

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу РИК Тетяни Миколаївни на тему **«Особливості генетичної структури свиней різних порід»**, представлену разовій спеціалізованій вченій раді 002 в Інституті розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія, галузь знань 09 – біологія

Актуальність теми. Генетичні дослідження свиней на основі ДНК-маркерів набули широкого поширення як у всьому світі, так і в Україні. Серед численних напрямів виділився один із актуальних та важливих пов'язаний із використанням свиней в якості моделей і лабораторних тварин в медико-біологічних дослідженнях. В даний час домашня свиня (*Sus scrofa domestica*) вважається найкращим донором біологічного матеріалу для ксенотрансплантації. Її анатомо-фізіологічні параметри схожі з людськими. Розведення свиней добре розвинене та економічно ефективне, а велика різноманітність порід дозволяє підібрати розмір вилучених органів до реципієнта. В Україні не існує жодної породи свиней, яка б використовувалася для біомедичних цілей. Проте склалася сприятлива ситуація для створення такої породи чи виведення спеціалізованої лінії через попит фармакологічних концернів на модельні біологічні об'єкти для дослідження механізмів дії сучасних медичних препаратів, відпрацювання методик проведення безкровних хірургічних операцій тощо.

Виведення спеціалізованої лінії свиней для медико-біологічних потреб не є простим, оскільки пред'являє ряд вимог до відбору тварин. Свині повинні бути максимально гомозиготними за якомога більшою кількістю генів, володіти високою резистентністю, бути стресостійкими й адаптованими до умов утримання та годівлі в межах віварію. Досягнення генної інженерії дозволили модифікувати геном тварин-донорів таким чином, щоб не розпізнавати їхні органи імунною системою людини-реципієнта та гальмувати процеси, що призводять до відторгнення ксенотрансплантата.

З огляду на це, дисертаційна робота, присвячена визначенню імуногенетичних і молекулярних особливостей свиней різних порід для

потенційної придатності їх використання у біомедичних дослідженнях є актуальною і своєчасною.

Мета і завдання досліджень. Для розкриття теми наукових досліджень чітко сформульовано мету, визначено завдання, якими передбачалося дослідити генотипову структуру окремих мікропопуляцій свиней вітчизняної і зарубіжної селекції за локусом ріанодинового рецептора RYR1; розробити, оптимізувати та відпрацювати методику ідентифікації ендогенних ретровірусів PERV A/C свиней в мультиплексній ПЛР-SSP системі PERV-C – α -Actin (LAPC) для оцінки рівня біологічної безпеки потенційного донорського матеріалу; створити тест-систему для визначення типів ендогенних ретровірусів PERV A/C у геномах свиней в технології мультиплекс; дослідити розповсюдження ендогенних ретровірусів PERV підтипів C і A у геномах свиней різних порід української і зарубіжної селекції та провести імуногенетичне дослідження за еритроцитарними системами антигенів (факторів груп крові) у контексті визначення певних генотипів, подібних до груп крові людини.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що дисертанткою вперше розроблено алгоритм системи лабораторного оцінювання придатності свиней окремих порід для потреб біомедицини, який складається із визначення стійкості тварин до стресових чинників (тестування за системою ріанодинового рецептора RYR1), наявності у їх геномі елементів ретровірусів, насамперед PERV, оцінки імунологічного статусу з визначенням тварин бажаного генотипу і виявлення особин з високим ступенем гомозиготності за цільовими генотипами для мінімізації фенотипової гетерогенності.

Вперше проведено оптимізацію техніки генотипування свиней у мультиплексній ПЛР-SSR-системі PERV-C- α -Actin (LAPC), суть якої заключається у визначенні оптимальних режимів ампліфікації, зокрема зменшення концентрації праймерів, коригування температурного режиму, визначення оптимуму компонентного складу реакційної суміші і удосконалення режиму детекції продуктів ПЛР. Встановлено, що для системи PERV-C- α -Actin гранично допустима концентрація ДНК для ПЛР складає 15,2 пг/мкл, а

мінімально необхідна кількість копій ПЛР-продукту для візуалізації методом електрофорезу у 2% агарозному гелі – 5×10^3 копій.

Практичне значення роботи. Розроблена та відпрацьована методика ідентифікації ендогенного ретровірусу свиней підтипу C, що дає можливість оцінити рівень біологічної безпеки потенційного донорського матеріалу для біомедичного використання.

За результатами молекулярно-генетичного аналізу встановлено, що за маркерами RYR1 та PERV-C свині спеціалізованих м'ясних порід, за виключенням полтавської м'ясної породи, є найпридатнішими для розведення з метою використання у біомедичних цілях. Встановлено, що за параметрами імуногенетичного статусу – наявністю генотипів A-/- та Ebdgkmp/ bdgkmp, які відповідають системі груп крові АВО людини, відсутністю алеля стресочутливості та PERV-C ретровірусу – свині української м'ясної та миргородської порід можуть слугувати потенційними фундаторами спеціалізованої вітчизняної лабораторної лінії свиней для медичних потреб. Натомість свині породи п'єстен та будь-якого поєднання з цією породою не придатні для використання у біомедичних цілях через гомозиготність генотипу за геном стресочутливості.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, є достатнім, що демонструється сукупністю експериментального матеріалу, обґрунтованим теоретичним обговоренням власних і літературних даних.

Мета, актуальність, наукова новизна і доцільність проведення досліджень та практичне значення одержаних результатів обґрунтовані у вступній частині дисертаційної роботи. Якість досліджень, викладених у дисертації, підтверджується ретельно розробленою методикою, сучасними методами, застосованими для отримання експериментальних даних, репрезентативністю вибірок.

Структура роботи побудована відповідно до чинних вимог і складається із анотацій українською та англійською мовами, списку опублікованих праць за темою дисертації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, чотирьох

основних розділів: огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу і обговорення отриманих результатів, висновків, пропозицій виробництву, списку посилань та додатків. Матеріали дисертації викладено на 137 сторінках комп'ютерного тексту. Робота проілюстрована 12 таблицями і 16 рисунками. Перелік цитованої літератури містить 188 найменування.

В «Огляді літератури» у чотирьох підрозділах авторкою розглянуто досвід і перспективи використання свині свійської (*Sus scrofa domestica*) у біомедичних експериментах, стрес-синдром у свиней як наслідок мутації в ріанодин-рецепторному гені RYR1, ендегенні ретровіруси у свиней, імунологічні бар'єри у використанні свиней для біомедичних цілей та імунологічні маркери у комплексі гістосумісності.

У розділі «Матеріали і методи досліджень» наведено роки та місце проведення досліджень, породи та кількість свиней, використані у дослідженні, коротка характеристика порід свиней, що увійшли у дослідження та загальна схема досліджень. Описано відбір зразків крові для генетичних досліджень, ретельно розглянуті методики досліджень та статистична обробка результатів.

У розділі «Результати власних досліджень» досліджено генотипову структуру мікропопуляцій свиней вітчизняних порід за локусами ріанодинового рецептору RYR1. Для ідентифікації ендегенних ретровірусів свиней PERV-C та PERV-A створено та оптимізовано діагностичну системи для визначення носіїв ендегенного ретровірусу PERV-C, проведено визначення чутливості та специфічності системи PERV-C- α -Actin, створено діагностичну систему для визначення носіїв ендегенного ретровірусу PERV-A. За допомогою створених діагностичних систем дисертанткою досліджено розповсюдження ендегенних ретровірусів PERV підтипів A і C у геномах свиней українських порід. Визначено ендегенні ретровіруси PERV A/C у геномах свиней українських порід та їх зв'язок з рівнем осалюваності туш. Досліджена імуногенетична структура свиней двох вітчизняних порід за еритроцитарними антигенами.

У розділі «Аналіз і обговорення отриманих результатів досліджень» авторка обґрунтовує отримані результати і аналізує розроблений алгоритм

системи лабораторного оцінювання придатності свиней певних порід для потреб біомедицини, який складається із таких складових: визначення стійкості свиней до стресових чинників (тестування за системою ріанодинового рецептора – RYR-1); визначення наявності в їх геномі елементів ретровірусів, насамперед PERV; оцінки імунологічного статусу з визначенням тварин бажаного генотипу та пошук особин з високим ступенем гомозиготності за цільовими генотипами для мінімізації фенотипової гетерогенності в медичних експериментах.

«Висновки» відповідають меті і завданням, змісту виконаних досліджень та містяться у 6 пунктах, також запропоновано пропозиції використовувати для біомедичних цілей вільних від ретровірусу PERV-C та PERV-A свиней порід: миргородської, української степової рябої та ландрас.

Повнота викладу в опублікованих працях. За темою дисертаційного дослідження опубліковано 14 наукових праць у наукових збірниках, матеріалах і тезах конференцій. З них 5 статей – у фахових виданнях України, 1 стаття – у зарубіжному науковому виданні, 8 – у збірниках матеріалів вітчизняних та зарубіжних конференцій.

Загалом позитивно оцінюючи дисертаційну роботу РИК Т. М., слід вказати і на окремі недоліки, висловити **зауваження та побажання**:

Огляд літератури

- У підрозділі 1.5 бажано розкрити особливості будови ГКГ свині (SLA). Не зазначено як зараз вирішується проблема гістосумісності тканин людини та свині при ксенотрансплантації, також, не має посилання на авторів.

Матеріали та методи досліджень

- Не зрозуміло чому імуногенетичні дослідження проведено лише на двох породах (миргородська та українська м'ясна).

- Характеристику порід свиней, що увійшли у дослідження логічно перенести у розділ 1 «Огляд літератури».

- Рис.2.2. Немає потреби показувати у роботі стандартне обладнання, яке використовується у рутинних молекулярно-генетичних дослідженнях.

- Ст. 57. Чи потрібно використовувати комплемент при постановці реакції аглютинації для визначення груп крові свиней? Якщо потрібно, то чий?

- Ст. 58. В підрозділі «Статистична обробка результатів» зазначено, що «Окремі популяційно-генетичні характеристики обчислені за допомогою Excel 2007 з наступною побудовою дендрограм». В результатах досліджень дендрограми не приведено.

Результати власних досліджень

- Рис. 3.1– 3.3 показано електрофореграми розділення продуктів рестрикції локусу RYR1 у 3%-у агарозному гелі. У другому розділі авторкою описано постановку алель-специфічної реакції. Тому, підписи рисунків не зрозумілі.

- Рис. 3.5, 3.7 – 3.10 Інформаційність рисунків недостатня, оскільки не вказано розмірність маркерів та їх виробники.

Аналіз та узагальнення результатів досліджень

- При аналізі отриманих дисертанткою результатів більшу увагу бажано приділити можливості використанню порід свиней української селекції для біомедичних цілей ніж для ксенотрансплантації, тому що на відторгнення трансплантата, в першу чергу, впливають антигени гістосумісності, а не еритроцитарні антигени.

Висновки

- Перший висновок має не зовсім коректне висловлювання щодо «імунологічного статусу» свиней, тому що стресостійкість та еритроцитарні антигени не є визначальними.

Список посилань

- Чи доречно зараз використовувати посилання на російські та російськомовні наукові джерела (№ 42, 80, 82, 92, 113, 143, 150, 159, 160, 161, 163, 165, 172). Також, джерела № 92 та № 94 є ідентичними.

Вказані зауваження і побажання є дискусійними і не зменшують наукової цінності роботи, її актуальності та практичної значимості.

Загальний висновок. Враховуючи актуальність теми, обсяг досліджень, наукову новизну, кваліфікаційний рівень, аналіз одержаних результатів, оформлення, апробацію, зміст висновків і пропозицій виробництву, вважаю, що дисертаційна робота на тему «Особливості генетичної структури свиней різних порід», відповідає чинним в Україні вимогам до дисертацій доктора філософії, а

її автор РИК Тетяна Миколаївна заслуговує присвоєння наукового ступеня докторки філософії за спеціальністю 091 – біологія, галузь знань 09 – біологія.

Офіційний опонент,
доктор сільськогосподарських наук,
професор, завідувач кафедри гігієни
тварин та ветеринарного забезпечення
кінологічної служби Національної
поліції України Закладу вищої освіти
«Подільський державний університет»



Тетяна СУПРОВИЧ

Учений секретар ЗВО ПДУ,
к. с.-г. н., доцент.

Олена КОБЕРНЮК