

Шорманова Маржан Муратовнаның 6D120100-"Ветеринариялық медицина" мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алуға ұсынылған "Асыл тұқымды бұқаларда TNP генетикалық варианттарын идентификациялау және спермийлердің ұрықтандырғыш қасиетін бағалау" тақырыбындағы диссертациялық жұмысының

АНДАТПА

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Ірі қара малдың сүт, ет өнімділігін арттырудың және популяцияның генетикалық әлеуетін арттырудың қол жетімді әдісі-табынның көбеюі үшін жоғары өнімді, асыл тұқымды бұқаларды пайдалану. Сондықтан, қазіргі уақытта зиянды жасырын мутациялардан таза, репродуктивтік қызметінің жоғары параметрлері бар асыл тұқымды бұқаларды іріктеу мәселелеріне көп көңіл бөлінеді. Диссертация репродуктивтік қызметтің ДНҚ маркерлері ретінде, аталық бұқаларының репродуктивтік қызметінің көрсеткіштерімен байланысты TNP2 генінің кодтау бөлігіндегі (g.269 G→A, g.1536 C→T SNP) SNP полиморфизмдері, SPEF2 генінің экзон бөлігіндегі полиморфизмдер зерттелді, бұл аталған гендердің экспрессиясы сперматогенез үдерістерін бақылайды. . Соңғы уақытта әлемде жоғары өнімді сиырлардың репродуктивті функциясының төмендеу тенденциясы екі себепке байланысты байқалды: сүт өнімділігінің жоғарылауы, жоғары зат алмасу жылдамдығы, бұл сиырлардың құнарлылығының төмендеуімен бірге жүреді. Екінші өте маңызды себеп – нүктелік мутация, делеция немесе кірістіру нәтижесінде пайда болған жасырын зиянды мутациялардың гетерозиготалы тасымалдаушыларының көбеюі; сиырларда мұндай ауытқулар эмбрионалдық дамудың бұзылуымен қатар жүреді, жасырын түсік жиі орын алып, сүтті мал шаруашылығына үлкен экономикалық зиян келтіреді.

Әлемдік әдебиеттерді талдау SNP полиморфизмдерін пайдалану репродуктивтік қабілеті жоғары қалаған генотипі бар жануарларды анықтауға мүмкіндік беретіндігін көрсетеді. Қазіргі уақытта сиырларда эмбрионалдық өліммен бірге жүріп, төл алу көрсеткішін төмендететін зиянды мутациялардың тасымалдаушыларын балаудың молекулалық-генетикалық әдістерін жасау әсіресе өзекті болып табылады. Бұл жұмыста Гольштейн тұқымындағы HH4, HH5, HCD фертилдік гаплотиптері және өндіруші бұқалардағы субфертильділік синдромы сияқты тұқым қуалайтын ауытқуларды балау әдістері оңтайландырылды және әзірленді. Алғаш рет аталық бұқалардың қосымша жыныстық бездерінің морфологиялық жағдайын анықтау үшін ультрадыбыстық сканерлеу әдісі қолданылды. Аллельдері шәует сапасы мен құнарлылығына әсер ететін гендік локустар белгілі. Ветеринариялық андрологияда ірі тұқымдық орталықтарда асыл тұқымды бұқалардың ұрық өнімділігін ынталандыру үшін гормоналды препараттарды қолдану маңызды. Репродуктивті функцияны жақсарту үшін сперматогенез процесіне ынталандырушы әсері бар препараттар сәтті қолданылады.

Диссертациялық жұмыстың мақсаты:

«Асыл Түлік» АҚ Малды асылдандыру орталығына, «Таурус» ЖШС, Жетысу облысы Талдықорған қаласы «Асыл» ЖШС, Алматы облысы Еңбекшіқазақ ауданы «Сарканд-Агро», Талғар ауданы «Байсерке-Агро» шаруашылығына қарасты бұқалардың TNP2, SPEF2 ген локустары бойынша генотиптерін анықтау және осы ген аллелдерінің - бұқалардың репродуктивтік қызметіне әсерін зерттеу, генетикалық ақауларға мониторинг жүргізу, гетерозиготалы тасымалдаушы бұқаларды анықтау

Зерттеудің міндеттері:

1. «Асыл» ЖШС, «Сарканд - Агро» жеке меншік мал шаруашылығына, «Байсерке-Агро» көпсалалы шаруашылығына қарасты бұқаларға TNP2 ген локусы бойынша ПТР-РФҰП тәсілімен генотиптеу жұмыстарын жүргізу, зерттеу популяциясындағы бұқалардың генетикалық құрылымын зерттеу, ген аллелдерінің жиілігін, ген тепе теңдігін зерттеу;
2. «Асыл Түлік», «Асыл» ЖШС, «Сарканд-Агро», «Байсерке-Агро» асылдандыру орталықтарына және шаруашылықтарына қарасты асыл тұқымды бұқалардың генотипін SPEF2 ген локусы бойынша анықтау, зерттеу популяциясындағы бұқалардың генетикалық құрылымын зерттеу, ген аллелдерінің жиілігін, ген тепе теңдігін зерттеу;
3. «Сарканд-Агро», «Байсерке-Агро» шаруашылықтарында өндіріс жағдайында бұқалардың жыныстық қызметінің көрсеткіштері, либидо, бір маусым ішіндегі бұқалардың жынысық белсенділігі мен TNP2 ген локусы бойынша генетикалық нұсқаулары арасындағы байланыстарды зерттеу;
4. «Асыл Түлік» асылдандыру орталығындағы бұқалардың шәует сапасы, SPEF2 ген аллелдерінің бұқалардың эякулятының көлеміне, концентрациясына, белсенді спермийлер санына ассоциативтік әсері зерттеу;
5. «Асыл Түлік» АҚ, «Таурус» ЖШС, қарасты асыл тұқымды бұқаларға HH4, HH5, HCD, субфертильдік синдромы, (TMEM95) генетикалық кемтарлықтарының таралуын зерттеу үшін генетикалық скрининг жүргізу, гетерозиготалы тасымалдаушы бұқаларды анықтау;
6. «Сарканд - Агро», «Байсерке - Агро» шаруашылықтарында асыл тұқымды бұқалардың репродуктивтік қызметіне кері әсерін тигізетін факторларды зерттеу және олардың жыныстық қызметін арттыруға бағытталған белсендендіру нобайларын құрастыру, олардың тиімділігін зерттеу;

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу материалы ретінде мұздатылған антикоагулянтты қан үлгілері және аталық бұқалардың мұздатып-қатырылған шәуеті пайдаланылды. Биологиялық үлгілерден ДНҚ-ны оқшаулау коммерциялық жиынтықтар мен классикалық фенол әдісімен жүргізілді. Оқшауланған ДНҚ сапасын бағалау көлденең электрофорез әдісімен және ДНҚ концентрациясын өлшеу арқылы жүргізілді.

Молекулярлық-генетикалық зерттеу әдістерін модельдеу: биологиялық үлгілерді жинау, ДНҚ экстракциясы, праймерлер дизайні, амплификаттау шарттарын анықтау, көлденең электрофорез әдісімен ПТР нәтижелерін визуалдау, гельді құжаттау жүйесі көмегімен үлгілердің генотипін анықтау.

Жұмыс заманауи молекулярлық-генетикалық зерттеу әдістерін қолдану арқылы жүргізілді. Алынған ДНҚ сапасын бағалау үшін 0,8% агарозды геледегі көлденең электрофорез әдісі қолданылды. Бұл әдіс ДНҚ концентрациясын және ДНҚ фрагментация дәрежесін жанама анықтауға мүмкіндік береді, бұл ДНҚ сапасын бағалаудың маңызды критерийі болып табылады. ДНҚ концентрациясы Nanodrop 2000 құрылғысы арқылы өлшенді. ДНҚ концентрациясы мен ДНҚ тазарту дәрежесі анықталды, ол 0,75-тен жоғары болды. Сондай-ақ, Primer 3, Primer 1 компьютерлік бағдарламалары, χ^2 мәндерін анықтау калькуляторы, NCBI веб-сайтының ақпараты пайдаланылды.

Диссертациялық жұмыста ДНҚ үлгілерін генотиптеу үшін әдебиетте сипатталған праймер тізбегі және өзіміздің праймерлер пайдаланылды. Бұқалардағы субфертильдік синдромды тасымалдау үшін асыл тұқымды бұқаларды генотиптеу үшін рестриктеуші ферментті қолдануды қоспағанда, классикалық ПТР-ПДРФ талдауынан артықшылығы бар Tetra-Primer ARMS-ПТР реакция әдісі қолданылды.

Жұмыстың тәжірибелік бөлігі «Асыл Түлік» АҚ асыл тұқымды зауытының бұқаларына жүргізілді; ДНҚ үлгілерін генотиптеу үлкен үлгіде жүргізілді. Зерттелетін гендердің аллельдерінің шәует өнімділігіне әсерін зерттеу мақсатында генотиптері TNP2 және SPEF2 гендік локусы бойынша белгілі асыл тұқымды бұқалардың репродуктивті қызметінің келесі параметрлері анықталды. «Асыл Түлік» АҚ асыл тұқымды орталығының 25 бас асыл тұқымды бұқаларының шәует жинау, криоконсервациялау, қатырылған шәуеттерді сату нәтижелерін талдау негізінде репродуктивті қызметі жоғары 5 асыл тұқымды бұқа анықталды. Көрсетілген бұқалардың ұрық дозасын сатудың ең үлкен көлемі, көбею үшін жоғарғы бұқалардың ұрығын пайдаланған шаруашылықтар саны. Айта кету керек, сату көлемі және шаруашылықтар саны жоғары бұқалар SPEF2 генінің локусы үшін гетерозиготалы TG генотипі бар бұқалар болды. 2016-2021 жылдар аралығындағы асыл тұқымды бұқалардың репродуктивті қызметін талдау нәтижелері бойынша ең жақсы асыл тұқымды бұқалар анықталды: симментал тұқымының «Сокол» бұқасы, қазақтың ақбас тұқымының «Чемпион» бұқасы. Алынған нәтижелер асыл тұқымды бұқалардың өнімділігін болжау үшін ДНҚ маркерлерін қолдануға болатынын көрсетеді.

Бұқалардың қосымша жыныстық (баданалық, көпіршік тәрізді без) бездерінің морфологиялық жағдайын бағалау үшін Pu2200 Vet және Mindray Z5 vet құрылғыларының көмегімен ультрадыбыстық зерттеу әдісі қолданылды. Айта кететін жағдай, ультрадыбыстық зерттеу ветеринариялық тәжірибеде негізінен паренхималық органдарда, ауылшаруашылық және үй жануарларының аналықтарының көбею органдарында патологиялық өзгерістерді анықтау үшін қолданылады. Ультрадыбыстық сканерлеуді қолдануды талдау көрсеткендей, бұл әдіс ветеринарлық андрологияда қолданылмайды. Диссертациялық жұмыста морфологиялық өзгерістерді анықтау үшін алғаш рет өндірушілердің бұқаларында эпидидимальды жыныс бездерін ультрадыбыстық сканерлеу әдісі қолданылды. Ультрадыбыстық

зерттеу үшін ең қол жетімді жыныстық бездер: бадана және көпіршікті бездері. Ультрадыбыстық зерттеу жыныс бездерінің морфологиялық жағдайын, патологиялық өзгерістердің болуын, әсіресе адгезияны анықтауға мүмкіндік береді. Сонограмманың өте жақсы сапасы алынды, онда бадана және көпіршікті бездерінің құрылымы көрінеді.

Бұқалардың жыныстық белсенділігін, сексуалдылығын, либидо деңгейін анықтау бақылау әдісімен жүргізілді, эякулят сапасының көрсеткіштері микроскоп және АФС-500 құрылғысының көмегімен анықталды. Бұқалардың репродуктивтік қызметін стимулдеу әдістерінің тиімділігін сынау асыл тұқымды шаруашылықтар жағдайында жүргізілді, пайдаланылған стимулдеу әдістерінің тиімділігі анықталды. Диссертациялық жұмыста репродуктивті функцияны ынталандыру үшін препараттар, сурфагон, ұлпалық препарат ACD 2 қолданылды. Бұқалардың репродуктивті функциясын ынталандыру схемалары сперматогенез процесінің ерекшеліктерін ескере отырып оңтайландырылды, оның ұзақтығы 45-60 күнге созылады. Сперматогенез процесі күрделі биологиялық процесс болып табылады, бұл процесті жақсарту бұқалардың ағзасына гормоналды әсер ету арқылы жүзеге асырылуы мүмкін, сонымен қатар организмдегі метаболикалық процестерді арттыру арқылы. TMM95 генінің кодтау бөлігіндегі нүктелік мутацияны анықтау үшін (бұқалардың субфертильділік синдромы) реакция Tetra-Primer ARMS -PCR реакциялары әдісі қолданылды. Асыл тұқымды бұқалардың көбею функциясын ынталандыру схемалары әзірленді, тұқымдық бұқалардың сперматозоидтарын ынталандыру нәтижелері талданды. Докторантта шаруашылық жағдайында өндірушілердің бұқаларынан шәует алу үшін электроэякуляция әдісін қолдану бойынша жарияланымдар бар.

Ғылыми нәтижелер, олардың негізділігі мен жаңалығы. Диссертацияның ғылыми жаңалығы зерттелетін аталық бұқаларда TNP2 (SNP полиморфизмдер g.269 g→a SNP, g.1536 C→T) және SPEF2 гендік локустары бойынша генетикалық полиморфизм деңгейін анықтау аталған гендердің аллельдерінің спермаөнімділік көрсеткіштеріне әсерін зерттеу. Зерттелетін өндірушілердің бұқаларында зерттелетін гендердің барлық локустары бойынша генетикалық полиморфизм анықталды. Геннің тиісті фрагменттерін амплификациялау нәтижесінде амплификат алынды, электрофореграммада алынған ПТР өнімдерінің өлшемдері жақсы ерекшеленеді. TNP2 және SPEF2 гендерінің аллельдерін анықтау үшін рестриктазалар қолданылады. Қазіргі уақытта аллельді геномды анықтаудың жалғыз қол жетімді және арзан әдісі-ПТР-ПДРФ талдау әдісі. Сәйкестендірудің балама әдісі ретінде молекулалық генетикада нақты уақытағы ПТР әдісі қолданылады, бұл ген аллельдерін анықтаудың қымбатырақ әдісі.

Алғаш рет асыл тұқымды бұқаларда HH5, HCD және субфертильдік синдромының ұрықтандырғыштық гаплотиптерінің гетерозиготалы тасымалдаушылары анықталды, балау әдісінің Tetra-Primer ARMS-PCR әдістемесі әзірленді. Диссертациялық жұмыстың ғылыми жаңалығының дәлелі ҚР өнертабысына алынған 4 патент, 1 пайдалы модельге патент алынды,

зерттеу нәтижелерін Q2, процентиль 71 жоғары рейтингтік журналда жариялау болып табылады.

Ғылымды дамытудың негізгі бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі. Диссертациялық жұмыс "Ірі қара малдағы жасырын мутацияларды анықтаудың молекулярлық-генетикалық тәсілдерін әзірлеу және тұқым қуалайтын аномалияларды жою үдерісін басқару" ҚР ҒЖБМ ғылыми жобасы аясында орындалды, ИРН AP09057988, іске асыру мерзімі 2021-2023 жж. Докторант "жас Ғалым" конкурсына қатысу үшін AP25793505 "сперматозоидтардың өнімділігіне гендік аллельдердің әсерін зерттеу және өндірушілердің сперматозоидтарының құнарлылығын зерттеу" тақырыбында өтінім дайындады және ҰҒК шешімі мақұлданды.

Докторанттың әр жарияланымды дайындауға қосқан үлесінің сипаттамасы.

Докторант ғылыми зерттеулердің нәтижелері бойынша ғылыми кеңесшілердің жетекшілігімен 4 мақала, оның ішінде Қазақстан республикасы Ғылым және Жоғары білім Министрлігі ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету Комитетінің журналдарында 3 мақала, Жариялады., Scopus мәліметтер базасына енгізілген журналда 1 мақала. "Reproduction in Domestic Animals" журналында 1 мақала, мақаланың атауы "Development of alternative diagnosis of HH1, HH3, HH5 and HCD fertility haplotypes and subfertility syndrome in cattle", 2024, 59(1), e14533. TNP2 және SPEF2 гендерінің аллельдерінің спрема өнімділігіне, эякулят көрсеткіштеріне әсерін зерттеу мақсатында 2016 жылдан 2022 жылға дейінгі кезеңде ақпарат жинау, №1 асыл тұқымды орталықтың шәует алу журналының жазбаларын талдау бойынша үлкен жұмыс жүргізілді, бұл жерде: алынған эякулят көлемі, эякулят алғаннан кейін және шәует сұйылтылғаннан кейін шәует қозғалғыштығы. криоконсервация, алынған спермадозаларды сұйылту нәтижесінде пайда болатын көрсеткіштер ескерілді.

Диссертацияның көлемі мен құрылымы. Диссертация компьютерлік мәтінде 122 бетте баяндалған және Кіріспеден, Әдебиеттерге шолу, Материалдар мен зерттеу әдістері, зерттеу нәтижелері, зерттеу нәтижелерін талқылау, қорытынды, тәжірибелік ұсыныстар, пайдаланылған әдебиеттер тізімі, қосымшалар сияқты бөлімдердер тұрады. Диссертация 21 кестемен, 20 суретпен көркемделген. Әдебиеттер тізіміне 180 дереккөз кіреді.