

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Семенова Владимира Григорьевича 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 диссертации. Оксид азота (II) представляет собой газообразную сигнальную молекулу, которая участвует в различных физиологических и патофизиологических процессах, а именно, в клеточных и иммунных реакциях, таких как: нейротрансмиссия, онкогенез, экспрессия генов, регуляция дыхания, вазодилатация; а также взаимодействует с многочисленными биомолекулами.

Оксид азота действует как молекула-мессенджер, передающая сигналы клеткам сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем. В организме оксид азота (II) продуцируется под действием фермента нитроксидсинтазы (NOS) с помощью комплексной окислительной реакции. В организме молекула NO синтезируется различными тканями млекопитающих, включая эндотелий сосудов, макрофаги, нейтрофилы, клетки Купфера печени, ткани надпочечников, мозжечок и другие ткани.

На сегодняшний день известно, что NO является важным компонентом иммунной системы. Учеными доказано, что оксид азота (II) выделяемый макрофагами, обладает антимикробной и противоопухолевой активностью. Ответственной за уничтожение вторгающихся патогенов является изоформа синтазы оксида азота, так называемая индуцибельная синтаза оксида азота (*iNOS*). 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.

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.

Исходя из сказанного, считаю, что тема диссертационной работы Тухватуллиной Лилии Альбертовны является актуальной и имеет важное значение и требует дальнейшего научного развития.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Достоверность результатов подтверждается фактическим материалом, применением нескольких методов, длительностью исследования с использованием стандартных методов и статистической обработкой экспериментальных данных.

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

Новизна исследований и полученных результатов. Автором впервые выявлена зависимость активности нитроксидергической системы и врожденного иммунитета у телят и кроликов после применения иммуномодуляторов. Также была 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), которая является высокоиммуногенной, не вызывает повышения уровня нитрат- и нитрит-анионов в сыворотке крови и не активирует 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 °С, 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*.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций диссертанта. Автором получен ряд новых и значимых результатов, в частности: установлена зависимость между уровнем стабильных метаболитов оксида азота (II) и активностью клеточного иммунитета после применения иммуномодуляторов «Имунофан» и «Фоспренил»; установлена ассоциативная связь повышения уровня антител и активности оксида азота (II) после вакцинации, что доказывает, активное участие NO в системе иммунитета, а также выявлена зависимость активности врожденного иммунитета телят от генотипа по гену *iNOS*, что доказывает участие маркера AN-13-1 в неспецифических иммунных реакциях.

Практическая значимость работы заключается в возможности применения оптимизированного способа проведения ПЦР-ПДРФ при генотипировании 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.

Соответствие работы к требованиям, предъявляемым к диссертациям. Диссертация изложена на 115 страницах компьютерного текста и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка литературы. Работа иллюстрирована 8 таблицами, 36 рисунками. Список литературы включает 247 источник, в том числе 160 – зарубежных авторов.

Во введении обоснованы актуальность работы, цель, задачи исследований, раскрывается новизна, научная и практическая значимость и формулируются основные положения диссертации, вынесенные на защиту.

В обзоре литературы автором предпринята попытка раскрыть роль NO в системе специфического и неспецифического иммунитета. Собрано 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 разделе «Материалы и методы исследований» автором представлена схема исследований, обзор используемых методик, а также способы статистической обработки полученного экспериментального материала.

Согласно разработанной соискателем схеме исследования диссертационная работа проводилась в 6 этапов:

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.

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

В разделе «Результаты собственных исследований» экспериментальным путем доказано, что применение иммуномодуляторов телятам и кроликам обеспечивает стабильное повышение уровня метаболитов оксида азота (II), а также выявлена видовая особенность реакции организма на введение иммуномодуляторов; 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.

Работа иллюстрирована рисунками и таблицами. Автор по ходу анализа полученных результатов дает их интерпретацию.

Содержание автореферата полностью отражает содержание и суть диссертации. Выводы, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны и полностью соответствуют ее содержанию.

Апробация и публикации основных материалов. Основные положения диссертации доложены, обсуждены и одобрены на ежегодных отчетах кафедры физиологии и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (Казань, 2017-2021 гг.); 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.

По материалам 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.

Признавая высокое качество содержания диссертационной работы Тухватуллиной Л.А., и оценивая ее положительно, считаю нужным получить ответы на некоторые вопросы уточняющего характера, возникшие в ходе ее изучения:

1. Как вы можете объяснить повышение уровня стабильных метаболитов оксида азота (II) в плазме крови при иммунизации морских свинок штаммами *B. abortus* 82-Rr и *B. abortus* 1096? И каков механизм отсутствия ответной реакции нитроксидергической системы при применении штамма *B. abortus* 19?

2. Чем обусловлен выбор двух иммуномодуляторов Имунофана и Фоспренила для активации системы иммунитета?

3. В диссертационной работе изучена активность врожденного иммунитета в зависимости от полиморфизма гена *iNOS*. Как Вы думаете может ли влиять на систему иммунитета полиморфизм других NO-синтаз?

Приведенные вопросы не снижают научную и практическую ценность диссертационной работы, которая написана хорошим литературным и профессиональным языком, аккуратно оформлена и удачно завершена по замыслу и результатам автора.

Заключение

Диссертация 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, выполненной автором самостоятельно, на высоком научно-методическом уровне, содержит совокупность новых научных результатов в области физиологии.

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 диссертация отвечает критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой

степени кандидата наук, а ее автор Тухватуллина Лилия Альбертовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

Официальный оппонент
заведующий кафедрой морфологии, акушерства
и терапии ФГБОУ ВО Чувашский ГАУ,
доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки Чувашской Республики,

 Семенов Владимир Григорьевич

03 июня 2022 года

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Чувашский государственный аграрный университет»
428003 Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, д. 29.
Контактный телефон: 8 (927) 851-92-11; раб. тел. (8352) 62-20-38
E-mail: semenov_v.g@list.ru

Подпись профессора Семенова В.Г. заверяю:
Секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО Чувашский ГАУ



 Зотова Ирина Вячеславовна