

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Мухаметова Л. И., Еремин С. А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», химический факультет, Москва, Россия

Контактная информация:

Мухаметова Лилия Инилевна,
ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»,
химический факультет,
Ленинские горы, д. 1/3, Москва, Россия,
119991.
E-mail: liliya106@mail.ru

Статья поступила в редакцию 31.05.2023
и принята к печати 25.09.2023.

Резюме

Современная клиническая медицина своими достижениями помогла человеку избавиться от многих инфекционных и неинфекционных заболеваний, восстановить здоровье, сохранить и улучшить качество жизни людей с хроническими болезнями. В медицинской практике используются десятки тысяч лекарственных средств. Однако, как ни парадоксально это звучит, создав лекарства практически от всех болезней, человечество не стало здоровее, а потребность в медикаментах с каждым годом только растет. Более чем у 20 % людей, получающих фармпрепараты в процессе терапии, возникают различные осложнения. Поэтому поиск лекарств не прекращается, а только расширяется в настоящее время.

Не менее важной остается проблема обнаружения лекарственных средств в объектах окружающей среды и продуктах питания. Большинство подобных соединений, попадающих в сточные воды с фармацевтических производств, ферм, диагностируются даже в прошедшей очистку воде.

Метод поляризации флуоресценции чрезвычайно широко распространен в клинической и биомедицинской практике. Благодаря внедрению в лабораторную диагностику приборов, способных измерять сигнал поляризации флуоресценции на микропланшетах, поляризационный флуоресцентный анализ применяется не только в традиционном формате как обнаружение лекарственных средств в физиологических жидкостях человека, объектах окружающей среды и продуктах питания, но и в высокотехнологическом скрининге лекарственных препаратов, заметно ускоряя и облегчая процесс выявления новых лекарств.

Ключевые слова: антибиотики, высокопроизводительный скрининг, иммуноанализ, лекарства, поляризация флуоресценции.

Для цитирования: Мухаметова Л.И., Еремин С.А. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для определения и скрининга лекарственных веществ. Трансляционная медицина. 2023; 10(5):412-422. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-5-412-422. EDN: DAAWNH

FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION AND SCREENING OF MEDICINES

Liliya I. Mukhametova, Sergei A. Eremin

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Corresponding author:

Liliya I. Mukhametova,
Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gori, 1/3, Moscow, Russia, 119991.
E-mail: liliya106@mail.ru

Received 31 May 2023; accepted
25 September 2023.

Abstract

Modern clinical medicine with its achievements has helped a person to get rid of many infectious and non-communicable diseases, restore health, preserve and improve the quality of life of people with chronic diseases. Tens of thousands of medicines are used in medical practice. However, paradoxical as it sounds, having created medicines for almost all diseases, humanity has not become healthier and the need for medicines is only growing every year. More than 20 % of people receiving medications during therapy have various complications. Therefore, the search for medicines does not stop, but only increases at the present time.

Another important problem is the detecting drugs in environmental objects and food products. Most drugs that get into wastewater from pharmaceutical factories and farms, even after treatment at wastewater treatment plants, are still diagnosed in the water.

The method of fluorescence polarization is extremely widespread in clinical and biomedical fields. Thanks to the introduction into laboratory diagnostics of devices capable of measuring the signal of fluorescence polarization on microplates, polarization fluorescent analysis is used not only in the traditional format: the detection of drugs in human physiological fluids, environmental objects and food, but also in high-tech screening of drugs, significantly speeding up and facilitating the process of identifying new drugs.

Key words: antibiotics, fluorescence polarization, high-throughput screening, immunoassay, medicines.

For citation: Mukhametova LI, Eremin SA. Fluorescence polarization immunoassay for the determination and screening of medicines. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(5):412-422. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-5-412-422. EDN: DAAWNH

Поиск лекарств — достаточно сложный, но увлекательный процесс, конечная цель которого состоит в том, чтобы оценить состояние здоровья, определить способ лечения заболевания и снизить побочные эффекты при терапии. На первом этапе разработки лекарств биологи выявляют мишень для проведения терапии, которая может быть рецептором или ферментом, которая обладает определенной функцией в организме. Нарушение этой функции приводит к заболеванию. Лекарство — это, как правило, низкомолекулярное вещество, которое специфически связывается

с мишенью и изменяет клеточный ответ. Основой для разработки активных лекарственных средств являются молекулы, способные ингибировать или активировать мишень. В ходе поиска таких молекул ученым приходится анализировать огромное количество веществ. Сократить время отбора перспективного лекарственного средства возможно при помощи инновационных технологий, таких как высокопроизводительный скрининг (HTS).

Первоначальный скрининг лекарств проводится с помощью молекулярных анализов, которые сосредоточены на взаимодействии между канди-

датом в лекарство и изолированной очищенной мишенью. Эти анализы предназначены для тестирования сотен тысяч соединений, подобных лекарствам, из коммерчески доступных или целевых библиотек. На следующем этапе проводятся клеточные исследования выбранной группы соединений. Традиционные клеточные исследования были менее подходящими для HTS. Однако интеграция проточной цитометрии с планшет-ридерами увеличила применение высокопроизводительных клеточных анализов при поиске лекарств [1]. В последнее время оптические методы, использующие флуоресцентно меченные молекулы, стали доминирующими в открытии лекарств, начиная от молекулярных анализов и заканчивая визуализацией биораспределения препаратов во всем организме. Эти методы почти полностью заменили радиоактивное мечение, которое широко применялось в XX веке. Это связано с превосходной чувствительностью флуорофоров, с разнообразием их спектральных характеристик: интенсивностью, временем жизни и поляризацией. Быстро растущее разнообразие удобных, недорогих коммерческих флуорофоров делает флуоресцентные молекулы привлекательными для исследований при открытии лекарств.

Одним из распространенных методов тестирования флуоресцентно меченных соединений является поляризация флуоресценции (FP). Благодаря универсальности FP и наличию высококачественных поляризаторов, стабильных детекторов и источников возбуждения, этот метод нашел широкое применение в различных биологических приложениях: исследование клеточного микроокружения [2] и мониторинг клеточных сигнальных путей [3], до 2D и 3D-визуализация, [4], оценка систем доставки лекарств [5], обнаружение органических веществ и лекарственных средств [6–8].

Методы FP становятся все более популярными. За последние несколько десятилетий количество и разнообразие исследований поляризации флуоресценции увеличилось поразительно, и в настоящее время этот метод чрезвычайно широко распространен в клинической и биомедицинской областях [8]. Настоящий взрыв исследований FP, начавшийся в середине 1980-х годов, был обусловлен широким распространением коммерческих приборов, оснащенных поляризаторами, коммерческой доступностью огромного количества флуоресцентных зондов, а в области клинической химии — внедрением прибора TDx (и связанных с ним реагентов) компанией Abbott Laboratories. Причины популярности поляризации флуоресценции в клинических и высокопроизводительных

анализах многообразны. Во-первых, поляризационные анализы являются гомогенными, то есть нет необходимости в разделении свободного и связанного лиганда. Данные типы анализов часто называют анализами «смешения и измерения». Во-вторых, и это одна из первоначальных мотиваций для развития анализов, основанных на флуоресценции, это отказ от радиоизотопов. В-третьих, поляризационные анализы воспроизводимы и могут быть легко автоматизированы. В данной работе мы кратко проследим историю этого метода и рассмотрим теоретические и практические аспекты, а также приведем примеры из литературы, которые иллюстрируют область применения метода в таких областях, как высокопроизводительный скрининг и иммунологические анализы.

1. Принципы поляризации и анизотропии флуоресценции

Еще в 1926 году Перреном была описана теория поляризации флуоресценции, основанная на наблюдении того факта, что излучение небольшой флуоресцентной молекулы, возбуждаемой плоскополяризованным светом, в значительной степени деполаризуется из-за вращательной диффузии в течение времени жизни флуоресценции [9]. Перреном было выведено следующее уравнение (1):

$$\frac{1}{FP} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{FP_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT}{\eta V} \tau \right) \quad (1)$$

где FP — наблюдаемая поляризация, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, η — вязкость раствора, FP_0 — внутренняя поляризация (значение поляризации при отсутствии молекулярного вращения или FP, когда $T/\eta \rightarrow 0$), V — молярный объем, а τ — время жизни возбужденного состояния флуоресценции.

Уравнение (1) демонстрирует, что наблюдаемая поляризация флуоресценции зависит от молекулярного объема флуоресцентных частиц при постоянной температуре и вязкости. Следовательно, поляризацию флуоресценции можно использовать для обнаружения биологических процессов, которые сопровождаются изменением молекулярной массы вещества, например, при связывании или ферментативном расщеплении субстрата. Время вращательной корреляции (θ) для молекулы (уравнение (2)), входит в уравнение (1), и становится очевидно, что FP увеличивается с увеличением θ и уменьшается с увеличением τ .

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \quad (2)$$

В 1950-х годах Вебер развил теорию Перрена для вращения эллипсоида и впервые разработал прибор для измерения поляризации флуоресценции и применил его к изучению белков [10, 11]. Для измерения поляризации флуоресценции в лаборатории флуоресцентный образец возбуждается поляризованным светом, и интенсивности излучения регистрируются по каналам, параллельным (I_{\parallel}) и перпендикулярным (I_{\perp}) электрическому вектору возбуждающего света (рис. 1).

Эти измерения могут быть использованы для расчета либо поляризации флуоресценции (FP), либо анизотропии флуоресценции (FA), которые в настоящее время обе широко используются. Уравнение (3) показывает расчет FP, который количественно определяется как разница между параллельной (I_{\parallel}) и перпендикулярной (I_{\perp}) интенсивностями излучения, нормированная на общую интенсивность флуоресценции излучающего пучка.

$$FP = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (3)$$

Анизотропия флуоресценции (4) определяется как разница между параллельной (I_{\parallel}) и перпендикулярной (I_{\perp}) интенсивностями излучения, нормированная на общую интенсивность флуоресценции образца.

$$FA = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4)$$

Стоит отметить, что анизотропия не дает никакой дополнительной информации о поляризации, и обычно используются обе функции. Анизотропия иногда предпочтительнее, поскольку разложение анизотропии на значения ее компонентов представляется более простым, чем для поляризации, хотя в конечном счете различия оказыва-

ются незначительными [12, 13]. Кроме того, общая интенсивность флуоресценции, рассчитанная как знаменатель в уравнении (4), полезна для маркировки интерференционных соединений.

Таким образом, практически поляризация флуоресценции может быть использована для измерения изменений скорости вращательной диффузии флуорофора, как показано на рисунке 2, и измерения FP могут дать информацию о размере и форме флуорофора и молекулы, образующей комплекс с флуорофором. При связывании флуорофора с макромолекулой комплекс будет вращаться намного медленнее, при этом время корреляции вращения будет близко к типичному времени жизни флуоресценции, что и будет приводить к поляризованному излучению. Это формирует основу для количественного определения доли флуорофора, связанного с макромолекулой (рис. 2). Анализы с участием антител, называемые флуоресцентно поляризационными иммуноанализами (FPIA), были впервые описаны в 1960-х годах и широко использовались для разработки различных анализов поляризации флуоресценции. В настоящее время в качестве распознающего реагента используются не только антитела, но и рецепторы, ферменты и белки.

Предельное значение поляризации или анизотропии флуоресценции связано с молекулярной массой вещества и временем жизни флуоресценции. Типичные флуорофоры, такие как флуоресцеин или BODIPY, имеют идеальное время жизни флуоресценции, позволяющее измерять FP между небольшим меченым зондом (~ 1500 Да) и рецептором макромолекулы ($> \sim 15\,000$ Да).

Использование планшетных флуориметров, которые позволяют одновременно осуществлять в зависимости от возможностей приборов 96, 384

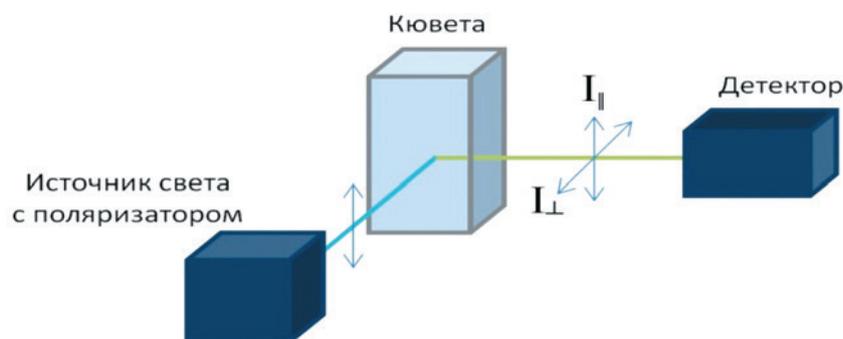


Рис. 1. Схема измерения сигнала поляризации флуоресценции

Figure 1. Fluorescence polarization signal measurement scheme

или даже 1 536 анализов, значительно расширяет возможности HTS.

Обычно пригодность анализа для HTS оценивается на основе фактора Z' [14]. Уравнение (5) показывает, как рассчитать коэффициент Z' , где средние значения и стандартные отклонения для положительного и отрицательного контролей обозначены μ^+ , σ^+ и μ^- , σ^- соответственно.

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_+ + 3\sigma_-}{|\mu_+ - \mu_-|} \quad (5)$$

Если значение коэффициента Z' меньше нуля, это указывает на низкое качество анализа. Анализы с нулевым коэффициентом Z' могут работать как подход «да/нет», но не дискриминировать положительный и отрицательный контроли, что приводит к выявлению как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Значение коэффициента Z' от нуля до 0,5 указывает на небольшую полосу разделения, тогда как значение фактора Z' между 0,5 и 1 указывает на превосходное качество анализа с большой полосой разделения между высоким и низким контролями. Предпочтительно оптимизированные анализы FP имеют значения Z' выше 0,5, что хорошо подходит для HTS.

Таким образом, суть FP при поиске или обнаружении лекарств заключается в его способности различать гидродинамический радиус флуоресцентного объекта при его взаимодействии с лекарством. Почти все анализы FP основаны на косвенном измерении изменения размера и процессов ассоциации,

диссоциации, расщепления, связывания, перегруппировки и многих других типов реакций, сопровождающих взаимодействие между лекарственным средством и биологической мишенью.

2. Применение поляризации флуоресценции для скрининга лекарственных веществ

Принципы FP широко применяются в анализах для обеспечения высокопроизводительного скрининга библиотек малых молекул для разработки новых лекарственных средств. При поиске в базе данных биоанализов PubChem по ключевым словам «поляризация флуоресценции» и «анизотропия флуоресценции» на май 2023 года обнаружено более 1 000 уникальных анализов на основе FP и FA. FP-анализы были разработаны для изучения впечатляющего разнообразия классов биологических мишеней, включая рецепторы, ионные каналы, эпигенетические регуляторы, факторы транскрипции, киназы, протеазы и изомеразы. Это подчеркивает полезность FP-анализов для получения информации о ряде важнейших биологических активностей для применения в HTS. Здесь мы кратко обсудим различные типы анализов FP, реализованные в HTS, из последних литературных данных. Одним из основных применений FP-анализов является изучение биологически значимых молекулярных взаимодействий, либо за счет прямого связывания флуоресцентно меченой молекулы, либо за счет конкуренции с немечеными кандидатами на лекарство. Такие подходы позволили проводить скрининг, дающий возможность судить о взаимодействиях рецеп-

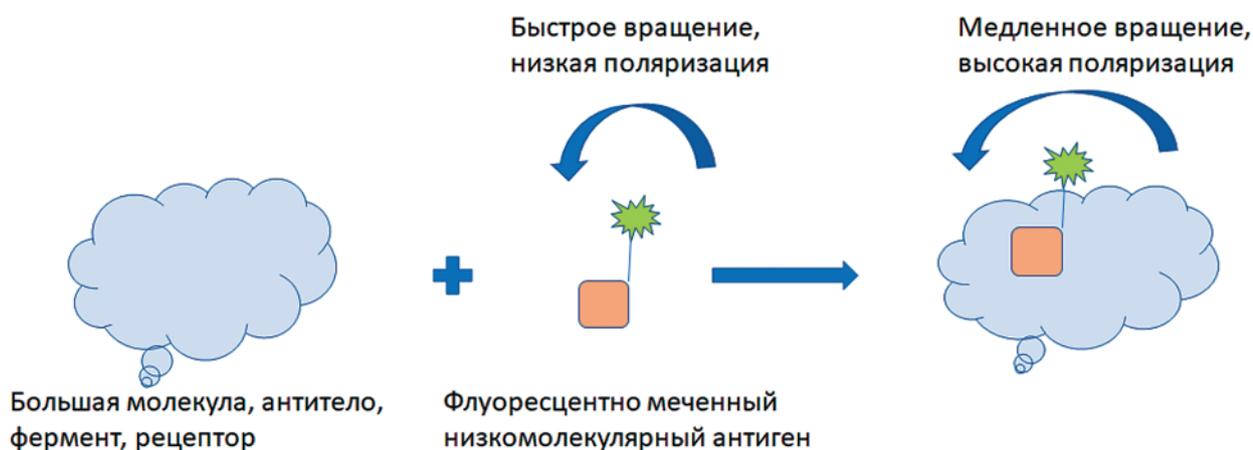


Рис. 2. Принцип изменения сигнала поляризации флуоресценции при связывании низкомолекулярного антигена с флуоресцентной меткой с большой молекулой

Figure 2. Principle of fluorescence polarization signal change upon binding fluorescent labeled low molecular antigen with large molecule

тор–лиганд, белок–пептид, белок–белок и белок–нуклеиновая кислота.

Например, MitoNEET принадлежит к семейству белков CDGSH Iron-Sulphur Domain (CISD) и представляет собой белок, обнаруженный на внешней мембране митохондрий. Специфические функции данного белка еще до конца не ясны, но он участвует в регуляции митохондриальной биоэнергетики при некоторых метаболических заболеваниях. К сожалению, поиск лекарств, нацеленных на MitoNEET для улучшения метаболических нарушений, затруднен из-за отсутствия анализов связывания лигандов для этого митохондриального белка. В работе [15] был представлен протокол, позволяющий осуществить высокопроизводительный скрининг методом поляризации флуоресценции аденозинтрифосфата (АТФ), чтобы облегчить обнаружение лекарств, нацеленных на MitoNEET. Основываясь на наблюдениях, что АТФ взаимодействует с MitoNEET, при разработке анализа использовали АТФ-флуоресцеин. Разработанный анализ подходит как для 96-, так и для 384-луночных планшетов. Было показано, что данный анализ надежно оценивает аффинность связывания соединений по сравнению с радиоактивным анализом с рекомбинантным белком MitoNEET человека. Разработанный анализ имеет важное значение для выявления новых химических зондов для метаболических заболеваний. Это позволит ускорить открытие лекарств, нацеленных на MitoNEET и, возможно, на другие члены семейства генов CISD.

Другое предположение — о том, что вирусные макромолекулы могут связываться и/или гидролизовать адениндифосфатрибозу (ADP-р) из белков, противодействовать иммунному ответу хозяина и быть важными мишенями для разработки противовирусных препаратов — позволило разработать методы HTS для нахождения ингибиторов этих макромолекул [16]. Используя новый трейсер TAMRA-ADPr, соединение ADP-рибозы, конъюгированное с тетраметилпроламином, разработали надежный анализ FP для различных вирусных и человеческих макромолекул, включая SARS-CoV-2 Macro1. С использованием данного анализа были подтверждены ингибирующие характеристики уже известных низкомолекулярных ингибиторов SARS-CoV-2 Macro1 и идентифицированы новые.

В настоящее время не удовлетворен спрос на новые терапевтические средства для лечения сердечной недостаточности, и поиск новых препаратов и мишеней очень актуален. В последнее время сократительные миофиламенты стали привлекательной мишенью для разработки новых терапевтических средств. Однако клиническое применение

препаратов, воздействующих на миофиламенты, ограничено, а дальнейший прогресс сдерживается неполным пониманием функции миофиламентов на молекулярном уровне и технологиями скрининга малых молекул, точно воспроизводящих эту функцию *in vitro*. Авторам удалось разработать и охарактеризовать новые высокопроизводительные платформы для скрининга низкомолекулярных эффекторов, нацеленных на взаимодействие между субъединицами тропонина С и тропонина I сердечного тропонинового комплекса [17]. Анализы на основе поляризации флуоресценции использовались для скрининга коммерчески доступных библиотек соединений, и был идентифицирован новый сенситизатор кальция, который способен стабилизировать активный тропонин.

Еще одно важное приложение для анализа FP в HTS — это обнаружение низкомолекулярных модуляторов активности различных ферментов, в том числе киназы [18], фосфатазы [19], протеазы [20], нуклеазы [21], деацетилазы [22] тканевой трансглутаминазы [23].

Методы обнаружения можно также разделить на два типа: (1) прямое измерение образования продукта, (2) измерение продукта посредством конкуренции FP. Например, анализы киназы IMAP и PDE (Molecular Devices) являются примерами анализов FP, которые непосредственно измеряют продукт ферментативной реакции. В анализе киназы IMAP флуоресцентно меченный фосфо-пептидный продукт обнаруживается с помощью гранул IMAP (гранулы IMAP служат макромолекулами) [24]. Преимущества таких анализов, как IMAP, включают: (1) прямое измерение продукта; сигнал растет с увеличением концентрации продукта; (2) активность соединения (% ингибирования и IC50) существенно не меняется в зависимости от скорости конверсии анализа, когда скорость конверсии не превышает 50 % [25]; и (3) анализ интерференции доступен для устранения ложноположительных результатов из-за помех в системе обнаружения. К недостаткам анализа IMAP относятся: (1) использование меченого субстрата вместо «нативного»; (2) анализ требует относительно более высокой конверсии (20–50 %) субстрата, чем обычные функциональные анализы с использованием более традиционных схем обнаружения для достижения приемлемого изменения сигнала FP.

Методы высокотехнологического скрининга для отбора лекарств-кандидатов на основе FP чаще используют конкурентный формат, поскольку в основном лекарственные препараты имеют небольшую молекулярную массу. Каспазы принадлежат к семейству цистеиновых протеаз и играют важ-

ную роль в апоптозе и воспалительных реакциях. Сейчас уже разработаны ингибиторы активного центра каспаз. Ингибирование взаимодействия LPS-Casp-4 является новой стратегией в разработке селективных ингибиторов с новым механизмом действия для лечения инфекционных заболеваний и сепсиса, вызванных LPS. Известно, что распознавание внутриклеточного липополисахарида (LPS) каспазой-4 (Casp-4) имеет решающее значение для защиты хозяина от грамотрицательных патогенов. LPS связывается с N-концевым доменом прокаспазы-4, что приводит к автопротеолитической активации с последующим высвобождением провоспалительных цитокинов и пироптотической гибелью клеток. Гиперактивация Casp-4 приводит к усилению воспалительной реакции, связанной с сепсисом. Была разработана система HTS, основанная на флуоресценции для обнаружения ингибиторов взаимодействия LPS и Casp-4. N-концевой домен каспазы был конъюгирован с флуоресцентным красителем Alexa488, изучено его взаимодействие с LPS, и, используя конкурентный анализ HTS на основе FP, удалось рассчитать эффективность 1 443 соединений и проанализировать ингибирующую активность Casp-4. Выявлены четыре перспективных соединения. Эти результаты впервые продемонстрировали, что взаимодействие между LPS и Casp-4 может быть мишенью для поиска лекарств для разработки селективных ингибиторов Casp-4 [26].

Другой пример HTS, использующий конкурентный формат анализа на основе FP, это поиск ингибиторов деацетилазы [22, 27]. Гистондеацетилазы (HDAC) представляют собой семейство белков, ответственных за деацетилирование остатков лизина, которое имеет значение во множестве процессов: транскрипция, клеточное распознавание и передача сигналов, субклеточная локализация и белковая активность. Гистондеацетилаза 6 является новой клинической мишенью для лечения нескольких гематологических видов рака и заболеваний центральной нервной системы. В работе представлен HDAC6-селективный флуоресцентный зонд, который обеспечивает быстрый и надежный высокопроизводительный скрининг новых лекарственных препаратов, направленных на ингибирование каталитического домена HDAC6. Активность деацетилирования HDAC6 на цитозольных негистоновых субстратах, таких как α -тубулин, способствует клеточной подвижности и миграции, что необходимо для пролиферации раковых клеток, а также для прогрессирования нейродегенеративных состояний, таких как болезнь Альцгеймера. HDAC6 является подтверж-

денной клинической мишенью. Методом FP удалось выявить три новых препарата — ингибитора HDAC6.

Таким образом, благодаря преимуществам метода, возможной миниатюризации и автоматизации FPIA стал мощным инструментом для проведения высокотехнологического скрининга препаратов, позволяющим быстро и эффективно обнаруживать кандидаты для терапии различных заболеваний.

3. Определение лекарственных средств

Следующей задачей метода FP является определение этих самых лекарственных веществ не только в физиологических жидкостях человека для терапевтического мониторинга, но и в объектах окружающей среды, поскольку производство и применение фармпрепаратов рано или поздно приводит к ее загрязнению.

Все терапевтические препараты требуют мониторинга их концентрации в крови для последующей коррекции дозы, обеспечения эффективности действия препарата и минимизации побочных эффектов. Тесты для определения концентрации лекарственного средства в крови в настоящее время проводятся в центральных лабораториях, что требует значительного объема пробы (обычно несколько мл), при этом являются дорогостоящими и достаточно длительными, что может снизить терапевтический эффект в случае позднего назначения терапии и повлиять на клинический исход. Быстрое и точное количественное определение важнейших лекарственных препаратов в цельной крови в пункте оказания медицинской помощи позволило бы сократить время обращения и обеспечить более удобный доступ пациентам. Предпочтительно проводить такие измерения быстро и с небольшими количествами образцов для проведения тестирования по месту оказания медицинской помощи [28].

Одним из подходящих методов является FPIA [29, 30]. Внедрение в клиническую практику прибора TDx и выпуск реагентов к нему фирмой Abbott Laboratories способствовали тому, что метод FPIA стал доступен во многих лабораториях [31].

Однако использование метода FPIA в клинике было ограничено и другими проблемами — это неспецифическое связывание флуоресцентно меченого антигена с белками сыворотки и ее собственная флуоресценция. Для ряда препаратов эти проблемы были решены, и разработаны тесты для определения различных терапевтических препаратов в плазме или сыворотке крови, включая гентамицин, карбамазепин [32, 33], теофиллин [34], фенитоин и фенобарбитал [35], ванкомицин [36], и было показано,

Таблица 1. Лекарственные препараты, на которые рассчитан FPIA

Table 1. Medicines for which the FPIA has been developed

Лекарственный препарат	Физиологическая активность и применение	Ссылка
Теofilлин	Применяется в лечении бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эмфиземы и апноэ у новорожденных	[34]
Фенитоин, фенобарбитал	Противосудорожные препараты	[35]
Ванкомицин	Антибиотик, используемый для лечения ряда бактериальных инфекций	[36]
Клинафлоксацин	Препарат, принадлежащий к классу галогенированных фторхинонов. Обладает антибактериальным действием, применяется в ветеринарии	[38]
Цефалексин	Антибиотик, широко используемый в ветеринарии для профилактики инфекционных заболеваний. Также способен стимулировать рост животных	[39]
Валнемулин	Антибиотик, использующийся для лечения респираторных и кишечных инфекций у свиней, птицы, кроликов. При применении может вызывать побочные эффекты: отсутствие аппетита, лихорадка и атаксия	[40]
Эритромицин	Макролидный антибиотик, применяется для лечения инфекционных заболеваний	[41]
Канамицин и гентамицин	Аминогликозидные антибиотики, препятствующие синтезу белка на рибосоме	[32, 42]
Карбамазепин	Противоэпилептическое лекарственное средство	[33, 43]
Диклофенак	Нестероидный противовоспалительный препарат	[44]
Сульфатиазол	Группа сульфаниламидов, противомикробная активность	[45, 46]

что они хорошо коррелируют с рядом эталонных методов. Анализы были полностью автоматизированы с одновременным повышением скорости и простоты использования, а также значительным улучшением производительности. Метод FPIA проще и быстрее других методов и более подходит для проведения анализов в клинике. Например, количественный анализ теофиллина методом FPIA требует всего около 10 мин, в течение которых 20 мкл сыворотки разбавляют 700 мкл буфера и к 50 мкл разбавленной сыворотки добавляют 25 мкл раствора для предварительной обработки. Затем раствор смешивают с 25 мкл раствора флуоресцентно меченного конъюгата и 25 мкл раствора антител и инкубируют в течение 3 мин с последующим определением сигнала FP [37]. В неотложной медицине быстрый анализ лекарственного средства необходим, когда у пациента развиваются симптомы отравления. В педиатрии желателен анализ лекарственного средства с использованием одной или всего нескольких капель крови, поскольку трудно взять образцы крови

у младенца или маленького ребенка. Таким образом, потребность в экспресс-анализе с использованием одной или нескольких капель крови становится существенной для мониторинга лекарств, особенно в неотложной медицине и педиатрии.

В настоящее время не менее важной остается проблема обнаружения лекарственных средств в объектах окружающей среды и продуктах питания. Большинство медикаментов, попадая в сточные воды с фармацевтических производств, ферм, все равно обнаруживаются даже в прошедшей очистку воде. Применение антибиотиков в ветеринарии вызывает все большие опасения в связи с возникновением новых штаммов бактерий с устойчивостью к действию антибактериальных средств. Поэтому необходимы методы контроля лекарственных препаратов в открытых водоемах и продуктах питания, которые быстро и специфично могут определять их наличие. Метод FPIA был разработан для определения многих антибиотиков, противовоспалительных средств, в табли-

це приведена лишь небольшая часть препаратов, на которые рассчитан FPIA (табл. 1).

Таким образом, с появлением на рынке приборов для измерения поляризации флуоресценции, внедрением их в клинические лаборатории и благодаря своим преимуществам (простоте исполнения, высокой чувствительности и селективности) метод FPIA начал широко применяться с середины 1980-х годов в определении низкомолекулярных лекарственных средств в физиологических жидкостях и продуктах питания. С момента разработки приборов для измерения сигнала поляризации флуоресценции на микропланшетах, способных одновременно измерять от 96 до 1 536 анализов, метод FPIA приобрел еще большую популярность не только в своем традиционном формате, но и в высокопроизводительном скрининге и открытии лекарств.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова 122040600057-3. / The work was supported by the state task of Lomonosov Moscow State University 122040600057-3.

Список литературы / References

- Dufort S, Sancey L, Wenk C, et al. Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1798(12):2266–2273. DOI: 10.1016/j.bbame.2010.03.016.
- Tiemeijer BM, Sweep MWD, Sleebom JFF, et al. Probing Single-Cell Macrophage Polarization and Heterogeneity Using Thermo-Reversible Hydrogels in Drop-let-Based Microfluidics. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021; 9:715408. DOI: 10.3389/fbioe.2021.715408.
- Yi NY, He Q, Caligan TB, et al. Development of a Cell-Based Fluorescence Polarization Biosensor Using Preproinsulin to Identify Compounds That Alter Insulin Granule Dynamics. *Assay Drug Dev Technol*. 2015; 13(9):558–569. DOI: 10.1089/adt.2015.665.
- Albrecht A, Pfennig D, Nowak J, et al. Amplitude Analysis of Polarization Modulation Data and 3D-Polarization Demodulation (3D-SPoD). Preprint. DOI: 10.1101/2020.03.10.986034.
- Georgiev NI, Bakov VV, Anichina KK, et al. Fluorescent Probes as a Tool in Diagnostic and Drug Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023; 16(3):381. DOI: 10.3390/ph16030381.
- Nasir MS, Jolley ME. Fluorescence polarization: an analytical tool for immunoassay and drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen*. 1999; 2(4):177–190.
- Maltseva LN, Mukhametova LI, Eremin SA. Polarization fluorescence immunoassay for quantitative determination of organic compounds. Laboratory and production. 2020; 6:78–86. In Russian [Мальцева Л.Н., Мухаметова Л.И., Еремин С.А. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для количественного определения органических соединений. *Лаборатория и производство*. 2020; 6: 78–86]. DOI: 10.32757/2619-0923.2020.6.15.78.86.
- Hendrickson OD, Taranova NA, Zherdev AV, et al. Fluorescence Polarization-Based Bioassays: New Horizons. *Sensors (Basel)*. 2020; 20(24):7132. DOI: 10.3390/s20247132.
- Perrin F. The polarization of fluorescence light. Average life of molecules in their excited state. *J. Phys.* 1926; 7: 390–401. In French [Perrin F. Polarization de la lumière de fluorescence. *Vie moyenne de molecules dans l'etat excite*. *J Phys Radium* 1926; 7:390–401].
- Weber G. Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method. *Biochem J*. 1952; 51(2):145–155. DOI: 10.1042/bj0510145.
- Weber G. Photoelectric method for the measurement of the polarization of the fluorescence of solutions. *JOSA* 1956; 46: 962–970. DOI: 10.1364/JOSA.46.000962.
- Jameson DM, Mocz G. Fluorescence polarization/anisotropy approaches to study protein-ligand interactions: effects of errors and uncertainties. *Methods Mol Biol*. 2005; 305:301–322. DOI: 10.1385/1-59259-912-5:301.
- Buchli R, VanGundy RS, Hickman-Miller HD, et al. Development and validation of a fluorescence polarization-based competitive peptide-binding assay for HLA-A*0201--a new tool for epitope discovery. *Biochemistry*. 2005; 44(37):12491–12507. DOI: 10.1021/bi050255v.
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*. 1999; 4(2):67–73. DOI: 10.1177/108705719900400206.
- Newton E, Starcovic SA, Menze M, et al. Development of a fluorescence screening assay for binding partners of the iron-sulfur mitochondrial protein mitoNEET. *Bioorg Med Chem Lett*. 2023; 89:129310. DOI: 10.1016/j.bmcl.2023.129310.
- Anmangandla A, Jana S, Peng K, et al. A Fluorescence Polarization Assay for Macrod domains Facilitates the Identification of Potent Inhibitors of the SARS-CoV-2 Macrod domain. *ACS Chem Biol*. 2023; 18(5):1200–1207. DOI: 10.1021/acscmbio.3c00092.
- Parijat P, Ponnam S, Attili S, et al. Discovery of novel cardiac troponin activators using fluorescence polarization-based high throughput screening assays. *Sci Rep*. 2023; 13(1):5216. DOI: 10.1038/s41598-023-32476-w.

18. Rohe A, Henze C, Erdmann F, et al. A fluorescence anisotropy-based Myt1 kinase binding assay. *Assay Drug Dev Technol.* 2014; 12(2):136–144. DOI: 10.1089/adt.2013.534.
19. Pirruccello M, Nandez R, Idevall-Hagren O, et al. Identification of inhibitors of inositol 5-phosphatases through multiple screening strategies. *ACS Chem Biol.* 2014; 9(6):1359–1368. DOI: 10.1021/cb500161z.
20. Vickers CJ, González-Páez GE, Umotoy JC, et al. Small-molecule procaspase activators identified using fluorescence polarization. *Chembiochem.* 2013; 14(12):1419–1422. DOI: 10.1002/cbic.201300315.
21. Baughman BM, Jake Slavish P, DuBois RM, et al. Identification of influenza endonuclease inhibitors using a novel fluorescence polarization assay. *ACS Chem Biol.* 2012; 7(3):526–534. DOI: 10.1021/cb200439z.
22. Haus P, Korbus M, Schröder M, et al. Identification of selective class II histone deacetylase inhibitors using a novel dual-parameter binding assay based on fluorescence anisotropy and lifetime. *J Biomol Screen.* 2011; 16(10):1206–1216. DOI: 10.1177/1087057111424605.
23. Hauser C, Wodtke R, Löser R, et al. A fluorescence anisotropy-based assay for determining the activity of tissue transglutaminase. *Amino Acids.* 2017; 49(3):567–583. DOI: 10.1007/s00726-016-2192-5.
24. Gaudet EA, Huang KS, Zhang Y, et al. A homogeneous fluorescence polarization assay adaptable for a range of protein serine/threonine and tyrosine kinases. *J Biomol Screen.* 2003; 8(2):164–175. DOI: 10.1177/1087057103252309.
25. Wu G, Yuan Y, Hodge CN. Determining appropriate substrate conversion for enzymatic assays in high-throughput screening. *J Biomol Screen.* 2003; 8(6):694–700. DOI: 10.1177/1087057103260050.
26. An J, Kim SY, Yang EG, et al. A Fluorescence-Polarization-Based Lipopolysaccharide-Caspase-4 Interaction Assay for the Development of Inhibitors. *Molecules.* 2022; 27(8):2458. DOI: 10.3390/molecules27082458.
27. Ashraf QF, Quilates EJ, Olaoye OO, et al. Fluorescence Polarization-Based Competition Assays to Evaluate Histone Deacetylase 6 Inhibitors. *Methods Mol Biol.* 2023; 2589:481–492. DOI: 10.1007/978-1-0716-2788-4_31.
28. Taddeo A, Prim D, Bojescu ED, et al. Point-of-Care Therapeutic Drug Monitoring for Precision Dosing of Immunosuppressive Drugs. *J Appl Lab Med.* 2020; 5(4):738–761. DOI: 10.1093/jalm/jfaa067.
29. Jolley ME. Fluorescence polarization immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma. *J Anal Toxicol.* 1981; 5(5):236–240. DOI: 10.1093/jat/5.5.236.
30. Smith DS, Eremin SA. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391(5):1499–1507. DOI: 10.1007/s00216-008-1897-z.
31. Oeltgen PR, Shank WA Jr, Blouin RA, et al. Clinical evaluation of the Abbott TDx fluorescence polarization immunoassay analyzer. *Ther Drug Monit.* 1984; 6(3):360–367. DOI: 10.1097/00007691-198409000-00018.
32. Ma J, Zhu PL, Xie JW, et al. Restricted-access media high pressure liquid chromatography vs fluorescence polarization immunoassay for analysis of carbamazepine in human plasma. *Acta Pharmacol Sin.* 2002; 23(1):87–91.
33. Wilimowska J, Gomółka E, Pasich A, et al. Comparison of fluorescence polarization immunoassay and high performance liquid chromatography for determination of carbamazepine concentration in blood of poisoned patients. *Przegl Lek.* 2005; 62(6):595–598.
34. Mounié J, Richard L, Ribon B, et al. Methods of theophylline assay and therapeutic monitoring of this drug. *Ann Biol Clin (Paris).* 1990; 48(5):287–293.
35. Ashy AR, el-Sayed YM, Islam SI. Comparison of fluorescence polarization immunoassay and high performance liquid chromatography for the quantitative determination of phenytoin, phenobarbitone and carbamazepine in serum. *J Pharm Pharmacol.* 1986; 38(8):572–577. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1986.tb03083.x.
36. Cheng X, Ma J, Su J. An Overview of Analytical Methodologies for Determination of Vancomycin in Human Plasma. *Molecules* 2022; 27:7319. DOI: 10.3390/molecules27217319.
37. Tachi T, Hase T, Okamoto Y, et al. A clinical trial for therapeutic drug monitoring using microchip-based fluorescence polarization immunoassay. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 401(7):2301–2305. DOI: 10.1007/s00216-011-5304-9.
38. Chen J, Shanin IA, Lv S, et al. Heterologous strategy enhancing the sensitivity of the fluorescence polarization immunoassay of clinafloxacin in goat milk. *J Sci Food Agric.* 2016; 96(4):1341–1346. DOI: 10.1002/jsfa.7228.
39. Beloglazova NV, Eremin SA. Design of a sensitive fluorescent polarization immunoassay for rapid screening of milk for cephalexin. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(28):8525–8532. DOI: 10.1007/s00216-015-9006-6.
40. Zhang H, Mi T, Khan OY, et al. Fluorescence polarization immunoassay using IgY antibodies for detection of valnemulin in swine tissue. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(25):7843–7848. DOI: 10.1007/s00216-015-8948-z.
41. Duan C, Zhang H, Zhang Y, et al. A Robust Homogeneous Fluorescence Polarization Immunoassay for Rapid Determination of Erythromycin in Milk. *Foods.* 2023; 12(8):1581. DOI: 10.3390/foods12081581.
42. Li C, Zhang Y, Eremin SA, et al. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA. *Food Chem.* 2017; 227:48–54. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.058.
43. Oberleitner L, Eremin SA, Lehmann A, et al. Fluorescence polarization immunoassays for carbamazepine – comparison of tracers and formats. *Analytical Methods.* 2015; 7(14): 5854–5861. DOI: 10.1039/C5AY00617A.

44. Raysyan A, Moerer R, Coesfeld B, et al. Fluorescence polarization immunoassay for the determination of diclofenac in wastewater. *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413(4):999–1007. DOI: 10.1007/s00216-020-03058-w.

45. Nesterenko IS, Hendrikson OD, Smirnova NI, et al. Development of polarizing fluorescent immunoassay of sulfatiazole and its application for honey testing. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2023; 59(1):96–102. In Russian [Нестеренко И.С., Гендриксон О.Д., Еремин С.А. и др. Разработка поляризационного флуоресцентного иммуноанализа сульфатиазола и его применение для тестирования мёда. *Прикладная биохимия и микробиология* 2023; 59(1):96–102]. DOI: 10.31857/S0555109923010051.

46. Duan C, Zhang Y, Li P, et al. Dual-Wavelength Fluorescence Polarization Immunoassay for Simultaneous Detection of Sulfonamides and Antibacterial Synergists in Milk. *Biosensors (Basel).* 2022; 12(11):1053. DOI: 10.3390/bios12111053.

Информация об авторах:

Мухаметова Лилия Инилевна, к.х.н., старший научный сотрудник, химический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова;

Еремин Сергей Александрович, д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник, химический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова.

Author information:

Liliya I. Mukhametova, PhD, Senior Researcher, Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University;

Sergei A. Eremin, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Leading Researcher, Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University.