

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Шормановой Маржан Муратовны на тему «Идентификация генетических вариантов TNP у племенных быков-производителей и оценка фертильности спермиев», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D120100 «Ветеринарная медицина»

Актуальность темы исследования. Доступным методом повышения генетического потенциала популяции, увеличения молочной, мясной продуктивности крупного рогатого скота является использование племенных высокопродуктивных быков производителей для воспроизводства стада. Поэтому, в настоящее время уделяется большое внимание вопросам отбора, селекции племенных быков с высокими параметрами репродуктивной функции, которые не являются носителями вредных скрытых мутаций. В диссертационной работе в качестве ДНК маркеров репродуктивной функции были изучены SNP полиморфизмы (g.269 G→A, g.1536 C→T SNP) в кодирующей части гена TNP2, полиморфизм в экзонной части гена SPEF2, которые ассоциируются с показателями воспроизводительной функции быков производителей, экспрессия указанных генов контролирует процессы сперматогенеза. Анализ мировой литературы свидетельствует, что использование SNP полиморфизмов позволяет выявить особей с желательным генотипом, которые имеют более высокую воспроизводительную способность. В настоящее время особенно актуальной является разработка молекулярно-генетических способов диагностики носителей вредных мутаций, которые сопровождаются эмбриональной смертностью у коров, снижает выход молодняка. В последнее время в мире наблюдается тенденция, снижения репродуктивной функции у высокопродуктивных коров по двум причинам: увеличение молочной продуктивности, высокий уровень метаболизма, которое сопровождается снижением фертильности у коров. Вторая очень важная причина, увеличение гетерозиготных носителей скрытых вредных мутаций, которые возникли в результате точечной мутации, делеции или инсерции, у коров такие аномалии сопровождаются нарушением эмбрионального развития, часто происходит скрытый аборт, наносит молочному скотоводству большой экономический ущерб.

В настоящей работе были оптимизированы и разработаны способы диагностики таких наследственных аномалий у голштинской породы, как гаплотипы фертильности HH4, HH5, HCD и синдрома субфертильности у быков производителей. Впервые для определения морфологического состояния придаточных половых желез у быков производителей использован метод УЗИ сканирования репродуктивных органов с помощью эндоректального датчика. Изучение влияния аллелей отдельных генов, ассоциированных с параметрами воспроизводительной функции быков производителей имеет практическое значение. Известны локусы генов, аллели которых имеют достоверное влияние на качество спермы, на оплодотворяемость. В ветеринарной андрологии важным является

использование гормональных препаратов для стимуляции спермапродуктивности племенных быков на крупных племенных центрах. Для повышения репродуктивной функции успешно применяются препараты, оказывающие стимулирующее действие на процесс сперматогенеза.

Цель диссертационной работы – изучение распространенности генетических вариантов по локусам генов TNP2, SPEF2, исследование влияния аллелей указанных генов на репродуктивную функцию быков производителей, оптимизация и разработка способов диагностики носителей мутации HH4, HH5, HCD, синдрома субфертильности у быков, внедрение эффективных способов стимуляции воспроизводительной функции быков.

Задачи исследования:

1. Проведение генотипирования быков производителей ТОО «Асыл», племенных хозяйств «Сарканд - Агро» ТОО «Байсерке - Агро» по локусу гена TNP2 методом ПЦР-ПДРФ анализа, изучение частоты генетических вариантов и аллелей гена по изучаемому локусу;

2. Проведение генотипирования быков производителей АО «Асыл Тулик», ТОО «Асыл», племенных хозяйств «Сарканд - Агро», «Байсерке - Агро» по локусу гена SPEF2, определение ассоциативного влияния аллелей данного гена на репродуктивную функцию быков;

3. Изучение показателей репродуктивной функции быков племенных хозяйств «Сарканд-Агро», «Байсерке-Агро», определение уровня либидо, сексуальной активности быков, изучение влияния аллелей гена TNP2 на репродуктивную функцию;

4. Определение влияния аллелей гена SPEF2 на показатели спермапродуктивности быков производителей АО «Асыл Тулик», объем эякулята, концентрацию спермы, количества активных спермиев;

5. Проведение генетического мониторинга на носительство гетерозиготных носителей гаплотипов фертильности HH4, HH5, HCD и синдрома субфертильности у быков АО «Асыл Тулик», ТОО «Таурус», выявление гетерозиготных носителей;

6. Изучение влияния отрицательных факторов на репродуктивную функцию быков производителей племенных хозяйств «Сарканд - Агро», «Байсерке - Агро» и внедрение оптимальных схем стимуляции воспроизводительной функции быков, изучение их эффективности.

Материалы и методы исследований.

В качестве материала для исследования были использованы замороженные образцы крови с антикоагулянтом и криоконсервированные образцы спермы быков производителей. Выделение ДНК из биологических образцов проводилось с помощью коммерческих наборов и классическим фенольным методом. Оценка качества изолированной ДНК проводилась методом горизонтального электрофореза и путем измерения концентрации ДНК. Моделирование молекулярно-генетических методов исследования: сбор биологических образцов, экстракция ДНК, дизайн праймеров, определения условий амплификации, визуализация результатов ПЦР методом горизонтального электрофореза, определение генотипа образцов с помощью

гель документирующей системы. Работа выполнена с использованием современных молекулярно-генетических методов исследования. Для оценки качества полученной ДНК использован метод горизонтального электрофореза в 0,8% агарозном геле, данный способ позволяет определить косвенно концентрацию ДНК и степень фрагментации ДНК, что является тоже важным критерием оценки качества ДНК. Измерение концентрации ДНК осуществлено с помощью прибора нанодроп 2000, определена концентрация ДНК и степень очистки ДНК, которая составила выше 0,75. Были также использованы компьютерные программы Primer 3, Primer 1, калькулятор определения значения χ^2 , информации сайта NCBI. В диссертационной работе для генотипирования образцов ДНК использованы последовательности праймеров, описанные в литературе и собственные праймеры. Для генотипирования племенных быков производителей на носительство синдрома субфертильности быков использован способ Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, который имеет преимущество по сравнению с классическим ПЦР-ПДРФ анализом, исключается применение рестриктазы.

Экспериментальная часть работы выполнена на быках производителей племенного центра АО «Асыл Тулик», генотипирование образцов ДНК проводилась на большой выборке. С целью изучения влияния аллелей изучаемых генов на спермапродуктивность были определены следующие параметры репродуктивной функции быков производителей, у которых были известны генотипы по локусу гена TNP2 и SPEF2. На основании анализа результатов получения спермы, криоконсервации спермы, реализации замороженной спермы 25 племенных быков производителей племенного центра АО «Асыл Тулик» были определены с высокими показателями репродуктивной функции 5 быков производителей. Самый большой объем реализации сперматозоидов указанных быков, количество фермерских хозяйств, которые использовали сперму топ быков для воспроизводства. Следует отметить, что быки производители с высокими показателями объема реализации, количества фермерских хозяйств были быки с гетерозиготным TG генотипом по локусу гена SPEF2. По результатам анализа репродуктивной функции быков производителей за период с 2016 года по 2021 годы были определены лучшие быки производители, бык «Сокол» симментальской породы, бык «Чемпион» казахской белоголовой породы. Полученные результаты позволяет предполагать, что ДНК маркеры можно использовать для прогнозирования спермапродуктивности быков производителей.

Для оценки морфологического состояния придаточных половых желез у быков, предстательной, пузырьковидной желез был использован метод УЗИ сканирования с помощью PU2200 Vet и Mindray Z5 Vet УЗИ приборов. Следует отметить, что УЗИ исследование в ветеринарной практике в основном используется для определения патологических изменений в паренхиматозных органах, в органах воспроизводства самок сельскохозяйственных и домашних животных. Анализ использования УЗИ сканирования показывает, что практический данный метод не используется в ветеринарной андрологии. В диссертационной работе для определения морфологических изменений был

впервые использован метод УЗИ сканирования придаточных половых желез у быков производителей. Наиболее доступными для УЗИ исследования являются придаточные половые железы: предстательная и пузырьковидные железы. УЗИ исследование позволяет определить морфологическое состояние придаточных половых желез, наличие патологических изменений, особенно спайки. Получены достаточно хорошего качества сонограммы, где видна структура предстательной и пузырьковидной желез. Определение половой активности быков, сексуальности, уровня либидо проводилось методом наблюдения, микроскопические показатели качества эякулята были определены с помощью микроскопа и прибора АФС 500. Испытание эффективности способов стимуляции репродуктивной функции быков проводилось в условиях племенных хозяйств, установлена эффективность использованных способов стимуляции. В диссертационной работе для стимуляции воспроизводительной функции были использованы препараты, сурфагон, тканевой препарат АСД2. Схемы стимуляции репродуктивной функции быков были оптимизированы с учетом особенностей течения процесса сперматогенеза, длительность которого продолжается 45-60 дней. Процесс сперматогенеза является сложным биологическим процессом, улучшение данного процесса может осуществляться путем гормонального воздействия на организм быков производителей и также путем повышения обменных процессов в целом в организме. Для идентификации точечной мутации в кодирующей части гена TMEM95 (синдром субфертильности быков) был использован метод Tetra-Primer ARMS-PCR реакции.

Разработаны схемы стимуляции воспроизводительной функции племенных быков производителей, анализированы результаты стимуляции спермапродуктивности быков производителей. Докторант имеет публикации по использованию метода электроэякуляции для получения спермы у быков производителей в условиях хозяйства.

Научные результаты, их обоснованность и новизна. Научной новизной диссертационной работы является определение уровня генетического полиморфизма по локусам генов TNP2 (SNP полиморфизмы g.269 G→A SNP, g.1536 C→T) и SPEF2 у исследуемых быков производителей, изучение влияния аллелей указанных генов на показатели спермапродуктивности. По всем изучаемым локусам генов у исследуемых быков производителей определен генетический полиморфизм. В результате амплификации соответствующих фрагментов гена получены амплификаты, на электрофореграмме хорошо различаются размеры полученных ПЦР продуктов. Для идентификации аллелей генов TNP2 и SPEF2 использованы рестриктазы. В настоящее время единственным доступным и дешевым способом идентификации аллелей генов является метод ПЦР-ПДРФ анализа. В качестве альтернативного способа идентификации в молекулярной генетике используется метод Реал Тайм ПЦР, который является более дорогим способом идентификации аллелей генов. Впервые у племенных быков производителей выявлены гетерозиготные носители гаплотипов фертильности HH5, HCD и синдрома субфертильности, разработана методика Tetra-Primer ARMS-PCR

способа диагностики. Доказательством научной новизны диссертационной работы являются полученные 4 патента на изобретение РК, публикации результатов исследования в высокорейтинговом журнале Q2, процентыль 71. Достоверность полученных результатов исследования подтверждаются наличием хорошего качества электрофореграмм, для молекулярно-генетических исследований была использована инфраструктура Казахстанско-Японского инновационного центра, где имеются все необходимые оборудования. Для амплификации нужного фрагмента, соответствующих генов были использованы реактивы зарубежных производителей, компании Thermo Fisher Scientific, для детекции дикого и мутантного типов аллелей были использованы соответствующие рестриктазы.

Интересные результаты получены по изучению распространенности носителей гаплотипов фертильности HH5, HCD у быков голштинской породы племенных центров №1 и №2. Выявлены быки производители, гетерозиготные носители гаплотипа фертильности HH5 и параллельно проведен генеалогический анализ, изучение ветеринарных документов. Установлено, что бык производитель голштинской породы зарубежной селекции является гетерозиготным носителем дефекта HH5, данный бык производитель был импортирован в Республику Казахстан в 2022 году и в ветеринарном сертификате была отметка, что бык является гетерозиготным носителем мутации HH5. Данный факт свидетельствует о достоверности полученных результатов в рамках диссертационной работы, что полученные результаты докторантом соответствует с информацией ветеринарного сертификата страны импортера. Следует отметить, что в последнее время наблюдается тенденция завоза на территорию страны замороженную сперму племенных быков производителей, гетерозиготных носителей вредных мутации. Таким образом, с целью недопущения завоза спермы быков, гетерозиготных носителей мутации необходимо проводить генетический мониторинг методами ПЦР-ПДРФ анализа и Реал Тайм ПЦР диагностики.

Соответствие основным направлениям развития науки или государственным программам. Диссертационная работа выполнена в рамках научного проекта МНВО РК «Разработка молекулярно-генетических способов детекции скрытых мутации у крупного рогатого скота и управление процессом элиминации наследственных аномалии», ИРН AP09057988, сроки реализации 2021-2023 гг. Докторанткой была подготовлена заявка на тему: «Исследование влияния аллелей генов на спермопродуктивность и изучение фертильности спермиев быков производителей» AP25793505 для участия в конкурсе «Жас Ғалым» и одобрена решение ННС.

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации.

Докторантом по результатам научных исследований были опубликованы под руководством научных консультантов 4 статьи, в том числе 3 статьи в журналах Комитета по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан, 1 статья в журнале, входящий в базу данных Scopus. Статья в журнале «Reproduction in Domestic Animals», название статьи «Development of

alternative diagnosis of HH1, HH3, HH5 and HCD fertility haplotypes and subfertility syndrome in cattle», 2024, 59(1), e14533. С целью изучения влияния аллелей генов TNP2 и SPEF2 на спремапродуктивность, на показатели эякулята, проведена большая работа по сбору информации за период с 2016 года по 2022 годы, анализ записей журнала получения спермы племенного центра №1, при этом учитывались показатели: объем полученного эякулята, подвижность спермиев после получения эякулята и после разбавления спермы перед криоконсервацией, количество в результате разбавления полученных спермадоз.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследований, заключения, предложения для производства, списка использованных источников, приложений. Диссертация иллюстрирована 21 таблицами, 20 рисунками. Список литературы включает 180 источника.