

Квантово-химический анализ структуры имунофана и уровень экспрессии CD-маркеров

Кабденова А.Т., Сатыбалдиева Ж.А.
РГП «НЦЭЛС» МЗ РК

Исходя из анализа литературных данных о современных компьютерных технологиях, мы предположили о возможности использования методов компьютерной химии для изучения действия имунофана на уровень экспрессии CD-маркеров [1, 2].

1. Материалы и методы

1.1 Подготовка образца крови – забор производили в контейнер со стерильным 6% раствором ЭДТА в соотношении 20/1. Кровь перемешивали с полиглюкином (1:1), инкубировали при комнатной температуре в течение 1-1,5 ч, взвесь клеток без эритроцитов декантировали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Удаляли надосадочную жидкость, осадок разбивали и добавляли 1 мл среды RPMI-1640.

1.2 Фракционирование мононуклеаров на градиенте плотности – в центрифужную пробирку вносили 1 мл изопака (Sigma, США) с плотностью 1,076 г/мл, осторожно наслаивали 1 мл клеточной суспензии. Осаждали на центрифуге при 3000 об/мин в течение 20 мин (температура ротора 8°C). Интерфазное кольцо клеток собирали в контейнер, добавляли 20 мл среды RPMI-1640 и отмывали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант удаляли, встряхивали клеточный осадок постукиванием по дну контейнера и добавляли к нему 1 мл полной культуральной среды RPMI-1640, с 10% ФТС, 4 мМ L-глутамин, 100 мг/мл стрептомицин и 100 МЕ/мл пенициллина.

1.3 Оценка количества и жизнеспособности мононуклеарных клеток - использовали тест на исключение красителя трипанового синего.

1.4 Культивирование клеток – суспензию полученных клеток доводили до 10^6 кл./мл полной культуральной средой и вносили по 200 мкл в 96-луночный планшет. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности в течение 48 ч. В опытные ячейки вносили тестируемую пробу.

1.5 Приготовление рабочих разведений препаратов – имунофан разводили до концентрации 0,05 мкг/мл.

1.6 Оценка пролиферации клеток - в МТТ-тесте [1, 9].

1.7 Проточная цитофлуориметрия клеток - процентное содержание меченых клеток в образце определяли с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur.

1.8 Компьютерный химический анализ - осуществляли

с применением метода Хартри-Фока в полуэмпирическом приближении PM3 [1].

1.9 Статистический анализ - данные обрабатывали методами математической статистики, используя программу Microsoft Excel.

2. Результаты исследования

Результаты исследований свидетельствуют о практическом отсутствии экспрессии CD3-маркера (рисунок 1). Т.е. имунофан в наших исследованиях не способствовал экспрессии Т-клеток. Аналогичные данные получены и относительно CD4, CD8 и CD19. Т.е. препарат не активирует кластеры дифференциации Т-хелперов, субпопуляций моноцитов, кортикальных тимоцитов, EBV трансформированных В-клеток (т.е. корцептора МНС II класса, рецептор для ВИЧ), Т-цитотоксических, субпопуляций NK-клеток, предшественников В-клеток и самих В-клеток (рисунки 2, 3, 4).

Полученные данные показывают, что имунофан достоверно стимулирует экспрессию CD16-маркера, что свидетельствует о способности этого препарата стимулировать противоопухолевый и противовирусный иммунитет за счет экспрессии NK-клеток, гранулоцитов, макрофагов (FcγR III). В то же время имунофан в наших экспериментах практически не влиял на распознавание чужеродных антигенов и межклеточные взаимодействия В-лимфоцитов и макрофагов с Т-хелперами.

Квантово-химические характеристики имунофана представлены в таблице 1. Для анализа нами отобраны: теплота образования ($\Delta H_{f, \text{ккал/мол}}$), полная энергия (E_{tot}), потенциал ионизации (IP), полная электронная энергия (E_{el}), энергия отталкивания ядер (E_{nn}). Это основные квантово-химические характеристики, которые позволяют оценить стабильность соединения, его способность взаимодействовать с различными биологическими структурами.

Анализ полученных результатов, представленных в таблице 1, свидетельствует, что структура имунофана обладает высокой реакционной способностью (положительные значения дипольного момента и потенциала ионизации). При этом молекула достаточно стабильна (отрицательные значения теплоты образования, общей энергии и полной электронной энергии). Исследования в области молекулярной механики показывают, молекула имунофана достаточно

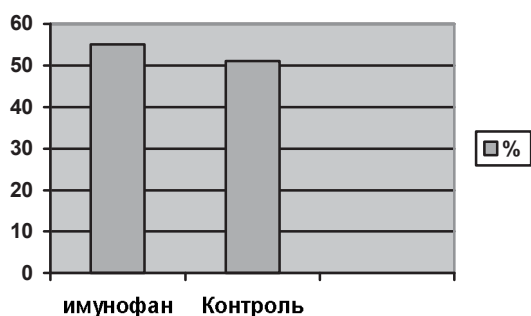


Рисунок 1 – Влияние имунофана на экспрессию CD3-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека

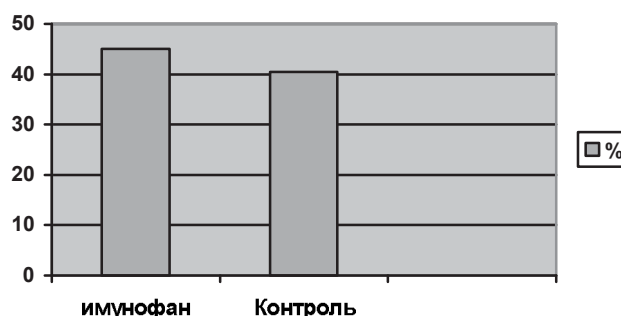


Рисунок 2 – Влияние имунофана на экспрессию CD4-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека

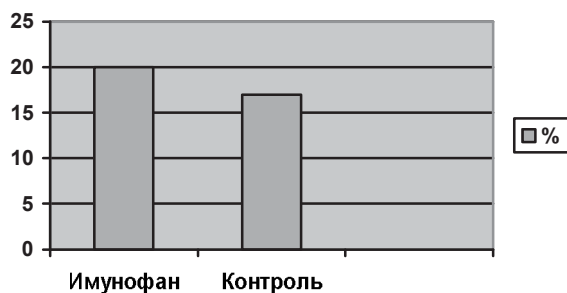


Рисунок 3 – Влияние имунофана на экспрессию CD8-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека

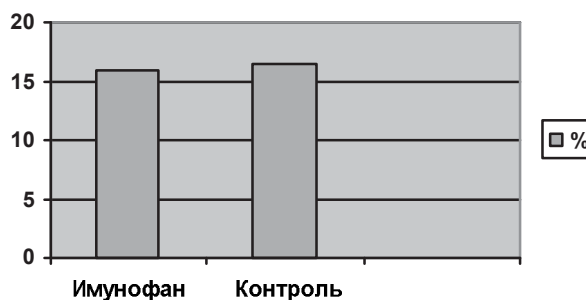


Рисунок 4 – Влияние имунофана на экспрессию CD19-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека

Таблица 1. Основные энергетические характеристики имунофана: теплота образования ΔH_f , полная энергия E_{tot} , потенциал ионизации IP, полная электронная энергия E_{el} , дипольный момент Dip

| Показатели | Имунофан |
|--------------------------|----------------|
| ΔH_f , ккал/моль | -387.23 |
| E_{tot} , эВ | -10255.495835 |
| E_{el} , эВ | -134769.767996 |
| Dip, Дебай | 12.962 |
| IP эВ | 9.169 |

большая, однако его структура включает, по меньшей мере, 7 активных центров, обладающих высокой доступностью для химических взаимодействий (рисунок 5).

С точки зрения молекулярной динамики они характеризуют молекулу имунофана как структуру с очень прочными межатомными связями, что предполагает движение молекулы имунофана в силовом поле, создаваемом биологическими макромолекулами организма в виде компактной частицы (несмотря на относительно большие размеры). Т.е. молекула имунофана с точки зрения молекулярной динамики обладает высокой биодоступностью, в том числе и в такие энергетически насыщенные области, как органы иммунной системы. Тем не менее, высокие значения потенциала ионизации и дипольного момента наглядно доказывают наличие у этой молекулы больших возможностей к межмолекулярным взаимодействиям в органах-мишенях. Таким образом, полученные данные вновь демонстрируют возможности компьютерной химии к получению новых важных результатов при изучении механизма действия лекарственных средств, влияющих на иммунную систему.

Выводы

Компьютерные химические исследования позволяют получить новые важные данные при изучении механизма действия иммунокомпетентных лекарственных средств.

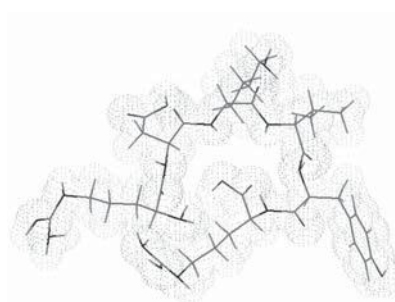


Рисунок 5. Пространственное строение имунофана

Литература

1. Nicolova N., Javorska J. Approaches to Measure Chemical Similarity// Review QSAR Comb. Sciences, 2003, 22, 1006 - 1026
2. Perun T.J., Propst C.L. Computer-Aided Drug Design: Methods and Applications (Hardcover) Marcel Dekker Ink New-York and Basel, 2010, 485 с
3. Имунофан — регуляторный пептид в терапии инфекционных и неинфекционных болезней / Под ред. В. И. Покровского. / М., 1998. С. 119.
4. А.В.Караулов, С.И.Сокурено - Имунофан: непосредственные и отдаленные результаты лечения больных хроническим бронхитом // Медикал Маркет. 2000. № 34. С. 21-24.
5. А.В.Караулов– Клинико-иммунологическая эффективность применения имунофана при оппортунистических инфекциях// Лечащий врач, 2000, № 4.
6. Хедвиг П.. Прикладная квантовая химия. Москва, «Мир», 1977 г
7. Пчелкина З. Различные приближения для расчета электронной структуры твердых тел: область применения и ограничения. Лаборатория рентгеновской спектроскопии. Институт физики металлов. УрО РАН, г Екатеринбург <http://impro.imr.uran.ru>.
8. Шайтан К.В., Терешкина К.Б.. Введение в метод молекулярной динамики. В: Молекулярная динамика белков и пептидов (Методическое пособие), МГУ. <http://www.moldyn.ru/library/manual>, 2008 г с1 – 2
9. Beaumont K, Fotini B. Immunological Fingerprinting Method for Differentiation of Serum Samples in Research-Oriented Biobanks // Clinical and Vaccine Immunology, Vol. 17, No. 5, May 2010, p. 735-740.