

## ОТЗЫВ

официального оппонента 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.

При возникновении неблагоприятных условий в окружающей среде (голод, холод, отсутствие воды и пищи) гипотермия и гипометаболизм являются одними из основных стратегией для защиты организма и его органов, тканей и клеток у многих видов животных, включая приматов и человека. В настоящее время гипотермия является критическим компонентом многих процедур, используемых для транспортировки и сохранения органов перед трансплантацией. При трансплантации сердца проблема жизнеспособности является постоянным ограничением. Известно, что метаболизм сердца ограничивает время гипотермического хранения 4–6 часами, прежде чем этот орган подвергнется чрезмерной потере АТФ, образованию кислородных радикалов и необратимому разрушению в результате апоптоза и некроза. С 1960-х годов для продления срока сохранности трансплантируемого сердца разрабатывались такие методы, как гипотермическое хранение, перфузия, оксигенация и гипербария. Постоянная разработка кардиоплегических растворов позволила минимизировать отёк и образование кислородных радикалов, что привело к продлению жизнеспособности донорского сердца. Новые исследования событий, предохраняющих от или приводящих к некрозу и апоптозу, в сочетании с технологиями транспортировки сердца, могут способствовать дальнейшей разработке новых защитных кардиоплегических средств. Продление срока сохранности сердца в состоянии гипотермии потенциально может увеличить число доноров и, в конечном итоге, улучшить послеоперационные результаты. Данный подход необходим и используется при сохранении половых клеток с последующим их использованием в репродуктивных технологиях.

Именно в этом направлении выполнена диссертационная работа Гагаринского, актуальность которой не вызывает сомнения, и которая посвящена разработке и исследованию гипотермической (+4°C) газовой защите сердца крыс и сохранности ооцитов травяной лягушки (*Rana temporaria*) на сроках консервации до 4х суток и при их дальнейшем эмбриональном развитии.

Как было показано, протекторная роль газовой смеси в процессе гипотермической консервации обусловлена запуском клеточных механизмов,

отвечающих за снижение окислительного стресса и гипоксии, а также поддержания аэробного метаболизма. Следовательно, полный потенциал применения гипотермии и газовой смеси ( $N_2O+O_2$ ) не может быть реализован до тех пор, пока клеточные и молекулярные механизмы не будут изучены. В данной работе исследованы показатели функциональной активности, уровень инфарктных повреждений и экспрессия некоторых маркерных генов и продемонстрирован высокий уровень сохранности сердца при пролонгации гипотермической консервации до 24 часов.

**Целью своей работы** автор определил изучение протекторных свойств и механизмов воздействия газовых смесей кислорода и закиси азота при пролонгированном гипотермическом хранении сложных биологических объектов (для которых отсутствуют методы низкотемпературной консервации). Использование в своем составе разрешенных медицинских газов и хороший уровень восстановления органа после консервации, по сравнению с другими экспериментальными группами ( $N_2+O_2$ ,  $CO+O_2$ ,  $O_2$ ), позволяет рассматривать смесь закиси азота и кислорода как перспективного кандидата для внедрения в клиническую практику

#### **Общая характеристика работы**

Диссертация изложена на 116 страницах и состоит из введения и 4-х глав, включающих обзор литературы, постановку задачи, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов, списка сокращений и обозначений и списка литературы из 262 источников. Работа содержит 21 рисунок и 9 таблиц в качестве иллюстративного материала проведенного исследования.

**Во введении** обоснована актуальность темы, отражена степень ее разработанности; сформулированы цель и задачи диссертационного исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Здесь же указаны методология и методы исследования; перечислены положения, выносимые на защиту; приведено обоснование степени достоверности полученных результатов, а также представлены сведения о личном вкладе автора, апробации, количестве публикаций по теме диссертации.

**Первая глава** представляет собой обзор литературы и состоит из 6 разделов. Первые три раздела (1.1-1.3) посвящены обзору основных подходов к хранению биологических объектов, а также рассмотрению как механизмов повреждения сложных биологических объектов в процессе криоконсервации, так и механизмов действия гипотермии на них. В разделе 1.4.обсуждаются методы гипотермического хранения «сложных» биологических объектов, включая органы теплокровных (подраздел 1.4.1) и ооциты холоднокровных животных (подраздел 1.4.2).

В разделе 1.5. рассматриваются биологически активные газы, а именно, кислород, монооксид углерода и закись азота (подразделы 1.5 1- 1.5.3), и обсуждается их роль в

защите клеток и тканей в процессе гипотермического хранения. В частности, в разделе 1.5.1., детально рассматриваются альтернативные варианты применения газообразного кислорода для целей консервации различных биологических объектов. В разделе 1.5.2. проведен анализ литературных данных по применению монооксида углерода как одного из компонентов в многообещающей стратегии защиты органов и клеток от функциональных нарушений перед трансплантацией. Раздел 1.5.3. посвящен немногочисленному анализу литературы о защитной роли и клеточных механизмах закиси азота, как одного из старейших анестетиков, используемых в медицинской практике, во время хранения биологических объектов. В разделе 1.6. анализируется влияние низких и сверх высоких давлений на различные клеточные системы и процессы, в частности, на протекание внутриклеточного синтеза ДНК и работу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы.

**Вторая глава** методологическая и содержит описание материалов (реактивов, использованных животных, анестезирующих веществ, газов (разделы 2.1.1-2.1.4), и экспериментальных методов (разделы 2.2.1- 2.2.12). Для решения поставленных задач в работе использован широкий спектр физиологических (исследование изолированного сердца методом ретроградной перфузии по Лангендорфу), криобиологических (газовая гипотермическая консервация), гистологических (приготовление ультратонких срезов а также окрашивание сердца трифенилтетразолием хлористым (ТТХ)), молекулярных (полимеразная цепная реакция), а также вспомогательных репродуктивных технологий (получение гамет травяной лягушки, искусственное оплодотворение и их дальнейшее развитие). В качестве объектов исследования были выбраны изолированные сердца крыс линии Wistar и ооциты травяной лягушки (*Rana temporaria*). Следует особо выделить последний объект. После гормональной инъекции лягушек и изъятия ооцитов, использованные животные в хорошем состоянии возвращались в естественную среду обитания. Таким образом, данный методический подход, вносит свой вклад не только в развитие репродуктивных технологий, но также оказывает положительное влияние на сохранение и безопасность окружающей среды. Как уже упоминалось, исследования проводились с применением классических и современных методов в полной мере адекватных поставленным целям и задачам. В итоге проделанной работы автором получены важные приоритетные результаты, которые обсуждались на международных конференциях и представлены в высоко рейтинговых международных журналах.

В разделе 2.2.12. излагается статистическая обработка полученных результатов с помощью программы SigmaPlot 12.5. Значимость различий, наблюдаемых в экспериментах, определяли с помощью U-теста Манна-Уитни и *t*-теста Стьюдента.

**Третья глава** содержит результаты исследования и состоит из 6-ти разделов. Первый раздел посвящен выбору временного интервала хранения сердца крысы для анализа защитных свойств газовых смесей. В последующих трех разделах, представлены результаты по изучению уровня восстановления функциональной активности сердца крыс после гипотермической консервации в газовой композиции, состоящей из разрешенных к применению в медицинской практике газов (кислород, закись азота). Соискателем дана оценка степени восстановления сократительной активности сердца на перфузионном стенде (перфузия по Лангендорфу), проведен анализ нарушений ритма в процессе реперфузии и инфарктного повреждения миокарда с последующим гистологическим анализом. При помощи ПЦР в реальном времени был осуществлен поиск возможных защитных механизмов газовых смесей в процессе гипотермического хранения сердца. Необходимо отметить, что в данных разделах: (а) впервые была продемонстрирована успешная консервация изолированного сердца крысы в газовой смеси, состоящей из кислорода и закиси азота в соотношении 1:1, обеспечивающем высокий уровень сохранности миокарда при 24-часовом хранении и (б) доказана большая эффективность применения двухкомпонентных газовых смесей, содержащих кислород, для лучшего сохранения данного органа. Полученные результаты являются значимыми как с фундаментальной, так и с практической точки зрения. В работе произведён анализ уровня развития окислительного стресса, апоптоза, оценен риск развития гипоксических повреждений и состояния энергетической системы миокарда сердца крысы на основе анализа экспрессии ключевых генов после гипотермической консервации (+4°C) при воздействии различных газовых смесей (подразделы 3.3.1-3.3.4).

**В пятом и шестом разделе** представлены пионерские результаты по адаптации технологии газовой консервации и разработка условий ее применения для гипотермического хранения ооцитов земноводных. Произведена оценка максимального времени хранения ооцитов травяной лягушки под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода и кислорода, Выяснено влияние состава газовой смеси и прилагаемого давления на сохранность ооцитов травяной лягушки в процессе гипотермического хранения. Одним из важных научных достижений данного этапа работы, имеющим теоретическую и практическую значимость, является предложение новых подходов, для пролонгирования сроков хранения ооцитов пойкилотермных животных в целях контролируемого разведения амфибий, как одного из стремительно вымирающих видов животных.

**В главе 4,** представлено всеобъемлющее обсуждение результатов полученных при газовой консервации сердца крысы (4.1) и газовой консервации ооцитов травяной

лягушки (4.2.), которые позволяют говорить как о возможности продления сроков гипотермической консервации сердца без возникновения рисков необратимого повреждения трансплантата, так и о высокой сохранности репродуктивных клеток лягушки на сроках хранения до 4х суток.

**Диссертация завершается выводами, списком сокращений и обозначений и списком цитированной литературы, оформленном в единообразном стиле.**

Достоверность полученных в диссертационной работе результатов подтверждается использованием в ней современных методов, биологического анализа и взаимной согласованностью полученных результатов с литературными данными, не противоречащих современным научным представлениям и закономерностям, а также публикацией основных результатов исследования в рецензируемых журналах, входящих в международные базы цитирования и Перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ. Все результаты и выводы диссертанта обоснованы, они опираются на большой объем литературных данных и теоретических оценок, полученных в ходе проведения работы. Таким образом, выше представленный анализ содержания диссертации позволяет говорить о том, что выполненное исследование обладает несомненной научной новизной и практической значимостью. Полученные результаты соответствуют поставленной цели и задачам.

**Публикации.** Результаты работы представлены в 3 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных положений кандидатских и докторских диссертаций, а также представлены на 2 конференциях различного уровня. Кроме того, имеются 2 патента, описывающих способы поддержания жизнеспособности, повышения безопасности и эффективности хранения и транспортировки трансплантируемого органа под давлением консервирующей газовой смеси и устройство на его основе. Указанные выше публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

**Вопросы и замечания по существу диссертационной работы.**

1. В разделе 3.3.3 представлены данные по экспрессии гена белка-разобщителя (Ucp-1, термогенин), “экспрессирующегося в различных отделах сердца”. Действительно, в некоторых статьях и даже в базе данных мы можем найти ссылки о присутствии данного гена в сердце животных. Однако, на сегодняшний день, имеются многочисленные сообщения об экспрессии разобщающего белка 1 (UCP1) которые выявили его присутствие только в эпикардальной жировой ткани сердца (для примера, Arch Endocrinol Metab. 2023 Jan 17;67(2):214–223., JCI Insight 2019 Apr 18;4(8):e123618). Думаю, что диссертанту следует обратить на это внимание в своих будущих исследованиях.

2. В главе 3.3.4. “Оценка рисков развития апоптоза в изолированных сердцах крысы...”, исходя из уровней активации эффекторной каспазы-3 (Casp3). Необходимо отметить, что, несмотря на то, что активацию Casp3 интерпретируют как апоптотический признак, исследования показывают, что функция каспазы-3 неоднозначна. В настоящее время Casp3 рассматривается как фермент, необходимый не только для гибели, но и для нормальной жизнедеятельности клетки, а катализируемые каспазой-3 реакции - необходимы для поддержания клеточного гомеостаза. Для того чтобы с большей уверенностью говорить об увеличении или уменьшении уровня апоптоза, необходимо анализировать фрагментацию ДНК, которая происходит при расщеплении геномной ДНК. Этот тип расщепления геномной ДНК происходит ближе к концу апоптоза и является ключевым маркером поздней стадии апоптоза. Либо смотреть уровень Cleaved Caspase 3 (расщепленная каспаза 3) - это активная, протеолитически расщепленная форма Caspase 3. Хочется пожелать диссертанту обратить на это внимание в дальнейших исследованиях.

3. В тексте имеется незначительное количество опечаток, в основном, пунктуационного характера.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы. Диссертация представляет собой законченное научное исследование, в котором решена задача усовершенствования пролонгации сроков гипотермического хранения биологических объектов консервирующими газовыми смесями кислорода и закиси азота, имеющая существенное значение для развития биофизики клетки (криобиологии, как одной из областей биофизики). Достоверность полученных результатов, научная значимость и корректность сделанных выводов не вызывают сомнений. Автореферат диссертации, в целом, отражает суть и выводы проделанной работы. Результаты, представленные в диссертации, соответствуют паспорту специальности 1.5.2. Биофизика.

Считаю, что по своей актуальности, научному уровню проведённых исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа «ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ КОНСЕРВАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ГАЗОВЫХ СМЕСЯХ КИСЛОРОДА И ЗАКИСИ АЗОТА» отвечает требованиям пп. 9-11, 13, 14 Положения о порядке присуждения ученых степеней (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.13 № 842) в действующей редакции, а ее автор, Гагаринский Евгений Леонидович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник лаборатории

“Механизмов организации биоструктур”

Института Теоретической и Экспериментальной Биофизики

Кандидат биологических наук,

Крамарова Людмила Ивановна

27.02.2026

Адрес: 142290 г. Пущино, Московской области, ул. Институтская, 3

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики

Российской академии наук (ИТЭБ РАН)

Подпись Крамаровой заверяю,

Ученый секретарь ИТЭБ РАН

к.б.н. Перевязова Т.А.

