

Кабденова Акмарал Талаповна, Сатыбалдиева Жанат Абеновна

**КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ИМУНОРИКСА И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD-МАРКЕРОВ**

Адрес статьи: [www.gramota.net/materials/1/2010/10/23.html](http://www.gramota.net/materials/1/2010/10/23.html)

Статья опубликована в авторской редакции и отражает точку зрения автора(ов) по рассматриваемому вопросу.

Источник

**Альманах современной науки и образования**

Тамбов: Грамота, 2010. № 10 (41). С. 76-78. ISSN 1993-5552.

Адрес журнала: [www.gramota.net/editions/1.html](http://www.gramota.net/editions/1.html)

Содержание данного номера журнала: [www.gramota.net/materials/1/2010/10/](http://www.gramota.net/materials/1/2010/10/)

**© Издательство "Грамота"**

Информация о возможности публикации статей в журнале размещена на Интернет сайте издательства: [www.gramota.net](http://www.gramota.net)

Вопросы, связанные с публикациями научных материалов, редакция просит направлять на адрес: [almanac@gramota.net](mailto:almanac@gramota.net)

УДК 612.017.1

*Акмарал Талаповна Кабденова, Жанат Абеновна Сатыбалдиева  
Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения  
«Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения  
и медицинской техники» Республики Казахстан, г. Алматы*

## КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ИМУНОРИКСА И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD-МАРКЕРОВ<sup>©</sup>

Компьютерная химия – одна из наиболее быстро развивающихся отраслей химической и биологической науки. Однако, о применении компьютерной химии в иммунобиологии сравнительно мало известно. Наши исследования направлены на восполнение этого пробела.

Мы предположили о возможности использования методов компьютерной химии для изучения действия известного иммуностимулятора имунорикса на уровень экспрессии CD-маркеров [3; 4].

Имунорикс (пидотимод) стимулирует и регулирует клеточный и гуморальный иммунитет в условиях иммунодефицита, усиливает активность естественных киллеров и активирует фагоцитоз, увеличивает продукцию цитокинов [1; 2].

### 1. Материалы и методы

#### 1.1. Подготовка образца крови

Эксперименты проводили на периферической крови, полученной от одного здорового донора. Забор производили натошак из локтевой вены в одноразовый 50-миллилитровый пластиковый контейнер, содержащий стерильный 6% раствор ЭДТА (кровь/ЭДТА - 20/1). Кровь перемешивали с полиглюкином (1:1) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1-1,5 ч. Взвесь клеток без эритроцитов декантировали в чистый контейнер и центрифугировали при 1000 g - 10 мин. (комнатная температура), удаляли надосадочную жидкость, клеточный 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 g - 20 мин. ( $T^0$  ротора 8°C). Интерфазное кольцо клеток собирали в 50-мл контейнер, добавляли 20 мл среды RPMI-1640 и отмывали от примесей изопака центрифугированием при 1000 g - 10 мин. (комнатная температура). Супернатант удаляли, встряхивали клеточный осадок и добавляли к осадку 1 мл полной среды RPMI-1640 с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 4 мм L-глутамин, 100 мг/мл стрептомицин и 100 МЕ/мл пенициллина.

#### 1.3. Культивирование клеток

Суспензию полученных клеток доводили до концентрации  $10^6$  кл./мл полной культуральной средой и вносили по 200 мкл в 96-луночный планшет. Клетки культивировали в  $CO_2$ -инкубаторе (37°C, 5%  $CO_2$  и 95% влажности) в течение 48 ч. В опытные ячейки вносили тестируемый препарат в концентрации, равной его содержанию в 1 мл из расчета на 5 л крови после разового введения терапевтической дозы.

#### 1.4. Приготовление рабочих разведений препарата

28 мкл препарата имунорикс растворяли в 5 мл полной культуральной среды. 100 мкл полученного раствора добавляли к каждому 100 мкл клеточной суспензии, получая конечную концентрацию препарата 2,8 мкл/мл.

#### 1.5. Проточная цитофлуориметрия клеток

После окончания культивирования из каждой 10 ячеек, содержащих мононуклеарные клетки контроля (без препарата) или опыта, после мягкого ресуспендирования отбирали культуральную среду и центрифугировали при 1000 g - 10 мин. (комнатная температура). Супернатант удаляли, встряхивали клеточный осадок и добавляли к нему 1 мл фосфатно-солевого буферного раствора для определения клеток, несущих CD маркеры (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, dr). К 100 мкл исследуемого образца добавляли 20 мкл моноклональных антител, меченных фикоэритрином (PE) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Перемешивали и инкубировали в течение 15-30 мин. (комнатная температура) в затемненном месте, центрифугировали при 300 g - 5 мин., удаляли супернатант и повторно центрифугировали при 200 g - 5 мин с фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,1% азид натрия. Удаляли супернатант, добавляли фиксирующий раствор формальдегида. Содержание меченых клеток в образце определяли с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur.

#### 1.6. Компьютерный химический анализ

Использовали метод Хартри-Фока в полуэмпирическом приближении PM3 (Parametrization Method 3).

#### 1.7. Статистический анализ

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel.

## 2. Результаты исследования

Данные, представленные на Рисунках 1, 2, 3, 4 показывают, что имунорикс достоверно ( $p \leq 0,05$ ) стимулирует экспрессию CD3, CD8, CD19 и CD16-маркеров, следовательно, противоопухолевый и противовирусный иммунитет. Однако, он не активировал кластеры дифференциации т-хелперов, субпопуляций моноцитов, кортикальных тимоцитов, т.к. Не способствовал экспрессии CD4.

Одновременно, имунорикс подавлял распознавание чужеродных антигенов и межклеточные взаимодействия в-лимфоцитов и макрофагов с т-хелперами (Рисунок 5).

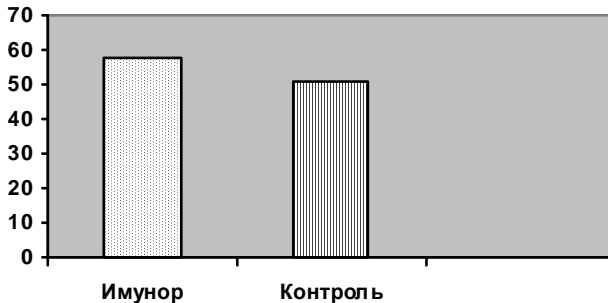


Рис. 1. Экспрессия CD3-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека под влиянием пидотимода

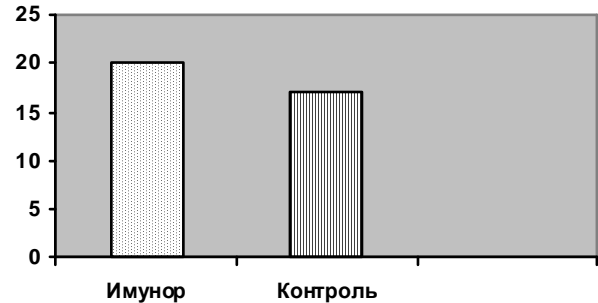


Рис. 2. Экспрессия CD8-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека под влиянием пидотимода

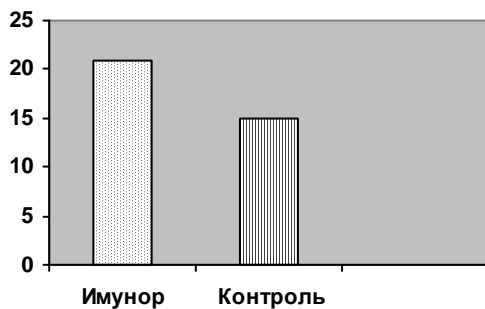


Рис. 3. Экспрессия CD19-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека под влиянием пидотимода

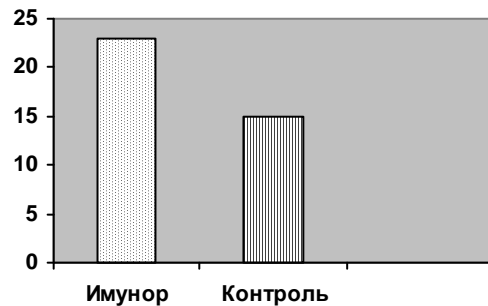


Рис. 4. Экспрессия CD16-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека под влиянием пидотимода

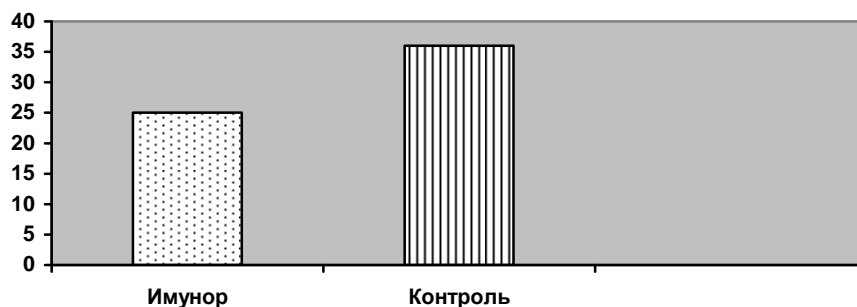


Рис. 5. Экспрессия DR-маркера мононуклеарными клетками периферической крови человека под влиянием пидотимода

Квантово-химические характеристики имунорикса представлены в Таблице 1.

Для анализа нами отобраны: теплота образования ( $\Delta H_f$ , ккал/мол), полная энергия ( $E_{tot}$ ), потенциал ионизации (IP), полная электронная энергия ( $E_{el}$ ).

Анализ данных Таблицы 1 свидетельствует о том, что молекула пидотимода может существовать в виде двух энергетических моделей: кислоты и аниона.

Следует отметить их высокую стабильность (отрицательные значения  $\Delta H_f$ ,  $E_{tot}$ ,  $E_{el}$ ). Для обеих моделей характерен положительный IP, что свидетельствует о высокой реакционной способности (особенно – у кислоты), что свидетельствует о наличии выраженной биологической активности.

Второй особенностью является положительное значение  $Dip$ , которое также объясняет наличие у данного соединения высокой биологической активности: молекула пидотимода конформационно весьма активна и, следовательно, способна вступить во взаимодействие с самыми разными биологическими структурами. Следует отметить, что молекула пидотимода обладает более высокой реакционной способностью и конформационной активностью в форме кислоты, то есть в условиях организма биологическую активность должна проявлять именно кислота.

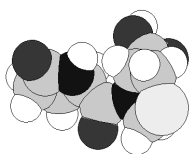
Рисунок 6 наглядно показывает наличие у данной молекулы множества доступных для взаимодействия активных центров.

Сопоставление полученных результатов с ранее представленными данными о влиянии пидотимода на экспрессию CD-маркеров показывает, что квантово-химические исследования дают теоретическое обоснование и объяснения проявляемой данным препаратом высокой активности в отношении иммунной системы.

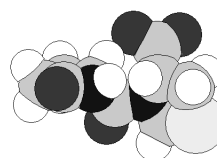
**Таблица 1.**

*Основные энергетические характеристики пидотимода*

	Пидотимод - кислота	Пидотимод - анион
$\Delta H_f$ ккал/моль	-155.25	-201.04
$E_{tot}$ эВ	-2937.571124	-2924.234703
$E_{el}$ эВ	-17941.855138	-17713.437671
$Dip$ , дебай	3.37	-
$IP$ эВ	9.334	5.470



Кислота



Анион

**Рис. 6.** *Пространственное строение пидотимода*

### Выводы

Компьютерные химические исследования дали новые важные данные для понимания природы стимулирующего действия иммунорикса на иммунную систему.

### Список литературы

1. **Имунорикс** [Электронный ресурс] // Видаль: справочник. URL: [www.vidal.kz](http://www.vidal.kz)
2. **Караулов А. В., Кокушков Д. В.** Пидотимод: механизм действия и эффективность при респираторных инфекциях // Педиатрическая фармакология. М., 2008. Т. 5. № 5. С. 31–37.
3. **Шайтан К. В., Терешкина К. Б.** Введение в метод молекулярной динамики [Электронный ресурс] // Молекулярная динамика белков и пептидов: методическое пособие. М.: МГУ, 2008. С. 1-2. URL: [www.moldyn.ru/library/manual](http://www.moldyn.ru/library/manual)
4. **Perun T. J., Propst C. L.** Computer-aided drug design: methods and applications. New-York - Basel, 2010. 485 p.