



МЕТОДИКА РАДИОЛИГАНДНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ β_1 - И β_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. Я. Шевелев*, Н. М. Каширина**, Л. Н. Липатова**, Е. В. Янушевская**,
М. М. Пекло**, И. Н. Рыбалкин*, **, П. Н. Руткевич*, **, О. К. Чусовитина**,
Н. А. Скоблова***, Ю. С. Скоблов***, #, Т. Н. Власик*, **, К. А. Зыков**, ****

*ЗАО “Фрамон”, Россия, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России,
Россия, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

***ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

****ФГБОУ ВО “Московский государственный медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова” Минздрава России, Россия, 127473 Москва, ул. Делегатская, 20/1

Поступила в редакцию 11.12.2021 г.

После доработки 22.12.2021 г.

Принята к публикации 24.12.2021 г.

Разработана методика одновременного отдельного определения β_1 - и β_2 -адренорецепторов на основе радиолигандного анализа с использованием ^{125}I -йодоцианопиндолола, включающая проведение трех измерений: 1) без лигандов-конкурентов; 2) в присутствии селективного лиганда ICI 118,551 (0.25 мкМ); 3) в присутствии двух селективных лигандов – ICI 118,551 и CGP 20712 (по 0.25 мкМ каждого). Методика протестирована на модельной системе из двух трансгенных линий клеток ADL-7A и A2R9 с экспрессией рекомбинантных β_1 - и β_2 -адренорецепторов. При соотношении количества β_1 -адренорецепторов к β_2 -адренорецепторам 1 : 10 погрешность измерения составляет ~15%. Анализ девяти клеточных линий, представляющих различные типы клеток крови, показал наличие β_2 -адренорецепторов в клетках Daudi, Raji, Dami, K-562, HL-60, U-937 и ТНР-1 и их отсутствие в Т-лимфоцитарных клетках Jurkat и MOLT-4. β_1 -Адренорецепторы достоверно зарегистрированы лишь в клетках ТНР-1 моноцитарного происхождения. В остальных клетках, за исключением линии Dami, их количество оказалось ниже порога детекции, оцениваемого на уровне 200 молекул на клетку. Измерения, выполненные на мононуклеарных клетках периферической крови семи здоровых доноров, продемонстрировали присутствие β_2 -адренорецепторов в диапазоне 1000–2500 молекул на клетку, тогда как содержание β_1 -адренорецепторов во всех случаях находилось на грани или за гранью порога детекции.

Ключевые слова: β_1 - и β_2 -адренорецепторы, радиолигандный анализ, клетки человека

DOI: 10.31857/S0132342322050219

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе сердечно-сосудистых и бронхо-обструктивных заболеваний — двух самых распространенных неинфекционных патологий — важную роль играют адренергические механизмы. Людям, страдающим этими заболеваниями, часто необходимо назначение препаратов, воздействующих на β_1 - и β_2 -адренорецепторы. Основные мишени β -агонистов и β -блокаторов — ткани сердца и легких, труднодоступные для ла-

бораторных анализов. Однако в ряде исследований продемонстрирована высокая степень корреляции (~0.9) между содержанием β -адренорецепторов в лимфоцитах крови и их содержанием в ткани предсердий [1, 2]. Таким образом, открывается возможность оценивать процессы, происходящие в этих тканях под воздействием применяемых в ходе лечения препаратов, наблюдая за динамикой поведения β -адренорецепторов в клетках периферической крови.

На поверхности лейкоцитов крови в основном представлены β_2 -адренорецепторы [3, 4]. Систематических сравнительных измерений содержания β_2 -адренорецепторов в клетках крови у паци-

Сокращения: FBS — фетальная бычья сыворотка; РВМС — мононуклеарные клетки периферической крови.

Автор для связи: (тел.: +7 (905) 538-25-14; эл. почта: sur@ibch.ru).

ентов с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями ранее не проводилось, поэтому экспериментальные данные о динамике поведения β_2 -адренорецепторов при использовании препаратов, воздействующих на адренорецепторную систему, носят фрагментарный, случайный характер.

Анализ содержания β_1 -адренорецепторов весьма затруднен из-за крайне низкой их представленности в клетках крови. У большинства людей содержание β_1 -адренорецепторов в лейкоцитах в ~ 20 раз ниже содержания β_2 -адренорецепторов [5]. Есть косвенные свидетельства, указывающие на присутствие β_1 -адренорецепторов в моноцитах [6]. Не исключено также, что количество β_1 -адренорецепторов на Т-лимфоцитах может резко возрастать при некоторых сердечно-сосудистых патологиях или под влиянием каких-либо других факторов [5].

Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов обычно измеряют при помощи ^{125}I -меченного лиганда иодоцианопиндолола, способного одинаково эффективно связываться с обоими типами рецепторов. Присутствие преобладающих количеств β_2 -адренорецепторов на лейкоцитах крови — дополнительный фактор, препятствующий определению минорной фракции β_1 -адренорецепторов.

Настоящая статья — продолжение работ по модификации радиолигандного анализа для определения β -адренорецепторов в крови индивидуальных людей [5, 7].

Цель данного исследования — разработка методики радиолигандного анализа, позволяющей проводить одновременное раздельное определение содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов на поверхности клеток крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры реакции связывания. Корректная постановка экспериментов по радиолигандному анализу подразумевает такой выбор условий и параметров, при котором реакция связывания лиганда с рецептором доходит до состояния, близкого к равновесному [8]. На рис. 1 представлена кинетика прямой реакции связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола с трансгенными клетками ADL-7A и A2R9, экспрессирующими, соответственно, рекомбинантные β_1 - или β_2 -адренорецепторы, при температуре 37°C и концентрации лиганда 114 пМ ($400\,000\text{ имп. мин}^{-1}\text{ мл}^{-1}$). Как можно видеть, 30-минутной инкубации вполне достаточно для того, чтобы обе кривые связывания вышли на плато.

Кинетика обратной реакции, определенная при температурах 25 и 37°C (рис. 2), демонстрирует тот факт, что за время, необходимое для проведения отмывок (~ 30 мин), потеря связанной радиоактивности за счет диссоциации лиганда хотя и имеет место, но ее доля невелика — не более 15% за время манипуляций.

Константы связывания и число рецепторов на клетку. Константы связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола с β_1 - и β_2 -адренорецепторами (K_d) и число рецепторов, приходящееся на одну клетку ADL-7A или A2R9 (величину B_{max}), определяли по графикам Скотчарда (рис. 3). Результаты представлены в табл. 1.

Ингибирование селективными лигандами. Агаповой с соавт. [7] ранее была продемонстрирована возможность определения β_2 -адренорецепторов в Т-лимфоцитах по разнице сигналов связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола в присутствии и в отсутствие высокоселективного лиганда-конкурента ICI 118,551. Однако попытки непосред-

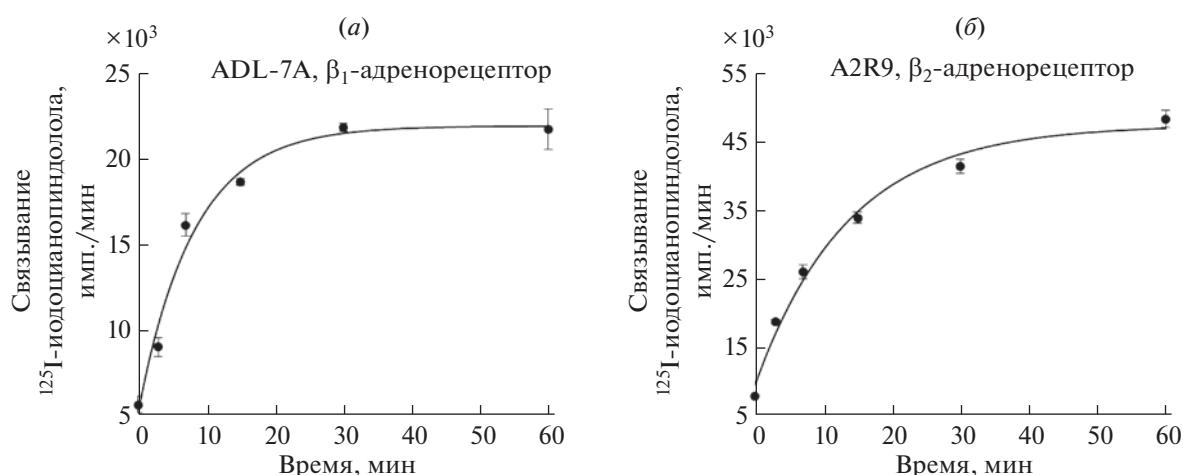


Рис. 1. Кинетика прямой реакции связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола с клетками ADL-7A (а) и A2R9 (б) при 37°C и концентрации лиганда 114 пМ .

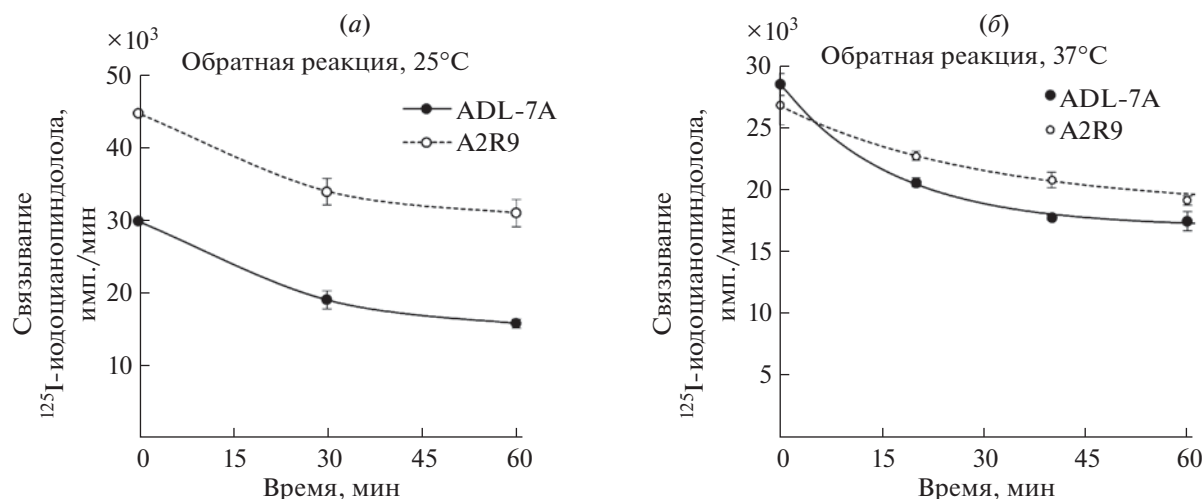


Рис. 2. Кинетика обратной реакции диссоциации ^{125}I -иодоцианопиндола при 25°C (а) и 37°C (б).

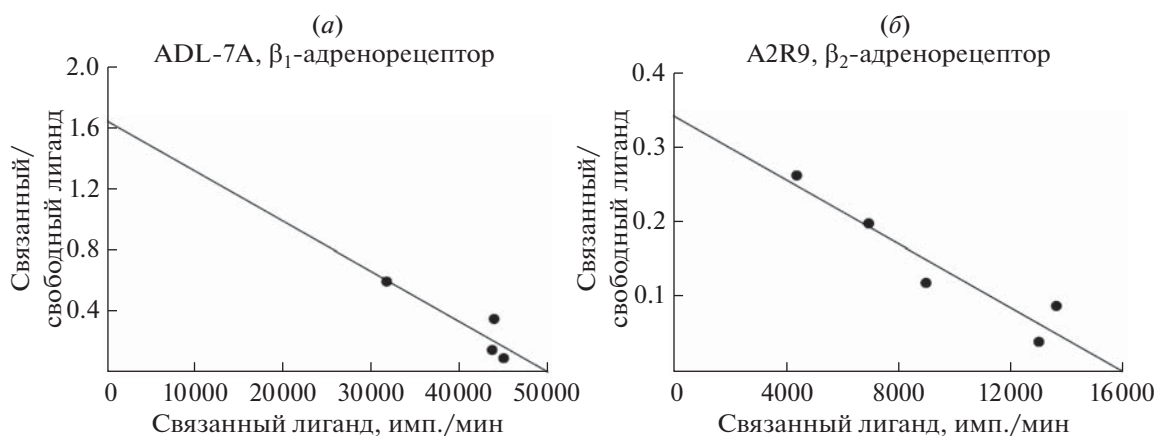


Рис. 3. Графики Скетчарда для связывания ^{125}I -иодоцианопиндола с клетками ADL-7A (а) и A2R9 (б).

ственно применить аналогичный подход для определения β_1 -адренорецепторов, используя лиганд-конкурент CGP 20712 вместо ICI 118,551, потерпели неудачу. Причина заключается в том, что селективность CGP 20712 не абсолютна: при концентрациях лиганда, в достаточной степени ингибирующих связывание ^{125}I -иодоцианопиндола с β_1 -адренорецепторами, имеет место хотя и небольшое, но заметное ингибирование связывания ^{125}I -иодоцианопиндола и с β_2 -адренорецепторами. А поскольку содержание β_2 -адренорецепторов в клетках крови в норме на порядок превосходит содержание β_1 -адренорецепторов, возникающая интерференция препятствует вычленению и идентификации той части разницы в сигналах, которая обусловлена присутствием именно β_1 -адренорецепторов.

С целью свести к минимуму помехи, обусловленные присутствием преобладающих количеств

β_2 -адренорецепторов, мы предложили схему анализа, включающую три измерения связывания ^{125}I -иодоцианопиндола с клетками: 1) в отсутствие лигандов-конкурентов; 2) в присутствии лиганда ICI 118,551 в такой концентрации, кото-

Таблица 1. Константы диссоциации и содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в модельных трансгенных клетках

Модельные клетки	Тип адренорецептора	K_d , пМ	Количество молекул рецепторов на клетку (B_{\max})
ADL-7A	β_1	40	4.3×10^6
A2R9	β_2	16	3.7×10^6

рая подавляла бы связывание с β_2 -адренорецепторами почти до нуля; 3) в присутствии обоих лигандов ICI 118,551 и CGP 20712. В условиях, когда связывание с β_2 -адренорецепторами практически заблокировано, даже небольшая разница между вторым и третьим измерениями должна отражать содержание β_1 -адренорецепторов в системе. Разумеется, при расчетах необходимо учесть, что высокие концентрации ICI 118,551 до определенной степени ингибируют связывание ^{125}I -иодоцианопиндолола с β_1 -адренорецепторами.

В рамках простой линейной модели связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола с клетками, несущими оба типа адренорецепторов, можно представить в виде суммы трех независимых компонентов: V_0 – фонового связывания, не подверженного влиянию селективных лигандов; V_1 – специфического связывания с β_1 -адренорецепторами; V_2 – специфического связывания с β_2 -адренорецепторами. Фоновое связывание включает в себя как полностью неспецифическое налипание меченого цианопиндолола на поверхность клетки, не вытесняемое высокими концентрациями немеченого лиганда, так и специфическое связывание с другими клеточными рецепторами, в частности с серотониновыми рецепторами [9]. В присутствии ICI 118,551 (второе измерение) связывание с β_1 -адренорецепторами будет ослаблено до уровня k_1V_1 , а с β_2 -адренорецепторами – до уровня k_2V_2 , где коэффициенты k_1 и k_2 характеризуют уровни остаточного связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола, соответственно, с β_1 - и β_2 -адренорецепторами. В присутствии обоих селективных лигандов специфическое связывание меченого иодоцианопиндолола будет описываться аналогичными величинами k_3V_1 и k_4V_2 . В соответствии с формулой Ченга–Пруссоффа [10] коэффициенты k_1 – k_4 зависят как от концентраций лигандов-конкурентов,

так и от концентрации способного к связыванию ^{125}I -иодоцианопиндолола в пробе, поэтому при проведении измерений эти концентрации должны быть фиксированы.

Для результатов трех вышеуказанных измерений можно записать систему трех линейных уравнений и, зная коэффициенты k_1 – k_4 , разрешить ее относительно неизвестных V_0 , V_1 и V_2 . При условии малости доли связавшегося ^{125}I -иодоцианопиндолола по отношению к его полному количеству в системе количества адренорецепторов каждого типа далее рассчитываются по приближенным формулам:

$$R_1 = V_1(1 + K_1/L); \quad R_2 = V_2(1 + K_2/L),$$

где R_1 и R_2 – искомые количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов, K_1 и K_2 – соответствующие константы связывания, L – концентрация фракции “bindable” ^{125}I -иодоцианопиндолола в пробе: 400000 (имп. мин $^{-1}$ мл $^{-1}$) или 114 пМ в стандартных условиях анализа.

Рабочие концентрации селективных лигандов ICI 118,551 и CGP 20712 – по 0.25 мкМ каждого – были выбраны на основании анализа кривых ингибирования (рис. 4). Соответствующие коэффициенты k_1 – k_4 приведены в табл. 2.

Модельное смешивание клеток. Тестирование описанной выше схемы анализа проводили с использованием клеток ADL-7A и A2R9, которые смешивали друг с другом в различных пропорциях. При этом соотношение модельных клеток выбирали так, чтобы имитировать ситуацию, характерную для клеток крови: содержание β_1 -адренорецепторов существенно ниже содержания β_2 -адренорецепторов. Приготовленные смеси подвергали анализу по предложенной методике и на основании полученных данных вычисляли, сколько клеток ADL-7A и A2R9 было в каждой смеси. Работоспособность методики оценивали

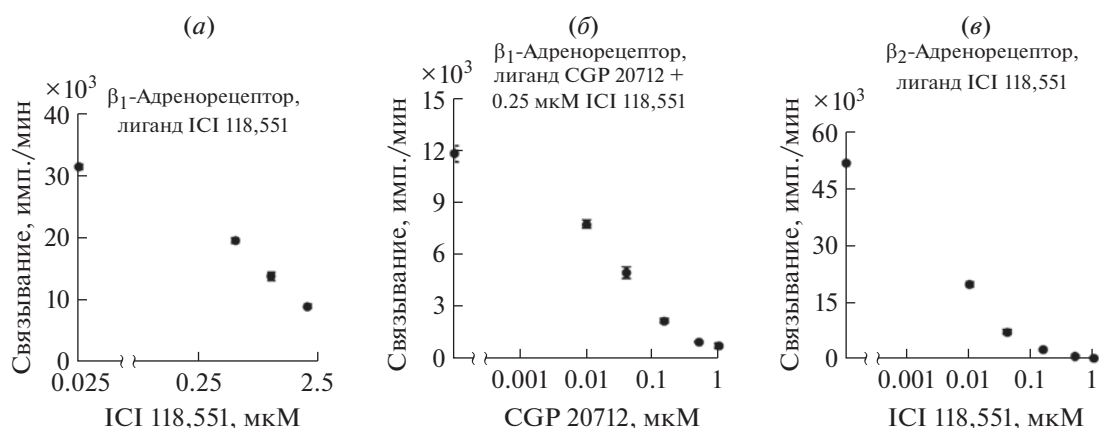


Рис. 4. Кривые ингибирования лигандами-конкурентами связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола с β_1 - (а, б) и β_2 -адренорецепторами (в).

Таблица 2. Коэффициенты остаточного связывания ^{125}I -иодоцианопиндола в присутствии селективных лигандов-ингибиторов

Лиганды-ингибиторы	β_1 -Адренорецептор клетки ADL-7A	β_2 -Адренорецептор клетки A2R9
0.25 мкМ ICI 118,551	$k_1 = 0.76$	$k_2 = 0.032$
0.25 мкМ ICI 118,551 + 0.25 мкМ CGP 20712	$k_3 = 0.11$	$k_4 = 0.032$

по тому, насколько близки оказывались полученные значения к истинным количествам клеток обоих типов, использованным при составлении смесей.

Результаты трех типичных экспериментов представлены на рис. 5. Эти и другие подобные эксперименты показали, что если соотношение β_1 - и β_2 -адренорецепторов составляет $\sim 1 : 10$, погрешность анализа находится в пределах 15%. Если же доля β_1 -адренорецепторов снижается до $1 : 40$, то ошибка в их определении может достигать 40%, что превращает результат анализа в качественную оценку.

Связывание лиганда на суспензионных клеточных культурах и мононуклеарных клетках крови

здоровых доноров. Разработанная методика была применена для оценки содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов в клетках ряда линий, ведущих свое начало от различных типов клеток крови человека. Результаты анализа представлены в табл. 3. Как можно видеть, β_2 -адренорецепторы практически не представлены в клетках, происходящих от Т- и В-лимфоцитов (Jurkat, MOLT-4, Daudi и Raji), и относительно высоко представлены в клетках моноцитарного происхождения ТНР-1 и U-937. Что касается β_1 -адренорецепторов, то их присутствие достоверно выявлено в клетках ТНР-1 и под сомнением – в клетках Dami. Для большинства остальных исследованных клеточных линий содержание β_1 -адренорецепторов ока-

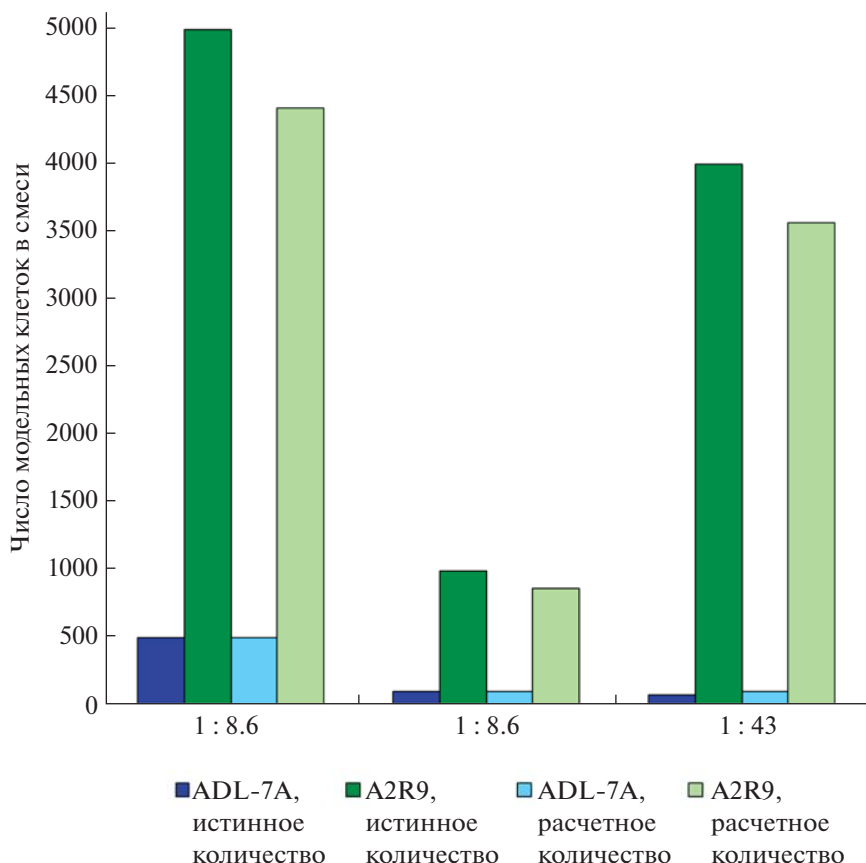
**Рис. 5.** Модельное смешивание разных количеств клеток, экспрессирующих β_1 -адренорецептор (ADL-7A) и β_2 -адренорецептор (A2R9), в разных пропорциях. Три группы столбцов – это результаты трех независимых экспериментов.

Таблица 3. Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в клеточных линиях

Клетки	Происхождение	Количество молекул рецепторов на клетку	
		β_1 -адренорецепторы	β_2 -адренорецепторы
Jurkat	T-лимфоциты	<50	<30
MOLT-4	T-лимфоциты	<150	<120
Daudi	B-лимфоциты	<30	130 ± 20
Raji	B-лимфоциты	<100	230 ± 60
Dami	Мегакариоциты	480 ± 230	250 ± 120
K-562	Гранулоциты	<300	480 ± 200
NL-60	Промиелоциты	<500	4000 ± 300
U-937	Макрофаги	<800	6900 ± 900
THP-1	Моноциты	23000 ± 3000	6200 ± 1800

залось ниже порога детекции, который в среднем можно оценить на уровне 250 молекул на клетку.

Полученные нами данные на культурах суспензионных клеток имеет смысл сопоставить с результатами аналогичных исследований других групп авторов. Sager et al. [11] измерили содержание β_2 -адренорецепторов в клетках NL-60. Их данные (~2000 молекул на клетку) по порядку величины сравнимы с полученным в настоящей работе значением 4000. В работе Mäki et al. [12] проведен радиолигандный анализ содержания β -адренорецепторов (без дифференциации по типам) в мембранных фракциях клеток ряда линий, в том числе NL-60, U-937, K-562 и Raji. Как и следовало ожидать, β -адренорецепторы обнаружены в клетках NL-60 и U-937, причем в сравнимых количествах. Однако в клетках K-562 и Raji присутствие β -адренорецепторов авторами не зарегистрировано, что расходится с результатами нашего исследования. По-видимому, порог детекции в работе Mäki et al. проходил выше и не позволил выявить в 5–10 раз меньшие количества β_2 -адренорецепторов, которые, по нашим данным, содержатся в этих клетках. Наибольшее число β_1 - и β_2 -адренорецепторов выявлено нами в клетках моноцитарной линии THP-1. В работах Grisanti et al. [6] и Talmadge et al. [13] методами иммуноблоттинга и радиолигандного анализа также показано, что клетки THP-1 производят значительные количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов. Таким образом, тестирование разработанной нами методики на клеточных линиях дало результаты, близкие к результатам работ других авторов.

Выполненный аналогичным образом анализ содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) семи здоровых доноров показал (табл. 4), что количество β_2 -адренорецепторов в этих клетках варьирует в диапазоне 1000–2500 молекул на клетку. Присутствие β_1 -адренорецепторов в клетках РВМС ни

у одного из доноров достоверно зарегистрировать не удалось.

Обсуждение полученных результатов. В настоящее время известны три типа β -адренорецепторов: β_1 , β_2 и β_3 . В лейкоцитах человека β_3 -адренорецептор не обнаружен, β_2 -адренорецептор встречается практически во всех типах белых клеток крови. Изучению представленности β -адренорецепторов в клетках крови больных и здоровых людей посвящены многочисленные исследования [4, 5, 8, 14–17]. Сопоставлять результаты этих исследований довольно сложно, т.к. анализы проводились по разным методикам и часто не верифицировались количественно другими методами. Несмотря на отсутствие строгой метрологической верификации, в некоторых случаях удавалось выявить очень интересные и клинически значимые изменения представленности β_2 -адренорецепторов, связанные с респираторными патологиями [17]. В данной работе количество рецепторов определяли по количеству связавшейся с клетками радиоактивности в имп./мин на 1 млн

Таблица 4. Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров

Донор	Количество молекул рецепторов на клетку	
	β_1 -адренорецепторы	β_2 -адренорецепторы
1	<200	2370 ± 120
2	(60 ± 60)	1320 ± 60
3	<70	1260 ± 60
4	(140 ± 160)	1890 ± 150
5	<250	1890 ± 170
6	(240 ± 440)	1130 ± 240
7	(220 ± 460)	2030 ± 270

Примечание: в скобках указаны данные для случаев, когда погрешность измерения превышает полученное значение.

клеток. Очевидно, прямой пересчет количества радиоактивного лиганда, связанного с клетками, в количество рецепторов, экспонированных на поверхности этих клеток, без учета K_d приводит к некоторому занижению результатов измерений. Поэтому данные работы Агаповой с соавт. [17] следует рассматривать скорее как оценочные.

Тем не менее, анализируя результаты различных исследований, можно заключить, что содержание β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови варьирует в диапазоне 400–2500 молекул на клетку, что вполне согласуется и с нашими данными.

В большинстве органов и тканей человека β_1 - и β_2 -адренорецепторы присутствуют совместно, поэтому актуальна задача их раздельного определения. В работе Бундкирхена с соавт. [18] представлено одно из возможных решений этой задачи при помощи математического анализа кривых связывания ^{125}I -иодоцианопиндолола в зависимости от концентраций лигандов-ингибиторов ICI 118,551 и CGP 20712. Построение таких кривых требует большого объема экспериментального материала, поскольку подразумевает проведение не менее 40 измерений. Предложенная нами более простая схема анализа из трех измерений имеет то преимущество, что для ее выполнения достаточно ~6 млн клеток, которые можно получить из 10–20 мл крови.

Как правило, одновременно с содержанием рецепторов проводят оценку соответствующих K_d иодоцианопиндолола. В ряде работ K_d измеряли на модельных клетках, экспрессирующих тот или иной тип адренорецепторов [19, 20]. K_d для обоих типов рецепторов, по-видимому, близки между собой и заключены в пределах между 17 и 53 пМ. Похожие значения, 40 пМ для β_1 -адренорецептора и 16 пМ для β_2 -адренорецептора, получены и в нашей работе.

Вопрос о том, сколько β_1 -адренорецепторов в норме содержится в различных типах клеток крови, на сегодняшний день остается открытым. Сообщение Смоляковой с соавт. [5] о высоком уровне β_1 -адренорецепторов в клетках крови некоторых пациентов с кардиологическими патологиями, возможно, связано с какими-то особыми обстоятельствами и нуждается в дополнительном экспериментальном подтверждении. Нам удалось лишь показать, что количество β_1 -адренорецепторов в суммарной фракции мононуклеарных клеток у семи здоровых людей не превышает 250 молекул на клетку и не может быть достоверно измерено при помощи предложенной методики.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии клеток и условия культивирования. Линия клеток ADL-7A была получена нами ранее [21] путем трансфекции клеток эмбриональной почки человека HEK293 (из коллекции Института экспериментальной кардиологии НМИЦ) плазмидой pMC4IPW-ADRBort, кодирующей оптимизированный ген β_1 -адренорецептора человека под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса. Линию клеток A2R9 получали трансфекцией исходных клеток HEK293 плазмидой pC4IPW-hADRB2-EGFP, кодирующей ген β_2 -адренорецептора, соединенного на C-конце с зеленым флуоресцентным белком, который служил маркером для идентификации трансфицированных клонов. Клетки указанных линий культивировали в среде DMEM, содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку (FBS), 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина (все реактивы Invitrogen, США), в атмосфере 5% CO_2 при 37°C.

Для проведения реакции связывания с ^{125}I -иодоцианопиндололом клетки снимали с поверхности флаконов обработкой трипсином, реакцию протеолиза останавливали добавлением культуральной среды с 10% FBS, клетки осаждали центрифугированием 15 мин при 1100 об/мин (200 g), дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) при комнатной температуре и суспендировали в PBS до конечной концентрации 10^1 – 10^6 кл./мл (HEK293) или 10^6 кл./мл (ADL-7A, A2R9).

Суспензионные клетки человека линий Raji, Daudi, Jurkat, K-562, U-937, MOLT-4, Dami, HL-60 и THP-1 из коллекции Института экспериментальной кардиологии НМИЦ культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина. Для проведения радиолигандного анализа клетки осаждали центрифугированием и дважды промывали PBS, как описано выше.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC). Забор крови у добровольцев проводили в лаборатории Института экспериментальной кардиологии НМИЦ. Венозную кровь семи здоровых добровольцев собирали в вакуумные пробирки BD Vacutainer CPT (Becton, Dickinson and Company, США) и обрабатывали согласно инструкции производителя. Мононуклеарные клетки переносили в другие пробирки и дважды промывали PBS.

Лиганды. В работе использовали следующие лиганды: цианопиндолол хемифумарат (Bio-Techne Corporation, США), ICI 118,551 (Sigma-Aldrich, США) и CGP 20712 (Bio-Techne Corporation, США).

¹²⁵I-иодоцианопиндолол. Радиоактивный изотоп иода в составе молекулы Na¹²⁵I (2000 Ки/ммоль) получали от АО “Радиевый институт им. В.Г. Хлопина” (Санкт-Петербург, Россия). Внедрение атома ¹²⁵I в молекулу цианопиндолола при помощи хлорамина Т проводили методом Greenwood et al. [22] с некоторыми модификациями. В реакцию мечения брали 1 мкг цианопиндолола хемифумарата и 1 мКи Na¹²⁵I в 50 мкл 0.2 М калий-фосфатного буфера, pH 7.0. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл раствора хлорамина Т (5 мг/мл), инкубировали при комнатной температуре в течение 30 с, останавливали реакцию добавлением 10 мкл тиосульфата натрия (20 мг/мл). Смесь выдерживали 5 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 1 мкл раствора “холодного” иодида натрия (6 мг/мл).

Целевой продукт очищали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Диасорб 130 (5 мкм, 4 × 150 мм; Елсико, Россия) в ион-парном режиме с элюцией в градиенте концентрации ацетонитрила 0–90% в 10%-ной уксусной кислоте. Фракции, содержащие ¹²⁵I-иодоцианопиндолол, объединяли, упаривали досуха, растворяли в 70%-ном этиловом спирте и хранили при –20°C. Долю радиоактивности во фракции, способной к связыванию с адренорецепторами (фракция “bindable”), оценивали в предварительных экспериментах с избыточным количеством клеток ADL-7A или A2R9.

Реакция связывания с ¹²⁵I-иодоцианопиндололом. Модельные клетки смешивали с таким расчетом, чтобы в 100 мкл суспензии находилось 2 × 10⁵ клеток НЕК293, выполняющих роль носителя, и дозированное число клеток ADL-7A и/или A2R9, как правило, 100–5000 клеток. В случае суспензионных клеточных линий использовали от 2 × 10⁵ до 2 × 10⁶ клеток в 100 мкл, клетки РВМС брали в количестве от 5 × 10⁵ до 10⁶ в 100 мкл суспензии. Для снижения неспецифического связывания в суспензию добавляли казеиновый концентрат СВС2 (Stereospecific Detection Technologies, Германия) в разведении 1 : 10.

В пробирки типа эппендорф последовательно вносили 100 мкл клеточной смеси, 20 мкл PBS, или 20 мкл 2.5 мкМ раствора селективного лиганда ICI 118,551, или 20 мкл смеси 2.5 мкМ ICI 118,551 и 2.5 мкМ CGP 20712, затем добавляли 80 мкл раствора ¹²⁵I-иодоцианопиндолола в PBS с 10% СВС2. В стандартных экспериментах количество радиоактивности во фракции “bindable” составляло 80000 имп./мин на пробу. Пробирки с реакционной смесью инкубировали в течение 30 мин при 37°C с перемешиванием на шейкере.

По окончании инкубации пробирки с пробами центрифугировали 10 мин при 2000 g. Супернатант удаляли, осадок суспендировали в 200 мкл

PBS, центрифугировали 10 мин при 2000 g, после чего осадок вторично суспендировали в 200 мкл PBS, центрифугировали 5 мин при 10000 g и удаляли супернатант. Количество связавшейся с клетками радиоактивности определяли при помощи гамма-счетчика 2470 Wizard² (Perkin-Elmer, США) с эффективностью счета 79%. Все измерения проводили в трех или четырех параллелях. Отклонение от средней величины не превышало 20%.

В кинетических экспериментах по истечении времени инкубации для полной остановки реакции связывания в пробы добавляли немеченый цианопиндолол до 10 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании разработана и верифицирована методика одновременного раздельного определения β_1 - и β_2 -адренорецепторов на основе радиолигандного анализа с использованием ¹²⁵I-иодоцианопиндолола, определен порог детекции β_1 -адренорецепторов, обсуждаются методологические вопросы сопоставления результатов анализа. Верификация методики проведена с помощью модельного смешивания трансгенных линий клеток ADL-7A и A2R9 друг с другом в различных пропорциях и последующего раздельного определения количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов в получаемых смесях. При соотношении количества β_1 -адренорецепторов к β_2 -адренорецепторам 1 : 10 погрешность измерения не превышает 15%, однако с уменьшением доли β_1 -адренорецепторов до 1 : 40 ошибка измерения резко возрастает и может достигать 40%.

По разработанной методике проанализировано содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в девяти клеточных линиях (различных типах клеток крови), а также в мононуклеарных клетках периферической крови семи здоровых доноров.

Измерение количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках крови здоровых доноров, описанное в настоящей статье, выступает скорее демонстрацией возможности применения разработанной нами методики и не может претендовать на серьезные медико-биологические заключения вследствие явно недостаточного количества исследованных образцов крови.

Важным достижением предложенного метода можно считать возможность использования этого анализа для индивидуального человека (пациента), что делает метод весьма привлекательным для прикладных медицинских целей. Однако, учитывая высокую динамику рецепторного аппарата человека под действием различных факторов (патологии, стресс, лекарственные препараты и проч.), к получаемым данным надо относиться осторожно. Видимо, более информативными и

более корректными с медицинской точки зрения будут такие исследования по динамике изменений адренорецепторной активности, как ответ на действие лекарственных препаратов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках НИР Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России по государственному заданию № 056-00153-19-01 от 17.01.2019 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из участвующих в исследовании доноров-добровольцев было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michel M.C., Beckeringh J.J., Ikezono K., Kretsch R., Brodde O.E. // J. Hypertens Suppl. 1986. V. 4. P. S215–S218.
2. Brodde O.E., Kretsch R., Ikezono K., Zerkowski H.R., Reidemeister J.C. // Science. 1986. V. 231. P. 1584–1585.
<https://doi.org/10.1126/science.3006250>
3. Zoukos Y., Leonard J.P., Thomaidis T., Thompson A.J., Cuzner M.L. // Ann. Neurol. 1992. V. 31. P. 657–662.
<https://doi.org/10.1002/ana.410310614>
4. Zoukos Y., Thomaidis T.N., Kidd D., Cuzner M.L., Thompson A. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2003. V. 74. P. 197–202.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.74.2.197>
5. Смолякова Е.В., Скоблов Ю.С., Скоблова Н.А., Агапова О.Ю., Амбатьелло Л.Г., Климова А.А., Кузнецова Т.В., Масенко В.П., Нистор С.Ю., Рвачева А.В., Чазова И.Е., Зыков К.А. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 295–301. [Smolyakova E.V., Skoblov Yu.S., Skoblova N.A., Agapova O.Y., Ambatiello L.G., Klimova A.A., Kuznetsova T.V., Masenko V.P., Nistor S.Y., Rvacheva A.V., Chazova I.E., Zykov K.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 129–134.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020134>
6. Grisanti L.A., Evanson J., Marchus E., Jorissen H., Woster A.P., DeKrey W., Sauter E.R., Combs C.K., Porter J.E. // Mol. Immunol. 2010. V. 47. P. 1244–1254.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.12.013>
7. Агапова О.Ю., Скоблов Ю.С., Зыков К.А., Рвачева А.В., Бейлина В.Б., Масенко В.П., Чазова И.Е. // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. С. 592–598. [Agapova O.Y., Skoblov Yu.S., Zykov K.A., Rvacheva A.V., Beilina V.B., Masenko V.P., Chazova I.E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 529–535.]
<https://doi.org/10.1134/s1068162015050027>
8. Hulme E.C., Trevethick M.A. // Br. J. Pharmacol. 2010. V. 161. P. 1219–1237.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x>
9. Adham N., Tamm J.A., Salon J.A., Vaysse P.J., Weinschank R.L., Branchek T.A. // Neuropharmacology. 1994. V. 33. P. 387–391.
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)90068-x](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)90068-x)
10. Cheng Y., Prusoff W.H. // Biochem. Pharmacol. 1973. V. 22. P. 3099–3108.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2)
11. Sager G., Bang B.E., Pedersen M., Aarbakke J. // J. Leukoc. Biol. 1988. V. 44. P. 41–45.
<https://doi.org/10.1002/jlb.44.1.41>
12. Mäki T., Andersson L.C., Kontula K.K. // Eur. J. Haematol. 1992. V. 49. P. 263–268.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1992.tb00059.x>
13. Talmadge J., Scott R., Castelli P., Newman-Tarr T., Lee J. // Int. J. Immunopharmacol. 1993. V. 15. P. 219–228.
[https://doi.org/10.1016/0192-0561\(93\)90098-j](https://doi.org/10.1016/0192-0561(93)90098-j)
14. Brodde O.E., Engel G., Hoyer D., Bock K.D., Weber F. // Life Sci. 1981. V. 29. P. 2189–2198.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90490-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90490-2)
15. Fujii N., Homma S., Yamazaki F., Sone R., Shibata T., Ikegami H., Murakami K., Miyazaki H. // Am. J. Physiol. 1998. V. 274. P. E1106–E1112.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.274.6.E1106>
16. Красникова Т.Л., Коричнева И.Л., Радюхин В.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 235–243.
17. Агапова О.Ю., Скоблов Ю.С., Ткачев Г.А., Мироннова Н.А., Голицын С.П., Масенко В.П., Чазова И.Е., Зыков К.А. // Мол. биология. 2016. Т. 50. С. 999–1006.
<https://doi.org/10.7868/S0026898416050025>
18. Bundkirchen A., Brixius K., Bölck B., Nguyen Q., Schwinger R.H. // Eur. J. Pharmacol. 2003. V. 460. P. 19–26.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02875-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02875-3)
19. Tate K.M., Briend-Sutren M.M., Emorine L.J., Delavier-Klutchko C., Marullo S., Strosberg A.D. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 357–361.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15824.x>
20. Hoffmann C., Leitz M.R., Oberdorf-Maass S., Lohse M.J., Klotz K.N. // Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol. 2004. V. 369. P. 151–159.
<https://doi.org/10.1007/s00210-003-0860-y>
21. Шевелев А.Я., Каширина Н.М., Кузнецова И.Б., Шарф Т.В., Мамочкина Е.Н., Агапова О.Ю., Гурская Т.Х., Липатова Л.Н., Пекло М.М., Руткевич П.Н., Янушевская Е.В., Рыбалкин И.Н., Скоблов Ю.С., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Зыков К.А. // Вестник биотехнол. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2015. Т. 11. С. 5–14.
22. Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S. // Biochem. J. 1963. V. 89. P. 114–123.
<https://doi.org/10.1042/bj0890114>

Radioligand Binding Assay for the Simultaneous Determination of β_1 - and β_2 -Adrenergic Receptors in Human Blood Cells

A. Y. Shevelev*, N. M. Kashirina**, L. N. Lipatova**, E. V. Yanushevskaya**, M. M. Peklo**, I. N. Rybalkin*, **, P. N. Rutkevich*, **, O. K. Chusovitina**, N. A. Skoblova***, Yu. S. Skoblov***, #, T. N. Vlasik*, **, and K. A. Zykov**, ****

Phone: +7 (916) 644-30-95; e-mail: sur@ibch.ru

*Framon Joint Stock Company, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

**National Medical Research Center of Cardiology, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

****Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Delegatskaya 20/1, Moscow, 127473 Russia

In this study, a method for the separate determination of both types of adrenoceptors based on radioligand binding analysis using ^{125}I -iodocyanopindolol is proposed, comprising three measurements: (1) without competing ligands, (2) in the presence of selective ligand ICI 118,551 (0.25 μM) and (3) in the presence of two selective ligands – ICI 118,551 and CGP 20712 (0.25 μM each). The technique was tested on a model system of two transgenic cell lines ADL-7A and A2R9 with the expression of recombinant β_1 - and β_2 -adrenergic receptors. If the ratio of the number of β_1 -adrenergic receptors to β_2 -adrenergic receptors is 1 : 10, the measurement error is about 15%. Analysis of 9 cell lines representing different types of blood cells showed the presence of β_2 -adrenergic receptors in Daudi, Raji, Dami, K-562, HL-60, U-937 and THP-1 cells and their absence in Jurkat and MOLT-4 cells. β_1 -Adrenergic receptors are reliably registered only in THP-1 cells of monocytic origin. In the remaining cell lines, with the exception of Dami, the number of β_1 -adrenergic receptors was found below the detection limit, estimated as 250 molecules per cell. Measurements performed on the peripheral blood mononuclear cells of seven healthy donors showed the presence of β_2 -adrenergic receptors in the range from 1000 to 2500 molecules per cell, while the content of β_1 -adrenergic receptors in all cases appeared to be on the border or beyond the detection limit.

Keywords: β_1 - and β_2 -adrenergic receptors, radioligand binding assay, human cells