

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Е.Ю. Рыковой на диссертацию Фроловой Татьяны Сергеевны «Исследование механизма цитотоксического действия тритерпеновых кислот урсанового ряда», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности “клеточная биология, цитология, гистология” - 03.03.04

Онкологические заболевания являются основной причиной смертности населения после внешних причин и заболеваний, связанных с сердечно - сосудистой системой. Для успешной борьбы с опухолями необходимы цитотоксические препараты, не повреждающие клетки здоровых тканей. Тритерпеноиды – один из классов природных соединений, среди которых уже найдены вещества, которые в перспективе могут стать такими лекарствами. Однако для создания эффективных противораковых средств необходимо понимание механизмов избирательной цитотоксичности природных соединений и их модифицированных производных. В связи с этим работа Т.С. Фроловой актуальна и значима в фундаментальном плане для понимания биологических свойств тритерпеновых кислот урсанового ряда, а также в плане применения полученных знаний для нужд практической медицины.

В работе Т.С. Фроловой решена задача выделения из природного сырья и определения цитотоксической активности помоловой и урсоловой кислот в нескольких линиях онкотрансформированных клеток. Для выполнения поставленной цели - выявить механизмы наблюдаемой активности, были получены производные урсоловой кислоты с флуоресцеином и установлены закономерности проникновения и распределения этих производных в трансформированных клетках.

Для решения поставленных задач автором была выделена и охарактеризована фракция липофильных компонентов из заготовленного сырья иван-чая узколистного (*Chamaenerion angustifolium*), отработана методика получения очищенных препаратов тритерпеновых кислот урсанового ряда. Мутагенные, генотоксические и антиоксидантные свойства помоловой кислоты определены в стандартных микробиологических тестах. Испытания цитотоксических свойств были проведены с использованием панели онкотрансформированных клеток. Для нескольких линий цитотоксичность помоловой кислоты обнаружена впервые: рак легкого H1299, глиома U87, рак толстой кишки HCT116 (p53+/+ и p53-/-). Показано, что для первичных

лимфоцитов токсичность помоловой кислоты была существенно ниже, чем для исследованных линий трансформированных клеток, что подтверждает ранее полученные данные об избирательной цитотоксичности тритерпеновых кислот. Эти результаты открывают перспективу возможного применения кислот урсанового ряда в медицине, однако для этого необходимо провести дополнительное исследование на нормальных первичных клетках человека различной тканевой принадлежности. Анализ клеток глиомы линии U87 методом проточной цитофлуориметрии выявил проапоптотический эффект помоловой кислоты. Кроме того, микроскопический анализ обработанных клеток позволил предположить, что гибель клеток под действием помоловой кислоты идет также по механизму параптоза. Поскольку это предположение сделано на основании цитологической картины изменения клеток, возникает вопрос о подтверждении его с использованием положительного контроля, например, под действием тритерпенового спирта целастрола, для которого ранее показана способность индуцировать параптоз.

На основании собственных данных и результатов, опубликованных ранее в литературе, автор выбрала белки – потенциальные мишени действия кислот урсанового ряда и оценила возможность взаимодействия MDM2 и Akt1 с помоловой и урсоловой кислотами с использованием молекулярного моделирования. Для подтверждения гипотезы об участии этих белков в механизме токсического действия тритерпеновых кислот Т.С. Фролова провела синтез и разделение α - и β -эпимеров конъюгата урсоловой кислоты с флуоресцеином, что позволило визуализировать проникновение и локализацию урсоловой кислоты на внутренних мембранах и на митохондриях в клетках линии MCF-7. Полученные результаты по колокализации с красителем CellMask Orange являются косвенным свидетельством в пользу предположения о взаимодействии флуоресцентно меченой урсоловой кислоты с протеинкиназой В (Akt1) – ключевым белком внешнего сигнального пути индукции апоптоза, который локализуется преимущественно на внутренних клеточных мембранах. В перспективе использование конъюгатов кислот урсанового ряда с флуоресцеином совместно с флуоресцентно мечеными антителами к белкам – потенциальным мишеням позволит более точно колокализировать их в клетках, и расширить представления о механизмах цитотоксического действия этих соединений.

Диссертация Т.С. Фроловой написана в традиционном стиле, изложена на 112 страницах, также включает список литературы, содержащий 292 ссылки.

Диссертация содержит необходимые таблицы, рисунки и схемы. Во введении обоснована актуальность темы исследования, четко сформулирована цель и задачи работы, дана характеристика научной новизны и теоретической значимости исследования. Обзор литературы логично выстроен, хорошо написан и согласуется с темой диссертационной работы. Его разделы посвящены описанию объекта исследования – тритерпеновым соединениям, их разнообразным биологическим эффектам, в том числе приведены свидетельства избирательной цитотоксичности для онкотрансформированных клеток, подробно обсуждаются возможные механизмы. Обзор литературы дает разностороннее представление об исследуемой области знаний и позволяет оценить новизну и значимость полученных автором результатов. В главе «Материалы и методы» приведено подробное описание широкого спектра биохимических, молекулярно-биологических и цитологических методов, использованных соискателем в работе. Глава «Результаты и обсуждение» содержит подробное описание экспериментального материала, полученного автором, и сопровождаются обсуждением. Следует отметить, что автором получено много новых интересных результатов, которые открывают перспективы дальнейшего исследования. Разработанный Т.С. Фроловой подход предполагает возможность использования флуоресцентно меченых производных других тритерпеновых кислот для изучения их биологических свойств. Выводы, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы и отражают результаты проведенной работы. Результаты исследования опубликованы в 6-ти статьях в рецензируемых журналах перечня ВАК, в 8-ми тезисах в сборниках трудов конференций, а также были доложены на российских и международных конференциях. Автореферат отражает основное содержание диссертационного исследования.

Таким образом, работа Т.С. Фроловой представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, содержащую решение фундаментальной задачи по выявлению цитотоксических свойств тритерпеновых кислот урсанового ряда в онкотрансформированных клетках и определению возможных механизмов противоопухолевого эффекта. Это исследование имеет существенное значение для клеточной биологии и медицины. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и ее автор, Фролова Татьяна Сергеевна,

несомненно, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности “ клеточная биология, цитология, гистология ” - 03.03.04

Доктор биологических наук

Рыкова Е.Ю.

старший научный сотрудник

лаборатории молекулярной медицины

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института химической

биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук

630090, г. Новосибирск, пр. Академика

Лаврентьева, д.8

Тел. +7 (383) 363 5150, 8 913 958 5356

Подпись Е.Ю. Рыковой заверяю.

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

К.Х.Н.



Пестряков П.Е.