

**ОТЗЫВ**  
**ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

о диссертационной работе Моргуновой Галины Васильевны  
«Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой  
культуре клеток» на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки)

Диссертация Г.В. Моргуновой посвящена исследованию закономерностей вымирания культуры клеток в рамках модели «стационарного старения», а также применению полученных кривых выживания для изучения механизмов старения и тестирования геропротекторных препаратов. Вопросы о том, существует ли старение на клеточном уровне и обусловлено ли старение организма какими-либо изменениями в клетках, до сих пор остаются открытыми. Геронтологами предложено несколько вариантов ответов на эти вопросы, но в настоящее время ни один из них не является однозначным. В то же время существующие модели клеточного старения все же позволяют получать результаты, согласующиеся с данными как опытов на животных, так и клинических испытаний, что свидетельствует о необходимости дальнейшей работы в этом направлении.

**Актуальность темы диссертации**

Наравне с животными в геронтологических исследованиях используются клеточные культуры и популяции одноклеточных организмов. Как и всякие модели, модели клеточного старения имеют свои преимущества и недостатки. Широко известное репликативное старение, основанное на феномене Л. Хейфлика, не может объяснить, что является причиной деградации и гибели клеток, которые не делятся. Для моделирования старения неделящихся клеток существует модель «хронологического старения», однако в качестве объекта исследований в ней преимущественно используются дрожжи, в то время как в первую очередь геронтологов интересуют клетки млекопитающих и человека. Необходимость изучать старение неделящихся клеток обусловлена тем фактом, что организм человека состоит из большого числа тканей, клетки которых не пролиферируют

(или почти не пролиферируют) – это так называемые терминально дифференцированные клетки (нейроны, миоциты, специализированные клетки крови и т.д.). Изучение старения неделящихся клеток позволит приблизить исследователей к проблеме старения мозга и сердца.

В рассматриваемой диссертационной работе эксперименты проводятся на клетках млекопитающих, а в качестве модели используется модель «хронологического старения» (автор предпочитает называть его «стационарным», так как термин «хронологическое» закрепился за дрожжами). При «стационарном старении» клетки делятся до момента достижения монослоя, а затем перестают пролиферировать и переходят в стационарную фазу роста, пребывая в которой и стареют. Так как даже в экспериментах с дрожжами обнаруживаются интересные для геронтологии данные, можно предполагать, что похожие исследования на клетках млекопитающих являются актуальными.

#### **Научная новизна результатов диссертационного исследования**

В диссертационной работе Г.В. Моргунова установила, что вымирание клеток в «стационарной» культуре подчиняется законам Гомпертца: сила смертности экспоненциально растет со временем, т.е. для каждой живой клетки вероятность гибели все время увеличивается. Таким образом, показано, что закон Гомпертца работает не только в популяциях людей и лабораторных животных, но и в культуре неделящихся клеток (даже не в популяциях одноклеточных организмов, а именно в культуре линейных клеток), что было показано впервые.

Новшеством является также предложение авторов использовать в экспериментах на культурах клеток млекопитающих показатели, которые обычно применяются в исследованиях на когортах животных – средняя, максимальная, медианная и модальная продолжительность жизни, сила смертности, темп старения.

Впервые изучена экспрессия ряда генов (несколько генов, отвечающих за аутофагию, несколько – за регуляцию пролиферации) в клетках, находящихся на разных этапах «стационарного старения». Установлено, что изменяется только уровень транскрипции гена, кодирующего белок LC3 (понижен в «зрелых» и «умеренно старых» клетках).



Показано, что ассоциированная со старением  $\beta$ -галактозидаза может быть хорошим биомаркером «клеточного возраста» не только в модели стресс-индуцированного старения, но и в выбранной автором «стационарной» модели. Это позволяет думать, что существуют некоторые общие черты между разными моделями «клеточного старения».

Наконец, с помощью анализа кривых вымирания «стационарно стареющей» культуры автор смогла протестировать несколько соединений и препаратов, которые предположительно могли бы иметь геропротекторные свойства. В ходе исследования установлено, что разбавление части культуральной среды аналогом известного с конца 19 века раствора для замены плазмы крови – препаратом «Квинтон» (Quinton Marine Plasma) – увеличивает продолжительность жизни культуры и смещает кривую ее вымирания вправо.

#### **Практическая значимость диссертационного исследования**

В исследовании предлагается методика для поиска и первичного отбора препаратов, которые в перспективе могут стать геропротекторами, на клеточных культурах.

В работе Г.В. Моргуновой большое место занимает анализ наиболее подходящих по составу компонентов сред для длительного культивирования клеток, что может быть полезно не только геронтологам, но и любым исследователям, которые работают с культурами. Также интерес представляют данные о динамике изменения pH в ходе роста клеток и их «стационарного старения», связи плотности культуры клеток и величины pH, влиянии добавления буфера к среде на кинетику роста и вымирания клеток.

Экспериментаторам, работающим на клетках китайского хомячка линии B11-dii FAF28, будут полезны данные о количестве копий генов, исследованных в диссертации, а также об уровне их экспрессии.

#### **Достоверность полученных результатов, степень обоснованности выносимых на защиту положений, выводов и рекомендаций**

Обоснованность выносимых на защиту положений обусловлена глубоким анализом данных литературы и согласованием полученных в ходе экспериментов результатов с результатами других авторов. Организация экспериментов, а также выбор методов

исследования оправданы и соответствуют поставленным целям и задачам. Достоверность полученных результатов подтверждается грамотной статистической обработкой данных. В автореферате и диссертации приведена подлинная информация о публикациях соискателя.

### **Общая оценка структуры и содержания работы**

Диссертацию Г.В. Моргуновой можно назвать завершенной комплексной научно-исследовательской работой. Название, цели и задачи исследования соответствуют его содержанию. Работа построена классическим образом и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список использованной литературы, три приложения. Работа изложена на 193 страницах, содержит 34 рисунка и две таблицы, все разделы удобно структурированы. Список использованной литературы включает 390 источников, 31 из которых на русском языке, остальные – на иностранных языках. Объем диссертации обусловлен большим количеством проведенных экспериментов и полученных данных, обстоятельным обзором литературы, подробным описанием методики (иногда даже излишне подробным), всесторонним обсуждением полученных результатов.

Содержание диссертации отражено в 36 научных работах, в том числе в 16 статьях из журналов, рекомендованных ВАК, трех главах в коллективных монографиях, трех статьях в сборниках и 14 тезисах докладов. Опубликованные работы соответствуют материалам диссертации, автореферат отражает основное содержание работы.

### **Использование результатов диссертационной работы в научной работе и учебном процессе**

Работа соответствует государственному заданию биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

### **Замечания и вопросы к диссертационной работе**

К работе нет принципиальных замечаний, но есть несколько вопросов и предложений.

1) В некоторых экспериментах (особенно в предварительных) культуры клеток в разных исследуемых группах достигают разного уровня насыщающей плотности. Как в таком случае проводилось сравнение групп? Осуществлялась ли какая-либо нормировка – например, на контрольную группу?

2) Следующие вопросы также связаны с плотностью культуры клеток. Сильно ли зависит от плотности посева форма получаемых кривых (и роста, и вымирания)? Какую плотность посева можно считать оптимальной? Почему от опыта к опыту она немного различается?

3) В главе «Результаты и обсуждение» (последняя фраза подраздела 3.5.1), вероятно, возникла путаница с указанием диапазона концентраций.

4) В дополнение к анализу кривых вымирания, было бы логичным оценить динамику изменения активности ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы в экспериментах по тестированию геропротекторов, так как предварительно было установлено, что этот биомаркер старения подходит для изучаемой модели. Вероятно, автору было сложно сочетать эти процедуры, но они могли бы хорошо дополнить друг друга.

Перечисленные выше вопросы и предложения носят уточняющий характер и не снижают уровень научной ценности диссертационной работы.

Рукопись также содержит незначительное количество опечаток, неудачных выражений, плеоназмов вроде «хлорид аммония  $\text{NH}_4\text{Cl}$ » и других стилистических ошибок.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Разработка и усовершенствование моделей для изучения старения являются одними из основных направлений в геронтологии, в связи с чем диссертационное исследование Г.В. Моргуновой «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» посвящено решению актуальной задачи в этой области науки. По методическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства



Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04. 2016 г. и №1168 от 01.10.2018 г.), 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:

ведущий научный сотрудник

лаборатории межклеточных взаимодействий

отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства,

гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»,

доктор биологических наук

Корневский Андрей Валентинович

“6” декабря 2019 г.

Подпись А.В. Корневского заверяю

*Специально по поручению*  
*06.12.2019*

*А.В. Корневский*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

“Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта” (ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д.О. Отта”)

Почтовый адрес: 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

Тел.: +7 (812) 679-55-51

Факс: +7 (812) 328-23-61

e-mail: a.korenevsky@yandex.ru

www: <https://ott.ru>

## 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, Корневский Андрей Валентинович, согласен быть официальным оппонентом по диссертации Моргуновой Галины Васильевны на тему: «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

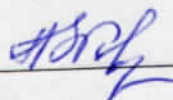
О себе сообщаю следующее:

- Год рождения: 1972
  - Гражданство – РФ
  - Место работы – ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта"
  - Адрес места работы, телефон, должность – 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3, +7 (812) 679-55-51, ведущий научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий
  - Ученая степень с указанием специальности – доктор биологических наук, физиология (03.03.01), биохимия (03.01.04)
  - Ученое звание с указанием специальности – без звания
  - Основные работы (за последние 5 лет):
- Korenevskii A.V., Milyutina Y.P., Zhdanova A.A., Pyatygina K.M., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Mass-spectrometric analysis of proteome of microvesicles produced by NK-92 natural killer cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. 165(4):564–571.
  - Керкешко Г.О., Корневский А.В., Соколов Д.И., Сельков С.А. Роль взаимодействия экстраклеточных микровезикул трофобласта с клетками иммунной системы и эндотелия в патогенезе преэклампсии. *Мед. иммунол.* 2018. 20(4):485–514.
  - Arutyunyan A.V., Zaloznyaya I.V., Kerkeshko G.O., Milyutina Yu.P., Korenevsky A.V. Prenatal hyperhomocysteinemia impairs hypothalamic regulation of reproductive cycles in rat progeny. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. 162(6):738–740.
  - Korenevsky A.V., Milyutina Yu.P., Kerkeshko G.O., Arutyunyan A.V., Kozina L.S. Role of reactive oxygen species in premature ageing of the female reproductive function. *Current Aging Sci.* 2017. 10(1):26–31.
  - Korenevskii A.V., Arutyunyan A.V. On the role of biogenic amines and reactive

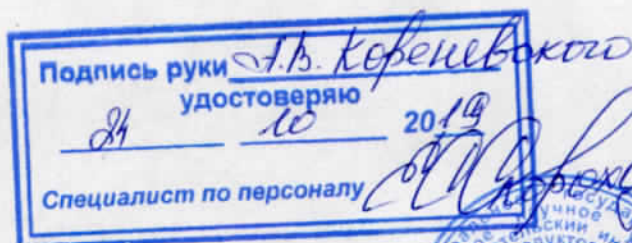


oxygen species in the disruption of the hypothalamic regulation of reproductive function in xenobiotic-induced and experimental hyperhomocysteinemia. *Neurochem. J.* 2016. 10(1):19–25.

- Milyutina Y.P., Pustygina A.V., Zaloznyaya I.V., Arutjunyan A.V. Age-related changes in biogenic amine content and oxidative stress profile in rat hypothalamus with hyperhomocysteinemia. *Adv. Gerontol.* 2016. 6(4):291–297.
- Арутюнян А.В., Керкешко Г.О., Милютин Ю.П., Корневский А.В., Козина Л.С., Залозная И.В. Влияние гипергомоцистеинемии на моноаминергические системы гипоталамуса и гиппокампа у самок крыс при старении. *Усп. геронтол.* 2015. 28(3):472–478.
- Korenevsky A.V., Arutyunyan A.V., Milyutina Yu.P., Zaloznyaya I.V., Kozina L.S. Pinealon corrects hyperhomocysteinemia-induced disturbances of the diurnal dynamics of hypothalamic norepinephrine content in female rats. *Neurochem. J.* 2014. 8(3):205–207.
- Korenevsky A.V., Milyutina Yu.P., Arutyunyan A.V., Bukalyov A.V., Baranova Y.P., Vinogradova I.A. The protective effect of melatonin and epithalon on hypothalamic regulation of the reproductive function in female rats in a model of its premature aging and on the estrous cycles of aging animals in different lighting conditions. *Adv. Gerontol.* 2014. 4(1):67–77.
- Arutyunyan A.V., Korenevsky A.V. Age-related impairment of hypothalamic regulation of the reproductive cycle and its correction. *Adv. Gerontol.* 2014. 4(4):229–237.

 д.б.н. Корневский Андрей Валентинович

«24» октября 2019 г.





### СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Моргуновой Галины Васильевны на тему: «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на перерсеваемой культуре клеток», представленной на соискание ученой 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	Корневский Андрей Валентинович	1972 г., гражданин России	ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта", ведущий научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий	Доктор биологических наук, 03.03.01 – физиология, 03.01.04 – биохимия	без звания	<p>1. Korenevskii A.V., Milyutina Y.P., Zhdanova A.A., Pyatygina K.M., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Mass-spectrometric analysis of proteome of microvesicles produced by NK-92 natural killer cells. <i>Bull. Exp. Biol. Med.</i> 2018. 165(4):564–571.</p> <p>2. Керкешко Г.О., Корневский А.В., Соколов Д.И., Сельков С.А. Роль взаимодействия экстраклеточных микровезикул трофобласта с клетками иммунной системы и эндотелия в патогенезе преэклампсии. <i>Мед. иммунол.</i> 2018. 20(4):485–514.</p> <p>3. Arutyunyan A.V., Zaliznyaya I.V., Kerkeshko G.O., Milyutina Yu.P., Korenevsky A.V. Prenatal hyperhomocysteinemia impairs hypothalamic regulation of reproductive cycles in rat</p>

						<p>progeny. <i>Bull. Exp. Biol. Med.</i> 2017. 162(6):738-740.</p> <p>4. Korenevsky A.V., Milyutina Yu.P., Kerkeshko G.O., Arutyunyan A.V., Kozina L.S. Role of reactive oxygen species in premature ageing of the female reproductive function. <i>Current Aging Sci.</i> 2017. 10(1):26-31.</p> <p>5. Korenevskii A.V., Arutyunyan A.V. On the role of biogenic amines and reactive oxygen species in the disruption of the hypothalamic regulation of reproductive function in xenobiotic-induced and experimental hyperhomocysteinemia. <i>Neurochem. J.</i> 2016. 10(1):19-25.</p> <p>6. Milyutina Y.P., Pustygina A.V., Zaloznyaya I.V., Arutyunyan A.V. Age-related changes in biogenic amine content and oxidative stress profile in rat hypothalamus with hyperhomocysteinemia. <i>Adv. Gerontol.</i> 2016. 6(4):291-297.</p> <p>7. Арутюнян А.В., Керкешко Г.О., Милютинa Ю.П., Корневский А.В., Козина Л.С., Залозная И.В. Влияние гипергомоцистеинемии на моноаминергические системы гипоталамуса и гиппокампа у самок крыс при старении. <i>Усп. геронтол.</i> 2015. 28(3):472-478.</p> <p>8. Korenevsky A.V., Arutyunyan A.V., Milyutina Yu.P., Zaloznyaya I.V., Kozina L.S. Pinealon corrects hyperhomocysteinemia-</p>
--	--	--	--	--	--	--



						<p>induced disturbances of the diurnal dynamics of hypothalamic norepinephrine content in female rats. <i>Neurochem. J.</i> 2014. 8(3):205–207.</p> <p>9. Korenevsky A.V., Milyutina Yu.P., Arutyunyan A.V., Bukalyov A.V., Baranova Y.P., Vinogradova I.A. The protective effect of melatonin and epithalon on hypothalamic regulation of the reproductive function in female rats in a model of its premature aging and on the estrous cycles of aging animals in different lighting conditions. <i>Adv. Gerontol.</i> 2014. 4(1):67–77.</p> <p>10. Arutyunyan A.V., Korenevsky A.V. Age-related impairment of hypothalamic regulation of the reproductive cycle and its correction. <i>Adv. Gerontol.</i> 2014. 4(4):229–237.</p>
--	--	--	--	--	--	--

Ученый секретарь  
 ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта"

*Капустин Р.В.*

Капустин Р.В.

«24 октября» 2019 г.

