohnuki T, Suzuki R, Ochi T, Nakamura K, Fukui N. Effect of GDF-5 on ligament healing. *J Orthop Res*. 2006;24(1):71-79. doi: <https://doi.org/10.1002/jor.20002>
29. Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF- β superfamily member. *Nature Genetics*. 1996;12:315-317. doi: <https://doi.org/10.1038/ng0396-315>
30. Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, Wallace C, Evans DM, Mangino M, Freathy RM, et al. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet*. 2008;40(5):575-583. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.121>
31. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- β gene family. *J Clin Invest*. 1997;100(2):321-330. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI119537>

32. Wu DD, Li GM, Jin W, Li Y, Zhang YP. Positive selection on the osteoarthritis-risk and decreased-height associated variants at the GDF5 gene in East Asians. PLoS One. 2012;7(8):e42553. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042553>
33. Yang W, Cao L, Liu W, Jiang L, Sun M, Zhang D, Wang S, Lo HYW, Luo Y, Zhang X. Novel point mutations in GDF5 associated with two distinct limb malformations in Chinese: brachydactyly type C and proximal symphalangism. J Hum Genetics. 2008;53:368-374. doi: <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0253-7>
34. Zhang YR, Gui LS, Li YK, Jiang BJ, Wang HC, Zhang YY, Zan LS. Molecular characterization of bovine SMO gene and effects of its genetic variations on body size traits in Qinchuan cattle (*Bos taurus*). J Mol Sci. 2015;16(8):16966-16980. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms160816966>

Харламов Анатолий Васильевич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий отделом технологии мясного скотоводства и производства говядины, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532)43-46-78, e-mail: vniiims.or@mail.ru

Фролов Алексей Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела технологии мясного скотоводства и производства говядины, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532)43-46-78, e-mail: forleh@mail.ru

Завьялов Олег Александрович, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела технологии мясного скотоводства и производства говядины, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532)43-46-78, e-mail: oleg-zavyalov83@mail.ru

Тяпугин Евгений Александрович, доктор биологических наук, академик РАН, главный научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и металомики в животноводстве, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532) 43-46-78, e-mail: vniiims.or@mail.ru

Поступила в редакцию 5 сентября 2019 г.; принята после решения редколлегии 16 сентября 2019 г.; опубликована 30 сентября 2019 г. / Received: 5 September 2019; Accepted: 16 September 2019; Published: 30 September 2019