

На правах рукописи

ТУХВАТУЛЛИНА ЛИЛИЯ АЛЬБЕРТОВНА

**УРОВЕНЬ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА (II) ПРИ
АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *iNOS***

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный руководитель

Каримова Руфия Габдельхаевна – доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты**Семенов Владимир Григорьевич**

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой морфологии, акушерства и терапии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный аграрный университет»

Кляпнев Андрей Владимирович

кандидат биологических наук, доцент кафедры «Анатомия, хирургия и внутренние незаразные болезни» ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно – исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж

Защита состоится 21 «июня» 2022 года в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <https://kazanveterinary.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г., размещен на сайтах: <https://kazanveterinary.ru> и <http://www.vak.ed.gov.ru>

Ученый секретарь
диссертационного совета

Р.А. Асрутдинова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Оксид азота (II) является короткоживущей и высоко реактивной сигнальной молекулой, которая участвует в различных физиологических и патофизиологических процессах. В организме оксид азота (II) продуцируется с помощью комплексной реакции, где молекулярный кислород присоединяется к конечному атому азота в гуанидиновой группе аминокислоты L-аргинина под действием фермента нитроксидсинтазы (NOS).

В настоящее время внимание исследователей привлекают биологические свойства оксида азота (II). Несмотря на многочисленные работы по изучению влияния NO на физиологические функции организма и выяснению его роли в патогенезе заболеваний, до сих пор не существует четких представлений о его роли в системе иммунитета животных.

На сегодняшний день известно, что NO является важным компонентом иммунной системы. J.V. Hibbs и его коллегами доказано, что оксид азота (II), который выделяется макрофагами, обладает антимикробной и противоопухолевой активностью. Большое количество оксида азота (II), которое выделяется в макрофагах и некоторых других клетках иммунной системы оказывает цитотоксическое, антибактериальное, противовирусное, противогрибковое действие на вторгающиеся в организм патогенные микроорганизмы, таких как: бактерии, грибки, простейшие, а также образующиеся в самом организме, злокачественные клетки. Ответственной за это является изоформа синтазы оксида азота, так называемая индуцибельная синтаза оксида азота (*iNOS*). Данные ряда исследований также подтверждают, что NO и пероксинитрит оказывают выраженное бактерицидное действие на *St. aureus*, *Mycoplasma pneumonia*, *Chlamydia*, *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis*.

В обзорных исследованиях Bogdan C., (2015) показана роль синтаз оксида азота (II) во врожденном иммунитете, влияние их на функцию клеток иммунитета, моделирование иммунных реакций, а также воспалительных процессов. Интересно то, что одним из факторов активизации синтаз NOS в макрофагах являются микробные патогены или их продукты (например, LPS). Исследования Lima-Junior, D.S. et al. (2013) показали, что макрофаги мыши, инфицированные паразитами *Leishmania amazonensis*, стимулированные интерлейкином (IL)-1b, выделяли значительное количество NO, примерно 40% NO зависело от активации инфламассомы (каспазы 1). Это говорит о том, что интерлейкин сам по себе может передавать сигналы, активирующие синтазу оксида азота (II). Но, важно отметить и тот факт, что активность синтаз NOS и уровень NO зависит от количества L-аргинина в клетках, хотя и отмечают, что некоторые бактерии могут заменять L-аргинин на цитруллин.

Несмотря на разрозненные сведения, до сих пор не существует четких представлений о клеточно-опосредованном влиянии оксида азота (II) на механизмы иммунитета.

В связи с вышеизложенным выявление роли оксида азота (II) в регуляции системы иммунитета является актуальным в теоретическом и практическом отношениях.

Степень разработанности темы. Изучением роли оксида азота (II) в системе иммунитета занимались отечественные ученые Гончаров Н.П., 2020; Реутов В.П., 2018; Шабунин С.В. и Шахов А.Г., 2017; Плехова Н.Г. и Сомова Л.М., 2012; Каримова Р.Г., 2011; Рецкий М.И., 2009; и зарубежные авторы Wang Y., 2021; Yang J., 2019; Stiff A., 2018; Radi R., 2018; Lee H.S., 2016; Soufli I., 2016; Arora D.P., 2015; Bogdan C., 2015; Buie J.N.J., 2014; Bellin D., 2013; Wink D.A., 2011; Ignarro L.J., 1990; Hibbs Jr.J.B., 1988 и др. Несмотря на большое количество трудов в этой области, неизученным остается влияние оксида азота (II) на систему иммунитета в целом; а также реакции нитроксидергической системы на активацию врожденного иммунитета при вакцинации и при введении иммуномодуляторов.

Цель работы - изучить динамику изменения уровня стабильных метаболитов оксида азота (II) при активации системы врожденного иммунитета млекопитающих и в зависимости от полиморфизма гена *iNOS*.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить содержание стабильных метаболитов оксида азота (II) в плазме крови и активность врожденного иммунитета у телят после введения иммуномодуляторов «Имунофан» и «Фоспренил»;
2. Изучить содержание стабильных метаболитов оксида азота (II) в плазме крови и активность врожденного иммунитета у кроликов после введения иммуномодулятора «Имунофан»;
3. Изучить содержание стабильных метаболитов оксида азота (II) в плазме крови и активность врожденного иммунитета у морских свинок после иммунизации вакцинами *B. abortus* 82-Rr, *B. abortus* 19 и *B. abortus* R-1096;
4. Определить аллельный полиморфизм гена индуцибельной NO-синтазы у телят относительно полиморфного маркера AN13-1;
5. Оптимизировать способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования телят по гену *iNOS*;
6. Изучить содержание стабильных метаболитов оксида азота (II) в плазме крови и активность врожденного иммунитета у телят разного генотипа, а также выявить зависимость генотипов гена *iNOS* с активностью нитроксидергической системы телят.

Научная новизна.

Впервые выявлена зависимость активности нитроксидергической системы и врожденного иммунитета у телят и кроликов после применения иммуномодуляторов.

Установлена зависимость между уровнем стабильных метаболитов оксида азота (II) в крови морских свинок и общим количеством лейкоцитов крови, что доказывает участие NO в механизмах врожденного иммунитета за счет повышения активности нейтрофилов.

Впервые установлено, что иммунизация S-формой противобруцеллезной вакцины (*B. abortus* 19), не вызывает повышения уровня нитрат- и нитрит-анионов в сыворотке крови и не активизирует механизмы неспецифической резистентности организма. Доказано, что иммунизация вакциной *B. abortus* 82-Rr вызывает повышение стабильных метаболитов в сыворотке крови, бактерицидной активности сыворотки крови и фагоцитарной активности нейтрофилов у морских свинок.

Оптимизирован способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования телят по гену *iNOS*, подобран оптимальный режим отжига праймеров 63-64оС который обеспечивает сравнительно высокий выход специфического ПЦР-продукта длиной 258bp.

Впервые проведена оценка аллельного полиморфизма гена *iNOS* у исследуемой выборки телят по генотипам *AA* и *AB*; установлена зависимость активности системы врожденного иммунитета от генотипа по гену *iNOS*.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Значимость работы заключается в том, что она расширяет представления о роли оксида азота (II) в системе иммунитета. Установленная зависимость между уровнем стабильных метаболитов оксида азота (II) и активностью клеточного иммунитета после применения иммуномодуляторов и вакцинации, доказывает, что NO является одним из регуляторов активности клеток иммунитета. Положительная корреляция между бактерицидной активностью сыворотки крови и уровнем стабильных метаболитов NO свидетельствует о том, что оксид азота (II) принимает непосредственное участие в механизмах врожденного иммунитета.

Выявленная зависимость активности врожденного иммунитета телят от генотипа по гену *iNOS* доказывает участие маркера АН-13-1 в неспецифических иммунных реакциях.

Практическая значимость работы заключается в возможности применения оптимизированного способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота в селекции для получения животных с повышенной активностью врожденного иммунитета. Также уровень стабильных метаболитов NO может служить маркером активности системы врожденного иммунитета при диагностике и терапии патологий, связанных с изменением активности иммунной системы.

Методология и методы исследования. Основой методологии явилась научная постановка проблемы изучения роли оксида азота (II) в регуляции системы врожденного иммунитета. В процессе проведения исследований были использованы физиологические,

морфологические, бактериологические и генетические методы исследования, которые включали в себя серологические и бактериологические исследования, гематологический анализ крови, ПЦР диагностику.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Активность системы врожденного иммунитета (бактерицидная, лизоцимная активность сыворотки крови, фагоцитарная активность нейтрофилов) при введении иммуностимуляторов положительно коррелирует с активностью системы оксида азота (II);

2. Иммунизация R-формами противобруцеллезных вакцин (*B. abortus* 82-Rr; *B. abortus* R-1096) повышает уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) и неспецифическую резистентность организма; тогда как S-форма (*B. abortus* 19) не влияет на активность врожденного иммунитета;

3. Телята с генотипом AA по гену *iNOS* обладают более высоким врожденным иммунитетом относительно телят с генотипом AB.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов обусловлена большим объемом экспериментального материала, а также подтверждается использованием современных методов исследования, сертифицированного оборудования и проведением статистической обработки. Биометрическая обработка цифрового материала проведена на персональном компьютере по критерию Стьюдента. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых изданиях, апробированы на специализированных научных конференциях.

Основные результаты исследований доложены и получили одобрение на:

-Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых вузов Минсельхоза России в номинации «Биологические науки», Казань, 2018; международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК», Казань, 2019; международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК», посвященная 90-летию образования казанской зоотехнической школы, Казань, 2020; международной научно-практической конференции «Фундаментальная и прикладная наука: состояние и тенденции развития», Петрозаводск, 2021, международной юбилейной конференции, посвященной 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете, Казань, 2021.

Личный вклад автора. Планирование, подготовка, проведение экспериментов, статистическая обработка результатов, формулирование выводов, основных положений,

выносимых на защиту, и формирование диссертации проведены автором лично. Доля участия диссертанта в выполнении работы составляет 85%.

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 1 – в издании, включенном в библиографическую и реферативную базу данных Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, основную часть, заключение, практические предложения, список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы. Работа иллюстрирована 8 таблицами, 36 рисунками. Список литературы включает 247 источников, в том числе 160 – зарубежных авторов.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследования

Исследования проведены в условиях кафедры физиологии и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» в период с 2017 по 2021 годы в соответствии с планом научных исследований. Общая схема проведенных исследований приведена на рисунке 1.

Исследования проведены на телятах голштино-фризской породы в возрасте от 0 до 6 месяцев весом от 25 до 35 кг, на кроликах породы Ризен в возрасте от 3 до 4 месяцев весом от 2 до 3,5 кг и на морских свинках в возрасте от 1 до 2 месяцев живой массой 400-450 г. Все животные были клинически здоровы. Телята содержались на базе животноводческого хозяйства ООО «БИРЮЛИ МОЛОКО» Высокогорского района Республики Татарстан и на базе агрофирмы ООО «Татарстан» Высокогорского района Республики Татарстан. Кролики содержались в виварии ФГБОУ ВО Казанской ГАВМ. Морские свинки содержались в виварии лаборатории бактериальных зооантропонозов в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»¹. Содержание животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), утвержденным МЗ СССР 06.07.73. Кормили лабораторных животных натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР от 12.-8.77.

Опыты с животными были одобрены в строгом соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1994 г.) и с руководящими принципами Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (1996 г.).

¹ Выражаем благодарность заведующему лаборатории бактериальных зооантропонозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» кандидату биологических наук М.А. Косареву за оказанную помощь в выполнении работы

Исследования по оценке аллельного полиморфизма генов *iNOS* проводили на выборке из 50 телят. После ПЦР-диагностики телята были отобраны по 10 голов животных с генотипами *AA* и *AB*: первая группа: опытная – телята с генотипом *AA* (n=5); вторая группа: опытная – телята с генотипом *AB* (n=5).

Морских свинок разделили на 4 равные группы: первая группа: иммунизировали вакциной из штамма *B. abortus* 82-Rg подкожно в область левого паха в дозе 1,5 млрд.м.к. по ОСО (оптический отраслевой стандарт мутности) ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича на фосфатном забуференном физиологическом растворе в объеме 1 мл (n=5); вторая группа: вакцинировали штаммом *B. abortus* 19 подкожно в область паха в дозе 1 млрд. м. к. объеме 1 мл (n=5); третья группа: вакцинировали штаммом *B. abortus* R-1096 подкожно в область паха в дозе 1,5 млрд.м.к. в объеме 1 мл (n=5); четвертая группа: интактная (n=5).

Кролики были разделены на 2 группы: первая группа: контрольная – клинически здоровые кролики (n=5); вторая группа: опытная – кролики после введения иммуномодулятора «Имунофан» в дозе 1 мл подкожно в область холки согласно инструкции по применению (n=5).

Взятие крови у телят производился из ярёмной вены с помощью индивидуальной вакуумной системы в 8-9 часов утра. Взятие крови у морских свинок производился из ушной вены с помощью надреза в 8-9 часов утра. Взятие крови у кроликов производился из ушной вены с помощью иглы в 8-9 часов утра.

2.1.1 Определение содержания стабильных метаболитов оксида азота (II)

Комплексную нитроксидергическую реакцию организма определяли по полезному приспособительному результату - концентрации оксида азота (II) в плазме крови, а также по физиологическим эффектам, свидетельствующим об изменении состояния нитроксидергической системы. Такими эффектами являются изменение неспецифической и специфической резистентности организма, а также изменение морфологического состава крови.

Об активности системы оксида азота (II) в крови судили по содержанию нитрат- и нитрит-анионов (NO_x) в плазме крови, которую определяли путём восстановления нитратов до нитритов однократной навеской цинковой пыли, обработанной аммиачным комплексом сульфата меди, с последующим фотометрическим определением нитритов с помощью реактива Грисса при длине волны 520,0 нм на КФК – 3-01.

2.1.2 Определение активности врожденного иммунитета организма животных

О состоянии неспецифической резистентности организма животных мы судили по результатам определения следующих факторов гуморального иммунитета: бактерицидной активности сыворотки (БАС) крови, лизоцимной активности сыворотки (ЛАС) крови,

морфологическим составом крови, а также по показателям, отражающим состояние клеточного иммунитета – лейкоцитарной формуле и фагоцитарной активности нейтрофилов.

Бактерицидную активность сыворотки крови телят изучали в отношении *St. aureus* (штамм Wood 46 АТС В 4442) и *E. coli* (штамм М-17 В 2929) (Шахов А.Г. и др., 2005). Лизоцимную активность сыворотки крови телят определили в отношении *M. lisodecticus* фотоэлектроколориметрическим (Шахов А.Г. и др., 2005). Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли в отношении *E. coli* (Шахов А.Г. и др., 2005). О фагоцитарной активности нейтрофилов судили по следующим показателям: фагоцитарный индекс (ФИ) 30 – процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа после 30 – минутной инкубации, фагоцитарное число 30 – среднее число бактерий, находящихся внутриклеточно (частное от деления общего числа поглощенных бактерий на число клеток, вступивших в фагоцитоз) после 30 – минутной инкубации.

Морфологический состав крови кроликов определяли с помощью автоматического гематологического анализатора MindrayBC -2800-VET (Китай) с использованием стандартного набора реактивов.

2.1.3 Определение специфической резистентности организма животных

В исследованиях на морских свинках применяли культуры бруцелл вакцинных штамм *B. abortus* 82-Rr, *B. abortus* 19, штамм *B. abortus* R-1096, полученных из лаборатории Музея штаммов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

С целью изучения гуморального иммунитета в исследованиях применяли серологические реакции: РСК (реакция связывания комплимента) с S- и R- антигеном, РА (реакция агглютинации) и бенгал пробу (РБП) с роз – бенгал антигеном.

При постановке реакций использовали роз-бенгал и единый антигены Щелковского биокомбината, R-антиген, приготовленный в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» из штамма R – 1096. РСК, РА и РБП ставили согласно существующим наставлениям.

Через 15 суток, 1 и 2 месяца с момента прививки у 3-х животных из каждой группы брали кровь из ушной вены для проведения серологического исследования.

2.1.4 Генотипирование телят

Для экстракции ДНК из цельной консервированной крови телят использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-С-М» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Постановку ПЦР для амплификации локуса гена *iNOS* длиной 258 bp осуществляли набором реактивов «EncycloPlus PCR kit» (ЗАО «Евроген») с применением набора специфических праймеров (*iNOS-F* и *iNOS-R*).

Для детекции полученных результатов ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа применен горизонтальный электрофорез в 2,5 % агарозном геле с буфером ТВЕ (рН 8,0), содержащим

бромистый этидий, с последующим рассмотрением электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе ($\lambda=310$ нм). Размеры генерируемых фрагментов ДНК были оценены сопоставлением со стандартными маркерами молекулярного веса ДНК (ООО «Сиб Энзим»).

2.1.5 Статистическая обработка

Достоверность результатов при проведении всех экспериментальных исследований обеспечивалась достаточным количеством животных в контрольных и подопытных группах, что подтверждалось нормальностью распределения выборки по методу Колмогорова-Смирнова. Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

2.2 Результаты исследования

2.2.1 Уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) в плазме крови телят после введения иммуномодуляторов

В ходе экспериментов нами было установлено, что содержание нитрат- и нитрит-анионов в плазме крови у контрольной группы телят составляет $28,9 \pm 1,87$ мкмоль/л. В течении эксперимента у телят контрольной группы показатель не изменялся. При введении Имунофана на 5 сутки эксперимента концентрация стабильных метаболитов оксида азота (II) повышается. Так, в второй группе концентрация нитрат- и нитрит-анионов составила $42,44 \pm 4,17$ мкмоль/л, что превышает в 1,47 раза ($p < 0,01$) показатель контрольной группы; в третьей группе - $34,56 \pm 3,21$ мкмоль/л, что больше показателя контрольной группы в 1,19 раза. Следовательно, после применения Фоспренила отмечается только тенденция к повышению уровня нитрат- и нитрит-анионов. На 20 сутки после применения иммуномодуляторов уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) повышается в обеих опытных группах: во второй группе составило $45,91 \pm 2,24$ мкмоль/л (превышение в 1,59 раза ($p < 0,001$) относительно контроля), в третьей $52,97 \pm 3,96$ мкмоль/л (превышение в 1,82 раза ($p < 0,001$) относительно контроля).

Таким образом, введение Имунофана обеспечивает стабильное повышение уровня метаболитов оксида азота (II) с пятого по двадцатый день применения. Введение же Фоспренила повышает активность нитроксидазной системы только на 20 день, но при этом обеспечивает более высокий уровень нитрат- и нитрит-анионов относительно второй опытной группы.

2.2.2 Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови телят после введения иммуномодуляторов

Повышение бактерицидной активности сыворотки крови телят в отношении *St. aureus* отмечается во все сроки исследования после введения иммуномодуляторов. Во второй опытной группе показатель составил $54,62 \pm 1,85$ % (выше показателя контрольной группы в

1,36 раза, $p < 0,001$), в третьей – $65,26 \pm 1,28$ % (выше показателя контрольной группы в 1,64 раза ($p < 0,001$)). На 20 сутки эксперимента БАС продолжает повышаться: $79,78 \pm 3,5$ % против $39,88 \pm 1,9$ % в контроле ($p < 0,001$) после введения препарата «Имунофан» и $69,76 \pm 2,4$ % против $39,88 \pm 1,9$ % в контроле ($p < 0,001$) после введения препарата «Фоспренил».

Бактерицидная активность сыворотки крови телят в отношении *E. coli* на 5 сутки эксперимента повышается только после введения Фоспренила ($50,42 \pm 3,2$ % против $42,56 \pm 0,7$ % в контроле ($p < 0,05$)). При введении препарата «Имунофан» отмечается тенденция к повышению БАС. На 20 сутки после введения иммуномодуляторов БАС крови повышается в 1,83 раза ($p < 0,001$) $77,84 \pm 2,05$ % против $42,56 \pm 0,71$ % в контроле во второй опытной группе и в 2,08 раза ($p < 0,001$) $88,88 \pm 3,24$ % против $42,56 \pm 0,7$ % в контроле в третьей опытной группе.

Лизоцимная активность сыворотки (ЛАС) крови телят повышается на 20 сутки после введения Фоспренила в 1,58 раза ($p < 0,001$) $45,27 \pm 1,86$ % против $28,68 \pm 2,38$ % в контроле. В остальных опытных группах показатель достоверно не изменяется.

2.2.3 Фагоцитарная активность нейтрофилов крови телят

Фагоцитарная активность нейтрофилов является важной составляющей частью общей резистентности организма и факторов клеточного иммунитета. При однократном введении иммуномодуляторов отмечается тенденция к повышению фагоцитарной активности нейтрофилов: фагоцитарное число увеличивается после применения Имунофана на 5 сутки на 13,21 % ($p < 0,05$) ($1,74 \pm 0,08$ против $1,51 \pm 0,05$ до введения) от исходного значения, после применения Фоспренила на 9,03 % ($1,66 \pm 0,09$ против $1,51 \pm 0,05$ до введения). На 20 сутки после применения Имунофана фагоцитарное число продолжает повышаться на 22,15 % ($1,94 \pm 0,24$ против $1,51 \pm 0,05$ до введения), после применения Фоспренила на 22,96 % ($1,96 \pm 0,32$ против $1,51 \pm 0,05$ до введения).

Фагоцитарный индекс (ФИ) так же как и фагоцитарное число увеличивается после применения иммуномодуляторов. Так, после Имунофана увеличился через 5 суток на 25,99 % (в 1,35 раза) от первоначального значения (с $45,94 \pm 3,12$ % до $62,08 \pm 10,03$ %), а после применения Фоспренила на 30,73 % ($p < 0,01$) (в 1,43 раза) от первоначального значения (с $45,94 \pm 3,12$ % до $66,32 \pm 3,61$ %). Через 20 суток активность нейтрофилов на повышенном уровне сохраняется и составляет: ФИ - после применения Имунофана – $97,78 \pm 4,03$ %, что на 46,97 % ($p < 0,001$) выше первоначального показателя, а после применения Фоспренила – $77,86 \pm 3,73$ %, что на 40,99 % ($p < 0,001$) выше первоначального показателя.

Таким образом, применение иммуномодуляторов телятам приводит к повышению фагоцитарной активности нейтрофилов, бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, что коррелирует с повышением активности NO.

2.2.4 Морфологический состав крови телят

После введения препарата «Имунофан» в организме телят отмечаются следующие морфологические изменения состава крови на 5 сутки эксперимента: уровень эритроцитов в крови уменьшается в 1,27 раза ($6,81 \pm 0,28 \cdot 10^{12}/\text{л}$ против $8,65 \pm 0,56 \cdot 10^{12}/\text{л}$ в контроле, $p < 0,05$); гематокрит также уменьшается в 1,22 раза ($26,74 \pm 1,59 \%$ против $32,96 \pm 1,29 \%$ в контроле, $p < 0,05$); уровень лимфоцитов телят повышается в 1,24 раза ($59,6 \pm 1,48 \%$ против $47,6 \pm 1,1 \%$ в контроле, $p < 0,001$); палочкоядерные нейтрофилы повышаются в 1,3 раза ($6,8 \pm 0,95 \%$ против $5,2 \pm 0,42 \%$ в контроле); уровень сегментоядерных нейтрофилов понижается в 1,51 раза ($25,8 \pm 0,95 \%$ против $39,0 \pm 2,84 \%$ в контроле, $p < 0,001$).

На 20 сутки эксперимента после введения препарата «Имунофан»: количество лимфоцитов повышается ($57,0 \pm 1,3 \%$ против $47,6 \pm 1,1 \%$ в контроле, $p < 0,001$); палочкоядерных нейтрофилов увеличивается в 1,6 раза ($8,4 \pm 1,03 \%$ против $5,2 \pm 0,42 \%$ в контроле, $p < 0,05$); сегментоядерных нейтрофилов понижается в 1,41 раза ($27,6 \pm 1,14 \%$ против $39,0 \pm 2,84 \%$ в контроле, $p < 0,001$).

Анализируя изменения морфологического состава крови телят после введения препарата «Фоспренил» на 5 сутки отметили следующие изменения: количество лейкоцитов повышается в 1,2 раза ($9,5 \pm 0,24 \cdot 10^9/\text{л}$ против $7,86 \pm 0,19 \cdot 10^9/\text{л}$ в контроле, $p < 0,001$); сегментоядерных нейтрофилов понижается в 1,35 раза ($28,6 \pm 1,95 \%$ против $39,0 \pm 2,84 \%$ в контроле, $p < 0,01$); лимфоцитов повышается в 1,17 раза ($56,4 \pm 0,89 \%$ против $47,6 \pm 1,1 \%$ в контроле, $p < 0,001$).

На 20 сутки после введения препарата «Фоспренил» в организме телят отмечаются следующие морфологические изменения состава крови: количество лейкоцитов повышается в 1,29 раза ($10,12 \pm 0,11 \cdot 10^9/\text{л}$ против $7,86 \pm 0,19 \cdot 10^9/\text{л}$ в контроле); лимфоцитов повышается в 1,03 раза ($49,4 \pm 1,4 \%$ против $47,6 \pm 1,1 \%$ в контроле); моноцитов уменьшается в 1,5 раза ($3,2 \pm 0,42 \%$ против $4,8 \pm 0,55 \%$ в контроле, $p < 0,05$); уровень палочкоядерных нейтрофилов повышается в 1,73 раза ($9,0 \pm 0,61 \%$ против $5,2 \pm 0,42 \%$ в контроле, $p < 0,001$). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние иммуномодулятора «Имунофан» и «Фоспренил» на лейкоцитарную формулу крови телят (n=5)

№	Показатели ед. измерения	Контрольная группа	Опытные группы			
			II группа		III группа	
			на 5 сутки	на 20 сутки	на 5 сутки	на 20 сутки
1	LYM(лимфоциты), %	47,6±1,1	59,6±1,48***	57,0±1,3***	56,4±0,89***	49,4±1,4
2	Палочкоядерные нейтрофилы, %	5,2±0,42	6,8±0,95	8,4±1,03*	6,6±0,91	9,0±0,61***
3	Сегментоядерные нейтрофилы, %	39,0±2,84	25,8±0,95***	27,6±1,14***	28,6±1,95**	35,0±1,26
4	ЕО(эозинофилы),%	2,2±0,55	1,6±0,27	1,8±0,22	2,0±0,35	2,0±0,35
5	BAS(базофилы),%	1,2±0,22	1,8±0,42	1,4±0,27	1,4±0,27	1,4±0,27
6	MON(моноциты), %	4,8±0,55	4,4±0,76	3,8±0,65	5,0±0,35	3,2±0,42*

Примечание: * – достоверно по сравнению с контрольной группой (p<0,05)

** – достоверно по сравнению с контрольной группой (p<0,01)

*** – достоверно по сравнению с контрольной группой (p<0,001)

Таким образом, установлена зависимость между уровнем стабильных метаболитов оксида азота (II) и общим количеством лейкоцитов в крови. Повышение количества лейкоцитов крови обусловлено повышением количества палочкоядерных нейтрофилов. Этот факт доказывает участие NO в механизмах врожденного иммунитета за счет повышения активности нейтрофилов.

2.2.5 Уровень нитрат- и нитрит-анионов в плазме крови кроликов после введения иммуномодулятора «Имунофан»

В ходе экспериментов было установлено, что содержание нитрат- и нитрит-анионов в плазме крови у контрольной группы здоровых кроликов составляет 44,84±1,32 мкмоль/л. В опытной группе кроликов, которым вводили препарат «Имунофан», суммарный уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) на 5 сутки составил 61,87±2,07 мкмоль/л, что превышает в 1,38 раза (p<0,001) аналогичный показатель контрольной группы. На 15 сутки уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) составил 67,46±3,78 мкмоль/л, что также превышает показатель контроля в 1,5 раза (p<0,001).

2.2.6 Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови кроликов

Показатель бактерицидной активности сыворотки крови в отношении *S. aureus* у кроликов на 5 сутки после введения «Имунофана» составил 40,16±3,72 % (p<0,05) (ниже показателя контрольной группы в 1,2 раза), на 15 сутки - 71,09±0,73 % (p<0,01) (выше показателя контрольной группы в 1,46 раза). Показатель бактерицидной активности

сыворотки крови в отношении *E. coli* у кроликов на 5 сутки после введения Имунофана составил $49,98 \pm 7,97$ % (выше показателя контрольной группы в 1,02 раза), на 15 сутки – $49,23 \pm 14,66$ % (выше показателя контрольной группы в 1,01 раза).

Лизоцимная активность сыворотки крови кроликов на 5 сутки после применения Имунофана составила $24,73 \pm 7,68$ %, что на 40,1 % ниже показателя контрольной группы, на 15 сутки составила $26,65 \pm 4,42$ %, что на 30,01 % также ниже показателя контрольной группы.

2.2.7 Фагоцитарная активность нейтрофилов крови кроликов

При однократном введении иммуномодулятора «Имунофан» у кроликов отмечается тенденция к повышению фагоцитарной активности нейтрофилов: фагоцитарное число увеличивается на 5 сутки на 2,67 % ($1,5 \pm 0,1$ против $1,46 \pm 0,05$ до введения) от исходного значения, на 15 сутки фагоцитарное число продолжает повышаться на 14,61 % ($1,71 \pm 0,08$ против $1,46 \pm 0,05$ до введения, $p < 0,05$) от исходного значения.

Фагоцитарный индекс (ФИ) также как и фагоцитарное число увеличивается после применения иммуномодулятора «Имунофан». Так, ФИ на 5 сутки увеличился на 24,86 % (1,32 раза) от первоначального значения (с $36,25 \pm 3,68$ % до $48,25 \pm 5,75$ %), на 15 сутки составил $38,0 \pm 3,08$ %, что на 4,6 % выше первоначального показателя (с $36,25 \pm 3,68$ % до $38,0 \pm 3,09$ %).

Введение иммуномодулятора приводит к повышению фагоцитарной активности нейтрофилов у кроликов.

2.2.8 Морфологический состав крови кроликов

После введения препарата «Имунофан» в организме кроликов отмечаются следующие морфологические изменения состава крови на 5 сутки эксперимента: уровень лейкоцитов в крови увеличивается в 1,08 раза ($9,64 \pm 0,39 \cdot 10^9/\text{л}$ против $8,92 \pm 0,21 \cdot 10^9/\text{л}$ в контроле); уровень лимфоцитов кроликов повышается в 1,21 раза ($43,8 \pm 1,41$ % против $35,86 \pm 0,87$ % в контроле, $p < 0,001$); количество тромбоцитов повышается в 1,17 раза ($304,0 \pm 11,75 \cdot 10^9/\text{л}$ против $260,28 \pm 22,6 \cdot 10^9/\text{л}$ в контроле); уровень тромбокриты повышается в 1,01 раза ($34,98 \pm 0,94$ % против $34,6 \pm 1,13$ % в контроле); количество сегментоядерных нейтрофилов понижается в 1,18 раза ($41,2 \pm 3,8$ % против $48,4 \pm 5,2$ % в контроле).

На 15 сутки эксперимента после введения препарата «Имунофан»: уровень лейкоцитов в крови увеличивается в 1,16 раза ($10,4 \pm 0,36 \cdot 10^9/\text{л}$ против $8,92 \pm 0,21 \cdot 10^9/\text{л}$ в контроле, $p < 0,001$); уровень лимфоцитов кроликов повышается в 1,5 раза ($54,0 \pm 0,96$ % против $35,86 \pm 0,87$ % в контроле, $p < 0,001$); количество тромбоцитов повышается в 1,49 раза ($387,8 \pm 29,19 \cdot 10^9/\text{л}$ против $260,28 \pm 22,6 \cdot 10^9/\text{л}$ в контроле, $p < 0,01$); уровень тромбокриты повышается в 1,2 раза ($41,56 \pm 1,43$ % против $34,6 \pm 1,13$ % в контроле, $p < 0,001$); количество

сегментоядерных нейтрофилов понижается в 1,86 раза ($25,8 \pm 1,6$ % против $48,4 \pm 5,2$ % в контроле, $p < 0,001$). Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние иммуномодулятора «Имунофан» на лейкоцитарную формулу крови кроликов (n=5)

№	Показатели ед. измерения	Контрольная группа	Опытная группа	
			на 5 сутки	на 15 сутки
1	LYM(лимфоциты),%	$35,86 \pm 0,87$	$43,8 \pm 1,41$ ***	$54,0 \pm 0,96$ ***
2	Палочкоядерные нейтрофилы, %	$5,0 \pm 1,46$	$4,0 \pm 0,35$	$4,2 \pm 0,42$
3	Сегментоядерные нейтрофилы, %	$48,4 \pm 5,2$	$41,2 \pm 3,8$	$25,8 \pm 1,6$ **
4	ЕО(эозинофилы),%	$4,6 \pm 1,03$	$5,6 \pm 0,43$	$7,8 \pm 0,42$ *
5	ВАС(базофилы),%	$1,6 \pm 0,26$	$2,0 \pm 0,34$	$2,6 \pm 0,26$ *
6	MON(моноциты), %	$4,6 \pm 0,56$	$4,2 \pm 0,95$	$5,6 \pm 1,24$

Примечание: * – достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

** – достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$)

*** – достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$)

2.2.9 Уровень нитрат- и нитрит-анионов в плазме крови морских свинок при активации системы врожденного иммунитета вакцинацией

У морских свинок, иммунизированных вакцинами *B. abortus* 82-Rr и *B. abortus* R-1096 образование оксида азота (II) происходит интенсивнее в сравнении с контрольной группой. Так, у контрольной группы в крови морских свинок уровень метаболитов NO составил $28,18 \pm 1,9$ мкмоль/л. В группе животных вакцинированных вакциной штамма *B. abortus* 82-Rr на 15 сутки уровень метаболитов NO составил $41,81 \pm 3,27$ мкмоль/л, а на 60 сутки $62,42 \pm 3,71$ мкмоль/л. Сравнивая средние значения NO морских свинок вакцинированных на 15 сутки и на 60 сутки, можно сделать вывод: на 60 сутки активность NO в 1,49 раза ($p < 0,001$) больше, чем на 15 сутки после вакцинации.

Уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) нитрит- и нитрат- анионов на 15 сутки после вакцинации культурой штамма *B. abortus* R-1096 составляет $46,69 \pm 1,72$ мкмоль/л, а на 60 сутки $41,51 \pm 2,43$ мкмоль/л. Наибольшее содержание активных метаболитов приходится на 15 сутки после вакцинации в сравнении с контрольной группой больше на 65,57% ($p < 0,001$), а в сравнении с группой вакцинированных животных через 60 суток на 11,03% ($p < 0,01$).

Иммунизация S-формой противобруцеллезной вакцины *B. abortus* 19 не вызывает повышения нитрит- и нитрат - анионов в сыворотке крови морских свинок.

2.2.10 Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови морских свинок

Бактерицидная активность сыворотки крови морских свинок в отношении *E. coli* на 15 сутки после вакцинации штаммом *B. abortus* R-1096 составила $66,47 \pm 14,2$ % (ниже показателя контрольной группы в 1,34 раза), на 60 сутки – $81,92 \pm 4,23$ % (выше показателя контрольной группы в 1,67 раза, $p < 0,001$).

БАС крови морских свинок в отношении *E. coli* на 15 сутки после вакцинации штаммом *B. abortus* 82-Rг повышается: $65,11 \pm 15,36$ % против $49,17 \pm 15,36$ % в контроле, а на 60 сутки отмечена тенденция к понижению – $54,62 \pm 27,32$ % против $49,17 \pm 15,36$ % в контроле. БАС крови морских свинок в отношении *E. coli* на 60 сутки уменьшается – $45,82 \pm 11,78$ % (ниже показателя контрольной группы в 1,06 раза).

Лизоцимная активность сыворотки крови морских свинок в отношении *Micrococcus lisodecticus* привитых штаммом *B. abortus* R-1096 повышается на 15 сутки в 1,26 раза ($22,25 \pm 9,64$ % против $17,68 \pm 9,5$ % в контроле), на 60 сутки ЛАС крови также повышается в 2,24 раза ($39,56 \pm 1,66$ % против $17,68 \pm 9,5$ % в контроле, $p < 0,05$).

Лизоцимная активность сыворотки крови морских свинок привитых штаммом *B. abortus* 82-Rг на 15 сутки в 1,69 раза и на 60 сутки в 1,94 раза увеличивается по сравнению с контрольной группой ($30,0 \pm 3,54$ % и $34,26 \pm 16,34$ % против $17,68 \pm 9,5$ % в контроле).

Таким образом, лизоцимная активность сыворотки крови морских свинок в отношении *Micrococcus lisodecticus* повышается во всех группах во все сроки исследования при вакцинации R-формами вакцины. Наибольшее повышение отмечается на 60 день после вакцинации.

2.2.11 Фагоцитарная активность нейтрофилов крови морских свинок

После вакцинации штаммом *B. abortus* R-1096 у морских свинок на 15 сутки отмечается тенденция к повышению фагоцитарной активности нейтрофилов: фагоцитарное число увеличивается на 5 сутки на 6,37 % ($1,41 \pm 0,15$ против $1,32 \pm 0,05$ до введения) от исходного значения, на 60 сутки фагоцитарное число уменьшается на 1,54 % ($1,3 \pm 0,04$ против $1,32 \pm 0,05$ до введения) от исходного значения.

Фагоцитарный индекс (ФИ) на 15 сутки у морских свинок привитых штаммом *B. abortus* R-1096 увеличился на 45,38 % (в 1,82 раза) ($p < 0,001$) от первоначального значения (с $31,4 \pm 4,81$ % до $57,5 \pm 0,32$ %), на 60 сутки также увеличился и составил $51,75 \pm 6,54$ % что на 60,66 % ($p < 0,05$) выше первоначального показателя (с $31,4 \pm 4,81$ % до $51,75 \pm 6,54$ %).

После вакцинации штаммом *B. abortus* 82-Rг у морских свинок на 15 сутки отмечается тенденция к повышению фагоцитарной активности нейтрофилов: фагоцитарное число увеличивается на 15 сутки на 10,81 % ($1,49 \pm 0,16$ против $1,32 \pm 0,05$ до введения) от исходного

значения, на 60 сутки фагоцитарное число повышается на 10,81 % ($1,48 \pm 0,16$ против $1,32 \pm 0,05$ до введения) от исходного значения. Фагоцитарный индекс (ФИ) у морских свинок также как и фагоцитарное число увеличивается после вакцинации штаммом *B. abortus* 82-Rr. На 15 сутки на 47,4 % (1,9 раза) ($p < 0,001$) от первоначального значения ($31,4 \pm 4,82$ % до $59,67 \pm 2,04$ %), на 60 сутки ФИ составил $45,75 \pm 3,5$ %, что на 31,37 % ($p < 0,05$) выше первоначального показателя (с $31,4 \pm 4,82$ % до $45,75 \pm 3,5$ %).

После вакцинации штаммом *B. abortus* 19 у морских свинок на 15 сутки фагоцитарное число уменьшается на 7,31 % ($1,23 \pm 0,06$ против $1,32 \pm 0,05$ до введения) от исходного значения, на 60 сутки фагоцитарное число увеличивается на 10,2 % ($1,47 \pm 0,05$ против $1,32 \pm 0,05$ до введения) от исходного значения. Фагоцитарный индекс (ФИ) у морских свинок после вакцинации штаммом *B. abortus* 19 на 15 сутки имеет тенденцию к снижению в 1,16 раза, на 60 сутки в 1,24 раза в сравнении с контрольной группой.

2.2.12 Серологические исследования морских свинок в разные сроки после иммунизации

Серологические исследования морских свинок, иммунизированных культурой из штамма *B. abortus* 82-Rr показали, что, ни одно животное, ни в одной реакции с S-антигеном (РБП, РА, РСК) не дало положительного результата. Тогда как РСК с R-антигеном говорит о сильно выраженном иммунном ответе. Так, на 15 сутки после вакцинации у морских свинок титр антител был $1,3 \pm 0,0$ Ig, на 30 сутки у них достиг самого высокого титра, который составил $1,7 \pm 0,12$ Ig, а на 60 сутки снизился до $1,3 \pm 0,0$ Ig. Из таблицы 5 видно, что морские свинки, привитые культурой из штамма 19, через 15 суток после иммунизации реагировали положительно в РБП, РА и РСК с S-антигеном, РСК с R- антигеном была отрицательной. На 30 сутки титры антител в РА и РСК с S-антигеном соответственно составили $1,4 \pm 0,12$ Ig. Максимальный титр антител в РСК с S-антигеном был на 60 сутки который равнялся $1,6 \pm 0,0$ Ig, а в РА – $1,3 \pm 0,0$ Ig, РБП была также положительной, тогда как РСК с R-антигеном – отрицательной. Данные в третьей группе свидетельствуют о том, что ни одно животное, ни в одной реакции с S-антигеном не дало положительного результата. А в РСК с R-антигеном реагировали в титре $1,8 \pm 0,0$ Ig. Через 1 месяц после вакцинации показатели серологических реакции с S-антигенами, так же, как и через 15 суток были отрицательными у всех животных этой группы. В РСК с R-антигеном титры антител возросли – $93,3 \pm 35,9$.

2.2.13 Определение аллельного полиморфизма гена *iNOS* телят относительно маркера АН13-1

На первом этапе апробировали ПЦР с разными режимами термоциклирования. Полученная, в результате реакции, электрофореграмма ПЦР-амплификации гена *iNOS* представлена на (рисунок 1).

*Hinf*I-ПДРФ-анализ генерируемых генотип-специфичных фрагментов ($AA=258/192/66$ bp, $BB=258$ bp и $AB=192/66$ bp) обеспечивает корректную процедуру генетического тестирования исследуемых образцов (рисунок 2).

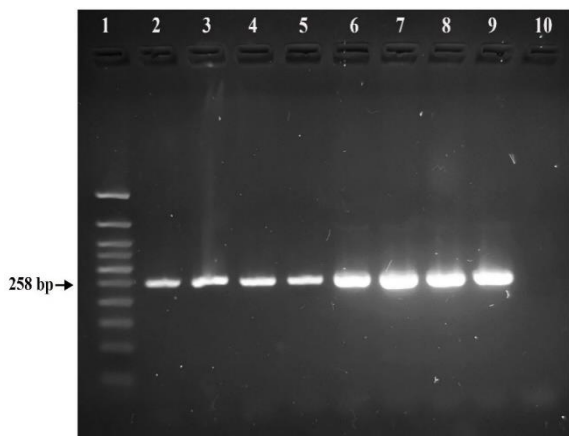


Рисунок 1 – Электрофореграмма результата ПЦР-амплификации

Обозначения: 1. ДНК-маркеры 50 bp + 50 bp; 2-4. ПЦР-пробы, амплифицированные с режимом отжига праймеров 63°C; 6-9. ПЦР-пробы, амплифицированные с режимом отжига праймеров 64°C; 10. Отрицательный контроль

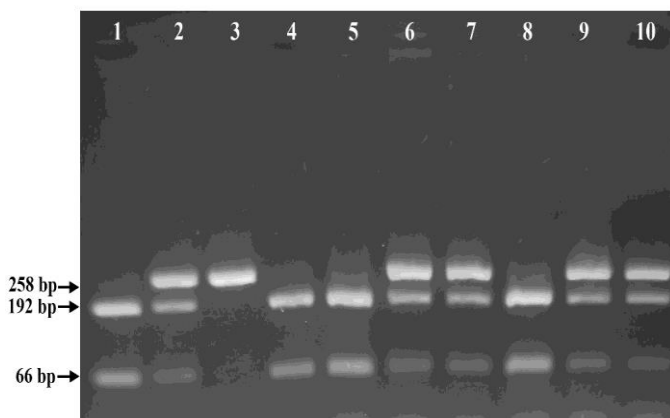


Рисунок 2 – Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ-анализа по аллельным вариантам А и В гена *iNOS*

Обозначения: 1-10. ПЦР-ПДРФ профили: 1, 4, 5, 8 – генотип *AA*; 3 – генотип *BB*; 2, 6, 7, 9, 10 – генотип *AB*

Как видно из электрофореграммы рисунка 1, применение в реакции режима отжига праймеров 63-64 °C обеспечивает сравнительно высокий выход специфичного ПЦР-продукта длиной 258bp без образования шмеров и неспецифики.

Распределение телят по генотипам полиморфного маркера АН13-1 гена *iNOS* было следующим: *AA* – 11 гол. (22 %), *AB* – 38 гол. (76 %), *BB* – 1 гол. (2 %). Частота аллеля *A* составила 0,6, аллеля *B* – 0,4 (таблица 3).

Таблица 3 – Аллельный полиморфизм гена *iNOS* у исследуемой выборки телят

Телята	n = 50 гол.	Частота встречаемости						χ^2		
		генотипов				аллелей				
		AA		AB		BB			A	B
		n	%	n	%	n	%			
Н	11	22	38	76	1	2	0,6	0,4	10,01	
О	18	36	24	48	8	16				

Примечание: Н- наблюдаемое, О-ожидаемое.

2.2.14 Уровень нитрат - и нитрит – анионов в плазме крови телят с генотипами AA и AB по гену *iNOS*

В ходе экспериментов было установлено, что содержание нитрат- и нитрит-анионов в крови у телят первой группы с генотипом AA составляет $83,48 \pm 6,73$ мкмоль/л; суммарный уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) в крови у телят второй группы с генотипом AB составил $66,86 \pm 2,09$ мкмоль/л, что ниже в 1,25 раза ($p < 0,05$) аналогичного показателя первой группы (рисунок 3).

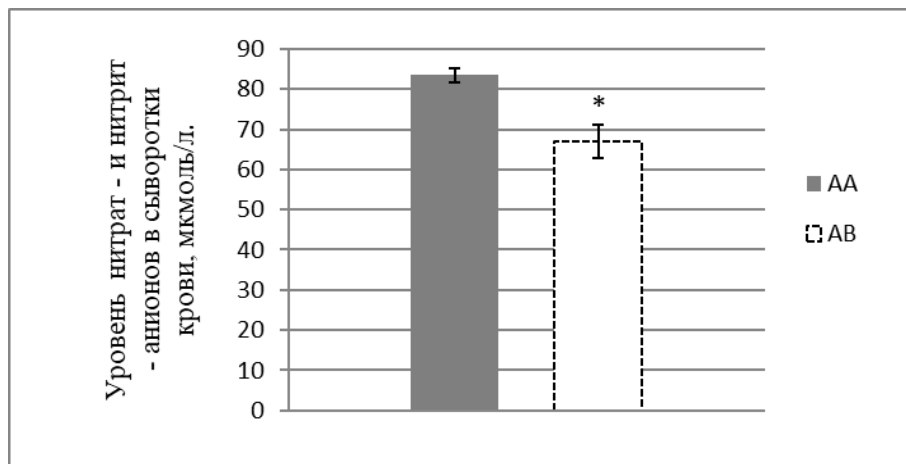


Рисунок 3 – Уровень нитрат- и нитрит-анионов в сыворотки крови телят, мкмоль/л

Примечание: * – достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)

2.2.15 Активность системы врожденного иммунитета организма телят с генотипами AA и AB по гену *iNOS*

У телят с генотипом AA показатель бактерицидной активности сыворотки крови в отношении *S. aureus* составил $53,65 \pm 3,29$ %, что в 1,25 раза ($p < 0,05$) ниже показателя телят с генотипом AB.

Бактерицидная активность сыворотки крови телят в отношении *E. coli* у телят с генотипом AA составила $78,05 \pm 3,27$ %, а у телят с генотипом AB $68,71 \pm 2,42$ %, что в 1,14 раза ($p < 0,05$) меньше. Исследования БАС крови телят показали, что активность в отношении *E. coli* в группе телят с генотипом AA выше. Лизоцимная активность сыворотки крови телят с

генотипом *AA* составляет $43,48 \pm 1,47$ %, у телят с генотипом *AB* $31,02 \pm 1,22$ %, что в 1,4 раза меньше ($p < 0,001$). У телят с генотипом *AA* фагоцитарное число активности нейтрофилов составило 1,92, также как и у телят с генотипом *BB*. При исследовании фагоцитарного индекса установлено: у телят с генотипом *AA* количество активных нейтрофилов участвующих в фагоцитозе составило 43,03 %, что в 1,38 раза ($p < 0,05$) больше, чем у телят с генотипом *AB*. Таким образом, клеточный иммунитет выше у телят в группе с генотипом *AA*.

3 Заключение

Активность системы врожденного иммунитета при введении иммуномодуляторов положительно коррелирует с активностью системы оксида азота (II). Выявленный аллельный полиморфизм гена *iNOS* относительно маркера АН13-1 позволил установить зависимость активности врожденного иммунитета от генотипа по этому гену. В ходе работы были сделаны следующие выводы:

1. Введение иммуномодуляторов обеспечивает стабильное повышение уровня метаболитов оксида азота (II) у телят: на пятые сутки после введения Имунофана в 1,47 раза ($p < 0,01$), на двадцатые сутки - в 1,59 раза ($p < 0,01$); на 20 сутки после введения Фоспренила - в 1,82 раза ($p < 0,01$); у кроликов – на 15 сутки в 1,5 раза ($p < 0,001$).

2. Повышение активности врожденного иммунитета организма телят при введении иммуномодуляторов коррелирует с повышением активности системы NO. БАС крови повышается в отношении *S. aureus* после применения Имунофана, на 20 сутки в 1,64 раза ($p < 0,001$); после применения Фоспренила - в 1,74 раза ($p < 0,01$); в отношении *E. coli* - в 1,83 раза ($p < 0,001$), и в 2,08 раза ($p < 0,001$) соответственно. Фагоцитарная активности нейтрофилов повышается на 20 сутки после применения Имунофана в 2,12 раза ($p < 0,001$), после применения Фоспренила в 1,69 раза ($p < 0,001$).

3. Вакцинация морских свинок способствует повышению стабильных метаболитов оксида азота (II) на 60 сутки после введения вакцинного штамма *B. abortus* 82-Rr в 2,21 раза ($p < 0,001$); *B. abortus* 1096 - в 1,47 раза ($p < 0,05$).

4. Фагоцитарная активность нейтрофилов повышается на 15 сутки при введении вакцинного штамма *B. abortus* 82-Rr в 1,82 раза ($p < 0,001$); *B. abortus* 1096 в 1,82 раза ($p < 0,001$); на 60 сутки активность клеток продолжает повышаться при вакцинации *B. abortus* 82-Rr в 1,45 раза ($p < 0,05$); *B. abortus* 1096 в 1,64 раза ($p < 0,05$). Иммунизация S-формой противобруцеллезной вакцины (*B. abortus* 19), которая является высокоиммуногенной, не вызывает повышения уровня нитрат- и нитрит-анионов в сыворотке крови.

5. Оптимизирован способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования телят по гену *iNOS*, подобран оптимальный режим отжига праймеров $63-64^{\circ}\text{C}$ который обеспечивает сравнительно высокий выход специфичного ПЦР-продукта длиной 258bp.

6. Распределение телят по генотипам полиморфного маркера АН13-1 гена *iNOS* было следующим: *AA* – 22 %, *AB* – 76 %, *BB* – 2 %.

7. Содержание нитрат- и нитрит-анионов в крови у телят с генотипом *AA* выше в 1,25 ($p < 0,05$), чем у телят с генотипом *AB*.

8. Телята с генотипом *AA* по гену *iNOS* обладают более высоким врожденным иммунитетом относительно телят с генотипом *AB*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Оптимизированный способ ПЦР-ПДРФ может быть рекомендован для генотипирования крупного рогатого скота с целью получения животных с повышенной активностью врожденного иммунитета.

2. Определение уровня стабильных метаболитов оксида азота (II) можно рекомендовать в качестве маркера активности системы врожденного иммунитета при диагностике и терапии различных патологий.

3. Полученные результаты могут быть использованы для чтения лекций и проведения лабораторных занятий по физиологии и иммунологии.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. Тухватуллина, Л.А. Влияние препаратов «Имунофан» и «Фоспренил» на морфологический состав крови телят / Л.А. Тухватуллина, Р.Г. Каримова // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Том. 247 (III). – С. 262-266.

2. Тухватуллина, Л.А. Влияние иммуномодуляторов на неспецифическую резистентность и образование оксида азота (II) в организме телят / Л.А. Тухватуллина, Р.Г. Каримова // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2021. – Том. 247 (III). – С. 267-272.

3. Тухватуллина, Л.А. Активность нитроксидергической системы при иммунизации кроликов вакциной из штамма *B. abortus* 82 / Л.А. Тухватуллина, Р.Г. Каримова, М.А. Косарев, Г.М. Сафина, Я.А. Богова, Р.Ю. Насибуллин // Ветеринарный врач. – 2021. – №5. – С. 49-54.

Статьи в научных изданиях, входящих в базу данных Web of Sciece

1. Tukhvatullina L. A. Comparative activity of the nitric oxide (II) system the process of developing of an immune response in guinea pigs after injection of anti-brucellosis vaccines / L. A. Tukhvatullina, M. A. Kosarev, Y. A. Bogova, G. M. Safina, R. Y. Nasibullin, A. K. Gabbasova, R. G. Karimova // Bioscience Biotechnology Research Communications. – 2021. – 14 (9). – P. 15-19.

В других научных изданиях

1. **Галимова Л.А.** Образование NO в организме разных видов животных в норме и патологии / **Л.А. Галимова** // Сбор. материалов межвузовского ежегодного конкурса студенческих научно-исследовательских работ «Студент исследователь» по медико-биологическим и естественнонаучным дисциплинам. – 2016. – С. 143-145.

2. Давыдова Д.Д. Активность нитроксидергической системы при применении иммуномодулятора у больных бронхопневмонией телят / Д.Д. Давыдова, А.А. Белова, **Л.А. Тухватуллина** // Сборник материалов международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК». – 2019. – С. 34–36.

3. Хусаинова А.М. Влияние использования иммуномодулятора «Имунофан» на интенсивность образования оксида азота у телят при диспепсии / А.М. Хусаинова, **Л.А. Тухватуллина** // Сбор. материалов международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК», посвященная 90-летию образования Казанской зоотехнической школы. – 2020. – Т. 1. – С. 178–180.

4. Юсупова А.А. Влияние вакцины против нодулярного дерматита на нитроксидергическую систему коров / А.А. Юсупова, **Л.А. Тухватуллина** // Сбор. материалов международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК», посвященная 90-летию образования Казанской зоотехнической школы. – 2020. – Т. 1. – С. 199–201.

5. **Тухватуллина, Л.А.** Динамика концентрации стабильных метаболитов оксида азота (II) и морфологического состава крови кроликов при применении препарата «Имунофан» / **Л.А. Тухватуллина** // Сборник статей XII Международной научно-практической конференции «Фундаментальная и прикладная наука: состояние и тенденции развития». – 2021. – С. 373-379.

6. Каримова Р.Г. Содержание стабильных метаболитов оксида азота (II) в крови морских свинок при формировании иммунного ответа на введение противобруцеллезных вакцин / Р.Г. Каримова, **Л.А. Тухватуллина** // Тезисы докладов Международной юбилейной конференции, посвященной 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете. – 2021. – С. 45.