ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Зиннатовой Ф.Ф. на диссертационную работу Макаровой Н.В. 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 ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.07. – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

Актуальность темы диссертационной работы

Известно, что молочное скотоводство является ведущей отраслью животноводства. Поэтому борьба со многими заболеваниями крупного рогатого скота, которые наносят колоссальный вред здоровью животного, при этом в значительной мере снижая уровень их надоев, является актуальным вопросом в современном молочном скотоводстве. Значительный экономический ущерб наносил и наносит мастит коров, являясь одним из самых распространенных заболеваний в молочном животноводстве в России и в мире. Согласно статистическим данным Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, заболеваемость коров маститом в год в среднем составляет 20-30%, при этом в Северо-Западном регионе его уровень достигает 50%. В связи с данным заболеванием потери в хозяйствах могут достигать до 18% и более по молоку, и до 30-40%, а иногда и до 50% по выбраковки коров из дойного стада.

При этом наибольший ущерб приносит молочному скотоводству субклиническое проявление мастита уровень, которого в некоторых хозяйствах достигает 60-80%, при этом его клиническая форма встречается в 1,5-2 раза реже.

Субклинический мастит в большинстве своем протекает в скрытой форме. Поэтому очень важным является качественное и своевременное ветеринарное обслуживание животных с целью профилактики возникновения мастита. Для этого необходимо включить в график ветеринарных мероприятий хозяйств периодические индикативные лабораторные исследования молока.

Известно, что субклинический мастит характеризуется нарушением функции молочной железы, а также многочисленными изменениями биохимического состава молока, в том числе и наблюдается увеличение числа соматических клеток в молоке.

Однако опыт всех стран мира с развитым молочным скотоводством показывает, что ввиду полиэтиологичности возникновения мастита одними традиционными методами нельзя обойтись в борьбе с данным заболеванием. В связи с чем исследования многих ученых направлены на поиски генетических факторов устойчивости коров к заболеванию маститом.

На сегодняшний день установлены некоторое количество генов, которые могут стать генетическими маркерами в поиске особей устойчивых к заболеванию маститом.

Работа Макаровой Н.В. посвящена исследованию белкового состава молока, молочной сыворотки при разных степенях и формах заболевания коров маститом, молекулярно-генетической оценке опытного поголовья коров татарстанского типа по 6 локусам, в том числе 4 по белковому локусу – β-, к-казеин, β-лактоглобулин, лактоферрин (LTF), а также по 2 гена кодирующих синтез гормонов пролактин (PRL) и соматотропин (GH).

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

В результате проведенных Макаровой Н.В. исследований по теме диссертации на защиту выдвинуты 3 положения, основанные на проведенных научно-хозяйственных опытах в течении 2013-2017 гг. в условиях ЗАО «Бирюли» на 92 коровах татарстанского типа. Аналитические исследования молока проводились на кафедре биологии, генетики и разведения животных в ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана». Молекулярно-генетическое тестирование ДНК крови опытных коров по 3-ем генетическим маркерам – LTF, PRL, GH проводили в ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория» с использованием метода ПЦР-ПДРФ анализа. В результате проведенных комплексных исследований Макаровой Н.В. был определен фракционный состав белков молока и молочной сыворотки у здоровых и больных субклиническим и клиническим маститом коров. При этом диссертантом приведены результаты анализа фракционного состава белков молока и молочной сыворотки у коров, которые получили лечение. Соискателем представлен материал по частоте встречаемости полиморфных вариантов белковых локусов (β-, к-казеин, β-лактоглобулин, лактоферрин), а также генов кодирующих синтез гормонов пролактин и соматотропин как у здоровых, так и у больных маститом коров. Далее Макаровой Н.В. установлен фракционный состав белков молока и молочной сыворотки у здоровых и больных субклинической и клинической формой мастита коров в разрезе полиморфизма изученных генов. Полученные статистические данные обработаны с использованием компьютерной программы Microsoft Excel, что обуславливает достоверность полученных

автором диссертации результатов исследований, а также выводов и практических рекомендаций.

Обоснованность и достоверность положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Макаровой Н.В., обусловлены полнотой их освещения в научных публикациях, ежегодных отчетах на кафедре биологии, генетики и разведения животных ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» и апробации их на конференциях международного уровня. Всего по теме диссертации опубликовано 6 научных статей, 3 из них в изданиях рекомендованных ВАК РФ, 1 – в издании входящие в международную базу Web of Science.

Степень новизны, научная и практическая значимость результатов

Научная новизна проведенных Макаровой Н.В. исследований заключаются в том, что впервые в условиях Республики Татарстан проведена молекулярно-генетическая оценка резистентности коров татарстанского типа к маститу. Получены данные о качественном и количественном составе белковых фракций молока и молочной сыворотки, как в случае здоровых, так и в случае больных субклиническим и клиническим маститом коров татарстанского типа. Подобные данные установлены и в разрезе изученных полиморфных вариантов белковых локусов β-, к-казеин, β-лактоглобулин, лактоферрин и генов, кодирующих синтез гормонов пролактин и соматотропин. В диссертационной работе Макаровой Н.В. установлено новое свойство молока – способность сохранять нативное состояние при заболевании маститом.

Научная и практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что результаты исследований и новые знания, полученные Макаровой Н.В., в дальнейшем могут быть использованы в диагностике мастита коров, в селекционно-племенной работе в хозяйствах с татарстанским типом молочного скота в качестве дополнительных критериев отбора коров на устойчивость к маститу.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Макаровой Н.В. оформлена в соответствии с требованиям ВАК РФ, при этом есть некоторые замечания. Написана работа с соблюдением традиционной структуры, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, предложений производству, списка использованной литературы.

Материалы диссертационной работы изложены на 129 страницах компьютерного текста, содержит 17 таблицы, 18 рисунков. Список использованной литературы включает 276 источников, в том числе 113 – на иностранных языках.

В разделе **Введение** в наиболее сжатой, в тоже время понятной форме изложена актуальность диссертационной работы, четко сформулированы цели и задачи работы, достаточно изучена степень разработанности темы, приведены и аргументированы характеристики новизны работы, ее теоретическая и практическая значимость.

Обзор литературы изложен на 37 страницах компьютерного текста и состоит из 3 разделов.

Первый раздел посвящен вопросу хозяйственно-биологических особенностей татарстанского типа скота и его совершенствованию в условиях Республики Татарстан. В данном разделе диссертант подробно описывает, что татарстанский тип скота объединяет генофонд и соответственно свойства трех лучших пород: холмогорской, черно-пестрой, голштинской. В разделе диссертант сообщает также о том, что при линейной оценке экстерьера животные татарстанского типа положительно превосходят модельный тип, качество полученного от них молока и соответственно произведенная из нее молочная продукция отвечает требованиям высшего сорта. Приведены данные подтверждающие отличные воспроизводительные свойства коров данного типа.

В следующем разделе освещен вопрос заболевания коров различной формой мастита, причины их возникновения, а также проблемы, с которым сталкиваются молочные фермы в хозяйствах в особенности, что касается экономического ущерба.

Третий раздел Обзора литературы описывает молекулярно-генетические маркеры пролактин, соматотропин, лактоферрин и свойства агентов которые они кодируют в организме коров. Также в разделе подробно описывается белковый состав молока, молочной сыворотки и соответственно их фракционный состав.

Отдельно хотелось бы отметить, что раздел Обзор литературы заканчивается кратким резюмированием изложенного, где автор дает заключение о выборе темы диссертационной работы.

Материалы и методы исследований описаны во втором разделе диссертационной работы – «Основное содержание работы» (стр. 44-59).

В данном разделе подробно изложена информация об объеме выполненных работ, об объектах и методах исследований, которые вполне соответствуют целям и задачам диссертационной работы. В достаточно понятной и легко читаемой форме приведена информация о методах исследования фракционного состава молока и молочной сыворотки, определение числа соматических клеток, молекулярно-генетическом методе анализа. Автор использует статистические методы расчета селекционно-генетических параметров. Отдельно хотелось бы отметить, что данный раздел

иллюстрирован образцами результатов исследований фракционного состава белков, молекулярно-генетического тестирования и другие, что делает его более наглядным и понятным.

Раздел **2.2 Результаты собственных исследований** изложен автором на 32 страницах компьютерного текста. Раздел состоит из 6 подразделов.

Подраздел 2.2.1 посвящен диагностике мастита у опытных коров путем использования комплекса методов, включая клинический осмотр, а также лабораторные исследования качества молока на количественное содержание соматических клеток с использованием препарата Мастоприм. Раздел иллюстрирован фото-рисунками вымени здоровой и больной маститом опытных коров. Полученные результаты Макарова Н.В. свела в единую таблицу 5 результатов исследований. В таблице 5 на стр. приведены данные количества здоровых животных и больных субклиническим и клиническим маститом, кратко сформулированы клинические признаки мастита у больных коров, а также численные пределы выявленных в ходе анализа количество соматических клеток в 1 мл молока у всех групп коров.

В подразделе 2.2.2 подробно описаны полученные результаты лабораторного анализа фракционного состава белков молока и молочной сыворотки как у здоровых, так и у больных субклиническим и клиническим маститом коров. При этом автор приводит цифровой материал полученных данных, а также иллюстрации в виде электрофореграмм молочной сыворотки, молочного казеина и их белковых фракций. Автор в результате исследований установил, что у больных маститом коров происходит значительные изменения по белковому составу. При этом им выявлено, что у животных, которые получили лечение и выздоровели не полностью восстанавливается белковый состав молока, и приводит аргументы причин таковых изменений.

В разделе 2.2.3 Макарова Н.В. подробно описывает результаты тестирования белковых локусов β-, к-казеин, β-лактоглобулин и приводит соответствующие данные встречаемости их полиморфных вариантов и аллелей у опытной группы коров в разрезе групп их здоровья. Автор установил, что в генетической структуре подопытных коров значительно (в 1,5 раза) наблюдается увеличение частоты встречаемости аллеля А в локусах β - и к-казеина у больных животных. Таким образом, Макарова Н.В. делает вывод о возникновении естественного отбора животных по их устойчивости и восприимчивости к маститу, что приводит к нарушению генетического равновесия в изученных белковых локусах ($\chi 2$ = 13,2 и 15,9; P< 0,01 и 0,001).

Далее в разделе 2.2.4 диссертант приводит данные результатов исследований фракционного состава белков молока и молочной сыворотки в

разрезе генетической структуры подопытных коров по генотипам β-, к-казеин, β-лактоглобулин.

Раздел 2.2.5 посвящен молекулярно-генетическому исследованию опытной группы коров по генам лактоферрин, пролактин и соматотропин. В данном разделе диссертант приводит данные о частоте встречаемости их полиморфных и аллельных вариантов как у здоровых, так и у больных особей в отдельности, которые сведены в таблицы 13 и 14. Там же представлены результаты расчеты $\chi 2$ с помощью, которых Макарова Н.В. констатирует о наличии или же отсутствии генетического равновесия в опытной группе коров в разрезе существующего полиморфизма исследованных генов.

В разделе 2.2.6 приведена сравнительная оценка фракционного состава белков молока и молочной сыворотки в разрезе полиморфизма генов LTF, PRL, GH как у здоровых, так и больных субклиническим и клиническим маститом коров. Диссертантом установлено, что по локусам LTF, PRL и GH генотипы также, как генотипы локусов β-, к-казеин и β-лактоглобулин, оказывают большое влияние на стабильность молочных белков при мастите.

В разделе **Заключение** соискатель кратко резюмирует результаты собственных исследований и приводит 8 выводов.

Автореферат отражает основное содержание диссертации. Выводы соответствуют поставленным задачам и результатам исследований и в полном объеме раскрывают суть проведенной работы.

Несмотря на общую положительную оценку диссертации, возникли некоторые вопросы и замечания:

1. В разделе Материалы и методы исследований на стр. 44 вы отнесли изученные вами 6 генов к белковым локусам. Однако, смею с вами не согласиться так, как гены пролактин и соматотропин кодируют синтез гормонов в организме животных, в данном случае коров.
2. На стр. 46 диссертационной работы вами приведена схема основных направлений и результатов проведенных исследований. Данная схема составлена не верно, не выдерживает последовательности проведенных вами исследований и заводит читателя в заблуждение.
3. На стр. 44 в разделе Материалы и методы исследований наименование хозяйства, в котором проводился научно-хозяйственный опыт указано не верно. Согласно электронной выписке из ЕГРЮЛ ФНС России, которая доступна каждому в интернет ресурсах, данное хозяйство на сегодняшний день носит наименование ЗАО «Бирюли». При этом, также отсутствует информация о том, какому району и региону принадлежит хозяйство, о чем и прошу вас сообщить.

4. На стр. 56 диссертационной работы вы сообщаете о том, что проводили ПЦР-ПДРФ анализ в лаборатории ФГБУ «Татарская межрегиональная лаборатория». В какой конкретно лаборатории данного учреждения вы проводили анализы? Расскажите в краткой форме о методе ПЦР-ПДРФ анализа.
5. На рис. 18 стр. 73 в диаграммах в которых вы привели результаты частот встречаемости генотипов белков молока по локусам β-, κ-казеин и β-лактоглобулин как у здоровых, так и больных коров отсутствует обозначение под какой цветовой гаммой подразумевается какой генотип. Поясните, отсутствие данной информации.
6. Наиболее наглядную и информативную форму диссертационная работа имела бы в случае указания в ней дополнительной информации о молочной продуктивности подопытных коров, так как на возникновение мастита не маловажное значение имеют такие показатели как уровень удоя, период лактации и т.д. В связи с этим, сообщите каков уровень удоя у опытных животных и на какой стадии лактации они находились на момент проведения исследований?
7. В разделе Материалы и методы исследований на стр. 44, а также в разделе 2.2.1 на стр. 60 вами сообщается, что количество подопытной группы коров составило n=92 головы, из них 57 голов здоровых и 35 больных субклинической и клинической формой мастита. Однако в таблицах, где вы приводите результаты анализов фракционного состава белков молока и сыворотки молока у здоровых и больных коров до лечения и после (табл. 6 и 7), количество здоровых коров у вас – 27, а больных субклиническим и клиническим маститом – 17. Подобные ошибки выявлены и в других таблицах раздела 2 Результаты собственных исследований. Ответьте, почему в диссертационной работе допущены такие расхождения? И в связи с чем, молоко остальных 30 голов здоровых коров и 18 больных маститом коров не было исследовано на фракционный состав белков молока и сыворотки молока?
8. В разделе Материалы и методы исследований вами сообщается о том, что всего исследовано по молоку 27 здоровых коров и 33 больных маститом, итого n=60. При этом в разделе 2.2.3 в таблице 8 на стр. 72 вы описываете результаты исследований 46 коров. Объясните причину расхождений количества исследованных коров?
9. Ответьте, проводились ли вами дополнительные исследования, в частности бактериальный посева молока полученного от больных

субклиническим и клиническим маститом, для установления патогенна который вызвал данное заболевание и его КОЕ?

10. В таблицах 9, 10,11, 12, 14, 15, 16, 17 вы приводите стандартные обозначения достоверности полученных результатов, однако при этом вами не выведено в примечание описание критических значений уровня достоверности, что снижает уровень восприятия и понимания приведенного цифрового материала в данных таблицах.
11. В разделе Заключение вы приводите данные ряда ученых по результатам молекулярно-генетического тестирования генов BoLa, связанный с устойчивостью крупного рогатого скота к лейкозу, каппа-казеина, лактоферрина. Однако известно, что подобное генетическое тестирование, в том числе и исследования по возможной взаимосвязи, исследуемых вами генетических маркеров с заболеваемостью маститом коров проводилось учеными, являющиеся вашими соотечественниками (Шамсиенва Л.В., Юльметьева Ю.Р., Зиннатова Ф.Ф., Тюлькин С.В. и др.). Почему в вашей диссертационной работе не приведены результаты их исследований как наиболее близких к вашим исследованиям с точки зрения условий региона и типа крупного рогатого скота?
12. Опишите физиологические и биологические функции агента который кодирует ген лактоферрин.

В качестве дополнительных замечаний по оформлению следует отметить имеющиеся отдельные опечатки и стилистические погрешности. Однако, указанные замечания не снижают общую положительную оценку диссертационной работы, а носят больше дискуссионный характер.

Заключение

Макарова Наталья Владимировна, пользуясь современными методами исследований, провела значительные по объему и глубине научные изыскания и решила поставленные задачи на высоком профессиональном уровне, сделала логические выводы.

Диссертационная работа Макаровой Натальи Владимировны на тему: «Молекулярно-генетическая оценка коров татарстанского типа по резистентности к маститу», является законченной научно-квалификационной работой, выполненной автором на высоком научном уровне, и соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 23.09.2013 №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор

достоин присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных.

Официальный оппонент кандидат биологических наук, заместитель руководителя по научной работе Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН Зиннатова Фарида Фатиховна

Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт 48, (843)277-54-00, Эл.почта (e-mail): faridafffz@mail.ru

Подпись Зиннатовой Ф.Ф. заверяю, заведующий сектором по кадрам Мухаметшин Ринат Нургаянович

04.04.2019 г.

Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства - обособленное структурное подразделение федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» ОГРН 1021602842539
ТатНИИСХ
ИНН 1655022127
КПП 165945001
отдел кадров