

Муслимова Жадыра Умирбеккызы 8D09101 – «Ветеринариялық медицина» білім беру бағдарламасы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін ұсынылған «Сиырларда желінсауға резистенттілік ДНҚ маркерлері және оларды идентификация жасау» тақырыбындағы диссертациялық жұмысына

АҢДАТПА

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Желінсауға төзімділік - күрделі полигенді құбылыс ол бірнеше гендердің мөлшерінің ықпал етуімен анықталады. Барлық геннің ассоциативті зерттеулері, геномдық нұсқалардың таралуын анықтауда кеңінен қолданылады, соның ішінде желінсауға төзімділікті анықтау үшін жалпы генетикалық архитектура құрылымын анықтау кеңінен қолданылады. Ірі қараның желінсауы – бүкіл әлем бойынша сүт өнеркәсібінде кең таралған және қаражат көп жұмсалатын ауырулардың бірі болып қала береді.

Желінсаумен күресу стратегиялары, мысалы, антибиотикотерапия, вакцинация, шарушылықты дұрыс басқару және азықтандыруды жақсарту үлкен жетістікке жеткізбеді. Желінсауға генетикалық төзімділік әртүрлі сүтті сиыр тұқымдарына жүргізілген бірнеше тәуелсіз зерттеулермен дәлелденген. Бұл белгінің полигенді табиғаты желінсауға төзімділікке жауапты кандидат-гендерді зерттеу қажеттілігін көрсетті. Авторлардың мақаласында мынадай SNP полиморфизмдердің генетикалық маркерлер ретінде қолдану мүмкіндігі қарастырылған: TLR4, Lactoferrin, IL-8, CXCR1, CXCR2, CCL2, IL8, BPI, MBL, CACNA2D1, BRCA1, FEZL, SEMA5A

Көптеген авторлардың мәліметтері бойынша, сиырлардың желінсаумен ауруы табынның 21-70%-ын қамтиды, ал 8-16%-ы лактация кезінде екі немесе одан да көп рет қайталанып ауырады. Табындағы қоздырғыштың түріне байланысты субклиникалық желінсау клиникалық түріне қарағанда 2-20 есе жиі кездеседі. Желін секрециясындағы соматикалық жасушалар санын анықтау үшін Калифорния мастит-тесті және Кенотест қолданылды. Оң реакция көрсеткен сүт тұндыру сынағымен тексерілді.

Халықты азық-түлік өнімдерімен қамтамасыз ету үшін сүтті ірі қара шаруашылығы ерекше маңызды рөл атқарады, оның қарқынды дамуының қажетті шарты – аналық мал басының денсаулығын сақтау. Сүт өнімділігінің төмендеуіне және сүт сапасының ветеринарлық-санитарлық нормаларға сәйкес келмеуі желінсау ауруының кең таралғандығы белгілі.

Сүтті мал шаруашылығының басым бағыттарының бірі – санитарлық-гигиеналық нормаларға және өңдеу кәсіпорындарының талаптарына сәйкес келетін жоғары сапалы сүт өндіру. Сүт сапасын сипаттайтын негізгі көрсеткіштерге майдың, ақуыздың, лактозаның, мочевианың және соматикалық жасушалардың мөлшері жатады. Майдың, ақуыздың, лактозаның және несепнәр құрамына негізінен сиырлардың азықтандыру және генетикасы әсер етеді, ал соматикалық жасушалардың саны желін саулығының көрсеткіші болып табылады.

Диссертациялық жұмыстың мақсаты: Алматы облысы, Талғар ауданы, «Байсерке-Агро», «Амиран» сүт фермаларында барлығы 400 бастан астам сиырларға субклиникалық желінсауға төзімділікпен байланысты келесі ген локустары бойынша SELL, MX1, CXCR1, TLR6, BRCA1, MASP2 генотиптеу жұмыстарын жүргізу, аталған ген аллелдерінің сүт құрамындағы соматикалық торшалармен ассоциативтік байланыстарын, желінсауға төзімділікпен байланысын зерттеу, сүт фермасында клиникалық және субклиникалық желінсауды емдеу әдістерін жетілдіру, желінсау кезінде экссудат құрамындағы патогенді микроорганизмдерді ПТР әдісімен детекция жасау.

Зерттеудің міндеттері: 1. «Амиран» және «Байсерке-Агро» сүт фермаларында желінсауға төзімділікпен байланысты SELL, MX1, CXCR1, с.+291C>T, CXCR1 +1093C>T SNP полиморфизмдерін зерттеу;

2. Сиырларда TLR6, BRCA1, MASP2 ген локустары бойынша амплификация жүргізу және генетикалық нұсқауларын анықтау, осы ген аллелдерінің сиырларда соматикалық торшалар санымен байланысы;

3. Сиырларда клиникалық және субклиникалық желінсауда клиникалық материалдарда патогенді микроорганизмдерді ПТР әдісімен детекция жасау жұмыстары, патогенді микроорганизмдердің антибиотикке резистенттілігін анықтау;

4. «Амиран» сүт фермасында сүт құрамындағы соматикалық торшалар санын FOSSOMATIC™ қондырғысымен анықтау және сүт құрамындағы антибиотик қалдықтарының мөлшерін зерттеу;

5. «Амиран», «Байсерке-Агро» сүт фермаларында клиникалық және субклиникалық желінсаулардың таралуы, алдын алу және емдеу жұмыстарын жүргізу.

Зерттеу материалдары мен әдістері. Генотиптеу үшін материал ретінде SELL генінің локусына (SNP с.567C>T) байланысты голштейн тұқымды сиырлардың (n=129) қан үлгілері «Байсерке-Агро» ЖШС-нің мал шаруашылығы фермасынан алынған. Ал MX1 (n=164), CXCR1, с.+291C>T (n=42), CXCR1 +1093C>T (n=164) гендерінің локустары бойынша ДНҚ үлгілерін генотиптеу үшін қан үлгілері «Амиран» ЖШС сүт фермасынан алынған. Бұл фермалар Алматы облысының Талғар ауданында орналасқан, аталған сүт фермаларында орташа сүт өнімділігі лактацияға 9000-9500 кг құрайды. ДНҚ экстракциясы үшін қан күре тамырдан, кейбір жағдайларда құйрық асты венасынан 2 мл көлемінде вакуумды ЭДТА бар түтіктерге алынды. Қаннан геномдық ДНҚ бөліп алу «Жасыл биотехнология және торшалық инженерия» зертханасында Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университетінде екі әдіспен жүргізілді: классикалық фенолдық әдіс және коммерциялық PureLink™ Genomic DNA Mini Kit жинтығы көмегімен, өндіруші нұсқаулығына сәйкес жүргізілді. Алынған ДНҚ-ның сапасы NanoDrop™ 2000 микроспектрофотометрия әдісімен өлшенді, ал ДНҚ тазалығы A260/A280 көрсеткіштерімен анықталды. SELL, MX1, CXCR1 гендерінің локустарындағы сиырлардың генотиптерін анықтау үшін әдебиеттерде сипатталған праймерлердің тізбектері қолданылды

TLR6, BRCA1 ген локустары бойынша генотиптеу жұмыстары Алматы облысы Талғар ауданында орналасқан «Амиран» ЖШС шаруашылығының асыл тұқымды голштейн тұқымды сиырлардың мұздатылған қаны үлгілері қолданылды, MASP2 ген локусы бойынша осы аудандағы «Амиран» сүт фермасынан алынған сиырлардан алынған биологиялық материалдар қолданылды. Сиырларды TLR6 және BRCA1 гендерінің локустары бойынша генотиптеу үшін ұсынылған праймерлердің тізбектері пайдаланылды, сонымен қатар TLR6 генінің аллельдерін анықтау үшін Primer 3 бағдарламасы арқылы арнайы праймерлердің тізбектері таңдалды.

Желінсаумен ауырған сиырларда патогенді микроорганизмдерді ПТР әдісімен детекциялау. Эксперименттік жұмыстың алғашқы кезеңінде клиникалық және субклиникалық желінсауды анықтауды экспресс тесттері арқылы балау жүргізілді, молекулярлық-генетикалық зерттеулер үшін сүт бездерінен секрециялар мен экссудат, қынаптың кіреберісінен және қынаптан шырыш алынды. Клиникалық материалдан ДНҚ бөліп алу фенолды әдіс немесе коммерциялық жиынтық арқылы жүргізілді. ПТР балау үшін биологиялық материалдарды жинау 2023 жылы сүт фермалары сиырларынан алынды, ал ДНҚ бөліп алу Қазақстан-Жапон инновациялық орталығы ҚазҰАЗУ-нің «Жасыл биотехнология және клеткалық инженерия» зертханасында жүргізілді. Сүт үлгілері таңертеңгі сауын кезінде стерилді түтікшелерге алынып, 2-3 сағат ішінде ҚазҰАЗУ-нің сүт өнімдері бойынша референттік зертханасына жеткізілді.

Сүттегі соматикалық жасушалардың мөлшерін және антибиотиктердің қалдық мөлшерін анықтау эксперименттік жұмыстары 2023 жылдың наурыз-мамыр айларында Алматы облысында орналасқан сүт фермасында жүргізілді. Зерттеуге голштейн тұқымды, лактация кезеңінде сүт өнімділігі 8500-9000 кг болатын сиырларда жүргізілді. Сүт фермасында субклиникалық желінсауды балау үшін Delaval mastitis test, Kenotest компанияларының экспресс тестілері қолданылды. Сүттің сапасын экспресс бағалау нәтижелері зерттелген материалдың түсінің өзгеруіне және желе тәрізді ұйыған заттың түзілуіне негізделді. Әр тоқсан сайын DeLaval mastitis test жинағы арқылы экспресс әдісімен субклиникалық желінсауғы балау жүргізілді. Сүттегі соматикалық жасушалар мөлшерін анықтау (сүттегі соматикалық торшаларды санау) FOSSOMATIC™ зертханалық жабдығы арқылы жүргізілді.

Қорғауға ұсынылған негізгі қағидалар: - «Амиран» және «Байсерке Агро» сүт фермаларындағы голшетин тұқымдас сиырларында жүргізілген, келесі ген локустары L-selectin, TLR6, MX1, CXCR1, BRCA1, MASP2, CATHL2 бойынша генотиптеу жұмыстарының нәтижелері, аталған ген аллелдерінің сиырлардағы клиникалық және субклиникалық желінсаулармен төзімділігімен ассоциативтік байланыс дәрежедері туралы ақпараттар;

- «Амиран» және «Байсерке Агро» сүт фермаларында сиырларда клиникалық, субклиникалық желінсаулардың таралуы, өндірісте қолданылған балау әдістерінің тиімділігі. Сиырларда клиникалық желінсауларда микробтордың түрін, құрамын, патогендік қасиеттерін, антибиотикке

төзімділігін бағалау үшін клиникалық материалдарда микроорганизмдерді детекция жасауға мутиплекстік ПТР әдісін қолдану нәтижелері;

- «Амиран» және «Байсерке Агро» сүт фермаларында сиырларда жеке сиырларда, олардың жеке сүт бөліктеріндегі, жалпы жиналған сүт сынамаларындағы соматикалық торшалар санын анықтау, осы көрсеткіштердің дені сау және клиникалық субклиникалық желінсаумен ауыратын сиырларды сандық мәні;

- Сиырлардан алынған сүт сынамаларындағы келесі антибиотик қалдықтарының: хлорамфениколдың, стрептомициннің, тетрациклиндер тобының, β -лактамдар тобының сүттегі қалдық мөлшерінің нәтижелері;

- «Амиран» және «Байсерке Агро» сүт фермаларында сиырларда клиникалық желінсауда, субклиникалық желінсауда түрлі емдеу нобайларының тиімділігі, олардың әсер ету механизмдерін зерттеу нәтижелері.

Ғылыми нәтижелер, олардың негізділігі мен жаңалығы. Диссертациялық жұмыс көлемінде алғаш рет голштейн тұқымдас сиырларында үлкен мал басында ($n < 400$) клиникалық және субклиникалық желінсауға төзімділікке байланысты ДНҚ маркерлері зерттеліп, осы ген аллелдерінің желінсаумен ауыру деңгейі зерттелді, клиникалық желінсау кезінде экссудат құрамындағы патогенді микроорганизмдерді идентификация жасау үшін және олардың антибиотикке резистенттілігін анықтау үшін ПТР қолданылды.

Жалпы ветеринарияда жұқпалы және жұқпалы емес ауруға төзімділікті қамтамасыз ететін көптеген факторлар бар, иммунитет, жас төлдерде колостралдық иммунитет, малдың түрі мен жасына байланысты төзімділік, вакцина егу нәтижесінде түзілетін иммунитет. Осы факторлардың ішінде ерекше маңызды факторлардың бірі – генетикалық фактор. Диссертациялық жұмыста сиырларда клиникалық және субклиникалық желінсауға төзімділікпен байланысты келесі SNP полиморфизмдер SELL, MX1, CXCR1, c.+291C>T, CXCR1 +1093C>T, TLR6, BRCA1, MASP2 зерттелген, аталған ген локустары бойынша зерттеу тобындағы сиырлар популяциясында генетикалық нұсқаулардың таралуы, ген тепе теңдігі, ген аллелдері мен сүт құрамындағы соматикалық торшалар санының байланысы анықталған. Әдетте сүт құрамында, басқа да патологиялық экссудат құрамдарында патогенді микророрганизмдерді идентификация жасау үшін микробиологиялық әдістер кеңінен қолданылады, осы жұмыста патогенді микроорганизмдерді детекция жасау үшін және ол патогенді микроорганизмнің антибиотикке резистенттілігін бағалау үшін ПТР қолданылған.

Диссертациялық жұмыстың тәжірибелік маңызы – сүт фермалары жағдайында сиырларда клиникалық және субклиникалық формаларының таралуын анықтау үшін ай сайын мониторинг жүргізіліп отырды, субклиникалық желінсауға балау экспресс әдістермен жүргізілді, сонымен қатар сүт бездерінің функционалдық ақуалын бағалау үшін сүт құрамындағы соматикалық торшалар санын анықтау тәсілі қолданылды. Клиникалық желінсауда патогенді агенттің, микробиологиялық құрамын және олардың антибиотикке резистенттілігін анықтау үшін ПТР тәсілі қолданылды, микроорганизмнің түрін

анықтау, оның антибиотиктерге резистенттілігін анықтау нәтижесіне сәйкес емдеу жүргізу терапия нәтижесін көтеруге мүмкіндік береді.

Ғылымды дамытудың негізгі бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі. Диссертациялық жұмыс келесі ҚР ҒЖЖБМ гранттық қаржыландыру жобалары аясында орындалды: ИРН АР09057988 «Ірі қара малында жасырын генетикалық мутацияларды балау әдістерін ойлап табу және тұқымқуалайтын кемтарлықтарды жою үрдісін басқару» тақырыбы, (2021-2023 жж). ИРН АР19674808 «Толық геномдық секвенирлеуді пайдалану арқылы Қазақстандық жергілікті тұқымдық ірі қара малының генетикасын зерттеу және генетикалық паспорттарын жасау», (2023-2025 жж). ИРН АР22682970 «Сүт бағытындағы сиырларда, сүттің құрамындағы соматикалық торшалардың мөлшерімен байланысты SNP полиморфизмдерді зерттеу», (2024-2026 жж).

Докторанттың әр жарияланымды дайындауға қосқан үлесінің сипаттамасы. Диссертацияның материалдарына сәйкес 24 ғылыми еңбек жарияланды, 1 мақала «Reproduction in Domestic Animals» журналында «Genotyping of Holstein Cows by SELL, MX1 and CXCR1 Gene Loci Associated With Mastitis Resistance», 2024; 59:e14713 <https://doi.org/10.1111/rda.14713>, Scopus базасына енген, Қазақстан Республикасының өнертабыстарына арналған 2 патент, ҚР БҒМ Білім және ғылым саласындағы бақылау комитетінің тізімінен республикалық ғылыми журналдарда 3 мақала:

- Ғылым және білім, Наука и образование, Science and education журналында «Результаты генотипирования коров голштинской породы по локусам генов TLR6, BRCA1, ассоциированных с резистентностью к маститам». Том 1 № 2 (75) (2024): стр 69-83

- Ғылым және білім, Наука и образование, Science and education журналында «Практическое значение определения SCC и остаточного количества антибиотиков в молоке и детекция патогенной микрофлоры методом ПЦР», Том 1 № 4 (77) (2024): стр 126-136

- Ғылым және білім, Наука и образование, Science and education, «Голштейн тұқымдас сиырларды MX1, CXCR1 ген локустары бойынша генотиптеу нәтижелері және осы ген аллелдерінің сиырларда желінсауға төзімділікпен байланысы» Том 1 № 1-1 (78) 2025 б. 3-15

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Диссертация 119 бетте компьютерлік мәтінде, ол келесі бөлімдерден тұрады: анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу әдістері мен материалдары, зерттеу нәтижелері, зерттеу нәтижелерін талқылау, қорытынды, тәжірибелік ұсыныстар, қолданылған әдебиеттер тізімі, соның ішінде 176 отандық және шетелдік авторлардың еңбектері және қосымшалар. Диссертация материалдары 22 кестемен және 21 суреттермен безендірілген.