

## АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ЛЕПТИНУ ТА РЕЦЕПТОРА ЛЕПТИНУ З ЯКІСТЮ М'ЯСА СВИНЕЙ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

В.М. БАЛАЦЬКИЙ<sup>1,2,\*</sup>, Є.К. ОЛІЙНИЧЕНКО<sup>1</sup>, А.М. САЄНКО<sup>1</sup>, Т.В. БУСЛИК<sup>3</sup>,  
І.Б. БАНЬКОВСЬКА<sup>1</sup>, М.Ю. ПЕКА<sup>1,2</sup>, О. ДОРАН<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Лабораторія генетики, Інститут свинарства і агропромислового виробництва, Національна академія аграрних наук України, Шведська Могила 1, Полтава, 36013, Україна

<sup>2</sup> Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, площа Свободи 4, Харків, 61022, Україна

<sup>3</sup> Лабораторія обміну речовин імені Степана Гжицького, Інститут біології тварин, Національна академія аграрних наук України, В. Стуса 38, Львів, 79034, Україна

<sup>4</sup> Факультет здоров'я і прикладних наук, Університет Західної Англії, Френчей кампус, Колдхарбор лейн, Брістоль, BS16 1 QY, Великобританія

E-mail: vnbalatsky@gmail.com, olejliza@gmail.com, artsm82@gmail.com, tvbulyk@gmail.com, gloryir2017@gmail.com, pekapoltava@gmail.com, olena.doran@uwe.ac.uk

Досліджували асоціації SNP в гені лептину (*LEP* g.2845A>T, *LEP* g.3996T>C, *LEP* g.3469T>C) і гені рецептора лептину (*LEPR* c.232A>T, *LEPR* c.2856C>T, *LEPR* c.915C>T) з ознаками якості м'яса свиней великої білої породи української селекції (УВБ). Був проведений обчислювальний аналіз (SIFT, PolyPhen-2 та I-Mutant біоінформаційні сервіси) впливу мутацій, які викликають SNP, як для вибраних SNP, так і для тих місенс-SNP, для яких вони можуть бути потенційними LD (Linkage Disequilibrium) маркерами, на структуру та функції лептину і рецептора лептину. *LEP* SNP c.3469T>C (екзон 3, rs45431504) асоційований із вмістом білка в м'ясі та вмістом вологи в спинному жирі. *LEP* SNP g.2845A>T (rs344615147), який асоціюється з вологоутримуючою здатністю м'яса та вмістом вологи в спинному жирі, розташований у другому інтроні та, як і SNP c.3469T>C, імовірно, можна розглядати як LD маркер місенс-поліморфізму SNP *LEP* rs701423985. *LEPR* SNP c.232A>T (екзон 4, rs45435517) — це місенс-мутація, яка викликає амінокислотну заміну S52I. Оцінки, отримані за допомогою SIFT і PolyPhen-2, вказують на значний вплив rs45435517 на функціональні характеристики рецептора лептину. Дійсно, у нашій роботі встановлена асоціація SNP c.232A>T з товщиною шпигу. У той же час SNP c.2856C>T (екзон 20, rs694660564, синонімічна заміна), який у нашій роботі продемонстрував асоціацію з втратою вологи у м'ясі у свиней УВБ, може бути потенційним LD маркером і знаходиться у нерівновазі за зчепленням з місенс SNP *LEPR* rs1113972516, rs792804682 і rs1109261799. SNP, для яких у нашій роботі були встановлені асоціації з показниками якості м'яса, очевидно, можна розглядати як потенційні маркери для селекції свиней УВБ і, мож-

ливо, інших порід, направленої на отримання генотипів з покращеними характеристиками якості м'яса.

**Ключові слова:** свині, ген лептину, ген рецептора лептину, SNP, ознаки якості м'яса, асоціація, обчислювальний аналіз ефектів SNP.

**Вступ.** Маркер-асоційована селекція широко використовується у свинарстві для збільшення вмісту м'яса, швидкості росту тварин, багатоплідності та для зменшення коефіцієнта конверсії корму (Hermesch et al, 2015; Egbert et al, 2016). У той же час генетичний відбір може мати негативний вплив на якість м'яса як безпосередньо, так і через підвищення чутливості свиней до стресу (Biedermann et al, 2000; Matousek et al, 2016). Зокрема, селекція, направлена на більш високий вміст м'яса в туші, була пов'язана зі зниженням вмісту внутрішньом'язового жиру, ніжності та pH (Pena et al, 2016; Kim et al, 2020), що, у свою чергу, негативно вплинуло на споживання та конкурентоспроможність свинини (Vonneau et al, 2010). Одним із підходів до вирішення цієї проблеми є визначення ефективних і специфічних для породи генетичних маркерів ознак якості м'яса та включення їх у програми розведення. У цьому відношенні ген лептину (*LEP*) і ген рецептора лептину (*LEPR*) привертають все більшу увагу.

Ген *LEP* кодує гормон лептин, який бере участь у регуляції енергетичного балансу. Він розташований на 18-й хромосомі в області QTL, що контролює продуктивні ознаки свиней, а також вміст м'язової тканини і склад

© В.М. БАЛАЦЬКИЙ, Є.К. ОЛІЙНИЧЕНКО,  
А.М. САЄНКО, Т.В. БУСЛИК, І.Б. БАНЬКОВСЬКА,  
М.Ю. ПЕКА, О. ДОРАН, 2022

туші (Malek et al, 2001; Dragos-Wendrich et al, 2003; Pant et al, 2015). Інформація про зв'язок між поліморфізмом *LEP* і характеристиками якості м'яса обмежена, а іноді суперечлива. Ряд авторів продемонстрували зв'язок між *LEP* SNP с.3469T>C і товщиною хребтового жиру (BFT, back fat thickness), вмістом внутрішньом'язового жиру (IMF, intramuscular fat) м'ясністю та вагою шинки, середньодобовим приростом і споживанням корму у свиней великої білої породи різного походження, ландрас та деяких інших промислових порід. (Jiang & Gibson, 1999; Kennes et al, 2001; Bauer et al, 2006; de Oliveira Peixoto et al, 2006; Vižiene et al, 2018). Було встановлено зв'язок між SNP g.2845A>T (інтрон 2) і характеристиками споживання корму та швидкістю росту у свиней ландрас (Kennes et al, 2001). Крім того, в інтроні 2 SNP g.2411T>C був пов'язаний із вагою лопатки без шкіри та жиру, товщиною спинного жиру та вагою філе, мутація T3266G була пов'язана із забійним віком та структурою туші свиней, отриманих шляхом схрещування місцевої бразильської породи Brazilian Piau зі свиноматками комерційних ліній, отриманих від схрещування порід ландрас, велика біла та п'етрен (De Oliveira Peixoto et al, 2009). У наших попередніх дослідженнях, проведених на свинях великої білої породи, були встановлені асоціації *LEP* з такими показниками якості м'яса, як вміст протеїну, вологи та її втрата (SNP с.3469T>C), вологоутримуюча здатність і вміст внутрішньом'язового жиру (SNP g.2845A>T) (Oleinychenko et al, 2018a). У той же час Szydlowski et al. (2004) не спостерігали зв'язку між цими SNP та товщиною хребтового жиру та відсотком пісного м'яса в польській великій білій та польській синтетичній лінії 990. У наших роботах (Balatsky et al, 2018; Oleinychenko et al, 2018b) також не виявлено зв'язку *LEP* SNP g.2845A>T з товщиною спинного жиру у свиней великої білої породи. Згідно Hirose et al (2014) та Szydlowski et al (2004), зв'язок між *LEP* SNP та складом туші є породоспецифічним та залежить від генетичного оточення. Про незначний вплив *LEP* SNP на продуктивність свиней свідчать дані Mankowska et al (2015). Так, у порід польський ландрас і польська велика біла виявлено 8 SNP і 1 індел в області 3'UTR гена *LEP*. У поро-

ди дюрок було ідентифіковано 9 специфічних SNP в тій самій області, один з яких був локалізований у цільовому сайті для мікроРНК (miR-9). Однак лише один із SNP (с.+846C>T) мав слабкий зв'язок із вагою абдомінального жиру.

Дія лептину здійснюється через рецептори лептину, які кодуються геном *LEPR*. QTL, що контролює ознаки якості м'яса, включаючи відкладення жиру, було ідентифіковано на 6-й хромосомі у ділянці близькій до *LEPR* в досліді на свинях поєднань Іберійська × Ландрас і Іберійська × Мейшан (Ovilo et al, 2005; Munoz et al, 2009; Ros-Freixedes et al, 2016). Є багато даних про зв'язок поліморфізму *LEPR* з ознаками продуктивності, але щодо ознак якості м'яса дані фрагментарні. Одним із найбільш вивчених SNP *LEPR* є с.1987C>T у 18-му екзоні гена. Наша попередня робота та дані інших авторів повідомляли про зв'язок між цим SNP та відкладенням жиру у свиней породи українська велика біла, кросу дюрок × ландрас/велика біла, породи дюрок та іберійських свиней (Galve et al, 2012; Henriquez-Rodriguez et al, 2016; Balatsky et al, 2016a; 2016b; 2018; Oleinychenko et al, 2018b). У той же час було ідентифіковано ряд інших SNP *LEPR*, пов'язаних з продуктивними ознаками (наприклад, с.2856C>T, с.915C>T і с.232A>T), але їх зв'язок із ознаками якості м'яса залишається неясним (Mackowski et al, 2005; Zhang et al, 2014). Крім того, в роботі Chmurzynska et al (2004), проведеної на свинях порід польський ландрас і польська велика біла, встановлено зв'язок між мікросателітом у 3-му інтроні гена *LEPR* і товщиною хребтового жиру та вмістом внутрішньом'язового жиру. Jun-Mo Kim et al, (2017) продемонстрували асоціацію 5'-регуляторної області гена *LEPR* з BFT і ознаками якості м'яса (колір, склад білка та вологи, втрата при кулінарній обробці та рН через 24 год після забою) у свиней породи беркшир. А в роботі Trakovicka et al (2016) продемонстровано асоціацію поліморфізму НраII, розташованого в четвертому інтроні гена *LEPR*, з товщиною спинного жиру, площею довгого м'яза грудної клітини, відсотком нежирного м'яса свиней кросу велика біла × ландрас. Kyung-Tai Lee et al, (2016) дослідили 24 SNP, у тому числі 6 SNP в екзонах і 18 SNP в межах 5'-регулятор-

ної області гена *LEPR* свиней, і встановили зв'язок між SNP –790C>G гена *LEPR* і BFT та відсотком нежирного м'яса в туші свиней породи дюркок, тоді як інші, включаючи SNP з місенс-поліморфізмом, не впливали на жодний фенотип. Є відомості про вплив SNP *LEPR* с.2856C>T на ніжність м'яса і його загальний смак у свиней канадського потрійного кросу (Zhang et al, 2014) і на IMF, вологість м'яса, вміст холестерину і смак м'яса у свиней кросу корейська локальна порода × йоркшир (Li et al, 2010).

Загалом літературні дані щодо пошуку асоціацій поліморфізмів, локалізованих у різних частинах генів *LEP* та *LEPR*, з продуктивними якостями свиней пов'язані переважно з будовою туші тварин, накопиченням BFT та інтенсивністю їх росту. І лише поодинокі публікації присвячені зв'язку поліморфізмів *LEP* і *LEPR* з параметрами якості м'яса.

Очевидно, що вплив кожного з SNP, виявлених у гені та в прилеглих до нього регіонах, не є однаковим для контрольованої ознаки. Це залежить від локалізації SNP у певних структурно-функціональних ділянках гена, місенс-або синонімічного характеру мутації, що є причиною поліморфізму, можливого впливу нуклеотидної заміни на рівень і специфічність експресії гена, зміни сигналів сплайсингу, що призводять до синтезу альтернативних варіантів мРНК та інших факторів. Таким чином, при асоціативному аналізі при вивченні можливого впливу гена на досліджувані ознаки доцільно розглядати не один SNP, а кілька різних локалізацій.

Велика біла української селекції (УВБ) — одна з основних порід свиней в Україні. Велика біла порода свиней (ВБ) широко використовується для виробництва комерційних кросів у більш ніж 100 країнах (FAO, 2014). Велика біла порода свиней української селекції, створена на основі великої білої, має поєднання високої м'ясності туші, високої швидкості росту та високого рівня відтворювальних ознак, відмінних м'ясних якісних характеристик і не має високих вимог до менеджменту (Kramarenko et al, 2020). Однак існує дуже обмежена інформація щодо генетичних маркерів якості м'яса свиней УВБ.

Це дослідження мало на меті проаналізувати асоціації поліморфізмів генів лептину (*LEP* g.2845A>T, *LEP* g.3996T>C, *LEP* g.3469T>C) і рецептора лептину (*LEPR* с.232A>T, *LEPR* с.2856C>T, *LEPR* с.915C>T) з якістю м'яса свиней української великої білої породи. Вибір SNP визначався як інформацією про асоціацію кожного з них з ознаками продуктивності, що свідчить про можливий вплив на якість м'яса, так і локалізацією SNP у різних ділянках генів *LEP* та *LEPR*, що робить їх потенційними LD (Linkage Disequilibrium) маркерами.

Конкретними цілями були: (i) обчислювальний аналіз впливу вибраних SNP і тих місенс-SNP, для яких вони можуть бути потенційними LD маркерами, на структуру та функції білків з використанням різних алгоритмів прогнозування (SIFT, PolyPhen-2 та I-Mutant), (ii) оцінка поліморфізму вибраних SNP в популяції свиней української великої білої породи та (iii) аналіз асоціації поліморфізмів з показниками якості м'яса.

**Матеріал і методи.** *Тварини та біологічні зразки.* Дослідження проводили на свиноматках великої білої породи української селекції. У асоціативних дослідженнях було використано 106 тварин. Кількість тварин у популяційних дослідженнях становила від 106 до 215 залежно від досліджуваних SNP. Протокол експерименту затверджено вченою радою Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН України. Усі процедури, пов'язані з поводженням з тваринами, відповідали Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Європейська конвенція 1986 р.). Тварин вирощували у господарстві, що належить Українській академії аграрних наук, в умовах, які описані у нашій попередній роботі (Balatsky et al, 2016a).

Зразки крові (1 мл) відбирали з вушної вени. Зразки крові змішували із 0,05 М EDTA та зберігали до 7 днів при +4 °С до використання для виділення ДНК.

*Аналіз якості м'яса.* Свині, використані в асоціативних дослідженнях, були перевірені на мутацію с.1843C>T в гені рецептора ріанодину, яка, як відомо, пов'язана з дефектами якості м'яса свиней (Biedermann et al, 2000). Усі тва-

рини у нашому дослідженні мали генотип СС, що означає відсутність мутантного алельного варіанту.

Значення рН м'яса визначали за використання портативного цифрового приладу LFMeter (Ing.-Buro & Klassifizierungsservice, Німеччина) після охолодження туш впродовж 48 год при температурі від +2 °С до +4 °С. Аналіз проводили на зразках м'язів *m. longissimus thoracic*, у ділянці між 10-м і 12-м грудними хребцями з правого боку туш.

Загальний вміст води визначали шляхом висушування зразків м'яса у печі із примусовою вентиляцією при 105 °С до постійної ваги та обчислення різниці між початковою вагою зразка та вагою сухого зразка. Подібний підхід використовувався для аналізу вмісту золи, коли зразки м'яса спалювали в муфельній печі при 550 °С і розраховували різницю між початковою вагою зразка та вагою зразка після спалювання (АОАС, 1990). Вміст сирого протеїну аналізували за методом К'ельдаля, а вміст внутрішньом'язового жиру визначали за методом Сокслета, як описано в офіційних методах аналізу (АОАС, 1990).

Ніжність м'яса визначали за допомогою аналізу сили зсуву Уорнера-Братцлера (Warcard et al, 1981). Зразки м'яса (довжиною 8 см і діаметром 2,5 см) відбирали паралельно поздовжній орієнтації м'язових волокон. Зразки подрібнювали ріжучим лезом у шести точках зі швидкістю 200 мм/хв. Для кожної точки реєстрували час подрібнення та розраховували середні значення.

Товщину хребтового жиру визначали на рівні 6–7 ребер.

**Генотипування.** Описані вище SNP *LEP* і *LEPR* були позначені відповідно до їхнього положення у послідовності генів та мРНК, що представлені у GenBank (ген лептину: GenBank U66254.1; мРНК *LEPR*: AF092422.1). У цьому дослідженні всі SNP були ідентифіковані також відповідно до їхніх ID номерів «rs» у Ensembl genome браузері. Референсними послідовностями, використаними для характеристики SNP, були ENSSSCG00000040464 для гена *LEP* і ENSSSCG00000025188 для гена *LEPR*. Такий підхід допомагає уніфікувати всі SNP, представлені у дослідженні, і спростити подальше використання його результатів.

Геномну ДНК виділяли із крові сорбентним методом з використанням набору Diatom™ DNA Prep 100 kit («Isogen», РФ) згідно з інструкціями виробника із лізисним реагентом гуанідинтіоціанатом.

Генотипування *LEP* і *LEPR* проводили, як описано De Oliveira et al (2006), Kennes et al (2001), Li et al (2010) та Mackowski et al (2005) за допомогою методу визначення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів продуктів ПЛР-ампліфікації (ПЛР–ПДРФ). Інформація про праймери представлена у табл. 1. Реакційна суміш містила геномну ДНК, прямий і зворотний праймери (0,2 мкМ), dNTP (0,25 мМ), MgCl<sub>2</sub> (2,5 мМ) і рекомбінантну Taq ДНК-полімеразу (Thermo Scientific, ЄС), загальний об'єм 25 мкл. Генотипування *LEP* проводили за SNP: g.2845A>T (інтрон 2, rs344615147), g.3996T>C (3'UTR, rs337366389) та g.3469T>C (екзон 3, rs45431504). Генотипування *LEPR* проводили за SNP: c.232A>T (екзон 4, rs45435517), c.915C>T (екзон 8, rs710321903) та c.2856C>T (екзон 20, rs694660564). Умови ПЛР, праймери та розміри рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ патерни алелів *LEP* і *LEPR*) представлені в табл. 1.

**Статистичний аналіз.** Програмне забезпечення GenAlEx 6.5 використовувалося для аналізу частот алелів і генотипів, інформаційного вмісту поліморфізму (PIC, polymorphic information content), а також фактичної (H<sub>o</sub>) і теоретично очікуваної (H<sub>e</sub>) гетерозиготності і нерівноваги за зчепленням (Peakall, et al 2012).

Статистична модель, використана для розрахунку ефекту кожного з SNP окремо, була:

$$y_i = \mu + \text{SNP}_i + e_i$$

де:  $y_i$  – фенотипове значення ознаки,  $\mu$  – середнє популяційне значення,  $\text{SNP}_i$  – постійний ефект генотипу SNP ( $i$  = генотипи 1, 2 або 3),  $e_i$  – випадкова помилка.

Модель не враховувала вплив стада, сезону, року тощо, оскільки дослідження проводилося одночасно в межах одного стада.

Аналіз зв'язків між генотипами з ознаками якості м'яса проводився методом One Way ANOVA. Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали двобічним t-test критерієм з використанням JMP12 (SAS

Inst. Inc., Cary, NC). Значення  $P \leq 0,05$  вважаються значущими.

Адитивна (A) і домінуюча (D) компоненти впливу SNP були розраховані, як описано в нашій попередній роботі (Balatsky et al, 2016a).

**Прогнозування ефектів SNP.** Було використано три біоінформаційні сервіси для аналізу впливу мутацій, які викликають SNP, як для вибраних SNP, так і для тих місенс-SNP, для яких вони можуть бути потенційними LD маркерами, на структуру та функції лептину та рецептора лептину. Мутація розглядалася як заміна нуклеотиду, відповідного еталонної послідовності гена.

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) використовувався для визначення різниці між толерантними і нетолерантними кодуєчими мутаціями. Це програмне забезпечення базується на інформації про множинне вирівнювання, щоб передбачити допустиму або шкідливу заміну для кожної позиції на послідовності. Заміни з ймовірністю, меншою за індекс толерантності 0,05, прогноуються як нетерпимі або шкідливі; ті, що перевищують або дорівнюють 0,05, вважаються допустимими (Ng et al, 2003).

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) — програмний інструмент, який передбачає можливий вплив амінокислотної заміни на структуру та функцію білка (Adzhubei et al, 2013).

Таблиця 1. ПЛР-праймери, умови та патерни рестрикції алелів *LEP* та *LEPR* у свиней великої білої породи української селекції

| Ген та SNP                              | Структура праймерів  | Умови ПЛР               |                          | Рестрикційні ензими та патерни рестрикції (п.н.)          |
|---|--|-------------------------|--------------------------|---|
|   |  | Довжина продукту (п.н.) | Температура відпалу (°C) |   |
| <i>LEP</i> g.2845<br>A>T (rs344615147)  | Прямий:<br>TTGGCGAGCCTGGGAGCAGT<br>Зворотній:<br>TCCCACTTAGGGATGGAGGCTGC   | 242                     | 63                       | (XbaI):<br>алель g.2845A, 242<br>алель g.2845T, 170+72    |
| <i>LEP</i> g.3996<br>T>C (rs337366389)  | Прямий:<br>AACTCCAAGGCACGACAC<br>Зворотній:<br>ACCCTGCTTGATGGTCGAAAGGCT    | 192                     | 63                       | (BglII):<br>алель g.3996T,<br>192 алель g.3996C, 107+85   |
| <i>LEP</i> g.3469<br>T>C (rs45431504)   | Прямий:<br>TGCCTGCTGGAATCTCAA<br>Зворотній:<br>TTCCCTGCAATGTTGTCTGC        | 486                     | 63                       | (Hinf I):<br>алель g.3469T, 486<br>алель g.3469C, 343+143 |
| <i>LEPR</i> c.2856<br>C>T (rs694660564) | Прямий:<br>CCCTCTCTTTGGAGCCTGA<br>Зворотній:<br>AGAAGCTTCTGGAATGAACTTAGACG | 795                     | 64                       | (AvaII):<br>алель c.2856T, 795<br>алель c.2856C, 502+293  |
| <i>LEPR</i> c.915<br>C>T (rs710321903)  | Прямий:<br>GCTGATGAGATCGTCTCAG<br>Зворотній:<br>CTTGTGTGGTAAAAGTAAAGG      | 145                     | 55                       | (MspI):<br>алель c.915T, 145<br>алель c.915C, 50+95       |
| <i>LEPR</i> c.232<br>A>T (rs45435517)   | Прямий:<br>TGCCTGCTGGAATCTCAA<br>Зворотній:<br>TTCCCTGCAATGTTGTCTGC        | 145                     | 55                       | (TasI):<br>алель c.232A, 71+113<br>алель c.232T, 184      |

I-Mutant — програмний інструмент для прогнозування змін стабільності білка при точкових мутаціях (Capriotti et al, 2005).

**Результати і обговорення.** Обчислювальний аналіз впливу мутації в генах лептину та рецептора лептину на функції та структуру білка. Існує ряд поліморфізмів генів *LEP* та *LEPR*, локалізованих у їхніх різних структурних областях, які асоціюються з певними ознаками продуктивності свиней. Але лише деякі з них пов'язані з місенс-мутаціями, які викликають зміни в структурі гормону або його рецептора. При цьому також можуть мати місце асоціації синонімічних і інтронних поліморфізмів і тих, що розташовані в суміжних ділянках генів, з продуктивними ознаками тварин. Вони можуть бути реалізовані через наступні механізми: (i) синонімічні заміни в екзонах можуть впливати на силу взаємодії кодон-антикодон і, як наслідок, швидкість трансляції мРНК, (ii) SNP, розташовані поруч із місенс-мутаціями, можуть бути їхніми генетичними маркерами, (iii) мутації в інтронах і в 5'- і 3'-нетрансльованих областях (5'-, 3'-UTR) можуть відбуватися

в послідовностях, залучених до регуляції транскрипції, трансляції та деградації транскриптів.

Наприклад, в гені лептину SNP g.2845A>T (rs344615147) розташований в другому інтроні в регіоні з регуляторним сайтом залученим до контролю експресії мРНК (Kennes et al, 2001). Згідно з Chogev et al (2012), інтрони впливають на час між активацією генної транскрипції і появою протеїнового продукту, що і може відбуватися у цьому випадку.

SNP g.3469T>C (rs45431504) — синонімічна мутація в 3-му екзоні *LEP*, для якого (для 3-го екзону) встановлено ряд вищеописаних асоціацій з продуктивними ознаками свиней. З одного боку, rs45431504 може бути маркером місенс-мутації *LEP* rs701423985 (V113I), розташованої на відстані 186 п.н. від нього, з іншого — здійснювати прямий вплив у відповідності з механізмом кодон-антикодонової взаємодії.

SNP *LEP* g.3996T>C (rs337366389) розташований у 3'-UTR, який бере участь у контролі стабільності мРНК (Kennes et al, 2001; Matoulkova et al, 2012) і містить послідовності, які впливають на долю мРНК і, відповідно,

Таблиця 2. Прогнозування ефектів SNP

| SNP   | Амінокислотні заміни | Прогнозовані ефекти SNP |                               |   |
|---|----------------------|-------------------------|-------------------------------|---|
|   |                      | SIFT                    | PolyPhen-2                    | I-Mutant  |
| <i>LEPR</i> rs45435517  | S52I                 | 0<br>(Шкідливий)        | 0,77<br>(Можливе пошкодження) | $\Delta\Delta G = 0,24$ Kcal/mol<br>(Збільшення стабільності) |
| <i>Розташований поблизу <i>LEPR</i> rs710321903 (c.915C&gt;T):</i>  |                      |                         |                               |   |
| <i>LEPR</i> rs1108059605  | F305L                | 0,56<br>(Толерантний)   | 0,0<br>(Сприятливий)          | $\Delta\Delta G = -0,68$ Kcal/mol<br>(Зменшення стабільності) |
| <i>Розташований поблизу <i>LEPR</i> rs694660564 (c.2856C&gt;T):</i> |                      |                         |                               |   |
| <i>LEPR</i> rs1113972516  | R938C                | 0,19<br>(Толерантний)   | 0,001<br>(Сприятливий)        | $\Delta\Delta G = -0,73$ Kcal/mol<br>(Зменшення стабільності) |
| <i>LEPR</i> rs1109261799  | P999L                | 1,0<br>(Толерантний)    | 0,0<br>(Сприятливий)          | $\Delta\Delta G = -0,51$ Kcal/mol<br>(Зменшення стабільності) |
| <i>LEPR</i> rs792804682   | Y1058D               | 0,0<br>(Шкідливий)      | 1,0<br>(Пошкодження)          | $\Delta\Delta G = -1,23$ Kcal/mol<br>(Зменшення стабільності) |
| <i>Розташований поблизу <i>LEP</i> rs45431504 (c.3469T&gt;C)</i>    |                      |                         |                               |   |
| <i>LEP</i> rs701423985  | V113I                | 0,04<br>(Шкідливий)     | 0,001<br>(Сприятливий)        | $\Delta\Delta G = -0,59$ Kcal/mol<br>(Зменшення стабільності) |

протеосинтез. Загалом, 3'-UTR гена лептину є складним набором регуляторних систем.

Що стосується гена рецептора лептину, то SNP с.232A>Т (rs45435517), розташований в 4-му екзоні гена, асоціюється з місенс-мутацією. Вона є причиною амінокислотної заміни S52I в рецепторному білку. Для цього SNP були встановлені вищезазначені асоціації з низкою продуктивних ознак свиней.

SNP *LEPR* с.915C>Т (rs710321903, 8-й екзон) і с.2856C>Т (rs694660564, 20-й екзон) пов'язані з синонімічними мутаціями. Кожен

з них, окрім того, що самостійно, як передбачається, може впливати на експресію гена *LEPR* за механізмом кодон-антикодонової взаємодії, також, очевидно, може служити маркером місенс-мутацій і відповідних SNP, розташованих поруч. Для rs710321903 це rs1108059605, розташований у тому самому 8-му екзоні *LEPR*, а для rs694660564 це rs1113972516, rs1109261799 і rs792804682, розташованих в екзоні 20, табл. 2.

Була проведена комп'ютерна оцінка SNP щодо їх здатності впливати на функції та стабільність білка. Оцінка проводилася для SNP, ві-

Таблиця 3. Генотипи *LEP* та *LEPR*, частоти алелів та гетерозиготність у свиней великої білої породи української селекції

| Ген та SNP                   | Генотип  | n <sup>a</sup> | Частота генотипа <sup>d</sup> | Частота алеля | He <sup>b</sup> | PI <sup>c</sup> | χ <sup>2</sup> |
|------------------------------|----------|----------------|-------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <i>g.2845A g.2845T</i>       |          |                |                               |               |                 |                 |                |
| <i>LEP</i><br>(rs344615147)  | g.2845AA | 78             | 0,37/0,45                     | 0,67 0,33     | 0,442           | 0,344           | 22,18          |
|                              | g.2845AT | 123            | 0,59/0,44                     |               |                 |                 |                |
|                              | g.2845TT | 8              | 0,04/0,11                     |               |                 |                 |                |
| <i>g.3996C</i>               |          |                |                               |               |                 |                 |                |
| <i>LEP</i><br>(rs337366389)  | g.3996CC | 106            | 1,00/1,00                     | 1 0,00        | 0,000           | 0,000           | —              |
|                              | g.3996CT | —              | 0,00/0,00                     |               |                 |                 |                |
|                              | g.3996TT | —              | 0,00/0,00                     |               |                 |                 |                |
| <i>g.3469T g.3469C</i>       |          |                |                               |               |                 |                 |                |
| <i>LEP</i><br>(rs45431504)   | g.3469TT | 89             | 0,84/0,84                     | 0,92 0,08     | 0,147           | 0,136           | 0,81           |
|                              | g.3469TC | 17             | 0,16/0,15                     |               |                 |                 |                |
|                              | g.3469CC |                | 0,00/0,01                     |               |                 |                 |                |
| <i>c.2856C c.2856T</i>       |          |                |                               |               |                 |                 |                |
| <i>LEPR</i><br>(rs694660564) | c.2856CC | 30             | 0,14/0,11                     | 0,34 0,66     | 0,449           | 0,348           | 2,75           |
|                              | c.2856CT | 85             | 0,40/0,45                     |               |                 |                 |                |
|                              | c.2856TT | 99             | 0,46/0,44                     |               |                 |                 |                |
| <i>c.915C c.915T</i>         |          |                |                               |               |                 |                 |                |
| <i>LEPR</i><br>(rs710321903) | c.915CC  | 174            | 0,81/0,76                     | 0,87 0,13     | 0,226           | 0,201           | 41,08          |
|                              | c.915CT  | 27             | 0,13/0,22                     |               |                 |                 |                |
|                              | c.915TT  | 14             | 0,06/0,02                     |               |                 |                 |                |
| <i>c.232A c.232T</i>         |          |                |                               |               |                 |                 |                |
| <i>LEPR</i><br>(rs45435517)  | c.232AA  | 17             | 0,08/0,02                     | 0,14 0,86     | 0,241           | 0,212           | 50,09          |
|                              | c.232AT  | 27             | 0,13/0,24                     |               |                 |                 |                |
|                              | c.232TT  | 170            | 0,79/0,74                     |               |                 |                 |                |

Примітка. <sup>a</sup> Чисельність тварин у досліджуваній популяції, <sup>b</sup> очікувана гетерозиготність, <sup>c</sup> polymorphic information content, <sup>d</sup> фактична/очікувана частота генотипів.

дібраних для асоціативного аналізу і для мі-сенс-SNP, для яких перші можуть бути маркерами. Для цієї мети було використано три біоінформаційні сервіси з різними підходами до обчислення: (i) головним чином передбачення функції білка на основі гомології послідовності (сервіс SIFT), (ii) прогнозування ушкоджуючої дії на основі комбінації декількох властивостей SNP (сервіс PolyPhen-2), (iii) прогнозування стабільності протеїну (сервіс I-Mutant). Результати аналізу представлені в табл. 2. Для більшості SNP за допомогою різних сервісів були отримані різноманітні оцінки.

Відповідно до SIFT *LEPR* c.232A>T (rs45435517) може впливати на функціональні характеристики білка. Оцінка PolyPhen-2 також свідчить про значний зв'язок цього SNP із фенотиповим ефектом. У той же час сервіс iMutant підрахував, що цей SNP призводить до підвищення стабільності рецептора лептину.

Що стосується *LEPR* rs1108059605, який розташований поблизу від rs710321903 (c.915C>T), обраного для нашого дослідження, то лише за даними iMutant, має місце потенційний вплив на стабільність білка. Такі ж висновки були

зроблені для *LEPR* rs1113972516 і *LEPR* rs1109261799, які розташовані в екзоні 20 і поблизу rs694660564 (c.2856C>T). Що стосується *LEPR* rs792804682, який також розташований в тому ж екзоні 20, то цей SNP за всіма трьома параметрами може потенційно істотно впливати на характеристики білка. SNP rs701423985, який знаходиться в екзоні 3 гена лептину, де знаходиться аналізований SNP *LEP* g.3469T>C (rs45431504), згідно з розрахунками, може впливати на стабільність структури білка.

Таким чином, характеристики, розраховані за алгоритмами оцінки SIFT, PolyPhen-2 та iMutant, вказують на потенційний вплив кожного з досліджуваних SNP і тих SNP, маркерами яких вони можуть бути, на структуру гормону та його рецептор, а отже, можуть проявлятися на фенотиповому рівні.

*Поліморфізм генів LEP та LEPR і нерівновага за зчепленням між SNP.* Результати, наведені у табл. 3, демонструють наявність поліморфізму у п'яти з шести досліджених SNP у популяції свиней УВБ. Поліморфізм не спостерігається лише для *LEP* SNP g.3996C>T, де було знайдено один алельний варіант g.3996C.

Таблиця 4. Вплив поліморфізмів *LEP* на показники якості м'яса свиней великої білої породи української селекції

| Найменування                                 | Генотип                  |              |             |                   |              |              |             | P |
|--|--------------------------|--------------|-------------|-------------------|--------------|--------------|-------------|---|
|  | <i>LEP</i> g.3469        |              | P           | <i>LEP</i> g.2845 |              |              | P           |   |
|  | TT (n <sup>a</sup> = 89) | TC (n = 17)  |             | AA (n = 54)       | AT (n = 47)  | TT (n = 5)   |             |   |
| Ніжність (g/cm <sup>2</sup> )                | 50,35 ± 0,98             | 53,95 ± 2,23 | 0,16        | 52,59 ± 1,25      | 49,15 ± 2,46 | 55,91 ± 2,87 | 0,08        |   |
| pH48 h                                       | 5,51 ± 0,01              | 5,51 ± 0,02  | 0,92        | 5,51 ± 0,01       | 5,51 ± 0,01  | 5,45 ± 0,03  | 0,58        |   |
| Втрат вологи (%)                             | 16,11 ± 0,41             | 14,92 ± 1,29 | 0,30        | 15,53 ± 0,49      | 16,27 ± 0,65 | 18,25 ± 2,87 | 0,30        |   |
| Волога в м'язовій тканині (%)                | 73,10 ± 0,30             | 73,00 ± 0,14 | 0,85        | 73,16 ± 0,17      | 72,90 ± 0,22 | 72,52 ± 0,39 | 0,41        |   |
| Волого-утримуюча здатність (%)               | 53,10 ± 0,56             | 54,14 ± 1,41 | 0,52        | 54,59 ± 0,73      | 51,71 ± 0,71 | 50,62 ± 2,90 | <b>0,02</b> |   |
| Зола (%)                                     | 1,19 ± 0,01              | 1,13 ± 0,04  | 0,16        | 1,17 ± 0,02       | 1,19 ± 0,02  | 1,13 ± 0,09  | 0,43        |   |
| Вміст протеїну (%)                           | 21,76 ± 0,11             | 21,05 ± 0,49 | <b>0,05</b> | 21,82 ± 0,15      | 21,40 ± 0,20 | 21,11 ± 0,83 | 0,16        |   |
| IMF <sup>b</sup> (%)                         | 2,79 ± 0,47              | 2,69 ± 0,13  | 0,88        | 2,66 ± 0,19       | 2,83 ± 0,18  | 3,46 ± 0,84  | 0,37        |   |
| Товщина хребтового жиру (см)                 | 2,56 ± 0,10              | 2,65 ± 0,32  | 0,57        | 2,52 ± 0,14       | 2,64 ± 0,14  | 2,95 ± 0,25  | 0,16        |   |
| Вміст вологи у хребтовому жирі (%)           | 6,29 ± 0,12              | 5,70 ± 0,11  | <b>0,05</b> | 5,95 ± 0,09       | 6,39 ± 0,18  | 7,16 ± 0,98  | <b>0,02</b> |   |
| Температура плавлення хребтового жиру t (°C) | 34,52 ± 0,38             | 35,20 ± 0,88 | 0,50        | 34,55 ± 0,48      | 34,93 ± 0,57 | 32,80 ± 0,74 | 0,44        |   |

Примітка. Дані представлені як Least Square Means ± SEM; <sup>a</sup> Кількість тварин; <sup>b</sup> Внутрішньом'язовий жир.



У випадку *LEP* SNP g.2845A>T частота алеля g.2845A була значно вищою порівняно з g.2845T. Це узгоджується з результатами досліджень порід йоркшир і дюрок (Kennes et al, 2001) і підтверджує результати, отримані в нашому попередньому дослідженні іншої популяції свиней української великої білої (Balatsky et al, 2018). У цьому дослідженні відхилення від збалансованого розподілу генотипів за *LEP* SNP g.2845A>T (розрахованого за рівнянням Харді-Вайнберга) мало статистично підтвержене значення ( $\chi^2 = 22,18$ ) за рахунок збільшення долі гетерозиготних свиней. Значення PIS становило 0,344, що є оптимальним рівнем для проведення асоціативних досліджень.

SNP *LEP* g.3469T>C у нашому дослідженні сегрегував із низькою частотою алеля g.3469C. У результаті значення PIS для цього SNP було низьким (0,136), що не дозволяє включити генотип g.3469CC в асоціативні дослідження. Роботи Villalba et al (2009) та Kennes et al (2001) також продемонстрували низьку частоту алеля *LEP* g.3469C у свиней дюрок, ландрас і йоркшир. У той же час дослідження Візієне et al (2018) продемонстрували однакову частоту альтернативних алелів *LEP* у змішаній групі неспоріднених свиней великої білої, ландрас та

йоркширської порід. Крім того, дослідження Getmantseva et al (2017) показали, що частота алеля *LEP* g.3469C у великій білої породи досягала 0,31. Однією з причин цієї невідповідності літературних даних може бути використання різних порід у дослідженнях. Також, навіть у межах однієї породи напрям селекції може впливати на частоту алелів, включаючи алелі *LEP* SNP g.3469T>C.

У випадку поліморфізму *LEPR* c.232A>T обидва алельні варіанти були присутні у свиней великої білої породи української селекції з більш високою частотою алеля c.232T. Це узгоджується з результатами нашої попередньої роботи (Balatsky et al, 2018) та узгоджується з даними щодо популяцій польських свиней великої білої породи, дюрок, польський ландрас, п'єтрен і гемпшир (Mackowski et al, 2005; Uemoto et al, 2012). У цьому дослідженні ми спостерігали значний зсув у розподілі генотипів *LEPR* c.232A>T від рівноваги у бік зменшення гетерозиготного генотипу та збільшення частки обох гомозиготних генотипів. У випадку поліморфізму *LEPR* c.915C>T, у цьому дослідженні алель c.915T був присутній у невеликій кількості тварин.

Подібно до поліморфізму *LEPR* c.232A>T, розподіл генотипів для SNP c.915C>T був змі-

Таблиця 5. Вплив поліморфізмів *LEPR* на показники якості м'яса свиней великої білої породи української селекції

| Показник                                   | Генотип                  |                         |      |                          |
|--|--------------------------|-------------------------|------|--------------------------|
|  | <i>LEPR</i> c.232        |                         | P    | CC (n <sup>a</sup> = 92) |
|  | TT (n <sup>a</sup> = 84) | AT (n <sup>a</sup> = 5) |      |                          |
| Ніжність (г/см <sup>2</sup> )              | 51,37 ± 0,97             | 49,59 ± 3,57            | 0,80 | 50,82 ± 1,01             |
| pH48 h                                     | 5,53 ± 0,02              | 5,51 ± 0,01             | 0,63 | 5,51 ± 0,01              |
| Втрата вологи (%)                          | 16,30 ± 0,41             | 14,80 ± 3,08            | 0,41 | 15,73 ± 0,46             |
| Волога в м'язевій тканині (%)              | 73,16 ± 0,15             | 72,65 ± 0,27            | 0,41 | 73,02 ± 0,16             |
| Вологоутримуюча здатність (%)              | 53,51 ± 0,56             | 53,04 ± 3,53            | 0,85 | 53,82 ± 0,62             |
| Зола (%)                                   | 1,17 ± 0,01              | 1,23 ± 0,03             | 0,31 | 1,17 ± 0,02              |
| Вміст протеїну (%)                         | 21,62 ± 0,14             | 22,09 ± 0,55            | 0,41 | 21,72 ± 0,14             |
| IMF <sup>b</sup> (%)                       | 2,91 ± 0,15              | 2,66 ± 0,14             | 0,53 | 2,79 ± 0,76              |
| Товщина хребтового жиру (см)               | 2,57 ± 0,01              | 3,23 ± 0,63             | 0,03 | 2,60 ± 0,11              |
| Вміст вологи в хребтовому жирі (%)         | 6,23 ± 0,13              | 6,24 ± 0,50             | 0,98 | 6,23 ± 0,14              |
| Температура плавлення хребтового жиру (°C) | 34,67 ± 0,40             | 35,00 ± 1,38            | 0,84 | 34,44 ± 0,44             |

Примітка. Дані представлені як Least Square Means ± SEM; <sup>a</sup> Кількість тварин; <sup>b</sup> Внутрішньом'язовий жир

шений у бік збільшення частки гомозигот через зменшення частки гетерозиготних генотипів. Інформативність цих SNP була низькою при значеннях PIC 0,212 і 0,201, відповідно, і була нижчою за оптимальний рівень, необхідний для асоціативних досліджень.

*LEPR* SNP с.2856C>T сегрегував у досліджуваній групі українських великих білих свиней з вищою частотою алеля с.2856T. Фактичний розподіл генотипів був подібним до очікуваного ( $\chi^2=2,75$ ) (табл. 2). Значення PIC для цього SNP було високим (0,348), що дозволяє використати цю групу тварин для асоціативних досліджень щодо *LEPR* SNP с.2856C>T.

Щоб оцінити можливості використання генотипів SNP *LEP* і *LEPR* як генетичних маркерів, було розраховано нерівновагу за зчепленням між проаналізованими SNP в межах кожного з генів (*LEP* g.2845A>T, g.3469T>C, g.3996T>C) і рецептора лептину (*LEPR* с.232A>T, с.915C>T і с.2856C>T), а також між SNP цих генів. Порушення рівноваги було виявлено лише між SNP с.232A>T і с.2856C>T у гені рецептора лептину ( $\chi^2 = 5,05$ ), однак сила зв'язку не була високою,  $r = 0,218$ . Вочевидь, комбінації варіантів генотипів лише цих двох SNP можна розглядати як генетичний маркер, який, імовірно, може збільшити статистичну вірогідність виявлення асоціації між геном і досліджуваними ознаками. Інші комбінаційні

варіанти SNP, як всередині кожного гена, так і між SNP цих генів не показали статистично підтвердженого порушення рівноваги за зчепленням і, отже, не є перспективними з точки зору їх використання в асоціативному аналізі.

Вплив поліморфізмів в генах *LEP* і *LEPR* на показники якості м'яса. Поліморфізм *LEP* g.3996C>T був відсутній у досліджуваній популяції свиней, тому щодо нього асоціативні дослідження не проводилися. Розподіл тварин за генотипами для кожного з SNP наведено в табл. 3. Слід зазначити, що *LEP* SNP g.3469T>C і с.232A>T мали низький рівень поліморфізму у свиней УВБ. Тому в дослідженні не було групи тварин із генотипами *LEP* g.3469CC та *LEPR* с.232AA. Результати асоціативного аналізу наведено в табл. 4 і 5.

У нашому дослідженні встановлено, що *LEP* SNP g.3469T>C мав значний вплив на вміст білка у м'ясі ( $P = 0,05$ ). Вміст білка у м'ясі свині з генотипом g.3469TT був достовірно вищим, ніж у тварин з g.3469TC. Крім того, *LEP* SNP g.3469T>C вплинув на вміст вологи у хребтовому жирі. Також встановлено, що свині з гетерозиготним генотипом мали меншу вологість спинного жиру порівняно з гомозиготами (табл. 4).

Слід зазначити, що наші дані збігаються з даними Vega et al (2018), які не спостерігали суттєвого зв'язку між *LEP* g.3469T>C SNP та

| <i>LEPR</i> с.915        |                         | P    | <i>LEPR</i> с.2856      |                          |                          | P    |
|--------------------------|-------------------------|------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------|
| СТ (n <sup>a</sup> = 10) | ТТ (n <sup>a</sup> = 4) |      | СС (n <sup>a</sup> = 9) | СТ (n <sup>a</sup> = 30) | ТТ (n <sup>a</sup> = 67) |      |
| 53,95 ± 2,24             | 55,03 ± 4,53            | 0,36 | 54,05 ± 3,23            | 51,80 ± 1,58             | 50,60 ± 1,23             | 0,29 |
| 5,51 ± 0,02              | 5,54 ± 0,02             | 0,82 | 5,54 ± 0,02             | 5,51 ± 0,02              | 5,52 ± 0,01              | 0,68 |
| 17,53 ± 1,25             | 18,18 ± 1,20            | 0,19 | 11,06 ± 3,03            | 17,70 ± 0,60             | 15,84 ± 0,57             | 0,01 |
| 73,55 ± 0,30             | 74,19 ± 0,61            | 0,13 | 73,64 ± 0,90            | 73,08 ± 0,28             | 73,12 ± 0,19             | 0,77 |
| 51,25 ± 1,30             | 52,67 ± 3,43            | 0,34 | 54,85 ± 3,88            | 54,13 ± 1,06             | 53,47 ± 0,77             | 0,82 |
| 1,20 ± 0,05              | 1,20 ± 0,03             | 0,69 | 1,18 ± 0,00             | 1,22 ± 0,03              | 1,15 ± 0,02              | 0,08 |
| 21,60 ± 0,46             | 20,30 ± 0,80            | 0,09 | 20,79 ± 0,35            | 22,08 ± 0,17             | 21,57 ± 0,18             | 0,08 |
| 2,73 ± 0,65              | 1,91 ± 1,02             | 0,68 | 1,89 ± 0,41             | 2,95 ± 0,58              | 2,76 ± 0,85              | 0,35 |
| 2,51 ± 0,30              | 2,72 ± 0,77             | 0,86 | 3,13 ± 0,69             | 2,27 ± 0,21              | 2,63 ± 0,12              | 0,22 |
| 6,40 ± 0,24              | 5,97 ± 0,21             | 0,82 | 6,30 ± 0,23             | 6,41 ± 0,30              | 6,22 ± 0,16              | 0,89 |
| 35,80 ± 0,77             | 36,50 ± 0,87            | 0,32 | 36,13 ± 0,84            | 35,20 ± 0,73             | 34,41 ± 0,60             | 0,52 |

відкладенням жиру у великих білих свиней і ці дані узгоджуються з даними Bauer et al (2009), які не виявили жодного впливу цього SNP на вміст внутрішньом'язового жиру у словацької великої білої породи свиней та ландрасу. У той же час Villalba et al (2009) продемонстрували залежний від віку зв'язок поліморфізму *LEP* g.3469T>C із вмістом внутрішньом'язового жиру у свиней дюрок. Таким чином, можна припустити, згідно з Szydlowski et al (2004), що виявлені асоціації є популяційно-специфічними, а поліморфізм *LEP* g.3469T>C не впливає безпосередньо на генетичну варіабельність ознак росту і параметрів туш свиней.

Відомо, що *LEP* SNP g.2845A>T пов'язаний з деякими характеристиками продуктивності, такими як швидкість росту та використання корму (Kennes et al, 2001). Наше дослідження показало, що свині УВБ генотипу g.2845AA мали достовірно вищу вологоутримуючу здатність м'яса (P = 0,02) і нижчий вміст вологи в спинному жирі (P = 0,02) порівняно з генотипами 2845TT і 2845AT (табл. 4). Вплив *LEP* SNP g.2845A>T на зазначені вище ознаки якості м'яса характеризувався переважанням адитивного компонента.

Відомо, що ці два SNP розташовані близько один від одного, відстань між ними становить 659 п.н. Таким чином, можливо, *LEP* SNP g.3469T>C і g.2845A>T маркують каузативну мутацію, яка розташована в безпосередній близькості до обох SNP і яка безпосередньо впливає на властивості м'яса. Імовірно, такою

мутацією може бути SNP *LEP* rs701423985, який розташований на відстані 845 п.н. від SNP g.2845A>T і на відстані 186 п.н. від g.3469T>C. Ще одне припущення – SNP g.2845A>T може бути залучений до контролю експресії мРНК.

Наше дослідження щодо впливу поліморфізму *LEPR* на ознаки якості м'яса (табл. 5) продемонструвало, що *LEPR* SNP с.2856C>T асоційований із втратою вологи (P = 0,01). Найбільша втрата вологи в м'ясі спостерігалась у тварин з генотипом с.2856CT (17,70 %), а найменша – з генотипом с.2856CC (11,06 %). Вплив *LEPR* SNP с.2856C>T на втрату вологи був комплексним і характеризувався як адитивною, так і домінантною складовою (табл. 6). Ми не виявили статистично підтвердженого зв'язку *LEPR* SNP с.2856C>T із товщиною хребтового жиру, як у нашій попередній роботі (Balatsky et al, 2018). Але була подібна тенденція до зниження BFT у свиней із генотипами с.2856TT або 2856CT (табл. 5).

Було виявлено зв'язок між SNP с.232A>T (місенс-мутація) та товщиною хребтового жиру у свиней української великої білої породи (P = 0,03) (табл. 4). Ці результати узгоджуються з даними Maskowski et al (2005), які продемонстрували зв'язок між SNP с.232A>T і товщиною жира на лопатці у свиней породи ландрас.

У літературі немає інформації щодо впливу *LEPR* SNP с.915C>T на показники якості м'яса свиней, але є дані щодо інших ознак про-

Таблиця 6. Вплив поліморфізмів в *LEP* і *LEPR* на показники якості м'яса свиней великої білої породи української селекції розрахований з використанням адитивно-домінантної моделі

| SNP/Показник                   | Адитивно-домінантна модель |                |                             |                             |                                  |
|--------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
|                                | A <sup>a</sup>             | D <sup>b</sup> | a <sub>c</sub> <sup>c</sup> | a <sub>r</sub> <sup>d</sup> | $\frac{a}{2}(L \rightarrow V)^e$ |
| <i>LEP</i> g.2845A>T           |                            |                |                             |                             |                                  |
| Вологоутримуюча здатність      | -1,9850                    | -0,8950        | 0,690                       | -1,709                      | -1,199                           |
| Вміст вологи в хребтовому жирі | 0,6050                     | -0,1650        | -0,134                      | 0,395                       | 0,264                            |
| <i>LEPR</i> с.2856C>T          |                            |                |                             |                             |                                  |
| Втрата вологи                  | 2,390                      | 4,250          | 0,236                       | 0,301                       | 0,032                            |

Примітка. <sup>a</sup> Адитивний компонент, <sup>b</sup> домінантний компонент, <sup>c</sup> вплив алеля А для SNP *LEP* g.2845A>T і алеля С для SNP *LEPR* с.2856C>T, <sup>d</sup> вплив альтернативного алеля, <sup>e</sup> ефект алельного заміщення.

дуктивності. Наше дослідження показало, що *LEPR* SNP с.915C>T не пов'язаний з жодною з досліджуваних ознак якості м'яса.

Як зазначалося вище, нерівновагу за зчепленням було встановлено між SNP с.232A>T і с.2856C>T в гені рецептора лептину. Комбінацію варіантів генотипу для цих двох LD SNP можна розглядати як генетичний маркер досліджуваних ознак, що може сприяти збільшенню статистичної можливості виявлення асоціацій. У нашому дослідженні у дослідній групі для SNP *LEPR* с.232A>T і с.2856C>T було ідентифіковано загалом 6 комбінацій варіантів генотипу за SNP с.232/с.2856: AA/TC, AA/TT, AA/CC, AT/CC, AT/CT і AT/TT.

Проте в асоціативному аналізі можна було використати лише дві групи тварин із комбінаціями генотипів AA/TC і AA/TT; кількість тварин з іншими комбінаціями генотипів була недостатньою для аналізу. Існує лише один статистично підтверджений зв'язок. Вміст золи (%) у зразках м'яса тварин AA/TC був вищим порівняно зі зразками м'яса свиней AA/TT ( $1,23 \pm 0,03$  та  $1,16 \pm 0,02$  відповідно,  $p = 0,020$ ). За іншими показниками якості м'яса відмінностей не виявлено. Слід зазначити, що наведені комбінації відрізняються лише одним алелем, а саме: у SNP с.2856C>T в одному випадку був алель С, в іншому – Т; на SNP с.232A>T усі тварини були однаковими.

Водночас, окремо для SNP с.2856C>T при аналізі зв'язку із вмістом золи не встановлено (табл. 4). Очевидно, в останньому випадку на результат статистичної оцінки вплинув той факт, що в референтних групах вплив алельних варіантів за SNP с.232A>T, який знаходиться в нерівновазі за зчепленням з SNP с.2856C>T, не був виключений. Крім того, цей аналіз включав третю групу тварин з генотипом с.2856CC та з різними генотипами за SNP с.232A>T. З іншого боку, аналіз асоціацій стосовно SNP с.2856C>T окремо (табл. 4) виявив зв'язок цього поліморфізму з втратою вологи. А при аналізі асоціації комбінацій генотипів двох SNP з цією ознакою такий зв'язок був відсутній. Цю невідповідність можна пояснити комплексним впливом SNP с.2856C>T на ознаку. В адитивно-домінантній моделі впливу поліморфізму на ознаку, розраховану

для цього SNP, має місце внесок як адитивного, так і домінантного компонента, причому останній переважає. У цьому випадку різниці між AA/TC і AA/TT немає, алель Т можна розглядати як домінантний.

**Висновки.** Встановлено асоціації SNP генів *LEP* і *LEPR* з ознаками якості м'яса у свиней УВБ. Так, у гені лептину SNP rs45431504 (с.3469T>C, синонімічна мутація), за нашими результатами, асоціюється з такими показниками якості м'яса, як вміст білка в м'ясі та вологість сала. З досліджень інших авторів відомий зв'язок цього поліморфізму з будовою туші і ростом тварин. Можна припустити, що SNP rs45431504 є LD-маркером місенс-мутації С>Т (*LEP* SNP rs701423985), розташований на відстані 186 п.н. Ця мутація призводить до заміни 113 амінокислотного залишку валіна на ізолейцин (V113I), що, за оцінкою iMutant, знижує стабільність структури лептину і, відповідно, може впливати на його функціональні характеристики. *LEP* SNP g.2845A>T (rs344615147), який був асоційований з вологоутримуючою здатністю м'яса та вмістом вологи в хребтовому жирі, розташований у другому інtronі на відстані 845 п.н. від SNP *LEP* rs701423985 і також може розглядатися як LD маркер цієї місенс-мутації. Щодо *LEPR* SNP с.232A>T (rs45435517), він пов'язаний з місенс-мутацією, яка викликає амінокислотну заміну S52I. Оцінки, отримані за допомогою біоінформаційних сервісів SIFT і PolyPhen-2, вказують на значний вплив rs45435517 на функціональні характеристики рецептора лептину. Дійсно, в нашій праці, як і в ряді інших робіт, встановлена асоціація SNP с.232A>T з BFT. У той же час SNP с.2856C>T (rs694660564, синонімічна заміна), який у нашій роботі продемонстрував асоціацію з втратою вологи в м'ясі у свиней УВБ і за результатами інших авторів, пов'язаний з низкою інших показників якості м'яса, може бути потенційним LD маркером місенс-мутацій у SNP *LEPR* rs1113972516, rs792804682 та rs1109261799. SNP, для яких у нашій роботі були встановлені асоціації з показниками якості м'яса, очевидно, можна розглядати як потенційні маркери для селекції свиней УВБ і, можливо, інших порід свиней, направленої

на отримання генотипів з покращеними характеристиками якості м'яса.

**Дотримання етичних стандартів.** Було дотримано всіх відповідних міжнародних, національних та/або інституційних правил щодо догляду та використання тварин.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Ця робота виконана за підтримки Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН України (номер ДР 0111U005008), Університету Західної Англії, Брістоль та EU COST Action IPЕМА (номер гранту CA15215).

#### ASSOCIATIONS BETWEEN LEPTIN GENE AND LEPTIN RECEPTOR POLYMORPHISMS AND THE MEAT QUALITY OF UKRAINIAN LARGE WHITE PIGS

V.M. Balatsky, Ye.K. Oliynychenko, A.M. Saienko, T.V. Buslyk, I.B. Bankovska, M.Yu. Peka, O. Doran

Genetics Laboratory, the Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production, the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Shvedska Mohyla, 1, Poltava, 36013, Ukraine  
V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody square, 4, Kharkiv, 61022, Ukraine  
Laboratory of Metabolism named after Stepan Gzhytskyi, the Institute of Animal Biology, the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, V. Stusa Str., 38 Lviv, 79034, Ukraine  
Faculty of Health and Applied Sciences, the University of the West of England, Frenchay Campus, Coldharbour Lane, Bristol, BS16 1 QY, UK

E-mail: vnbalatsky@gmail.com, olejliza@gmail.com, artsm82@gmail.com, tvbuslyk@gmail.com, gloryir2017@gmail.com, pekapoltava@gmail.com, olena.doran@uwe.ac.uk

The associations between SNP in leptin gene (*LEP* g.2845A>T, *LEP* g.3996T>C, *LEP* g.3469T>C) and leptin receptor gene (*LEPR* c.232A>T, *LEPR* c.2856C>T, *LEPR* c.915C>T) and the meat quality traits of Ukrainian Large White pigs (ULW) were studied. The computational analysis (SIFT, PolyPhen-2 and I-Mutant bioinformational services) was conducted to investigate the effect of mutations, causing SNP, for both selected SNP, and those missense SNP, for which they can be potential linkage disequilibrium (LD) markers, on the structure and functions of leptin and leptin receptor. *LEP* SNP c.3469T>C (exon 3, rs45431504) is associated

with the protein content in meat and the content of moisture in the back fat. *LEP* SNP g.2845A>T (rs344615147), which is associated with moisture-retaining ability of meat and the content of moisture in the back fat, is located in the second intron and, similar to SNP c.3469T>C, may be viewed as an LD marker of missense-polymorphism of SNP *LEP* rs701423985. *LEPR* SNP c.232A>T (exon 4, rs45435517) is a missense mutation, causing the amino acid replacement S52I. The evaluations, made using SIFT and PolyPhen-2, demonstrate a considerable impact of rs45435517 on the functional characteristics of leptin receptor. Our study determined the association between SNP c.232A>T and fat thickness. At the same time, SNP c.2856C>T (exon 20, rs694660564, a synonymic replacement), which in our work demonstrated the association with the loss of moisture in meat for ULW pigs, may be a potential LD marker and be in disequilibrium with the linkage to missense SNP *LEPR* rs1113972516, rs792804682 and rs1109261799. SNP, for which in our work the associations were found with meat quality traits, may be viewed as potential markers for the breeding of ULW pigs and possibly other breeds, directed at obtaining genotypes with improved characteristics of meat quality.

#### REFERENCES

- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Cur Protoc Human Genet*. Chapter 7, 7:20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>.
- AOAC (1990) *Official Methods of Analysis*, 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Balatsky V, Bankovska I, Pena, RN et al (2016a) Polymorphisms of the porcine cathepsins, growth hormone-releasing hormone and leptin receptor genes and their association with meat quality traits in Ukrainian Large White breed. *Mol Biol Rep* 43:517–526. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-3977-z>.
- Balatsky V, Bankovska I, Saienko A (2016b). Association between leptin receptor gene polymorphism and quality of both meat and back fat in large white pigs of Ukrainian breeding. *Agric Sci Pract* 3(2):42–48. <https://doi.org/10.15407/agrisp3.02.042>.
- Balatsky V, Oliynychenko Y, Sarantseva N et al (2018) Association of single nucleotide polymorphisms in leptin (*LEP*) and leptin receptor (*LEPR*) genes with backfat thickness and daily weight gain in Ukrainian Large White pigs. *Livestock Science* 217:157–161. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.09.015>
- Bauer M, Babelova A, Omelka R et al (2006) Association of *HinfI* polymorphism in the leptin gene with production traits in White improved pig breed. *Slovak J Anim Sci* 39:119–122

- Bauer M, Babelova A, Omelka R et al (2009) Effect of leptin and leptin receptor genes on meat production traits of Slovak Large White and Landrace pigs. *Slovak J Anim Sci* 42:49–53.
- Biedermann G, Jatsch C, Peschke et al (2000) Fattening and carcass performance and meat- and fat quality of Pietrain pigs of different MHS-genotype and sex. I. Fattening and carcass performance and meat quality. *Archiv Tierzucht Dummerstorf* 43:151–164.
- Biziene R, Morkūniene K, Mīļeikiene R et al (2018) Effects of single nucleotide polymorphism markers on the carcass and fattening traits in different pig populations. *J Anim Feed Sci* 27:255–262. <https://doi.org/10.22358/jafs/95020/2018>.
- Boccard R, Buchter L, Casteels M et al (1981) Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments. *Livestock Production Science* 8:385–397. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(81\)90061-0](https://doi.org/10.1016/0301-6226(81)90061-0).
- Bonneau M, Lebret B (2010) Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat Sci* 84:293–300. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.013>.
- Capriotti E, Fariselli P, Casadio RI (2005) Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucl Acids Res* <https://doi.org/10.1093/nar/gki375>.
- Chmurzynska A, Maćkowski M, Szydłowski M et al (2004) Polymorphism of intronic microsatellites in the A-FABP and LEPR genes and its association with productive traits in the pig. *J Anim Feed Sci* 13(4):615–624. <https://doi.org/10.22358/jafs/67629/2004>.
- Chorev M, Carmel L (2012) The function of introns. *Front. Gene* 3:55. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00055>.
- De Oliveira PJ, De Faria DA, Silva PV et al (2009) Association between leptin gene single nucleotide polymorphisms and carcass traits in pigs. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38, 2:271–276. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000200008>.
- De Oliveira PJ, Facioni GSE, Sávio-Lopes P et al (2006) Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. *J Anim Breed Genet* 123:378–383. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2006.00611.x>.
- Dragos-Wendrich M, Stratil A, Hojny J et al (2003) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 18. *J Anim Breed Genet* 120:138–143.
- Egbert F Knol, Bjarne Nielsen, Pieter W Knap (2016) Genomic selection in commercial pig breeding. *Anim Front* 6:15–22. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0003>.
- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Strasbourg, 18.III.1986. Retrieved from <http://conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm>. Accessed March 12, 2019.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nation (2014) Breeding strategies for sustainable management of animal. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/012/i1103e.pdf>. Accessed October 28, 2019.
- Galve A, Burgos C, Siliy L et al (2012) The effects of leptin receptor (LEPR) and melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphisms on fat content, fat distribution and fat composition in a Duroc × Landrace/Large White cross. *Livestock Sci* 145: 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.01.010>.
- Getmantseva L, Leonova M, Usatov A et al (2017) The single and combined effect of MC4R and GH genes on productive traits of pigs. *Amer J Agric Biolog Sci* 12:28–32. <https://doi.org/28-32.10.3844/ajabssp.2017.28.32>.
- Henriquez-Rodriguez E, Bosch L, Tor M et al (2016) The effect of SCD and LEPR genetic polymorphisms on fat content and composition is maintained throughout fattening in Duroc pigs. *Meat Sci* 121:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.05.012>.
- Hermesch S, Li L, Doeschl-Wilson AB et al (2015) Selection for productivity and robustness traits in pigs. *Anim Prod Sci* 55(11):1437–1447. <https://doi.org/10.1071/AN15275>.
- Hirose K, Ito T, Fukawa K et al (2014) Evaluation of effects of multiple candidate genes (LEP, LEPR, MC4R, PIK3C3, and VRTN) on production traits in Duroc pigs. *Anim Sci J* 85:198–206. <https://doi.org/10.1111/asj.12134>.
- Jiang ZH, Gibson JP (1999) Genetic polymorphisms in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. *Mammalian Genome* 10:191–193.
- Kim J-M, Park J-E, Lee S-W et al (2017) Association of polymorphisms in the 5' regulatory region of LEPR gene with meat quality traits in Berkshire pigs. *Animal Genetics* v. 48:6, 723–724. <https://doi.org/10.1111/age.12588>.
- Kennes YM, Murphy BD, Pothier F et al (2001) Characterization of swine leptine (LEP) polymorphisms and their association with production traits. *Anim Genet* 32:215–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2001.00768.x>.
- Kim JA, Cho ES, Jeong YD et al (2020) The effects of breed and gender on meat quality of Duroc, Pietrain, and their crossbred. *J Anim Sci Technol* 62:409–419. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.3.409>.
- Kramarenko AS, Ignatenko ZhV, Lugovoy SI et al (2020) Effect of parity number, year and season farrowing on reproductive performance in Large White pigs. *Ukr J Ecol* 10:307–312. [https://doi.org/10.15421/2020\\_48](https://doi.org/10.15421/2020_48).

- Li X, Kim SW, Choi JS et al (2010) Investigation of porcine FABP3 and LEPR gene polymorphisms and mRNA expression for variation in intramuscular fat content. *Mol Biol Rep* 37:3931–3939. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0050-1>.
- Mackowski M, Szymoniak K, Szydlowski et al (2005) Missense mutations in exon 4 of the porcine LEPR gene encoding extracellular domain and their association with fatness traits. *Anim Genet* 36:135–137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01247.x>.
- Malek M, Dekkers JC, Lee HK et al (2001) A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mammal Genome* 12:637–645. <https://doi.org/10.1007/s003350020019>.
- Mankowska M, Szydlowski M, Salamon S et al (2015) Novel polymorphisms in porcine 3'UTR of the leptin gene, including a rare variant within target sequence for MIR-9 gene in Duroc breed, not associated with production traits. *Anim Biotechnol* 26(2):156–163. <https://doi.org/10.1080/10495398.2014.958612>.
- Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B et al (2012) The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol* May 9, 5:563–576. <https://doi.org/10.4161/rna.20231>.
- Matousek V, Kernerova N, Hysplerov6 K et al (2016) Carcass traits and meat quality of Prestice Black-Pied pig breed. *Asian Austr J Anim Sci* 29:1181–1187. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0659>.
- Munoz G, Ovilo C, Siliy L et al (2009) Single and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm quantitative trait loci on Sus scrofa chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits. *J Anim Sci* 87:459–468. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1127>.
- Ng PC (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucl Acids Res* 31(13):3812–3814. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg509>.
- Oleinychenko EK, Bankovskaia YB, Balatsky VN et al (2018a) Henetychnyi ta asotsiatyvnyi analiz odnonukleotydykh polimorfizmiv v henakh leptynu i katepsynu F svynei. *Naukovyi visnyk Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy. Seriya : Tekhnolohiia vyrobnytstva i pererobky produktii tvarynyntstva* 289:38–50.
- Oleinychenko EK, Sarantseva NK, Vovk VA et al (2018b) Vlyaniye polimorfyzmov henov leptyna y retseptora leptyna na produktyvnye kachestva svynei krupnoi beloi porody. *Svynarstvo. Mizhvid. n. zb.* 71:83–92.
- Ovilo C, Fernández A, Noguera JL et al (2005) Fine mapping of porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross. *Genet Res* 85:57–67. <https://doi.org/10.1017/s0016672305007330>.
- Pant SD, Karlskov-Mortensen P, Jacobsen MJ et al (2015) Comparative Analyses of QTLs Influencing Obesity and Metabolic Phenotypes in Pigs and Humans. *PLoS ONE* 10(9):e0137356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137356>.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.
- Pena RN, Ros-Freixedes R, Tor M et al (2016) Genetic marker discovery in complex traits: a field example on fat content and composition in pigs. *Inter J Mol Sci* 17:2100. [doi.org/10.3390/ijms17122100](https://doi.org/10.3390/ijms17122100).
- Ros-Freixedes R, Gol S, Pena RN, Tor M et al (2016) Genome-wide association study singles out SCD and LEPR as the two main loci influencing intramuscular fat content and fatty acid Ccomposition in Duroc pigs. *PLoS One* 11:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152496>.
- Szydlowski M, Stachowiak M, Mackowski M et al (2004) No major effect of the leptin gene polymorphism on porcine production traits. *J Anim Breed Genet* 121:149–155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2004.00453.x>.
- Trakovicka A, Moravčiková N, Kukučková V et al (2016) The associations of lepr and H-FABP gene polymorphisms with carcass traits in pigs. *Acta agriculturae Slovenica, Supplement* 5:189–194, Ljubljana 2016, 24th Int. Symp. “Animal Science Days”, Ptuj, Slovenia, Sept. 21<sup>st</sup>–23<sup>rd</sup>.
- Uemoto Y, Kikuchi T, Nakano H et al (2012) Effects of porcine leptin receptor gene polymorphisms on backfat thickness, fat area ratios by image analysis, and serum leptin concentrations in a Duroc pure-bred population. *Anim Sci J* 83:375–85. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00963.x>.
- Vega RSA, Castillo RMC, Barientos NNB et al (2018) Leptin (T3469C) and estrogen receptor (T1665G) gene polymorphisms and their associations to backfat thickness and reproductive traits of Large White pigs (*Sus scrofa* L.). *Philippine J Sci*, 14
- Villalba D, Tor M, Vidal O et al (2009) An age-dependent association between a leptin C3469T single nucleotide polymorphism and intramuscular fat content in pigs. *Livestock Sci* 121:335–338. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.06.008>.
- Zhang CY, Wang Z, Bruce HL et al (2014) Associations between single nucleotide polymorphisms in 33 candidate genes and meat quality traits in commercial pigs. *Anim Genet* 45:508–516. <https://doi.org/10.1111/age.12155>.

Надійшла в редакцію 11.05.22  
Після доопрацювання 22.07.22  
Прийнята до друку 18.11.22