

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИНЦ РАН)**

ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу (Отдел № 3,
ИНЦ РАН), л/с 20726Ц41010, Северо-
Западное ГУ Банка России
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

11 января 2017 г.



На № _____ от 14.11.16

Поиск новых лекарственных средств и определение механизма их действия является сейчас одним из ведущих подходов молекулярной медицины. Вся многовековая история медицины демонстрирует использование различных лекарственных растений, что не потеряло актуальности и в наше время. Подбором растений, которые можно продуктивно

использовать для получения новых лекарств, занимаются во многих лабораториях во всем мире. Диссертация Татьяны Сергеевны Фроловой посвящена исследованию широко распространенного в Сибири растения *S. angustifolium* (иван-чай узколистный) в качестве источника тритерпенов. Хотя к настоящему времени описано более 20 000 тритерпеновых соединений, их противоопухолевый эффект был показан впервые не так давно и сразу вызвал огромное количество публикаций, касающихся избирательной цитотоксичности тритерпеноидов и их производных. На данный момент некоторые полусинтетические производные тритерпеноидов уже находятся в стадии клинических испытаний. Несмотря на такое обилие работ, механизм действия терпеноидов на опухолевые клетки все еще недостаточно изучен, даже не предложена конкретная внутриклеточная мишень для связывания с тритерпенами. Т.С.Фролова в своей работе поставила перед собой именно такую сложную амбициозную задачу.

Выделение новых тритерпеновых соединений из широко доступных растений и подробное исследование с целью выявления их противоопухолевых свойств для возможного дальнейшего применения в фармакологии, безусловно, является крайне актуальным.

Научная новизна исследования, достоверность и обоснованность научных результатов.

Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 56 рисунков и 24 таблицы. Список цитируемой литературы включает 288 источников, из них 279 иностранных.

Содержание диссертационной работы соответствует заявленной теме. Объем полученной соискателем информации о действии помоловой кислоты на клетки разного типа позволяет рассматривать ее для дальнейшего применения в медицине в качестве противоопухолевого препарата, обладающего выраженным цитотоксическим действием на клетки различных опухолевых линий (H1299, U87, HCT116, MCF-7) и на культуру клеток глиомы. Помоловая кислота изучена очень мало, поэтому параллельно в качестве «контроля» использовалась урсоловая кислота, отличающаяся от нее химически только отсутствием третичной ОН-группы в 19 положении, но гораздо лучше изученная в силу большей распространенности и доступности.

Впервые у выделенной из растительного сырья в чистом виде помоловой кислоты было показано отсутствие генотоксических и мутагенных свойств, при этом было задействовано несколько разных тестовых систем (бактериальные, SOS-хромотест и тест Эймса).

Помоловая кислота достоверно снижала мутагенный эффект NQO и показывала выраженную антооксидантную активность. Анализ цитотоксичности при действии помоловой кислоты на различные линии опухолевых клеток был проведен с помощью МТТ-теста, в качестве контроля была взята линия эмбриональных фибробластов MRC-5, токсическое действие помоловой кислоты на которые недостоверно.

Получение меченых препаратов необходимо для изучения их проникновения в клетку и локализацию в ней, распределения в ткани и организме в целом. Мечение небольших молекул, когда размер метки сопоставим с размером молекулы, достаточно затруднен. Грамотное применение молекулярного моделирования позволило Т.С.Фроловой не только оценить связывание помоловой и урсоловой кислот с белками-мишенями Akt1 и MDM2, но показать, что присоединение флуорофора (FITC) не ослабляет это связывание. Модельный эксперимент по получению флуоресцентно меченой урсоловой кислоты продемонстрировал проникновение эпитмера внутрь клеток и накопление вначале на внутренних мембранах, а затем на митохондриях, подтвердив таким образом наличие локализованной внутри клетки мишени тритерпеновых кислот, наиболее вероятно, что это Akt1–ключевой белок внешнего сигнального пути.

Здесь отдельно нужно подчеркнуть прекрасное оформление работы – приведено большое количество рисунков, показывающих результаты молекулярного моделирования, которые наглядно демонстрируют строение помоловой и урсоловой кислот и сайты их связывания с флуорофором и возможными белками-мишенями.

Выполненный анализ результатов не вызывает сомнений. Степень математической обработки полученных данных с помощью статистического пакета PAST и использование t-критерия Стьюдента для оценки достоверных различий между средними значениями в контрольной и экспериментальной выборках, позволяют считать, что достоверность выводов находится на достаточном уровне. Использование молекулярного моделирования показывает высокий уровень подготовки Т.С.Фроловой не только как исследователя-экспериментатора, но и как серьезного теоретика.

Основные результаты исследований Т.С.Фроловой опубликованы в 14 печатных научных работах, 6 из которых – статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 8 – тезисы докладов, представленных на тематических общероссийских и международных научных конференциях по химии биологически активных веществ и биофармакологии.

В основу диссертации Т.С.Фроловой положены материалы собственного исследования и компьютерного моделирования.

Обработка результатов экспериментов и подготовка публикаций сделаны автором диссертации совместно с научным руководителем.

Значимость результатов диссертации для науки и практики.

При изучении химического состава липофильных компонентов лекарственного растения *C. angustifolium* (иван-чай узколистый), широко распространенного в Сибири, выявлены 6 новых тритерпеновых соединения. Два из них – урсоловая и помоловая кислоты являются перспективными в качестве антираковых препаратов, не обладающих цитотоксическим и мутагенным действием на здоровые клетки. Получение тритерпеновых кислот из натурального сырья позволяет активно использовать их в фармакологии, для чего была разработана и усовершенствована методика выделения урсоловой и помоловой кислот в чистом виде. Было выявлено, что их содержание достигает максимума к концу периода вегетации *C. angustifolium*, что принципиально для его промышленного использования. Важно, что кроме нескольких клеточных линий (рак легкого H1299, глиома U87, рак толстой кишки HCT116, рак молочной железы, MCF-7) были использованы также клетки, полученные из нативной глиомы, так как клетки глиомы часто устойчивы к химиотерапии. С использованием клеточных линий с инактивированным геном p53 (HCT116 p53+/+ и HCT116 p53-/-) было показано, что основным механизмом действия помоловой кислоты на опухолевые клетки является запуск апоптоза, и определены возможные молекулярные мишени – белки Akt1 и MDM2.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям ВАК

Рецензируемая диссертация, изложенная на 112 страницах и состоящая из введения, 3 глав, выводов, заключения, благодарности, списка литературы, а также автореферат на ее основе соответствуют требованиям ВАК по структуре, содержанию и степени проработки поставленной научной проблемы.

Заключение

Рецензируемая работа Фроловой Татьяны Сергеевны на тему: «Исследование механизма цитотоксического действия тритерпеновых кислот урсанового ряда», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук является

законченным самостоятельным исследованием, направленным на решение актуальной для современной биомедицины проблемы – получение и подробное описание новых противоопухолевых препаратов на основе тритерпеновых кислот. Одновременно автором был разработан новый метод флуоресцентного мечения тритерпеновых кислот флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). В рамках данной работы была выделена в чистом виде помоловая кислота и определен ее доступный источник – стебли иван-чая узколистного.

Подробное описание помоловой кислоты, разработка метода ее выделения и наличие в природе доступного источника предполагает ее дальнейшее использование в фармацевтике для создания препарата противоопухолевой терапии. При этом нужно учитывать, что несмотря на избирательную цитотоксичность, тритерпеновые соединения обычно рассматриваются не как самостоятельные противоопухолевые агенты, а как препараты синергического действия, позволяющие в разы снизить дозы классических цитостатиков. Многие тритерпеновые соединения способны преодолевать синдром лекарственной резистентности опухоли и обладают противовоспалительным действием, также способствующим более эффективному лечению онкологических заболеваний. Исходя из этого, исследование Татьяны Сергеевны Фроловой представляется перспективным как с точки зрения фундаментальной, так и прикладной науки.

Представленная диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук; сама Татьяна Сергеевна Фролова заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Отзыв составлен доцентом, к. б. н., старшим научным сотрудником лаборатории радиационной цитологии Спивак И.М.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории радиационной цитологии 9 января 2017 года, протокол № 1/17.

Доцент, к.б.н. Спивак И.М.

