АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктор философии (PhD)
по специальности 6D060700 – «Биология»

Осикбаевой Сании Омирхановны

Механизмы действия полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм интактных и раковых клеток простаты

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа посвящена исследованию клеточных механизмов действия полифенолов природного происхождения на интактные и раковые клетки простаты в условиях *in vitro*.

Актуальность темы исследования. Рак предстательной железы является наиболее часто распространённым видом рака среди мужчин, занимая вторую позицию. По оценкам на 2018 год, один из девяти мужчин будет диагностирован с раком простаты во время его жизни. В Казахстане рак предстательной железы по структуре заболеваемости среди мужчин занимает в 2018 году 3 место (Показатели онкологической службы Республика Казахстан за 2018 г. под редакцией Кайдаровой Д.Р.).

Изучение механизмов воздействия полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм раковых и нормальных клеток простаты дает возможность разработки терапевтических подходов при совместном использовании их с химиотерапией для снижения цитотоксичности и повышения эффективности лечения. Эффективность использования полифенолов напрямую зависит от количества и биодоступности их в диетических продуктах. В свою очередь их действие зависит и от химической структуры (полимеризация, этерификация, ацетилирование, метилирование и этерификация), пищевого матрикса и метаболизма. Кроме того, эффективность абсорбции всех полифенолов в пищеварительном тракте различна, неоднозначна, что отражается на влиянии их на сигнальные пути, которые они модулируют.

Полифенолы модулируют ключевые белки в сигнальных каскадах, связанных с дифференцировкой клеток в организме в процессе пролиферации и метастазирования или апоптоза. Полифенолы представляют собой природные пищевые соединения, встречающиеся в фруктах, овощах, зерне. На сегодняшний день в рационе человека идентифицировано более 8000 соединений полифенольного происхождения. Молекулы полифенолов идентифицируются как вторичные метаболиты растений, которые содержат одну или несколько гидроксильных (ОН) групп, то есть являются полигидроксильными коньюгатами. Наиболее распространенные полифенолы классифицированы в различные группы, в зависимости от их химической структуры и ориентации числа фенольных колец, связанных друг с другом. Они подразделяются на четыре основных подкласса: фенольные кислоты, стилбены, куркуминоиды и флавоноиды, из которых фенольные кислоты и флавоноиды составляют, соответственно, 30 и 60%.

Один из куркуминоидов - куркумин и его производные обладают противовоспалительными, антиокислительными и антиканцерогенными свойствами, ингибируя клеточные сигнальные пути, в том числе фактор роста (NFκB), рецептор фактора некроза опухоли (TNFR), ферменты (COX-2, MMP, мTOR) и протеинкиназы (C и EGFR). Куркумин ингибирует жизнеспособность рака предстательной железы и индуцирует апоптоз клеток. Показано, что куркумин подавляет экспрессию в клеточной линии рака предстательной железы (PC3), ключевую сигнальную молекулу в канцерогенезе рака простаты и метастатическую прогрессию. Куркумин значительно подавляет фосфорилирование внеклеточной сигнально-регулируемой киназы и эндотелиальный фактор роста (VEGF), модулируя сигнальный путь остеопонтина/интегрина. Куркумин как модулятор активности эндоплазматического ретикулума является эффективным средством в защите от метастазов рака предстательной железы.

Карназоловая кислота обладает эффективными противораковыми свойствами, значительными ингибирующими и цитотоксическими свойствами в клеточных линиях рака простаты метастазируемых в мозг (Du145) и PC3, что снижает жизнеспособность клеток до 13-20 % при лечении в течение 48 часов при концентрации 6,25 мкг/мл. Также карназоловая кислота предотвращает окисление липопротеинов низкой плотности в эндотелиальных клетках аорты человека и опосредованный липидгидропероксидом окислительный стресс в клетках Caco-2. При воздействии карназоловой кислоты происходит ингибирование процессов перекисного окисления липидов в микросомах печени крысы и фосфолипидных липосомах головного мозга. Всесторонние исследования антиоксидантной активности карназоловой кислоты *in vitro* показали различные способы действия карнозоловой кислоты на АФК и липидные радикалы, что делает этот дитерпеноидный тандем своеобразной и эффективной антиоксидантной системой.

Следовательно, актуальным направлением профилактики и лечения онкологических заболеваний является поиск природных соединений, повышающих устойчивость организма к развитию опухолей и снижающих возможность рецидива опухоли после проведенной лучевой или химиотерапии, а также исследование механизмов их действия. Эффективным подходом представляется комбинированная противоопухолевая фитотерапия, сочетающая в себе препараты с различными механизмами действия.

Цель исследования. Выявить особенности клеточных механизмов при воздействии полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм интактных и раковых клеток простаты.

Задачи исследования:

1. Установить цитотоксичность и оптимальные дозы действия полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты на раковые и нормальные клетки простаты;

2. Изучить механизмы изолированного действия куркумина и карназоловой кислоты по отдельности и при комбинации на пролиферацию клеточных линий простаты;

3. Определить особенности влияния полифенолов на мембранный потенциал и окислительный стресс митохондрий в раковых и интактных клетках простаты;

4. Изучить дыхательную функцию раковых клеток простаты при комбинированном воздействии полифенолов природного происхождения;

5. Показать особенности комбинированного влияния куркумина и карназоловой кислоты на клеточный цикл раковых клеток простаты.

Объект исследования. Клетки простаты человека с метастазами DU145 (метастазируют в отделах мозга) и PC3 (более агрессивные, метастазируют в кости) были получены из Американской коллекции типовых культур, используется до 70-го пассажа (Manassas, США). Клетки поддерживались в среде Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) для роста, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS). Эпителиальные клетки простаты (PrEC) поддерживались в рекомендованной среде PrEGM со всеми необходимыми добавками в соответствии с протоколом производителя, кроме гентамицина, и использовались до 5 пассажа. Клетки HCT116 были приобретены у Американской коллекции типовых культур и использовались до 65 пассажа (Manassas, США). 2-амино-2- (гидроксиметил) пропан-1,3-диол (на базе Trizma) был приобретен у Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A.).

Методы исследования. Культивирование клеток *in vitro*, флуоресцентная спектроскопия (Platereader, Flowcytometer), проточная цитометрия BD Accuri C6, респирометрия (OROBOROS Oxygraph-2K), микроскопия (Leica MZ16F), конфокальная микроскопия (Olympus FluoView), статистическая обработка данных (GraphPad Prism).

Научная новизна исследования

- Впервые изучено сравнительное действия полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты на раковые и нормальные клетки простаты.

- Впервые проведено исследование противоопухолевой активности комбинированного действия куркумина и карназоловой кислоты на митохондриальный метаболизм раковых и нормальных клеток простаты: мембранный потенциал и окислительный стресс митохондрий.

- Установлено синергетическое действие куркумина и карназоловой кислоты и выявлена терапевтическая активность этих полифенолов.

- Показано, что комбинированное действие полифенолов природного происхождения куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ повышает дыхание раковых клеток простаты.

- Впервые выявлены особенности клеточных циклов раковых клеток простаты при комбинированном воздействии полифенолов природного происхождения - куркумина и карназоловой кислоты.

Теоретическая значимость работы. Установлены значения полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты для разработки терапевтических подходов при сочетанном использовании с химиотерапией для снижения цитотоксичности и повышения эффективного действия при лечении рака предстательной железы. Выявлены особенности комбинированного и раздельного действия разных концентраций полифенолов природного происхождения на клеточные механизмы: на мембранный потенциал, окислительный стресс, дыхание клеток и клеточный цикл. Установлены цитотоксичные и оптимальные концентрации карназоловой кислоты и куркумина в отдельности и при их сочетанном действии. Выявлено, что при комбинированном воздействии на клеточный цикл полифенолы - куркумин 7 мкМ и карназоловая кислота 5 мкМ ингибируют рост раковых клеток простаты на фазе G1. Установлено, что при комбинированном воздействии полифенолов понижается мембранный потенциал митохондрий клеток и отмечается стимулирование дыхания.

Практическая значимость. Практическая ценность исследовании связана в использовании полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты и лечении раковых клеток простаты. Полученные результаты были проиллюстрированы в Казахском научно–исследовательском институте онкологии и радиологии (акты внедрения №2 – 2017 г., №3 – 2019 г., №4 – 2019 г. – Приложение А). Форма внедрения: проведен мастер класс с презентацией и практические занятия на животных.

Полученные результаты внедрены в учебный процесс и используются при преподовании курса «Основы физиологии животных» (акт внедрения завершенной научно–исследовательской работы в учебный процесс 2018 г. – Приложение Б).

Основные положения, выносимые на защиту:

Цитотоксические эффекты и оптимальные дозы влияния полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты на интактные и раковые клетки простаты связаны с их концентрацией и длительностью воздействия;

Куркумин и карназоловая кислота при комбинированном действии повышают дыхание в раковых клетках линии Du145 и в эпителиальных клетках простаты - PrEC, но в клетках рака простаты линии PC3 отмечается ингибирование дыхания.

Мембранный потенциал митохондрий при комбинированном действии полифенолов - куркумина и карназоловой кислоты - понижается в зависимости от времени и от концентрации;

Комбинированное воздействие полифенолов на раковые и эпителиальные клетки простаты приводит к окислительному стрессу в зависимости от времени;

Сочетанное действие куркумина и карназоловой кислоты на клеточный цикл раковых клеток простаты зависит от концентрации полифенолов.

Основные результаты исследования и выводы:

1. Определены цитотоксичные концентрации куркумина и карназоловой кислоты и выявлены оптимальные дозы куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ.

2. Установлено, что полифенолы природного происхождения куркумин и карназоловая кислота влияют на задержку пролиферативной способности раковых клеток предстательной железы.

3. Показано, что сочетанное действие полифенолов снижает мембранный потенциал митохондрий в раковых клетках простаты.

4. Обнаружено, что куркумин и карназоловая кислота в комбинации приводят к окислительному стрессу.

5. Установлено, что сочетанное воздействие куркумина и карназоловой кислоты приводит к стимулированию дыхательного процесса в раковых клетках простаты.

6. Выявлено, что полифенолы в комбинации ингибируют клеточный цикл у раковых клеток простаты.

Все поставленные в диссертации задачи выполнены.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа поддерживалась фондами «Cornelius Beukenkamp» (2014-2015г.г.), «Louise» и «Bessie Stein Fellowship» (2014-2015г.г.) с целью исследования рака предстательной железы(руководитель проекта профессор университета Дрексель З.С. Орынбаева), и выполнялась в рамке темы кафедры биофизики и биомедицины: «Современные проблемы биофизики и биомедицины» (2013-2018г.г.) – руководитель темы профессор С.Т. Тулеуханов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены:

- на XXIII международной научно-практической конференции "Прогрессивные процессы мировой научной мысли в исследованиях XXI века" (М-23) №24, Section 7, Казань. – 2015г;
- на международной научной конференции Frontiers in basic cancer research – October 23-26. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA. 2015.;
- на международной научной конференции First annual International Research Showcase, May 26. Philadelphia. USA. 2016;
- на международной конференции «European Bioenergetics Conference». Riva del Garda, July 2-7, Италия. - 2016.;
- на международной научной конференции студентов и молодых ученых «Фараби әлемі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан, 2017г.;
- на международной конференции «Қазақстан онкологтары мен радиологтарының VI – съезі», Алматы 2017г.;
- на международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины», Баку, Азербайджан, 2-3 мая 2018г.;
- на X Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. Россия, Сочи, 23-25 апреля 2018г.;

- на международной научно – практической конференции «Актуальные проблемы экологической генетики и экспериментальной биологии». – Алматы.- 2018г.;

- на VII Съезде онкологов и радиологов Казахстана с международным участием Казахстана, г. Нур-Султан, 17-18 октябрь 2019г.

Публикации и личный вклад автора. Основное содержание диссертации отражено в 16 печатных работах, в том числе: 1 статья и 1 тезис в журналах с ненулевым импакт-фактором входящим в базу данных Web of Science и Scopus, 3 статей из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки Республики Казахстан; 12 тезисов в материалах международных конференций. Автор самостоятельно провел анализ литературных данных по теме исследования, экспериментальные исследования, обработку и анализ результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников из 304 наименований; содержит 26 рисунков, 1 таблицу и 4 приложения.