

Утверждаю:

Директор ФГБНУ «ВНИВИПФиТ»

П.А. Паршин

2022 г.



ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» 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) (NO) представляет собой небольшую газообразную молекулу, которая вырабатывается в организме и участвует во множестве физиологических и патофизиологических процессов, в том числе системы иммунитета. Способность NO проникать через мембраны определяет его роль не только как внутриклеточного посредника, но и как сигнального соединения в межклеточной коммуникации. Основной путь синтеза NO обеспечивается семейством ферментов NO-синтаз (NOS), включающим три изоформы, которые экспрессируются тканеспецифично и имеют различную внутриклеточную локализацию. Механизмы действия NO на клеточные процессы разнообразны. С одной стороны, NO активирует сигнальный фермент гуанилатциклазу, которая продуцирует вторичный посредник циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). В свою очередь, цГМФ, стимулируя протеинкиназы G и модулируя напрямую активность ряда каналов, запускает фосфорилирование многих белков и изменяет ионные токи через мембраны, соответственно. С другой стороны, NO может напрямую модифицировать некоторые белки через S-нитрозилирование. Более того продукция NO тесно связана с активными формами кислорода и окислительным стрессом. Последняя реакция является одной из главных если рассматривать ее как фактор антимикробной защиты организма. Эффекты NO на окислительно-восстановительные процессы в клетках разнонаправленные и зависят от концентрации как NO, так и активных форм кислорода.

Известно, что NO включен в механизмы неспецифического иммунитета. Макрофаги и некоторые другие клетки иммунной системы производят большие количества оксида азота (II) с целью уничтожения

вторгающихся в организм патогенных микроорганизмов, а также образующихся в самом организме злокачественных клеток. Ответственной за это является индуцибельная синтаза оксида азота (*iNOS*).

В связи с вышеизложенным изучение уровня стабильных метаболитов оксида азота (II) при активации системы врожденного иммунитета, а также в зависимости от полиморфизма гена *iNOS* является актуальным в теоретическом и практическом отношениях.

Научная новизна исследований заключается в том, что Тухватуллиной Л.А. впервые раскрыта динамика изменения количества метаболитов оксида азота (II), определена ответная реакция системы врожденного иммунитета, а также гематологических показателей при применении иммуномодуляторов и вакцинации. Выявлена взаимосвязь активности нитроксидергической системы и системы врожденного иммунитета телят и кроликов при применении иммуномодуляторов; морских свинок при вакцинации. Проведена оценка аллельного полиморфизма гена *iNOS* у телят по генотипам *AA* и *AB*, в результате которой установлено, что животные с генотипом *AA* обладают более активным неспецифическим иммунитетом.

Степень достоверности, обоснование научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность результатов подтверждается фактическим материалом, значительным объемом экспериментального материала, применением современных биологических, серологических и молекулярно-генетических методов исследования, их соответствия поставленным целям и задачам, статистической обработкой экспериментальных данных.

Исследования проведены на допустимом числе животных согласно установленному диссертантом плану исследований. Научные выводы сформулированы в виде констатации наиболее важных из полученных результатов, а практическое предложение обосновано интерпретацией полученных фактических данных. Выводы соответствуют поставленным задачам и цели. Материалы работы были апробированы на различных конференциях международного и всероссийского уровня.

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 – в журналах рекомендованных ВАК РФ и 1 – в издании, включенном в библиографическую и реферативную базу данных Web of Science.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в том, что она расширяет представления о роли оксида азота (II) в системе иммунитета. Автором установлена зависимость между уровнем стабильных метаболитов оксида азота (II) в крови морских свинок и общим количеством лейкоцитов крови, что доказывает участие NO в механизмах неспецифического иммунитета за счет повышения нейтрофилов.

По результатам исследований диссертантом установлено, что иммунизация S-формой бротивобруцеллезной вакцины (*B. abortus* 19), которая является высокоиммуногенной, не вызывает повышения уровня нитрат- и нитрит-анионов в сыворотке крови и блокирует 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.

Практическая значимость работы заключается в оптимизации способа проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования телят по гену *iNOS* для получения животных с высокой активностью врожденного иммунитета.

Оценка объема, структуры и содержания диссертации.

Диссертационная работа Тухватуллиной Л.А. по своей структуре соответствует утвержденной форме и содержит: введение, обзор литературы, основную часть, заключение, выводы, 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.

Во введении представлены актуальность работы, цель, задачи исследований, раскрыта новизна, научная и практическая значимость полученных результатов и сформулированы основные положения диссертации, выносимые на защиту.

В обзоре литературы автор раскрывает роль NO в системе специфического и неспецифического иммунитета. Представлено достаточное количество информации о важной роли оксида азота (II), как медиатора гомеостатических и защитных процессов, а также его участие в клеточно-опосредованных реакциях. Рассматриваются физико-химические свойства индуцибельной NO-синтазы оксида азота (II) – *iNOS*.

В главе «Материалы и методы исследований» автором представлена схема исследований, обзор используемых методик, а также способы обработки полученного экспериментального материала.

В процессе выполнения экспериментальной работы применялись следующие методы: биологические, серологические и молекулярно-генетические. Обработка полученных данных проведена с использованием t-критерия Стьюдента.

В главе «Результаты собственных исследований» представлены результаты экспериментов доказывающие, что введение иммуномодуляторов в организм телят обеспечивает стабильное повышение уровня метаболитов оксида азота (II). Выявлена видовая особенность реакции организма на введение иммуномодуляторов; установлено, что вакцинация морских свинок способствует повышению стабильных метаболитов оксида азота (II) на 60 сутки после введения вакцинных штаммов R-формы, а S-формой – наоборот.

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

праймеров, который обеспечивает сравнительно высокий выход специфичного ПЦР-продукта.

Диссертация в целом представляет логически цельную законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для ветеринарной науки, животноводства и сельского хозяйства в целом.

Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о присуждении ученых степеней».

Автореферат содержит основные разделы диссертации и в полном объеме раскрывает ее научные положения. Диссертационная работа и автореферат четко структурированы, изложены в научном стиле повествования профессиональным языком с использованием специальных терминов. Выводы и практические предложения, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны. Диссертация и автореферат соответствуют критериям «Положения о присуждении ученых степеней».

Соответствует паспорту специальности 03.03.01 Физиология по пунктам :

2. Анализ механизмов нервной и гуморальной регуляции, генетических, молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических функций.

3. Исследование закономерностей функционирования основных систем организма (нервной, иммунной, сенсорной, двигательной, крови, кровообращения, лимфообращения, дыхания, выделения, пищеварения, размножения, внутренней секреции и др.).

При ознакомлении с результатами исследований, представленными в диссертации, возник ряд вопросов.

1. Каков механизм повышения уровня стабильных метаболитов оксида азота (II) при введении иммуномодуляторов в организм животных?

2. С какой целью активность нитроксидергической системы организма при введении иммуномодуляторов изучен на разных видах животных – телятах и кроликах?

3. Чем был обусловлен выбор разных вакцинных штаммов бруцелл для иммунизации?

Заданные вопросы имеют познавательный характер и не снижают ценность рецензируемой работы.

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 завершенной научно-квалификационной работой, выполненным автором самостоятельно, на высоком научно-методическом уровне, содержит совокупность новых научных результатов, вносящих вклад в физиологию системы врожденного иммунитета.

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 присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

Отзыв заслушан, рассмотрен и одобрен на совещании лаборатории доклинических исследований и моделирования биологических систем ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» (протокол № 5 от 27 мая 2022 г.)

Отзыв составила:

Заведующая лабораторией доклинических исследований и моделирования биологических систем, доктор биологических наук

Востроилова Галина Анатольевна

394087, Воронеж, ул. Ломоносова 114–б, gvostroilova@mail.ru;
8 (473) 253 92 81.

27.05.2022г.

Личную подпись Г.А. Востроиловой заверяю.
Ученый секретарь ФГБНУ «ВНИВИПФиТ»,
кандидат биологических наук



Т.И. Ермакова