



Olsztyn 27.01.2025

REVIEW OF A SCIENTIFIC CONSULTANT

**on the dissertation work of Shormanova Marzhan Muratovna on the topic:
«Identification of genetic variants of TNP in breeding bulls and the
assessment of sperm fertility», submitted for defense for the degree of Doctor
of Philosophy (PhD) in the specialty 6D120100 «Veterinary Medicine»**

In countries with a high level of breeding of breeding animals, along with traditional methods of evaluating breeding animals, such technologies as genomic selection, search and use of SNP polymorphisms for the selection of highly productive animals are used. In dairy and beef cattle breeding, DNA markers are often used to identify individuals with good productivity parameters, especially in dairy cows. Analysis of specialized literature shows that DNA markers are rarely used in breeding bulls to predict the reproductive function. Thus, the search for candidate genes of the reproductive function in breeding bulls, the development and optimization of genotyping methods for breeding bulls is an urgent problem in the biotechnology of breeding agricultural animals. In the dissertation work of M.M. Shormanova, genotyping of breeding bulls of different breeds bred in the Republic of Kazakhstan was carried out for the loci of two genes, TNP2 (SNP g.269 G → A g.1536 C → T) and SPEF2, which are associated with the process of spermatogenesis and sperm quality.

Also, a more important area of research is the development and optimization of diagnostic methods for genetic defects in breeding bulls using molecular genetic research methods. Currently, according to the information on the OMIA website - Online Mendelian Inheritance in Animals (<https://www.omia.org/home/>), 967 hereditary anomalies are found in cattle, of which more than 50 genetic defects can be identified using PCR, PCR-PRDF analysis, Real Time PCR, Tetra-Primer ARMS-PCR methods. Recently, there has been a change in the strategy for eliminating genetic defects in breeding animals, previously, if the method of culling animals, heterozygous carriers of harmful mutations, was used, then now it is recommended to conduct genetic monitoring of breeding animals, especially breeding bulls.

Usually, at breeding centers and commercial farms, such diagnostic methods as macroscopic ejaculate evaluation, sperm quality evaluation using the CASA program, and molecular genetic methods of sperm quality evaluation are used to evaluate the reproductive function of bulls. In this work, along with existing evaluation methods, such reflexological methods as determining the sexual activity of bulls, studying sexual activity, and determining the level of libido were used to evaluate the reproductive function of bulls, which reflect the state of sexual activity of the used breeding bulls.

It should be noted that the methodological level of this dissertation work was high. The work used such modern molecular genetic research methods as polymerase chain reaction, obtaining an amplificate, restricting the obtained PCR product, using endonucleases to identify wild and mutant types of the allele of the genes under study, visualizing the results of PCR and restriction of the amplificate by horizontal electrophoresis, using a gel documentation system. According to the results of the study, the TNP2 SNP g.269 G→A gene locus turned out to be monomorphic and all individuals had a heterozygous GA genotype; genetic polymorphism was detected for another SNP g.1536 C→T polymorphism in the bulls under study. Similar results were obtained for the SPEF2 gene locus, where all three genetic variants were detected in the group of bulls under study (n=161). In order to obtain reliable genotyping results, the calculator, Equilibrium Hardy-Weinberg (<https://gene-calc.pl/hardy-weinberg-page>) computer programs were used and the digital values of χ^2 were determined.

The dissertation work has a high level of scientific novelty, as evidenced by the receipt of four patents for the invention of the Republic of Kazakhstan on methods for genotyping bulls. For the first time, heterozygous carriers of the HH5 mutation, HCD and subfertility syndrome in bulls were identified at breeding centers No. 1 and No. 2 of the Republic of Kazakhstan. In the work, ultrasound scanning of the reproductive organs of bulls was used to determine the morphological state of the accessory sex glands, prostate, and vesicular gland. This work was carried out within the framework of the project of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan «Development of molecular genetic methods for detecting latent mutations in cattle and managing the process of eliminating hereditary anomalies», AR09057988.

Shormanova M.M. studied the effectiveness of various methods of stimulating the reproductive function of bulls using hormonal, multivitamin, tissue preparations. The same high efficiency of hormonal methods for increasing the fertility of bulls in breeding and commercial farms was established. However, the stimulating effect occurs faster when using surfagon and the drug E selenium, with the second treatment scheme, surfagon and the drug ASD2, the stimulating effect occurs at a later period, since the tissue preparation has a positive effect through improving the metabolic process.

The dissertation of Shormanova Marzhan Muratovna consists of the following sections: introduction, literature review, materials and research

methods, research results, discussion of the results, conclusions and proposals for production, list of references. The reliability of the obtained research results are confirmed by the received patents for invention of the RK (4 patents), the main results of the study were published in the journal "Reproduction in Domestic Animals", which is included in the Web of Science database, quartile Q2 and in the RK publications, which are included in the list of journals of the Committee for Quality Assurance in Science and Higher Education of the MNiVO RK. The dissertation work is illustrated with photographs, high-quality sonograms, electrophoregrams, which reflect the results of experimental work on genotyping of breeding bulls.

Personal contribution of the doctoral student. Doctoral student Shormanova M.M. took part in collecting biological materials for the study (samples of cryopreserved bull sperm, samples of peripheral blood with EDTA anticoagulant), isolated DNA from blood samples using the classical phenol method and from sperm samples using a modified method, she assessed the quality of the obtained DNA using horizontal electrophoresis and measuring the concentration of DNA samples.

Doctoral student Shormanova M.M. is fully proficient in the technology of genotyping DNA samples using PCR-RFLP analysis, she used the computer programs Primer 3 and Primer 1 to select the sequences of the primers used. A large analytical work was carried out to study the effect of alleles of the TNP2 genes (SNP g.269 G → A g.1536 C → T) and SPEF2 on the reproductive function of breeding bulls, the effect of alleles of genes on the quality of sperm. The obtained results of the work have been repeatedly tested at international scientific conferences, Russia, St. Petersburg, 2018, Altai State Agrarian University, Barnaul, 2021. Thus, the dissertation work of Shormanova Marzhan Muratovna meets the requirements for doctoral dissertations in the specialty 6D120100 – «Veterinary Medicine» and the author of the work deserves to be awarded the degree of PhD.

Scientific consultant,
Professor


KIEROWNIK KATEDRY
prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj

Aleksandra Platt-Samoraj

Мертаңба: / ОЛЫШТЫНДАҒЫ ВАРМИН-МАЗУР УНИВЕРСИТЕТІ
ВЕТЕРИНАРИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
10-718 Олыштын, Очаповский көшесі, 14
тел. (089) 523 34 40, 523 39 93, факс 323 34 40
СТТН 739-30-33-97/

ОЛЫШТЫНДАҒЫ ВАРМИН-МАЗУР УНИВЕРСИТЕТІ

Ветеринария факультеті
ЭПИЗООТОЛОГИЯ кафедрасы
10-718 Олыштын, Очаповский көшесі, 13
тел. 089/523 35 04 **СТТН 739-30-33-097**

Олыштын 27.01.2025

**Ғылыми кеңесші Шорманова Маржан Муратовнаның 6D120100 "Ветеринария"
мамандығы бойынша философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін алу үшін
қорғауға ұсынылған "Асыл тұқымды бұқаларда TNP генетикалық варианттарын
идентификациялау және спермийлердің ұрықтандырғыш қасиетін бағалау"
тақырыбындағы диссертациялық жұмысына пікірі**

Асыл тұқымды мал өсіру деңгейі жоғары елдерде асыл тұқымды жануарларды бағалаудың дәстүрлі әдістерімен қатар геномдық селекция, жоғары өнімді жануарларды таңдау үшін SNP полиморфизмдерін іздеу және пайдалану сияқты технологиялар қолданылады. Сүтті және етті мал шаруашылығында ДНҚ маркерлері көбінесе өнімділік параметрлері жақсы адамдарды анықтау үшін қолданылады, әсіресе сүтті сиырларда. Арнайы әдебиеттерді талдау репродуктивті функцияны болжау үшін асыл тұқымды бұқаларда ДНҚ маркерлері сирек қолданылатынын көрсетеді. Осылайша, асыл тұқымды бұқалардан репродуктивті функцияға үміткер гендерді іздеу, асыл тұқымды бұқаларды генотиптеу әдістерін әзірлеу және оңтайландыру ауыл шаруашылығы жануарларын өсіру биотехнологиясындағы өзекті мәселе болып табылады. М.М.Шорманованың диссертациялық жұмысында сперматогенез процесіне және сперматогенез сапасына байланысты екі геннің - TNP2 (SNP g.269 G → A g. 1536 C → T) және SPEF2 локустары бойынша Қазақстан Республикасында өсірілетін әртүрлі тұқымды асыл тұқымды бұқаларды генотиптеу жүргізілді.

Сондай-ақ зерттеудің маңызды бағыты молекулярлық-генетикалық зерттеу әдістерін пайдалана отырып, асыл тұқымды бұқалардағы генетикалық ақауларды диагностикалау әдістерін әзірлеу және оңтайландыру болып табылады. Қазіргі уақытта OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals сайтындағы ақпаратқа сәйкес (<https://www.omia.org/home/>), ірі қара малдың 967 тұқым қуалайтын ауытқулары анықталды, олардың 50-ден астамы генетикалық ақауларды PCR, PCR-PRDF талдау, нақты уақыттағы PCR, ТЕТРАПРАЙМЕРЛІК ARMS-PCR әдістері арқылы анықтауға болады. Жакында Асыл тұқымды малдардағы генетикалық ақауларды жою стратегиясы өзгерді, егер бұрын зиянды мутациялардың гетерозиготалы тасымалдаушыларын жою әдісі қолданылған болса, енді асыл тұқымды малдарға, әсіресе асыл тұқымды бұқаларға генетикалық мониторинг жүргізу ұсынылады.

Әдетте асыл тұқымды орталықтар мен коммерциялық шаруашылықтарда бұқалардың репродуктивті қызметін бағалау үшін эякулятты макроскопиялық бағалау, CASA бағдарламасы бойынша сперматозоидтардың сапасын бағалау, сперматозоидтардың сапасын бағалаудың молекулалық-генетикалық әдістері сияқты

диагностикалық әдістер қолданылады. Бұл жұмыста бұқалардың репродуктивті қызметін бағалау үшін қолданыстағы бағалау әдістерімен қатар бұқалардың жыныстық белсенділігін анықтау, жыныстық белсенділікті зерттеу, пайдаланылатын асыл тұқымды бұқалардың жыныстық белсенділік күйін көрсететін либидо деңгейін анықтау сияқты рефлексологиялық әдістер қолданылды.

Бұл диссертацияның жоғары әдіснамалық деңгейін атап өткен жөн. Жұмыста полимеразды тізбекті реакция, күшейту, алынған PCR өнімін шектеу, зерттелетін гендік аллельдердің жабайы және мутантты түрлерін анықтау үшін эндонуклеазаларды пайдалану, PCR нәтижелерін визуализациялау және геледік құжаттама жүйесін пайдалана отырып, көлденең электрофорез арқылы күшейтуді шектеу сияқты заманауи молекулалық-генетикалық зерттеу әдістері қолданылды. Зерттеу нәтижелері бойынша TNP2 SNP g.269 G → A генінің локусы мономорфты болып шықты және барлық адамдарда гетерозиготалы GA генотипі болды; басқа SNP полиморфизмі үшін g. 1536 C→T зерттелетін бұқаларда генетикалық полиморфизм анықталды. Ұқсас нәтижелер spf12 генінің локусы үшін де алынды, мұнда бұқалардың зерттеу тобында (N=161) барлық үш генетикалық нұсқа анықталды. Генотиптеудің сенімді нәтижелерін алу үшін калькулятор, Equilibrium Hardy - Weinberg компьютерлік бағдарламалары қолданылды (<https://genecalc.pl/hardy-weinberg-page>) және сандық мәндерді анықтады x2.

Диссертациялық жұмыс ғылыми жаңалықтың жоғары деңгейіне ие, бұған бұқаларды генотиптеу әдістеріне Қазақстан Республикасының өнертабысына төрт Патент алу дәлел. Қазақстан Республикасының № 1 және № 2 асыл тұқымды орталықтарында алғаш рет бұқаларда HH5, HCD мутациясының және субфертильділік синдромының гетерозиготалы тасымалдаушылары анықталды. Жұмыста қосымша жыныс бездерінің, простата және Вас-деферендердің морфологиялық жағдайын анықтау үшін бұқалардың репродуктивті мүшелерін ультрадыбыстық сканерлеу қолданылды. Жұмыс Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің "ірі қара малдағы жасырын мутацияларды анықтаудың және тұқым қуалайтын ауытқуларды жою процесін басқарудың молекулярлық-генетикалық әдістерін әзірлеу" жобасы шеңберінде орындалды, AP09057988.

М.М. Шорманова гормоналды, мультивитаминді, тіндік препараттарды қолдана отырып, бұқалардың репродуктивті қызметін ынталандырудың әртүрлі әдістерінің тиімділігін зерттеді. Асыл тұқымды және тауарлық шаруашылықтарда бұқалардың құнарлылығын арттырудың гормоналды әдістерінің бірдей жоғары тиімділігі анықталды. Алайда, стимуляторлық әсер серфагон мен селена Е препаратын қолданғанда тезірек пайда болады, екінші емдеу режимімен, серфагонмен және АСД2 препаратымен стимуляторлық әсер кейінірек пайда болады, өйткені ұлпалық препарат метаболизм процестерін жақсарту арқылы оң әсер етеді.

Шорманова Маржан Муратовнаның диссертациясы келесі бөлімдерден тұрады: кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері, нәтижелерді талқылау, өндіріске қорытындылар мен ұсыныстар, әдебиеттер тізімі. Зерттеулердің алынған нәтижелерінің дұрыстығы ҚР өнертабысына алынған патенттермен расталады (4 патент), зерттеудің негізгі нәтижелері Web of Science дерекқорына кіретін "үй жануарларында өсімін молайту" журналында, Q2 квантилінде және ҚР ҰҚМ ғылым және жоғары білім сапасын қамтамасыз ету Комитетінің журналдар тізбесіне кіретін ҚР басылымдарында жарияланды. Диссертациялық жұмыс асыл тұқымды бұқаларды генотиптеу бойынша эксперименттік жұмыстың нәтижелерін көрсететін фотосуреттермен, жоғары сапалы сонограммалармен, электрофореграммалармен суреттелген.

Докторанттың жеке үлесі. Докторант М.М. Шорманова зерттеу үшін биологиялық материалды жинауға катысты (бұқалардың криоконсервіленген сперматозоидтарының үлгілері, EDTA антикоагулянты бар перифериялық қан үлгілері), классикалық фенол әдісімен қан үлгілерінен және модификацияланған әдіспен сперматозоидтардан ДНҚ бөліп алды, алынған ДНҚ сапасын көлденең электрофорез және ДНҚ үлгілерінің концентрациясын өлшеу арқылы бағалады.

Докторант М.М. Шорманова PCR-RFLP талдау арқылы ДНҚ үлгілерін генотиптеу технологиясын толық меңгерген, ол қолданылатын праймерлердің тізбегін таңдау үшін Primer 3 және Primer 1 компьютерлік бағдарламаларын пайдаланды. TNP2 гендік аллельдерінің (SNP g.269 G → A g. 1536 C → T) және SPEF2 асыл тұқымды бұқалардың репродуктивті қызметіне, гендік аллельдердің сперматозоидтардың сапасына әсерін зерттеу бойынша үлкен аналитикалық жұмыс жүргізілді. Алынған жұмыс нәтижелері халықаралық ғылыми конференцияларда бірнеше рет сыналды, Ресей, Санкт-Петербург, 2018. Алтай мемлекеттік аграрлық университеті, Барнаул, 2021. Осылайша, Маржан Муратовна Шорманованың диссертациялық жұмысы 6Q120100 - "Ветеринария" мамандығы бойынша докторлық диссертацияларға қойылатын талаптарға сәйкес келеді, ал жұмыс авторы ғылым кандидаты ғылыми дәрежесін беруге лайық.

Ғылыми кеңесші,
профессор

/қолы/

Александра Платт-Саморадж

Мөртаңба:/Бөлім меңгерушісі проф. др. Александра Платт-Саморадж/