

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ПУЛЬМОНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**РАДИОЛИГАНДНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ
АКТИВНОСТИ БЕТА2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ Т-
ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ОЦЕНКИ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОГО
БЕТА-АГОНИСТА ИЛИ М-ХОЛИНОЛИТИКА У
СПОРТСМЕНОВ С ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬЮ
БРОНХОВ**

Методические рекомендации

Москва 2019

Утверждены Ученым советом ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства» и рекомендованы к изданию (протокол № 9/19 от 26 сентября 2019 г.). Введены впервые.

В *методических рекомендациях* изложен разработанный в ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России метод радиолигандного тестирования активности бета2-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека для оценки эффективности применения селективного бета-агониста или М-холинолитика у спортсменов с гиперреактивностью бронхов, занимающихся циклическими видами спорта. Настоящие методические рекомендации предназначены для врачей по спортивной медицине и врачей других специальностей, работающих в области физической культуры и спорта, заведующих отделениями и кабинетами спортивной медицины, массажистов, а также аспирантов, ординаторов и студентов медицинских вузов и других специалистов, непосредственно участвующих в медицинском и медико-биологическом обеспечении спортсменов.

Методические рекомендации по радиолигандному тестированию активности бета2-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека для оценки эффективности применения селективного бета-агонистов или М-холинолитиков у спортсменов с гиперреактивностью бронхов разработаны: Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-исследовательским институтом пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации (Под редакцией профессора РАН, д.м.н. К.А. Зыкова. Авторы: д.х.н. Ю.С. Скоблов, А.В.Еременко, Е.В. Смолякова, к.м.н. А.В. Черняк).

Настоящие методические рекомендации не могут быть полностью или частично воспроизведены, тиражированы и распространены без разрешения Федерального медико-биологического агентства

Оглавление	стр
Введение	4
1. Бронхиальная гиперреактивность у спортсменов. Общие сведения: патогенез, факторы риска и принципы диагностики.	6
2. Рекомендации по выявлению бронхиальной гиперреактивности у спортсменов сборных команд Российской Федерации	16
3. Комплексное обследование респираторной функции для выявления бронхиальной гиперреактивности	17
4. Методы оценки характеристик адренорецепторного аппарата	17
4.1 Косвенные методы	20
4.2 Прямые методы	21
4.3. Новый модифицированный радиолигандный метод определения активности связывания бета-адренорецепторов	22
5. Методика радиолигандного тестирования активности β 1- и β 2-адренорецепторов Т-лимфоцитов человека	23
5.1. Методика проведения радиолигандного определения активности связывания β 1- и β 2-адренорецепторов и расчета индекса специфического связывания.	24
6. Персонализированный подход к выбору дозировки дозы β 2-агониста	28
Заключение	31
Список литературы	32

Введение

Современная спортивная наука охватывает все большее число теоретических и прикладных направлений, посвященных выявлению наиболее эффективных моделей сопровождения спортсменов, а также прогнозирования спортивных результатов. Большинство исследователей сходятся во мнении, что физиологические детерминанты пиковой нагрузки включают перенос кислорода из воздуха в кровь через альвеолярно-капиллярную мембрану легких и далее доставку к скелетным мышцам. При этом респираторная система элитного спортсмена подвергается воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, связанных со сверхвысокими физическими нагрузками, с условиями тренировок и соревнований и обусловленных особенностями каждого вида спортивной деятельности. Такими факторами являются:

- дыхание и легочная гипервентиляция и преимущественно через рот, в результате чего резко снижается защитная функция легких в отношении поллютантов, нарушается терморегуляция воздушного потока в дыхательных путях, что приводит к развитию их дегидратации и гипотермии, высвобождаются медиаторы аллергического воспаления (гистамин, триптаза, лейкотриены), что вызывает бронхоспазм:

- дыхание сухим холодным воздухом у спортсменов, занимающихся зимними видами спорта (лыжники, конькобежцы), что вызывает инфильтрацию слизистой оболочки бронхов эозинофилами и нейтрофилами с повышением продукции лейкотриенов, а также структурные (утолщение базальной мембраны, отложение в ней коллагена) и воспалительные изменения с накоплением активных форм кислорода (окислительным стрессом) в слизистой оболочке дыхательных путей;

- воздействие аллергенов и поллютантов (продукты сгорания дизельного топлива машин для заливки льда в помещениях с искусственным льдом и диоксид азота NO₂ у конькобежцев и хоккеистов) во время тренировок внутри помещения;

- иммуносупрессия за счет сверхвысоких физических нагрузок с высоким риском вирусных и бактериальных респираторных инфекций.

Все вышперечисленные факторы и вызываемые ими процессы способствуют формированию бронхиальной гипервосприимчивости или гиперреактивности (БГР) - повышенной реакции дыхательных путей на воздействие различных экзогенных и эндогенных стимулов. Синдром БГР лежит в основе патогенеза бронхиальной астмы, но также встречается при других заболеваниях (вазомоторный и аллергический риниты) и у здоровых людей.

Распространенность БГР и бронхиальной астмы у спортсменов в 1,5–2 раза выше, чем в популяции в целом. Эти состояния имеют сходные патогенетические механизмы и

клинические проявления, но требуют разного подхода к лечению. Основным методом лечения и профилактики БГР является применение бронхолитиков, прежде всего β_2 агонистов, оказывающих помимо бронхорасширяющего также стимулирующее действие на сердечно-сосудистую систему и поперечно-полосатую мускулатуру.

Противоастматическая терапия у элитных атлетов позволяет существенно улучшить их спортивные результаты, но такое терапевтическое вмешательство может проводиться только с разрешения Медицинской Комиссии Международного Олимпийского Комитета (МК МОК) и поэтому требует особо тщательного подтверждения диагноза.

Ингаляционные β -агонисты осуществляют свой эффект через β -адренорецепторы. Изменения аффинности и уровня экспрессии β -адренорецепторов под действием препаратов ведет к изменению эффективности воздействия лекарственных средств и ассоциировано с частотой развития побочных эффектов. Убедительно продемонстрировано, что М-холинолитики, воздействующие преимущественно на М3-холинорецепторы, применяемые, наряду с бета-агонистами, для лечения пациентов с бронхиальной астмой, могут влиять на характеристики бета-адренорецепторов из-за сложной системы рецепторных взаимодействий. Поэтому исследования рецепторной активности β_2 -адренорецепторов и механизмов их взаимодействия со специфическими лигандами имеют прикладное значение, а самое главное, позволяет персонифицировать необходимую дозу лекарственного препарата. Ранее нами был разработан и апробирован для использования в клинической практике модифицированный радиолигандный метод определения активности связывания β -АР Т-лимфоцитов человека с использованием $[^{125}\text{I}]$ цианопиндолола. Радиолигандный метод позволяет определить активность связывания β -АР на поверхности Т-лимфоцитов периферической крови и оценить динамику активности связывания адренорецепторов под влиянием препаратов, воздействующих на β -АР. Определение характерных паттернов изменений активности связывания β -АР под влиянием специфических лигандов может быть маркером, позволяющим определить спортсменов, у которых терапия бета-агонистами и М-холинолитиками может привести к развитию побочных эффектов или, напротив, быть высокоэффективной.

Таким образом, выявление бронхиальной гиперреактивности у спортсменов с последующим персонифицированным подбором ингаляционных бета-агонистов является актуальной задачей, решение которой позволит как улучшить спортивные результаты, так и профилировать нежелательные побочные эффекты их применения

1. Бронхиальная гиперреактивность у спортсменов. Общие сведения: патогенез, факторы риска и принципы диагностики.

Распространенность астмы в общей популяции взрослых составляет приблизительно 7 %, при этом у 70-90 % пациентов с астмой развивается бронхоспазм при физической

нагрузке (БИН). Выраженность бронхоконстрикторной реакции на нагрузку не обязательно связана с клинической тяжестью астмы. Кроме того, БИН может также встречаться и у 10-20 % людей без каких-либо клинических проявлений бронхиальной астмы.

По сравнению с не спортсменами, спортсмены высокой квалификации демонстрируют более высокую распространенность таких респираторных заболеваний, как бронхиальная астма, БИН, аллергический или неаллергический ринит, хронический кашель, рецидивирующие респираторные инфекции, обструкция гортани, вызванная физической нагрузкой. По литературным данным, до 25 % спортсменов, занимающихся летними видами спорта, и до 50 % спортсменов, занимающихся зимними видами спорта, имеют диагноз бронхиальной астмы. Распространенность БГР еще выше и колеблется от 30 до 70 %, наиболее высокий процент отмечается у пловцов и спортсменов, занимающихся зимними видами спорта. Высокая распространенность БИН отмечается среди спортсменов, занимающихся циклическими видами спорта, достигая 55 % среди спортсменов, занимающихся зимними видами спорта. Бронхиальная астма и БИН являются наиболее распространенными заболеваниями у спортсменов, участвующих в Олимпийских Играх. У 40 % юных спортсменов регистрируются симптомы бронхоспазма, вызванного физической нагрузкой, у 9,4 % подтверждается бронхиальная астма. В систематических обзорах отмечено, что от 3,7 до 22,8 % элитных спортсменов страдают бронхиальной астмой. При этом отмечается рост распространенности и бронхоспазма, вызванного физической нагрузкой. Исследования последних лет, проведенные при помощи специальных вопросников, и исследования функции внешнего дыхания, показали, что среди элитных спортсменов бронхиальная астма встречается чаще (12–14 %), чем в общей популяции населения.

Как и в случае с классической бронхиальной астмой, симптомы БИН являются просто «верхушкой айсберга» и отражают ремоделирование дыхательных путей или воспаление, которое характеризуется приступами бронхиальной обструкции (бронхоспазма) и бронхиальной гиперреактивностью (БГР). Бронхиальная гиперреактивность (гиперреактивность бронхов) - состояние респираторного тракта, при котором в ответ на воздействие физического, химического или фармакологического раздражителя (экзогенных и эндогенных раздражителей, например, вдыхание холодного воздуха) происходит сужение просвета дыхательных путей. Таким образом, у здорового человека при воздействии бронхоконстрикторных или бронхолитических препаратов, а также других факторов, изменяющих бронхиальный тонус (физическая нагрузка, холодный воздух, ингаляция аллергенов, ацетилхолина или гистамина), не наблюдается динамики показателей бронхиальной проходимости или выявляются очень небольшие сдвиги ее, что связано с активацией механизмов, регулирующих бронхиальный тонус. Больные с бронхиальной

гиперреактивностью отличаются от здоровых тем, что при воздействии на бронхиальную систему одного и того же количества бронхоактивного вещества степень нарушения проходимости дыхательных путей у них во много раз сильнее, чем у здоровых испытуемых. Проблема гиперреактивности бронхов занимает одно из ведущих мест среди патологических состояний дыхательной системы. В настоящее время полагают, что, существуют два основных типа бронхиальной гиперреактивности: Врожденный тип, генетически обусловленный, который неизменно проявляется при контакте с соответствующими агентами и не исчезает при удалении агентов. Приобретенный тип – порождается действием аллергизирующих агентов, при удалении которых бронхиальной гиперреактивности постепенно исчезает.

Также выделяют два вида бронхиальной гиперреактивности: специфическая гиперреактивность (под специфической понимают реакцию бронхов на специфические (пыльцевые, пищевые, эпидермальные и др.) аллергены, неспецифическая гиперреактивность (бронхоспазм, вызванный медиаторами (ацетилхолин, гистамин, брадикинин, простагландин F_{2a} и т.д.), физическими и химическими раздражителями.

В механизме БИН можно выделить несколько факторов. Чтобы обеспечить потребности организма в кислороде во время интенсивной нагрузки, необходимо увеличение легочной вентиляции. Как результат, увеличение дыхательного объема и частоты дыхания, что, в конечном итоге, приводит к охлаждению и иссушению поверхности дыхательных путей, и стимулирует высвобождение различных медиаторов воспаления [10-13]. В общей популяции, в отличие от спортсменов, периферическая мышечная усталость наступает значительно раньше, чем достигается МВЛ [8]. Механизмы развития БИН активно изучались и были предложено несколько гипотез: тепловая и осмотическая.

Согласно осмотической теории – БГР, связанная с БИН, наиболее вероятно инициируется испарением воды из поверхностной жидкости дыхательных путей, что приводит к изменению осмолярности в клетках слизистой оболочки дыхательных путей. Это происходит вследствие нагревания во время нагрузки вдыхаемого воздуха до 31°C и увлажнения его до 99% относительной влажности. Считается, что приток воды для восстановления осмолярности, когда интенсивность нагрузки или, что более важно, вентиляция снижается, стимулирует высвобождение медиаторов воспаления. Эти медиаторы вызывают сужение гладких мышц бронхов, образование слизи и/или отек. Ремоделирование субэпителиальной базальной мембраны, выявленное у лыжников, скорее всего, снижает способность реагировать на потерю воды в результате испарения. Это, в свою очередь, приводит к повышению БГР, поскольку нарушается процесс увлажнения вдыхаемого воздуха.

Альтернативное объяснение механизма БИН (тепловая гипотеза) предполагает, что сужение дыхательных путей связано с процессами теплообмена. Высокий уровень вентиляции при нагрузке приводит к охлаждению поверхности дыхательных путей и последующему спазму бронхиальных сосудов. При вдыхании холодного воздуха эти изменения особенно выражены. А сразу после прекращения нагрузки снижение вентиляции и быстрое согревание дыхательных путей приводит к реактивной гиперемии, которая сужает просвет дыхательных путей. Вполне возможно, что осмотическая и тепловая гипотезы могут дополнять друг друга.

Несомненным в механизме развития БИН является роль клеток и медиаторов воспаления. Тучные клетки могут быть наиболее важными клетками в высвобождении медиаторов воспаления (гистамина, триптазы, цистеиновых лейкотриенов (ЛТ), простагландина (ПГ) D₂). Повышенное количество Т-лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов также было выявлено как при классической бронхиальной астме, так и при «астме лыжников». Однако, эти клетки могут быть просто маркерами хронического воспаления дыхательных путей и не иметь отношения к острому ответу, связанному с БИН. Вероятно, тучные клетки играют важную роль в патогенезе БИН у человека как с бронхиальной астмой, так и без нее. Освобождение медиаторов тучных клеток может происходить при активации аллергеном иммуноглобулина Е (IgE), а также при воздействии стимулов (например, холодный сухой воздух), не связанных с IgE.

В отличие от воздействия аллергена у людей с сенсibilизацией БИН не вызывает значительного воспаления дыхательных путей и не повышает БГР у пациентов с бронхиальной астмой. Степень воспаления дыхательных путей, по-видимому, является важным фактором восприимчивости к БИН, чем выше степень эозинофилии дыхательных путей, тем более выражен БИН. Однако, роль эозинофилов в развитии БИН у людей без астмы остается изученной недостаточно. Современные данные подтверждают важную роль эозинофилов и высвобождаемых ими медиаторов воспаления (ЛТ и эозинофильного катионного белка (ЕСР)) в хроническом воспалении. Тем не менее, эозинофилы, вероятно, непосредственно не участвуют в остром бронхоспазме, так как время эозинофильной воспалительной реакции отсрочена на несколько часов после воздействия стимула.

У пациентов с БИН обычно выявляют повреждение эпителия дыхательных путей, инфильтрацию дыхательных путей тучными клетками и эозинофилами и увеличение продукции медиаторов воспаления. Хотя точный механизм, посредством которого гиперосмолярность приводит к активации лейкоцитов, еще не до конца изучен, известно, что в результате этой активации происходит высвобождение бронхоконстрикторных медиаторов (например, ЛТ и ПГ D₂). У пациентов с БИН повреждение эпителия дыхательных путей приводит к снижению синтеза ПГ E₂, что приводит к увеличению соотношения ЛТ к ПГ E₂

и также способствует бронхоконстрикции. Также наблюдается снижение выработки других защитных медиаторов, таких как липоксин А4.

В развитие БИН вовлечена и нервная система. Как известно, парасимпатические пути иннервируют гладкую мускулатуру дыхательных путей и могут вызывать сужение бронхов, в то время как активация β -адренорецепторов симпатической нервной системы приводит к бронходилатации, причем оба отдела вегетативной нервной системы играют значительную роль в регулировании просвета дыхательных путей. Нарушение регуляции нервной системы может способствовать развитию БГР. Воспаление дыхательных путей, наблюдаемое при бронхиальной астме, может также изменить как сократительные свойства гладких мышц дыхательных путей, так и регуляцию их функционирования вегетативной нервной системой. У пациентов с бронхиальной астмой тонус парасимпатической нервной системы, по-видимому, повышен по сравнению со здоровыми людьми. Однако роль этого фактора в патогенезе БИН у спортсменов остается неизученной.

Спортсмены, занимающиеся циклическими видами спорта, особенно пловцы и лыжники, имеют повышенную распространенность бронхиальной астмы, БГР и БИН. Развитие этой формы «профессиональной» астмы связано с высоким уровнем легочной вентиляции, который спортсмены поддерживают во время тренировок и соревнований в течение длительного периода, и с интенсивным воздействием различных раздражителей дыхательных путей и аллергенов у спортсменов с сенсibilизацией. Существует очевидная связь между аллергией и астмой у спортсменов. У спортсменов отмечается высокая распространенность (49–73%) атопии. Недавно было высказано предположение о возможной связи между интенсивной тренировкой и повышенной реакцией Т-хелперов типа 2 (Th2-ответом) - иммунной реакцией, участвующей в сенсibilизации к аллергенам.

При минутной вентиляции до 200 л/мин, которую развивают спортсмены высокой квалификации, в сочетании с переходом от носового к ротовому дыханию неизбежно развивается тепловой и осмотический стресс. Для согревания и увлажнения вдыхаемого воздуха ротовое дыхание значительно менее эффективно по сравнению с дыханием через нос. Вдыхание большого объема некондиционированного воздуха связано с обезвоживанием слизистой дыхательных путей - основным механизмом БИН. Также это приводит к охлаждению дыхательных путей, способствуя бронхиальной вазоконстрикции с последующей реактивной гиперемией и отеком слизистой оболочки, когда вентиляция возвращается к нормальной. Такие изменения температуры могут привести к застою в микроциркуляторном русле и отеку слизистой оболочки бронхов, способствуя сужению просвета дыхательных путей.

Важным фактором развития БИН у спортсменов является повреждение эпителия дыхательных путей. Повреждение эпителия, повышенная проницаемость дыхательных

путей и экссудация плазмы способствуют прохождению вдыхаемых веществ через эпителий дыхательных путей и взаимодействию этих субстанций с иммунными и воспалительными клетками. У пловцов и лыжников степень БГР коррелирует с выраженностью ремоделирования дыхательных путей (отложением коллагена и протеогликанов под базальной мембраной). Было показано, что у спортсменов, занимающихся зимними видами спорта, воспаление дыхательных путей (в основном нейтрофильное) является минимальным или отсутствует. Более того, было показано, что после прекращения тренировок и соревнований, после непродолжительного отдыха бронхиальная реактивность может нормализоваться или заметно снизиться.

Как и в общей популяции, важную роль в развитии БИН у спортсменов играет вегетативная нервная система. У спортсменов холинергический тонус, оцениваемый по вариабельности сердечного ритма, тесно связан со степенью БГР: исследование, проведенное в Норвегии, показало что у лыжников и пловцов с астмой и без нее повышение парасимпатического тонуса приводит к повышению реактивности дыхательных путей.

Диагноз бронхиальной астмы физического напряжения должен основываться на данных анамнеза, клинического обследования, исследовании функции внешнего дыхания, выявлении обратимости обструкции дыхательных путей и проведении провокационных тестов с физической нагрузкой и такими препаратами, как гистамин, метахолин, бронходилататоры.

Естественно, что важным условием для выявления бронхиальной астмы физического напряжения у спортсменов является наличие у них не только бронхоспазма, но и других объективных критериев. Для правильной формулировки диагноза и проведения дифференциальной диагностики бронхиальной астмы физического напряжения необходима комплексная оценка истории заболевания, результатов клинического обследования и адекватных лабораторных и функциональных тестов. В рекомендациях, базирующихся на принципах доказательной медицины, указывается, что «необходимым условием для постановки диагноза является указание на наличие повторяющихся симптомов бронхиальной обструкции, таких как чувство тяжести в грудной клетке, свистящее дыхание и хрипы, которые провоцируются различными стимулами и, в частности, физической нагрузкой. Лабораторные (инструментальные) тесты без сопоставления с клиническими данными не являются достаточным основанием для постановки диагноза бронхиальной астмы физического напряжения. Сообщение о таких симптомах должно быть верифицировано с помощью тестов обратимости бронхиальной обструкции, выявления бронхоспазма под влиянием физической нагрузки или подтверждено другими любыми (прямыми и непрямыми) методами, позволяющими выявлять бронхиальную гиперреактивность.

Ранее установлено, что у большинства больных бронхиальной астмой под влиянием физической нагрузки развивается типичная клиническая картина с ощущением тяжести в грудной клетке, появлением свистящего дыхания, одышки и кашля. Симптомы появляются, как правило, в конце физической нагрузки и могут прогрессировать после ее завершения. Максимальная выраженность симптомов наблюдается через 8–15 мин после завершения нагрузки и самостоятельно исчезает в течение 1 ч. В последующие 4 ч после нагрузки может наблюдаться рефрактерный период, в течение которого физические упражнения вызывают менее выраженную бронхоконстрикцию. Полагают, что формирование рефрактерного периода может быть связано с высвобождением простагландинов (PGE), оказывающих частичное протективное действие. Симптомы бронхиальной астмы у спортсменов обычно бывают нетяжелыми и обратимыми, поскольку могут исчезать после прекращения интенсивных тренировок.

При наличии симптомов бронхообструкции следует в максимально короткие сроки проводить оценку функции внешнего дыхания. В качестве основного показателя функции внешнего дыхания следует использовать ОФВ₁ (объем выдыхаемого воздуха при максимальном форсировании в первую секунду) и его изменения в ответ на тот или иной стимул. Согласно критериям Европейского респираторного общества и Американского торакального общества, положительной реакцией на физическую нагрузку считается снижение ОФВ₁ на 10 % и более, поскольку такое уменьшение ОФВ₁ уже является фактором, способным ухудшать спортивные результаты. Изменение объемной скорости потока в средней части экспираторного маневра между 25 и 75 % форсированной жизненной емкости легких — ФЖЕЛ (FEF_{25–75}) после физической нагрузки не используют для количественной оценки бронхоспазма, вызванного физической нагрузкой, поскольку результаты измерения этого параметра зависят от неизменной величины жизненной емкости легких. Кроме того, установлено, что объем форсированного выдоха после выдоха 50 % ФЖЕЛ (FEF₅₀) недостаточно чувствителен для выявления бронхоспазма, вызванного физической нагрузкой, у спортсменов высокого класса. Тем не менее, низкие экспираторные показатели в средней части кривой «поток — объем» теоретически могут ухудшать спортивные достижения вследствие ограничения дыхательного объема, особенно при неизменном резервном объеме в конце выдоха. В последние годы предложено увеличить показатель разделения нормы и патологии ОФВ₁ после физической нагрузки (восьмиминутная езда на велосипеде или бег) до 12 %, что, вероятно, улучшает диагностику бронхоспазма, вызванного физической нагрузкой у спортсменов.

Оценку степени гиперреактивности бронхов при использовании провокационных тестов с фармацевтическими средствами (метахолин, гистамин и/или бронходилататоры) широко применяют при обследовании пациентов с подозрением на бронхиальную астму.

Однако для того, чтобы использовать снижение ОФВ1 на 12 % в ответ на ингаляцию метахолина в качестве параметра раздела нормы и патологии, необходимо провести повторный анализ многих исследований, с тем чтобы установить, какая доза или концентрация метахолина обладает такой же специфичностью для выявления бронхиальной астмы, как и другие провокационные тесты. Причина необходимости такого анализа состоит в том, что ОФВ1 снижается при провокационном тесте с гистамином и у здоровых людей, но у них кривая снижения ОФВ1 имеет плато, которое может появляться гораздо позже после снижения ОФВ1 на 12 %.

В ряде случаев возникает необходимость проведения дифференциальной диагностики бронхиальной астмы физического напряжения с дисфункцией голосовых связок, индуцированным плаванием легочным отеком, индуцированной нагрузкой артериальной гипоксемией и другими астмаподобными симптомами у спортсменов.

Рекомендации по ведению пациентов с бронхиальной астмой физического напряжения предусматривают проведение элиминационных и общих мероприятий, образовательных программ, адекватной фармакотерапии и поощрение занятий спортом. Общие мероприятия предполагают обеспечение рационального режима физической активности, поскольку тренировки и адекватное повышение температуры и влажности окружающей среды снижают частоту и тяжесть бронхиальной астмы физического напряжения. Полезным может быть вдыхание теплого воздуха в течение завершающих 10 минут тренировки, при холодной погоде рекомендуется дышать через прикрытые шарфом рот и нос, проводить по возможности занятия в теплом помещении с достаточной влажностью, использовать разрешенные к применению спорт-сменам лекарственные препараты для оптимального контроля бронхиальной астмы. Крупные соревнования должны проводиться таким образом, чтобы имелась возможность осуществления глобальных стратегий, направленных на уменьшение в окружающей среде уровня раздражителей, например, мелких частиц и диоксида азота в ледовых дворцах для хоккея с шайбой или паров хлора в плавательных бассейнах. Приверженцам зимних видов спорта могут помочь специальные устройства, улучшающие теплообмен воздушных масс, а при занятиях спортом летом можно использовать специальные маски, препятствующие проникновению аллергенов.

2. Рекомендации по выявлению бронхиальной гиперреактивности у спортсменов сборных команд Российской Федерации

Для выявления распространенности БГР у спортсменов в ходе предшествующих этапов работы нами предложен следующий алгоритм действий:

1. - Анкетирование для выявления факторов риска и симптомов, сопровождающих БГР с помощью анкеты, представленной в Таблице 1.
2. – При наличии хотя бы одного положительного ответа на вопросы анкеты - первичный врачебный осмотр спортсменов (группа риска)
3. - Комплексное обследование респираторной функции у спортсменов из группы риска
4. - Повторный врачебный осмотр с выдачей заключения о наличии или отсутствии БГР и рекомендациями по персонализированному подбору бета-2-агониста

В Таблице 1 представлена разработанная в ходе предшествующих этапов работы форма анкеты для спортсменов по выявлению рисков БГР.

Таблица 1. Форма анкеты для спортсменов по выявлению рисков БГР

№	Вопрос	Ответ	
		ДА	НЕТ
1.	Вызывает ли смог, табачный дым, дорожная пыль, резкие запахи или другие факторы кашель или затрудненное дыхание?		
2.	Беспокоили ли Вас когда-либо эпизоды затрудненного дыхания и/или сдавления (тяжести) в груди?		
3.	Возникали ли у Вас когда-либо дистанционные (слышимые на расстоянии) свистящие хрипы при дыхании?		
4.	Ограничивают ли Вас жалобы со стороны дыхательной системы в выполнении необходимой для Вас физической нагрузки?		
5.	Появляются ли у Вас затрудненное дыхание, ощущение сдавления (тяжести) в груди, приступы кашля, свистящие хрипы при дыхании на высоте физической нагрузки?		
6.	Появляются ли у Вас затрудненное дыхание, ощущение сдавления (тяжести) в груди, приступы кашля, дистанционные свистящие хрипы при дыхании вскоре после физической нагрузки?		
7.	Часто ли Вы простужаетесь или болеете респираторными вирусными инфекциями. (более 2-х раз в год)?		
8.	Болеете ли Вы затяжными бронхитами?		
9.	Курите ли вы или курили раньше (более 20 сигарет за все время)?		
10.	Принимали ли Вы когда-нибудь противоаллергические препараты с положительным эффектом?		
11.	Бывают ли у Вас сезонные проявления аллергии?		

12.	Были ли у Вас высыпания на коже аллергического характера?		
13.	Отмечали ли Вы какие-либо аллергические реакции на пищевые продукты, при контакте с домашними животными, цветущими растениями и травами, бытовой пылью, при укусах насекомых?		
14.	Испытываете ли Вы затруднения при дыхании через нос? Отмечали ли Вы эпизоды заложенности носа или ринореи (обильного выделения слизи из носа)?		
15.	Есть ли у Вас непереносимость каких-либо лекарственных средств (аспирина, анальгина, антибиотиков и др.)?		
16.	Имеются ли аллергические заболевания (астма, риниты, дерматиты) у кровных родственников?		

3. Комплексное обследование респираторной функции для выявления бронхиальной гиперреактивности

В лабораторных условиях БГР можно выявить с помощью различных бронхоконстрикторных стимулов, которые приводят к сужению бронхиального просвета, непосредственно воздействуя на гладкие мышцы дыхательных путей (например, метахолин), или опосредованно через высвобождение медиаторов из клеток воспаления (например, гиперосмолярный раствор, физическая нагрузка) (рис.1). Тест с метахолином обладает высокой чувствительностью и умеренной специфичностью для диагностики БА у спортсменов.

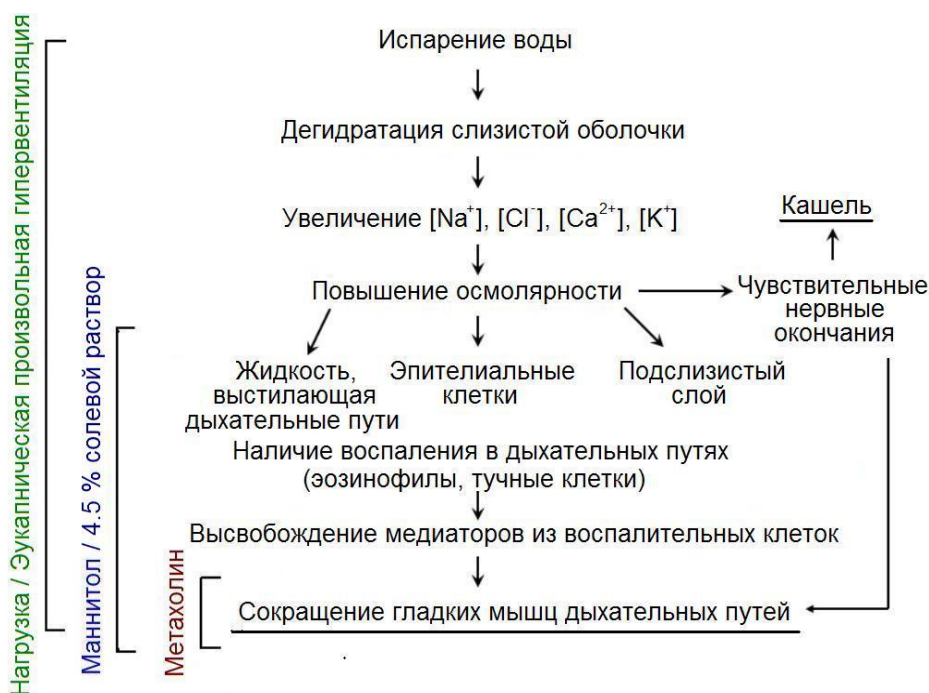


Рисунок 1. - Схематическое изображение ключевых событий, приводящих к сужению просвета дыхательных путей при воздействии «прямых стимулов» (метахолин) и «непрямых

стимулов» (нагрузка, эукапническая произвольная гипервентиляция, маннитол, гипертонический солевой раствор).

Тест с метахолином проводится по стандартному протоколу. У спортсменов, принимающих лекарственные препараты по поводу диагностированных ранее бронхолегочных заболеваний, следует отменить их перед данным исследованием на срок, соответствующий длительности действия этих препаратов. Тест прекращают при снижении ОФВ₁ на 20 % и более от исходного значения. Если такая реакция выявлена при пороговой концентрации метахолина хлорида < 4 мг/мл у спортсмена, не принимающего ингаляционных кортикостероидов (ИГКС), или при пороговой концентрации метахолина хлорида < 16 мг/мл у спортсмена, принимающего ИГКС, то она расценивается как положительная.

После завершения теста с метахолином спортсмену проводят ингаляцию β_2 -агониста (например, 200 мкг сальбутамола), и через 5-10 мин измеряют ОФВ₁. Если ОФВ₁ составляет 90% и более от исходного уровня, то исследование прекращают. В противном случае повторяют ингаляцию β_2 -агониста (например, 200 мкг сальбутамола) и через 5-10 мин еще раз измеряют ОФВ₁. Спортсмен может покинуть лабораторию, если ОФВ₁ восстановился не менее чем на 90% от исходного уровня.

БГР, диагностированная при концентрации метахолина хлорида $\leq 0,25$ мг/мл, считается выраженной; от 0,25 мг/мл до 2,0 мг/мл – умеренной; более 2 мг/мл – легкой.

4. Методы оценки характеристик адренорецепторного аппарата

β_2 -агонисты являются препаратами симптоматической терапии в лечении бронхообструктивной патологии, осуществляя свои эффекты через бета-адренорецепторы (β -АР). Убедительно продемонстрировано, что М-холинолитики, воздействующие преимущественно на М3-холинорецепторы, применяемые, наряду с бета-агонистами, для лечения пациентов с бронхиальной астмой, могут влиять на характеристики бета-адренорецепторов из-за сложной системы рецепторных взаимодействий. Таким образом, выявляя изменения бета-рецепторного звена на фоне острого приема адренергических и холинергических препаратов, можно выделить подгруппу спортсменов, у которых применения бронхолитиков может быть сопряжено с риском развития побочных эффектов или, напротив, с высокой их эффективностью. При назначении β_2 -агонистов всегда возникает вопрос безопасности данных препаратов, который остается до сих пор нерешенным, по причине отсутствия абсолютной селективности действия и возможности формирования побочных эффектов на фоне их приема. Это обусловлено наличием как β_1 -АР, так и β_2 -АР, хотя и в разном соотношении, в органах респираторной системы. В настоящее время, имеется ряд работ посвященных изменениям адренорецепторного

аппарата, происходящим под влиянием физических нагрузок, в частности, было отмечено, что при длительной адаптации к физическим нагрузкам, которые испытывают спортсмены, β -адренергические реакции ослабевают, а при экстремальных состояниях, в свою очередь, изменения имеют противоположную направленность. Это может быть связано не только с выбросом повышенного количества катехоламинов, но и иметь в своей основе возросшую плотность β 2-адренорецепторов. Большое значение имеют индивидуальные реакции конкретного человека на воздействие β -агонистов, что заставляет переходить к персонализированному подходу к применению таких препаратов..

Приведенные выше данные показывают необходимость объективной оценки характеристик адренорецепторного аппарата. В последнее время был разработан ряд как прямых (оценка изменения аффинности, экспрессии рецепторов), так и косвенных методов (оценка изменения вторичных мессенджеров) для определения рецепторной активности β -адренорецепторов [54].

4.1. Косвенные методы.

Наиболее высокой чувствительностью и специфичностью среди косвенных методов обладают иммуноблоттинг (Вестерн-блоттинг) и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Вестерн-блоттинг – это аналитический метод, используемый для определения специфичных белков. Данный метод включает электрофорез белков для разделения денатурированных полипептидов по длине, перенос белков на нитроцеллюлозную или PVDF-мембрану и их детектирование с использованием антител, специфичных к заданному белку [130]. ПЦР-РВ является лабораторным методом, использующим общие принципы ПЦР. ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце [131]. Недостатком же этих методов является то, что при проведении ПЦР-РВ мы можем получить информацию только об уровне экспрессии генов β -адренорецепторов в исследуемых клетках, а при Вестерн-блоттинге – об уровне трансляции гена (о плотности адренорецепторов на внешней поверхности клетки). Собственно рецепторную активность β -адренорецепторов, т. е. связывание ими специфических лигандов, этими методами измерить невозможно.

Оценка вторичных мессенджеров.

Посредниками при передаче сигнала от препаратов, воздействующих на β -АР, являются Gs-белки (стимулирующие), которые приводят к активации аденилатциклазы и повышению уровня цАМФ. Поэтому одним из непрямых методов оценки экспрессии β -АР служит определение изменений состояния вторичных мессенджеров: уровня цАМФ и

активности протеинкиназы А. Однако, данный метод дает лишь косвенную информацию о рецепторной активности лимфоцитов, требуя значительного количества крови для анализа [54].

4.2 Прямые методы.

Безусловно важным параметром является определение количества β 1- и β 2-АР на поверхности клеток - плотности адренорецепторов. Прямыми методами позволяющими измерить плотность β -АР является иммуноферментный анализ (ИФА) и проточная цитофлуометрия. Они основаны на реакции «антиген-антитело». Для ИФА используют конъюгат с ферментами, а для цитофлуометрии - антитела, меченные флуоресцентным красителем. Однако стоит отметить, что методы не обладают достаточной чувствительностью, с их помощью невозможно проследить влияние препаратов на адренорецепторный аппарат [54].

Пожалуй, одним из наиболее точных прямых методов исследования адренорецепторного аппарата является радиолигандный анализ. Он позволяет определять количество (плотность) на клеточной мембране и сродство (аффинность) к лигандам β -АР. Традиционный радиолигандный анализ рецепторов заключается в определении зависимости количества связанного рецептором лиганда, меченного радиоактивным [125 I]йодоцианопиндололом или [3 H]дигидроальprenололом, от концентрации свободного лиганда в растворе. При разделении связанного и свободного лиганда существует проблема неспецифического связывания лиганда на неспецифических центрах (мембранные липиды, белки). Для определения неспецифического связывания добавляют избыток немеченого лиганда, и при построении графика наблюдают не плато концентрации насыщения, а линейную зависимость от общей концентрации лиганда. В свою очередь специфическое связывание рассчитывается по разности общего и неспецифического связывания, на основании полученных данных строится график Скэтчарда, с использованием коэффициента линейной регрессии. График Скэтчарда, построенный на основании экспериментальных данных, позволяет определить количество рецепторов и их сродство к данному лиганду. Однако этот вариант радиолигандного метода является трудоемким, дорогостоящим и требует забора большого объема крови, особенно при исследовании влияния препаратов, воздействующих на β -АР. И применение его в условиях реальной клинической практике маловероятно [54].

4.3. Новый модифицированный радиолигандный метод определения активности связывания бета-адренорецепторов

Существующие до недавнего времени методы исследования β -АР имели свои ограничения для использования в широкой клинической практике. Требовался простой и легко применимый в реальной практике метод, который бы давал клиническую релевантную

информацию. В связи с чем был разработан и апробирован модифицированный радиолигандный метод определения активности связывания β -АР Т-лимфоцитов человека с использованием [125 I] цианопиндолола. Под активностью связывания β -АР понимается способность рецептора связывать регистрируемое количество меченого лиганда в строго определенных условиях, выраженное в имп. /мин на 10^6 клеток [54, 64]. Радиолигандный метод позволяет определить активность связывания β -АР на поверхности Т-лимфоцитов периферической крови и оценить динамику активности связывания адренорецепторов под влиянием препаратов, воздействующих на β -АР. При проведении этого анализа был выявлен широкий разброс показателей активности связывания β -АР у здоровых добровольцев. В связи с этим клиническое значение могут иметь не абсолютные показатели активности связывания адренорецепторов (показатели «нормы»), а динамические изменения полученных значений под действием препаратов, влияющих на β -АР. Анализ проводится на Т-лимфоцитах периферической крови ввиду возможности экстраполировать количественные характеристики β -АР лимфоцитарного звена на миокард и легкие. В ранее проведенных исследованиях было продемонстрировано снижение β -АР в легких и сердце под действием β -агонистов, что соответствует изменениям, происходящим в циркулирующих мононуклеарных лейкоцитах [65, 66]. Стоит также отметить доступность этого клинического материала. Дополнительным преимуществом разработанного метода над классической радиолигандной методикой является снижение на порядок необходимого для анализа объема крови – не более 10–15 мл [54, 67, 132, 133]. 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 -адренорецепторов Т-лимфоцитов человека для здоровых людей и лиц с респираторной патологией. Причем в этих работах при анализе активности β_2 -АР Т-лимфоцитов была отмечена взаимосвязь этого показателя с параметрами функциональной диагностики, имеющих доказанное клиническое значение.

5. Методика радиолигандного тестирования активности β_1 - и β_2 -адренорецепторов Т-лимфоцитов человека

Образцы крови для исследования получают венопункцией с использованием 2 вакуумных пробирок S-Monovette EDTA KE (Sarstedt, Германия) объемом 9 мл двукратно. Забор крови проводится в утренние часы (с 8.00 до 10.00) на голодный желудок, дважды (суммарно 30 мл) – исходно и после проведения бронходилатационного теста. Кровь берется для оценки изменений характеристик β -адренорецепторов на клетках крови.

Полученные образцы крови 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. N9 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) из каждой пробирки в чистые 50 мл пробирки. Суспензию лимфоцитов однократно отмывают 30 мл раствора PBS буфера (фосфатно-солевой буфер, pH 7,2, 2мМ EDTA (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 PBS буфера и переносят в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки erpendorf, используя автоматическую пипетку и наконечники с фильтром. Центрифугируют 10 мин при 400g при комнатной температуре. Надосадочную жидкость аккуратно удаляют. Осадки из пробирок используют для выделения Т-клеток с помощью набора Pan T cell isolation kit (human) (Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-096-535) согласно инструкции набора. Для этого осадок в каждой пробирке ресуспендируют в 40 мкл PBS-BSA буфера и добавляют 10 мкл антител к Т-клеткам (Pan T Cell Biotin Antibody Cocktail), хорошо перемешивают и инкубируют 7 мин в холодильнике при температуре 28⁰С. К полученной смеси добавляют 30 мкл PBS-BSA буфера и 20 мкл магнитных частиц (Pan T Cell MicroBeard Cocktail), аккуратно перемешивают и инкубируют 15 мин в холодильнике при температуре 28⁰С. К раствору добавляют 500 мкл PBS-BSA буфера, перемешивают и пропускают полученные суспензии через заранее промытые PBS-BSA магнитные колонки. Магнитную сепарацию проводят на MS колонках, используя OctoMACS сепаратор (MS columns, Miltenyi Biotec, Германия, кат. № 130-042-201) согласно инструкции производителя. Проходящий раствор (Т-клетки) собирают в пробирки. 500 мкл раствора из пробирки переносят в эппендорф, добавляют 500 мкл среды 199 (питательная среда), хорошо перемешивают. Из полученного объема 1 мл отбирают 10 мкл в отдельный эппендорф для подсчета клеток. Полученные клетки могут храниться в холодильнике при 40⁰С в течение 24 часов до использования в радиолигандном анализе (приблизительно 10⁶ клеток).

5.1. Методика проведения радиолигандного определения активности связывания β 1- и β 2-адренорецепторов и расчета индекса специфического связывания.

В работе применялись: цианопиндолол, бычий сывороточный альбумин (фирма «Sigma», США), а также специфические лиганды CGP-20712 (β 1-адреноблокатор) и IC1 118551 (β 2-адреноблокатор). Стоит отметить, что CGP-20712 (β 1-адреноблокатор) и IC1 118551 (β 2-адреноблокатор) являются селективными лигандами к β 1,2 - адренорецепторам

(Sigma-Aldrich, США). Радиоактивный Na^{125}I в растворе NaOH с концентрацией 1000 МБк/мл (В/О “Изотоп”, Россия).

Цианопиндолол (цианопроизводное пиндолола) является блокатором β -АР и 5-НТ1А-рецепторов (серотониновых) (фирма «Sigma», США). В исследованиях распределения β -АР в организме широко применяется его меченое соединение с короткоживущим радиоактивным изотопом йода ^{125}I .

Забор крови и выделение клеток.

Исследование адренорецепторного аппарата производилось на Т-лимфоцитах периферической крови. Забор периферической крови осуществлялся венепункцией дважды: один раз – контрольный (исходно), второй раз – после проведения пробы с препаратами (сальбутамол, бисопролол, формотерол). Так, изменение активности связывания всем пациентам осуществлялось исходно и через 120 минут после однократного назначения селективного β 1-адроблокатора (бисопролола) в дозе 2,5 мг, через 30 минут после назначения β 2-агониста короткого действия (сальбутамола) в дозировке 400 мкг и через 60 минут после использования β 2-агониста длительного действия (формотерола) в дозировке 12 мкг.

Выделение мононуклеарных лимфоцитов проводилось по методике, описанной ранее [68]. Т-лимфоциты выделяли из полученной фракции суммарных лимфоцитов с помощью набора Pan T Cell Isolation Kit II human 1x1 ml, 1x2 ml (фирма "Miltenyi Biotec", Германия) по предоставленной инструкции производителя.

В работе определялось активность связывания β -рецепторов, отражающая способность рецептора связывать определяемое количество меченого лиганда в строго определенных фиксированных условиях, выраженное в имп./мин. на 1 млн клеток [64, 132, 133].

Определения активности связывания β -адренорецепторов Т-лимфоцитов периферической крови проводилась по схеме, указанной ниже (табл.6).

Таблица 6.

	Клеточная суспензия с концентрацией 10 млн. клеток/мл	Радиоактивный препарат с концентрацией радиоактивности 1000 срм/мкл	Переменный компонент
Пробирка 1	100 мкл	100 мкл	10 мкл - воды

Пробирка 2	100 мкл	100 мкл	10 мкл – «холодного» цианопиндолола
Пробирка 3	100 мкл	100 мкл	10 мкл - раствора специфического лиганда для β_1 -рецепторов
Пробирка 4	100 мкл	100 мкл	10 мкл - раствора специфического лиганда для β_2 -рецепторов

Где в ходе расчетов определялось:

Данные считывания **1 пробирки** за вычетом данных считывания **2 пробирки** – общая специфическая активность связывания рецепторов;

Данные считывания **1 пробирки** за вычетом данных считывания **3 пробирки** – активность связывания β_1 -АР;

Данные считывания **1 пробирки** за вычетом данных считывания **4 пробирки** – активность связывания β_2 -АР.

Получение [125 I]-цианопиндолола.

Введение радиоактивного изотопа ^{125}I в молекулу цианопиндолола проводили по методу, описанному ранее с некоторыми изменениями [69]. Реакционная смесь для радиойодирования содержала: 1 мкг цианопиндолола и 1мКи Na^{125}I в 50 мкл 0.2М калий-фосфатного буфера pH 7.0. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл раствора хлорамина Т (10 мг/мл), выдерживали при комнатной температуре 1 мин и реакцию останавливали добавлением 10 мкл тиосульфата натрия (20 мг/мл). После 5 мин инкубации при комнатной температуре добавляли 1 мкл раствора «холодного» йодистого натрия (6 мг/мл). Целевой продукт выделяли с помощью ВЭЖХ на колонке Nucleosil 100 C-18 (5 мкм, 4x150 мм) в ион-парном режиме: с элюцией в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 100 % в 10% уксусной кислоте за 20 мин со скоростью 0.5 мл/мин и детекцией элюата по УФ-поглощению при λ 280 нм. Хроматограф для ВЭЖХ фирмы Gilson (Франция). Фракции, содержащие [125 I]цианопиндолол, объединяли, упаривали досуха, растворяли в 70% спирте и хранили при -20°C [70].

Получение [125 I]цианопиндолола проводилось в лаборатории изотопных методов анализа Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (руководитель лаборатории, д.х.н. Скоблов Ю.С.).

Общее специфическое связывание [¹²⁵I]цианопиндолола с T-лимфоцитами периферической крови.

Все реакции и измерения проводили в трех параллелях. 100 мкл водного раствора [¹²⁵I]цианопиндолола в PBS с концентрацией 1000 имп./мин./мкл, 10 мкл раствора немеченого цианопиндолола (или 10 мкл воды) и 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 5-10млн./мл инкубировали в течение 1 ч при 37°C при осторожном перемешивании на шейкере со скоростью 100 об./мин в пробирках на 1,5 мл (Эппендорф). Процесс останавливали добавлением в каждую пробу по 400 мкл ледяной воды (холодная вода со льдом). Клетки центрифугировали на центрифуге Microspin12 BioSan (Латвия) при 2000g 10 мин, супернатант отбрасывали, осадок осторожно суспендировали в 200 мкл холодного (+4°C) PBS и вновь центрифугировали при тех же условиях. Супернатант отбрасывали и осадок осторожно суспендировали в 200 мкл холодного (+4°C) PBS и центрифугировали при 10000g 2 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок в пробирках просчитывали на γ -счетчике Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer), измеряя количество радиоактивного материала в каждой пробе. Эффективность счета около 60% [70].

Специфическое β 1- и β 2-связывание [¹²⁵I]цианопиндолола с T-лимфоцитами периферической крови.

Все реакции и измерения проводили в трех параллелях (триплеты 100 мкл водного раствора [¹²⁵I]цианопиндолола в PBS с концентрацией 1000 имп./мин./мкл, 10 мкл раствора немеченого специфического лиганда (CGP-20712 или ICI 118551 или цианопиндолол) и 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 10 млн./мл инкубировали в течение 1 ч при 37°C при осторожном перемешивании на шейкере со скоростью 100 об./мин. в эппендорфах на 1,5 мл. Дальнейшая последовательность постановки проводилась аналогично вышеописанной манипуляции на общее специфическое связывание (см. выше).

Расчет индекса специфического связывания и динамики индекса специфического связывания.

Учитывая высокий разброс данных по абсолютным значениям активности связывания β -АР, не позволяющий ввести понятие «нормальных значений», рекомендуется использовать принципиально новый, не использовавшийся ранее **индекс специфического связывания (ИСС)**, представляющего собой безразмерную величину, отражающую *долю специфического связывания рецепторов от общего специфического связывания* (абсолютные значения активности связывания β -АР (имп./мин)/значения общего специфического связывания):

абсолютные значения активности связывания β -АР (имп./мин)

~~значения общего специфического связывания(имп./мин)~~

Тем самым нивелируются различия условий постановки и значения оказываются в одной системе координат, для последующего сравнения.

Как уже отмечалось, большее значение имеет не сам индекс специфического связывания, а его изменение на фоне применения специфических лигандов, взаимодействующих с бета- и холинорецепторам. Для оценки динамики индекса специфического связывания рекомендуется использовать отношение данного показателя после ингаляции сальбутамола 400 мкг или непосредственно после проведения бронхопровокационного тестирования с метахолином. На основании проведенных исследований можно заключить, что клинически значимым изменением индекса специфического связывания можно считать динамику более 7%. Таким образом, значение данного показателя выше 1,07 означает увеличение вклада соответствующего рецептора в общее специфическое связывание, а снижение ниже 0,93 – уменьшение этого вклада.

6. Персонализированный подход к выбору дозировки дозы β 2-агониста

Предложенный вариант модификации радиолигандного метода определения рецепторной активности β -адренорецепторов Т-лимфоцитов человека с использованием [125 I] цианопиндолола позволяет изучение характеристик β -адренорецепторов в практической медицине. Использование нового предложенного расчетного показателя – индекса специфического связывания имеет значение с клинической точки зрения, так как в ходе проведенных работ было установлено, что :

1. Определение индекса специфического связывания β -рецепторов клинически релевантно, так как тесно связано с клинически значимыми параметрами, что подтверждается наличием тесных корреляционных связей между ними у пациентов с кардиореспираторной патологией.
2. Характеристики активности связывания β -АР у пациентов зависят от наличия бронхообструктивной патологии.
3. Характеристики активности связывания зависят от назначаемых препаратов, воздействующих на β -адренорецепторы, при этом назначение β 2-агониста отражается на изменении активности связывания β 1-адренорецепторов, что позволяет предположить тесные рецепторные взаимодействия на уровне вторичных внутриклеточных мессенджеров.

Описанный подход, конечно, не дает информации о точном количестве β 1 – и β 2-адренорецепторов на поверхности Т-лимфоцитов, потому что количество связанного клетками лиганда, в данном случае [125 I]цианопиндолола, зависит не только от количества рецепторов, экспонированных на внешней стороне клеток, но и от аффинности рецепторов и

их доступности для взаимодействия с лигандом из раствора. Поэтому в данном случае более правильно говорить о рецепторной активности и ее динамике под действием β_2 -агониста сальбутамола или холинергического препарата метахолин в ходе бронхопровокационного теста., что, возможно, окажется более значимым для клинической практики, чем определение экспрессии и аффинности рецепторов. Таким образом, для определения индивидуальной дозировки бета-агониста необходимо использование нового параметра – динамики рецепторной активности клетки, которая определена как количество лиганда, связанного с β -адренорецепторами при определенных условиях. Этот параметр позволяет количественно оценивать функциональную активность адренорецепторов. В ходе проведенных ранее работ (Агапова, 2015, Смолякова 2019) было продемонстрировано, что ключевое значение имеет не абсолютное измерение активности связывания бета-рецепторов, а изменение данного параметра под влиянием специфических лигандов (например, бета2-агонистов или метахолина).

Таким образом, при проведении бронходилатационного или бронхопровокационного теста по стандартной методике необходимо осуществить забор крови по следующей схеме: для исследований на Т-лимфоцитах забор периферической крови осуществлялся трижды у каждого пациента:

1. один раз – контрольный (исходно),
2. второй раз – через 30 мин после ингаляции сальбутамола 400 мкг или непосредственно после окончания ингаляции метахолина в ходе бронхопровокационного теста.

В каждой пробе по вышеописанной методике определяется активность связывания бета-рецепторов, после чего формируется индивидуальный профиль изменения активности связывания бета-рецепторов на фоне применения бета-агониста или холинергика. Характерные паттерны изменений активности связывания имеют несколько основных вариантов:

1. У здоровых добровольцев под действием β_2 -агониста короткого действия активность β_2 -адренорецепторов Т-лимфоцитов снижается. После окончания действия активность возвращается к исходному уровню.
2. У пациентов с бронхиальной астмой под действием β_2 -агониста короткого действия активность β_2 -адренорецепторов Т-лимфоцитов повышается. После окончания действия активность возвращается к исходному уровню.
3. При использовании сальбутамола при наличии бронхообструктивной патологии повышение индекса специфического связывания бета1-адренорецепторов ассоциировано с лучшими клиническими показателями, а снижение индекса специфического связывания бета2-адренорецепторов – с худшими клиническими показателями.

Таким образом, выявление характерных паттернов изменений активности связывания бета-рецепторов позволяет оценить изменения, характерные для бронхиальной астмы на рецепторном уровне, а амплитуда изменений измеряемого показателя характеризует рецепторную активность ингаляционного бета - агониста у конкретного спортсмена. Серийное сопоставление функциональных параметров с данными радиолигандных исследований (минимально по двум точкам наблюдения с использованием различных дозировок бета - агонистов (200 и 400 мкг. сальбутамола) с контролем паттерна изменений активности связывания рецепторов под влиянием бета-агониста может позволить определить минимальную дозу бета - агониста, позволяющую получать требуемое воздействие на бета₂ - адренорецепторы.

Заключение

Предлагаемая методология выявления бронхиальной гиперреактивности у спортсменов циклических видов спорта с последующим *ex vivo* тестированием β - адренорецепторов лимфоцитов периферической крови на основе радиолигандного анализа, является оригинальной, разработанной специалистами ФГБУ «НИИ пульмонологии ФМБА России». Данный подход, объединяющий современные методы функциональной и радиолигандной диагностики, позволит определить дозы ингаляционных β_2 - агонистов, требующихся для профилактики бронхоспазма в ответ на физические стимулы, которым подвергается организм спортсменов, имеющих гиперреактивность бронхов.

Для разработки рекомендаций с высоким уровнем доказательности, которые могли бы быть предложены в качестве практического инструмента для внедрения в работу спортивных федераций для обследования спортсменов, требуется продолжение начатой научно - исследовательской работы с увеличением объема выборки и статистической мощности.

Список литературы:

1. Bjermer L., Anderson S. D. - Bronchial hyperresponsiveness in athletes: mechanisms for development. In: Diagnosis, Prevention and Treatment of Exercise -Related Asthma, Respiratory and Allergic Disorders in Sports. Edited by K-H. Carlsen, L. Delgado and S. Del Giacco. Eur Respir Mon, 2005, 33, 19 - 34. DOI: 10.1183/1025448x.00033 - 004
2. Carlsen KH, Anderson SD, Bjermer L, et al.; European Respiratory Society; European Academy of Allergy and Clinical Immunology. - Exercise-induced asthma, respiratory and allergic disorders in elite athletes: epidemiology, mechanisms and diagnosis: Part I of the report from the Joint Task Force of the European Respiratory Society (ERS) and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) in cooperation with GA2LEN. Allergy. 2008; 63 (4): 387 - 403. doi: 10.1111/j.1398 - 9995.2008.01662.x.
3. Fitch KD. An overview of asthma and airway hyper-responsiveness in Olympic athletes Br J Sports Med. 2012 May; 46(6):413 - 6
4. Management of allergic Olympic athletes. J Allergy Clin Immunol. 1984; 73 (5 Pt 2): 722 - 727
5. Schmidt, R. A., & Lee, T. D. (2011). Motor control and learning: A behavioral emphasis (5th ed.)
6. Agapova O. Yu., Skoblov Yu. S., Zykov K. A., Rvacheva A.V., Beilina V. B., Masenko V. P., Chazova I. E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41(5). P. 529 - 535
7. Агапова О. Ю., Скоблов Ю. С., Ткачев Г. А., и др.//Мол.биол. 2016 Т. 50(6).С. 999 - 1006
8. Чинкин А. С. Соотношение адреналин: норадреналин и альфа - : бета - адренорецепторы в миокарде и адренергические хроно - и инотропные реакции при экстремальных состояниях и адаптации. Наука и спорт: современные тенденции. № 3 (Том 4), 2014 г.
9. Смолякова Е.В. Влияние терапии селективным бета1-адреноблокатором и бета2-агонистом на изменение характеристик бета-адренорецепторов у пациентов с кардиореспираторной патологией. Автореферат на соискание ученой степени канд. мед. наук. Москва 2019.