

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Долматовой И.Ю.
на диссертационную работу Макаровой Натальи Владимировны
на тему «**Молекулярно-генетическая оценка коров татарстанского типа по
резистентности к маститу**», представленную в диссертационный совет
Д 220.034.02 на базе ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» на соискание учёной степени
кандидата биологических наук по специальности
06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

Актуальность темы диссертационной работы

Актуальность темы исследования Макаровой Н.В. определяется тем внедрение в практическое животноводство генотипирования животных на уровне ДНК является актуальной задачей фундаментальной и прикладной биотехнологии, поскольку делает возможным дополнительно к традиционным методам отбора животных вовлекать в селекцию ценные с хозяйственной точки зрения варианты генов, связанные не только с продуктивными признаками, но и с устойчивостью к некоторым болезням.

Мастит является одним из самых распространенных заболеваний молочного скота, и относится к категории полиэтиологичных и убыточных, т.к. происходит преждевременная выбраковка заболевших высокопродуктивных коров, в связи с чем сельхозпроизводители недополучают молоко.

Гены гормонов, и, в частности, пептидных гормонов пролактина и соматотропина в первую очередь рассматриваются в качестве генов-кандидатов, обуславливающих уровень молочной продуктивности коров, поскольку необходимы для регуляции постнатального роста, углеводного, липидного, азотного и минерального обмена. Биологическое действие пролактина связано с репродуктивной функцией т.к. он стимулирует развитие молочных желёз и молокообразование в период лактации. Соматотропин также играет важную роль в регуляции метаболизма и влияет на рост и дифференциацию тканевых клеток и гомеостаз жировых отложений. Лактоферрин обладает широким спектром противомикробного и противовирусного действия за счёт стимуляции роста лимфоцитов.

Имеется достаточно много работ, посвященных изучению взаимосвязи полиморфизма генов *bPRL*, *bGH* и *bLTF* с молочной продуктивностью коров и качественным составом их молока, однако степень влияния названных полиморфных генов на предрасположенность к маститу изучена недостаточно.

Гены белков молока в настоящее время также считаются перспективными генами – кандидатами, в первую очередь обуславливающими технологические свойства молока, а по некоторым данным, и уровень молочной продуктивности. Однако информация о наличии наследственной обусловленности устойчивости коров к маститу в зависимости от их генотипов по β - и κ - казеинам, а также β -лактоглобулину в доступной литературе практически отсутствует.

Работа Макаровой Н.В. посвящена исследованию полиморфизма названных генов в связи с устойчивостью коров татарстанского типа к маститу и с этой точки зрения является достаточно актуальной.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Макаровой Н.В.. написана с соблюдением традиционной структуры и состоит из введения, обзора литературы и основного содержания работы, включающего разделы, в которых описаны материалы, методы и условия проведения работы, а также результаты собственных исследований, заключения с выводами и практическими предложениями и списка цитированной литературы. Материал диссертации изложен на 129 страницах компьютерного текста, содержит 17 таблиц и 18 рисунков. Список использованной литературы включает 276 наименований, в том числе 113 - на иностранных языках.

Во введении чётко определены цели и задачи исследования, проведён анализ степени разработанности темы, что позволяет логично сформулировать актуальность проблемы, её новизну, теоретическую и практическую значимость.

Обзор литературы изложен на 36 страницах и состоит из 3 разделов. В первом разделе описаны хозяйственно-биологические особенности относительно новой породной группы молочного скота - татарстанского типа, который удачно сочетает в себе генофонд трех лучших молочных пород (холмогорской, чёрно-пестрой и голштинской) и охарактеризована его генеалогическая структура.

В следующем разделе рассматриваются пататипические и генетические факторы этиологии мастита, описывается классификация маститов, изложены некоторые факты о физико-химических показателях молока при маститах, а также анализируются проблемы молочного скотоводства, возникающие в связи с данным заболеванием.

Третий, наиболее объемный раздел, изложенный на 23 страницах, посвящён подробному анализу научных исследований о роли молекулярно-генетических маркеров в селекции крупного рогатого скота.

Оценивая обзор литературы, считаю необходимым отметить то, что он завершается кратким резюме, позволившим аргументировано сформулировать актуальность исследования, направленную на поиск молекулярно-генетических механизмов устойчивости к маститу, а в перспективе – на возможность разработки селекционных методов, обеспечивающих наследственную устойчивость к этому заболеванию.

Материал и методы исследований описаны в третьем разделе «Основное содержание работы» (стр. 44-60). В данном разделе приводятся сведения об объёме выполненных работ, объектах и методах исследования, которые соответствуют поставленным задачам. Эксперименты выполнены на достаточно большом материале с использованием зоотехнических, генетических, биохимических и статистических методов, хорошо апробированных практикой. Генотипический состав молочных белков изучен у 92 коров татарстанского типа. Полиморфизм генов *bPRL*, *bGH* и *bLTF* изучен у 25 коров (в том числе 12 здоровых и 13 – больных). Раздел подробно проиллюстрирован электрофорограммами и денситограммами молочных белков, а также результатами ПЦР-ПДРФ анализа генов гормонов и лактоферрина.

При ознакомлении с данным разделом в отношении содержания и стиля изложения не возникло никаких замечаний.

Результаты собственных исследований (раздел 2.2) излагаются автором на 31 страницах. Раздел построен логично, исходя из целей и задач, и состоит из шести подразделов. В подразделе 2.2.1 изложены материалы по диагностике мастита у коров на основании клинических признаков и по количеству соматических клеток в молоке.

Анализу фракционного состава белков молока у здоровых и больных клинической формой мастита коров посвящен раздел 2.2.2. Автором показано, что при мастите в молоке снижается содержание общего белка (до 40 %), казеина (до 65 %), и повышается концентрация сывороточных белков (до 60 %). При этом наибольшим изменениям подвергаются главные белки молока: α_1 -, β -, κ -, α_2 -казеины, иммуноглобулин, β -лактоглобулин, α -лактальбумин, в результате чего молоко из казеиновой группы переходит в аномальную альбуминовую группу с соотношением казеинов и белков сыворотки 45:55 % при норме 79:21 %. Этот показатель автор предлагает в качестве основного критерия оценки состояния вымени и качества молочной продукции при мастите.

В разделе 2.2.3 описывается генетическая структура по молочным белкам групп здоровых и больных маститом коров. Выявлено, что у коров татарстанского типа полиморфизм белков молока достаточно хорошо выражен и находится на уровне полиморфизма у других пород молочного скота: холмогорского, черно-пестрого и голштинского. Установлено, что резистентность коров к маститу в достаточно сильной степени зависит от их генотипа по белкам молока. Эта связь хорошо выражена с генотипами β - и κ -казеинов, в меньшей степени с β -лактоглобулином. Показано, что к маститу более устойчивы коровы – гетерозиготы с генотипом AB β - и κ -казеинов и менее устойчивы – гомозиготы AA .

На этом основании автор приходит к выводу, что существующий уровень полиморфизма позволяет решать важнейшие вопросы селекции и разведения, в т.ч. по созданию наследственной устойчивости к маститу.

В следующем разделе (2.2.4) автором показано, что генотипы коров по локусам β -*Cn*, κ -*Cn* и β -*Lg* оказывают существенное влияние на белковый состав молока при заболевании маститом. При этом у маститных коров с генотипами BB и AB в молоке отмечены меньшие количественные изменения белковых фракций по сравнению с генотипом AA .

Характеристике генетической структуры по локусам *bPRL*, *bGH* и *bLTF* здоровых и больных маститом коров, а также анализу белкового состава молока маститных коров в зависимости от их генотипов по названным генам посвящены два завершающих раздела (2.2.5 и 2.2.6) результатов собственных исследований.

На основании проведенного анализа показано, что различия по частоте встречаемости генотипов по генам *bPRL*, *bGH* и *bLTF* между больными и здоровыми коровами выявлены только для локуса пролактина, а именно: частота гомозиготного генотипа PRL^{AA} в группе здоровых коров была в 1,8 раза выше

(83,3 %), чем у больных коров (46,2 %), а частота гетерозигот PRL^{AB} соответственно снизилась в 5,5 раз, т.е. с 46,2 до 8,3%.

Автором также показано, что генотипы по локусам $bLTF$, $bPRL$ и bGH оказывают большое влияние на стабильность молочных белков при мастите. При этом влияние генотипов локусов $bLTF$ и bGH оказалось аналогичным влиянию локусов $\beta\text{-Cn}$, $\kappa\text{-Cn}$ и $\beta\text{-Lg}$, т.е. преимуществом по стабильности молочных белков при мастите обладали гетерозиготы. А по локусу $bPRL$, напротив, наибольшая стабильность белковых фракций в молоке хорошо выражена у гомозигот PRL^{AA} и PRL^{BB} , чем у гетерозигот PRL^{AB} .

В разделе «**Заключение**» Наталья Владимировна кратко суммирует полученные результаты и формулирует 8 выводов, которые вытекают из результатов собственных исследований и логично отвечают на поставленные автором задачи.

Все разделы диссертации построены вдумчиво и каждый последующий тематически логично связывается с предыдущим. Стиль изложения всех разделов грамотный, доступный и интересный.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

По результатам проведённых исследований соискателем на защиту выдвинуты 3 положения, основным, практически значимым из которых, с моей точки зрения, является выявление у коров татарстанского типа наследственной устойчивости к маститу, обусловленной влиянием определенных генотипов по локусам $\beta\text{-Cn}$, $\kappa\text{-Cn}$, $\beta\text{-Lg}$, $bLTF$, $bPRL$ и bGH .

Обоснованность результатов проведённых исследований определяется их методологией. Эксперименты выполнены на достаточно большом материале. Генотипический состав молочных белков изучен у 92 коров татарстанского типа племенного завода «Бирюли» Республики Татарстан. Полиморфизм генов $bPRL$, bGH и $bLTF$ изучен у 25 коров. Аналитическая работа проведена на базе ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» с использованием как классических, достаточно хорошо известных методов (электрофоретическое разделение белков и ферментов с последующей микрофотометрией), так и новых (молекулярно-генетический метод ПЦР-ПДРФ). Экспериментальные данные статистически обработаны с использованием компьютерной аналитической программы Microsoft Excel, что обосновывает получение достоверных результатов, а следовательно, и выводов, также как и практических рекомендаций.

Обоснованность и достоверность положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется также полнотой их освещения в научных публикациях и апробацией на конференциях различного уровня. Всего по теме диссертации соискателем опубликовано 6 статей, из которых - 3 статьи в журнале, рекомендованном ВАК, 1 - в журнале, индексированного на платформе «WoS». Результаты исследований апробированы также на двух Международных конференциях.

Рукопись авторефера соответствует содержанию рассматриваемой диссертации и полученным результатам.

Степень новизны, научная и практическая значимость результатов

Впервые проведена молекулярно-генетическая оценка коров татарстанского типа по резистентности к маститу. При этом получены новые данные о качественных и количественных изменениях белкового состава молока при заболевании коров разными формами мастита. Автором показано наличие наследственной устойчивости коров к маститу, обусловленной определенными генотипами по генам β -*Cn*, κ -*Cn*, β -*Lg*, *bLTF*, *bPRL* и *bGH*. Установлено новое свойство белков молока - способность сохранять нативное состояние при заболевании маститом.

Практическая значимость заключается в том, что проведённая автором работа вносит новые знания в область диагностики, профилактики заболевания коров маститом, в связи с чем материалы диссертации могут быть использованы в практической селекции молочного скота в качестве дополнительных критериев оценки и отбора коров по устойчивости к маститу.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

1. Имеется замечание к тому, как освещена степень разработанности темы. В данном разделе не названо ни одной фамилии исследователей, работающих в этом направлении, хотя такие работы проводятся в КГАВМ под руководством проф. Ахметова Т.М. (Рачкова Е.Н.) и проф. Юсуповой Г.Р. (Шамсиева Л.В.). Согласуются ли полученные Вами результаты с результатами этих авторов?

2. Каким методом рассчитывали величину χ^2 в группах здоровых и больных маститом коров (в разделе «Методы исследования» способ расчета не указан)? Если по Харди-Вайнбергу, то использование данного метода рекомендовано для выявления генетического равновесия в панмиктических популяциях. Является ли группа коров численностью 12-13 голов такой популяцией? Или же Вы использовали критерий К.Пирсона, т.е. «критерий расхождения распределений»?

3. В диссертации и в автореферате имеются некоторые противоречивые утверждения. Например, в практических предложениях для повышения эффективности селекции молочного скота на устойчивость к маститу рекомендуется включить в программу селекции оценку генотипа коров по локусам *bLTF*, *bPRL* и *bGH*. Однако в 7-ом выводе указано, что относительно возможная связь с устойчивостью к маститу выявлена лишь в отношении локуса пролактина. С какой целью тогда генотипировать коров по локусам лактоферрина и соматотропина?

4. Какой можете предположить механизм устойчивости коров к маститу в зависимости от их генотипа по молочным белкам молока, а конкретнее – от их гетерогигиотности по β - и κ -казеинов и β -лактоглобулина?

5. Если мастит уже диагностирован по клиническим признакам и количеству соматических клеток в молоке, имеет ли практический интерес электрофоретически анализировать белковый состав молока для уточнения диагноза?

Все высказанные замечания и заданные вопросы носят дискуссионный характер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Макаровой Натальи Владимировны на тему «Молекулярно-генетическая оценка коров татарстанского типа по резистентности к маститу» является законченной научно-квалификационной работой, в которой соискатель изучала белковый состав молока коров татарстанского типа при разных степенях и формах заболевания маститом. Автором также дана оценка наследственной обусловленности устойчивости коров к маститу при определённых генотипах по генам β -Cn, κ -Cn, β -Lg, bPRL, bGH и bLTF.

Оценивая кандидатскую диссертационную работу Н.В. Макаровой в целом, считаю, что она соответствует паспорту специальности 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных и является актуальной, цельной, законченной научной работой, выполненной на достаточно высоком профессиональном уровне.

По своей научной новизне, практической значимости и объему полученных данных диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842 (ред. от 02.08.2016), а ее автор, Макарова Наталья Владимировна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

Официальный оппонент:

Зав. лабораторией молекулярной генетики, профессор кафедры пчеловодства, частной зоотехнии и разведения животных ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», доктор биол. наук, специальность 06.02.07 - разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

Долматова Ирина Юрьевна

Адрес:

450001, г. Уфа,
ул. 50-летия Октября,
тел.(347)228-91-77
Web-сайт: www.bsau.ru
E-mail: bgau@ufanet.ru, dolmat@list.ru

Подпись И.Ю. Долматовой заверяю:

Учёный секретарь ФГБОУ ВО
Башкирский ГАУ, доктор
сельскохозяйственных наук



Султанова Рида Разибовна

02.04.2019 г.