

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 14.07.2016.К/В/Т.13.01
РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ
БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ
БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

ИБРАГИМОВ ФАЗИЛ АХМЕДОВИЧ

**ОНКОЛОГИК КАСАЛЛИКЛАРНИ ДАВОЛАШДА СОЯДАН
ОЛИНГАН ОҚСИЛ ПРЕПАРАТИНИНГ БИОЛОГИК ФАОЛЛИГИ**

**02.00.10 – Биоорганик кимё
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

УДК 616.988.23.6:543.865-547.963.3

Докорлик диссертацияси автореферати мунтарижаси
Оглавление автореферата докторской диссертации
Content of the abstract of doctoral dissertation

Ибрагимов Фазил Ахмедович

Соядан олинган оқсил препаратининг онкологик касалликларни
даволашдаги биологик фаоллиги5

Ибрагимов Фазил Ахмедович

Биологическая активность белкового препарата из сои в лечении
онкологических заболеваний31

Ibragimov Fazil Aymedovich

Biological activity of protein preparation from soybean in treatment of
oncological diseases 59

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works 85

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ХУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 14.07.2016.К/В/Т.13.01**

**РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ
БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ
БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

ИБРАГИМОВ ФАЗИЛ АХМЕДОВИЧ

**ОНКОЛОГИК КАСАЛЛИКЛАРНИ ДАВОЛАШДА СОЯДАН
ОЛИНГАН ОҚСИЛ ПРЕПАРАТИНИНГ БИОЛОГИК ФАОЛЛИГИ**

**02.00.10 – Биоорганик кимё
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.5.В68 рақам билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Биоорганик кимё институтида бажарилган. Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб саҳифасига (<http://ss.biochem.uz>) ва «ZiyoNet» таълим ахборот тармоғида ([www. ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Кадирова Дильбар Абдуллаевна биология
фанлари доктори

Расмий оппонентлар: Саитмуратова Огульджан Худайбергановна биология
фанлари доктори, доцент

Бугланов Анатолий Аюшевич
биология фанлари доктори, профессор

Гафур-Ахунов Мирза Али
тиббиёт фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот: Республика иммунология илмий маркази

Диссертация ҳимояси Биоорганик кимё институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги 14.07.2016.К/В/Т.13.01 рақамли Илмий кенгаш асосидаги бир марталик Илмий кенгашнинг 2016 йил «__» декабрда соат ____ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63).

Докторлик диссертацияси билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63), e-mail: asrarov54@mail.ru).

Диссертация автореферати 2016 йил «__» ноябрда тарқатилди.
(2016 йил «__» _____ даги № _____ рақамли реестр баённомаси).

А.С. Тураев

Фан доктори илмий даражасини берувчи бир
марталик Илмий кенгаш раиси, к.ф.д., профессор

М.И. Асраров

Фан доктори илмий даражасини берувчи бир
марталик Илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.д., профессор

Р.З.Сабиров

Фан доктори илмий даражасини берувчи бир
марталик Илмий кенгаш ҳузуридаги бир

КИРИШ (Докторлик диссертациясининг аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда дунёда онкологик касалликлар профилактикаси ва даволаш долзарб бўлганлиги сабабли ўсимлик ва ҳайвон хом ашёсидан олинадиган табиатан биологик бўлган янги доривор воситалар яратилмоқда. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти статистик маълумотларига кўра онкологик касалликлар билан касалланиш яқин 20 йилда ўртача икки баробарга кўпаяди¹.

Республикамиз мустақилликка эришгандан буён маҳаллий ўсимликлар хомашёси асосида онокологик касалликлар терапиясида қўлланиладиган юқори самарали препаратлар яратиш ва аҳолини сифатли дори воситалари билан таъминлаш йўналишларида кенг қамровли чора-тадбирлар амалга оширилди ва муайян натижалар қўлга киритилди. Саратон касаллигини профилактика қилиш, хавфли ўсмаларни эрта аниқлаш ва ўсмага қарши янги доривор воситаларни яратиш бўйича изланишларни алоҳида таъкидлаш мумкин.

Бугунги кунда дунёда ўсма касалликлари этиологияси ва патогенезининг механизмларини аниқлаш, ўсмага қарши қўлланиладиган кимёвий ва нурли терапиядан келиб чиқадиган оғир оқибатларни бартараф этувчи янги препаратларни ишлаб чиқиш масаласи долзарб бўлиб қолмоқда. Биологик фаол бирикмалар асосида онкологик патологияларни профилактика қилиш ва даволаш учун янги дори воситаларини яратиш, ўсмага қарши фаол бирикмаларнинг таъсир механизмларини исботлаш, антиметастатик самара берувчи оксил табиатли препаратларни ишлаб чиқиш, ўсмага қарши таъсирни кучайтирадиган ҳамда апоптозни чақирувчи омилларни аниқлаш, эндоген ҳимоя механизмларини фаоллаштирадиган ва даволаш натижаларини яхшилайдиган ўсмага қарши табиий препаратларни ишлаб чиқиш кабилар долзарб масалалардан ҳисобланади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 28 ноябрдаги ПҚ-1652-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини ислоҳ қилишни янада чуқурлаштириш чоралари тўғрисида» Қарори ва Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2012 йил 29 мартдаги 91-сон «Тиббиёт муассасаларининг моддий-техника базасини янада мустаҳкамлаш ва фаолиятини ташкил этишни такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялари ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология»

устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича ҳорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи.²

¹<http://www.cancer.org/downloads/STT>

Онкологик касалликларни даволашда оксил ва пептидлар асосидаги биологик препаратларни яратишга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Саратон Миллий институти (АҚШ), Андонг миллий университети (Корея), Москва давлат университети, Физик-кимёвий тиббиёт илмий-тадқиқот институти, Республика онкология илмий маркази (Россия), Онкология институти (Украина), Онкология илмий-тадқиқот маркази (Грузия), шунингдек, Ўсимлик моддалари кимёси институти ҳамда Биоорганик кимё институтида (Ўзбекистон) амалга оширилади.

Онкологик касалликларни даволашда ўсимликлар моддалари асосидаги биологик препаратларни яратишга оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: соя ва баъзи бошоқли экинлар донидан хавфли ўсмага қарши луназид пептиди, метастазлар профилактикаси учун Бауман-Бирк протеазалар ингибитори ажратилган (Саратон Миллий институти, АҚШ); *Poligonatum varticillatum* тоғ купенаси ўсимлиги асосида антиканцероген хоссали Immucor GA-40 иммуномодулятор ишлаб чиқилган (Онкология илмий-тадқиқот маркази, Грузия); антиканцероген хоссага эга бўлган «Инсол» биологик фаол қўшимча яратилган (Москва давлат университети, Россия); ўсма ҳужайралари ўсишини ингибирлаш хоссасига эга бир қатор биологик фаол бирикмалар ва экстрактларнинг янги фармакологик фаолликлари аниқланган (Ўсимлик моддалари кимёси институти, Ўзбекистон); *Testudo horsfieldi* тошбақа қонидаги нейтрал олигопептидлар йиғиндисидан бўлган, радио- ҳамда кимётерапия полифункционал таъсирга эга иммунокорректор Тортезин препарати ишлаб чиқилган (Биоорганик кимё институти, Ўзбекистон).

Дунёда саратон касаллиги билан оғриган беморларни даволашда қўлланиладиган дори воситаларини яратиш бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: кимё- ва радиотерапиядан юзага келадиган иммунологик ва гематологик бузилишларни коррекцияловчи воситалар ишлаб чиқиш; оғир оператив аралашувдан кейин қўлланиладиган иммунокорректорларни яратиш; ўсманинг иммунодепрессив таъсири оқибатида юзага келадиган иммунологик бузилишларни коррекциялаш; ўсмага қарши фаол бирикмаларнинг молекуляр ва ҳужайра даражасида таъсир механизмларини аниқлаш; антиметастатик самара берувчи, оксил табиатли препаратларни ишлаб чиқиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Онкологиянинг энг янги йўналишларидан бири саратонни биопрепаратлар - ўсма ҳужайраларини

нобуд қиладиган ва соғлом тўқималар, шунингдек, бутун организмга зарарли

² Диссертациянинг мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи <http://www.lib.uiowa.edu/harding/md/ej.html>; http://www.cancer.gov/search/cancer_literature/; <http://www.scirp.org/journal/jct> ва бошқа манбалар асосида ишлаб чиқилган.

6

таъсир кўрсатмайдиган ноёб воситалар билан даволаш ҳисобланади. Ушбу йўналишда хорижий олимлар Nagase H., Medawar P.B., Xiao C.W., Rheinwald J., Green H., Jackman K.A. томонидан саратон касаллигини замонавий диагностика усуллари ишлаб чиқилган ва даволаш учун янги биологик доривор воситалар яратилган. Соя оксидадаги лецитиннинг юқори даражаси қондаги қанд микдорининг пасайишига, қон томирлари деворининг атеросклеротик тикилмалардан тозалашга, алмашинув жараёнларининг яхшиланишига ёрдам бериши аниқланган. Соядан ажратиб олинadиган протеазаларнинг ингибиторлари одам хужайраларининг рентген нурлари таъсирида саратон хужайраларига ўзгариши эҳтимоллигини 5-10 мартага пасайтирган [Jackman, 2007].

МДХ давлатларида онкологик касалликларни ўсимликлар асосидаги доривор воситалар билан даволаш бўйича тадқиқотларни Крутяков В.М., Казачкина Н.И., Корсун Е.В., Тимошенко А.В., Кадагидзе З.Г., Немцова Е.Р. олиб бормоқдалар. Маълум бўлишича, ингибиторлар жигар, ўпка, ошқозон, ҳикилдоқ, сичқонлар, каламушлар, хомяклар бриктирувчи тўқимасининг турли ўсма касалликларида (аденокарцинома, ангиосаркома, меланома ва бошқалар.) ёрдам беради. Тоза ва қисман тозаланган протеаза ингибиторлари бир хилда таъсир кўрсатади, ушбу хосса препаратлар таннархини камайтириш имконини берган [Крутяков, 2001].

Ўзбекистонда онкологик касалликларни ўсимликлар асосидаги доривор воситалар билан даволаш тадқиқотлари билан профессорлар Еникеева З.М., Юлдашев А.Х. шуғулланадилар, улар томонидан ўсмага қарши бирикмалар колхицин ҳосилалари, винкристин и винбластин ажратиб олинган. Соядан оксил комплексининг стандартлаштирилган комплексини олиш ва олинган препаратнинг *in vitro* ва *in vivo* шароитида биологик ва ўсмага қарши фаоллигини аниқлаш, шунингдек, унинг фармакология ва токсикологияси йўналишида тадқиқотларни амалга ошириш долзарб, илмий-амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-А11-Т174 «Соя кунжарасидан ўсмага қарши оксил препарати ва маҳаллий хом ашёдан тоза ферментларни ажратиб олишни ишлаб чиқиш» (2009-2011 йй.), Украина илмий-техника марказининг 3501-рақамли «Соя оксидини организм хужайрасининг хавфли янги ҳосилаларини

даволашда тадқиқоти» (2006-2009 йй.) мавзuidaги лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади соядан оқсил комплекси ажратиш, унинг физик-кимёвий, фармако-токсикологик тавсифлари, саратонга қарши фаоллигини ўсманинг ҳар хил турларида *in vivo*, биопсия материалида кўкрак беи, эндометрия ва йўғон ичак саратонини *in vitro* аниқлашдан иборат.

7

Тадқиқотнинг вазифалари:

соядан оқсил комплексини ажратиб олиш усулини ишлаб чиқиш;
оқсиллар комплексини ажратиш ва физик-кимёвий тавсифлаш;
оқсил комплексининг протеаза фаоллигини аниқлаш;
тадқиқот моделларида *in vivo* экспериментларида моно- ва комплекс терапияда биологик активлигини аниқлаш;

оқсиллар комплексининг *in vitro* экспериментларида анъанавий терапияга резистент бўлган кўкрак беи, эндометрия ва йўғон ичак саратони хужайраларида ўсмага қарши фаоллигини аниқлаш;

препарат субстанцияси ва дори шаклининг фармако-токсикологияси бўйича клиникагача бўлган тадқиқотлар олиб бориш;

«Биокор-0,2г» препаратининг дори шаклини ишлаб чиқиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида «Генетик-1» соя навидан (*Glycine max (L.) Mtrr.*) олинган оқсиллар комплекси, онкологик касалликлар, йўғон ичак саратони, АКАТОЛ, АКАТОН, Меланома В-16 ва Саркома 180 каби пайвандланган ўсма штаммлари олинган.

Тадқиқотнинг предмети оқсиллар комплексининг («Биокор-0,2г» препарати субстанцияси) физик-кимёвий ва ўсмага қарши хоссалари, унинг АКАТОЛ, АКАТОН, Меланома В-16 ва Саркома 180 каби пайвандланган ўсма штаммларида, резистент бўлган эндометрия саратони, йўғон ичак саратони хавфли трансформациянинг барча босқичларида *in vitro* пролиферациясини ингибирлаши, фармако-токсикологиясини тавсифлашдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертация ишида колонкали хроматография, электрофорез тадқиқот усуллари, оқсилнинг аминокислота таркибини аниқлаш, иммуногистокимёвий таҳлил, микроскопия, масс спектрометрия, иммунофермент таҳлили ва фармакологик ҳамда токсикологик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

соядан оқсил комплекси ажратиб олинган ва унинг физик-кимёвий, фармакологик ҳамда токсикологик хоссалари аниқланган;

оқсил 12,7-79,0 кДа молекуляр массага эга полипептидлар комплексидан таркиб топганлиги, pI -4,1; 4,2; 4,5 ва 4,7 лардаги изоэлектрик нуқтага эгалиги исботланган;

масс-спектрометрия усули билан оксил комплексида протеазалар Кунитц ингибитори аниқланган;

оксил комплексининг *in vitro* ва *in vivo* шароитларида ҳафвли ўсмага, шамоллашга қарши фаоллиги ҳамда иммунмодуловчи ва антиканцероген хоссалари аниқланган;

соя дуккакларидан олинган полипептидлар комплекси асосида «Биокор-0,2г» препарати яратилган ва унинг таблетка кўринишидаги дори шакли ишлаб чиқилган.

Тадқиқотнинг амалий натижаси куйидагилардан иборат:

8

клиникагача бўлган фармакологик ва токсикологик тадқиқотлар олиб борилган ва уларга кўра, «Биокор-0,2г» препарати заҳарсиз бирикмаларнинг V синфига кираиши ҳамда кумулятив хоссаларга эга эмаслиги аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги экспериментал маълумотлар замонавий юқори аниқликка эга бўлган тадқиқот усуллари кўллашда олинганлиги, натижаларнинг амалиётга кўлланилиши ҳамда ҳулосалар замонавий математик статистикадан фойдаланилган ҳолда ишлаб чиқилгани билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти соя дуккакларидан оксил комплексининг ажратилиши бўлиб, бу республикада янги илмий йўналишга асос бўлган. Экспериментал ҳайвонлар организмига «Биокор-0,2г» препарати таъсирининг механизми аниқланган, бу эса ҳафвли ўсмалар ривожланишининг этиологияси ва хусусиятлари тўғрисида янги маълумотлар олиш билан изоҳланади.

Тадқиқотнинг амалий аҳамияти соядан олинган оксил комплекси асосида «Биокор-0,2г» - онкологик касалликларни комплекс даволаш учун таблетка кўринишидаги препаратнинг дори шакли яратилгани, препарат даволашнинг бошқа турлари (кимёвий- ва нурли терапия) заҳарли таъсирини камайтиргани, иммун тизимини нормаллаштиргани, қоннинг гематологик ва морфологик кўрсаткичларини яхшилагани ва метастазларнинг олдини олиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Маҳаллий ўсимлик хомашёси асосида саратонга қарши дори воситаларини яратиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

соя кунжарасидан саратонга қарши фаолликка эга оксил ва уни ажратиш усулига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти олинган (IAP 04501, 2012). Илмий тадқиқот натижасида онкологик касалликларни даволаш учун «Биокор-0,2г» таблетка дори шакли ишлаб чиқиш имконини берди;

соядан ажратилган ўсмага қарши фаолликка эга оксил комплекси бўйича натижалар EMBL маълумотлар базасида рўйхатдан ўтказилган

(<http://www.ebi.ac.uk>). «Биокор-0,2г» препарати АКАТОЛ, АКАТОН, меланома В-16 ва Саркома 180 каби пайвандланган ўсма штаммларида ўсмага қарши фаоллик намоён қилган ва саратон тўқимасининг ўсишини секинлаштирган. «Биокор-0,2г» препарати 5-фторурацил берилган ўсма ташувчи ҳайвонлар иммун тизимининг қайта тикланишига ёрдам бериши, ўсмага қарши препаратларнинг даволовчи таъсирини яхшилаши ва ўсма ташувчи ҳайвонлар иммунитетини ошириши тасдиқланган. Тадқиқот натижалари ўсимлик оксиллари асосида онкологик касалликларни даволашда янги йўналишга ва самарали доривор воситалар яратиш имконини беради.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мавзу бўйича Тадқиқот натижалари 23 та республика ва халқаро илмий-амалий анжуманларда,

9

жумладан, Закавказье давлатлари онкологларининг III конгресси (Ереван, 2004 «Врачларни дипломдан кейинги тайёрлашнинг долзарб муаммолари ва тиббиётнинг янги уфқлари» конференцияси (Тошкент, 2007); XI Россия онкология конгресси (Москва, 2007 й); «Физик-кимёвий биология ва биотехнология истиқболлари» илмий-амалий конференция материаллари (Андижон, 2007); МДХ онкологлари ва радиологларининг V-съезди (Тошкент, 2008); «Табиий бирикмалар кимёсининг долзарб муаммолари» (Тошкент, 2009, 2010, 2011, 2012), «Биотехнология – ҳолати ва ривожланиш истиқболлари» Халқаро конгресси (Москва, 2009); «Биологик фаол моддалар: олиш ва қўллашнинг фундаментал ва амалий масалалари» илмий амалий анжумани (Украина, 2009, 2011); «Ҳозирги замон онкологияси: ютуқлар ва ривожланиш истиқболлари» Россия илмий-амалий анжумани (Томск, 2009); Фундаментал онкология бўйича 6-Россия анжумани (Санкт Петербург, 2010), 14-, 15-Халқаро Пушино мактаби – ёш олимлар анжумани «Биология – XXI аср фани» (Москва, 2010 й, 2011); «Биоорганик кимё ривожланишининг долзарб муаммолари» (Ташкент, 2010) конференцияси; X, XI «Ўсмага қарши маҳаллий препаратлар» Бутунроссия илмий-амалий анжумани (Москва, 2011й., 2012); «Фундаментал онкология – Петров ўқишлари» еттинчи конференцияси (Санкт-Петербург, 2011); Ўзбекистон онкологлари II Конгресси (Тошкент, 2011.); «Петров ўқишлари» 8-конференцияси (Москва, 2012); Беларусь-Россия «Ўсмага қарши маҳаллий препаратлар» (Минск, 2013) мавзуларидаги республика ва халқаро илмий амалий конференцияларда маъруза кўринишида баён этилган ҳамда апробациядан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 48 та илмий иши чоп этилган, улардан 13 та илмий мақола, жумладан, 9 таси маҳаллий ва 4 таси Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссияси томонидан докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган чет эл илмий журналларида нашр этилган, ихтирога патент олинган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертациянинг тузилиши

кириш, бешта боб, хулоса, адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 195 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

10

Диссертациянинг **«Соя дуккаклари: тавсифи ва турли касалликлар профилактикаси ҳамда даволашдаги аҳамияти»** деб номланган биринчи бобида ўсмалар биотерапиясидаги оксиллар ва пептидлар тадқиқоти, онкологик беморларни даволашда иммуномодуляторларни қўллаш, турли касалликлар терапиясида соя ҳосилалари асосидаги дори воситаларига бағишланган батафсил адабиётлар шарҳи берилган.

Диссертациянинг **«Биокор препарати оксил комплекси тадқиқоти материали, шароити ва усуллари»** деб номланган иккинчи бобида соя дуккакларидан оксил комплексини ажратиш усули батафсил берилган, электрофорез, радиометрия, масс-спектрометрия, иммунология, экспериментал ўсма штаммларида оксил препаратининг биологик фаоллигини аниқлаш, фармакология ва токсикология, шунингдек, гистология усуллари баён этилган.

Диссертациянинг **«Оксил комплексининг физик-кимёвий тавсифи ва унинг биологик фаоллиги»** деб номланган учинчи бобида Биокор препаратининг физик-кимёвий тавсифи ва экспериментал ўсма штаммларидаги биологик фаоллигининг тадқиқоти натижалари келтирилган.

Оксиллар хроматографияси ва оксилларнинг физик-кимёвий тавсифи.

Ҳозирда дунёда соя ва таркибий қисмининг канцерогенезга таъсирини аниқлаш бўйича кўпгина тадқиқотлар олиб борилмоқда [Крутяков, 2001; Немцова ва бошқ., 2002]. Ўтказилган тадқиқотларга кўра, соянинг таркибий қисми ўсма ҳужайралари пролиферациясини ингибирлаш, трансформацияланган ҳужайраларда апоптозни чақириш хусусиятига эга бўлиб, ўсма ҳужайраларига таъсири натижасида организм нормал тўқималарига нисбатан заҳарлилиги кам даражада бўлади [Залеток ва бошқ., 2006; Казачкина ва бошқ., 2006]. Шунга кўра, соядан оксил комплексини, унинг ўсмага қарши фаоллигининг тадқиқоти учун ажратиш долзарб ҳисобланади. Соя дуккакларидан оксиллар натрий хлорнинг 0,06М эритмаси ва рН 7,4 бўлган 0,05М Трис буфери билан экстракция қилишнинг икки хил

усули билан ажратилди.

Оқсиллар ўсмага қарши фаоллигини тестдан ўтказиш учун КМЛ – сичқонлар меланома штамми В-16 [Кузнецова ва бошқ., 2005] in vitro сичқонлар меланомаси хужайра линиясида ўсмага қарши моддаларни танлаш тест-тизими модели қўлланилди. Гельфилтрация учун самарали ажратиш имконини берувчи G-75 ва G-50 сефадекслари-ташувчилар танлаб олинди [Остерман, 1983]. Оқсиллар гельфилтрация хроматограммаси 1 ва 2 расмларда келтирилган.

D_{80}^2
2,5
2
1,2
1,5
1
0,5

0,05M Трис -HCl буфер рН
7,4 колонкасидаги
гельфилтрацияси

11

0 200 400 600 800 1000 1200 Объем элюции, мл
Элюция хажми, мл

1,4
 D_{80}^2
1,2
1
0,8
0,6

2-расм. Соя оксигенининг G
50 сефадексли (80 x 2,6),
0,05M Трис -HCl буфер рН
7,4 колонкасидаги

0,4 0,2 0
2
1 3

1-расм.Соя оксигенининг G
75сефадексли (80 x 2,6),

гельфилтрацияси

-0,2 0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200

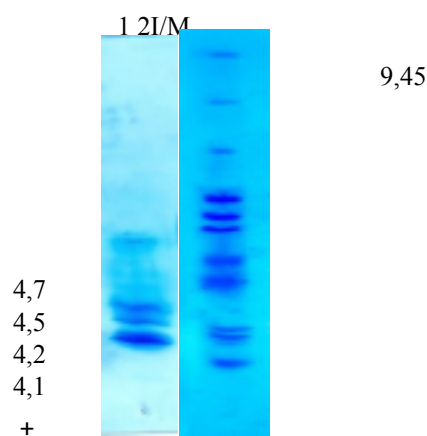
Объем элюции
Элюция хажми, мл

Иккала ташувчида учтадан фракция элюирланган. ^{14}C -тимидин киритмаси бўйича фракциялар фаоллигини аниқлаш 100 мкг/мл дозадаги $64,0 \pm 1,9\%$ ли G-75 сефадексли колонкадаги гельфилтрациядан сўнг биринчи фракциянинг катта фаолликка эга эканлигини кўрсатди. Гельфилтрациядан сўнг ўтказилган оксил фракцияларининг электрофорез тадқиқотлари G-75 сефадекслидаги оқсиллар ажралиши энг самарали эканлигини кўрсатди.

Биринчи фракциянинг таркибий қисми 12,7, 13,0, 15,0, 67,0, 79,0 кДа молекула массали аниқ кўринишга эга бўлган полипептидлардан иборат. G 50 сефадексли колонкада ўтказилган гельфилтрацияда оқсиллар ажралиши самарасиз бўлди, учта фракцияда ҳам оқсиллар спектри бир хилда бўлди.

Сўнгра оқсил фаол фракциясининг изоэлектрофокусланиши ўтказилди.

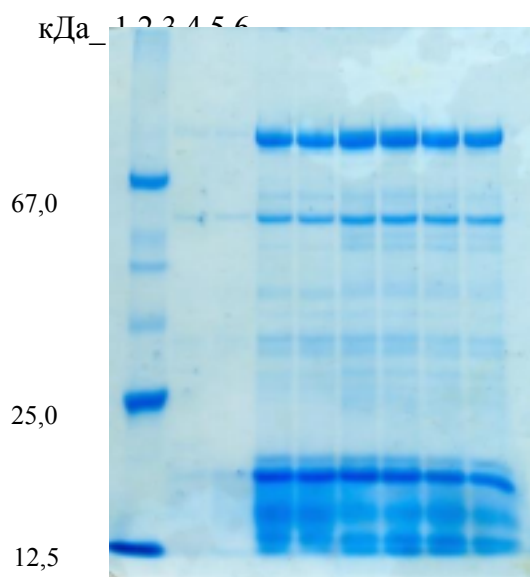
pI -4,1, 4,2, 4,5 ва 4,7 қисмларда тўртта изонукта мавжудлиги кузатилди (3-расм).



**3.расм. G-75 колонкасидаги
гельфилтрациядан сўнг оксил фаол
фракциясининг
изоэлекторофокусланиши
рН 3,5-10диапазонидаги амфолинлар
1- I Фракция
2-изофокусланиш белгилари.**

3,50

Лаборатория намуналарининг бешта сериясида ҳам
стандартлаштирилган оксилнинг фаол фракциясига Биокор препарати номи
берилди. (4-расм).



**4-расм. Биокор субстанциясининг ДСН
+
иштирокидаги 10% ПААГдаги
электрофорези:
1-маркер-оксиллар аралашмаси (БСА-67
кДа, Химотрипсиноген-25 кДа, Цитохром
С-12,5кДа), 2-РСО, 3-7 – препарат тажриба
намуналарининг бешта серияси.**

Фаол оксил фракциясининг аминокислота таркиби аниқланди (1-жадвал).

1-жадвал

.

Фаол оксил фракциясининг аминокислота таркиби

Аминокислоталар	Фоизли таркиби	Аминокислоталар	Фоизли таркиби
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
Σ 95,99%			

Биокор препаратининг антитрипсин фаоллигини аниқлаш.

Ўсма ўсишида, фаол марказида серин (трипсин, химотрипсин, калликреин, плазмин, тромбин) тутувчи серинли протеазалар ва фаол марказида Zn^{2+} тутувчи металлопротеиназалар муҳим аҳамиятга эга [Nagase et al, 1994]. Шунга кўра, Биокор препаратининг антитрипсин фаоллигини аниқлаш бўйича тажриба ўтказилди (2-расм). Жадвалда келтирилган маълумотларда Биокорнинг $24,1 \pm 0,1$ дан $34,7 \pm 0,1$ гача серин протеазаларига нисбатан юқори ингибирлаш фаоллигига эга эканлигини кўриш мумкин, бу эса препаратнинг ўсмага қарши хусусиятлари мавжудлигини тахмин қилиш имконини беради.

13

2-жадвал.

Серинли протеазалар протеаза фаоллигининг Биокор томонидан ингибирланиши

Серинли протеазалар	Серинли протеазалар фаоллигининг ингибирланиши	
	Протеолитик фаолликнинг шартли бирликлари, ютилиши λ 280	ингибирланиш%
Трипсин	$0,145 \pm 0,002$	$34,7 \pm 0,1$
Химотрипсин	$0,156 \pm 0,003$	$29,4 \pm 0,2$
Плазмин.	$0,167 \pm 0,002$	$24,1 \pm 0,1$
Назорат*	$0,220 \pm 0,002$	0

* pH 7,6 ли 0,05М фосфат буферида протеазалар 3,0 мкг/мл ташкил этади; субстрати - казеин 300,0 мкг, (* - $p < 0,05$).

Биокор препарати субстанцияси пептидларининг масс-спектрометрия таҳлили

Икки ўлчамли гель-электрофорези ва масс-спектрометрия усули билан биргаликда Биокор препарати таркибига кирувчи оқсиллар аниқланди. Препарат таркибига протеазалар ингибитори – Kunitz trypsin protease inhibitor нинг мавжудлиги тасдиқланди. Маълумотлар 3-жадвалда келтирилган.

3-жадвал

Биокор препаратининг масс-спектрометрия таҳлили

Идентификацияланган оқсиллар	ID	Mr(Da)	Score	Sequence Coverag %
Kunitz trypsin protease inhibitor	Glycin emax	22676,1	339,17	50
Beta- conglycinin alpha subunit	Glycin emax	72475,7	375,39	43
Beta-amylase	Glycin emax	57000,0	205,59	52
2,4-D inducible glutathione S transferase	Glycin emax	49000,0	78,66	23
PR10-like protein	Glycin emax	3865,99	55,42	29
24 kDa protein SC24	Glycin emax	24569,7	52,27	17

Илова: ID –NCBI базаси маълумотларига мос оқсиллар номланишининг аббревиатураси; Mr – оқсилларнинг молекула массаси; Score- $10 \lg P$, бунда P – масс спектр маълумотлари базасидан қиёсланган оқсилнинг мос келмаганлиги эҳтимоллиги.

Экспериментал канцерогенезда йўғон ичак аденокарциномаси (АКАТОЛ), ингичка ичак аденокарциномаси (АКАТОН), меланома В-16 ва саркома 180 кўчириб ўтказилган ўсма штаммларида Биокор субстанциясининг ўсмага қарши фаоллигининг тадқиқоти. Ўсма ўсишини оғирлик ва ҳажм бўйича секинлаштириш.

Биокорни киритиш дозалари йўғон ичак аденокарциномаси (АКАТОЛ) штаммида ишлаб чиқилди.

Экспериментал ҳайвонлар 4та тажриба гуруҳларига бўлинди: I гуруҳ – ҳайвонларга 10 кун давомида бир мартадан 125 мг/кг дозадаги Биокор peros киритилди; II гуруҳ – ҳайвонларга 10 кун давомида бир мартадан 150 мг/кг дозадаги Биокор peros киритилди; III гуруҳ - ҳайвонларга 10 кун давомида бир мартадан 250 мг/кг дозадаги Биокор peros киритилди; IV назорат гуруҳи

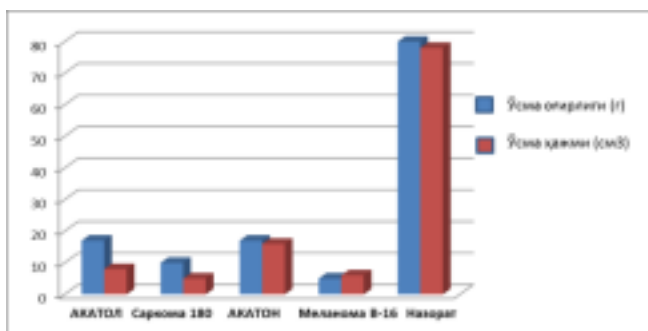
– ҳайвонларга 10 кун давомида бир мартадан NaCl физиологик эритма *per os* киритилди.

150 мг/кг дозадаги Биокор билан *per os*ни қўллаш катта самарадорликни кўрсатди ва АКАТОЛ ўсма ўсишини оғирлиги бўйича 71,9% га ингибирлаган, таъсир дозаси 125 мг/кг гача камайтирилганида, ўсма ўсишининг ингибирланиши оғирлиги бўйича 57,68% гача камайган. Киритилиш дозаси 250 мг/кг гача оширилганда, ингибирланишнинг ўсма оғирлиги бўйича ошишига олиб келмади ва 69,8% ни ташкил этди.

Биокор киритилган ҳайвонлар тажриба гуруҳларида ўсма ҳажмининг сезиларли даражада ишончли камайиши кузатилади, бунинг протеиннинг инейтрофил инвазия экссудацияси жараёнларига ижобий таъсири билан тушунтириш мумкин. Энг сезиларли ўсмага қарши самара II ва III гуруҳ ҳайвонларида кузатилади - 88,46%. I гуруҳда ўсма тўқимаси ҳажми ўсишининг ингибирланиши 61,4% ни ташкил этди.

Олинган натижалар, Биокорнинг оптимал киритилиш дозаси 150 мг/кг эканлигини кўрсатди.

Биокор таъсирини аниқлаш бўйича кейинги тадқиқотлар ингичка ичак аденокарциномаси (АКАТОН), меланом В-16 ва саркома 180 штаммларида



5-расм. Турли штаммларда 150 мг/кг дозадаги субстанция киритилгандан сўнг тажриба якунида экспериментал ҳайвонлар ўсмаси оғирлиги ва ҳажмининг ўзгариши (* - $p < 0,05$).

5-расмда тўртта штаммнинг барчасида ўсма ўсишининг секинлашиши натижалари келтирилган.

Биокор субстанцияси монотерапияда ўрганилаётган ўсмалар ўсишини оғирлиги ва ҳажми жиҳатидан 70%га секинлаштиради.

Биокор киритилгандан сўнг ўсма тўқимасида митотик ва апоптотик индекслари ҳисоблаш.

Ўсма оғирлиги ва ҳажмини ифодаловчи ўлчовлар ҳар доим ҳам ўсма тўқимасида кечаётган прогрессия ва регрессия жараёнларини етарлича акс эттира олмайди. Ўсма ҳужайраларининг пролифератив фаоллиги тўғрисида ҳолисона баҳони ўсма тўқимасидаги митозлар сонини ҳисоблаш – унинг митотик индекси (МИ) бериши мумкин. Ўсма ҳужайраларининг нобуд бўлиш жараёнларини акс эттирувчи кўрсаткич апоптотик индекс (АИ) ҳисобланади.

Апоптотик индекснинг (АИ) митотик индексга (МИ) нисбати (АИ/МИ) ўсма тўқимасидаги регрессия ёки прогрессия даражасини кўрсатади. АИ/МИ нисбати бирдан катта бўлса, ўсма регрессияси кузатилади.

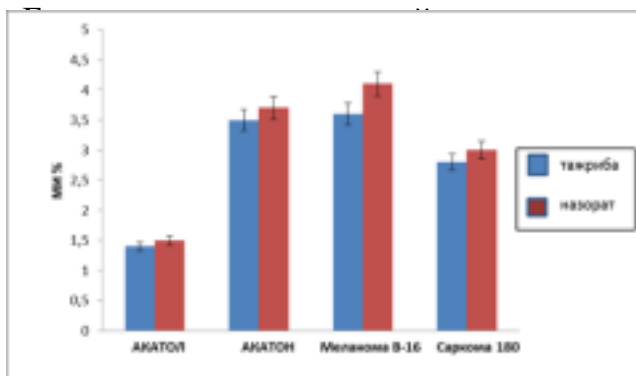
АКАТОЛ штаммидаги тажриба гуруҳида ўсма тўқимасининг юқори регрессияси кузатилди. АИ/МИ нисбати тажрибада - 2,08, назорат гуруҳида эса -0,89ни ташкил этди. Меланома В-16 штаммида АИ/МИ нисбати тажрибада -15,18, назорат гуруҳида - 0,74ни ташкил этди. АКАТОН штаммида АИ/МИ нисбати тажрибада - 1,75, назорат гуруҳида - 0,81ни ташкил этди. Саркома 180 штаммида эса АИ/МИ нисбати тажрибада - 3,6, назорат гуруҳида - 0,86ни ташкил этди.

Берилган натижаларга кўра, барча тажриба гуруҳларида ўсма тўқимасининг ишончли регрессияси кузатилади, яъни апоптозга учраган хужайралар сони митоз йўли билан кўпайган саратон хужайралари сонидан кўп бўлади, экспериментал ҳайвонлар назорат гуруҳида эса АИ/МИ нисбати 1,0 дан кам бўлади.

Биокорнинг экспериментал канцерогенез шароитида қизил илик хужайраларига ингибирловчи таъсирининг тадқиқоти.

Ўсма хужайраларига нисбатан цитотоксик самарага эга бўлган исталган терапевтик модданинг қўлланилиши, организмнинг юқори пролиферацияли нормал хужайраларида пролиферацияни камайтириши мумкин. Препаратларнинг бундай таъсирига биринчи навбатдаги нишонлардан бири қизил илик кўмиги хужайраларидир, улардаги пролиферациянинг бузилиши гемопозз жараёнлари ва иммун тизимининг самарали фаолиятида жиддий негатив оқибатларга олиб келади [Васильев, 1997].

Илик кўмиги хужайраларининг пролифератив фаоллигини аниқлаш учун Фитцджеральд бўйича хромосома таҳлили учун хужайраларни соатли культуралаш тўғри усули қўлланилди. Биокорнинг ўсмага қарши хоссаларининг тадқиқотида экспериментал канцерогенез шароитида АКАТОЛ, АКАТОН, Меланома В-16 ва Саркома 180 ўсма моделларида бу оксилнинг қизил илик хужайралари пролиферациясига ингибирловчи таъсири аниқланли. 6-расмда экспериментал ҳайвонлар қизил илигида МИни ҳисоблаш натижалари келтирилган. Маълумотлар диаграммасига кўра, ферациясини ингибирламаган.



6-расм. Ўсма имплантация қилинган экспериментал ҳайвонлар қизил илиги хужайраларининг сояли биокорни киритгандан сўнг эксперимент якунидаги митотик индекси (МИ) (* - $p < 0,05$).

Биокор препаратининг Саркома 180 ўсма экспериментал модели бўлган сичқонлар қони гематологик кўрсаткичлари ва морфологик манзарасига таъсири.

Тадқиқот сичқонлар қонида ўтказилди. Ҳайвонлар қуйидаги гуруҳларга ажратилди: интакт ҳайвонлар, назорат гуруҳи (имплантация қилинган ўсма модели) ва 150 мг/кг дозадаги регос препарати берилган ҳайвонлар гуруҳи. Препаратни киритиш ўсма кўчириб ўтказилгандан сўнг 10-куни бошланди ва ҳар куни 10 кун давомида давом эттирилди.

Шунингдек, қоннинг гематологик ва морфологик кўрсаткичларининг (лейкоцитлар фоиз кўрсаткичларининг нормаллашуви, гранулоцитлар, гемоглобин даражасининг ва эритроцитлар сонининг ошиши) яхшиланганлиги ҳам кузатилади.

4-жадвал

Биокор препаратининг Саркома 180 ўсма экспериментал модели бўлган сичқонлар қони гематологик кўрсаткичлари ва морфологиясига таъсири.

Тадқиқотнинг номи	Ҳайвонлар гуруҳи		
	Интакт гуруҳ	Назорат гуруҳи	Даволанганлар
Лейкоцитлар	7,95±0,61	20,4±3,64*	11,2±2,48**
Лимфоцитлар	5,1±0,16	3,5±0,46*	4,0±0,15
Ўрта ўлчамли хужайралар	1,45±0,12	1,7±0,5	1,2±0,1
Гранулоцитлар	1,9±0,08	3,03±0,2*	2,97±0,26*
Лимфоцитлар фоизи	57,0±2,45	38,3±0,66*	45,3±1,2**
Ўрта ўлчамли хужайралар, %	17,6±1,06	14,2±1,09	13,1±2,0
Гранулоцитла, %	22,4±1,31	44,8±1,13*	47,2±4,19*
Таёқсимон ядроли, %	1,5±0,4	7,3±2,91*	5,0±2,08*
Бўлинган ядроли, %	34,0±1,63	48,0±2,31*	50,7±3,84*
Гемоглобин	130,3±8,89	122,5±5,31	141,0±7,58**
Эритроцитлар	7,98±0,71	7,98±0,26	9,06±0,48

Илова: * $P \leq 0,05$ интакт ҳайвонлар билан қиёслашда, ** $P \leq 0,05$ назорат гуруҳи билан қиёслашда

Полипептидларнинг стандартлаштирилган комбинацияси яққол кўринадиган ўсмага қарши самарага эга бўлиши билан бирга, организм иммун тизимининг тикланишида қатнашади, қоннинг гематологик кўрсаткичларини яхшилайдди.

Биокорнинг ўсмага қарши фаоллигининг кўчириб ўтказилган штамми экспериментал ҳайвонларда препаратни кеч киритишдаги тадқиқоти. Ҳайвонлар ҳаёти давомийлигини аниқлашга оид экспериментлар юқорида номи келтирилган препарат таъсирида ўсма ўсишини оғирлиги ва ҳажми бўйича секинлаштиришни аниқлаш ҳолатига ўхшаш ҳолда олиб борилди. Препаратни киритиш ўсма кўчириб ўтказилишининг 10-кунида амалга оширилди.

17

5-жадвал

Биокорнинг ўсмага қарши фаоллигини уни кеч (ўсма кўчириб ўтказилганининг 10-куни) киритишда ўсма ўсишини секинлаштириш кўрсаткичлари ва ҳайвонлар ҳаёти давомийлигининг узайиши бўйича изланишлар

Экспериментал штаммлар	Ҳажм бўйича ЎЎТ %	Масса бўйича ЎЎТ%	ХДУ %
АКАТОЛ	91,40	66,35	38,34
АКАТОН	60,95	47,17	49,83
Меланома В-16	56,35	60,06	30,59
Саркома 180	63,84	61,63	35,90

Соядан олинган Биокорнинг АКАТОЛ, АКАТОН, Меланома В-16 ва Саркома 180 кўчириб ўтказилган штаммларида ўсмага қарши фаоллигини аниқлашга оид олиб борилган тадқиқотларга кўра, ушбу оқсил ўсма кўчириб ўтказилгандан сўнг, 10-куни киритилганида, ўсма ўсишини секинлаштириш (ЎЎС) самадорлиги ва экспериментал ҳайвонларнинг ҳаёт давомийлигини узайтириши (ХДУ) кўрсаткичлари бўйича тегишли равишда 60% ва 30% ижобий таъсирга эга бўлган (5-жадвал).

Экспериментал ҳайвонларнинг ҳаёт давомийлигини узайтиришини аниқлаш экспериментларида ички органларни текшириш ўсма кўчириб ўтказилгандан сўнг 10-куни киритилганида кам сонли метастаз ҳолатлари мавжудлигини кўрсатди. Биокор оқсил комплекси таркибидаги протеазалар

ингибиторлари метастазланиш ҳолатларини камайтиришга ёрдам беради.

Биокор ўсмага қарши фаоллигини 5-фторурацил билан киритишида сичқонларнинг кўчириб ўтказилган ўсмаларида олиб борилган изланишлар.

5-фторурацил (5-ФУ) препарати 228 мг/кг дозада ҳайвонларга ўсма трансплантацияси ўтказилгандан сўнг 3, 5 ва 9 кунлари қорин бўшлиғидан киритилди, Биокор 150 мг/кг дозада ўсма трансплантацияси ўтказилгандан сўнг иккинчи кундан бошлаб, 10 кун давомида перорал киритилди. Шундан кейин ҳайвонлар табиий нобуд бўлгандан сўнг барча гуруҳларда ЎЎС, ўртача ҳаёт давомийлиги кўрсаткичлари ҳисобланди ва булар асосида назорат гуруҳи билан қиёслаб, ҳаёт давомийлигининг узайиши аниқланди.

Оқсил препаратининг 5-фторурацил билан бирга сичқонлар кўчириб ўтказиладиган ўсмаларидаги эрта муддатларда киритилишида ўсмага қарши фаоллигини аниқланди. Препарат цитостатик даражасидаги юқори ўсмага қарши фаолликни кўрсатди. Соя оқсилни 5-фторурацил билан комплекс терапияда киритилиши ўсмага қарши таъсирни 10дан 25%гача кучайтиради (6-жадвал).

Ўсмага қарши цитостатик ва биокорни комплекс қўллаш самараси янада сезиларли бўлди, тажриба ҳайвонларининг ҳаётчанлиги ўсма гистогенезига боғлиқ ҳолда 30%дан 60%га кўтарилди (7-жадвал).

18

6-жадвал

Сичқонлар кўчириб ўтказиладиган ўсмаларида оқсил препаратини 5-фторурацил билан бирга киритилишда ўсмага қарши фаоллигини аниқлаш

Ўсма тури	Препарат	Дозаси	Киритилишлар сони	Ўсманинг ўртача массаси (г)	Масса бўйича ЎЎС%
АКАТОН	Назорат 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228мг/кг+150мг/кг 150 мг/кг	3 3+10 10	1,24±0,48 0,32±0,18* 0,09±0,06* 0,36±0,23*	74,2 92,7 71,0
АКАТОЛ	Назорат 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228 мг/кг+150мг/кг 150 мг/кг	3 3+10 10	0,87±0,31 0,12±0,03* 0,07±0,01* 0,25±0,19*	86,2 91,9 71,3

Саркома 180	Назорат 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228мг/кг+150мг /кг 150 мг/кг	3 3+10 10	1,8±0,38 0,16±0,0 5* 0,12±0,0 4* 0,19±0,0 8*	91,1 93,3 89,4
Мелано ма В-16	Назорат 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228мг/кг+150мг /кг 150 мг/кг	3 3+10 10	1,7±0,23 0,62±0,1 2* 0,40±0,1 1* 0,66±0,1 3*	63,4 76,4 61,2

Таҷриби гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун $*p<0,05$, назоратга нисбатан. Биокор препарати субстанцияси ва 5-фторурацил билан бирга киритилиши кейингисининг захарлилик таъсирининг камайишига, шунингдек, ўсма ўсиши секинлашишининг ортишига, экспериментал ўсма ташувчи ҳайвонлар ҳаёти давомийлигининг узайишига олиб келади.

Биокорни киритишда ўсма ташувчи ҳайвонлар иммун статусининг ўзгариши.

Саркома 180 штаммли ўсма зотсиз сичқонларга трансплантация қилингандан сўнг 3-, 5- ва 9-кунлари қорин бўшлиғидан 5-фторурацил 228 мг/кг дозада, 2-21-кунлари – перорал Биокор 150 мг/кг дозада киритилди.

Иммун статусини баҳолаш усули ҳар бир рецепторнинг ўзига хос дифференциялаш кластерлари (CD) [Залялиева, 2004] билан лимфоцитлар субпопуляцияларини миқдорий тестдан ўтказишга асосланган. CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 каби CD-маркерлар қўлланилди. Нейтрофилларнинг фагоцитар фаоллиги (НФФ) уларнинг латекс (1,5 мк) нейтрал заррачаларини фоизларда фагоцитлаш хусусиятига кўра аниқланди.

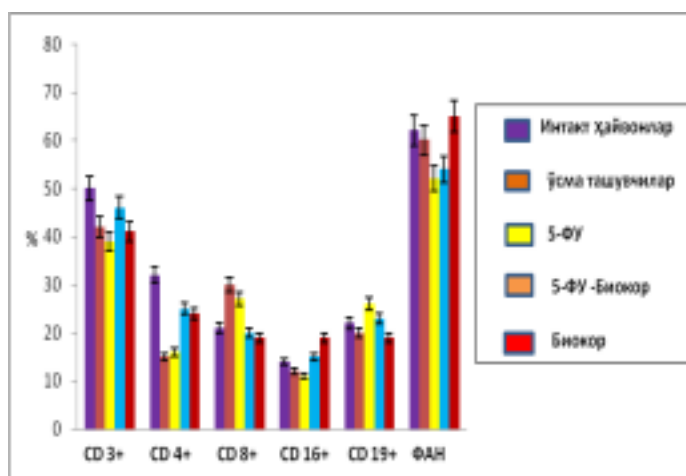
7-жадвал

Оксил препаратининг 5-фторурацил билан бирга киритилишида сичқонлар кўчириб ўтказиладиган ўсмаларида ҳайвонлар ҳаёти давомийлигининг узайишини аниқлаш

Ўсма тури	Препарат	Дозаси	Киритилиш	ХДК(кун)	ХДУ%
-----------	----------	--------	-----------	----------	------

			СОНИ		
--	--	--	------	--	--

АКАТОН	Назорат5- ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228 мг/кг+150 г/кг 150 мг/кг	3 3+21 21	25,1±1,25 33,5±1,67 37,3±1,72 26,6±1,33	33,4 48,6 35,5
АКАТОЛ	Назорат 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228 мг/кг+150 г/кг 150 мг/кг	3 3+21 21	17,7±1,35 30,5±1,52 27,5±1,26 30,6±1,51	72,3 55,3 72,8
Саркома 180	Назорат 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228 мг/кг+150 г/кг 150 мг/кг	3 3+21 21	36,6±1,83 50,3±2,52 65,3±3,26 56,3±2,81	37,4 78,4 53,8
Мелано ма В-16	Назорат 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228 мг/кг+150 г/кг 150 мг/кг	3 3+21 21	23,4±1,17 30,8±1,52 41,8±2,06 30,6±1,53	31,6 78,6 30,7



7-расм. 5-фторурацил ва Биокор препаратининг ўсма ташувчи-хайвонлар иммунологик кўрсаткичларига таъсири

Цитостатикларни киритиш CD3+, CD4+, CD8+Т-лимфоцитлар, шунингдек, химоянинг табиий омилларини ҳам (НФФ, CD16+) фоизи ва функционал фаоллигини пасайтиради (7-расм). Биокор цитостатикнинг захарлилик ва иммунодепрессив таъсирини пасайтиради, ва шу билан ўсмага қарши фаолликни кучайтиради, иммунбошқарилиш индексини тиклайди (8-жадвал).

8-жадвал

5-фторурацил ва Биокор препаратининг иммунбошқарилиш индексига таъсири

	Интакт хайвонлар	Ўсма ташувчилар	5-ФУ	5-ФУ+Биокор	Биокор
ИРИ	1,63±0,1	0,5 ±0,01	0,6 ±0,01	1,1 ±0,1	1,2 ±0,1

Биокор 5-фторурацил киритилган ўсма ташувчи ҳайвонлар иммун статусининг тикланишига ёрдам беради. Биокор ўсмага қарши препаратларнинг даволовчи таъсирини модуллаштиради ва ўсма ташувчи ҳайвонлар иммунитетини бошқаради.

Экспериментал ўсмалар ўсишини нурли терапия ва Биокор таъсирида модификациялаш.

Нурли терапия 2 Гр дозадаги гамма-нурланишда ўсма кўчириб ўтказилгандан сўнг 52 с дан кейин олиб борилди. Биокор перорал ўн баробар 150 мг/кг дозасида, ўсма трансплантация қилинганидан сўнг иккинчи кундан бошлаб киритилди. Ҳайвонлар экспериментнинг 14-куни хлороформли наркоз остида сўйилди. Ўсмага қарши самара олиб ташланган ўсма тўқимасининг оғирлиги (М) ва ҳажми (V) бўйича баҳоланди. Тадқиқотлар натижасига кўра, 2 Гр дозадаги гамма-нурланиш Саркома-180 ўсма ўсишини оғирлик бўйича 48%га ва ҳажм бўйича 52%га секинлаштиради (9-жадвал). Биокорнинг нурланиш билан биргаликда таъсири ўсма ўсишини секинлаштиришда даволаш самарасини оғирлик бўйича 85%га ва ҳажм бўйича 97%га оширади. АКАТОЛ ўсмаси билан нурланиш ўсма ўсишини оғирлик бўйича 37%гача ва ҳажм бўйича 70%гача секинлаштиради. Биокорнинг таъсири нурланишнинг ўсмага қарши самарасини оширади. ЎЎС оғирлиги бўйича 91%ни, ҳажм бўйича эса 88%ни ташкил этди.

АКАТОН ўсмаси билан нурланиш ўсма ўсишини оғирлик бўйича 64%гача ва ҳажм бўйича 91%гача тўхтатади. Биокорнинг таъсири, шунингдек, нурланишнинг ўсмага қарши самарасини оширишга олиб келади: ЎЎС оғирлик бўйича 70%ни, ҳажм бўйича эса, 97%ни ташкил этди.

Олиб борилган тадқиқотларнинг тасдиқлашича, ўсмага қарши даволашни Биокор билан тўлдириш ҳайвонлар экспериментал ўсмалар нурли терапияси самарасини ошириш имконини беради. Бунда регрессиясининг кучайишида намоён бўладиган даволашнинг ижобий самараси ўсма гистогенезига боғлиқ бўлади.

Диссертациянинг «Биокорнинг ўсмага қарши фаоллигини *in vitro* (кўкрак бези саратони, бачадон эндометрияси саратони ва йўғон ичак саратони) экспериментларидаги тадқиқоти» деб номланган тўртинчи бобида Биокор *in vitro* препарати субстанциясининг касаллик ривожланишининг турли босқичларида апоптозни чақириш ва биопсия материали саратон хужайралари пролиферациясини ингибирлашга кўрсатган таъсири натижалари тўлиқ келтирилган.

9-жадвал

Биокор ва нурланишнинг кўчириб ўтказилган ўсмалар ўсишига таъсири

Ўсма	Гуруҳ/препа- ратлар	Ўсманинг ўртача	Ўсманинг ўртача	Масса бўйича,	Ҳажм бўйича,
------	------------------------	--------------------	--------------------	------------------	-----------------

		массаси, г	ҳажми, см ³	ЎЎС%	ЎЎС%
Саркома 180	назорат	0,74±0,16	0,93 ±0,28	-	-

21

	Ү	0,38±0,12*	0,45 ±0,25*	48	52
	Ү+БП	0,11±0,02* **	0,02 ±0,01 * **	85	97
АКАТОЛ	назорат	1,87±0,32	3,72 ±0,80	-	-
	Ү	1,16±0,34*	1,12 ±0,35 *	38	70
	Ү+БП	0,17±0,09 * **	0,44 ±0,43 *	91	88
АКАТОН	назорат	1,75±0,53	2,75 ±1,10	-	-
	Ү	0,63±0,22*	0,25 ±0,16 *	64	91
	Ү+БП	0,52±0,19 *	0,09 ±0,06 * **	70	97

Илова: *P≤0,05 1 гуруҳ билан қиёсланганда (даволанмаган ҳайвонлар), ** P≤0,05 1 гуруҳ билан қиёсланганда (нурли терапия олган ҳайвонлар).

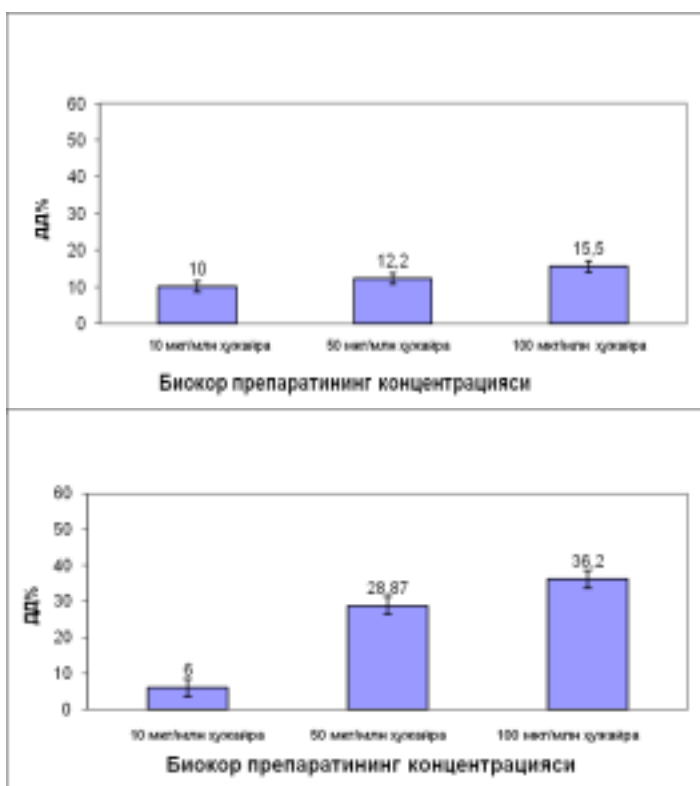
Анъанавий терапияга резистент бўлган кўкрак беи саратони ҳужайраида Биокорнинг ўсмага қарши фаоллиги бўйича изланишлар. Тарқалган кўкрак беи саратони мавжуд беморларда терапия схемасини индивидуал танлаш учун ўсмаларнинг гормонал ва дори сезгирлигини аниқлаш, айниқса, долзарбдир [Петров и др., 2000]. Кўкрак беи саратони ҳужайралари юзасида эстроген ва прогестеронга нисбатан рецепторларнинг бўлмаслиги бу касалликнинг анъанавий терапиясини қўллаш имконини бермайди ва фармакологик таъсирни ўзгартиришни талаб этади, бунда ушбу касаллик беморларнинг тахминан 15%ида учрайди [Герштейн, Кушлинский, 2002].

Ўсма материали олингандан сўнг кўкрак беи саратони билан касалланган беморларда эстроген ва прогестеронга нисбатан рецепторларнинг мавжудлиги бўйича тадқиқотлар олиб борилди. Эстрогенларга нисбатан рецепторларга қарши «Novocastra» (Англия) фирмасида ишлаб чиқарилган сичқон моноклонал антитаналари (клон 6F11) ва прогестеронга нисбатан рецепторларга қарши сичқон моноклонал антитаналари (клон 1A6) қўлланилди.

Ўсма тўқималари намуналари прогестерон ва эстрогенларга нисбатан

рецепторларнинг бор-йўқлигига қараб, гуруҳларга бўлинди, шундан сўнг иккала тур ўсма хужайралари ўсиш муҳитида *in vitro* культураланди. Келтирилган маълумотларга кўра, Биокор ўсма хужайраси юзасида эстроген ва прогестеронларга нисбатан рецепторлар бўлмаган ҳолатда, кўкрак беши саратони хужайралари пролиферациясини сезиларли ингибирлаш хусусиятига эга (8, 9-расмлар). Бунда оксил яққол кўринадиган дозага боғлиқ таъсири намоён этди.

22



8-расм. Эстрогенлар ва прогестеронга нисбатан рецепторлари мавжуд кўкрак беши саратони хужайралари қатламининг Биокор таъсирида деструкция даражаси. Тажриба гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун $p < 0,05$.

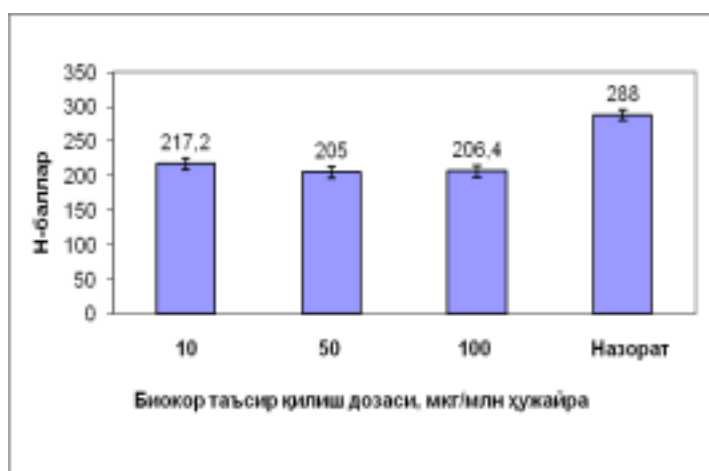
9-расм. Эстрогенлар ва прогестеронга нисбатан рецепторлари бўлмаган кўкрак беши саратони хужайралари қатламининг Биокор таъсирида деструкция даражаси. Тажриба гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун $p < 0,05$.

Биокорнинг кўкрак беши саратони хужайраларига $50 \text{ мкг}/10^6$ хужайрага ва $100 \text{ мкг}/10^6$ хужайрага нисбатан олинган концентрациялари таъсирида ўсма хужайраларининг кўпгинаси нобуд бўлди (деструкция даражаси $28,87\% \pm 5,38$ ва $36,2\% \pm 11,47$ га тегишли равишда тенг бўлди), $10 \text{ мкг}/10^6$ хужайрага нисбатан олинган концентрацияда эса аввалгига ўхшаш самара намоён бўлмади ва оксилнинг цитотоксик таъсири назорат кўрсаткичига яқин келди ($6,0\% \pm 0,98$).

Bcl-2 гени апоптоздан устунлик қилиб, хужайра нобуд бўлиши

механизмини белгилаб берадиган етакчи ген ҳисобланади. Бу ген митохондрияларда тўпланадиган оксилнинг ҳосил бўлишини кодлайди [Безбородова ва бошқ., 2004; Казачкина ва бошқ., 2006]. Bcl-2 гени экспрессияси стероид гормонларига нисбатан рецепторларнинг мавжудлиги ва хавфлиликнинг паст даражаси билан коррекциялангани учун ижобий натижага ишора қилувчи омиллар билан боғлиқ [Gallo et al, 2006].

Кўкрак беи саратони ўсма хужайралари юзасида эстроген ва прогестеронларга нисбатан рецепторлари бўлмаган ҳолатда Биокор таъсиригача ва ундан сўнг протеин Bcl-2 экспрессияси бўйича изланишлар олиб борилди. Барча концентрациялардаги Биокор таъсири кўкрак беи хужайраларида Bcl-2 оксили миқдорининг ўртача $27,25 \pm 1,14\%$, $p < 0,05$ га камайишига олиб келди (10-расм).



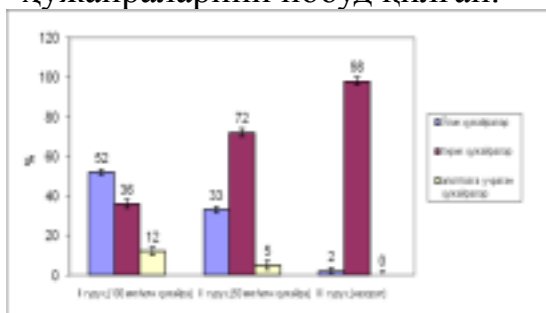
10-расм. Эстрогенлар ва прогестеронга нисбатан рецепторлари бўлмаган кўкрак беи саратони хужайраларида биокор in vitro таъсирида bcl-2 протеинининг миқдорий ўзгариши. Тажриба гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун $p < 0,05$.

Биокорнинг кўкрак беи саратони хужайраларига касалликнинг кеч босқичларидаги таъсири.

Кўкрак беи хужайраларининг хавфли трансформацияси кузатилган, касалликнинг учинчи босқичидаги ўсма тўқимаси намуналаридан фойдаландик. Бемор Г., 68 ёш, ташҳиси – чап кўкрак беи саратони, $T_2N_1M_0$ (Т – ўсма ўлчами, N – махсус лимфотик тугунларнинг катталашганлиги, M – узоқ мтастазларнинг аниқланиши), операция материалидан олинган ўсма хужайралари полистиролли планшетнинг тешикларига солинди, ўртача калинликдаги хужайра қатлами ҳосил бўлгандан сўнг дозаси 100 мкг/млн хужайрага (I гуруҳ) бўлган вадозаси 50 мкг/млн хужайрага (II гуруҳ) бўлган Биокор қўшилди, назорат гуруҳи сифатида Биокор қўшилмаган кўкрак беи саратони хужайралари олинди (III гуруҳ), протеинли хужайралар инкубация вақти 60 дақиқани ташкил этди. Биокорнинг кўкрак беи саратони хужайраларига нисбатан цитотоксик фаоллиги натижалари 11-расмда келтирилган.

Олинган натижаларга кўра, дозаси 100 мкг/млн хужайрага бўлган Биокор умумий ўсма хужайраларининг 64% ини nobуд қилиб, шу билан бир

каторда 12% хужайраларда апоптозни чақириб, юқори ўсмага қарши фаолликни кўрсатди. Протеин таъсир қилиш дозасининг камайиши билан унинг ўсмага қарши фаоллиги ҳам камаяди, худди шундай, Биокорнинг таъсир қилиш дозаси 50 мкг/млн хужайрага бўлган оксил 38% саратон хужайраларини нобуд қилган.



11-расм. Биокорнинг кўкрак беи саратони хужайраларига нисбатан цитотоксик фаоллиги (Бемор Г., 68 ёш, ташҳиси – чап кўкрак беи саратони, T₂N₁M₀нинг операция материали). Тажриба гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун

$p < 0,05$.

24

Биокорнинг ўсмага қарши фаоллигини бачадон эндометрияси саратони хужайраларида тадқиқоти.

Эндометрия саратони (ЭС) онкогинекология патологияси тузилишида биринчи ўринни эгаллайди, ЭС билан касалланиш кўрсаткичларининг ўсиш суръатлари аёллар репродуктив тизимининг бошқа хавфли ўсмаларидан анчагина юқоридир [Imyanitov E.N.et.al, 2005].

Намунада эндометрия тўқимасининг ўсмадан аввалги ҳолат кузатилди, бемор бачадон миомаси ташҳиси билан операция қилинди. 1 млн хужайрага 20 мкг дозада оксил ўсма хужайраларининг $89,0 \pm 0,98\%$ ини нобуд қилди. Шунингдек, Биокор таъсиридаги тажриба гуруҳларида апоптозли хужайраларининг ҳосил бўлиши кузатилди. (12-расм).

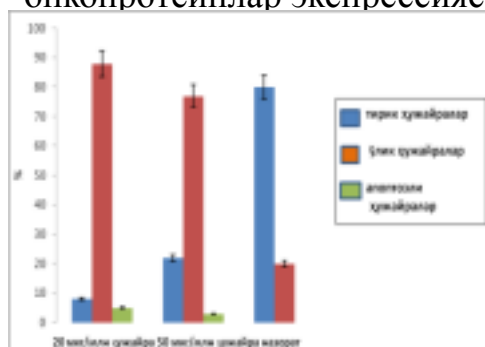
Биокор цитотоксик фаоллигининг II-босқич эндометрия саратони ташҳиси билан, T₂N₁M бўлган беморнинг операцион материалидан олинган хужайраларга нисбатан натижалари 13-расмда келтирилган. Олинган натижаларга кўра, сояли протеин барча қўлланилган дозаларда саратон эндометрияси хужайраларга нисбатан юқори цитотоксик фаолликни намоён қилди, 1 млн хужайрага 20 мкг дозада оксил $42,0 \pm 1,56\%$ ўсма хужайраларини нобуд қилган, 50 мкг дозасида эса - $50,0 \pm 1,58\%$ бўлди. Бу ҳолатда эндометрия саратон хужайраларига протеиннинг таъсирида тажриба гуруҳларида апоптозли хужайралар сонининг ошиши кузатилди, бундай хужайраларнинг энг кўпи оксилнинг 20 мкг дозадаги таъсирида – $32,0 \pm 1,47\%$ кузатилди, назорат гуруҳида эса апоптозли хужайралар $11,0 \pm 0,98\%$ бўлди.

Биокорнинг йўгон ичак саратони хужайраларида ўсмага қарши фаоллигининг тадқиқоти.

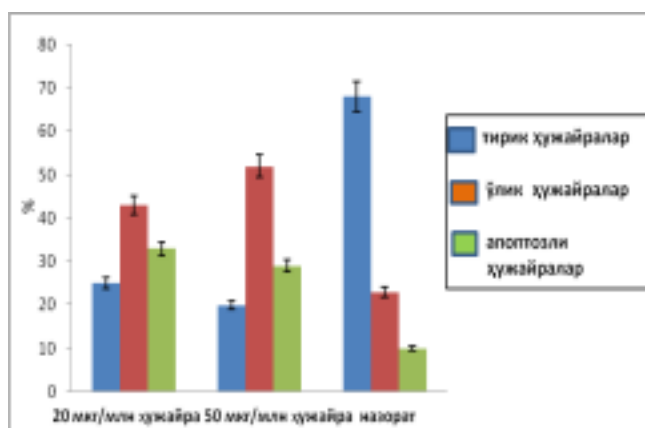
Охирги ўн йилликда онкология билан касалланиш динамикасининг ўзига хос хусусиятларидан бири ёйсимон ва йўгон ичак саратони билан

касалланишнинг ўсганлигидир. Ҳозирда ғарбий Европа мамлакатларида йўғон ичак саратони барча хавфли ўсмаларнинг 15%ини ташкил этади. Онкологик касалликлар тизимида эркаклар (ўпка саратонидан кейин) ва аёлларда (кўкрак беи саратонидан кейин) ҳам иккинчи ўринни эгаллайди [Smith R.A. et al, 2009, p. 27].

Бемор М.Р., 68 ёш, ташҳиси – йўғон ичак саратони, $T_4N_0M_0$ бўлган операцион материалидан олинган ўсма тўқимасида Bcl-2 ва Ki-67 онкопротеинлар экспрессияси аниқланди.



12-расм. Эндометрий хужайраларига нисбатан Биокорнинг цитотоксик фаоллиги (бачадон миомаси ташҳисли беморнинг операция материали). Тажриба гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун $p < 0,05$.



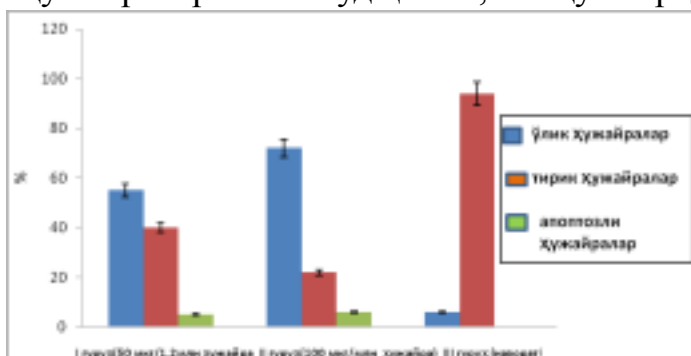
13-расм. II-босқич эндометрий саратони ташҳиси билан, T_2N_1M бўлган беморнинг операцион материалидан олинган хужайраларга нисбатан Биокор цитотоксик фаоллиги. Тажриба гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун $p < 0,05$.

Йўғон ичак саратон хужайралари протеин Bcl-2 ва протеин Ki-67ни бирдай сезиларли даражада экспрессияга учратган. Bcl-2 экспрессияси $97,0 \pm 0,76\%$ ни ташкил этди, бу ҳолат ушбу гистогенез хужайраларида апоптоз жараёнларининг кучли секинлашганлигини билдиради. Ki-67 протеин экспрессияси $64,0 \pm 2,14\%$ ни ташкил этди. Ўтказилган иммуногистокимёвий таҳлилга кўра, йўғон ичак саратон хужайралари апоптозли хужайрасиз, анъанавий терапияга резистент юқори пролиферацияли тўқимага эга.

Bcl-2 ва Ki-67 онкопротеинларининг статуси тасдиқланган сўнг йўғон ичак саратони хужайраларига дозаси 50 мкг/1,2 млн хужайрага (I гуруҳ) ва дозаси 100 мкг/1,2 млн хужайрага (II гуруҳ) сояли Биокор таъсир эттирилди, назорат гуруҳи бўлиб Биокорсиз йўғон ичак саратони хужайралари хизмат қилди (III гуруҳ), протеинли хужайралар инкубация вақти 60 дақиқани ташкил этди.

Олинган маълумотларга кўра, 50,0 мкг/1,2 млн хужайрага дозасидаги Биокор 60% ўсма хужайраларини нобуд қилиб, шу жумладан, 5% хужайрада

апоптозни чақирган ҳолда, юқори ўсмага қарши фаолликни кўрсатди. 100,0 мкг/1,2 млн хужайрага таъсир дозасида Биокор оксили 78% саратон хужайраларини нобуд қилиб, 6% хужайрада апоптозни чақирган (14-расм).



14-расм. Йўғон ичак саратони хужайраларига нисбатан Биокорнинг цитотоксик фаоллиги (Бемор М.Р., 68 ёш, ташҳиси – тўғри ичак саратони, T₄N₀M₀ бўлган операция материали). Тажриба гуруҳларининг барча кўрсаткичлари учун p<0,05.

Диссертациянинг «Биокор препарати субстанциясининг умумий, сурункали ва махсус токсикологиясининг клиникача бўлган тадқиқоти» деб номланган бешинчи бобида экспериментал ҳайвонлар организмига препарат таъсирининг тавсифи тасдиқланди ва унинг хавфсизлигига баҳо берилди.

26

Биокор препарати субстанциясининг умумий таъсири ва «ўтқир» токсиклигини аниқлаш.

Биокор препаратининг субстанцияси заҳарсиз бирикмаларнинг V синфига кириши тасдиқланди. 5000мг/кг бир марталик перорал киритишда, сичқонларда LD50 ва қорин бўшлиғидан киритишда 1200 (900-1600) мг/кгни ташкил этди (10-жадвал). Биокор субстанцияси кумуляцияси бўйича тадқиқотларга кўра, тажриба ҳайвонларининг (сичқонлар ва каламушлар) умумий ҳолати ва ҳуқ-атвори интакт гуруҳлардан фарқ қилмаган. Тажриба сичқонлари ва каламушларининг нобуд бўлмаганлиги, Биокор субстанцияси кумуляция хоссасига эга эмаслиги тўғрисида хулоса қилишга имкон беради (11-жадвал).

Биокор препаратинининг сурункали заҳарлилигини клиникача бўлган изланишлари.

Биокор сурункали киритилишда периферик қон таркибига заҳарли таъсир кўрсатмайди. Лейкоцит формуласида барча изланишлар муддатларида патологик ўзгаришлар аниқланмади. Препарат буйраклар фаолиятига заҳарли таъсир кўрсатмайди. Препарат субстанцияси кўрилган дозаларда перорал ҳар куни киритилганда каламушлар ва куёнлар жигари фаолиятига заҳарли таъсир кўрсатмайди. Препарат субстанциясининг 30 кун давомида ҳар куни ҳайвонларга киритилишида олиб борилган кузатувлар натижасида тажриба ва назорат гуруҳлари ўртасида ҳеч қандай фарқлар аниқланмади. Тажриба каламушлари ва куёнларининг ҳуқ-атвори назорат гуруҳи ҳайвонларидан фарқ қилмади.

**Биокор препарати субстанциясининг «ўткир» токсиклиги
кўрсаткичларининг натижалари**

Дозала р, мг/кг	Киритиш йўли			
	Перорал		Қорин бўшлиғидан киритиш	
	Каламушлар сони Нобуд бўлганлар/ ҳаммаси	Каламушлар сони Нобуд бўлганлар/ ҳаммаси	Каламушлар сони Нобуд бўлганлар/ ҳаммаси	Каламушлар сони Нобуд бўлганлар/ ҳаммаси
500	-	-	0/2	-
600	-	-	1/2	-
800	0/2	-	1/2	-
1000	0/2	0/2	2/2	0/2
1500	0/2	0/2	2/2	0/2
1800	0/2	0/2	-	1/2
2000	0/2	0/2	-	2/2
3000	0/2	0/2	-	2/2
4000	-	0/2	-	-
5000	-	0/2	-	-

Биокор препаратини кумуляцияси

Киритиш кунлари	Ҳайвонлар сони(п10)	LD ₅₀ ҳиссаси	LD ₅₀ ≥ 5000мг/кг
1-4	0/10	0,1	500
5-8	0/10	0,15	750
9-12	0/10	0,22	1100
13-16	0/10	0,34	1700
17-20	0/10	0,50	2500
21-24	0/10	0,75	3800

25-28	0/10	1,12	5600
-------	------	------	------

24 кундаги LD_{50} нинг йиғиндисиди 12800ни, экспериментнинг максимал давомийлиги 24 ± 4 кунни ташкил этди. $K_k LD_{50n} / LD_{50 1}$, бунда K_k -кумуляция коэффиценти, LD_{50n} – n маротабали киритишда ўртача нобуд қилиш дозаси, $LD_{50 1}$ – 1 маротабали киритишда ўртача нобуд қилиш дозаси. $K_k \geq 1$ ўрганиш; $K_k \leq 1$ кумуляция.

Каламушлар тажриба гуруҳларида тана оғирлигининг бирмунча ортиши кузатилди. Қуёнлар тажриба ва назорат гуруҳларида эксперимент давомида тана оғирлигининг ортиши кузатилмади.

Препарат субстанцияси 10 марталик киритилишда гипокоагуляцияни чақириб, қон ивишининг I ва II фазаларида таъсир кўрсатмайди. Биокор препаратининг дозасини ошириш гипокоагуляцион самаранинг ошишига олиб келмади. Самара 10 марта киритилиш давомида барча текширилган дозаларда сақланиб қолди, 30 кунгача Биокорни киритиш аста-секин таъсирининг камайишига олиб келади.

Препаратни давомли киритиш ички органлар тузилишида (юрак, ошқозон, ичаклар, буйрак, бачадон) морфологик ўзгаришларни чақирмайди. Шунга кўра, берилган янги препарат хавфсиз восита бўлиб, клиника тиббиёти учун тавсия этилиши мумкин.

Биокор препарати ўзига хос токсикологиясининг клиникагача изланишлари.

Биокор препарати маҳаллий қитиқловчи, резорбтив, маҳаллий аллерген, эмбриотоксик ва тератоген, лимфоид органларнинг хужайравийлиги ва оғирлигига имунотоксик, мутаген (физиологик норма даражасидаги хромосома ўзгаришлари) таъсир кўрсатмайди, организм иммунологик реактивлигини сезиларли рағбатлантирадиган хусусияти тасдиқланди аниқланган модда иммунитетнинг гуморал занжирини интенсивлаштириш хоссасига эга.

Биокор препаратининг умумий фармакологиясини аниқлаш Препаратни 30 кун давомида киритишда иштаҳага, ёш, ўсаётган сичқонлар тана оғирлигини тўплашга, ҳаракат фаоллиги ва жисмоний юкламаларга чидамлилигига сезиларли таъсири кузатилмади. Этаминал натрийнинг уйқу чақириб таъсирининг кучайиши, коразолнинг тириштириш таъсирининг камайиш тенденцияси кузатилди.

28

«Очиқ майдон» тести - препарат кўп маротабалик қўлланилганда тажриба каламушларининг ҳулқ-атвор реакциялари, марказий ва периферик асаб тизимини экспериментнинг 10 ва 30 кунларида ҳам бирдек фаоллаштиради. 1 ойдан сўнг препарат киритилиши тўхтатилгандан кейин тажриба ҳайвонларининг барча кўрсаткичлари назорат кўрсаткичларига қайтиши кузатилди.

Юқорида санаб ўтилган маълумотлар препаратнинг ҳайвонлар организмига токсик таъсир кўрсатмаслиги тўғрисида хулоса қилиш имконини беради.

«Биокор – 0,2г» препаратининг дори шаклини ишлаб чиқиш

Тадқиқотлар асосида «Биокор – 0,2г» препаратининг таблеткаси ишлаб чиқилди. Таблеткалар оқиш-кул рангдан оч сариқ ранггача, думалоқ, япалок цилиндрсимон, киритмали эгатсиз.

Битта таблетка дорининг таркиби:

Биокор (100% курук модда ҳисобида)
(ВФМ 42 Уз -) - 200 мг Микрочисталли целлюлоза
(ТУУз 42-002-96 ёки ТSh88.2-6:2000) - 274 мг Н-карбоксиметил
целлюлозахап дори учун
(ТSh 88.3-003:2007) 120 мг Кальций стеарат
(ТУ 6-09-42-33-76, ВР) - 6 мг Хап дори массаси 600 мг

Шундай қилиб, «Биокор-0,2г» препарати – иммуномодулятор бўлиб, клиникагача бўлган тадқиқотлар асосида меланома, йўғон ичак, кўкрак беши ва бачадон эндометрияси саратонлари каби онкологик касалликларда қўлланилиши мумкин.

ХУЛОСАЛАР

1. Илк бор соянинг «Генетик-1» (*Glycine max (L.) Mtrr*) навидан молекуляр массаси 12,7-79,0 кДа бўлган, изоэлектрик нуқтаси pI -4,1, 4,2, 4,5 ва 4,7 га тенг оксиллар комплексида иборат «Биокор-0,2г» препаратининг субстанцияси ажратилди, унинг таркибига кирувчи оксиллар (Kunitz trypsin protease inhibitor, beta-amylase, beta-conglycinin alpha prime subunit, 2,4-Dinducible glutathione S-transferase, PR10-like protein, 24kDa protein SC24) аниқланди.

2. «Биокор-0,2г» препаратининг трипсин, химотрипсин ва плазмин каби серинли протеазаларга нисбатан ингибирлаш фаоллиги кўрсатилди. 3. «Биокор-0,2г» препаратининг АКАТОЛ, АКАТОН, Меланома В-16 ва Саркома 180 каби пайвандланган ўсма штаммларида ўсмага қарши фаоллиги, унинг монотерапияда пайвандланган ўсма штаммларида саратон тўқимасининг ўсишини 70% га секинлаштириши аниқланди.

29

4. «Биокор-0,2г» препаратининг субстанцияси экспериментал ҳайвонлар суяк илиги ҳужайралари пролиферациясини ва уларнинг яшаш давомийлигини ўсма гистогенезига боғлиқ ҳолда 30-49% гача ошириши аниқланди.

5. «Биокор-0,2г» препарати субстанциясини 5-фторурацил билан комплекс терапияда лаборатория ҳайвонларига киритиш ўсмага қарши таъсирни ўртача 10-25% га кучайтиради ва экспериментал ўсмаларда нурли

терапиянинг самарадорлигини ўртача 1,5-2,3 марта ошириш имконини беради. Тажриба ҳайвонларининг ҳаётчанлигини 30-60 % гача оширади.

6. «Биокор-0,2г» препарати субстанциясининг 5-фторурацил берилган ўсма-ташувчи ҳайвонлар иммун тизимининг қайта тикланишига ёрдам бериши, ўсмага қарши препаратларнинг даволовчи таъсирини яхшилаши ва ўсма-ташувчи ҳайвонлар иммунитетини бошқариши аниқланди.

7. Сичқонларга «Биокор-0,2г» препарати субстанциясини киритиш коннинг гематологик ва морфологик кўрсаткичларини (лейкоцитлар фоиз таркибини нормаллаштириши, гранулоцитлар даражасини, гемоглобин таркиби ва эритроцитлар сонининг ошиши) яхшилашига ёрдам бериши аниқланди.

8. Эндометрия ҳамда йўғон ичак саратони (bcl-2 bKi-67нинг юқори кўрсаткичи) хавфли трансформациянинг барча босқичларида *in vitro* тажрибаларда «Биокор-0,2г» препарати субстанцияси кўкрак беши саратони терапиясига резистент бўлган, эстрогенлар ва прогестеронга нисбатан рецепторлари бўлмаган ўсма хужайралари пролиферациясини 50% га ингибирлаши кўрсатилди.

9. «Биокор-0,2г» препаратининг субстанцияси заҳарсиз бирикмаларнинг V- синфига кириши аниқланди. Сичқонларга препаратни перорал киритишда LD₅₀ 5000мг/кг дан кўпроқлиги, кумулятив таъсирга эга эмаслиги, буйрак ва жигар функцияси, шунингдек, ҳайвонлар органлари ва тўқималари патоморфологиясига заҳарли таъсир кўрсатмаслиги, юрак-томир тизими, нафас олиш ва периферик асаб тизимларга таъсир қилмаслиги кўрсатилди. Препаратининг субстанцияси лимфа органлари оғирлигига, макрофаглар миқдорига, суяк илиги хужайраларига иммунотоксик, резорбцияловчи, аллерген, эмбриотоксик, тератоген ва мутаген таъсир кўрсатмайди.

10. «Биокор-0,2г» иммуномодулятор препаратининг таблетка дори кўринишидаги дори шакли ишлаб чиқилди ва онкологик касалликларни комплекс даволаш учун тавсия этилди.

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

ИБРАГИМОВ ФАЗИЛ АХМЕДОВИЧ

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА
ИЗ СОИ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**02.00.10 – Биоорганическая химия
(биологические науки)**

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

ТАШКЕНТ - 2016

31

**Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной
комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за 30.09.2014/B2014.5.B68**

Докторская диссертация выполнена в Институте биоорганической химии
Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский) размещен на

веб-странице Научного совета по адресу (<http://ss.biochem.uz>) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» по адресу (www.ziyo.net).

Научный консультант: Кадырова Дильбар Абдуллаевна доктор
биологических наук

Официальные оппоненты: Саитмуратова Огульджан Худайбергеновна
доктор биологических наук, доцент

Бугланов Анатолий Аюшевич
доктор биологических наук, профессор

Гафур-Ахунов Мирза Али
доктор медицинских наук, профессор

Ведущая организация: Республиканский научный центр иммунологии

Защита диссертации состоится «__» декабря 2016 года в __ часов на заседании разового Научного совета 14.07.2016.К/В/Т.13.01 при Институте биоорганической химии и Национальном университете Узбекистана. (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63).

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биоорганической химии. Адрес: 100125, г.Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63, e-mail: asrarov54@mail.ru).

Автореферат диссертации разослан: «__» ноября 2016 года
(реестр протокола рассылки № __ от ноября 2016 года).

А.С. Тураев

Председатель разового Научного совета по присуждению
ученой степени доктора наук, д.х.н., профессор

М.И. Асраров

Ученый секретарь разового Научного совета по присуждению
ученой степени доктора наук, д.б.н., профессор

Р.З.Сабилов

Председатель разового научного семинара при разовом
Научном совете по присуждению ученой степени
доктора наук, д.б.н., профессор

32

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. На сегодняшний день в мире профилактика и лечение онкологических заболеваний остается актуальной, в связи с этим создаются новые

лекарственные средства биологического происхождения, получаемые из растительного и животного сырья. По статистическим данным Всемирной Организации Здравоохранения в течение 20 лет онкологическая заболеваемость возрастет в два раза¹.

С приобретением независимости Республики организация научно исследовательских работ по получению лекарственных средств из местного сырья и проведенные расширенные мероприятия по обеспечению национального фармацевтического рынка качественными лекарственными средствами на высоком уровне привели к определенным результатам. При этом, особенно важно отметить лекарственные препараты получаемые из местного сырья используемые при лечении онкологических заболеваний.

В настоящее время механизмы этиологии и патогенеза раковых заболеваний окончательно не выяснены из-за большой сложности и многообразия молекулярных механизмов, происходящих при этом процессов. 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, кроме того, одной из важнейших задач является создание эффективных лекарственных средств и внедрение их в производство.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлениях Президента Республики Узбекистан от 28 ноября 2011 года № ПП-1652 «О мерах по дальнейшему углублению реформирования системы здравоохранения», Кабинета Министров Республики Узбекистан от 29 марта 2012 г. № 91 «О мерах по дальнейшему укреплению материально-технической базы и совершенствованию организации деятельности медицинских учреждений», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики – VI. Медицина и фармакология.

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации². Научные исследования, направленные на создание биологических препаратов на основе белков и пептидов в лечении онкологических заболеваний осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, в Национальном институте

¹<http://www.cancer.org/downloads/STT>

Республиканский онкологический научный центр (Россия), Институте онкологии (Украины), Онкологическом научно-исследовательском центре (Грузия), в Институте биоорганической химии (Узбекистан). В результате исследований, проведенных в мире по созданию биологических препаратов на основе белков и пептидов в лечении онкологических заболеваний, получены ряд научных результатов, в том числе: выделен пептид луназид содержащийся в сое и в зернах некоторых злаковых культур, который предложен в качестве средства для лечения рака, выделен ингибитор протеаз Баумана-Бирка (Национальный институт рака, США); разработан иммунотерапевтический лечебный препарат Immucor GA 40с антиканцерогенными свойствами на основе горного растения Купена горная *Polgonatum varticillatum* (Онкологический научно-исследовательский центр, Грузия); разработана биологическая активная добавка «Инсол», обладающий антиканцерогенными свойствами (Московский государственный университет, Россия); выявлена новая фармакологическая активность ряда соединений и экстрактов, обладающих ингибиторными свойствами роста раковых клеток (Институт химии растительных веществ, Узбекистан); разработан полифункциональный препарат Тортезин, представляющий собой сумму нейтральных олигопептидов из крови среднеазиатских черепах *Testudo horsfieldi*, как иммунокорректор, и как средство сопровождения лучевой и химиотерапии (Институт биоорганической химии АН РУз).

В мире по созданию биологических препаратов в лечении онкологических заболеваний по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: разработка средств для коррекции иммунологических и гематологических нарушений, возникающих после химиотерапии и облучения; создание иммунокорректоров после тяжелых оперативных вмешательств; коррекция иммунологических нарушений, возникающих вследствие иммунодепрессивного действия самой опухоли; определение механизмов действия онкопрепаратов на молекулярном и клеточном уровнях; разработка препаратов белковой природы, которые оказывают антиметастатический эффект;

Степень изученности проблемы. Одним из самых последних новых направлений онкологии является лечение рака биопрепаратами - уникальными средствами, воздействующими губительно на клетки опухоли, и не оказывающими вредного влияния на здоровые ткани и весь организм в

²Научно-исследовательские комментарии по теме диссертационной работы разработаны приведен-ным данным в источниках <http://www.lib.uiowa.edu/hardin/md/ej.html>; http://www.cancer.gov/search/cancer_literature/; <http://www.scirp.org/journal/jcti> разработаны на основе других источников

онкологических заболеваний и созданы биологические лекарственные средства для лечения. Высокое содержание лецитина в соевом белке способствует снижению уровня сахара в крови, очищению стенок кровеносных сосудов от атеросклеротических наслоений, улучшению обменных процессов. Ингибиторы протеаз, выделяемые из соевых бобов, в 5-10 раз снижают вероятность ракового перерождения клеток человека под действием рентгеновских лучей [Jackman, 2007].

В странах СНГ исследования лекарственных средств на основе растений в лечении онкологических заболеваний, ведутся учеными Казачкиной Н.И., Крутяковым В.М., Корсуным Е.В., Тимошенко А.В., Кадагидзе З.Г., Немцовой Е.Р. Ингибиторы помогают при различных опухолевых заболеваниях (аденокарцинома, ангиосаркома, меланома и др.) печени, легких желудка, кишечника, носоглотки, соединительной ткани у мышей, крыс, хомяков. Чистые и частично очищенные ингибиторы протеаз действуют приблизительно одинаково. Последнее свойство позволит снизить себестоимость препаратов [Крутяков, 2001].

В Узбекистане исследованиями лекарственных средств на основе растений в лечении онкологических заболеваний занимаются Еникеева З.М., Юлдашев А.Х., ими были выделены такие противоопухолевые соединения, как производные колхицина, винкристин и винбластин. Получение стандартизированной комбинации белкового комплекса и определение биологической и противоопухолевой активности в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также фармако-токсикологическая характеристика полученного препарата имеет практическое значение.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами научно-исследовательского учреждения, где выполнена работа.

Диссертационное исследование выполнено в рамках прикладного проекта ФА-А11-Т174 «Разработка противоопухолевого белкового препарата из шрота сои и выделения особо чистых ферментов из местного сырья» (2009-2011 г.г.), научно-исследовательских работ фундаментального проекта УНТЦ №3501 «Исследование соевого белка в лечении злокачественных новообразований клетки организма» (2006-2009г.), проводимых в Институте биоорганической химии.

Целью исследования является выделение белкового комплекса из сои, его физико-химические, фармако-токсикологические характеристики, определение противораковой активности на различных видах раковой опухоли *in vivo*, на биопсийном материале *in vitro* рака молочной железы, эндометрия и толстого кишечника.

Задачи исследования:

разработка метода выделения белкового комплекса из сои;

из сои;

определение протеазной активности белкового комплекса;

определение биологической активности в экспериментальных моделях при моно- и комплексной терапии в экспериментах *in vivo*;

определение противоопухолевой активности белкового комплекса на клетки рака молочной железы, эндометрия и толстого кишечника, резистентных к терапии в экспериментах *in vitro*;

доклиническое исследование фармако-токсикологии субстанции и лекарственной формы препарата;

разработка лекарственной формы препарата «Биокор-0,2».

В качестве **объекта исследования** выбраны белковый комплекс из бобов сои сорта «Генетика-1» (*Glycine max* -(L.)Mtrr.), онкологические заболевания, рака толстого кишечника, перевиваемые штаммы АКАТОЛ, АКАТОН, меланомы В-16, Саркома-180.

Предметом исследования являются физико-химические и противоопухолевые свойства белкового комплекса (субстанция препарата «Биокор 0,2 г») на перевиваемых штаммах АКАТОЛ, АКАТОН, меланомы В-16, Саркома-180, на биопсийном материале *in vitro* рака молочной железы, резистентным клеткам эндометрия и толстого кишечника на всех стадиях злокачественной трансформации, а также фармако-токсикологические свойства.

Методы исследования. В диссертации использованы методы колоночной хроматографии, электрофоретические методы исследования, определение аминокислотного состава, иммуногистохимического анализа, микроскопии, масс-спектрометрии, иммуноферментного анализа и фармако-токсикологические.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

из бобов сои выделен белковый комплекс, определены его физико-химические, фармакологические и токсикологические свойства; доказано, что белок состоит из комплекса полипептидов с молекулярной массой 12,7-79,0 кДа, изоэлектрической точкой в области pI - 4,1; 4,2; 4,5 и 4,7;

методом масс-спектрометрии показано наличие в белковом комплексе ингибиторы протеаз Кунитца.

показана специфическая противоопухолевая активность белкового комплекса в условиях *in vitro* и *in vivo*;

на основе комплекса полипептидов из бобов сои разработана лекарственная форма препарата «Биокор-0,2г» в виде таблетки.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

проведены доклинические фармако-токсикологические исследования и показано, что препарат «Биокор-0,2г» относится к V классу практически нетоксичных соединений, не обладает кумулятивными свойствами.

Достоверность результатов исследования обосновывается тем, что экспериментальные данные получены с применением современных высокоточных методов исследования. Выводы в работе сделаны на основе результатов, обработанных с использованием современных методов математической статистики.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования заключается в том, что выделен белковый комплекс из бобов сои в первые в Республике, что позволит создать новое направление в биотерапии рака. Установлен механизм действия препарата «Биокор-0,2г» на организм экспериментальных животных, что позволит получить новые данные об этиологии и особенностях развития злокачественных опухолей.

Практическая значимость заключается в том, что на основе белкового комплекса из сои создана лекарственная форма препарата - «Биокор-0,2г» таблетка для комплексного лечения онкологических заболеваний, препарат снижает токсическое действие других видов лечения (химио и лучевой терапии), нормализует иммунную систему, улучшает гематологические и морфологические показатели крови, предотвращает метастазирование.

Внедрение результатов исследования. На основании исследования биологической противораковой активности белка из местной сои: из шрота сои выделен и разработан способ выделения белка обладающий противораковой активностью, и получен патент на изобретение Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (26.04.2012, №IAP 04501). В результате научно-исследовательских работ разработана лекарственная форма в виде таблетки для лечения онкологических заболеваний;

данные по комплексу белков выделенные из сои зарегистрированы в базе данных EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>), установлена противоопухолевая активность препарата «Биокор-0,2г» на перевиваемых опухолевых штаммах АКАТОЛ, АКАТОН, Меланома В-16 и Саркома 180. Препарат «Биокор-0,2г» способствует восстановлению иммунного статуса животных получавших 5-фторурацил, увеличивает лечебное действие противоопухолевых препаратов и регулирует иммунитет у животных-опухоленосителей. Результаты научных исследований позволят создать новое направление в лечении онкологических заболеваний на основе растительных белков и создание эффективных лекарственных средств.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации, изложены в виде докладов и прошли апробацию на 23 международных и республиканских научно-исследовательских конференциях, в частности на:

III конгрессе онкологов закавказских государств (Ереван, 2004), Конференции «Актуальные проблемы последипломной подготовки врачей и новые горизонты медицины» (Ташкент, 2007); XI Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2007); Материалы научно-практической конференции «физико-химическая биология и перспективы биотехнологии» (Андижан, 2007); V-съезде онкологов и радиологов СНГ (Ташкент, 2008); конференция «Актуальные проблемы химии природных соединений» (Ташкент, 2009, 2010, 2011, 2012), Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2009); Научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Украина, 2009г, 2011); Российской научно-практической конференции с международным участием «Современная онкология: достижения и перспективы развития» (Томск, 2009); 6-й Российской конференции по фундаментальной онкологии (Санкт-Петербург, 2010), 14-й, 15-й Международной Пущинской школе – конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Москва, 2010, 2011); Конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент 2010); X, XIV Всероссийской научной- практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2011, 2012.); Седьмой конференции «Фундаментальная онкология – петровские чтения» (Санкт-Петербург, 2011); II Конгрессу онкологов Узбекистана (Ташкент, 2011); 8-й конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения (Москва, 2012); Белорусско-Российской научно практической конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2013).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 48 печатных работ. Из них 13 научных статей, в том числе 9 в республиканских и 4 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, получен патент на изобретение.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы. Объем диссертации составляет 195 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным

раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Соевые бобы: характеристика и значение в профилактике и лечении различных заболеваний»** приведен подробный обзор литературы, посвященный исследованию белков и пептидов в биотерапии опухолей, применение иммуномодуляторов при лечении онкологических больных, лекарственные средства на основе производных сои в терапии различных заболеваний.

Во второй главе диссертации **«Материал, условия и методы исследования белкового комплекса препарата Биокор-0,2г»** подробно описаны методы выделения белкового комплекса из бобов сои, изложены электрофоретические, радиометрические, масс-спектрометрические, иммунологические, определение биологической активности белкового препарата на экспериментальных опухолевых штаммах, фармако токсикологические и гистологические.

В третьей главе диссертации **«Физико-химическая характеристика белкового комплекса и его биологическая активность»** приведены результаты исследований физико-химической характеристики и биологической активности препарата «Биокор-0,2г» на экспериментальных опухолевых штаммах.

Хроматография белков и физико-химической характеристика белков. В настоящее время в мире проводится большое количество исследований по изучению влияния сои и её компонентов на течение канцерогенеза [Крутяков 2001; Немцова 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 и др., 2006; Казачкина и др., 2006].

В связи с этим является актуальным, выделение белкового комплекса из сои для исследования их противоопухолевой активности. Выделение белков из бобов сои проводили двумя методами экстракции раствором 0,06М раствора хлористого натрия 0,05М 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 [Кузнецова и др., 2005]. Были выбраны носители для гельфильтрации сефадексы G-75 и G-50, позволяющие провести эффективное разделение [Остерман, 1983].

Хроматограммы гельфильтрации белков представлены на рисунках 1 и

2. На обоих носителях элюировалось по три фракции. Определение активности фракций по включению ^{14}C -тимидина, показало, что наибольшей

39

активностью $64,0 \pm 1,9\%$ в дозе 100 мкг/мл обладала первая фракция после гельфилтрации на колонке с сефадексом G-75.

$D_{80}^2 D_{80}^2$

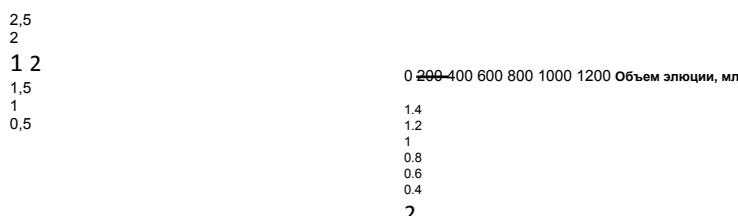
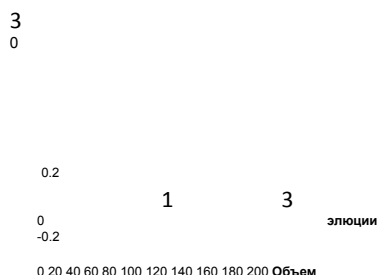


Рис.1. Гельфилтрация белка из сои на колонке с сефадексом G-75 (80 x 2,6), 0,05M Трис -HCl буфер pH 7,4

Рис.2. Гельфилтрация белка из сои на колонке с сефадексом G-50 (80 x 2,6), 0,05M Трис -HCl буфер pH 7,4



Электрофоретические исследования белковых фракций после гельфилтрации, показало, что наиболее эффективное разделение белков на сефадексе G-75.

Компонентный состав первой фракции представлен ярко выраженными полипептидами с молекулярной массой 12,7, 13,0, 15,0, 67,0, 79,0 кДа. При гельфилтрации на колонке с сефадексом G-50 разделение белков не эффективное, спектр белков всех трех фракций практически одинаков.

Затем было проведено изоэлектрофокусирование активной белковой фракции. Наблюдалось наличие четырех изоточек в области pI -4,1, 4,2, 4,5 и 4,7 (рис.3).

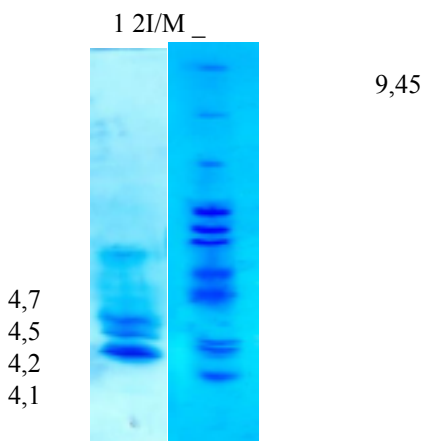


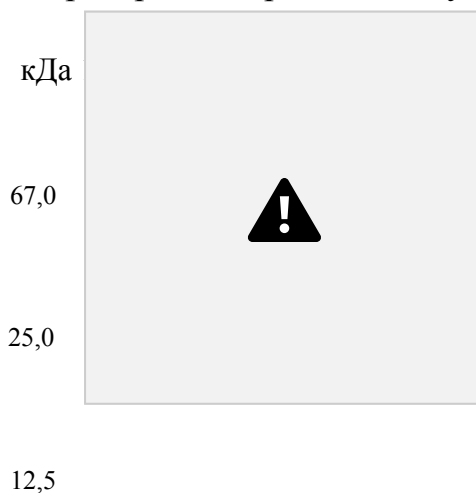
Рис. 3. Изоэлектрофокусирование активной фракции белка после гельфилтрации на колонке с G-75 (амфолины в диапазоне pH 3,5-10)

+

1-Фракция I

2-Свидетели изофокусирования.

Активная белковая фракция стандартизированная на пяти сериях лабораторных образцов, получила название препарата «Биокор-0,2г» (рис. 4).



+

Рис. 4. Электрофорез в 10% ПААГ в присутствии ДСН субстанции Биокор: 1-смесь белков-маркеров (БСА-67 кДа, Химотрипсиноген-25 кДа, Цитохром С 12,5кДа), 2–РСО, 3-7 – пять серий опытных образцов препарата.

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

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
Σ 95,99%			

Определение антитрипсиновой активности препарата «Биокор-0,2г».

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, et al, 1994].

В связи с этим, был проведен эксперимент по определению антитрипсиновой активности препарата «Биокор-0,2г» (табл. 2). Из табличных данных видно, что «Биокор-0,2г» обладает высокой ингибирующей активностью по отношению к сериновым протеазам от $24,1 \pm 0,1$ до $34,7 \pm 0,1$, что предполагает противоопухолевые свойства препарата.

Таблица 2.

Ингибирование протеазной активности сериновых протеаз Биокором

Сериновые протеазы	Ингибирование активности сериновых протеаз	
	Условные единицы протеолитической активности, поглощение λ 280	% ингибирования

41

Трипсин	$0,145 \pm 0,002$	$34,7 \pm 0,1$
Химотрипсин	$0,156 \pm 0,003$	$29,4 \pm 0,2$
Плазмин.	$0,167 \pm 0,002$	$24,1 \pm 0,1$
Контроль*	$0,220 \pm 0,002$	0

3,0 мкг протеаз, в 0,05М фосфатном буфере pH 7,6; субстрат-казеин 300,0 мкг, (- $p < 0,05$).

Масс-спектрометрический анализ пептидов субстанции препарата Биокор

Методом двумерного гель-электрофореза в сочетании с масс спектрометрическим методом были определены белки входящие в состав препарата Биокор. Было подтверждено наличие в препарате ингибиторов протеаз –Kunitz trypsin protease inhibitor. Данные приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Масс-спектримический анализ препарата Биокор

Идентифицированные белки	ID	Mr(Da)	Score	Sequence Coverag %
Kunitz trypsin protease inhibitor	Glycine max	22676,1	339,17	50
Beta- conglycinin alpha subunit	Glycine max	72475,7	375,39	43

Beta-amylase	Glycine max	57000,0	205,59	52
2,4-D inducible glutathione S transferase	Glycine max	49000,0	78,66	23
PR10-like protein	Glycine max	3865,99	55,42	29
24 kDa protein SC24	Glycine max	24569,7	52,27	17

Примечание: ID – аббревиатура названия белков в соответствии с базами данных NCBI; Mr – молекулярная масса белков; Score-10xlgP, где P – вероятность того, что белок, который был сопоставлен масс-спектру из баз данных, является неверным. Все результаты поиска белков со значением Score больше 50 являются достоверными; SequenceCoverag – процент покрытия аминокислотной последовательности белка по базами данных. Достоверным считается показатель от 15 до 90%.

Исследование противоопухолевой активности субстанции Биокор в экспериментальном канцерогенезе на перевиваемых опухолевых штаммах аденокарцинома толстого кишечника (АКАТОЛ), аденокарцинома тонкого кишечника (АКАТОН), меланома В-16 и саркома 180.

Торможение роста опухоли по массе и объему.

Отработку дозы введения препарата «Биокор-0,2» проводили на штамме аденокарцинома толстого кишечника (АКАТОЛ). Экспериментальные животные были разбиты на 4 опытные группы: I группа – животные получали препарат «Биокор-0,2г» per os 10 дней каждый день однократно в дозе 125 мг/кг; II группа – животные получали «Биокор-0,2г» per os 10 дней каждый день однократно в дозе 150 мг/кг; III группа – животные получали «Биокор-0,2г» per os 10 дней каждый день однократно в дозе 250 мг/кг; IV группа – контроль, животным вводили каждый день per os физиологический раствор NaCl.

«Биокор-0,2г» в дозе 150 мг/кг в случае применения per os показал наибольшую эффективность и ингибировал рост опухоли АКАТОЛ по массе

42

на 71,9%, при снижении дозы воздействия до 125 мг/кг ингибирование роста опухоли по массе уменьшалось до 57,68%. Повышение дозы введения до 250 мг/кг не привело к повышению ингибирования опухоли по массе и составило 69,8%.

Во всех опытных группах животных, принимавших «Биокор-0,2г», наблюдается значительное достоверное снижение объема опухоли, что может объясняться положительным влиянием протеина на процессы экссудации и нейтрофильной инвазии. Самый значительный противоопухолевый эффект наблюдается у животных из опытных групп II и III - 88,46%. В группе I ингибирование роста объема опухолевой ткани составило 61,4%. Полученные результаты показали, что оптимальной дозой введения «Биокор

0,2г» а, является доза 150 мг/кг.

Дальнейшие исследования влияния «Биокор-0,2г» проводили на штаммах аденокарцинома тонкого кишечника (АКАТОН), меланомы В-16 и саркома 180.

На рисунке 5. представлены результаты торможения роста опухоли на

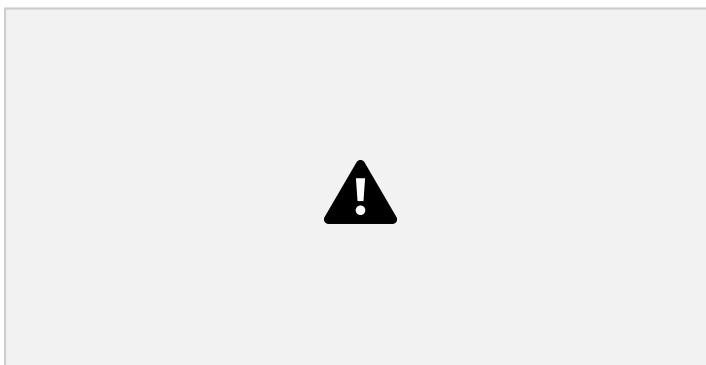


Рис 5. Изменение массы и объема опухоли экспериментальных животных на различных штаммах после введения субстанции в дозе 150 мг/кг ко дню окончания эксперимента (* - $p < 0,05$).

Препарат «Биокор-0,2г» при монотерапии тормозит рост исследуемых опухолей по массе и объему более чем на 70%.

Подсчет митотического и апоптотического индексов в опухолевой ткани после введения препарата «Биокор-0,2г»

Метрические данные массы и объема опухоли не всегда адекватно способны отразить процессы прогрессии или регрессии опухолевой ткани. 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).

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.

В опытной группе на штамме АКАТОЛ наблюдалась высокая регрессия опухолевой ткани. Отношение АИ/МИ в опыте составило 2,08, в то

43

время как в контроле – 0,89. На штамме Меланомы В-16 отношение АИ/МИ в опыте составило 15,18, в контроле – 0,74. На штамме АКАТОН отношение АИ/МИ в опыте составило 1,75, в контроле – 0,81. На штамме Саркома 180 отношение АИ/МИ в опыте составило 3,6, в контроле – 0,86.

Как видно из представленных результатов, во всех опытных группах наблюдается достоверная регрессия опухолевой ткани, т.е. количество апоптозных клеток превышает количество митотически делящихся раковых клеток, тогда как в контрольной группе экспериментальных животных значение АИ/МИ меньше 1,0.

Изучение ингибирующего действия «Биокор-0,2г» на клетки красного костного мозга в условиях экспериментального канцерогенеза. 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 [Васильев, 1997].

Для определения пролиферативной активности клеток костного мозга использовали прямой метод часового культивирования клеток для хромосомного анализа по Фитцджеральду. В исследованиях противоопухолевых свойств «Биокор-0,2г» нами проводилось изучение ингибирующего действия этого белка на пролиферацию клеток красного костного мозга в условиях экспериментального канцерогенеза на моделях опухоли АКАТОЛ, АКАТОН, Меланома В-16 и Саркома 180. На рисунке 6. приведены результаты подсчета МИ в красном костном мозге экспериментальных животных. Как видно из данных диаграммы, «Биокор 0,2г» не ингибировал пролиферацию клеток красного костного мозга.

5
4
3
МИ %опыт 2

контроль
1

Рис. 6. Митотический индекс (МИ) клеток красного костного мозга экспериментальных животных с имплантированной опухолью после введения биокора ко дню
0
АКАТОЛ АКАТОН Меланома В-16 Саркома 180
окончания эксперимента (* - $p < 0,05$).

44

Влияние препарата «Биокор-0,2г» на гематологические показатели и морфологическую картину крови мышей с экспериментальной моделью опухоли Саркома 180.

Исследования проводили в цельной крови мышей. Животные были разделены на следующие группы: интактные животные, контрольная группа (модель с имплантированной опухолью) и группа животных, получавших препарат в дозе 150 мг/кг per os. Введение препарата начали на 10 день после перевивки опухоли и продолжали ежедневно в течение 10 дней (табл. 4).

Таблица 4

Влияние применения препарата «Биокор-0,2г» на гематологические

показатели и морфологическую картину крови мышей с экспериментальной моделью опухоли Саркома 180

Наименование исследования	Группы животных		
	Интактная	Контрольная	Леченая
Лейкоциты	7,95±0,61	20,4±3,64*	11,2±2,48**
Лимфоциты	5,1±0,16	3,5±0,46*	4,0±0,15
Клетки средних размеров	1,45±0,12	1,7±0,5	1,2±0,1
Гранулоциты	1,9±0,08	3,03±0,2*	2,97±0,26*
Процент лимфоцитов	57,0±2,45	38,3±0,66*	45,3±1,2**
Клетки средних размеров, %	17,6±1,06	14,2±1,09	13,1±2,0
Гранулоциты, %	22,4±1,31	44,8±1,13*	47,2±4,19*
Палочкоядерные Процент	1,5±0,4	7,3±2,91*	5,0±2,08*
Сегментоядерные Процент	34,0±1,63	48,0±2,31*	50,7±3,84*
Гемоглобин	130,3±8,89	122,5±5,31	141,0±7,58**
Эритроциты	7,98±0,71	7,98±0,26	9,06±0,48

Примечание: * $P \leq 0,05$ по сравнению с интактными животными, ** $P \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Отмечается также улучшения гематологических и морфологических показателей крови (нормализация процентного содержания лейкоцитов, повышения уровня гранулоцитов, содержания гемоглобина и числа эритроцитов).

Стандартизированная комбинация полипептидов обладает не только выраженным противоопухолевым эффектом, но и участвует в восстановление иммунной системы организма, улучшает гематологические показатели крови.

Изучение противоопухолевой активности «Биокор-0,2г» на экспериментальных животных с перевитыми штаммами при позднем введении препарата.

Эксперименты по изучению продолжительности жизни животных при действии вышеназванного препарата проводились аналогично, как и в случае изучения торможения роста опухоли по массе и по объему. Введение препарата осуществлялось на 10 сутки после перевивки опухоли.

Проведенное изучение противоопухолевой активности соевого биокора на перевиваемых штаммах АКАТОЛ, АКАТОН, Меланомы В-16 и Саркома 180 по показателям эффективности торможения роста опухоли (ТРО) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ) экспериментальных животных показало позитивное действие данного белка при его введении на 10-й день после перевивки опухоли более 60% и 30% соответственно (табл. 5). Ревизия внутренних органов в экспериментах по изучению увеличения продолжительности жизни экспериментальных животных показало единичные случаи метастазирования на 10-й день после перевивки опухоли. Ингибиторы протеаз, содержащиеся в белковом комплексе «Биокор-0,2г», способствуют снижению метастазирования.

Таблица 5

Изучение противоопухолевой активности «Биокор-0,2г» при позднем его введении (на 10 день после перевивки опухоли) по показателям торможения роста опухоли и увеличению продолжительности жизни животных

Экспериментальные штаммы	ТРО по объему %	ТРО по массе %	УПЖ %
АКАТОЛ	91,40	66,35	38,34
АКАТОН	60,95	47,17	49,83
Меланома В-16	56,35	60,06	30,59
Саркома 180	63,84	61,63	35,90

Изучение противоопухолевой активности «Биокор-0,2г» при совместном введении с 5-фторурацилом на перевиваемые опухоли мышей Препарат 5-фторурацил (5-ФУ) в дозе 228 мг/кг внутривентально вводился животным на 3, 5 и 9 день после трансплантации опухоли, «Биокор 0,2г» в дозе 150 мг/кг перорально в течение 10 дня, начиная со вторых суток после трансплантации опухоли. Затем после естественной гибели животных во всех группах подсчитывались показатели ТРО, средней продолжительности жизни и на их основе рассчитывали увеличение продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой. Изучение противоопухолевой активности белкового препарата при совместном введении с 5-фторурацилом на перевиваемые опухоли мышей на ранних сроках введения. Препарат показал высокую противоопухолевую активность на уровне цитостатика. Введение соевого белка в комплексной терапии с 5-фторурацилом усиливает противоопухолевое воздействие в среднем от 10 до 25% (табл. 6). Эффект комплексного применения противоопухолевого цитостатика и биокора был еще более существенным выживаемость подопытных животных увеличилась

от 30 до 60% в зависимости гистогенезиса опухоли (табл. 7). Совместное введение субстанции препарата «Биокор-0,2г» и 5-фторурацила приводит к снижению токсического

46

действию последнего и увеличению торможения роста опухоли, увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных-опухоленосителей.

Таблица 6

Изучение противоопухолевой активности белкового препарата при совместном введении с 5-фторурацилом на перевиваемые опухоли мышей

Вид опухоли	Препарат	Доза	Кол-во введений	Средняя масса опухоли (г)	ТРО по массе %
АКАТОН	Контроль 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228мг/кг+150мг /кг 150 мг/кг	3 3+10 10	1,24±0,48 0,32±0,1 8* 0,09±0,0 6* 0,36±0,2 3*	74,2 92,7 71,0
АКАТОЛ	Контроль 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228 мг/кг+150мг/кг 150 мг/кг	3 3+10 10	0,87±0,31 0,12±0,0 3* 0,07±0,0 1* 0,25±0,1 9*	86,2 91,9 71,3
Саркома 180	Контроль 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228мг/кг+150мг /кг 150 мг/кг	3 3+10 10	1,8±0,38 0,16±0,0 5* 0,12±0,0 4* 0,19±0,0 8*	91,1 93,3 89,4
Мелано ма В-16	Контроль 5-ФУ 5-ФУ+БП БП	228 мг/кг 228мг/кг+150мг /кг 150 мг/кг	3 3+10 10	1,7±0,23 0,62±0,1 2* 0,40±0,1 1* 0,66±0,1 3*	63,4 76,4 61,2

Для всех значений опытных групп * $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Таблица 7

Изучение увеличения продолжительности жизни белкового препарата при совместном введении с 5-фторурацилом на перевиваемые опухоли мышей

Вид опухоли	Препарат	Доза	Кол-во введений	СПЖ (дней)	УПЖ %
АКАТОН	Контроль	228 мг/кг	3	25,1±1,25	33,4
	5-ФУ	228 мг/кг+150	3+21	33,5±1,67	48,6
	5-ФУ+БП	г/кг 150 мг/кг	21	37,3±1,72	35,5
	БП			26,6±1,33	
АКАТОЛ	Контроль	228 мг/кг	3	17,7±1,35	72,3
	5-ФУ	228 мг/кг+150	3+21	30,5±1,52	55,3
	5-ФУ+БП	г/кг 150 мг/кг	21	27,5±1,26	72,8
	БП			30,6±1,51	
Саркома 180	Контроль	228 мг/кг	3	36,6±1,83	37,4
	5-ФУ	228 мг/кг+150	3+21	50,3±2,52	78,4
	5-ФУ+БП	г/кг 150 мг/кг	21	65,3±3,26	53,8
	БП			56,3±2,81	
Меланома	Контроль			23,4±1,17	

47

В-16	5-ФУ	228 мг/кг	3	30,8±1,52	31,6
	5-ФУ+БП	228 мг/кг+150	3+21	41,8±2,06	78,6
	БП	г/кг 150 мг/кг	21	30,6±1,53	30,7

Изменение иммунного статуса у животных-опухоленосителей при введении «Биокор-0,2г».

После трансплантации опухоли штамма Саркома 180 беспородным мышам на 3-, 5-, и 9-й день внутрибрюшинно вводили 5-фторурацил в дозе 228 мг/кг, на 2-21-й день – перорально «Биокор-0,2г» в дозе 150 мг/кг. Метод оценки иммунного статуса основан на количественном тестировании субпопуляций лимфоцитов со специфическими для каждого вида рецепторами – кластерами дифференцировки (CD) [Залялиева, 2004]. Использовались CD-маркеры: CD3, CD4, CD8, CD16, CD19. Фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) определяли по их способности к фагоцитозу (15 мк) в процентах.

Рис. 7. Влияние 5-фторурацила



Введение цитостатиков снижает процентное содержание и функциональную активность Т-лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+, а также естественных факторов защиты (ФАН, CD16+) (рис. 7). «Биокор-0,2г» снижает токсическое и иммунодепрессивное действие цитостатика и тем самым усиливает противоопухолевый эффект, восстанавливает индекс иммунорегуляции (табл. 8).

Таблица 8

**Влияние 5-фторурацила и препарата Биокор-0,2г на индекс
иммунорегуляции**

	Интактные животные	Опухоле носители	5-ФУ	5-ФУ+Биокор	Биокор
ИРИ	1,63±0,1	0,5 ±0,01	0,6 ±0,01	1,1 ±0,1	1,2 ±0,1

«Биокор-0,2г» способствует восстановлению иммунного статуса животных-опухоленосителей, получавших 5-фторурацил. «Биокор-0,2г» модулирует лечебное действие противоопухолевых препаратов и регулирует иммунитет у животных-опухоленосителей.

*Модификация роста экспериментальных опухолей под воздействием
лучевой терапии и «Биокор-0,2г».*

Лучевую терапию проводили при тотальном гамма-облучении в дозе 2 Гр через 52 ч после перевивки опухоли. «Биокор-0,2г» вводили перорально десятикратно в дозах 150 мг/кг, начиная со вторых суток после трансплантации опухоли. Животных забивали на 14 день эксперимента под хлороформным наркозом. Эффект противоопухолевого действия оценивали по массе (М) и объему (V) извлеченной опухолевой ткани.

Результаты исследования показали, что тотальное облучение в дозе 2 Гр тормозит рост опухоли Саркома-180 до 48% по массе и до 52% по объему (табл. 9). Воздействие на рост опухоли совместно с облучением «Биокор-0,2 г» повышает эффективность лечения ТРО по массе до 85% ТРО по объему до 97%. С опухолью АКАТОЛ, тотальное облучение вызывает торможение

роста опухоли по массе до 37% и по объему - до 70%. Воздействие препарата усиливает противоопухолевый эффект облучения. ТРО по массе составило 91%, а по объему - 88%.

С опухолью АКАТОН, тотальное облучение задерживает рост опухоли до 64% по массе и до 91% по объему. Воздействие «Биокор-0,2г» также приводит к увеличению противоопухолевого эффекта облучения: ТРО по массе составило 70%, а по объему - 97%.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что дополнение противоопухолевого лечения «Биокор-0,2г» позволяет повысить эффективность лучевой терапии экспериментальных опухолей животных. При этом положительный эффект лечения, проявляющийся в усилении регрессии опухоли, зависит от гистогенеза опухоли.

Таблица 9

Влияние Биокора и облучения на рост перевиваемых опухолей

Опухоль	Группа/препараты	Средняя масса опухоли, г	Средний объем опухоли, см ³	ТРО, по массе, %	ТРО по объему, %
Саркома 180	контроль	0,74±0,16	0,93 ±0,28	-	-
	Υ	0,38±0,12*	0,45 ±0,25*	48	52
	Υ+БП	0,11±0,02* **	0,02 ±0,01 * **	85	97
АКАТОЛ	контроль	1,87±0,32	3,72 ±0,80	-	-
	Υ	1,16±0,34*	1,12 ±0,35 *	38	70
	Υ+БП	0,17±0,09 * **	0,44 ±0,43 *	91	88
АКАТОН	контроль	1,75±0,53	2,75 ±1,10	-	-
	Υ	0,63±0,22*	0,25 ±0,16 *	64	91
	Υ+БП	0,52±0,19 *	0,09 ±0,06 * **	70	97

Примечание: *P≤0,05 по сравнению с 1 группой (нелеченные животные), ** P≤0,05 группой (животные, получавшие лучевую терапию).

В четвертой главе диссертации «Исследование противоопухолевой активности «Биокор-0,2г» в экспериментах *in vitro* (рак молочной железы, рак эндометрия и толстого кишечника)» подробно описаны результаты влияния субстанции препарата «Биокор-0,2г» *in vitro* на индукцию апоптоза и

ингибирование пролиферации раковых клеток биопсийного материала на разных стадиях развития заболевания.

Исследование противоопухолевой активности «Биокор-0,2г» на клетки рака молочной железы резистентных к традиционной терапии. У больных распространенным раком молочной железы особенно актуальным является определение гормональной и лекарственной чувствительности опухолей для индивидуального подбора схем терапии [Петров, 2000; Пожарисский, Леенман, 2000]. 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 [Герштейн, Кушлинский, 2002]. После получения опухолевого материала у больных раком молочной железы проводили его исследование на наличие рецепторов к эстрогенам и прогестерону. Были использованы мышинные моноклональные антитела против рецепторов к эстрогенам (клон 6F11) и мышинные моноклональные антитела против рецепторов к прогестерону (клон 1A6) производства фирмы «Novocastra» (Англия). Образцы опухолевой ткани разделяли на группы с наличием и отсутствием рецепторов к прогестерону и эстрогенам, после чего оба типа опухолевых клеток культивировали *in vitro* в ростовой среде. Как видно из представленных данных, «Биокор-0,2г», при отсутствии рецепторов к эстрогенам и прогестерону на поверхности опухолевых клеток, способен значительно ингибировать пролиферацию клеток рака молочной железы (рис. 8, 9).

При влиянии «Биокор-0,2г» на клетки рака молочной железы в концентрации 50 мкг/10⁶ клеток и 100 мкг/10⁶ клеток значительное количество опухолевых клеток оказывалось погибшими (степень деструкции равнялось 28,87%±5,38 и 36,2%±11,47 соответственно), тогда как в концентрации 10 мкг/10⁶ клеток аналогичный эффект практически не проявлялся и цитотоксическое действие белка было близко к контролю (6,0%±0,98).

Bcl-2 является ведущим геном, определяющим механизм клеточной смерти, подавляя апоптоз. Этот ген кодирует образование белка, накапливающегося в митохондриях [Безбородова, 2004; Казачкина, 2006]. Экспрессия Bcl-2 связана с факторами, указывающими на благоприятный прогноз, так как коррелирует с наличием рецепторов к стероидным гормонам и низкой степенью злокачественности [Gallo, 2006]. При этом этот белок проявил ярко выраженное доз зависимое действие.

50		
40	20	10 12,2 ^{15,5}
30	10	
сд%	0	10мкг/млн клеток 50мкг/млн

клеток 100мкг/млн клеток ... воздействия Биокора-0,2г.
Для всех значений
опытных групп $p < 0,05$.

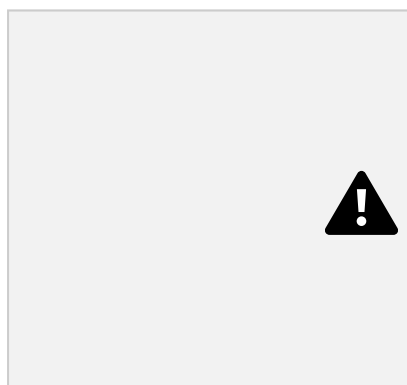


Рис. 8. Степень деструкции слоя клеток рака молочной железы с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону при



Рис. 9. Степень деструкции слоя клеток рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону при воздействии биокора. Для

Было проведено исследование экспрессии протеина Bcl-2 на клетках рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону до, и после воздействия «Биокор-0,2г».

Воздействие «Биокор-0,2г» 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. 10).

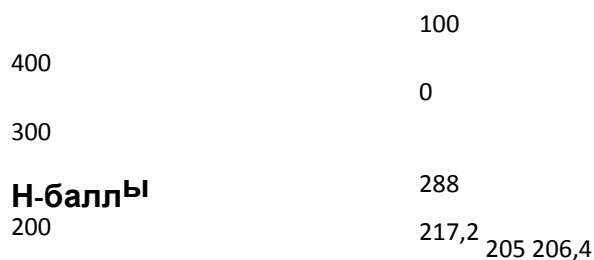


Рис. 10. Количественные

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

10 50 100 контроль
доза воздействия препарата Биокор, мкг/млн ...

Влияние «Биокор-0,2г» на клетки рака молочной железы при поздних стадиях заболевания

Мы использовали образцы опухолевой ткани, в которых прослеживалась злокачественная трансформация клеток молочной железы, третья стадия заболевания.

Г., 68 лет, диагноз – рак левой молочной железы, $T_2N_1M_0$ (Т - размер опухоли, N – увеличение региональных лимфотических узлов, М – обнаружение отдаленных метастаз), вносили в лунки полистиролового планшета, куда после образования клеточного слоя средней плотности добавляли «Биокор-0,2г» в дозах 100 мкг/млн клеток (группа I) и 50 мкг/млн клеток (группа II), контролем служили клетки рака молочной железы без воздействия «Биокор-0,2г» (группа III), время инкубации клеток с протеином составило 60 мин. Результаты цитотоксической активности препарата в отношении клеток рака молочной железы приведены на рис. 11.

Как видно из полученных данных «Биокор-0,2г» 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. С уменьшением дозы воздействия протеина уменьшается и его противоопухолевая активность, так, в дозе воздействия «Биокор-0,2г» 50 мкг/млн клеток, белок вызывал гибель у 38% раковых клеток.

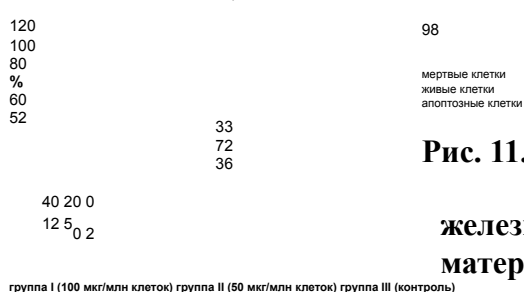


Рис. 11.

Цитотоксическая активность Биокор-0,2г в отношении

клеток рака молочной железы (операционный материал больной Г., 68

лет, диагноз – рак

$p < 0,05$.

левой молочной железы, $T_2N_1M_0$).

Для всех значений опытных групп

Исследование противоопухолевой активности «Биокор 0,2г» на клетки рака эндометрия матки

Рак эндометрия (РЭ) занимает первое место в структуре онкогинекологической патологии, темпы роста показателей заболеваемости РЭ значительно выше таковых при других злокачественных опухолях репродуктивной системы у женщин [Imyanitov et.al, 2005]. В образце наблюдалось предраковое состояние ткани эндометрия, пациентку оперировали с диагнозом миома матки. В дозе 20 мкг на 1 млн клеток белок вызывал гибель $89,0 \pm 0,98\%$ опухолевых клеток. Также отмечалось появление апоптотических клеток в опытных группах при воздействии «Биокор-0,2г» (рис.12).

Результаты цитотоксической активности «Биокор-0,2г» в отношении клеток эндометрия приведены, полученные из операционного материала больной с диагнозом рак эндометрия II стадии, T_2N_1M , показаны на рис. 13. Как видно из полученных данных, соевый протеин во всех использованных дозах проявил высокую цитотоксическую активность в отношении клеток рака эндометрия, в дозе 20 мкг на 1 млн клеток белок вызывал гибель $42,0 \pm 1,56\%$ опухолевых клеток, в дозе 50 мкг - $50,0 \pm 1,58\%$. В этом случае воздействие протеином на клетки рака эндометрия также отмечалось

значительное повышение количества апоптозных клеток в опытных группах, наибольшее количество таких клеток наблюдалось при воздействии белком в дозе 20 мкг – $32,0 \pm 1,47\%$, тогда как в контрольной группе апоптозных клеток было $11,0 \pm 0,98\%$.



Рис. 12. Цитотоксическая активность Биокора-0,2г в отношении клеток эндометрия (операционный материал пациентки с диагнозом миомы матки). Для всех значений опытных групп $p < 0,05$

Рис.13. Цитотоксическая активность Биокора-0,2г в отношении клеток рака эндометрия II стадии (операционный материал пациентки с диагнозом рак эндометрия, $T_2N_1M_0$). Для всех значений опытных групп $p < 0,05$.

Исследование противоопухолевой активности «Биокор-0,2г» на клетки рака прямой кишки

Одной из особенностей динамики онкологической заболеваемости последних десятилетий явился рост заболеваемости раком ободочной и прямой кишки. В настоящее время рак толстого кишечника составляет почти 15% всех злокачественных опухолей в западноевропейских странах. Он занимает второе место в структуре онкологической заболеваемости как у мужчин (после рака легкого), так и у женщин (после рака молочной железы) [Smith et al, 2009].

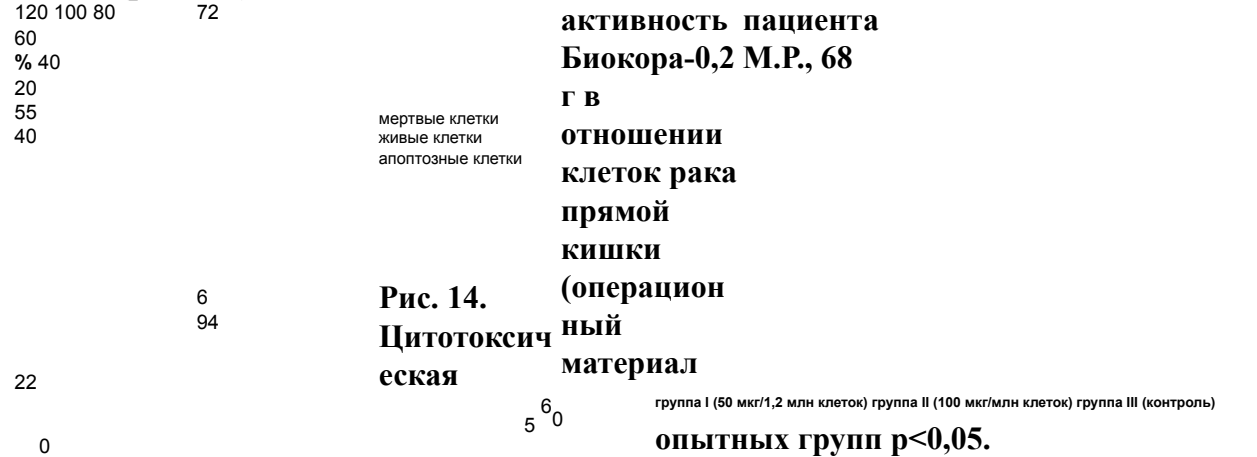
В опухолевой ткани, полученной из операционного материала больного М.Р., 68 лет, диагноз – рак прямой кишки, $T_4N_0M_0$, определили экспрессию онкопротеинов Bcl-2 и Ki-67. Раковые клетки прямой кишки экспрессировали в значительной степени как протеин Bcl-2, так и протеин Ki-67. Экспрессия Bcl-2 составила $97,0 \pm 0,76\%$, что говорит о сильном торможении процессов апоптоза в клетках данного гистогенеза. Экспрессия протеина Ki-67 составила $64,0 \pm 2,14\%$. Проведенный иммуногистохимический анализ показал, что раковые клетки прямой кишки

представляли собой высокопролиферирующую ткань с практически отсутствующими апоптозными клетками, резистентную к традиционной

53

терапии. После установления статуса онкопротеинов Bcl-2 и Ki-67 на клетки рака прямой кишки воздействовали соевым биокором в дозах 50 мкг/1,2 млн клеток (группа I), 100 мкг/1,2 млн клеток (группа II), контролем служили клетки рака прямой кишки без воздействия «Биокор-0,2г» (группа III), время инкубации раковых клеток с протеином составило 60 мин.

Как видно из полученных данных «Биокор-0,2г» в дозе 50,0 мкг/1,2 млн клеток показал высокую противоопухолевую активность, вызывая гибель в общей сложности 60% раковых клеток, в том числе индуцируя апоптоз у 5% клеток. В дозе воздействия «Биокор-0,2г» 100,0 мкг/1,2 млн клеток, белок вызывал гибель у 78% раковых клеток, в том числе индуцируя апоптоз у 6% клеток (рис. 14).



лет, $T_4N_0M_0$. Для всех значений

В пятой главе диссертации «Доклиническое изучение общей, хронической и специфической токсикологии субстанции препарата «Биокор-0,2г» установлен характер действия препарата на организм экспериментальных животных и проведена оценка его безопасности.

Изучение общего действия и «острой» токсичности субстанции препарата «Биокор-0,2г»

Изучение острой токсичности препарата «Биокор-0,2г» показало, что препарат относится к V классу практически нетоксичных соединений. LD50 у мышей при однократном пероральном введении составило >5000 мг/кг и при внутривенном введении 1200 (900-1600) мг/кг (таблица 10).

Таблица 10

Результаты показателей «острой» токсичности субстанции препарата «Биокор-0,2г»

Дозы,	Путь введения
-------	---------------

мг/кг	Пероральный		внутрибрюшинный	
	Кол-во крыс погибшие/ всего	Кол-во мышей Погибшие/ всего	Кол-во крыс погибшие/ всего	Кол-во мышей Погибшие/ всего
500	-	-	0/2	-
600	-	-	1/2	-
800	0/2	-	1/2	-
1000	0/2	0/2	2/2	0/2

54

1500	0/2	0/2	2/2	0/2
1800	0/2	0/2	-	1/2
2000	0/2	0/2	-	2/2
3000	0/2	0/2	-	2/2
4000	-	0/2	-	-
5000	-	0/2	-	-

Исследование кумуляции препарата «Биокор-0,2г»

Таблица 11

Дни введения	Число животных(п10)	Доля от LD ₅₀	LD ₅₀ ≥ 5000мг/кг
1-4	0/10	0,1	500
5-8	0/10	0,15	750
9-12	0/10	0,22	1100
13-16	0/10	0,34	1700
17-20	0/10	0,50	2500
21-24	0/10	0,75	3800
25-28	0/10	1,12	5600

Суммарная доза за 24 дня 12800LD₅₀, максимальная продолжительность эксперимента 24±4дня. $K \cdot LD_{50n} / LD_{50 \text{ 1}}$, где K-коэф. кумуляции, LD_{50n} – средняя смертельная доза при n

кратном введении, LD_{50} – средняя смертельная доза при однократном введении. $K_k \geq 1$ привыкание; $K_k \leq 1$ кумуляция.

Исследование кумуляции субстанции «Биокор-0,2г» показало, что общее состояние и поведение опытных животных (мыши и крысы) не отличались от интактных групп. Гибели среди подопытных мышей и крыс не было, что позволяет сделать вывод об отсутствии кумулятивного свойства у субстанции «Биокор-0,2г» (табл. 11).

Доклиническое изучение хронической токсичности препарата «Биокор-0,2г».

«Биокор-0,2г» не оказывает токсического действия при хроническом введении на состав периферической крови. В лейкоцитарной формуле не было обнаружено патологических изменений во все сроки исследования. Препарат не оказывает токсического действия на функцию почек. Субстанция препарата при пероральном ежедневном введении в изученных дозах не оказывает токсического действия на функцию печени крыс и кроликов. Наблюдение за животными в течение 30 дней ежедневного введения субстанции препарата не выявили, каких либо различий между опытными и контрольными группами. Поведение подопытных крыс и кроликов не отличалось от поведения контрольных групп животных. В опытных группах крыс наблюдалось незначительное увеличение веса тела. У кроликов, как в контрольной, так и опытных группах увеличение веса не наблюдалось на протяжении всего эксперимента.

Субстанция препарата при 10 кратном введении оказывала влияние на I и II фазы свертывания крови, вызывая гипокоагуляцию. Увеличение дозы препарата «Биокор-0,2г» не приводило к увеличению выраженности гипокоагуляционного эффекта. Эффект сохраняется в течение 10 введений,

55

во всех изученных дозах, дальнейшее введение «Биокор-0,2г» до 30 дней приводит постепенно к снижению его действия.

Длительное введение препарата в структуре внутренних органов (сердце, желудок, кишечник, печень, почки, матка) не вызывает морфологических изменений. Следовательно, предлагаемый новый препарат является безопасным средством и может быть рекомендован для клинической медицины.

Доклиническое изучение специфической токсикологии препарата «Биокор 0,2г».

Препарат «Биокор-0,2г» не оказывает местного раздражающего, резорбтивного, местного аллергенного действия, эмбриотоксического и тератогенного, иммунотоксического действия на клеточность и вес лимфоидных органов, мутагенного действия (хромосомные изменения на уровне физиологической нормы), установлена способность изученного препарата существенно стимулировать иммунологическую реактивность организма, изученное вещество обладает способностью интенсифицировать

гуморальное звено иммунитета.

Изучение общей фармакологии препарата «Биокор-0,2г»

При длительном 30-ти дневном введении не отмечалось существенного влияния на аппетит, набор массы тела молодых растущих мышей, существенного влияния на двигательную активность и устойчивость к физической нагрузке.

Отмечалось: усиление снотворного действия этаминала-натрия, тенденция к ослаблению судорожного действия коразола.

Тест « открытое поле».

Препарат при многократном применении активизирует поведенческие реакции, центральную и периферическую нервную систему подопытных крыс, как через 10 дней проведения эксперимента, так и через 30 дней. Через 1 месяц после прекращения введения препарата все показатели опытных животных возвращались к контрольным значениям.

Все выше перечисленные данные позволяют сделать вывод о том, что препарат не оказывает токсического действия на организм животных.

Разработка лекарственной формы препарата «Биокор-0,2г» Таблетки от беловато серого до светло желтого цвета , круглые, плоско цилиндрические, без риски с вкраплениями.

Состав на одну таблетку:

Биокор (в пересчёте на 100% безводное вещество)

(ВФС 42 Уз -) 200 мг

Микрокристаллической целлюлозы

(ТУУз 42-002-96 или TSh88.2-6:2000) 274 мг

Н-карбоксиметил целлюлозы для таблетирования

(TSh 88.3-003:2007) 120 мг

Кальция стеарата

(ТУ 6-09-42-33-76, ВР) 6 мг

Масса одной таблетки 600 мг

56

Препарат «Биокор-0,2г» – иммуномодулятор, на основании доклинических исследований может применяться для комплексного лечения онкологических заболеваний меланомы, рака прямой кишки, рака молочной железы, рака эндометрия матки.

ВЫВОДЫ

1. Впервые из бобов сои сорта Генетик-1 (*Glycine max*) выделена субстанция препарата «Биокор-0,2г» состоящая из комплекса белков с молекулярной массой 12,7-79,0 кДа, изоэлектрической точкой в области pI - 4,1, 4,2, 4,5 и 4,7.2., определены белки входящие в состав препарата Исследование кумуляции субстанции «Биокор-0,2г» (Kunitz trypsin protease inhibitor, beta-amylase, beta-conglycinin alpha prime subunit, 2,4-D inducible glutathione S-transferase, PR10-like protein, 24 kD a protein SC24).

2. Показана ингибирующая активность препарата «Биокор-0,2г» к сериновым протеазам трипсину, химотрипсину и плазмину. 3. Установлена противоопухолевая активность препарата «Биокор-0,2г» на перевиваемых опухолевых штаммах АКАТОЛ, АКАТОН, Меланомы В-16 и Саркома 180, при монотерапии тормозит рост раковой ткани на перевиваемых опухолевых штаммах более чем на 70%.

4. Выявлено, что субстанция препарата «Биокор-0,2г» увеличивает пролиферацию клеток красного костного мозга экспериментальных животных и продолжительность жизни экспериментальных животных от 30 до 49% в зависимости от гистогенезиса опухоли.

5. Показано, что введение субстанции препарата «Биокор-0,2г» в комплексной терапии с 5-фторурацилом усиливает противоопухолевое воздействие в среднем от 10 до 25% и позволяет повысить эффективность лучевой терапии экспериментальных опухолей животных в среднем в 1,5-2,3 раза. Увеличивает выживаемость подопытных животных от 30 до 60%.

6. Установлено, что субстанция препарата «Биокор-0,2г» способствует восстановлению иммунного статуса животных-опухоленосителей, получавших 5-фторурацил, модулирует лечебное действие противоопухолевых препаратов и регулирует иммунитет у животных-опухоленосителей.

7. Определено, что введение субстанции препарата «Биокор-0,2г» способствует улучшению гематологических и морфологических показателей крови (нормализации процентного содержания лейкоцитов, повышения уровня гранулоцитов, содержания гемоглобина и числа эритроцитов).

8. Показано, что субстанция «Биокор-0,2г» ингибирует пролиферацию *in vitro* более чем на 50% резистентных к терапии клеток рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону, рака

57

эндометрия, рака толстого кишечника (с высоким содержанием bcl-2, Ki-67) на всех стадиях злокачественной трансформации.

9. Установлено, что субстанция препарата «Биокор-0,2г» относится к V классу практически нетоксичных соединений. LD₅₀ при пероральном введении более 5000 мг/кг, не обладает кумулятивным действием, не оказывает токсического действия на функцию почек и печени, а также на патоморфологию органов и тканей животных, не влияет на сердечно-сосудистую систему, дыхание и периферическую нервную систему. Субстанция препарата «Биокор-0,2г» не оказывает местного раздражающего, резорбтивного, аллергенного, эмбриотоксического и тератогенного, мутагенного действия, иммунотоксического действия на клеточность и вес лимфоидных органов, количество макрофагов и клеточность костного мозга.

10. Разработана лекарственная форма препарата иммуномодулятора

«Биокор – 0,2г» таблетки и рекомендована для комплексного лечения онкологических заболеваний.

**ONCE-ONLY SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARD OF SCIENTIFIC
DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCES 14.07.2016.K/B/T.13.01 AT THE
INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY AND THE NATIONAL
UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY

IBRAGIMOV FAZIL AHMEDOVICH

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTEIN PREPARATION FROM
SOYBEAN IN TREATMENT OF ONCOLOGICAL DISEASES.**

**02.00.10 – Bioorganic chemistry
(biological sciences)**

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

TASHKENT – 2016

59

**The theme of the doctoral dissertation is registered at the Supreme Attestation
Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under number
30.09.2014/B2014.5.B68.**

The doctoral dissertation has been prepared at Institute of Bioorganic Chemistry

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English) languages on the website of the Scientific Council (<http://ss.biochem.uz>) and the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziyo.net).

Scientific consultant: Kadirova Dilbar Abdullaevna doctor of sciences in biology

Official opponents: Saitmuratova Oguldjan Hudaybergenovna doctor of sciences in biology, docent

Buglanov Anatoliy Ayuchevich
doctor of sciences in biology, professor

Gafur-Akhunov Mirza Ali
doctor of sciences in medicine, professor

Leading organization: Republican Scientific Center of Immunology

Defense will take place on «___» december 2016 at ___ at the once-only meeting of the Scientific council 14.07.2016.K/B/T.13.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry and the National University of Uzbekistan at the following address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phon: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63; e-mail: asrarov54@mail.ru

Doctoral dissertation is registered in library at the Institute of Bioorganic Chemistry, it is possible to review it in library (100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63)

Abstract of dissertation sent out on «___» November 2016 year

(mailing report № ___ on «___» _____ 2016 year)

A.S. Turaev
Chairman of once-only Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D. ch. Sc., professor

M.I. Asrarov
Scientific secretary of once-only Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D.b. Sc., professor

R.Z. Sabirov
Chairman of once-only Scientific seminar under once-only Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D.b.Sc., professor

60

INTRODUCTION (abstract of doctoral dissertation)

Urgency and relevance of the dissertation topic. For today in the world preventive maintenance and treatment of oncological diseases remains actual in

this connection the new medical products of a biological origin received from vegetative and animal raw materials are created. On statistical data of the World Organization of Public health services within 20 years oncological disease grows in two¹.

With acquisition of independence of Republic the organization of research works on reception of medical products from local raw materials and the carried out expanded actions for maintenance of the national pharmaceutic market with qualitative medical products at high level have led to certain results. Thus, it is especially important to note medical products received of local raw materials used at treatment of oncological diseases.

Now mechanisms of an aetiology and патогенеза cancer diseases definitively are not found out because of the big complexity and variety of the molecular mechanisms occurring thus of processes. Carried out researches show, that soya components are capable tumor cages, to induce apoptosis in the transformed cages, and they operate on tumor cages, and toxic effects concerning normal fabrics of an organism are, besides, one of the major problems is creation of effective medical products and their introduction in manufacture.

The given dissertational research in certain degree serves performance of the problems provided in Decisions of the President of Republic Uzbekistan from November, 28th, 2011 № software-1652 «About measures on the further deepening of reforming of system of public health services», the Cabinet of Republic Uzbekistan from March, 29th, 2012 № 91 «ABOUT measures on the further strengthening of material base and perfection of the organization of activity of medical institutions», and also in other is standard-legal documents accepted in given sphere.

Compliance of the research with priority areas of science and technology of the Republic². This research was performed in accordance with the priority areas of science and technology of the Republic - VI. Medicine and pharmacy.

Review of foreign scientific researches on the dissertation topic².

Researches aimed at development of biological drugs based on proteins and peptides for treatment of cancer are performed at leading research centers and higher education institutions of the world, including the National Institute of Cancer (USA), Andong National University (Korea), State Scientific Research Institute of Physic-Chemical Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences (Russian), The Institute of Oncology of the Academy of Medical Sciences (Ukraine), Oncology Research Center of the Ministry of Health of

¹<http://www.cancer.org/downloads/STT>

Georgia, National Oncology Research Center of RAMS (Russia). As a result of researches carried out in different research institutions on development of biological products on the basis of proteins and peptides in the treatment of cancer,

a number of scientific results was received, including: - isolation of lunazid peptide, that presents in soy and grains of some cereals, which is offered as a means for treatment of cancer, high cholesterol, cardiovascular diseases and inflammation (University of California-Berkeley); - isolation of Bowman-Birk protease inhibitor, received from soy with molecular weight of 8 kDa, seems promising at application after radical surgical removal of malignant tumor with the purpose of prevention of recurrence and metastases (USA);

- development of GA-40 immunotherapeutic treatment medication with anti carcinogenic properties (Immucor GA-40), which is a complex of plant polypeptides from mountain Solomon's seal (*Polgonatum varticillatum*) (Oncology Research Center of the Georgian Ministry of Health);

- development of "Insol" BAS possessing anti-cancer properties, extracted from soybeans and containing Bowman-Birk inhibitor, soy proteins and carbohydrates, with anti-inflammatory and anti-cancer effect (Moscow State University);

New pharmacological activity of some connections and the extracts possessing ингибиторными properties of growth of cancer cages (Institute of chemistry of plants of Academy of sciences Republik of Uzbekistan)

- development of Tortezin - a multifunctional drug which is a sum of neutral oligopeptides from the blood of Central Asian tortoises *Testudo horsfieldi*, used as immunocorrector and means for accompanying radiation and chemotherapy (Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan).

A number of researches are held worldwide for development of biological drugs for treatment of cancer in several priority areas, including: development of means for correction of immunological and hematological disorders arising after chemotherapy and radiation; studies of immunomodulations for application after severe surgical interventions; correction of immunological disorders arising as a result of immunosuppressive influence of the tumor; development of preparations of protein nature possessing anti-metastatic effect.

The degree of study of the problem. It is well known that oncological situation in the world remains unfavorable. According to recent reports of IARC (International Agency for Research on Cancer) and WHO, over 12 million new cancer cases are registered in the world each year.

Despite the fact that cancer is the most dangerous of all diseases, its treatment becomes more and more efficient year to year, thanks to constant development of

²Research and commentary on the thesis developed in <http://www.lib.uiowa.edu/hardin/md/ej.html>; <http://www.cancer.gov/search/cancer> literature/; <http://www.scirp.org/journal/jctn> and developed on the basis of other sources.

new methods and their implementation on practice. One of the most recent areas of oncology is the treatment of cancer by biological preparations - unique agents

acting destructively on tumor cells, and that have no adverse effects on healthy tissues and the organism as a whole.

It is known that soy protein products do not contain cholesterol, which allows recommending them to patients with lipid metabolism disorders (atherosclerosis, coronary heart disease, hypertension, etc.). Soy proteins are easily digested (86-98%), have medical effects on allergies and diathesis [Xiao C.W., 2008]. High content of lecithin in soy protein helps to reduce blood sugar, cleanse blood vessels from atherosclerotic layers, and improve metabolic processes [Jackman K.A., 2007].

Protease inhibitors isolated from soybeans for 5-10 times lower probability of cancerous degeneration of human cells under the influence of X-rays. Inhibitors help with various tumor diseases of liver, lung stomach, bowel, nasopharynx, connective tissue of mice, rats, hamsters. Pure or partially purified protease inhibitors act approximately equally. The latter property will reduce the cost of the medicine [Krutyakov V.M., 2001].

In Uzbekistan researches of medical products on the basis of plants in treatment of oncological diseases are engaged in Enikeeva Z.M., Juldashev A.H., they had been allocated such antineoplastic connections, as proiz-water colchicine, vincristine and vinblastine. The present work is devoted reception of the standardised combination of an albuminous complex and studying of biological and tumor activity in conditions *in vitro* and *in vivo*, and also to studying of the pharmacy-toxicology, the received preparation has practical value.

This paper is dedicated to reception of a standardized combination of protein complex and study of its biological and antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, as well as study of pharmacy-toxicology of the received preparation.

Connection of the dissertation topic with research work held in research institution where the work was carried out. The dissertation research was carried out within the framework of the plan of research works of fundamental project STCU №3501 «Study of soy protein in the treatment of cancer cells of an organism" (2006-2009) and applied project FA-A11-T174 "Development of antitumor protein preparation from soybean cake and isolation of highly pure enzymes from local raw materials" (2009-2011) held at the Institute of Bioorganic Chemistry.

The purpose of the research is reception of soy protein complex, determination of its physicochemical characteristics, anti-cancer activity on various kinds of cancer *in vivo*, *in vitro* on biopsies of breast and endometrial cancer, pharmacy-toxicology of the received substance.

Research objectives:

- development and physical and chemical characterization of protein complex from soy;
- determination of protease activity of the protein complex;

- determination of biological activity on experimental models in mono- and combined therapy at in vivo experiments;
- determination of antitumor activity of the protein complex on breast, colon and endometrium cancer cells resistant to conventional therapy at in vitro experiments;
- preclinical studies of pharmacology-toxicology of the substance and dosage form of the preparation;
- development of Biokor medical form of the medicine.

The object of the research is the protein complex from soybeans from beans of a soya of a grade «Genetica-1» (*Glycine max* - (*L* is.) *Mtrr.*), oncological diseases, a cancer of the thick intestines, intertwined ACATOL, ACATON, melanome B-16, Sarcome-180

The subject of the research Physical and chemical and anti-tumor properties of an complex (a preparation substance «Biocor-0,2 g») on intertwined ACATON, ACATON, melanome B-16, Sarcome-180, on biopsy material *in vitro* a mammary gland cancer, to resistant cages endometria and thick intestines on all a stage of malignant transformation as well as pharmacological and toxicological properties of the received substance.

Research methods. The research included methods of column chromatography, electrophoretic methods of research, definition of amino acid composition, immunohistochemical analysis, microscopy, mass spectrometry, immune-enzyme and pharmacology-toxicological analysis.

Scientific novelty of the research is as follows:

- protein complex was isolated from soy beans, its physicochemical properties were determined;
- the purified protein consists of a complex of proteins with a molecular weight of 12,7-79,0 kDa, and isoelectric point in pI -4,1; 4.2, 4.5 and 4.7; - mass spectrometry determined the presence of Kunitz trypsin protease inhibitor in the protein complex;
- specific antitumor activity of the protein complex revealed at in vitro and in vivo conditions;
- pharmacology-toxicological properties of the received substance were identified; - medical form of "Biokor-0,2g" preparation was developed .

Practical results of the study are as follows:

- development of "Biokor" preparation based on a set of polypeptides from soy beans;
- development of an effective medicine with antitumor action possessing detoxicating, anti-inflammatory, immunomodulatory and anticarcinogenic properties;
- pre-clinical pharmacology-toxicological studies showed that Biokor preparation belongs to class V of practically non-toxic compounds and has no cumulative properties.

Reliability of the research results based on the fact that the experimental data was obtained with application of modern high-precision methods. Conclusions of the work were made on the basis of the results processed using modern methods of mathematical statistics.

Scientific and practical significance of the research results. The scientific significance of the research results is isolation and study of a protein complex from soybean. The mechanism of action of the preparation on the organism of experimental animals was studied, what allows to receiving new data on the etiology and characteristics of development of malignant tumors.

The practical significance of the work is development of medical form of "Biokor-0,2g" pills preparation on the basis of a protein complex from soybean for complex treatment of oncological diseases. The preparation reduces the toxic effects of other treatments (chemotherapy and radiotherapy), normalizes the immune system, improves the hematological and morphological parameters of blood (reduces the percentage of white blood cells, increases the level of granulocytes, hemoglobin and red blood cells) and prevents metastasis.

Implementation of the research results. On the basis of receiving data on extraction, physico-chemical study of biologic and anticancer activity of the protein from soybean cake the following actions were made:

- Development of Biokor preparation possessing anti-cancer activity, as well as of a method of its extraction. The invention was patented in the Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan (26.04.2012, №IAP 04501). Based on the receiving substance a medicinal form (pills) was developed for incorporation into a basic therapy of cancer treatment.

The obtained data, on a complex of fibers allocated of a soya are registered in database EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>), antineoplastic activity of a preparation «Bikor-0,2g» on intertwined tumor AKATOL, AKATON, melanome B-16 and the Sarcoma 180 is established.

- "Biokor-0,2g" pills on the basis of preclinical studies are recommended as an immunomodulation for the integrated treatment of oncological diseases of different localization of tumor process of breast cancer, melanoma, colorectal cancer, endometrial cancer.

- The technical documentation on VFS projects was submitted to the General Department for Medicines and Medical Equipment Quality Control for examination and registration. "Biokor-0,2g" pills are tested in clinical trials on the second stage breast cancer patients in not adjuvant therapy mode.

Approbation of the work. Results of the research on dissertation topic were presented in the form of reports and have been approved at 23 international and national science and research conferences, in particular: III Congress of Oncologists of Transcaucasian States (Yerevan, 2004), The conference on "Actual

problems of post-graduate training of doctors and new horizons of medicine" (Tashkent, 2007); XI Russian Oncology Congress (Moscow, 2007); Materials of scientific-practical conference on "The physic-chemical biology and prospects of

65

biotechnology" (Andijan, 2007); V Congress of oncologists and radiologists of CIS countries (Tashkent, 2008); Conference on "Actual problems of chemistry of natural compounds" (Tashkent, 2009, 2010, 2011, 2012); International Congress "Biotechnology: state and prospects for development" (Moscow, 2009); Scientific practical conference "Biologically active substances: basic and applied questions of preparation and application" (Ukraine, 2009, 2011); Russian scientific-practical conference with international participation "Modern Oncology: achievements and prospects" (Tomsk, 2009); 6th Russian conference on fundamental oncology (St. Petersburg, 2010), 14th and 15th International Pushchino School - Conference of Young Scientists "Biology - Science of XXI Century" (Moscow, 2010, 2011); Conference on "Actual problems of development of Bioorganic Chemistry" (Tashkent, 2010); X, XI All-Russian scientific-practical conference with international participation "Domestic antitumor preparations" (Moscow, 2011, 2012); 7th Conference "Fundamental Oncology – Peter readings" (St. Petersburg, 2011); II Congress of Oncologists of Uzbekistan (Tashkent, 2011); 8th Conference on fundamental oncology "Peter Reading (Moscow, 2012); Belarusian-Russian scientific-practical conference with international participation "Domestic antitumor preparations" (Minsk, 2013).

Publication of the results. 48 publications were made on the materials of the dissertation: 13 scientific articles, including 9 national and 4 foreign journals recommended by the Higher Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publication of basic scientific results of doctoral dissertations. In addition, a patent for the invention was receiving.

The structure and volume of the dissertation. The Structure of the dissertation consists of an introduction, five chapters, conclusion, and list of references. The volume of the dissertation is 195 pages.

HIGHLIGHTS OF THE DISSERTATION

The introduction discusses the urgency and relevance of the study, the purpose and objectives of the study, the object, subject and correspondence with research priority areas of Science and Technology of the Republic of Uzbekistan, scientific novelty and practical results of the study, scientific and practical significance of the results, practical application of research results, information on published works and the dissertation structure.

The first chapter of the dissertation **"Soybeans: characteristics and importance in prevention and treatment of various diseases"** provides a detailed review of the literature devoted to the study of proteins and peptides in the biotherapy of tumors, application of immune modulators in the treatment of cancer

patients, medicines based on soy derivatives in the treatment of various diseases.

The second chapter of the dissertation "**The material, conditions and methods of study of protein complex of Biokor preparation**" describes detailed methods for extraction of the protein complex from soybean, electrophoretic, radiometric, mass spectrometry, immunologic methods, methods of determining

66

the biological activity of the protein preparation on experimental tumor strains, pharmacology-toxicological and histology methods.

The third chapter of the dissertation "**Physical and chemical characteristics of the protein complex and its biological activity**" describes the results of the studies of physical and chemical properties and biological activity of the Biokor preparation on experimental tumor strains.

Proteins chromatography and physical-chemical characterization of proteins.

Currently, many researches are held to study the influence of soy and its components on carcinogenesis (Krutyakov VM 2001, p.106; Nemtsova ER et al, 2002, p.30.). Ongoing studies indicate that soy components capable of inhibiting tumor cell proliferation, inducing apoptosis in transformed cells, and they influence tumor cells with minimum toxic effects on normal tissues of the organism (Zaletok S.P. et al., 2006, s.294 ; N.I. Kazatchkina et al, 2006, p 35). In this regard extraction of soy protein complex to study its anti-tumor activity is a topical problem.

Isolation of proteins from soybean was performed by two methods of extraction: with solution of 0,06M solution of sodium chloride 0.05 M Tris buffer, pH 7,4.

To test the antitumor activity of protein we used a model test system for the selection of anticancer agents in vitro on KML mice melanoma cell line - B-16 mice melanoma strain (Kuznetsov, N. et al, 2005, p.5). Carriers for gel filtration – sephadex G-75 and G-50 – were selected for efficient separation (Osterman, L.A., 1983, p.116).

The chromatograms of gel filtration of proteins are shown in Fig. 1 and 2.

Fig.1. Gel filtration of soy protein on column with sephadex G-75 (80 x 2,6), 0,05M Tris-HCl buffer pH 7,4

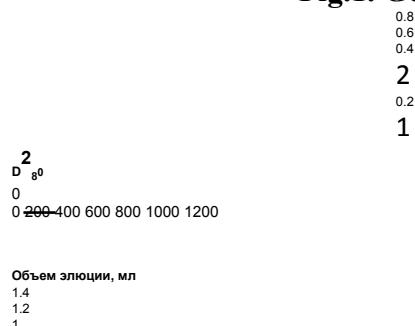


Fig.1. Gel filtration

0.8
0.6
0.4
2
0.2
1

Fig.2. Gel filtration of soy protein on column with sephadex G-50 (80 x 2,6),

0,05M Tris-HCl buffer pH 7,4

0
-0.2
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 Объем

67

Both media eluted three fractions. Determination of activity of fractions by ^{14}C -thymidine activation showed that the highest activity of $64.0 \pm 1.9\%$ at the dose of 100 mcg/ml was shown by the first fraction after gel filtration on column with Sephadex G-75.

Electrophoretic studies of the protein fractions after gel filtration has shown that the most effective separation of proteins is receivingd on Sephadex G-75. The component composition of the first fraction is presented by pronounced polypeptides with molecular weights of 12.7, 13.0, 15.0, 67.0, 79.0 kDa. Gel filtration on Sephadex G-50 column did not provide effective separation of proteins, the spectrum of all three protein fractions was virtually identical. Isoelectric focusing of active protein fraction showed the presence of four isopoints in pI -4,1, 4,2, 4,5 and 4.7 (Fig.3).

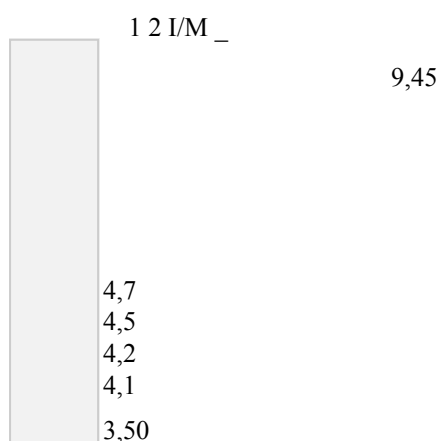


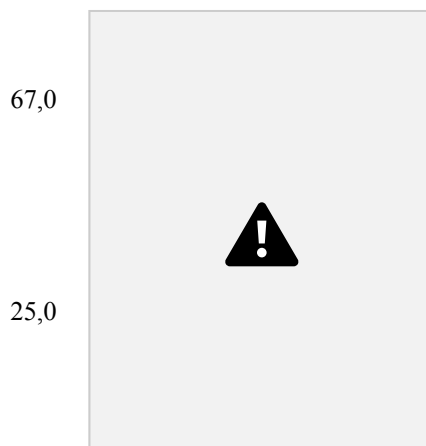
Fig.3. Isoelectric focusing of the active protien fraction after gel filtration on G-75 column (ampholine within the

range of pH 3,5-10)

1-Fraction I

2- Witnesses of Свидетели isofocusing.

+ kDa_ 1 2 3 4 5 6 _



12,5
+

Fig.4 Electrophoresis in 10% polyacrylamide gel with presence of SDS of Biokor substance:

1- mixture of marker proteins (Albumins Bovine 67-kDa, chemotrypsinogen-25 kDa, cytochrome C-12,5 kDa), 2-WSS, 3-7 – five series of experimental samples of the preparation.

The active protein fraction standardized on five series of laboratory samples was given the name of Biokor preparation (Fig. 4).

Amino acid composition of the active protein fraction was determined (Table 1).

68

Table 1.

Amino acid composition of the active protein fraction

Amino acids	Percentage	Amino acids	Percentage
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
Σ 95,99%			

Determination of antitrypsin activity of Biokor preparation.

Serine proteases play an important role in tumor growth, comprising serine (trypsin, chymotrypsin, kallikrein, plasmin, thrombin) in its active site, as well as metalloproteinase containing Zn^{2+} in the active site (Nagase H., et al, 1994, p. 21491).

Table 2.

Inhibition of serine proteases activity by Biokor

Serine proteases	Inhibition of serine proteases activity	
	Standard units of proteolytic activity, absorption λ 280	% of inhibition
Trypsin	0,145 $\pm$ 0,002	34,7 $\pm$ 0,1

Chymotrypsin	0,156±0,003	29,4±0,2
Plasmin	0,167±0,002	24,1±0,1
Control*	0,220±0,002	0

3,0 mcg protease, in 0,05M phosphate buffer pH 7,6; substrate - casein 300,0 mcg, (- $p < 0,05$). In this connection, an experiment was conducted to determine the anti-trypsin activity of Biokor preparation (Table 2). The data shows that Biokor possesses high inhibitory activity against serine proteases from 24.1 ± 0.1 to 34.7 ± 0.1 , that suggests antitumor properties of the preparation.

69

Mass spectrometric analysis of peptides of Biokor preparation

Table 3.

Identified proteins	ID	Mr(Da)	Score	Sequence Coverage %
Kunitz trypsin protease inhibitor	Glycine max	22676,1	339,17	50
Beta- conglycinin alpha subunit	Glycine max	72475,7	375,39	43
Beta-amylase	Glycine max	57000,0	205,59	52
2,4-D inducible glutathione S transferase	Glycine max	49000,0	78,66	23
PR10-like protein	Glycine max	3865,99	55,42	29
24 kDa protein SC24	Glycine max	24569,7	52,27	17

Note: ID - abbreviation of proteins according to NCBI databases; Mr - molecular weight of proteins; Score- $10 \times \lg P$, where P - probability that a protein, which was compared to the mass spectrum of the databases is incorrect. All search results of proteins with the Score value greater than 50 are valid; SequenceCoverage – the percentage of coverage of amino acid sequence according to databases. Reliable index is from 15 to 90%.

Two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry identified the proteins that are part of Biokor preparation. The presence of protease inhibitors – Kunitz trypsin protease inhibitor - in the preparation was confirmed. The data is presented in Table 3.

Investigation of antitumor activity of Biokor substance in experimental carcinogenesis on transplanted colon adenocarcinoma (AKATOL), small bowel adenocarcinoma (AKATON), B-16 melanoma and Sarcoma 180 tumor strains. Inhibition of tumor growth by weight and volume.

Adjustment of the dose of Biokor preparation was performed on colon adenokartsinoma tumor strain (AKATOL).

The experimental animals were divided into 4 groups: group I - animals receivingd Biokor per os 10 days once a day at a dose of 125 mg/kg; group II - animals receivingd Biokor per os 10 days once a day at a dose of 150 mg/kg; group III – animals receivingd Biokor per os 10 days once a day at a dose of 250 mg/kg; group IV - control, animals were once a day injected NaCl saline per os.

Biokor at the dose of 150 mg/kg per os showed the greatest efficacy and inhibited AKATOL tumor growth by 71.9% by weight. Reducing the exposure dose to 125 mg/kg lead to reduction of tumor growth inhibition to 57.68% by weight. Increasing the dose to 250 mg/kg did not lead to increased inhibition of tumor weight and reached 69.8%.

All experimental groups of animals treated with Biokor have shown a significant confirmed decrease of tumor by volume what can be explained by a positive effect of the protein on the processes of exudation of ineitrofilnoy invasion. The most significant antitumor effect was observed on the animals of the II and III experimental groups - 88,46%. In Group I the inhibition of tumor tissue growth reached 61.4%.

The results have shown that that the optimal dose of BIOKOR is 150mg/kg.

70

Further studies of BIOKOR were carried out on adenocarcinoma of small
 and Sarcoma 180 tumor strains.

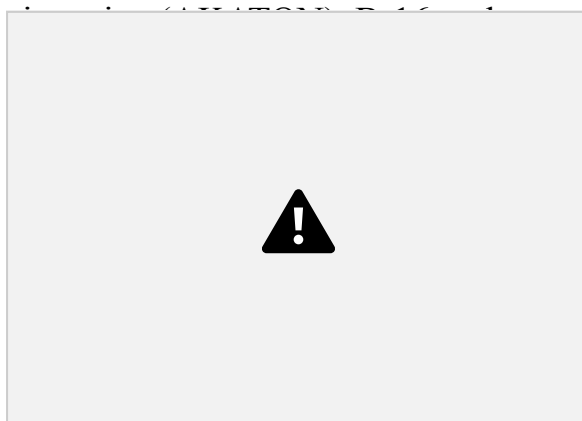


Fig. 5. Changes in tumor volume and weight in experimental animals on different strains after substance introduction at the dose of 150mg/kg to the last day of the experiment. (* - $P < 0,05$).

Fig. 5 shows the results of tumor growth inhibition on all four strains. Biokor substance at mono therapy inhibits tumor growth by volume and weight by more than 70%.

Calculation of apoptotic and mitotic index in the tumor tissue after introduction of Biokor.

Metric data on tumor weight and volume is not always able to adequately reflect the processes of progression or regression of the tumor tissue. More objective picture of proliferative activity of tumor cells can be obtained by counting the number of mitoses in the tumor tissue - its mitotic index (MI). Another parameter that reflects the processes of tumor cell death is apoptotic index (AI).

The ratio of apoptotic index (AI) to the mitotic index (MI) (AI/MI) demonstrates the degree of progression or regression of the tumor tissue. In case the value of AI/MI exceeds unity, tumor regression is observed.

The experimental group with AKATOL strain has shown high regression of the tumor tissue. The AI/MI ratio in the experiment was 2.08, whereas the control group ratio was 0.89. On Melanoma B-16 strain the AI/MI ratio in the experiment reached 15.18, and in the control group - 0.74. On AKATON strain the AI/MI ratio in the experiment was 1.75, with 0.81 ratio in the control group. On Sarcoma 180 tumor strain the AI/MI ratio reached 3.6 in the experiment, with 0.86 ratio in the control group.

As can be seen from the results, all experimental groups have shown significant regression of the tumor tissue, i.e. the number of apoptotic cells exceeds the number of mitotically dividing cancer cells, whereas the control group of experimental animals provided the AI/MI ratio of less than 1.0.

Study of the inhibitory effect of Biokor on red bone marrow cells in experimental carcinogenesis.

Application of any therapeutic substance possessing a cytotoxic effect on tumor cells creates a risk of reducing the proliferation of normal and highly proliferating cells. One of the primary targets of such side effect of the

71

preparations are red bone marrow cells. Disorder of their proliferation leads to serious negative consequences for the process of hematopoiesis and efficient operation of the immune system [Y.M. Vasilyev, 1997, p.20].

To determine the proliferative activity of red bone marrow cells the direct method of one-hour cell culturing for chromosome analysis by Fitzgerald was used. In studies of Biokor anticancer properties we studied the inhibitory effect of the protein on the proliferation of red bone marrow cells in experimental carcinogenesis on AKATOL, AKATON, B-16 melanoma and Sarcoma 180 tumor models. Fig. 6 shows the results of counting of MI in red bone marrow of experimental animals. As can be seen from the chart Biokor did not inhibit

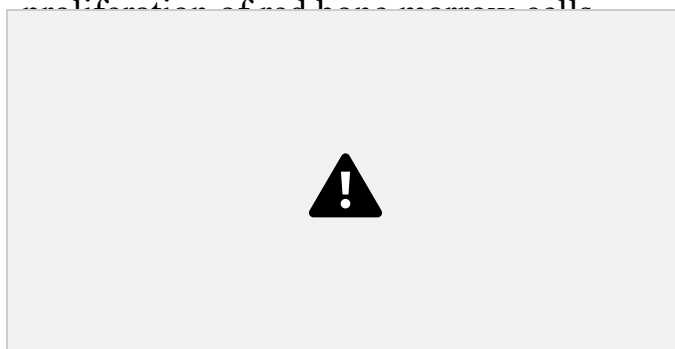


Fig. 6. Mitotic index (MI) of red bone marrow cells of experimental animals with implanted tumors after

introduction of Biokor to the last day of the experiment
 (* - $P < 0,05$).

Influence of Biokor preparation on haematological parameters and morphological picture of blood of the mice with experimental model of sarcoma 180 tumor.

Table 4

Influence of "Biokor" preparation application on haematological parameters and morphological picture of blood of mice with Sarcoma 180 experimental model.

Objects of study	Animal groups		
	Intact	Control	Treated
White blood cells	7,95±0,61	20,4±3,64*	11,2±2,48**
Lymphocytes	5,1±0,16	3,5±0,46*	4,0±0,15
Cells of medium size	1,45±0,12	1,7±0,5	1,2±0,1
Granulocytes	1,9±0,08	3,03±0,2*	2,97±0,26*
The percentage of lymphocytes	57,0±2,45	38,3±0,66*	45,3±1,2**
Cells of medium size, %	17,6±1,06	14,2±1,09	13,1±2,0
Granulocytes, %	22,4±1,31	44,8±1,13*	47,2±4,19*
Rod nuclear cell, %	1,5±0,4	7,3±2,91*	5,0±2,08*
Segmentated cell, %	34,0±1,63	48,0±2,31*	50,7±3,84*
Hemoglobin	130,3±8,89	122,5±5,31	141,0±7,58**
Red blood cells	7,98±0,71	7,98±0,26	9,06±0,48

Note: * $p \leq 0.05$ compared to intact animals, ** $p \leq 0.05$ compared to the control group

Studies were performed on whole blood of mice. Animals were divided into the following groups: intact animals, control group (model with implanted tumor) and a group of animals receiving the drug at the dose of 150 mg/kg per os. Introduction of the drug was started on the 10th day after tumor transplantation and continued daily for 10 days.

The study has shown improvement of hematological and morphological

parameters of blood (normalization of percentage of white blood cells, increase of the level of granulocytes, hemoglobin and quantity of red blood cells). A standardized combination of polypeptides possesses not only pronounces anti tumor effect, but also is involved in the recovery of the immune system, improves blood hematologic indices.

Study of Biokor antitumor activity on experimental animals with transplanted tumor strains at late introduction of the drug.

Experiments on study of the life span of animals after introduction of Biokor were conducted similarly to the study of tumor growth inhibition by weight and by volume. Introduction of the drug was carried out on day 10 after tumor transplantation.

The conducted study of anti-tumor activity of Biokor on transplanted AKATOL, AKATON, B-16 melanoma and sarcoma 180 strains in terms of the effectiveness of tumor growth inhibition (TGI) and an increase of life span (ILS) of experimental animals has shown a positive effect of the protein at introduction on the 10th day after tumor transplantation for more than 60% and 30% respectively (table 5).

An audit of internal organs in experiments for study of life span of experimental animals revealed isolated cases of metastasis on the 10th day after tumor transplantation. Protease inhibitors contained in Biokor protein complex help to reduce metastasis.

228 mg/kg of 5-fluorouracil (5-FU) was introduced to animals intraperitoneally on the 3rd, 5th and 9th day after tumor transplantation **Table 5**

Study of Biokor antitumor activity at later introduction (on day 10 after tumor transplantation) in terms of tumor growth inhibition and increase of life span of animals.

Experimental strains	TGI by volume %	TGI by weight %	ILS %
AKATOL	91,40	66,35	38,34
AKATON	60,95	47,17	49,83
Melanoma B-16	56,35	60,06	30,59
Sarcoma 180	63,84	61,63	35,90

Study of Biokor antitumor activity at joint introduction with 5-fluorouracil (5-FU) on mice with transplanted tumor.

application with 5-FU on animals with transplanted tumor.

Tumor strain	Preparation	Dosage	Q-ty of intro ductions	Average tumor weight (g)	TGI by weight %
AKATON	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+10 10	1,24±0,48 0,32±0,1 8* 0,09±0,0 6* 0,36±0,2 3*	74,2 92,7 71,0
AKATOL	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+10 10	0,87±0,31 0,12±0,0 3* 0,07±0,0 1* 0,25±0,1 9*	86,2 91,9 71,3
Sarcoma 180	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+10 10	1,8±0,38 0,16±0,0 5* 0,12±0,0 4* 0,19±0,0 8*	91,1 93,3 89,4
Melanoma B-16	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+10 10	1,7±0,23 0,62±0,1 2* 0,40±0,1 1* 0,66±0,1 3*	63,4 76,4 61,2

For all values of the experimental groups * p <0,05 versus control

Table 7

Study of the effect of Biokor protein preparation (BP) on increase of life span of animals with transplanted tumor at combined application with 5-FU.

Tumor strain	Preparation	Dosage	Q-ty of intro ductions	Average life span (days)	Increase of life span, %
--------------	-------------	--------	------------------------	--------------------------	--------------------------

AKATON	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+21 21	25,1±1,25 33,5±1,67 37,3±1,72 26,6±1,33	33,4 48,6 35,5
AKATOL	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+21 21	17,7±1,35 30,5±1,52 27,5±1,26 30,6±1,51	72,3 55,3 72,8
Sarcoma 180	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+21 21	36,6±1,83 50,3±2,52 65,3±3,26 56,3±2,81	37,4 78,4 53,8
Melanoma B-16	Control 5-FU 5-FU+BP BP	228 mg/kg 228mg/kg +150mg/kg 150 mg/kg	3 3+21 21	23,4±1,17 30,8±1,52 41,8±2,06 30,6±1,53	31,6 78,6 30,7

74

Biokor in a dose of 150 mg/kg was introduced per os for 10 days starting from the second day after tumor transplantation. Then, after natural death of the animals in all groups, indices of TGI and average life span were counted and ILS index was calculated and compared with the control group. Study of antitumor activity of protein drug at joint application with 5-FU on mice with transplanted tumor at early stages of introduction.

The drug has shown excellent antitumor activity at cytostatic level. Introduction of soy protein in complex therapy with 5-fluorouracil increases antitumor effect on average from 10 to 25% (Table 6). The effect of combined application of antitumor cytostatic and Biokor was even more significant - survival of experimental animals increased by 30 to 60% depending tumor histogenesis (Table 7).

Combined application of Biokor substance and 5-fluorouracil reduces the toxic effect of the latter and increases tumor growth inhibition and life span of experimental animals with transplanted tumor.

Changes in immune status of tumor-bearing animals at introduction of Biokor.

After transplantation of Sarcoma 180 tumor strain to outbred mice, 5- fluorouracil was introduces intraperitoneally on the 3rd, 5th, and 9th day at a dose of 228mg/kg. Biokor was introduced per os at a dose of 150 mg/kg on 2nd and 21st day.

The method for assessing the immune status is based on quantitative testing of lymphocyte subpopulations with specific receptors - differentiation clusters (CD) [Zalyalieva M., 2004, p. 9]. The following markers were used: CD3, CD4, CD8, CD16, CD19. The phagocytic activity of neutrophils (PAN) was determined

by their ability to phagocytize neutral particles of latex (1.5 microns) in

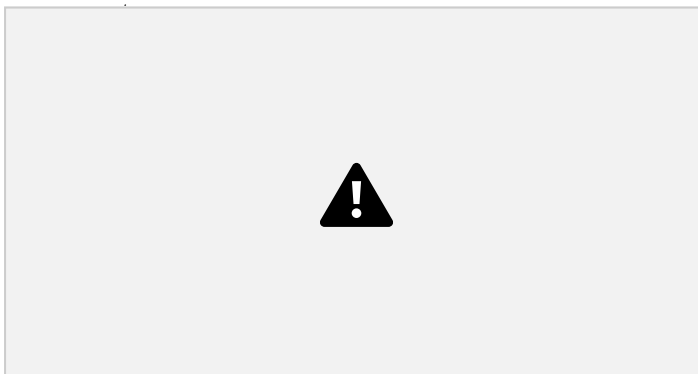


Fig. 7. Effect of 5-fluorouracil and Biokor preparation on immune parameters of animals with transplanted tumors.

Table 8
Effect of 5-fluorouracil and Biokor preparation on immunoregulation index (IRI).

	Intact animals	Animals with tumor	5-FU	5-FU+Biokor	Biokor
IRI	1,63±0,1	0,5 ±0,01	0,6 ±0,01	1,1 ±0,1	1,2 ±0,1

75

Introduction of cytostatics reduces the percentage content and functional activity of T-lymphocytes CD3+, CD4+, CD8+, as well as the natural protective factors (FAN, CD16+) (Fig. 7). Biokor preparation reduces toxic and immunosuppressive effect of the cytostatic and thus enhances antitumor effect and restores immune regulation index (Tab.8)

Biokor helps restore immune status of tumor-bearing animals treated with 5-fluorouracil. Biokor modulates the therapeutic effect of anticancer drugs and regulates immunity in tumor-bearing animals.

Modification of the growth of experimental tumors under the influence of radiation therapy and Biokor.

Radiation therapy was performed by total gamma-irradiation at a dose of 2 Gy 52 hours after tumor transplantation. Biokor was introduced per os at a dose of 150 mg/kg, starting from the second day after tumor transplantation. The animals were killed on 14th day of the experiment under chloroform anesthesia. The effect of antitumor activity was evaluated by weight (W) and volume (V) of the extracted tumor tissue.

The results showed that 2 Gy total radiation inhibits Sarcoma-180 tumor growth for 48% by weight and up to 52% by volume (Table 9). Effect of combination of Biokor with radiation treatment increases the efficiency of TGI for 85% by weight and for 97% by volume. On AKATOL tumor, total irradiation causes inhibition of tumor growth for 37% by weight and for 70% by volume.

Addition of Biokor to the therapy enhances antitumor effect of radiation: TGI reached 91% by weight and 88% by volume.

On AKATON tumor, total irradiation inhibits tumor growth for 64% by weight and up to 91% by volume. Application of Biokor also increases the antitumor effect of irradiation: TGI reached 70% by weight and 97% by volume. **Table 9**

Influence of Biokor and irradiation on the growth of transplanted tumors.

Tumor	Group/preparations	Average tumor weight, g	Average tumor volume, sm3	TGI by weight, %	TGI by volume, %
Sarcoma 180	control	0,74±0,16	0,93 ±0,28	-	-
	Υ	0,38±0,12*	0,45 ±0,25*	48	52
	Υ+BP	0,11±0,02* **	0,02 ±0,01 * **	85	97
AKATOL	control	1,87±0,32	3,72 ±0,80	-	-
	Υ	1,16±0,34*	1,12 ±0,35 *	38	70
	Υ+BP	0,17±0,09 * **	0,44 ±0,43 *	91	88
AKATON	control	1,75±0,53	2,75 ±1,10	-	-
	Υ	0,63±0,22*	0,25 ±0,16 *	64	91
	Υ+BP	0,52±0,19 *	0,09 ±0,06 * **	70	97

Note: * $p \leq 0.05$ compared to group 1 (untreated animals), ** $p \leq 0.05$ group (animals treated with radiation therapy).

76

The research testifies that the addition of Biokor to anti-tumor treatment can improve the efficacy of radiotherapy of experimental animal tumors. The positive effect of treatment, shown by enhancing tumor regression, depends on the histogenesis of the tumor.

The fourth chapter of the dissertation - "**Study of antitumor activity of Biokor invitro (breast cancer, endometrial cancer and colon cancer)**" - describes in detail the effect of Biokor preparation in vitro on induction of apoptosis and inhibition of proliferation of biopsies cancer cells at different stages of disease development.

Study of antitumor activity of Biokor on breast cancer cells resistant to conventional therapy.

Determination of hormone and tumor drug sensitivity for individual

selection of treatment schemes is very important for patients with advanced breast cancer [Petrov S.V., 2000, p. 35, Pozharissky K.M., Leenman E.E., 2000, p.5]. The absence of receptors to estrogen and progesterone on the surface of breast cancer cells does not allow to follow traditional treatment of the disease and requires changes in pharmacologic influence. This pathology occurs at approximately 15% of patients [Gerstein E.S., Kushlinsky N.E., 2002, p. 40].

Upon receipt of tumor material from patients with breast cancer, we conducted research of the presence of receptors for estrogen and progesterone. The study used mice monoclonal antibodies against estrogen receptors (clone 6F11) and mice monoclonal antibodies against progesterone receptors (clone 1A6) manufactured by “Novosastra” (England).

Tumor tissue samples were divided into groups with and without receptors for estrogen and progesterone, then both types of tumor cells were cultured in growth substance in vitro.

As can be seen from the data presented, Biokor in the absence of estrogen and progesterone receptors on the surface of tumor cells, can significantly inhibit the proliferation of breast cancer cells (Figure 8, 9).



Fig. 8. The degree of destruction of breast cancer cells layer with the presence of receptors to estrogen and progesterone after exposure to Biokor. For all values of the experimental groups $p < 0,05$.

It is worth to notice that the protein showed a pronounced dose-dependent effect.

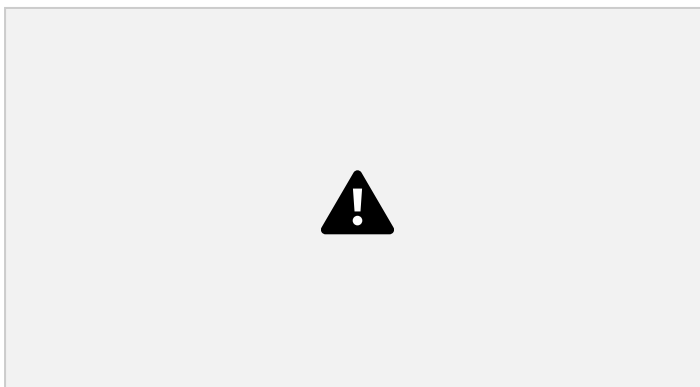


Fig. 9. The degree of destruction of breast cancer cells layer without receptors to estrogen and progesterone after exposure to Biokor. For all values of the experimental groups $p < 0,05$.

After influence by Biokor on breast cancer cells at a concentration of 50

mcg/10⁶cells and 100 mcg/10⁶cells significant number of tumor cells died (degradation degree equaled to 28.87%±5.38 and 36.2%±11.47 respectively), whereas at a concentration of 10 mcg/10⁶cells the effect was not shown and the cytotoxic action of the protein was similar to the control (6,0% ± 0,98).

Bcl-2 gene is a leading gene defining the mechanism of cell death by inhibiting apoptosis. This gene encodes a formation of protein accumulated in the mitochondria [Bezborodov O.A. et al., 2004, p.40, Kazatchkine N.I. et al., 2006, p.35]. Expression of Bcl-2 is associated with factors indicating a favorable prognosis, as it correlates with the presence of receptors for steroid hormones and a low degree of malignancy [GalloD. Et al., 2006, p.74].

The expression of Bcl-2 protein on breast cancer cells with the absence of receptors to estrogen and progesterone was studied before and after exposure to Biokor.

Exposure to Biokor at all concentrations resulted in reduction of Bcl-2 protein in breast cancer cells by an average of 27,25±1,14%, p <0,05 (Fig. 10).

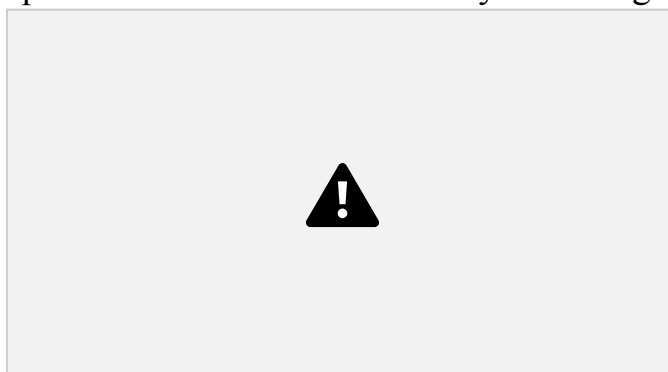


Fig. 10. Quantitative changes of bcl-2 protein in breast cancer cells with the absence of receptor to estrogen and progesterone at invitro exposure to Biokor. For all the values of the experimental groups p <0,05.

Influence of Biokor on breast cancer cells at later stages of the disease. The study was conducted on samples of the tumor tissue with malignant transformation of breast cells, the third stage of the disease.

Tumor cells from surgical specimen of patient G., 68 years, diagnosis - cancer of the left mammary gland, T₂N₁M₀ (T - tumor size, N - increase in regional lymph nodes, M - detection of distant metastases) were added to the wells of a

78

polystyrene plate. After formation of cellular layer of medium density, Biokor preparation was added at the dose of 100 mcg/million cells (group I) and 50 mcg/million cells (group II). The control group were breast cancer cells without exposure to Biokor (group III). Incubation time with the protein was 60 min. The results of Biokor cytotoxic activity against breast cancer cells are presented in Fig.11.

As can be seen from the data, Biokor at the dose of 100 mcg/million cells showed high antitumor activity, causing death of 64% of cancer cells, including inducing apoptosis in 12% of cells. Reduction of exposure dose of the protein

reduced its antitumor activity, at the dose of 50 mcg/million cells the protein

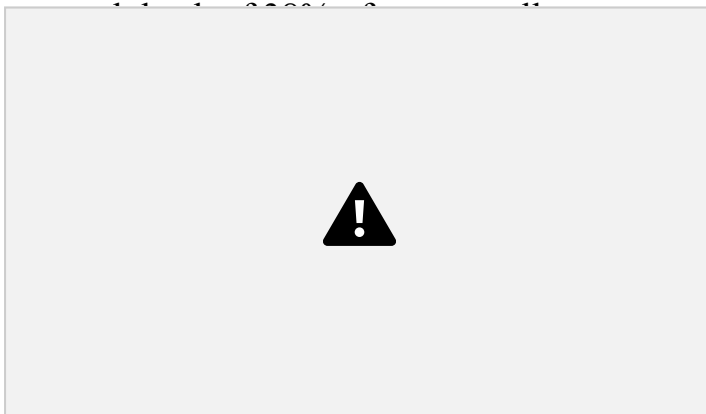


Fig. 11. Cytotoxic activity of Biokor against breast cancer cells (surgical material from patient G., 68 years old, diagnosis - cancer of the left breast, T₂N₁M₀). For all the values of the experimental groups p <0,05.

The study of antitumor activity of Biokor on uterus endometrium cancer cells.

Endometrial cancer (EC) takes the first place in the structure of onco gynecological pathology, morbidity growth rate of EC is significantly higher than those of other cancers of the reproductive system of women [Imyanitov E.N.et.al, 2005 p.1004].

Precancerous condition of endometrial tissue was observed in the sample from the patient operated with the diagnosis of hysteromyoma.

At a dose of 20 mg/1 million cells the protein caused death of 89,0±0,98% of tumor cells. Also the study showed appearance of apoptotic cells in the experimental groups after exposure to Biokor (Figure 12).

Results of Biokor cytotoxic activity against endometrial cells obtained from surgical specimens of patient diagnosed endometrial cancer stage II, T₂N₁M, are shown in Fig. 13.

As seen from the data obtained, the soy protein at all applied doses showed high cytotoxic activity against endometrial cancer cells, at a dose of 20 mcg/ 1 million cells the protein caused death of 42.0±1.56% of tumor cells, at a dose of 50 mcg - 50,0±1,58%. In this case the influence of protein on endometrium cancer cells also showed a significant increase in the number of apoptotic cells in the experimental groups.

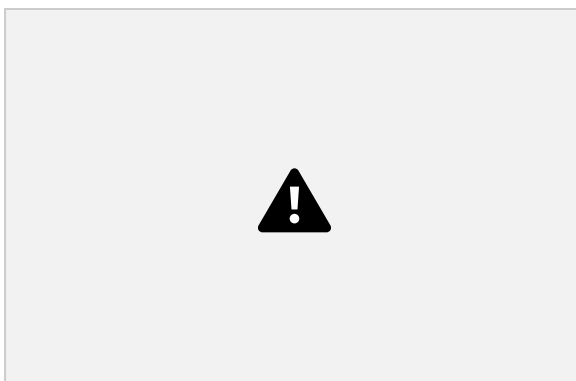


Fig. 12 Cytotoxic activity of Biokor against endometrium cells (Operating material from patient diagnosed hysteromyoma). For all the values of the experimental groups p <0,05

The largest number of such cells was observed at exposure at a dose of 20 mcg - $32,0 \pm 1,47\%$, whereas the control group showed the level of apoptotic cells of only $11,0 \pm 0,08\%$.

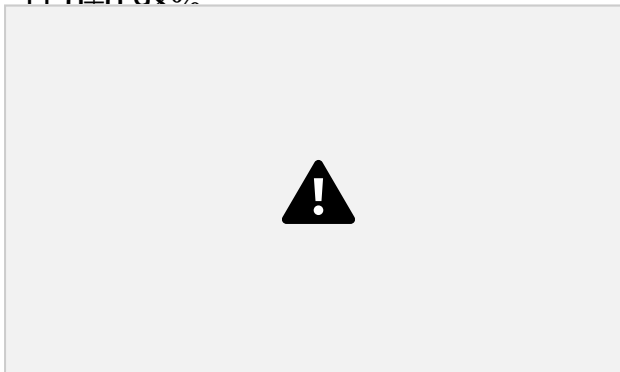


Fig. 13 Cytotoxic activity of Biokor against endometrial cells (surgical specimens of patient diagnosed endometrial cancer stage II, T₂N₁M₀) For all experimental groups the values of p < 0,05

The study of antitumor activity of Biokor on colon cancer cells.

One of the peculiarities of cancer morbidity dynamics of recent decades is increase in the incidence of colon and rectum cancer. Currently colon cancer accounts for nearly 15% of all malignancies in West European countries. It ranks second in the structure of cancer incidence at males (after lung cancer) and at females (after breast cancer) [Smith R.A.etal, 2009, p.27].

In tumor tissue obtained from a patient's surgical material M.R., 68 years old, diagnosis - cancer of the colon, T₄N₀M₀, expression of Bcl-2 and Ki-67 oncoproteins was determined.

Colon cancer cells expressed largely both Bcl-2 and Ki-67 proteins. Expression of Bcl-2 reached $97,0 \pm 0,76\%$ that indicates strong inhibition of apoptosis in cells of the histogenesis. Expression of Ki-67 protein reached $64,0 \pm 2,14\%$. Immunohistochemical analysis showed that rectum cancer cells were highly proliferating tissue with virtually absent apoptotic cells and resistant to conventional therapy.

After definition of the status of Bcl-2 and Ki-67 oncoproteins, the colon cancer cells were exposed to Biokor preparation at doses of 50 mcg/1.2 million cells (Group I) and 100 mcg/1.2 million cells (group II). The control group was rectal