

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора, заведующей научно-исследовательской лабораторией молекулярных механизмов старения ФГБНУ "ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН" Колосовой Наталии Гориславовны о диссертационной работе Моргуновой Галины Васильевны на тему "Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток", представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки)

Актуальность темы диссертационной работы. К неизбежным проявлениям старения относятся снижение функциональных возможностей нервной и сердечно-сосудистой систем, увеличение вероятности развития связанных с этими системами заболеваний, а также ухудшение трофического обеспечения головного мозга и сердца, обусловленные нарушением метаболизма и изменением микроокружения клеток. В связи с увеличением продолжительности жизни и ростом числа людей, страдающих нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями, изучение фундаментальных механизмов, инициирующих развитие возрастных нарушений, а также поиск способов их предотвращения приобрели особую актуальность. Для исследований на уровне организма существует ряд модельных объектов – представителей как беспозвоночных, так и позвоночных животных. Что же касается клеточного уровня, то для изучения старения нейронов, кардиомиоцитов и других дифференцированных и высокоспециализированных клеток ряд авторов чаще всего предлагают использовать модель хронологического старения дрожжей. Так как в процессах, ассоциированных со старением, преимущественно участвуют консервативные метаболические пути, результаты, полученные на дрожжах, часто хорошо согласуются с результатами исследований на животных. В диссертационном исследовании Г.В. Моргуновой используется модель, похожая на хронологическое

старение дрожжей, но в качестве объекта исследований выбрана культура клеток млекопитающего – китайского хомячка. Использование таких культур клеток, вероятно, сможет еще больше приблизить геронтологов к пониманию "старения" млекопитающих на клеточном уровне, так как их метаболизм значительно отличается от метаболизма дрожжей, если мы рассматриваем неконсервативные пути. В работе исследуется важный вопрос – как оценивать наличие положительного или отрицательного эффекта в экспериментах по испытанию потенциальных геропротекторов. Предлагается использовать тот же способ, что применяется для животных, т.е. получать кривые выживания.

Научная новизна результатов исследования. Основная новизна диссертационного исследования Г.В. Моргуновой заключается в доказательстве того, что клетки в культуре вымирают в соответствии с законом Гомпертца, и в предложении использовать для анализа кривых дожития клеток методы, применяемые в геронтологических экспериментах на людях и животных. Использование этих методов позволило диссертанту протестировать несколько потенциальных геропротекторов. Впервые было установлено, что 2,4-динитрофенол в "мягко разобщающих" концентрациях не влияет на вымирание клеток, 8-оксо-2'-дезоксигаунозин уменьшает среднюю продолжительность жизни культуры клеток в стационарной фазе, а замена 44,4% среды для культивирования на изотонический препарат "Quinton Marine Plasma" увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни. Показано, что ассоциированная со старением β -галактозидаза может быть использована в качестве биомаркера "стационарного клеточного старения". Проведена проверка числа копий ряда референсных генов, а также генов, связанных с аутофагией и регуляцией пролиферации, в клетках китайского хомячка линии B11-dii FAF28, при этом не обнаружено аномального увеличения этого показателя по сравнению с числом копий у *Cricetulus griseus*. Установлено, что уровень транскрипции генов *Atg5* и *PRKAA1* не изменяется в ходе "стационарного старения" клеток этой линии, а уровень экспрессии гена *MAP1LC3A* понижен в "зрелых" и "умеренно старых" клетках.

Практическая значимость исследования. Используемый в диссертационной работе анализ кривых вымирания культуры клеток может быть применен и в экспериментах на других клеточных линиях, а также в опытах с бактериями и дрожжами. Такой метод может стать хорошим инструментом для изучения фундаментальных механизмов старения, поиска или проверки геропротекторов, а также для эволюционно-сравнительных исследований на клеточных популяциях самого разного происхождения. Специфика экспериментов потребовала диссертанта исследовать рост и гибель клеток китайского хомячка на разных культуральных средах и проанализировать, вклад каких компонентов наиболее важен для длительного их поддержания без пересевов. Результаты этих исследований могут быть использованы самыми разными специалистами, работающими с похожими клеточными линиями, в том числе – биотехнологами.

Достоверность и обоснованность полученных результатов. В своей работе Г.В. Моргунова использовала стандартные процедуры и методы – такие как тесты на цитотоксичность изучаемых соединений (в том числе с анализом способности к колониеобразованию), методы определения экспрессии генов и активности ассоциированной со старением β -галактозидазы, окраску клеток для оценки их жизнеспособности и т. д. Подробно описаны все подразделы методики, в том числе способ получения данных для построения кривых вымирания. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных статистических методов, проанализированы и сопоставлены с данными других авторов, что позволяет судить об их обоснованности. По материалам диссертационного исследования опубликовано 16 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК Минобрнауки РФ, 3 главы в коллективных монографиях (из Scopus и Web of Science), 3 статьи в сборниках и 14 тезисов докладов (всего 36 научных работ по теме исследования). Результаты доложены на российских и международных конференциях. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы, а выводы соответствуют поставленным автором задачам. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Общая оценка структуры и содержания работы. Название диссертации соответствует ее содержанию. Работа изложена на 193 страницах, включает в себя введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список использованной литературы, 3 приложения, проиллюстрирована 34 рисунками и содержит 2 таблицы. В списке использованной литературы 390 источников, 359 – на английском и других иностранных языках, 31 – на русском. Одним из достоинств диссертации можно назвать ее литературный обзор, охватывающий как научные работы начала XX в., необходимые для понимания особенностей возникновения экспериментов на клеточных культурах в геронтологии, так и последние современные статьи, посвященные самым новым открытиям в этой области науки. Довольно подробно описаны "Материалы и методы". Всем экспериментам с геропротекторами предшествовали подготовительные опыты по оценке цитотоксичности и определению действующей концентрации препаратов. В отдельных случаях дополнительно проанализированы чистота препаратов или динамика их поглощения клетками из среды, что также положительно характеризует работу и свидетельствует о продуманном дизайне экспериментов.

Использование результатов диссертационной работы в научной работе и учебном процессе. Работа выполнялась в рамках государственного задания ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (ч. 2, фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8) и полностью соответствует научным планам биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Вопросы и замечания по работе. Принципиальных замечаний к работе и выносимым на защиту положениям нет. Есть несколько вопросов и комментариев, которые хотелось бы предложить для обсуждения.

1. В "Материалах и методах" приведены формула расчета средней продолжительности жизни и рисунок 1, на котором показано, как рассчитывались медианная и 90%-ная продолжительность жизни. Однако не совсем понятно, всегда

ли удавалось определить момент, когда вымирает 50% и 90% клеток в культуре, чтобы получить соответствующую точку на кривой вымирания. Или для этих целей использовали аппроксимированный график, из которого такие данные получали аналитически? Это в методах необходимо было пояснить подробнее.

2. В качестве предложения для будущих экспериментов можно порекомендовать диссертанту исследовать компонентный состав культуральных сред на разных этапах длительного культивирования, чтобы более точно установить, как поглощаются разные соединения и какие из них необходимы клеткам в большей степени (аминокислоты, витамины, глюкоза). Таким образом можно будет точно доказать, от нехватки какого компонента преждевременно начали погибать клетки, выращиваемые на среде 199.

3. Известен ли точный состав изотонического препарата "Quinton Marine Plasma"? Если известен, то можно предположить, как именно необходимо изменить состав модифицированной Дульбекко среды Игла, чтобы клетки дольше могли существовать в культуре.

Эти вопросы не влияют на высокую положительную оценку исследования и не умаляют значимости проделанной работы.

Заключение

Диссертация Моргуновой Галины Васильевны "Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток", представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной самостоятельной научно-квалификационной работой. Исследование направлено на решение актуальной задачи геронтологии – поиск способов оценки геропротекторных препаратов и усовершенствование моделей для изучения механизмов старения на клеточных культурах.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 "Положения о порядке

присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель Моргунова Галина Васильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

Официальный оппонент:

заведующая научно-исследовательской лабораторией

молекулярных механизмов старения

ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр

Институт цитологии и генетики СО РАН"

доктор биологических наук,

профессор

Колосова Наталия Гориславовна

" 2 " декабря 2019 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук" (ФГБНУ "ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН")

Почтовый адрес: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10; тел.: +7 (383)

363-49-80; факс: +7 (383) 333-12-78; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru; www:

http://www.bionet.nsc.ru

Подпись И.Г. Колосовой заверяю



Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН

к.б.н. Г.В.Орлова

СОГЛАСИЕ

На оппонирование диссертации, защищаемой в диссертационном совете Д 521.103.01 при Автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательский центр "Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии" по защите кандидатских и докторских диссертаций. Адрес: 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д.3.

Специальность диссертационного совета 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

Я, Колосова Наталия Гориславовна, согласна быть официальным оппонентом по диссертации Моргуновой Галины Васильевны на тему: «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непереживаемой культуре клеток», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

О себе сообщаю следующее:

1. Год рождения: 1949
2. Гражданство – РФ
3. Место работы – ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук"
4. Адрес места работы, телефон, должность – 630090, Новосибирск, пр-т акад. Лаврентьева, д. 10, +7 (383) 363-49-63, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения
5. Ученая степень с указанием специальности – доктор биологических наук, физиология человека и животных (03.00.13), биохимия (03.00.04)
6. Ученое звание с указанием специальности – профессор (патофизиология – 14.03.03; биохимия – 03.01.04).
7. Основные работы (за последние 5 лет):

1. Rudnitskaya E.A., Kozlova T.A., Burnyasheva A.O., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Alterations of hippocampal neurogenesis during development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *Exp. Gerontol.* 2019. 115:32–45.
2. Telegina D.V., Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S. Immunohistochemical localization of NGF, BDNF, and their receptors in a normal and AMD-like rat retina. *BMC Med. Genomics.* 2019. 12(2):48.
3. Stefanova N.A., Ershov N.I., Maksimova K.Y., Muraleva N.A., Tyumentsev M.A., Kolosova N.G. The rat prefrontal-cortex transcriptome: Effects of aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2018. 74(1):33–43.
4. Muraleva N.A., Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Suppression of AMD-like pathology by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 is associated with a decrease in the accumulation of amyloid β and in mTOR activity. *Antioxidants.* 2019. 8(6):177.
5. Muraleva N.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. p38 MAPK-dependent alphaB-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *Exp. Gerontol.* 2019, 119:45–52.
6. Baturina G.S., Katkova L.E., Kolosova N.G., Solenov E.I. Age-related changes in water transport by corneal endothelial cells in rats. *Adv. Gerontol.* 2018. 8(2):153–157.
7. Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Association of cerebrovascular dysfunction with the development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *BMC Genomics.* 2018. 19(3):75.

8. Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G. Changes in retinal glial cells with age and during development of age-related macular degeneration. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018. 83(9):1009–1017.
9. Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Devyatkin V.A., Kolosova N.G. Involvement of the autophagic pathway in the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Biogerontology*. 2018. 19(3–4):223–235.
10. Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Kiseleva E.V., Kolosova N.G. Mitochondria with morphology characteristic for Alzheimer's disease patients are found in the brain of OXYS rats. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018. 83(9):1083–1088.
11. Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Muraleva N.A., Rumyantseva Y.V., Kiseleva E., Vavilin V.A., Kolosova N.G. Mitochondrial dysfunction as a predictor and driver of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *J. Alzheimers Dis.* 2018. 63(3):1075–1088.



д.б.н. проф. Колосова Наталия Гориславовна

«22» 10 2019 г.

Подпись д.б.н. проф. Колосовой Н.Г. заверяю

Учёный секретарь
ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук"
к.б.н.



Орлова Галина Владимировна

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Моргуновой Галины Васильевны на тему: «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непереживаемой культуре клеток», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

№ п/п	ФИО	Год рождения, гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, специальность	Ученое звание	Основные работы
1	Колосова Наталия Гориславовна	1949 г., гражданка России	ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук", заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения	Доктор биологических наук, 03.00.13 – физиология человека и животных, 03.00.04 – биохимия	Профессор, патофизиология – 14.03.03; биохимия – 03.01.04	<p>1. Rudnitskaya E.A., Kozlova T.A., Buryasheva A.O., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Alterations of hippocampal neurogenesis during development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. <i>Exp. Gerontol.</i> 2019. 115:32–45.</p> <p>2. Telegina D.V., Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S. Immunohistochemical localization of NGF, BDNF, and their receptors in a normal and AMD-like rat retina. <i>BMC Med. Genomics.</i> 2019. 12(2):48.</p> <p>3. Stefanova N.A., Ershov N.I., Maksimova K.Y., Muraleva N.A., Tyumentsev M.A., Kolosova N.G. The rat prefrontal-cortex transcriptome: Effects of aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology. <i>J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.</i> 2018.</p>

74(1):33–43.

4. Muraleva N.A., Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Suppression of AMD-like pathology by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 is associated with a decrease in the accumulation of amyloid β and in mTOR activity. *Antioxidants*. 2019. 8(6):177.
5. Muraleva N.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. p38 MAPK-dependent alphaB-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *Exp. Gerontol.* 2019, 119:45–52.
6. Baturina G.S., Katkova L.E., Kolosova N.G., Solenov E.I. Age-related changes in water transport by corneal endothelial cells in rats. *Adv. Gerontol.* 2018. 8(2):153–157.
7. Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Association of cerebrovascular dysfunction with the development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *BMC Genomics*. 2018. 19(3):75.
8. Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G. Changes in retinal glial cells with age and during development of age-related macular degeneration. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018. 83(9):1009–1017.
9. Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Devyatkin V.A., Kolosova N.G. Involvement of the autophagic pathway in

					<p>the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. <i>Biogerontology</i>. 2018. 19(3-4):223-235.</p> <p>10. Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Kiseleva E.V., Kolosova N.G. Mitochondria with morphology characteristic for Alzheimer's disease patients are found in the brain of OXYS rats. <i>Biochemistry (Mosc.)</i>. 2018. 83(9):1083-1088.</p> <p>11. Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Muraleva N.A., Rummyantseva Y.V., Kiseleva E., Vavilin V.A., Kolosova N.G. Mitochondrial dysfunction as a predictor and driver of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. <i>J. Alzheimers Dis.</i> 2018. 63(3):1075-1088.</p>
--	--	--	--	--	--

Доктор биологических наук, профессор

«22» 10 2019 г.

Подпись д.б.н. проф. Колосовой Н.Г. заверяю
 Учёный секретарь ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр
 Институт цитологии и генетики
 Сибирского отделения Российской академии наук"
 к.б.н.

Учен

Колосова Наталья Гориславовна



Г.Г. Колосова

Колосова Галина Владимировна