

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Дата защиты 8 февраля 2017 г. протокол № 2

О присуждении **Фроловой Татьяне Сергеевне**

ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Исследование цитотоксического действия тритерпеновых кислот урсанового ряда» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология принята к защите 29.11.2016, протокол № 27, диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утвержден ВАК 15.01.2010 г., приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Фролова Татьяна Сергеевна, 1990 года рождения, в 2012 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск.

С 1.10.2012 г. по 31.09.2015 г. Фролова Т. С. обучалась в очной аспирантуре при Федеральном государственном автономном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования

«Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», в настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории фармакологических исследований Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН.

Диссертация выполнена в секторе мутагенеза и репарации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: **Синицына Ольга Ивановна** - кандидат биологических наук, исполняющая обязанности заведующего сектором мутагенеза и репарации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

- 1) **Рыкова Елена Юрьевна** – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.
- 2) **Щербаков Дмитрий Николаевич** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, р. п. Кольцово.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург. В положительном заключении, подписанном доцентом, к. б. н., старшим

научным сотрудником лаборатории радиационной цитологии Спивак И. М., и утвержденном временно исполняющим обязанности директора ФГБУН Институт цитологии РАН, д. б. н. Михайловой Н. А., указано, что «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», и «...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 обсужден и утвержден на заседании лаборатории радиационной цитологии 17 января 2017 года, протокол № 1/17.

Соискатель имеет 19 опубликованных работ, из них по теме диссертации 14 работ общим объемом 50 страниц, в том числе 6 статей, опубликованных в научных рецензируемых изданиях, и 8 тезисов в материалах международных и общероссийских конференций.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. **Frolova T. S.**, Salnikova O. I., Dudareva T. A., Kukina T. P., Synitsyna O. I. Isolation of pomolic acid from *Chamaenerion angustifolium* and evaluation of its genotoxicity by microbiological tests // Bioorg Khim. 2014. Vol. 40. N. 1. P.92-98. (Scopus)
2. Кукина Т. П., **Фролова Т. С.**, Сальникова О. И. Липофильные кислоты иван-чая узколистного // Химия растительного сырья. 2014. № 1. С. 139–146. (Scopus, Springer)
3. **Фролова Т. С.**, Баев Д. С., Синицына О. И. Исследование цитотоксических свойств тритерпеновых кислот против клеток глиомы // Успехи современной науки и образования. 2016. № 9. Т. 4. С. 14-18 (Agris)

На диссертацию и автореферат поступило 8 отзывов, все положительные.

Отзывы прислали:

1. Болсуновский А. Я. – д.б.н., зав. лабораторией радиоэкологии института биофизики СО РАН – обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», (г. Красноярск).
2. Морозов С. В. – к.х.н., зав. лабораторией экологических исследований и хроматографического анализа ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск).
Замечания: В разделе «Научная новизна» на стр. 2 правильнее и точнее было бы написать, что впервые обнаружено 6 тритерпеновых кислот, и их назвать; а на стр. 3 – проведен синтез по получению смеси эпимеров меченой урсоловой кислоты (аналогично на стр. 6 и 14). На стр. 6 следовало бы указать количественные характеристики содержания тритерпеновых кислот, поскольку на стр. 1 отсутствие количественных характеристик как недостаток предыдущих работ. На стр. 9 тритерпен целастрол правильнее и точнее было бы назвать тритерпеновой кислотой фриделанового типа. На стр. 11. Элементным анализом подтверждается состав, а не структура. На стр. 14 в выводе № 3 указаны урсоловая и помоловая кислоты, а в автореферате приведены данные только для помоловой кислоты (данные по урсоловой кислоте, по-видимому, в диссертации).
3. Полякова Г. Г. – д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии и экологической биотехнологии Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН – обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», (г. Красноярск).

4. Седых С. Е. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории ферментов репарации ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).
5. Орищенко К. Е. – к.б.н., зав. сектором клеточных технологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск). «В качестве замечания можно отметить небольшую несогласованность данных по анализу стадий апоптоза при помощи проточной цитофлюориметрии представленных в таблице 2 и на рисунке 2. Так в таблице 2 для обработки ДМСО доля клеток в стадии раннего апоптоза составляет –3.2%, позднего апоптоза – 1,6% и некроза – 5%, тогда как по данным рисунка 2А, клетки в данных стадиях отсутствуют полностью. При этом на рисунках 2Б и 2В клетки в тех же стадиях апоптоза и в аналогичных долях четко детектируются.»
6. Григорьев И. А. – д.х.н., профессор, зав. лабораторией азотистых соединений ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск). Замечание: «При обсуждении строения синтезированных соединений диссертант вскользь упоминает только использование методов спектроскопии ЯМР, при этом из автореферата не ясно, на каких ядрах были получены спектры ЯМР, и были ли использованы другие спектральные методы?»
7. Дымшиц Г. М. – д.б.н., профессор, зав. кафедрой естественных наук СУНЦ НГУ (г. Новосибирск).
8. Рихтер В. А. – к.б.н., зам. директора, зав. лабораторией биотехнологии ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

На все замечания Фроловой Т. С. были даны убедительные ответы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области клеточной и молекулярной биологии, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих Институтов в нашей стране по изучению биологии клетки.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказана генетическая безопасность помоловой кислоты, обладающей избирательным цитотоксическим эффектом на онкотрансформированные клетки и защитными свойствами против мутагенов. Доказана перспективность использования лекарственного растения иван-чая узколистного (*Chamaenerion angustifolium*) в качестве природного источника тритерпеновых кислот в условиях Западной Сибири.

Предложена оригинальная гипотеза возможного механизма проапоптического действия тритерпеновых кислот урсанового ряда на онкотрансформированные клетки через связывание с протеинкиназой B/Akt1.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые изучены мутагенные и генотоксические свойства помоловой кислоты и цитотоксический эффект помоловой и урсоловой кислот на онкотрансформированных клеточных линиях различного происхождения и первичных культурах. Показано, что помоловая кислота значительно снижала мутагенный эффект 4-нитрохиолин-1-оксида, проявляла выраженный защитный эффект в тестах с трет-бутил-гидропероксидом и оказывала проапоптический эффект на клетки глиомной линии U87.

Впервые изучены цитотоксические свойства эпимеров флюоресцентно меченой урсоловой кислоты. **Доказано**, что они связаны с выраженным проапоптическим эффектом, который продемонстрирован на онкотрансформированных клетках MCF-7. Предполагается, что этот эффект

обусловлен проникновением эпимеров в клетку, их накоплением на внутренних мембранах и связыванием с протеинкиназой B/Akt1.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что представлены доказательства высокого содержания тритерпеновых кислот урсанового ряда, обладающих противораковыми и антиоксидантными свойствами, в листьях и стеблях иван-чая узколистного (*C. angustifolium*) в конце вегетационного периода. Содержание урсоловой, олеаноловой и помоловой кислот достаточно для его использования в качестве источника природного сырья в фармакологической промышленности.

Разработана и усовершенствована методика очистки тритерпеновых кислот с высокой чистотой целевого продукта (>96%).

Разработан метод получения флюоресцентно меченых эпимеров урсоловой кислоты, который может быть экстраполирован на другие тритерпеновые кислоты, обладающие гидроксильной группой в третьем положении, и применен для детекции проникновения и внутриклеточного распределения тритерпеновых кислот урсанового ряда.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных химических, цитологических и микроскопических методов, а также метод молекулярного докинга, которые в совокупности позволили изучить цитотоксические свойства урсоловой и помоловой кислот, выдвинуть гипотезу о механизме их проапоптического действия, а также проверить возможность реализации этого механизма экспериментально.

Оценка достоверности результатов исследования выявила высокую воспроизводимость полученных результатов и наличие всех экспериментальных контролей. Статистическая обработка результатов подтвердила их достоверность. В работе использованы методики, адекватные поставленным задачам, как классические (ЯМР- и элементный анализ, хроматографические методы, световая и конфокальная микроскопия,

проточная цитометрия, молекулярный докинг), так и модифицированные автором (очистка тритерпеновых кислот, флюоресцентное мечение урсоловой кислоты); результаты экспериментальных этапов работы получены с использованием современного сертифицированного оборудования и могут быть использованы другими исследователями. Интерпретация данных о возможных механизмах цитотоксического действия тритерпеновых кислот учитывает результаты, полученные ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах работы: заготовке растительного сырья, разработке методов выделения и флюоресцентного мечения тритерпеновых соединений, оценке мутагенного, цитотоксического и проапоптотического действия тритерпеновых кислот и статистической обработке полученных экспериментальных данных. Соискатель внес основополагающий вклад в разработку плана исследований, обсуждение результатов, формулировку выводов и написание публикаций по теме диссертационной работы.

Полученные соискателем научные данные соответствуют п. 6 «Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии» паспорта специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация Фроловой Т. С. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям пункта 9, абзац 2, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, и принято решение присудить Фроловой Татьяне Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук.

На заседании 8 февраля 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Фроловой Татьяне Сергеевне учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 8 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за — 21, против — нет, недействительных бюллетеней — нет.

Председатель
диссертационного совета,
академик РАН



В.К. Шумный

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

8.02.2017 г.