

**Тургумбеков Асет Абдымаратовичтың 6D120100 – «Ветеринариялық медицина» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін ұсынылған «Доминантты фолликулдің өсу динамикасын зерттеу және ER α генінің локусы бойынша генотиптеу негізінде сиырлардың репродуктивтік қызметін арттыру» тақырыбындағы диссертациялық жұмысына
АҢДАТПА**

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Әлемде соңғы 15-20 жылда сүт сауу көрсеткішін арттыру бойынша қарқынды жүргізілген селекциялық жұмыстардың нәтижесінде сүт өнімділігінің артуына байланысты сиырлардың репродуктивтік қызметінің төмендеу үрдісі байқалады. Сиырлардың репродуктивтік қызметінің фенотиптік белгісінің тұқым қуалаушылық коэффициенті төмен және тек 0,02 болатыны белгілі. Осылайша, фолликулдардың өсу ерекшеліктерін, овуляцияның басталу механизмін зерттеу, сүтті сиырлардың эстралдық циклін оңтайлы синхрондау нобайларын әзірлеу және оларды теориялық негіздеудің үлкен практикалық маңызы бар. Отандық әдебиеттерді талдау Қазақстандық ғалымдардың сиырларда доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу ерекшеліктерін зерттеу бойынша ғылыми жұмыстар жүргізбегенін көрсетеді, дегенмен шетелдік ғалымдар эстралдық цикл кезінде сиырларда доминантты фолликулдардың өсуінің екі немесе үш толқыны байқалатынын мәлімдейді. Ультрадыбыстық сканерлеу және ультрадыбыстық доплерография сияқты заманауи әдістер аналық безде фолликулдардың өсу динамикасын анықтауға, фолликулдардың өсу қарқынын зерттеуге, доминантты және субдоминантты фолликулдардың көлемін анықтауға, сары дененің қантамырлану (васкуляризация) дәрежесін анықтауға мүмкіндік береді.

Дамыған елдерде сиырдың репродуктивтік қызметін болжау үшін геномдық селекция қолданылады, бұл қажетті генотипі бар жануарларды анықтауға мүмкіндік береді, бұзаулау көрсеткішін 100 сиырдан 100 бұзауға арттыруға мүмкіндік береді. Алайда, қазіргі уақытта біздің елімізде геномдық селекция технологиясын енгізу, фенотиптік деректерді жинаудың күрделілігіне, инфрақұрылымның әлсіздігіне, рефренс популяциясының болмауына байланысты шектеулі. Сондықтан ірі қара малдың репродуктивтік қызметінің маркерлерінің ДНҚ-сын зерттеу ветеринария ғылымының өзекті мәселесі болып табылады. Бірнеше SNP полиморфизмдер бар, олардың аллельдері сиырлардың репродуктивті қызметіне ассоциативті ықпал етеді.

Шетелдік ғалымдардың көпшілігі репродуктивтік қызметтің ДНҚ маркерлері ретінде келесі гендердің – эстрогендік рецептордың (ER α) және дифференциацияның өсу факторының (GDF9) локустары бойынша SNP полиморфизмдерін пайдаланады.

Асыл тұқымды жануарларды генотиптеу технологиясы басқа генетикалық нұсқаларға қарағанда артықшылығы бар қалаған генотипі бар жануарларды анықтауға мүмкіндік береді. Айта кету керек, іс жүзінде сиырлардағы эстралдық циклді синхрондау және ынталандыру, жыныстық циклдің сатысын

есепке алмай, доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу динамикасын ескермей фронтальды түрде жүзеге асырылады. Доминантты фолликулдардың өсу динамикасын ескере отырып, сиырлардағы эстралдық циклді оңтайлы синхрондау нобайларын әзірлеудің сүт фермалары үшін тәжірибелік маңызы бар.

Диссертациялық жұмыстың мақсаты: Сиырларда эстралдық цикл кезінде доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу динамикасын зерттеу, фолликулдардың өсу толқындарының санын анықтау, эстрадиол гормонының концентрациясының өзгеруін және сиырлардың репродуктивтік қызметіне ER α , GDF9 гендері аллелдерінің ассоциативті ықпалын зерттеу.

Зерттеудің міндеттері: 1. «Байсерке-Агро» сүт фермасы жағдайында зерттеу тобындағы голштин тұқымды сиырлардың бір эстралдық циклында олардың аналық бездеріндегі доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу динамикасын және өсу толқындарын 48 сағат аралықпен УДЗ тәсілімен зерттеу;

2. Зерттеу тобындағы сиырларының қан сарысуындағы эстрадиол гормонының концентрациясын овуляцияға дейінгі кезеңде және репродуктивтік циклдің әртүрлі кезеңдерінде ИФТ әдісімен зерттеу;

3. Зерттеу тобындағы сиырлардың қан үлгілерінен ДНҚ бөліп алу, алынған ДНҚ сынамаларының сапасын горизонталдық электрофорез әдісімен және нанодроп қондырғысының көмегімен ДНҚ сынамаларының сапасын зерттеу;

4. «Байсерке-Агро» ЖШС шаруашылығындағы 120 бас сиырлардан тұратын зерттеу тобын құру және олардан қан үлгілерін алу, сынамалардан ДНҚ бөлу, оларға Er α ген локусы бойынша ПТР-РФҰП тәсілімен зерттеу;

5. Зерттеу тобындағы сиырлардың *Era* рецепторы локусы бойынша генотиптеу нәтижелері алынған соң, осы локус бойынша генетикалық варианттардық репродуктивтік қызметпен байланысын зерттеу;

6. «Байсерке-Агро» ЖШС шаруашылығындағы зерттеу тобындағы сиырлардан қан үлгілерін алу, сынамалардан ДНҚ бөлу, оларға GDF9 ген локусы бойынша SNP A625T/DRAI полиморфизмін ПТР-РФҰП тәсілімен зерттеу;

7. Зерттеу тобындағы сиырлардың GDF9 ген локусы бойынша генотиптеу нәтижелері алынған соң, осы локус бойынша генетикалық варианттардық репродуктивтік қызметпен байланысын зерттеу;

8. «Байсерке-Агро» сүт фермасында сиырларға жыныстық циклін стимулдеудің түрлі нобайларының тиімділігін зерттеу.

Зерттеу материалдары мен әдістері. Доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу динамикасын зерттеу бойынша эксперименттік жұмыстар PU2200 vet және Mindray Z5 vet аспаптарының көмегімен 48 сағат аралықпен аналық бездерді УД сканерлеу әдісімен Алматы облысы Талғар ауданы "Байсерке-Агро" ЖШС асыл тұқымды шаруашылығы жағдайында лактация үшін 8500-9000 кг сүт өнімділігі бар шетелдік селекциялық Гольштейн тұқымының сиырларында жүргізілді.

Овуляция алды кезеңде сиырлардағы қан сарысуы үлгілеріндегі эстрадиол гормонының құрамын анықтау Ресейлік "ИмуноФА Эстрадиол"

компаниясының коммерциялық жиынтығын пайдалана отырып, E1x808 анализаторының (микропланшетті ридер) ИФТ көмегімен ҚазҰАЗУ «Акушерлік, хирургия және көбею биотехнологиясы» кафедрасының зертханасында жүргізілді. Era және GDF9 ген локустары бойынша ДНҚ үлгілерін генотиптеу ҚазҰАЗУ Қазақстан-Жапон инновациялық орталығының «Жасыл биотехнология және торшалық инженерия» зертханасында жүргізілді.

Сиырларды эстрогендік рецептор Era, GDF9 SNP A625T/DRAI гендерінің локустары бойынша генотиптеу үшін материал ретінде жануарлардың мұздатылған қаны пайдаланылды. Қанды сиырлардың күре тамырынан, кейде құйрықтасты венасынан көлемі 2,0 мл болатын, ішінде ЭДТА бар вакуумдық пробиркаларға алдық.

Қанның үлгілері мұздатқышта сақталды, қан үлгілерінен ДНҚ бөлу «Акушерлік, хирургия және көбею биотехнологиясы» кафедрасының зертханасында фенолдық әдіспен, сондай-ақ Ресейлік "ДНҚ СОРБ-В" коммерциялық жиынтығының көмегімен жүргізілді. Оқшауланған ДНҚ сапасы көлденең электрофорез әдісімен анықталды, ДНҚ үлгілерінің концентрациясы NanoDrop™ 2000 микроспектрофотометриялық талдауыш құралының көмегімен өлшенді, үлгілердегі нуклеин қышқылдарының мөлшері, ДНҚ тазарту дәрежесі анықталды.

Era, GDF9 гендері локустары бойынша 120 бас голштин сиырларының ДНҚ үлгілерін генотиптеу үшін түзу және кері праймерлер қолданылды, олардың реттілігі әдеби көздерден алынды. Алайда, қателерді болдырмау үшін Era, GDF9 гендерінің реттілігі талданды, праймерлерді оңтайлы қыздыру температурасы анықталды. Era, GDF9 гендерінің қажетті фрагментін амплификациятау Германияның Эппендорф компаниясы мен SimpliAmp шығарған амплификатор құралдарының көмегімен жүзеге асырылды. Полимеразды тізбекті реакцияның нәтижелерін визуалдау және ДНҚ үлгілерінің генетикалық нұсқаларын анықтау үшін көлденең электрофорез әдісі және гель құжаттау жүйесі пайдаланылды.

Зерттелетін ген локустары бойынша генетикалық варианттарын анықтау өнімді ПТР рестриктеу әдісімен жүзеге асырылды.

Жұмысты жүргізу үшін келесі реактивтер 10x Taq Buffer KCL, dNTP (25 mM) қоспасы, Taq DNA Polymerase (recombinant) 5U/μl, 25 mM MgCl₂, горизонталдық электрофорез үшін 1XТАЕ буфер пайдаланылды, агарозаны, бромды этидий, гелге қосу үшін бояу, ДНҚ маркері қолданылды.

Жануарлардың генотипіне байланысты репродуктивтік қызметтің әртүрлі параметрлері бар сиырлардың репродуктивті қызметіне талдау жасалды, Era, GDF9 гендік аллельдерінің сиырлардың репродуктивтік қабілетіне ассоциативті ықпалы анықталды. Доминантты фолликулдардың диаметріне байланысты сиырларда эстралдық циклді синхрондаудың оңтайлы нобайлары құрылды, синхрондау жүргізілген күні диаметрі 5-8 мм болатын доминантты фолликулдар табылған сиырларда ұрықтану көрсеткіштері жоғары болды.

Сиырларда туғаннан кейінгі кезеңдегі эстралдық циклді синхрондау үшін OvSynch синхрондау нобайы қолданылды және анеструстың ұзақ кезеңі бар сиырларда синхрондау үшін басқа PreSynch-OvSynch синхрондау нобайы

қолданылды. *Era*, *GDF9* гендері локустары бойынша генетикалық варианттардың репродуктивтік қызметке ықпалын бағалау үшін 58-ші күні қолдан ұрықтандырудан кейін сиырлардың «қайтарылмау индексі» критерийі қолданылды.

Қорғауға ұсынылған негізгі қағидалар: -Сүт фермасы жағдайында голштин тұқымды сиырларында УДЗ қондырғысының көмегімен (48 сағат аралықпен) жүргізілген доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу динамикасы мен өсу толқындары жөнінде алынған мәліметтер, өсу толқындарының ұзақтығы, фолликулдардың өсу динамикасы, фолликулдардың диаметрі мен көлемі туралы нәтижелері;

-Молекулярлық-генетикалық әдістерімен ПТР, ПТР-РФҰП тәсілдерімен *Era* эстрогендік рецептор, *GDF9* ген локустары бойынша генотиптеу үшін ДНҚ сапасын анықтау, праймерлер дизайнын жасау, рестрикция жүргізу жұмыстарының нәтижелері;

-«Байсерке Агро» сүт фермасындағы сиырларға жүргізілген *Era* эстрогендік рецептор локусы бойынша генотиптеу жұмыстарының, генетикалық варианттарының таралуы, гендік тепе-теңдік, ген аллельдерінің өсіп-өну қызметімен корреляциялық байланыстар нәтижелері;

-«Байсерке Агро» сүт фермасындағы сиырларға жүргізілген *GDF9* гені локусы бойынша генотиптеу жұмыстарының, генетикалық варианттарының таралуы, гендік тепе теңдік, ген аллельдерінің өсіп өну қызметімен корреляциялық байланыстар нәтижелері;

-Сиырларда *Era*, *GDF9* ген локустары бойынша түрлі генотиптегі сиырлардың репродуктивтік қызметіне жүргізілген талдау нәтижелері, соның ішінде ұрықтану индексі, қолдан ұрықтандырғаннан кейін 58-і тәулікте қайта күйлеп келу индексі нәтижелері;

-доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу толқындарын ескере отырып сиырларда эстралдық циклді синхрондаудың тиімділігі туралы.

Ғылыми нәтижелер, олардың негізділігі мен жаңалығы. Диссертациялық жұмыстың ғылыми жаңалығы сиырлардағы эстралдық цикл кезінде доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу динамикасын зерттеу болып табылады, алғаш рет голштин тұқымды сиырларда фолликулдардың өсу толқындарының саны анықталды (фолликулдардың өсуінің екі және үш толқыны), доминантты фолликулдардың өсу толқынының ұзақтығы зерттелді, фолликулогенез үдерісінде эстрадиол гормонының концентрациясының рөлі анықталды, біреуінің өсуін қамтамасыз ету гипотезасы дәлелденді субдоминантты фолликулдар популяциясы доминантты фолликулды, жыныстық циклдің сары денесінің қантамырлану (васкуляризация) дәрежесін анықтау үшін Доплер ультрадыбыстық сканерлеу әдісі сәтті қолданылды, доминантты фолликулдардың өсуін ескере отырып, сиырлардағы эстралдық циклді синхрондау нобайы оңтайландырылды, *Era*, *GDF9* гендері аллельдерінің сиырлардың репродуктивтік қызметіне ассоциативті ықпалы зерттелді.

Доминантты және субдоминантты фолликулдардың өсу динамикасын зерттеудің нәтижелері сиырлардағы эстралдық циклді синхрондаудың дәлелді

нобайларын жасауға мүмкіндік береді. Сары дененің қантамырлану (васкуляризация) дәрежесін анықтаудың қолданбалы маңызы бар, ол буаздықтың дамуын болжауға мүмкіндік береді, өйткені сары дененің қантамырлануы (васкуляризация) жақсы байқалса, жанама түрде сиырлардағы буаздықты қолдайтын прогестерон гормонының жоғары секрециясын көрсетеді. Диссертацияда E α , GDF9 гендік аллельдерінің сиырлардың репродуктивті қызметіне ықпалы анықталды. Осылайша, гомозиготалы GG генотипі бар сиырдың эстрогендік рецепторлық генінің локусында репродуктивтік қызметтің параметрлері жоғары болды.

Диссертациялық жұмысты орындау барысында зерттеулер жүргізген жануарлар популяциясында аналық безді ультрадыбыстық сканерлеу, сиырларды ДНҚ паспорттау, ПТР, ПТР-ПДРФ талдау әдістері, алынған нәтижелерді өңдеу, Харди-Вайберг формуласы бойынша β 2 мәнін анықтау, гендік тепе-теңдікті зерттеу, E α , GDF9 гендерінің локустары бойынша генетикалық нұсқалардың нақты және теориялық таралуы сияқты заманауи зерттеу әдістері қолданылды. По результатам УЗИ сканирования получены хорошего качества сонограммы, проведен четкий учет результатов УЗИ исследования, определены диаметры, место расположения доминантных и субдоминантных фолликулов, количество волн роста фолликулов, что свидетельствует о достоверности полученных результатов. Для генотипирования образцов ДНК по двум локусам генов были использованы реактивы компании Thermo Fisher Scientific.

Ғылымды дамытудың негізгі бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі. «Мал шаруашылығында торшалық репродуктивтік технологияларды пайдалану негізінде селекциялық үрдістерді қарқындету» тақырыбындағы ҚР БҒМ ғылыми жоба аясында орындалды, мемлекеттік тіркеу № 0115PK00728, (2015-2017 жж), «Ет бағытындағы асыл тұқымды жануарларда жасырын генетикалық кемтарлықтарға мониторинг жүргізу», тақырыбы бойынша ҚР ҒЖЖОМ гранттық қаржыландыру жобасы, ИРН AP15473095, (2022-2024 жж).

Докторанттың әр жарияланымды дайындауға қосқан үлесінің сипаттамасы. Ғылыми зерттеулердің нәтижелері бойынша докторант ғылыми консультанттардың басшылығымен 4 мақала, оның ішінде Ғылым және Жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету Комитетінің журналдарында 3 мақала, Scopus дерекқорына кіретін журналда 1 мақала дайындап, жариялады.

1 мақала «International Journal of Veterinary Science» жорналында, мақала атауы «Results of Ultrasound Studies of the Growth Dynamics of Dominant, Subdominant Follicles and Determination of Estradiol Concentration in the Preovulatory Period in Cows», ISSN 2304-3075, 2305-4360, 2023, Vol.12, No. 5, 36 pp. 680-689, Scopus

3 мақала Қазақстан Республикасы Ғылым және Жоғары білім министрлігі Ғылым және Жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету Комитеті ұсынған басылымдарда;

Ахмет Байтұрсын атындағы Қостанай университетінің «3i: intellect, idea, innovation - интеллект, идея, инновация» жорналында 2023. – № 2. - С. 147-154.

Жәңгір Хан атындағы Батыс-Қазақстан агро-техникалық университетінің «Ғылым және білім», журналында 2023. - №2-2 (71). – С. 121-129.

Жәңгір Хан атындағы Батыс-Қазақстан агро-техникалық университетінің «Ғылым және білім», журналында, 1-бөлім. 2023. – № 4-1 (73). - С. 182-193.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Диссертация 125 бетте компьютерлік мәтінде және ол келесі бөлімдерден тұрады: кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу әдістері мен материалдары, өзіндік зерттеу нәтижелері, зерттеу нәтижелерін талқылау, қорытынды, өндіріске тәжірибелік ұсыныстар, пайдаланылған әдебиеттер тізімі және қосымшалар. Диссертация материалдары 23 кестемен және 26 суреттермен безендірілген. Әдебиеттер тізіміне 203 дереккөздер кіреді.