РЕЦЕНЗИЯ

на диссертационную работу Осикбаевой Сании Омирхановны на тему «Механизмы действия полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм интактных и раковых клеток простаты» по специальности 6D060700 – Биология

1. Актуальность темы исследования и ее связь с общенаучными и общегосударственными программами.

Рак предстательной железы (РПЖ) является медленно, но прогрессивно развивающимся заболеванием, которое с течением времени и при достаточной продолжительности жизни больного приводит к появлению клинических симптомов и смерти.

Ежегодно в мире выявляется 500 тыс. новых случаев и около 200 тыс. человек каждый год умирает от РПЖ.

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.

Исследование связи между потреблением полифенолов и риском развития рака предстательной железы представляет особый интерес. Это связано с тем, что в Японии, занимающей первое место в мире по потреблению зеленого чая, содержащего комплекс полифенолов, на душу населения, заболеваемость раком предстательной железы, сравнительно невелика (в 10 раз меньше, чем в США) (Kikuchi N., Ohmori K. Shimazu T. et al., 2006)

В сравнительно небольшом (30 больных и 274 человека в контрольной группе) исследовании связи потребления зеленого чая с возникновением рака предстательной железы, проведенном в Китае, выявлено что потребление зеленого чая около 1 литра снизило риск рака предстательной железы (Jian L., Xie L., Lee A et al. 2004).

В связи, с вышеизложенным, выбор использования полифенолов в лечении РПЖ вполне обоснован.

Изучение механизмов воздействия полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм раковых и нормальных клеток простаты позволит разработать терапевтические подходы 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.

Проведенные другими авторами научные исследования в условиях in vitro и in vivo явились доказательствами эффективности куркумина против рака предстательной железы, также проводились исследования, направленные на разработку куркумина в виде наночастиц, благодаря чему его биодоступность может быть усилена для предотвращения или уменьшения развития рака предстательной железы.

Совместно с куркумином, были исследования воздействия карназоловой кислоты на клетки организма. Карназоловая кислота обладает эффективными противораковыми свойствами, значительными ингибирующими и цитотоксическими свойствами в клеточных линиях рака простаты метастазируемых в мозг, что снижает жизнеспособность клеток. Также карнозоловая кислота предотвращает окисление липопротеинов низкой плотности в эндотелиальных клетках аорты человека и опосредованный липидгидропероксидом окислительный стресс в клетках Caco-2. Происходит ингибирование процессов перекисного окисления липидов при воздействии карназоловой кислоты в микросомах печени крысы и фосфолипидных липосомах головного мозга. Проводились всесторонние исследование антиоксидантной активности карназоловой кислоты in vitro.

Следовательно, современным 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.

В этой связи тема исследования является актуальной и направлена на изучение возможностей комбинированной противоопухолевой фитотерапии, сочетающей в себе препараты с различными механизмами действия.

2. Научные результаты и их обоснованность.

Весь объем работы по данному исследованию выполнен самим докторантом при научном консультировании доктора биологических наук, профессора Тулеуханова С.Т. и PhD, профессора Орынбаевой З.С.

Диссертационная работа поддерживалась фондами «Cornelius Beukenkamp» (2014-2015г.г.), «Louise» и «Bessie Stein Fellowship» (2014- 2015гг.) 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.).

Тема диссертации, цель и задачи, соотношение их с дизайном исследования и методологической основой, практический выход, подтверждают соответствие исследования специальности 6D060700 – Биология.

Результаты, достигнутые докторантом, нашли отражение в положениях выносимых на защиту и соответствуют требованиям Правил присуждения ученых степеней, утвержденных Приказом Министра Образования и науки Республики Казахстан от 13 мая 2011 года №6951.

Научная новизна включает 5 пунктов, в которых отражены основные достижения, полученные диссертантом. Выводы исследования основаны на продуманной тактике и современных методах исследования (культивирование клеток in vitro, флуоресцентная спектроскопия, проточная цитометрия, респирометрия, конфокальная микросопия и т.д.).

По итогам научной работы разработаны и успешно внедрены новые методы с использованием полифенолов природного происхождения, СОПы «Определение

цитотоксичности клеток с использованием красителя Аламар синего», «Определение цитотоксичности колонии клеток с использованием красителя кристаллического фиолетового» в Казахском НИИ онкологии и радиологии.

Материалы диссертационной работы доложены и обсужденным на 10 международных и республиканских форумах, что подтверждает достоверность данного труда.

Основные положения исследования изложены в следующих результатах:

1. 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.

3. Степень обоснованности и достоверности каждого научного результат (положения), выводы и заключения соискателя, сформулированных в диссертации.

Результатом диссертационного исследования явилось определение: 5

пунктов научной новизны и 5 положений, 6 выводов, что соответствует 5 поставленным задачам исследования.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов диссертационной работы обусловлена проведенными автором методами исследования, включающими: определение цитотоксичности с применением красителей аламар синего и кристаллического фиолетового, конфокальную микроскопию и флуоресценцию куркумина, высокоточный респирометрический анализ, оценку мембранного потенциала митохондрии, определение клеточного цикла, определение механизмов апоптоза, измерение окислительного стресса, а также статистическую обработку полученных данных.

Клетки простаты человека для исследования 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.).

Новизна исследовательской работы заключается в следующем:

- Научная новизна №1 связана с тем, что сравнительное изучение действия полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты на раковые и нормальные клетки простаты проведено впервые.
- Научная новизна №2 основана на изучении противоопухолевой активности комбинированного действия куркумина и карназоловой кислоты на митохондриальный метаболизм раковых и нормальных клеток простаты: мембранный потенциал и окислительный стресс митохондрий.
- Научная новизна №3 обусловлена взаимным синергетическим действием куркумина и карназоловой кислоты, что доказано в экспериментах in vitro.
- Научная новизна №4 основана на изучении что комбинаторного действия полифенолов природного происхождения куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5мкМ на дыхание раковых клеток простаты.
- Научная новизна №5 получена при исследовании особенностей клеточных циклов раковых клеток простаты при комбинированном воздействии полифенолов природного происхождения - куркумина и карназоловой кислоты.

Полученные результаты не вызывают сомнений, т.к. диссертант имеет соответствующую квалификацию и владеет навыками сбора и подготовки биоматериала к исследованию.

4. Степень новизны каждого научного результат (положения), выводы соискателя, сформулированных в диссертации.

Новизна исследовательской работы заключается в следующем:

- Научная новизна №1 связана с тем, что сравнительное изучение действия полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты на раковые и нормальные клетки простаты проведено впервые.
- Научная новизна №2 основана на изучении противоопухолевой активности комбинированного действия куркумина и карназоловой кислоты на митохондриальный метаболизм раковых и нормальных клеток простаты: мембранный потенциал и окислительный стресс митохондрий.
- Научная новизна №3 обусловлена взаимным синергетическим действием куркумина и карназоловой кислоты, что доказано в экспериментах in vitro.
- Научная новизна №4 основана на изучении что комбинаторного действия полифенолов природного происхождения куркумина 7 мкМ и карназоловой кислоты 5мкМ на дыхание раковых клеток простаты.
- Научная новизна №5 получена при исследовании особенностей клеточных циклов раковых клеток простаты при комбинированном воздействии полифенолов природного происхождения - куркумина и карназоловой кислоты.

В диссертации вынесено 5 положений, определяющих актуальность, новизну и значимость данного исследования для фундаментальной и прикладной биологии и медицины.

Результат, сформулированный в положении 1, обладает новизной, т.к. ранее исследования затрагивали изучение этих полифенолов по отдельности, тогда как эффекты совместного применения куркумина и карназоловой кислоты на интактные и раковые клетки простаты ранее не изучались.

Положение 2 является новым, т.к. впервые изучено влияние комбинированного действия вышеуказанных веществ на дыхание в раковых клетках линии Du145 и в эпителиальных клетках простаты – PrEC.

Положение 3 содержит элементы новизны, т.к. мембранный потенциал митохондрий изучался ранее другими авторами, но при комбинированном действии полифенолов - куркумина и карназоловой кислоты он не изучался.

Положения №4 и 5 также являются новыми, поскольку впервые выявили комбинированное воздействие полифенолов на окислительный стресс в зависимости от времени; а также на клеточный цикл раковых клеток простаты в зависимости от концентрации полифенолов.

Каждый из выводов соответствует поставленной задаче и вытекает из научно обоснованного подхода к выполнению научной работы.

Практическая ценность исследования связана с возможностью использования полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты в 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).

5. Практическая и теоритическая значимость научных результатов.

Результаты диссертационного исследования имеют несомненную теоретическую и практическую значимость. Содержащиеся в диссертации заключения могут быть полезны как при изучении влияния природных полифенолов на клетки злокачественной опухоли других органов, так и при дальнейшем поиске методов комбинированной терапии рака предстательной железы. Полученные данные могут с успехом применяться в образовательном процессе для всех категорий обучающихся (бакалавры, магистры) различных ВУЗов медицинского и естественно-научного направления. В частности, Полученные результаты внедрены в учебный процесс и используются при преподавании курса «Основы физиологии животных».

Результаты исследования позволяют продолжить использования полифенолов природного происхождения куркумина и карназоловой кислоты в лечении раковых клеток простаты.

Полученные результаты отвечают критериям актуальности, статистической достоверности, научной новизны и практической значимости диссертации, что подтверждается документально выводами, достигнутыми диссертантом, а также очевидностью ее практической направленности.

В целом полученные докторантом результаты способствуют решению теоретических и практических задач, а также развитию новых методов лечения рака предстательной железы и других органов с использованием полифенолов природного происхождения.

Диссертантом выполнены требования пункта 7 «Правил присуждения ученых степеней», утвержденных приказом Министера образования и науки Республики Казахстан от 31 марта 2011 года №127.

Основные выводы и предложения диссертационного исследования опубликованы 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. Имеется 4 Акта внедрения на новые методы с использованием полифенолов природного происхождения, СОПы «Определение цитотоксичности клеток с использованием красителя Аламар синего», «Определение цитотоксичности колонии клеток с использованием красителя кристаллического фиолетового» в Казахском НИИ онкологии и радиологии, а также о внедрении НИР в учебный процесс КазНУ им.аль-Фараби.

В процессе выполнения диссертации и по ее завершению диссертатнт выступила на 12 республиканских и международных конференциях, конгрессах и съездах.

6. Замечания, предложения по диссертации.

Содержание и оформление диссертации полностью соответствует предъявляемым требованиям. Однако наряду с достоинствами имеются отдельные недостатки, которые носят дискуссионный характер и в целом не меняют положительной оценки диссертации. В числе замечаний и предложений следующие:

1. В диссертационной работе не указано взаимосвязь с общегосударственными программами.
2. В диссертационной работе не в полной мере обоснован выбор куркумина и карназольной кислоты.
3. Необходимо обосновать выбора именно рака предстательной железы.
4. Последний пункт заключения представляется сомнительным, т.к. на разных клетках были получены разные результаты. Данный пункт необходимо обосновать в сомой диссертационной работе.

7. Соответствие содержания диссертации в рамках требований Правил присуждения ученой степеней.

Диссертационное исследование на тему «Механизмы действия полифенолов природного происхождения на митохондриальный метаболизм интактных и раковых клеток простаты» имеет важное теоретическое и практическое значение. Исследование проведено на основе доказательной базы и квалифицируется как новое достижение в области биологии.

В соответствии с «Правилами присуждения ученых степеней», утвержденных приказом Министера образования и науки Республики Казахстан от 31 марта 2011 года №127, диссертационная работа и ее автор, Осикбаева Сания Омирхановна, заслуживает присвоения ученой степени доктора философии (PhD) по специальности 6D060700 – Биология.

Официальный рецензент,
доктор медицинских наук, профессор,
Лауреат Государственной премии РК **Нургожин Т.С.**