

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ и ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)**

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
<https://www.icgbio.ru>
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

Утверждаю

Директор ИЦиГ СО РАН

академик РАН, д.б.н.



А.В. Кочетов

« 14 02 » 2026 г.

от 14.02.2026 № 15345-29-38/249
на № _____ от _____

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
на диссертационную работу Гагаринского Евгения Леонидовича
**«ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ КОНСЕРВАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В
ГАЗОВЫХ СМЕСЯХ КИСЛОРОДА И ЗАКИСИ АЗОТА»,**
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.2 Биофизика

Нехватка донорских органов, а также небольшой срок их холодового хранения сдерживает развитие медицинской трансплантологии. Увеличение срока хранения донорских органов может спасти жизни многих пациентов. Поиск новых подходов, обеспечивающих увеличение времени гипотермической консервации - актуальная задача. На сегодняшний день около трети видов земноводных находится на грани исчезновения. Поиск способов гипотермической консервации ооцитов позволит оптимизировать процесс разведения и последующей реинтродукции краснокнижных видов.

Одним из способов длительного сохранения органов и клеток является гипотермическая консервация с применением газовых смесей на основе кислорода и монооксида углерода (CO). Однако CO является крайне ядовитым химическим соединением, его применение может быть небезопасным. Другим соединением, применение которого может стать ключом к успешному сохранению органов и клеток при низких температурах, является закись азота. Это газ, допущенный для использования в медицинских целях. В литературе представлено мало информации о влиянии данного газа на сохранность биологических объектов. Автор в своих исследованиях восполняет этот пробел.

Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, 3х глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка цитируемой литературы, списка сокращений и условных обозначений, списка публикаций по теме диссертации. Работа изложена на 116 страницах печатного текста, содержит 21 рисунок и 9 таблиц. Список литературы содержит 262 ссылки.

Первая глава, обзор литературы, состоит из 6ти подразделов. В данной главе приводится описание трех методов длительного хранения биологических объектов (гипотермическая консервация, криоконсервация и лиофилизация). В главе приводятся механизмы повреждения клеток и тканей после криоконсервации. Описаны механизмы действия гипотермии на биологические объекты. Обозначена проблема двойственности гипотермического хранения объектов: гипотермия способствует повышению устойчивости клетки к ишемии и гипоксии, но в то же время может приводить к развитию серьезных нарушений метаболизма, степень которых зависит от приложенных температур и времени воздействия гипотермии. Автор приводит описание методов гипотермического хранения органов теплокровных, а именно статической холодовой консервации, машинной перфузии, нормотермической перфузии. В обзоре отмечается, что одним из перспективных направлений становится разработка методики консервации органов в атмосфере биологически активных газов (CO , NO , H_2S , O_2).

Консервация ооцитов земноводных также имеет ряд трудностей, в основном связанных с изменением химического состава студенистой оболочки при контакте с водными растворами для хранения, что как следствие приводит к нарушению оплодотворения. Однако, перспективной методикой является консервация ооцитов земноводных в плотно закрытых контейнерах без солевых растворов. Это позволило пролонгировать срок хранения до 4-5 дней.

В литературном обзоре автор подробно описывает роль газов (O_2 , CO , NO), а также повышенного давления в защите клеток и органов в процессе их гипотермического хранения. В первой главе автор убедительно объясняет, почему криоконсервация до криогенных температур и лиофилизация органов и ооцитов амфибий не подходит для данных биологических объектов. Альтернативным способом сохранения сложных биологических объектов является метод гипотермической консервации, и в литературном обзоре еще раз продемонстрирована актуальность усовершенствования этого метода.

Вторая глава диссертационной работы посвящена описанию используемых материалов и методик. Работа была проведена с использованием современных методов и на большой выборке животных, что говорит о репрезентативности исследования. Работа проводилась на 3-месячных крысах-самцах Вистар ($n=119$) и взрослых особях *R. temporaria* ($n=130$). Е.Л.

Гагаринским подробно описаны методики извлечения сердца, подготовка к консервации и непосредственно сама консервация. Представлено описание измерения основных показателей восстановления функциональной активности сердца - ДРЛЖ (давление, развиваемое левым желудочком) и ЧСС (частота сердечных сокращений), снятых на установке ретроградной перфузии по Лангендорфу. Описаны другие методы исследования сердца после консервации (метод окраски миокарда трифенилтетразолием хлоридом на наличие инфарктных зон, гистологическая оценка сохранности изолированного сердца крысы при помощи окрашивания метиленовым синим, азуром-II и основным фуксином, выделение РНК из левого желудочка, синтез кДНК и ПЦР в реальном времени). Автор подробно описывает получение ооцитов и уринальной спермы обыкновенной лягушки, консервацию ооцитов и дальнейшую их оценку после гипотермического хранения.

Третья глава посвящена результатам исследования. Приведен подробный анализ уровня восстановления по показателям ЧСС и ДРЛЖ сердец крыс, подвергнутых гипотермической консервации под давлением различных газов и газовых смесей в течение 24 часов, а также анализ частоты возникновения аритмий. В ходе проведенных исследований было показано, что присутствие кислорода является критическим фактором, обеспечивающим восстановление работоспособности органа на стенде перфузии. Отмечается снижение соотношения жизнеспособных сердец с 5/6 до 3/6 при повышении давления кислорода с 2,75 до 6.5 избыточных атмосфер, что связано с усилением окислительного стресса в процессе консервации. Добавление к кислороду дополнительных газовых компонентов (N_2 , N_2O , CO) с различной эффективностью повышает выживаемость органа после гипотермической консервации. Закись азота обеспечивает высокие показатели ЧСС 240 ± 67 уд/мин. и лучшие показатели ДРЛЖ 47 ± 9 мм среди исследованных групп. Однако, в данной группе анализ сердечных сокращений в течение времени выявил выраженные сердечные аритмии (5/6 экспериментов). Была проведена оценка уровня инфарктного повреждения сердца крысы после гипотермической консервации при $+4^\circ C$ в газовых смесях $CO+O_2$, N_2O+O_2 , N_2+O_2 , а также в чистом O_2 в течение 24 часов. В группе N_2O+O_2 присутствуют умеренные по площади зоны инфарктного повреждения $14 \pm 10\%$. С помощью ПЦР в реальном времени проведена оценка изменения уровня экспрессии маркерных генов, затрагивающих процессы развития гипоксии, окислительного стресса, апоптоза, состояние энергетической системы в изолированных сердцах крысы в присутствии различных консервирующих газов.

В группе « N_2O+O_2 » экспрессия *Ucp-1*, которая активируется при снижении температуры и концентрации АТФ, примерно в 7 раз превышает показатели контрольной группы, а экспрессия *Slc2a4* в 2 раза выше нормы. Также отмечается повышенный риск

развития апоптоза в изолированных сердцах крысы после гипотермической консервации в группе закиси азота, о чем свидетельствует рост экспрессии Jun в 14 раз и Casp3 в 7 раз по сравнению с данными контрольной группы. Использование закиси азота позволяет избежать гипоксического повреждения органа согласно низким показателям экспрессии Hif1a - в 8 раз выше нативного контроля и Nos2 - в 2 раза выше нативного контроля. Дополнительно отмечается малый уровень экспрессии Nfe2l2 - в 2 раза выше по сравнению с нативным контролем, Nox1 - в 5 раз и Prdx1 - 11 раз, что свидетельствует о подавлении окислительных процессов в тканях миокарда.

Была проведена гистологическая оценка сердец крыс в группах «CO₂+O₂» и «N₂O+O₂» в сравнении с контролем. В целом в обеих группах консервации помимо интерстициального отека наблюдаются схожие изменения в морфологии миокарда (баллонная дистрофия отдельных групп кардиомиоцитов, белковая дистрофия кардиомиоцитов легкой степени выраженности), что характеризуется как умеренные ишемически-реперфузионные повреждения.

Состав смеси (разрешенные медицинские газы) и хороший уровень восстановления органа после консервации (по показателям выживаемости, функциональной активности, сохранности ткани, экспрессии генов) позволяют считать смесь закиси азота и кислорода перспективной для внедрения в клиническую практику.

Второй блок результатов посвящен ооцитам травяной лягушки. Была проведена оценка максимального времени хранения ооцитов травяной лягушки под давлением газовой смеси на основе CO и кислорода. Фертильность ооцитов, хранящихся при 4°C в газовой смеси, состоящей из CO и кислорода, на четвертые сутки достоверно не отличалась от показателей не подвергавшейся воздействиям икры (контроль), составив 91±8%. Далее наблюдали снижение показателей оплодотворения до 66±8% на седьмой и 39±14% на двенадцатый день эксперимента. Процент выклева при использовании данной смеси не имел достоверных отличий на четвертые сутки хранения по сравнению с таковым в контроле, составив 80±14%. На седьмые сутки хранения наблюдалось резкое снижение количества ооцитов, дошедших до стадии выклева, до уровня 19±6. На двенадцатые сутки хранения процент выклева составил 1±2%. Также было оценено влияние различных составов газовых смесей, в том числе N₂O + O₂, и прилагаемого давления на сохранность ооцитов травяной лягушки в процессе гипотермического хранения. Композиция N₂O+O₂ (2,5 изб. атм.) обеспечивает фертильность ооцитов на уровне 96% от интактного контроля после 4-х дней хранения. Полученные сроки в 25 раз превосходят предельные временные значения стандартных методов консервации ооцитов в специализированных растворах. Повышение

давления смеси свыше 3 изб. атм. снижает показатели жизнеспособности ооцитов при сроках консервации более 4-х дней.

Четвертая глава диссертации посвящена обсуждению полученных результатов. В этой главе соискатель подробно обсуждает полученные в ходе работы результаты, опираясь на последние исследования в данной области. Раздел Заключение суммирует все полученные автором результаты, а Выводы соответствуют поставленным задачам.

Имеются **вопросы и замечания** (не носящие критический характер) в целом к диссертации.

1. На каком основании выбирали наиболее перспективные газовые композиции (соотношение частей газов) для консервации сердца в эксперименте? На основании данных литературы? Собственных предварительных экспериментов?
2. Планируется ли в будущем внедрение газовой композиции закиси азота и кислорода в медицинскую практику? Какие шаги, по мнению автора, для этого необходимо предпринять?
3. Каково мнение автора, возможно ли применять данную методику консервации к другим сложным объектам, например, яичникам, а также к ооцитам представителей других таксонов кроме земноводных, например, рыб?
4. Несмотря на то, что методы описаны достаточно подробно и четко, для лучшего понимания работы не лишним было бы представить общую схему дизайна эксперимента.

Общее заключение по диссертации.

Представленная диссертация производит благоприятное впечатление и характеризует автора как состоявшегося специалиста, глубоко разбирающегося в теме исследования, способного решать теоретические и практические проблемы на высоком методологическом уровне. Исследование Е.Л. Гагаринского важно для развития трансплантологии и может внести вклад в сохранение редких видов амфибий. Выявленные замечания не являются существенными и не влияют на общее благоприятное впечатление от диссертации. Полученные результаты являются перспективными как для медицины и зоологии, так и для фундаментальной криобиологии и биофизики.

Основные положения диссертации отражены в трех научных работах, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК. Результаты работы представлены на конференции, также оформлены два патента. Диссертационная работа Гагаринского Евгения Леонидовича по содержанию, новизне, практической ценности полученных результатов соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842,

предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 Биофизика.

Отзыв на диссертацию и автореферат заслушан, обсужден и утвержден на заседании сектора криоконсервации и репродуктивных технологий и сектора постгеномной нейробиологии Института цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН), протокол заседания № 1 от 16 февраля 2026 г: присутствовали на заседании 10 человек, в том числе один доктор биологических наук и три кандидата биологических наук. Результат голосования «ЗА» – 10 человек, против и воздержавшихся – нет.

Отзыв составил:

Инженер-исследователь
сектора постгеномной нейробиологии ИЦиГ СО РАН
к.б.н.
s.v.ranneva@gmail.com

Окотруб

Окотруб С. В.

Председатель заседания
Главный научный сотрудник сектора
криоконсервации и репродуктивных технологий
ИЦиГ СО РАН, д.б.н.
amstis@bionet.nsc.ru

Амстиславский

Амстиславский С. Я.

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН,
к.б.н.



Орлова

Орлова Г. В.

Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
(ИЦиГ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10

Телефон: +7(383) 363-49-80

E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

Сайт организации: <https://www.icgbio.ru/>

В диссертационный совет **24.1.232. 01** при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (г. Серпухов, г. Пушкино Московской обл. проспект Науки, д. 3, 142290)

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное наименование организации: (по Уставу организации)	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук"
Сокращенное наименование организации:	ИЦиГ СО РАН
Ведомственная принадлежность:	Министерство науки и высшего образования РФ
Место нахождения:	630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10
Почтовый адрес организации с указанием индекса:	630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10
Телефон с указанием кода города:	+7(383) 363-49-80
Адрес электронной почты (e-mail):	icg-adm@bionet.nsc.ru
Адрес официального сайта в сети «Интернет» (при наличии):	https://www.icgbio.ru/
Ф. И.О., ученая степень, ученое звание руководителя организации	Кочетов Алексей Владимирович директор ИЦиГ СО РАН, доктор биологических наук, академик РАН
Ф. И.О., ученая степень, ученое звание сотрудника, утвердившего отзыв ведущей организации	Кочетов Алексей Владимирович директор ИЦиГ СО РАН, доктор биологических наук, академик РАН
Лаборатории, кафедры или другие научные подразделения, деятельность которых связана с научным направлением диссертации	Сектор криоконсервации и репродуктивных технологий
Фамилия Имя Отчество Ученая степень, ученое звание сотрудников, составивших отзыв ведущей организации	Амстиславский Сергей Яковлевич доктор биологических наук, г.н.с; Окотруб Светлана Васильевна кандидат биологических наук, инженер-исследователь

Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций) прилагается.

1. Amstislavsky S., Rozhkova I., Rakhmanova T., Kozeneva V., Brusentsev E. Full-Term In Vivo Development of Frozen-Thawed Mammalian Diapausing Embryos. Reprod Domest Anim. 2025 V. 60(9), P. e70123. doi: 10.1111/rda.70123. PMID: 40910471.

2. Amstislavsky S., Brusentsev E., Lebedeva D., Rozhkova I., Rakhmanova T., Okotrub S., Kozeneva V., Igonina T., Babochkina T. Effect of cryopreservation on Odc1 and RhoA genes expression in diapausing mouse blastocysts. Reprod Domest Anim. 2024. V. 59(5). P. e14576. doi: 10.1111/rda.14576. PMID: 38712681.

3. Igonina T.N., Rakhmanova T.A., Omelchenko A.N., Okotrub K.A., Brusentsev E.Y., Rozhkova I.N., Amstislavsky S.Y. Effects of stearic acid on the embryo cryopreservation in mouse. *Cryo Letters*. 2024. V. 45(1). P. 28-35. PMID: 38538369.
4. Okotrub K.A., Omelchenko A.N., Chuyko E.A., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Irreversible lipid phase transition detected in a porcine oocyte at chilling. *Cryobiology*. 2024. V. 114. P. 104850. doi: 10.1016/j.cryobiol.2024.104850.
5. Omelchenko A.N., Okotrub K.A., Igonina T.N., Rakhmanova T.A., Okotrub S.V., Rozhkova I.N., Kozeneva V.S., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Probing metabolism in mouse embryos using Raman spectroscopy and deuterium tags. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2025. V. 15;325. P. 125044. doi: 10.1016/j.saa.2024.125044.
6. Amstislavsky S., Okotrub S., Rozhkova I., Rakhmanova T., Igonina T., Brusentsev E., Kozeneva V., Lebedeva D., Omelchenko A., Okotrub K. Program freezing of diapausing embryos in the mouse. *Theriogenology*. 2024. V. 217. P. 1-10. doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.01.006.
7. Rakhmanova T., Mokrousova V., Okotrub S., Kizilova E., Brusentsev E., Amstislavsky S. Effects of forskolin on cryopreservation and embryo development in the domestic cat. *Theriogenology*. 2023. V. 210. P. 192-198. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.07.035.
8. Omelchenko A.N., Igonina T.N., Brusentsev E.Y., Okotrub K.A., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Cryopreservation increases accumulation of exogenous stearic acid in mouse embryos. *Cryobiology*. 2022. V. 109. P. 44-52. doi: 10.1016/j.cryobiol.2022.09.005.
9. Igonina T.N., Okotrub K.A., Brusentsev E.Y., Chuyko E.A., Ragaeva D.S., Ranneva S.V., Amstislavsky S.Y. Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after in vitro culture with linoleic acid. *Cryobiology*. 2021. V. 99. P. 55-63. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.01.014.

Даю согласие на размещение персональных данных на официальном сайте ФИЦ ПНЦБИ РАН включение персональных данных в аттестационное дело соискателя и их дальнейшую обработку.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель и его научный руководитель (консультант) не являются ее сотрудниками, а также в ведущей организации не ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соискателем).

Ученый секретарь, к.б.н.



Орлова Г.В.