

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Кляпнева Андрея Владимировича на диссертационную работу Тухватуллиной Лилии Альбертовны на тему «Уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) при активации системы врожденного иммунитета и в зависимости от полиморфизма гена *iNOS*», представленную к защите в диссертационный совет Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология

Актуальность темы. Оксид азота (II) - высоко реактивное соединение, участвующее в физиологических и патофизиологических процессах. Оно вызывает расслабление гладких мышц сосудов, является нейромедиатором, регулирует программируемую гибель и пролиферацию клеток, играет важную роль в секреторной и репродуктивной системе. Оксид азота является важным компонентом иммунной системы. Он образуется нейтрофилами, макрофагами, моноцитами, лимфоцитами, оказывая цитотоксическое, антибактериальное, противовирусное, противогрибковое действие. Его синтез происходит в ходе окислительной реакции под действием нитроксидсинтазы (NOS). Под влиянием иммуногенных и противовоспалительных стимулов происходит экспрессия гена, ответственного за синтез *iNOS*, после чего образуется большое количество оксида азота, который оказывает мощное повреждающее действие на проникающие в организм чужеродные клетки, осуществляя защитную функцию. Однако, до сих пор не существует четких представлений о клеточно-опосредованном влиянии оксида азота (II) на механизмы иммунитета, поэтому, выявление его роли в регуляции системы иммунитета является актуальным в теоретическом и практическом отношении.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Научные положения, представленные к защите в диссертационном совете, выводы и рекомендации сформулированы автором на основании проведенных экспериментальных исследований на телятах голштино-фризской породы, кроликах породы Ризен и морских свинках. 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». 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.).

Основой методологии явилась научная постановка проблемы изучения роли оксида азота (II) в регуляции системы врожденного иммунитета. В процессе проведения исследований использовались физиологические, морфологические, бактериологические и генетические методы исследования, которые включали в себя серологические и бактериологические исследования, гематологический анализ крови, ПЦР диагностику. Цифровой материал сведен в таблицы и подвергнут статистической обработке. Заключение, выводы и практические рекомендации диссертационной работы, аргументировано отражающие ее основные научные положения, являются обоснованными и достоверными.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций. Автором 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 63-64 °C который обеспечивает сравнительно высокий выход специфичного 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*.

Полученные диссертантом научные результаты, репрезентативны и достоверны, статистически обработаны. Экспериментальные результаты получены с помощью современных методик и на сертифицированном оборудовании.

Ценность для науки и практической деятельности, проведенной соискателем 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 автором 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.

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, что свидетельствует об их широкой апробации.

Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о присуждении ученых степеней», формуле и паспорту специальностей. Автореферат отражает основные разделы диссертации, содержит заключение, выводы и практические рекомендации, раскрывает ее научные

положения. Диссертация и автореферат в полной мере соответствуют критериям «Положения о присуждении ученых степеней».

Диссертационная работа соответствует формуле и паспорту специальности 03.03.01 – Физиология, а именно пунктам 3 – «Исследование закономерностей функционирования основных систем организма (нервной, иммунной, сенсорной, двигательной, крови, кровообращения, лимфообращения, дыхания, выделения, пищеварения, размножения, внутренней секреции и др.)» и 6 – «Изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации».

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, репрезентативность эмпирического материала. 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%.

Грамотное толкование полученных результатов придает исследованиям завершённый характер, свидетельствует об их полноте и научной обоснованности, профессиональной зрелости соискателя. Материалы диссертационной работы рекомендуется использовать и внедрять в сельскохозяйственных предприятиях. Полученные результаты могут быть использованы для чтения лекций и проведения лабораторных занятий по физиологии и иммунологии.

Оценка оформления, содержания и завершенности работы. Диссертационная работа Тухватуллиной Лилии Альбертовны изложена на 114 страницах компьютерного текста и включает: введение (6 с.), обзор литературы (20 с.), основную часть (47 с.), заключение (5 с.), выводы (1 с.) практические предложения (1 с.), список сокращений и условных обозначений (1 с.), список использованной литературы (29 с.). Работа иллюстрирована 8 таблицами, 36 рисунками. Список литературы включает 247 источников, в том числе 160 – зарубежных авторов.

Во «Введении» (С. 5-10), которое повторяется на С.3-7 автореферата, даны сведения об актуальности темы исследования; степени разработанности темы, цели и задачах исследований; научной новизне; теоретической и практической значимости работы; методологии и методах исследования; основных положениях, выносимых на защиту; степени достоверности и апробации результатов; объеме и структуре диссертации. Цель и вытекающие из нее задачи четко сформулированы, полностью реализованы в работе и нашли своё отражение в положениях, выносимых на защиту, а также в заключении диссертации.

Обзор литературы (С. 11-30) содержит данные отечественных и зарубежных исследователей по теме диссертации, в частности о физиологической роли оксида азота (NO) в организме; физико-химических свойствах индуцибельной NO-синтазы оксида азота (NO) *iNOS*; роли NO в системе иммунитета; роли оксида азота (NO) в реакциях специфического и неспецифического иммунитета; активности системы оксида азота (NO) при вакцинации; изменении активности NO-системы при введении в организм иммуномодуляторов. Представленный материал раскрывает широкую научную эрудицию автора, вводит читателя в курс изучаемой проблемы и определяет актуальность темы.

В разделе диссертации «Материалы и методы исследований» (С. 31-36) описаны условия, место проведения опытов, объекты исследований, даны схемы проведения опытов. Для проведения исследований в работе использованы телята, морские свинки, кролики. Телята были разделены на 3 группы: первая группа: контрольная – клинически здоровые телята (n=5); вторая группа: опытная – телята после введения иммуномодулятора в дозе 1 мл подкожно согласно инструкции по применению «Имунофан» – (n=5); третья группа: опытная – телята после введения иммуномодулятора «Фоспренил» в дозе 1 мл подкожно согласно инструкции по применению – (n=5).

Исследования по оценке аллельного полиморфизма генов *iNOS* проводили на выборке из 50 телят. После ПЦР-диагностики телята были отобраны по 10 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: контрольная (n=5); вторая группа: иммунизировали вакциной из штамма *B. abortus* 82-Rr подкожно в область левого паха в дозе 1,5 млрд.м.к. по ОСО ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича на фосфатном забуференном физиологическом растворе в объеме 1 мл (n=5); третья группа: вакцинировали штаммом *B. abortus* 19 подкожно в область паха в дозе 1 млрд. м. к. объеме 1 мл (n=5); четвертая группа: вакцинировали штаммом *B. abortus* R-1096 подкожно в область паха в дозе 1,5 млрд.м.к. в объеме 1 мл (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 производилось из яремной вены с помощью индивидуальной вакуумной системы в 8-9 часов утра; у морских свинок из

ушной вены с помощью надреза в 8-9 часов утра; у кроликов из ушной вены с помощью иглы в 8-9 часов утра.

Изучалось содержание стабильных метаболитов оксида азота (II), бактерицидной активности сыворотки (БАС) крови, лизоцимной активности сыворотки (ЛАС) крови, фагоцитарной активности нейтрофилов, выведение лейкоцитарной формулы; проводили РСК (реакцию связывания комплимента) с S- и R- антигеном, РА (реакцию агглютинации) и бенгал пробу (РБП) с роз – бенгал антигеном. Автор четко и конкретно описывает применяемые методы исследований и способы статистической обработки результатов. Этот раздел свидетельствует о достаточном количестве экспериментального материала, адекватности выбранных методик для решения поставленных задач исследования.

Раздел «Результаты исследования» (С. 39-77) автор начинает с изучения уровня стабильных метаболитов оксида азота (II) в плазме крови телят после введения иммуномодуляторов. Автором установлено, что введение Имунофана обеспечивает стабильное повышение уровня метаболитов оксида азота (II) с пятого по двадцатый день применения. Введение Фоспренила повышает активность нитроксидергической системы только на 20 день, но при этом обеспечивает более высокий уровень нитрат- и нитрит-анионов.

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 активность нейтрофилов повышается на 20 сутки после применения Имунофана в 2,12 раза ($p < 0,001$), после применения Фоспренила в 1,69 раза ($p < 0,001$).

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 ($p < 0,05$).

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.

Диссертантом оптимизирован способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования телят по гену *iNOS*, подобран оптимальный режим отжига

праймеров 63-64°C, который обеспечивает сравнительно высокий выход специфичного ПЦР-продукта длиной 258bp.

Распределение телят по генотипам полиморфного маркера AN13-1 гена *iNOS* было следующим: AA - 22%, AB - 76%, BB - 2%. Содержание нитрат- и нитрит-анионов в крови у телят с генотипом AA выше в 1,25 раза ($p < 0,05$), чем у телят с генотипом AB. Телята с генотипом AA по гену *iNOS* обладают более высоким врожденным иммунитетом относительно телят с генотипом AB.

Заключение (С.78-83) диссертации вытекает из данных собственных исследований, 8 выводов и 3 практические предложения являются логичными ответами на поставленные задачи.

Практические предложения научно обоснованы и являются логическим завершением работы. Диссертация написана хорошим литературным языком, почти не содержит стилистических и иных ошибок. Автореферат диссертации (объемом 1 усл. печ. л.) достаточно полно отражает основное содержание диссертационной работы.

Публикации по теме работы. 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.

Оценивая диссертационную работу Тухватуллиной Лилии Альбертовны положительно, хотелось бы получить ответы на вопросы, возникшие в ходе ознакомления с диссертацией и авторефератом:

1. Чем обусловлен выбор препаратов Имунофан и Фоспренил для проведения опытов?
2. В каком возрасте телятам вводили препараты Имунофан и Фоспренил?
3. Изменялись ли показатели бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа у телят контрольной группы на протяжении опыта?
4. Каковы механизмы действия препаратов Имунофан и Фоспренил?

Приведенные вопросы не снижают научной и, особенно, практической ценности диссертационной работы, которая написана хорошим литературно-профессиональным языком, аккуратно оформлена и удачно завершена по замыслу и результатам.

Заключение:

Диссертационная работа Тухватуллиной Лилии Альбертовны на тему «Уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) при активации системы врожденного иммунитета и в зависимости от полиморфизма гена *iNOS*»

является целостным, завершенным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком методическом уровне, с применением современных методов исследований. Она является важной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований содержится решение актуальной для ветеринарии и физиологии научной задачи – роли оксида азота (II) в механизмах иммунитета животных.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, публикациям, в которых изложены основные научные результаты, теоретической и практической значимости работы диссертация Тухватуллиной Лилии Альбертовны на тему «Уровень стабильных метаболитов оксида азота (II) при активации системы врожденного иммунитета и в зависимости от полиморфизма гена *iNOS*» отвечает критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

Официальный оппонент,
кандидат биологических наук, доцент
кафедры «Анатомия, хирургия и
внутренние незаразные болезни»
Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Нижегородская
государственная сельскохозяйственная
академия»

12.05.2022 г.



Кляпнев Андрей Владимирович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Нижегородская государственная
сельскохозяйственная академия» (ФГБОУ ВО Нижегородская ГСХА);
603107, Россия, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина,
97, тел. +7 (831) 214-33-49; email: anatomifarmitox@mail.ru.

Подпись Кляпнева А.В. заверяю:

*Ученый секретарь
Ученого совета академии*

