

Кабденова Акмарал Талаповна, Сатыбалдиева Жанат Абеновна

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

Адрес статьи: www.gramota.net/materials/1/2010/9/19.html

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

Источник

Альманах современной науки и образования

Тамбов: Грамота, 2010. № 9 (40). С. 64-67. ISSN 1993-5552.

Адрес журнала: www.gramota.net/editions/1.html

Содержание данного номера журнала: www.gramota.net/materials/1/2010/9/

© Издательство "Грамота"

Информация о возможности публикации статей в журнале размещена на Интернет сайте издательства: www.gramota.net

Вопросы, связанные с публикациями научных материалов, редакция просит направлять на адрес: almanac@gramota.net

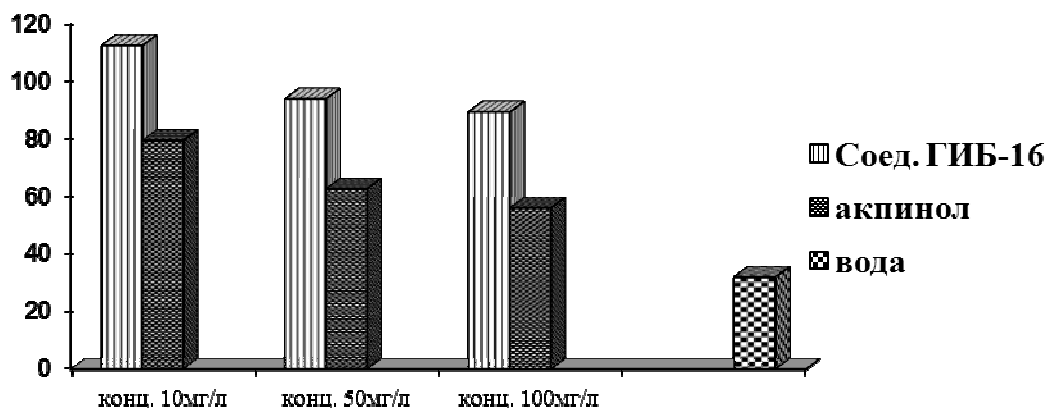


Рис. 1. Влияние регуляторов роста на длину корней фасоли

Анализ всех полученных данных показал, что исследуемое соединение (ГИБ-16) при исследуемых концентрациях способствовало лучшему корнеобразованию фасоли как по сравнению с водой, так и по сравнению с эталоном сравнения – «Акпинолом». При этом наибольший двукратный эффект на корнеобразование (длина корневой зоны, количество точек роста, количество бугорков, количество корней, длина всех корней.) по сравнению с акпинолом, испытываемое соединение показало при концентрации 10 мг/л. При концентрациях 50 и 100 мг/л соединение (ГИБ-16) показало соответственно наименьший эффект, чем при концентрации 10 мг/л.

Список литературы

1. Газалиев А. М., Исабаева М. Б., Ибатаев Ж. А., Ибраев М. К. Синтез и свойства новых потенциально биоактивных веществ на основе тиомочевины и биогенных аминов // Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов V-ой Всероссийской научной конференции. Сыктывкар-Уфа, 2008. С. 104.
2. Граник В. Г. Лекарства, фармакологический, биохимический и химический аспекты. М.: Вузовская книга, 2001. 408 с.
3. Добрынина В. И. Учебник по биологической химии. М.: Госуд. изд. мед. литер., 1963. 447 с.

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» МЗ Республики Казахстан, г. Алматы

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ АЗАТИОПРИНА И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD-МАРКЕРОВ[©]

Исходя из анализа литературных данных о современных компьютерных технологиях, мы предположили о возможности использования методов компьютерной химии для изучения действия Азатиоприна на уровень экспрессии CD-маркеров в зависимости от его концентрации в крови [3; 4].

Как известно, CD (кластеры дифференциации) представляют собой макромолекулы, появляющиеся на определенной стадии развития клеток. Их обнаружение и количественная оценка позволяют достоверно оценить состояние иммунной системы под тем или иным воздействием.

В данной статье представлено исследование влияния квантово-химических характеристик азатиоприна - известного лекарственного средства, обладающего цитотоксическим механизмом действия на проявление экспрессии CD. Азатиоприн представляет собой имидазольное производное 6-меркаптопурина, но в отличие от последнего, обладает более широким спектром действия. Установлено, что данный препарат по механизму действия относится к цитотоксическим разновидностям иммуносупрессоров. Предполагают, что препарат ингибирует активацию клеточной пролиферации и разрушает стимулированные лимфоидные клетки [5-9].

1. Материалы и методы

1.1. Компьютерный химический анализ - расчеты осуществлены с применением метода Хартри-Фока в полупирическом приближении РМЗ (Parametrization Method 3) [8; 9]. Была изучена молекулярная механика и реакционная способность Азатиоприна.

1.2. Иммунологические исследования:

1.2.1. 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.

1.2.2. Фракционирование моноклеаров 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.

1.2.3. Культивирование клеток - суспензию полученных клеток доводили до 106 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.

1.2.4. Приготовление рабочих разведений препаратов - азатиоприн растворяли в среде RPMI-1640. После центрифугирования супернатант стерилизовали, профильтровывали (диаметр пор - 0,22 мкм). Раствор азатиоприна в концентрации 640 мкг/мл добавляли в ячейки с клетками в объеме 20 мкл на каждые 180 мкл клеточной суспензии, получая конечную концентрацию препарата 64 мкг/мл.

1.2.5. Проточная цитофлуориметрия клеток - после окончания культивирования из каждой 10 ячеек, содержащих моноклеарные клетки контроля (без препарата) или опыта, после мягкого ресуспендирования отбирали культуральную среду и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем супернатант удаляли, встряхивали клеточный осадок и добавляли к осадку 1 мл фосфатно-солевого буферного раствора для определения содержания клеток, несущих маркеры иммунокомпетентных клеток (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, DR) согласно прилагаемым инструкциям. К 100 мкл исследуемого образца добавляли 20 мкл моноклональных антител, меченных фикоэритрином (PE) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Перемешивали и инкубировали в течение 15-30 мин при комнатной температуре в затемненном месте. После инкубации центрифугировали в течение 5 мин при 300 g. После этого удаляли супернатант и повторно центрифугировали в течение 5 мин при 200 g с фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,1% азид натрия. Удаляли супернатант и добавляли фиксирующий раствор, содержащий формальдегид. Процентное содержание меченых клеток в образце определяли с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur.

1.3. Статистический анализ - результаты обрабатывали методами математической статистики, используя прикладную программу Microsoft Excel.

2. Результаты исследования

Квантово-химические характеристики азатиоприна представлены в Табл. 1. Для анализа нами отобраны: теплота образования (ΔH_f , ккал/мол), полная энергия (E_{tot}), потенциал ионизации (IP). Это основные квантово-химические характеристики, которые позволяют оценить стабильность соединения, его способность преодолевать биологические барьеры и взаимодействовать с различными биологическими структурами. *Теплота образования (энтальпия образования, ΔH_f)* - тепловой эффект реакции образования химических соединений из простых веществ в стандартном состоянии. Эта характеристика позволяет оценить стабильность химического соединения. *Полная энергия (E_{tot})* - сумма кинетической и потенциальной энергий, т.е. общий энергетический потенциал молекулы. Она дополняет прогноз стабильности химического вещества и позволяет оценить возможности его гидролиза в организме и продолжительность его действия. *Потенциал ионизации (IP)* - это физическая величина, определяемая отношением наименьшей энергии, необходимой для однократной ионизации атома (или молекулы), находящегося в основном состоянии, к заряду электрона. IP - мера энергии ионизации, которая равна работе вырывания электрона из атома или молекулы и характеризует прочность связи электрона с ядром в атоме или молекуле, а также способность биологически активного вещества вступать во взаимодействие с теми или иными молекулами.

Структура азатиоприна обладает достаточно высокой реакционной способностью (положительные значения ΔH_f и IP). Положительное значение ΔH_f свидетельствует об относительной нестабильности данной молекулы, что подтверждается литературными данными. В то же время уровень IP показывает, что молекула азатиоприна относительно хорошо растворима в воде, следовательно, относительно быстро выводится из организма. Литературные данные свидетельствуют о том, что при приеме внутрь азатиоприн хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта (максимальная концентрация в крови появляется в пределах 2 часов после введения), однако период полувыведения составляет около 5 часов, что свидетельствует о достаточно быстром выведении этого препарата [5-7; 9].

Тем не менее, высокая реакционная способность, в целом, предполагает наличие относительной легкости взаимодействия данной молекулы с различными биологическими структурами.

Исследования в области молекулярной механики азатиоприна свидетельствуют: все циклы плоские, отклонения менее 1° . Угол C-S-C= 104.6° . 5-членный цикл повернут относительно 6-членного на 99° . Группа NO₂ повернута относительно 5-цикла на 91° , т.е. сопряжения с C=C 5-цикла отсутствует (порядок связи C15-N16 = 0.857). Молекула азатиоприна относительно небольшая, плоская, из-за чего доступны для взаимодействия все её фрагменты.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что азатиоприн в организме способен вступать во взаимодействие с самыми различными тканями и органами, что обуславливает его высокую токсичность. Особенности молекулярной механики данной молекулы и её реакционной способности свидетельствуют о возможности её воздействия на все основные этапы иммунного ответа, начиная от лимфоидной стволовой клетки до хелперов и супрессоров [10].

Табл. 1. Основные энергетические характеристики азатиоприна

Наименование препарата	ΔH_f , ккал/мол	E_{tot} , ккал/мол	IP, эВ
Азатиоприн	97.13	-3078.65866	9.473

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами иммунологических исследований.

Анализ Рис. 1 свидетельствует о том, что раствор 1 Азатиоприна и его разведение 1:2 практически не влияют на экспрессию CD4. При дальнейшем снижении концентрации имеется тенденция к экспрессии CD4.

В разведении 1:2 азатиоприн подавлял экспрессию CD8 и CD19, однако при дальнейшем снижении концентрации наблюдалась тенденция к восстановлению их уровня до контроля.

Препарат практически не влиял на экспрессию CD14.

Уровень CD16 достоверно ($p \leq 0,05$) повышался по мере уменьшения концентрации ликопада.

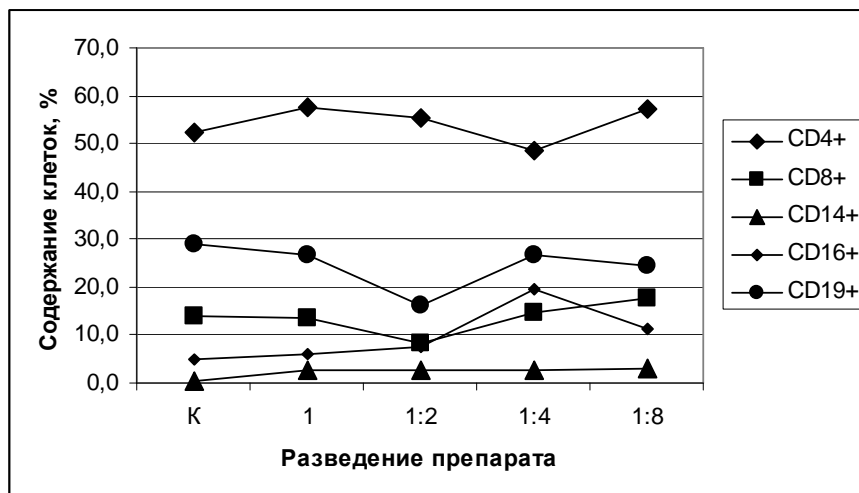


Рис. 1. Влияние последовательного разбавления азатиоприна на уровень экспрессии CD-маркеров мононуклеарных клеток периферической крови человека при 48-часовом культивировании

Таким образом, для азатиоприна характерен дозозависимый эффект: наиболее выраженное иммуносупрессивное действие обнаружено в концентрации 1:2. По мере уменьшения концентрации, в целом, иммуносупрессивный эффект нивелируется, что можно было бы объяснить снижением воздействия препарата на иммунокомпетентные органы в связи с уменьшением его содержания в питательной среде. Однако, для низких концентраций ликопада обнаружена тенденция к экспрессии CD4 и CD8.

Суммируя выше изложенное, можно предположить, что азатиоприн подавляет дифференциацию моноцитов, НК-клеток, гранулоцитов, макрофагов, предшественников В-клеток и В-клетки, но может вызвать экспрессию Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток. То есть в высоких концентрациях азатиоприн демонстрирует типичные иммуносупрессивные свойства. В низких же концентрациях, по-видимому, он может продемонстрировать иммуномодулирующие свойства, вплоть до оказания прямого цитотоксического действия на клетки трансплантатов.

Сопоставляя с выше изложенными результатами компьютерных химических исследований, можно отметить, что иммунологические исследования подтвердили обширность зоны «воздействия» азатиоприна на иммунную систему.

Таким образом, наши исследования показали возможность использования компьютерных химических расчетов для прогнозирования широты фармакологического действия иммунокомпетентных лекарственных средств и получения достоверных результатов.

Выводы

1. Методами квантово-химического анализа и молекулярной механики установлено, что молекула азатиоприна обладает высоким уровнем реакционной способности и афинности к различным биологическим структурам, что предполагает воздействие данного препарата от уровня стволовых клеток до Т-супрессоров.

2. Результаты, полученные в процессе компьютерных химических исследований, подтвердились при изучении экспрессии CD-маркеров.

Список литературы

1. Барбуто Х. А. М., Херш Э., Сальмон С. Иммунофармакология // Базисная и клиническая фармакология / ред. Б. Г. Катцунг. СПб: Невский Диалект, 1998. Т. 2. С. 463-486.
2. Дейл М. М., Формен Дж. К. Руководство по иммунофармакологии. М.: Медицина, 1998. С. 235-332.
3. Лоуренс Д. Р., Беннет П. Н., Браун М. Дж. Клиническая фармакология. М.: Медицина, 2002. С. 540-561.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Медицина, 2000.
5. Оксфордский справочник по клинической фармакологии / ред. Г. Грэхам-Смит. М.: Медицина, 2000.
6. Пчелкина З. Различные приближения для расчета электронной структуры твердых тел: область применения и ограничения [Электронный ресурс]. URL: <http://impo.imp.uran.ru>
7. Хедвиг П. Прикладная квантовая химия. М.: Мир, 1977.
8. Шайтан К. В., Терешкина К. Б. Введение в метод молекулярной динамики [Электронный ресурс] // Молекулярная динамика белков и пептидов: методическое пособие. URL: <http://www.moldyn.ru/library/manual>
9. Nicolova N., Javorska J. Approaches to measure chemical similarity// Review QSAR Comb. Sciences. 2003. № 22. P. 1006-1026.
10. Perun T. J., Propst C. L. Computer-aided drug design: methods and applications. New-York – Basel: Marcel Dekker Ink., 2010. 485 p.

УДК 612.017.1

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

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЛИКОПИДА И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD-МАРКЕРОВ[©]

В современной биологической науке компьютерные химические расчеты становятся неотъемлемой частью исследований в области прогнозирования биологических эффектов различных химических веществ. Однако в иммунобиологии компьютерная химия относительно мало использована. Как отмечалось ранее, наши исследования направлены на восполнение этого пробела. Исходя из анализа литературных данных о современных компьютерных технологиях, мы предположили о возможности использования методов компьютерной химии для изучения действия ликопида на уровень экспрессии CD-маркеров в зависимости от его концентрации в крови [3; 5].

Как известно, CD (кластеры дифференциации) представляют собой макромолекулы, появляющиеся на определенной стадии развития клеток. Их обнаружение и количественная оценка позволяют достоверно оценить состояние иммунной системы под тем или иным воздействием.

В данной статье представлено исследование влияния квантово-химических характеристик известного иммуностимулятора ликопида на проявление экспрессии CD.

Ликопид – синтетический аналог универсального фрагмента клеточных стенок бактерий – глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), оказывающего иммуномодулирующее действие. Препарат действует через клетки моноцитарно-макрофагальной системы, повышая в них:

- активность лизосомальных ферментов;
- образование активных форм кислорода;
- поглощение и уничтожение микробов;
- цитотоксические свойства по отношению к вирусинфицированным и опухолевым клеткам;
- экспрессию HLA-DR-антигенов, за счет чего улучшается распознавание антигенов;
- продукцию цитокинов: интерлейкина-1 (ИЛ-1), фактора некроза опухоли (ФНО), колониестимулирующего фактора (КСФ), гамма-интерферона.