

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. акад. А.С. САДЫКОВА**

На правах рукописи
УДК 616.988.23.6:543.865-547.963.3

БЕРЕСНЕВА ЮЛИАНА ВИКТОРОВНА

**ПРОТЕИН SP-2 ИЗ ШРОТА СОИ, ИЗУЧЕНИЕ ЕГО
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ**

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ТАШКЕНТ-2010

Работа выполнена в лаборатории Биорегуляторов Института
биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Ибрагимов Фазыл Ахмедович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник
Салахутдинов Бахтиёр Асаметдинович

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Касимова Тамара Дарханбаевна

Ведущая организация: Институт биохимии АН РУз.

Защита состоится «___» _____ 2010 г. в ___⁰⁰ часов на заседании
Специализированного совета Д.015.21.01 при Институте биоорганической
химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз по адресу: 100125, г. Ташкент, ул.
Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

**Ученый секретарь
Специализированного Совета,
кандидат химических наук**

М.Б. Гафуров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность работы. За последние 100 лет по уровню заболеваемости и смертности онкопатология переместилась с десятого места на второе, уступая лишь болезням сердечно-сосудистой системы. По данным ВОЗ, каждый год вновь заболевают 10 млн. человек. Специалисты полагают, что если в ближайшие 15-20 лет не будет разработана эффективная профилактика, то количество заболевших раком возрастет до 20 млн, а число смертей — до 12 млн в год.

Помимо трех основных методов терапии рака – хирургии, химиотерапии и радиотерапии – в арсенале клиницистов появился четвертый - биотерапия. Биотерапия опухолей – это лечение злокачественных новообразований препаратами биологического происхождения. Формируется новое направление, основанное на повышении резервных возможностей организма с помощью нетоксичных природных препаратов [Вершинина С.Ф. и др., 2003, Безбородова О.А. и др., 2004, Семенов А.Л. и др., 2009].

В настоящее время в мире проводится большое количество исследований по изучению влияния сои и её компонентов на течение канцерогенеза [Крутяков В.М., 2001, Немцова Е.Р. и др., 2002]. Проводимые исследования показывают, что компоненты сои способны ингибировать пролиферацию опухолевых клеток, индуцировать апоптоз в трансформированных клетках, и действуют они на опухолевые клетки, и токсические эффекты в отношении нормальных тканей организма минимальны [Залеток С.П. и др., 2006, Казачкина Н.И. и др., 2006].

Лечение онкологических больных в сравнении с другими заболеваниями необычайно дорогостоящее. Поэтому даже в экономически развитых странах постоянно думают о рациональном расходовании средств и удешевлении медицинских процедур и медицинских препаратов.

В связи с этим представляется актуальным выделение белковых компонентов из вторичного сырья – шрота сои и исследование их противоопухолевой активности.

Степень изученности проблемы. Лечебные свойства продуктов из соевых бобов хорошо известны в течение длительного времени. Еще в 30-е годы соевое молоко рекомендовалось при гастроинтестинальных язвах, истощении, холецистите, циррозе печени, гипертензии, отеках, лихорадочных состояниях, сердечно-сосудистых заболеваниях [Гапонова Л.В. и др. 1999, Модич Е., Модич П. 1999].

Исследования последних лет показали, что связанные с соевым белком изофлавоны - генестеин, диадзеин и глицитеин обладают антиканцерогенным профилактическим и в некоторых случаях лечебным эффектом [Zhou J.-R. et al., 1998, Zhou J.-R. et al., 1999, Constantinou A.I. et al., 2001]. Считается, что генестеин, один из основных изофлавонов сои, оказывает блокирующее действие на развитие опухолевых процессов [Cassidy A. et al., 2006].

Эпидемиологические исследования доказывают, что в восточных регионах, где люди традиционно употребляют в пищу сою, реже встречаются опухоли различных локализаций: толстой кишки, легких, матки, молочной железы, предстательной железы и т.д. [Rose D.P. et al., 1986, Messina M.J. et al., 1991].

Уникальность соевых фитоэстрогенов в том, что они помогают восстанавливать гормональное равновесие в организме [Scambia G. et al., 2000, Morton M.S. et al., 2002, Gallo D. et al., 2006]. Изофлавоны сои благодаря гормоноподобным эффектам могут оказывать лечебный эффект у женщин в период менопаузы. Применение соевых рационов позволяет справиться со многими проблемами, сопутствующими наступлению климактерического периода, облегчает течение климакса, предупреждает развитие рака молочной железы и матки.

В настоящее время интенсивно изучаются белковые ингибиторы протеаз, которые замедляют инвазию и метастазирование в отношении злокачественной опухоли [Крутяков В.М., 2001]. Среди различных ингибиторов протеаз наиболее перспективным для медицины представляется самый низкомолекулярный ингибитор протеаз Баумана-Бирка с молекулярной массой 8 кДа [Birk Y., 1985].

Настоящая работа посвящена исследованию действия белковых компонентов, выделенных из шрота сои на канцерогенез в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Работа является частью исследований выполненных в рамках проекта УНТЦ №3501 «Исследование соевого белка в лечении злокачественных новообразований клетки организма», проводимых в Институте биоорганической химии АН РУз (2006-2009 г.г.).

Цель исследования. Получение белкового комплекса протеина sp-2 из шрота сои, исследование его физико-химических характеристик и противораковой активности на штаммах АКАТОЛ, Меланома В-16 и раке молочной железы.

Задачи исследования.

- Получение белкового комплекса протеина sp-2 из шрота сои.
- Определение физических и химических характеристик протеина sp-2.
- Тестирование протеина sp-2 на пролиферацию клеток меланомы мышей КМЛ в цитотоксическом тесте радиометрическим методом по включению ¹⁴C–тимидина в экспериментах *in vitro*.
- Определение антитрипсиновой активности протеина sp-2.
- Определение чувствительности различных штаммов раковых опухолей к протеину sp-2 на животных опухоленосителях в экспериментах *in vivo*.
- Исследование экспрессии онкогенов до и после введения протеина sp-2 экспериментальным животным.

- Определение цитотоксической активности протеина sp-2 в клетках злокачественных новообразований человека.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования является белковый комплекс протеин sp-2 из шрота сои. Предметом исследования является физико-химические и противоопухолевые свойства протеина sp-2.

Методы исследований. Методы колоночной хроматографии, электрофоретические исследования, определение аминокислотного состава и N-концевых аминокислот, радиометрического анализа по включению ^{14}C - тимидина, имунногистохимического анализа, микроскопии, имуноферментного анализа, ПЦР анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

- выделение и физико-химическая характеристика белкового комплекса протеина sp-2 из шрота сои;
- исследование специфической биологической активности протеина sp-2 в условиях *in vitro* и *in vivo*;
- исследование экспрессии онкогенов, контролирующих апоптоз после введения протеина sp-2.

Научная новизна. Впервые из шрота сои выделен белковый комплекс протеин sp-2, изучены его физико-химические свойства. Полученный очищенный белок состоит из комплекса белков с молекулярной массой основного компонента 30 кДа, изоэлектрической точкой в области pI -3,8; 3,9 и 8,2. Аминокислотный состав Ala, Arg, Asp, Val, His, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Tyr, Thr, Phe. N-концевые аминокислоты: треонин, глицин, серин, пролин, валин. Исследована специфическая противоопухолевая активность протеина sp-2 в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Научная и практическая значимость результатов исследований.

Подана заявка в патентное Государственное ведомство Республики Узбекистан (№ IAP 20080420) «Способ выделения белкового комплекса из шрота растительного сырья». Полученные результаты помогут увеличить фундаментальные знания современной науки относительно механизма и эффектов действия белков на опухолевые клетки, позволят понять новую стратегию лечения злокачественных новообразований, проектировать новые противоопухолевые препараты на основе белков, выделяемых из сои.

Реализация результатов. В результате проведенных исследований протеин sp-2 предложен в качестве противоопухолевого средства. В рамках прикладных исследований по гранту ФА-A11-T174 «Разработка противоопухолевого белкового препарата из шрота сои и выделения особо чистых ферментов из местного сырья» (2009-2011 г.г.) проводится разработка лекарственной формы и подготовка необходимых НТД по проекту ВФС субстанции для передачи в ФК МЗ РУз.

Апробация работы. Основные результаты исследований доложены на: XI Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2007); научно-практической конференции «Физико-химическая биология и перспективы

биотехнологии» (Андижан, 2007); международной научно-практической конференции конференции «Актуальные проблемы химии природных соединений» (Ташкент, 2009); международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2009); Российской научно-практической конференции с международным участием «Современная онкология: достижения и перспективы развития (Томск, 2009); научно – практической конференции «Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации» (Ташкент, 2009).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ. Эти публикации включают 3 статьи в рецензируемых журналах, 9 тезисов в материалах научных форумах, 1 буклет.

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 109 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы (Глава I), описания материалов и методов (Глава II), результаты и их обсуждение (Глава III), заключения, выводов, списка используемой литературы. Диссертация иллюстрирована 3 таблицами и 35 рисунками. Список литературы включает 183 ссылки.

Диссертационная работа построена следующим образом:

- первая глава – литературный обзор посвящен характеристике сои, биохимическим компонентам семян сои и лечебным свойствам этого растения;
- в главе II приводятся методики выделения и очистки протеина sp-2, методы физико-химических и биологических исследований его свойств;
- в главе III охарактеризован протеин sp-2 и обсуждается его специфическая биологическая активность.

В заключение диссертации приводятся основные выводы.

Автор благодарит за помощь в проведении совместных исследований: с.н.с. лаборатории биорегуляторов ИБОХ АН РУз, к.м.н. Кузнецову Н.Н. по отбору активных фракций *in vitro* на клеточной линии меланомы мышей КМЛ (штамм меланомы мышей В-16); с.н.с. лаб. химии белков и пептидов ИБОХ АН РУз к.х.н. Э.М. Султанову по определении N – концевых аминокислот активной белковой фракции; зав. лаб. канцерогенеза и первичной профилактики РОНЦ МЗ РУз д.б.н Киреева Г.В.; зав лаб. биологии опухолей РОНЦ МЗ РУз к.б.н. Гильдиеву М.С.; с.н.с. ОЗ «Нихол» РОНЦ МЗ РУз к.б.н. Абдувалиева А.А.; с.н.с. ОЗ «Нихол» РОНЦ МЗ РУз к.м.н. Юсупову А.А. в определении противоопухолевой активности протеина sp-2.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выделение протеина *sr-2* и определение активности по включению ^{14}C -тимидина

Выделение белков из шрота сои проводили двумя методами экстракции раствором 5% NaCl и 0,05M Трис буфером pH 7,4. Для тестирования противоопухолевой активности белков нами была использована модельная тест-система для отбора противоопухолевых веществ *in vitro* на клеточной линии меланомы мышей КМЛ (штамм меланомы мышей В-16). Определение активности фракций по включению ^{14}C -тимидина, показало, что при использовании этих методов выделения белков из шрота сои вещество является активным. Однако белки, выделенные 0,05M Трис буфером pH 7,4, обладали большей активностью в подавлении пролиферации клеток КМЛ, которая составила $52,3 \pm 1,4\%$.

Электрофоретическое исследование компонентного состава тотальной фракции показало, что основные и ярко выраженные полипептиды находятся в области молекулярной массы до 67 кДа. В связи с этим были выбраны носители для гельфильтрации сефадексы G-75 и G-50.

На обоих носителях элюировалось по три фракции. Определение активности фракций по включению ^{14}C -тимидина, показало, что наибольшим подавлением пролиферации клеток КМЛ $58,5 \pm 1,4\%$ в дозе 100 мкг/мл обладала первая фракция после гельфильтрации на колонке с сефадексом G-75. Электрофоретические исследования белковых фракций после гельфильтрации, показало, что наиболее эффективное разделение белков на колонке с сефадексом G-75. Компонентный состав первой фракции представлен основными полипептидами с молекулярной массой 30, 32, 35 кДа. Эти полипептиды отсутствуют во второй и третьей фракции. При гельфильтрации на колонке с сефадексом G-50 разделение белков не эффективное, спектр белков всех трех фракций практически одинаков.

Дальнейшую очистку первой активной фракции после сефадекса G-75 проводили на колонке с ультогелем AcA34 в 0,5M NaCl, pH 7,4. Разделение показало наличие пяти фракций. Хроматограмма гельфильтрации представлена на рисунке 1. Определение активности фракций по включению ^{14}C -тимидина, показало, что активная фракция элюировалась вторым пиком, процент подавления включения метки составил $64,0 \pm 1,9\%$ в дозе 100 мкг/мл.

Электрофоретическое исследование показало, что активная фракция состоит из комплекса белков с молекулярной массой основного компонента 30 кДа (Рис. 2.).

Процентное содержание основного компонента с молекулярной массой 30 кДа увеличивается по мере очистки с 5,36% до 29,16%. Вероятно, повышение активности белкового комплекса связано с повышением процентного содержания этого полипептида.

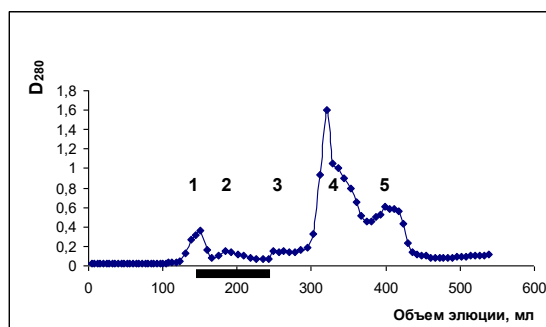


Рис.1. Гельфильтрация протеина sr-2 на колонке с ультрогелем АсА34 (80 x 2.5), 0,5M NaCl, рН 7,4

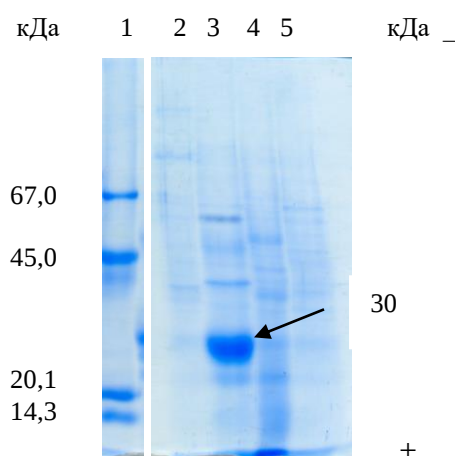


Рис.2. Электрофорез в градиенте 10-15% ПААГ в присутствии SDS белка из шрота сои после разделения на колонке с ультрогелем АсА34.

1-смесь белков-маркеров (БСА, Овальбумин, Соевый ингибитор трипсина, Лизоцим); 2-фракция I; 3- фракция II; 4- фракция III; 5- фракция IV.

Затем было проведено изоэлектрофокусирование активной белковой фракции. Наблюдалось наличие трёх компонентов с изоэлектрическими точками в области pI -3,8; 3,9 и 8,2 (Рис. 3).

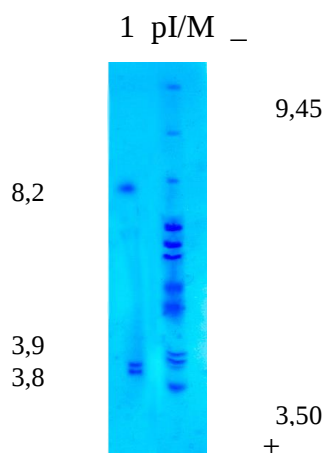


Рис. 3. Изоэлекторофокусирование активной фракции белка после гельфильтрации на колонке с ультрогелем АСА-34 (амфолины в диапазоне рН 3,5-10).

1 - Фракция II, 2 - Маркёры изофокусирования.

Определен аминокислотный состав активной белковой фракции (см. табл.1.).

Проведение анализа по определению N-концевой аминокислоты, показало наличие пяти N-концов: треонин, глицин, серин, пролин, валин .

Активный белковый комплекс, состоящий из пяти полипептидов, который элюировался второй фракцией с ультрогеля АсА34, был назван протеин sp-2 (**soybean proteins**).

Таблица 1

Аминокислотный состав активной белковой фракции

Аминокислоты	Процентное содержание	Аминокислоты	Процентное содержание
Ala	5,30	Leu	9,04
Arg	10,08	Lys	4,90
Asp	11,09	Met	1,40
Val	5,06	Pro	5,19
His	3,57	Ser	4,85
Glu	16,03	Tyr	3,09
Gly	4,05	Thr	4,90
Ile	3,01	Phe	4,05
$\Sigma = 95,99\%$			

Определение антитрипсиновой активности протеина sp-2

Важную роль в опухолевом росте играют сериновые протеазы, содержащие в своем активном центре серин (трипсин, химотрипсин, калликреин, плазмин, тромбин), и металлопротеиназы, содержащие Zn^{2+} в активном центре [Nagase H. et al., 1994, Alexander D.S. et al., 1996]. В связи с этим, был проведен эксперимент по определению антитрипсиновой активности протеина sp-2 (см. табл. 2).

Таблица 2

Ингибирование протеазной активности трипсина протеином sp-2

Фракции протеина sp-2	Ингибирование активности трипсина	
	Условные единицы протеолитической активности Поглощение λ 280	% ингибирования
Тотальная фракция	0,145±0,002	34,7±0,1
Фракция-I после гельфильтрации на сефадексе G-75	0,156±0,003	29,4±0,2
Фракция-II после гельфильтрации на ультрогеле АсА34.	0,167±0,002	24,1±0,1
Контроль*	0,220±0,002	0

*3,0 мкг трипсин, в 0,05M фосфатном буфере pH 7,6; субстрат - казеин 300,0 мкг

Результаты опыта, показали, что протеин sp-2 обладает ингибирующей способностью к трипсину, которая снижается по мере очистки в 1,4 раза. Что позволяет говорить о том, что он в своем комплексе содержит ингибиторы протеаз. Препараты ингибиторы протеаз представляются перспективными при применении после радикального хирургического удаления злокачественной опухоли с целью профилактики рецидива и метастазов [Крутяков В.М., 2001]. Эффективны даже частично очищенные препараты ингибиторы протеаз, так как белковые примеси конкурентно защищают ингибиторы протеаз от протеаз, содержащихся в желудочно-кишечном тракте [Jordinson M. et al., 1999].

Специфическая биологическая активность протеина sp-2 в экспериментальном канцерогенезе

Перед тем как изучать противоопухолевую активность протеина sp-2 *in vivo*, было проведено изучение токсичности белка sp-2 в трех дозах (150, 500, 1000 мг/кг, применение *per os*) и наблюдение осуществлено в течение 60-ти дней. Были изучены параметры внутренних органов экспериментальных животных после завершения эксперимента. Внешний вид данных органов соответствует здоровым животным. Данные позволяют заключить, что проведенное изучение острой токсичности соевого протеина sp-2 показало, что данный препарат в дозах 150, 500, 1000 мг/кг не обладает токсичностью и может быть использован для изучения противоопухолевой активности.

Затем было проведено пассирование экспериментальных опухолевых штаммах АКАТОЛ (аденокарцинома толстого кишечника) и меланомы В-16. Животные были разбиты на четыре группы. I группа – животные получали протеин sp-2 *per os* 10 дней каждый день однократно в дозе 150 мг/кг; II группа – животные получали протеин sp-2 *per os* 10 дней каждый день однократно в дозе 125 мг/кг; III группа – животные получали протеин sp-2 подкожно в виде инъекций 5 раз каждые 48 часов в дозе 12,5 мг/кг; IV группа – контроль, животным вводили каждый день *per os* и подкожно растворитель – физиологический раствор NaCl.

Соевый протеин sp-2 на штамме АКАТОЛ в дозе 150 мг/кг в случае применения *per os* (I группа) показал наибольшую эффективность и ингибировал рост опухоли по массе на 71,9%, по объёму 88,46%. На штамме меланомы В-16 (I группа) подавлял рост опухоли по массе на 85,44%, по объёму на 77,93%. Следует отметить, что действие протеина sp-2 при введении *per os* в дозе 150 мг/кг (I группа) и при подкожном введении (III группа) практически одинаковы, при введении в дозе 125 мг/кг (II группа) подавление раковой опухоли незначительно снижено. По полученным результатам наблюдается коррелирование значений объема опухоли со значениями ее массы в опытных группах (на штамме АКАТОЛ: I группа $r=$

0,999, II группа $r=0,973$, III группа $r=0,614$; на штамме меланомы В-16: I группа $r=0,789$, II группа $r=0,938$, III группа $r=0,566$). В группе контроля (без введения протеина sp-2) корреляционная зависимость отсутствует на штамме АКАТОЛ $r=0,380$, на штамме меланомы В-16 $r=-0,0002$. Можно сделать вывод, что бесконтрольное деление раковых клеток исключает корреляционную зависимость.

Метрические данные массы и объема опухоли не всегда адекватно способны отразить процессы прогрессии или регрессии опухолевой ткани. Это связано с тем, что высокая степень экссудации, нейтрофильная инвазия, зоны некротического разрушения или же высокая дифференциация клеточного состава, сопутствующие процессам злокачественной трансформации тканей организма, способны изменять массу или объем опухоли в ту или иную сторону. Более объективную картину о пролиферативной активности опухолевых клеток дает подсчет количества митозов в опухолевой ткани - ее митотический индекс (МИ). Другим параметром, отражающим процессы гибели опухолевых клеток, является апоптотический индекс (АИ) [Васильев Ю.М., 1997].

На штамме АКАТОЛ в группе I наблюдалось на 36,0% меньше митотически делящихся раковых клеток, чем в контрольной группе животных, раковые клетки погибали в процессе апоптоза на 49,25% чаще, чем это наблюдалось в контрольной группе. На штамме меланомы В-16 в группе I наблюдалось на 83,16% меньше митотически делящихся раковых клеток, чем в контрольной группе животных, раковые клетки погибали в процессе апоптоза на 60,72% чаще, чем это наблюдалось в контрольной группе.

Отношение апоптозного индекса (АИ) к митотическому индексу (МИ) (АИ/МИ) демонстрирует степень регрессии или прогрессии опухолевой ткани. В случае если значения АИ/МИ превышают единицу, наблюдается регрессия опухоли.

Во всех опытных группах наблюдается регрессия опухолевой ткани. На штамме АКАТОЛ в контрольной группе экспериментальных животных значение АИ/МИ меньше 1,0 (0,89), т.е. в этом случае мы наблюдаем прогрессию опухоли. Наибольшая скорость регрессии опухолевой ткани наблюдалась в группе I (АИ/МИ=2,08). На штамме меланомы В-16 в контрольной группе экспериментальных животных значение АИ/МИ меньше 1,0 (0,74), наибольшая скорость регрессии опухолевой ткани наблюдалась в группе I (АИ/МИ=15,18).

Применение любого терапевтического вещества, обладающего цитотоксическим эффектом в отношении опухолевых клеток, создает риск снижения пролиферации и нормальных высокопролиферирующих клеток организма. Одной из первоочередных мишеней такого побочного влияния препаратов являются клетки красного костного мозга, нарушение пролиферации которых приводит к серьезным негативным последствиям для

процессов гемопоэза и эффективной работы иммунной системы [Кост Е.А., 1975].

В исследованиях противоопухолевых свойств протеина sp-2 нами проводилось изучение ингибирующего действия этого белка на пролиферацию клеток красного костного мозга в условиях экспериментального канцерогенеза на моделях опухолей АКАТОЛ и меланомы В-16. Протеин sp-2 статистически достоверно не ингибировал пролиферацию клеток красного костного мозга. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии негативного влияния sp-2 в отношении нормальных высокопролиферирующих клеток организма с сохранением противоопухолевого эффекта действия этого белка на раковые клетки.

Для экспериментов по изучению продолжительности жизни экспериментальных животных было отобрано три группы мышей: 1-я группа – контрольная (10 животных); мышам данной группы перевивалась опухоль, и вводился дистиллят. 2-я группа опытная (10 животных); мышам этой группы вводился соевый белок в дозе 150 мг/кг на 5-й день после перевивки штамма. 3-я группа экспериментальная (10 животных); мышам данной группы вводили соевый белок (sp-2) десятикратно в дозе 150 мг/кг через 10 дней после перевивки опухоли. Наблюдение осуществляли до естественной гибели мышей. Согласно принятым методикам по изучению противоопухолевой активности препаратов, полученные результаты по увеличению средней продолжительности жизни животных по сравнению с контрольной группой более 25% говорят о неплохих результатах их биологической активности [Безбородова О.А. и др., 2004].

На штамме АКАТОЛ показатель увеличения продолжительности жизни животных на 5 день (2-я группа) после перевивки опухоли – 38,34%. Этот параметр имеет позитивное значение. Введение соевого белка на 10 день после перевивки штамма (3-я группа) показало снижение этого параметра, он составил 10,15%. На штамме меланомы В-16 показатель увеличения продолжительности жизни животных на 5 день после перевивки опухоли – 32,7%, на 10 день после перевивки штамма (3-я группа) – 15,29%. Макроскопически установлено единичные случаи метастазирования в группах на 5-й день после перевивки опухоли.

Таким образом, проведенные эксперименты показали биологически значимую противоопухолевую активность соевых белков в эксперименте на мышах с перевитыми штаммами АКАТОЛ и Меланомы В-16 при их введении не позднее 5-го дня с начала лечения.

Исследование экспрессии онкогенов после введения протеина sp-2

Экспрессия некоторых онкогенов и антионкогенов несут в себе наравне с классическими клиническими и морфологическими признаками важную дополнительную прогностическую информацию об опухолевом процессе.

Некоторые авторы [Van Slooter H-J. Et al., 1996, Кулагин Р.Н. и др. 2009] в своих работах подчеркивают значимость экспрессии онкогенов p53, bcl-2 в оценке злокачественного потенциала новообразований.

Поэтому изучение экспрессии онкогенов bcl-2 и p-53, контролирующих апоптоз являлось целью данной работы.

По данным литературы высокая экспрессия bcl-2 ассоциируется с низким уровнем апоптоза ($p < 0,001$), а высокий уровень пролиферации и высокая степень злокачественности связаны с отсутствием или снижением экспрессии bcl-2 ($p < 0,001$) [Van Slooter H-J. et.al., 1996].

p53 экспрессируется на высоком уровне практически во всех типах опухолей разной локализации и присутствует в небольших количествах в нормальных клетках [Levine A.J. et.al., 1991]. Мутантный ген p53 можно обнаружить в различных биологических образцах от онкологических больных [Hardy-Bressard A.C et.al., 1998, lokim-Liossi A. et.al., 1998].

При использовании праймера bcl-2 на обоих штаммах меланомы В-16, АКАТОЛ в раковой ткани экспрессия этого гена повышена (рис. 4., см. 2, 4). После воздействия протеином sp-2 экспрессия bcl-2 снижается.

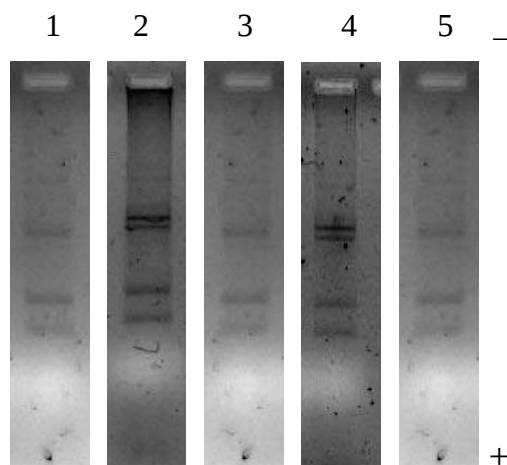


Рис. 4. Электрофорез продуктов амплификации гена bcl-2 в 2% агарозном геле на штаммах меланомы В-16(2,3), АКАТОЛ (4,5).

1-ДНК, выделенная из интактной ткани; 2, 4-ДНК, выделенная из раковой ткани; 3, 5-ДНК, выделенная из раковой ткани, после воздействия протеином sp-2.

При использовании мутантного p53 (5, 6, 7 – экзонов) наблюдается экспрессия аллелей в раковой ткани на обоих штаммах (рис. 5). Введение протеина sp-2 оказывает достоверный эффект на снижение уровня экспрессии этих генов. Механизм противоопухолевого действия протеина sp-2 заключается в индукции апоптоза в раковых клетках. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования данных онкогенов, как молекулярных маркеров в лечении протеином sp-2.

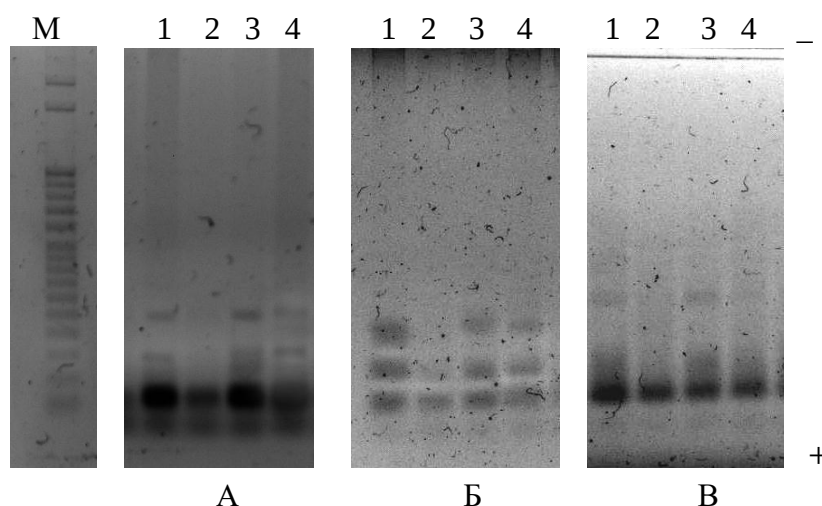


Рис. 5. Электрофорез продуктов амплификации гена p53 5-экзон (А), 6-экзон (Б), 7-экзон (В) в 2% агарозном геле на штаммах меланомы В-16(1, 2), АКАТОЛ (3, 4). М-маркер Step Ladder, 50 bp; 1, 3 -ДНК, выделенная из раковой ткани; 2, 4 -ДНК, выделенная из раковой ткани, после воздействия протеином sp-2.

Исследование биологической активности протеина sp-2 при раке молочной железы в экспериментах *in vitro*

Отсутствие на поверхности клеток рака молочной железы рецепторов к эстрогену и прогестерону не позволяет придерживаться традиционной терапии этого заболевания и требует изменения фармакологического воздействия, при этом, данная патология встречается приблизительно у 15% пациентов [Пожарисский К.М., 2000].

С помощью иммуногистохимического анализа нами были обследованы образцы 6 опухолей, полученных из биопсийного и операционного материалов пациентов с верифицированным диагнозом рак молочной железы, проходящих лечение в Республиканском онкологическом научном центре МЗ РУз. В опухолевых образцах определяли количество рецепторов к эстрогенам и прогестерону.

В 4-х из 6-ти образцов опухолевой ткани молочной железы количество рецепторов к эстрогенам и прогестерону соответствовало 150-280 Н-баллам, то есть в этих клетках отсутствовали генетические нарушения экспрессии рецепторов к этим гормонам (рис.6, 7). В одном из шести образцов опухолей количество рецепторов к эстрогенам и прогестерону было незначительно, и только один образец трансформированных клеток молочной железы показал полное отсутствие рецепторов к этим гормонам (рис. 8, 9).

Для проведения дальнейших экспериментов нами был взят опухолевый материал, как с наличием, так и с полным отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону.

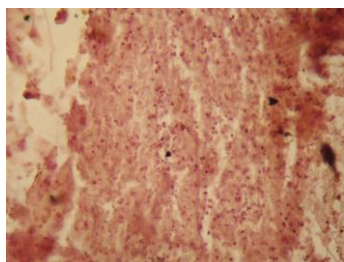


Рис. 6. Иммуногистохимия. Участок ткани рака молочной железы больной С., 53 года. Определение рецепторов к эстрогенам (196 Н-баллов). Peroксидазный метод окрашивания. Ув. ок. $10\times$, об. $40\times$.

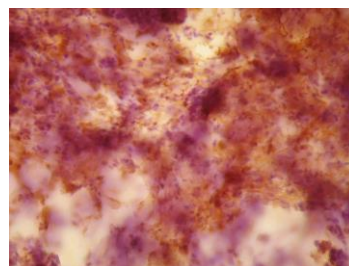


Рис. 7. Иммуногистохимия. Участок ткани рака молочной железы больной С., 53 года. Определение рецепторов к прогестерону (196 Н-баллов). Peroксидазный метод окрашивания. Ув. ок. $10\times$, об. $40\times$.

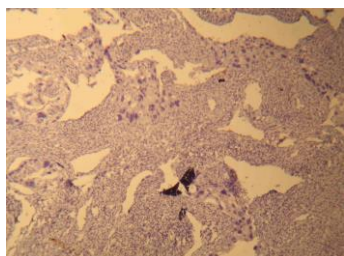


Рис. 8. Иммуногистохимия. Участок ткани рака молочной железы больной У., 73 года. Определение рецепторов к эстрогенам (отсутствие рецепторов к эстрогенам). Peroксидазный метод окрашивания. Ув. ок. $10\times$, об. $10\times$.

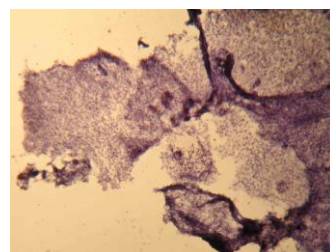


Рис. 9. Иммуногистохимия. Участок ткани рака молочной железы больной У., 73 года. Определение рецепторов к прогестерону (отсутствие рецепторов к прогестерону). Peroксидазный метод окрашивания. Ув. ок. $10\times$, об. $10\times$.

После культивирования клеток рака молочной железы с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону и получения слоя средней плотности этих клеток в лунки полистиролового планшета вносили протеин sr-2 в концентрациях $10 \text{ мкг}/10^6$ клеток, $50 \text{ мкг}/10^6$ клеток, $100 \text{ мкг}/10^6$ клеток.

Влияние протеина sr-2 на пролиферацию опухолевых клеток с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону незначительно (степень деструкции (СД) в дозе $100 \text{ мкг}/10^6$ клеток $15,5\%$) и не позволяет говорить об активной регуляции этим белком процессов деления и роста клеток рака молочной железы (рис. 10).

Протеин sr-2, при отсутствии рецепторов к эстрогенам и прогестерону на поверхности опухолевых клеток, способен значительно ингибировать (СД в дозе $100 \text{ мкг}/10^6$ клеток $36,2\%$) пролиферацию клеток рака молочной железы (рис. 11).

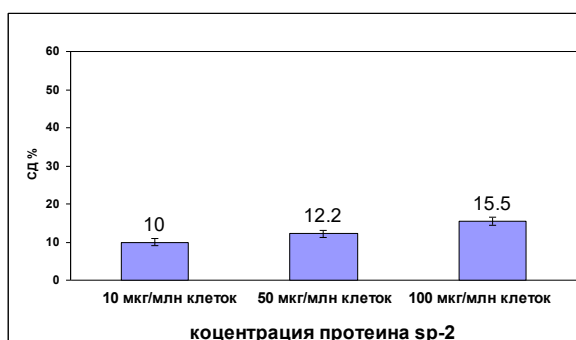


Рис. 10. Степень деструкции слоя клеток рака молочной железы с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону при воздействии протеина sp-2, * - $p < 0,05$.

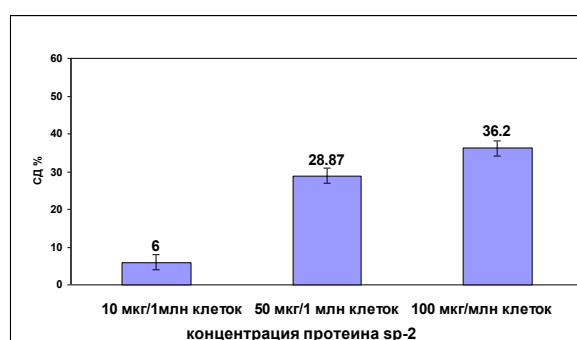


Рис. 11. Степень деструкции слоя клеток рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону при воздействии протеина sp-2, * - $p < 0,05$.

Ген bcl-2 выполняет уникальную среди онкогенов млекопитающих функцию в качестве негативного регулятора апоптоза. Уменьшение концентрации протеина Bcl-2 приводит клетки к апоптозу. Белок Bcl-2 также связан с наличием резистентности опухоли к терапии [Fernandes-Alheemri T. et al., 1994].

Нами было проведено исследование экспрессии протеина Bcl-2 на клетках рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону. Воздействие протеина sp-2 во всех концентрациях привело к уменьшению количества белка Bcl-2 в клетках молочной железы в среднем на $27,25 \pm 1,14\%$, $p < 0,05$ (рис. 12).

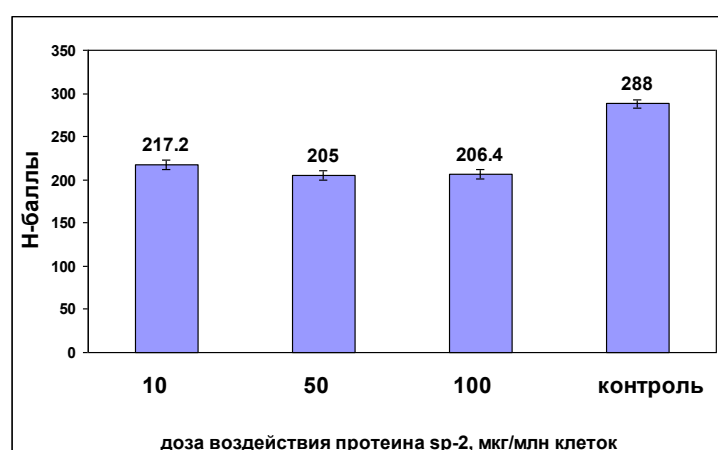


Рис. 12. Количественные изменения протеина Bcl-2 в клетках рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону при воздействии протеина sp-2 *in vitro*. Для всех значений опытных групп $p < 0,05$.

Целью постановки следующего эксперимента явилось изучение влияния соевого протеина sp-2 на индукцию апоптоза и ингибирование пролиферации

клеток рака молочной железы при поздних стадиях развития заболевания. В первом образце наблюдалась 2-я стадия развития рака молочной железы, метастазирование носило локальный характер, пациентку оперировали с диагнозом рак левой молочной железы. Во втором образце уже 3-я стадия заболевания, пациентку оперировали с диагнозом рак левой молочной железы, метастазирование носило также локальный характер.

Опухолевые клетки, полученные из операционного материала больных, вносили в лунки полистиролового планшета, куда после образования клеточного слоя средней плотности добавляли соевый протеин sp-2 в дозах 100 мкг/млн клеток (группа I) и 50 мкг/млн клеток (группа II), контролем служили клетки рака молочной железы без воздействия протеином sp-2 (группа III), время инкубации клеток с протеином составило 60 мин.

На 2-ой стадии развития рака молочной железы протеин sp-2 в дозе 100 мкг/млн клеток показал высокую противоопухолевую активность, вызывая гибель в общей сложности 64% раковых клеток, в том числе индуцируя апоптоз у 12% клеток (рис 13). С уменьшением дозы воздействия протеина уменьшается и его противоопухолевая активность, так, в дозе воздействия протеина sp-2 50 мкг/млн клеток, белок вызывал гибель у 38% раковых клеток.

На 3-ей стадии развития рака молочной железы sp-2 в дозе 100 мкг/млн клеток показал высокую противоопухолевую активность, вызывая гибель в общей сложности 58% раковых клеток, в том числе индуцируя апоптоз у 11% клеток (рис 14). С уменьшением дозы воздействия протеина sp-2 до 50 мкг/млн клеток, белок вызывал гибель у 50% раковых клеток.

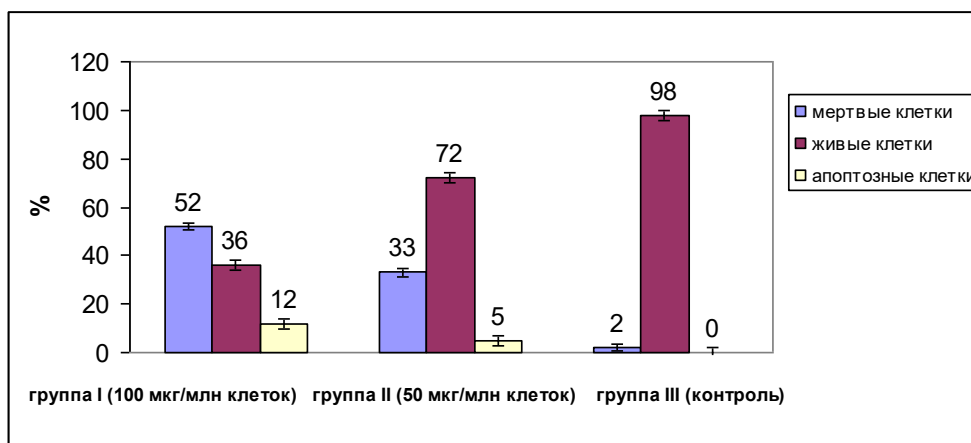


Рис. 13. Цитотоксическая активность протеина sp-2 в отношении клеток рака молочной железы (операционный материал больной Г., 68 лет, диагноз – рак левой молочной железы, T₂N₁M₀).

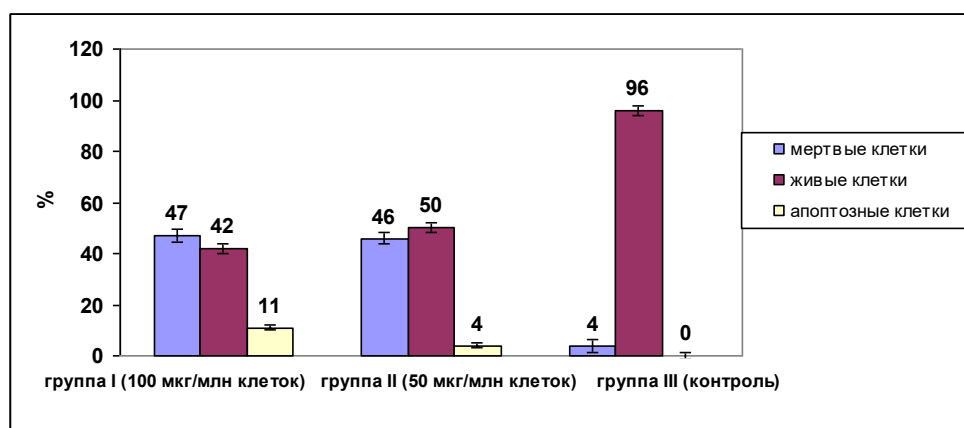


Рис. 14. Цитотоксическая активность протеина sr-2 в отношении клеток рака молочной железы (операционный материал больной Н., 48 лет, диагноз – рак левой молочной железы, Т3N1M0).

Таким образом, можно сделать следующие выводы. Протеин sr-2 обладает значительной противоопухолевой активностью в отношении клеток рака молочной железы, находящихся на 2 и 3 стадиях заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы

1. Впервые из шрота сои выделен протеин sr-2 состоящий из комплекса белков с молекулярной массой основного компонента 30 кДа.
2. В цитотоксическом тесте радиометрическим методом на пролиферацию клеток меланомы мышей КМЛ протеин sr-2 в дозе 100 мкг/мл вызывает подавление включения метки ^{14}C – тимидина на $64,0 \pm 1,9 \%$.
3. Протеин sr-2 обладает ингибирующей способностью к трипсину, следовательно, в своем комплексе содержит ингибиторы протеаз.
4. Протеин sr-2 тормозит рост раковой ткани на перевиваемых опухолевых штаммах АКАТОЛ и меланома В-16 более чем на 60%, увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных более 30%, протеин sr-2 не ингибирует пролиферацию клеток красного костного мозга.
5. Введение протеина sr-2 экспериментальным животным индуцирует процессы, восстанавливающие клеточный баланс организма и индуцирует апоптоз.
6. Соевый протеин sr-2 способен ингибировать пролиферацию *in vitro* резистентных к терапии клеток рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону (СД $36,2\% \pm 11$), воздействие протеина sr-2 привело к уменьшению количества белка Bcl-2 в клетках молочной железы в среднем на $27,25 \pm 1,14\%$, $p < 0,05$.

7. Протеин sp-2 в дозе 100 мкг/млн клеток в условиях *in vitro* обладает противоопухолевой активностью в отношении клеток рака молочной железы, находящихся на 2 и 3 стадиях заболевания, вызывая гибель более 60% раковых клеток, индуцируя апоптоз более 10% раковых клеток.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

В результате проведенных экспериментов и согласно литературным данным мы можем рекомендовать использовать протеин sp-2:

- для дополнения в лечении онкологических заболеваний (меланомы, рака прямой кишки (АКАТОЛ), рака молочной железы);
- профилактики инвазии и метастазирования;
- диетического питания онкологических больных людей;
- для повышения эффективности и снятия токсичности противоопухолевого лечения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Береснева Ю.В., Абдувалиев А.А., Гильдиева М.С., Ибрагимов Ф.А., Jin-Rong Zhou. Противоопухолевая активность соевого протеина sp-2 в экспериментальном канцерогенезе // Материалы научно-практической конференции «физико-химическая биология и перспективы биотехнологии». - Андижан, 15-16 июня 2007.-С. 218-219.

2. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Jin-Rong Zhou. Изучение противоопухолевой активности соевого протеина sp-2 на перевиваемом штамме опухоли АКАТОЛ // XI Российский онкологический конгресс. - Москва, 20-22 ноября 2007 года.- С. 234

3. Ибрагимов Ф.А., Береснева Ю.В., Jin-Rong Zhou. Соевый протеин sp-2, индуцирующий апоптоз в экспериментальном канцерогенезе на перевиваемом штамме опухоли Меланома В-16 // XI Российский онкологический конгресс. - Москва, 20-22 ноября 2007 года. – С. 171.

4. Абдувалиев А.А., Гильдиева М.С., Ибрагимов Ф.А., Береснева Ю.В., Jin-Rong Zhou. Влияние соевого белка sp-2 на экспрессию протеина bcl-2 в клетках рака молочной железы // XI Российский онкологический конгресс. - Москва, 20-22 ноября 2007 года. – С. 148-149.

5. Береснева Ю.В., Киреев Г.В., Гильдиева М.С., Абдувалиев А.А., Юсупова А.А., Кузнецова Н.Н., Ибрагимов Ф.А., Боков А.Ф., Ахунов А., Jin-Rong Zhou. Противоопухолевая активность соевого протеина sp-2 в экспериментальном канцерогенезе на перевиваемом штамме опухоли Меланома В-16 // Журнал теоретической и клинической медицины.- Ташкент, 2007.- № 3. - С. 17-22.

6. Береснева Ю.В., Киреев Г.В., Гильдиева М.С., Абдувалиев А.А., Юсупова А.А., Ибрагимов Ф.А., Боков А.Ф., Ахунов А., Jin-Rong Zhou. Противоопухолевая активность соевого протеина sp-2 в экспериментальном канцерогенезе на перевиваемом штамме опухоли аденокарциномы толстого

кишечника (АКАТОЛ) // Журнал теоретической и клинической медицины. – Ташкент, 2007. - № 4.- С. 32-37.

7. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Султанова Э.М., Максимов В.В., Гильдиева М.С., Абдувалиев А.А., Jin-Rong Zhou. Получение противоопухолевого препарата из шрота сои // Материалы конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития».- Москва, 16-20 марта 2009 г. – С. 116-117.

8. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Султанова Э.М., Максимов В.В., Сагдиев Н.Ж., Киреев Г.В., Jin-Rong Zhou. Протеин sp-2 из шрота сои, обладающий противоопухолевой активностью // Сб. тезисов конференция «Актуальные проблемы химии природных соединений». – Ташкент, 18-19 марта 2009 г.- С. 177.

9. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Киреев Г.В., Юсупова А.А., Jin-Rong Zhou. Изучение противоопухолевой активности протеина sp-2 при позднем введении на штамме АКАТОЛ // Российская научно-практическая конференция с международным участием «Современная онкология: достижения и перспективы развития».- Томск, 10 - 11 сентября 2009 г.- С. 25-26.

10. Ибрагимов Ф.А., Береснева Ю.В., Гильдиева М.С., Абдувалиев А.А., Jin-Rong Zhou. Изучение цитотоксической активности протеина sp-2 на клетки рака молочной железы // Российская научно-практическая конференция с международным участием «Современная онкология: достижения и перспективы развития». – Томск, 10-11 сентября 2009 г. – С. - 84.

11. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Сагдиев Н.Ж., Киреев Г.В., Юсупова А.А., Jin-Rong Zhou. Изучение противоопухолевой активности протеина sp-2 на экспериментальных животных с перевитыми штаммами АКАТОЛ и АКАТОН при позднем введении препарата // Журнал теоретической и клинической медицины. – Ташкент, 2009.- №4. - С. 12-15.

12.Ибрагимов Ф.А., Береснева Ю.В., Киреев Г.В., М.С. Гильдиева, А.А. Абдувалиев, А.А. Юсупова, Г.В. Кадряева, Jin-Rong Zhou. Специфическая активность протеина sp-2 из шрота сои // Материалы научно – практической конференции «Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации». – Ташкент, 10-11 ноября, 2009 г. – С. 295-296.

13.Ibragimov F., Beresneva Yu. Biologically Active Protein from Soybean Cake // The booklet Science &Technology Center in Ukraine «Science Opportunities in Uzbekistan». – Kiev, 2009. – P. 46.

Биология фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Юлиана Викторовна Бересневанинг 02.00.10 – Биоорганик кимё ихтисослиги бўйича «Соя шротининг sp-2 протеини, унинг рак шишига қарши фаоллигини ўрганиш» мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч сўзлар: протеин sp-2 оксил комплекси, сичқонларнинг меланома ҳужайра линияси КМЛ, эстрогенлар, прогестерон, пролиферация, апоптоз, рак ҳужайраларининг деструкцияланиш даражаси.

Тадқиқот объекти. Тадқиқот объекти сифатида соя шротидagi протеин sp-2 оксил комплекси ҳисобланади.

Ишнинг мақсади. Соя шротидан протеин sp-2 оксил комплексини тозалаб олиш, унинг физик-кимёвий таснифларини ва ракка қарши махсус фаоллигини АКАТОЛ штаммларида, меланома В-16 ва сут беи ракларида тадқиқ қилиш.

Тадқиқот методлари. Колонкали хроматография услублари, электрофоретик тадқиқотлар, аминокислота таркиби ва N-охирги аминокислота қолдиқларини ўрганиш, ^{14}C – тимидиннинг боғланиши бўйича радиометрик таҳлиллар, имунногистокимёвий таҳлиллар, микроскопия, имуннофермент таҳлил, ПЦР таҳлил.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги. Соя шротидан биринчи марта протеин sp-2 оксил комплекси тозалаб олинди ва унинг физик-кимёвий хусусиятлари ўрганилди. Ажратиб олинган тоза оксил оксиллар комплексидан иборат бўлиб, унинг асосий компонентининг молекуляр оғирлиги 30 кДа, изоэлектрик нуқталари pI -3,8; 3,9 ва 8,2 га тенг. Аминокислота таркиби эса Ala, Arg, Asp, Val, His, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Tyr, Thr, Phe дан иборат. N-охирги аминокислота қолдиқлари: треонин, глицин, серин, пролин, валин. sp-2 оксиллини in vitro ва in vivo шароитларда ракка қарши юқори фаоллиги кўрсатилди.

Амалий аҳамияти. Ўзбекистон Республикаси патент идорасига патент олиш учун талабнома топширилди (№ IAP 20080420) «Ўсимлик хом ашёси шротидан оксил комплексини ажратиб олиш усули». Олинган натижалар табиий оксилларнинг рак ҳужайраларига қарши самаралари ва таъсир механизмлари бўйича фундаментал билимларни кенгайтиришга хизмат қилиши мумкин, рак ҳужайраларига қарши курашда даволашнинг янги стратегияларини тушунишга имкон беради, соядан ажратилган оксиллар асосида рак шишига қарши янги препаратларни яратиш имконини очади.

Натижаларнинг татбиқ этилиши. Тадқиқотлардан олинган натижалар асосида sp-2 оксилли рак шишига қарши восита сифатида таклиф этилган. Амалий тадқиқотлар бўйича бажарилаётган ФА-А11-Т174 «Соя шротидан рак шишига қарши оксил препаратини яратиш ва маҳаллий хом-ашёдан юқори тозаликдаги ферментларни ажратиш» лойиҳаси доирасида дори

шаклининг яратиш, зарурий МТХ ва препарат субстанцияси ВФМ лойиҳасини тайёрлаш ва ЎЗР ССВ ҳузуридаги фармқўмитага топшириш ишлари олиб борилмоқда.

Қўлланилиш соҳаси: табиий ва физиологик фаол моддалар кимёси, тиббиёт.

РЕЗЮМЕ

Диссертации Ю.В. Бересневой на тему: «Протеин sp-2 из шрота сои, изучение его противоопухолевой активности» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Ключевые слова: белковый комплекс протеин sp-2, клеточная линия меланомы мышей КМЛ, эстрогены, прогестерон, пролиферация, апоптоз, степень деструкции раковых клеток.

Объект исследования. Объектом исследования является белковый комплекс протеин sp-2 из шрота сои.

Цель исследования. Получение белкового комплекса протеина sp-2 из шрота сои, исследование его физико-химических характеристик и специфической противораковой активности на штаммах АКАТОЛ, меланомы В-16 и раке молочной железы.

Методы исследования. Методы колоночной хроматографии, электрофоретические исследования, определение аминокислотного состава и N-концевых аминокислот, радиометрического анализа по включению ^{14}C - тимидина, иммуногистохимического анализа, микроскопии, иммуноферментного анализа, ПЦР анализа.

Полученные результаты и их новизна. Впервые из шрота сои выделен белковый комплекс протеин sp-2, изучены его физико-химические свойства. Полученный белок состоит из комплекса белков с молекулярной массой основного компонента 30 кДа, изоэлектрической точкой в области pI -3,8; 3,9 и 8,2. Аминокислотный состав Ala, Arg, Asp, Val, His, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Tug, Thr, Phe. N-концевые аминокислоты: треонин, глицин, серин, пролин, валин. Показана высокая противоопухолевая активность протеина sp-2 в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Практическая значимость. Подана заявка в патентное Государственное ведомство Республики Узбекистан (№ IAP 20080420) «Способ выделения белкового комплекса из шрота растительного сырья». Полученные результаты помогут увеличить фундаментальные знания современной науки относительно механизма и эффектов действия белков на опухолевые клетки, позволят понять новую стратегию лечения злокачественных новообразований, проектировать новые противоопухолевые препараты на основе белков, выделяемых из сои.

Реализация результатов. В результате проведенных исследований протеин sp-2 предложен в качестве противоопухолевого средства. В рамках прикладных исследований по гранту ФА-A11-T174 «Разработка противоопухолевого белкового препарата из шрота сои и выделения особо чистых ферментов из местного сырья» проводится разработка лекарственной формы и подготовка необходимых НТД по проекту ВФС субстанции для передачи в ФК МЗ РУз.

Область применения: химия природных и физиологически активных веществ, медицина.

RESUME

of Yu.V. Beresneva thesis on the scientific degree competition of the doctor of philosophy in biology, specialty 02.00.10 – Bioorganic chemistry, entitled as "Sp-2 protein from soybean cake, the study of its antitumor activity"

Key words: sp-2 protein complex, KML mice melanoma cell line, estrogens, progesterone, proliferation, apoptosis, cancer cells destruction degree.

Subjects of research: The object of study is the sp-2 protein complex from soybean cake.

Purpose of work. Isolation of the sp-2 protein complex from soybean cake, the study of its physical and chemical characteristics and specific anticancer activity on AKATOL, B-16 melanoma and breast cancer strains.

Methods of research. Column chromatography, electrophoretic studies, determination of amino acid composition and N-terminal amino acids, radiometric analysis on incorporation of ^{14}C - thymidine, immunohistochemical analysis, microscopy, immunenzyme analysis, PCR analysis.

The results obtained and their novelty. For the first time sp-2 protein complex was isolated from soybean cake and its physical and chemical properties were studied. The obtained purified protein complex consists from 5 proteins with a molecular mass of the core component of 30 kDa, isoelectric point of pI -3,8; 3,9 and 8,2. Amino acid composition: Ala, Arg, Asp, Val, His, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Tyr, Thr, Phe. N-terminal amino acids: threonine, glycine, serine, proline, valine. The sp-2 protein has shown high antitumor activity in vitro and in vivo.

Practical value. Application was submitted to the State Patent Agency of the Republic of Uzbekistan №IAP 20080420 «The method of extraction of protein complex from plant material cake ». The results will help to increase fundamental knowledge of modern science regarding the mechanism and effects of proteins on tumor cells, allow to understand the new strategy for treating malignant tumors and to develop new anticancer drugs based on proteins extracted from soybean.

Application of results. In a result of the research sp-2 protein was proposed as an antitumor agent. In a framework of applied research under the grant of FA-A11-T174 on "Development of anti-tumor protein preparation from soybean cake and isolation of extra pure enzymes from local raw materials" a drug form of the preparation is being developed and the necessary technical documentation by the Temporary Pharmacopeias paper project for submission to the Pharmacopeias Committee of the Republic of Uzbekistan.

Field of application: chemistry of natural and physiologically active substances, medicine.

Соискатель: