Казахский Национальный университет имени Аль-Фараби

УДК:57:616.65-006

На правах рукописи

ОСИКБАЕВА САНИЯ ОМИРХАНОВНА

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

6D060700 – Биология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты
доктор биологических наук,
профессор Тулеуханов С.Т.;
PhD, профессор Орынбаева З.С.

Республика Казахстан
Алматы, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ 4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 5
ВВЕДЕНИЕ 7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
1.1 Митохондрии и их физико–химические и метаболические особенности 13
1.2 Полифенолы природного происхождения и их свойства 22
1.3 Рак и раковые клетки простаты 33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 41
2.1 Материалы исследования 41
2.2 Методы исследования 41
2.2.1 Определение цитотоксичности с применением красителей аламар синего и кристаллического фиолетового 41
2.2.2 Подготовка небольших однослойных и гигантских везикул и многослойных дисперсий для дифференциальной сканирующей калориметрии 45
2.2.3 Выделение митохондрий из клеток и подготовка субмитохондриальных частиц 45
2.2.4 Конфокальная микроскопия и флуоресценция куркумина 46
2.2.5 Высокоточный респирометрический анализ 47
2.2.6 Оценка мембранного потенциала митохондрии 48
2.2.7 Определение клеточного цикла 49
2.2.8 Определение механизмов апоптоза 52
2.2.9 Измерение окислительного стресса 54
2.3 Статистическая обработка 54
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 55
3.1 Влияние куркумина и карназоловой кислоты на раковые и нормальные клетки простаты и определение их цитотоксичности 55
3.2 Определение синергетической эффективности куркумина и карназоловой кислоты на пролиферацию раковых и нормальных клеток простаты 60
3.3 Взаимодействия куркумина с мембранами 71
3.4 Определение механизмов действия куркумина и карназоловой кислоты на клеточный цикл клеток рака простаты 81
3.5 Анализ окислительного стресса, вызванного полифенолами природного происхождения в раковых и эпителиальных клетках предстательной железы 84
3.6 Выявление механизмов действия куркумина и карназоловой кислоты на мембранный потенциал митохондрий раковых и интактных клеток простаты 87

3.7 Установление особенностей сочетанного действия куркумина и карназоловой кислоты на дыхание в раковых клетках простаты 89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 92
ВЫВОДЫ 93
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 94
ПРИЛОЖЕНИЯ А – Акт внедрения методов определение цитотоксичности полифенолов на раковые клетки простаты с применением красителей аламар синего и кристаллического фиолетового в Казахском научно – исследовательском институте онкологии и радиологии 116
ПРИЛОЖЕНИЯ Б – Акт внедрения завершенной научно – исследовательской работы в учебный процесс 119

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В диссертации использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 7.32-2001. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общее требования и правила составления.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АДФ	–	Аденозиндифосфат
АТФ	–	Аденозинтрифосфат
АФК	–	Активные формы кислорода
ГВ	–	Гигантские везикулы
ДМСО	–	Диметилсульфоксид
ДМФГ	–	димиристоилфосфатидилглицерин
ДМФХ	–	димиристоилфосфатидилхолин
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФГ	–	1,2-диолеоил-сн-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин) натриевой соли
ДОФХ	–	1,2-диолеоил-сн-глицеро-3-фосфохолин
ДСК	–	Дифференциальная сканирующая калориметрия
КЛ	–	Кардиолипин
Комб	–	Комбинация полифенолов
Кур	–	Куркумин
КФ	–	Кристаллический фиолетовый
МетС	–	Метаболический синдром
ММР	–	Матриксные металлопротеиназы
мРНК	–	Матричная рибонуклеиновая кислота
МПН	–	Митохондриальный пируватный носитель
НАД	–	Никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	–	Никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
ПК	–	Пируваткиназа
ППП	–	Полифенолы природного происхождения
РПЖ	–	Рак предстательной железы
СА	–	Карназоловая кислота
СМЧ	–	Субмитохондриальные частицы
СОД	–	Супероксиддисмутаза
СОХ-2	–	Циклооксигеназа
ФАД	–	Флавинадениндинуклеотид
$ФАДН_2$	–	Восстановленная форма флавинадениндинуклеотида
ЦТК	–	Цикл трикарбоновой кислоты
ЭГКГ	–	Эпигаллокатехин-3-галлат
ЭР	–	Эндоплазматический ретикулум
ЭСР	–	Электронный спиновой резонанс
Bcl-2	–	Антиапоптотический белок В-клеточной лимфомы 2
Bcl-XL	–	Антиапоптотический белок семейства белков Bcl-2
Du145	–	Клеточная линия рака предстательной железы метастазируемая в мозг
EGCG	–	Галлат эпигаллокатехина
FBS	–	Фетальная бычья сыворотка
FCCP	–	Разобщитель митохондриального окислительного

		фосфорилирования
FRET	–	Ферстеровский резонансный перенос энергии
mTOR	–	Мишень рапамицина млекопитающих
NF-κB	–	Ядерный фактор-κB
PBS	–	Натрий-фосфатный буфер
PC3	–	Клеточная линия рака предстательной железы метастазируемая в костях
PI	–	Йодид пропидия
PrEC	–	Эпителиальные клетки простаты
RPMI 1640	–	Roswell Park Memorial Institute 1640 среда для раковых клеток простаты
TNFR	–	Рецептор фактора некроза опухоли
TNFR	–	Фактор некроза опухолей
VEGF	–	Эндотелиальный фактор роста

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. В диссертационной работе были исследованы клеточные механизмы действия полифенолов природного происхождения на раковые и нормальные клетки простаты в условиях *in vitro*.

Актуальность темы. Рак предстательной железы является наиболее часто распространённым видом рака среди мужчин, занимая вторую позицию [1]. По состоянию на 2018 год, по оценкам авторов Siegel R.L. et. al., у одного из девяти мужчин диагностирован рак простаты. В Казахстане рак предстательной железы (РПЖ) по структуре заболеваемости среди мужчин в 2018 году занимает 3 место.

Основными методами лечения рака простаты являются хирургическая резекция, химия или лучевая терапия. Для использования в комплексной химиотерапии злокачественных новообразований рака предстательной железы в последнее десятилетие заслужили внимание полифенолы, применяемые с целью их оздоровительных эффектов и при разработке ценных пищевых продуктов [2].

Изучение механизмов воздействие 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 [3]. Полифенолы представляют собой природные пищевые соединения, встречающиеся во фруктах, овощах, зерне. На сегодняшний день в рационе человека идентифицировано более 8000 соединений полифенольного происхождения [4]. 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% [5-7]. 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) [8,9]. Куркумин ингибирует жизнеспособность рака предстательной железы и индуцирует апоптоз клеток. Авторы Yu X.L. et. al. сообщают, что куркумин подавляет экспрессию в клеточной линии рака предстательной железы (PC3), ключевую сигнальную молекулу в канцерогенезе рака простаты и метастатическую прогрессию [10]. Куркумин значительно подавляет фосфорилирование внеклеточной сигнально-регулируемой киназы и эндотелиальный фактор роста (VEGF), модулируя сигнальный путь остеопонтина/интегрина. Это также вызывает активацию MMP-9, связанную с ангиогенезом, посредством регуляции секреции VEGF и ангиостатина в клетках рака простаты метастазируемых в костях (PC3) [11]. Куркумин как модулятор активности эндоплазматического ретикулума является эффективным средством в защите от метастазов рака предстательной железы.

Таким образом, результаты научных исследования в условиях *in vitro* и *in vivo* явились доказательствами эффективности куркумина против рака предстательной железы, однако представляют интерес исследования, направленные на разработку куркумина в виде наночастиц, благодаря чему биодоступность куркумина может быть усилена для предотвращения или уменьшения развития рака предстательной железы [12].

Совместно с куркумином были рассмотрены воздействия карназоловой кислоты. 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 и 20%, соответственно, при лечении в течение 48 часов при концентрации 6,25 мкг/мл [13]. Также карнозоловая кислота предотвращает окисление липопротеинов низкой плотности в эндотелиальных клетках аорты человека [14] и опосредованный липидгидропероксидом окислительный стресс в клетках Caco-2 [15]. Происходит ингибирование процессов перекисного окисления липидов при воздействии карназоловой кислоты в микросомах печени крысы и фосфолипидных липосомах головного мозга [16-17]. Проводились всесторонние исследование антиоксидантной активности карназоловой кислоты *in vitro*. Показаны различные способы действия карнозоловой кислоты на АФК и липидные радикалы, что делает этот дитерпеноидный тандем своеобразной и эффективной антиоксидантной системой [18].

Из обзора литературы были получены данные о воздействии полифенолов природного происхождения на различные формы раковых заболеваний и их положительное воздействие. 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. В соответствии с целью работы были сформулированы следующие задачи:

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.

Объекты 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).

Новизна исследовательской работы

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

- Впервые проведено исследования 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 установлена терапевтическая активность этих полифенолов.

- Показано, что комбинаторное действие полифенолов природного происхождения куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5мкМ 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 на клетках рака простаты линии PC3 наблюдается 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.

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 и обсуждены:

- 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Митохондрии и их физико-химические и метаболические особенности

Митохондрии являются полуавтономнойой органеллой, которые выполняют важные функции в клеточном метаболизме и регуляции клеточной смерти. Хотя точное происхождение митохондрий все еще остается неопределенным, это широко распространенное мнение, что они возникли от древних свободноживущих аэробных прокариотических организмов, которые, проникают в клетку, затем образовывают с ней взаимовыгодный симбиотический комплекс.

Митохондрии – наиболее обособленные структурные элементы цитоплазмы клетки, обладающие в значительной степени самостоятельной жизнедеятельностью, обладающие собственной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК). Они являются “энергетическими станциями клетки”, участвуют в процессах клеточного дыхания и преобразуют порядка 40% энергии окисления субстратов в аденозинтрифосфат (АТФ), в форму энергии доступную при использовании в многочисленных клеточных процессах.

Принято считать, что остальные 60% выделившейся при окислении энергии превращаются в тепло и выводятся из клетки и организма. В световом микроскопе митохондрии выглядят в виде округлых (шарообразных) или удлинённых (палочкообразных) структур длиной 0,3 – 5 мкм и шириной 0,2 – 1 мкм. С помощью электронной микроскопии установлено, что митохондрии являются органеллами с двойными мембранами. Между наружной и внутренней митохондриальными мембранами расположено межмембранное пространство толщиной 10 – 20 нм.

Внутренняя мембрана, имея большую площадь, чем внешняя, образует многочисленные гребневидные складки – кристы. Кристы существенно увеличивают поверхность внутренней мембраны, обеспечивая значительное место для размещения дыхательной цепи.

В митохондриях локализованы и ферменты, катализирующие окислительные реакции. Большая часть белков митохондрий синтезируется вне митохондрий и контролируется ядром, митохондриальная ДНК кодирует лишь немногочисленные митохондриальные белки. Наблюдались случаи перемещения митохондрий в протоплазме. Считается, что доставка аденозиндифосфата (АДФ), ферментов, кислорода, субстратов для реакций окисления в матрикс и вывод из матрикса в цитоплазму углекислого газа и АТФ, последовательно через две мембраны митохондрии, осуществляется методом активного транспорта. В зависимости от функциональной активности клеток, количество митохондрий в них изменяется от сотен до десятков тысяч [19,20].

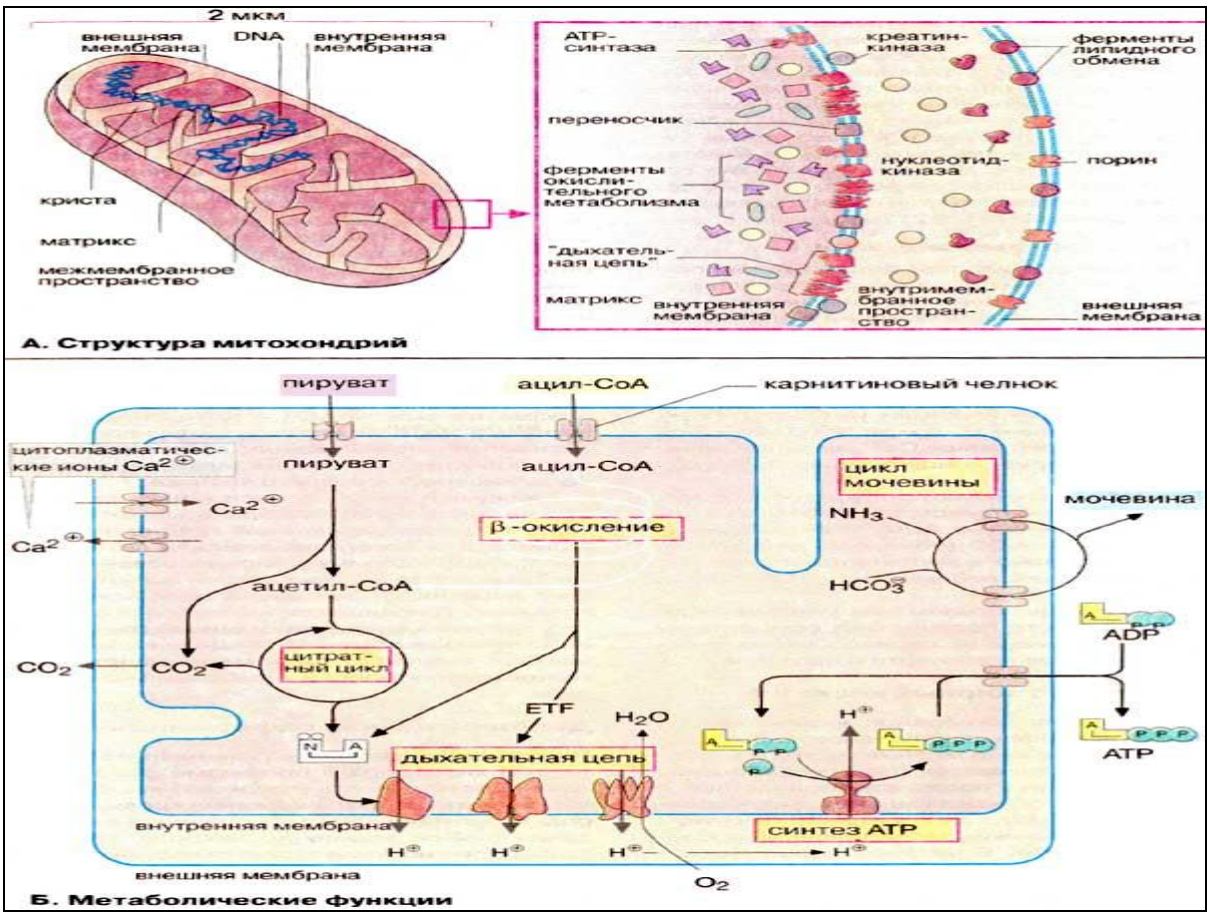
Основная функция митохондрии связана с окислением органических соединений и использованием освобождающейся при распаде этих соединений энергии в синтезе молекул АТФ. Поэтому митохондрии часто называют энергетическими станциями клетки [21].

Поскольку митохондрии используют окислительное фосфорилирование для преобразования пищевых калорий в полезную энергию, генерируя активные формы кислорода в качестве токсичного побочного продукта, предполагается, что дисфункция митохондрий играет центральную роль в широком спектре возрастных нарушений и различных формах рака [22].

Митохондрии осуществляют синтез АТФ, происходящий в результате процессов окисления органических субстратов и фосфорилирования АДФ. В клетках процессы окисления и выделения энергии, освобождающейся в результате этого процесса, проходят в несколько взаимосвязанных этапов. При этом в качестве начальных субстратов используются различные углеводы, жирные кислоты, аминокислоты. Начальные этапы окисления углеводов происходят в гиалоплазме и не требуют участия кислорода. Поэтому они называются анаэробным окислением, или гликолизом.

В процессе гликолиза происходит неполное окисление субстрата. Так, например, глюкоза распадается до триоз, при этом тратятся две молекулы АТФ и синтезируются четыре молекулы АТФ. Образовавшиеся в результате гликолиза триозы, и в первую очередь пировиноградная кислота, вовлекаются в дальнейшее окисление, происходящее уже в самих митохондриях. При этом используется энергия расщепления всех химических связей, что приводит к выделению CO_2, потреблению кислорода и синтезу большого количества АТФ. Эти процессы связаны с окислительным циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) и дыхательной цепью переноса электронов, где происходят фосфорилирование АДФ и синтез клеточного “топлива” – молекул АТФ.

Функция активности клеток, приводит изменению количество митохондрий от сотен до десятков тысяч (данные по структуре и метаболическим функциям митохондрии видны на рисунке 1). Вырабатываемая энергия в организме расходуется на жизнеобеспечение клетки: на деление, на дыхание и на все основные функции клетки [23-26].



А – Структура митохондрии, Б – Метаболические функции митохондрии

Рисунок 1 - Структура митохондрии и метаболические функции [27]

Косарев А.В. [28] предположил, что, митохондрии используют энергию окисления, получаемую в соответствии с законом Гесса, более рационально, чем принято считать, 40% используется в процессе фосфорилирования АТФ, а 60%, выделяясь в объёме матрикса митохондрии, вызывают местный подъём температуры и как следствие давления. Повышенное давление в области матрикса сдавливает кристы, происходит сжатие митохондрии и она работает как сильфонный насос. Биологический раствор выдавливается в форме гидродинамического потока из межмембранного пространства и матрикса митохондрии.

Митохондриальный и клеточный цикл сбережения энергии в целом соответствует циклу сильфонного двигателя. У митохондрии есть дополнительные морфологические особенности, без которых она не сможет работать циклично. Митохондриальный цикл реализует способ преобразования тепла в работу [29,30].

Митохондрии имеют свою собственную ДНК. Это означает, митохондрии обладают способностью к самовоспроизведению и увеличение их количество. Человеческие клетки могут вмещать от 2 до 2500 митохондрии, в зависимости от типа ткани, антиоксидантного статуса и других факторов [31-33].

Митохондрии конкретного морфологического класса могут иметь функциональные преимущество в зависимости от клеточной окружающей среды. Например, было предложено, что крайне удлиненные митохондрии может позволить быструю передачу мембранного потенциала через значительные расстояние внутри клетки [34].

С учетом важной роли, которую играют митохондрии в цикле лимонной кислоты, в цепи переноса электронов, окислительного фосфорилирования, окислением жирных кислот, и катаболизм аминокислот, это не удивительно, что митохондриальные заболевания часто имеют соответствующий компонент метаболизма [35]. В дополнение их важной роли в выполнении требований клеточной энергии, митохондрии также имеют большое значение при обработке промежуточных продуктов метаболизма для различных путей, участвующих в метаболизме углеводов [36]. Цикл трикарбоновых кислот в митохондриях является ярким примером биохимического пути, где многие важные метаболические промежуточные сходятся [37].

Клетки и ткани имеют различные ответы на митохондриальную дисфункцию. Эти различия, вероятно, из-за специализации камерного типа, которые полагаются на определенные функции митохондрии. Большинство исследований митохондриальной дисфункции, естественно сосредоточены на органелл биоэнергетических и метаболических функции, но митохондрии также управляют цитозольный уровень кальция, регулирует апоптоз [38-40] .

Можно выделить основные функции митохондрий. Важная функция это осуществление синтез АТФ, происходящий в результате процессов окисления органических субстратов и фосфорилирования АДФ. Ранние этапы окисления углеводов называются анаэробным окислением, или гликолизом и происходят в гиалоплазме и не требуют участия кислорода в нем. Субстратом окисления при анаэробном получении энергии служат гексозы и в первую очередь глюкоза; некоторые бактерии обладают свойством извлекать энергию, окисляя пентозы, жирные кислоты или аминокислоты.

Кребс цикла или дыхательная цепь – это основная система превращения энергии в митохондриях. В дыхательной цепи происходит последовательное окисление и восстановление элементов дыхательной цепи, в результате чего высвобождается энергия в клетках. Из этой энергии цепи из АДФ и фосфата образуется АТФ [41,42].

Митохондрии находятся в центре энергетического обмена клетки, нарушение в них может негативно воздействовать на жизненно важные функции организма. В научных исследованиях в настоящее время выявлены множество генетических заболеваний, связанных с нарушениями митохондриальных процессов, которые обусловлены дефектами митохондриального генома. Митохондриальная генетика человека интенсивно развивается в последние десятилетия [43,44].

Дефекты в митохондриях могут проявляться на разных стадиях индивидуального развития. Генетические изменения, связанные со старением или изменением клеточных механизмов, наиболее выражены в митохондриях.

В последние годы авторы исследований высказываются предложениями, что в будущем удастся разработать способы исправления митохондриальных дефектов методами генетической инженерии [45-47].

Одним из признаков опухолей является перепрограммирование метаболизма, которое поддерживает синтез макромолекулы, биоэнергетический спрос и клеточную выживаемость [48]. Митохондрии являются центрами метаболических реакций и приводят к перепрограммированию через множество механизмов.

Митохондрии являются основным звеном, активизирующим и подавляющим фактором в гибели клеток. Митохондриальный путь апоптоза происходит за счет повреждения ДНК [49]. Важнейшим белком, регулирующим клеточную гибель, является p53, это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. Активация белка p53 происходит в ответ на множество внешних раздражителей таких как: гипоксия, облучение, высокая концентрация монооксида азота [50,51]. Ген p53 активирует гены Bax и Bid, происходит образование свободных форм кислорода, что способствует выходу цитохрома-с из митохондрий. Одним из самых важных моментов в митохондриальном пути клеточной гибели, является включение белков семейства Bcl-2. Белки семейства Bcl-2 имеют общую структуру, состоящую из гидрофобной α-спирали, окруженной алифатическими α-спиралями. Некоторые члены семейства имеют трансмембранные домены на своем с-конце, которые в основном функционируют, чтобы локализовать их в митохондрии. Семейство Bcl-2 объединяет группу белков со сходными морфофункциональными качествами.

Bcl-2 регулирует клеточную смерть контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Bcl-2 локализуется на внешней мембране митохондрий, играет важную роль в клеточной выживаемости, так же Bcl-2 участвует в контроле метаболической активности, повышает уровень инсулина, что ведет к защитному метаболическому эффекту. Лабораторные мыши, у которых ген Bcl2 искусственно инактивирован, характеризуются замедленным ростом и умирают вскоре после рождения. Гематопоэз у таких мышей протекает нормально на ранних стадиях, но тимус и селезёнка подвергаются ярко выраженной апоптотической инволюции. Также у животных развивается почечная недостаточность и нарушается синтез меланина [52].

Bcl-x представляет собой трансмембранную молекулу в митохондриях, он является членом семейства белков Bcl-2, действует как антиапоптический белок, предотвращая выделение митохондриального содержимого. Дисфункция Bcl-x у мышей может привести к неэффективной выработке эритроцитов, тяжелой анемии, гемолиза и смерти.

Митохондрии являются одним из важнейших компонентов в пути реализации клеточной гибели. Установлено что митохондрии обладают широким спектром белковых и не белковых факторов, активизирующим процесс клеточной гибели. В настоящее время существует гипотеза,

предполагающая, что накопление нарушений в митохондриальном геноме, является одной из причин в различных патологиях.

Помимо энергетической функции, митохондрии способны также накапливать ионы кальция. Еще в 1960х годах было показано поглощение дышащими митохондриями Ca2+ и других двухвалентных катионов [53]. В настоящее время известно, что кальций – это один из важнейших вторичных посредников в клетке. При этом концентрация Ca2+ в цитозоле весьма низкая, он запасается в основном в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и митохондриях. Кальциевый сигналинг имеет вид «волн» повышения и понижения концентрации Ca2+, причем митохондрии принимают важнейшее участие как в формировании этих «волн», так и их модулировании [54,55]. Накопление кальция митохондриями (как и его выход) включает два этапа – перенос кальция через внешнюю мембрану и через внутреннюю мембрану [56]. Как было сказано ранее, за проницаемость внешней митохондриальной мембраны для ионов и небольших молекул отвечает зависимые каналы аниона. Известно, что зависимые каналы аниона могут находиться в двух состояниях: открытом (в норме) и закрытом (например, при взаимодействии с рутениевым красным или факторами семейства Bcl-2). В открытом состоянии он проницаем для метаболитов массой до 5 кДа и демонстрирует малую селективность в отношении пропускаемых молекул. Кроме того, опыты по реконструкции зависимых анионных каналов липидном бислое показали, что зависимое анионные каналы проницаем не только для моновалентных катионов, но и для ионов Ca2+ [57]. Исходя из этого, считали, что кальций свободно диффундирует через открытый канал зависимый анионный канал. Однако последние данные показали, что зависимый анионный канал проницаем для ионов кальция именно в закрытом состоянии [58], хотя размер поры при этом существенно меньше (1,8 нм в закрытом состоянии против 2,5 нм в открытом состоянии) [59]. Перенос кальция через внутреннюю митохондриальную мембрану матрикса происходит с помощью ряда переносчиков – кальциевого унипортера, 17 митохондриального рианодинового рецептора и, по крайней мере, одного кальциевого канала (митохондриального кальциевого канала типа 2). Кальциевый унипортер осуществляет закачивание свободных ионов кальция из цитоплазмы в матрикс митохондрий за счѐт энергии электрохимического потенциала [60]. Накопление митохондриями кальция Ca2+ играет одну из центральных ролей в физиологии и патофизиологии клетки. В частности, поступление Ca2+ из цитозоля в митохондрию регулирует скорость митохондриального синтеза АТФ. Ионы кальция, находящиеся в матриксе митохондрии, активируют дегидрогеназы цикла Кребса [61]. Другие звенья митохондриального метаболизма, такие как ЭТЦ, АТФ-синтетаза, также регулируются ионами Ca2+ [62,63]. От него зависит также подвижность митохондрий и их морфология [64]. Более того, поглощение кальция митохондриями модулирует временно е и пространственное распределение внутриклеточного Ca2+ . Так регулируются все сигнальные пути, связанные с этим катионом, включая клеточную смерть [65].

Также использование липидов при лечении раковых заболеваниях играют важную роль, но их использование мало изучены. Раковые изменения липидного обмена, по-видимому, уникальны по отношению к типу опухоли, позволяя некоторым раковым клеткам активировать окисление жирных кислот, в то время как другие больше зависят от синтеза липидов. Предполагается, что регуляция липогенеза является общей характеристикой большинства опухолей, частично для производства мембран для пролиферации. Ингибирование АТФ-цитратлиазы, которое превращает цитрат, полученный митохондрием, в ацетил-CoA в цитоплазме для поддержки липогенеза, ухудшает опухолегенез в моделях раковых типах [66]. Напротив, некоторые виды рака, включая лимфомы и лейкозы, в основном полагаются на окисление жирных кислот для производства АТФ. Кроме того, окисление жирных кислот может быть предпочтительным выбором топлива для рака, подвергающегося стрессу, поскольку он является важнейшим механизмом выживания для клеток рака молочной железы, страдающих от потери прикрепления к внеклеточному матриксу. Однако механизмы, которые регулируют окислением жирных кислот в раковых заболеваниях, остаются недостаточно понятными. В одном из примеров, регуляция опухолевых клеток специфической для мозга изоформы карнитин-пальмитоилтрансферазы (Cpt-1c), необходимой для импорта митохондриальных FA, привела к увеличению производства жирных кислот и АТФ и устойчивости к метаболическому стрессу. Более того, увеличение окисление жирных кислот может принести выгоды, превышающие развитие АТФ, такие как поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза [67]. Производство ацетил-CoA из окисленных жирных кислот может быть использовано для эпигенетического ремоделирования хроматина, что впоследствии приводит к длительным изменениям в обмене веществ.

Исследованные работы подчеркнули важность изучения метаболизма рака в моделях. Исследования, сравнивающие глюкозы и глутамина в мышиных моделях немелкоклеточного рака легких, основанного на K-Ras мутации, показали минимальный вклад промежуточных продуктов цикла глютамина в ЦТК [68]. Кроме того, исследования в клетках глиобластомы показали, что глутаминзависимый анаплероз не требуется для роста клеток [69]. В этом исследовании экспрессия синтеза глутамина обеспечивала рост и биосинтез пуринового нуклеотида во время голодания глютамина. Эти исследования подчеркивают важность понимания метаболических потребностей *in vivo* опухолевых клеток при разработке терапевтических стратегий.

Митохондрии влияют на рост клеток, выживание и метастазы рака, а многие аспекты митохондриальной биологии за выработку энергии активно способствуют развитию опухоли. К ним относятся митохондриальная масса, динамика, регуляция клеточной смерти, редокс-гомеостаз, метаболическая регуляция и сигнализация. Взаимодействие между этими аспектами митохондриальной биологии приводит к скоординированным программам митохондриальной регуляции клеточной физиологии и подчеркивает плейотропные функции митохондрий при раке.

Митохондрии показывают очень неоднородную форму в различных типах клеток, образуют короткие эллипс или стержнеобразные структуры в непрерывную сетчатую сеть (рисунок 2). Кроме того, подобно трансформационным открытиям онкогенных мутаций в сигнальных путях фактора роста, мутации в митохондриальных метаболических ферментах являются захватывающей новой ступенькой в онкологии.

Исследования выявили взаимодействие между элементами цитоскелета и митохондрий, которые могут модулировать синтез и передачу энергии [70]. Цитоскелетный белок β-тубулин II участвует не только в переносе органеллы, но и регулирует метаболизм митохондриальной энергии и дыхательную функцию [71]. Была также показана тесная связь между динамикой митохондрий и их интеграцией с актиновыми филаментами [72].

Динамическое взаимодействие с элементами цитоскелета имеет большое значение в митохондриальной и общей клеточной физиологии [73]. Эти различия в фенотипе митохондрий являются результатом сложного равновесия между подвижностью органелл, такими как, слияния и деления [74]. Сетчатая структура митохондрий тесно связана с их физической ассоциацией с эндоплазматическим ретикулумом и их совместной регуляцией клеточной передачи сигналов кальция (рисунок 2B) [75].

В данной работе представлены последние данные о структурных особенностях митохондрий на функции митохондрий. Благоприятно, что биологическая система зависит от их физиологической роли. Следовательно, структурные аспекты организации органелл и клеток должны быть глубоко изучены, чтобы понять их функциональность, а также должны быть учтены при поиске различных патологий [76].

На рисунке 2A - митохондрии, меченные оранжевым флуоресцентным красителем *MitoTracker*. Вставки демонстрируют постепенно увеличивающуюся инфраструктуру митохондрий 2B. На вставке показан физический контакт между эндоплазматическим ретикулом (зеленый) и митохондриями (красный) (Предоставлено доктором З. Орынбаевой, Медицинский колледж Университета Дрексел, США).

Метаболическое перепрограммирование раковых клеток является их отличительным свойством, играющим важнейшую патогенетическую роль в развитии злокачественных новообразований в течение всех стадий канцерогенеза и усугубляющим выраженность всех признаков, присущих опухолевым клеткам.

А

Б

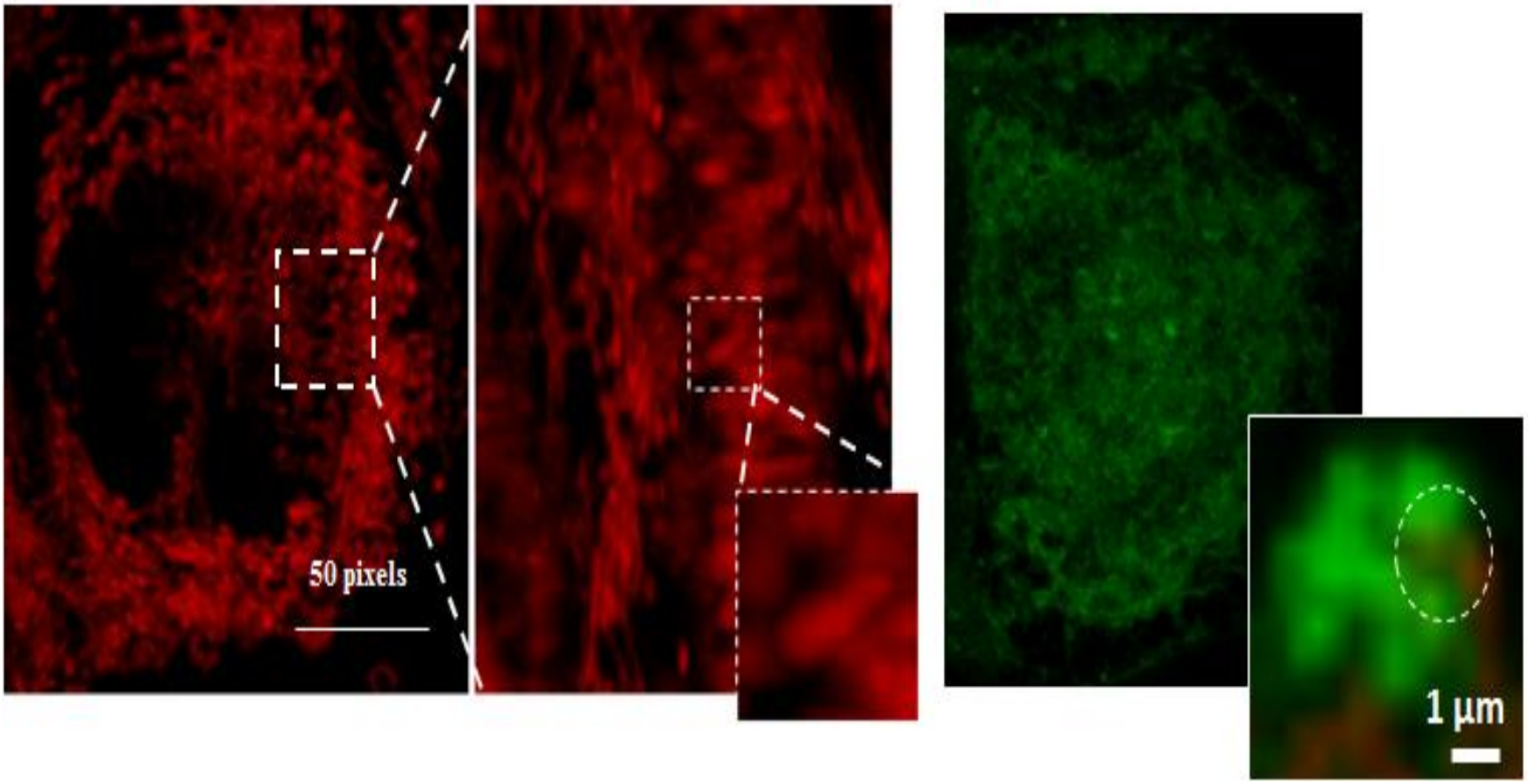


Рисунок 2 - Трехмерная структура митохондрий клеток HeLa и сетей эндоплазматического ретикулума

Таким образом, чтобы эффективно лечить раковые заболевания, следует рассмотреть пути к терапевтическим вмешательствам, предоставляемым митохондриями, будущие исследования комбинированных методов лечения, будут важны для продвижения лечения раковых заболеваний.

1.2 Полифенолы природного происхождения и их свойства

Полифенолы - это природные соединения, встречающиеся в основном во фруктах, овощах, злаках и напитках, также они встречаются в зерновых, сухих бобах и в шоколаде [77,78]. Полифенолы являются вторичными метаболитами растений и обычно участвуют в защите от ультрафиолетового излучения или против агрессии со стороны патогенов [79]. В пище полифенолы могут привносить горечь, терпкость, цвет, вкус, запах и окислительную стабильность. Исследования на животных, людях и эпидемиологические исследования показывают, что различные полифенолы обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, которые могут оказывать профилактическое и/или терапевтическое воздействие на сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные нарушения, рак и ожирение [80,81]. Последние годы возрос интерес к полифенолам и другим фенольным соединениям, так как они являются предметом в научных исследованиях из-за их возможного полезного воздействия на здоровье человека. Также основное преимущество полифенолов природного происхождения, использование их в качестве химиопрофилактики из-за низкой токсичности и высокой переносимости. В этом обзоре основное внимание уделяется современному пониманию биологических эффектов пищевых полифенолов и их важности для здоровья и заболеваний человека на клеточном уровне.

Основной показатель в использовании полифенолов – это биодоступность. Биодоступность - это доля питательного вещества, которое переваривается, усваивается и метаболизируется нормальными путями. Биодоступность каждого полифенола различна, однако не до конца исследованы их связи между количеством полифенолов в пище и их биодоступностью в организме человека. Важно то, что химическая структура полифенолов, а не их концентрация, определяет скорость и степень абсорбции, а также характер метаболитов, циркулирующих в плазме. Наиболее распространенными полифенолами в диете не обязательно являются те, которые показывают наибольшую концентрацию активных метаболитов в тканях-мишенях; следовательно, биологические свойства полифенолов значительно отличаются от одного полифенола к другому. Исследования, дают понимание об их абсорбции через кишечный барьер и дают увеличение антиоксидантной способности после употребления продуктов, богатых полифенолами [82,83].

Проведенные научные исследования полифенолов в основном состоят из эпидемиологических исследований, которые фокусируются на конечных точках заболевания, в дополнение к экспериментам на мышиной модели и кормлении человека, которые исследуют их взаимодействия. Данные, полученные в

исследованиях на животных и людях, показывают, что антиоксидантные и противовоспалительные свойства полифенолов могут потенциально предотвращать или служить средством лечения многих неинфекционных заболеваний (таблица 1).

Таблица 1 - Данные о воздействии полифенолов на здоровье человека [84]

Тип заболевания	Эффект действия
Нейродегенеративные заболевания	* Куркумин, ресвератрол и катехины могут защищать от болезней Альцгеймера с помощью антиоксидантных и иммуномодулирующих и поглощающих свойств, которые защищают нейроны и ингибируют нейротоксические эффекты бета-амилоидного белка (85–94) * Железо-хелатообразующие эффекты галлат эпигаллокатехина (EGCG), куркумина, мирицетина, гинсенозидов и гинкгетина являются основным механизмом, посредством которого полифенолы предотвращают нейротоксичность, приводя к нейропротективному эффекту против нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона (95,96).
Воспаление	Фенольные соединения могут предотвращать системное и / или локализованное воспаление, восстанавливая окислительно-восстановительный баланс для уменьшения окислительного стресса и модулируя воспалительные реакции посредством смягчения путей цитокинов (93).
Рак	* Флаваноиды, такие как антоцианы, катехины, флаванолы, флавоны, флаваноны и изофлавоны, могут нейтрализовать свободные радикалы и снизить риск развития рака, останавливая рост клеток в опухолях (97). * Исследованы виды рака, положительным эффектом при воздействии полифенолов: рак толстой кишки, предстательной железы и молочной железы (93,94,98–101).
Сердечно-сосудистые заболевания	Пища, богатая флавоноидами, ассоциируется с улучшением здоровья желудочков, снижением активности тромбоцитов, ферментативной модуляцией, противовоспалительными эффектами и снижением артериального давления для улучшения общего состояния сосудов (102).

Также, в литературных данных, немало исследований в изучении доставки этих полифенолов природного происхождения и их биодоступность. Разные

виды полифенольных соединений, по-разному разбавляются и доставляются в организм человека. Их биодоступность, зависит от их эффекта действия при опухолевых заболеваниях.

Таргетное лечение, также дает возможность действие на клеточные механизмы и их изучение в целом при воздействии этих полифенольных соединений. На таблице 1, рассматриваются распространённые виды заболеваний, при которых использовали полифенольные соединения и получали положительный результат. Это раковые клетки, воспаление, нейродегенеративные заболевания, часто встречающиеся сердечно – сосудистые заболевания.

Из показателей таблицы объяснением доминирующим этих преимуществ является нейтрализирование свободных радикалов, образуемые стабилизированные химические комплексы, предотвращая тем самым дальнейшие реакции [103]. Также имеются данные о дополнительном механизме, с помощью которого полифенолы защищают от окислительного стресса, продуцируя перекись водорода (H_2O_2), которая затем может помочь регулировать действия иммунного ответа, такие как рост клеток [103,104].

Считается, что полифенолы, обладают антиканцерогенным действием, задерживают клеточный рост, вызывая старение клеток или апоптотическую гибель клеток, а их дифференциальный окислительно-восстановительный статус может избирательно влиять на опухолевые клетки [93, p. 23]. Ресвератрол, содержащийся в красном вине, как сообщается, предотвращает агрегацию тромбоцитов и расслабляет артериальные кровеносные сосуды, нарушая окисление холестерина липопротеинов низкой плотности [99,p. 1-4;100, p. 82; 105-107].

Влияние полифенолов на линии раковых клеток человека чаще всего носит защитный характер и вызывает уменьшение количества опухолей или их роста [108]. Эти эффекты наблюдались в местах, таких как рот, желудок, двенадцатиперстную кишку, толстую кишку, печень, легкое, молочная железа или кожа. Были проверены многие полифенолы, такие как кверцетин, катехины, изофлавоны, лигнаны, флаваноны, эллаговая кислота, полифенолы красного вина, ресвератрол и куркумин; все они показали защитные эффекты в моделях с опухолевыми заболеваниями, их механизмы действия оказались разными [109].

Развитие рака или онкогенез является многостадийным и микроэволюционным процессом. Существуют основные три этапа канцерогенеза: инициация, продвижение и прогрессирование. Инициированные клетки, таким образом, могут иметь трансформацию в злокачественную опухоль, если последует дальнейшее развитие. На развитие, влияют факторы, которые не изменяют последовательности ДНК и включают в себя отбор инициированных клеток.

Для химиопрофилактического действия полифенолов было выявлено несколько механизмов действия, в том числе эстрогенная/антиэстрогенная

активность, антипролиферация, индукция остановки или апоптоза клеточного цикла, предотвращение окисления, индукция ферментов детоксикации, регуляция иммунной системы хозяина, противовоспалительная активность и изменения в сигнализации [110].

Полифенолы влияют на метаболизм про-канцерогенов, модулирование экспрессии ферментов цитохрома P450, участвующих в их активации в канцерогены. Они также могут облегчать их выведение путем увеличения экспрессии ферментов, конъюгирующих фазу II. Эта индукция ферментов фазы II может быть вызвана токсичностью полифенолов [111]. Полифенолы могут образовывать в организме потенциально токсичные хиноны, которые сами являются субстратами этих ферментов. Потребление полифенолов может затем активировать эти ферменты для их собственной детоксикации и, таким образом, вызвать общее повышение нашей защиты от токсичных ксенобиотиков [74,с. 306]. Было продемонстрировано, что катехины чая в форме капсул при введении мужчинам с интраэпителиальной неоплазией предстательной железы высокой степени обладают профилактической активностью при раке, подавляя преобразование повреждений интраэпителиальной неоплазии высокой степени злокачественности в рак [112].

Теафлавины и теарубигины, полифенолы черного чая также обладали сильными противораковыми свойствами. Обнаружено, что полифенолы черного чая ингибируют пролиферацию и усиливают апоптоз в клетках карциномы предстательной железы Du 145. Было обнаружено, что более высокий уровень инсулина, подобного фактору роста-1 (IGF-1), связан с более высоким риском развития рака предстательной железы. Связывание IGF-1 с его рецептором является частью пути передачи сигнала, который вызывает пролиферацию клеток. Было обнаружено, что добавление полифенолов черного чая блокирует прогрессию роста клеток, индуцированное IGF-1, в S-фазу клеточного цикла в дозе 40 мг/мл клетки карциномы простаты [113].

Полифенолы действуют как генераторы активных форм кислорода, выполняющих роль вторичных мессенджеров в клеточной сигнальной трансдукции. В клетках рака простаты существует множество мишеней, на которые могут воздействовать полифенольные соединения. Фактор NF-kB, тем не менее, можно считать центральной мишенью, поскольку он контролирует экспрессию генов, отвечающих за пролиферацию, апоптоз, метастазирование опухолей [114].

Ресвератрол предотвращает все стадии развития рака и, как было установлено, эффективен при большинстве видов рака, включая рак легких, кожи, молочной железы, предстательной железы, желудка и колоректального рака. Также было показано, что он подавляет ангиогенез и метастазирование. Обширные данные в клеточных культурах человека показывают, что ресвератрол может модулировать множество путей, вовлеченных в рост клеток, апоптоз и воспаление. Антиканцерогенные эффекты ресвератрола, по-видимому, тесно связаны с его антиоксидантной активностью, он ингибирует

циклооксигеназу, гидропероксидазу, протеинкиназу С, фосфорилирование Bcl-2, Akt-киназу с фокальной адгезией, NFκB, матриксную металлопротеазу-9 и регуляторы клеточного цикла [115]. Эти и другие исследования in vitro и in vivo дают обоснование использование пищевых полифенолов в химиопрофилактики рака у человека в комбинаторном подходе с химиотерапевтическими препаратами или цитотоксическими факторами для эффективного лечения резистентных к лекарству опухолевых клеток.

На основании приведенных литературных данных о действиях полифенольных соединений на раковые клетки можно заключить, что полифенолы природного происхождения обладают большим потенциалом для использования их комбинации с химиотерапией. Подходящая комбинация полифенолов с существующими химиотерапевтическими средствами приведет к уменьшению побочных эффектов, не уменьшая химиотерапевтических эффектов. Также, полифенольны природного происхождения являются перспективными для использования химиопрофилактики рака простаты, поскольку они являются безопасными и недорогими.

Куркумин — основной куркуминоид, входящий в состав корня куркумы. К куркуминоидам также относятся диметоксикуркумин и бис-диметоксикуркумин [116]. Куркума использовалась из-за ее целебных свойств в течение тысяч лет и является широко используемой специей в азиатских и индийских продуктах. Куркумин имеет характерный жёлтый цвет, плохо растворяется в воде, но легко растворяется в спирте и в диметилсульфоксиде (ДМСО) (рисунок 3).

Куркумин обладает множеством полезных для здоровья эффектов, таких как снятие воспаления, боли и симптомов метаболических синдромов. Есть также данные, что куркумин обладает противораковыми свойствами.

Исследовано, что куркумин обладает противоопухолевыми свойствами, но большинство этих исследований были проведены *in vitro* [117,118]. Эти исследования предполагают, что куркумин ингибирует пролиферацию клеток и вызывает остановку клеточного цикла, апоптоз и старение - через различные механизмы, на различные типы раковых клеточных линий. Были данные исследования, что куркумин уменьшает экспрессию множества различных ферментов, факторов транскрипции, воспалительных цитокинов, факторов роста и других компонентов клеточной сигнализации, которые важны для роста и прогрессирования рака.

Например, во многих исследованиях различных линий раковых клеток было обнаружено, что куркумин подавляет экспрессию транскрипционного фактора NF-κB, который обычно высоко экспрессируется раковыми клетками и, как известно, способствует развитию рака, метастазирования и опухоли роста.

Кроме того, куркумин останавливает клеточный цикл в фазах G1/S или G2/M путем ингибирования различных циклинов в раковых клетках. Куркумин также вызывает апоптоз через каспазозависимые пути и снижает экспрессию

антиапоптотических белков. Свойства куркумина было изучено на моделях животных различных типов рака [118, p. 15]. Эти исследования в целом показали, что куркумин обладает антипролиферативным действием.

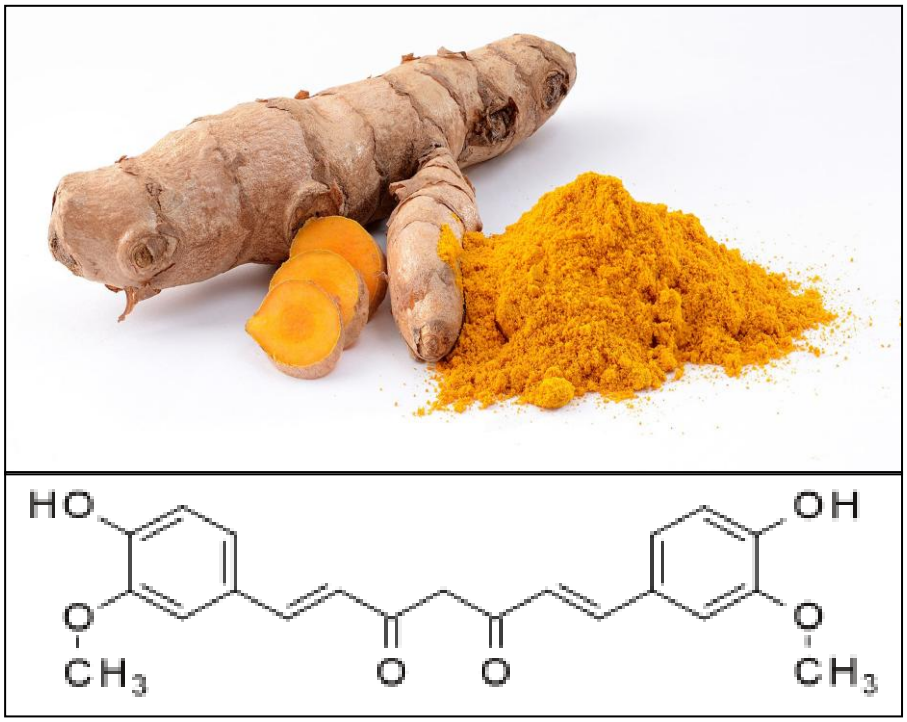


Рисунок 3 - Куркумин и его химическая структура [119]

Например, мышиная модель колоректального рака, которую лечили внутрибрюшинной инъекцией куркумина или контрольного носителя, продемонстрировала, что куркумин продлевает жизнь и ингибирует рост опухоли [120]. Эти данные также предполагают, что куркумин активировал miRNA miR-130a, что уменьшало путь Wnt/β-catenin и приводило к увеличению выживаемости.

Исследования на животных моделях рака молочной железы показали, что куркумин также подавляет NF-κB, уменьшает метастазирование и ингибирует ангиогенную передачу сигналов, что приводит к уменьшению образования микрососудов [121]. Исследования на животных рака поджелудочной железы также показали, что куркумин ингибирует рост опухоли, подавляет пролиферацию и уменьшает ангиогенез [122]. Было проведено противоопухолевое действие куркумина, эти исследования в основном являются пилотными исследованиями и показали, что куркумин не является токсичным и хорошо переносится даже в высоких концентрациях. Например, в исследовании заболеваний миеломой в концентрациях 4 - 8г куркумина уменьшило отношение свободных радикалов, а также замедлит процесс заболевания [117, p. 92].

В исследованиях [123] 17 пациентов с прогрессирующей опухоли поджелудочной железы получали 8г куркумина в день одновременно с гемцитабином. 9% из оцениваемых пациентов продемонстрировали частичный ответ, 36% - стабильное заболевание, а 55% - прогрессирующее заболевание, а средняя выживаемость составила 5 месяцев. Тем не менее, 5 пациентов прекратили куркумин из-за переполнения живота или боли, и еще 2 пациентам потребовалось снижение дозы куркумина.

В пилотном исследовании 2 фазы оценивалось использование куркумина с доцетакселом у 26 мужчин с устойчивым к химиотерапии метастатическим раком предстательной железы, устойчивым к кастрации [124]. Мужчины получали 6г куркумина ежедневно в дополнение к доцетакселу и преднизону в течение 6 циклов. Был ответ простат-специфического антигена (ПСА) среди 59% пациентов, и 40% испытали частичный ответ. Побочных явлений не было у 100% пациентов.

Апоптоз - это нормальный физиологический процесс, необходимый для поддержания клеточного гомеостаза. Клеточные изменения, вовлеченные в этот процесс, являются как морфологическими, так и биохимическими, включая распад цитоскелета и последующее сжатие клеток, конденсацию хроматина и активацию специфических протеаз, называемых каспазами [125-127]. Апоптоз инициируется с различными внутренними и внешними стимулами, включая токсические повреждения. Апоптоз играет решающую роль не только в развитии ткани и гомеостаза, но также вовлечен в широкий спектр патологических состояний [128,129]. Апоптотическая гибель клеток сопровождается серией сложных биохимических событий и определенных морфологических изменений, которые включают сжатие клеток, конденсацию хроматина, фрагментацию ДНК, расщепление мембран и появление мембранно-связанных апоптотических тел. Неспособность точно подвергнуться апоптозу может вызвать серьезные аномалии, начиная от аутоиммунного заболевания до рака.

Действие куркумина были исследованы в воспалительных состояниях [130], метаболических синдромах [131], болях [132] и помогает в лечении воспалительных и дегенеративных глазных состояний [133,134]. Кроме того, куркумин используется для улучшения работы почек [135].

Несмотря на то, что, как представляется, бесчисленные терапевтические преимущества при добавлении куркумина, большинство из этих преимуществ обусловлено его антиоксидантными и противовоспалительными эффектами [124, p. 1137; 132, p. 815].

Одной из основных проблем куркумина является его низкая биодоступность [136], которая, как представляется, в основном связана с плохим поглощением, быстрым метаболизмом и быстрой элиминацией. Были протестированы полифенолы, которые улучшат биодоступность куркумина. Большинство из них были разработаны для блокирования метаболического пути куркумина, чтобы увеличить его биодоступность. Например, пиперин,

известный усилитель биодоступности, является основным активным компонентом черного перца [137] и связан с увеличением на 2000% биодоступности куркумина [138].

Доклинические данные свидетельствуют о том, что куркумин обладает противораковыми свойствами, и эти данные требуют его дальнейшей оценки в качестве потенциального лечения рака у людей. Однако из-за его плохой биодоступности, текущие исследования разрабатывают подходы для улучшения его доставки к клеткам, тем самым потенциально улучшая дозировку и эффективность.

Таким образом, проблема плохой биодоступности, по-видимому, устраняется путем добавления таких агентов, как пиперин, которые повышают биодоступность, тем самым создавая комплекс куркумина.

Куркумин также проявляет значительные взаимодействия с кардиолипином (КЛ), липидом, который находится исключительно в митохондриальной мембране. Было исследовано, что куркумин влияет на структуру и динамику КЛ-содержащих биомиметических и биологических мембран митохондрий.

Применение нескольких биофизических методов выявляет ассоциацию, стимулируемую КЛ, и интернализацию куркумина в липидный бислой. Параллельно, что куркумин с КЛ-содержащими бислоями увеличивал их текучесть и уменьшал упорядоченность липидов. Эти данные свидетельствуют о том, что модификации мембран, опосредуемые взаимодействиями КЛ, могут играть роль в терапевтических функциях куркумина и что внутренняя митохондриальная мембрана в целом может представлять собой потенциальную лекарственную мишень [139].

Антиоксидантными и противовоспалительными свойствами являются два основных механизма, которые объясняют большинство эффектов куркумина на различные условия [140]. Показано, что куркумин улучшает системные маркеры окислительного стресса [141]. Имеются данные о том, что он может увеличить активность сыворотки антиоксидантов, таких как супероксиддисмутаза (СОД) [131, p. 621; 142].

Систематический обзор и метаанализ контрольных данных, связанных с эффективностью добавок с очищенными куркуминоидами по параметрам окислительного стресса, показал значительное влияние добавления куркуминоидов на все исследованные параметры окислительного стресса, включая плазменную активность СОД и каталазы, а также как концентрации глютатионпероксидазы и липидных пероксидов в сыворотке [141,p. 939].

Следует отметить, что все исследования, включенные в метаанализ, использовали какую-то формулировку для преодоления проблем биодоступности и четыре из шести использованных пиперин.

Влияние куркумина на свободные радикалы осуществляется несколькими различными механизмами. Он может собирать различные формы свободных радикалов, таких как реакционноспособный кислород и азот [142, p. 1201]; он

может модулировать активность глютатионпероксидазы, каталазы и СОД-ферментов, активных в нейтрализации свободных радикалов [139, p. 578]; также он может ингибировать АФК-генерирующие ферменты, такие как липоксигеназа/циклооксигеназа и ксантингидрогеназа/оксидаза [143].

Кроме того, куркумин представляет собой липофильное соединение, которое делает его эффективным поглотителем пероксильных радикалов, поэтому, подобно витамину Е, куркумин также рассматривается как антиоксидант, разрушающий цепь [139, p. 578].

В жизнедеятельности любого организма в клетках и межклеточном пространстве происходит один из самых универсальных процессов – образование свободных радикалов. На самом деле известно, что воспалительные клетки высвобождают ряд реактивных видов в месте воспаления, приводя к окислительному стрессу, что демонстрирует связь между окислительным стрессом и воспалением.

Оксидативный стресс (процесс повреждения клетки в результате окисления) причастен ко многим хроническим заболеваниям, и его патологические процессы тесно связаны с болезнями воспаления [144]. При этом ряд реакционно способных видов кислорода/азота могут инициировать внутриклеточный сигнальный каскад, который усиливает провоспалительную экспрессию гена [145,146], эти болезни включают болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, эпилепсию, церебральную травму, сердечно-сосудистые заболевания, метаболический синдром, рак, аллергия, астму, бронхит, колит, артрит, почечную ишемию, псориаз, диабет, ожирение, депрессию, усталость, и синдром приобретенного иммунодефицита спида [130,p. 699].

Фактор некроза опухоли α (TNF-α) является основным медиатором воспаления при большинстве заболеваний, регулируясь активацией фактора транскрипции, ядерного фактора (NF) -κB. В то время как TNF-α считается наиболее мощным активатором NF-κB, экспрессия TNF-α также регулируется NF-κB. TNF-α NF-κB активируется большинством воспалительных цитокинов; грамотрицательных бактерий, различных болезнетворных вирусов, загрязнителей окружающей среды, высоким уровнем глюкозы, ультрафиолетовым излучением и другими вызывающими болезни факторами.

Агенты, которые регулируют NF-κB и NF-κB-регулируемые генные продукты, обладают потенциальной эффективностью против негативного воздействия этих негативных факторов. Роль куркумина в этом процессе заключается в том, что он блокирует активацию NF-κB. Было показано, что куркумин подавляет воспаление через множество различных механизмов [130,p. 699], тем самым зарекомендовав в себя как потенциально противовоспалительное средство.

Исследовано, что куркумин ослабляет аспекты метаболического синдрома, улучшая чувствительность к инсулину [147,148], подавляя адипогенез [149] и снижая повышенное кровяное давление [150], воспаление [151] и

окислительный стресс [152-153]. Кроме того, имеются данные о том, что куркуминоиды модулируют экспрессию генов и активность ферментов, участвующих в метаболизме липопротеинов, которые приводят к уменьшению триглицеридов и холестерина в плазме [154-156] и повышают концентрацию HDL-C [157].

Результаты исследования показывают, что добавление куркумина в еду значительно снижает концентрацию провоспалительных цитокинов в сыворотке у пациентов с МетС [158].

Одно из полифенольных соединений растительного происхождения, которое привлекает внимание клиницистов - карназоловая кислота. Организм не способен синтезировать карназоловую кислоту самостоятельно, поэтому может попадать только за счет продуктов питания.

Карназоловая (или карнозиновая) кислота – это химическое соединение, которое в большом количестве содержится в розмарине и шалфее, обладает рядом свойств, которые дают возможность включить ее в состав некоторых лекарственных препаратов и профилактических средств.

Листья розмарина используются в качестве приправы и консерванта пищевых продуктов. Эти ароматные травы не только ценятся за свой неповторимый вкус и запах, химический состав пряностей послужил отличным сырьем для получения полезного лекарственного соединения - карназоловой кислоты (рисунок 4).

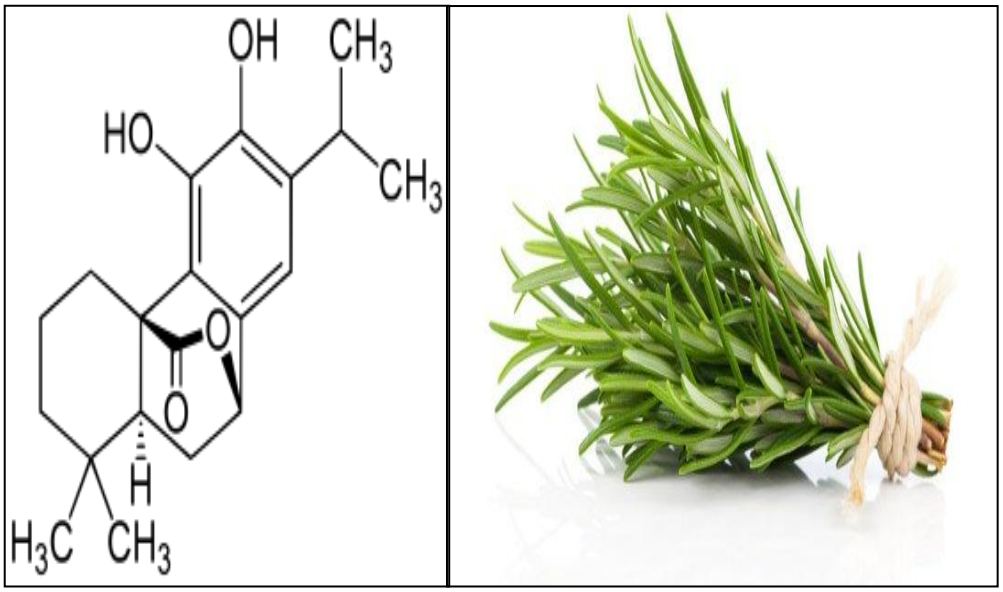


Рисунок 4 - Карнозоловая кислота и его химическая структура [159]

Листья розмарина включены в состав Британской травяной фармакопеи. В США, Индии, Китае они являются официальным фармакологическим сырьем и используются в фитотерапии и гомеопатии [160-169]. Листья розмарина используются в качестве приправы и консерванта пищевых продуктов. Эфирное масло розмарина проявляет выраженные антибактериальные,

противогрибковые, противовоспалительные, цитостатические, антиоксидантные свойства [170].

Полифенолы розмарина - карнозоловая кислота является противовоспалительным и антиоксидантным соединением из розмарина. Полифенол розмарин, в частности выделяемая из него карнозоловая кислота, является одним из самых мощных природных антиоксидантов, используемых при сохранении пищевых продуктов, но также и для здоровья, таких как противовоспалительное и детоксикационное действие [171].

При исследованиях на линиях клеток и животных карназоловой кислоты было показано, что она обладала противовоспалительной, антиоксидантной и противоопухолевой активностью. Главное свойство этого соединения в том, что карназоловая кислота обладает высокой нейтрализующей способностью свободных радикалов, даже в мозге человека, предотвращая расстройства, связанные с ослабленной передачей нервного сигнала. Хорошо известно, что нарушенная передача нервного сигнала, например, при низких уровнях нейротрансмиттеров, связана с психическими заболеваниями, повышенной чувствительностью к стрессу и когнитивными нарушениями. Применение карназоловой кислоты возможно для профилактики или лечения состояний, ассоциируемых со сниженной трансмиттерной/медиаторной активностью дофамина, серотонина и норадреналина. Свободные радикалы могут стать причиной воспаления, развития онкологических заболеваний и просто вести к старению организма.

Карнозоловая кислота была в основном исследована для противоопухолевой, противовоспалительной и антиоксидантной активности на нескольких линиях клеток и животных [172-175]. Карнозоловая кислота подавляла индуцируемый нитроксид-синтазой понижающий регуляторный множитель-В в мышиных макрофагах. Он подавляет циклооксигеназу (COX) - 2-транскрипцию в эпителиальных клетках молочной железы человека [176], также индуцировал Nrf-2, важный регулятор транскрипции антиоксидантных, противовоспалительных и детоксикационных процессов [177]. Токсичных элементов не накапливает.

Клетки рака предстательной железы приобретают метаболически высокоактивные митохондрии с повышенной частотой дыхательных комплексов и более высоким уровнем мембранного потенциала митохондрий и способности удерживать кальций. Следовательно, при таких окислительных типах опухолей стратегия лечения должна быть направлена на отключение окислительного фосфорилирования митохондрий. Было исследовано, что остановка роста, вызванная этим полифенолом, не ограничивает его протонофорную активность, но также зависит от изменения митохондрий, содержащих белки, регулирующие клеточный цикл. Нацеливание метаболизма рака с помощью карназоловой кислоты представляет собой многообещающую стратегию преодоления лекарственной устойчивости и сенсибилизации опухоли в терапии рака [178,179].

Ориентация на метаболизме рака с полифенольными соединениями представляет собой многообещающую стратегию для лечения полифенольными соединениями и в терапии раковых заболеваний [180].

Опубликованные в литературе данные, отвечающие требованиям доказательной медицины, подтверждают благоприятное влияние куркумы и розмарина с высоким содержанием полифенолов, таких как куркумин и карназоловая кислота, при патологических нарушениях в организме процессов деления, в частности, при онкологических процессах. Исследования механизма клеточного действия этих полифенольных соединений ориентирует на применение в онкологии и представляет собой многообещающую стратегию для повышения эффективности терапии рака предстательной железы и других локализаций.

1.3 Рак и раковые клетки простаты

Рак является наиболее сложным заболеванием, меняющее многочисленные факторы и механизмы в клеточной физиологии, которое, в конечном счете, приводит к злокачественным опухолям. Распространение злокачественных опухолевых клеток в окружающие ткани и отдаленные органы является основной причиной заболеваемости и смертности большинства раковых больных. В ходе этого, основной биологический процесс, при котором нормальные клетки превращаются в злокачественные раковые клетки, является признаком больших исследовательских работ в области биомедицинских наук в течение многих десятилетий. Несмотря на многочисленные научно-исследовательские работы, лечение метастатического рака является, сложным по сей день, как они были и сорок лет назад [181,182].

Рак предстательной железы является основной причиной заболеваемости у мужского населения смерти от рака простаты в возрасте от 55-74 и выше 75 лет она является второй по значимости причиной смерти в североамериканских мужчин после рака легких и рака бронха [183,184]. Все мужчины с прогрессирующим опухолевым заболеванием, которые прошли через андрогенные терапии, впоследствии умирают из-за развития метастатического андроген независимого рака простаты [185-187]. В структуре онкологических заболеваний в Казахстане рак предстательной железы занимает 9 ранговое место, что составляло 3,8% [188]. Первые места в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями мужского населения Республики Казахстан распределены следующим образом: опухоли трахее – 1, бронхов – 2, рака желудка – 3, рака кожи – 4, рак предстательной железы занимает – 5 место [189]. А в 2018 году рак предстательной железы по структуре заболеваемости среди мужчин занимало 3 место, процент составил 8,4 (по данным 7 форма «Отчет о больных и заболеваниях злокачественными новообразованиями) [190].

Высокий уровень смертности от рака предстательной железы связано с активным распространением аденокарциномы предстательной железы, который

распространяет в отдаленные органы с предпочтением к костной ткани, и происходят метастазы. Исследовано большое количество экспериментальных данных, которое указывает на то, что прогрессирование как первичных, так и метастатических опухолей предстательной железы определяется потерей клетки апоптотического потенциала [187, p. 484]. Заболеваемость рака простаты возрастает каждый год на 3% в год, за что он был назван эпидемиологами “онкологической бомбой замедленного действия”, так как его обнаруживают уже, когда он метастазирует. Каждый год в мире выявляется свыше 400 тыс. новых случаев рака предстательной железы и около 200 тыс. человек умирают каждый год [169,p. 20585].

По прогнозам всемирной организации здравоохранение к 2030 году заболеваемость и смертность от рака простаты во всем мире возрастет в вое раза. Она является – одна из ведущих причин смерти у мужчин пожилого возраста от злокачественных опухолей в Казахстане.

Причины возникновения рака простаты многообразны: возраст, питание, образ жизни и т.д., и окончательно не выяснена. В настоящий момент накоплено огромное количество фактического материала, которые проливают свет и понятие о механизмах патогенеза данного заболевания.

В мире по онкологической заболеваемости рак простаты занимает шестое место, а среди мужчин – третье. Ежегодно данный вид рака диагностируется у более полумиллиона людей, что соответствует примерно одной десятой части от всех онкологических заболеваний у мужчин. В более развитых странах доля РЖП в структуре онкологической заболеваемости составляет одну шестую, в развивающихся – менее одной двадцатой.

Смертность от рака простаты значительно выше, чем сама заболеваемость, так как о нем узнают больные на поздних стадиях. Тем не менее, РПЖ занимает вторую позицию в списке причин онкологической смертности в США, причём на долю новообразований предстательной железы приходится чуть менее одной десятой летальных исходов рака [190, с. 110; 191-193]. В возрасте риск развития этого заболевания растет на 3-4% в год, и прекращает расти только тогда, когда у данной популяции начинает увеличиваться уровень смертности от сердечно–сосудистых заболеваний [194]. Более того, с 1985 г. наблюдается небольшое увеличение числа летальных исходов от РПЖ в большинстве стран, включая те страны и регионы, в которых он не распространён [195].

Все мужчины с прогрессирующим заболеванием, которые прошли через андрогенной депривации лечения, в конце умирают из-за развития андроген-независимого метастатического рака простаты [196-199], высокий уровень смертности от рака предстательной железы связано с активным распространением аденокарциномы предстательной железы, которая распространяет в отдаленные органы с предпочтениями в костной ткани [200]. Существует большое количество данных, которое указывает, что прогрессирование обоих первичных и метастатических опухолей

предстательной железы определяется потерей клетки апоптотического потенциала [201-203].

При лечении рака простаты применяется мультимодальный подход. Кроме выполнения радикальной хирургии, гормональной терапии, лучевой терапии все чаще стали применяться аблативные технологии. Высокие показатели канцер-специфической выживаемости наряду с низким уровнем послеоперационных осложнений позволяют малоинвазивной хирургии являться методом выбора в лечении пациентов с РПЖ [204].

Научные исследование нормальных и раковых клеток предстательной железы в сравнении, показало, что они имеют различия в метаболизме цитрата и митохондриального L-лактата. Кроме того, в отличие от большинства злокачественных тканей клетки рака простаты имеют низкую гликолитическую активность и транспорт глюкозы, а также преимущественно метаболизируют жирные кислоты.

Есть данные о работе, где изучались митохондрии, выделенные из нормальных эпителиальных клеток простаты (PrEC), а также метастатических клеточных линий LNCaP, PC-3, DU145. Было выявлено, что раковые клетки простаты содержат в 2-4 раза больше митохондриальных белков, ровно, как и общее содержание митохондрий в них больше чем в нормальных эпителиальных клетках.

Дыхательная активность раковых митохондрий в 5-20 раз выше, чем таковая митохондрий нормальных клеток простаты в зависимости от субстрата и метаболического состояния органелл. Было выявлено ряд особенностей, которые обеспечивают раковым митохондриям устойчивость к развитию апоптоза, а именно низкое сродство комплекса I к никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), на 20-30 мВ более высокий мембранный потенциал и большая кальциевая емкость. Эти параметры, в свою очередь позволяют сдерживать открытие пермеабилизованной поры митохондрий и предотвращать развитие апоптоза в раковых клетках. Более того, низкое сродство НАДН-дегодрогеназы к субстрату можно рассматривать как адаптивное свойство раковых клеток к накоплению и выделению лактата.

В результате окисления внеклеточной среды активируется переносчик дикарбоксильных кислот на плазматической мембране раковых клеток для поддержания повышенного окислительного фосфорилирования. Полученные литературные данные свидетельствуют о митохондриях, как потенциальных мишенях анти-раковых терапий [205].

В раковых клетках простаты метастазы распространяются как по кровеносным, так и по лимфатическим путям (рисунок 5). В большинство случаев они метастазируют в лёгкие, печень, паховые и подвздошные лимфатические узлы, а также в костную ткань (преимущественно в кости таза). Выявлена эмпирическая закономерность: метастазы в лимфатические узлы не сочетаются с метастазированием в костную ткань [196, p. 680].

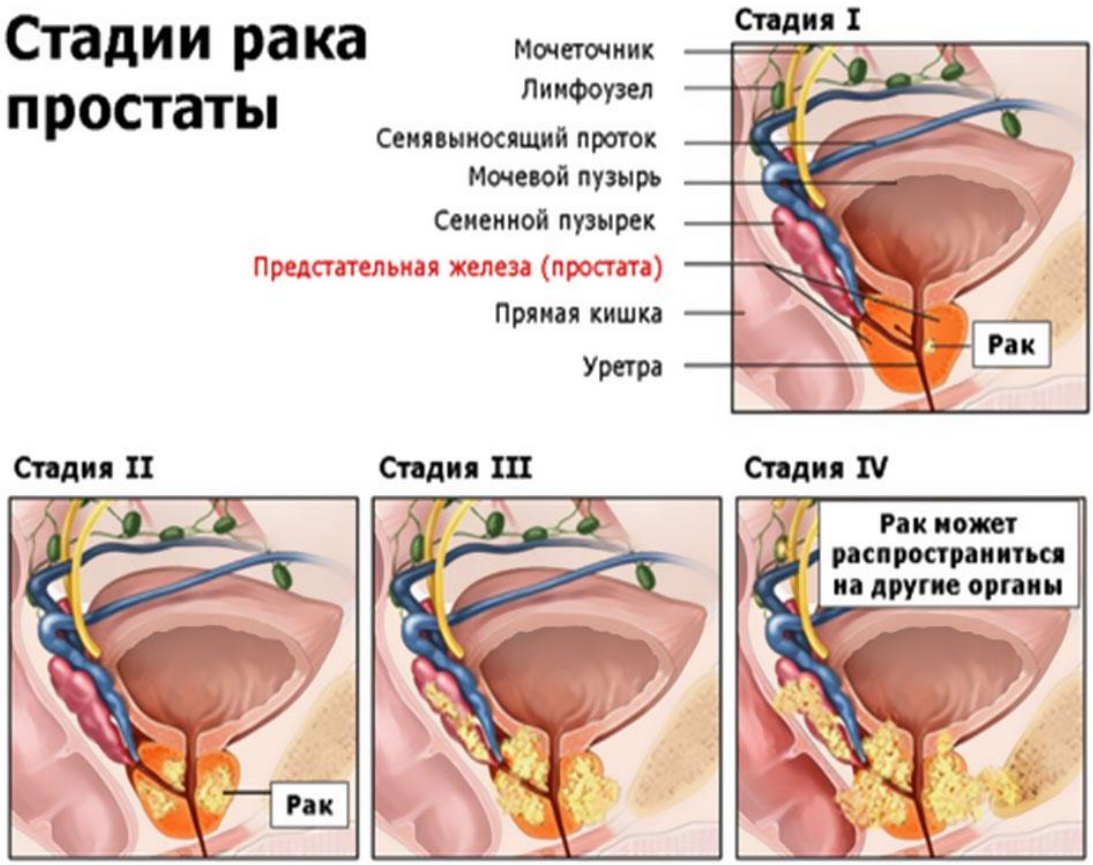


Рисунок 5 – Стадии рака простаты [206]

Причины рака простаты разные и окончательно не выяснены. Это может быть причина в питании, климат, но основная причина это возрастной показатель. К настоящему моменту получены материалы, проливающего свет на молекулярные механизмы патогенеза данного заболевания. В полученных данных установлено, что в трансформированных клетках простаты наблюдаются многочисленные изменения экспрессии генов, контролирующих пролиферативные процессы, также регистрировался повышенный уровень образования факторов роста и их рецепторов; активируются сигнальные каскады, ассоциированные с андрогенными рецепторами и рецепторами эстрогенов. Было отмечено повышения активность характерных для стволовых клеток эмбриональных сигнальных путей и Wnt-катенин. Эти компоненты придают трансформированным клеткам простаты агрессивные свойства, стимулируют их миграцию пролиферацию и метастатическую активность. В нормальных простатических клетках, вставших на путь злокачественного перерождения, отмечены также значительные изменения экспрессии генов и белков, вовлеченных в регуляцию апоптоза. В частности, снижена активность каспаз и повышена экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2, что может способствовать выживанию метастазных клеток и развитию устойчивости к химиотерапевтическим препаратам [207].

Изучение энергетического метаболизма рака предстательной железы, дают более точные параметры в лечении этого онкологического заболевания. Митохондрий в клетках имеют немало важную роль, во всех клеточных механизмах. Участие митохондрий в апоптозе было подтверждено большим количеством данных, описывающих проапоптотические митохондриальные изменения, такие как образование реакционноспособных видов кислорода, истощение АТФ и индукция порога перехода митохондриальной проницаемости (mPTP) [208]. Было, исследовано, что Bcl-2 и другие белки, регулирующие апоптоз этого семейства, расположены на участках митохондриального перехода внутренней и внешней мембран или межмембранного пространства и регулируют апоптоз посредством их влияния на переход митохондриальной проницаемости [205,с. 212; 206; 207, с. 98; 208, р. 162; 209-212]. Исследования взаимосвязи между индукцией апоптоза в клетках рака предстательной железы и экспрессией Bcl-2 и связанных с Bax белков дали противоречивые результаты [213-218], и данные показывают, что Bcl-2, Bcl-xL и некоторые другие связанные с апоптозом белки не важны для индукции апоптоза в клетках рака предстательной железы [219-221]. С другой стороны, открытие порога перехода проницаемости непосредственно зависит от свойств митохондрий, таких как электрический мембранный потенциал ($\Delta\Psi$), образование АФК и дыхательная активность [222-225]. Поэтому важно понимать биохимические и физиологические аспекты митохондриальной функциональности в качестве центрального сторожа в неспособности клеток рака предстательной железы совершить запрограммированную гибель клеток.

Несмотря на то, что имеется много сообщений об индукции апоптоза в клетках предстательной железы посредством модуляции метаболизма митохондрий [226-228], в целом, малоизвестно о биоэнергетических и митохондриальных функциях нормальных или раковых клеток простаты, за исключением различий лимонной кислоты в их метаболизме [229] и митохондриального L-лактата [230]. В отличие и в сравнении от большинства злокачественных новообразований опухолевые клетки предстательной железы характеризуются низкой скоростью гликолиза и поглощением глюкозы [231-233], а также преимущественным поглощением жирных кислот над глюкозой. Высокая биохимическая пластичность клеток рака предстательной железы помогает им адаптировать свой метаболизм к типичному гипоксическому состоянию опухоли [234]. Однако во многих из этих исследований по метаболизму митохондрий в клетках рака предстательной железы авторы использовали антибиотики [235]. Известно, что аминогликозидные антибиотики (стрептомицин, гентамицин) являются митотоксичными [236-240]. Мы установили, что митохондрии, выделенные из клеток рака предстательной железы, лимфобластоидные клетки человека и гепатоциты, выращенные в присутствии стрептомицина, не дышат на каких-либо субстратах. Таким образом, клетки в культурах, содержащих антибиотики, не поддерживают аэробный метаболизм, и гликолиз является единственным источником АТФ.

Поэтому многие выводы, полученные на клеточных культурах с антибиотиками, следует рассматривать с осторожностью.

Ранние исследования ультрамикроскопической структуры нормальных и раковых клеток предстательной железы показали, что клетки рака предстательной железы демонстрируют поразительное увеличение числа и плеоморфизма митохондрий [241]. Это отделяет рак предстательной железы от других типов рака, где злокачественная трансформация обычно сопровождается значительным снижением митохондрий клетки [242].

В нормальной простате эпителиальные клетки выделяют высокий уровень цитрата, вероятно, из-за их относительной неспособности окислять цитрат через цикл Кребса [243]. При развитии рака предстательной железы уровень снижается, а в предстательной железы еще больше повышаются при доброкачественной гиперплазии предстательной железы, потому, что митохондрии рака простаты приобретают способность к окислению цитрата. Это метаболическое свойство митохондрий рака предстательной железы является антитезой, наблюдаемой для многих быстрорастущих видов рака, в которых цикл Кребса переключается с использования цитрата на производство цитрата, что приводит к увеличению производства холестерина [244].

Вклад в энергетический обмен в развитии рака и его прогрессировании сообщается в ряде работ [245-247]. Считается, что для того, чтобы сделать противораковую терапию специфичной для рака, сначала должны быть выяснены биоэнергетические метаболические признаки каждого типа опухоли. Показано, что изменения в биоэнергетических функциях рака предстательной железы человека LNCaP, DU145 и PC-3 связаны с митохондриальными дисфункциями [236,p. 44], в то время как детальные механизмы митохондриальной патологии остаются неопределенными. Цель этого исследования состояла в том, чтобы выяснить те метаболические особенности митохондрий, которые могут способствовать ингибированию апоптоза в клетках рака предстательной железы. Из-за известной необычной гетерогенности рака предстательной железы мы исследовали митохондриальные биоэнергетические свойства трех линий клеток рака простаты, а именно PC-3, LNCaP и DU145, отличающихся по происхождению, туморогенности, реакции на андрогены и скорости пролиферации [248-252]. Для сравнения мы изучали митохондрии из культивируемых нормальных человеческих эпителиальных клеток предстательной железы. Все эти клеточные линии практически не изучены в терминах митохондриальных функций, для сравнения мы изучили также линию клеточной линии фибросаркомы человека без простаты HT1080. EBV-трансформированные нормальные лимфобластоидные клетки человека служили ссылкой на то, как митохондрии из культивируемых нормальных клеток реагируют на нагрузки Ca2 + и циклоспорин A.

Митохондрии из трех линий метастатических раковых клеток предстательной железы имеют ряд различных метаболических особенностей:

потенциал мембраны на 20-30 мВ выше (ΔΨ), низкое сродство комплекса I к НАДН, более высокая устойчивость к нагрузкам Ca2 + и необычный ответ на циклоспорин A, и порообразующий антибиотик аламетицин по сравнению с PrEC и нормальными митохондриями HLB. Наблюдаемые особенности митохондрий рака предстательной железы могут защитить клетки рака предстательной железы от апоптоза прямым и косвенным ингибированием перехода митохондриальной проницаемости [249,p. 773].

В целом данные, представленные в настоящем исследовании, поддерживают биоэнергетическую гипотезу рака простаты и важную роль митохондрий в потере апоптотического потенциала метастатическими раковыми клетками предстательной железы [253].

Нормальные эпителиальные клетки предстательной железы характеризуются высоким уровнем производства цитрата. Эта метаболическая особенность может быть объяснена регуляторной ролью Zn2 + в каталитической активности митохондриальной цис-аконитазы. При физиологических концентрациях Zn2 + действует как мощный конкурентный ингибитор цис-аконитазы в митохондриях предстательной железы и, таким образом, ингибирует дальнейшую трансформацию цитрата в цикле трикарбоновой кислоты [254]. Кроме того, в митохондриях предстательной железы аконитаза встречается при низкой концентрации [255]. Это объясняет, почему показатели дыхания на грамм ткани предстательной железы обычно считаются значительно низкими.

Противоопухолевыми таргетными мишенями являются ключевые белковые молекулы, избирательно поражающие трансформированные клетки. Это область медицины, прошедшее бурное развитие в течение последних 15 лет благодаря достижениям современной науки. Было выявлено, что можно лечить злокачественных новообразований способом терапевтического лечения с достаточно большими возможностями соответствующими лекарственными средствами. Лечения таково вида уже сейчас активно используются в клиниках, а большинство - проходит II-III фазы клинических испытаний, в том числе при раке простаты.

Доказано, все более очевидно, что терапия направленного действия на механизмы эффективна только тогда, когда “бьет” одновременно по нескольким, минимум трем-четырем, молекулярным мишеням. Более того, трансформированной клетке выходит из строя не один, а целая группа регуляторных молекулярных механизмов, позволяющих ей выйти из-под контроля внутриклеточных и иммунных защитных систем и дать начало зарождающейся опухоли. Это дает понимание, что врач-химиотерапевт должен назначить онкологическому больному минимум три-четыре таких препарата. При этом лучше, если они будут действовать на разные звенья канцерогенеза и блокировать разные биологические мишени, например, подавлять пролиферацию, усиливать апоптоз опухолевых клеток и блокировать опухолевой неоангиогенез.

Однако каждый препарат химиотерапии будет иметь свои ограничения в применении и свой спектр нежелательных побочных эффектов. Другая возможность заключается в том, чтобы назначить таргетный препарат (препараты) в комбинации или по отдельности стандартной противоопухолевой гормональной или химиотерапиной эффективностью с полифенольными соединениями, чтобы уменьшить токсичность и повысить эффективность лечения.

В литературных данных описано немало примеров более-или-менее успешного использования подобного подхода (правда, пока в основном только в эксперименте), при попытках снижения метастатического потенциала опухолей, в том числе рака простаты и молочной железы, лейкемии [256-263].

В случае прогрессии заболевания, развития метастазов в опухолях клетках все проводимые лечебные работы становятся неэффективными или токсичными. Таким образом, изучение клеточных механизмов раковых клеток простаты при воздействии полифенольных соединений, дает дальнейшее перспективное направления лечения рака предстательной железы и поиск новых лекарственных мишеней – полифенольных соединений.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Объектом исследования являются клеточные линии рака предстательной железы метастазирующие в костную ткань - PC3, клетки рака простаты метастазирующие в мозг - Du145 и условно здоровые эпителиальные клетки - PrEC.

Нормальные клетки эпителия предстательной железы человека, были получены от клонолиальной корпорации, Сан-Диего, штат Калифорния, и выращивались в бессывороточной среде PrEBM с добавками, предоставляемые Lonza. Установленные клеточные линии рака простаты клеток человека DU145 [264], PC3 [265] были получены из Американской коллекции типовых культур, Роквилл, штат Мэриленд [266].

Клеточные линии рака предстательной железы культивировались при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Клетки выращивали в среде RPMI 1640 (Lonza), дополненной 10% инактивированной телячьей сыворотки (PAA, Pasching, Австрия), 1% раствор глутамина (200), 1% раствор пирувата натрия (100мМ). Линии клеток рассаживали два раза в неделю, и среду меняли через день. Каждый фласк с клетками подписывали: название клеток, какой пассаж и дату, которая менялась среда или дата пассажа клеток. Во время культивирования клеток не использовались антибиотики.

Клетки карциномы толстой кишки человека HCT116 - были приобретены у Американской коллекции типовых культур и использовались до пассажа 65 (Manassas, VA, США).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение цитотоксичности с применением красителей аламар синего и кристаллического фиолетового

Цитотоксичность полифенолов природного происхождения определяли с применением красителей аламар синего и кристаллического фиолетового во времени сразу после добавления, после 4-48 часов. Клеточные линии простаты после размножения, при росте 60-65% плотности культивировались на 96-луночные планшеты с плотностью 9000 клеток на одну лунку. Клетки инкубировались в планшетах в течение 24 часов перед добавлением препаратов. После суток клеткам добавлялись полифенолы природного происхождения в разных концентрациях, в каждом планшете был свой контроль без добавления полифенолов.

Пролиферативную активность клеток в культуре на планшетах, под влиянием полифенолов в различных концентрациях оценивали с помощью красителя аламар синего (Alamar blue) [267], на аппарате Plate reader BioTek Synergy (BD Biosciences, San Jose, CA). Аламар синий прикрепляется к условно

метаболический живым клеткам, и он менее токсичен для клеточных культур, сравнительно с другими красителями.

Используя уменьшающую способность живых клеток для количественного измерения пролиферации различных клеточных линий человека, животных, бактерий, растений и грибов, позволяет установить относительную цитотоксичность агентов в различных классах химических веществ или препаратов. Если клетки живые, они поддерживают восстановительную среду в цитозоле клетки, что дает свою очередь сигнал от красителя Аламар синего.

После окраски Аламар синим, клетки можно смыть клеточным буфером и можно использовать эти клеточные культуры для других исследований. Аламар синий краситель определяет качественные показатели клеток при воздействии разных концентрации препаратов. Реагент аламар синий, представляет собой нетоксичное, проницаемое для клеток соединение, которое имеет синий цвет и практически в применении.

Живые клетки способны непрерывно преобразовывать резарузин в резоруфин, тем самым формируя количественный сигнал. Клетки культивировались в течение 4-48 часов.

На рисунке 6 ход работы для определения цитотоксичности клеток с применением красителя аламар синего.

Измерение флуоресцентной интенсивности производили на планшете Plate Reader (возбуждение при 530 нм, эмиссия при 590 нм). Контрольными клетками считались, те клетки, которые культивировались в средах без добавки полифенолов.

Влияния полифенолов на пролиферацию клеток исследованы в пяти независимых экспериментах с 5-и образцами для каждой концентрации. Количество живых клеток рассчитывали в процентах от контроля, которым являлись клетки, культивированные без добавления полифенолов. Для определения действия полифенолов на рост колоний опухолевых клеток культур были выбраны концентрации: 0,25 мкМ; 0,5 мкМ; 1 мкМ; 2,5 мкМ; 5 мкМ; 7 мкМ; 10 и 20 мкМ.

Определение цитотоксичности с применением красителя Кристаллического фиолетового. Кристаллический фиолетовый (КФ) клеточный анализ цитотоксичности является одним из распространенных методов, используемых для определения жизнеспособности клеток или цитотоксичности препарата. КФ представляет собой триарилметановый краситель, который может связываться с молекулами типа рибозы, такими как ДНК в ядрах. Обычно мертвые адгезивные клетки отделяются от пластин для культивирования клеток и будут удалены из жизнеспособного клеточного перемещения во время промывных стадий.

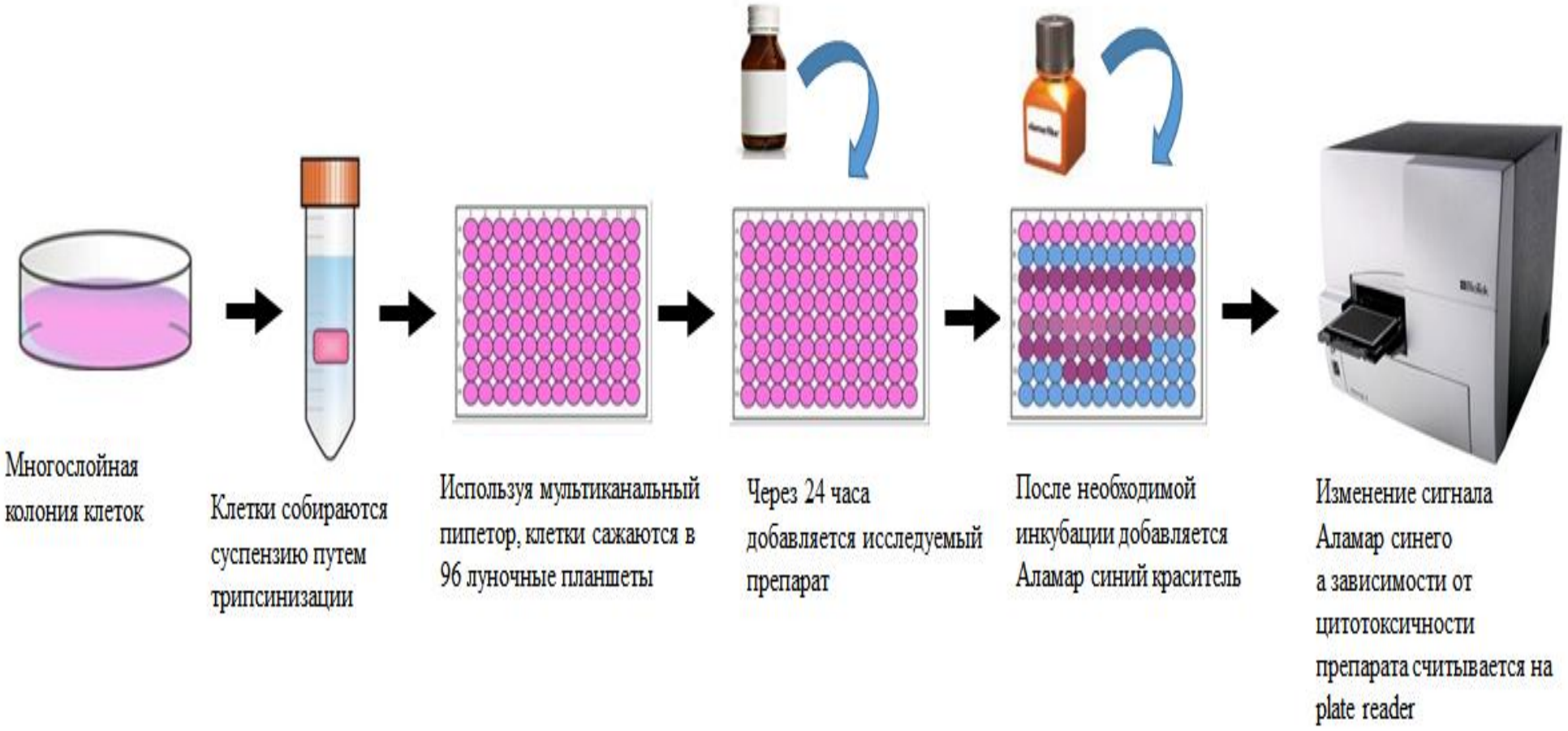


Рисунок 6 – Определение цитотоксичности – метод проведения

Краситель КФ может использоваться для количественной оценки полной ДНК оставшейся популяции и, таким образом, определения жизнеспособности клеток. Краска КФ прямо пропорциональна биомассе ячейки и может быть измерена при 570 нм. Краситель КФ представляет собой быстрый и универсальный анализ для скрининга жизнеспособности клеток при различных условиях стимуляции или ингибирования.

Набор для анализа цитотоксичности КФ-клеток BioVision прост, точен, воспроизводим и чувствителен. Он также включает доксорубицин в качестве положительного контроля. Этот набор предлагает отличный и эффективный метод для исследований цитотоксичности *in vitro*. Был применен метод определения числа клеток в монослое культуры с использованием кристаллического фиолетового. Он основан на наблюдении, что в фиксированных клетках кристаллический фиолетовый связывается с нуклеопротеинами, и количество связанных соединений линейно коррелирует с количеством клеток.

Клетки были инкубированы в 6-луночные планшеты с плотностью 20000 клеток в одну лунку. Клетки инкубировались с полифенолами в течении 6-7 дней. После инкубации клеточные колонии фиксировались 3,7% формальдегидом при комнатной температуре в течение 5 минут. После фиксации они промывались натрий-фосфатным буфером (PBS) трижды, после чего были высушены. Затем клетки окрашивались 0,05% кристаллическим фиолетовым и инкубировались в течение 30 минут (Sigma – Crystal Violet). Наилучшее окрашивание было получено на планшетах в течении 30 мин при комнатной температуре. Влияния полифенолов на пролиферацию клеток исследованы в восьми независимых экспериментах с 5-и образцами для каждой концентрации

Несвязанный краситель был удален обильным промыванием дважды дистиллированной водой, после чего планшеты были высушены. В результате клетки имели связанный с красителем нуклеотид, в то время как цитоплазма не была окрашена.

Сигнал кристаллического синего считывается на микроскопе. Сила сигнала означает количество выросших или не выросших клеток.

Окрашенные колонии были рассмотрены на Zeiss Axiovert 40 CFL инвертированном микроскопе с помощью SPOT RT-SE ™ цифровой фотокамеры (Diagnostic Instruments Inc. США). Изображения были проанализированы с помощью программы ImageJ. Программа ImageJ - быстрый и простой автоматический подсчет клеток.

Аламар синий и кристалический фиолетовый это ряд методик, которые определяют цитотоксичность веществ. Аламар синий тест дает вощможность определить метаболический живые клетки и кристаллический синий количественные показатели исследуемых клеток. В этой методике мы определяли оптимальные дозы полифенолов и их эффект на раковые клетки простаты.

2.2.2 Подготовка небольших однослойных и гигантских везикул и многослойных дисперсий для дифференциальной сканирующей калориметрии

Липидные компоненты растворяли в хлороформ/этаноле (1:1) и сушили вместе в вакууме до постоянного веса с последующим добавлением трис-буфера (pH 7,4) и зондированием в течение 10 мин при комнатной температуре с 20% -ной амплитудой и вкл. / выкл. 59 сек циклов. Для всех методов конечная общая концентрация липидов составляла 1мМ, за исключением электроного спинового резонанса (ЭСР), когда конечная концентрация липидов составляла 10 мМ.

Многослойная дисперсия (общая концентрация липидов 1мМ) для измерений дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) была получена путем растворения сухих липидов в буфере Трис (pH 7,4). Затем добавляли стеклянные бусины, и образец тщательно встряхивали до получения гомогенного раствора.

Гигантские везикулы (ГВ) были получены быстрым методом испарения [268]. ГВ, содержащие различные липидные композиции, растворяли в 1 мл хлороформа в 250 мл круглодонной стеклянной колбе. К пипетке осторожно добавляли 5 мл Трис-буфера (10 мМ, pH 7,4). Затем органический растворитель удаляли в роторном испарителе при пониженном давлении при комнатной температуре. После выпаривания в течение 4-5 мин полученный раствор везикул проявлял мутный вид и использовался в день приготовления. Затем куркумин добавляли к смеси гигантских везикул в конечных концентрациях 0,4-1,6 мкМ, а ее флуоресценцию визуализировали с помощью конфокальной микроскопии.

2.2.3 Выделение митохондрий из клеток и подготовка субмитохондриальных частиц

Линию клеток рака толстой кишки HCT116 культивировали в среде RPMI, дополненной 10% FBS при 37°C в атмосфере 5% CO_2. Для выделения митохондрий клетки собирали при слиянии 70-75%. Около 2 г клеточного осадка промывали ледяным PBS (без Ca^{+2}/Mg^{+2}) и повторно суспендировали в гипотоническом растворе (100 мМ сахарозы, 10 мМ MOPS, pH 7.2, 1 мМ EGTA), чтобы клетки набухали в течение 10 мин на льду по Панову [269]. Суспензию гомогенизировали в гомогенизаторе из тефлонового стекла с помощью нежных круговых штрихов после немедленного разведения с помощью гипертонического раствора (1,25 мМ сахарозы, 10 мМ MOPS, pH 7.2), 1 мл на 10 мл суспензии клеток для восстановления буферной изотоничности. Смесь разбавляли тремя объемами изолирующего буфера (75 мМ маннита, 225 мМ сахарозы, 10 мМ МОПС, pH 7.2, 1 мМ ЭГТА, 0,1% без жирной кислоты БСА). Полученный неочищенный митохондриальный осадок промывали центрифугированием при тех же параметрах в 10 мл буфера дыхания MiR06 (110 мМ сахарозы, 60 мМ K-лактобионата, 20 мМ HEPES, pH 7.2, 1 мМ KH_2PO_4, 3 мМ $MgCl_2x6H_2O$, 0,5 мМ EGTA, 20 мМ таурина, 0,1% без жирной

кислоты BSA) [270]. Конечный осадок повторно суспендировали в 100 мкл MiR06 путем встряхивания и хранили на льду в холодильнике. Митохондриальный белок определяли анализом белка Брэдфорда.

Подготовка субмитохондриальных частиц (СМЧ). Аликвоту выделенных митохондрий клеток HCT116 (40 мкг/мл) разбавляли буфером для ультразвуковой обработки (250 мМ сахарозы, 10 мМ Трис HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7.0) до объема 1 мл. Суспензию митохондрий обрабатывали зондом в течении 20 секунд при 40°C, с 20% - ной амплитудой и 5-секундными циклами вкл/выкл, чтобы сформировать ориентированные на наивысший из них СМЧ. Концентрацию белка СМЧ определяли по анализу белка Брэдфорда и использовали при конечной концентрации 1 мкг/мл. Инверсия внутренней митохондриальной мембраны в СМЧ была подтверждена анализом цитохрома с оксидазой.

2.2.4 Конфокальная микроскопия и флуоресценция куркумина

Взаимодействие куркумина с митохондриями HCT116 и ГВ оценивали с помощью конфокальной микроскопии. Клетки HCT116 высевали на предварительно обработанных 35% стеклянных чашках MatTek на основе коллагена (MatTek Corp, Ashland, MA, U.S.A.) с плотностью 300 000 клеток. Для визуализации взаимодействия куркумина с митохондриями, клетки промывали модифицированным буфером Кребса (137мМ NaCl, 5мМ KCl, 1мМ KH_2PO_4, 20 мМ HEPES, pH 7.4, 1 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$, 10 мМ глюкозы) и окрашивали 70 нМ красителем *MitoTracker Orange* CM ™ Ros (длина волн Ex/Em 554/576 нм) в течение 30 минут при комнатной температуре.

После инкубации клетки промывали и оставляли в последней промывке, содержащей 7мкМ куркумина (автоматическая флуоресценция ~ 520 нм). Обработка изображений проводилась на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Melville, NY, U.S.A) в последовательном режиме с использованием 60x NA 1.42 PLAPON масляного объекта.

ГВ были помечены куркумином, как описано выше, и помещены в тарелку со стеклянным дном. Суспензии ГВ были отображены на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Axiovert 100M (Carl Zeiss, Йена, Германия) с использованием масляного объектива NAX Plan Apochromat 63x/1.4. Флуоресценцию куркумина возбуждали аргоновым лазером 488 нм, излучаемый свет пропускали через фильтр 580-700 нм.

Флуоресценция куркумина. Различные композиции небольших одноламеллярных везикул получали способом, описанным выше. Образцы для измерений флуоресценции получали путем добавления заданных объемов куркумина (конечные концентрации - 0,8 мкМ, 2,4 мкМ, 28 мкМ) в 1 мл Трис-буфера (50 мМ, pH 7,4) с последующим добавлением везикулы (1мМ). Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре FL920 (Edinburgh

Instruments, Livingston, UK) с использованием возбуждения 470 нм и излучения ~ 505 нм.

Также, флуоресценцию куркумина измеряли в раковых клетках простаты Du145, PC3 с разными концентрациями куркумина и в течение 5 минут, 1 часа и после 5 часов воздействия.

Передача энергии резонанса Фёрстера. Перед сушкой, липидные везикулы дополнительно дополняли N-Rh-PE при молярном соотношении 500: 1 (фосфолипид: N-Rh-PE). Затем куркумин добавляли к везикулам с N-Rh-PE в разных концентрациях (0,8-2,4 мкМ). Спектры флуоресцентной эмиссии были получены в диапазоне 490-700 нм при возбуждении 470 нм с использованием спектрофлуориметра FL920.

Электронный спиновой резонанс (ЭСР). Образцы для экспериментов с электронным спин-резонансом были получены с использованием следующих спиновых зондов: N-Tempoyl Palmitamide (N-TEMPO) и 10-доксил-нонадекан. Спин-зонды добавляли к образцам пузырьков в молярном соотношении 500: 1 (фосфолипид: спиновый зонд). Конечная концентрация везикул составляла 10 мМ.

Образцы помещали в стеклянный капилляр длиной 20 мМ и внутренним диаметром 1 мМ, а спектры ЭСР регистрировали на спектрометре EPR-mini X-band (Спин, Россия) при комнатной температуре. Модуляция 20 G, постоянная времени 0,01 и уровень микроволновой мощности были выбраны при докритических значениях 20 мВт для достижения наилучшего отношения сигнал / шум.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Эксперименты по дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводились на микрокалориметре VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA, U.S.A.). Куркумин в разных концентрациях добавляли к многослойным дисперсиям, и сканирование нагрева регистрировалось со скоростью 60°C/ч. Для анализа данных использовалось программное обеспечение *Microcal Origin* 7.0. Контрольные измерения проводились в присутствии ДМСО при одинаковых объемах, используемых с куркумином.

2.2.5 Высокоточный респирометрический анализ

Клеточное дыхание анализировали с высокой разрешающей способностью респирометрии *Oroboros Oxygraph-2K* при 37°C (Инсбрук, Австрия) [270,p. 431; 271-273]. Программное обеспечение *OROBOROS DatLab* используется для сбора и анализ данных.

OROBOROS Oxygraph-2k - уникальный ультрасовременный инструмент для респирометрии высокого разрешения, в котором учитывается высокое разрешение:

- с небольшим количеством клеток или ткани,
- при низких респираторных действиях,

- множественные титрования субстрата-разъединителя (протоколы SUIT) с разрешением изменения потока кислорода в течение продолжительных периодов инкубации,

- гибкость приложений O2k-MultiSensor,

- быстрых переходов при низких уровнях кислорода

- стабильности и контроля качества

Клетки в количестве должны составлять не менее нескольких млн., собранные центрифугированием, промываются и ресуспендируются в модифицированном буфере Кребса (содержащем 137 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 20 мМ MOPS, pH 7.4; 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ KH_2PO_4, 2мМ $CaCl_2$). Частота дыхания показана одним миллионом клеток в секунду. Как только клеточное дыхание стабилизируется, к клеткам добавляли полифенолы природного происхождения куркумин 7 мкМ, затем карназоловая кислота 5 мкМ. Влияния полифенолов в комбинации на дыхание клеток исследованы в пяти независимых экспериментах.

После стабилизации сигнала к клеткам добавляли 2 мг/мл олигомицина для ингибирования АТФ. После олигомицина клеточное дыхание ингибируется и к клеткам добавляются 20 или 40 нмоль раствора карбонилцианид 4- (трифторметокси) фенилгидразон (FCCP), который не вызывает деполяризацию мембраны и активирует потребление кислорода. до максимально уровня. Скорости дыхания выражались в моль на миллион клеток в секунду. Таким образом, респирометрия высокого разрешения обеспечивает основу для сравнительной физиологии митохондрий, биомедицинские исследования, применения в клинических исследованиях, также установление количественной функциональной митохондриальной диагностики.

2.2.6 Оценка мембранного потенциала митохондрии

Клетки сажали на шести луночные планшеты. После 48 часов инкубации клетки собираются. Центрифугируются 2000 оборотов в течение 5 минут. Затем окрашиваются с краской *MitoRed*. Затем инкубируются в течении 20 мин в 37°C. Центрифугируются 2000 оборотов в течении 5 минут. Клетки ($0.2x10^6$ клетки) были загружены с 75 нмоль *MitoRed* (Ex/Em длина волн 622/648 нм) (PromoCell GmbH, Heidelberg, Германия), чувствительных к митохондрии мембранного потенциала. Клеткам добавляются PBS без добавления Ca^{2+}/Mg^{2+} и полифенолы в разных концентрациях. Влияния полифенолов на мембранный потенциал митохондрии клеток исследованы в семи независимых экспериментах с 5-и образцами для каждой концентрации.

Мембранный потенциал митохондрии измеряли на BD Accuri потока C6 цитометра (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). Для позитивного контроля клетки обрабатывали 2 мкМ FCCP дозой, которая разобщает окислительное фосфорилирование митохондрий и приводит к коллапсу мембранного потенциала.

Проточные цитофлуориметры (цитометры) — высокопроизводительные системы анализа частиц (как правило, клеток) в потоке жидкости. Анализ частиц ведется с большой скоростью (до десятков тысяч в секунду), причем каждая частица анализируется отдельно. Метод проточной цитометрии позволяет получить качественные и количественные данные по анализируемым частицам за короткое время, данные статистический достоверны.

Также используются для широкого круга задач, связанных с анализом клеток, таких как подсчет клеток, иммунофенотипирование (в иммунологии, гематологии, онкологии, при культивировании клеток и пр.), клеточный цикл и пролиферация, клеточное здоровье и апоптоз, автофагия, клеточный сигналинг, токсикология, эффективность трансфекции и т.д.

Типичные объекты - клетки человека и животных, клетки растений и микроводоросли, дрожжи, бактерии, микрочастицы и экзосомы. Измерение проводилось сразу после добавления полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты отдельно и в комбинации, а также после 4, 24, 48 часов инкубации.

2.2.7 Определение клеточного цикла

Протокол анализа клеточного цикла с помощью проточной цитометрии путем окрашивания ДНК пропидием йодистым (PI)

- Реагенты:

70% этанол, йодистый пропидий (исходный раствор 50 мкг/мл), рибонуклеаза I (исходных раствор 100 мг/мл).

- Протокол:

1) Собрать клетки ($0.2x10^6$ клетки) в пробирку и промыть несколько раз в PBS без Ca^{2+}/Mg^{2+}.

2) Провести фиксацию клеток в холодном 70% этаноле: осадить клетки; удалить буфер; перемешивая клетки на вортексе, медленно добавлять этанол.

Таким образом происходит фиксация всех клеток и предотвращается образование слипшихся масс. Оставить фиксироваться клетки в этаноле на 30 мин при 4°C в темном месте.

3) Отмыть клетки от этанола в PBS (2 раза): центрифугировать клетки на скорости 850g, осторожно слить супернатант, избегая потери клеток, особенно после первой отмывки от этанола. Оставить часть клеток в качестве отрицательного контроля (неокрашенные клетки).

4) Обработать клетки рибонуклеазой I: добавить 50 мкл исходного раствора рибонуклеазы I (100 мг/мл). Это обеспечит связывание только ДНК с красителем, но не РНК.

5) Добавить 200 мл исходного раствора проподиум йодида (100 мг/мл).

- Анализ образца делали на проточном цитофлуориметре:

1) Настроить прибор с помощью неокрашенных клеток.

2) Найти исследуемый образец на гистограмме FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяния).

3) Отделить синглеты на гистограмме SSC-H (высота сигнала бокового светорассеяния) против SSC-W (ширина сигнала бокового светорассеяния).

4) Провести анализ фаз клеточного цикла на гистограммах FSC-A против PI; PI-W (ширина сигнала флуоресценции PI) против PI-A (площадь) сигнала флуоресценции PI); PI количества клеток.

Мембранный потенциал митохондрии возникает из-за присутствия различных ионных каналов/переносчиков с определенной ионной селективностью и проницаемостью.

Мембранный потенциал митохондрии является ключевым биофизическим сигналом в невозбудимых клетках, модулирующим важные клеточные активности, такие как пролиферация и дифференцировка клеток. Следовательно, множество различных ионных каналов/транспортеров, экспрессируемых в разных клетках, точно настраивается для регулирования.

Клетки инкубируются в течении 24 часов. После инкубации, клеткам меняют среду без добавления фетальной бычьей сыворотки и после чего инкубируют 24 часа. После инкубации добавляются полифенолы природного происхождения в комбинации и по отдельности куркумина и карназоловой кислоты в различных концентрациях во временеи 4-24 часов воздействия (рисунок 7).

Клетки собираются и центрифугируются (в течение 5 минут, 2000 оборотов). Подсчет клеток, 2 млн. клеткам добавляются 9 мл 70% этанола и оставляют клетки в морозильнике (-20-40°C) на ночь. Клетки суспензируются 0,1% тритоном. Раствор 1 мл PBS + 50мг/мл RNAsse + 0.1% тритона и инкубация в течение 30мин при комнатной температуре, клетки окрашиваются йодид проподиумом и инкубируются в течение 20 мин при комнатной температуре.

Клеточный цикл клеточных линии простаты определяли на проточном цитофлуориметре (Platereader Flowcytometer).

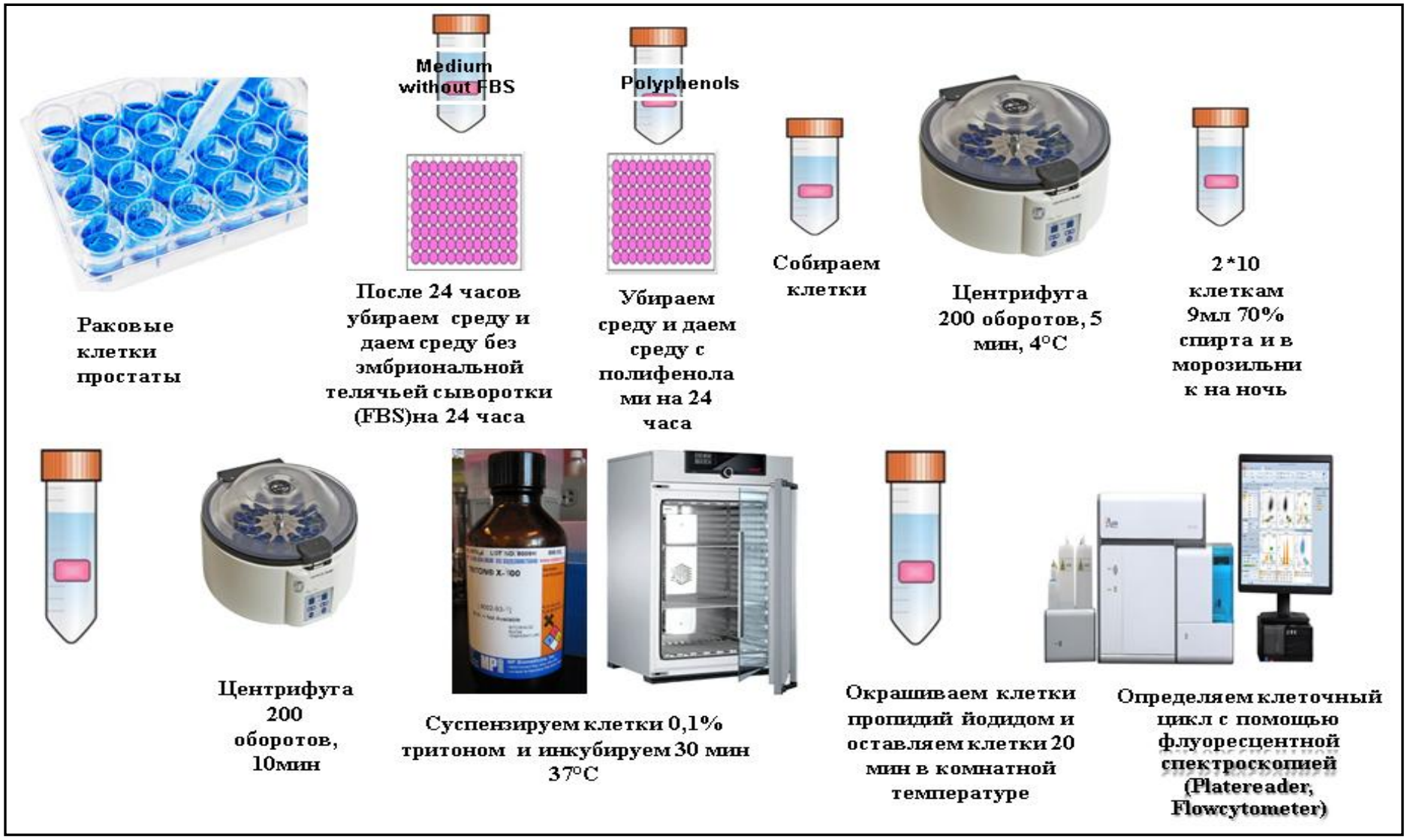


Рисунок 7 - Измерение клеточного цикла – метод проведения

Перед измерением проточной цитофлуометрии, клетки окрашиваются флуоресцентными красками, которые дают сигнал. Метод проточной флуоцитометрии позволяет измерять физические и химические параметры отдельных клеток или частиц. На основании регистрации флуоресценции и светорассеяния от отдельных клеток или частиц, проходящих через лазерный луч в струе жидкости.

2.2.8 Определение механизмов апоптоза

Апоптоз индукции в клетках проверяется с использованием набора апоптоз на основе аннексина V (Life Technologies, Grand Island, NY).

Клетки инкубируются в одинаковом количестве с разными концентрациями полифенолов природного происхождения и имеется контроль без добавления. Клетки после инкубационного периода промывают в холодном фосфатно-буферном солевом растворе (PBS). Приготовляется 1X аннексин-связывающий буфер. Также 100 мкг/мл рабочего раствора иодида проподиума (PI) путем разбавления 5 мкл 1 мг/мл исходного раствора PI (Компонент B) в 45 мкл 1X аннексина-связывающего буфера. Центрифугируют промытые клетки (со стадии 2), отбрасывают супернатант и ресуспендируют клетки 1X аннексин-связывающем буфере. Затем определяют плотность клеток и разводят в 1X аннексин-связывающем буфере до ~ 1 × 106клеток/мл, готовя достаточный объем, чтобы иметь 100 мкл на анализ, добавляется 5 мкл Alexa Fluor® 488 аннексин V (компонент A) и 1 мкл 100 мкг / мл рабочего раствора PI (приготовленного на стадии 4) для каждого 100 мкл клеточной суспензии. Инкубируется клетки при комнатной температуре в течение 15 минут. После инкубационного периода добавляется 400 мкл 1X аннексина-связывающего буфера, осторожно перемешивается и хранится образцы на льду. Анализ окрашенных клеток происходит с помощью проточной цитометрии на BD Accuri C6 проточного цитометра (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния), используя возбуждения и эмиссии длинах волн 488 и 525 нм, соответственно (рисунок 8).

Протокол цитофлуориметрического анализа апоптоза клеток с помощью AnnexinV-FITC/PI метода**:**

- Реагенты:

- Связывающий буфер (10 мМ HEPES/NaOH pH7.4, 140 мМ NaCl, 2.5 мМ $CaCl_2$),

- FITC-Annexin V,

- PI (исходный водный раствор 400 мг/мл йодистого пропидия, 4°C).

- Протокол:

1) Приготовить суспензию клеток с концентрацией 10^6/мл, отмыть в PBS 2 раза.

2) Осадить клетки центрифугированием, удалить буфер, ресуспензировать клетки в связывающем буфере.

3) Добавить конъюгат AnnexinV-FITC в конечной концентрации 1мг/мл клеточной суспензии. Инкубировать 10 мин. в темноте при комнатной температуре.

4) Добавить PI в конечной концентрации 2 мг/мл клеточной суспензии. Продолжить инкубацию еще 5 мин.

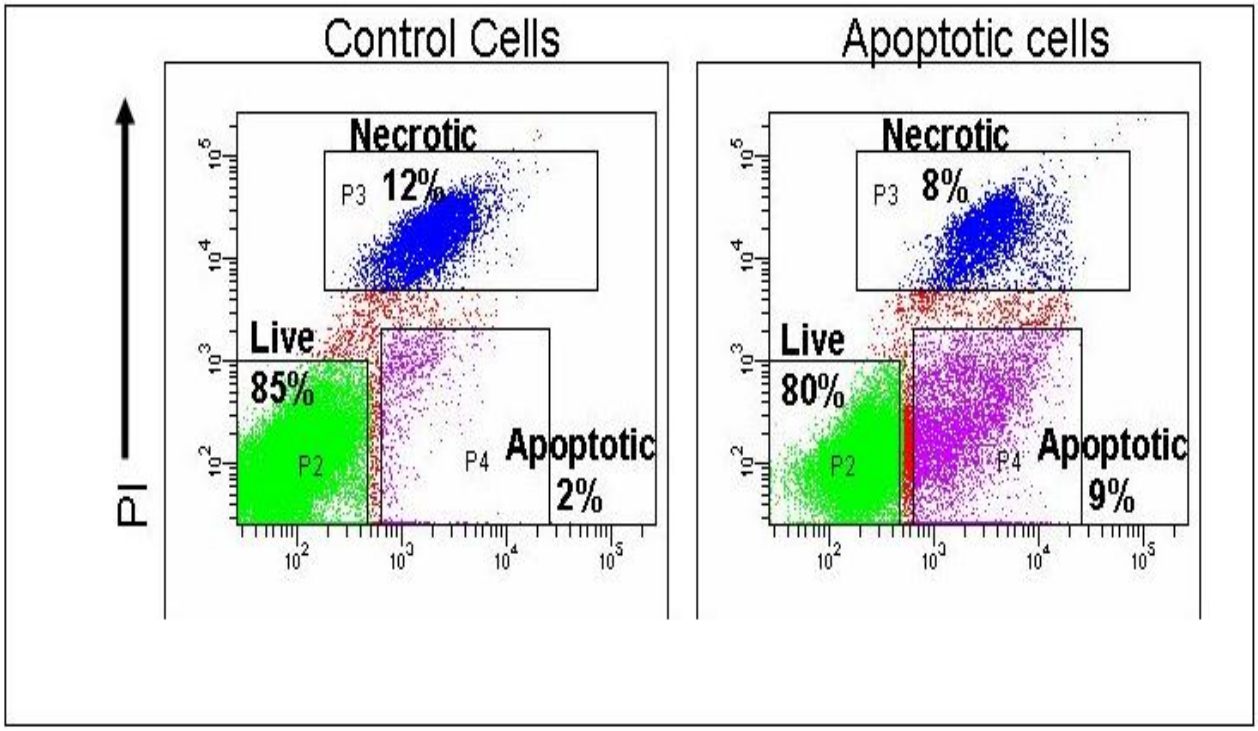


Рисунок 8 - Апоптоз при измерении – контроль и апоптоз

Для корректного анализа также необходимо приготовить контроли:

- отрицательный контроль для настройки прибора (неокрашенные клетки);
- клетки, окрашенные только конъюгатом *AnnexinV-FITC*, и клетки, окрашенные только PI, для настройки компенсации;
- в качестве положительного контроля можно провести окраску клеток без использования Ca^{2+}-содержащего буфера.

Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре:

1) Настроить прибор с помощью неокрашенных клеток, а также остальных контролей.

2) Найти исследуемый образец на гистограмме FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяния).

3) Отделить синглеты на гистограмме SSC-H (высота сигнала бокового светорассеяния) против SSC-W (ширина сигнала бокового светорассеяния).

4) На гистограмме FITC-A (площадь сигнала флуоресценции FITC) против PI-A (площадь сигнала флуоресценции PI) разделить клетки на 4 популяции и провести дальней анализ выделенных популяций (определить процентное содержание каждой популяции). При этом необходимо помнить, что в процессе пробоподготовки исследуемые клетки могут также уходить в апоптоз,

индуцированный сторонними воздействиями. Поэтому, после первичной (экспериментальной) индукции апоптоза, необходимо как можно скорее провести анализ клеток на проточном цитофлуориметре. Также необходимо учитывать, что начальные стадии апоптоза – обратимые, поэтому цитофлуориметрический анализ апоптоза клеток с помощью *Annexin*V-FITC/PI метода необходимо повторять несколько раз для получения достоверных воспроизводимых результатов.

2.2.9 Измерение окислительного стресса

Окислительный стресс – это процесс повреждения активными формами кислорода различных клеток и органов. Происходит образование АФК в системе, превышая способность системы их нейтрализовать. В результате недостатка системы антиоксидантной защиты, вызванного нарушениями продукции или распределения антиоксидантов или избытком АФК, может привести к дисбалансу.

Окислительный стресс производится путем обработки полифенолов природного происхождения и оценивали флуориметрическими окрасками с использованием как *CM-H2DCFDA* и *MitoSox*, перекись водорода и митохондрии генерируемые супероксид чувствительные красители. Клетки ($200x10^3$ клетки) окрашиваются 2 мкМ *CM-H_2DCFDA* (Ex / Em длины волн 495/527 нм) или 5 мкМ *MitoSox* и инкубируются в термошейкере 37^0C темном месте в течение 15 минут и загружаются в цитометрию (Ex / Em длины волн 510/570 нм) (Life Technologies, Grand Island, NY).

Изменение уровня H_2O_2 или супероксид были исследованы на BD Accuri потока C6 цитометра (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). Для положительных контрольных клеток заражали 1 мкг/мл ротеноном, 500 мкМ малоната и 2,5 мкм антимицина, ингибиторы дыхательных комплексов I, II и III/IV, соответственно. Окислительный стресс клеток исследованы в семи независимых экспериментах с 5-и образцами для каждой концентрации

2.3 Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с помощью программы *GraphPad Prism* версию 5.03 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, США). Результаты представлены как среднее значение (±SEM) по меньшей мере, в трех независимых экспериментах. Статистически значимые различия между данными оценивали с помощью *t*-теста *Стьюдента*. Различия считались значимыми при $p \leq 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние куркумина и карназоловой кислоты на раковые и нормальные клетки простаты и определение их цитотоксичности

Были проведены исследования воздействия куркумина и карназоловой кислоты (отдельно и в комбинации) на раковые и интактные клетки простаты. При определении цитотоксичности воздействия полифенолов природного происхождения использовались разные концентрации куркумина (Кур) (0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7; 10 мкМ) и карназоловой кислоты (СА) (0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7; 10 мкМ), которые растворялись в диметилсульфоксид.

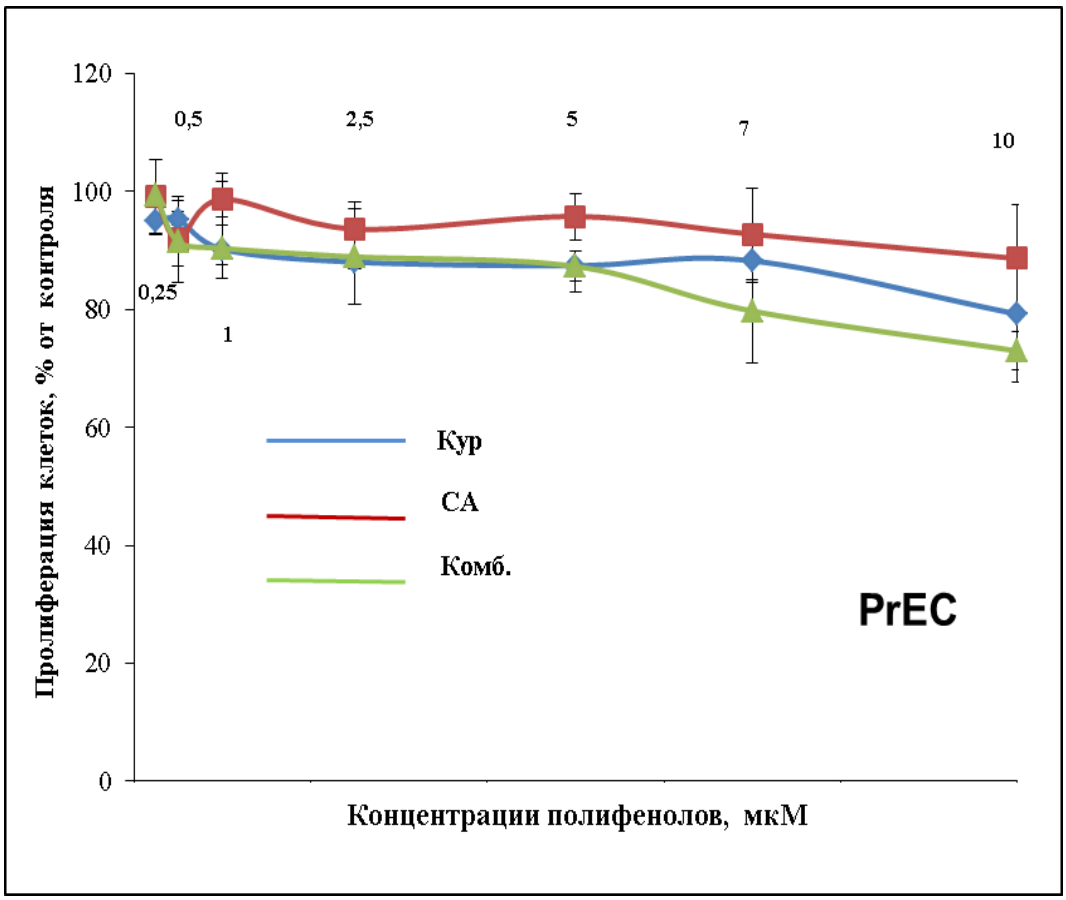
Воздействие полифенольных соединений изучалось на клеточных линиях простаты (клетки рака простаты метастазирующие в костную ткань - PC3, клетки рака простаты метастазирующие в мозг - Du145 и условно здоровые эпителиальные клетки простаты PrEC).

Деление клеток рака простаты Du145 и PC3 происходит с периодичностью каждые 4 часа, они достаточно устойчивы к контаминации. Интактные клетки простаты PrEC растут медленнее – их деление происходит с периодичностью один раз в 24 часа (культуральную среду меняют каждые 48 часов). К тому же интактные клетки простаты очень чувствительны к контаминации. Поэтому, действие полифенольных соединений исследовалось во времени: через 4, 24, 48 часов.

Для определения цитотоксичности и оптимальных доз полифенолов природного происхождения на воздействие клеточных линии простаты, клетки помещали в 96-ти луночные планшеты в одинаковом количестве (по 5000 клеток в лунку) и через сутки в них добавляли куркумин и карназоловую кислоту в различных концентрациях.

Эксперимент проводили в трех повторностях, для каждой повторности был свой контроль. О цитотоксичности судили по проценту выживших клеток от контроля в зависимости от концентрации воздействующих полифенолов. Контролем служили те же клетки различных линий без воздействия полифенолов, контроль принимался при этом за 100%. Выжившие клетки определялись по окраске аламар синим, являющимся индикатором метаболически живых клеток.

На рисунке 9 отражено количество (%) оставшихся в живых клеток после 24 часов воздействия полифенолов на интактные клетки простаты PrEC.



Кур – куркумин, СА – карназоловая кислота, Комб – комбинация куркумина 0,25 – 10 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ. По абциссе: среднестатистические значения показателя (± SEM) - % клеток, по ординате: концентрации полифенолов (мкМ). Уровень статистической значимости *p≤0,05

Рисунок 9 –Действие куркумина и карназоловой кислоты на интактные клетки простаты PrEC

Исходя из полученных данных, отраженных на рисунке 9, показано, что низкие концентрации (от 0,25 и 0,5 мкМ) куркумина и карназоловой кислоты не оказали существенного воздействия на пролиферацию клеток - значимых изменений не выявлено.

Воздействие карназоловой кислоты в концентрации 1 мкМ также находилось в пределах контроля (100%) – ингибирования клеток не наблюдалось. Воздействие куркумина в концентрациях 1 мкМ и 2,5 мкМ привело к ингибированию пролиферацию клеток PrEC до 5-10%. При воздействии карназоловой кислоты в концентрации 0,5-2,5 мкМ этот показатель был идентичным - ингибирование пролиферации клеток составляло в пределах 5-10%.

При воздействии СА в концентрации 5 мкМ и 7 мкМ на пролиферацию клеток, ингибирование было в пределах 5-9%, а при концентрации 10мкМ в пределах 12%. Эффект воздействия куркумина был значительнее, чем

карназоловой кислоты. После воздействия куркумина ингибирование клеток простаты PrEC наблюдалась уже в концентрациях 0,5-1 мкМ, рост клеток составлял 82-90%, при концентрациях 7 и 10 мкМ ингибирование пролиферации клеток составляло 12-17% ($p \leq 0,05$) от контроля.

При воздействии куркумина в концентрации 5 мкМ и в комбинации (Комб) куркумина (5 мкМ) и карназоловой кислоты (5 мкМ) результаты были идентичны. Однако, при комбинации куркумина и карназоловой кислоты в более высокой концентрации (7 мкМ и 5 мкМ, соответственно) ингибирование повысилось до 20%, а в дозах Кур 10 мкМ и СА 5 мкМ процент ингибирование составил 23% от контроля. Оказалось, что именно комбинаторное действие этих полифенолов дает более высокий эффект.

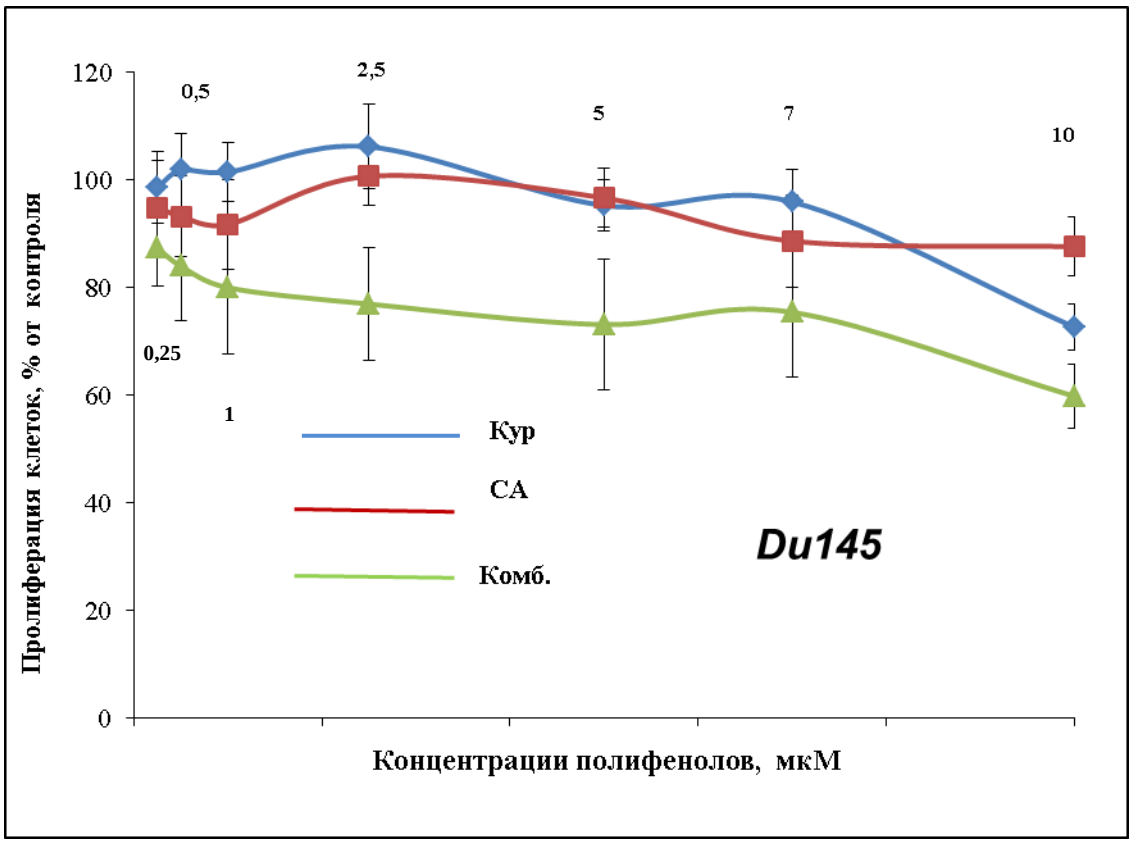
Таким образом, куркумин значительно эффективнее ингибирует рост клеток простаты PrEC в сравнении с действием карназоловой кислоты. Однако в комбинации этих двух полифенолов воздействие усиливается.

Также воздействие полифенольных соединений исследовались на раковые клетки простаты Du145. На рисунке 10 отражено количество (%) оставшихся клеток после 24 часов воздействия.

Как видно на рисунке 10, при воздействии полифенолов природного происхождения по отдельности куркумина и карназоловой кислоты сильных изменений в пролиферации клеток не выявлено, однако низкие концентрации не значительно стимулировали рост раковых клеток Du145. Например, куркумина в концентрации 0,25 до 5,0 мкМ не значительно стимулировал рост раковых клеток (различия не достоверны).

Воздействие карназоловой кислоты в концентрации 0,25-1 мкМ ингибировало рост раковых клеток простаты, в концентрации 1,0 мкМ - стимулировало пролиферацию клеток рака простаты Du145. Эффект ингибирования куркумина в концентрации 7 мкМ составлял 5-12%, а в концентрации 10 мкМ - до 20% ($p \leq 0,05$). Действие карназоловой кислоты на пролиферацию клеток в больших концентрациях (7 и 10 мкМ) было более ощутимым, ингибирование роста клеток составляло 25-28% ($p \leq 0,05$).

При воздействии куркумина (0,25 мкМ) и карназоловой кислоты (5 мкМ) в комбинации рост клеток составлял 87-88%.



Кур – куркумин, СА – карназоловая кислота, Комб – комбинация куркумина 0,25 – 10 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ. По абциссе: среднестатистические значения показателя (± SEM) - % клеток, по ординате: концентрации полифенолов (мкМ). Уровень статистической значимости *p≤0,05

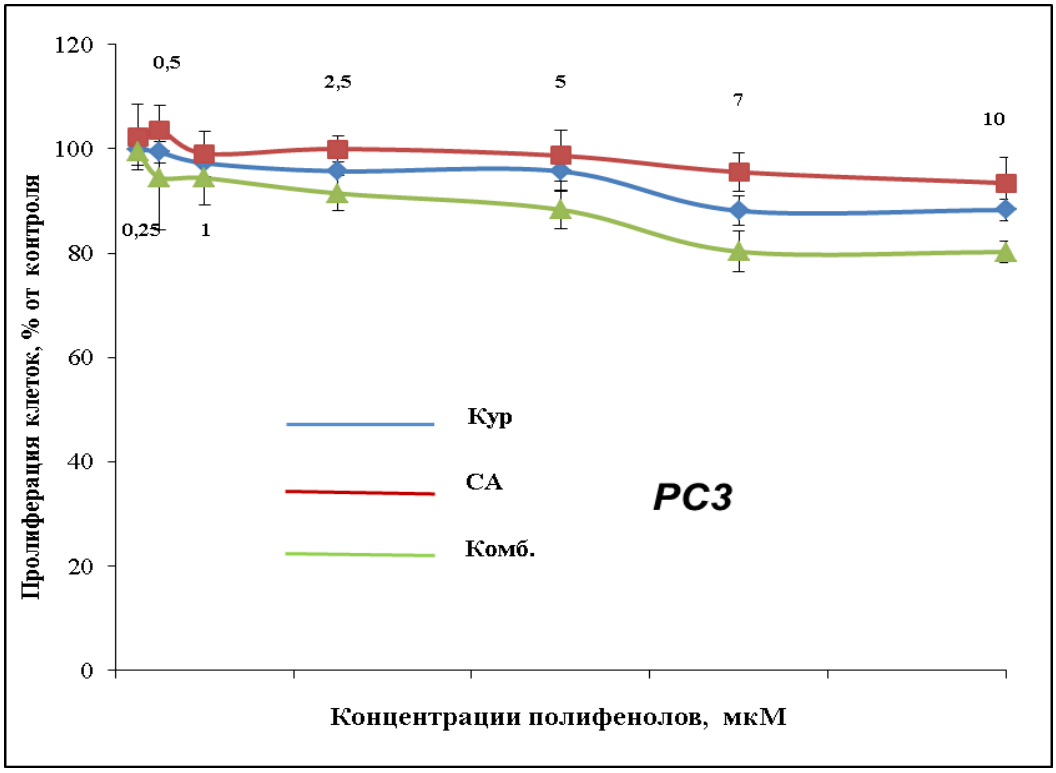
Рисунок 10 - Действие куркумина и карназоловой кислоты на раковые клетки простаты Du145 в течение 24 часов

При концентрациях куркумина 0,5-7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ рост клеток варьировал от 76-80%. Самый сильный эффект наблюдался при концентрациях куркумина 10 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ, ингибирование раковых клеток составило 24-29% (p≤0,05).

Таким образом, рост клеток варьировал в пределах 76-88%. При действии полифенолов по отдельности на раковые клетки Du145 особых изменений не наблюдалось. В комбинации эти полифенолы в высоких концентрациях (7-10 мкМ) ингибировали пролиферации клеток до 29%.

Также было выявлено действие полифенолов на раковые клетки PC3, метастазирующих в костях (рисунок 11). При воздействии куркумина и карназоловой кислоты на раковые клетки PC3 сильных изменений на пролиферацию клеток не было выявлено. Как видно на рисунке 13, карназоловая кислота при концентрациях 0,25 до 5 мкМ не оказывало действие на рост раковых клеток простаты PC3 – показатель был в пределах контроля. СА в концентрации 7 и 10 мкМ ингибировала рост клеток всего на 2-4%.

Действие куркумина было эффективнее в сравнении с карназоловой кислотой, эффект воздействия куркумина на рост клеток наблюдался уже в меньших концентрациях - 0,25-2,5 мкМ.



Кур – куркумин, СА – карназоловая кислота, Комб – комбинация куркумина 0,25 – 10 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ. По абциссе: средне - статистические значения показателя (± SEM) - % клеток, по ординате: концентрации (мкМ) полифенолов. Уровень статистической значимости *p≤0,05

Рисунок 11 - Действие куркумина и карназоловой кислоты на раковые клетки простаты PC3 в течение 24 часов

При концентрациях куркумина 0,25–5 мкМ рост клеток ингибировался на 5-7%, при 7 и 10 мкМ - на 8-11%. Сравнительное действие комбинации этих полифенолов в течение 24 часов показало значительные угнетение пролиферации раковых клеток. При концентрациях куркумина 0,25-5 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ, ингибирование клеток составляло 2-8%. В высоких концентрациях куркумина 7-10 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ в комбинации ингибировали рост раковых клеток PC3 до 16-17% (p≤0,05). При этом эффект был выше, чем воздействие этих полифенолов по отдельности. Многочисленные исследования, *in vitro* с использованием разнообразных культур опухолевых клеток, дали серьезные основания полагать, что полифенолы способны ингибировать этапы развития раковых клеток: ингибирование клеточной пролиферации [274-275]. Применение полифенолов в комбинации является более эффективной, рассматривались их

противоопухолевое действие на различные раковые клетки, а также ингибирующее действие их комбинаций на процесс пролиферации и индуцирование каспаза-зависимого апоптоза клеток острой миелоидной лейкемии [276].

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что полифенолы природного происхождения по отдельности действовали на пролиферацию клеток простаты менее эффективно, чем в комбинации, и их действие зависело от концентрации. Детальная оценка данных по ингибированию роста клеток PC3, Du145 и эпителиальные клетки PrEC выявила четкое синергическое взаимодействие между куркумином и карназоловой кислотой, которое было особенно сильным при концентрации куркумина 7 мкМ в сочетании с карназоловой кислоты 5 мкМ.

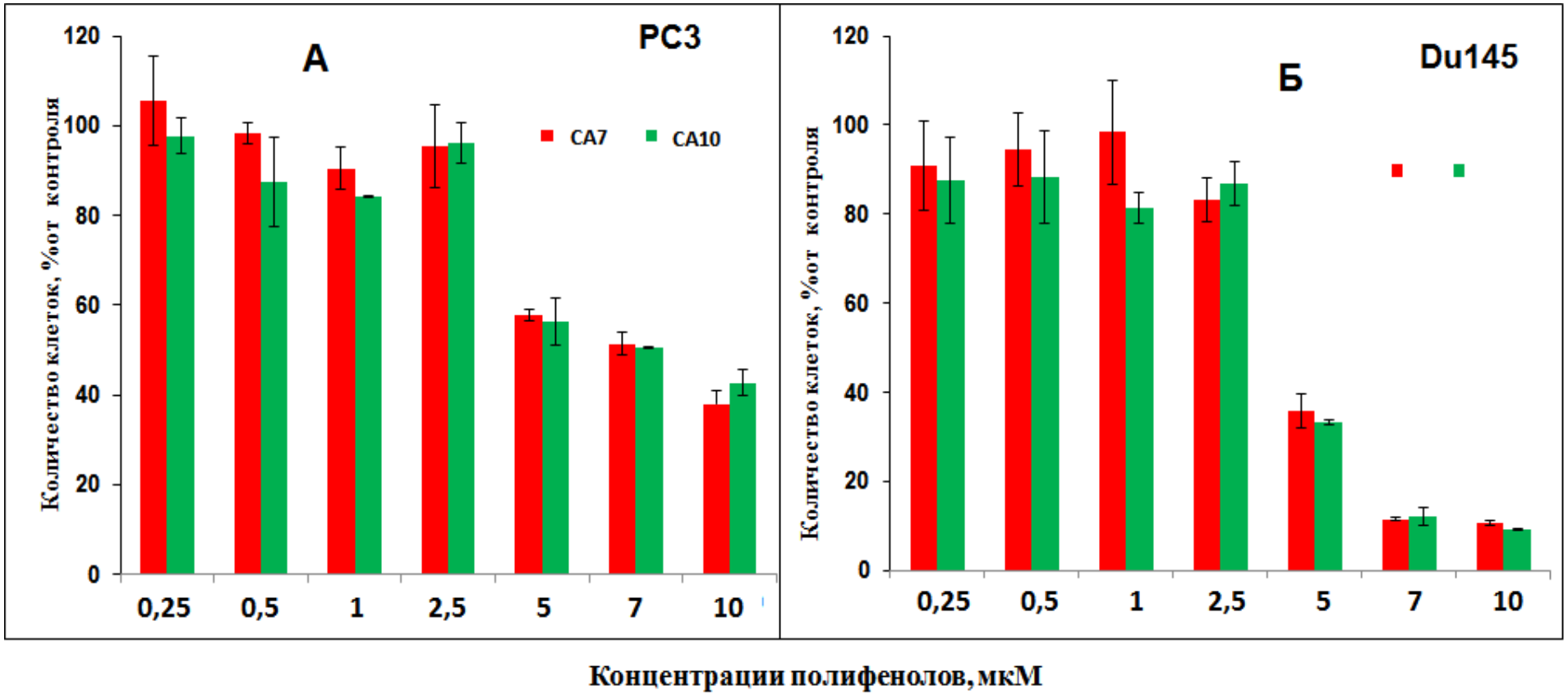
3.2 Определение синергетической эффективности куркумина и карназоловой кислоты на пролиферацию раковых и нормальных клеток простаты

Сочетанное действия полифенольных соединений на пролиферацию клеток определяли на 2 видах раковых клетках простаты Du145 и PC3 и нормальных эпителиальных клетках простаты PrEC с применением красителей аламар синем (являющимся индикатором метаболически живых клеток) и кристаллическим фиолетовым (являющимся индикатором количественно живых клеток).

Определяли сравнительное действие куркумина и карназоловой кислоты с разными концентрациями и в их комбинации. Концентрация карназоловой кислоты составила 5 и 10 мкМ, а концентрация куркумина начиналась от 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7 до 10 мкМ.

На рисунке 12А, результаты действия куркумина и карназоловой кислоты при различных концентрациях на раковые клетки простаты PC3 в течение 48 часов. На рисунке 12Б, результаты действия куркумина и карназоловой кислоты при различных концентрациях на раковые клетки простаты Du145 в течение 48 часов. Значения достоверности этих данных составило $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,003$.

В первой графе на рисунке 12А, при воздействии концентрации куркумина 0,25-2,5мкМ и карназоловой кислоты 7-10 мкМ показывает небольшой эффект на рост раковых клеток PC3. Во втором графике можно наблюдать похожую ситуацию, здесь действия полифенолов куркумина 0,5-2,5 мкМ и карназоловой кислоты 7-10 мкМ останавливает рост раковых клеток Du145 на 10-13%.



Данные значения среднестатистические (± SEM). Кур – куркумин, СА – карназоловая кислота, Комб. – комбинация куркумина. Статистические значения *p≤0,05 и **p≤0,003. А: PC3 - обработка 48 ч, куркумин 0,25 - 10 мкМ + карназоловая кислота 7-10 мкМ комбинация. Б: Du145 - обработка 48 ч, куркумин 0,25 - 10 мкМ + СА 5-10 мкМ комбинация

Рисунок 12 – Влияние куркумина и карназоловой кислоты при комбинации различных концентрациях на раковые клетки простаты PC3 и Du145

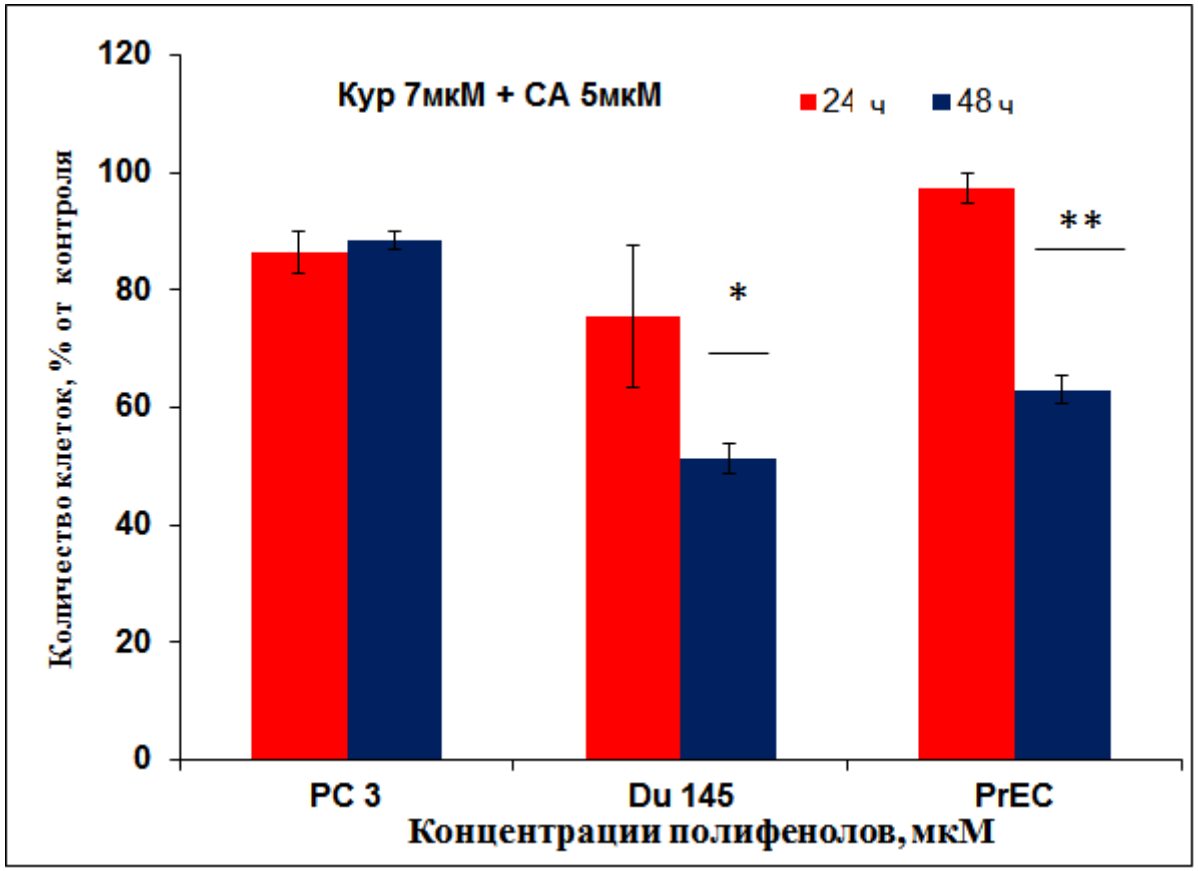
Эффект ингибирования раковых клеток простаты наблюдался при концентрации выше куркумина 5 мкМ и карназоловой кислоты 7-10 мкМ. Концентрация куркумина: 5 мкМ и карназоловой кислоты 7-10 мкМ останавливало рост раковых клеток PC3 в пределах 30-40% после 48 часов воздействия, эти же концентрации в раковых клетках Du145 останавливало до 55-60%.

В раковых клетках линии PC3 высокое ингибирование наблюдалось при концентрации куркумина 7-10 мкМ и карназоловой кислоты 5-10 мкМ в комбинации, рост раковых клеток составил 40-46% после 48 часов воздействия. Сравнительно в раковых клетках линии Du145, высокое ингибирование наблюдалось при концентрации куркумина 7-10 мкМ и карназоловой кислоты 7-10 мкМ в комбинации, рост клеток составил после 48 часов воздействия всего 12-20% ($p \leq 0{,}003$).

Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод, что при воздействии куркумина в комбинации с карназоловой кислотой в концентрации 5-10 мкМ значительно ингибируется рост раковых клеток, в частности PC3 и Du145.

На рисунке 13, результаты метаболически живых клеток рака простаты Du145, PC3 и эпителиальных клеток простаты PrEC и их пролиферация и выживаемость после воздействия полифенолов в течении 24 и 48 часов. Определение цитотоксичности и оптимальных доз полифенолов по отдельности и в комбинации рассматривались в течении 24 часов. Как видно на рисунке 15 в комбинации 0,25 мкМ куркумина и карназоловой кислоты 5 мкМ рост клеток варьировался в 83-85% ($p \leq 0{,}05$). Дозы куркумина 0,5 мкМ дал скачок роста раковых клеток простаты. Карназоловая кислота в концентрации 1 мкМ сильных изменений не показала. В комбинации это доза с куркумином могла остановить рост раковых клеток на 80-82%. Дозы куркумина и карназоловой кислоты 2,5 – 5 мкМ была в 100% - нормы. В комбинации этих полифенолов 2 мкМ рост клеток составил 80%, а в дозах 5 мкМ рост клеток составил 75-80%. Концентрация куркумина 7 мкМ остановил рост клеток на 88-90%, а 10 мкМ концентрация показало около 85%. Концентрации карназоловой кислоты 5 и 10 мкМ никаких особых изменений в росте клеток не показал. Комбинация полифенолов дозах 7 мкМ показал рост клеток после 24 часов действия 75-78%, а доза 10 мкМ 75%.

Концентрации полифенолов природного происхождения по отдельности показывает, что действия куркумина значительно останавливает рост раковых клеток, сравнительно в отношении карназола таких же концентрациях. На рисунке 15 можно увидеть, что комбинация полифенолов в концентрациях 5 и 7 мкМ рост клеток остановливало до 80%. А концентрациях 10 мкМ остановка клеток составило 60% после 24 часов действия полифенолов.



Данные значения среднестатистические (± SEM). Кур – куркумин, СА – карназоловая кислота
Статистические значения * p≤ 0,05; ** p≤0,003

Рисунок 13 - Комбинаторное действие полифенолов куркумина и карназоловой кислоты на раковые клетки простаты Du145, PC3 и эпителиальные клетки простаты PrEC

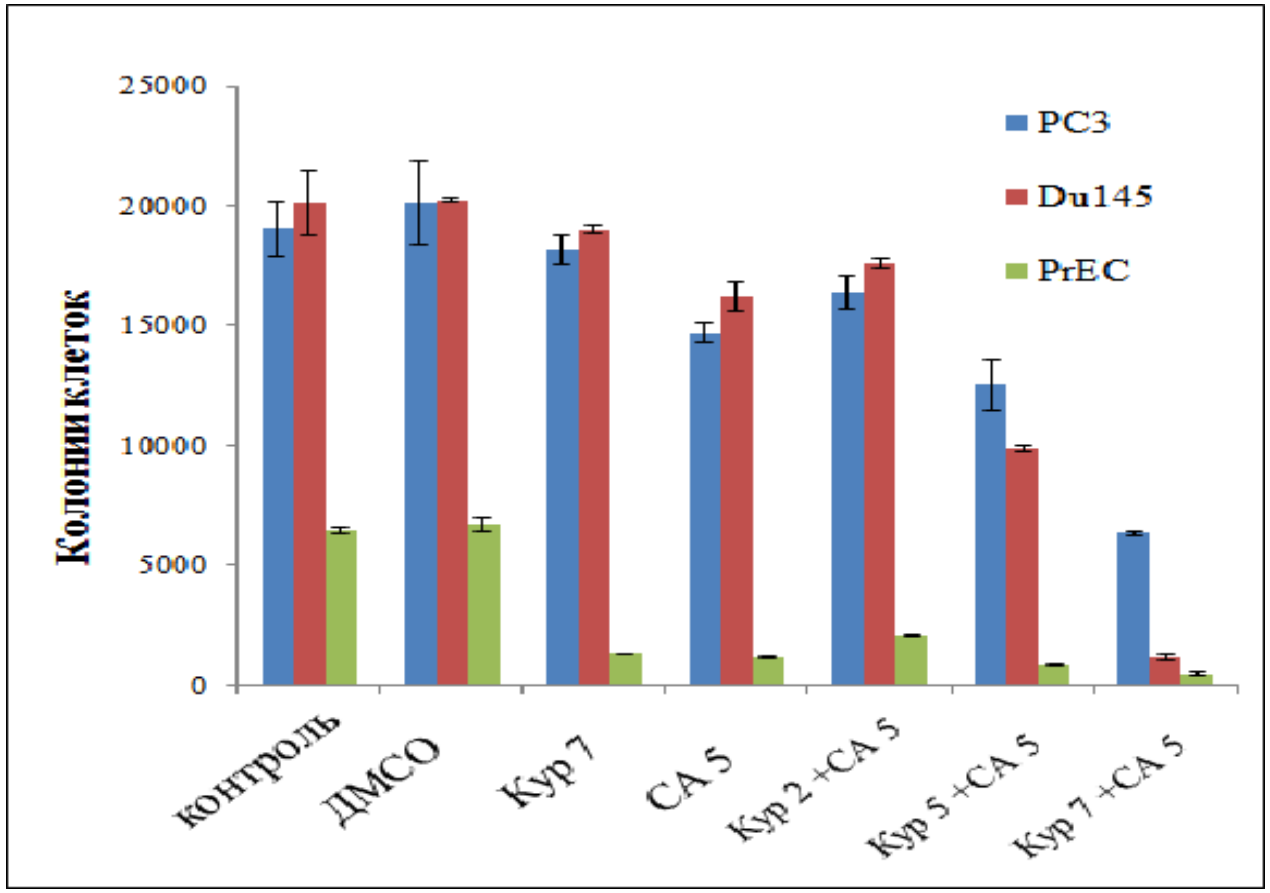
Как видно по клеткам более агрессивных раковых клеток PC3, после действия 24 и 48 часов особого отличия не было. Это свидетельствует, что раковые клетки PC3, более агрессивные и устойчивы к полифенолам, но рост клеток по сравнению с нормальными клетками простаты, при воздействии 24 часов уменьшилось на 20%.

В клетках Du 145 эффект полифенолов были ярко выражены. Если при воздействии комбинации, после 24 часов число клеток составляло 80-100%, то после 48 часов он составлял 50-60% ($p \leq 0,05$). Это было очень хорошим показателем. В нормальных эпителиальных клетках простаты при воздействии 24 часов показатель если не менялся, то при воздействии 48 часов рост клеток составлял аналогично клеткам Du145.

Таким образом оптимальная доза концентрации комбинации полифенолов составляло куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ. Цитотоксичная концентрация составила 10 мкМ куркумина и карназоловой кислоты 10 мкМ в комбинации, так как рост раковых клеток составлял меньше 50% после 24 часов воздействия. Также разные концентрации воздействовали и на колонии нормальных и раковых клеток простаты (рисунок 14). Клетки были посажены в шести луночные планшеты в одинаковом количестве (20000 клеток в лунку). Каждый эксперимент (28 повторностей) состоял из контроля, ДМСО и различных концентрации полифенолов в отдельности и в комбинации.

Уровень образования колоний необработанными клетками рака предстательной железы был пропорционален агрессивному потенциалу конкретной клеточной линии. Высоко агрессивные клетки PC-3 продуцировали наибольшее количество колоний 190. Умеренно агрессивные клетки DU-145 продуцировали меньше колоний, 99 и минимально продуцировали наименьшее количество колоний 12 в интактных клетках простаты ($p \leq 0,05$). Куркумин и карназоловая кислота в концентрациях 7 мкМ и 5 мкМ значительно ингибировали колониеобразующие способности, как высоко агрессивных клеток PC-3, так и умеренно агрессивных клеток DU-145 по сравнению с уровнем ингибирования необработанных контрольных культур. Полученные данные позволяют утвердить, что полифенолы куркумин и карназоловая кислота в комбинации работают синергетиками. При комбинации куркумина и карназоловой кислоты 7 мкМ и 5 мкМ соответственно, они подавляют рост раковых клеток.

На рисунке 14, при воздействии в течении 7 дней обработанные полифенольными соединениями в отдельности и в комбинации у всех видах клеточных линии концентрация куркумин 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ приводило самому сильному ингибированию колонии клеток, что свидетельствует об их синергическом взаимодействии.



Данные значения среднестатистические (± SEM). Кур – куркумин, CA – карназоловая кислота, Комб. – комбинация куркумина. Статистические значения *p≤0,05; ***p≤0,001

Рисунок 14 - Действия концентрации полифенолов по отдельности и в комбинации на раковые клетки Du145, PC3 и интактные клетки PrEC простаты

Если по отдельности эффект ингибирование составлял в пределах 20-30%, то в комбинации ингибирование клеток составляло 50-80% в сравнении с контролем. Необработанные клетки PC-3 продуцировали 190 ±14 колоний, а номера колоний подавлялись до 114 ±20 ($p \leq 0,05$) и 59 ±13 ($p \leq 0,001$) с 7 и 5 мкМ куркумина и карнозоловой кислоты соответственно. Необработанные клетки DU-145 продуцировали 995 колоний, а номера колоний были подавлены до 64 ±11 ($p \leq 0,001$) и 72 ($p \leq 0,001$) с куркумином и карнозоловой кислоты 7 и 5 мкМ соответственно. Более низкие концентрации полифенолов куркумина и карнозоловой кислоты (от 2 до 5 мкМ) не оказали существенного влияния на колониеобразующие способности любой из клеточных линий.

Как видно на рисунке 14, в меньших концентрациях куркумина 0,25- до 2 мкМ в комбинации карназоловой кислоты 5 мкМ сильных отличий не выявило в росте интактных клеток простаты PrEC в течении 24 часов воздействия. В комбинации куркумина 2 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ количественно уменьшались рост эпителиальных клеток простаты на 5-10%. Контроль клетки, в разных линиях клеток простаты были идентичны в сравнении с ДМСО. Показатели ДМСО варьировались в пределах нормы.

Карназоловая кислота в течении 7 дней воздействия, показала, на раковые клетки простаты влияние было меньшей степени, а на интактные клетки он действовал, как ингибитор.

Концентрация куркумина 7 мкМ уменьшала рост всех видов клеточных линий в зависимости от времени воздействия. Комбинация куркумина 5 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ уменьшала рост раковых клеток в пределах на 34-40%, статистически они были достоверны ($p \leq 0,05$). Концентрация куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 10 мкМ воздействовали на все виды клеточных линий эффективно, останавливая рост клеток до 60-70% ($p \leq 0,001$).

Все полученные результаты по определению пролиферации клеток простаты после 7 дней воздействия полифенолов в отдельности и в комбинации на колонии клеток были сфотографированы на специальном микроскопе.

Данные по интактным клеткам простаты PrEC (рисунок 15) и раковым клеткам простаты Du145 (рисунок 16), PC3 (рисунок 17) показаны в концентрациях куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ по отдельности и с меньшей концентрации комбинации этих полифенолов. Колонии были считаны специальной программой Image J.

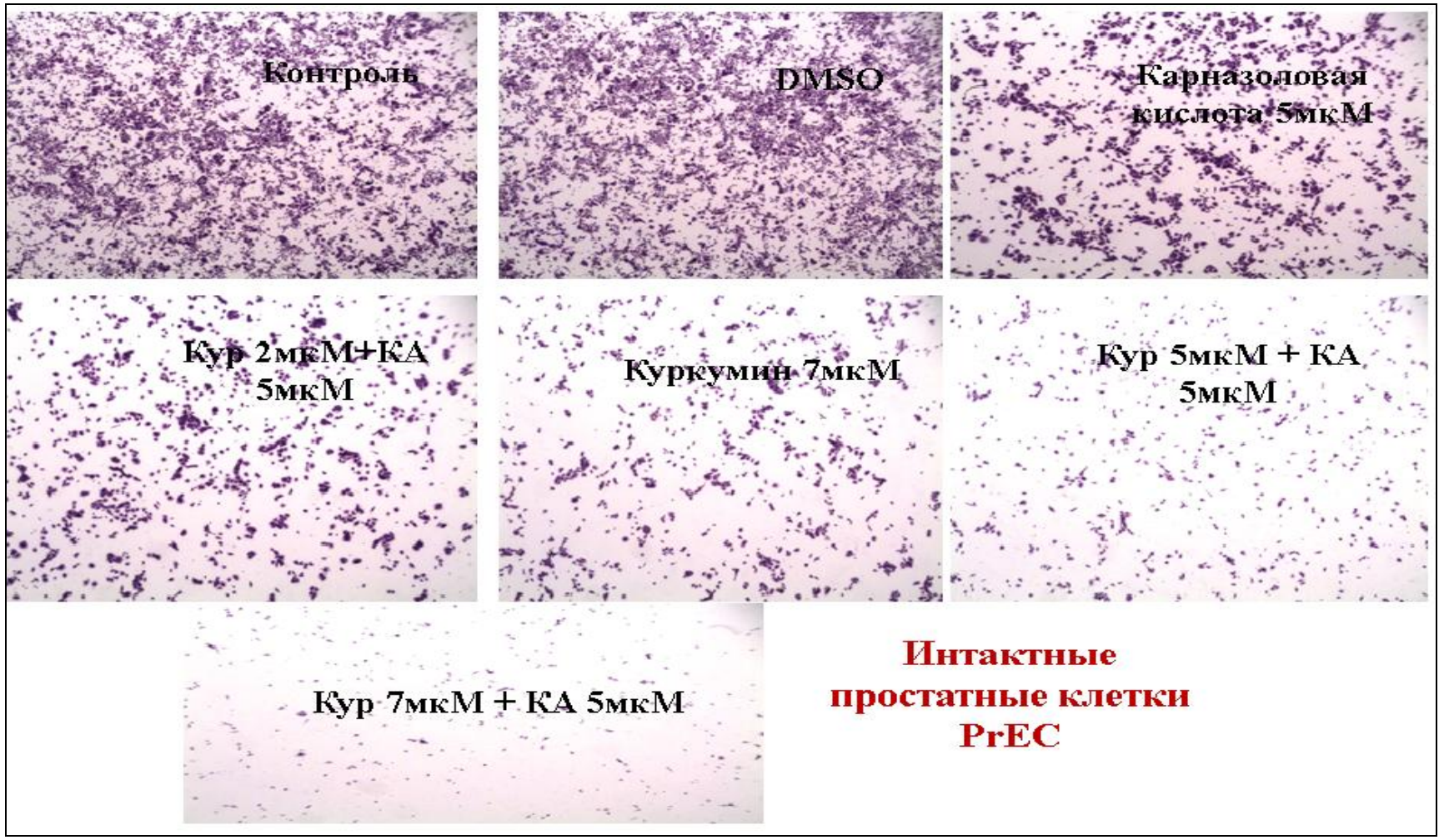


Рисунок 15 - Действия разных концентраций полифенолов на колонию клеток простаты PrEC

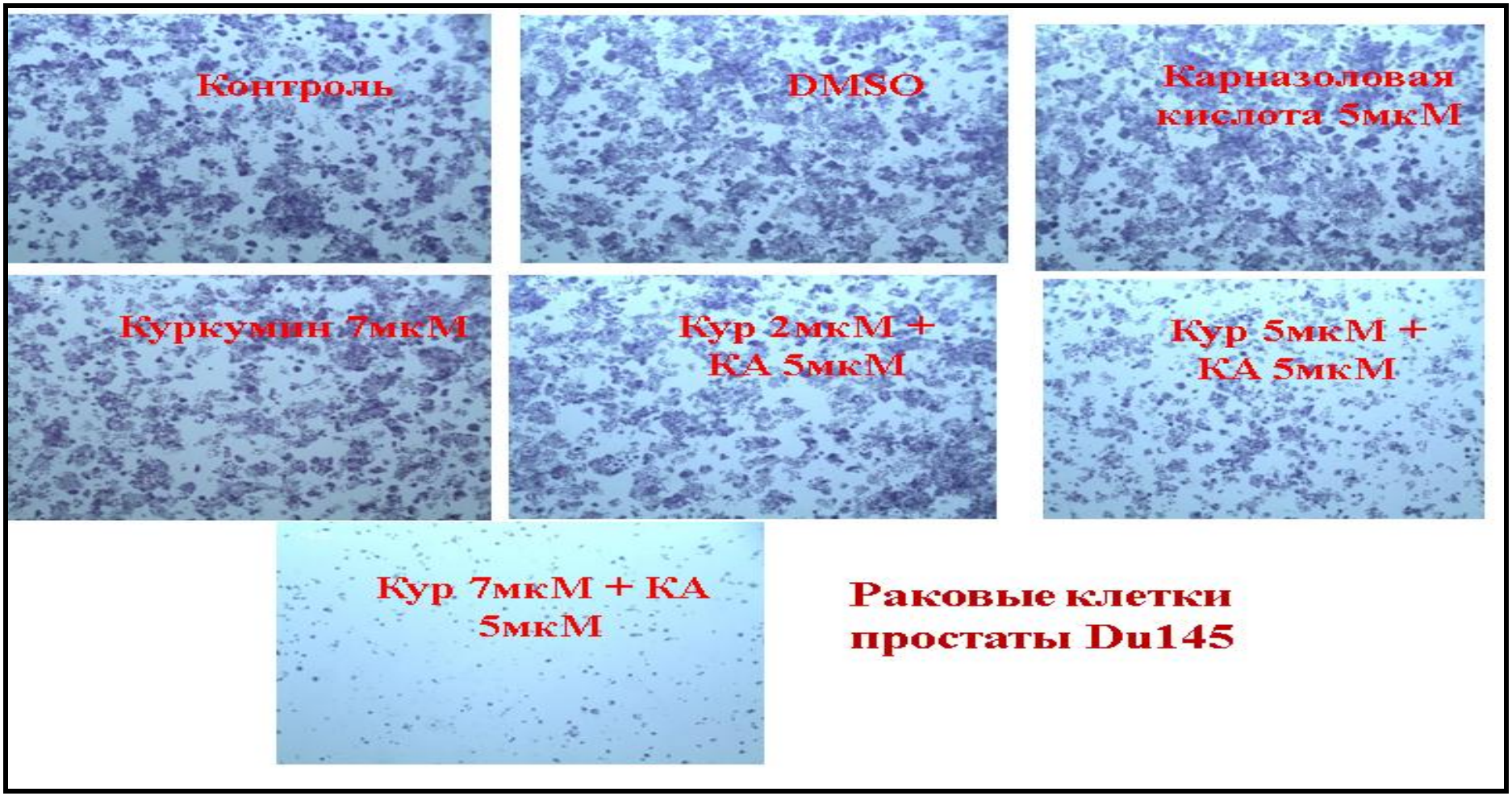


Рисунок 16 - Действия разных концентраций полифенолов на колонию раковых клеток простаты Du145

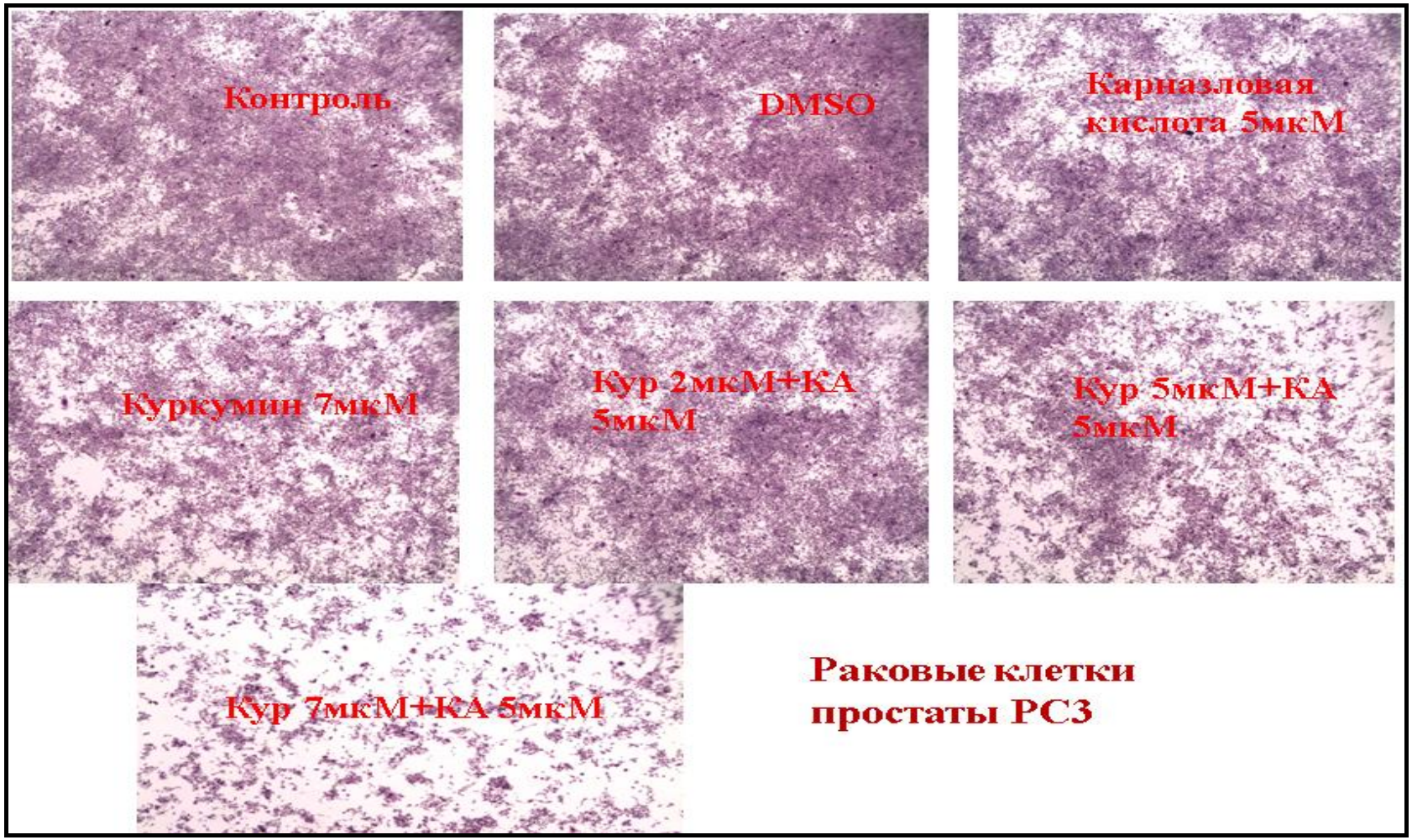


Рисунок 17 - Действия разных концентраций полифенолов на колонию раковых клеток простаты PC3

Как видно на рисунке 15, были взяты разные концентрации куркумина и карназоловой кислоты в отдельности и в комбинации в сравнении с контролем. В интактных клетках простаты PrEC, карназоловая кислота в отдельности при концентрации 5 мкМ в сравнении с контролем ингибировало колонии клеток простаты в пределах 20-40%. Похожая картина наблюдалась при концентрации куркумина 2 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ в комбинации. Концентрация куркумина 7 мкМ уменьшало рост колонии в пределах 40-50 %. Комбинация куркумина 5 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ ингибировало рост колонии в пределах 60-70%. Так как, концентрация куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ ингибировало рост колонии интактных клеток до 80-90%. Это связано с тем, что деление интактных клеток происходит только каждые 48 часов, так как, раковые клетки простаты делятся каждые 4 часа.

Также на рисунке 16, показаны воздействия полифенолов на колонию клеток Du145. Карназоловая кислота в отдельности при концентрации 5 мкМ в сравнении с контролем ингибировало колонии клеток простаты в пределах 20-30%. При концентрации куркумина 2 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ в комбинации. Концентрация куркумина 7 мкМ уменьшало рост колонии в пределах 30-50%. Комбинация куркумина 5 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ ингибировало рост колонии в пределах 60-70%. Концентрация куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ в комбинации ингибировало рост колонии интактных клеток до 85-95%.

На рисунке 17, были взяты разные концентрации куркумина и карназоловой кислоты в отдельности и в комбинации в сравнении с контролем. Действие карназоловой кислоты 5 мкМ в росте колонии не показало. Концентрация куркумина 7 мкМ рост колонии уменьшался в пределах 5-15 %. Похожая картина наблюдалась при концентрации куркумина 2 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ в комбинации. Комбинация куркумина 5 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ ингибировало рост колонии в пределах 30-40%. Так как концентрация куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ ингибировало рост колонии раковых клеток до 80-90%. Другие исследования также показали, что различные фитохимические вещества могут взаимодействовать в антипролиферативных и цитотоксических эффектах в раковых клетках [277]. Например, комбинации ресвератрола и эллаговой кислоты или кверцетина [278], а также галлата куркумина и эпигаллокатехина [279] вызывали усиление задержки роста и апоптоза в клетках лимфолейкоза. Аналогичные эффекты были зарегистрированы для куркумина и изофлавона в раковых клетках поджелудочной железы [280].

Из полученных данных можно заключить, что полифенолы в комбинации куркумина и карназоловой кислоты воздействуют как ингибиторы на пролиферацию клеток, останавливая рост раковых и интактных клеток простаты. Результат совместного действия куркумина и карназоловой кислоты выражен в синергическом эффекте.

3.3 Взаимодействия куркумина с мембранами

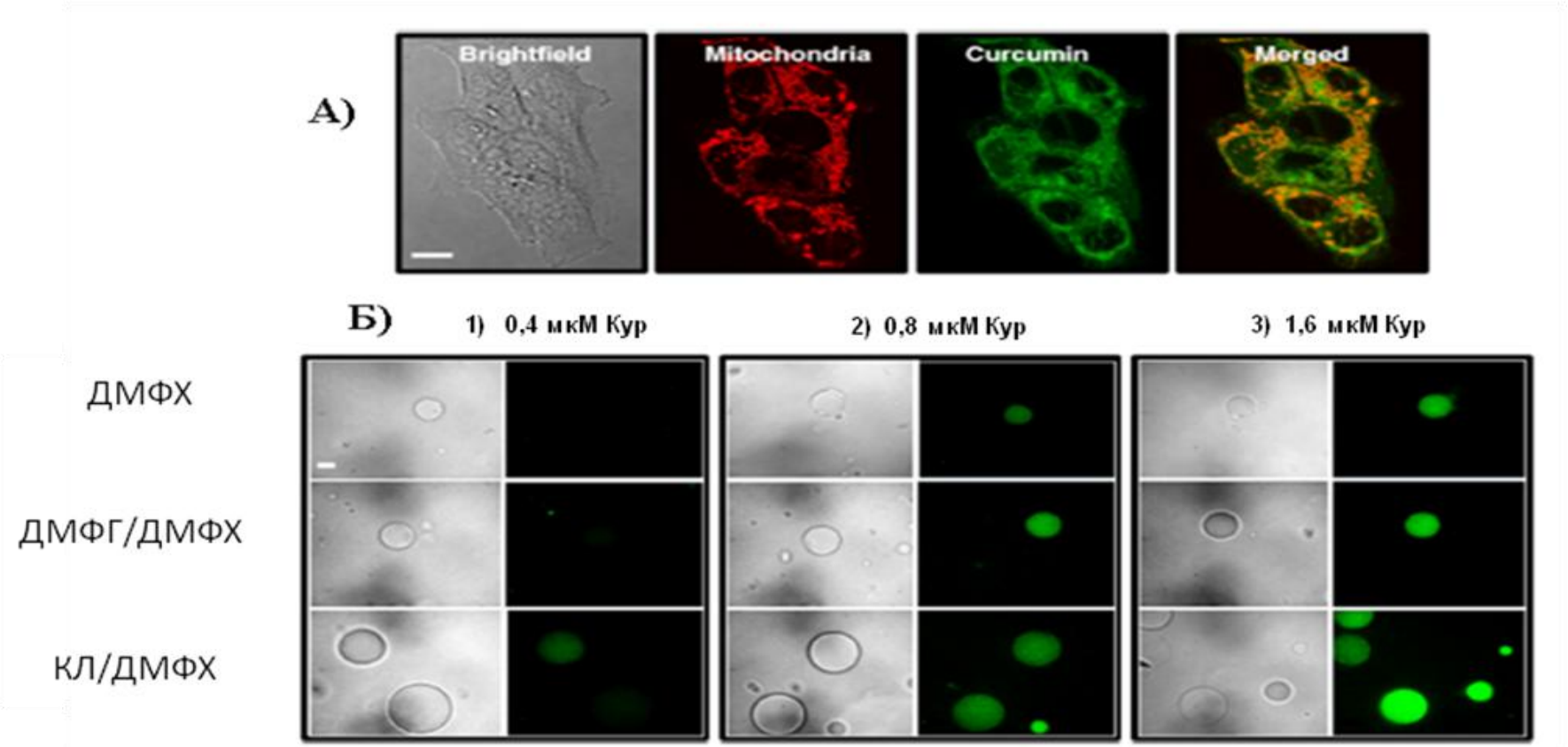
В данной работе мы изучали взаимодействие куркумина с биологическими и биомиметическими системами, имитирующее внутреннюю митохондриальную мембрану. В частности, эксперименты были разработаны для изучения роли кардиолипина при взаимодействии куркумина и встраивании в бислой, и сопутствующей куркумин-индуцированной модуляции свойств бислоя.

На рисунке 18А показаны изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии, зарегистрированные при инкубации куркумина с клетками HCT116. Эксперименты по флуоресцентной микроскопии были основаны на внутренней флуоресценции куркумина для контроля его относительной адсорбции на мембранах. Умеренная 7 микромолярная доза (рисунок 18А) куркумина была выбрана во всех клеточных оценках цитотоксичности куркумина, эта концентрация было высокой.

Примечательно, что внутриклеточное распределение куркумина, излучающее сильную зеленую флуоресценцию, которое дает сигнал от красителя, сильно коррелирует с окрашиванием митохондрий с использованием красителя *MitoTracker Orange*. Этот результат микроскопии показывает, что куркумин адсорбируется в значительной степени на митохондриальных мембранах (рисунок 18А) при введении в живые клетки и дает излучение в зеленый цвет.

На рисунке 18Б, в трех отведениях, контрастами серого и зеленого, исследуется связывание куркумина с биомиметическими гигантскими везикулами (ГВ), содержащими различные липидные композиции, предназначенные для имитации различных клеточных мембран.

Важно отметить, что на рисунке 18Б (1), при концентрации куркумина 0,4 мкМ показано преимущественное взаимодействие куркумина с бислоями везикул, содержащими кардиолипин. В то время как концентрационное-зависимое накопление куркумина происходило во всех используемых типах гигантских везикул, то есть в чистом (ДСГФ) (1,2-диолеоил-сн-глицеро-3-фосфохолине), смешанном 1,2-диолеоил-сн-глицеро- 3-фосфо- 1'-рац-глицерин и кардиолипин/ДСГФ - везикулы, в последних гигантских везикулах интенсивность флуоресценции была значительно увеличена, что указывает на большую интернализацию куркумина внутри кардиолипин содержащих мембран.



А) Визуализация клеток, окрашенных 70 нмоль митохондриального (MitoTracker) оранжевого красителя (длина волны Ex/Em 554/576 нмоль) с последующим добавлением 7 мкМ раствора куркумина (длина волны Ex/Em 488/520 нм). Б) Увеличение концентрации куркумина (0,4-1,6 мкМ) добавляли к ГВ разных составов: ДМФХ; ДМФГ/ДМФХ (10:90) и КЛ/ДМФХ (10:90). Шкалы соответствуют 10 мкМ

Рисунок 18 - Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток HCT116

Гигантские везикулы, используемые в конфокальных микроскопических экспериментах, включали ДСФГ в качестве объемного фосфолипида, поскольку он обеспечивал более высокий выход и стабильность везикул.

Сродство куркумина к кардиолипину. Для изучения двухслойной инерции куркумина и его зависимости от состава липидов мы контролировали интенсивность флуоресценции куркумина (пик возбуждения при 470 нм) при ассоциации с различными липидными мембранами.

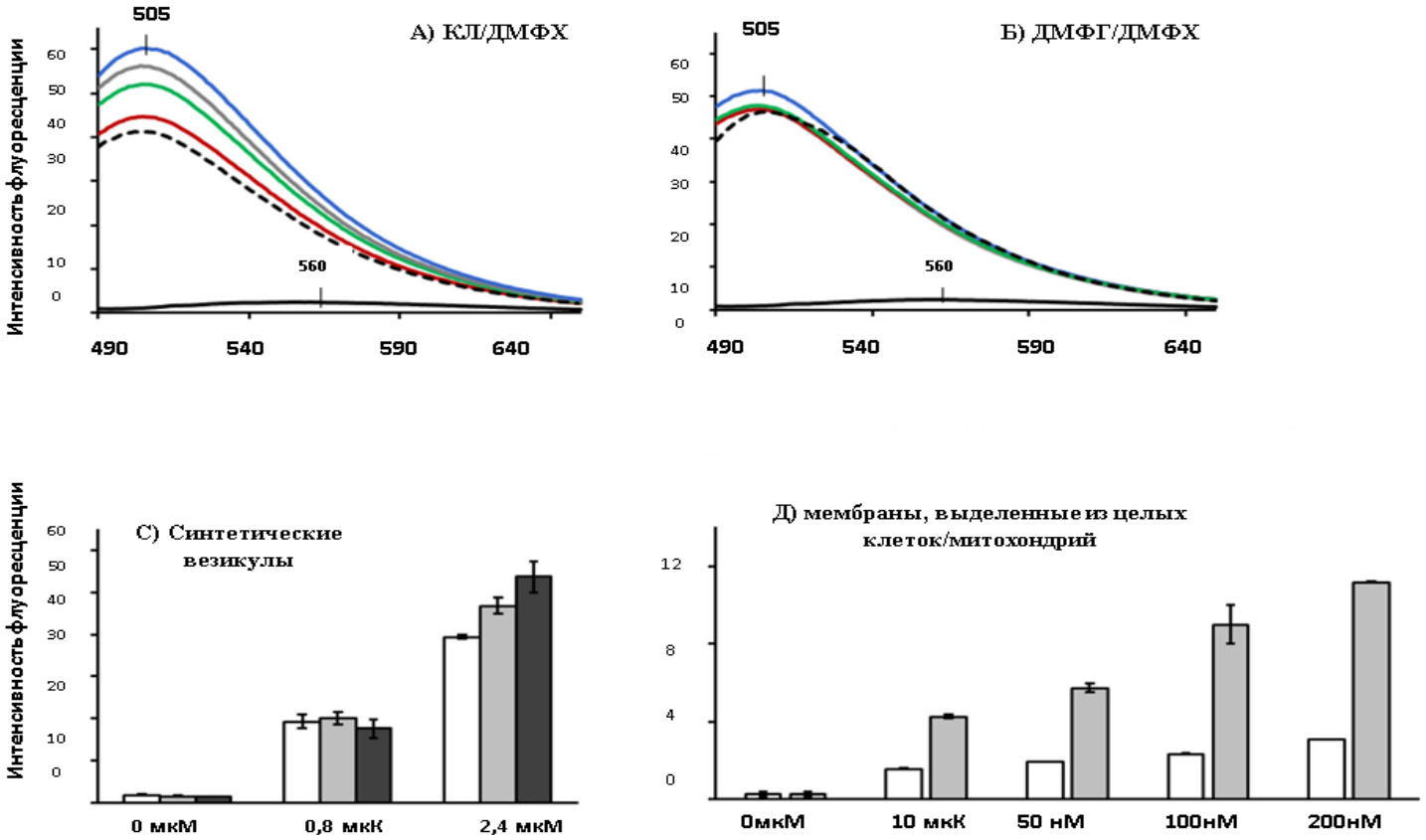
На рисунке 19 А-С показана степень ассоциации куркумина и введения в маленькие однослойные везикулы, включающие димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), обильный фосфолипид в клеточных мембранах и различные концентрации КЛ или димиристоилфосфатидилглицерин (ДМФГ) для учета вклада отрицательного заряда.

В частности, везикулы инкубировали с 28 мкМ куркумина, и его флуоресцентное излучение регистрировалось сразу же после добавления куркумина. Как показано на рисунке 19 А, Б (сплошная черная кривая), внутренняя флуоресценция куркумина (при максимуме интенсивности 560 нм) в буфере очень мала, что отражает полярную среду водного раствора [281].

Однако в присутствии везикул КЛ/ ДМФХ или ДМФГ/ДМФХ произошло значительное усиление флуоресценции, сопровождающееся синим сдвигом пика флуоресценции до 505 нмоль, что указывает на введение куркумина в гидрофобную среду бислоев [282].

Важно отметить, что наличие КЛ в двухслойном слое привело к более выраженной вставке куркумина, что отразилось на более высокой интенсивности флуоресценции пика при 505 нмоль (рисунок 19А). Эти данные согласуется с данными конфокальной микроскопии, показанными на рисунке 19, подчеркивая сродство куркумина к КЛ.

На рисунке 19С показано везикулярное включение куркумина в более низких концентрациях (0,8 мкМ и 2,4 мкМ соответственно), которые лучше отражают фактические терапевтические показатели и потенциальные системные концентрации этого полифенола [283], в везикулах ДМФХ, содержащих либо не ДМФГ, 2% ДМФГ (молярное соотношение 2:98), либо КЛ. Важно отметить, что содержание КЛ в последней композиции соответствует таковой внутренней мембраны митохондрий клеток млекопитающих [284]. Данные показывают, что при концентрации 2,4 мкМ, куркумин, по-видимому, гораздо более значителен в пределах КЛ-содержащих везикулярных бислоев по сравнению с другими тестируемыми везикулами, что приводит к большей интенсивности флуоресценции.



По абциссе: изменение флуоресценции, по ордината: концентрации мкМ дозах. Статистические значения *p≤0,05; ***p≤0,001

Рисунок 19 - Изменения флуоресценции куркумина при взаимодействии с различными липидными мембранами

Измерения флуоресценции в присутствии постоянной концентрации куркумина (28 мкМ) внутри биомиметическая везикула: А) везикулы КЛ/ДМФХ; Б) Везикулы ДМФГ/ДМФХ. Сплошная черная линия: буфер; штриховой черный: DMPC; красный: КЛ/ДМФХ (2:98) или ДМФГ/ДМФХ (2:98); зеленый: КЛ/ДМФХ (4:96) или ДМФГ/ДМФХ (4:96); серый: КЛ/ДМФХ (8:92) или ДМФГ/ДМФХ (8:92); синий: КЛ/ДМФХ (10:90) или ДМФГ/ДМФХ (10:90). С) Измерения флуоресценции с увеличением концентрации куркумина (обозначается по оси x).

Белые полосы: ДМФХ; серые полосы: ДМФГ/ДМФХ (2:98) и черные полосы: КЛ/ДМФХ (2:98). Д) Измерение флуоресценции различных концентраций куркумина (указано по оси x) в биологических мембранных системах. Белые полоски: нетронутая мембрана клеток HCT116; серые полосы: HCT116 - субмитохондриальных частицы. Возбуждение составляло 470 нм.

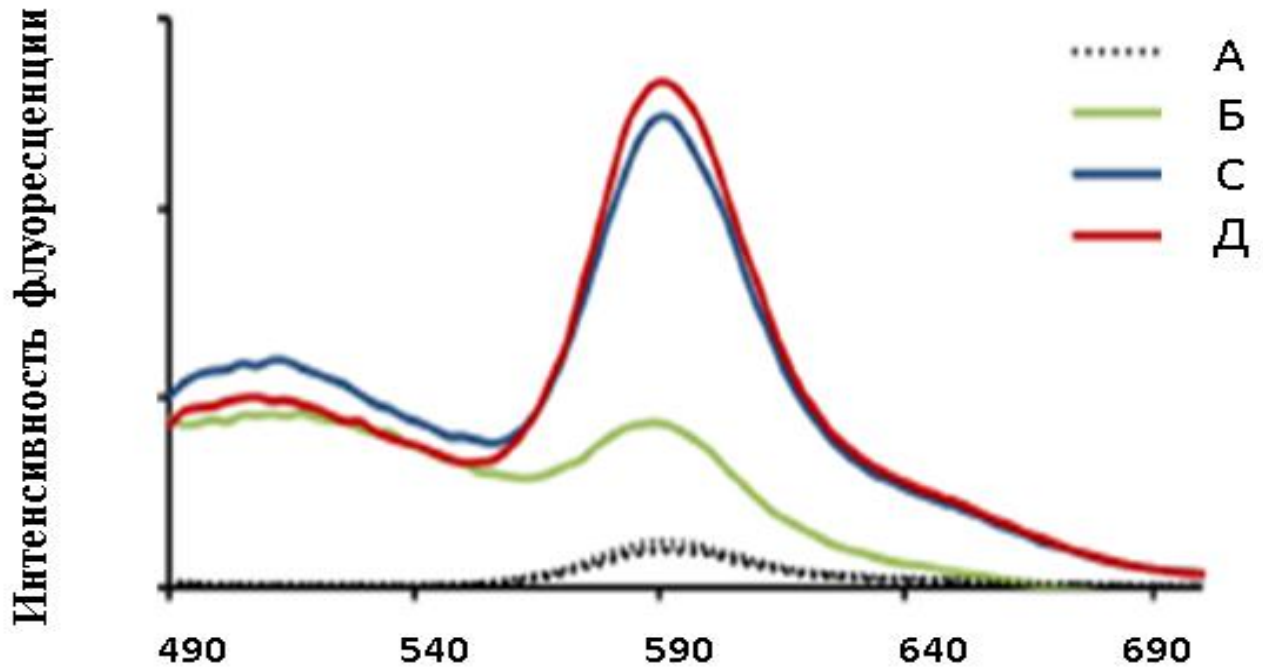
Мы также рассмотрели ассоциацию куркумина с двумя биологическими мембранными системами (рисунок 19Д) - неочищенные мембраны суспензии клеток HCT116 и субмитохондриальные частицы, полученные из митохондрий, выделенных из клеток рака толстой кишки HCT116.

Две мембранные системы были нормализованы в соответствии с общим содержанием белка. СМЧ строятся путем обработки ультразвуком и последующего повторного запечатывания, тем самым обнажая внутреннюю митохондриальную мембрану и встроенные респираторные белки. Анализ цитохрома с оксидазой подтвердил внутреннюю ориентацию мембранного бислоя в СМЧ (рисунок 19С – 0 мкМ).

Диаграмма на рисунке 19Д, где статистическое значение $p \leq 0{,}001$, показывает значительно более выраженную флуоресценцию куркумина при взаимодействии с СМЧ (серые полосы) и суспензией цельных клеточных мембран (белые полосы). Эта тенденция, очевидная во всех тестируемых концентрациях куркумина, согласуется с данными ГВ на рисунке 19 (A-C) и, вероятно, указывает на высокое сродство куркумина с кардиолипином в СМЧ.

Перенос энергии резонанса Фёрстера в липидных бислоях, вызванная куркумином. Преференциальная ассоциация куркумина в кардиолипин - содержащих бислоях была подтверждена в экспериментах по ферстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ) с использованием везикул, содержащих различные липидные композиции (рисунок 20).

Везикулы содержали флуоресцентный краситель 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3- фосфоэтаноламин-N- (лиссамин родамин B сульфонил) (N-Rh-PE), служащий в качестве акцептора флуоресценции, переносимой из куркумина, которая представляет собой донор флуоресценции, если она включена в бислой.



Спектры флуоресценции регистрировались при возбуждении при 470 нм (длина волны возбуждения куркумина). Флуоресценция N-Rh-PE при 590 нм была вызвана FRET из куркумина (2,4 мкМ). А) Контроль (только ДМФХ, добавление куркумина); Б) ДМФХ + куркумин; С) ДМФГ/ДМФХ (2:98) + куркумин; Д) КЛ/ДМФХ (2:98) + куркумин

Рисунок 20 - Спектры излучения флуоресценции N-Rh-PE, встроенные в разные везикулы

Важно отметить, что флуоресцентный остаток NRh- локализован в гидрофобном ядре бислоя, хотя и близко к интерфейсу головной группы, и, таким образом, можно исследовать связь куркумина с бислоем. Когда в везикулы, содержащие N-Rh-PE, не добавляли куркумин, при возбуждении при 470 нм, длина волны возбуждения куркумина, наблюдалась очень низкая флуоресцентная эмиссия (рисунок 20, спектр А). Когда куркумин (2,4 мкМ) инкубировали с везикулами, содержащими только ДМФК, пик флуоресцентного излучения при ~ 590 нм был выраженным (рисунок 20, спектр В), что указывает на относительно низкое поглощение куркумина в бислое, что приводит к небольшому переносу энергии резонанса Фёрстера между куркумином и N-Rh-PE.

Более выраженная ФРПЭ была зарегистрирована в везикулах ДМФГ/ДМФХ (рисунок 20, спектр С), что объясняется большей ассоциацией и введением куркумина в бислой везикул в присутствии ДМФГ.

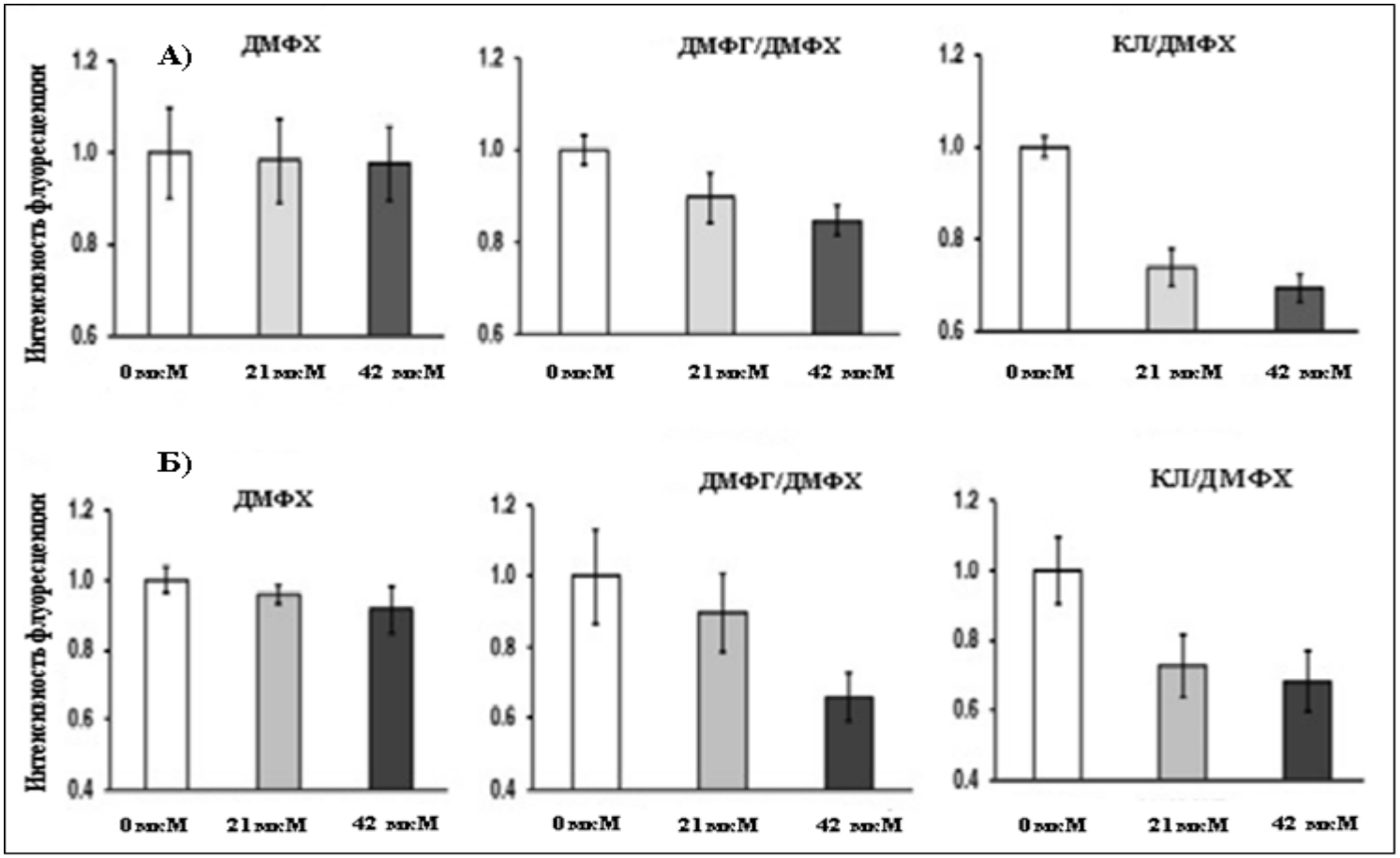
Тем не менее, еще более эффективная ФРПЭ была очевидна после добавления куркумина в везикулы КЛ/ДМФХ (рисунок 20, спектр Д), отраженного в нижней интенсивности излучения при~500 нм и более высокой интенсивности при интенсивности 590 нм.

Аналогичные тенденции ФРПЭ были очевидны, когда дополнительные концентрации куркумина были добавлены в везикулы, образованные из различных липидных композиций (дополнительный рисунок 20С).

Данные переноса энергии резонанса Фёрстера, показанные на рисунке 20, согласуются с результатами, представленными выше изложенного, что указывает на то, что кардиолипин играет важную роль в опосредовании мембранной вставки куркумина.

Локализация куркумина в липидных бислоях. Чтобы оценить локализацию и глубину проникновения куркумина в двухслойный слой и вклад кардиолипин в локализацию куркумина в двухслойном режиме, мы провели эксперименты ЭПР.

На рисунке 21 представлены результаты ЭПР, полученные путем использования двух спиновых зондов, локализованных в разных областях двухслойной мембраны. На диаграммах штрихов изображены амплитуды отношений нижнего поля: I + 1 (i) / I + 1 (0), где I + 1 (i) представляет собой сигнал спинового зонда в присутствии куркумина, а I + 1 (0) соответствует контрольным измерениям в отсутствие куркумина. Куркумин является мощным акцептором свободных радикалов [285], поэтому он должен погасить сигнал ЭПР спинового зонда в непосредственной близости.



а) Зонд N-ТЕМРО. б) 10-доксильный нонадекановый зонд. Статистические значения * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$

Рисунок 21 - Уровни сигнала ЭПР различных радикальных зондов в зависимости от концентрации куркумина

На рисунке 21А показаны отношения интенсивности сигнала ЭСР, зарегистрированные для N-Tempoyl Palmitamide (N-TEMPO) в разных везикулах, после добавления различных концентраций куркумина. N-TEMPO локализуется в области головной группы бислоя и, таким образом, сообщается о молекулярных событиях, происходящих на мембранном интерфейсе [286].

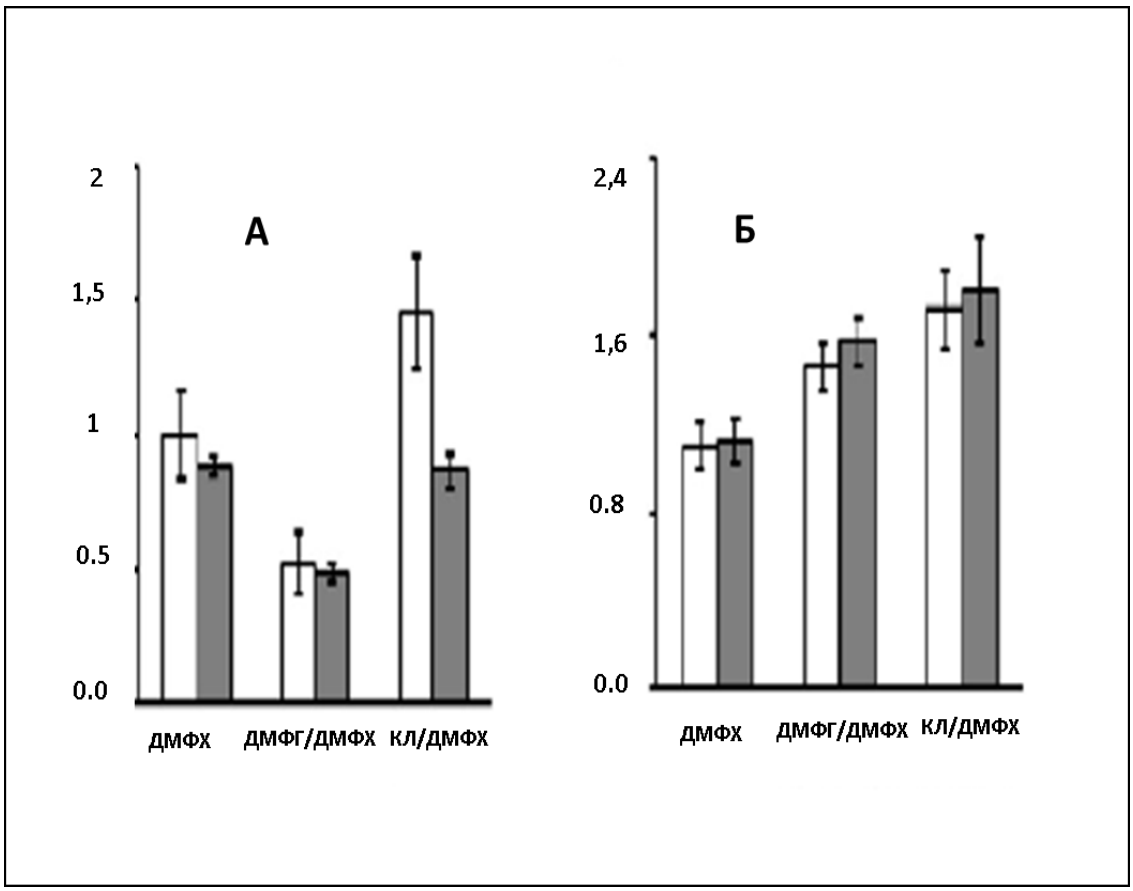
На рисунке 21А показано, что добавление куркумина в везикулы, содержащие чистый ДМФХ и зонд N-TEMPO, практически не влияет на сигнал ЭСР по сравнению с контрольным образцом (до добавления куркумина), что указывает на незначительную ассоциацию куркумина с поверхностью везикул ДМФХ.

Однако сигнал N-TEMPO в везикулах ДМФГ/ДМФХ подвергся более интенсивному тушению куркумином, что указывает на более выраженную адсорбцию куркумина на двухслойной границе. Важно отметить, что на рисунке 21А также показано, что наиболее значительное снижение интенсивности сигнала N-TEMPO регистрировалось в везикулах КЛ/ДМФХ, что соответствовало усвоению куркумина КЛ в области головных групп везикул.

Чтобы оценить, был ли куркумин введен глубже в область ацильной цепи бислоя, мы провели эксперименты ЭСР с использованием везикул, содержащих 10-доксиловый неадеканский спиновый зонд (рисунок 21Б). Доксиловый спиновый зонд в этой молекуле ковалентно связан с углеродом в положении 10 ацильной цепи и, таким образом, локализуется внутри гидрофобной внутренней части бислоя.

Подобно экспериментам ЭСР, использующим N-TEMPO (рисунок 21А), данные 10-доксильных нонадеканов на рисунке 21Б показывают, что наиболее существенное тушение сигнала ЭСР происходило в везикулах, которые содержали КЛ. Эти результаты свидетельствуют о том, что КЛ способствует введению куркумина в гидрофобное ядро бислоя, хотя и в меньшей степени, чем в интерфейсе головной группы.

Куркумин влияет на двухслойную организацию. Для дальнейшей оценки влияния мембранной ассоциации куркумина на двухслойную организацию мы провели эксперименты по дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (рисунок 22). ДСК-анализ многослойных дисперсий ДМФХ, ДМФГ/ДМФХ (2:98) или КЛ/ДМФХ (2:98) демонстрирует модуляцию двухслойных термодинамических параметров при добавлении куркумина.



Белые полосы: 1:50 куркумин: отношение ДМФХ; серые полосы: 1:25 молярное отношение *p≤0,05; ***p≤0,001

Рисунок 22 - По абциссе сигнал $\Delta H_i/\Delta H_0$, отношение энтальпии, в котором ΔH_i соответствует изменению энтальпии после добавления куркумина, а ΔH_0 является контрольным везикулярным образцом до добавления куркумина (а), по ординате сигнал $\Delta T_{(1/2)i}/\Delta T_{(1/2)0}$, отношение ширины на половине высоты пика фазового перехода (б)

В частности, куркумин вызвал значительное снижение температуры фазового перехода гель-жидкость (ΔT, рисунок 22А), что отражает смещение ацильных хвостов ДМФХ, связанное с повышенным нарушением бислоя [287]. Примечательно, что наиболее отрицательный ΔT был очевиден в везикулах КЛ/ДМФХ, что согласуется с данными, показанными на рисунке 1–4, обозначая КЛ-промотированные двухслойные взаимодействия куркумина. В то время как индуцированные куркумином изменения Tm происходили во всех трех исследованных липидных композициях (рисунок 22А), более существенные модуляции изменения энтальпии (ΔH, рисунок 22Б) и температуры фазового перехода при полуширине (ΔT1/2, рисунок 22Б) были зарегистрированы в случае липидных дисперсий КЛ/ДМФХ. В частности, хотя энтальпия фазового перехода не изменялась при инкубации куркумина с чистым ДМФХ или уменьшалась после добавления куркумина к ДМФГ/ДМФХ, при добавлении

куркумина к мультиламеллярным везикулам КЛ/ДМФХ было зафиксировано значительное увеличение ΔH.

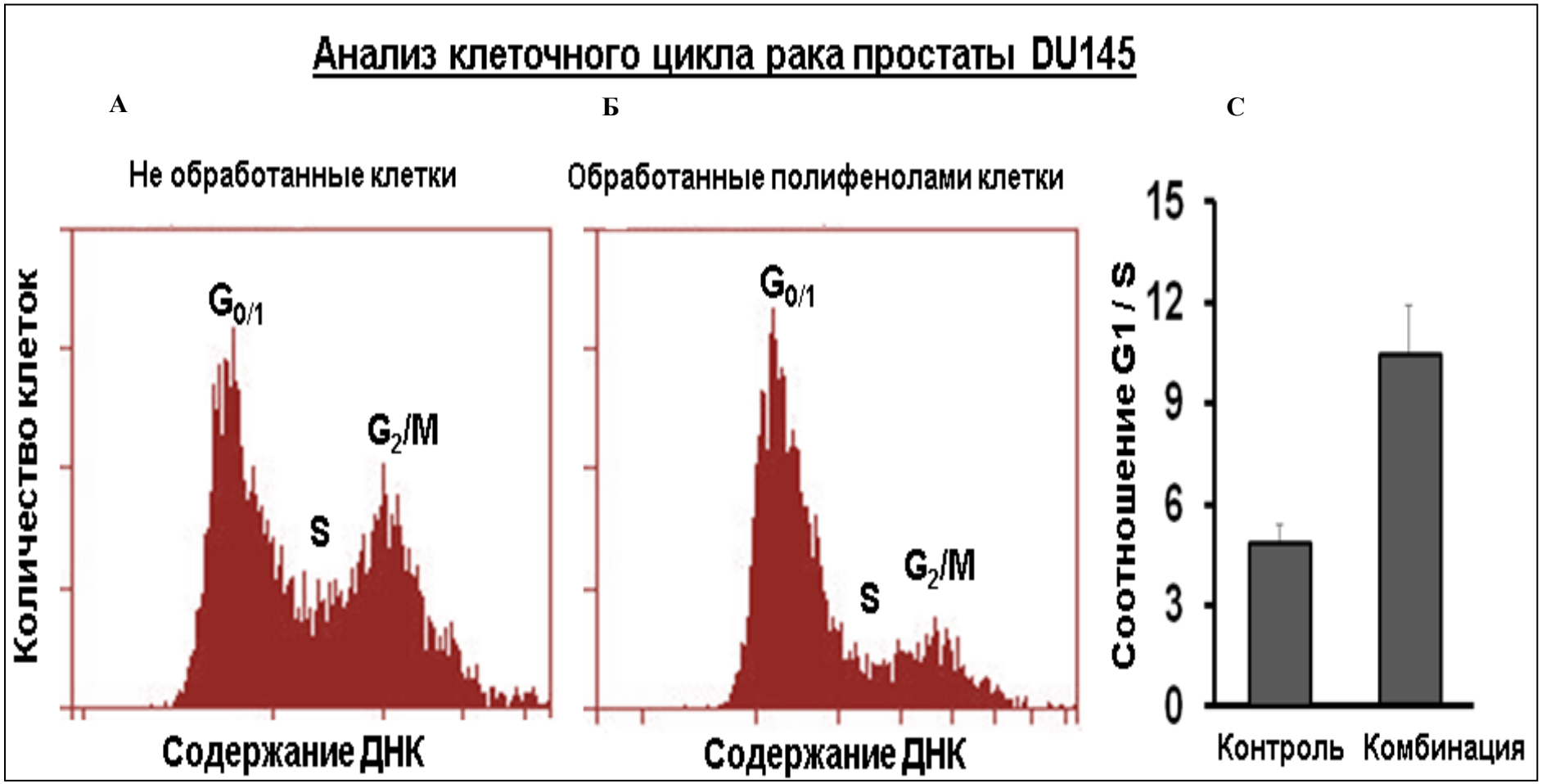
Полученный результат приписывает более выраженное участие ДМФХ в процессе фазового перехода, вероятно, из-за взаимодействий КЛ-куркумин, которые отделяют КЛ от молекул ДМФХ в бислое. Аналогичным образом, наиболее заметное увеличение температуры фазового перехода при ΔT1/2 произошло в случае везикул КЛ/ДМФХ после добавления куркумина. Это указывает на снижение кооперативности в процессах фазовых переходов из-за более низкого порядка фосфолипидов в результате нарушений, вызванных куркумином. Эти двухслойные разрушения приводят к снижению значений Tm. Влияние добавления куркумина привело к расширению кривой термографа.

3.4 Определение механизмов действия куркумина и карназоловой кислоты на клеточный цикл клеток рака простаты

Изменения в клеточном цикле определяли после воздействия комбинации куркумина и карназоловой кислоты в течение 48 часов. Анализ клеточного цикла проводили с помощью проточной цитометрии, чтобы проверить, была ли цитотоксичность куркумина и карназоловой кислоты обусловлена остановкой клеточного цикла. Полученные результаты показали, что полифенольные соединения в комбинации приводили к остановке клеточного цикла. Комбинация полифенолов представляла собой сочетание 7 мкМ куркумина и 10 мкМ карназоловой кислоты.

Клеточный цикл состоит из четырех фаз жизненного цикла: G_1-фазы начального роста, S-фазы удвоения молекул ДНК, G_2-фазы роста и M-фазы клеточного деления. Наиболее детально изучена фаза клеточного деления или митоз (M-фаза). В G_1-фазе, продолжительность, которой может сильно варьировать, происходит синтез мРНК, белков и других компонентов клетки. Клетки, которые прошли дифференцировку и больше не делятся, постоянно находятся в фазе покоя G_0. При воздействии разными полифенолами или другими препаратами, клеткам свойственно останавливаться в фазе G_0. G_2-фаза является конечным этапом подготовки клетки к делению.

На рисунке 23 можно увидеть данные контрольных клеток рака простаты линии Du145 (рисунок 23А), которые не обрабатывались полифенолами и данные этих же клеток, которые обработались комбинацией полифенолов – 7 мкМ куркумина и 10 мкМ карназоловой кислоты (рисунок 23Б). Длительность клеточного цикла у разных клеток разная, раковые клетки простаты делятся каждые 4 часа. Период клеточного роста (интерфаза), во время которого идет синтез ДНК и белков и осуществляется подготовка к делению клетки, у раковых клеток сравнительно короткий.



А – контроль клетки без добавления полифенолов, Б – клетки обработанные полифенолами. С – клетки в процентном соотношении
Статистические изменения ***p≤0,001

Рисунок 23 - Анализ клеточного цикла клеток Du145 после воздействия полифенолов через 48 часов

На рисунке 23А представлены раковые клетки линии Du145, которые не обрабатывались полифенолами. На рисунке 23Б, раковые клетки, обработанные в течении 48 часов комбинацией полифенолов куркумина и карназоловой кислоты.

При воздействии комбинации полифенолов, можно увидеть, что в фазах G_0/G_1 популяция клеток уменьшалась, а в фазе S популяция в сравнении повышалась.

В сравнении с контролем и с клетками, которые обрабатывались полифенолами, можно увидеть, что при воздействии полифенолами, основная часть популяции ингибировалась на фазе S. В сравнении, у контрольных клеток линии Du145, к которым не добавлялись полифенолы природного происхождения, популяция клеток переходила к фазе G_2/M. При воздействии комбинации куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ после 48 часов, основная популяция клеток остановилась на фазе $G_{0/1}$. Если в контрольной группе неподелившиеся клетки составляли до 50%, а остальные переходили на следующие этапы клеточного цикла, то при действии комбинации полифенолов, основная популяция остановилась на первой фазе $G_{0/1}$.

У контрольных клеток, которым не добавлялись полифенолы, изменения клеточного цикла не наблюдалось. При воздействии полифенолов в комбинации, основная часть клеток обнаружена на фазе G_1/S. Это свидетельствует о том, что клетки не переходят на фазу G_2/M деления (рисунок 23С).

Многие растительные полифенолы ингибируют рост опухолевых клеток, вызывая задержку клеточного цикла. При этом механизмы действия полифенольного соединения в разных линиях опухолевых клеток могут отличаться. Так, ресвератрол приостанавливал переход из фазы S в фазу G2 в лейкемических промиелоцитах HL60 [288], в клетках лимфомы U937 [289]. Экстракт виноградных косточек воздействовал на остановку клеточного цикла и прогрессирование опухоли простаты у мышей [290]. Кверцетин индуцировал арест клеток на фазе G0/G1 клеток рака простаты PC3 [291]. Эти результаты хорошо коррелируют с нашими результатами, так как обработанные куркумином и карназоловая кислотой в комбинации клетки рака простаты линии Du145 показали остановку клеточного цикла на фазе G_1/S, после 48 часов воздействия.

Из полученных данных, в заключении можно сказать, что комбинация полифенолов работает как ингибиторы роста раковых клеток простаты, основная популяция ингибируется на фазе $G_{0/1}$ и S ($p \leq 0{,}001$). На фазу деления G_2 /M клетки не переходят, так как основное количество клеток задерживаются на фазе $G_{0/1}$, тем самым популяция ингибируется.

3.5 Анализ окислительного стресса, вызванного полифенолами природного происхождения в раковых и эпителиальных клетках предстательной железы

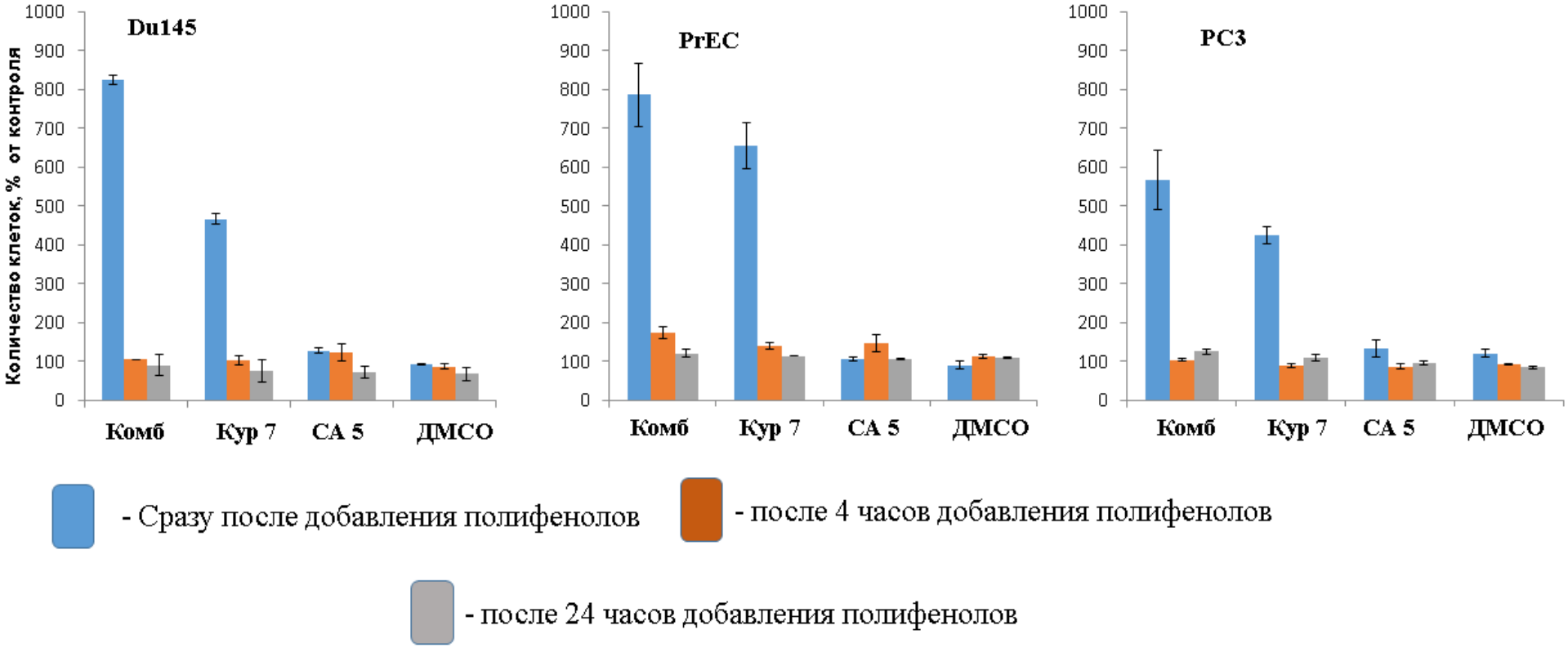
Повреждение митохондрий, как правило, сопровождается усиленным образованием АФК. В раковых клетках простаты передача сигналов АФК может играть важную роль в развитии и прогрессировании опухоли. Повышение АФК, также известное как окислительный стресс, является результатом потери механизмов антиоксидантной защиты. Окислительный стресс связан с несколькими патологическими состояниями, включая воспаление и инфекцию.

АФК являются продуктами нормального клеточного метаболизма и играют жизненно важную роль в стимуляции сигнальных путей в ответ на изменение внутри- и внеклеточных условий окружающей среды. Известно, что хроническое повышение АФК с течением времени вызывает соматические мутации и неопластическую трансформацию. Кроме того, действие полифенолов может приводить к развитию окислительного стресса в опухолевых клетках различных типов и повышению уровня АФК [292].

Доля митохондрий, которые являются одним из ключевых метаболических регуляторных центров клеток АФК и его физиологических источников, была изучена при развитии окислительного стресса, вызванного полифенолами природного происхождения. Для этой цели использовались флуоресцентные зонды *Mitosox* и H_2O_2, для чувствительности к митохондриальному супероксиду. Использование зонда позволило разделить плазменные эффекты, характерные для митохондрий. Сигналы оценивались в присутствии митохондриальных дыхательных ингибиторов, что было полезным инструментом для изучения механизмов АФК [293-294].

Исследование было проведено на линии эпителиальных и раковых клеток простаты. Концентрация полифенолов в комбинации составила куркумин – 7 мкМ, карназоловая кислота – 5 мкМ. По отдельности куркумин применялся в концентрации – 7 мкМ, карназоловая кислота - 5 мкМ. В виде контроля был взять диметилсульфоксид (растворитель), так как полифенолы были расствoрены в нем. Повторность эксперимента составило 18 раз. Полученные результаты представлены на рисунке 24. Возникновение окислительного стресса митохондрии смотрели несколько раз: сразу после добавления, после 4 и 24 часов воздействия по отдельности куркумина и карназоловой кислоты и их в комбинации.

Как видно из рисунка, во всех видах клеток при воздействии полифенолов в комбинации показатель АФК повышался. В клетках рака простаты Du145 и эпителиальных клетках PrEC в сравнении PC3 окислительное фосфорилирование было выше сразу после добавления полифенолов.



Данные значения среднестатистические (± SEM). Кур – куркумин, СА – карназоловая кислота, Комб. – комбинация куркумина, ДМСО – диметилсульоксид. Статистические значения *p≤0,05, ** p≤0,003

Рисунок 24 - Действия полифенолов на окислительное фосфорилирование по отдельности и в комбинации на нормальные PrEC и раковые клетки простаты Du145, PC3

В клетках рака простаты линии Du145 при воздействии сразу после добавления комбинации полифенолов АФК повышался до 80% ($p \leq 0,003$), при воздействии куркумина в отдельности этот показатель был ниже, он повысил АФК на 50% в клетках, карназоловая кислота не повышало АФК, и его содержание было в пределах нормы. Показатели ДМСО были соответственны данными контроля.

В клетках рака простаты линии PC3 при воздействии сразу после добавления комбинации полифенолов АФК повышался до 70-90% ($p \leq 0,05$), при воздействии куркумина в отдельности этот показатель был ниже, он повысил АФК на 60-75% в клетках ($p \leq 0,05$), карназоловая кислота не повышало АФК, и его содержание соответствовали показателями контроля. Показатели ДМСО были соответственны данными контроля.

В эпителиальных клетках простаты PrEC при воздействии сразу после добавления комбинации полифенолов АФК повышался до 50-65% ($p \leq 0,05$), при воздействии куркумина в отдельности этот показатель был ниже, он повысил АФК на 40% в клетках ($p \leq 0,003$), карназоловая кислота повысило АФК на 5% ($p \leq 0,05$). Показатели ДМСО повысили на 5-7%.

Повышение АФК наблюдалось только при измерении воздействия полифенолов в отдельности и в комбинации в сравнении с контролем сразу после добавления. После 4 часов воздействия содержание АФК начинало нормализоваться и после 24 часов его содержание было в пределах нормы как в концентрациях при воздействии в комбинации, также и в концентрациях в отдельности полифенолов ($p \leq 0,003$), как в контрольных группах. Действие ДМСО также соответствовало показателями контроля. Так действие полифенолов при добавлении различных концентрации приводило оксидативному стрессу во всех клеточных линиях простаты.

Накопление активных форм кислорода приводит к повреждению клеток и к развитию патологических состояний [295]. Механизмы, участвующие в антиоксидантной способности полифенолов, включают подавление образования АФК путем либо ингибирования ферментов, участвующих в их продукции, удаления АФК, либо усиления или защиты антиоксидантной защиты [296].

Ресвератрол ингибирует внутриклеточный уровень АФК и подавляет гликолитический метаболизм раковых клеток [297]. Тогда, как низкая концентрация кверцетина ослабляет терапевтические эффекты цисплатина и других противоопухолевых препаратов в раковых клетках яичников, уменьшая повреждение АФК [298]. Все эти исследования показывают изменения АФК в разных видах раковых заболеваний.

Таким образом, сравнительно наши исследования показывают, что сочетанное действие полифенолов куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ временно увеличивают образование супероксида митохондрии и проводит оксидативному стрессу. В свою очередь, окислительный стресс, вызванный

полифенолами природного происхождения в раковых клетках повреждают механизм митохондрий.

3.6 Выявление механизмов действия куркумина и карназоловой кислоты на мембранный потенциал митохондрий раковых и интактных клеток простаты

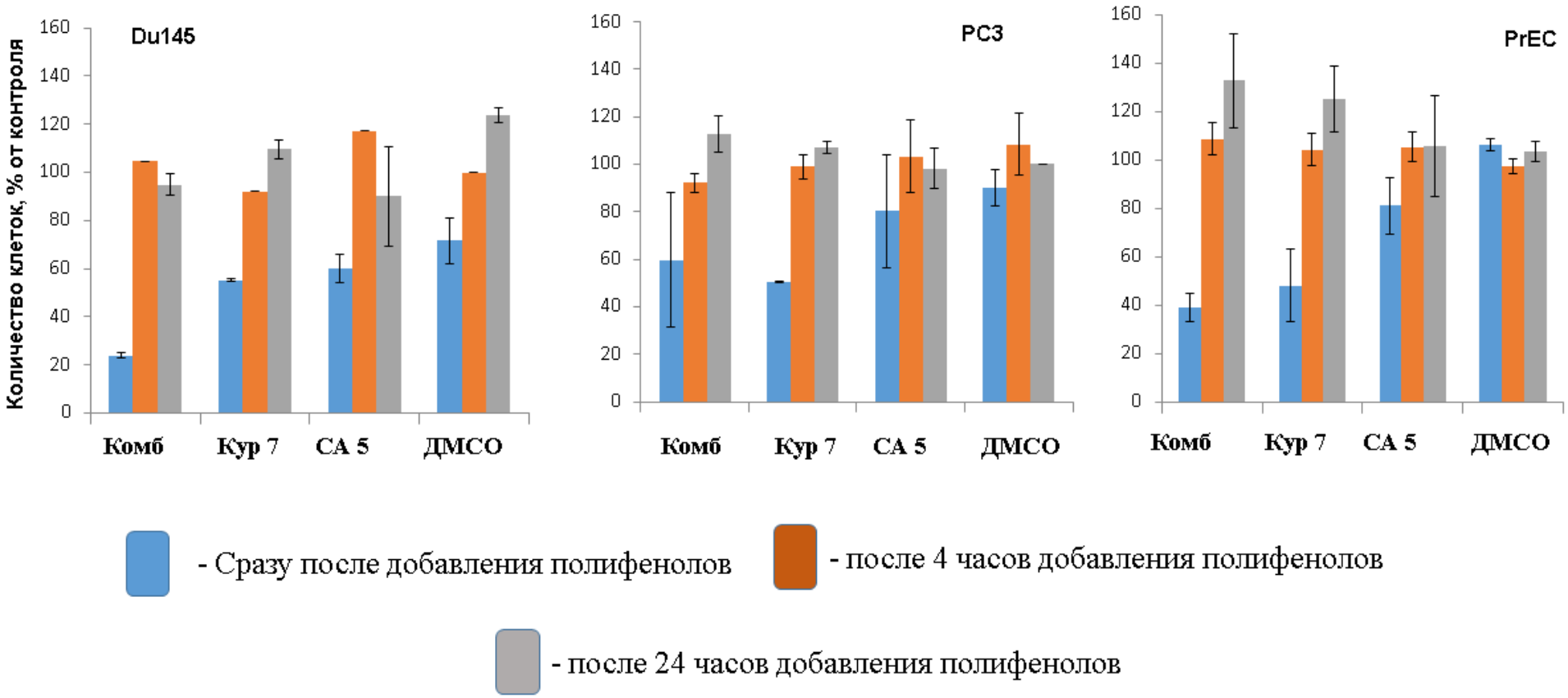
Митохондрии являются основными органеллами, вырабатывающими АТФ, которые обеспечивают 95% энергии для клеточной деятельности [299]. В исследовании рассматривалось роль митохондрий в изменениях клеточного гомеостаза в клетках, индуцированных полифенолами природного происхождения. Известно, что митохондрии являются основным источником синтеза АТФ, передачи сигналов и стресса в ответ на энергетические потребности раковых клеток. Для выявления изменений мембранного потенциала митохондрии использовали проникающий флуоресцентный краситель *MitoRed* (75 нмоль).

Мембранный потенциал митохондрии ($\Delta\Psi m$) в интактных клетках простаты PrEC, метастазных клетках Du145 и PC3 измеряли обработанных полифенолами в разных концентрациях, при указанных концентрациях (рисунок 25) в течение: сразу после добавления полифенолов в комбинации по отдельности, также во времени 4 и 24 часов воздействия. Положительным образцом контроля применялись клетки обработанные 2 мкМ FCCP, что приводит к полному осаждению клеточной мембраны и окислительному фосфорилированию митохондрий.

Клетки ($0.2x10^6$ клетки) были загружены с 75 нмоль красителем *MitoRed* (Ex/Em длинах волн 622/648 нм) (PromoCell GmbH, Heidelberg, Германия), митохондрии чувствительных к данному красителю, степень окрашивания зависит от мембранного потенциала оболочки митохондрий. Все данные вычислялись по сравнению с контролем – клетками без добавления полифенолов, величина мембранного потенциала высчитывалась в % от контроля, в каждом эксперименте рассматривался свой контроль. Повторность составила 15 экспериментов. В качестве сравнения был взят диметилсульфид, так как полифенолы растворялись в нем.

Показатели в группе ДМСО были идентичны показателям в группе контроля. Для определения мембранного потенциала были взяты концентрации: куркумин 7 мкМ, карназоловая кислота 5 мкМ и комбинация этих двух полифенолов и контроль для сравнения, контролем служил ДМСО.

Как видно на рисунке 25, в раковых клетках Du145 мембранный потенциал митохондрии при воздействии комбинации сразу после добавления понижался до 80% ($p \leq 0{,}001$) (синий цвет), что составило 20%.



Данные значения среднестатистические (± SEM). Кур – куркумин, СА – карназоловая кислота, Комб. – комбинация куркумина, ДМСО – диметилсульоксид. Статистические изменения *p≤0,05, ** p≤0,001

Рисунок 25 - Действия полифенолов на мембранный потенциал по отдельности и в комбинации на нормальные PrEC и раковые клетки простаты Du145, PC3

При воздействии 7 мкМ куркумина мембранный потенциал митохондрии составлял менее 50% ($p \leq 0,001$), тогда как карназоловая кислота понижала мембранный потенциал митохондрии на 40% ($p \leq 0,001$). ДМСО также понижал мембранный потенциал митохондрии на 15-20% ($p \leq 0,05$).

В более агрессивных раковых клетках PC3, комбинация полифенолов воздействовала менее эффективно, мембранный потенциал митохондрии понижался в пределах 50-80% ($p \leq 0,05$), куркумин воздействовал понижая до 55-60% ($p \leq 0,001$). Действия карназоловой кислоты было не значительно в пределах 5-10% ($p \leq 0,05$).

В нормальных эпителиальных клетках простаты комбинация полифенолов снижало мембранный потенциал митохондрии на 60% ($p \leq 0,005$), куркумин в концентрации 7 мкМ снижал на 40-50%, карназоловая кислота снижало на 10-12% ($p \leq 0,05$). В сравнении с раковыми клетками линии PC3, в эпителиальных клетках простаты динамика мембранного потенциала митохондрии наблюдалась выше. Это говорит о том, что общая динамика мембранного потенциала митохондрий в нормальных клетках значительно сильнее, чем у раковых новообразований [300]. Показатели ДМСО не показали никаких изменении при воздействии ($p \leq 0,001$).

Снижение мембранного потенциала наблюдалась, при добавлении полифенолов сразу же после добавление клеткам. Эти показатели были на всех видах клеточных линии простаты. После 4 часов воздействия, мембранный потенциал восстанавливался, также и после 24 часов воздействия. Такие показатели были в исследованиях при воздействии силибинина, что приводило разрушению потенциала митохондриальной мембраны в клетках рака молочной железы [301], при воздействии экстракта шалфея в раковых клетках поджелудочной железы [302].

Из выше изложенного можно заключить, что куркумин и карназоловая кислота в комбинации и по отдельности подавляет мембранный потенциал раковых и интактных клеток простаты в зависимости от времени воздействия.

3.7 Установление особенностей сочетанного действия куркумина и карназоловой кислоты на клеточное дыхание в раковых клетках простаты

Митохондрии играют главную роль в клеточной биоэнергетике в большинстве эукариотических клеток, отвечая за выработку почти 95% клеточных АТФ посредством митохондриального окислительного фосфорилирования, таким образом контролируя гибель или выживание клеток.

Дыхание клеток измеряли при воздействии комбинации полифенолов на раковые клетки простаты линии Du145 (рисунок 26). Клетки, собранные трипсинизацией центрифугировались, промывались и ресуспендировались в модифицированном буфере Кребса, содержащем 137 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 20 мМ MOPS, pH 7,4; 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ KH_2PO_4, 2мМ $CaCl_2$.

.

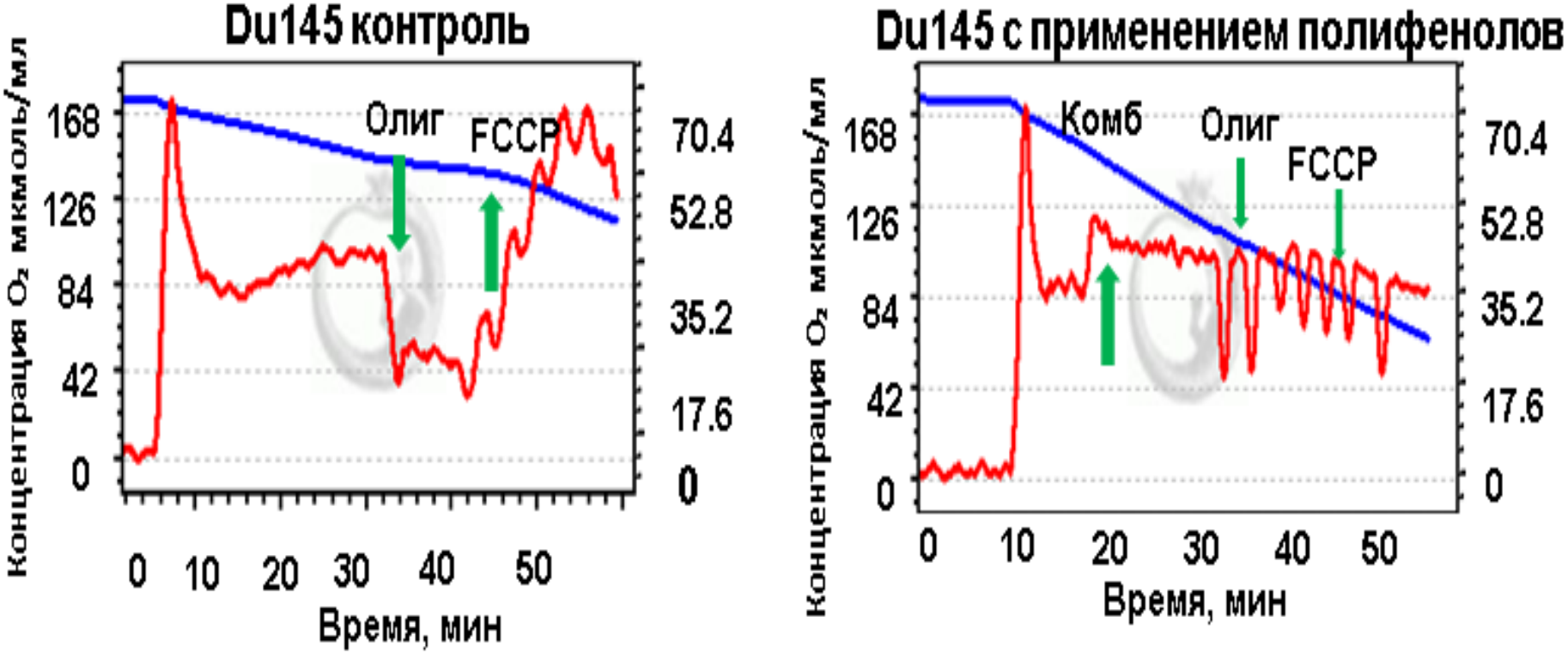


Рисунок 26 - Дыхание раковых клеток Du145 при добавлении комбинации куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ

Как только система стабилизировалась, к клеткам добавляли полифенолы куркумин 7 мкМ и карназоловую кислоту 5 мкМ. Собранные клетки размещали в так называемые чемберы в одинаковом количестве и измерялось клеточное дыхание. Клеточное дыхания анализировали методом респирометрии с высокой разрешающей способностью при 37°С в две камеры на респирометре Oroboros Oxygraph-2K (Инсбрук, Австрия).

После стабилизации сигнала, к клеткам добавляли 2 мг/мл олигомицина для ингибирования АТФ синтазы. Затем клетки титрировали 20нмоль концентрацией карбонилцианид 4- (трифторметокси) фенилгидразон для стимуляции потребления кислорода до уровня максимально возможного. Скорости дыхания выражались в единицах моль на миллион клеток в секунду. Из полученных данных видно, что в контроле, где клеткам не добавляли полифенолов картина резко отличалась в сравнении с клетками к которым добавляли комбинацию полифенолов.

В контроле, когда к раковым клеткам простаты Du145, после стабилизации дыхания, добавляли олигомицин для ингибирования дыхании, ингибирующее действие олигомицина сохранялось (рисунок 30). Как только происходило ингибирование, клеткам добавляли FCCP для стимуляции потребления кислорода с титрованием по концентрации 20 нмоль каждые 2 минуты. Для раковых клетках простаты Du145 в контроле видно, что механизм FCCP работал по назначению, стимулируя дыхание клеток, клетки начали активно употреблять кислород. В сравнении, где раковым клеткам добавлялись полифенолы в комбинации куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ, этот механизм не работал. Как только клеточное дыхание стабилизировалось, к клеткам добавляли куркумин и карназоловую кислоту по очередности. После добавления комбинации дыхание клеток участилось, наблюдался рост дыхание клеток. Как только дыхание стабилизировалось, после добавления олигамицина ингибирование как у контроля не произошло. Олигамицин не действовал на дыхание клеток, после добавление комбинации, в сравнении контролем, где он ингибировал дыхание клеток. После добавление олигамицина, было добавлено FCCP. Механизм стимуляции FCCP также не сработал, при титровании 20 нмоль FCCP дыхание клеток не участилось, наоборот происходило ингибирование дыхание клеток. Есть данные, что соединение серинола 16 снижает энергетический метаболизм (гликолиз и митохондриальное дыхание) в клетках рака толстой кишки SW-620 [303], а флавоноиды какао ингибируют клеточную пролиферацию раковых клеток [304].

Таким образом, можно заключить, что комбинация куркумина и карназоловой кислоты стимулировало дыхание раковых клеток простаты, что приводит быстрому исходу энергии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате исследований определены цитотоксические дозы куркумина - 10 мкМ, где рост клеток составлял 38%, после воздействия 48 часов и карназоловой кислоты – 20 мкМ, где рост клеток составлял 44%. Оптимальные дозы полифенолов составляли концентрации: куркумин 7 мкМ и карназоловоя кислота 5 мкМ в комбинации и по отдельности.

2. Установлено, что полифенолы природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты в проводимых экспериментах влияют на задержку пролиферативной способности клеток рака предстательной железы и меньшей степени на нормальные эпителиальные клетки простаты. Также задержка пролиферативной активности наблюдалоась и в колонии клеточных линии простаты при воздействии различных концентрации и в комбинации полифенолов в течении 7 дней.

3. Установлено, что сочетанное действие полифенолов временно снижает мембранный потенциал митохондрии раковых и эпителиальных клеток простаты. При воздействии мгновенного эффекта полифенолов в комбинации мембранный потенциал снижался до 20% в раковых клетках Du145 и в раковых клетках PC3 до 60%, а в эпителиальных клетках простаты PrEC до 45%, но после 4-24 часов воздействия мембранный потенциал митохондрии воостанавливался

4. Наблюдалось, что при концентрации куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ в комбинации сразу после добавления приводило временному окислительному стрессу митохондрии раковых и эпителиальных клеток простаты, так как после 4-24 часов воздействия происходит восстанавливание.

5. Выявлена фаза клеточного цикла. При воздействии полифенолов в комбинации куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5 мкМ после 48 часов на клеточные линии рака простаты Du145 наблюдалось время реагирования жизненной активности во время клеточного цикла. Остановка роста раковых клеток проявлялась на фазе $G_{0/1}$, таким образом последовательность следующих клеточных фаз не просиходило, так как основная популяция ингибируется в первой фазе клеточного цикла.

6. Установлено, что полифенолы в комбинации стимулировали дыхание раковых клеток простаты Du145, но на раковых клеток простаты PC3 и эпителиальных клетках простаты PrEC происходило ингибирование дыхание.

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 митохондрии 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics // CA Cancer J Clin. – 2018. - №68. – P. 7–30.

2 Khan N., Syed D.N., Ahmad N., Mukhtar H. Fisetin: A dietary antioxidant for health promotion // Antioxid. Redox Signal. – 2013. - №19. - P. 151–162.

3 Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability // Am. J. Clin. Nutr. – 2004. - №79. - P. 727–747.

4 Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten S.V., Oteiza P.I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols // Mol. Asp. Med. – 2010. - №31. – P. 435–445.

5 Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2009. - №2. - P. 270–278.

6 Hu M. Commentary: Bioavailability of flavonoids and polyphenols: Call to arms // Mol. Pharm. – 2007. - №4. – P. 803–806.

7 Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention // J. Nutr. Biochem. – 2007. - №18. - P. 427–442.

8 Mimeault M., Batra S.K. Potential applications of curcumin and its novel synthetic analogs and nanotechnology-based formulations in cancer prevention and therapy // Chin. Med. – 2011. - №6. – P. 31.

9 Parsai S., Keck R., Skrzypczak-Jankun E., Jankun J. Analysis of the anti-cancer activity of curcuminoids, thiotryptophan and 4-phenoxyphenol derivatives // Oncol. Lett. – 2014. - №7. - P. 17–22.

10 Yu X.L., Jing T., Zhao H., Li P.J., Xu W.H., Shang F.F. Curcumin inhibits expression of inhibitor of DNA binding 1 in PC3 cells and xenografts // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2014. - №15. - P. 1465–1470.

11 Gupta A., Zhou C.Q., Chellaiah M.A. Osteopontin and MMP9: Associations with VEGF expression/secretion and angiogenesis in PC3 prostate cancer cells // Cancers. – 2013. - №5. - P. 617–638.

12 Luo C., Li Y., Zhou B., Yang L., Li H., Feng Z., Li Y., Long J., Liu J. A monocarbonyl analogue of curcumin, 1,5-bis(3-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one (Ca 37), exhibits potent growth suppressive activity and enhances the inhibitory effect of curcumin on human prostate cancer cells // Apoptosis. – 2014. - №19. -P. 542–553.

13 Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, Vardar-Sukan Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines // FPlant Foods Hum Nutr. – 2010. - №65(2). - P. 158-63.

14 Pearson B.Z., Fernandez S.C., Lewedge V., Oller D.K. The relation of input factors to lexical learning by bilingual infants // Applied Psycholinguistics. - 1997. - №18. - P. 41-58.

15 Wijeratne S.S., Cuppett S.L. Potential of rosemary (Rosemarinus officinalis L.) diterpenes in preventing lipid hydroperoxide-mediated oxidative stress in Caco-2 cells // J Agric Food Chem. – 2007. - №55(4). - P. 1193-1199.

16 Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Löligers J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid // Xenobiotica. - 1992. - №22. - P. 257–268.

17 Romo Vaquero M., Garcia Villalba R., Larrosa M., Yáñez-Gascón M.J., Fromentin E., Flanagan J., Roller M., Tomás-Barberán F.A., Espín J.C., García-Conesa M.T. Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: metabolic profile in the intestine, liver, plasma, and brain of Zucker rats // Mol Nutr Food Res. - 2013. - №57. - P. 1834–1846.

18 Margot L., Anja K., Ljubica S., Antoine B., Simona B., Michel H. Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms // Plant Physiology. – 2017. - Vol. 175. - P. 1381–1394.

19 Schwartz R.M., Dayhoff M.O. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts // Science. – 1978. - №199. - P. 395-403.

20 Gray M.W., Doolittle W.F. Has the endosymbiont hypothesis been proven // Microbiol Rev. – 1982. - №46. – P. 1-42.

21 David C. Chan Mitochondria dynamic organelles in disease, aging, and development. Division of Biology, California Institute of Technology. – Pasadena; USA, 2006. – Vol. 6. - P. 10.

22 Wallace D.C. A mitochondria paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine // Annu Rev Genet. - 2005. - №39. - P. 359-407.

23 Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. – Екатеренбург: Изд-во «Уральский рабочий», 1994. - 384 с.

24 Каменский А.А. Биология. - М.: ЭКСМО, 2003. – 640 с.

25 Сапин и др. Анатомия человека. – М.:ОНИКС, 2002. - Т.1. – 464 с.

26 Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология / пер. с англ. Ю.Л. Амченкова, М.Г. Дуниной и др. – М.: Мир, 2001. – Т. 1. – 454 с.; 2002. – Т. 2. – 436 с.; 2002. - Т. 3. – 451 с.

27 Биохимия // http://www.chem.msu.su/rus/teaching/kolman/212.htm. (дата обращения: 19.12.2018).

28 Косарев А.В. Биодинамика, механизм и условия производства кооперативных потоков энергии в биологических структурах // Вестник Оренбургского гос. у-та. – 2004. - №6. - С. 93-99.

29 Косарев А.В. Динамика эволюции неравновесных диссипативных сред. – изд. 2-е переработанное и дополнение. – Саарбрюккен; Германия: Изд-во LAMBERT ACADEMIC Publishing, 2013. - 354 с.

30 Косарев А.В. Тепловой двигатель на новом термодинамическом принципе преобразования тепла в работу и его работа на естественных перепадах температур возобновляемых источников энергии // http/new-idea.kulichki.net/pubfiles/140121164236.doc.(дата обращения: 18.05.2000).

31 Bruce A., Johnson A., Lewis J., Raff M. Molecular Biology of the Cell. - New York: Garland Publishing, 1994. - 365 p.

32 Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular Level. - 2 nd ed. - New Jersey:John Wiley and Sons, 2006. – 547 p.

33 Pike R.L., Brown M. Nutrition: An Integrated Approach. - New York: Prentice-Hall, 1984. - P. 450-484.

34 Skulachev V.P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power transmitting cables // Trends Boichem. - 2001. - №26. - P. 23-29.

35 Maasen J.A., Hart L.M., Essen E. and etc. Mitochondrial diabetes molecular mechanisms and clinical presentation // Diabetes. - 2004. - №53. - P.103-109.

36 Conley K.E., Amara C.E., Jubrias S.A. Mitochondrial function, fibre types and ageing: new insights from human muscle in vivo // Exp Physiol. – 2007. - №92(2). – P. 333-339.

37 Smith R., Hartley R., Cocheme H., Murphy M. Mitochondrial pharmacology // Trends in Pharmacological Sciences. – 2012. - №33(6). - P. 341-352.

38 Anastasia A., Vladimir V., Boris V. Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway. – Cleveland: Lerner Research Institute NE2, 2010. - 125 p.

39 Katrin H., William M. Evolutionary biology: Essence of mitochondria // Nature. - 2003. - №426. - P. 127-128.

40 Champoux J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism // Annu. Rev. Biochem. - 2001. - №70. – P. 369–413.

41 Жимулев И. Ф. Общая молекулярная генетика. - Новосибирск: Издательство Новосибирского университета, 2002. – Т. 1. - 459 с.

42 Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки // В 3 т. – М.: Мир, 1994. - Т. 1. - 517 с.

43 Passarella S., Atlante A., Valenti D., de Bari L. The role of mitochondrial transport in energy metabolism // Mitochondrion. – 2003. – Vol. 2, issue 5. - P. 319–343.

44 Осикбаева С.О., Аблайханова Н.Т. О физико-химических особенностях митохондрии. ВЕСТНИК. КазНУ. Серия экологическая. Алматы 2015 - №2/1 (44). -С.360-365.

45 Hales K.G. The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution,and emerging connections to apoptosis. – Mitochondrion, 2004. – Vol. 4, issue 4.- P. 285–308.

46 Millhouse-Flourie T.J. Physical, occupational, respiratory, speech, equine and pet therapies for mitochondrial disease. - 2004. - Vol. 4, issue 5–6. – P. 549–558.

47 Thorburn D.R., Chow C.W., Kirby D.M. Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. - 2004. – Vol. 4, issue 5–6. – P. 363–375.

48 Scalbert A., Manach C., Morand C,. Remesy C., Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. - 2005. - №45. - P. 287–306.

49 Adams J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis // Genes and Development. - 2003. - №17. - P. 2481–2495.

50 Владимирская Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток // Гематология и трансфузиология. - 2002. - Т. 47, №2. - С. 35–40.

51 Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. Apoptosis - the p53 network // Journal of Cell Science. - 2003. - №116. - P. 4077–4085.

52 Itoh K., Hase H., Kojima H. et al. Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts // Rheumatology. - 2004. - №43. - P. 277–285.

53 Vasington F. D., Murphy J. V. Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. // J Biol Chem. - 1962. - Vol. 237. - P. 2670-2677.

54 Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. The versatility and universality of calcium signaling // Nat Rev Mol Cell Biol. - 2000. - Vol. 1. - P. 11-21.

55 Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game // J Physiol. - 2000. - Vol. 529, part 1. - P. 37-47.

56 Hoppe U. C. Mitochondrial calcium channels. // FEBS Lett. - 2010. - Vol. 584. - P. 1975-1981.

57 Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function // Biochem J. - 2001. - Vol. 358. - P. 147-155.

58 Tan W., Colombini M. VDAC closure increases calcium ion flux // Biochim Biophys Acta. - 2007. - Vol. 1768. - P. 2510-2515.

59 Song J., Midson C., Blachly-Dyson E., Forte M., Colombini M. The sensor regions of VDAC are translocated from within the membrane to the surface during the gating processes // Biophys J. - 1998. - Vol. 74. - P. 2926-2944.

60 Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel // Nature. - 2004. - Vol. 427. - P. 360-364.

61 Jouaville L. S., Pinton P., Bastianutto C., Rutter G. A., Rizzuto R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1999. - Vol. 96. - P. 13807-13812.

62 McCormack J.G., Halestrap A.P., Denton R.M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism // Physiol Rev. - 1990. - Vol. 70. - P. 391-425.

63 Territo P.R., Mootha V. K., French S. A., Balaban R. S. Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase // Am J Physiol Cell Physiol. - 2000. - Vol. 278. - P. C423-435.

64 Yi M., Weaver D., Hajnoczky G. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit // J Cell Biol. – 2004. - №167(4). – P. 661–672.

65 Hajnoczky G., Csordas G., Das S., Garcia-Perez C., Saotome M., Sinha Roy S., Yi M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for

assessing the role of mitochondrial Ca2+ uptake in apoptosis // Cell Calcium. - 2006. - Vol. 40. - P. 553-560.

66 Ye J., Fan J., Venneti S., Wan Y.W., Pawel B.R., Zhang J., Finley L.W., Lu C., Lindsten T., Cross J.R. et al. Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia // Cancer Discov. - 2014. - №4. - P.1406-1417.

67 Currie E., Schulze A., Zechner R., Walther T.C., Farese R.V. Cellular fatty acid metabolism and cancer // Cell Metab. - 2013. - №18. - P. 153-161.

68 Carracedo A., Cantley L.C., Pandolfi P.P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight // Nat. Rev. Cancer. - 2013. - №13. - P. 227-232.

69 Осикбаева С.О., С.Т. Тулеуханов, З.С. Орынбаева Энергетический метаболизм - гликолиз в нормальных и раковых клеток Вестник КазНМУ - Алматы 2017 - № 2. С.243-247.

70 Tardito S., Oudin A., Ahmed S.U., Fack F., Keunen O., Zheng L., Miletic H., Sakariassen P.O., Weinstock A., Wagner A. et al. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma // Nat. Cell Biol. - 2015. - №17. - P. 1556-1568.

71 Rostovtseva T.K. et al. Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration // Proc Natl Acad Sci USA. - 2008. - №105(48). - P. 18746-18751.

72 Heggeness M.H., Simon M., Singer S.J. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells // Proc Natl Acad Sci USA. - 1978. - №75(8). - P. 3863-3866.

73 De Vos K.J. et al. Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission // Curr Biol. - 2005. - №15(7). - P. 678-683.

74 Ossikbayeva S. New insights on mitochondria structural organization. Интеграция мировых научных процессов как основа общественного прогресса. - Казань, 2015. – Вып. 4. - С. 305-309.

75 Chan D.C. Mitochondrial fusion and fission in mammals // Annu Rev Cell Dev Biol. - 2006. - №22. - P. 79-99.

76 Giorgi C. et al. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum // Int J Biochem Cell Biol. - 2009. - №41(10). - P. 1817-1827.

77 Zinoveva V.N., Spasov A. Mechanisms of plant polyphenols anti – cancer effects I. Blockade of carcinogenesis initiation // Biomeditsinskaya khimiya. - 2012. - №58(2). - P. 160-175.

78 Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases // Crit Rev Food Sci Nutr. – 2005. - №45. – P. 287-306.

79 Spencer J.P., Abd E.l., Mohsen M.M., Minihane A.M., Mathers J.C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research // Br J Nutr. – 2008. - №99. – P. 12-22.

80 Beckman C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? // Physiol. Mol. Plant Pathol. – 2000. - №57. – P. 101-110.

81 Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalber A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database // Eur J Clin Nutr. – 2010. - №64. – S. 112–120.

82 Singh A., Holvoet S., Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases // Clin Exp Allergy. – 2011. - №41. – P. 1346–1359.

83 Duthie G.G., Pedersen M.W., Gardner P.T., Morrice P.C., Jenkinson A.M., McPhail D.B., Steele G.M. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers // Eur J Clin Nutr. – 1998. - №52. – P. 733-736.

84 Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalber A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database // Eur J Clin Nutr. - 2010. - №64. – S. 112–120.

85 Young J.F., Nielsen S.E., Haraldsdóttir J., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Crozier A., Sandström B., Dragsted L.O. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status // Am J Clin Nutr. – 1999. - №69. – P. 87-94.

86 Orgogozo J.M., Dartigues J.F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R. et al. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area // Rev Neurol. – 1997. - №153. – P. 185–192.

87 Truelsen T., Thudium D., Grønbæk M. Amount and type of alcohol and risk of dementia: the copenhagen city heart study // Neurology. – 2002. - №59. – P. 1313–1319.

88 Aquilano K., Baldelli S., Rotilio G., Ciriolo M.R. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols // Neurochem Res. – 2008. - №33. - P. 2416–2426.

89 Rossi L., Mazzitelli S., Arciello M., Capo C.R., Rotilio G. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease // Neurochem Res. – 2008. - №33. – P. 2390–2400.

90 Ng T.P., Chiam P.C., Lee T., Chua H.C., Lim L., Kua E.H. Curry consumption and cognitive function in the elderly // Am J Epidemiol. – 2006. - №164. – P. 898–906.

91 Noguchi-Shinohara M., Yuki S., Dohmoto C., Ikeda Y., Samuraki M., Iwasa K. et al. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline // PLoS ONE. – 2014. - №9. – P. 96013.

92 Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L.L., Simonetti R.G., Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis // J Am Med Assoc. – 2007. - №297. – P. 842–857.

93 Ogle W.O., Speisman R.B., Ormerod B.K. Potential of treating age-related depression and cognitive decline with nutraceutical approaches: a mini-review // Gerontology. – 2012. - №59. – P. 23–31.

94 Zhang H., Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects // Curr Opin Food Sci. – 2016. - №8. – P. 33–42.

95 Zhou Y., Zheng J., Li Y., Xu D.P., Li S., Chen Y.M. et al. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer // Nutrients. – 2016. - №8. – P. 515.

96 Khurana S., Venkataraman K., Hollingsworth A., Piche M., Tai T.C. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging // Nutrients. – 2013. - №5. – P. 3779–3827.

97 Jiang H., Wang J., Rogers J., Xie J. Brain iron metabolism dysfunction in Parkinson's disease // Mol Neurobiol. – 2017. - №54. – P. 3078–3101.

98 Wang S., Moustaid-Moussa N., Chen L., Mo H., Shastri A., Su R. Novel insights of dietary polyphenols and obesity // J Nutr Biochem. – 2014. - №25. – P. 1–18.

99 Fujiki H., Sueoka E., Watanabe T., Suganuma M. Primary cancer prevention by green tea, and tertiary cancer prevention by the combination of green tea catechins and anticancer compounds // J Cancer Prev. – 2015. - №20. – P. 1–4.

100 Li W., Liu B., Li S., Zhang B., Xu Y. Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro // Med Sci Monit Basic Res. – 2014. - №20. – P. 82–92.

101 Zhang H., Liu Q., Lin J., Wang Y., Chen S., Hou J. GW27-e0657 resveratrol protects against oxidized LDL-induced foam cells formation and apoptosis through inhibition of ER stress and downregulation of CD36 // J Am Coll Cardiol. – 2016. - №16. – P. 226-310.

102 Boullata J.I., Hudson L.M. Drug–nutrient interactions: a broad view with implications for practice // J Acad Nutr Diet. – 2012. - №112. – P. 506–517.

103 Wang S., Sun Z., Dong S., Liu Y., Liu Y. Molecular interactions between (–)-epigallocatechin gallate analogs and pancreatic lipase // PLoS ONE. – 2014. - №9. – P. 111 - 143.

104 Sroka Z., Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids // Food Cheml Toxicol. – 2003. - №41. – P. 753–758.

105 Saeidnia S., Abdollahi M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century // Toxicol Appl Pharmacol. – 2013. - №271. – P. 49–63.

106 Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease // Oxid Med Cell Longev. – 2009. - №2. – P. 270–278.

107 Berman A.Y., Motechin R.A., Wiesenfeld M.Y., Holz M.K. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials // NPJ Prec Oncol. – 2017. - №1. – P. 35.

108 Guo H., Chen Y., Liao L., Wu W.. Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway // Cardiovasc Drugs Ther. – 2013. - №27. – P. 189–198.

109 Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds // Ann Rev Nutr. – 2001. - №21. – P. 381-406.

110 Johnson I.T., Williamson G., Musk S.R. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients? // Nutr Res Rev. – 1994. - №7. – P. 175-204.

111 García-Lafuente A., Guillamón E., Villares A., Rostagno M.A., Martínez J.A. Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease // Inflamm Res. – 2009. - №58. – P. 537-552.

112 Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases // Crit Rev Food Sci Nutr. – 2005. - №45. – P. 287-306.

113 Khan N., Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols // Cancer Lett. – 2008. - №269. – P. 269-280.

114 Sharma V., Rao L.J. A thought on the biological activities of black tea // Crit Rev Food Sci Nutr. – 2009. - №49. – P. 379-404.

115 Ossikbayeva S.O., Orynbayeva Z.S., Tuleukhanov S.T. The mechanism of polyphenolic compounds on prostate cancer // Доклады НАН РК. - 2017. - Т.1, №3117. - С. 23-30.

116 Athar M., Back J.H., Tang X., Kim K.H., Kopelovich L., Bickers D.R., Kim A.L. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention // Toxicol Appl Pharmacol. – 2007. - №224. – P. 274-283.

117 Hewlings S.J., Kalman D.S. Curcumin: a review of its effects on human health // Foods. – 2017. - №6(10). – P. 92-103.

118 Allegra A., Innao V., Russo S., Gerace D., Alonci A., Musolino C. Anticancer activity of curcumin and its analogues: preclinical and clinical studies // Cancer Invest. – 2017. - №35(1). – P. 1-22.

119 Turmeric: The Genus Curcuma / ed. de P.N. Ravindran, K. Nirmal Babu, K. Sivaraman. - Broken, 2007. - P. 82.

120 Shanmugam M.K., Rane G., Kanchi M.M., et al. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment // Molecules. – 2015. - №20(2). – P. 2728-2769.

121 Dou H., Shen R., Tao J. et al. Curcumin suppresses the colon cancer proliferation by inhibiting Wnt/β-catenin pathways via miR-130a // Front Pharmacol. – 2017. - №8. – P. 877.

122 Banik U., Parasuraman S., Adhikary A.K., Othman N.H. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis // J Experiment Clin Cancer Res. – 2017. - №36. – P. 98-114.

123 Bimonte S., Barbieri A., Leongito M., et al. Curcumin anticancer studies in pancreatic cancer // Nutrients. – 2016. - №8(7). – P. 433-445.

124 Epelbaum R., Schaffer M., Vizel B., Badmaev V., Bar-Sela G. Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer // Nutr Cancer. – 2010. - №62(8). –P. 1137-1141.

125 Mahammedi H., Planchat E., Pouget M. et al. The new combination docetaxel, prednisone and curcumin in patients with castration-resistant prostate cancer: a pilot phase II study // Oncology. – 2016. - №90(2). – P. 69-78.

126 Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Br J Cancer. – 1972. - №26. – P. 239–257.

127 Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis // Int Rev Cytol. – 1980. - №68. – P. 251–306.

128 Nicholson D.W., Thornberry N.A. Caspases: killer proteases // Trends Biochem Sci. – 1997. - №22. - P. 299–306.

129 Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // Science. – 1995. - №267. - P. 1456–1462.

130 Fadeel B., Orrenius S., Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? // Biochem Biophys Res Commun. – 1999. - №266. - P. 699–717.

131 Kotha A., Sekharam M., Cilenti L., Siddiquee K., Khaled A., Zervos A.S., Carter B., Turkson J., Jove R. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein // Molecular Cancer Ther. - 2006. - №5. - P. 621-629.

132 Manolova Y., Deneva V. et al. The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach, Spectrochimica Acta Part A // Molecular and Biomolecular Spectroscopy. - 2014. – Vol. 132, №11. – P. 815-820.

133 Gupta S.C., Patchva S., Aggarwal B.B. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials // AAPS J. – 2013. - №15. – P. 195–218.

134 Vaishali B., Sabeena M., Bhaumik B., Adhip P.N. Majumdar.Colorectal cancer: chemopreventive role of curcumin and resveratrol // Nutrition and Cancer. - 2010. - №62(7). - P. 958—967.

135 Dhillon Navneet et al. Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer // Clinical Cancer Research. - 2008. - №14 (14). - P. 4491-4499.

136 Kulkarni S., Dhir A., Akula K.K. Potentials of curcumin as an antidepressant // Scientific World Journal. - 2009. - №9. - P. 1233-1241.

137 Волкова Р. Энциклопедия защиты иммунитета. Имбирь, куркума, шиповник и другие. – М.: АСТ, 2014. - 160 с.

138 Aggarwal B.B., Harikumar K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases // Int. J. Biochem. Cell Biol. -2009. - №41. – P. 40–59.

139 Panahi Y., Hosseini M.S., Khalili N., Naimi E., Simental-Mendia L.E., Majeed M., Sahebkar A. Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in

subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial // Biomed. Pharmacother. – 2016. - №82. – P. 578–582.

140 Kuptniratsaikul V., Dajpratham P., Taechaarpornkul W., Buntragulpoontawee M., Lukkanapichonchut P., Chootip C., Saengsuwan J., Tantayakom K., Laongpech S. Efficacy and safety of Curcuma domestica extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: A multicenter study // Clin. Interv. Aging. – 2014. - №9. - P. 451–458.

141 Mazzolani F., Togni S. Oral administration of a curcumin-phospholipid delivery system for the treatment of central serous chorioretinopathy: A 12-month follow-up study // Clin. Ophthalmol. – 2013. - №7. - P. 939–945.

142 Allegri P., Mastromarino A., Neri P. Management of chronic anterior uveitis relapses: Efficacy of oral phospholipidic curcumin treatment. Long-term follow-up // Clin. Ophthalmol. – 2010. - №4. - P. 1201–1206.

143 Trujillo J., Chirino Y.I., Molina-Jijón E., Andérica-Romero A.C., Tapia E., Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings // Redox Biol. – 2013. - №1. - P. 448–456.

144 Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A., Aggarwal B.B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises // Mol. Pharm. – 2007. - №4. – P. 807–818.

145 Han H.K. The effects of black pepper on the intestinal absorption and hepatic metabolism of drugs. Expert Opin. Drug Metab // Toxicol. – 2011. - №7. - P. 721–729.

146 Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers // Planta Med. – 1998. - №64. – P. 353–356.

147 Ben Z.S., Kolusheva S., Danilenko M., Ossikbayeva S., Stabbert J.W., Poggio L.J., Stein E.D., Orynbayeva Z.S., Jelinek R. Cardiolipin mediates curcumin interactions with mitochondrial membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Biomembranes. – 2019. – Vol. 1861, issue 1. - P. 75-82.

148 Marchiani A., Rozzo C., Fadda A., Delogu G., Ruzza P. Curcumin and curcumin-like molecules: From spice to drugs // Curr. Med. Chem. – 2014. - №21. – P. 204–222.

149 Sahebkar A., Serbanc M.C., Ursoniuc S., Banach M. Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // J. Funct. Foods. – 2015. - №18. – P. 898–909.

150 Banach M., Serban C., Aronow W.S., Rysz J., Dragan S., Lerma E.V., Apetrii M., Covic A. Lipid, blood pressure and kidney update 2013 // Int. Urol. Nephrol. – 2014. - №46. – P. 947–961.

151 Menon V.P., Sudheer A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. - №595. – P. 105–125.

152 Priyadarsini K.I., Maity D.K., Naik G.H., Kumar M.S., Unnikrishnan M.K., Satav J.G., Mohan H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the

free radical reactions and antioxidant activity of curcumin // Free Radic. Biol. Med. – 2003. - №35. – P. 475–484.

153 Biswas S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? Oxid. Med. Cell // Longev. – 2016. - №569. – P. 89-31.

154 Jurenka J.S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: A review of preclinical and clinical research // Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther. – 2009. - №14. – P. 141–153.

155 Recio M.C., Andujar I., Rios J.L. Anti-inflammatory agents from plants: Progress and potential // Curr. Med. Chem. – 2012. - №19. - P. 2088–2103.

156 Na L.X., Li Y., Pan H.Z., Zhou X.L., Sun D.J., Meng M., Li X.X., Sun C.H. Curcuminoids exert glucose-lowering effect in type 2 diabetes by decreasing serum free fatty acids: A double-blind, placebo-controlled trial. Mol // Nutr. Food Res. – 2013. - №57. – P. 1569–1577.

157 Chuengsamarn S., Rattanamongkolgul S., Luechapudiporn R., Phisalaphong C., Jirawatnotai S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes // Diabetes Care. – 2012. - №35. – P. 2121–2127.

158 Bradford P.G. Curcumin and obesity // Biofactors. – 2013. - №39. – P. 78–87.

159 Simona Birtic, Pierre Dussort, Francois-Xavier Pierre, Antoine C. Bily, Marc Roller Carnosic acid // Phytochemistry. - 2015. - №115. - P. 9–19.

160 Hlavackova L., Janegova A., Ulicna O., Janega P., Cerna A., Babal P. Spice up the hypertension diet-Curcumin and piperine prevent remodeling of aorta in experimental L-NAME induced hypertension // Nutr. Metab.- 2011. - №8. – P. 72.

161 Sahebkar A. Are curcuminoids effective C-reactive protein-lowering agents in clinical practice? Evidence from a meta-analysis // Phytother. Res. – 2013. - №28. – P. 633–642.

162 Ak T., Gulcin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin // Chem. Biol. Interact. – 2008. - №174. – P. 27–37.

163 Sahebkar A., Mohammadi A., Atabati A., Rahiman S., Tavallaie S., Iranshahi M., Akhlaghi S., Ferns G.A., Ghayour-Mobarhan M. Curcuminoids modulate pro-oxidant-antioxidant balance but not the immune response to heat shock protein 27 and oxidized LDL in obese individuals // Phytother. Res. – 2013. - №27. – P. 1883–1888.

164 Mohammadi A., Sahebkar A., Iranshahi M., Amini M., Khojasteh R., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G.A. Effects of supplementation with curcuminoids on dyslipidemia in obese patients: A randomized crossover trial // Phytother. Res. - 2013. - №27. – P. 374–379.

165 Disilvestro R.A., Joseph E., Zhao S., Bomser J. Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle-aged people // Nutr. J. – 2012. - №11. – P. 79 // doi: 10.1186/1475-2891-11-79.

166 Sahebkar A. Curcuminoids for the management of hypertriglyceridaemia // Nat. Rev. Cardiol. – 2014. - №11. – P. 123 // doi: 10.1038/nrcardio.2013.140-c1.

167 Soni K.B., Kuttan R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers // Indian J. Physiol. Pharmacol. – 1992. - №36. – P. 273–275.

168 Kuptniratsaikul V., Dajpratham P., Taechaarpornkul W., Buntragulpoontawee M., Lukkanapichonchut P., Chootip C., Saengsuwan J., Tantayakom K., Laongpech S. Efficacy and safety of Curcuma domestica extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: A multicenter study // Clin. Interv. Aging. – 2014. - №9. – P. 451–458.

169 Borrás-Linares I., Stojanovic Z., Quirantes-Piné R., Arráez-Román D., Svarc-Gajic J., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds // Int. J. Mol. Sci. – 2014. - №15. - P. 20585-20606.

170 Логвиненко Л.А., Хлыпенко Л.А., Марко Н.В. Ароматические растения семейства Lamiaceae для фитотерапии // Фармация и фармакология. - 2016. - №4(4). - С. 34-47.

171 Danilenko M., Wang Q., Wang X., Levy J., Sharoni Y., Studzinski G.P. Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in leukemia cells but does not promote elevation of basal levels of intracellular calcium // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63, №6. – P. 1325-1332.

172 Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. – Минск: БГУ, 2004. –179 с.

173 Тохсырова З.М., Никитина А.С., Попова О.И. Изучение антимикробного действия эфирного масла из побегов розмарина лекарственного (Rosmarinus officinalis L., Lamiaceae) // Фармация и фармакология. - 2016. - Т. 4, №1(14). - С. 66-71.

174 Offord E.A. / in: Packer L., Ong C.N., Halliwell B.B., Wachtel-Galor S., Benzie I.F.F. editors. Herbal Medecine and molecular basis of health and disease management: Marcel Dekker. – New York, 2004. – 457 p.

175 Huang S.C., Ho C.T., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun // Biochem Pharmacol. - 2005. - №69(2). – P. 221–232.

176 Johnson J.J. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent // Cancer Lett. – 2011, march – 9. – P.11.

177 Takaki I., Bersani-Amado L.E., Vendruscolo A., Sartoretto S.M., Diniz S.P., Bersani-Amado C.A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Rosmarinus officinalis L. essential oil in experimental animal models // J Med Food. – 2008. - №11(4). – P. 741–746.

178 Lo A.H., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages // Carcinogenesis. -2002. - №23(6). – P. 983–991.

179 Martin D., Rojo A.I., Salinas M., Diaz R., Gallardo G., Alam J. et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol // J Biol Chem. – 2004. - №279(10). – P. 8919–8929.

180 Ossikbayeva S., Tuleukhanov S.T., Danilenko M., Orynbayeva Z. The plant-derived polyphenol carnosic acid arrests cancer cells growth via alteration of mitochondria metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Bioenergetics. – 2016. – Vol. 1857. - P. 112.

181 Anand R., Kunnumakkara A.B., Sundaram C., Harikumar K.B., Tharakan S.T. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes // Pharmacology Research. - 2008. - №25(9). - P. 2097-2116.

182 Bailar J.C., Gornik H.L. Cancer undefeated. New England Journal Medicine. - 1997. - №336(22). - P. 1569-1574.

183 Parker S.L., Tong T., Bolden S., Wingo P.A. Cancer statistics // CA Cancer J Clin. - 1966. - №65. – P. 5-27.

184 Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics // CA Cancer Journal Clinicians. - 2010. - №60. - P. 277-300.

185 Attar R.M., Takimoto C.H., Gottardis M.M. Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes // Clin Cancer Res. – 2009. - №15. - P. 3251-3255.

186 Shen M.M., Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges // Genes Dev. - 2010. - №24. - P. 1967-2000.

187 Trounce I.A., Kim Y.L., Jun A.S., Wallace D.C. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines // Methods Enzymol. - 1996. - №264. – P. 484-509.

188 Кайдарова Д.Р., Ауезова Э.Т., Чингисова Ж.К., Сейсенбаева Г.Т., Ажмагамбетова А.Е., Жылкайдарова А.Ж. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2015 год (статистические материалы). – Алматы, 2016. - 151 с.

189 Нургазиев К.Ш., Байпеисов Д.М., Ауезова Э.Т., Жылкайдарова А.Ж., Сейсенбаева Г.Т. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2014 год (статистические материалы). – Алматы, 2015.- 126 с.

190 Кайдарова Д.Р., Чингисова Ж.К., Шатковская О.В., Сейсенбаева Г.Т., Ажмагамбетова А.Е., Жылкайдарова А.Ж., Лаврентьева И.К., Саги И.К. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2018 год (статистические материалы). – Алматы, 2018.- 117 с.

191 Bruchovsky N., Snoek R., Rennie P.S., Akakura K, Goldenberg S.L, Gleave M. Control of tumor progression by maintenance of apoptosis // Prostate. – 1996. - №28, supple 6. - P. 13-21.

192 Koivisto P., Visakorpi T., Rantala I., Isola J. Increased cell proliferation activity and decreased cell death are associated with the emergence of hormone-refractory recurrent prostate cancer // J Pathol. - 1997. - №183. - P. 51-56.

193 Palmberg C., Rantala I., Tammela T.L., Helin H., Koivisto P.A. Low apoptotic activity in primary prostate carcinomas without response to hormonal therapy // Oncol Rep. - 2000. - №7. - P. 1141-1144.

194 Hsing A.W., Chokkalingam A.P. Prostate cancer epidemiology // Frontiers in Bioscience. - 2006. - №11. - P. 1388–1413.

195 Hankey B.F., Feuer E.J., Clegg L.X., Hayes R.B., Legler J.M., Prorok P.C., Ries L.A., Merrill R.M., Kaplan R.S. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer-part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates // J Natl Cancer Inst. - 1999. - №91 (12). - P.1017–1024.

196 Breslow N., Chan C.W., Dhom G., Drury R.A., Franks L.M., Gellei B., Lee Y.S., Lundberg S., Sparke B., Sternby N.H., Tulinius H. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France // Int J Cancer. - 1977. - №20 (5). – P. 680–688.

197 Zeegers M.P., Jellema A., Ostrer H. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis // Cancer. - 2003. - №97 (8). – P. 1894–1903.

198 Martin R.M., Vatten L., Gunnell D., Romundstad P. Blood pressure and risk of prostate cancer: cohort Norway (CONOR) // Cancer Causes Control. - 2010. - №21 (3). - P. 463–472.

199 Friedenreich C.M., Neilson H.K., Lynch B.M. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention // European journal of cancer (Oxford, England: 1990). - 2010. - №46 (14). - P. 2593–2604.

200 Struewing J.P., Hartge P., Wacholder S., Baker S.M., Berlin M., McAdams M., Timmerman M.M., Brody L.C., Tucker M.A. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews // N. Engl. J. Med. - 1997. - №336 (20). - P. 1401–1408.

201 Grönberg H. Prostate cancer epidemiology // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 859-864.

202 Haas G.P., Sakr W.A. Epidemiology of prostate cancer // CA Cancer. J. Clin. – 1997. – Vol. 47. – P. 273-287.

203 Hsing A.W., Chokkalingam A.P. Prostate cancer epidemiology // Front Biosci. – 2006. – Vol. 11. – P. 1388-1413.

204 Абоян И.А., Бадьян К.И., Галстян А.М., Лемешко С.И., Кравцова О.В. Морфологические и иммуногистохимические предикторы рецидива рака предстательной железы после HIFU // Материалы XIII международного конгресса российского общества онкоурологов. – М., 2018. - С. 13.

205 Борщ В.Ю., Варенпов Г.И., Захматов Ю.М. и соавт. Трансуретральная резекция при раке предстательной железы // Материалы Пленума Правления российского общества урологов. - М., 1999.- С. 212-214.

206 Стадии и степени развития рака предстательной железы. – Гономед, 2018 // https://genomed.ru/rak-predstatelnoj-zhelezy (дата обращения:14.11.2018).

207 Осикбаева С.О., Панов А.В., Орынбаева З.С., Тулеуханов С.Т. Метаболические особенности митохондрий клеток рака предстательной железы. V съезд физиологов СНГ // Научные труды. – Сочи; Дагомыс, 2016. - Т.1. - С. 98-99.

208 Quinn M., Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. International comparisons // BJU Int. – 2002. - №90(2), part 1. – P. 162–73.

209 Копыльцов Е. И., Новиков А. И., Косенок В. К., Леонов О. В., Голубь Н. Н., Акулинин В. А., Jacqmin D., Massard G. Онкологические заболевания органов мочеполовой системы. - Омск: Изд-во Центра МО и ИТ Омской гос. мед. академии, 2008. - 197 с.

210 Karhadkar S.S., Bova G.S., Abdallah N. et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis // Nature. – 2004. - №431. – P. 707–712.

211 Mimeault M., Pommery N., Henichart J.P. New advances on prostate carcinogenesis and therapies: involvement of EGF-EGFR transduction system // Growth Factors. – 2003. - №21. – P. 1–14.

212 Olsen C.L., Hsu P.P., Glienke J. et al. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors // BMC Cancer. – 2004. - №4. – P. 43.

213 Zhu H., Mazor M., Kawano Y. et al. Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor // Cancer Res. – 2004. - №64. – P. 7918–7926.

214 De Clercq E. Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100 // Mini Rev Med Chem. – 2005. - №5. - P. 805–824.

215 Mann J.R., Backlund M.G., DuBois R.N. Mechanisms of disease: Inflammatory mediators and cancer prevention // Nat Clinical Practice Oncology. - 2005. - №2. - P. 202–210.

216 Neiva K., Su Y.X. The Role of Osteoblasts in Regulating Hematopoietic Stem Cell Activity and Tumor Metastasis Brazilian // Journal of Medical and Biological Research. - 2005. - №38 (10). - P. 1449-1454.

217 Жаманбаева Г.Т., Мурзахметова М.К., Тулеуханов С.Т., Даниленко М.П. Противораковое действие этанольного экстракта листьев облепихи на клетки острой миелоидной лейкемии человека in vitro // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. -№8. - С. 221-224.

218 Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis // Science. – 1998. - №281. – P. 1309-1312.

219 Patergnani S., Suski J.M., Agnoletto C., Bononi A., Bonora M. et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs) // Cell Commun Signal. – 2010. - №9. – P. 19.

220 Kroemer G., Zamzami N., Susin S.A. Mitochondrial control of apoptosis // Immunol Today. – 1997. - №18. – P. 44-51.

221 Bossy-Wetzel E., Green D.R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier // Mutat Res. – 1999. - №434. – P. 243-251.

222 Tsujimoto Y., Nakagawa T., Shimizu S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death // Biochim Biophys Acta. – 2006. - №1757. – P. 1297-1300.

223 Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? // Genes Cells. – 1998. - №3. – P. 697-707.

224 Saeed B., Zhang H., Ng S.C. Apoptotic program is initiated but not completed in LNCaP cells in response to growth in charcoal-stripped media // Prostate. – 1997. - №31. – P. 145-152.

225 Rokhlin O.W., Bishop G.A., Hostager B.S., Waldschmidt T.J., Sidorenko S.P. et al. Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines // Cancer Res. – 1997. - №57. – P. 1758-1768.

226 Pantazis P., Chatterjee D., Wyche J., DeJesus A., Early J. et al. Establishment of human prostate tumor xenografts in nude mice and response to 9-nitrocamptothecin in vivo and in vitro does not correlate with the expression of various apoptosis-regulating proteins // J Exp Ther Oncol. – 1996. - №1. – P. 322-333.

227 Zhang H., Hoang T., Saeed B., Ng S.C. Induction of apoptosis in prostate tumor cells line DU145 by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinases // Prostate. – 1996. - №29. – P. 69-76.

228 Castilla C., Congregado B., Chinchon D., Torrubia F.J., Japon M. et al. BclX L is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak // Endocrinology. – 2006. - №147. – P. 4960-4967.

229 Marcelli M., Marani M., Li X., Sturgis L., Haidacher S.J., Trial J.A. et al. Heterogeneous apoptotic responses of prostate cancer cell lines identify an association between sensitivity to staurosporine-induced apoptosis, expression of Bcl-2 family members, and caspase activation // Prostate. – 2000. - №42. – P. 260-273.

230 Herrmann J.L., Briones F.Jr., Brisbay S., Logothetis C.J., McDonnell T.J. Prostate carcinoma cell death resulting from inhibition of proteasome activity is independent of functional Bcl-2 and p53 // Oncogene. – 1998. - №17. – P. 2889-2899.

231 Lebedeva I., Rando R., Ojwang J., Cossum P., Stein C.A. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity // Cancer Res. – 2000. - №60. – P. 6052-6060.

232 Kang B.H., Siegelin M.D., Plescia J., Raskett C.M., Garlick D.S. et al. Preclinical characterization of mitochondria-targeted small molecule hsp90 inhibitors, gamitrinibs, in advanced prostate cancer // Clin Cancer Res. – 2010. - №16. – P. 4779-4788.

233 Scorrano L., Petronilli V., Bernardi P. On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal // J Biol Chem. – 1997. - №272. – P. 12295-12299.

234 Chauvin C., De Oliveira F., Ronot X., Mousseau M., Leverve X. et al. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells // J Biol Chem. – 2001. - №276. – P. 41394-41398.

235 Fontaine E., Ichas F., Bernardi P.A. Ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore // J Biol Chem. – 1998. - №273. – P. 25734-25740.

236 Panov A.V., Andreeva L., Greenamyre J.T. Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: Two modes of action of mPTP modifiers // Arch Biochem Biophys. – 2004. - №424. – P. 44-52.

237 Joshi B., Li L., Taffe B.G., Zhu Z., Wahl S. et al. Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain // Cancer Res. – 1999. - №59. – P. 4343-4355.

238 Hail N.Jr., Chen P., Kepa J.J. Selective apoptosis induction by the cancer chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl)retinamide is achieved by modulating mitochondrial bioenergetics in premalignant and malignant human prostate epithelial cells // Apoptosis. – 2009. - №14. – P. 849-863.

239 Ben Sahra I., Laurent K., Giuliano S., Larbret F., Ponzio G. et al. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells // Cancer Res. – 2010. - №70. – P. 2465-2475.

240 Costello L.C., Franklin R.B. Concepts of citrate production and secretion by prostate. 1. Metabolic relationships // Prostate. – 1991. - №18. – P. 25-46.

241 De Bari L., Chieppa G., Marra E., Passarella S. L-lactate metabolism can occur in normal and cancer prostate cells via the novel mitochondrial L-lactate dehydrogenase // Int J Oncol. – 2010. - №37. – P. 1607-1620.

242 Effert P.J., Bares R., Handt S., Wolff J.M., Büll U. et al. Metabolic imaging of untreated prostate cancer by positron emission tomography with 18fluorine-labeled deoxyglucose // J Urol. – 1996. - №155. – P. 994-998.

243 Hofer C., Laubenbacher C., Block T., Breul J., Hartung R. et al. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography is useless for the detection of local recurrence after radical prostatectomy // Eur Urol. – 1999. - №36. – P. 31-35.

244 Liu Y., Zuckier L.S., Ghesani N.V. Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach // Anticancer Res. – 2010. - №30. – P. 369-374.

245 Bourdeau-Heller J., Oberley T.D. Prostate carcinoma cells selected by long-term exposure to reduced oxygen tension show remarkable biochemical plasticity via modulation of superoxide, HIF-1alpha levels, and energy metabolism // J Cell Physiol. – 2007. - №212. – P. 744-752.

246 Higgins L.H., Withers H.G., Garbens A., Love H.D., Magnoni L. et al. Hypoxia and the metabolic phenotype of prostate cancer cells // Biochim Biophys Acta. – 2009. - №1787. – P. 1433-1443.

247 Wirmer J., Westhof E. Molecular contacts between antibiotics and the 30S ribosomal particle // Methods Enzymol. – 2006. - №415. – P. 180-202.

248 Davey P.J., Haslam J.M., Linnane A.W. Biogenesis of mitochondria. 12. The effects of aminoglycoside antibiotics on the mitochondrial and cytoplasmic protein-synthesizing systems of Saccharomyces cerevisiae // Arch Biochem Biophys. – 1970. - №136. –P. 54-64.

249 Avadhani N.G., Buetow D.E. Protein synthesis with isolated mitochondrial polysomes // Biochem Biophys Res Commun. – 1972. - №46. - P. 773-778.

250 Mao P., Nakao K., Angrist A. Human prostatic carcinoma: An electron microscopic study // Cancer Res. – 1966. - №26. – P. 955-973.

251 Horoszewicz J.S., Leong S.S., Kawinski E., Karr J.P., Rosenthal H. et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma // Cancer Res. – 1983. - №43. – P. 1809-1818.

252 Hochachka P.W., Rupert J.L., Goldenberg L., Gleave M., Kozlowski P. Going malignant: the hypoxia-cancer connection in the prostate // Bioessays. – 2002. - №24. – P. 749-757.

253 Baggetto LG Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells // Biochimie. – 1992. - №74. – P. 959-974.

254 Moreno-Sánchez R., Rodríguez-Enríquez S., Marín-Hernández A., Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells // FEBS J. - 2007. - №274. - P. 1393-1418.

255 Ishikawa K., Takenaga K., Akimoto M., Koshikawa N., Yamaguchi A. et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis // Science. – 2008. - №320. – P. 661-664.

256 Kaighn M.E., Narayan K.S., Ohnuki Y., Lechner J.F., Jones L.W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3) // Invest Urol. – 1979. - №17.- P. 16-23.

257 Stone K.R., Mickey D.D., Wunderli H., Mickey G.H., Paulson D.F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145) // Int J Cancer. – 1978. - №21. – P. 274-281.

258 Panov A., Orynbayeva Z. Bioenergetic and Antiapoptotic Properties of Mitochondria from Cultured Human Prostate Cancer Cell Lines PC-3 // DU145 and LNCaP PLoS One. – 2013. - №8(8). – P. 720-78.

259 Pedersen P.L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells // Prog Exp Tumor Res. - 1978. - №22. - P.190-274.

260 Costello L.C., Liu Y., Franklin R.B., Kennedy M.C. Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells // J Biol Chem. - 1997. - №272. - P. 28875-28881.

261 Costello L.C., Liu Y., Zou J., Franklin R.B. Mitochondrial aconitase gene expression is regulated by testosterone and prolactin in prostate epithelial cells // Prostate. - 2000. - №42. - P. 196-202.

262 Sartor C.I. Mechanisms of disease: Radiosensitization by epidermal growth factor receptor inhibitors // Nat Clin Pract Oncol. - 2004. - №1. - P. 80–87.

263 Sun Y.X., Schneider A., Jung Y. et al. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12) CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo // J Bone Miner Res. - 2005. - №20. - P. 318–329.

264 Stone K.R., Mickey D.D., Wunderli H., Mickey G.H., Paulson D.F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145) // Int J Cancer. - 1978. - №21. - P. 274-281.

265 Kaighn M.E., Narayan K.S., Ohnuki Y., Lechner J.F., Jones L.W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3) // Invest Urol. - 1979. - №17. - P. 16-23.

266 Wallace D.C. Structure and evolution of organelle DNA // In: Endocytobiology. – Berlin; New York: Walter de Gruyter & Co, 1983. - Vol. 2. - P.87-100.

267 O'Brien J., Wilson I., Orton T. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Äluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267, №17. – P.5421-5426.

268 Moscho A., Orwar O., Chiu D.T., Modi B.P, Zare R.N., Rapid preparation of giant unilamellar vesicles // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. - №93. – P. 11443-11447.

269 Panov A.V., Lund S., Greenamyre J.T. Ca2+-induced permeability transition in human lymphoblastoid cell mitochondria from normal and Huntington's disease individuals // Mol Cell Biochem. - 2005. - №269. - P. 143-152.

270 Gnaiger E., Kuznetsov A., Schneeberger S. Mitochondria in the cold // In: Heldmaier G., Klingenspor M. editors. Life in ine Cold. – Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 2000. - P. 431-442.

271 Gnaiger E., Steinlechner-Maran R., Mendez G., Eberl T., Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen // J Bioenerg Biomembr. – 1995. - №27. - P. 583–596.

272 Pesta D., Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle // Methods Mol Biol. - 2012. - №1. - P. 25–58.

273 Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function / in: Dykens J.A., Will Y., editors. Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity. – Wiley, 2008. - P. 27–352.

274 Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types // Pharmacogn. Rev. – 2014. - №8 (16). – P. 122–146.

275 Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human htalth and disease // Oxid. Med. Cell. Long. – 2009. - №2(5). – P. 270–278.

276 Жаманбаева Г.Т., Мурзахметова М.К., Тулеуханов С.Т., Жапаркулова Н.И. Противоопухолевые эффекты растительных полифенолов // Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан. - 2016. - №3. - С. 108-115.

277 de Kok T.M., van Breda S.G., Manson M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review // Eur J Nutr. - 2008. - №47, suppl 2. – P. 51–59.

278 Mertens-Talcott S.U., Percival S.S. Extractsfrom red muscadine and cabernet sauvignon wines induce cell death in Food Chemistry. – London, 2008. – P. 824-832.

279 Ghosh A.K., Kay N.E., Secreto C.R., Shanafelt T.D. Clin Curcumin inhibits prosurvival pathways in chronic lymphocytic leukemia B cells and may overcome their stromal protection in combination with EGCG // Cancer Res. – 2009. - №15. - P. 1250–1258.

280 Wang Z., Desmoulin S., Banerjee S., Kong D., Li Y. et al. Synergistic effects of multiple natural products in pancreatic cancer cell // Life Sci. – 2008. - №83. - P. 293–300.

281 Mondal S., Ghosh S., Moulik S.P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study // J Photochem Photobiol B. - 2016. - №158. - P. 212-218.

282 Sun Y., Lee C.C., Hung W.C., Chen F.Y., Lee M.T., Huang H.W. The bound states of amphipathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin // Biophys J. – 2008. – №95. – P. 2318-2324.

283 Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A., Aggarwal B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises // Mol Pharm. – 2007. - №4. - P. 807-818.

284 Lee C. Tightly coupled beef heart submitochondrial particles // Methods Enzymol. - 1979. - №55. – P. 105-112.

285 Sreejayan N., Rao M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids // Arzneimittelforschung. – 1996. - №46. - P. 169-171.

286 Lally C.C., Bauer B., Selent J., Sommer M.E. C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor // Nat Commun. - 2017. - №8. - P. 14258.

287 Akinloye O., Adaramoye O., Kareem O. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation in Nigerian patients with prostate carcinoma // Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej. - 2009. - №1. - P. 526–532.

288 Ragione F.D., Cucciolla V., Borriello A., Pietra V.D., Racioppi L., Soldati G., Manna C., Galletti P., Zappia V. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition // Biochemical and Biophysical Research Communications. - 1998. - №250. - P. 53-58.

289 Park J.W., Choi Y.J., Jang M.A., Lee Y.S., Jun D.Y., Suh S.I., Baek W.K., Suh M.H., Jin I.N., Kwon T.K. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells // Cancer Letters. - 2001. - №163. - P. 43-49.

290 Raina K., Singh R.P., Agarwal R., Agarwal C. Oral grape seed extract inhibits prostate tumor growth and progression in TRAMP mice // Cancer Res. – 2007. - №67(12). – P. 5976-5982.

291 Liu K.C., Yen C.Y., Wu R.S., Yang J.S., Lu H.F., Lu K.W., Lo C., Chen H.Y., Tang N.Y., Wu C.C., Chung J.G. The roles of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic signaling pathway in quercetin-mediated cell death of human prostate cancer PC-3 cells // Environ Toxicol. – 2014. - №29(4). - P. 428-39.

292 Муравлёва Л.Е., Сирота В.Б., Жумакаева С.С., Понамарева О.А., Кабилдина Н.А., Клюев Д.А. Окислительный стресс при раке молочной железы // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – №1. – С. 15.

293 Panov A., Dikalov S., Shalbuyeva N., Hemendinger R., Greenamyre J.T., Rosenfeld J. Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007. - №292(2). - P. 708-718.

294 Murphy M.P. How mitochondria produce reactive species // Biochem Journal. - 2009. - №417, part 1. - P. 1–13.

295 Willcox J.K., Ash S.L., Catignani G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease // Crit Rev Food Sci Nutr. – 2004. - №44(4). - P. 275-295.

296 Mishra A., Sharma A.K., Kumar S., Saxena A.K., Pandey A.K. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities // Biomed Res Int. – 2013. – №1. - P. 915 - 936.

297 Jung K.H., Lee J.H., Quach C.H.T. et al. Resveratrol suppresses cancer cell glucose uptake by targeting reactive oxygen species-mediated hypoxia-inducible factor-1α activation // Journal of Nuclear Medicine. - 2013. - Vol. 54, №12. - P. 2161–2167.

298 Li N., Sun C., Zhou B. et al. Low concentration of quercetin antagonizes the cytotoxic effects of anti-neoplastic drugs in ovarian cancer // PLoS ONE. - 2014. - Vol. 9, №7. – P. 314.

299 Zhou P., Xie W., Sun Y., Dai Z., Li G., Sun G., Sun X. Ginsenoside Rb1 and mitochondria: A short review of the literature // Mol Cell Probes. – 2019. - №43. - P. 1-5.

300 Zhunussova A., Irgebayeva Zh., Sen B., Friedman L., Ossikbayeva S., Tuleukhanov S., Brooks A., Sensenig R., Orynbayeva Z. Tumor promoting activity of SLC13A3 in metastatic prostate cells // Fourth AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research. AACR. - Philadelphia; USA, 2015. – P. 76-77.

301 Jiang K., Wang W., Jin X., Wang Z., Ji Z., Meng G. Silibinin, a natural flavonoid, induces autophagy via ROS-dependent mitochondrial dysfunction and loss of ATP involving BNIP3 in human MCF7 breast cancer cells // Oncol. Rep. – 2015. - №33. - P. 2711–2718.

302 Zhao Q., Huo X.C., Sun F.D., Dong R.Q. Polyphenol-rich extract of Salvia chinensis exhibits anticancer activity in different cancer cell lines, and induces cell cycle arrest at the G0/G1-phase, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential in pancreatic cancer cells // Molecular medicine reports. - 2015. - №12. - P. 4843-4850.

303 Gómez de M., Vargas T., Madrona A., Jiménez A., Pérez-Pérez M.J., Quintela J.C., Reglero G., San-Félix A., Ramírez de Molina A. Novel

Polyphenols That Inhibit Colon Cancer Cell Growth Affecting Cancer Cell Metabolism // J Pharmacol Exp Ther. – 2018. - №366(2). - P. 377-389.

304 Martin M., Goya L., Ramos S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer // Food and Chemical Toxicology. – 2013. - №56. - P.336-351.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

АКТ

внедрения новых методов с использованием полифенолов природного происхождения и их действие на раковые клетки простаты
в Казахском НИИ онкологии и радиологии

Наименование предложения: Применение флуоресцентных красителей (Аламар синий и Кристаллический фиолетовый) для определения цитотоксичности и эффективности доз полифенолов природного происхождения – куркумина и розмарина (в отдельности и в комбинации) при воздействии на нормальные и раковые клетки простаты (методы применялись в работе докторанта Осикбаевой С.О. на тему: «Механизмы действия полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм раковых клеток простаты»).

Форма внедрения: Проведение Мастер – класса с презентацией и практическим занятием с использованием животных, где Осикбаева С.О. представила методы определения цитотоксичности и эффективности различных доз полифенолов природного происхождения in vitro и in vivo при трансплантации клеток различных опухолевых штаммов на животных (крысы, мыши) для обучения молодых сотрудников и резидентов КазНИИ онкологии и радиологии.

Ответственные за внедрение: PhD докторант КазНУ имени аль-Фараби - Осикбаева С.О. (Казахстан), д.б.н., профессор, заведующий кафедрой «Биофизики и биомедицины» КазНУ им. Аль-Фараби - Тулеуханов С.Т. (Казахстан), PhD, профессор, заведующая лабораторией «Патофизиологии митохондрий» Дрексельского Университета - Орынбаева З.С. (США), д.б.н., ученый секретарь КазНИИ онкологии и радиологии - Гончарова Т.Г. (Казахстан), заведующий банком опухолевых штаммов КазНИИ онкологии и радиологии – Красноштанов В.К. (Казахстан).

Эффективность внедрения: Использование цитотоксических методов, с применением флуоресцентных красителей (Аламар синий и Кристаллический фиолетовый) при проведении экспериментальных исследований, даст возможность определять метаболические и численные показатели выживших клеток при воздействии различных препаратов и полифенолов природного происхождения.

Срок внедрения: 13-14 апреля 2017г.

Ответственные за внедрение: Осикбаева С.О.
Тулеуханов С.Т.
Орынбаева З.С.
Гончарова Т.Г.
Красноштанов В.К.

480012, г. Алма-Ата, проспект Абая, 91 КазНИИ онко. орган и радио. отд.
12-2017

Зам. директора по научной работе, к.м.н. Адилбай Д.Г.

Акт
внедрения разработанных и утвержденных СОПа «Определение цитотоксичности клеток с использованием красителя Аламар синего» в Казахском НИИ онкологии и радиологии

Наименование предложения: Внедрение метода определения цитотоксичности клеток с использованием красителя Аламар синего – СОП.

Форма и сущность внедрения: Проведение презентации и практических занятий, по применению СОПа «Определение цитотоксичности клеток с использованием красителя Аламар синего» по исследованиям:

Определение цитотоксичности клеток при различном воздействии. Краситель Аламар синий дает возможность определения метаболических живых клеток при воздействий каких – либо препаратов и выявление их цитотоксичности. Внедрение в организацию работы в лаборатории «Центр молекулярно-генетических исследований» по определению цитотоксичности методом Аламар синего.

Область применения: Цитотоксичность определяется in vivo и in vitro в доклинических исследованиях, а также при определении воздействия разных препаратов на клетки (in vivo) и на животных (in vitro) в разных концентрациях.

Ответственные за внедрение: Оразгалиева М.Г. – к.м.н., заведующая «Центра молекулярно – генетических исследований» КазНИИ онкологии и радиологии, Осикбаева С.О. – специалист «Центра молекулярно – генетических исследований» КазНИИ онкологии и радиологии, Гончарова Т.Г. – д.б.н., ученый секретарь КазНИИ онкологии и радиологии.

Эффективность внедрения: Внедрение СОПа «Определение цитотоксичности клеток с использованием красителя Аламар синего» позволит определять цитотоксичность in vivo и in vitro в доклинических исследованиях при разработке новых противоопухолевых препаратов, а также при других научных исследованиях, где необходимо определить цитотоксичность применяемых фитопрепаратов и препаратов химического происхождения.

Срок внедрения: январь – март 2019г.

Ответственные за внедрение: Оразгалиева М.Г.
Осикбаева С.О.
Гончарова Т.Г.

"ҚАЗАҚ ОНКОЛОГИЯ ЖӘНЕ РАДИОЛОГИЯ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ" АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ
2019

Акт
внедрения разработанного и утвержденного СОПа «Определение цитотоксичности колонии клеток с использованием красителя Кристаллического фиолетового»
в Казахском НИИ онкологии и радиологии

Наименование предложения: Внедрение метода определения цитотоксичности колонии клеток с использованием красителя Кристаллического фиолетового – СОП.

Форма и сущность внедрения: Форма внедрения – проведение презентации и практических занятий в «Центре молекулярно – генетических исследовании» КазНИИОиР, по применению СОПа «Определение цитотоксичности колонии клеток с использованием красителя Кристаллического фиолетового».

Сущность внедрения:

- Определение цитотоксичности колонии клеток in vitro при различном воздействии. Краситель кристаллический фиолетовый дает возможность посчитать количество живых клеток при воздействии каких – либо препаратов и выявить их цитотоксичность.
- Организация работы в лаборатории «Центр молекулярно-генетических исследований» по определению цитотоксичности методом Кристаллического фиолетового.

Область применения: Цитотоксичность колонии in vitro в доклинических исследованиях, а также при определении воздействия различных препаратов на колонии клеток на разных концентрациях в течении 10 дней.

Ответственные за внедрение: Оразгалиева М.Г. – к.м.н., заведующая «Центра молекулярно – генетических исследований» КазНИИ онкологии и радиологии, Осикбаева С.О. – специалист «Центра молекулярно – генетических исследований» КазНИИ онкологии и радиологии, Гончарова Т.Г. – д.б.н., ученый секретарь КазНИИ онкологии и радиологии.

Эффективность внедрения: Внедрение СОПа «Определение цитотоксичности колонии клеток с использованием красителя Кристаллического фиолетового» позволит определять цитотоксичность in vitro в доклинических исследованиях при разработке новых противоопухолевых препаратов, а также при других научных исследованиях, где необходимо определить цитотоксичность применяемых фитопрепаратов и препаратов химического происхождения в течении длительного времени воздействия.

Срок внедрения: январь – март 2019г.

Ответственные за внедрение: Оразгалиева М.Г.
Осикбаева С.О.
Гончарова Т.Г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

СОГЛАСОВАНО
Проректор по
научно-инновационной
деятельности
_____Рамазанов Т.С.
«_____»_____20__ г.

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе,
председатель комиссии
_____Хикметов А.К.
_____20__ г.

АКТ
о внедрении завершенной научно-исследовательской работы (этапа) в учебный процесс

Комиссия Казахского национального университета имени аль-Фараби в составе: председатель: Хикметов А.К. - проректор по учебной работе, члены: директор департамента по академическим вопросам Мухитдинова Т.М., директор департамента по науке и инновационной деятельности Мухамбетжанов С.К., директор УПиСУП Байгараев Н.А., декан факультета биологии и биотехнологии, председатель методбюро факультета биологии и биотехнологии Кулбаева М.С., заведующий кафедрой биофизики и биомедицины Тулеуханов С.Т. составили настоящий акт о том, что в 2017/2018 учебном году на кафедре биофизики и биомедицины внедрены результаты научно-исследовательской работы докторанта Осикбаевой С.О. на тему: «Механизм действия куркумина на митохондриальный метаболизм нормальных и раковых клеток простаты», выполненной по теме PhD «Механизм действия полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм интактных и раковых клеток простаты» (2014-2017 гг.), научный руководитель д.б.н., профессор: Тулеуханов С.Т.

№ п/п	Форма внедрения (наименование нового курса, спецкурса, раздела лекции, лаб.работы, установки, учебные пособия и т.п.); кур, специальность	Объем внедрения (количество работ, лекционных часов)	Краткое содержание внедренной работы
1	Результаты НИР «Механизм действия куркумина на митохондриальный метаболизм нормальных и раковых клеток простаты» внедрены в курс «Основы физиологии животных», 3 кредита, 2 курс бакалавриат по специальности - Биотехнология.	Лекция – 2 часа «Механизмы воздействия полифенолов природного происхождения, а именно куркумина на митохондриальный метаболизм нормальных и раковых клеток простаты».	Установлены метаболические особенности митохондрий раковых клеток простаты на уровне целостной клетки в сравнении с нормальными клетками простаты при воздействии полифенолов

			природного происхождения.

Материалы к настоящему акту рассмотрены на заседании методического бюро факультета биологии и биотехнологии (протокол № 3 от 24.10 2018 г.)

Члены комиссии:

Директор департамента по академическим вопросам _____ Мухитдинова Т.М.

Директор департамента по науке и инновационной деятельности работе _____ Мухамбетжанов С.К.

Управление методической работы и образавательных технологии _____ Саксенбаева Ж.С.

Декан факультета биологии и биотехнологии _____ Заядан Б.К.

Председатель методбюро факультета биологии и биотехнологии _____ Кулбаева М.С.

Заведующий кафедры биофизики и биомедицины _____ Тулеуханов С.Т.