

ИССЛЕДОВАНИЕ КАРДИТОКСИЧНОСТИ ПО СВЯЗЫВАНИЮ С hERG-КАНАЛАМИ СЕРДЦА МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА (PREDICTOR™ hERG FP ASSAY)

Метод используется для предсказания кардиотоксичности препарата по связыванию с hERG-каналами сердца *in vitro*. Ген специфических калиевых каналов (K^+ -каналов) сердца человека (ген hERG, human ether-a-go-go-related gene) кодирует белки калиевых каналов, согласованная работа которых играет ключевую роль в процессе сердцебиения и определяет форму и длительность потенциала действия в клетках сердечной мышцы. Блокировка hERG-каналов сердца приводит к смертельно опасным последствиям: нарушению реполяризации миокарда, увеличению продолжительности QT интервала и желудочковой тахикардии. Уникальной особенностью этих каналов является их относительно быстрая инактивация С-типа вследствие высокой чувствительности к внеклеточным катионам, а также медленная активация и деактивация. Эта комбинация воротных механизмов приводит к изменению свойств канала. По-видимому, за счет этой высокой чувствительности можно объяснить, почему множество химических соединений избирательно блокируют именно hERG-каналы.

Определение влияния препаратов на hERG-каналы сердца проводится с помощью *in vitro* тест-системы Predictor hERG FP Assay, основанной на методе анализа по поляризации флуоресценции. Этот конкурентный и гомогенный метод иммуноанализа без стадий разделения и промывки является одним из наиболее перспективных в фармацевтической индустрии, поскольку обладает высокой специфичностью, чувствительностью, экспрессностью, относительно низкой стоимостью и простотой проведения анализа. Метод основан на изменении деполяризации излучаемого света в результате быстрого вращения небольших флуоресцентных молекул (трейсеров). Если трейсер связывается с большой молекулой и тем самым увеличивает ее молекулярный объем, то вращение крупной молекулы замедляется, и излучаемый свет остается в той же плоскости, в которой он был возбужден. Изменение поляризации измеряется с помощью микропланшетного ридера, флуоресценция измеряется с помощью фильтров поляризованного возбуждения и эмиссии. Два измерения проводятся для каждой лунки. Измеряют флуоресценцию перпендикулярной плоскости возбуждения (“P-канал”) и флуоресценцию параллельной плоскости возбуждения (“S-канал”). По данным **Predictor™ hERG FP Assay** получают профили фармакологической безопасности веществ для калиевых каналов hERG (исследование IC50).

Краткое описание метода

Для анализа используется мембранная фракция, содержащая белок hERG–каналов (Predictor hERG Membrane) и обладающая высоким сродством к красному флуоресцентному лиганду канала hERG - трейсеру (Predictor™ hERG Tracer Red). Когда трейсер связан с белком, то производит высокую флуоресцентную поляризацию. Конкуренты (например, E-4031 или тестируемые соединения), которые привязываются к белку hERG–каналов, вытесняют трейсер. Освобожденный трейсер мешает выделению деполяризованного света относительно источника возбуждения, поляризация уменьшается. Чем ниже значение поляризации, тем большее сродство имеет конкурент к белку hERG-канала.

Протокол теста на определение связывания с hERG-каналами сердца

Инструмент	Многофункциональный микропланшетный ридер Infinite M1000 PRO (Tecan)
Метод анализа	Поляризация флуоресценции
Набор	Predictor™ hERG Fluorescence Polarization Assay Kit (Invitrogen)
Финальная концентрация ДМСО	1 %
Количество повторов	4 повтора для каждой концентрации
Контроль	Негативный контроль (0% связывания): hERG-мембраны и трейсер; Позитивный контроль E4031; Фоновый сигнал (бланк) 1 % ДМСО; Поляризация свободного трейсера (T) - опция.
Анализируемые параметры	% Связывания вещества или IC50; Поляризация, mP; Сигнальное окно, ΔmP; S/N и Z-фактор
Формат	IC50: 6 соединений + контроль E4031, либо по 2 конц./соединение

Подробнее: <http://chemrar.ru/services/adme.php>

По вопросам заказа и проведения исследований:

Ирина Титкова

Биоаналитическая лаборатория

ЗАО «ИИХР», ЦВТ "ХимРар"

тел. раб.: +7 (495) 925-30-74 +доб.(557)

E-mail: tira@ihr.ru