



УДК 577.171

СПЕЦИФИЧНОСТЬ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННОГО РАДИОЛИГАНДНОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ β 1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. Е. В. Смолякова***, #, Ю. С. Скоблов**, Н. А. Скоблова**, О. Ю. Агапова*, Л. Г. Амбатьелло***, А. А. Климова***, Т. В. Кузнецова***, В. П. Масенко***, С. Ю. Нистор*, А. В. Рвачева*, И. Е. Чазова***, К. А. Зыков****, *****

*Лаборатория пульмонологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Россия, 127473, Москва, ул. Десятская, д. 20/1

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

***ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Россия, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А

****ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Россия, 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

*****Кафедра факультетской терапии и профболезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Россия, 127473, Москва, ул. Десятская, д. 20/1

Поступила в редакцию 03.09.2018 г.

После доработки 28.09.2018 г.

Принята к публикации 17.10.2018 г.

На основе радиолигандного метода предложен способ количественной оценки связывающей активности β 1-адренорецепторов (АР) на поверхности Т-лимфоцитов человека. Используя в качестве модели линии трансфицированных клеток НЕК293, экспрессирующие β 1-АР (ADL-7A) и экспрессирующие β 2-АР (A2R9), подобраны условия, при которых с помощью [125 I]цианопиндолола можно достоверно выявлять специфическое связывание лиганда β 1-адренорецептором на уровне 1–1.5 фмоль на 1 млн клеток. На примере Т-лимфоцитов человека показана реальная возможность постановки этого анализа для клинических исследований.

Ключевые слова: адренорецепторы, [125 I]цианопиндолол, радиолигандный анализ

DOI: 10.1134/S0132342319020143

ВВЕДЕНИЕ

β -Адренорецепторы (β -АР) интенсивно изучаются уже более 50 лет и за эти годы в мире опубликованы десятки тысяч работ по этой тематике, причем только за последние 10 лет опубликовано более 7 тысяч работ. Основная причина такого интереса — участие β -АР в патогенезе ряда кардиореспираторных патологий, занимающих в настоящее время лидирующие места в структуре заболеваемости и смертности [1]. Назначение β -агонистов и β -адреноблокаторов, осуществляющих свое действие через β -АР, пациентам с данной сочетанной патологией до сих пор остается не решенным вопросом, ввиду возможного развития побочных эффектов. Специфичность взаимодействия β -агонистов и β -адреноблокаторов с β -АР

является одним из важнейших факторов, определяющих возможность их избирательного воздействия на организм, длительность и выраженность действия, в также вероятность возникновения нежелательных побочных реакций. Большое значение имеют индивидуальные реакции конкретного человека на действие β -агонистов и β -адреноблокаторов, что приводит к необходимости персонализированного подхода при назначении таких препаратов.

Большой вклад в изучение β -АР внесли исследования, проведенные с использованием радиолигандного анализа [2, 3]. С его помощью была получена важная информация о природе и типах адренорецепторов, о характере взаимодействия с различными лигандами — антагонистами и агонистами, а также о содержании различных типов адренорецепторов в органах и тканях [4]. Все эти работы носили исследовательский фундаментальный или прикладной характер, и, хотя в каждой работе декларировалась ее значимость

Список сокращений: PBS — 5 мМ калий-фосфатный буфер с 0.14 М NaCl, pH 7.0; BSA — бычий сывороточный альбумин; cAMP — циклический аденозинмонофосфат.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 737-86-97; эл. почта: smolyakovak@mail.ru).

для медицины, в практическом здравоохранении радиолигандные методы анализа не использовались. Среди многочисленных причин такого положения следует выделить две основные: во-первых, при работе в условиях реальной клинической практики для радиолигандного анализа доступна только кровь, а количество адренорецепторов на поверхности клеток крови весьма ограничено. Несмотря на высокую чувствительность радиолигандного метода, определение классических параметров — константы связывания лиганда и количества активных клеточных рецепторов — требует значительного количества крови. Во-вторых, β -адренорецепторная система весьма динамична, идет постоянный обмен информацией между клетками. В результате — количество адренорецепторов на поверхности клеток и константы связывания с лигандами меняются под действием множества различных факторов. Поэтому применение традиционного радиолигандного анализа в условиях реальной клинической практики затруднительно и маловероятно.

Ранее нами был предложен метод оценки рецепторной активности β -1- и β -2-адренорецепторов, основанный на вытеснении из клеточных рецепторов меченного иодом-125 цианопиндолола, неспецифически связывающегося с несколькими типами рецепторов, лигандами с высокой специфичностью к адренорецепторам: CGP-20712 и ICI 118,551 [5]. С помощью этого подхода удалось начать исследования динамики изменений активности β -АР и получить интересные данные о влиянии β -агониста (сальбутамола) на активность β 2-АР Т-лимфоцитов человека для здоровых людей и лиц с респираторной патологией [6]. Причем в этих работах была отмечена взаимосвязь β 2-АР с другими клиническими и лабораторными параметрами, имеющих доказанное клиническое значение. При этом активность β 1-АР лимфоцитов в этих же пробах, определенная нами, была на крайне низком уровне — примерно в 10–20 раз ниже активности β 2-АР этих же клеток. Эти данные хорошо согласуются с исследованиями о распределении β 1- и β 2-АР по органам и тканям [7]. Поэтому наши результаты активности β 1-АР Т-лимфоцитов нами всесторонне не анализировались из-за малодостоверных результатов.

Однако в ходе продолжающихся исследований с Т-лимфоцитами лиц, страдающих сочетанной кардиореспираторной патологией, нами было выявлено, что для некоторых типов кардиологических патологий характерна чрезвычайно высокая активность β 1-адренорецепторов Т-лимфоцитов. Это заставило нас вновь вернуться к вопросу о специфичности и достоверной селективности предложенного нами анализа, а также о необходимости разработки модификации метода с целью увеличения достоверности получаемых результа-

тов по активности β 1-адренорецепторов Т-лимфоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности β -АР живых клеток — задача достаточно сложная и, несмотря на громадное число публикаций по этой тематике, простое и однозначного метода для решения этой задачи до сих пор нет. Отчасти это связано с неоднозначностью самой задачи и неопределенностью терминологии. Различные авторы под понятием активность β -адренорецепторов подразумевают несколько разные эффекты. Часть авторов считает, что активность АР — это количество лиганда, связавшегося с рецептором в ходе измерения [8]. Этот взгляд радиолигандного подхода соответствует скорее химической точке зрения. Часть авторов считает, что активность клеточных рецепторов необходимо определять как биологическую функцию рецептора и более правильным является использование косвенных методов — определение вторичных мессенджеров (сАРМ или протеинкиназы А) [9, 10]. Такая точка зрения соответствует медико-биологическим представлениям об измеряемом объекте.

Мы считаем более правильным химический подход, при котором активность клеточных β -АР определяется как специфическое связывание меченого лиганда в определенных стандартизованных условиях [8]. Так как для определения рецепторной активности основным измеряемым параметром является количество связанного с рецептором радиоактивного лиганда, считаем, что для количественной оценки удобнее использовать величину имп./мин на 1 млн клеток. Это позволяет проводить количественные сравнения изменений рецепторной активности как под действием различных внешних факторов, так и в динамике.

Одной из проблем определения активности β -АР клеток с помощью [125 I]цианопиндолола является специфичность определяемых адренорецепторов. Использование меченных тритием специфических лигандов позволяет решить эту проблему [11]. Однако, чувствительность радиолигандного анализа с тритиевым лигандом примерно в 50 раз уступает чувствительности анализа с использованием [125 I]цианопиндолола, что является критическим показателем для возможного медицинского применения.

К сожалению, [125 I]цианопиндолол не обладает высокой специфичностью в отношении разных β -АР. По данным различных авторов константы связывания для β 1- и β 2-адренорецепторов из разных источников колеблются в диапазоне 7–40 пМ (10^{-12} М) [12]. Это привело к идее использовать для селективного определения

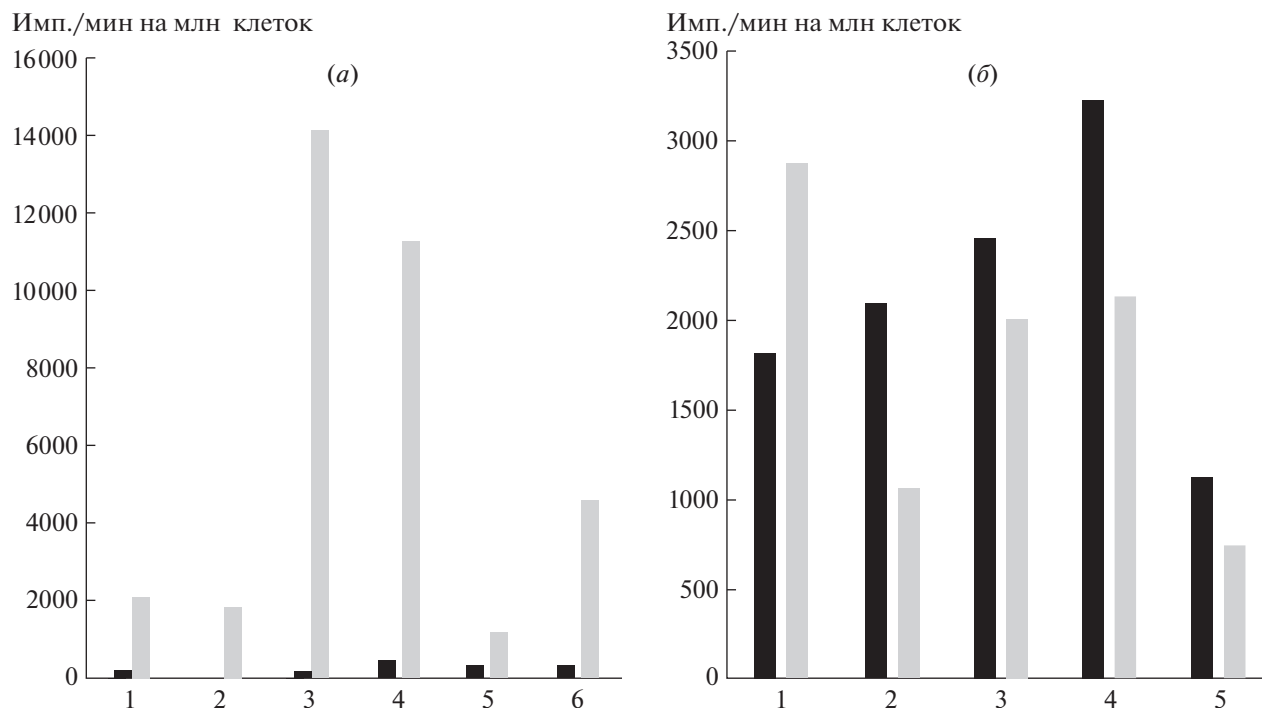


Рис. 1. Сравнительная активность β_1 - (черные столбики) и β_2 -адренорецепторов (светлые столбики) Т-лимфоцитов. Активность адренорецепторов приведена в имп./мин на млн клеток (Т-лимфоцитов). *a* – активность адренорецепторов здоровых добровольцев (1, 2, 3) и пациентов с бронхо-легочной патологией (4, 5, 6); *б* – активность адренорецепторов у пациентов с идиопатической аритмией. Анализ проводился в 3 параллелях, отклонения от средней величины не превышали 10%.

β_1 - и β_2 -адренорецепторов специфические лиганды CGP-20712 и ICI 118,551, впервые опубликованной в 1989 г. [13]. Позднее идея получила развитие, и были получены данные по селективному определению активности β_1 - и β_2 -АР для разных типов клеток, в том числе лимфоцитов лошади [14, 15]. Были получены очень интересные результаты о соотношении количества активных β_1 - и β_2 -АР на поверхности клеток и определены константы связывания лигандов. Но все эти работы были проведены на объектах, которые могли быть использованы для анализа в значительном количестве. Учитывая крайне ограниченный объем материала, доступный для анализа, который может быть взят у реального пациента (тем более в ходе серийных последовательных исследований), эти методы нельзя было переносить в клиническую практику без серьезной переработки.

Предложенный нами ранее способ определения активности β_2 -АР Т-лимфоцитов заключался в вытеснении [125 I]цианопиндолола β_2 -специфическим лигандом – эритро-(S^* , S^*)-1-[2,3-(дигидро-7-метил-1*H*-инден-4-ил)окси]-3-[(1-метилэтил-амино)-2-бутанол гидрохлоридом – более известным в литературе по сокращенному наименованию – ICI 118,551 [16]. Лиганд обладает высокой степенью селективности, аффинность ICI 118,551 к β_2 превышает аффинность к β_1 в 550 раз [17].

Фактически мы определяли активность клеточных β_2 -АР как количество [125 I]цианопиндолола, которое при определенных фиксированных условиях вытесняется специфическим лигандом ICI 118,551.

К сожалению, такой подход сложно использовать для определения активности β_1 -АР лимфоцитов. Количество β_1 -АР на поверхности лимфоцитов слишком мало, и специфический β_1 -лиганд – [дигидрохлорид 2-((3-карбамоил-4-гидрокси)фенокси)этиламино]-3-[4-(1-метил-4-трифторметил-2-имидазолил)фенокси]-2-пропанола), более известный как CGP-20712 [18], не мог специфически вытеснить [125 I]цианопиндолол из β_1 -АР просто из-за их слишком незначительного количества (см. рис. 1а). Причем специфичность CGP-20712 в отношении β_1 -АР также очень высокая – аффинность CGP-20712 к β_1 превышает аффинность к β_2 в 501 раз [17]. Из полученных нами данных по сравнительной активности β_1 и β_2 -АР в одних и тех же образцах для здоровых добровольцев (образцы 1, 2, 3) и пациентов с бронхо-легочной патологией (образцы 4, 5, 6) следует, что активность β_1 -АР весьма низкая и находится на уровне не превышающим 0.1 фмоль (10^{-16} моль) рецепторов на 1 млн Т-лимфоцитов, или примерно 60 рецепторов на клетку.

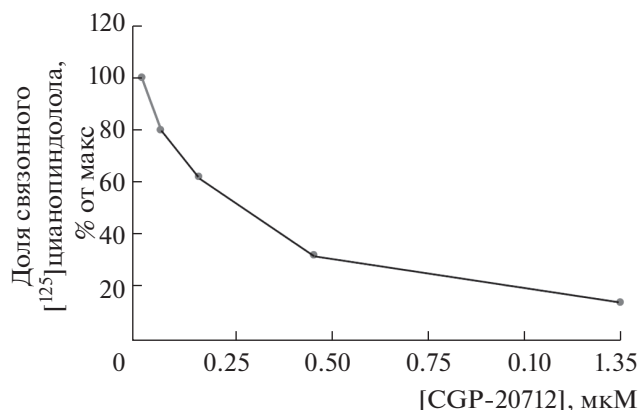


Рис. 2. Связывание $[^{125}\text{I}]$ цианопиндолола клетками ADL-7A в присутствии CGP-20712. В реакционной смеси 6 тыс. клеток ADL-7A. Подробности анализа в разделе “Экспериментальная часть”. Из 100000 имп./мин на млн клеток максимальное связывание 53390 имп./мин на млн клеток. Анализ проводился в 3 параллелях, отклонения от средней величины не превышали 10%.

Однако, при определении адренорецепторной активности Т-лимфоцитов у пациентов с идиопатическими нарушениями сердечного ритма оказалось, что у некоторых пациентов активность β_1 -адренорецепторов существенно выше — на уровне 1–1.5 фмоль на 1 млн клеток, и сопоставима с активностью β_2 -АР (см. рис. 1б). Эти результаты заставили нас заново проанализировать специфичность и селективность предложенного нами ранее метода определения активности β -АР.

Для верификации специфичности предложенного нами метода мы использовали линии трансфицированных клеток, экспрессирующих β_1 -АР (ADL-7A) или β_2 -АР (A2R9). Линия клеток ADL-7A несет рекомбинантный ген β_1 -АР человека под контролем конститутивного промотора ранних генов цитомегаловируса P_{CMV} ; на поверхности 1 клетки экспонируется более 2 млн активных β_1 -АР [19]. Линия трансфицированных клеток A2R9 содержит ген β_2 -адренорецептора с присоединенным на С-конце зеленым флуоресцентным белком EGFP также под контролем P_{CMV} . На поверхности 1 клетки A2R9 находится не менее 1.5 млн активных β_2 -АР. Ранее было показано [20], что присоединение зеленого белка к С-концу практически не меняет их биологические свойства.

Для подтверждения специфичности предложенного метода мы проверили эксперименты по вытеснению меченого $[^{125}\text{I}]$ цианопиндолола из клеточных рецепторов линии ADL-7A лигандом CGP-20712 в различных концентрациях (см. рис. 2). Аналогичная серия экспериментов по вытеснению меченого $[^{125}\text{I}]$ цианопиндолола ICI 118,551 в

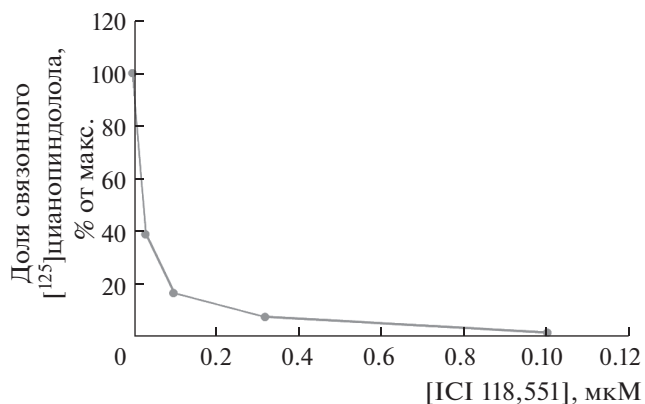


Рис. 3. Связывание $[^{125}\text{I}]$ цианопиндолола клетками A2R9 в присутствии ICI 118,551. В реакционной смеси 7.5 тыс. клеток A2R9. Подробности анализа в разделе “Экспериментальная часть”. Из 100000 имп./мин на млн клеток максимальное связывание 55980 имп./мин на млн клеток. Анализ проводился в 3 параллелях, отклонения от средней величины не превышали 10%.

различных концентрациях лигандом была проведена для линии A2R9 (рис. 3).

Подобные исследования проводились ранее на культурах клеток СНО (культуры клеток яичников китайского хомячка), в которых после соответствующих генно-инженерных трансформаций экспрессировались гены β_1 - или β_2 -АР человека [17, 21]. Эти исследования позволили получить данные по специфичности ряда адренорецепторных лигандов и их способности влиять на активность внутриклеточной аденилатциклазы. Правда, к точным количественным оценкам специфичности лигандов следует относиться осторожно, т.к. эти величины зависят от конкретного метода и условий проведения анализа. Например, коэффициент селективности для ICI 118,551, определенный в работе [14] на лимфоцитах лошади, отличается от данных, полученных на культуре клеток.

Следует отметить, что по нашим данным (см. табл. 1) CGP-20712, даже в очень высокой концентрации (0.44 мкМ), практически не вытесняет $[^{125}\text{I}]$ цианопиндолол из клеточных β_2 -АР — вытеснение составляет около 3%. Это подтверждает специфичность предложенной нами схемы анализа, т.к. выбранная концентрация CGP-20712 будет оказывать минимальное влияние на связывание радиоактивного лиганда β_2 -АР Т-лимфоцитов. В то же время лиганд ICI 118,551 в высокой концентрации (0.32 мкМ) частично (около 20%) вытесняет $[^{125}\text{I}]$ цианопиндолол из клеточных лимфоцитарных β_1 -АР. Впрочем, для селективного определения активности β_1 -АР Т-лимфоцитов это искажение количественной оценки не превысит 10% даже для лиц с чрезвычайно высо-

Таблица 1. Связывание [¹²⁵I]цианопиндолола клетками ADL-7A и A2R9 при различных условиях

Клетки	Количество связанной радиоактивности, имп./мин/млн клеток				Связывание, % от максимального		
	без лиганда	с CGP-20712		с ICI 118,551			
		без предынкубации	предынкубация	без предынкубации	предынкубация	без предынкубации	предынкубация
ADL-7A	53392					100	
ADL-7A		17059	11846			32	22
ADL-7A				41335	52391	78	98
A2R9	55978					100	
A2R9		54296	52391			97	92
A2R9				7293	12445	13	22

Ошибка представленных экспериментальных данных не превышает $\pm 10\%$.

кой (редкой патологической) активностью $\beta 1$ -АР Т-лимфоцитов.

Мы провели модификацию предложенного метода, заключающуюся в изменении порядка прибавления реактивов в инкубационную смесь. Было предложено сначала инкубировать клетки со специфическими лигандами CGP-20712 или ICI 118,551, а затем добавлять меченый цианопиндолол. Результаты этих экспериментов на клетках ADL-7A и A2R9 представлены в табл. 1. Интересно, что предынкубация клеток с CGP-20712 ($\beta 1$ -специфический лиганд) активирует клеточные $\beta 1$ -АР, в то же время предынкубация с ICI 118,551 ($\beta 2$ -специфический лиганд) существенных изменений в активность $\beta 2$ -АР не вносит.

Анализ β -адренорецепторной активности Т-лимфоцитов с предынкубацией

Для проверки этой модифицированной схемы анализа мы использовали несколько образцов Т-лимфоцитов реальных пациентов с сочетанной кардиореспираторной патологией. Сравнительные данные по активности $\beta 1$ - и $\beta 2$ -АР представлены на рис. 4. Следует отметить, что модификация метода не приводит к существенным изменениям активности $\beta 2$ -АР в 3 образцах из 5 (пациенты 1, 4, 5). В то же время для $\beta 1$ -АР изменения в методике дают радикальное увеличение величины активности. При этом не вызывает сомнения тот факт, что фактически незначительная коррекция методики – изменение порядка прибавления реагентов к исследуемым клеткам, приводит к получению новой информации о возможной реакции клеточных β -АР на предынкубацию со специфическим лигандами, что характеризует функциональное состояние рецепторного аппарата. Механизмы наблюдаемого феномена пока не ясны, поэтому необходимо накопление большего количества наблюдений у пациентов с различными кардиореспираторными заболеваниями

ми (и их сочетанием) для их расшифровки и оценки возможного клинического значения получаемых данных.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что предложенный нами способ, основанный на вытеснении меченого [¹²⁵I]цианопиндолола специфическими лигандами CGP-20712 и ICI 118,551, позволяет селективно определять активность как $\beta 2$ - так и $\beta 1$ -АР Т-лимфоцитов человека, а предынкубация с вышеуказанными лигандами позволяет получать дополнительную информацию, характеризующую состояние адренорецепторного аппарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали специфические лиганды CGP-20712 и ICI 118,551, а также цианопиндолол фирмы “Sigma” (США). Радиоактивный изотоп Na[¹²⁵I] с молярной активностью более 2000 Ки/ммоль был получен от фирмы В/О “Изотоп”. [¹²⁵I]цианопиндолол синтезировали как описано ранее [5]. Остальные реактивы, использованные в работе, были квалификации не ниже ч. д. а.

Клеточные культуры. Клетки ADL-7A, полученные путем трансфекции родительской линии НЕК293 клеток почки эмбриона человека геном $\beta 1$ -АР *ADRB1*, были любезно предоставлены Т.Н. Власик (Институт экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва). Клетки A2R9, экспрессирующие $\beta 2$ -АР человека, слитый с зеленым флуоресцентным белком, получены от ООО “Мона”, Москва. Клетки культивировали во флаконах в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина (все реактивы компании “Invitrogen”, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Для проведения анализа адренорецепторной активности клетки НЕК293, ADL-7A и A2R9 снимали с поверхности флаконов обработкой

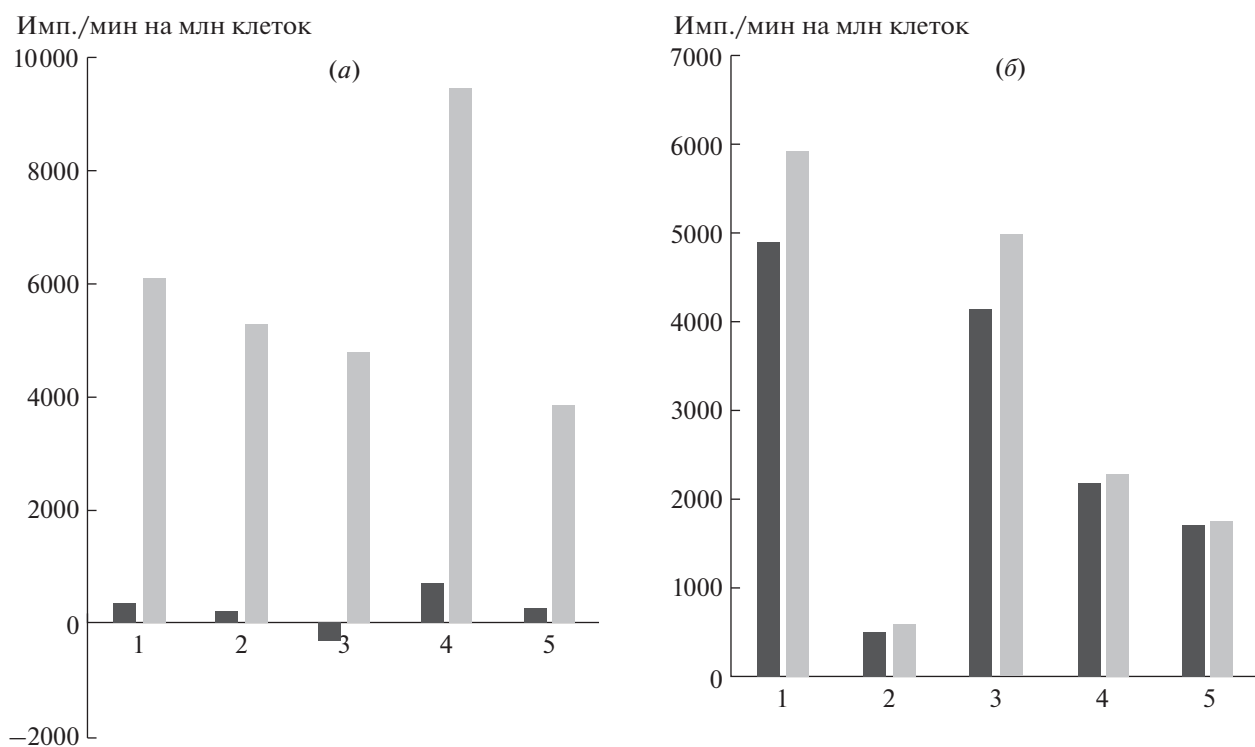


Рис. 4. Активность β 1-АР (а) и β 2-АР (б) Т-лимфоцитов без проведения предынкубации (черные столбики) и с проведением предынкубации (светлые столбики). Активность приведена в имп./мин на млн клеток (Т-лимфоцитов). 1, 2, 3, 4, 5 – реальные пациенты с сочетанной кардиореспираторной патологией. Анализ проводился в 3 параллелях, отклонения от средней величины не превышали 10%.

трипсином, реакцию протеолиза останавливали добавлением культуральной среды с 10% FBS, клетки осаждали центрифугированием 15 мин при 1100 об/мин (200 g), дважды промывали PBS при комнатной температуре и суспендировали в растворе PBS с 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma-Aldrich, США). В экспериментах по верификации специфичности суспензии клеток смешивали с таким расчетом, чтобы в пробе для анализа находилось 5×10^5 клеток НЕК293, выполняющих функцию носителя, и 2000 клеток ADL-7A или 3500 клеток A2R9. В экспериментах с предынкубацией использовали, соответственно, 3.5×10^5 клеток НЕК293, 6000 клеток ADL-7A и 7500 клеток A2R9.

Проведение радиолигандного анализа β -адренорецепторной активности. Забор периферической крови, выделение Т-лимфоцитов и анализ адренорецепторной активности проводили как описано ранее [5]. Для экспериментов с предынкубацией суспензию клеток разбавляли PBS с 0.1% BSA до концентрации 10 млн/мл и 100 мкл клеточной суспензии инкубировали в течение 30 мин при 37°C с добавлением 10 мкл раствора немеченого лиганда (CGP 20712 или ICI 118,551) при осторожном перемешивании на шейкере со скоростью 100 об./мин. Затем в реакционную смесь

добавляли 100 мкл раствора [125 I]цианопиндолола в PBS с концентрацией 1000 имп./мин/мкл и инкубировали еще 30 мин. Процесс останавливали добавлением в каждую пробу по 400 мкл ледяной воды. Для отмывки от не связанной радиоактивности клетки центрифугировали при 2000 g 10 мин, осадок трижды промывали суспендированием в 200 мкл холодного раствора PBS и центрифугированием при тех же условиях, после чего просчитывали на γ -счетчике “Wallac Wizard 1470” (PerkinElmer, США). Все измерения проводили в 3 параллелях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья написана в рамках проведения работ по Государственному контракту № 19.001.18.14 от 13 апреля 2018 года ФГБУ “НИИ пульмонологии” ФМБА России “Анализ распространенности бронхиальной гиперреактивности у спортсменов в циклических видах спорта с персонализированным обоснованием применения ингаляционных β 2-агонистов” (шифр: “Бронх-18”). Авторы выражают благодарность Т.Н. Власик за предоставление клеток ADL-7A, И.Н. Рыбалкину за предоставление клеток A2R9 и А.Я. Шевелеву за помощь при анализе результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чазова И.Е., Чучалин А.Г., Зыков К.А., Ратова Л.Г. // Системные гипертензии. 2013. Т. 10 (1). С. 5–35.
2. Perkins J.P. The Beta-Adrenergic Receptors / J.P. Perkins // Springer Science & Business Media, 2012. P. 405.
3. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Кичикулова Т.П. // Биологические мембраны. 1999. Т. 16(5). С. 541–554.
4. Minnetan K.P., Pittman R.N., Yeh H.H., Woodward D.J., Wolfe B.B., Molinoff P.B. // Brain Res. 1981. Mar 23. V. 209(1). P. 25–34.
5. Агарова О.Ю., Скоблов Ю.С., Зыков К.А., Рвачева А.В., Вейлина В.В., Масенко В.П., Чазова И.Е. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41(5). P. 529–535.
6. Агапова О.Ю., Скоблов Ю.С., Ткачев Г.А., Миронова Н.А., Голицын С.П., Масенко В.П., Чазова И.Е., Зыков К.А. // Мол. биол. 2016. Т. 50(6). С. 999–1006.
7. Abraham G., Broddet O.E., Ungemach F.R. // Equine Vet. J. 2001. Sep. V. 33(5). P. 487–493.
8. Bundkirchen A., Brixius K., Bölcck B., Nguyen Q., Schwinger R.H. // European Journal of Pharmacology. 2003. V. 460. P. 19–26.
9. Abraham G., Shibeshi W., Ungemach F.R. // Pulm. Pharmacol. Ther. 2011. V. 24(1). P. 174–181.
10. Guereschi M.G., Araujo L.P., Maricato J.T., Takenaka M.C., Nascimento V.M., Vivanco B.C., Reis V.O., Keller A.C., Brum P.C., Basso A.S. // Eur. J. Immunol. 2013. V. 43. P. 1001–1012.
11. Красникова Т.Л., Коричнева И.Л., Радюхин В.А. // Биохимия. 1989. Т. 54(2). С. 235–243.
12. Engel G., Hoyer D., Berthold R., Wagner H. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 1981. V. 317(4). P. 277–285.
13. Tsuchihashi H., Nagatomo T., Imai S. // J. Pharmacobiodyn. 1989 V. 12(9). P. 509–516.
14. Flügge G., Ahrens O., Fuchs E. // Cell Mol. Neurobiol. 1997. V. 17(4). P. 401–415.
15. Abraham G., Broddet O.E., Ungemach F.R. // Equine Vet. J. 2001. V. 33(5). P. 487–493.
16. Bilski A.J., Halliday S.E., Fitzgerald J.D., Wale J.L. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1983. V. 5(3). P. 430–437.
17. Baker J.G. // Br. J. Pharmacol. 2005. V. 144(3). P. 317–322.
18. Dooley D.J., Bittiger H. // J. Pharmacol Methods. 1987. V. 18(2). P. 131–136.
19. Шевелев А.Я., Каширина Н.М., Кузнецова И.Б. и др. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2015. Т. 11. С. 5–14.
20. McLean A.J., Milligan G. // Br. J. Pharmacol. 2000. V. 130(8). P. 1825–1832.
21. Baker J.G., Hall I.P., Hill S.J. // Mol. Pharmacol. 2003. V. 63. P. 1312–1321.

Specificity and Selectivity of the Modified Radioligand Method for Assessment of β 1-Adrenoreceptor's Binding Activity on Human T-Lymphocytes

E. V. Smolyakova^{***, #}, Y. S. Skoblov^{**}, N. A. Skoblova^{**}, O. Y. Agapova^{*}, L. G. Ambat'ello^{***}, A. A. Klimova^{***}, T. V. Kuznetsova^{*}, V. P. Masenko^{***}, S. Yu. Nistor^{*}, A. V. Rvacheva^{*}, I. E. Chazova^{***}, and K. A. Zykov^{****, *****}

[#]Phone: +7 (916) 737-86-97; e-mail: smolyakovak@mail.ru

^{*}FSBEI HE Evdokimov MSMSU MOH, Delegatskaya str., 20/1 Moscow, 127473 Russia

^{**}Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS (IBCh RAS), Miklouho-Maclay str., 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{***}National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3rd Cherepkovskaya str., 15A, Moscow, 121552 Russia

^{****}Federal State Budgetary Institution "Pulmonology Scientific Research Institute under Federal Medical and Biological Agency of Russian Federation", Orekhovy blvd., 28, Moscow, 115682 Russia

^{*****}Department of Faculty Therapy and Professional Diseases of FSBEI HE Evdokimov MSMSU MOH, Moscow, Russia

Radioligand-based method for quantitatively evaluating of the receptor binding activity of β 1-adrenergic receptors on the surface of human T-lymphocytes is proposed. Using as a model the transfected HEK293 cell lines expressing β 1-adrenoreceptors (ADL-7A) and expressing β 2-adrenoreceptors (A2R9), the conditions were selected for [¹²⁵I]cyanopindolol reliable detection of specific ligand binding by β 1-adrenergic receptor at the level of 1–1.5 fmol per 1 million cells. On the example of human T-lymphocytes, the possibility of performing of this analysis for clinical studies has been shown.

Keywords: adrenergic receptors, [¹²⁵I]cyanopindolol, radioligand analysis