

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036081**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.23

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)

(21) Номер заявки
201800542

(22) Дата подачи заявки
2018.11.01

**(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЙ РАДИОЛИГАНДНЫЙ СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ
ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА
ПОВЕРХНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

(43) 2020.05.31

(96) 2018000130 (RU) 2018.11.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ПУЛЬМОНОЛОГИИ"
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО
АГЕНТСТВА (ФГБУ "НИИ
ПУЛЬМОНОЛОГИИ" ФМБА
РОССИИ); ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ "МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИКО-
СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А.И.
ЕВДОКИМОВА" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ГБОУ ВПО МГМСУ ИМ. А.И.
ЕВДОКИМОВА МИНЗДРАВА
РОССИИ); ФЕДЕРАЛЬНОЕ**

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
КАРДИОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ
"НМИЦК" РОССИИ) (RU)**

(72) Изобретатель:
**Зыков Кирилл Алексеевич,
Смолякова Екатерина Владимировна,
Скоблов Юрий Самойлович,
Скоблова Наталья Александровна,
Масенко Валерий Павлович,
Амбатьелло Лали Гурамовна, Рвачёва
Анна Валерьевна, Чазова Ирина
Евгеньевна (RU)**

(56) ЕА-В1-26837
О.Ю. Агапова, Ю.С. Скоблов, К.А. Зыков,
А.В. Рвачева, В.Б. Бейлина, В.П. Масенко,
И.Е. Чазова. Радиолигандный метод оценки
рецепторной активности β -адренорецепторов т-
лимфоцитов человека. БИООРГАНИЧЕСКАЯ
ХИМИЯ, 2015, том 41, № 5, с. 592-598, ФГУП
"Издательство "Наука", весь документ.

(57) Изобретение относится к области медицины и обеспечивает модифицированный радиолигандный способ количественной оценки активности связывания β -адренорецепторов (β -АР) на поверхности Т-лимфоцитов человека, позволяющий достоверно определять специфическое связывание с β 1- и β 2-адренорецепторами при их малых концентрациях, на основе которого могут быть выполнены анализы для клинических исследований. Способ включает стадию предынкубации среды, содержащей Т-лимфоциты, с лигандом, специфическим по отношению к β 1 и β 2-АР, с последующим взаимодействием с $[^{125}\text{I}]$ цианопиндололом. Техническим результатом является существенное повышение чувствительности анализа в отношении активности связывания β 1-АР, а также возможность выявления характерных паттернов изменения характеристик β -АР звена под влиянием предынкубации со специфическими лигандами.

B1

036081

036081

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины. Более конкретно, изобретение обеспечивает модифицированный радиолигандный способ количественной оценки активности связывания β -адренорецепторов (β -АР) на поверхности Т-лимфоцитов человека, позволяющий достоверно определять специфическое связывание с β 1- и β 2-адренорецепторами при их малых концентрациях, на основе которого могут быть выполнены анализы для клинических исследований.

Предшествующий уровень техники

В структуре неинфекционной патологии наибольшее значение имеют сердечно-сосудистая и бронхо-легочная патологии. Заболевания сердечно-сосудистой системы находятся на первом месте среди причин заболеваемости и смертности, как в России, так и в других странах мира [Чазова И.Е., Чучалин А.Г., Зыков К.А., Ратова Л.Г. // Системные гипертензии. 2013. 10 (1) с. 5-35].

Среди бронхо-легочных патологий особого внимания требуют бронхообструктивные заболевания. [Global Initiative for Asthma (GINA) (updated 2014); Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (GOLD). Update 2014.] Многим пациентам, имеющим данные патологии, необходимо назначение препаратов, воздействующих на β -адренорецепторы.

Адренорецепторы по своей структуре относятся к группе рецепторов, соединенных с гуанин-нуклеотид связывающими белками (G-белок). Анатомически β -адренорецепторы подразделяются на β 1-, β 2- и β 3-адренорецепторы, среди которых для диагностики и лечения сердечно-сосудистых и бронхо-легочных заболеваний наиболее значимы следующие:

- 1) β 1-адренорецепторы, максимальное количество которых обнаруживают в правом предсердии;
- 2) β 2-адренорецепторы, которые присутствуют преимущественно в легких [Sano M, Yoshimasa T., Yagura T., Yamamoto I. Life Sci. 1993. v.52 (12). P.1063-70].

При заболеваниях легких часто в основе терапии лежат β -адреномиметики, а при сердечно-сосудистых заболеваниях - β -адреноблокаторы, которые для соответствующих рецепторов являются лигандами. Изменения экспрессии и аффинности рецепторов, происходящие под воздействием соответствующих препаратов, часто приводят к снижению эффективности назначенной терапии и в ряде случаев к развитию серьезных побочных эффектов, таких как увеличение частоты сердечных сокращений, удлинение интервала QT, снижение уровня калия, бронхоспазм и др.

Взаимодействие лиганд-рецептор зависит от типа лиганда (агонист или обратный агонист) и проявляется в изменении клеточной активности. Агонисты, связываясь с рецептором, активируют G-белок и увеличивают внутриклеточное содержание циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Одновременно с возникновением клинического эффекта данные изменения в клетке также вызывают изменение активности рецептора. Зачастую назначение агонистов приводит к снижению чувствительности к лиганду и десенситизации рецепторов [Mickey J., Tate R., Lefkowitz R.J.J. Biol: Chem. 1975. №250. P. 5727-5729; Perkins J.P., Waldo G.L., Harden T.K. Federation Proc. 1982. V. 41. P. 1327], что в ряде случаев вызывает неблагоприятное изменение клинического течения заболевания в виде утяжеляющейся бронхиальной обструкции и отсутствии ответа на проводимую терапию. Применение антагонистов, напротив, приводит к повышению плотности β -адренорецепторов [Парфенова Е.Ф., Красникова Т.Л., Арипова Н.А. и др. Гер. Архив. 1993. 65 (4). с. 49-52] на поверхности клеток млекопитающих и может повлиять на их аффинность.

Изменения рецепторной активности отмечаются не только под воздействием фармакологических препаратов. Отмечено, что при заболеваниях сердечно-сосудистой и бронхо-легочной систем имеется уже исходно измененный фон активности рецепторов. У пациентов с наличием желудочковой экстрасистолии количество β 2-адренорецепторов на лимфоцитах периферической крови статистически выше, чем у группы нормы [Красникова Т.Л., Юркова В.Б., Кузьмина М.М. и др. Кардиология. 1989. №7. С.25-29].

У пациентов с артериальной гипертонией также отмечается статистически значимо повышенная экспрессия β 2-адренорецепторов по отношению к норме, которая, кроме того, коррелирует с тяжестью заболевания. При этом наличие у последних сердечной недостаточности приводит к снижению показателя максимального связывания β 2-лигандов. [Qing F., Rahman S.U., Rhodes C.G. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997. 155(3). P. 1130-1134].

При обследовании пациентов с обструктивной патологией легких отмечаются противоречивые данные: в одних источниках сообщается об исходно низкой плотности β 2-рецепторов на поверхности клеток крови, тогда как другие не отмечают связи изменения плотности рецепторов на поверхности клеток крови с наличием бронхиальной астмы [P.G. Stanley, L. Duriseti, Sh. Underwood, S. Allred, P.A. Insel. J. Clin. Invest. 1980. V. 65 (3). P.577-585].

Для определения рецепторной активности в последние десятилетия разработан ряд как прямых, так и косвенных методов: оценка изменения аффинности, экспрессии рецепторов, а также их активности за счет изменения вторичных мессенджеров.

Методы связывания с радиоактивными лигандами позволяют дать оценку интересующих параметров рецепторов как исходно, так и на фоне применения препаратов, влияющих на β -адренорецепторы, а также позволяют определить их аффинность [Blankesteijn W. M., Graafsma S. J., Hectors M. P. Y. et al. Eur.

J. Clin. Pharmacol. 1992. 42(6). P. 613-8]. Плотность поверхностных β -адренорецепторов определяют методом специфического связывания с использованием специфического лиганда, меченого радиоактивным изотопом ^{125}I или ^3H . Неспецифическое связывание определяют при добавлении значительного избытка немеченого лиганда. Специфическое связывание лиганда с рецептором рассчитывают по разности общего и неспецифического связывания, плотность рецепторов и константу диссоциации определяют в координатах Скэтчарда, используя коэффициент линейной регрессии. По кривым вытеснения меченого лиганда рассчитывают константу диссоциации "рецептор-лиганд" по формуле Ченга-Пруссова [Williams L. T., Snyderman R., Lefkowitz R.J.J. Clin. Invest. 1976, v.57 (1). Pp. 149-55; Красникова Т.Л., Коричнева И.Л., Радюхин В.А. Биохимия. 1989. 54 (2), с. 235-243].

Однако описанный традиционный радиолигандный метод определения количества и аффинности β -адренорецепторов является трудоемким, дорогостоящим и требует забора большого количества крови, особенно при исследовании влияния препаратов. Последнее наиболее существенно при оценке динамики влияния препаратов, воздействующих на β -адренорецепторы, что делает этот метод малоприменимым в условиях реальной клинической практики.

Наиболее близким, по сути, техническим решением является способ селективной количественной оценки активности связывания β -адренорецепторов на поверхности лейкоцитов человека, раскрытый в патентной публикации ЕА 026837 (опубл. 31.05.2017), при осуществлении которого для оценки активности связывания β 1-адренорецепторов по специфическому связыванию [^{125}I]цианопиндолола с клетками определяют разность связывания [^{125}I]цианопиндолола клетками в присутствии 1,5-2,0 мкМ нерадиоактивного цианопиндолола и связывания [^{125}I]цианопиндолола клетками в присутствии 0,20-0,28 мкМ β 1-специфического лиганда CGP-20712 (химическое название - дигидрохлорид [2-((3-карбамоил-4-гидрокси)фенокси)этиламино]-3-[4-(1-метил-4-триформетил-2-имидазоллил)фенокси]-2-пропанола), для чего реакционную смесь, содержащую водный раствор [^{125}I]цианопиндолола, фосфатный буферный раствор (PBS), раствор немеченого лиганда (цианопиндолола или CGP-20712) и суспензию клеток инкубируют в течение 45-60 мин при 37°C при осторожном перемешивании, процесс останавливают добавлением ледяной воды (холодная вода со льдом), клетки центрифугируют при 1800-2000g в течение 10-12 мин, супернатант отбрасывают, осадок осторожно суспендируют в холодном (+4°C) PBS и вновь центрифугируют при тех же условиях, супернатант отбрасывают и осадок осторожно суспендируют в холодном PBS и центрифугируют при 10000-12000g в течение 2-3 мин, супернатант отбрасывают, а осадок просчитывают на γ -счетчике, измеряя количество радиоактивного материала в каждой пробе, после чего вычисляют активность связывания β 1-адренорецепторов по разности общего связывания и β -специфического связывания цианопиндолола, отнесенное на 1 млн клеток.

Для количественной селективной оценки активности связывания β 2-адренорецепторов определяют разность связывания [^{125}I]цианопиндолола клетками в присутствии 1,5-2,0 мкМ нерадиоактивного цианопиндолола и связывания [^{125}I]цианопиндолола клетками в присутствии 0,14-0,18 мкМ β 2-специфического лиганда ICI 118551 (химическое наименование гидрохлорид (\pm)-эритро-(S*,S*)-1-[2,3-(дигидро-7-метил-1H-инден-4-ил)окси]-3-[(1-метилэтил)амино]-2-бутанола), для чего реакционную смесь, содержащую водный раствор [^{125}I]цианопиндолола, фосфатный буферный раствор (PBS), раствор немеченого лиганда (цианопиндолола или ICI 118551) и суспензию клеток инкубируют в течение 45-60 мин при 37°C при осторожном перемешивании, процесс останавливают добавлением ледяной воды (холодная вода со льдом), клетки центрифугируют при 1800-2000g в течение 10-12 мин, супернатант отбрасывают, осадок осторожно суспендируют в холодном (+4°C) PBS и вновь центрифугируют при тех же условиях, супернатант отбрасывают и осадок осторожно суспендируют в холодном PBS и центрифугируют при 10000-12000g в течение 2-3 мин, супернатант отбрасывают, а осадок просчитывают на γ -счетчике, измеряя количество радиоактивного материала в каждой пробе, после чего вычисляют активность связывания β 2-адренорецепторов по разности общего связывания и β -специфического связывания цианопиндолола, отнесенное на 1 млн клеток.

Недостатком ближайшего аналога является низкая чувствительность в отношении β 1-адренорецепторов. Таким образом, существует потребность в разработке усовершенствованного метода радиолигандного анализа, который был бы, по существу, лишен недостатка решения, известного из уровня техники.

В соответствии с изобретением предложен способ радиолигандного определения активности связывания β 1- и β 2-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека, для осуществления которого проводят

- а) забор у объекта крови из периферической вены;
- б) выделение Т-лимфоцитов общепринятым способом;
- в) постановку четырех параллельных анализов с добавлением в каждом из них 100 мкл [^{125}I]цианопиндолола;
- г) инкубацию в течение 25-30 мин при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин;
- д) остановку реакции добавлением холодной воды;
- е) центрифугирование реакционной массы при 2000 g в течение 10-12 мин с отбрасыванием супернатанта;

ж) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием в тех же условиях с отбрасыванием супернатанта;

з) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием при 10000-12000 г в течение 2-3 мин с отбрасыванием супернатанта;

и) просчитывание осадка на γ -счетчике для измерения количества радиоактивного материала в каждой пробе и

м) вычисление активности связывания β 1-адренорецепторов по разности общего связывания и β -специфического связывания цианопиндолола, отнесенного на 1 млн клеток, отличающийся тем, что при постановке четырех параллельных анализов в первом из них к среде, содержащей Т-лимфоциты, добавляют воду, во втором в избытке добавляют "холодный" цианопиндолол, в третьем добавляют β 1-АР лиганд CGP 20712, в четвертом добавляют β 2-АР лиганд ICI 118551 и проводят предынкубацию каждого анализируемого образца в течении 25-30 мин при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин;

н) вычисление активности связывания β 2-адренорецепторов по разности общего связывания и β -специфического связывания цианопиндолола, отнесенного на 1 млн клеток, отличающийся тем, что при постановке четырех параллельных анализов в первом из них к среде, содержащей Т-лимфоциты, добавляют воду, во втором в избытке добавляют "холодный" цианопиндолол, в третьем добавляют β 1-АР лиганд CGP 20712, в четвертом добавляют β 2-АР лиганд ICI 118551 и проводят предынкубацию каждого анализируемого образца в течении 25-30 мин при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин.

Перечень чертежей

На фиг. 1 представлены гистограммы активности связывания β -адренорецепторов Т-лимфоцитов здоровых добровольцев и добровольцев, страдающих заболеваниями.

На фиг. 2 представлен график зависимости процента связывания [125 I]цианопиндолола клетками ADL-7A в присутствии CGP-20712 от концентрации последнего.

На фиг. 3 представлен график зависимости процента связывания [125 I]цианопиндолола клетками A2R9 в присутствии ICI 118551 от концентрации последнего.

На фиг. 4 представлены гистограммы активности связывания β 1-АР и β 2-АР Т-лимфоцитов в случаях проведения предынкубации и без проведения предынкубации.

Сущность изобретения

В качестве ближайшего аналога авторами настоящего изобретения был предложен способ оценки активности связывания β -1- и β -2-адренорецепторов, основанный на вытеснении из клеточных рецепторов меченого иодом-125 цианопиндолола, неспецифически связывающегося с несколькими типами рецепторов, лигандами с высокой специфичностью к адренорецепторам: CGP-20712 и ICI 118551. Была отмечена взаимосвязь β 2-АР с другими клиническими и лабораторными параметрами, имеющими доказанное клиническое значение. При этом активность связывания β 1-АР лимфоцитов была на крайне низком уровне, примерно в 10-20 раз ниже активности связывания β 2-АР этих же клеток. Поэтому ранее полученные результаты по активности связывания β 1-АР Т-лимфоцитов не были всесторонне проанализированы из-за их малой достоверности.

Однако в ходе продолжающихся исследований с Т-лимфоцитами лиц, страдающих сочетанной кардиореспираторной патологией, авторами было выявлено, что для некоторых типов кардиологических патологий характерна чрезвычайно высокая активность связывания β 1-адренорецепторов Т-лимфоцитов. Это явилось основанием для повторного рассмотрения вопроса специфичности и достоверной селективности предложенного ранее способа анализа, а также обусловило необходимость разработки модифицированного способа с целью увеличения достоверности получаемых результатов по активности связывания β 1-адренорецепторов Т-лимфоцитов.

В контексте настоящего изобретения активность связывания клеточных β -АР определяется как специфическое связывание меченого лиганда в определенных стандартизированных условиях. Так как для определения активности связывания основным измеряемым параметром является количество связанного с рецептором радиоактивного лиганда, считается, что для количественной оценки удобнее использовать величину имп/мин-млн клеток. Это позволяет проводить количественные сравнения изменений активности связывания как под действием различных внешних факторов, так и в динамике.

К сожалению, [125 I]цианопиндолол не обладает высокой специфичностью в отношении различных β -АР. По некоторым данным константы связывания для β 1- и β 2-адренорецепторов из разных источников колеблются в диапазоне 7-40 пМ (Engel G., Hoyer D., Berthold R., Wagner H.//Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 1981. Vol. 317(4). Pp. 277-285). Это привело к идее использовать для селективного определения β 1- и β 2-адренорецепторов специфические лиганды CGP-20712 и ICI 118551, впервые опубликованной в 1989 году (Tsuchihashi H., Nagatomo T, Imai S. // J. Pharmacobiodyn. 1989 Vol. 12(9). Pp. 509-516).

Однако такой подход сложно использовать для определения активности связывания β 1-АР лимфоцитов. Количество β 1-АР на поверхности лимфоцитов слишком мало, и специфический β 1-лиганд CGP-20712 не может специфически вытеснить [125 I]цианопиндолол из β 1-АР просто из-за их слишком незначительного количества. У здоровых добровольцев (фиг. 1А, образцы 1, 2, 3) активность связывания β 1-АР

весьма низкая и находится на уровне, не превышающем 0.1 фмоль (10^{-16} моль) рецепторов на 1 млн Т-лимфоцитов, или примерно 60 рецепторов на клетку. У пациентов с бронхо-легочной патологией (фиг. 1А, образцы 4, 5, 6) этот уровень значимо выше. У пациентов с идиопатическими нарушениями сердечного ритма (фиг. 1Б) активность связывания β 1-адренорецепторов существенно выше, на уровне 1-1,5 фмоль на 1 млн. клеток, и сопоставима с активностью связывания β 2-АР. Этот факт обуславливает важность разработки высокочувствительного способа определения активности связывания β 1-АР как клинического показателя.

Для подтверждения специфичности ранее предложенного метода были проведены эксперименты по вытеснению меченого [125 I]цианопиндолола из клеточных рецепторов линии ADL-7А лигандом CGP-20712 в различных концентрациях (фиг. 2). Аналогичная серия экспериментов по вытеснению меченого [125 I]цианопиндолола лигандом ICI 118551 в различных концентрациях была проведена для линии А2R9 (фиг. 3).

Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что изменение порядка прибавления реагентов в инкубационную смесь резко увеличивает активность связывания β 1-адренорецепторов, а также дает возможность выявления характерных паттернов изменения характеристик β -АР звена под влиянием предварительной инкубации со специфическими лигандами. В контексте настоящего изобретения такая процедура называется "предынкубацией". Было предложено сначала инкубировать клетки со специфическими лигандами CGP-20712 или ICI 118551, а затем добавлять меченый [125 I]цианопиндолол. Результаты этих экспериментов на клетках ADL-7А и А2R9 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Клетки	Количество связанной радиоактивности, имп/мин·млн клеток					% связывания от максимального	
	Без лиганда	с CGP-20712		с ICI 118551		Без ПИ	ПИ
		Без ПИ	ПИ	Без ПИ	ПИ		
ADL-7А	53392	–	–	–	–	100	–
ADL-7А	–	17059	11846	–	–	32	22
ADL-7А	–	–	–	41335	52391	78	98
А2R9	55978	–	–	–	–	100	–
А2R9	–	54296	52391	–	–	97	92
А2R9	–	–	–	7293	12445	13	22

ПИ - предынкубация

Интересно, что предынкубация клеток с CGP-20712 (β 1-специфический лиганд) активирует клеточные β 1-АР, но в то же время предынкубация с ICI 118551 (β 2-специфический лиганд) существенных изменений в активность связывания β 2-АР не вносит.

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что CGP-20712, даже в очень высокой концентрации (0,44 мкМ), практически не вытесняет [125 I]цианопиндолол из клеточных β 2-АР: вытеснение составляет около 3%. Это подтверждает специфичность предложенного модифицированного способа анализа, т.к. выбранная концентрация CGP-20712 будет оказывать минимальное влияние на активность связывания радиоактивного лиганда β 2-АР Т-лимфоцитами. В то же время лиганд ICI 118551 в высокой концентрации на уровне 0,32 мкМ частично (около 20%) вытесняет [125 I]цианопиндолол из клеточных лимфоцитарных β 1-АР. Впрочем, для селективного определения активности связывания β 1-АР Т-лимфоцитов, это искажение количественной оценки не превысит 10% даже для лиц с чрезвычайно высокой активностью связывания β 1-АР Т-лимфоцитов, наблюдаемой при редких патологиях.

Таким образом, предложенный модифицированный способ определения активности связывания β 1- и β 2-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека позволяет неожиданным образом преодолеть недостаток известного уровня техники с достижением технического результата изобретения - существенного повышения чувствительности определения активности связывания β 1-АР.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Материалы.

Для анализа применяют специфические лиганды: CGP-20712 (β 1-адреноблокатор), ICI 118551 (β 2-адреноблокатор) и цианопиндолол, полученные от фирмы Sigma (США). Радиоактивный изотоп [125 I] в виде иодида натрия с молярной активностью более 2000 Ки/ммоль получен от фирмы В/О "Изотоп" (Российская Федерация). Остальные реактивы, использованные в исследованиях, были квалификации не ниже ч.д.а.

Характеристика пациентов.

Все включенные добровольцы перед включением в исследование подписывают информированное

согласие в соответствии со всеми правилами этического положения Хельсинской декларации и Национальным стандартом Российской Федерации "Надлежащая клиническая практика" ГОСТ Р 52379-2005.

В исследование включены 11 добровольцев: 3 добровольца без сердечно-сосудистой и бронхолегочной патологий; 3 пациента с бронхиальной астмой средней степени тяжести контролируемого течения; 5 пациентов с нарушением ритма сердца (идиопатической аритмией).

Все добровольцы имеют возраст старше 18 лет и не принимают препараты, воздействующие на β -адренорецепторы. Участвующие проходят врачебный осмотр, обследование с помощью стандартных методик оценки состояния сердечно-сосудистой и бронхолегочной систем перед забором крови. Пациенты с бронхиальной астмой в течение 48 ч не принимают длительно действующие β 2-агонисты и М-холинолитические препараты, а короткодействующие - в течение 12 ч до исследования.

Исследование β 1-адренорецепторов проводят у 3 здоровых добровольцев и 3 пациентов с бронхолегочной патологией. Определение активности связывания β 2-адренорецепторов проводят у 5 добровольцев с сочетанной кардиореспираторной патологией.

Получение [125 I]цианопиндолола.

Введение радиоактивного изотопа 125 I в молекулу цианопиндолола проводят модифицированным способом, описанным в статье Greenwood F.C, Hunter W.M. The preparation of labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 1963, 89(1). P. 114-123.

Реакционная смесь для радиоiodирования содержит 1 мкг цианопиндолола, 0,2М калий-фосфатный буфер (рН 7,0), 1 мКи Na^{125}I в объеме 50 мкл. Реакцию иницируют добавлением 10 мл раствора хлорамин Т (10 мг/мл). Длительность инкубации при комнатной температуре составляет 1 мин. Реакцию останавливают добавлением 10 мкл тиосульфата натрия (20 мг/мл) и после 5 мин инкубации при комнатной температуре добавляют 1 мкл раствора "холодного" йодида натрия (6 мг/мл).

Целевой продукт выделяют ВЭЖХ (хроматограф производства фирмы Gilson, Франция) на колонке Nucleosil 100 C-18 (5 мкм, 150 мм) в ион-парном режиме. Буфер А: 10% уксусная кислота, буфер Б: 100% ацетонитрил. Элюирование осуществляют градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 100% за 20 мин с расходом 0,5 мл/мин. Детектирование элюата производят по УФ-поглощению при 280 нм и по проточному детектору радиоактивности. Фракции, содержащие [125 I]цианопиндолол, объединяют, выпаривают досуха, растворяют в 70% этаноле и хранят при -20°C .

Забор крови и выделение клеток.

Кровь пациента из периферической вены забирают в 2 вакуумные пробирки S-Monovette EDTA KE (Sarstedt, Германия) объемом 9 мл. Кровь отстаивают 60 мин при комнатной температуре до осаждения эритроцитов. Далее используют плазму, обогащенную лейкоцитами.

Плазму из двух пробирок (18 мл) отбирают и аккуратно наслаивают на 15 мл Histopaque-1077 (Sigma, США; кат. № H8889), содержащегося в пробирке объемом 50 мл. Для работы используют стерильные пробирки, стерильные пипетки или пипетки с дозатором. Проводят центрифугирование при комнатной температуре в течение 25 мин на центрифуге с горизонтальным ротором при 400 g. После центрифугирования собирают интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки (лимфоциты) в чистые пробирки объемом 50 мл.

Суспензию лимфоцитов однократно отмывают 30 мл буфера PBS (фосфатно-солевой буфер, рН 7,2, 2мМ ЭДТА; autoMACS Rinsing solution, Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-091-222) и центрифугируют 10 мин при 400 g. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в 500 мкл буфера PBS и переносят в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки эппендорф, используя автоматическую пипетку и наконечники с фильтром. Центрифугируют 10 мин при 400 g при комнатной температуре. Надосадочную жидкость аккуратно удаляют.

Осадок из пробирок используют для выделения Т-лимфоцитов с помощью набора Pan T cell isolation kit (human) (Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-096-535), согласно инструкции к набору. Для этого осадок в пробирке ресуспендируют в 40 мкл буфера PBS-BSA и добавляют 10 мкл смеси антител (Pan T Cell Biotin Antibody Cocktail), хорошо перемешивают и инкубируют 7 мин в холодильнике при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$. В пробирку к полученной смеси добавляют 30 мкл буфера PBS-BSA и 20 мкл магнитных частиц (Pan T Cell MicroBead Cocktail), аккуратно перемешивают и инкубируют 15 мин в холодильнике при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$. Далее в пробирку добавляют 500 мкл буфера PBS-BSA, перемешивают и пропускают полученные суспензии через магнитные колонки, заранее промытые буфером PBS-BSA. Магнитную сепарацию проводят с применением сепаратора OctoMACS (Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-042-201) согласно инструкции производителя. Проходящий раствор (Т-клетки) собирают в пробирку.

500 мкл раствора из пробирки переносят в эппендорф, добавляют 500 мкл питательной среды 199, хорошо перемешивают. Из полученного объема (1 мл) отбирают 10 мкл в отдельный эппендорф для подсчета клеток (приблизительно 10^6 клеток/мл). Полученные клетки хранят в холодильнике при 4°C в течение не более 24 ч до использования в радиолигандном анализе.

Предынкубация со специфическими лигандами.

В четыре отдельно взятых эппендорфа помещают (1) 10 мкл воды, (2) 10 мкл водного раствора "холодного" цианопиндолола с концентрацией в интервале $10^{-6}-10^{-8}$ М, содержащего избыток "холодного"

цианопиндолола, (3) 10 мкл 0,20-0,28 мкМ β1-специфического лиганда CGP-20712 (химическое название дигидрохлорид [2-((3-карбамоил-4-гидрокси)фенокси)этиламино]-3-[4-(1-метил-4-трифторметил-2-имидазоллил)фенокси]-2-пропанола) и (4) 10 мкл 0,14-0,18 мкМ β2-специфического лиганда ICI 118551 (химическое название - гидрохлорид (±)-эрито-(S*,S*)-1-[2,3-(дигидро-7-метил-1H-инден-4-ил)окси]-3-[(1-метилэтил)амино]-2-бутанола), фосфатный буферный раствор (PBS) и 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 5-10 млн/мл. Смеси предынкубируют в течение 25-30 мин при 37°C и осторожном перемешивании на шейкере со скоростью 100 об/мин. Процесс останавливают добавлением ледяной воды (холодная вода со льдом), клетки центрифугируют при 1800-2000 g в течение 10-12 мин, супернатант отбрасывают, осадок осторожно суспендируют в холодном (+4°C) PBS и вновь центрифугируют в тех же условиях. Супернатант отбрасывают и осадок осторожно суспендируют в холодном PBS, центрифугируют при 10000-12000 g в течение 2-3 мин и отбрасывают супернатант.

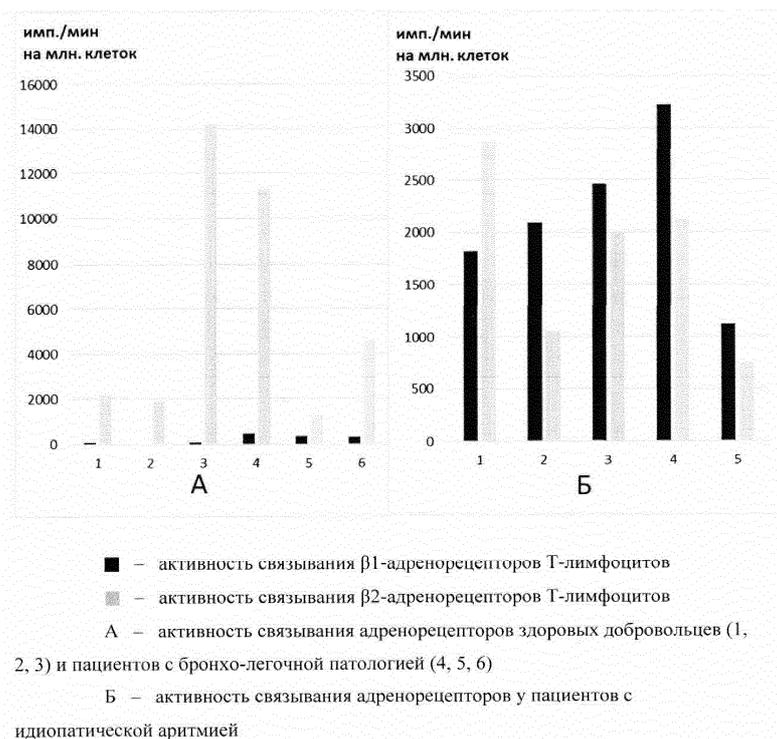
Радиолигандный анализ активности связывания β-адренорецепторов.

Для экспериментов с предынкубацией каждый из осадков (1)-(4) после центрифугирования разбавляют буфером PBS с 0,1% BSA до концентрации 10 млн/мл и 100 мкл клеточной суспензии инкубируют в течение 25-30 мин при 37°C и осторожном перемешивании на шейкере со скоростью 100 об/мин. Затем в реакционную смесь добавляют 100 мкл раствора [¹²⁵I]цианопиндолола в буфере PBS с концентрацией 1000 имп/мин-мкл и инкубируют еще 25-30 мин. Процесс останавливают добавлением в каждую пробу по 400 мкл ледяной воды (холодная вода со льдом). Для отмывки от не связавшейся радиоактивности клетки центрифугируют при 2000 g в течение 10 мин, осадок трижды промывают суспендированием в 200 мкл холодного буфера PBS и центрифугированием в тех же условиях, после чего просчитывают на γ-счетчике Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer, США). Вычисляют активность связывания β1- и β2-адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенное на 1 млн клеток.

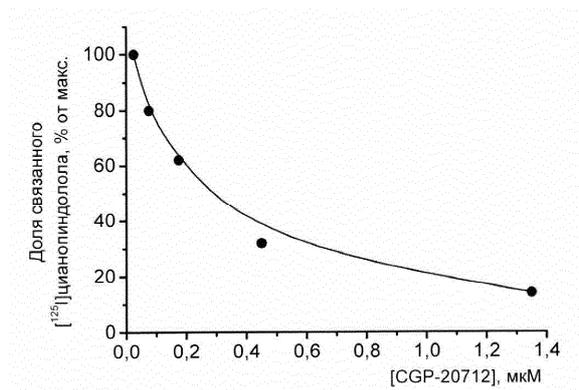
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ радиолигандного определения активности связывания β1-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека, для осуществления которого проводят

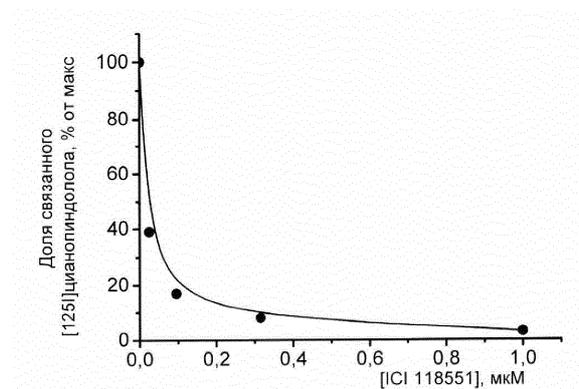
- а) забор у объекта крови из периферической вены;
- б) выделение Т-лимфоцитов общепринятым способом;
- в) постановку четырех параллельных анализов, при этом в первом из них к среде, содержащей Т-лимфоциты, добавляют воду, во втором в избытке добавляют "холодный" цианопиндолол, в третьем добавляют β1-АР лиганд CGP 20712, в четвертом добавляют β2-АР лиганд ICI 118551;
- г) инкубацию в течение 25-30 мин при 37°C и скорости движения шейкера 100 об/мин;
- д) добавление ко всем четырем предварительно инкубированным реакционным смесям по 100 мкл [¹²⁵I]цианопиндолола;
- е) остановку реакции добавлением холодной воды;
- ж) центрифугирование реакционной массы при 2000 g в течение 10-12 мин с отбрасыванием супернатанта;
- з) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием в тех же условиях с отбрасыванием супернатанта;
- и) суспендирование осадка в холодном (+4°C) буфере PBS с последующим центрифугированием при 10000-12000 g в течение 2-3 мин с отбрасыванием супернатанта;
- к) просчитывание осадка на γ-счетчике для измерения количества радиоактивного материала в каждой пробе и
- л) вычисление активности связывания β1-адренорецепторов по разности общего связывания и бета-специфического связывания цианопиндолола, отнесенного на 1 млн клеток.



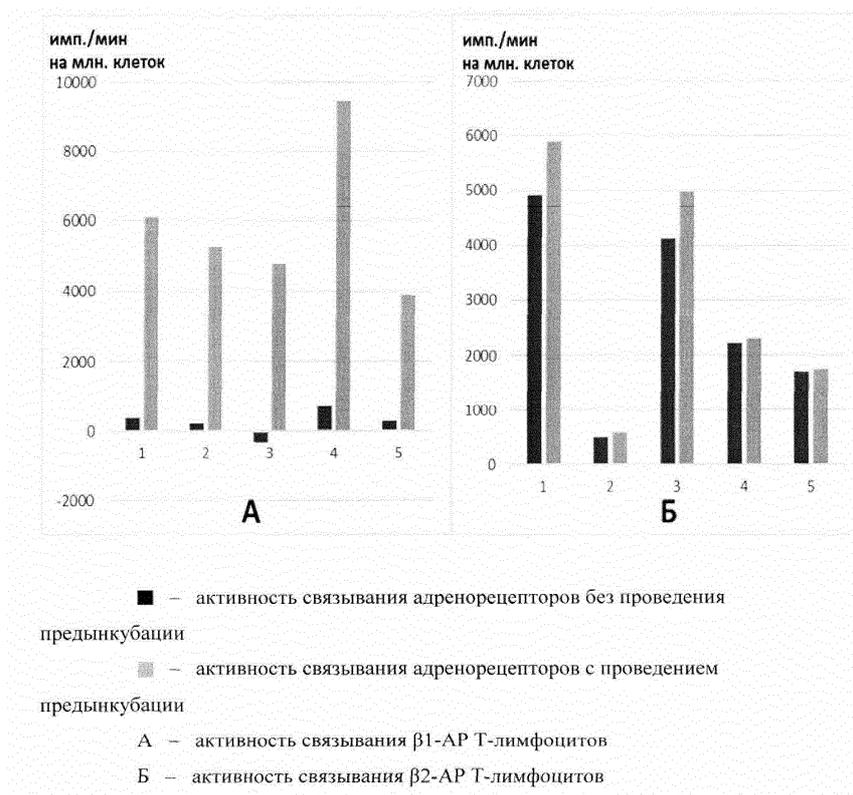
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

