

## УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВО «Ставропольский  
государственный аграрный университет»,  
Академик РАН, доктор сельскохозяйственных  
наук, Заслуженный деятель науки  
и техники



В.И. Трухачев

2019 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» на диссертационную работу Гильманова Хамида Халимовича «Генотипирование крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента», представленную в диссертационный совет Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 06.02.07 – разведение, селекция, генетика сельскохозяйственных животных и 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

### 1. Актуальность темы.

Изучение генотипирования крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, является одним из актуальных направлений в селекционно-племенной работе с высокопродуктивными животными. Влияние генотипов по генам BoLA-DRB3 и iNOS на показатели молочной продуктивности крупного рогатого скота до конца не изучены. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан весьма напряженная. Лейкоз крупного рогатого скота – хроническое инфекционное заболевание вирусной природы, проявляющееся лимфоцитозом и ростом злокачественных лимфоидных клеток; наносит

значительный экономический ущерб отрасли молочного и мясного скотоводства в результате падежа и вынужденного убоя животных, снижения выхода продукции и падения ее качества, а также затрат на проведение противолейкозных мероприятий.

Молекулярно-генетические методы исследования позволяют оценить генетическое многообразие вируса бычьего лейкоза и в системе противолейкозных мероприятий, наряду с ранней диагностикой данного вируса, особое внимание заслуживает маркер-ориентированная селекция на устойчивость к лейкозу крупного рогатого скота. Определение генотипической принадлежности изолятов ВБЛ с применением ПЦР-ПДРФ и проведение филогенетического анализа секвенируемых последовательностей env-гена возбудителя расширяет знания по мониторингу инфицированности стад крупного рогатого скота генотипами ВБЛ Республики Татарстан. Данный опыт необходимо применять и в других регионах России для усовершенствования противолейкозных мероприятий.

Вопросами распространения, диагностики и профилактики лейкоза, а также геноидентификаций ВБЛ в нашей стране и за рубежом занимались многие ученые. Однако, несмотря на достигнутые успехи, данная проблема продолжает оставаться одной из значимых для ветеринарной науки и практики. В этой связи, несомненно, является актуальным изучение генотипирования крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента – вируса бычьего лейкоза.

## **2. Новизна исследований и полученных результатов.**

В диссертационной работе Гильманова Х.Х. представлены убедительные данные по оценке аллельного полиморфизма генов iNOS и BoLA-DRB3 и генетической чувствительности животных к лейкозу крупного рогатого скота.

Соискателем разработан способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям А и В полиморфного маркера АН13-1 анализируемого гена, оптимизирована ПЦР-амплификация локуса экзона 2 гена BoLA-DRB3 *Bos taurus* до уровня пригодного для последующего секвенирования (SBT).

Диссертантом впервые изучена ассоциативная связь генотипов полиморфного маркера АН13-1 гена iNOS и групп генотипов BoLA-DRB3 быков производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков и впервые установлена генотипическая принадлежность изолятов ВБЛ у крупного рогатого скота Республики Татарстан на основе усовершенствованной ПЦР-ПДРФ генотипирования вируса бычьего лейкоза, которая согласуется с современной филогенетической классификацией изучаемого возбудителя.

### **3. Степень обоснованности и достоверности научных положений,**

#### **выводов и заключений.**

Научные положения, выводы и практические предложения сформулированы корректно и подтверждены достаточным количеством фактического материала.

Исследования были проведены на базе межкафедральной лаборатории иммунологии и биотехнологии ФГБУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», в ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан, НПК «Синтол» (г. Москва), а также сельскохозяйственных предприятий районов Республики Татарстан. Материалом по оценке аллельного полиморфизма генов iNOS и BoLA-DRB3 служили 68 быков-производителей молочного и мясного направления продуктивности, принадлежащих ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан. При проведении эпизоотологического мониторинга обрабатывались статистические материалы ветеринарной отчетности, а также результаты лабораторной диагностики лейкоза крупного рогатого скота

реакцией иммунодиффузии (РИФ) и гематологией. Молекулярно-генетическим исследованиям было подвергнуто 179 образцов крови РИД-положительных коров из сельхозпредприятий 21 района Республики Татарстан Российской Федерации.

Диссертантом четко сформулирована цель исследований и правильно определены 9 задач, дающих представление об объеме выполненных исследований. Материалы исследований опубликованы в рецензируемых источниках и апробированы на специализированных научных конференциях. В этой связи, достоверность научных положений, выводов и заключений, основанных на полученных результатах исследований и опубликованных в открытой научной печати, не вызывает никакого сомнения.

#### **4. Значимость для науки и производства полученных соискателем результатов.**

Результаты исследований соискателя Гильманова Х.Х. имеют несомненное научно-теоретическое и практическое значение. Полученные данные маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота на устойчивость к лейкозу и геноидентификации вируса бычьего лейкоза расширяют и пополняют теоретическую базу.

Практическая ценность работы состоит в том, что предложенные научно-методические подходы к генотипированию крупного рогатого скота по генам *iNOS* и *BoLA-DRB3* и геноидентификации ВБЛ будут внедрены в систему скрининговых исследований поголовья по ДНК-маркерам генетической резистентности и восприимчивости к лейкозу, а также в систему молекулярного мониторинга инфицированности стад генотипами ВБЛ.

Результаты изучения ассоциативной связи генотипов полиморфного маркера AN13-1 гена *iNOS* и групп генотипов *BoLA-DRB3* быков производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков предлагается учитывать в селекционно-

племенной работе при воспроизводстве молочного стада с генетической устойчивостью к лейкозу крупного рогатого скота.

### **5. Оценка содержания и оформления диссертации.**

Диссертационная работа Х.Х. Гильманова построена по классическому образцу и включает в себя следующие главы: введение (8 стр.); обзор литературы (21 стр.); материалы и методы исследований (9 стр.); результаты собственных исследований (50 стр.); заключение (14 стр.), которое содержит 9 выводов; практические предложения; список сокращений и условных обозначений. Список литературы включает 196 источников, в том числе 123 зарубежных. Диссертация изложена на 163 страницах компьютерного текста (включая приложения – 30 стр.).

Работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК, иллюстрирована 29 таблицами и 18 рисунками, отражающими основное содержание работы. Текст диссертации написан грамотно, аккуратно, читается и воспринимается легко.

Во *«Введении»* автор Х.Х. Гильманов обосновывает актуальность проведенного им исследования, степень разработанности темы, четко формулирует цель и задачи исследований, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследований, основные положения, выносимые на защиту, а также информацию о степени достоверности и апробации работы, публикациях результатов исследования, объеме и структуре диссертации. Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы кратко и четко, они находят свое отражение в тексте и выводах диссертационной работы.

Глава 1 *«Обзор литературы»* состоит из 10 разделов. В них приводятся и анализируются современные данные о главном комплексе гистосовестимости, включая систему BoLA ген BoLA-DRB3. Рассматривается ассоциация гена BoLA-DRB3 с устойчивостью и чувствительностью к лейкозу крупного рогатого скота, а также с признаками

молочной продуктивности крупного рогатого скота. Представлены данные о генах цитокиновой сети и индуцибельной синтазы оксида азота, лейкозе крупного рогатого скота и вирусе бычьего лейкоза, методах диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Следует отметить, что соискатель не просто констатирует источники литературы, а приводит информационно-аналитический обзор, что свидетельствует о высокой профессиональной подготовке диссертанта и глубоком научном обосновании предусмотренной цели и поставленных задач для ее достижения. Проведенный обзор литературы полностью отражает состояние изученности вопроса.

Глава 2 **«Основное содержание работы»** включает 2 раздела и 9 подразделов.

В первом разделе **«Материалы и методы исследований»** указаны учреждения и сельскохозяйственные предприятия (межкафедральная лаборатория иммунологии и биотехнологии ФГБУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», в ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан, НПК «Синтол» (г. Москва), а также сельскохозяйственных предприятий районов Республики Татарстан), где диссертантом проводились научные исследования, объекты, объемы и методы исследований, позволившие реализовать цель и поставленные задачи, и получить новые ценные научные данные, имеющие большое практическое значение.

Второй раздел **«Результаты собственных исследований»** содержит 9 подразделов.

Первый подраздел **«Оценка аллельного полиморфизма гена *iNOS* у исследуемой выборки животных на основе разрабатываемого способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям А и В полиморфного маркера AN13-1 анализируемого гена»** содержит данные, полученные из анализа выравнивания и *HinfI*-рестрикционного картирования амплифицируемых с помощью праймеров *iNOS* и *iNOS-R* частичных нуклеотидных последовательностей аллельных вариантов А и В

полиморфного маркера AN13-1 гена *iNOS Bos Taurus* с моделированием генерируемых ПЦР и *HinfI*-ПДРФ-профилей *HinfI* соответствующих генотипов. Автор отмечает, что наблюдаемое распределение частот генотипов полиморфного маркера AN13-1 гена *iNOS* в исследуемой выборке соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Второй подраздел «Изучение ассоциативной связи генотипов полиморфного маркера AN13-1 гена *iNOS* быков производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков» содержит данные по аллельному полиморфизму гена *iNOS* выборки быков производителей ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан. Х.Х. Гильманов провел глубокую оценку быков производителей с использованием индексов племенной оценки быков в которые входили показатели ближайших женских предков. Им было установлено, что наибольший РИБ по показателям молочной продуктивности и качества молока оказался в группе быков с генотипом ВВ.

В третьем подразделе «Оптимизация условий проведения ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена *BoLA-DRB3 Bos taurus*, пригодной для дальнейшей процедуры типирования методом секвенирования (SBT)» соискатель Х.Х. Гильманов отмечает, что ПЦР Encyclo GC буфером является наиболее оптимальным вариантом для накопления специфического продукта амплификации изучаемой мишени в сравнении с двумя другими буферами из набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit». Одним из достоинств работы является наличие качественных рисунков электрофореграмм результатов проведенной ПЦР-амплификации.

Четвертый подраздел «Полиморфизм гена *BoLA-DRB3* и генетически й статус выборки быков-производителей по отношению к лейкозу крупного рогатого скота» содержит ценную для науки и практики информацию полиморфных нуклеотидных позиций аллелей *BoLA-DRB3, Bos Taurus* флактурируемой с праймерами DRB3FRW и DRB3REV области. Автором

установлено, что на основании исследуемых частот встречаемости аллелей и генотипов анализируемого гена выяснено распределение групп аллелей (Ч>Н>У) и ассоциированных групп генотипов (Ч/Ч>Ч/Н>У/Ч>Н/Н>У/Н>У/У), а также распределение выборки животных согласно их генетическому статусу по отношению к лейкозу.

Пятый подраздел «Изучение ассоциативной связи групп генотипов *BoLA-DRB3* быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков» содержит анализ родительского индекса быка (РИД) и показывает степень возможной передачи потомству признаков молочной продуктивности. Х.Х. Гильманов указывает, что наибольшим удоем, содержанием молочного жира и выходом молочного жира характеризовались быки ассоциированной группы генотипов П/П, что может быть использовано в селекционно-племенной работе.

Шестой подраздел «Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан» содержит значимые сведения 2.2.6.1 «Сводная информация по серологическим и гематологическим исследованиям крупного рогатого скота на лейкоз за 2013-2017 гг.» и 2.2.6.2 «Степень инфицированности поголовья крупного рогатого скота вирусом бычьего лейкоза в Республике Татарстан за 2013-2017 гг.», которые свидетельствуют о том, что эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан остается напряженной. Автор оформил сводную информацию в виде таблиц. Данные представленные отделом инфекционных болезней животных и организации противоэпизоотических мероприятий Главного управления ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан свидетельствуют об усугублении ситуации.

В седьмом подразделе «Генотипическая принадлежность изолятов вируса бычьего лейкоза, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан» диссертантом представлены данные по



выявлению генотипов ВБЛ из 179 проидентифицированных изолятов. Х.Х. Гильманов также представляет внутри- и межгенотипическую гетерогенность референсных представителей ВБЛ по env-гену. В Республике Татарстан в популяциях крупного рогатого скота циркулирует 4p-re из 10-ти известных генотипов ВБЛ (1-го, 4-го, 7-го и 8-го генотипов).

Восьмой подраздел *«Типизация изолятов ВБЛ с расшифрованными нуклеотидными последовательностям локуса env-гена в зависимости от выбранной стратегии геноидентификации возбудителя»* содержит информацию о сравнительном анализе 505 нуклеотидных последовательностях фрагмента env-гена ВБЛ, в т.ч. депонированных в GenBank NCBI. Диссертант обращает внимание на несогласованность ряда использованных ранее стратегий ПЦР-ПДРФ-типизации ВБЛ с современной филогенетической классификацией возбудителя. Приведенные данные расширяют знания о генетическом многообразии генотипов изучаемого вируса.

В девятом подразделе *«Совершенствование стратегии ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласуемой с филогенетической классификацией возбудителя»* Х.Х. Гильманов представляет усовершенствованную стратегию ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласованную с филогенетической классификацией изучаемого вирусного патогена. Данный подраздел содержит таблицу и рисунки (электрофореграммы), подтверждающие достоверность полученных результатов исследований. Развернутая информация о проведенных исследованиях представлена и в Приложении.

Следует отметить, что все подразделы содержат значительное количество таблиц и рисунков, являющихся фактическим подтверждением полученных результатов исследования и облегчающих восприятие текста.

В главе *«Заключение»* Гильманов Х.Х. на основании результатов собственных исследований подводит итог своей научно-квалификационной работы. Диссертантом приводится тщательный анализ полученных научных данных и их сопоставление с результатами аналогичных исследований,

представленных в отечественной и зарубежной литературе. При этом диссертант Х.Х. Гильманов проявил достаточную компетентность в обсуждаемых вопросах, и дал убедительное обоснование выводам. В главе перечислены 9 аргументированных выводов, вытекающих из результатов собственных исследований, полученных в ходе достижения поставленной цели и решения задач. Представленные практические предложения актуальны и отражают основные положения диссертационной работы.

#### **6. Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати.**

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в которых отражены основные положения и выводы по теме диссертации, в том числе 4 публикации в изданиях, включенных в «Перечень Российских ведущих рецензируемых научных журналов и изданий...», утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени, и 1 публикация в рецензируемом научном издании, входящего в международную реферативную базу данных и систему цитирования (Web of Science / Scopus).

#### **7. Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.**

Автореферат изложен на 1,39 печатных листах и полностью соответствует содержанию диссертации. Выводы и практические предложения в обоих документах идентичны.

#### **8. Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.**

Соискателем Х.Х. Гильмановым лично организовано и проведено диссертационное исследование, самостоятельно проведен анализ состояния данного вопроса в отечественной и зарубежной литературе, сформулирована

цель и определены задачи научного исследования, обоснован выбор материала и методов исследования, проведен анализ полученных научных данных, сформулированы основные положения и выводы. Диссертационная работа написана и оформлена лично автором, опубликованные результаты являются подтверждением его существенного личного вклада в решение поставленной научной задачи в области генотипирования крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификации его этиологического агента.

#### **9. Конкретные рекомендации по использованию результатов диссертационной работы.**

Рекомендации, предложенные диссертантом, имеют теоретическое и практическое значение. Внедрение предложенных научно-методических подходов в генотипировании крупного рогатого скота, геноидентификация вируса бычьего лейкоза позволит улучшить селекционно-племенную работу при воспроизводстве стад крупного рогатого скота.

Материалы исследований Гильманова Х.Х. могут быть использованы при проведении научных исследований, а также при составлении учебных и справочных пособий для биологов и ветеринарных специалистов.

#### **10. Замечания, вопросы и пожелания по диссертации.**

В ходе рассмотрения диссертационной работы Гильманова Х.Х. принципиальных возражений и замечаний не возникало. Вместе с тем, хотелось бы отметить некоторые замечания, пожелания и вопросы:

1. В разделе «Материалы и методы исследований» с. 34 желательно было бы указать время обработки образца амплифицированного продукта 5 ед. эндонуклеазы рестрикции *Hinf*I в 1хбуфере «О» (ООО «СибЭзим») при 37 °С.
2. Чем обусловлено оптимальное накопление специфического продукта амплификации изучаемой мишени при применении Encyclo GC буфера.

3. Чем обусловлена циркуляция 1-го, 4-го, 7-го и 8-го генотипов ВБЛ на территории Республики Татарстан.

4. В разделе 2.2.5 изучена ассоциативная связь групп генотипов BoLA-DRB3 быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков, насколько это может быть применимо в селекционно-племенной работе при воспроизводстве молочного стада с генетической устойчивостью к лейкозу крупного рогатого скота.

5. По ходу текста работы встречаются отдельные редакционные погрешности.

В целом диссертационная работа написана хорошим литературным языком. Указанные замечания и вопросы не снижают научной и практической ценности рецензируемой диссертационной работы, носят главным образом дискуссионный характер и не влияют на ее общую положительную оценку.

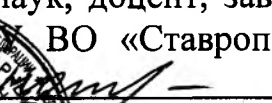
### **11. Заключение.**


Диссертация Х.Х. Гильманова на тему «Генотипирование крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента», является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой решена важная задача по генотипированию крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификации его этиологического агента, что является существенным вкладом в науку и практику. По актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, достоверности и значению для теории и практики полученных результатов, диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Гильманов

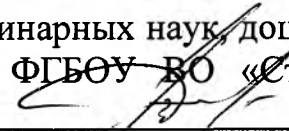
Хамид Халимович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 06.02.07 – разведение, селекция, генетика сельскохозяйственных животных и 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксинологией и иммунология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры эпизоотологии и микробиологии (Протокол № 11 от 12 марта 2019 года) и на заседании ученого совета факультетов ветеринарной медицины и технологического менеджмента ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» (Протокол № 7 от 14 марта 2019 года).

Отзыв составили:

доктор ветеринарных наук, доцент, заведующая кафедрой эпизоотологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»  Ожередова Надежда Аркадьевна

доктор сельскохозяйственных наук, профессор, профессор кафедры частной зоотехнии, селекции и разведения животных ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»  Коноплев Виктор Иванович

кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры физиологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»  Скрипкин Валентин Сергеевич

Адрес организации: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.  
ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»  
тел.: +7(8652)3522382, 352283; +7(8652)717815; inf@stgau.ru