

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Тургумбекова Асета Абдымаратовича на тему «Повышение репродуктивной функции коров на основе исследования динамики роста доминантного фолликула и генотипирования по локусу гена $ER\alpha$ », представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D120100 – «Ветеринарная медицина»

Актуальность темы исследования. В мире в последние 15-20 лет наблюдается тенденция снижения репродуктивной функции коров с связи увеличением молочной продуктивности в результате интенсивной селекционной работы по повышению удоя. Известно, что коэффициент наследуемости фенотипического признака воспроизводительной функции коров низкий и составляет всего 0,02. Таким образом, исследование особенностей роста фолликулов, изучение механизма наступления овуляции, разработка оптимальных схем синхронизации эстрального цикла у молочных коров и их теоретическое обоснование имеет большое практическое значение. Анализ отечественной литературы свидетельствует, что Казахстанскими учеными исследования особенностей роста доминантных и субдоминантных фолликулов у коров не проводились, хотя зарубежными учеными доказаны, что в течение эстрального цикла у коров наблюдается две или три волны роста доминантных фолликулов. Современные методы диагностики, такие как УЗИ сканирование яичников и применение Доплер УЗИ позволяет определить динамику роста фолликулов, изучить скорость роста фолликулов, определение размера доминантных и субдоминантных фолликулов, определить степень васкуляризации желтого тела. В развитых странах для прогнозирования репродуктивной функции используется геномная селекция, которая позволяет определить животных с желательным генотипом, позволяет увеличить выход телят на 100 коров. Однако, в нашей стране в настоящее время внедрение технологии геномной селекции ограничено из-за сложности сбора фенотипических данных, слабой инфраструктуры, отсутствие референсной популяции. Поэтому, изучение ДНК маркеров репродуктивной функции у крупного рогатого скота является актуальной проблемой ветеринарной науки. Существуют множественные SNP полиморфизмы, аллели которых оказывают ассоциативное влияние на воспроизводительную функцию коров. Большинство зарубежных ученых в качестве ДНК маркеров воспроизводительной функции используют, SNP полиморфизмы по локусам следующих генов – эстрогенного рецептора ($ER\alpha$) и фактора роста дифференциации ($GDF9$). Технология генотипирования племенных животных позволяет идентифицировать особей с желательным генотипом, которые имеют преимущество по сравнению с другими генетическими вариантами. Следует отметить, что часто на практике синхронизация и стимуляция эстрального цикла у коров проводится фронтально, без учета стадии полового цикла, без учета динамики роста доминантных и субдоминантных фолликулов. Разработка оптимальных схем

синхронизации эстрального цикла у коров с учетом динамики роста доминантных фолликулов представляет практическое значение для молочных ферм.

Цель диссертационной работы – изучение динамики роста доминантных и субдоминантных фолликулов у коров в течение эстрального цикла, определение количества волн роста фолликулов, изучение изменения концентрации гормона эстрадиола и ассоциативного влияния аллелей генов *ER α* , *GDF9* на репродуктивную функцию коров.

Задачи исследований:

-исследование динамики роста доминантных и субдоминантных фолликулов у коров голштинской породы методом УЗИ сканирования яичников с интервалом 48 часов в условиях молочной фермы ТОО «Байсерке-Агро» в течение одного эстрального цикла;

-определение количества гормона эстрадиола у коров исследуемой группы в преовуляционный период и у рандомно выбранных коров методом ИФА анализа;

-у исследуемой группы коров выделение ДНК, определение качества изолированной ДНК методом горизонтального электрофореза и путем измерения концентрации ДНК с помощью прибора нанодроп;

-создание экспериментальной группы животных в количестве 120 голов племенного хозяйства ТОО «Байсерке-Агро» и сбор биологического материала, выделение ДНК, проведение генотипирования коров по локусу гена *Era* методом ПЦР-ПДРФ анализа;

-получение результатов генотипирования коров по локусу гена эстрогенного рецептора *Era*, определение генетических вариантов и изучение влияния аллелей данного гена на репродуктивную функцию;

-взятие образцов крови у экспериментальных групп молочной фермы ТОО «Байсерке-Агро», выделение ДНК из образцов крови, генотипирование коров по локусу гена *GDF9* SNP A625T/DRAI полиморфизма методом ПЦР-ПДРФ анализа;

-получение результатов генотипирования коров по локусу гена *GDF9*, определение генетических вариантов и изучение влияния аллелей данного гена на репродуктивную функцию коров;

-изучение эффективности различных схем синхронизации эстрального цикла у коров молочной фермы ТОО Байсерке-Агро.

Материалы и методы исследований.

Экспериментальные работы по изучению динамики роста доминантных и субдоминантных фолликул проводились на коровах голштинской породы зарубежной селекции с молочной продуктивностью 8500-9000 кг за лактацию в условиях племенного хозяйства ТОО «Байсерке-Агро» Талгарского района Алматинской области методом УЗИ сканирования яичников с интервалом 48 часов с помощью приборов PU2200 Vet и Mindray Z5 Vet. Определение содержания гормона эстрадиола в образцах сыворотки крови у коров в преовуляторный период проводилось в лаборатории кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии

воспроизводства» КазНАИУ с помощью ИФА анализатора ELx808 (микропланшетный ридер) с использованием коммерческого набора Российской компании «ИммуноФА Эстрадиол». Генотипирование образцов ДНК по локусам генов *Era*, *GDF9* проводилось в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ.

Для генотипирования коров по локусам генов эстрогенного рецептора *Era*, *GDF9* SNP A625T/DRAI в качестве материала использовали замороженную кровь животных. Кровь взяли из яремной, иногда из хвостовой вены в вакуумные пробирки с ЭДТА объемом 2,0 мл. Образцы крови хранили в морозильнике, выделение ДНК из образцов крови проводилось в лаборатории кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства» фенольным методом, также с помощью коммерческого набора «ДНК сорб-В», Российского производства. Качество изолированной ДНК определяли методом горизонтального электрофореза, концентрацию образцов ДНК измеряли с помощью прибора микроспектрофотометрического анализатора NanoDrop™ 2000, были определены количество нуклеиновых кислот в образцах, степень очистки ДНК. Для генотипирования образцов ДНК коров голштинской породы в количестве 120 голов по локусам генов *Era*, *GDF9* были использованы прямые и обратные праймеры, последовательности которых взяли из литературных источников. Однако, для исключения ошибок были проанализированы последовательности генов *Era*, *GDF9*, определены оптимальные температуры отжига праймеров. Амплификация нужного фрагмента генов *Era*, *GDF9* проводилась с помощью амплификаторов производства Германской компании Эппендорф и SimpliAmp. Для визуализации результатов полимеразной цепной реакции и для идентификации генетических вариантов образцов ДНК были использованы метод горизонтального электрофореза и гель документирующая система. Детекция генетических вариантов по изучаемым локусам генов осуществлялась методом рестрикции ПЦР продукта. Были использованы реактивы: 10x Taq Buffer KCL, смесь dNTP (25 мМ), Taq DNA Polymerase (recombinant) 5U/μl, 25 мМ MgCl₂, для горизонтального электрофореза использовали 1ХТАЕ буфер, агарозу, бромистый этидий, краска для нанесения в гель, ДНК маркеры. Проведен анализ репродуктивной функции коров с разными параметрами воспроизводительной функции в зависимости с генотипом животных, установлены ассоциативные влияния аллелей генов *Era*, *GDF9* на воспроизводительную способность коров. Разработаны оптимальные схемы синхронизации эстрального цикла у коров в зависимости от диаметра доминантных фолликулов, наиболее высокие результаты искусственного осеменения были у коров, у которых были обнаружены в день проведения синхронизации доминантные фолликулы с диаметром 5-8 мм. Для синхронизации эстрального цикла в послеродовой период была использована схема синхронизации OvSynch и для синхронизации у коров с длительным периодом анэструса была

использована другая схема синхронизации - PreSynch-OvSynch. Для оценки влияния генетических вариантов по локусам генов *Era*, *GDF9* на репродуктивную функцию был использован критерий-индекс невозврата коров после искусственного осеменения на 58-й день.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты УЗИ сканирования яичников коров голштинской породы в условиях молочной фермы с интервалом 48 часов, о динамике роста доминантных и субдоминантных фолликулов, скорость роста доминантных фолликулов, о количестве волны роста фолликулов, о длительности фазы роста доминантных фолликулов, диаметр и объемы доминантных фолликулов;

-о результатах генотипирования коров по локусам генов эстрогенного рецептора *Era*, *GDF9* с помощью молекулярно-генетических методов ПЦР, ПЦР-ПДРФ анализа, о качестве изолированной ДНК, дизайн праймеров, условия проведения рестрикции;

-распространенность генетических вариантов по локусу гена эстрогенного рецептора *Era* у коров молочной фермы ТОО «Байсерке Агро», нарушение генного равновесия, влияния аллелей изучаемого гена на воспроизводительную функцию коров;

-распространенность генетических вариантов по локусу гена *GDF9* у коров молочной фермы ТОО «Байсерке Агро», нарушение генного равновесия, влияния аллелей изучаемого гена на воспроизводительную функцию коров;

-о результатах анализа влияния различных генетических вариантов по локусам генов *Era*, *GDF9* на репродуктивную функцию коров, индекс осеменения коров, индекс невозврата коров после искусственного осеменения на 58-й день;

-об эффективности синхронизации эстрального цикла у коров с учетом динамики роста доминантных и субдоминантных фолликулов у коров.

Научные результаты, их обоснованность и новизна.

Научной новизной диссертационной работы является исследование динамики роста доминантных и субдоминантных фолликулов в течение эстрального цикла у коров, впервые у коров голштинской породы определено количество волн роста фолликулов, (две и три волны роста фолликулов), изучена длительность волны роста доминантных фолликулов, определена роль концентрации гормона эстрадиола в процессе фолликулогенеза, доказана гипотеза обеспечения роста одного доминантного фолликула популяцией субдоминантных фолликулов, успешно использован метод доплер УЗИ сканирования для определения степени васкуляризации желтого тела полового цикла, оптимизирована схема синхронизации эстрального цикла у коров с учетом роста доминантных фолликулов, изучено ассоциативное влияние аллелей генов *Era*, *GDF9* на репродуктивную функцию коров.

Полученные результаты исследования динамики роста доминантных и субдоминантных фолликулов позволяют разработать научно-обоснованные

схемы синхронизации эстрального цикла у коров. Определение степени васкуляризации желтого тела имеет прикладное значение, позволяет прогнозировать развитие беременности, так как хорошо выраженная васкуляризация желтого тела косвенно свидетельствует о высокой секреции гормона прогестерона, который поддерживает беременность у коров. В диссертационной работе определены влияния аллелей генов *Era*, *GDF9* на репродуктивную функцию коров. Таким образом, по локусу гена эстрогенного рецептора коровы с гомозиготным генотипом GG имели более высокие параметры репродуктивной функции. В ходе выполнения диссертационной работы были использованы такие современные методы исследования, как УЗИ сканирование яичников, ДНК паспортизация коров, методами ПЦР, ПЦР-ПДРФ анализа, обработка полученных результатов, определение значения χ^2 по формуле Харди-Вайберга, изучение генного равновесия, фактического и теоретического распределения генетических вариантов по локусам генов *Era*, *GDF9* у исследуемой популяции животных.

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.

Соответствие основным направлениям развития науки или государственным программам.

Диссертационная работа выполнена в рамках научных проектов МОН РК «Интенсификация селекционного процесса в животноводстве на основе использования клеточных репродуктивных технологии», регистрационный номер № 0115РК00728, сроки реализации 2015-2017 гг, научного проекта МНиВО РК «Мониторинг племенных животных мясного направления продуктивности на носительство скрытых генетических аномалии», ИРН АР15473095, сроки реализации 2022-2024 гг.

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации. Докторантом по результатам научных исследований были подготовлены и опубликованы под руководством научных консультантов 4 статьи, в том числе 3 статьи в журналах Комитета по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования, 1 статья в журнале, входящий в базу данных Scopus.

1 статья в журнале «International Journal of Veterinary Science», название статьи «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 статьи в изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан:

в журнале - «3i: intellect, idea, innovation - интеллект, идея, инновация». – Костанайского университета имени Ахмета Байтұрсынова, 2023. – № 2. - С. 147-154.

в журнале «Ғылым және білім», Западно-Казахстанского агротехнического университета имени Жангир Хана, 2023. - №2-2 (71). – С. 121-129.

в журнале «Ғылым және білім», Западно-Казахстанского агротехнического университета имени Жангир Хана, 1-бөлім. 2023. – № 4-1 (73). - С. 182-193.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 125 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 23 таблицами, 26 рисунками. Список литературы включает 203 источника.