

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 521.103.01
НА БАЗЕ АННО ВО НИЦ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ
БИОРЕГУЛЯЦИИ И ГЕРОНТОЛОГИИ» ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26 декабря 2019 г. № 10

о присуждении Моргуновой Галине Васильевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» по специальности 14.01.30 "Геронтология и гериатрия" принята к защите 25 октября 2019 г., протокол № 9/1, диссертационным советом Д 521.103.01, созданным на базе АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», 197110, Санкт-Петербург, проспект Динамо, д. 3 (**приказ 22/нк от 24 января 2017 г.**, Минобрнауки России, внесение изменений в состав ДС, приказ 222/нк от 13 марта 2019 г.).

Соискатель Моргунова Галина Васильевна, 1989 года рождения, в 2013 году с отличием окончила биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «физиология» (диплом ААА 2202575).

В 2013 году Г.В. Моргунова поступила в аспирантуру в сектор эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета МГУ по специальности 03.03.05 – биология развития, эмбриология (биологические науки), которую окончила в 2017 году (Справка 17/105 от 23 октября 2017 года).

Тема диссертации и научный руководитель утверждены на заседании Ученого совета биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (20.09.2018 г., Протокол № 7 от 20 сентября 2018 года).

В настоящее время Г.В. Моргунова работает в должности научного сотрудника сектора эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета МГУ.

Диссертация «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» выполнена в секторе эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета МГУ.

Научный руководитель:

Хохлов Александр Николаевич – доктор биологических наук, заведующий сектором эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Колосова Наталия Гориславовна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения ФГБУН «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Корневский Андрей Валентинович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация: ФГБУН «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля» РАН в своем положительном заключении, подписанном кандидатом биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем отдела кинетики химических и биологических процессов Алексеем Матвеевичем Оловниковым и утвержденном директором ФГБУН «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля» РАН доктором химических наук, профессором Ильей Николаевичем Курочкиным, отметила, что диссертационная работа 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 научно-квалификационной работой, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты. В исследовании предлагается решение актуальной для геронтологии задачи – создание инструментов и методов для изучения механизмов старения и поиска потенциальных геропротекторных препаратов в экспериментах на клеточных культурах.

Приведенные в работе результаты исследований рекомендуется использовать в научно-исследовательских организациях, занимающихся моделированием процессов старения на культивируемых клетках, а также в биотехнологических работах с культурами, которые требуется поддерживать

в течение длительного времени.

По актуальности, новизне, методическому уровню, объему исследований и практической значимости полученных результатов диссертация на тему «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении 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 ее автор, Моргунова Галина Васильевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

Отзыв утвержден на заседании геронтологического семинара лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем отдела кинетики химических и биологических процессов ФГБУН «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля» РАН (протокол № 18 от 05 декабря 2019 г.).

Наиболее значительные работы по теме диссертации:

1. *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. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S009639251501006X>.
2. *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. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392516020073>.
3. *Khokhlov, A.N.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons / A.N. Khokhlov, **G.V. Morgunova** // Anti-aging Drugs: From Basic Research to Clinical Practice. Royal Society of Chemistry. – 2017. – P. 53–74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/9781782626602-00051>.
4. *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.
5. *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. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392518030136>.
6. *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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.3384>.

7. *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. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392519030088>.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от

1. д.б.н. Чистякова Владимира Анатольевича – директора Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ, г. Ростов-на-Дону;
2. д.б.н. Куликова Александра Владимировича – заведующего лабораторией клеточно-тканевых механизмов компенсации функций биообъектов ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, г. Пущино.
3. д.б.н., доц. Наумова Александра Дмитриевича – профессора кафедры радиологии и биофизики УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь;
4. д.м.н., проф. Вайсермана Александра Михайловича – заведующего лабораторией эпигенетики ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева» НАМН Украины, г. Киев, Украина;
5. д.б.н., проф. Божкова Анатолия Ивановича – директора НИИ биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина;
6. к.б.н., доц. Деева Анатолия Ивановича – доцента кафедры общей и медицинской биофизики ФГБОУ ВО «Российский государственный медицинский университет имени Н.И. Пирогова», г. Москва;
7. д.б.н. Михальского Анатолия Ивановича – главного научного сотрудника лаборатории 38 ФГБУН «Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова» РАН, г. Москва;
8. к.м.н., доц. Куликова Дмитрия Александровича – руководителя отдела экспериментальных и клинических исследований ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, г. Москва.

Все отзывы положительные, в них отмечается актуальность темы исследования, глубина анализа, научная новизна и научно-практическое значение полученных результатов. Отзывы существенных замечаний не содержат.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются специалистами в области геронтологии и гериатрии, физиологии и клеточной биологии старения.

Диссертационный совет считает, что наиболее значимыми являются следующие результаты диссертационной работы: в модели «стационарного старения» клеточных культур популяция клеток вымирает в соответствии с законом Гомпертца, т.е. сила смертности экспоненциально растёт со временем. Относительный уровень экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла и генов, связанных с аутофагией, не различается в клетках разного «стационарного возраста». Исключение составляет ген *MAP1LC3A* (кодирует белок LC3), уровень экспрессии которого понижен в «зрелых» и «умеренно старых» (от 8 до 34 сут. культивирования) клетках и повышен в «молодых» и «старых». Активность ассоциированной со старением β -галактозидазы проявляется в «стационарно старых» клетках и почти не проявляется в «молодых», что позволяет использовать этот биомаркёр в экспериментах по «стационарному старению». Хлорид аммония, нарушающий работу лизосом, вызывает вакуоляризацию цитоплазмы и способствует снижению плотности культуры клеток китайского хомячка, но не влияет на продолжительность их жизни. 2,4-Динитрофенол в концентрации $5,6 \cdot 10^{-7}$ М (предположительно обеспечивающей «мягкое разобщение» дыхания и окислительного фосфорилирования) не оказывает влияния на рост и гибель культуры клеток. В концентрации $5,6 \cdot 10^{-4}$ М он способствует угнетению роста культуры и вызывает преждевременную гибель клеток. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозин в концентрации 10^{-3} М, добавленный через сутки после посева, не влияет на рост культуры клеток, при этом его действие проявляется в поздней стационарной фазе, что выражается в уменьшении средней продолжительности жизни и в достоверном снижении плотности клеточной культуры через 25–30 сут. культивирования. Разбавление на 44,4% модифицированной Дульбекко среды Игла изотоническим препаратом «Квинтон» способствует увеличению максимальной средней и модальной продолжительности жизни, что позволяет считать этот препарат геропротектором. При длительном поддержании непересеваемой культуры клеток китайского хомячка необходимо подбирать ростовые среды с высоким содержанием некоторых аминокислот (в первую очередь, незаменимых и глутамина), витаминов и глюкозы. Для этой цели подходит модифицированная Дульбекко среда Игла с повышенной концентрацией глюкозы или любая близкая по составу среда. Добавление буфера HEPES не влияет на кинетику гибели клеток и на динамику изменения рН после достижения культурой монослоя (при этом рН в ходе эксперимента не опускается ниже 6,4), поэтому не является необходимым. Вымирание культуры клеток в поздней стационарной фазе не может быть обусловлено простой нехваткой питательных веществ или

значительным снижением рН. Исследование кинетики гибели клеток при «стационарном старении» клеточных культур можно использовать при изучении механизмов старения и при тестировании геропротекторов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: предложен новый способ обработки данных о «стационарном старении», основанный на анализе кинетики вымирания культуры клеток – тем самым **дополнена** и **усовершенствована** модель «стационарного»/хронологического старения; **введены** новые показатели для анализа продолжительности жизни клеток в «стационарно стареющей» культуре; **доказана** применимость законов Гомпертца для вымирающей культуры клеток млекопитающего; **определены** биомаркеры «клеточного возраста», которые можно использовать в экспериментах на модели «стационарного старения»; **обосновано** предположение о старении клеток как главной причине их вымирания в непересеваемой культуре.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: доказано соответствие кинетики гибели клеток закону Гомпертца – следовательно, их вымирание в культуре происходит по тем же принципам, что и вымирание когорты организмов; **показана** применимость широко известного биомаркёра возраста, ассоциированной со старением β -галактозидазы, для модели «стационарного» старения культур клеток, что подтверждает наличие общих черт между двумя основными цитогеронтологическими моделями (репликативное и хронологическое старение); применительно к проблематике диссертации **результативно использованы** методы обработки кривых выживания и данных о продолжительности жизни непересеваемой культуры клеток.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: показана применимость демографических методов для работы с моделями старения клеточных культур; **внедрен** анализ кривых дожития и расчёт продолжительности жизни клеток в непересеваемой культуре для изучения старения и тестирования геропротекторов; **дополнен** набор методов для работы с моделью «стационарного старения» культур клеток; **определен** выбор сред с высоким содержанием незаменимых аминокислот, глутамина и глюкозы для длительного культивирования клеток китайского хомячка (что требуется не только при изучении «стационарного старения», но и в биотехнологических целях для производства моноклональных антител и рекомбинантных белков человека).

Рекомендации по использованию результатов диссертации. Подобранные в работе условия культивирования клеток китайского хомячка,

методы их исследования и дополнительные «возрастные» характеристики можно рекомендовать для корректной постановки экспериментов на клеточных культурах по поиску геропротекторов с использованием модели «стационарного старения». Концентрация 2,4-Динитрофенола $5,6 \cdot 10^{-7}$ М может быть рекомендована для постановки экспериментов с «мягким разобщением» на клеточных культурах. Анализ кривых гибели клеток с аппроксимацией уравнением Гомпертца и вычислением средней, медианной, модальной и максимальной продолжительностью жизни можно использовать для работы по изучению выживаемости любых культур клеток. Этот методический подход внедрен в научно-исследовательскую работу сектора эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета МГУ.

Оценка достоверности и новизны научных результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием широко известных цитологических и молекулярно-биологических методов – таких, 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, окраска клеток для оценки их жизнеспособности и т. д. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных статистических методов. Материалы диссертации доложены на российских и международных конференциях. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы, а выводы соответствуют поставленным автором задачам. Обоснованность выносимых на защиту положений обусловлена глубоким анализом литературных данных и сопоставлением полученных в ходе экспериментов результатов с результатами других авторов. Организация экспериментов, а также выбор методов исследования оправданы и соответствуют поставленным целям и задачам. 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 β -галактозидазы. Подробно изучена динамика изменения рН в культуральной среде в ходе роста, пребывания в стационарной фазе и вымирания непересеваемой культуры клеток. 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*).

Личный вклад соискателя. Автор принимала участие во всех этапах подготовки и реализации работы – планировании и проведении экспериментов, обработке данных, написании научных статей, а также отчетов и глав в монографиях, подготовке тезисов и докладов для научных конференций.


Диссертационный совет пришел к выводу, что работа Моргуновой Галины Васильевны «Кинетические аспекты моделирования старения в экспериментах на непересеваемой культуре клеток» по актуальности темы, научной новизне, методическому уровню исследования, объему выполненной работы и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении 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.

На заседании 26 декабря 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Моргуновой Галине Васильевне учёную степень кандидата биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек (из них 15 докторов наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия), участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав диссертационного совета, проголосовали: за – 15, против – «нет», недействительных бюллетеней – «нет».

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ

диссертационного совета,
заслуженный деятель науки РФ,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор



В.Х. Хавинсон

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

доктор биологических наук, профессор

Л.С. Козина

26 декабря 2019 г.