

СИНТЕЗ И ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КОНЪЮГАТА ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ С ХЕЛАТОМ ЕВРОПИЯТ. А. Павич^а, А. В. Воробей^б, С. М. Арабей^в, К. Н. Соловьев^{а*}

УДК 535.37;543.426

^а Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, 220072, Минск, просп. Независимости, 68; e-mail: solovyov@imaph.bas-net.by^б Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск^в Белорусский государственный аграрный технический университет, Минск

(Поступила 11 марта 2012)

Синтезирован конъюгат фолиевой кислоты с европиевым комплексом, перспективный для биомедицинских применений. Исследованы спектры поглощения, люминесценции и возбуждения люминесценции конъюгатов фолиевая кислота—спейсер—аминозамещенный фенантролин и фолиевая кислота—спейсер—хелат европия, а также отдельных компонентов, входящих в состав синтезированных триад. Образование конъюгата фолиевой кислоты с комплексом европия подтверждается полученной совокупностью спектрально-люминесцентных данных. На опухолевых клетках HeLa показано связывание синтезированного конъюгата с фолатным рецептором клеток.

Ключевые слова: фолиевая кислота, органические комплексы европия, конъюгат фолиевой кислоты с европиевым комплексом, спектр поглощения, спектр люминесценции, люминесцентная метка.

A folic acid—europium complex conjugate has been synthesized, which is promising for biomedical applications. The absorption, luminescence, and luminescence excitation spectra have been studied both for the folic acid—spacer—aminosubstituted phenanthroline and folic acid—spacer—europium chelate conjugates and for the separate components comprising the synthesized triads. The formation of the conjugate of folic acid with the europium complex is confirmed by the totality of the acquired spectral-luminescent data. On tumor cells HeLa the binding of the synthesized conjugate with the folate receptor of the cells has been shown.

Keywords: folic acid, europium organic complexes, conjugate of folic acid with europium complex, absorption spectra, luminescence spectra, luminescent tag.

Введение. Комплексы некоторых редкоземельных элементов (лантанидов (Ln)), в частности европия (Eu^{3+}), с органическими хелатирующими аддендами¹ обладают специфическими люминесцентными свойствами, позволяющими использовать их в качестве высокочувствительных люминесцентных зондов в биомедицинских исследованиях (см., например, [1]). Главная особенность лантанидных зондов — длительное свечение в миллисекундном диапазоне. Это позволяет, используя технику временного разрешения при регистрации сигнала люминесцентного зонда, практически полностью избавиться от фонового свечения исследуемых объектов и среды. Такая регистрация повышает чувствительность люминесцентного анализа биосистем на 3—5 порядков по сравнению с регистрацией без временного разрешения. Время послесвечения (до практически полного его затухания) для собственной флуоресценции биообъектов составляет 50—100 нс [2]. Важная особенность люминесценции органических комплексов лантанидов — отсутствие тушения кислородом. Это обусловлено двумя причинами: 1) свечение самого иона-лантанида

SYNTHESIS AND LUMINESCENCE OF A FOLIC ACID—EUROPIUM CHELATE CONJUGATE

T. A. Pavich^a, A. V. Vorobey^b, S. M. Arabei^c, and K. N. Solovyov^{a*} (^a B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, 68 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220072, Belarus; e-mail: solovyov@imaph.bas-net.by; ^b Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk; ^c Belarusian State Agrarian and Technical University, Minsk)

¹ Мы намеренно не используем для описания комплексообразования более распространенный термин “лиганд”, так как последний имеет иное значение в биохимии фолиевой кислоты.

не чувствительно к кислороду, так как оптический переход происходит внутри 4*f*-оболочки, экранированной внешними электронами атома; 2) перенос энергии от аддендов к Ln^{3+} происходит с триплетного уровня T_1 с высокой константой скорости, а сокращение времени жизни состояния T_1 делает его также не чувствительным к влиянию растворенного кислорода.

Одно из актуальных направлений современной медицины — разработка и синтез селективных к клеткам патологически измененных тканей люминесцентных зондов [3]. Такая селективность может быть осуществлена с использованием зондов, связываемых со специфическими рецепторами, экспрессируемыми данными клетками. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что при онкологических заболеваниях, в частности для многих эпителиальных опухолей, наблюдается повышенная экспрессия опухолевыми клетками фолатных рецепторов [4]. Это обусловлено тем, что фолатный рецептор обеспечивает накопление в клетках фолатов, участвующих в процессах синтеза нуклеиновых кислот и белков [5], необходимых клеткам при повышении их пролиферативной активности. Следовательно, определение уровня экспрессии фолатных рецепторов клетками может быть использовано в качестве высокочувствительного подхода в диагностике опухолевого процесса, оценке скорости роста опухоли и индивидуальной чувствительности клеток к химиотерапевтическим препаратам.

Настоящая работа является первым шагом в развитии применений люминесцентного анализа с временным разрешением в онкологии путем создания люминесцентных зондов, селективно связывающихся с пролиферативно активными клетками, на основе конъюгатов фолиевой кислоты (ФК) с лантанидными метками.

Объекты исследования и методика эксперимента. Исследован синтезированный нами конъюгат ФК—спейсер—хелат европия (ФК–(Фен)Eu(БТА)₃, где Фен — 1,10-фенантролин, Eu(БТА)₃ — комплекс европия с бензоилтрифторацетоном). Для синтеза конъюгата использовали ФК фирмы Sigma. Остальные коммерческие реагенты (Eu(NO₃)₃, бензоилтрифторацетон, фенантролин, органические растворители) подвергались предварительной очистке.

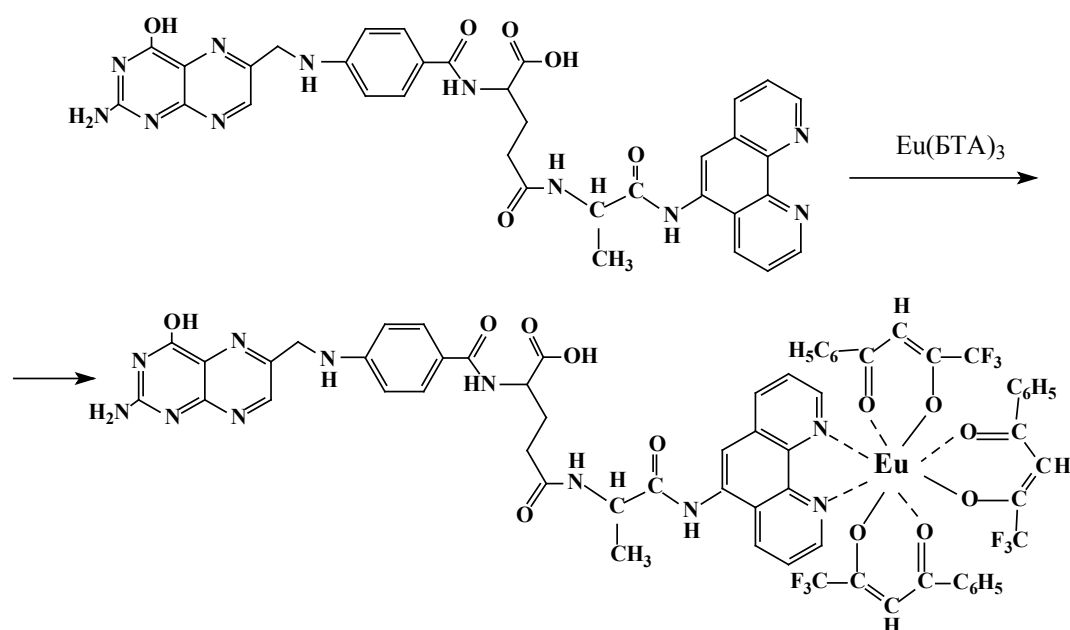
Связывание конъюгата с клетками исследовали на злокачественно трансформированных клетках эпителия шейки матки человека (HeLa). Клетки культивировали в полной питательной среде 199 с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Данная среда содержит ФК в низкой концентрации ($2 \cdot 10^{-8}$ моль/л). Инкубацию клеток осуществляли в культуральных флаконах при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Клетки пассировали через трое суток поддержания их в логарифмической фазе роста.

Измерения спектров люминесценции и возбуждения люминесценции проводились на автоматизированном спектрофлуориметре СДЛ-2, состоящем из светосильного монохроматора возбуждения МДР-12 и монохроматора регистрации МДР-23. Спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Cary 500 Scan UV-Vis-NIR. Все спектральные измерения проведены при комнатной температуре.

Результаты и их обсуждение. Для создания селективных методов люминесцентного микроанализа с временным разрешением на основе комплекса иона Eu^{3+} с аддендами-сенситизаторами (в частности, β-дикетонами, интенсивно поглощающими свет и эффективно передающими энергию возбуждения на ион лантанида) мы использовали специфическое сродство к пролиферативно активным клеткам ФК, которая химически связана с люминесцирующим комплексом в результате образования конъюгата. В качестве люминесцентной метки выбран комплекс Eu(БТА)₃. Однако для таких люминесцирующих комплексов европия с β-дикетонами в водной среде имеет место безызлучательный перенос энергии возбуждения на колебательные уровни молекул воды, которые входят в первую координационную сферу комплекса, что приводит к сильному тушению люминесценции. Эта проблема решается заполнением координационной сферы нетушащим агентом — Фен, который с европием формирует стабильный комплекс (Фен)Eu(БТА)₃.

Синтез конъюгата ФК–(Фен)Eu(БТА)₃ реализован через специальный спейсер (L-аланин), к которому “пришиваются” с двух сторон компоненты образующейся триады. На первом этапе синтеза лантанидсодержащего конъюгата получен конъюгат молекулы ФК, ковалентно связанной через углеводородный мостик (спейсер) с аминокзамещенным фенантролином (NH₂-Фен). Спейсер препятствует взаимодействию лантанидной метки с биообъектом. Периферийная аминогруппа NH₂ нужна для “пришивки” Фен к спейсеру. Синтез NH₂-Фен реализован по известной методике [6].

Синтез конъюгата ФК—спейсер—аминозамещенный Фен (ФК–Фен) проведен по методике, использованной нами ранее при синтезе конъюгата ФК с диметиловым эфиром хлорина e_6 [7]. Синтез конъюгата ФК–(Фен)Eu(БТА)₃ осуществлен путем интенсивного перемешивания стехиометрических количеств конъюгата ФК–Фен и комплекса Eu(БТА)₃ в диметилсульфоксиде. После выпадения ярко-желтых кристаллов конъюгата их центрифугировали, промывали водой и спиртом, затем высушивали. Структуры полученных конъюгатов ФК–Фен и ФК–(Фен)Eu(БТА)₃ имеют вид:



На рис. 1 представлены спектры поглощения $\text{NH}_2\text{-Фен}$, ФК и конъюгата ФК–Фен в этиловом спирте. Спектр поглощения $\text{NH}_2\text{-Фен}$ имеет интенсивную полосу при 263 нм с длинноволновым нисходящим до ~330 нм крылом. Спектр поглощения ФК в УФ области имеет максимумы при 286 и 361 нм. Как видно, спектр продукта, полученного в результате проведенной реакции ФК с $\text{NH}_2\text{-Фен}$ (кривая 3), существенно отличается от спектров поглощения исходных веществ, что является доказательством образования конъюгата ФК–Фен. Для конъюгированной молекулы длинноволновая полоса поглощения претерпевает гипсохромный сдвиг до 335 нм (по сравнению с полосой ФК 361 нм). Аналогичным образом смещается и вторая полоса поглощения ФК (286 нм), которая в спектре конъюгата находится при 278 нм. В спектре поглощения конъюгата присутствует полоса, аналогичная полосе поглощения несвязанного $\text{NH}_2\text{-Фен}$ (263 нм).

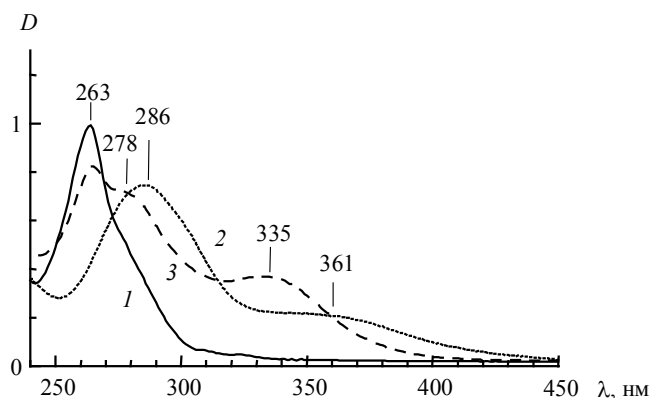


Рис. 1. Спектры поглощения $\text{NH}_2\text{-Фен}$ (1), ФК (2) и конъюгата ФК–Фен (3) в этиловом спирте

Для интерпретации спектральных характеристик конъюгата ФК–(Фен) Eu(BTA)_3 первоначально изучены флуоресцентные свойства конъюгата ФК+Фен. На рис. 2 (кривая 1) показан спектр поглощения ФК+Фен в диметилформамиде (ДМФА). Обращает на себя внимание то, что полоса поглощения при 336 нм имеет увеличенную относительную интенсивность и полуширину по сравнению с аналогичной полосой в этаноле. В спектре флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}} = 283$ нм (кривая 2) выделяются две полосы: интенсивная с максимумом при 333 нм и широкая малоинтенсивная с максимумом в области ~475 нм. Следует отметить, что для свободных молекул ФК в водном растворе характерен максимум флуоресценции при 445 нм [8]. Из анализа приведенных спектров поглощения и флуоресценции можно сделать следующие выводы: слабая и очень широкая полоса с максимумом при ~475 нм принадлежит флуоресценции несвя-

занных молекул ФК, длинноволновая полоса поглощения которых простирается до 450 нм; зарегистрированная полоса поглощения при ~ 336 нм (кривая 1) является суперпозицией поглощения свободной ФК и конъюгата ФК+Фен. В формирование спектрального контура полос при 283 и 330 нм в спектре возбуждения флуоресценции при $\lambda_{\text{рег}} = 475$ нм существенный вклад может вносить поглощение конъюгата ФК+Фен — в данной области спектр поглощения конъюгата ФК+Фен имеет соответствующие полосы. Коротковолновая интенсивная полоса флуоресценции при 333 нм является полосой флуоресценции конъюгата, которая претерпевает небольшой стоксов сдвиг относительно длинноволновой полосы поглощения конъюгата при 330 нм.

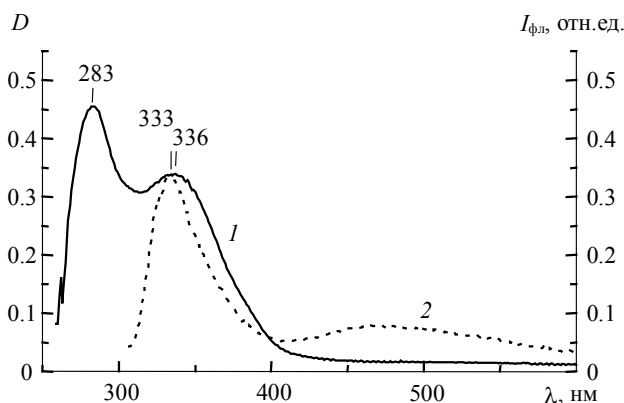


Рис. 2. Спектры поглощения (1) и флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}} = 283$ нм (2) конъюгата ФК–Фен в ДМФА

Спектр поглощения конъюгата ФК–(Фен)Eu(БТА)₃ в ДМФА (рис. 3, кривая 1) отличается от спектра поглощения конъюгата ФК+Фен (рис. 2, кривая 1) увеличением относительной интенсивности полосы при 326 нм, которая соответствует поглощению органических аддендов иона европия (БТА). Возбуждение при $\lambda = 283$ нм приводит к появлению сложного спектра люминесценции (рис. 3, кривая 2) — одновременно наблюдаются очень слабое свечение свободной ФК с максимумом при ~ 475 нм, слабое свечение с максимумом при 333 нм (свечение конъюгата ФК+Фен) и интенсивная люминесценция иона европия в области 580–710 нм с узкой и интенсивной полосой при 613 нм. Спектр возбуждения люминесценции при $\lambda_{\text{рег}} = 613$ нм (кривая 3) полностью соответствует поглощению органических лигандов иона европия (поглощению БТА), хотя полоса при 326 нм не имеет симметричного контура (отмечается плечо на длинноволновом крае). Последнее может свидетельствовать о возбуждении иона европия через поглощение конъюгата ФК+Фен, подтверждая химическое связывание хелата европия с конъюгатом ФК+Фен, т. е. образование конъюгата ФК–(Фен)Eu(БТА)₃.

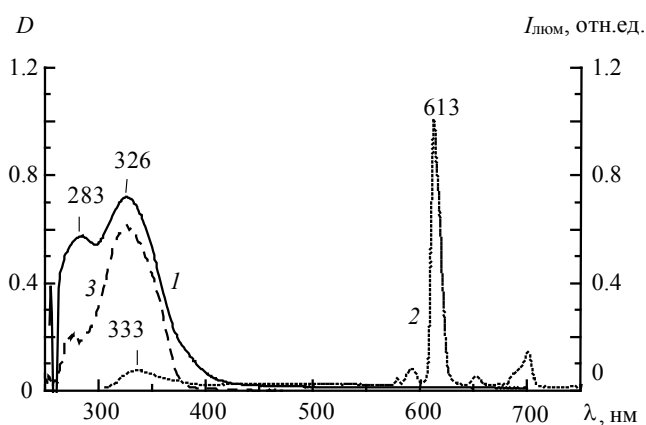


Рис. 3. Спектры поглощения (1), люминесценции при $\lambda_{\text{возб}} = 283$ нм (2) и возбуждения люминесценции при $\lambda_{\text{рег}} = 613$ нм (3) конъюгата ФК–(Фен)Eu(БТА)₃ в ДМФА

Для проверки способности полученного конъюгата связываться с экспрессируемыми клетками фолатными рецепторами исследовано накопление конъюгата в клетках после его введения в среду инкубации клеточного монослоя. Использован монослой при конфлюентности 70—90 % и концентрация конъюгата $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Клетки инкубировали с конъюгатом в течение 3 ч, отмывали охлажденным забуференным физиологическим раствором и лизировали в 0.1 % Тритоне X-100. Связывание клетками конъюгата определяли по интенсивности люминесценции европия в клеточных лизатах, применяя калибровочные зависимости интенсивности люминесценции конъюгата в лизирующем растворе от его концентрации. Установлено, что при использованных условиях клетки связывают конъюгат в значительном количестве ($\approx 4 \cdot 10^6$ молекул конъюгата на клетку). Это связывание резко снижается (на 68 %) в присутствии экзогенной ФК ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л), что свидетельствует об участии в связывании конъюгата фолатного рецептора, локализованного на поверхности клеток HeLa. Принадлежность люминесценции ионам европия, входящим в состав конъюгата, связанного с клеткой, подтверждена измерениями кинетики люминесценции, длительность которой составляет ~ 110 мкс.

Заключение. Выполненные исследования являются первым шагом в использовании специфического средства фолатной кислоты к пролиферативно активным клеткам и миллисекундной длительности люминесценции комплексов европия для создания селективных методов люминесцентного микроанализа с временным разрешением на основе конъюгатов фолатной кислоты с комплексами европия.

Синтезирован конъюгат фолатной кислоты с органическим хелатом европия и изучены его спектрально-люминесцентные параметры в растворах. В системе *in vitro* показано связывание полученного конъюгата с пролиферативно активными опухолевыми клетками HeLa. Установлена определяющая роль в связывании конъюгата клетками экспрессируемого ими фолатного рецептора.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Ф10-167).

[1] **А.П.Савицкий, К.Н.Соловьев, Д.Б.Папковский.** Изв. АН СССР. Сер. физ., **54** (1990) 518—523

[2] **E.Soini, I.Hemmilä.** Clin. Chem., **25** (1979) 353—361

[3] **P.Juzenas, W.Chen, Ya-P.Sun, M.Alvaro Neto Coelho, R.Generalov, N.Generalova, I.Lie Christensen.** Adv. Drug Deliv. Rev., **60** (2008) 1600—1614

[4] **B.A.Kamen, A.K.Smith.** Adv. Drug Deliv. Rev., **56** (2004) 1085—1097

[5] **M.Lucock.** Mol. Genet. Metabol., **71** (2000) 121—138

[6] **H.R.Li, J.Lin, H.J.Zhang, L.S.Fu, Q.G.Meng, S.B.Wang.** Chem. Mater., **14** (2002) 3651—3655

[7] **А.В.Воробей, Т.А.Павич, С.М.Арабей.** Сб. докл. междунар. науч. конф. “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем”, Минск, издат. центр БГУ, ч. 1 (2008) 39—41

[8] **P.Vorobey, M.K.Off, A.E.Stendal, A.Vorobey, J.Moan.** Photochem. Photobiol., **82** (2006) 817—822