

Султанбаев А.В.¹, Каюмова Р.Р.², Остатов С.С.², Сакаева Д.Д.¹, Мамлиева Ю.Ю.¹,
Султанбаева Н.И.¹, Пушкарев В.А.¹

Разработка метода флюоресцентного определения 5-фторурацила в крови больных со злокачественными новообразованиями «in vitro»

1 - ГБУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер. 2 - Уфимский институт химии РАН, г.Уфа

Sultanbaev A.V., Kajumova R.R., Ostahov S.S., Sakaeva D.D., Mamliева Ju.Ju.,
Sultanbaeva N.I., Pushkarev V.A.

Development of the method of fluorescent determination of 5-fluorouracil in the blood of patients with malignant neoplasms «in vitro»

Резюме

В работе представлены возможности флюоресцентного количественно-го определения противоопухолевого препарата 5-Фторурацил «IN VITRO». Изучено тушение 5-фторурацилом люминесценции водного раствора триптофана и крови. Показано, что фторурацил тушит флюоресценцию водных растворов аминокислотного остатка белка – триптофана и белка плазмы крови – альбумина. Тушение ФЛ альбумина 5-фторурацилом осуществляется по статическому механизму обратимого фотоиндуцированного переноса электрона. Полученные результаты открывают перспективу флюоресцентного титрования мно-гокомпонентных растворов биологических жидкостей.

Ключевые слова: 5-фторурацил, флюоресценция, триптофан, кровь

Summary

The possibilities of a fluorescent quantitative determination of an antitumor preparation of 5-fluorouracil "IN VITRO" are presented in the article. Extinguishing of 5-fluorouracil by luminescence of an aqueous solution of tryptophan and blood was studied. It was demonstrated that FU quenches FL of water solutions of protein amino acid residues - tryptophane and plasma protein - albumine. The quenching of albumine FL with 5-fluorouracil is made by static mechanism of reversible photoinduced electron transfer.

Keywords: 5-Fluorouracil, fluorescence, tryptophan, blood

Введение

Общезвестно, что белки имеют собственные флюоресцентные (ФЛ) свойства [4]. ФЛ белков обусловлена, в основном, их аминокислотным остатком – триптофаном (Трп), который в индивидуальном виде люминесцирует в области 353 нм [1, 4]. Как было представлено в литературе 5-фторурацил (FU), тушит ФЛ водных растворов триптофана [5] и бычьего сывороточного альбумина [7]. Данное взаимодействие FU с триптофановой компонентой белков, влияющую на интенсивность ФЛ белков, открывает возможность определения наличия лекарственного препарата в биологических жидкостях, измерения его концентрации и, как следствие, получения различных фармакокинетических данных.

При изучении фармакокинетики капецитабинов (фторпиримидина карбаматов) в плазме крови используются различные аналитические методы: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором [10, 11], tandemное масс-

детектирование капецитабинов, FU и других активных метаболитов в плазме крови и опухолевых клетках человека [9]. При исследовании метаболизма FU в живой ткани перспективен метод ЯМР с меченым фтором (F19) [8]. Однако, данные методы при изучении фармакокинетики FU, к сожалению, сопряжены с трудоемкой подготовкой анализируемых образцов [6], а также приобретением дорогостоящего оборудования.

Для оптимизации флюоресцентного анализа была поставлена цель: разработать качественную и количественную методику определения 5-фторурацила в крови человека «in vitro» по тушению ее собственной ФЛ.

Материалы и методы

Скорректированные спектры ФЛ регистрировали на спектрофлуориметре "СМ-2203" в кварцевых кюветках (l = 5 мм) при фотовозбуждении под углом 450. Фотовозбуждение крови проводили в полосе S2 ← S0 перехода аминокислоты на длине волны (λ_{ex}) 220 нм и записывали

вали спектры ФЛ в интервале длин волн эмиссии (λ_{em}) 300–400 нм.

Исследование взаимодействия крови с FU проведено в модельной системе водных растворов триптофана. Триптофан очищали двойной перекристаллизацией из бидистиллята и сушили под вакуумом. Забор венозной крови осуществлялся из локтевой вены до начала специализированного лечения у больных со злокачественными новообразованиями шейки матки, молочной железы, толстой кишки и ротолотки. На этапе разработки метода флюоресцентного анализа FU использовали кровь, разбавленную антикоагулянтом – раствором цитрата натрия в соотношении 1/1. Для достижения необходимой температуры крови с FU использовали термостат ($T = 310$ К или 37 °С). В основу разработки метода спектрально-люминесцентного определения FU в крови легли работы, выполненные на базе ИОХ УНЦ РАН [5]. Для исследования использовали «5-Фторурацил–Эбеве» производства ЭБЕВЕ Фарма (Австрия).

Результаты и обсуждение

С целью исключить влияние на интенсивность ФЛ крови гидроксида натрия, содержащийся в лекарственном препарате «5-Фторурацил – Эбеве» в качестве вспомогательного вещества, перед исследованием был проведен контрольный опыт. Концентрацию NaOH в крови получили из расчета на 50 мг FU 14.7 мг. NaOH (при внутривенном введении 750 мг FU, концентрация NaOH в крови пациента составляет $1.2 \cdot 10^{-3}$ М). Оказалось, что щелочь не оказывает влияния на характер ФЛ крови и ее интенсивность. Аналогичные результаты были получены при добавлении цитрата натрия (антикоагулянт), в исходный образец крови, увеличивающего длительность хранения образцов. В данном случае тушение интенсивности ФЛ происходило и не отличалось от интенсивности тушения ФЛ крови при добавлении в нее воды того же объема, что связано с разбавлением растворов. Поэтому равное смешивание образцов крови с антикоагулянтом в процессе одного исследования (кинетики интенсивности ФЛ крови) не будет влиять на его результаты, так как одинаковое уменьшение интенсивности ФЛ крови будет наблюдаться во всех образцах.

Перед изучением механизма тушения флюоресценции крови 5-фторурацилом было проведено исследование на модельной системе в водных растворах триптофана (Тр), аминокислотного остатка белков, ответственного за их люминесценцию.

На рис. 1 приведены спектры ФЛ Тр в отсутствие FU (спектр 1, $\lambda_{max} = 353$ нм) и после добавления FU в раствор (спектр 2). Аналогично на рис. 2 представлены спектры ФЛ крови без (спектр 1, $\lambda_{max} = 340$ нм) и с FU (спектр 2). Как известно из литературных данных, ФЛ крови обусловлена поверхностными остатками Тр в сывороточном альбумине [1, 7]. Добавление FU приводит к тушению ФЛ как водных растворов Тр (рис. 1, спектр 2), так и крови (рис. 2, спектр 2). Наличие тушения ФЛ крови 5-фторурацилом открывает возможность ФЛ контроля за его содержанием в нативных образцах без их предва-

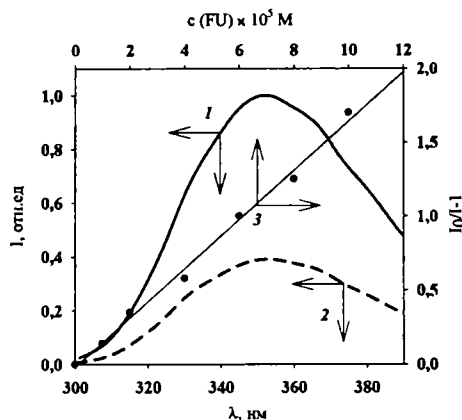


Рис. 1. Скорректированные нормированные спектры ФЛ: 1 – Трп (10-5 моль/л, H₂O), 2 – Трп (10-5 моль/л, H₂O) в присутствии FU (10-4 моль/л), 3 – зависимость интенсивности ФЛ от концентрации FU в координатах уравнения (1): Трп (10-5 моль/л, H₂O), ($\lambda_{ex} = 220$ нм, 298 К).

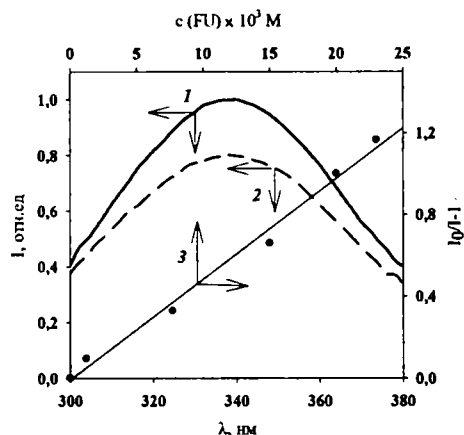


Рис. 2. Скорректированные нормированные спектры ФЛ: 1 – крови, 2 – крови в присутствии FU (8×10^{-3} моль/л), 3 – зависимость интенсивности ФЛ от концентрации FU в координатах уравнения (1): крови ($\lambda_{ex} = 220$ нм, 298 К).

рительной подготовки, что определяет экспрессность и простоту изучения фармакокинетики противоопухолевого препарата.

Гипохромный сдвиг в крови, по сравнению с водным раствором триптофана, который отмечался в работе [7] связан, как мы полагаем, с более высокой вязкостью крови препятствующей диффузии FU к триптофановым компонентам в белковой молекуле.

Тушение ФЛ раствора триптофана (Трп) и крови 5-фторурацилом удовлетворительно описывается уравнением Штерна-Фольмера (рис. 1, 2) [3]:

$$I_0 I - I = K [FU] = k_b \tau_0 [FU] \quad (1)$$

где K – константа тушения Штерна-Фольмера, $[FU]$ – концентрация тушителя, I_0, I – интенсивности ФЛ Тгр и крови в отсутствие и присутствии FU, соответственно, k_b – бимолекулярная константа скорости тушения, τ_0 – время жизни Тгр в электронно-возбужденном состоянии в отсутствие тушителя.

Константа Штерна-Фольмера тушения ФЛ Тгр 5-фторурацилом (рис. 1, зависимость 3) равна 16.4×10^3 л/моль, что в пределах порядка согласуется с данными по тушению им ФЛ водных растворов БСА ($10\text{-}5$ моль/л, 301 К) [7] с $K = 2.6 \times 10^3$ л/моль. Расхождение в константах, по-видимому, обусловлено труднодоступностью Тгр для тушителя в белке альбумина.

Время жизни ФЛ Тгр в воде равно 3.1 нс [1] и бимолекулярная константа тушения $k_b = K/\tau_0 = 5.3 \times 10^{12}$ л/(моль с) на три порядка превышает константу скорости диффузии 5-фторурацила в воде (6.5×10^9 л/(моль с), 293 К [3]). На основании этого можно предположить, что тушение ФЛ Тгр осуществляется по статическому механизму [2]. Ранее статический механизм тушения ФЛ водных растворов Тгр и БСА постулировался в работах [5, 7].

Эффективность тушения ФЛ крови 5-фторурацилом (рис. 2, зависимость 3) равная 52 л/моль значительно ниже, чем в водных растворах Тгр, что обусловлено более высокой вязкостью, препятствующей диффузии донора и акцептора энергии.

Наличие тушения ФЛ крови 5-фторурацилом открывает возможность ФЛ контроля над его содержанием, что позволит персонально подбирать дозу противоопухолевого препарата для пациента.

Степень тушения собственной флюоресценции крови зависит от концентрации FU. На основании этого нами были получены калибровочные зависимости интенсивности ФЛ крови от концентрации FU при комнатной температуре ($T = 20$ °C), и средней температуре тела онкобольных пациентов ($T = 37$ °C), которые представлены на рис. 3.

Согласно рисунку 3 (кривая 1) при добавлении FU к крови в концентрациях $8 \cdot 10^{-4}$ и $2 \cdot 10^{-3}$ М тушение интенсивности ФЛ крови составляет 5 и 17 % соответственно. Тогда как термостатирование при $T = 37$ °C образцов крови с FU разных концентраций приводит к резкому увеличению его тушащего действия и при вышеперечисленных концентрациях составляет 33 и 44 % соответственно (кривая 2). Наличие зависимости взаимодействия белков крови с FU от температуры окружающей среды указывает на то, что данная реакция – эндотермичная.

Таким образом, взаимодействие FU с флюоресцирующими компонентами крови при температуре тела более выражено, чем при комнатной температуре. В ходе проведенных исследований отмечено, что использование раствора крови и цитрата натрия в соотношении 1:1 является оптимальным вариантом. Преимущество цитрата натрия заключается в отсутствии его ФЛ и влияния на интенсивность ФЛ крови, из чего следует, что он не влияет на результаты взаимодействия FU с кровью. Полученная калибровочная зависимость интенсивности ФЛ крови от

$I, \text{отн.ед.}$

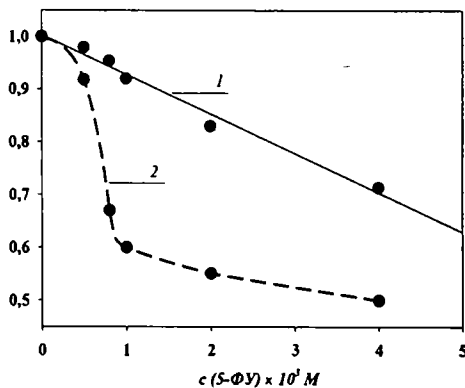


Рис. 3. Калибровочные кривые интенсивности ФЛ крови при введении FU ($c = 0.5 \cdot 10^{-3}$ - $4 \cdot 10^{-3}$ М): 1 – $T = 298$ К, 2 – $T = 310$ К ($\Delta_{\text{ех}} = 220$ нм).

концентрации FU «in vitro» позволяет с высокой точностью оценить концентрацию FU в разные промежутки времени после его внутривенного введения пациенту «in vivo».

Результаты данной работы открывают перспективы для экспресс-метода изучения фармакокинетики FU по тушению им собственной ФЛ крови онкологических больных, а также, в более широком аспекте, флуоресцентного титрования многокомпонентных растворов биологических жидкостей после введения иных тушащих ФЛ лекарственных препаратов.

Заключение

Разработана методика определения концентрации 5-фторурацила в крови человека «IN VITRO» методом тушения собственной люминесценции крови, обладающим высокой чувствительностью, с целью проведения фармакокинетических исследований при индивидуальном подборе доз противоопухолевого препарата. Полученные данные позволяют применить результаты исследования для изучения возможности персонализации противоопухолевой лекарственной терапии больным со злокачественными новообразованиями. ■

Султанбаев Александр Валерьевич, кандидат мед. наук, заведующий дневным стационаром, врач-онколог (химиотерапевт) в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства Здравоохранения Республики Башкортостан».
Кажнова Регина Робертовна, кандидат химических наук, научный сотрудник Института органической химии Российской академии наук Уфимского научного центра Российской Академии Наук.
Остахов Сергей Станиславович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института органической химии Российской академии наук Уфимского научного центра Российской Академии Наук.
Сакаева Дина Да-

мировна, заместитель главного врача по терапии в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства Здравоохранения Республики Башкортостан», доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии БГМУ. Мамлиева Юлия Юрьевна, врач-онколог (химиотерапевт) в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства Здравоохранения Республики Башкортостан». Султанбаева Надежда Ивановна, врач-онколог (химиотерапевт) в

Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства Здравоохранения Республики Башкортостан». Пушкарев Василий Александрович, доктор медицинских наук, заведующий отделением онкологии, врач-онколог в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства Здравоохранения Республики Башкортостан». Автор, ответственный за переписку - Султанбаев Александр Валерьевич, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 73/1. E-mail: sova@rambler.ru

Литература:

1. Демченко А.П. // Люминесценция и динамика структуры белков / Под ред. Бурштейн Э.А. Киев: Наук. думка. 1988. 280 с.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. Пер. с англ. М.: Мир, 1986. 496 с. (Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy; New York: Plenum Press, 1983).
3. Паркер С. Фотолуминесценция растворов. М.: Мир, 1972. 510 с.
4. Пермяков Е.А. // Метод собственной люминесценции белка. М.: Наука. 2003. 189 с.
5. Султанбаев М.В., Остахов С.С., Ганцев Ш.Х., Халиуллин Ф.А., Казаков В.П. Флуоресцентное исследование кето-енольного равновесия таутомеров 5 фторурацила в водных растворах // Химия высоких энергий. - 2010. т. 44, №5, С. 415-418.
6. Шахин И.Е., Раменская Г.В., Медведев Ю.В., Шамаль Л.Л. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2011. Т. 1. № 1. С. 46.
7. Bi S., Sun Y., Qiao C., Zhang H., Liu C. // J. Lumin. 2009. V. 129. № 5. P. 541.
8. Cochin M., James T.L., Shafer R.H. // Biochimica et Biophysica Acta. 1984. V. 804. P. 118.
9. Guichard S.M., Mayer I., Jodrell D. I. // Journal of Chromatography B. 2005. V. 826. P.232
10. Jayaseelan S., Bajivali Sk, Ramesh U., Sekar V., Perumal P. // International Journal of ChemTech Research. 2010. V. 2. № 4. P. 2086.
11. Zufia L., Aldaz A., Giráldez J. // Journal of Chromatography B. 2004. V. 809. P. 51.