

Методика радиолигандного анализа для одновременного определения содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов в клетках крови человека

А.Я. ШЕВЕЛЕВ¹, Н.М. КАШИРИНА², Л.Н. ЛИПАТОВА², Е.В. ЯНУШЕВСКАЯ², М.М. ПЕКЛО², И.Н. РЫБАЛКИН^{1,2}, П.Н. РУТКЕВИЧ^{1,2}, О.К. ЧУСОВИТИНА², Н.А. СКОБЛОВА³, Ю.С. СКОБЛОВ³, Т.Н. ВЛАСИК^{1,2}

¹ ЗАО «Фрамон», ул. 3-я Черепковская 15а, Москва, 121552, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. 3-я Черепковская 15а, Москва, 121552, Россия

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая 16/10, Москва, 117997, Россия

Резюме

Во многих тканях и клетках человека присутствуют как β_1 -, так и β_2 -адренорецепторы, информация о содержании и динамике поведения которых часто является клинически значимой. В настоящем исследовании предложена методика раздельного определения обоих типов адренорецепторов на основе радиолигандного анализа с использованием 125I-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 с экспрессией рекомбинантных β_1 - и β_2 -адренорецепторов. При соотношении количества β_1 -адренорецепторов к β_2 -адренорецепторам 1:10 погрешность измерения составляет около 15%. Анализ 9 клеточных линий, представляющих различные типы клеток крови, показал наличие β_2 -адренорецепторов в клетках Daudi, Raji, Dami, K-562, HL-60, U-937 и THP-1 и их отсутствие в Т-лимфоцитарных клетках Jurkat и MOLT-4. β_1 -адренорецепторы достоверно зарегистрированы лишь в клетках THP-1 моноцитарного происхождения. В остальных клетках, за исключением линии Dami, их количество оказалось ниже порога детекции, оцениваемого на уровне 250 молекул на клетку. Измерения, выполненные на мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров, продемонстрировали присутствие β_2 -адренорецепторов в диапазоне от 1000 до 2500 молекул на клетку, тогда как содержание β_1 -адренорецепторов во всех случаях находилось на грани или за гранью порога детекции. По-видимому, изучение β_1 -адренорецепторов в дальнейшем следует проводить на отдельных фракциях клеток крови, в частности на фракции моноцитов.

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

Radioligand binding assay for the simultaneous determination of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in human blood cells

A.Y. SHEVELEV¹, N.M. KASHIRINA², L.N. LIPATOVA², E.V. YANUSHEVSKAYA², M.M. PEKLO², I.N. RYBALKIN^{1,2}, P.N. RUTKEVICH^{1,2}, O.K. CHUSOVITINA², N.A. SKOBLOVA³, YU.S. SKOBLOV³, T.N. VLASIK^{1,2}

¹ Framon Joint Stock Company, 3rd Cherepkovskaya Str. 15a, Moscow, 121552, Russia

² Federal State Budget Organization «National Medical Research Center of Cardiology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3rd Cherepkovskaya Str. 15a, Moscow, 121552, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117997, Russia

Summary

β_1 - and β_2 -adrenergic receptors are presented in various human tissues and cells, while the information of their content and dynamic behavior is often considered as clinically significant. In this study, a method for the separate determination of both types of adrenoceptors based on radioligand binding analysis using 125I iodocyanopindolol is proposed, comprising three measurements: 1) without competing ligands; 2) in the presence of selective ligand ICI 118,551 (0.25 μ M); 3) in the presence of two selective ligands ICI 118,551 and CGP 20712 (0.25 μ M each). The technique was tested on a model system of two transgenic cell lines 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 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. Apparently, further study of β_1 -adrenergic receptors should be performed on the blood cells isolated fractions, on monocytes in particular.

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

Сведения об авторах:

Шевелев Александр Ясенович (автор, ответственный за переписку) — к. б. н., руководитель отдела исследований и развития ЗАО «Фрамон»; e-mail: a.shevelev@gmail.com; +7 (916) 644-30-95; ORCID: 0000-0003-4305-4132.

Каширина Наталья Михайловна — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: kashka55@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-0828-5325.

Липатова Людмила Николаевна — к. б. н., ст. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: Liliudon3005@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-0176-5147.

Янушевская Елена Вадимовна — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: yanushevskaya@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-0279-7466.

Пекло Михаил Михайлович — к. б. н., ст. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: Peclo@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-5485-4683.

Рыбалкин Игорь Николаевич — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: irybalin@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-2721-5864.

Руткевич Павел Николаевич — научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: p.rutkevich@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7295-256X.

Чусовитина Ольга Кирилловна — рук. службы изотопного анализа и радиационной безопасности; e-mail: tchuso@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-5473-9722.

Скоблова Наталья Александровна — инженер изотопного блока; e-mail: sur@ibch.ru; ORCID: 0000-0002-2413-1051.

Скоблов Юрий Самойлович — д. х. н., руководитель изотопного блока; e-mail: uskoblov@gmail.com; ORCID: 0000-0003-3659-3939.

Власик Татьяна Николаевна — к. б. н., вед. научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии; e-mail: tanya.vlasik@gmail.com; ORCID: 0000-0001-7058-1080.

Введение

В патогенезе сердечно-сосудистых и бронхообструктивных заболеваний важную роль играют адренергические механизмы. Пациентам, имеющим данные заболевания, часто необходимо назначение препаратов, воздействующих на β_1 - и β_2 -адренорецепторы. Основными мишенями β -агонистов и β -блокаторов являются ткани сердца и легких, труднодоступные для лабораторных анализов. Однако в ряде исследований продемонстрирована высокая степень корреляции (около 0,9) между содержанием β -адренорецепторов в лимфоцитах крови и их содержанием в ткани предсердий [1, 2]. Таким образом, открывается возможность судить о процессах, происходящих в этих тканях под воздействием применяемых в ходе лечения препаратов, наблюдая за динамикой поведения β -адренорецепторов в клетках периферической крови.

На лейкоцитах крови в основном представлены β_2 -адренорецепторы [3, 4]. Систематических сравнительных измерений содержания β_2 -адренорецепторов в клетках крови у пациентов с сердечно-сосудистыми и бронхообструктивными заболеваниями ранее не проводилось. Отсутствуют и данные о динамике поведения β_2 -адренорецепторов при сочетанном остром и длительном назначении препаратов, воздействующих на адренорецепторную систему. Что касается β_1 -адренорецепторов, то получение подобного рода информации весьма затруднено в силу крайне низкой их представленности в клетках крови. Есть косвенные свидетельства, указывающие на присутствие β_1 -адренорецепторов в моноцитах [5]. Не исключено также, что количество β_1 -адренорецепторов на Т-лимфоцитах может резко возрастать при некоторых сердечно-сосудистых патологиях [6].

Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов обычно измеряют при помощи 125 I-меченого лиганда йодоцианопиндолола, способного одинаково эффективно связываться с обоими типами рецепторов [7]. Присутствие преобладающих количеств β_2 -адренорецепторов на лейкоцитах крови является дополнительным фактором, препятствующим наблюдению минорной фракции β_1 -адренорецепторов.

В настоящем исследовании предпринята попытка разработать методику радиолигандного анализа, позволяющую проводить одновременные измерения содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов на поверхности клеток человека и определить порог детекции β_1 -адренорецепторов. Для решения этой задачи были

использованы две модельные линии клеток, одна из которых экспрессирует рекомбинантный β_1 -адренорецептор, а другая — рекомбинантный β_2 -адренорецептор.

Материал и методы

Линии клеток и условия культивирования. Линия клеток ADL-7A была получена нами ранее [8] путем трансфекции клеток HEK293 эмбриональной почки человека плазмидой pMC4IPW-ADRopt, 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 С-конце с зеленым флуоресцентным белком, который служил маркером для идентификации трансфицированных клонов. Клетки указанных линий культивировали в среде DMEM, содержащей фетальную бычью сыворотку (FBS) 10%, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (все реактивы компании Invitrogen, США) в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С.

Для проведения реакции связывания с 125 I-йодоцианопиндололом клетки снимали с поверхности флаконов обработкой трипсином, реакцию протеолиза останавливали добавлением культуральной среды с 10% FBS, клетки осаждали центрифугированием 15 минут при 1100 об./мин (200 g), дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) при комнатной температуре и суспендировали в PBS до конечной концентрации $10 \cdot 10^6$ 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 кардиологии 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.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Венозную кровь 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), CGP 20712 (Bio-Techne Corporation, США) и ICI 118,551 (Sigma-Aldrich, США).

125I-йодоцианопиндолол. Радиоактивный изотоп йода в составе молекулы Na125I (2000 Ки/ммоль) получали от АО «Радиовый институт имени В.Г. Хлопина» (Санкт-Петербург). Внедрение атома 125I в молекулу цианопиндолола при помощи хлорамина Т проводили методом Гринвуда и Хантера [9] с некоторыми модификациями. В реакцию мечения брали 1 мкг цианопиндолола хемифумарата (Bio-Techne Corporation, США) 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 30 сек и останавливали добавлением 10 мкл тиосульфата натрия (20 мг/мл). Смесь выдерживали 5 минут при комнатной температуре, после чего добавляли 1 мкл раствора «холодного» йодида натрия (6 мг/мл).

Целевой продукт очищали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Диасорб 130 (5 мкм, 4*150 мм) в ион-парном режиме с элюцией в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 90% в уксусной кислоте 10%. Фракции, содержащие 125I йодоцианопиндолол, объединяли, упаривали досуха, растворяли в этиловом спирте 70% и хранили при 20 °С. 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-йодоцианопиндололом. Модельные клетки смешивали с таким расчетом, чтобы в 100 мкл суспензии находилось $2 \cdot 10^5$ клеток НЕК293, выполняющих роль носителя, и дозированное число клеток ADL-7A и/или A2R9, как правило, от 100 до 5000 клеток. В случае суспензионных клеточных линий использовали от $2 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ клеток в 100 мкл, клетки РВМС брали в количестве от $5 \cdot 10^5$ до 10^6 в 100 мкл суспензии. Для снижения неспецифического связывания в суспензию добавляли казеиновый концентрат CBC2 (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 мМ раствора селективного лиганда ICI 118,551, или 20 мкл смеси 2,5 мМ ICI 118,551 и 2,5 мМ CGP 20712, затем добавляли 80 мкл раствора 125I йодоцианопиндолола в PBS с 10% CBC2. В стандартных экспериментах количество радиоактивности во фракции bindable составляло 80 000 имп./мин на пробу. Пробирки с реакционной смесью инкубировали в течение 30 мин при 37 °С с перемешиванием на шейкере-переворачивателе.

По окончании инкубации пробирки с пробами центрифугировали при 2000 g 10 мин. Супернатант удаляли, осадок суспендировали в 200 мкл PBS, центрифугировали при 2000 g 10 минут, после чего осадок вторично суспендировали в 200 мкл PBS, центрифугировали при 10 000 g 5 минут и удаляли супернатант. Количество связавшейся с клетками радиоактивности определяли при помощи гамма-счетчика 2470 Wizard2 (PerkinElmer, США) с эффективностью счета 79%. Все измерения проводили в 3 или 4 параллелях.

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

Результаты

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 [10]. На рисунке 1 представлена кинетика прямой реакции связывания 125I-йодоцианопиндолола с клетками, несущими β_1 - или β_2 -адренорецепторы, при температуре 37 °С и концентрации лиганда 400 000 (имп./мин)/мл (114 пМ). Как можно видеть, 30-минутной инкубации вполне достаточно, для того чтобы обе кривые связывания вышли на плато.

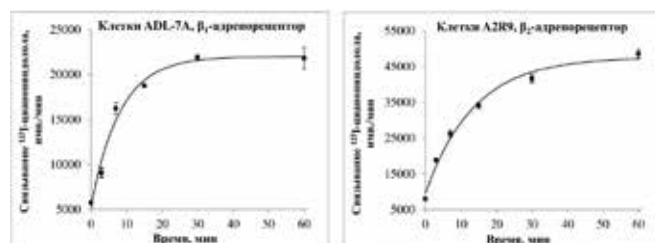


Рисунок 1. Кинетика прямой реакции связывания 125I-йодоцианопиндолола с клетками ADL-7A и A2R9 при 37 °С и концентрации лиганда 114 пМ

Кинетика обратной реакции, снятая при температуре 25 °С и 37 °С (рис. 2), демонстрирует тот факт, что за время, необходимое для проведения отмывок (около 30 минут), потеря связанной радиоактивности за счет диссоциации лиганда хотя и имеет место, но ее доля невелика.

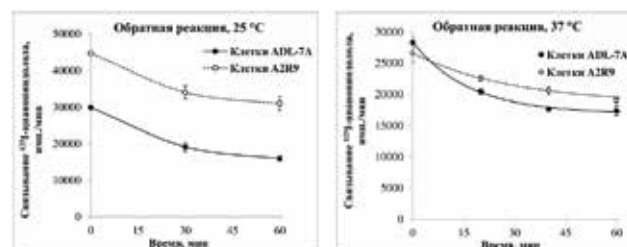


Рисунок 2. Кинетика обратной реакции диссоциации 125I-йодоцианопиндолола

Константы связывания и число рецепторов на клетку. Константы связывания 125I-йодоцианопиндолола 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 Скетчарда (рис. 3). Результаты представлены в таблице 1.

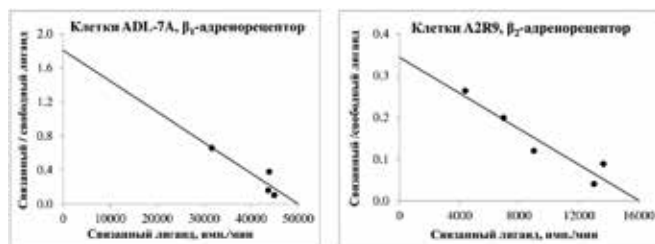


Рисунок 3. Графики Скетчарда для связывания 125I-йодоцианопиндолола с клетками ADL-7A и A2R9

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

Модельные клетки	Тип адренорецептора	Константа диссоциации Kd	Число рецепторов на клетку
ADL-7A	β_1	40 пМ	4,3к106
A2R9	β_2	16 пМ	3,7к106

Ингибирование селективными лигандами. О.Ю. Агаповой и соавт. ранее была продемонстрирована возможность определения β_2 -адренорецепторов в Т-лимфоцитах по разнице сигналов связывания 125I-йодоцианопиндолола в присутствии и в отсутствие высокоселективного лиганда-конкурента ICI 118,551 [7]. Однако попытки непосредственно 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 125I-йодоцианопиндолола с β_1 -адренорецепторами, имеет место хотя и небольшое, но заметное ингибирование связывания 125I-йодоцианопиндолола и с β_2 -адренорецепторами. А так как 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 125I-йодоцианопиндолола с клетками: 1) в отсутствие лигандов-конкурентов; 2) в присутствии лиганда ICI 118,551 в такой концентрации, которая 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 125I-йодоцианопиндолола с β_1 -адренорецепторами.

В рамках простой линейной модели связывание 125I-йодоцианопиндолола с клетками, несущими оба типа адренорецепторов, можно представить в виде суммы трех независимых компонентов: B0 — фонового связывания, не подверженного влиянию селективных лигандов; B1 — специфического связыва-

ния с β_1 -адренорецепторами; B2 — 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 [11]. В присутствии ICI 118,551 (второе измерение) связывание с β_1 -адренорецепторами будет ослаблено до уровня $k1 \cdot B1$, а с β_2 -адренорецепторами — до уровня $k2 \cdot B2$, где коэффициенты $k1$ и $k2$ характеризуют уровни остаточного связывания 125I-йодоцианопиндолола, соответственно, с β_1 - и β_2 -адренорецепторами. В присутствии обоих селективных лигандов специфическое связывание меченого йодоцианопиндолола будет описываться аналогичными величинами $k3 \cdot B1$ и $k4 \cdot B2$. В соответствии с формулой Ченга — Прусоффа [12] коэффициенты $k1$, $k2$, $k3$ и $k4$ зависят как от концентраций лигандов-конкурентов, так и от концентрации способного к связыванию 125I-йодоцианопиндолола в пробе, поэтому при проведении измерений эти концентрации должны быть фиксированы.

Таким образом, для результатов трех вышеуказанных измерений можно записать систему трех линейных уравнений и, зная коэффициенты $k1$ - $k4$, разрешить ее относительно неизвестных B0, B1 и B2. При условии малости доли связавшегося 125I-йодоцианопиндолола по отношению к его полному количеству в системе количества адренорецепторов каждого типа далее рассчитываются по приближенным формулам:

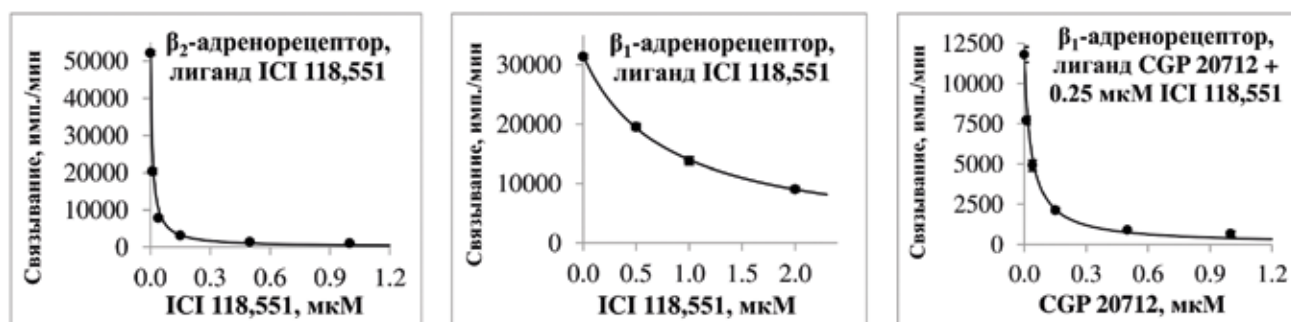
$$R1 = B1 \cdot (1 + K1/L); \quad R2 = B2 \cdot (1 + K2/L),$$

где R1 и R2 — искомые количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов, K1 и K2 — соответствующие константы связывания, L — концентрация фракции bindable 125I-йодоцианопиндолола в пробе: 400 000 (имп./мин)/мл 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 $k1$ - $k4$ приведены в таблице 2.

Таблица 2. Коэффициенты остаточного связывания в присутствии селективных лигандов-ингибиторов

Лиганды ингибиторы	β_1 -адренорецептор	β_2 -адренорецептор
0,25 мкМ ICI 118,551	$k1 = 0,76$	$k2 = 0,032$
0,25 мкМ ICI 118,551 + 0,25 мкМ CGP 20712	$k3 = 0,11$	$k4 = 0,032$

**Рисунок 4.** Кривые ингибирования лигандами-конкурентами связывания 125-йодоцианопиндолола с β_1 - и β_2 -адренорецепторами

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 участвовало в каждой смеси. Работоспособность методики оценивали по тому, насколько близки оказывались полученные значения к истинным количествам клеток обоих типов, использованным при составлении смесей.

Результаты трех типичных экспериментов представлены на рисунке 5. Эти и другие подобные эксперименты показали, что если соотношение β_1 - и β_2 -адренорецепторов составляет около 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.

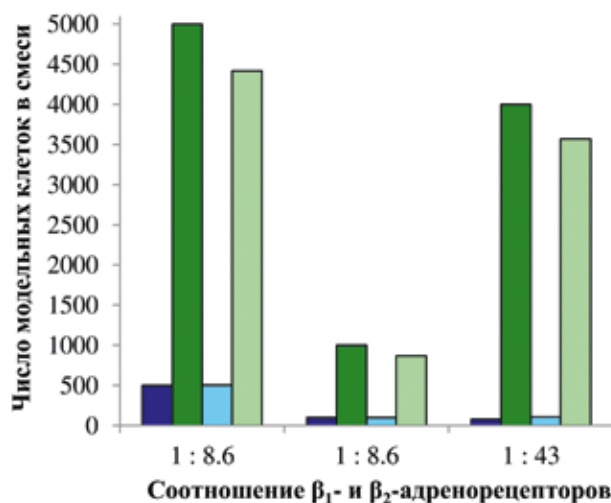


Рисунок 5. Модельное смешивание клеток ADL-7A (синие столбцы) и A2R9 (зеленые столбцы). Темный цвет — истинные количества клеток; светлый цвет — количества клеток, вычисленные по результатам эксперимента

Измерения на суспензионных клеточных культурах и РВМС 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 таблице 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 U-937 и THP-1. Что касается β_1 -адренорецепторов, то их присутствие достоверно выявлено в клетках THP-1 и под сомнением в клетках Dami. Для большинства остальных исследованных клеточных линий содержание β_1 -адренорецепторов оказалось ниже порога детекции, который в среднем можно оценить на уровне 250 молекул на клетку.

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

Клетки	Происхождение	β_1 -адренорецепторы (молекул на клетку)	β_2 -адренорецепторы (молекул на клетку)
Jurkat	Т-лимфоциты	менее 50	менее 30
MOLT-4	Т-лимфобласты	менее 150	менее 120
Daudi	В-лимфоциты	менее 30	130 ± 20
Raji	В-лимфоциты	менее 100	230 ± 60
Dami	мегакарициты	480 ± 230	250 ± 120
K-562	гранулоциты	менее 300	480 ± 200
HL-60	промиелоциты	менее 500	4000 ± 300
U-937	макрофаги	менее 800	6900 ± 900
THP-1	моноциты	23000 ± 3000	6200 ± 1800

Выполненный аналогичным образом анализ содержания β_1 - и β_2 -адренорецепторов в клетках РВМС семи здоровых доноров показал (табл. 4), что количество β_2 -адренорецепторов в этих клетках варьирует от 1000 до 2500 молекул на клетку. Присутствие β_1 -адренорецепторов в клетках РВМС ни у одного из доноров достоверно зарегистрировать не удалось. По-видимому, их количество в большинстве случаев не превышает 250 молекул на клетку и находится ниже предела чувствительности метода.

Таблица 4. Содержание β_1 - и β_2 -адренорецепторов в клетках РВМС

Донор	β_1 -адренорецепторы (молекул на клетку)	β_2 -адренорецепторы (молекул на клетку)
1	менее 200	2370 ± 120
2	(60 ± 60)	1320 ± 60
3	менее 70	1260 ± 60
4	(140 ± 160)	1890 ± 150
5	менее 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

Обсуждение

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, 13–14]. По результатам этих исследований можно заключить, что содержание β_2 -адренорецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови варьирует в диапазоне от 800 до 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 актуальной являет-

ся задача их раздельного определения. В работе A. Bundkirchen и соавт. [15] представлено одно из возможных решений этой задачи при помощи математического анализа кривых связывания 125I-йодоцианопиндолола 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 около 6 млн клеток, которые можно получить из 10–20 мл крови.

Как правило, одновременно с содержанием рецепторов получают оценки соответствующих констант диссоциации йодоцианопиндолола. В ряде работ константы диссоциации измеряли на модельных клетках, экспрессирующих тот или иной тип адренорецепторов [16–17]. Константы диссоциации для обоих типов рецепторов, по-видимому, близки между собой и заключены в пределах между 17 пМ и 53 пМ. Похожие значения, 40 пМ для β_1 -адренорецептора и 16 пМ для β_2 -адренорецептора, получены и в нашей работе.

Полученные нами на культурах суспензионных клеток данные имеет смысл сопоставить с результатами аналогичных исследований других групп авторов. G. Sager и соавт. [18] измерили содержание β_2 -адренорецепторов в клетках HL-60. Их данные — около 2000 молекул на клетку — по порядку величины сравнимы с полученным в настоящей работе значением 4000. В работе T. Muki и соавт. [19] проведен радиолигандный анализ содержания β -адренорецепторов (без дифференциации по типам) в мембранных фракциях клеток ряда линий, в том числе HL-60, U-937, K-562 и Raji. Как и следовало ожидать, β -адренорецепторы обнаружены в клетках HL-60 и U-937, причем в сравнимых количествах. Однако в клетках K-562 и Raji при-

сутствие β -адренорецепторов авторами не зарегистрировано, что расходится с результатами нашего исследования. По-видимому, порог детекции в работе T. Muki и соавт. 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 ТНР-1. В работах [5, 20] методами иммуноблоттинга и радиолигандного анализа также показано, что клетки ТНР-1 производят значительные количества β_1 - и β_2 -адренорецепторов. Таким образом, тестирование разработанной нами методики на клеточных линиях дало результаты, близкие к результатам других работ.

Вопрос о том, сколько β_1 -адренорецепторов в норме содержится в различных типах клеток крови, на сегодняшний день остается открытым. Нам удалось лишь показать, что их количество в суммарной фракции мононуклеарных клеток у большинства здоровых людей не превышает 250 молекул на клетку и не может быть достоверно измерено при помощи предложенной методики.

Заключение

По результатам настоящего исследования можно сделать вывод, что дальнейшее изучение представленности β_1 -адренорецепторов в клетках крови следует проводить на выделенных фракциях мононуклеарных клеток, из которых наиболее перспективной представляется фракция моноцитов. Альтернативным направлением может быть поиск таких заболеваний, для которых характерно значительное повышение содержания β_1 -адренорецепторов в клетках определенных типов.

Конфликт интересов не заявлен.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Michel MC, Beckeringh JJ, Ikezono K, Kretsch R, Brodde OE. Lymphocyte beta 2-adrenoceptors mirror precisely beta 2-adrenoceptor, but poorly beta 1-adrenoceptor changes in the human heart. *J Hypertens Suppl.* 1986;4(6):S215–S218.
2. Brodde OE, Kretsch R, Ikezono K, Zerkowski HR, Reidemeister JC. Human beta-adrenoceptors: relation of myocardial and lymphocyte beta-adrenoceptor density. *Science.* 1986;231(4745):1584–1585. <https://doi.org/10.1126/science.3006250>
3. Zoukos Y, Leonard JP, Thomaides T, Thompson AJ, Cuzner ML. beta-Adrenergic receptor density and function of peripheral blood mononuclear cells are increased in multiple sclerosis: a regulatory role for cortisol and interleukin-1. *Ann Neurol.* 1992;31(6):657–662. <https://doi.org/10.1002/ana.410310614>
4. Zoukos Y, Thomaides TN, Kidd D, Cuzner ML, Thompson A. Expression of beta2-adrenoceptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with primary and secondary progressive multiple sclerosis: a longitudinal six month study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(2):197–202. <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.2.197>
5. Grisanti LA, Evanson J, Marchus E, Jorissen H, Woster A, DeKrey W, Sauter E, Combs C, Porter J. Pro-inflammatory responses in human monocytes are beta1-adrenergic receptor subtype dependent. *Mol Immunol.* 2010;47(6):1244–1254. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.12.013>
6. Смолякова Е.В., Скоблов Ю.С., Скоблова Н.А., Агапова О.Ю., Амбатиелло Л.Г., Климова А.А., Кузнецова Т.В., Масенко В.П., Нистор С.Ю., Рвачева А.В., Чазова И.Е., Зыков К.А. Специфичность и селективность модифицированного радиолигандного метода оценки связывающей активности β_1 -адренорецепторов Т-лимфоцитов человека. *Биоорганическая химия.* 2019;45(3):295–301. [Smolyakova EV, Skoblov YS, Skoblova NA, Agapova OY, Ambatiello LG, Klimova AA, Kuznetsova TV, Masenko VP, Nistor SY, Rvacheva AV, Chazova IE, Zykov KA. Specificity and Selectivity of a Modified Radioligand Method for Estimating the Binding Activity of β_1 -Adrenergic Receptors in Human T-Lymphocytes. *Bioorganicheskaya Khimiya.* 2019;45(3):295–301. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S1068162019020134>
7. Агапова О.Ю., Скоблов Ю.С., Зыков К.А., Рвачева А.В., Бейлина В.Б., Масенко В.П., Чазова И.Е. Радиолигандный метод оценки рецепторной активности β -адренорецепторов Т-лимфоцитов человека. *Биоорганическая химия.* 2015;41(5):592–598. [Agapova OY, Skoblov YS, Zykov KA, Rvacheva AV, Beilina VB, Masenko VP, Chazova IE. Radioligand Method of Assessment of β -Adrenoceptor's Activity on Human T-Lymphocytes. *Bioorganicheskaya Khimiya.* 2015;41(5):592–598. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/s1068162015050027>
8. 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. Линия клеток с экспрессией рекомбинантного β_1 -адренорецептора для определения уровня аутоантител-агонистов методом конкурентного иммуноферментного анализа. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* 2015;11(4):5–14. [Shevelev AY, Kashirina NM, Kuznetsova TB, Sharf TV, Mamochkina EN, Agapova OY, Gurskaya TKh, Lipatova LN, Peklo MM, Rutkevich PN, Yanushevskaya EV, Rybalkin IN, Skoblov YS, Efremov EE, Vlasik TN, Zykov KA. Cell line expressing recombinant β_1 -adrenergic receptor for the agonistic autoantibodies detection by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *U.A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology.* 2015;11(4):5–14. (In Russ.)].
9. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The Preparation of ^{131}I -Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J.* 1963;89(1):114–123. <https://doi.org/10.1042/bj0890114>
10. Hulme EC, Trevethick MA. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol.* 2010;161(6):1219–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x>

11. Adham N, Tamm JA, Salon JA, Vaysse PJ, Weinshank RL, Branchek TA. A single point mutation increases the affinity of serotonin 5-HT1D alpha, 5-HT1D beta, 5-HT1E and 5-HT1F receptors for beta-adrenergic antagonists. *Neuropharmacology*. 1994;33(3–4):387–391. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)90068-x](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)90068-x)
12. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*. 1973;22(23):3099–3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2)
13. Brodde OE, Engel G, Hoyer D, Bock KD, Weber F. The beta-adrenergic receptor in human lymphocytes: subclassification by the use of a new radio-ligand, (+/-)-125 Iodocyanopindolol. *Life Sci*. 1981;29(21):2189–2198. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90490-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90490-2)
14. Fujii N, Homma S, Yamazaki F, et al. Beta-adrenergic receptor number in human lymphocytes is inversely correlated with aerobic capacity. *Am J Physiol*. 1998;274(6):E1106–E1112. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.274.6.E1106>
15. Bundkirchen A, Brixius K, Bolck B, Nguyen Q, Schwinger RH. Beta 1-adrenoceptor selectivity of nebivolol and bisoprolol. A comparison of [³H] CGP 12.177 and [¹²⁵I]iodocyanopindolol binding studies. *Eur J Pharmacol*. 2003;460(1):19–26. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02875-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02875-3)
16. Tate KM, Briend-Sutren MM, Emorine LJ, Delavier-Klutcho C, Marullo S, Strosberg AD. Expression of three human beta-adrenergic-receptor subtypes in transfected Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem*. 1991;196(2):357–361. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15824.x>
17. Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN. Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes – characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(2):151–159. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0860-y>
18. Sager G, Bang BE, Pedersen M, Aarbakke J. The human promyelocytic leukemia cell (HL-60 cell) beta-adrenergic receptor. *J Leukoc Biol*. 1988;44(1):41–45. <https://doi.org/10.1002/jlb.44.1.41>
19. Muki T, Andersson LC, Kontula KK. Expression and function of beta-adrenergic receptors in human hematopoietic cell lines. *Eur J Haematol*. 1992;49(5):263–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1992.tb00059.x>
20. Talmadge J, Scott R, Castelli P, Newman-Tarr T, Lee J. Molecular pharmacology of the beta-adrenergic receptor on THP-1 cells. *Int J Immunopharmacol*. 1993;15(2):219–228. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(93\)90098-j](https://doi.org/10.1016/0192-0561(93)90098-j)