

# ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Колінчука Руслана Васильовича**

**«ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА VOLA-DRV3 У ЗВ'ЯЗКУ ЗІ СХИЛЬНІСТЮ І СТІЙКІСТЮ ДО НЕКРОБАКТЕРІОЗУ В ПОПУЛЯЦІЯХ КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ»**, представлену на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15. – генетика.

Прикладну біологію можна віднести до однієї з галузей високих технологій, що швидко розвиваються. Крім високого економічного потенціалу, вона має потужний вплив на якість життя населення через нові лікарські препарати, нові медичні біонанотехнології, нові харчові продукти та засоби захисту навколишнього середовища. Важлива роль сучасної біології, зокрема генетики та біотехнології, у забезпеченні національної безпеки (вакцини, діагностикуми, лікувальні препарати й т. ін.), реалізації продовольчого самозабезпечення, збереження біологічного різноманіття.

**Актуальність теми.** При сучасному рівні розвитку науки у сільському господарстві та, зокрема, тваринництві, основним пріоритетом повинно стати не лікування, а профілактика генетичних та інфекційних хвороб різної етіології. Одним з найперспективніших напрямків профілактики можна вважати селекцію тварин на стійкість до факторів захворювання.

До одного з актуальних захворювань у тваринництві можна віднести некробактеріоз великої рогатої худоби (ВРХ). Дане захворювання реєструється найчастіше як асоційована інфекція, що проявляється на фоні зниженої резистентності організму за імунодефіциту В-клітинної ланки імунітету через

негативний вплив на організм тварин екзо - та ендогенних стресових факторів.

На сьогодні рівень ураженості ВРХ збудником некробактеріозу у тваринницьких господарствах різних областей України коливається у межах від 1 до 35,2%. Економічні збитки від захворювання ґрунтуються на зниженні молочної продуктивності корів (на 14-50%), недоодержанні телят від корів, які перехворіли та на витратах від проведення лікувальних та профілактичних заходів.

Останнім часом науковці інтенсивно ведуть пошуки імуногенетичних маркерів стійкості до різних захворювань. У цьому плані дуже великий інтерес викликає ген BoLA-DRB3 головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби. Це зумовлено тим, що продукт гену BoLA-DRB3 безпосередньо бере участь у зв'язуванні чужорідних антигенів, тим самим зумовлюючи імунну відповідь.

У зв'язку з цим актуальність дисертаційної роботи Колінчука Р.В. «Поліморфізм гена BOLA-DRB3 у зв'язку зі схильністю і стійкістю до некробактеріозу в популяціях корів української чорно-рябої молочної породи» не викликає сумніву, оскільки спрямована на вивчення поліморфізму гену BoLA-DRB3 та встановлення взаємозв'язків між окремими алелями та схильністю і стійкістю до некробактеріозу у корів, що в свою чергу відкриває широкі можливості при розробці селекційних заходів з формування стійких до даного захворювання тварин.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано згідно плану науково-дослідних робіт кафедри мікробіології, фармакології та гігієни тварин Подільського аграрно-технічного університету за завданням: «Вивчення зв'язку між BoLA-системою і захворюваннями у вітчизняних порід ВРХ» (номер державної реєстрації 01115u005805) та «Етіологічні, патогенетичні та імуногенетичні аспекти захворюваності ВРХ на некробактеріоз»(номер державної реєстрації 01115u005804).

Частину експериментальної роботи було виконано на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, с. Чубинське Київської області та лабораторії порівняльної генетики тварин Федерального державного бюджетного закладу науки Інституту генетики ім. М.І. Вавилова Російської академії наук, м. Москва.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій.** Наукові положення, висновки і рекомендації, що висвітлені у дисертації, є обґрунтованими і повністю підтверджуються отриманими результатами експериментальних досліджень. Автором проаналізовано вітчизняні і світові наукові літературні джерела за темою дисертаційної роботи, визначено методику та виконано експериментальні дослідження.

Висновки наукових досліджень і рекомендації виробництву впливають з одержаних результатів експериментальних даних, достовірність яких обґрунтовано результатами статистичних методів аналізу.

Результати дисертаційної роботи неодноразово доповідались автором на конференціях, наукових семінарах та звітах. За результатами досліджень автором опубліковано 10 наукових праць, із них 7 статей у фахових виданнях, 3 тез наукових доповідей, 1 патент на корисну модель.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Автором вперше проведено молекулярно-генетичний аналіз за поліморфізмом гена BoLA-DRB3 в популяціях української чорно-рябої молочної породи, що розводяться в племінних господарствах Хмельницької області.

Встановлено специфічні алелі за геном BoLA-DRB3, асоційовані зі схильністю та резистентністю до некробактеріозу корів.

Отримано нові експериментальні дані щодо змін у генетичній структурі популяцій української чорно-рябої молочної породи за геном BoLA-DRB3 у зв'язку із збільшенням частки кровності за голштинською породою.

**Структура та обсяг дисертаційної роботи.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів експериментальних досліджень та їх узагальнення, висновків, списку використаних джерел літератури.

Дисертаційну роботу викладено на на 185 сторінках комп'ютерного тексту з додатками. Робота вміщує 39 таблиць та 17 рисунків. Список використаних літературних джерел налічує 224 робіт, з яких 118 іноземних авторів.

**Розділ 1. «Огляд літератури»** викладено на 26 сторінках тексту, він складається з 2 основних глав. В огляді літератури висвітлені питання історії відкриття та вивчення головного комплексу гістосумісності людини та тварин. Розглянуто структуру головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби, а також сучасні дані з вивчення структури, функції та поліморфізму гену BoLA-DRB3. Особливу увагу приділено питанням дослідження ДНК-маркерів на основі алельних варіантів гену BoLA-DRB3 та їх тісній асоціації з різними захворюваннями у ВРХ.

Досліджено проблематику захворюваності ВРХ на некробактеріоз та розглянуто сучасний стан щодо некробактеріозу в господарствах світу та України. Обговорено причини виникнення та розвитку даного захворювання, а також методи дослідження та профілактики.

На основі здійсненого аналізу обґрунтовано актуальність і перспективність проведення досліджень зі встановлення асоціацій між алелями гену BoLA-DRB3 та схильністю або резистентністю до некробактеріозу.

**Розділ 2. Матеріали і методи досліджень.** Експериментальні дослідження, виконані за темою дисертаційної роботи, було проведено за період з 2012 по 2017 роки на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (с. Чубинське Київської області) та у співпраці з д.б.н., професором Г.Ю. Сулімовою у Федеральному державному бюджетному закладі науки Інституті генетики ім. Вавилова Російської академії наук (м. Москва).

Генетико-популяційні дослідження проводили на 293 зразках венозної крові від корів української чорно-рябої молочної породи.

Даний розділ дуже ретельно та детально описаний, зокрема, методики виділення ДНК, проведення ПЛР, рестрикційного аналізу та електрофорезу, а також дослідження поліморфізму гена BoLA-DRB3. Описані методи виявлення некробактеріозу у корів.

Статистична обробка даних проводилась у стандартному пакеті «Microsoft Excel 2013» з використанням власних програм та інтегрованих надбудов: GenAlEx 6.503 для розрахунків статистик Райта та StatistiXL 2.0 для кластерного аналізу з побудовою дендрограм. Перевірка на нормальність розподілу частот алелів виконувалась за критеріями Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова в стандартному пакеті IBM SPSS Statistics V24.0.

**Розділ 3. «Результати досліджень та їх обговорення»** містить 6 основних підрозділів, його викладено на 703 сторінках тексту та він нараховує 29 таблиць і 12 рисунків.

В підрозділі 3.1 «Формування груп здорових та хворих на некробактеріоз корів української чорно-рябої молочної породи» описано результати роботи з формування груп-аналогів корів української чорно-рябої молочної породи із здорових та хворих (з підтвердженням бактеріологічним діагнозом) тварин. Дослідження проведено в трьох господарствах Хмельницької області: ТОВ «Козацька долина 2006» Дунаєвецького району, ТОВ НВА «Перлина Поділля» та філія «Рідний край» МХП «Зернопродукт» Білогірського району. Детально вивчено структуру раціону годівлі корів упродовж року та розроблені рекомендації щодо необхідності нормалізації раціону лактуючих корів до фізіологічних потреб для вирівнювання продуктивності та забезпечення процесів життєдіяльності тварин. Також було вивчено динаміку некробактеріозної патології в досліджуваних групах тварин.

При формуванні дослідних груп для виявлення ДНК-маркерів BoLA-системи, що асоціюються з резистентністю і захворюваністю на некробактеріоз, автором

було враховано такі особливості, як генотипічне різноманіття породи, відсутність продуманої селекції в господарствах, фактори зовнішнього ризику розвитку некробактеріозу. Групи було сформовано на основі постійного моніторингу корів на захворюваність некробактеріозом.

Отримані результати дозволи дисертанту зробити висновок про те, що захворюваність на некробактеріоз в племінних господарствах Хмельницької області складала від 5,8 до 15,1% від загальної кількості дійного стада. В етіології некробактеріозу ведуче місце належить *Fusobacterium necrophorum*, який виділявся у 90,6% проб дослідженого матеріалу. Крім того, *F. necrophorum* виділявся завжди у асоціаціях з іншими бактеріями: золотистим стафілококом, клостридіями, стрептококами, ешерихіями та іншими умовно-патогенними мікроорганізмами.

Підрозділ 3.2 «Характеристика поліморфізму гена BoLA-DRB3 в популяціях корів української чорно-рябої молочної породи» присвячено аналізу алельного різноманіття гену BoLA-DRB3 корів в досліджуваних групах тварин.

В ході проведених досліджень автором було показано, що популяція корів української чорно-рябої молочної породи, що утримувалися в ТОВ «Козацька долина 2006» характеризується наявністю 31 алеля гена BoLA-DRB3 з середньою частотою 3,23% та 6 алелями з частотою понад 5%. Найчастіше виявлявся алель \*24 з частотою 18,03%. У досліджених тварин було виявлено 75 генотипів з середньою частотою 1,63%, три з яких були найбільш поширеними - \*02/\*28, \*22/\*22, \*16/\*24. В популяції корів української чорно-рябої молочної породи, що утримувалися в ТОВ НВА «Перлина Поділля», було виявлено 25 алелів гена BoLA-DRB3 з середньою частотою 4%, 8 алелів виявлялися з частотою понад 5%. Найбільш поширеним був алель \*22 (12,2%). У вибірці визначено 65 генотипів з середньою частотою 1,26%. Що стосується третьої популяції корів, що утримувалися в філії «Рідний край» ПрАТ «Зернопродукт», то тут було виявлено 28 алелів гена BoLA-DRB3. З частотою понад 5% виявлялися 8 алелів, які сумарно займають 63,4% алелофонду. Найбільш поширеним виявився алель

BoLA-DRB3 \*22. У досліджених тварин виявлено 67 генотипів з середньою частотою 1,33%.

Підрозділ 3.3 «Алельний поліморфізм у здорових і хворих на некробактеріоз тварин» присвячено вивченню розподілу частот алелів гена BoLA-DRB3 асоційованих з резистентністю та захворюваністю на некробактеріоз, встановленню значимого асоціативного зв'язку, а також виявленню ДНК-маркерів, які можуть використовуватись в селекційній роботі для створення стад стійких до некробактеріозу.

В ході проведених досліджень було встановлено генотипи, які найчастіше проявлялися в групах хворих та здорових тварин. У корів ТОВ «Козацька долина 2006» було виявлено 31 алель BoLA-DRB3 та 34 генотипи в групі хворих на некробактеріоз тварин. Що стосується групи здорових тварин, то виявлено 28 алелів та 46 генотипів. В групі хворих корів ТОВ НВА «Перлина Поділля» було визначено 22 алеля гена BoLA-DRB3 та 32 генотипи, у здорових – 21 алель та 41 генотип. В філії «Рідний край» у тварин хворих на некробактеріоз визначено 22 алеля та 28 генотипів, у здорових – 28 алелів та 44 генотипи.

У підрозділі 3.4. «Популяційно-генетична структура української чорно-рябої молочної породи за геном BoLA-DRB3» автором представлено результати досліджень щодо визначення особливостей генетичної структури за геном BoLA-DRB3 трьох популяцій української чорно-рябої молочної породи. В даному підрозділі розглянуто F-статистику Райта, ефективне число алелів ( $N_e$ ), індекс Шенона-Вінера ( $H'$ ) та генетичні відстані ( $D$ ) за  $N_e$ . Також було здійснено порівняльну оцінку особливостей генетичної структури за геном BoLA-DRB3 з рядом інших автохтонних порід ВРХ.

Автором показано, що досліджені популяції української чорно-рябої молочної породи характеризуються високим рівнем генетичного різноманіття.

Підрозділ 3.5 «Виявлення алелів гена BoLA-DRB3 асоційованих із схильністю та стійкістю до некробактеріозу» присвячено встановленню значимих асоціацій в системі «алель – захворювання». При встановленні алелів, які мають достовірний зв'язок із захворюванням на некробактеріоз чи стійкістю до

захворювання, автором було враховано такі фактори, як інформативність, мультиплікативність, достовірність по критерію відповідності та перевірка на достовірність малих виборок. В ході проведених досліджень було виявлено ДНК-маркери схильності та стійкості корів української чорно-рябої молочної породи до некробактеріозу.

Останній підрозділ 3.6 «Особливості алельного поліморфізму популяцій української чорно-рябої молочної породи за геном VoLA-DRB3 при збільшені частки кровності за голштинською породою» присвячено вивченню впливу процесу голштинізації на особливості генетичної структури популяції української чорно-рябої молочної породи ТОВ «Козацька долина» за геном VoLA-DRB3.

Отримані автором результати підтверджують збільшення в популяції за період з 2010 по 2017 рр. сумарної кількості голштинських алелів на 7,29%, зростання генетичної спорідненості зі стадами чистокровних голштинів, що в свою чергу призвело до зростання молочної продуктивності та захворюваності на некробактеріоз.

В процесі ознайомлення з роботою виникли деякі **зауваження та побажання**.

1. В тексті зустрічаються не досить вдалі або перевантажені вирази, котрі потребують редакторської правки, зокрема на сторінках 23 «...Генетична структура локусу була вивчена методом...», 27 «...Результати вивчення поліморфізму VoLA-DRB3 мають не тільки теоретичне, а й прикладне значення...», 140 «...Ефективність молочної галузі характеризується, передусім, рівнем продуктивності корів,...» та ряді інших;
2. У ряді випадків бажано навести посилання на літературні джерела, зокрема на сторінках 19 «...У 1936 році Gorer провів класичні досліді, які показали існування локусу тканинної сумісності у миші...», 20 «...Найважливішим етапом в розвитку вчення про ГКГ стала розробка нових методів дослідження, таких як ...», 56 «...Метод ПДРФ (RFLP - restriction fragment length polymorphism) – це спосіб дослідження геномної

ДНК шляхом обробки ДНК рестриктазами з наступним електрофоретичним розподілом ...»;

3. У підрозділі 2.2 розділу «Матеріали і методи досліджень» наведено інформацію щодо особливостей формування української чорно-рябої молочної породи, якій місце у розділі «Огляд літератури»;
4. В деяких підрозділах другого розділу не наведено інформацію щодо моделей, назв фірм виробників та країн походження окремих приладів та реагентів;
5. У підрозділі 2.3.3.1. «Виділення ДНК» наводиться детальний опис методики виділення ДНК. Чи доцільно це робити, якщо автор використовував комерційний набір без жодних власних модифікацій?;
6. Викликає здивування спосіб, в який автор визначав концентрацію ДНК - візуальний. Застосування методу спектрофотометрії дозволяє не тільки більш точно оцінити концентрацію ДНК, а також з'ясувати її чистоту. Недоочищені препарати ДНК можуть серйозно зашкодити подальшому проведенню ПЛР реакції;
7. На мою думку, краще використовувати термін «гібридизація праймерів», замість «відпалювання». Відпалювання є калькою з російської – «отжиг», або ще термін з металургії. В той час як «гібридизація» суто біологічний термін;
8. Частину інформації, що наведено у підрозділах 2.3.3.5. «Техніка проведення електрофорезу» та 2.5.3. «Визначення біорізноманіття» краще перенести до розділу «Результати експериментальних досліджень та їх обговорення»;
9. На сторінці 93 відсутній номер та назва таблиці. Назви критеріїв, за якими перевірялися отримані результати, бажано наводити однаково, або українською або англійською мовами;
10. Загальні висновки дисертаційної роботи № 3-5 є інформативно перевантаженими. Не впевнений, що доцільно перераховувати усі виявлені алелі з частотами та рівнями значущості;
11. Структура висновку № 9 важка для сприйняття.

В цілому, оцінюючи дисертаційну роботу **Колінчука Руслана Васильовича**, хочеться відмітити її комплексність, насиченість та направленість. Дисертацію характеризує високий рівень проведених досліджень. В ході виконання роботи встановлено низку нових наукових положень. Вона є самостійною і завершеною науковою працею і за змістом відповідає спеціальності 03.00.15. – генетика.

Вважаю, що дисертаційна робота **Колінчука Р.В.** відповідає рівню дисертаційних робіт згідно пункту 11 «Порядку присудження...», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15. – генетика.

Старший науковий співробітник  
Науково-виробничої лабораторії  
молекулярно-генетичних досліджень  
Центру 172 ДП „Укрметртестстандарт”,  
к.б.н., с.н.с.

\_\_\_\_\_ Р.В. Облап

Підпис Р.В. Облапа завіряю:  
Заступник начальника відділу  
управління персоналом  
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»

\_\_\_\_\_ Н.І. Солошенко