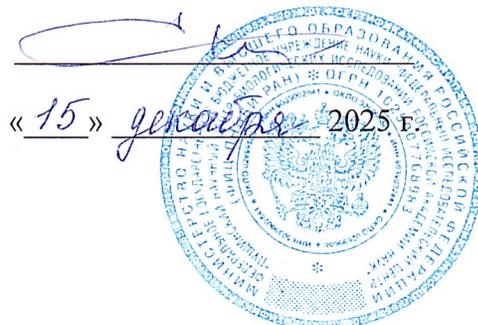


МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)
142290, Московская обл., г. Серпухов,
г. Пушкино, проспект Науки, д.3.
Тел./факс: (4967)73-26-36,
e-mail: info@pncbi.ru, <https://www.pbcra.ru>
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983,
ИНН/КПП 5039002841/503901001

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН
д.ф.-м.н. Грабарник П.Я.



15.12.2025 № 191-01-2115/1180

На № _____ от _____

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук»**

Диссертация «Гипотермическая консервация биологических объектов в газовых смесях кислорода и закиси азота», представленная Гагаринским Евгением Леонидовичем на соискание ученой степени кандидата биологических наук, выполнена в лаборатории криобиологии Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

В 2012 г. Гагаринский Е.Л. окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» с присуждением квалификации «Биолог», по специальности «Биология». С 2012 по 2015 гг. обучался в очной аспирантуре Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского по специальности «Ботаника».

В период подготовки диссертации соискатель работал в лаборатории криобиологии Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБК РАН) сначала в должности младшего научного сотрудника, а затем научного сотрудника. В настоящее время Гагаринский Е.Л. работает в должности научного сотрудника ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Справки о сдаче Гагаринским Е.Л. кандидатских экзаменов: Экзамены: История и философия науки (биологические науки), английский язык - Справка № 36-2016 от 20 мая 2016 г. выдана Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского». Экзамен Биофизика - Справка № 191-01-9211/884 от 06 октября 2025 г. выдана Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Научный руководитель диссертационной работы – кандидат биологических наук Фесенко Евгений Евгеньевич, ведущий научный сотрудник лаборатории криобиологии Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

По итогам рассмотрения диссертации «Гипотермическая консервация биологических объектов в газовых смесях кислорода и закиси азота» принято следующее заключение:

Диссертационная работа Гагаринского Е.Л. является законченной научно-квалификационной работой, которая посвящена проблеме продления сроков хранения биологических объектов различных уровней организации (клеточный, органный) с помощью технологии гипотермической консервации под давлением газовых смесей. В диссертации впервые продемонстрирована возможность использования газовой смеси закиси азота и кислорода в соотношении 1:1 под избыточным давлением (6,5 атм.) в качестве консерванта для длительной гипотермической консервации биологических объектов разной сложности организации (ооцит лягушки, сердце крысы). Полученные сроки консервации сердца (24 часа) в четыре раз превышают времена хранения, достигнутые с помощью классических методов, широко применяемых в медицинской практике. Впервые на основе анализа экспрессии генов показана защитная роль закиси азота в процессе консервации, которая обусловлена запуском клеточных механизмов, отвечающих за снижение уровня окислительного стресса. Использование в работе газов, таких как закись азота и кислород, входящих в реестр Жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) открывает возможность дальнейшего развития технологии газовой консервации для внедрения в медицинскую практику. В рамках исследования подобраны условия применения газовых смесей для консервации отдельных клеток, таких как ооциты лягушки, обеспечивающие высокий уровень сохранности биоматериала в течении четырех суток и фертильность ооцитов в сроки до 12 дней. Разработанный в данной работе подход гипотермической консервации ооцитов с использованием газовых смесей позволит оптимизировать процесс разведения краснокнижных видов амфибий в центрах воспроизводства и реинтродукции редких видов животных.

Результаты, представленные в данной работе, важны как для фундаментальных исследований в области криобиологии и воздействия низких температур на различные биологические процессы, так и для прикладных исследований, связанных с решением проблемы длительного гипотермического хранения биологических объектов.

Актуальность

Сохранность донорских органов является одной из ключевых проблем трансплантологии. Особенно ярко она проявляется в отношении донорского сердца, срок хранения которого составляет от 4 до 6 часов. Подходящий для пересадки орган зачастую не успевают доставить пациенту, что в конечном итоге приводит к потере ценного донорского материала. По этой причине в России время ожидания трансплантации сердца в среднем составляет полтора года. Для решения проблемы дефицита донорских органов в мире активно разрабатываются различные подходы консервации. Среди перспективных технологий выделяют гипотермическую консервацию под избыточным давлением смеси газов, содержащих монооксид углерода. Данный подход обеспечивает значительное увеличение срока хранения жизнеспособного органа по сравнению с классическим методом (статическая холодовая консервация), широко используемом в современных центрах трансплантологии во всем мире. Однако монооксид углерода является высоко ядовитым соединением, что не позволяет внедрить технологию в медицинскую практику. Замена

монооксида углерода на разрешенную к практическому применению закись азота открывает новые перспективы для дальнейшего развития технологии газовой консервации трансплантируемых органов.

Проблема малых сроков гипотермического хранения затрагивает и ряд других важных биологических объектов, ярким представителем которых являются ооциты класса амфибий. Данный класс характеризуется наиболее высоким темпом вымирания среди всех позвоночных животных, в связи с чем разработка подходов, увеличивающих срок хранения жизнеспособных ооцитов, становится актуальной задачей. Применяемые в центрах реинтродукции технологии способны обеспечить незначительное (8-16 часов) время хранения жизнеспособных ооцитов. Пролонгация и улучшение качества сохраняемого биоматериала актуально для восстановления популяций не только вымирающих видов амфибий, но и других представителей позвоночных животных.

В рамках выполнения данной работы был предложен новый состав газовой композиции, который отвечает требованиям безопасности и способствует пролонгации максимальных сроков консервации как ооцитов амфибий, так и сердца теплокровных.

Научная новизна.

Смесь, состоящая из закиси азота и кислорода (газов, включённых в список ЖНВЛП) в соотношении 1:1 впервые успешно применена для консервации биологических объектов различных уровней организации (клеточный – ооциты амфибий, органный – сердца крыс). Показано, что высокий уровень сохранности сердца достигается после консервации в газовой смеси газовой смеси закиси азота и кислорода (N_2O+O_2) в соотношении 1:1 под избыточным давлением (6,5 атм.) в течении 24 часов. Показатели сократимости сердца, такие как частота сердечных сокращений и давление, развиваемое левым желудочком сохраняются, соответственно, на уровне 96% и 42% по сравнению с интактным органом. Анализ площади инфарктного повреждения показывает сохранность ткани на уровне 86%. Достигнутое время консервации (24 часа) в четыре раза превышает сроки хранения сердца при использовании традиционного метода статической холодной консервации (СХК), широко применяемого в медицинской практике.

Продемонстрирована ключевая роль кислорода в составе консервирующих газовых смесей, которая обеспечивается сохранением аэробного метаболизма. Сердца, хранимые в бескислородных газовых смесях, не восстанавливают свои функции при реперфузии. При этом отмечается, что воздействие чистого кислорода в процессе консервации приводит к значительному повреждению миокарда вследствие развития сильного окислительного стресса (наблюдается наибольшая активация ключевого эндогенного продуцента АФК в клетке - NADPH оксидазы 1), анализ площади инфарктного повреждения показывает сохранность ткани на уровне 60%. По результатам оценки уровня экспрессии генов в миокарде, полученном при помощи ПЦР в реальном времени, впервые продемонстрирована защитная роль закиси азота в процессе гипотермической консервации характеризующаяся снижением риска развития окислительного стресса. Уровень экспрессии проокислительного Nox1 (NADPH оксидаза 1) в смеси содержащей закись азота снижается в 6 раз относительно группы с чистым кислородом. Кроме того, в смеси содержащей закись азота экспрессия основного регулятора антиоксидантного ответа - Nfe2l2 (NRF2) в 7,5 раз ниже, чем в группе чистого кислорода. При этом, в группе закиси азота также наблюдается снижение индукции Prdx1 - важнейшего антиоксидантного фермента эпителиальных тканей. Таким образом, применение закиси азота снижает уровень окислительного стресса в тканях миокарда и способствует его сохранению в условиях гипотермии.

Впервые достигнуты существенные времена консервации (12 дней) жизнеспособных ооцитов амфибий, в 25 раз превышающие максимальное время хранения ооцитов методами, применяемыми в центрах реинтродукции. Впервые получены ооциты высокого качества (по показателям фертильности и выклева неотличимые от контрольных образцов) при

хранении в смеси закиси азота и кислорода в течении 4-х дней. Новыми являются данные о влиянии избыточного давления на ооциты травяной лягушки в процессе гипотермического хранения. Показано, что на сроках консервации превышающих 4 дня, избыточное давление газовой смеси в камере не должно превышать 3 атмосфер.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в данной работе результаты расширяют представление о протекторном воздействии газов на миокард теплокровных животных в процессе гипотермической консервации и последующей реперфузии. В работе продемонстрирована ключевая роль кислорода в составе газовой смеси. Кислород обеспечивает восстановление функциональной активности сердца после 24 часовой консервации. При помощи ПЦР в реальном времени получены новые данные о защитной роли смеси закиси азота и кислорода в процессе гипотермического хранения сердца. Данная композиция представляется наиболее перспективной благодаря способности поддерживать аэробный метаболизм (снижение экспрессии гипоксического фактора Hif1 α и рост экспрессии вазодилатора NOS2), одновременно снижая уровень окислительного стресса (нормализация экспрессии антиоксидантов Nfe2l2, Prdx1 и подавление прооксиданта Nox1). Смесь закиси азота и кислорода способствует нормализации экспрессии указанных генов, обеспечивая показатели, близкие к характеристикам нативного органа.

Показано, что при консервации более 4-х суток повышенное давление (6,5 атмосфер) приводит к снижению количества фертильных ооцитов.

С практической точки зрения достигнутые времена консервации жизнеспособного биологического материала значительно превышают времена консервации, достигаемые стандартными методиками, широко применяемыми в современной практике. Так, время хранения жизнеспособного сердца увеличено в 4 раза, максимальное время хранения фертильных ооцитов амфибий увеличено в 25 раз.

Связь темы с планом основных научных работ учреждения

Результаты, представленные в работе, получены при выполнении государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН по теме «Биологические эффекты электромагнитных, магнитных и акустических воздействий на живые системы. Механизмы природного и искусственного гипобиоза, разработка новых подходов к криоконсервации биологических объектов».

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции исследования, планировании и выполнении экспериментов, обработке полученных результатов и подготовке публикаций. Основной объем экспериментальной работы выполнен лично соискателем. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались и утверждались всеми соавторами работы. Консервация ооцитов амфибий выполнена с участием к.б.н. В.К. Утешева, сотрудник ИБК РАН. Отдельные этапы работы (ПЦР в реальном времени) выполнены с участием сотрудников лаборатории механизмов редокс-регуляции клеточных процессов (совместные эксперименты с д.б.н. М.Г. Шараповым, сотрудник ИБК РАН). Гистологические исследования выполнены в лаборатории методов электронной микроскопии к.б.н. Рогачевским В.В., сотрудник ИБК РАН.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием сертифицированного научного оборудования, высококачественных расходных материалов и современных методик при проведении экспериментов. Представленные в диссертации результаты, прошли этап обязательного рецензирования и опубликованы в научных журналах, которые входят в перечень рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Научные положения и выводы диссертации обоснованы, достоверны и основываются на экспериментальных данных, полученных автором.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендована к защите

Диссертационная работа Гагаринского Е.Л. соответствует п. 12 (Криобиология. Воздействие низких температур на различные биологические процессы.) паспорта научной специальности 1.5.2. Биофизика (Биологические науки).

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на всероссийских конференциях с международным участием: VI Съезд биофизиков России (г. Сочи, 20.09.2019), IX съезд Герпетологического общества имени А.М. Никольского при Российской академии наук (г. Калуга, 10.10.2024.).

Публикации по теме диссертационной работы

Материалы, изложенные в диссертации, в полной мере отражены в 3 статьях в научных журналах, которые входят в перечень рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК и 2 патентах на изобретение.

Статьи в рецензируемых журналах

1) **Gagarinskiy E.L.** The Effectiveness of Prolonged Hypothermic Preservation of Isolated Rat Hearts Using Oxygen, Medical Nitrous Oxide and Carbon Monoxide Gas Mixtures / **Gagarinskiy, E. L.**, Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Gurin, A. E., Ugraitskaya, S. V., & Fesenko Jr, E. E. // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2025. – С. 110295. doi: 10.1016/j.abb.2025.110295.

2) **Gagarinskiy E.L.** Long-term hypothermic storage of oocytes of the European common frog *Rana temporaria* at various pressure regimes in gas mixtures based on oxygen, carbon monoxide, and nitrous oxide / **Gagarinskiy E. L.**, Uteshev V. K., Fesenko Jr E. E. // Cryobiology. – 2024. – Т. 116. – С. 104952. doi: 10.1016/j.cryobiol.2024.104952.

3) **Gagarinskiy E.L.** Prolonged hypothermic storage of oocytes of the European common frog *Rana temporaria* in a gas mixture of oxygen and carbon monoxide / **Gagarinskiy E.L.**, Uteshev V.K., Fesenko Jr E.E. // PloS one. – 2023. – Т. 18. – №. 7. – С. e0288370. doi: 10.1371/journal.pone.0288370.

Патенты

1) **Гагаринский Е.Л.** Способ поддержания жизнеспособности трансплантируемого органа в консервирующей газовой смеси и набор для его реализации. **Гагаринский Е.Л.**, Фесенко Е.Е. мл., Гурин А.Е. Патентообладатели: Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) // 2025 – RU 2847325 С1.

