

УТВЕРЖДАЮ:  
Декан биологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский  
государственный университет  
имени М.В. Ломоносова»  
академик РАН



М.Г. Кирпичников

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический  
факультет**

Диссертация «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» выполнена в секторе эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

В период подготовки диссертации соискатель Моргунова Галина Васильевна работала в секторе эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова» сначала в должности ведущего инженера, а с 2017 г. и по настоящее время – в должности научного сотрудника. В 2013 г. окончила с отличием кафедру физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова» по специальности «физиология», в 2017 г. окончила аспирантуру того же факультета по специальности «эмбриология». Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2016 г. ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», в 2017 г. ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» выдана дополнительная справка. Научный руководитель – доктор биологических наук Хохлов Александр Николаевич – заведующий сектором эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова».

По итогам обсуждения диссертации Моргуновой Галины Васильевны «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» принято следующее заключение:

Представленная диссертационная работа Моргуновой Галины Васильевны состоит из введения, обзора литературы, описания результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст диссертации изложен на 193 страницах, содержит 34 рисунка, 2 таблицы и 3 приложения. Список литературы включает 390 источников, из них на русском языке – 31, на иностранных – 359.

Диссертационная работа Моргуновой Г.В. выполнена на высоком научно-методическом уровне. Все результаты, представленные в диссертации, получены при непосредственном участии автора.

**Актуальность** диссертационного исследования подтверждается выполнением работы в соответствии с одним из Приоритетных направлений научных исследований РФ (Физиологические механизмы деятельности, развития и устойчивости организма человека и животных), с одним из направлений технологического прорыва России (Медицинские технологии и лекарственные средства), а также с научным направлением, утверждённым Учёным советом биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова» (государственное задание МГУ, ч. 2 – фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8). Утверждение темы диссертации состоялось 20 сентября 2018 г. на заседании Учёного совета биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова».

Увеличение доли пожилых людей свидетельствует о необходимости поиска способов продления активной работоспособности и путей предотвращения развития возрастных заболеваний. Патологии, связанные с нарушением функционирования постмитотических долгоживущих клеток, представляют одну из основных проблем геронтологии, так как они способствуют развитию болезней сердечно-сосудистой и нервной системы. Исследуемая в диссертации модель хронологического/"стационарного" старения позволяет изучать природу изменений неделящихся деградирующих клеток и тестировать способы продления времени их существования.

**Личный вклад автора** в диссертационное исследование состоял в разработке плана и выборе методов исследования, проведении экспериментов, статистической обработке и анализе полученных данных, а также в написании научных статей и отчётов, подготовке докладов. В задачи автора входили освоение методики постановки экспериментов с использованием модели хронологического/"стационарного" старения клеточных культур, изучение деталей и особенностей проведения таких экспериментов, математический анализ характера вымирания клеток в рамках изученной модельной системы, поиск способов и препаратов, позволяющих увеличить время жизни клеточной

культуры. Автор принимала участие во всех экспериментах, включавших в себя культивирование клеток, снятие кривых роста и гибели культуры, проведение биохимических и молекулярно-биологических опытов, анализ полученных данных и их статистическую обработку, а также в написании статей, глав в коллективных монографиях и других научных публикаций, подготовке докладов и выступлениях на конференциях.

**Научная новизна.** В работе впервые показано, что клетки в непересеваемой культуре вымирают в соответствии с законом Гомпертца, как и когорты животных или людей. Доказана применимость для изучаемой модели биомаркёра клеточного "возраста" – ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы, что говорит о сходстве двух типов клеточного старения – репликативного и "стационарного". Подробно изучена динамика изменения рН в культуральной среде в ходе роста, пребывания в стационарной фазе и вымирания непересеваемой культуры клеток, а также исследовано влияние разных способов поддержания этого показателя на рост такой культуры. В экспериментах с использованием методики полимеразной цепной реакции не обнаружено аномального увеличения числа копий генов *MAP1LC3A*, *Atg5*, *PRKAA1*, *GAPDH*, *ACTB*, *B2M*, *Mki67*, *Cdkn2a*, *Trp53* в клетках китайского хомячка линии B11-dii FAF28 по сравнению с их числом у китайского хомячка (*Cricetulus griseus*). Показано, что уровень транскрипции генов *Atg5* и *PRKAA1* (белок –  $\alpha_1$ -субъединица АМПК) не изменяется в ходе "стационарного старения" клеток этой линии. Установлено, что ДНФ в "мягко разобшающих" концентрациях не влияет на рост и гибель непересеваемой культуры клеток. 8-охо-dG не влияет на рост такой культуры клеток, но вызывает уменьшение её средней продолжительности жизни. Замена 44,4% модифицированной Дульбекко среды Игла на препарат "Квинтон" увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни культуры клеток в стационарной фазе.

**Теоретическая и практическая значимость.** Соответствие кинетики гибели клеток закону Гомпертца доказывает, что их вымирание в культуре происходит по тем же принципам, что и вымирание когорты организмов, – следовательно, для клеточной культуры можно строить кривые выживания и использовать их при тестировании геропротекторов. Применимость широко известного биомаркёра возраста, ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы, не только доказывает наличие общих черт между двумя основными цитогеронтологическими моделями (репликативное и хронологическое старение), но и позволяет дополнить набор методов для работы со второй из них. Как известно, линии клеток, полученные от китайского хомячка, являются популярными и широко используемыми в биотехнологических целях для производства моноклональных антител и рекомбинантных белков человека. В связи с этим результаты

диссертационной работы имеют прикладное значение, так как в ней подробно проанализировано влияние состава сред, добавления дополнительных компонентов и условий культивирования на рост и долговременное поддержание непереживаемой культуры клеток в жизнеспособном состоянии. Обнаружено, что при длительном культивировании клеток китайского хомячка необходимо подбирать среды с высоким содержанием незаменимых аминокислот и глюкозы. Не так принципиально наличие дополнительных компонентов – заменимых аминокислот, вспомогательных добавок, витаминов, наличие которых хотя и способствует бурному росту культуры, но приводит к её преждевременной гибели.

**Достоверность полученных результатов.** В работе были использованы широко известные стандартные для клеточной и молекулярной биологии методы, а также адекватная полученным данным статистическая обработка. Описанную методику можно использовать для постановки аналогичных экспериментов. Приводимые в работе сведения и факты согласуются с данными современной литературы.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

По материалам диссертации опубликовано 36 научных работ, в том числе 16 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований (из них 12 статей, индексируемых Scopus и Web of Science), 3 главы в коллективных монографиях, индексируемых Scopus и Web of Science, 3 статьи в сборниках и 14 тезисов докладов. Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Khokhlov, A.N. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system / A.N. Khokhlov, A.A. Klebanov, A.F. Karmushakov, G.A. Shilovsky, M.M. Nasonov, G.V. Morgunova // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2014. – Vol. 69. – №1. – P. 13–18.

2. Khokhlov, A.N. Pilot study of a potential geroprotector, “Quinton Marine Plasma,” in experiments on cultured cells / A.N. Khokhlov, G.V. Morgunova, T.S. Ryndina, F. Coll // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2015. – №1. – P. 9–13.

3. Khokhlov, A.N. On the constructing of survival curves for cultured cells in cytogerontological experiments: a brief note with three hierarchy diagrams / A.N. Khokhlov, G.V. Morgunova // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2015. – Vol. 70. – №2. – P. 19–23.

4. Morgunova, G.V. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase – a biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? / G.V. Morgunova, A.V. Kolesnikov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2015. – Vol. 70. – №4. – P. 15–18.

5. Morgunova, G.V. Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view / G.V. Morgunova, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* – 2016. – Vol. 71. – №2. – P. 3–7.

6. Моргунова, Г.В. Аутофагия и "стационарное старение" клеточных культур / Г.В. Моргунова, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // *Клиническая геронтология.* – 2016. – Т. 22. – №9–10. – С. 50–51.

7. Мармий, Н.В. 8-оксо-2'-дезоксигуанозин: биомаркер клеточного старения и окислительного стресса или потенциальное лекарство против возрастных болезней? / Н.В. Мармий, Г.В. Моргунова, Д.С. Есипов, А.Н. Хохлов // *Клиническая геронтология.* – 2016. – Т. 22. – №9–10. – С. 46–47.

8. Morgunova, G.V. Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction / G.V. Morgunova, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* – 2016. – Vol. 71. – №4. – P. 28–33.

9. Моргунова, Г.В. Концепция ацидотической альтерации организма при старении и цитогеронтологические исследования / Г.В. Моргунова, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // *Клиническая геронтология.* – 2017. – Т. 23. – №9–10. – С. 46–48.

10. Morgunova, G.V. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells / G.V. Morgunova, A.A. Klebanov, F. Marotta, A.N. Khokhlov // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* – 2017. – Vol. 72. – №2. – P. 58–62.

11. Shilovsky, G.A. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation / G.A. Shilovsky, S.I. Shram, G.V. Morgunova, A.N. Khokhlov // *Biochemistry (Moscow).* – 2018. – Vol. 83. – №1. – P. 47–60.

12. Khokhlov, A.N. On choosing control objects in experimental gerontological research / A.N. Khokhlov, A.A. Klebanov, G.V. Morgunova // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* – 2018. – Vol. 73. – №2. – P. 59–62.

13. Моргунова, Г.В. Связанное с возрастом закисление микроокружения и цитоплазмы клеток: влияние на организменном уровне и на уровне клеточной культуры / Г.В. Моргунова, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // *Клиническая геронтология.* – 2018. – Т. 24. – №9–10. – С. 49–50.

14. Morgunova, G.V. Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth / G.V. Morgunova, A.A. Klebanov // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* – 2018. – Vol. 73. – №3. – P. 124–129.

15. Morgunova, G.V. Age-related AMP-activated protein kinase alterations: From cellular energetics to longevity / G.V. Morgunova, A.A. Klebanov // Cell Biochemistry and Function. – 2019. – Vol. 37. – №3. – P. 169–176.

16. Morgunova, G.V. Studies into the effect of “mild” uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase / G.V. Morgunova, A.F. Karmushakov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2019. – Vol. 74. – № 3. – P. 163–169.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на II Российском симпозиуме с международным участием "Световой режим, старение и рак" (Петрозаводск, 2013); Международной научно-практической конференции "Пожилой больной. Качество жизни" (Москва, 2013–2018 гг.); Международной конференции "Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии" (Санкт-Петербург, 2014); Международной научной конференции "Радиобиология: антропогенные излучения" (Гомель, Беларусь, 2014); Международной научной конференции "Радиобиология: "Маяк", Чернобыль, Фукусима" (Гомель, Беларусь, 2015); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2016–2019 гг.); Международной научной конференции "Biomedical Innovations for Healthy Longevity/Биомедицинские инновации для здорового долголетия" (Санкт-Петербург, 2016); Международной научной конференции "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016" (Новосибирск, 2016); Научно-практической конференции "Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии – 2017", посвящённой 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии (Санкт-Петербург, 2017); Международном конгрессе "Социальная адаптация, поддержка и здоровье пожилых людей в современном обществе" (Санкт-Петербург, 2018). Результаты работы неоднократно обсуждались на заседаниях сектора эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Соответствие диссертации специальности.**

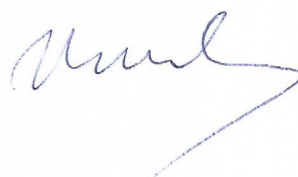
По актуальности, новизне, научной и практической значимости, объёму исследований, глубине анализа и обобщения материала диссертационная работа Моргуновой Галины Васильевны полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04. 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание

учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Диссертация «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» Моргуновой Галины Васильевны рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Заключение принято на заседании сектора эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Присутствовало на заседании – 11 чел. Результаты голосования: «за» – 11 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 5 от «17» апреля 2019 г.

Зав. сектором эволюционной  
цитогеронтологии биологического  
факультета МГУ д.б.н.



А.Н. Хохлов

10.10.2019