

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Облап Руслана Васильовича на тему «**Методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції**», представлену спеціалізованій вченій раді Д 27.355.01 Інституту розведення і генетики тварин НААНУ на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми. У сучасних умовах особливої актуальності набули проблеми продовольчої безпеки країни, серед яких однією із найважливіших є виробництво продуктів харчування, які б задовольняли вимоги показників якості й безпечності. Розробка та запровадження тест-систем, що ґрунтуються на основі молекулярно-генетичних методах діагностики суттєво доповнюють контроль безпечності та якості харчової продукції. Важливість досліджень обґрунтовано узгоджується з темами науково-дослідних робіт науково-дослідної лабораторії Білоцерківського національного аграрного університету у період 2012–2014 років за завданням «Розроблення діагностичних тест-систем на основі ПЛР у реальному часі для оцінювання безпеки та якості харчових продуктів» (№ ДР 0113U005453), а також за тематикою досліджень науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень Українського науково-методичного центру оцінки відповідності та випробувань харчових продуктів, виробів, що контактують з харчовими продуктами, іграшок, парфумерно-косметичної продукції та продукції побутової хімії (УкрПРОДТЕСТ) ДП «Укрметртестстандарт» у період 2012–2019 років.

З огляду на це, дисертаційна робота, присвячена розробленню методології молекулярно-генетичного оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження за допомогою сучасних методів молекулярно-генетичного аналізу, є актуальною і своєчасною.

Мета і завдання досліджень. Для розкриття теми наукових досліджень чітко сформульовано мету, визначено завдання, якими передбачалося визначити генетичну структуру двох популяцій української чорно-рябої молочної породи за локусами κ-казеїну (CSNK), β-лактоглобуліну (BLG) та пролактину (PRL) як потенційними генами-маркерами молочної продуктивності та дослідити зв'язок технологічних характеристик молока з окремими генотипами генів CSNK, BLG та PRL; запропонувати молекулярно-генетичні маркери для визначення провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ, ВЛВ) методом

молекулярно-генетичного аналізу на основі технології TaqMan® ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ), відпрацювати ПЛР-РЧ методику визначення цього збудника у молоці корів; розробити методологію визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі використання молекулярно-генетичних маркерів та технології SYBR®Green методу ПЛР-РЧ; розробити і запропонувати до використання мультиплексну тест-систему на основі методу ПЛР-РЧ, яка б уможливила одночасну детекцію трьох різних ДНК-мішеней; відпрацювати схему застосування різних типів молекулярно-генетичних маркерів для здійснення якісного та кількісного аналізу сільськогосподарської продукції на вміст елементів генно-інженерних конструктів; запровадити у виробництво серію тест-систем для якісного та кількісного визначення ГМО в сільськогосподарській сировині, кормах для тварин і харчовій продукції методом ПЛР-РЧ; розробити молекулярно-генетичний підхід до визначення глютену в сільськогосподарській сировині і харчовій продукції; розробити серію мультиплексних тест-систем для визначення *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* та *Shigella spp.*

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що дисертантом вперше науково обґрунтовано методологію застосування молекулярно-генетичних маркерів та методів генетичного аналізу для оцінювання ряду показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції.

Експериментально обґрунтовано та доведено можливість ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* у готовій молочній продукції під час контролю складу молочної мікрофлори, а також під час створення нових заквасок, пробіотиків і пробіотичних продуктів за допомогою SYBR® Green-технології методу ПЛР-РЧ.

Розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему «М'ясо-тест» на основі TaqMan-технології методу ПЛР-РЧ, яка уможливає одночасну ідентифікацію трьох різних ДНК-мішеней, що локалізовані в межах мітохондріальних генів цитохрому b (*cytb*) і сателітної IV ДНК (1.709 satellite IV DNA family), та дає змогу визначати видову належність м'яса курятини, свинини та яловичини у харчовій продукції і кормах для тварин.

Вперше розроблено та запроваджено у виробництво серію тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО кількість» та «ГМО ідентифікація» на основі TaqMan-технології методу ПЛР-РЧ.

Проведено аналіз з виявлення та ідентифікації у харчовій продукції та продовольчій сировині злакових культур, глютену у складі яких пов'язаний з виникненням захворювання на целиакію у людей. Визначено ДНК-мішені (ω -

гліадини пшениці та жита, В1 hordein ячменю, avenin вівсу) та розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему «Глютен-скринінг», яка уможливорює ідентифікацію навіть слідових кількостей пшениці, жита, вівса і ячменю у продуктах харчування.

Визначено ДНК-мішені та розроблено три мультиплексні тест-системи на основі TaqMan-технології ПЛР-РЧ «L. Monocytogenes-ідентифікація», «Salmonella spp.-ідентифікація» та «Shigella spp.-ідентифікація», які уможливають ідентифікацію збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу.

Практичне значення роботи. За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО кількість», «ГМО ідентифікація» отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011, ТУ У 20.1-40719638-001:2019 та патент на корисну модель. Розроблена серія тест-систем використовується у близько тридцятьох акредитованих за ДСТУ ISO/IEC 17025 випробувальних лабораторіях України різних систем підпорядкування. Упродовж 2007–2017 рр. за використання розроблених тест-систем здійснено контроль за обігом ГМО в країні шляхом перевірки сільськогосподарської сировини та харчової продукції.

Затверджено методику виконання вимірювань (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою ПЛР-РЧ тест-системи «Глютен-скринінг», а розроблений діагностикум може бути рекомендований для здійснення контролю харчової продукції на вміст глютену.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, є достатнім, що демонструється сукупністю експериментального матеріалу, обґрунтованим теоретичним обговоренням власних і літературних даних. Якість досліджень, викладених у дисертації, підтверджується ретельно розробленими методиками, сучасними методами, застосованими для отримання експериментальних даних, репрезентативністю вибірок, грамотно застосованим статистичним апаратом. Логіка викладення матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертації.

Структура дисертації побудована відповідно до чинних вимог і представлена аотацією, вступом, оглядом літератури, матеріалами і методами досліджень, результатами експериментальних досліджень та їх обговоренням, узагальненнями результатів досліджень, висновками, пропозиціями виробництву, списком використаних джерел а також додатків. Обсяг роботи – 410 сторінок комп'ютерного тексту, вона містить 113 таблиць, 83 рисунки та 14 додатків на 45 сторінках. Список використаних літературних джерел включає

716 джерел, у тому числі 362 латиницею.

В «Огляді літератури» у чотирьох підрозділах автором розглянуто безпечність та якість сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження і методи її оцінювання, ідентифікація QTL-генів у тваринництві, молекулярно-генетична діагностика інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин, виявлення фальсифікації м'ясної продукції і методи визначення видової належності тканин, біотехнологічні сільськогосподарські культури, методи і підходи щодо діагностики ГМО, проблема харчових алергенів та методи ідентифікації глютену, методи молекулярно-генетичної ідентифікації мікроорганізмів у харчовій продукції.

У розділі «Матеріали і методи досліджень» наведено місце проведення досліджень, дослідний матеріал та загальна схема досліджень. Достатньо ретельно представлено різні методи і підходи які використані автором щодо виділення ДНК, методи спектрофотометричного аналізу виділеної ДНК, підбір праймерів і зондів та проведення ПЛР, методи отримання генно-інженерних позитивних контрольних зразків у вигляді плазмідної ДНК, статистична обробка результатів досліджень та засоби вимірювальної техніки та устаткування.

У розділі «Результати експериментальних досліджень та їх обговорення» ґрунтуючись на отриманих результатах було розроблено серію молекулярно-генетичних діагностичних систем на основі різновидів методу полімеразної ланцюгової реакції.

Для розроблення і валідації методології ідентифікації генотипів тварин, асоційованих з поліпшеними характеристиками якості продукції, було досліджено генетичну структуру двох популяцій української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби (n=451) за потенційними генами-маркерами молочної продуктивності – к-казеїном (CSNK), β-лактоглобуліном (BLG) і пролактином (PRL).

Дослідження взаємозв'язків між виявленими генотипами та основними параметрами молочної продуктивності (загальний надій, вміст % жиру та білка) показало що найвищою молочною продуктивністю характеризувалися тварини з генотипами BLG AA та PRL AG, найвищий % жиру в молоці мали корови з генотипом BLG AA, найвищий % білка у молоці мали тварини з генотипами BLG BB та PRL AG. Оцінювання генетичної структури двох популяцій ВРХ за трьома локусами одночасно дало змогу встановити асоціацію комплексних генотипів CSNK AA / BLG AA / PRL AG, CSNK AA / BLG AA / PRL GG та CSNK AB / BLG AA / PRL AG з високою молочною продуктивністю, CSNK AA / BLG AA / PRL AG, CSNK AA / BLG AA / PRL GG та CSNK AA / BLG AB / PRL GG – з

високими показниками масової частки жиру в молоці, CSNK AB / BLG AA / PRL AG, CSNK AB / BLG BB / PRL AG – з високими показниками вмісту білка. За результатами досліджень впливу комбінацій генетичних варіантів CSNK, BLG та PRL на сиропридатність молока найкращі показники тривалості сичужного зсідання молока було встановлено для тварин з комплексними генотипами CSNK AB / BLG BB / PRL GG та CSNK AB / BLG AB / PRL GG.

Для удосконалення методології ідентифікації небезпечних чинників у харчовій продукції тваринного походження було проведено порівняльну діагностику поголів'я ВРХ на присутність провірусної ДНК вірусу ВЛ ВРХ (BLV) за допомогою технології TaqMan® методу ПЛР у реальному часі. Як молекулярно-генетичний маркер було використано консервативну ділянку гена Env, який кодує поверхневий вірусний глікопротеїд gp51. Отримані результати продемонстрували значно більшу чутливість та специфічність ПЛР-РЧ порівняно з методом РІД-аналізу, при цьому рівень інфікованості дослідженого поголів'я за двома методами становив відповідно 6,8 та 2,4 %. За результатами оцінювання ефективності використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу для ідентифікації збудника лейкозу було запропоновано застосування тест-системи як додаткового інструменту під час проведення протилейкозних заходів у господарствах та під час перевірки молока на молокопереробних підприємствах країни.

За використання як молекулярно-генетичних маркерів ділянок генів 16S рРНК та фактору елонгації Tu для ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* було розроблено метод визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі технології SYBR®Green методу ПЛР-РЧ та доведено можливість ідентифікації групи молочнокислих бактерій та біфідобактерій у готовій молочній продукції під час контролю складу молочної мікрофлори, а також під час створення нових заквасок, пробіотиків та пробіотичних продуктів.

Послідовності ДНК, локалізовані в межах мітохондріальних генів цитохрому b (cytb) курки і свині та сателітної IV ДНК ВРХ (1.709 satellite IV DNA family), було використано як маркерні для видової ідентифікації тваринної ДНК, на основі чого розроблено метод визначення фальсифікації видової належності м'яса курятини, свинини та яловичини у харчовій продукції та кормах для тварин. До визначених послідовностей підібрано праймери з зондами для розроблення мультиплексної тест-системи на основі технології TaqMan® методу ПЛР у реальному часі. Розроблена діагностична тест-система «М'ясо-тест» уможливорює ідентифікацію ДНК птиці, свині та ВРХ з межею виявлення не

менш ніж 1×10^{-6} нг (1фг). Специфічність тест-системи становить 100%, аналітична чутливість – 1×10^{-5} нг (0,1нг/мл). Діагностикум характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу. Розроблена тест-система може бути рекомендована випробувальним лабораторіям для здійснення контролю фальсифікації видової належності м'яса у складі м'ясних продуктів.

Розроблено підходи до визначення генетично модифікованих рослин (ГМР, ГМО) методом ПЛР-РЧ з врахуванням типу сільськогосподарських культур, що вирощуються в Україні. Згідно з даною методологією, дослідження зразків сільськогосподарської сировини та харчової продукції має проходити чотири основні етапи – якісний (скринінговий) аналіз, ідентифікацію ГМ ліній, видову ідентифікацію рослини та кількісний аналіз. Для розроблення необхідної панелі ПЛР-РЧ тест-систем було визначено низку молекулярно-генетичних маркерів до різних елементів генно-інженерних конструктів, які було використано під час створення трансгенних сільськогосподарських культур. ДНК-мішенями для підбору олігонуклеотидних прайсерів і зондів слугували як регуляторні елементи (P-35S, T-nos) генно-інженерних конструктів, так і гени «нової ознаки» – 5-енолпірувілшикимат-3-фосфат синтаза (epsps) із *Agrobacterium tumefaciens* штаму CP4, фосфінотрицин N-ацетилтрасфераза із *Streptomyces viridochromogenes* (pat), фосфінотрицин N-ацетилтрасфераза із *Streptomyces hygrosopicus* (bar). Для видової ідентифікації сільськогосподарських культур було обрано гени лектину сої (lec), алкогольдегідрогенази кукурудзи (adh1), круцеферину ріпаку (cru), глутамінсинтази цукрового буряку (gs) та фосфоліпази Д рису (pld). Для визначення ГМ ліній обирались праймери, локалізовані як у послідовності ДНК вбудованої генно-інженерної конструкції, так і в ДНК самої рослини. Кожну розроблену тест-систему було виконано в форматі мультиплексу, що уможлиблює одночасне проведення двох, трьох або навіть чотирьох незалежних реакцій. Одна реакція направлена на виявлення внутрішнього ендогенного контролю перебігу ПЛР (ген рослини), інші – відповідного елемента генно-інженерного конструкту. Загальна кількість розроблених діагностикумів – 51 найменування, включаючи тест-системи серії «ГМО скринінг», «ГМО кількість» та «ГМО ідентифікація».

Вивчено питання присутності у харчовій продукції та продовольчій сировині злакових культур глютену, який пов'язаний з виникненням захворювання на целиакію у людей. Визначено молекулярно-генетичні маркери (ω -gliadin пшениці, ω -secalin жита, V1 hordein ячменю, avenin вівсу) зернових культур та розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему, яка уможлиблює

ідентифікацію навіть слідових кількостей пшениці, жита, вівса і ячменю у харчових продуктах. Валідаційні характеристики тест-системи перевірено шляхом порівняльних випробувань з комерційними ІФА- та ПЛР-діагностикумами.

На основі аналізу літературних джерел і вивчення поліморфізму окремих генів було визначено молекулярно-генетичні маркери (гени *hly*, *invA*, *iraH*) для ідентифікації збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу за допомогою технології TaqMan® ПЛР-РЧ. Проведені дослідження дали змогу розробити три діагностичні мільтиплексні ПЛР-РЧ тест-системи для ідентифікації *L. Monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. у харчовій продукції та сільськогосподарській сировині тваринного та рослинного походження. Специфічність розроблених тест-систем «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella* spp.-ідентифікація», «*Shigella* spp.- ідентифікація» становить 100%, аналітична чутливість знаходиться у межах $n \times 10^3$ ГЕ/мл. Визначення аналітичної чутливості проводили за використання кількісно охарактеризованих зразків ДНК відповідних патогенів. Тест-системи характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу, що є підставою рекомендувати їх для здійснення контролю продовольчої сировини та харчових продуктів на вміст патогенів.

У розділі «Узагальнення результатів досліджень» автор наводить і обґрунтовує загальну схему застосування методології молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції.

«Висновки» відповідають меті і завданням, змісту виконаних досліджень та містяться у 11 пунктах, а пропозиції виробництву сформовано у чотирьох пунктах.

Повнота викладу в опублікованих працях. Фактичний матеріал дисертаційної роботи та висновки за результатами досліджень апробовано на сторінках наукових видань, доповідались на численних вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. Основні положення дисертаційної роботи викладено у 73 наукових працях, із них 2 монографії, 20 – опубліковано у наукових фахових виданнях України, 8 – у виданнях іноземних держав або у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз, 34 – наукові праці апробаційного характеру у збірниках наукових конференцій, з'їздів та симпозіумів, 8 – додатково відображають наукові результати дисертації, 1 – патент України на корисну модель.

Наукове і практичне значення отриманих результатів. Використання отриманих в дисертаційній роботі результатів досліджень з визначення

особливостей генетичної структури поголів'я української чорно-рябої молочної породи ВРХ, а також встановлення взаємозв'язку між виявленими генотипами та комплексними генотипами поліморфних локусів (*CSNK*, *BLG*, *PRL*) та технологічними властивостями (сиропридатністю) молока дасть змогу проводити селекційну роботу в бажаному напрямі, що, своєю чергою, сприятиме збільшенню продуктивного потенціалу тварин.

Запропоновано концептуальний підхід з оптимізації техніки визначення збудника лейкозу ВРХ у коров'ячому молоці за допомогою *TaqMan*-технології методу ПЛР-РЧ та доведено можливість її застосування як у комплексі проти лейкозних заходів у господарствах, так і безпосередньо під час контролю безпеки продукції.

Застосування розробленої тест-системи «М'ясо-тест» у практиці випробувальних лабораторій дасть змогу здійснювати контроль за фальсифікацією м'яса у харчовій продукції і кормах для тварин.

За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво тест-систем серії «ГМО скринінг», «ГМО кількість» та «ГМО ідентифікація» отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011 та патент на корисну модель. Розроблені тест-системи використовуються у близько тридцятьох акредитованих за ДСТУ ISO/IEC 17025 випробувальних лабораторіях України різних систем підпорядкування. Упродовж 2007–2017 рр. за використання розроблених тест-систем здійснено контроль за обігом ГМО в країні шляхом перевірки харчової продукції та сільськогосподарської сировини.

Затверджено методику виконання вимірювань (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою ПЛР-РЧ тест-системи «Глютен-скринінг», а розроблений діагностикум може бути рекомендований для здійснення контролю харчової продукції на вміст глютену.

Апробація роботи трьох ПЛР-РЧ тест-систем з визначення *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* на контрольних зразках показала високу специфічність, чутливість та відтворюваність результатів аналізу, що є підставою рекомендувати їх для здійснення контролю продовольчої сировини та харчових продуктів на вміст патогенів.

Автореферат дисертації відображає основні положення самої роботи.

Проте, в ході рецензування представленої роботи були виявлені деякі зауваження, що в цілому **не знижують її наукової цінності**:

1. Такі загальноновживані умовні позначення, як ДНК, РНК, не варто розшифровувати.

2. Завдання 2: «розробити та відпрацювати методологію дослідження

генетичної структури популяцій великої рогатої худоби за генами господарсько-корисних ознак». Виникає питання: на сьогодні хіба не розроблені ці методики?

3. В огляді літератури досить ретельно проаналізовано сучасний стан за всіма науковими напрямками проведених дисертантом досліджень. Але відсутній загальний підсумок, який би об'єднав усі підрозділи в єдине ціле.

4. Розділ 3.1.1. Визначення потенціалу молочної продуктивності великої рогатої худоби за аналізом поліморфізму QTL-генів логічно розмістити в Огляді літератури.

5. Розділ 3.1.1.1. Визначення генотипів CSNK, BLG та PRL, асоційованих з молочною продуктивністю ВРХ.

Якщо в цьому підрозділі описується відома методика проведення ПЛР, то його варто розмістити у II розділ. Якщо автором привнесені свої відпрацьовані методики, то, напевно, варто це зазначити у назві підрозділу.

6. Таблиця 3.5. Показники молочної продуктивності популяції корів української чорно-рябої молочної породи ВРХ господарства «Митниця» за різними генотипами локусів CSNK, BLG та PRL.

Не зрозуміло, чому відсутня аналогічна таблиця по господарству «Агрофірми Колос».

7. Розділ 3.1.3. Діагностика поголів'я ВРХ на присутність вірусу BLV бажано розмістити в Огляді літератури.

8. В якості молекулярно-генетичних маркерів для визначення ВЛ ВРХ автором було використано лише один з вірусних генів (Env). Чи не вважає автор, що в світі останніх подій (пандемія COVID-19), для діагностики вірусних інфекцій методом ПЛР у реальному часі доцільніше використовувати щонайменше дві вірусні мішені з огляду на високий рівень мутагенезу у вірусів.

9. В розділі 3.2.4. написано: «Перевірку специфічності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованої з наступних організмів: ...людина (*Homo sapiens*)». У II розділі не зазначено які тканини (напевно, кров) відбирали від людини.

10. Стор. 262 «Отримані дані свідчать, що обрані праймери дають змогу детектувати ДНК-мішені з ефективністю від 80 до 109 %.» Чому 109%, а не 100%?

11. Під час розроблення системи визначення молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів автором було використано технологію SYBR®Green методу ПЛР у реальному часі. Як відомо, технологія TaqMan характеризується більшою специфічністю та дозволяє розробляти мультиплексні тест-системи. З огляду на це чи не краще було б в даному випадку також

застосувати дану технологію.

12. Стор. 291. Чи доцільно показувати табл. 3.62 «Приклад комплектації тест-систем серії «ГМО ідентифікація», якщо вона аналогічна таблиці 3.52

13. Другий висновок є узагальнюючим, так як методики дослідження генетичної структури популяцій великої рогатої худоби за генами-маркерами молочної продуктивності – CSNK, BLG та PRL дисертантом були відпрацьовані і тому його краще було об'єднати з першим узагальнюючим висновком.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Р.В. Облапа є самостійним, завершеним дослідженням, в якому отримані нові, науково обґрунтовані результати, що підтверджують доцільність використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів для оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини тваринного і рослинного походження.

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 «Методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції», відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» (Постанова Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р.), а її автор Облап Руслан Васильович заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент, д-р с.-г. наук, професор,
завідувач кафедри гігієни тварин та
ветеринарного забезпечення
Національної поліції України
Подільського аграрно-технічного
університету

Т.М. Супрович

Учений секретар ПДАТУ
кандидат с.-г. наук, доцент



О.Т. Кобернюк