

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii

Mechanizmy działania wybranych
radiosensybilizatorów uszkodzeń DNA.
Badania metodami chemii komputerowej

mgr inż. Karina Falkiewicz

Promotor: prof. dr hab. Janusz Rak

Promotor pomocniczy: dr Lidia Chomicz-Mańka

Praca doktorska wykonana w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych

Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Gdańsk, 2022

Praca powstała w ramach projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju:



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



„Międzywydziałowe interdyscyplinarne studia doktoranckie Chemia z Fizyką realizowane w Uniwersytecie Gdańskim” (AKRONIM: CHEMFIZ)

Numer projektu: WND-POWR.03.02.00-00-I059/16

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Praca została również wsparta finansowaniem Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Maestro (numer umowy: UMO-2014/14/A/ST4/00405,
Kierownik: prof. dr hab. Janusz Rak).

Obliczenia wykonane zostały częściowo przy użyciu zasobów obliczeniowych Wrocławskiego Centrum Sieciowo-Superkomputerowego (WCSS, grant nr 209).

Podziękowania

Prof. dr. hab. Januszowi Rakowi, mojemu promotorowi, za życzliwość, wyrozumiałość, cierpliwość, cenne uwagi i pomoc w realizacji tej pracy.

Dr Lidii Chomicz-Mańce, mojej promotor pomocniczej, za wsparcie, opiekę i cenne wskazówki.

Agnieszce, Ani, Kamili, Magdzie, Mietkowi, Paulinie, Samancie oraz Witkowi, za współpracę i pomoc w realizacji badań oraz za wsparcie nie tylko naukowe.

Katedrze Chemii Fizycznej za miłą atmosferę.

Mojej Rodzinie i Przyjaciółom za ogromne wsparcie, zrozumienie, motywację i chwile wytchnienia.

Rodzicom, dzięki Wam jestem tym, kim jestem i dotarłam do tego momentu w życiu.
Za to, że mogłam na Was liczyć na każdym jego etapie.

Fryderykowi, za to, że wspierasz mnie zawsze w trudnych momentach.

Pracę pragnę zadedykować mojemu Tacie – pomimo, że nie ma Cię już obok,
wiem, że byłbyś ze mnie dumny.

Spis treści

Streszczenie	6
Abstract.....	9
Wykaz stosowanych skrótów.....	11
1. Wstęp teoretyczny.....	13
1.1. Wprowadzenie – epidemiologia i metody leczenia chorób nowotworowych	13
1.2. Promieniowanie jonizujące w radioterapii.....	14
1.2.1. Oddziaływanie promieniowania jonizującego na DNA komórki	15
1.2.2. Oddziaływanie elektronu z natywnym DNA – pęknięcia nici	20
1.3. Radiosensybilizatory i ich miejsce w terapii przeciwnowotworowej	25
1.3.1. Hipoksja komórek nowotworowych.....	25
1.3.2. Radiosensybilizatory i ich klasyfikacja	26
1.4. Analogi tyminy.....	28
1.4.1. Przykłady modyfikowanych nukleozydów	29
1.4.2. Mechanizm dysocjacyjnego przyłączenia elektronu	30
1.4.3. Propozycje nowych modyfikowanych nukleozydów	32
1.5. Mimetyki tlenu na przykładzie nitroimidazoli	36
1.5.1. Metronidazol oraz inne przykłady mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli	36
1.5.2. Mechanizmy działania mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli.....	38
2. Cele pracy	41
3. Metodologia.....	43
3.1. Obliczenia kwantowochemiczne.....	43
3.1.1. Profil DEA. Bodźce termodynamiczne i kinetyczne.....	45
3.1.2. Powinowactwo elektronowe.....	46
3.1.3. Pozycje rezonansów	46
3.1.4. Profile kinetyczne	47
3.1.5. Stężenia równowagowe	52
3.2. Analiza chemometryczna	54
3.2.1. Deskryptory molekularne	55
3.2.2. Walidacja modeli QSAR	55
3.2.3. Baza mimetyków tlenu	57
4. Dyskusja wyników.....	58
4.1. Degradacja amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu oraz <i>N,N</i> -dimetyloamidosiarczanu 5-hydroksyuracylu indukowana przyłączeniem elektronu w fazie gazowej.....	58
4.1.1. Wprowadzenie	58

4.1.2. Dysocjacyjne przyłączenie elektronu SU w roztworze wodnym oraz fazie gazowej (Projekt A).....	60
4.1.3. Radioliza stacjonarna SU	68
4.1.4. Wnioski.....	72
4.1.5. Degradacja DMSU indukowana LEE w fazie gazowej (Projekt B).....	74
4.1.6. Pozycje rezonansów dla anionów o m/z 16 i 15.....	79
4.1.7. Wnioski.....	82
4.2. Badanie stabilności jodopochodnych deoksyurydyny i urydyny w środowisku wodnym.....	83
4.2.1. Wprowadzenie	83
4.2.2. Możliwy mechanizm hydrolizy	84
4.2.3. Profile kinetyczne	91
4.2.4. Wnioski.....	95
4.3. Weryfikacja literaturowych mechanizmów działania mimetyków tlenu.....	97
4.3.1. Wprowadzenie	97
4.3.2. Obliczenia kwantowochemiczne dla mechanizmu rodnikowego.....	98
4.3.3. Analiza chemometryczna	104
4.3.4. Wnioski.....	113
5. Podsumowanie	114
6. Literatura.....	117
7. Wykaz rysunków	128
8. Wykaz tabel	131
9. Spis dorobku naukowego.....	132

Streszczenie

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych. Jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia nowotworów, obok chirurgii i chemioterapii, jest radioterapia. W jej trakcie pacjenci poddawani są działaniu promieniowania jonizującego, które nie jest obojętne dla organizmu ludzkiego, a stosowane w dużych dawkach prowadzi do szeregu poważnych skutków ubocznych, ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia w przyszłości nowotworu wtórnego włącznie. Szczególnie ważną cechą komórek nowotworów litych jest hipoksja, która zmniejsza skuteczność promieniowania jonizującego i jest odpowiedzialna za radiooporność guzów nowotworowych. Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu może być zastosowanie w radioterapii radiosensybilizatorów, czyli substancji uwrażliwiających komórki nowotworowe na działanie promieniowania jonizującego. Do lepiej poznanych klas związków tego typu należą mimetyki tlenu z grupy nitroimidazoli oraz analogi tyminy, wśród których klasycznym przykładem, o potwierdzonym *in vitro* działaniu radiosensybilizującym, jest 5-bromo-2'-deoksyurydyna. Ze względu na szybki metabolizm tego związku *in vivo*, nie znalazł on jednak zastosowania w praktyce klinicznej. Jak dotąd najskuteczniejszym znanym radiosensybilizatorem jest nimorazol, lek z grupy mimetyków tlenu, który został zatwierdzony w Danii i Norwegii jako środek wspomagający radioterapię nowotworów głowy i szyi. Ograniczone zastosowanie radiosensybilizatorów w terapii przeciwnowotworowej implikuje potrzebę opracowania nowych, lepiej działających radiouczulaczy, a do osiągnięcia tego celu wydaje się konieczne zrozumienie mechanizmu ich działania.

Niniejsza praca doktorska przedstawia wyniki badań nad mechanizmami działania radiosensybilizującego wybranych pochodnych urydyny oraz mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli. Do wyjaśnienia tych mechanizmów wykorzystano metody kwantowochemiczne oraz analizę chemometryczną.

Pochodne uracylu – amidosiarczan 5-hydroksyuracylu (SU) oraz *N,N*-dimetyloamidosiarczan 5-hydroksyuracylu (DMSU) zostały zbadane w fazie gazowej (przez grupę S. Denifla z Uniwersytetu w Innsbrucku w Austrii) przy pomocy techniki skrzyżowanych wiązek elektronowo-molekularnych, a obliczone teoretycznie bodźce termodynamiczne poszczególnych reakcji fragmentacji indukowanych przyłączeniem elektronu zostały porównane ze zmierzonymi. W przypadku pochodnej

SU, przeprowadzono również badania teoretyczne nad mechanizmem dysocjacyjnego przyłączenia elektronu (DEA) w roztworze wodnym oraz wykonano eksperyment radiolizy stacjonarnej (w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego). Wyniki badań eksperymentalnych pokazały, że SU nie wykazuje właściwości radiosensybilizujących, pomimo korzystnego profilu DEA obliczonego metodą M06-2x/6-31++G(d,p). Z tego powodu proces DEA został zweryfikowany przy pomocy metody o dokładności chemicznej, G2MP2. Wyniki obliczeń na poziomie G2MP2 okazały się być zgodne z wynikami eksperymentu radiolitycznego, stąd wniosek, że nie w każdym przypadku metody DFT okazują się być wystarczające do opisu problemu. Zablokowanie możliwości protonowania podstawnika amidosiarczanowego w SU poprzez metylowanie grupy amidowej (DMSU) okazało się nie wpływać jakościowo na proces degradacji tej pochodnej uracylu – degradacja przebiegała podobnie dla SU i DMSU.

Kolejnym badanym aspektem było określenie stabilności w roztworze wodnym trzech jodopochodnych urydyny: 6-jodourydyny (6IUrd), 5-jodo-2'-deoksyurydyny (5IdU) i 6-jodo-2'-deoksyurydyny (6IdU). Posługując się metodami chemii kwantowej zbadano przebieg hydrolizy tych związków pod względem termodynamicznym, a następnie wykonano symulacje kinetyczne w celu uzyskania obrazu zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu. Badania wskazały, że 6-jodo-2'-deoksyurydyna jest niestabilna w środowisku wodnym i wbrew wcześniejszym sugestiom, nie może być stosowana jako radiosensybilizator. Jej niska stabilność w porównaniu z pochodną 5IdU wynika prawdopodobnie z oddziaływań sterycznych pomiędzy atomem jodu w pozycji 6 a resztą cukrową.

Ostatni projekt opisany w niniejszej dysertacji był związany z mimetykami tlenu. Przeprowadzono interdyscyplinarne badania, mające na celu zidentyfikowanie możliwego mechanizmu radiouczulającego działania nitroimidazoli. Radioliza stacjonarna, a także badania obliczeniowe wykorzystano do weryfikacji jednego z mechanizmów działania mimetyków tlenu prezentowanego w literaturze – mechanizmu rodnikowego – dla modelu rodnika 5-hydroksypirymidynowego z metronidazolem. Badania zostały uzupełnione opisem zależności struktura-aktywność (QSAR) w oparciu o znane związki z grupy nitroimidazoli i ich skuteczność radiosensybilizacji, wyrażoną przy pomocy doświadczalnie zmierzonego parametru C1.6. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę zrewidowania sugerowanego w literaturze rodnikowego mechanizmu

radiosensybilizacji. Otrzymane modele QSAR, oparte na deskryptorach kwantowochemicznych, charakterystycznych dla jednego z dwóch rozpatrywanych mechanizmów – mechanizmu rodnikowego lub elektronowego – pokazują bardzo dobre zdolności prognostyczne tego drugiego, sugerując, że to właśnie mechanizm związany z przyłączeniem elektronu może być odpowiedzialny za właściwości radiosensybilizujące nitroimidazoli.

Abstract

Cancer is one of the leading cause of death, especially in highly developed countries. One of the most commonly used treatment modality, apart from surgery and chemotherapy, is radiotherapy. During radiotherapy, patients are exposed to ionizing radiation, which is not indifferent to human body, and when used in high doses, it leads to a number of serious side effects, including the appearance of a secondary tumor. A particularly important feature characterizing the cancer cells of solid tumors is hypoxia, which is responsible for the low effectiveness of radiotherapy, due to radioresistance of cells at the low concentration of oxygen. This situation calls for introducing of the so-called radiosensitizers, i.e. compounds which can sensitize cancer cells to ionizing radiation. The well-known classes of these compounds include the nitroimidazole oxygen mimetics and thymine analogues. A derivative with an *in vitro* and *in vivo* confirmed radiosensitizing effect, is 5-bromo-2'-deoxyuridine. It has not been used in clinical practice so far due to its swift metabolism. Nimorazol, an oxygen mimetic, is the only radiosensitizer approved in Denmark and Norway as a radiotherapeutic agent in the treatment of head and neck cancer. Due to the limited use of radiosensitizers in anti-cancer therapy, the understanding of their mechanism of action seems to be necessary for the development of new, better-performing compounds.

This doctoral dissertation presents the results of research on the mechanisms responsible for the radiosensitizing properties of selected uridine derivatives and oxygen mimetics from the nitroimidazole group. For this purpose, quantum-chemical calculations and chemometric analysis were used.

Uracil derivatives - uracil-5-yl *O*-sulfamate (SU) and uracil-5-yl *O*-(*N,N*-dimethylsulfamate) (DMSU) was tested using crossed electron-molecular beam experiments in the gas phase. For the obtained experimental results, the process of degradation induced by low-energy electrons of registered fragmentation anions was described. In the case of the SU derivative, theoretical studies of the dissociative electron attachment (DEA) in aqueous solution were additionally carried out with the stationary radiolysis experiment. SU does not show radiosensitizing properties despite encouraging results of theoretical calculations of its DEA profile. The recalculation of the DEA process with the chemical accuracy method, G2MP2, allowed to demonstrate that the previously adopted DFT model possesses too low accuracy. On the other hand, in case of

DMSU, the degradation paths in the gas phase were similar to those obtained for SU and support the conclusion that methylation of the derivative does not qualitatively affect the DEA process.

Another aspect studied within this dissertation was the determination of the stability in an aqueous solution of the 6-iodouridine (6IUrd) and selected iodo- derivatives of 2'-deoxyuridine: 5-iodo- (5IdU) and 6-iodo-2'-deoxyuridine (6IdU). For this purpose, the mechanism of the hydrolysis of these compounds was analyzed computationally, as well as kinetic simulations were performed in order to obtain the concentration-time plots and respective half-lifetimes. Research has shown that 6-iodo-2'-deoxyuridine is unstable in the aqueous environment and, different from the literature suggestions, cannot be used as a radiosensitizer. Its low stability, compared to the 5IdU derivative, may result from the steric hindrance of the iodine atom at the 6 position with the sugar residue.

Finally, an interdisciplinary research, in order to identify a possible mechanism of the radiosensitizing effect of nitroimidazoles was carried out. The stationary radiolysis, as well as computational studies were employed to verify one of the mechanisms of action of oxygen mimetics presented in the literature - the radical mechanism – using the 5-hydroxypyrimidine radical-metronidazole model. The quantum chemical studies was supplemented by the quantitative structure-activity relationship (QSAR) based on the known compounds from the nitroimidazole group and their radiosensitization efficiency, expressed as the experimentally measured parameter C1.6. The carried out studies indicate that the commonly assumed radical mechanism is not operative. The obtained QSAR models based on quantum chemical descriptors related to the two mechanisms – radical mechanism or electron attachment based mechanism – show that the model based on the electron attachment descriptors possesses much better prognostic abilities.

Wykaz stosowanych skrótów

2NI – 2-nitroimidazol
5IdU – 5-jodo-2'-deoksyurydyna
6IdU – 6-jodo-2'-deoksyurydyna
6IUrd – 6-jodouracyl
AA – asocjacyjne przyłączenie elektronu (z ang. *Associative Electron Attachment*)
AEA – adiabaticzne powinowactwo elektronowe (z ang. *Adiabatic Electron Affinity*)
AIMD – dynamika molekularna *ab initio* (z ang. *Ab Initio Molecular Dynamics*)
AmdC – 5-azydometylo-2'-deoksycytydyna
AmdU – 5-azydometylo-2'-deoksyurydyna
AvdC – 5-(1-azydowinylo)-2'-deoksycytydyna
AvdU – 5-(1-azydowinylo)-2'-deoksyurydyna
BrA – 8-bromoadenina
BrC – 5-bromocytozyna
BrdU – 5-bromo-2'-deoksyurydyna
BrG – 8-bromoguanina
BrSdU – 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyna
BrU – 5-bromouracyl
CCC – współczynnik korelacji zgodności (z ang. *Concordance Correlation Coefficient*)
CEMB – technika skrzyżowanych wiązek elektronowo-molekularnych (z ang. *Crossed Electron-Molecular Beam*)
CIU – 5-chlorouracyl
CNU – 5-cyjanouracyl
dCdF – 2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyna, gemcytabina
DEA – dysocjacyjne przyłączenie elektronu (z ang. *Dissociative Electron Attachment*)
DFT – teoria funkcjonału gęstości (z ang. *Density Functional Theory*)
DMSU – *N,N*-dimetyloamidosiarczan 5-hydroksyuracylu
DSB – podwójne pęknięcia nici DNA (z ang. *Double Strand Breaks*)
ESR – elektronowy rezonans spinowy (z ang. *Electron Spin Resonance*)
FU – 5-fluorouracyl
HAPs – proleki aktywowane w środowisku hipoksji (z ang. *Hypoxia-Activated Prodrugs*)
HRMS – wysokorozdzielcza spektrometria mas (z ang. *High-Resolution Mass Spectrometry*)
IOU – 5-jodozylouracyl
ISdU – 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyna
IU – 5-jodouracyl
LEE – niskoenergetyczny elektron (z ang. *Low Energy Electron*)
LET – liniowy transfer energii (z ang. *Linear Energy Transfer*)
MAE – średni błąd bezwzględny (z ang. *Mean Absolute Error*)
MET – metronidazol
miRNA – krótki kwas rybonukleinowy (mikroRNA)
NHNO₂U – 5-(nitroamino)uracyl
OCNU – 1-metylo-5-cyjanianouracyl

OECD – Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (z ang. *Organization for Economic Cooperation and Development*)

OTfdU – 5-triflano-2'-deosyurydyna

PES – spektroskopia fotoelektronowa lub fotoemisyjna (z ang. *Photoemission Spectroscopy*)

PJ – promieniowanie jonizujące

PSB – Pracownia Sensybilizatorów Biologicznych

R^2 – współczynnik determinacji (z ang. *determination coefficient*)

RMSE_C – średni kwadratowy błąd kalibracji (z ang. *Root Mean Square Error of Calibration*)

RMSE_{CV} – średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej (z ang. *Root Mean Square Error of Cross Validation*)

RMSE_P – średni kwadratowy błąd walidacji (z ang. *Root Mean Square Error of Prediction*)

SCIU – 5-(chlorosulfeno)uracyl

SCNdU – 5-tiocyanato-2'-deosyurydyna

SCNU – 1-metylo-5-tiocyanatouracyl

SeCNdU – 5-selenocyaniano-2'-deosyurydyna

SeCNU – 5-selenocyanianouracyl

siRNA – mały interferujący kwas rybonukleinowy

SSB – pojedyncze pęknięcia nici DNA (z ang. *Single Strand Breaks*)

SU – amidosiarczan 5-hydroksyuracylu

TNI – metastabilny stan przejściowy (z ang. *Transient Negative Ion*)

TS – stan przejściowy (z ang. *Transition State*)

Q^2 – współczynnik walidacji (z ang. *validation coefficient*)

Q^2_{CV} – współczynnik walidacji krzyżowej (z ang. *cross validation coefficient*)

WCSS – Wrocławskie Centrum Sieciowo-Superkomputerowe

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. *World Health Organization*)

VAE – energia wertykalnego przyłączenia elektronu (z ang. *Vertical Attachment Energy*)

VDE – energia wertykalnego oderwania elektronu (z ang. *Vertical Detachment Energy*)

ΔG^* – entalpia swobodna aktywacji; bariera kinetyczna

ΔG – zmiana entalpii swobodnej reakcji; bodziec termodynamiczny

1. Wstęp teoretyczny

1.1. Wprowadzenie – epidemiologia i metody leczenia chorób nowotworowych

Choroby przewlekłe są jednym z największych problemów dzisiejszych czasów. Pomimo rozwoju medycyny i technologii, ogromny odsetek społeczeństwa cierpi z ich powodu. Według najnowszego raportu Światowej Organizacji Zdrowia (z ang. *World Health Organization*, WHO) są one odpowiedzialne za prawie 71% zgonów na świecie [1]. Do tych najpoważniejszych i najbardziej śmiertelnych możemy zaliczyć choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory, choroby układu oddechowego oraz cukrzycę [1].

Tylko w 2020 roku na świecie zidentyfikowano 19 milionów przypadków nowych zachorowań na nowotwory, a aż 10 milionów osób zmarło z ich powodu [2]. Globalnie, choroby nowotworowe zajmują drugie miejsce wśród głównych przyczyn śmierci, przy czym w krajach wysokorozwiniętych nowotwory są ich najczęstszą przyczyną [3]. Szacuje się, że działanie szkodliwych czynników, tj. palenie tytoniu, nadwaga, spożywanie alkoholu, niezdrowa dieta, czy brak aktywności fizycznej odpowiada za 30% zgonów z powodu nowotworu. W Polsce stanowią one drugą co do częstości przyczynę zgonów [4]. Warto podkreślić, że według raportu „Health at a Glance 2021” Polska ma jeden z najwyższych wskaźników umieralności z powodu nowotworów złośliwych na tle innych krajów OECD (z ang. *Organization for Economic Cooperation and Development*) [5].

Dostępne dla pacjenta onkologicznego metody leczenia zależą przede wszystkim od umiejscowienia, stopnia zaawansowania i rodzaju nowotworu. Leczenie może odbywać się miejscowo, bądź systemowo poprzez podanie leków [6]. Do tej pierwszej grupy można zaliczyć chirurgię i radioterapię. W zależności od rodzaju podawanego leku leczenie ogólnoustrojowe można stosować w formie chemioterapii (leczenie cytostatykami), hormonoterapii (dotyczy wyłącznie nowotworów hormonozależnych), immunoterapii (leczenie lekami pobudzającymi układ odpornościowy do zwalczania nowotworu), czy terapii celowanej (np. leczenie m.in. przeciwciałami monoklonalnymi czy inhibitorami kinaz tyrozynowych) [6]. Praktycznie każda z dostępnych terapii przeciwnowotworowych wiąże się z uciążliwymi skutkami ubocznymi. Nie jest też powiedziane, że dana terapia przyniesie zadowalający poziom wyleczenia, co wiąże się często z występowaniem przerzutów do innych organów. Grupy badawcze stale

poszukują nowych metod leczenia, czy też leku idealnego w celu zwiększenia skuteczności terapii oraz zmniejszenia ich niekorzystnego wpływu na organizm.

1.2. Promieniowanie jonizujące w radioterapii

Radioterapia, obok chirurgii i chemioterapii, jest jedną z najczęściej stosowanych metod walki z chorobami nowotworowymi [7]. Ponad 50% pacjentów nowotworowych poddawanych jest tej terapii na którymś z etapów leczenia. Radioterapia jest dobrą alternatywą dla wspomnianych dwóch metod, dającą możliwość długofalowej kontroli nowotworu i opanowania guza w sposób mniej inwazyjny, jak również jest sposobem łagodzenia objawów, gdy zawodzą inne formy leczenia [7].

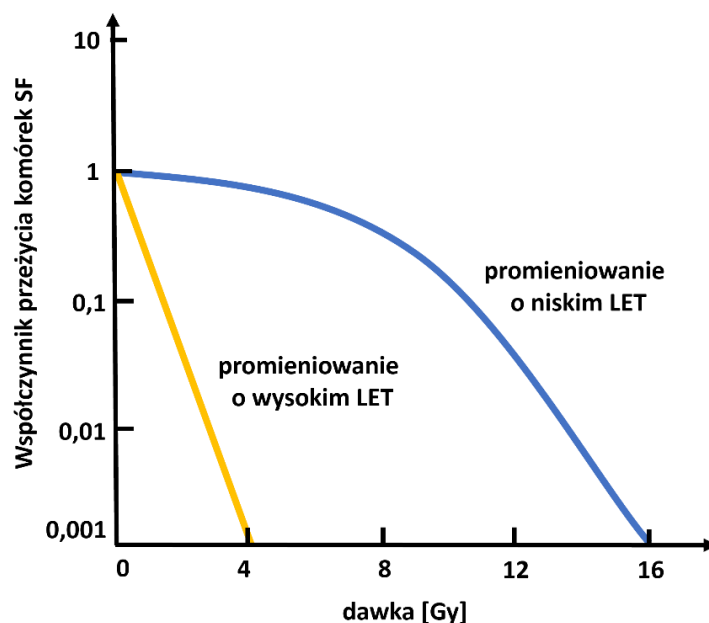
W trakcie radioterapii pacjenci poddawani są działaniu promieniowania jonizującego (PJ). Działanie PJ opiera się na wywołaniu jonizacji, co w efekcie inicjuje procesy fizykochemiczne i biologiczne, prowadzące do uszkodzenia struktur komórkowych i śmierci komórki. Istotną dla efektywności radioterapii charakterystyką jest promieniowrażliwość komórek (zdrowych i nowotworowych). Zależy ona przede wszystkim od stopnia uwodnienia i utlenowania komórki, zdolności do naprawy uszkodzeń, czy fazy cyklu komórkowego. Stopień wrażliwości komórek na PJ tłumaczy prawo Bergonie'a i Tribondeau'a, które mówi, że jest ona tym większa, im większa jest aktywność proliferacyjna komórek i im mniejszy jest stopień ich zróżnicowania [6].

Warto podkreślić, że PJ nie jest obojętne dla organizmu ludzkiego, a stosowane w zbyt dużych dawkach prowadzi do szeregu poważnych skutków ubocznych. W trakcie radioterapii następuje nie tylko miejscowe napromienienie nowotworu, ale również nieunikniona jest ekspozycja na PJ zdrowych tkanek. Działanie promieniowania jonizującego wiąże się z możliwością wystąpienia odczynów miejscowych (np. rumień skóry, zapalenie błon śluzowych) lub ogólnoustrojowych (nudności, wymioty, gorączka, uszkodzenia szpiku kostnego) [6]. Istnieje również zwiększone ryzyko pojawienia się nowotworów wtórnych [8].

1.2.1. Oddziaływanie promieniowania jonizującego na DNA komórki

Promieniowanie jonizujące stanowi nieodłączną część radioterapii, a więc konieczne jest dokładne zrozumienie jego działania na żywą materię. Działanie PJ polega na wywołaniu jonizacji ośrodka. W efekcie oderwania elektronu od obojętnego atomu/cząsteczki powstają pary jonów – jony dodatnie i ujemnie naładowane elektrony [9]. Materia może ulegać jonizacji w sposób bezpośredni, poprzez zderzenia cząstki jonizującej z cząsteczkami materii, bądź pośredni. Klasycznym przykładem jonizacji pośredniej w kontekście organizmów żywych stanowi zjawisko radiolizy wody.

Charakterystyczną cechą PJ jest stopień jego pochłaniania przez materię. Efekt, jaki wywoła promieniowanie zależy od ilości zdeponowanej w ośrodku energii. Liniowy transfer energii (LET) jest miarą efektywności przekazywania energii do ośrodka i określa ilość energii przekazanej na jednostkę drogi przebytej przez cząstkę jonizującą [10]. Wartość ta jest zależna od rodzaju i energii promieniowania. Możemy więc dokonać podziału PJ na promieniowanie o niskim współczynniku LET ($< 2 \text{ keV}/\mu\text{m}$), czyli promieniowanie gamma, promieniowanie X i protony oraz promieniowanie o wysokim współczynniku LET ($> 40 \text{ keV}/\mu\text{m}$), które stanowią cząstki α , czy wysokoenergetyczne cząstki o dużej liczbie atomowej Z [10]. W zależności od rodzaju zastosowanego promieniowania jonizującego jego wpływ biologiczny jest różny, co pokazują krzywe przeżywalności komórek (**Rysunek 1**) [11]. Przeżywalność dla PJ o niskiej wartości LET zmniejsza się liniowo, początkowo powoli, wraz ze wzrostem dawki, by po przekroczeniu jej pewnej wartości gwałtownie maleć (obszar opisywany prostą o znacznie większym, co do wartości bezwzględnej, współczynniku kierunkowym). Dla PJ o wysokiej wartości LET, przeżywalność gwałtownie spada już przy małych dawkach promieniowania i opisywana jest jedną prostą w całym zakresie dawek (**Rysunek 1**). PJ o niskim LET charakteryzuje się dużą przenikalnością, a mała wartość współczynnika LET wynika z dłuższej drogi, jaką promieniowanie musi przebyć w ośrodku, aby pozbyć się tej samej ilości energii, co promieniowanie o wysokiej wartości LET. Stąd wniosek, że prawdopodobieństwo wywołania jonizacji przez promieniowanie o małej wartości LET jest znacznie mniejsze niż PJ o dużej wartości LET.



Rysunek 1. Krzywe przeżywalności komórek [11].

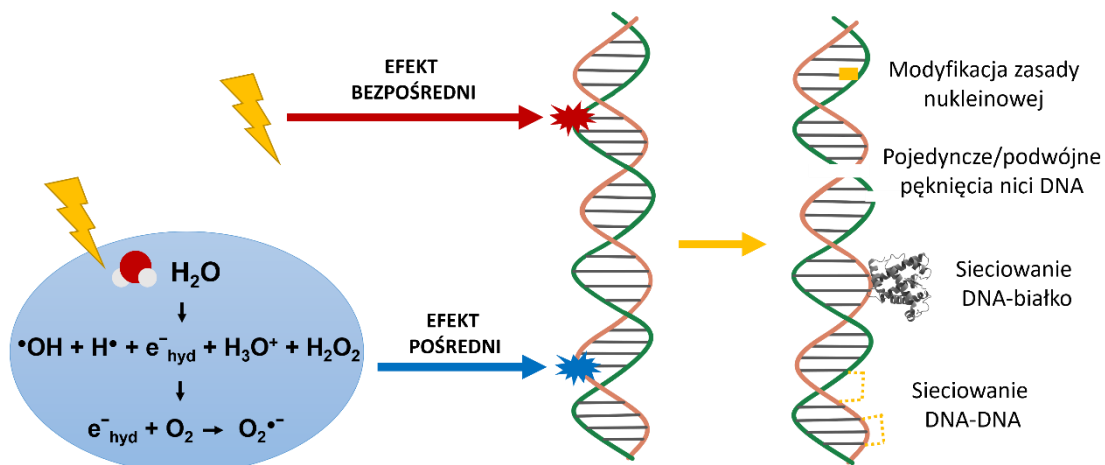
Działanie promieniowania jonizującego na organizm ludzki wywołuje zmiany na każdym poziomie – od pojedynczej molekuly, aż po cały organizm. Skutki napromienienia zależą od wielu czynników, m.in. wielkości i mocy dawki, czasu ekspozycji, wrażliwości komórek, czy rodzaju promieniowania. Wydajność indukowania zmian biologicznych jest w dużej mierze zależna od rodzaju struktury biologicznej poddawanej działaniu PJ. W **Tabela 1** zebrano wartości dawek pochłoniętych przez membranę, cytoplazmę i jądro komórkowe dla dawki śmiertelnej (LD_{50}) dla linii komórkowej CHO (komórek nabłonkowych jajnika chomika chińskiego) w zależności od lokalizacji źródła promieniowania [12]. W opisywanym eksperymencie zastosowano promieniowanie X z zewnętrznego źródła, inkorporowaną do DNA genomowego tymidynę znakowaną trytem, 3H -dThd, oraz zasocjowaną z błoną komórkową konkanawalinę znakowaną radioaktywnym jodem ^{125}I . Wyniki zestawione w **Tabela 1** pokazują, że w każdym z analizowanych przypadków jądro komórkowe (DNA) otrzymuje tę samą dawkę, około 3-4 Gy. Przy czym przy zastosowaniu znakowanej trytem tymidyny, jądro otrzymuje dawkę 3,8 Gy, cytoplazma dawkę kilkanaście razy mniejszą, zaś błona komórkowa dawkę kilkaset razy mniejszą. Natomiast ^{125}I -konkanawalina zaabsorbowana w błonie komórkowej dostarcza ponad 100-krotnie większą dawkę do błony komórkowej i 6-krotnie większą do cytoplazmy niż do jądra. Zastosowanie promieniowania X z zewnętrznego źródła powoduje równomierne napromienienie każdej z rozważanych struktur. Te znaczne wahania dawek związanych

z błoną i cytoplazmą i stała wartość dawki docierającej do jądra komórkowego świadczą o tym, że strukturą kluczową, której uszkodzenie prowadzi do śmierci komórki, jest jądro komórkowe. Z punktu widzenia radioterapii, DNA komórkowe wydaje się więc stanowić najważniejszy cel działania PJ.

Tabela 1. Dawka (Gy) zaabsorbowana przez jądro komórkowe, cytoplazmę i błonę komórkową przy dawce śmiertelnej LD₅₀ dla komórek linii CHO [12].

Źródło promieniowania	Jądro komórkowe	Cytoplazma	Błona komórkowa
Promieniowanie X	3,3	3,3	3,3
³ H-dThd (sonda w DNA)	3,8	0,27	0,01
¹²⁵ I-konkanawalina (sonda w błonie komórkowej)	4,1	24,7	516,7

Promieniowanie jonizujące, oddziałując z DNA w żywych komórkach prowadzi do uszkodzeń materiału genetycznego. Możemy do nich zaliczyć: jednoniciowe (z ang. *single strand break*, SSB) lub dwuniciowe pęknięcia (z ang. *double strand break*, DSB), sieciowanie DNA-białko, sieciowanie DNA-DNA, czy modyfikacje zasad nukleinowych (**Rysunek 2**) [13]. Dawka 1 Gy promieniowania o niskiej wartości LET (np. promieniowania X) wywołuje w pojedynczej komórce około 1000 uszkodzeń typu SSB, 40 typu DSB, 1000 uszkodzeń zasad nukleinowych (oksydacja zasady), a także 700 sieciowań DNA-białko [12]. Warto zaznaczyć, że codziennie w każdej komórce dochodzi do tworzenia od 10 do 150 tysięcy uszkodzeń oksydacyjnych DNA, z których część przekształca się w SSB w trakcie procesów naprawy [14]. Należy pamiętać, że od rodzaju uszkodzeń zależy, czy dojdzie do naprawy DNA, czy do nieodwracalnych zmian, prowadzących do śmierci komórki. Początkowo, w odpowiedzi na działanie PJ, komórka ma możliwość uruchomienia procesów naprawy oraz zahamowania cyklu komórkowego, w celu uniemożliwienia przekazania wadliwej kopii DNA nowym komórkom. Duża liczba uszkodzeń może jednak spowodować, że naprawa DNA będzie niemożliwa, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki. Uszkodzenia typu SSB są łatwo naprawiane (poprzez wykorzystanie komplementarnej nici DNA jako matrycy). DSB z kolei należą do najgroźniejszych uszkodzeń, prowadząc w większości do apoptozy (lub nekrozy) komórki.



Rysunek 2. Wpływ promieniowania jonizującego na DNA [13].

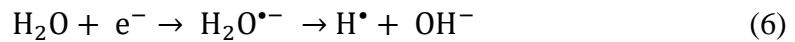
Działanie promieniowania jonizującego na cząsteczkę DNA może być bezpośrednie, prowadząc do jonizacji i tworzenia kationorodnika biomolekuły ($\text{DNA}^{\bullet+}$) lub jej stanu wzbudzonego elektronowo (DNA^*) (**Rysunek 2**). Z drugiej strony może ono działać pośrednio poprzez oddziaływanie z wodą, która jest naturalnym składnikiem każdej żywej komórki [13] (**Rysunek 2**). W wyniku radiolizy wody dochodzi do tworzenia wielu produktów, w tym rodników, które są zdolne do wywoływania uszkodzeń w DNA. Proces ten można przedstawić w trzech etapach [9]:

1. W trakcie procesu fizycznego (0,1 do 1 fs) następuje jonizacja (1) lub wzbudzenie (2) cząsteczki wody pod wpływem fotonów lub naładowanych cząstek (np. promieniowania gamma, promieniowania X, wysokoenergetycznych cząstek).



2. Kolejne stadium, fizykochemiczne, to proces, gdzie w czasie od 1 fs do 1 ps następuje dysocjacja wzbudzonych cząsteczek wody, w wyniku której powstają rodniki H^\bullet i $\bullet\text{OH}$ (3,4). Na tym etapie dochodzi również do hydratacji elektronu (5) oraz jego reakcji z cząsteczką wody (6):





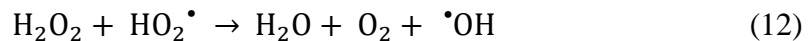
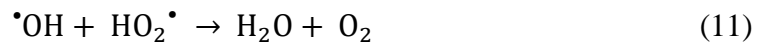
Jony H_2O^+ również ulegają dalszemu szybkiemu rozpadowi (7):



3. W końcowym procesie, jakim jest stadium chemiczne (ps - μ s), dochodzi do rekombinacji rodników $\bullet OH$ i atomów wodoru. W jej wyniku powstają cząsteczki wodoru, nadtlenku wodoru oraz wody (8-10):



Długotrwałe napromienianie wody powoduje dodatkowo wydzielanie się tlenu (11,12):



W procesie radiolizy wody powstają więc rodniki hydroksylowe ($\bullet OH$), rodniki wodorowe (H^\bullet), wtórne elektrony (e^- , które bardzo szybko przechodzą w uwodnioną formę – e_{aq}^- , a w obecności tlenu – przekształcają się w anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), jony hydroniowe (H_3O^+) oraz cząsteczki wodoru (H_2) i tlenu (O_2).

Wykazano, że w przypadku promieniowania stosowanego w radioterapii, prawdopodobieństwo tworzenia uszkodzeń biologicznych, spowodowane działaniem wolnych rodników, jest wyższe niż w przypadku jego bezpośredniego działania. Mianowicie stwierdzono, że śmierć komórki w 65% spowodowana jest reakcjami DNA z rodnikami hydroksylowymi [15]. Rodniki $\bullet OH$ uważane są więc za najważniejszy czynnik uszkadzający biopolimer. W obecności tlenu, powodują oderwanie atomu wodoru od cząsteczki deoksyrybozy, co prowadzi do zerwania ciągłości nici DNA.

Tabela 2. Wydajności radiacyjno-chemiczne produktów radiolizy wody w warunkach słabo jonizującego promieniowania (promieniowanie γ (^{60}Co), wysokoenergetyczne elektrony) w roztworach nasyconych różnymi gazami [12].

Produkt / Gaz nasycający	$\bullet\text{OH}$	$\text{H}\bullet$	e_{aq}^-	H^+	OH^-	H_2O_2	H_2	$\text{O}_2^{\bullet-} /$ $\text{HO}_2\bullet$
N_2	2,8	0,6	2,8	3,4	0,6	0,7	0,5	-
N_2O	5,6	0,6	-	3,0	3,0	0,9	0,5	-
$\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ (4:1)	5,6	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	0,6
O_2	2,8	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	3,3

Należy zauważyć, że solwatowane elektrony, generowane w trakcie procesu radiolizy wody, są wytwarzane w ilościach podobnych do ilości powstających rodników hydroksylowych (**Tabela 2**; woda nasycona azotem). Wiadomo jednak, że uwodnione elektrony nie wpływają na aktywność biologiczną DNA, natomiast rodniki hydroksylowe inaktywują go, wywołując pęknięcia nici [12]. Założenie o wiodącej roli rodników hydroksylowych w procesie uszkodzenia DNA komórkowego (patrz wyżej), wydaje się więc być uzasadnione. Niemniej należy podkreślić, że solwatowane elektrony reagują z zasadami, nukleozydami czy DNA z szybkością kontrolowaną przez dyfuzję [16].

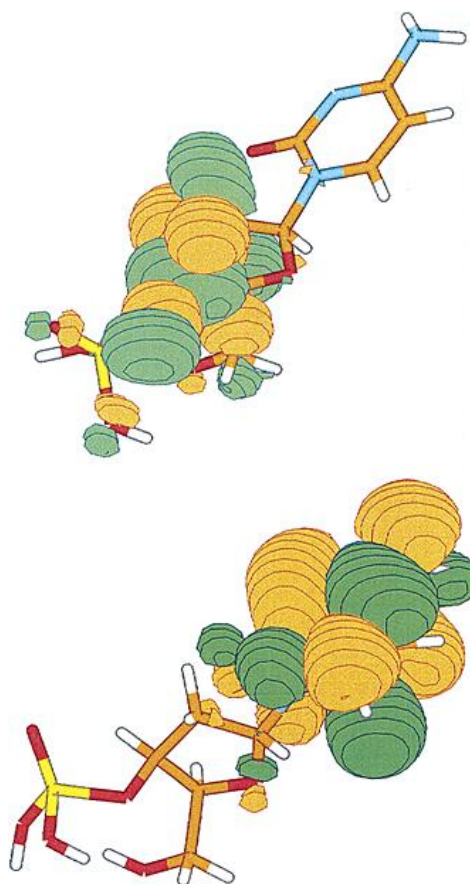
1.2.2. Oddziaływanie elektronu z natywnym DNA – pęknięcia nici

W 2000 roku Grupa Prof. Sanche'a [17] wykazała, że niskoenergetyczne elektrony (z ang. *Low Energy Electrons*, LEE) o energiach z przedziału 3-20 eV w warunkach wysokiej próżni mogą skutecznie generować jedno- i dwuniciowe pęknięcia w plazmidowym DNA zaadsorbowanym na metalicznym podłożu. Zauważono, że elektrony o energiach poniżej progu jonizacji DNA (7-8 eV) powodują uszkodzenia biopolimeru w podobnym stopniu, co elektrony o wyższych energiach [18]. Kształt krzywej wydajności uszkodzeń w funkcji energii elektronów sugeruje, że badany proces ma charakter rezonansowy. W związku z tym sugerowano, że przyłączenie elektronu prowadzi do powstania rezonansu, a dokładniej przejściowego anionu molekularnego $(\text{RH})^{\bullet-}$ (13):



Uszkodzenia wydają się być spowodowane poprzez szybki rozpad przejściowych rezonansów molekularnych do reaktywnych produktów rodnikowych ($\text{R}\bullet$).

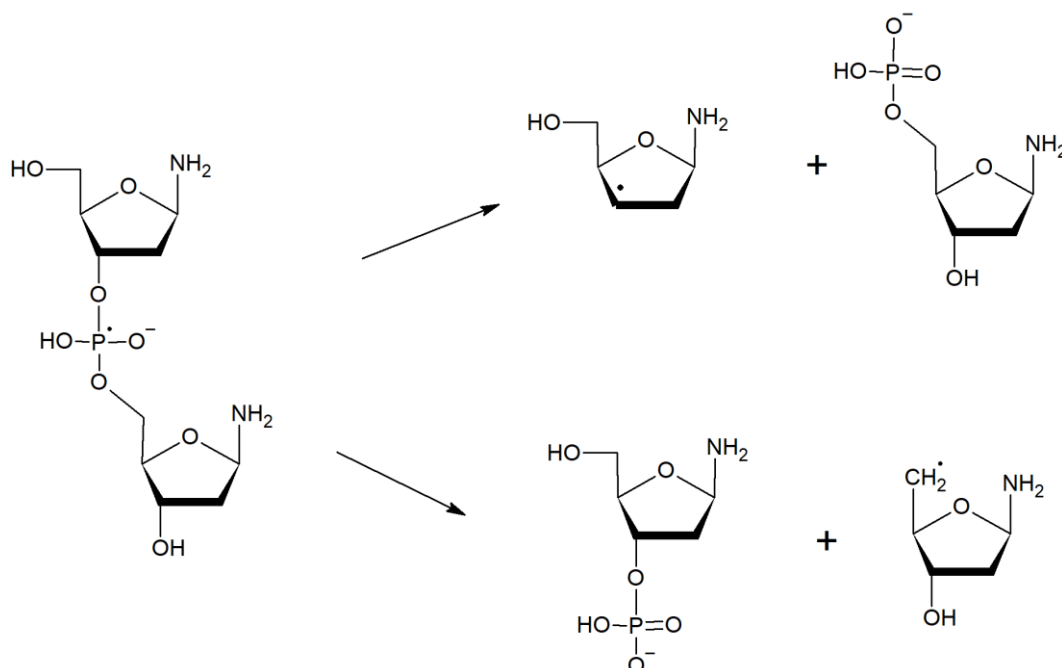
Na przestrzeni lat próbowano zrozumieć mechanizm powstawania pęknięć w DNA, indukowany działaniem niskoenergetycznych elektronów. Szereg badań eksperymentalnych i teoretycznych doprowadził do dwóch głównych hipotez: (i) hipotezy zakładającej tworzenie rezonansów („mechanizm rezonansowy”) oraz (ii) hipotezy elektronowo stabilnych anionów. Według Simonsa i współpracowników nadmiarowy elektron lokalizuje się początkowo na orbitalu π^* zasady, tworząc anion rezonansowy, by następnie przenieść się na orbital $C3'-O/C5'-O$ σ^* , co powoduje dysocjację wiązania fosfodiesterowego i odpowiada zerwaniu nici DNA (**Rysunek 3**) [19].



Rysunek 3. Pojedynczo obsadzony orbital molekularny (SOMO) solwatowanego anionu obliczony dla odległości równowagowej R_{CO} (na dole) odpowiadający orbitalowi π^* i dla odległości R_{CO} przy rozerwanym wiązaniu C-O, odpowiadający orbitalowi σ^* (na górze) [19].

Ta sama grupa określiła również możliwość dysocjacji wiązania C-O poprzez uprzednie utworzenie rezonansu, o energii z zakresu 2-3 eV, zlokalizowanego na grupie fosforanowej (**Rysunek 4**) [20]. W tym przypadku szybkość pęknięcia wiązania C-O jest jednak na tyle mała, że nie może ona konkurować z bardzo szybkim auto-oderwaniem

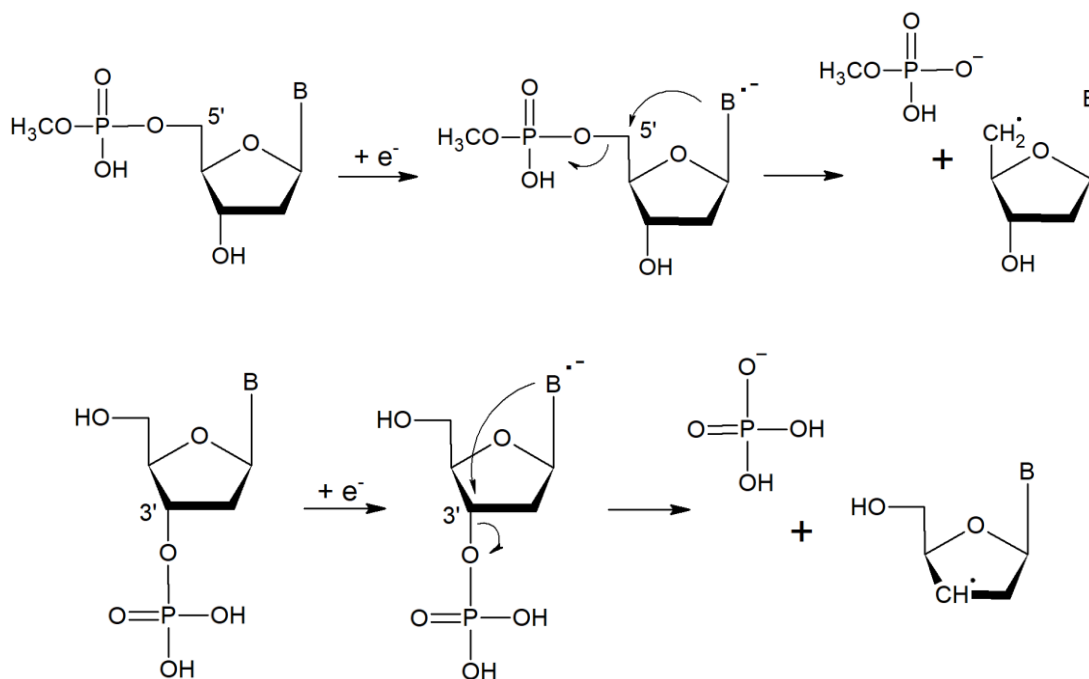
elektronu od anionu rezonansowego, przez co ta ścieżka wydaje się mało prawdopodobna.



Rysunek 4. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowanego przyłączeniem LEE poprzez utworzenie rezonansu zlokalizowanego na grupie fosforanowej [20].

Podobnie grupa Illenbergera stwierdziła, że elektrony o energiach poniżej progu wzbudzenia elektronowego (<3 eV) skutecznie rozkładają uracyl w fazie gazowej, generując ruchliwy rodnik wodorowy i odpowiadający mu anion U-H^- [21], które mogą prowadzić do potencjalnych uszkodzeń radiacyjnych w DNA.

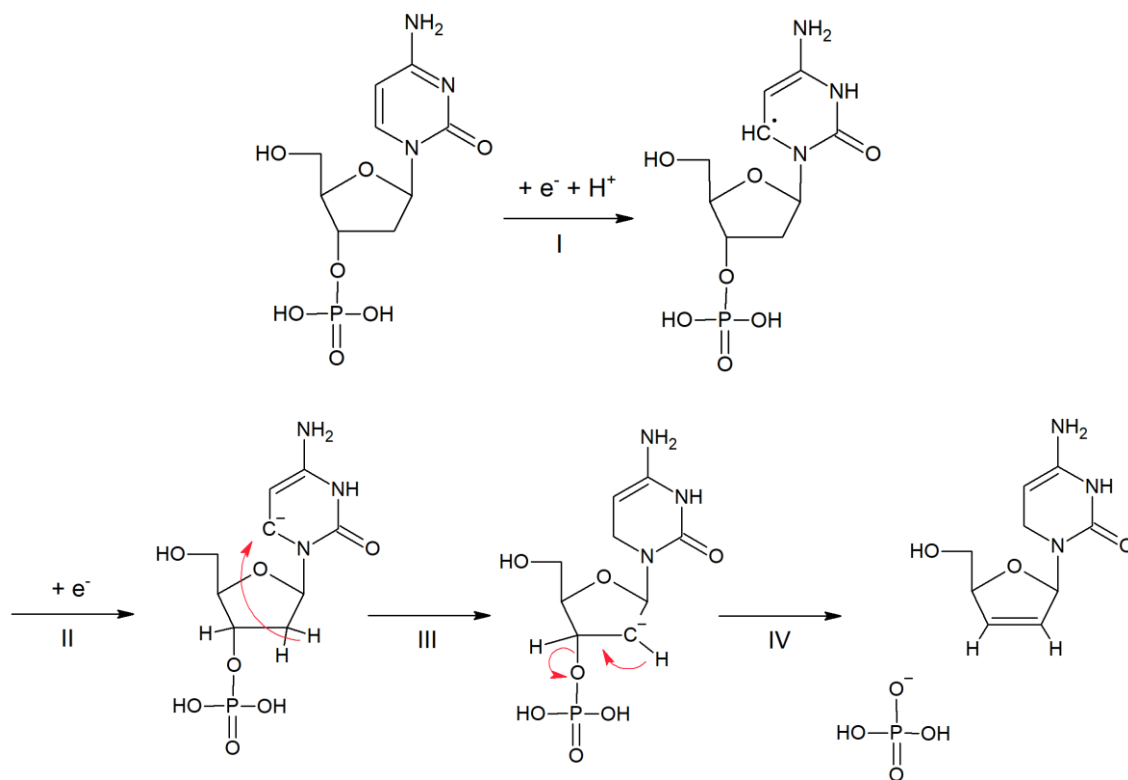
Inny punkt widzenia prezentuje Leszczyński i współpracownicy. Ich badania sugerują, że zasady pirymidynowe tworzą stabilne elektronowo anionorodniki w fazie gazowej, jak i wodnej [22,23]. Mechanizm tworzenia pęknięcia można opisać następująco: nadmiarowy elektron wiąże się z zasadą nukleinową, tworząc stabilny elektronowo anionorodnik, po czym elektron ten zostaje przeniesiony na orbital σ^* wiązania C5'-O lub C3'-O, co w następnym etapie prowadzi do zerwania wiązania C-O i utworzenia produktów: rodnika zlokalizowanego na reszcie cukrowej oraz anionu fosforanowego (**Rysunek 5**).



Rysunek 5. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowany przyłączeniem LEE dla nukleotydu (5'- lub 3'-monofosforanu). B oznacza zasadę azotową [22,23].

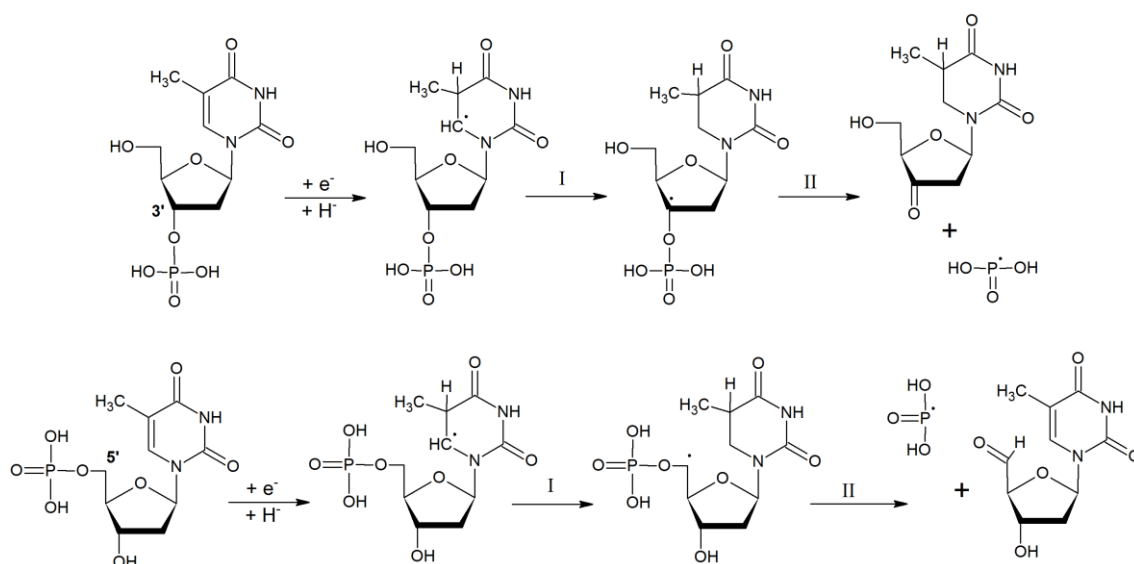
W środowisku wodnym wartości powinowactwa elektronowego są dużo wyższe niż w przypadku fazy gazowej, jednak solwatacja zwiększa również wysokość barier kinetycznych. Pękanie wiązania C5'-O5' wydaje się mniej prawdopodobne (bariera około 14 kcal/mol), niż wiązania C3'-O3' (bariera około 7 kcal/mol).

Podobnie, na przykładzie nukleotydu deoksycytydyny, mechanizm powstawania pęknięć z udziałem anionu stabilnego elektronowo rozważała Dąbkowska i współpracownicy [24]. Po przyłączeniu LEE do nukleotydu i utworzeniu stabilnego adiabaticznie anionu zlokalizowanego na cytozynie, dochodzi do protonowania zasady w pozycji C5, co daje obojętny rodnik (**Rysunek 6 I**). W kolejnym etapie drugi elektron przyłącza się do rodnika, indukując przeniesienie atomu wodoru z pozycji C3' cukru na atom węgla C6 cytozyny (**Rysunek 6 II**), co sprzężone jest z bezbarierową dysocjacją wiązania C3'-O (**Rysunek 6 IV**).



Rysunek 6. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowanego przyłączeniem LEE w 3'-monofosforanie 2'-deoksycytydyny [24].

Z kolei grupa Raka zbadła przy pomocy metody DFT (teorii funkcjonału gęstości, z ang. *Density Functional Theory*) możliwość powstawania uszkodzeń typu SSB wywołanych poprzez pęknięcie wiązania O-P w reszcie fosforanowej (**Rysunek 7**) [25].



Rysunek 7. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowany przyłączeniem LEE zachodzący poprzez dysocjację wiązania P-O dla 3'- lub 5'-monofosforanu 2'-deoksytymidyny [25].

Przyłączenie LEE do nukleotydu tymidyny prowadzi do utworzenia stabilnego walencyjnie anionu zlokalizowanego na zasadzie. W kolejnym kroku następuje przyłączenie protonu do węgla C5 tyminy, powodując utworzenie obojętnego rodnika nukleotydu. Następny etap polega na wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniu atomu wodoru z węgla C3' lub C5' reszty cukrowej na węgiel C6 tyminy. Ostatnim krokiem reakcji jest dysocjacja wiązania O-P z utworzeniem ketonu bądź aldehydu na reszcie cukrowej. Wyliczone bariery kinetyczne oraz termodynamiczne są mniej korzystne niż w przypadku powstawania pęknięć poprzez zerwanie wiązania CX'-O. Chociaż dane eksperymentalne, w szczególności badania techniką ESR [26,27] wskazują na możliwość dysocjacji wiązania O-P, to proces ten wydaje się mniej istotny w mechanizmie tworzenia uszkodzeń typu SSB. Należy jednak podkreślić, że badania ESR dotyczyły „suchego” DNA. Jeśli uwzględnić naturalne środowisko komórki, w którym DNA oddziałuje z białkami i innymi cząsteczkami wykazującymi właściwości protonodonorowe, pękanie wiązania O-P w procesach tworzenia SSB może odgrywać znacznie większą rolę.

1.3. Radiosensybilizatory i ich miejsce w terapii przeciwnowotworowej

1.3.1. Hipoksja komórek nowotworowych

Istotny aspekt w kontekście wpływu promieniowania jonizującego na komórki nowotworowe stanowi hipoksja. Środowisko komórek nowotworów litych charakteryzuje się niską zawartością tlenu (hipoksją), co jest związane z ich zwiększonym metabolizmem i zaburzeniami angiogenezy [28].

Pojęcie hipoksji stanowi przedmiot zainteresowań naukowców od dziesięcioleci. Pierwsze wzmianki dotyczące hipoksji w guzach litych opublikowano w połowie XX wieku, kiedy to Gray i Thomlinson wykazali związek między niedotlenieniem a opornością na radioterapię [29]. Potwierdził to również Brown przedstawiając wyniki badań, w których pokazał, że słaba odpowiedź na radioterapię jest ściśle skorelowana z hipoksją panującą w otoczeniu guza [30]. W latach siedemdziesiątych XX wieku prowadzono w kontekście hipoksji badania radiobiologiczne na liniach komórkowych i modelach zwierzęcych. Wykazano, że komórki znajdujące się w hipoksji są około trzykrotnie mniej wrażliwe na działanie promieniowania od komórek zdrowych (będących w normoksji) [31,32].

Hipoksja, będąc odpowiedzialna za niską skuteczność radioterapii, a co za tym idzie, za wzrost radiooporności guzów, stała się istotnym celem nowych leków. Problem hipoksji próbowano rozwiązać poprzez wprowadzenie do terapii radiosensybilizatorów oraz proleków aktywowanych w środowisku hipoksji (z ang. *Hypoxia-Activated Prodrugs*, HAPs) [33], a także poprzez zastosowanie hiperbarii tlenowej [34] jako metody zwiększającej poziom tlenu we krwi. Szczególnym zainteresowaniem cieszyły się i cieszą tzw. mimetyki tlenu z grupy nitroimidazoli. Jeden z tych związków, nimorazol, stosowany jest w praktyce klinicznej w Danii i Norwegii, a równocześnie jest nadal badany klinicznie, np. w połączeniu z cisplatyną, znanym cytostatykiem wykorzystywanym w chemioterapii (patrz **Rozdział 1.5**). Kolejną grupą radiosensybilizatorów bezpośrednio związanych z hipoksją są tzw. cytotoksyny, których zadaniem jest niszczenie komórek znajdujących się w hipoksji. Do substancji tego typu należy np. tirapazamina, będąca w III fazie badań klinicznych.

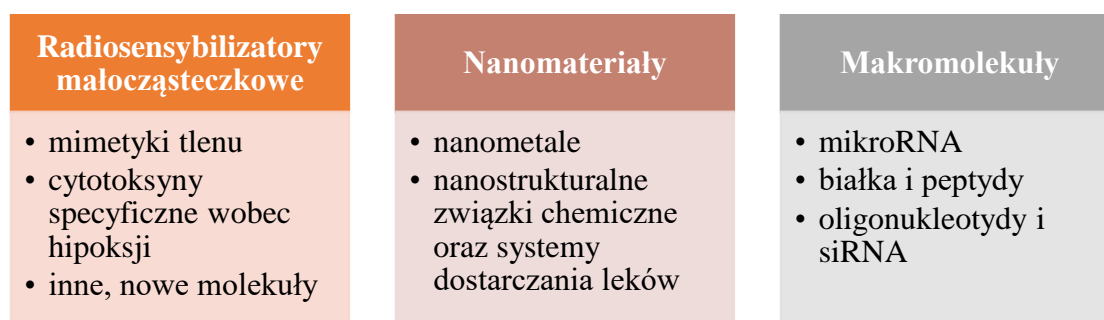
1.3.2. Radiosensybilizatory i ich klasyfikacja

Środowisko panujące w komórkach nowotworowych, czyli wysokie niedotlenienie, pozwala na wykorzystanie w terapii mieszanej (chemoradioterapii) radiosensybilizatorów. Są to związki chemiczne, które uczulają komórki nowotworowe na promieniowanie jonizujące wykorzystywane w radioterapii, prowadząc do wydajnego uszkodzenia ich DNA i co za tym idzie – do ich śmierci. Pierwszy okres wzmożonego zainteresowania tematyką radiosensybilizatorów, w tym – sposobem ich działania, przypada na lata siedemdziesiąte i osiemdziesiąte XX wieku. Wówczas szczególnym zainteresowaniem cieszyły się zwłaszcza związki z grupy nitroimidazoli [35].

Według Adams'a [36,37], pioniera w dziedzinie badań nad radiosensybilizacją, radiosensybilizatory można podzielić na 5 podstawowych klas: (1) supresory naturalnych radioprotektorów, (2) mimetyki tlenu, (3) analogi tyminy, (4) związki toksyczne po napromienieniu oraz (5) inhibitory procesów naprawczych DNA. Jego podział radiosensybilizatorów podkreśla rolę mechanizmów uszkodzeń i naprawy DNA. Trzy dekady później Hall [37,38] wyodrębnił dwie grupy tej klasy związków: (1) halogenowe pochodne pirymidyn oraz (2) sensybilizatory niedotlenionych komórek. Jego podział wskazywał na odmienny efekt działania promieniowania jonizującego na dany typ komórek – nowotworowych będących w hipoksji i zdrowych. Według Hall'a wykorzystanie radiosensybilizatora w terapii powoduje wzmocnione działanie na

komórki nowotworowe (zwiększoną cytotoksyczność) nie powodując uszkodzeń radiacyjnych w zdrowych tkankach [38].

Coraz intensywniejszy rozwój innych dziedzin nauki, takich jak nanotechnologia, czy biotechnologia, spowodował kolejną falę zainteresowania tematyką radiosensybilizacji. W tym kontekście Zhang [13,39] zaproponował podział radiosensybilizatorów, uwzględniający głównie ich strukturę. Podzielił je na: (1) małowcząsteczkowe molekuly, (2) nanomateriały oraz (3) makromolekuly (**Rysunek 8**).



Rysunek 8. Podział radiosensybilizatorów [13,39].

Tlen jest najbardziej znanym uczulaczem, który poprzez swoje powinowactwo elektronowe, umożliwia utrwalanie uszkodzeń w DNA. Próbowano badać małe molekuly o podobnych właściwościach. Stąd mamy klasę małowcząsteczkowych molekul chemicznych, do których można zaliczyć mimetyki tlenu i których zadaniem jest naśladowanie radiosensybilizujących właściwości tlenu. Najbardziej znaną grupą tego typu związków stanowią nitroimidazole (patrz **Rozdział 1.5**). Kolejną podgrupą małowcząsteczkowych radiosensybilizatorów są cytotoksyny specyficzne wobec hipoksji, do których zaliczamy chinony aromatyczne i alifatyczne N-tlenki, kompleksy metali przejściowych i związki nitrowe. Znanym przykładem związku z grupy cytotoksyn jest tirapazamina prowadząca do DSB, SSB oraz uszkodzeń zasad w DNA w warunkach hipoksji. Inne molekuly, należące do małowcząsteczkowych radiosensybilizatorów to tzw. pseudosubstraty, do których możemy zaliczyć analogi tyminy (patrz **Rozdział 1.4**), związki wpływające na sygnalizację komórkową, mające właściwości radioochronne, czy systemy dostarczania leków.

Rozwój nanotechnologii pozwolił poszerzyć zakres potencjalnych radiosensybilizatorów. Do klasy nanomateriałów możemy zaliczyć przede wszystkim nanometale, wykazujące wysoką biokompatybilność, stabilność chemiczną i niską

toksyczność, np. nanocząstki srebra. Podejmowano również próby przeniesienia małowcząsteczkowych radiosensybilizatorów do formuł nanostrukturalnych, co zaowocowało poprawą ich właściwości farmakokinetycznych i wzmocniło ich działanie. Tą grupę stanowią nanostrukturalne związki chemiczne i systemy dostarczania leków.

Ostatnią klasę stanowią makromolekuły, takie jak miRNA, białka, peptydy, oligonuklotydy i siRNA, również zdolne do regulowania wrażliwości na PJ. Wielkocząsteczkowe leki mają lepszą swoistość niż małe cząsteczki, są zwykle łatwiejsze do zaprojektowania i wyprodukowania i dają liczne możliwości projektowania nowych radiosensybilizatorów.

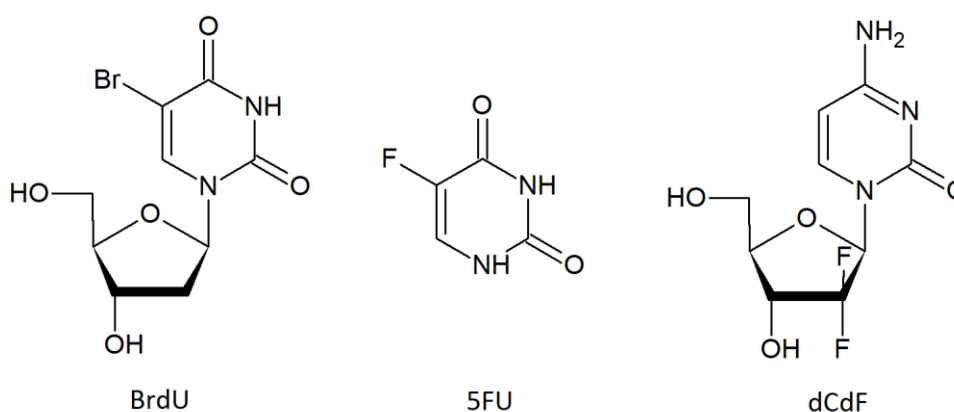
Z uwagi na tematykę niniejszej pracy doktorskiej, skupiającej się na radiosensybilizatorach małowcząsteczkowych, w dalszej części dysertacji zostaną szerzej omówione wyłącznie analogi tyminy oraz mimetyki tlenu.

1.4. Analogi tyminy

Analogi tyminy to jedna z najdłużej badanych grup radiosensybilizatorów, oddziałujących bezpośrednio z komórkowym DNA. Ich ideę działania można wyjaśnić w oparciu o koncepcję „konia trojańskiego” [40,41]. Modyfikowane nukleozydy różnią się od natywnej tymidyny zwykle niewielkim elektrofilowym podstawnikiem w pierścieniu pirymidynowym. Nieznaczna modyfikacja strukturalna umożliwia ich inkorporację do natywnego DNA w analogiczny sposób jak tymidyny. Wcielone do DNA, nie powodują znaczących zmian w strukturze tego biopolimeru i nie wpływają negatywnie na funkcje biologiczne komórki, m.in. nie blokują syntezy DNA i RNA, metabolizmu komórkowego czy naprawy DNA. Strukturalne podobieństwo umożliwia im więc swobodne wcielanie do cząsteczki DNA, jak również wpływa na brak cytotoxyczości. Dopiero zewnętrzny bodziec (promieniowanie jonizujące) wywołuje degradację modyfikowanej zasady wewnątrz nici DNA („koń trojański”), prowadząc do jej uszkodzeń i w konsekwencji do śmierci komórki nowotworowej. Należy tu podkreślić, że modyfikowane nukleozydy, uaktywniane dopiero promieniowaniem mogą więc selektywnie uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie PJ.

1.4.1. Przykłady modyfikowanych nukleozydów

Jedną z lepiej poznanych pochodnych tyminy o potwierdzonym *in vitro* działaniu radiosensybilizującym jest 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU) (**Rysunek 9**) [42,43]. Ulega ona wydajnej fosforylacji w komórkach oraz inkorporacji do DNA w czasie syntezy bądź naprawy. Jednak związek ten nie został wprowadzony do powszechnej praktyki klinicznej. Głównym problemem okazało się osiągnięcie zadowalającego stężenia terapeutycznego BrdU w komórkach rakowych, na co ma wpływ dehalogenowanie związku w wątrobie (prawie 90% związku, podanego dożylnie, ulega dezaktywacji w organizmie w bardzo krótkim czasie) [44]. Zaobserwowano również wpływ antymetabolitów, np. metotreksatu, podawanych na wstępnym etapie leczenia, na obniżenie szybkości procesu dehalogenowania BrdU [45]. Dlatego obecnie BrdU nie jest stosowana samodzielnie w praktyce klinicznej. Jednak, ze względu na wszechstronne badania jej właściwości radioczułających, może stanowić dobry punkt odniesienia do dalszych poszukiwań nowych, lepszych radiosensybilizatorów tej klasy.



Rysunek 9. Przykłady znanych analogów tyminy - od lewej: 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU), 5-fluorouracyl (5FU), gemcytabina (dCdF) [41].

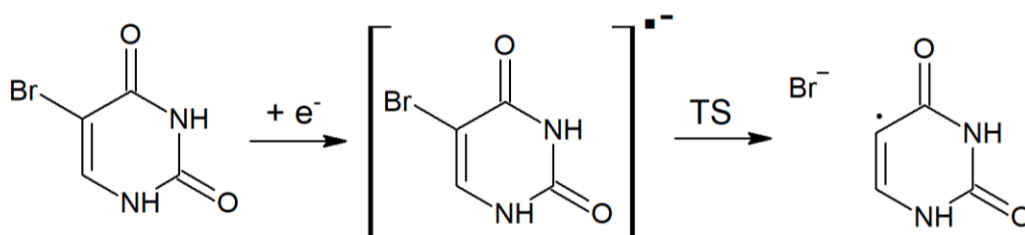
Doskonałymi przykładami analogów tyminy są również fluoropochodne pirymidyny, takie jak 5-fluorouracyl (5FU lub FU) oraz gemcytabina (dCdF) (**Rysunek 9**). 5FU jest lekiem antymetabolitowym szeroko stosowanym w leczeniu nowotworów, zwłaszcza jelita grubego [46]. Jego działanie opiera się na hamowaniu syntazy tymidylanowej. 5FU jest przekształcana w komórce do monofosforanu 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (FdUMP), który działa jako silny inhibitor syntazy tymidylanowej. Uważa się, że to działanie inhibicyjne FdUMP odpowiada za właściwości radiosensybilizujące FU, gdyż zaburza proces naprawy DNA. Wskazano również na nowe strategie np. jednoczesnego leczenia 5FU i metotreksatem – badania *in vitro*

i *in vivo* wykazały zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej przy zastosowaniu takiej strategii [46].

Gemcytabina (**Rysunek 9**) jest dobrze znanym modyfikowanym nukleozydem, wykazującym szeroką aktywność przeciwnowotworową [47]. Po wniknięciu do komórki ulega fosforylacji przez kinazy i zostaje przekształcona do difosforanu gemcytabiny (dFdCDP). Mechanizm sensybilizacji na promieniowanie przy pomocy tego związku nie został w pełni wyjaśniony, jednak przyjmuje się, że to metabolit dFdCDP odpowiada za właściwości radiouczulające gemcytabiny. W takiej formie hamuje ona aktywność reduktazy rybonukleotydowej i zmniejsza pulę trifosforanów deoksynukleotydów dGTP, dATP, dCTP i dTTP. Gemcytabina przekształca się również w trifosforan (dFdCTP), hamując aktywność polimerazy DNA.

1.4.2. Mechanizm dysocjacyjnego przyłączenia elektronu

Zrozumienie molekularnego mechanizmu działania modyfikowanych nukleozydów jest kluczowe dla projektowania nowych pochodnych o właściwościach radiosensybilizujących. Działanie uwrażliwiające modyfikowanych nukleozydów przypisuje się ich podatności na degradację pod wpływem przyłączenia elektronu – możemy mówić tu o wydajnym dysocjacyjnym przyłączeniu elektronu (z ang. *Dissociative Electron Attachment*, DEA). Już pod koniec lat siedemdziesiątych Zimbrick i inni [48] w eksperymencie radiolizy impulsowej pokazali, że przyłączenie elektronu do obojętnej cząsteczki (BrU) powoduje powstanie anionorodnika, który następnie w procesie eliminacji anionu bromkowego tworzy reaktywny rodnik uracylowy (**Rysunek 10**).

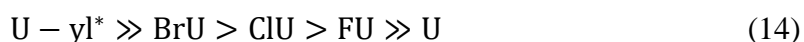


Rysunek 10. Mechanizm dysocjacyjnego przyłączenia elektronu na przykładzie 5-bromouracylu [41].

Eksperymenty w fazie gazowej [49] oraz obliczenia kwantowochemiczne potwierdziły wyniki radiolizy impulsowej. Grupy Wetmore'a [50] oraz Li [51] zbadały na poziomie teorii funkcjonału gęstości (DFT) mechanizm indukowanego przyłączeniem elektronu dehalogenowania trzech halogenopochodnych uracylu podstawionych

w pozycji 5 pierścienia. Pokazano, że przyłączenie elektronu do BrU prowadzi do tworzenia stabilnego elektronowo anionorodnika, który ze stosunkowo małą barierą kinetyczną, przekształca się do reaktywnego rodnika uracylowego. Jeśli rodnik ten powstanie wewnątrz nici DNA może w szeregu reakcji następczych prowadzić do uszkodzeń biopolimeru, w szczególności typu SSB [41].

Stwierdzono również, że wysoka wartość powinowactwa elektronowego, definiowanego jako różnica energii między cząsteczką obojętną a odpowiednim anionorodnikiem, wskazuje na wysokie prawdopodobieństwo wychwytu elektronu przez daną modyfikowaną zasadę [51]. Eksperyment komputerowy pokazał, że adyabatyczne powinowactwo elektronowe (AEA) wzrasta wraz z masą podstawianego halogenu. Rodnik uracylowy, jako układ otwartopowłokowy, wykazywał w tym szeregu najwyższą wartość powinowactwa, a niepodstawiony uracyl – najniższą (14):



Obliczenia wykonano również dla bromopochodnych pozostałych zasad nukleinowych w fazie gazowej oraz w modelu PCM [52]. Stwierdzono, że wszystkie zasady mogą ulegać dehalogenowaniu pod wpływem elektronu i w efekcie tworzyć rodnik zasady oraz anion bromkowy. Podstawienie wodoru przez brom powoduje wzrost powinowactwa (wskazując na wyraźną przewagę pirymidyn nad purynami), szczególnie w środowisku wodnym (15):



Powyżej wspomniane wyniki badań wykazały, że halogenowe pochodne są lepszymi akceptorami elektronów niż ich natywne odpowiedniki.

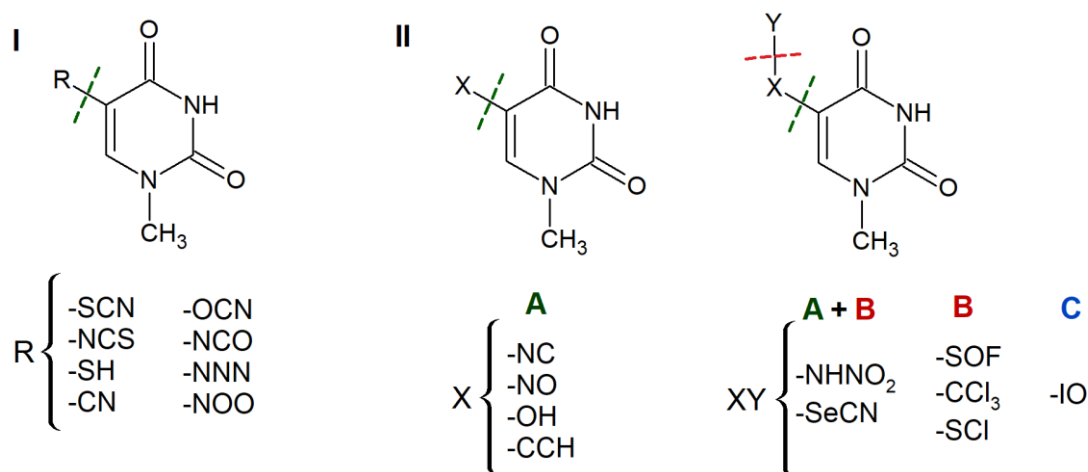
Obliczenia metodą dynamiki molekularnej (AIMD) [53] pozwoliły dodatkowo określić wpływ środowiska wodnego na proces degradacji pod wpływem elektronu. Wyniki potwierdziły wcześniejsze badania [52], że proces ten zachodzi z niską barierą kinetyczną w przypadku pirymidyn oraz bezbarierowo dla puryn. Sugeruje to, że puryny mogą być potencjalnie lepszymi uczulaczami, niż pirymidyny. Obliczona szybkość przyłączenia elektronu przez modyfikowaną zasadę wskazuje jednak na przewagę pirymidyn (7-9 fs a 12-15 fs odpowiedni dla pirymidyn i puryn), co prawdopodobnie wynika z wyższej wartości powinowactwa elektronowego pirymidyn.

1.4.3. Propozycje nowych modyfikowanych nukleozydów

Powyższy opis działania radiosensybilizatorów ulegających procesowi DEA stał się podstawą do zaprojektowania nowych związków o potencjale radiouczulającym, będących pochodnymi 2'-deoksyurydyny.

Grupa Raka [54] przedstawiła prosty protokół obliczeniowy, który pozwala proponować nowe potencjalnie radiosensybilizujące struktury. Pozwoliło to zaproponować szereg nowych związków, które przebadano przy pomocy obliczeń DFT w fazie gazowej (**Rysunek 11 I**). Pochodna uracylu o pożądanych właściwościach uczulających musi spełniać następujące warunki: (1) charakteryzować się wysokim powinowactwem elektronowym, w związku z czym podstawnik powinien posiadać dodatnią wartość stałej Hammeta σ_1 , (2) podstawnik powinien być jak najmniejszy (minimalizacja zawady sterycznej w DNA) i (3) charakteryzować się łatwością degradacji odpowiadającego mu anionorodnika, co wynika z wcześniejszych rozważań, że radiosensybilizator powinien łatwo ulegać procesowi DEA z wytworzeniem genotoksycznego, reaktywnego rodnika uracylowego, podobnie jak 5-bromouracyl.

Obliczenia powinowactwa elektronowego (AEA oraz VDE) dla związków przedstawionych na **Rysunek 11 I** pozwoliły stwierdzić, że wszystkie przebadane pochodne uracylu są zdolne do wychwytu elektronu. Dalsza analiza obliczeniowa przebiegu degradacji tych związków pod wpływem elektronu pozwoliła zawęzić badaną grupę pochodnych do dwóch związków wykazujących potencjalne działanie radiosensybilizujące – 1-metylo-5-tiocyanatouracylu (SCNU) oraz 1-metylo-5-cyjanianouracylu (OCNU). Przeprowadzono dodatkowo badania eksperymentalne przy pomocy spektroskopii fotoelektronowej (PES) dla SCNU oraz dla porównania, dla związku, dla którego protokół określił brak właściwości uczulających, czyli dla 5-cyjanouracylu (CNU). Badania potwierdziły wiarygodność zastosowanego modelu obliczeniowego.



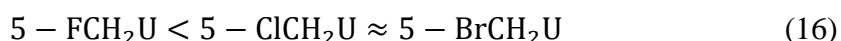
Rysunek 11. Propozycje nowych pochodnych uracylu [54,56].

Potencjalną wrażliwość SCNU na przyłączenie elektronu zbadano dla modelu 5-tiocyanato-2'-deoksyurydyny (SCNdU) [55] przy pomocy elektronowego rezonansu spinowego (ESR), radiolizy oraz modelowania DFT (**Rysunek 12**). Eksperyment sugerował, że zastosowanie wspomnianego wcześniej protokołu obliczeniowego [54] jest niewystarczające do pełnej charakterystyki procesu DEA. W eksperymencie ESR dla SCNdU zauważono bowiem, że główna ścieżka dysocjacji prowadzi do pęknięcia wiązania S-C wewnątrz podstawnika z utworzeniem rodnika $\bullet\text{SdU}$, a nie jak początkowo zakładano – do pęknięcia wiązania S-C5 między podstawnikiem a zasadą z utworzeniem rodnika $\text{dU}\bullet$. Fakt, że drugi produkt preferowanego procesu DEA, anion CN^- , jest silnie cytotoksyczny, dodatkowo sugeruje, że SCNdU może być efektywnym radiosensybilizatorem.

Przykład SCNdU pokazał, że degradacja pochodnych uracylu może zachodzić przynajmniej na dwa sposoby: (1) poprzez rozerwanie wiązania pomiędzy podstawnikiem a zasadą lub (2) wewnątrz podstawnika. Dzięki tej obserwacji w kolejnej zbadanej grupie pochodnych uracylu (**Rysunek 11 II**) przeanalizowano i porównano obie możliwe ścieżki reakcji [56]. Podgrupę A badanych pochodnych (**Rysunek 11 IIA**) stanowiły związki, dla których pod wpływem przyłączenia elektronu możliwa jest wyłącznie dysocjacja na rodnik uracylu oraz anion jego podstawnika. Natomiast w podgrupie B (**Rysunek 11 IIB**) znalazły się wyłącznie te struktury, dla których przyłączenie elektronu prowadzi do bezbarierowego pęknięcia wiązania wewnątrz podstawnika. Dwa związki, 5-(nitroamino)uracyl (NHNO_2U) i 5-selenocyjanianouracyl (SeCNU) (**Rysunek 11**), okazały się zdolne do degradacji na obydwa sposoby. Jeszcze inaczej pod wpływem przyłączenia elektronu zachowywała się pochodna

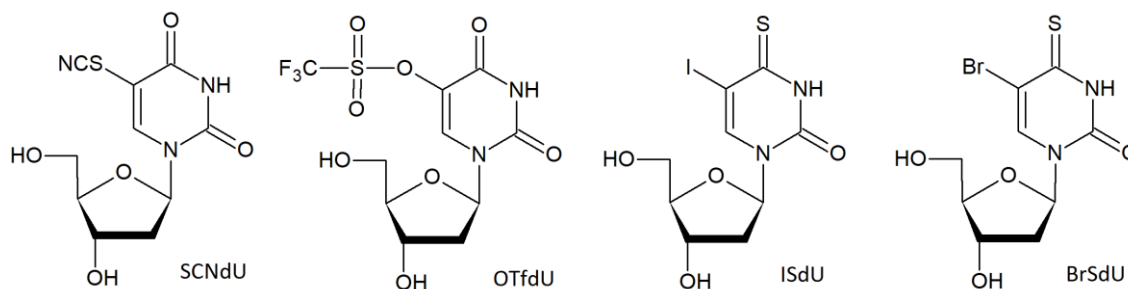
5-jodozylouracylu (IOU) (**Rysunek 11 IIC**). Związek degraduje poprzez rozerwanie wiązania wewnątrz podstawnika, jednak w jej wyniku powstaje anionorodnik tlenu oraz obojętna cząsteczka 5-jodouracylu. Analiza procesu DEA dla rozpatrywanych pochodnych pozwoliła wskazać trzy związki najchętniej ulegające degradacji, a tym samym najlepsze potencjalne radiouczulacze – SeCNU, SCIU (5-(chlorosulfeno)uracyl) oraz IOU. Dalszym badaniom eksperymentalnym została poddana pochodna 5-selenocyjaniano-2'-deoksyurydyna (SeCNdU) [57].

Grupa Wanga badała również właściwości radiosensybilizujące halogenometylo pochodnych urydyny – 5-XCH₂U (gdzie X to był F, Cl lub Br) [58]. Stwierdzono, że wszystkie pochodne tworzą stabilny anionorodnik i podlegają procesowi DEA poprzez pęknięcie wiązania X-C, tworząc rodnik •CH₂-U. Sugerowano, że tego typu związki mogą być potencjalnie lepszymi radiouczulaczami, niż 5BrU z uwagi na tworzenie rodnika •CH₂U, który może prowadzić do wydajniejszego sieciowania DNA niż rodnik urydylowy [58], a zdolność do uwrażliwienia powinna wzrastać w następującej kolejności (16):



Zastosowanie grupy azydkowej w układach 5-azydometylo- lub 5-(1-azydowinylo)- 2'-deoksyurydyny (AmdU, AvdU) i 2'-deoksytydyny (AmdC, AvdC) również pokazała, że przyłączenie elektronu prowadzi tutaj do tworzenia wysoce niestabilnego anionorodnika azydkowego [59]. Jest on w stanie szybko uwolnić azot, przekształcając się w rodnik nitrenowy, a następnie w wyniku protonowania w szkodliwy rodnik RNH•. Badania z wykorzystaniem linii komórkowej raka piersi EMT6 pokazały, że jedna z badanych pochodnych (AmdU) wykazuje właściwości radiouczulające.

Opisane wyżej badania pokazują, że przy pomocy prostego modelu obliczeniowego DFT, możemy w łatwy i tani sposób przewidywać właściwości fizykochemiczne związków w celu dokonania ich wstępnej selekcji, co pozwala zaoszczędzić czas i koszty syntezy. Ten prosty model nie jest jednak w stanie w pełni oddać warunków eksperymentalnych. Najbardziej powszechnym problemem jest środowisko reakcji. Przykład SCNdU pokazuje, że zmiana środowiska z gazowego [54] na wodne [55] wpływa na przebieg degradacji indukowanej przyłączeniem elektronu.



Rysunek 12. Proponowane pochodne 2'-deoksyurydyny – od lewej: 5-tiocyanato-2'-deoksyurydyna (SCNdU), 5-triflano-2'-deoksyurydyna (OTfdU), 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyna (ISdU), 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyna (BrSdU) [41].

Ciekawym przykładem jest również 5-triflano-2'-deoksyurydyna (OTfdU) (**Rysunek 12**) [57]. Badania eksperymentalne nad tym związkiem wykazały, że istotnym zjawiskiem związanym z degradacją OTfdU w środowisku wodnym jest reakcja protonowania. Rozważano dwie alternatywne ścieżki degradacji, w wyniku której powstaje: (1) rodnik $\bullet\text{OdU}$ i anion Tf^- (bariera kinetyczna $\Delta G^*=1,5$ kcal/mol), bądź mniej prawdopodobna, gdzie otrzymujemy (2) rodnik $\text{dU}\bullet$ i anion OTf^- (bariera kinetyczna $\Delta G^*=8,6$ kcal/mol). Jednak napromienianie roztworu zawierającego OTfdU prowadzi do tworzenia się produktów charakterystycznych dla drugiej ścieżki z dużo większą wydajnością. Ostatecznie stwierdzono, że różnice między obliczeniami a badaniami eksperymentalnymi wynikają z faktu, że anionorodnik OTfdU może podlegać protonowaniu lub może dochodzić do deprotonowania formy obojętnej OTfdU.

Napromienianie wodnego roztworu 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU) (**Rysunek 12**) pozwoliło z kolei pokazać, że związek ten ulega procesowi DEA, ale tworzy też szereg produktów m.in. dimery, produkty utleniania [60]. W obliczeniach pozwalających zinterpretować przebieg procesów indukowanych radiolitycznie, uwzględniono rodniki *tert*-butylowe oraz H_2O_2 tworzące się w środowisku reakcyjnym. Zaobserwowano spadek wydajności tworzenia SU z uwagi na fakt, że rodniki $\bullet\text{SU}$ zużywają się w trakcie tworzenia dimeru ISU-SU. Eksperyment radiolizy przeprowadzony dla bromowanego analogu 4-tio-2'-deoksyurydyny, 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU), (**Rysunek 12**) pozwolił zaobserwować szereg produktów degradacji związku pod wpływem PJ [61]. Jednak znacznie wyższa bariera aktywacyjna procesu DEA, niż obliczona dla ISdU oraz wyniki przeprowadzonych testów komórkowych pokazały brak właściwości radiosensybilizujących BrSdU pomimo strukturalnego podobieństwa obu pochodnych.

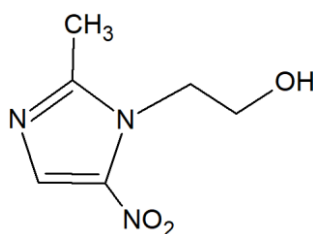
Powyżej przedstawione badania sugerują, że metody kwantowochemiczne pozwalają na lepsze zrozumienie i wyjaśnienie eksperymentu, jak również zmniejszenie kosztów i czasu badań. Przy poszukiwaniu nowych związków należy zwrócić uwagę na to, że dobry i skuteczny radiosensybilizator z grupy zasad nukleinowych powinien przede wszystkim:

1. być nietoksyczny;
2. być strukturalnie podobny do natywnych zasad nukleinowych, by móc wcielać się do DNA;
3. charakteryzować się wysokim powinowactwem do elektronu;
4. ulegać efektywnemu procesowi DEA, aby wytworzyć wewnątrz nici DNA reaktywny rodnik, który w szeregu dalszych reakcji może doprowadzić do pęknięcia nici biopolimeru.

1.5. Mimetyki tlenu na przykładzie nitroimidazoli

1.5.1. Metronidazol oraz inne przykłady mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli

Jedną z najbardziej znanych i najszerzej przebadanych grup związków o właściwościach radiosensybilizujących są nitroimidazole, które mogą pełnić funkcję mimetyków tlenu w radioterapii guzów charakteryzujących się hipoksją [35]. Przykładem związku z grupy nitroimidazoli jest metronidazol (MET, **Rysunek 13**), który po raz pierwszy został zastosowany w praktyce klinicznej w leczeniu rzęsistkowicy [62,63]. Obecnie jest wykorzystywany głównie w leczeniu zakażeń bakteriami beztlenowymi i pierwotniakami [63]. Warto wspomnieć, że znajduje się on na liście podstawowych leków rekomendowanych przez WHO dla systemów opieki zdrowotnej [64,65].

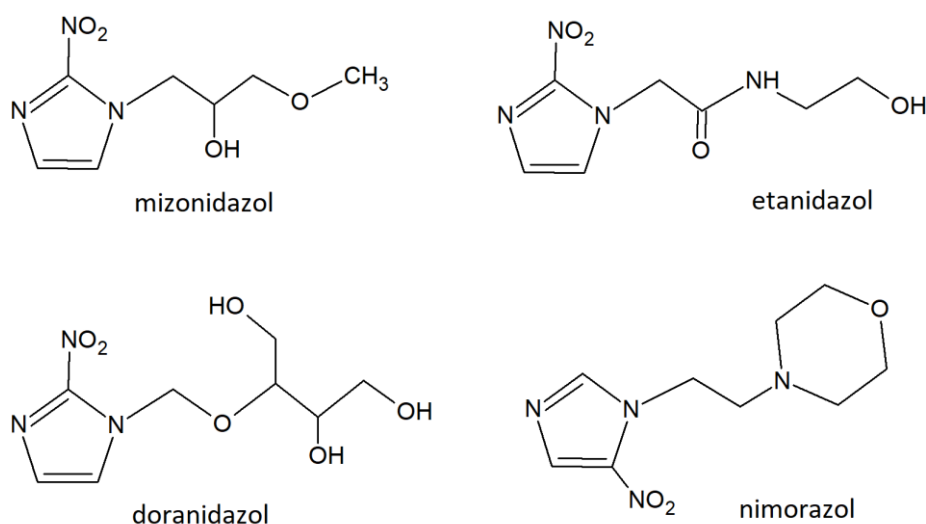


Rysunek 13. Metronidazol [41].

Działanie MET na organizmy beztlenowe przypisuje się oddziaływaniu jego cytotoksycznej, reaktywnej formy na DNA. MET może być aktywowany wyłącznie

w warunkach beztlenowych. Różnica potencjałów redoks między MET a ferredoksyną, która w organizmach beztlenowych odpowiada za transport elektronów, powoduje aktywację leku poprzez redukcję grupy nitrowej metronidazolu. Forma zredukowana (reaktywny rodnik) oddziałuje wówczas na DNA, prowadząc do zerwania nici [64,66]. Selektowna cytotoksyczność metronidazolu wobec komórek beztlenowych spowodowała wzrost zainteresowania wykorzystaniem związków tego typu wobec komórek nowotworowych, które często charakteryzują się hipoksją [67].

Już w latach osiemdziesiątych Adams [68] stwierdził, że kluczową cechą w kontekście efektu radiosensybilizującego oraz toksyczności jest powinowactwo elektronowe 2- i 5-nitroimidazoli. Wykazano, że mizonidazol (**Rysunek 14**), charakteryzujący się wyższym powinowactwem elektronowym niż metronidazol, jest bardziej efektywnym radiosensybilizatorem. Zastosowanie mizonidazolu w praktyce klinicznej okazało się jednak niemożliwe z uwagi na jego właściwości neurotoksyczne [69]. W celu zminimalizowania efektów ubocznych zaproponowano bardziej hydrofilowy etanidazol (**Rysunek 14**), który mimo mniejszej toksyczności nie dał jednak zadowalających efektów w badaniach klinicznych [70]. Innym przykładem testowanej pochodnej nitroimidazolu o mniejszej toksyczności jest doranidazol (**Rysunek 14**), który wykazywał aktywność radiosensybilizującą w środowisku hipoksji, dając obiecujące wyniki w I/II fazie badań klinicznych dla niedrobnokomórkowego raka płuca [71].



Rysunek 14. Przykłady znanych mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli [41].

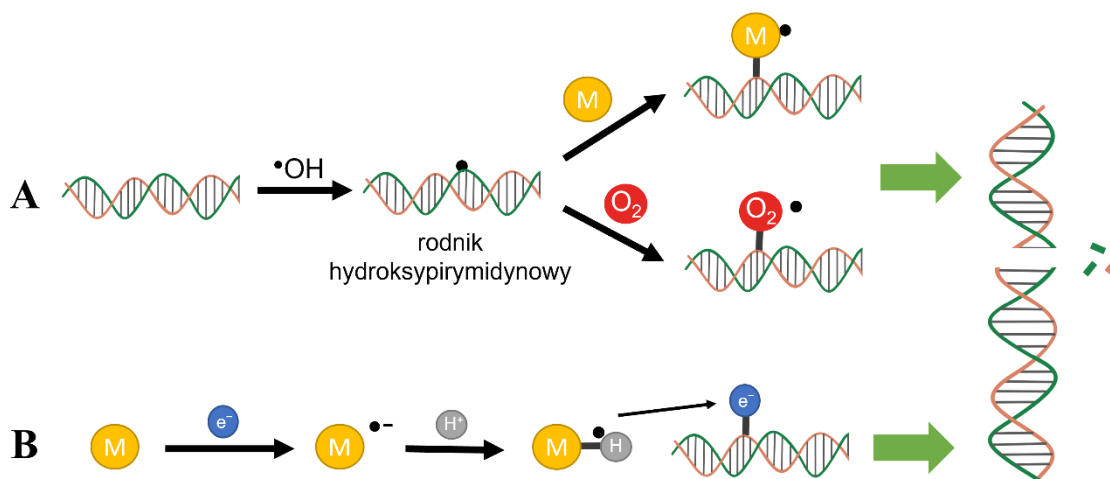
Jak dotąd najbardziej efektywnym radiosensybilizatorem zdaje się być, dobrze tolerowany przez organizm, nimorazol (**Rysunek 14**), który został zatwierdzony w Danii

i Norwegii jako środek wspomagający radioterapię raka głowy i szyi [72]. Z jego udziałem prowadzone są również badania kliniczne trzeciej fazy w Anglii [72-74], jak również badania z wykorzystaniem radioterapii protonowej w Danii [75].

Przesłanki literaturowe sugerują również przekształcenie klasycznych nitroimidazoli w alkilosulfonamidy nitroimidazoli, które wykazują dużo wyższe powinowactwo elektronowe oraz zwiększoną rozpuszczalność [76]. Ponadto modyfikacja alkilosulfonamidów do estrów fosforanowych pozwoliła otrzymać związki o wyższej aktywności *in vivo* w porównaniu do nitroimidazoli alkilosulfonamidowych [77].

1.5.2. Mechanizmy działania mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli

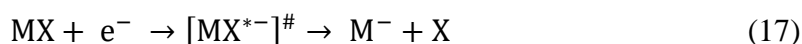
Mimo kilkudziesięciu lat badań nad nitroimidazolami mechanizm molekularny ich działania pozostaje wciąż niejasny. Jedną z hipotez wyjaśniających aktywność tych związków opiera się na rodnikowym mechanizmie zaproponowanym przez grupę O'Neill'a [78,37] (**Rysunek 15**). Mechanizm ten zakłada, że pochodna nitroimidazolu indukuje uszkodzenia DNA podobnie jak tlen. Dokładniej, tlen (lub mimetyk tlenu) miałby reagować z rodnikiem hydroksypirymidynowym (utworzonym w DNA na skutek reakcji zasady pirymidynowej z rodnikiem hydroksylowym – produktem działania promieniowania jonizującego na wodę), prowadząc przez serię kolejnych reakcji rodnikowych do pojedynczego pęknięcia nici DNA.



Rysunek 15. Mechanizm rodnikowy według O'Neill'a [78] (A) oraz przyłączenia elektronu według Edwards'a [79] (B), gdzie M to mimetyk tlenu.

Inna hipoteza jest związana z sugestią Edwards'a [79], że uszkodzenie oksydacyjne w DNA może być wywołane utlenieniem DNA przez sprotonowaną formę mimetyka tlenu (**Rysunek 15**). Ściślej, wtórne elektrony, które w warunkach hipoksji nie byłyby przekształcane w anionorodniki ponadtlenkowe, mogłyby reagować z charakteryzującą się wysokim powinowactwem elektronowym pochodną nitroimidazolu. Anionorodnik mimetyku tlenu powinien łatwo ulegać protonowaniu, z wytworzeniem obojętnego otwartopowłokowego rodnika nitroimidazolowego, który z kolei stabilizowałby się, np. przyjmując elektron od molekuly DNA.

Przyłączenie elektronu do mimetyków tlenu wydaje się kluczowe dla ich aktywności. W tym kontekście warto więc wspomnieć o badaniach nad wpływem niskoenergetycznych elektronów na cząsteczki mimetyków w fazie gazowej. Tego rodzaju elektrony mogą indukować rozpad molekuly poprzez proces dysocjacyjnego przyłączenia elektronu, który w tym przypadku jest dwuetapowy (17,18) i przedstawia się następująco:



gdzie MX to molekula, $[MX^{*-}]^{\#}$ to pośredni, metastabilny anion przejściowy, M^- to anion, a X to obojętna cząsteczka. Anion przejściowy może również przekształcić się w molekule obojętną (18) w wyniku oderwania nadmiarowego elektronu.

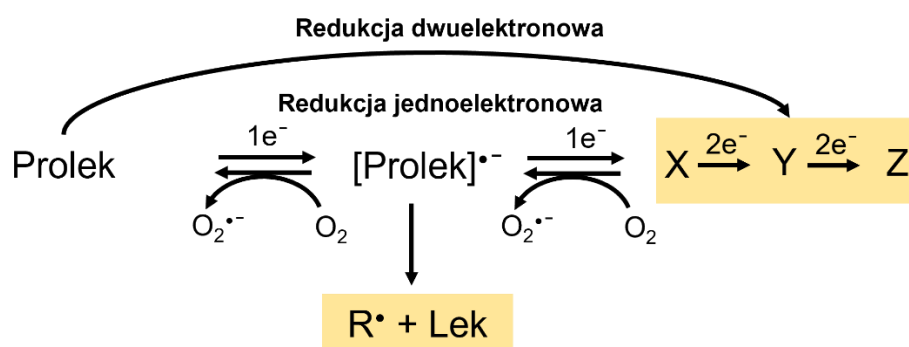
Zbadano przyłączenie LEE o energii z zakresu 0-8 eV do 4-nitroimidazolu i jego pochodnej: 1-metylo-4-nitroimidazolu [80]. Główna reakcja rozpadu dotyczyła pęknięcia wiązania C-NO₂ i tworzenia anionu i rodnika NO₂. W przypadku 4-nitroimidazolu zarejestrowano też powstawanie rodnika H•. Obserwowano też rodnik •OH, który powstaje na skutek pęknięcia dwóch wiązań – N-O i wiązania C-H lub N-H (w przypadku metylowanej pochodnej nie zaobserwowano tworzenia rodnika hydroksylowego).

Podobne badania przeprowadzono dla 2-nitroimidazolu (2NI) [81]. Proces DEA w 2NI jest wydajniejszy niż w pochodnych 4-nitroimidazolu. Zaobserwowano tworzenie się rodników •OH, •NO, wody oraz innych produktów, które mogą być kluczowymi czynnikami zwiększającymi wydajność uszkodzeń w DNA.

Stosując metodę skrzyżowanych wiązek elektronowo-molekularnych grupa Denifla zbadała wpływ niskoenergetycznych elektronów na nimorazol (pochodną

2-nitroimidazolu, wykorzystywaną w praktyce klinicznej) [82]. Wspomniany eksperyment pokazał, że po przyłączeniu elektronu do cząsteczki nimorazolu rejestrowana jest zarówno niezdysonowana forma metastabilnego anionu przejściowego (jon macierzysty; co wskazuje na tzw. asocjacyjny proces przyłączenia elektronu (AA)), jak i anion NO_2^- . Proces AA wydaje się być dominujący, szczególnie gdy cząsteczka nimorazolu jest uwodniona, gdyż kluczowy kanał fragmentacji (tworzenie anionu NO_2^-) jest wówczas wygaszany. Opisane wyżej wyniki pozostają w zgodzie z twierdzeniem, iż nimorazol staje się aktywny dopiero po zredukowaniu [79]. Tworzenie anionorodników wydaje się być kluczowe w procesie sensybilizacji komórek nowotworowych przez związki tego typu.

Literatura przedmiotu wskazuje również na wykorzystanie nitroimidazoli jako proleków aktywowanych w środowisku hipoksji (HAPs) [83]. W obecności tlenu prolek jest redukowany przez reduktazę ([84]) tworząc anionorodnik nitrowy (**Rysunek 16**). W warunkach hipoksji rodnik ten może ulec fragmentacji lub dalszej redukcji, prowadząc do powstania szeregu produktów (związki nitrozowe, hydroksyloaminy i aminy). Produkty te mogą również być wytwarzane bezpośrednio przez reduktazę katalizującą dwuelektronowy proces redukcji (**Rysunek 16**).



Rysunek 16. Mechanizm działania proleku w środowisku hipoksji. X, Y, Z to związki nitrozowe, hydroksyloaminy i aminy [41].

2. Cele pracy

Choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn umieralności na świecie. Poza leczeniem chirurgicznym i chemioterapią powszechnym sposobem walki z tym niebezpiecznym schorzeniem jest radioterapia. Szczególne wyzwanie dla radioterapii stanowi hipoksja komórek nowotworów litych, która jest odpowiedzialna za zwiększenie ich oporności na promieniowanie jonizujące. Jednym z podejść służących wspomaganie tej metody terapeutycznej jest wykorzystanie tzw. radiosensybilizatorów, tj. substancji, które uwrażliwiają komórki nowotworowe na działanie promieniowania jonizującego. Do lepiej poznanych radiosensybilizatorów należą mimetyki tlenu z grupy nitroimidazoli oraz analogi tyminy. Zrozumienie mechanizmu ich działania wydaje się konieczne do opracowania nowych, lepiej działających radiouczulaczy.

Głównym celem mojej rozprawy doktorskiej są więc badania nad mechanizmami odpowiedzialnymi za radiosensybilizujące właściwości wybranych pochodnych urydyny oraz mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli.

Niniejsza praca doktorska, wykorzystująca metody chemii kwantowej oraz chemometryczne, obejmuje następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Opisanie mechanizmu degradacji potencjalnych radiosensybilizatorów: amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu (SU) oraz *N,N*-dimetyloamidosiarczanu 5-hydroksyuracylu (DMSU), indukowanego niskoenerygetycznymi elektronami w skrzyżowanej wiązce elektronowo molekularnej, przy użyciu metod *ab initio* i teorii funkcjonału gęstości.
2. Określenie czynników molekularnych odpowiedzialnych za podatność na hydrolizę wybranych jodopochodnych urydyny i 2'-deoksyurydyny: 6-jodourydyny (6IUrd), 5-jodo- (5IdU) i 6-jodo-2'-deoksyurydyny (6IdU).
3. Zaproponowanie i weryfikacja, metodami kwantowochemicznymi i chemometrycznymi, mechanizmu odpowiedzialnego za radiosensybilizującą aktywność mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli.

Omawiając wyniki badań oraz zastosowaną metodologię przyjęto następujące oznaczenia poszczególnych projektów wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej:

- **Projekty A (SU) i B (DMSU)**, dotyczące badań nad mechanizmem degradacji pochodnych SU i DMSU indukowanej LEE w fazie gazowej zostały opisane w **Rozdziale 4.1**.
- **Projekt C**, dotyczący badań nad stabilnością 6-jodopochodnych urydyny i 2'-deoksyurydyny w środowisku wodnym został opisany w **Rozdziale 4.2**.
- **Projekt D** dotyczący weryfikacji literaturowych mechanizmów działania mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli został opisany w **Rozdziale 4.3**.

3. Metodologia

3.1. Obliczenia kwantowochemiczne

Obliczenia kwantowochemiczne, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy, zostały wykonane z wykorzystaniem oprogramowania Gaussian09 [85] zaimplementowanego na klastrze obliczeniowym „Libero”, należącym do Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego lub z zastosowaniem pakietu Gaussian16 [86], dostępnego na klastrze „BEM” Wrocławskiego Centrum Sieciowo-Superkomputerowego (WCSS, grant nr 209).

Większość obliczeń wykonano posługując się teorią funkcjonału gęstości (DFT). Zastosowane funkcjonały i bazy funkcyjne były dopasowywane do rozważanego problemu obliczeniowego, dlatego różnią się pomiędzy projektami, co przedstawiono w **Tabela 3**. W części badań zastosowano popularny funkcjonał hybrydowy B3LYP [87], który na potrzeby podstawowych obliczeń energetyki reakcji był wystarczający. Wykorzystano również funkcjonały M062x [88], CAM-B3LYP [89], metodę rachunku zaburzeń Møllera-Plesseta drugiego rzędu, MP2 [90] oraz ekstrapolacyjną metodę o dokładności chemicznej G2MP2 [91].

Tabela 3. Zastosowane w badaniach metody obliczeniowe oraz warunki.

	Metodologia	Co zostało policzone?
Projekt A (SU)	M062x/aug-cc-pVTZ (faza gazowa)	Termodynamika ścieżek reakcji
	M062x/6-31++G(d,p) B3LYP/6-31++G(d,p) G2MP2 (model PCM)	Przebieg procesu dysocjacyjnego przyłączenia elektronu w roztworze wodnym (bariery termodynamiczne i kinetyczne)
Projekt B (DMSU)	M062x/aug-cc-pVTZ (faza gazowa)	Termodynamika ścieżek reakcji
	MP2/aug-cc-pVTZ (faza gazowa)	Optymalizacja geometrii na potrzeby szacowania pozycji rezonansowych
Projekt C (6IUrd)	CAM-B3LYP/DGDZVP++ (model PCM)	Termodynamika i bariery kinetyczne ścieżek reakcji
Projekt D (mimetyki tlenu)	B3LYP/6-31++G(d,p) (model PCM)	Deskryptory molekularne, termodynamika ścieżek reakcji

Przy wykonywaniu poszczególnych obliczeń zastosowano następujące bazy funkcyjne: 6-31++G(d,p) [92], aug-cc-pVTZ [93] oraz DGDZVP [94]. Dodatkowego wyjaśnienia wymaga konieczność użycia ostatniej z wymienionych baz. Projekt C dotyczył obliczeń dla związków zawierających atom jodu. Zastosowano więc bazę

DGDZVP, którą opracowano dla atomów od wodoru do ksenonu (może więc być zastosowana dla atomu jodu). Baza DGDZVP została następnie rozszerzona o dodatkowe funkcje dyfuzyjne (++). W praktyce polegało to na dodaniu do bazy DGDZVP funkcji rozmytych o symetrii s, p i d w zależności od rodzaju atomu. Założono, że wartości wykładników ζ dodawanych funkcji stanowią 1/3 najmniejszego wykładnika funkcji danego typu obecnych w bazie DGDZVP [95].

Obliczenia w Projekcie B były prowadzone wyłącznie w gazie, natomiast w pozostałych projektach wykorzystano model ciągły rozpuszczalnika PCM [96], symulujący fazę wodną. W Projekcie C środowisko wodne zostało częściowo uwzględnione również *explicite*, poprzez uwzględnienie w modelowanych reakcjach cząsteczek wody. We wszystkich projektach obliczenia przeprowadzono dla warunków standardowych, czyli dla temperatury 298,15 K oraz ciśnienia 1 atm. W projektach A i B część obliczeń uwzględniała również warunki eksperymentalne – dla Projektu A były to temperatura 430,15 K oraz ciśnienie $1,58 \times 10^{-11}$ atm, natomiast dla Projektu B – temperatura 386,15 K i ciśnienie $5,33 \times 10^{-11}$ atm. Przy wyznaczeniu entalpii swobodnej uwzględniano wówczas poprawkę na ciśnienie, która została obliczona zgodnie z poniższym równaniem (19) [97]:

$$G_{\text{eksp,p,T}} = G_{1\text{atm,T}} + T S_{\text{trans;1atm,T}} - T S_{\text{trans;eksp,p,T}} \quad (19)$$

gdzie $G_{p,T}$ to entalpia swobodna dla określonego ciśnienia (p) i temperatury (T), $S_{\text{trans;p,T}}$ oznacza entropię translacyjną, którą można wyznaczyć zgodnie z poniższym równaniem (20) [97]:

$$S_{\text{trans}} = R \left(\ln(q_t e) + T \left(\frac{3}{2T} \right) \right) = R \left(\ln(q_t) + 1 + \frac{3}{2} \right) \quad (20)$$

Wartość translacyjnej funkcji rozdziału q_t można przedstawić za pomocą równania (21) [97]:

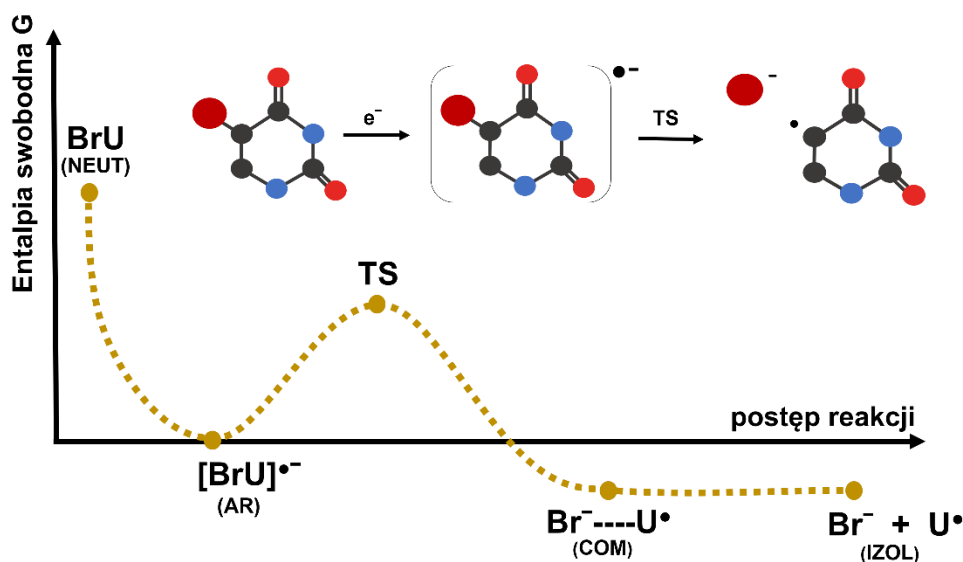
$$q_t = \left(\frac{2\pi m k_B T}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{k_B T}{p} \quad (21)$$

gdzie R to stała gazowa, e – liczba Eulera, m – masa cząsteczki, k_B – stała Boltzmanna, a h – stała Plancka.

Wszystkie obliczenia były wykonywane dla geometrii stacjonarnych (minima lub punkty siodłowe pierwszego rzędu), co zostało potwierdzone analizą częstości harmoniczných. W celu zweryfikowania, czy stan przejściowy łączy odpowiednie minima, zastosowano procedurę wewnętrznej współrzędnej reakcji (z ang. *Intrinsic Reaction Coordinate, IRC*) [98].

3.1.1. Profil DEA. Bódźce termodynamiczne i kinetyczne

Wspomniany w części literaturowej proces dysocjacyjnego przyłączenia elektronu można przedstawić w formie odpowiedniego profilu energetycznego (**Rysunek 17**). Obojętna cząsteczka BrU (NEUT) po przyłączeniu elektronu staje się anionorodnikiem (AR), w którym następnie, po pokonaniu określonej bariery kinetycznej (stan przejściowy, TS), dochodzi do zerwania wiązania (w tym przypadku – między bromem a zasadą azotową), prowadzącego do powstania kompleksu produktów (COM). Sytuację, w której poszczególne produkty kompleksu COM zostają rozseparowane do nieskończoności (w praktyce, są optymalizowane w oddzielnych zadaniach obliczeniowych) i funkcjonują jako suma izolowanych indywiduów – rodnika oraz anionu – oznaczono punktem IZOL na **Rysunek 17**.



Rysunek 17. Sposób wyznaczenia profilu energetycznego DEA na przykładzie BrU.

Bódźce termodynamiczne (ΔG) dla badanych reakcji obliczono jako różnicę między energią swobodną Gibbsa produktów (COM) i substratów (AR). Bariery kinetyczne (ΔG^*) obliczono jako różnicę entalpii swobodnej stanu przejściowego (TS) i substratu (AR).

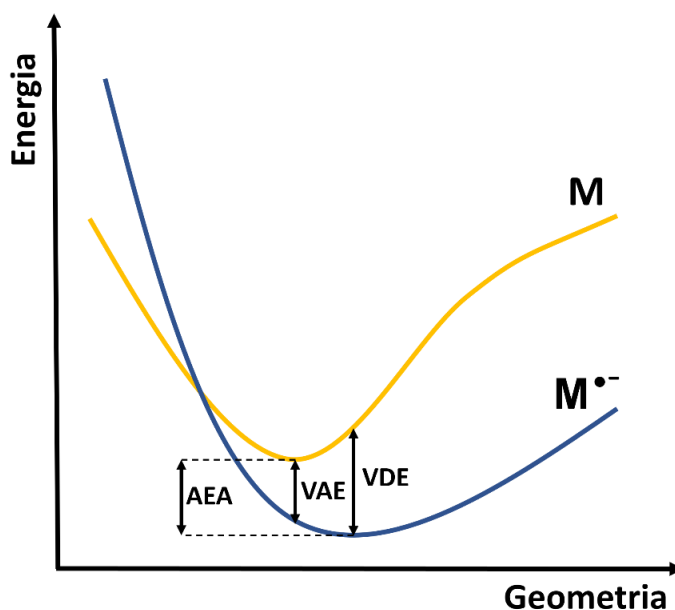
3.1.2. Powinowactwo elektronowe

Stabilność elektronowa anionów po przyłączeniu elektronu do cząsteczki obojętnej może być opisana przez trzy parametry – adiabatyczne powinowactwo elektronowe (AEA), wertykalną energię oderwania elektronu (VDE) oraz wertykalną energię przyłączenia elektronu (VAE) (**Rysunek 18**). Każdy z parametrów odpowiada różnicy między energią elektronową (E , dla VAE (23) i VDE (24)), bądź entalpią swobodną (G , dla AEA (22)) – cząsteczki obojętnej (M), a energią odpowiadającego jej anionu ($M^{\bullet-}$), wyrażoną zwykle w eV.

$$AEA = G_M - G_{M^{\bullet-}} \text{ (w ich optymalnych geometriach)} \quad (22)$$

$$VAE = E_M - E_{M^{\bullet-}} \text{ (w geometrii } M) \quad (23)$$

$$VDE = E_M \text{ (w geometrii } M^{\bullet-}) - E_{M^{\bullet-}} \quad (24)$$



Rysunek 18. Sposób wyznaczania wartości AEA, VAE, VDE. M symbolizuje molekułę obojętną, a $M^{\bullet-}$ anionorodnik.

3.1.3. Pozycje rezonansów

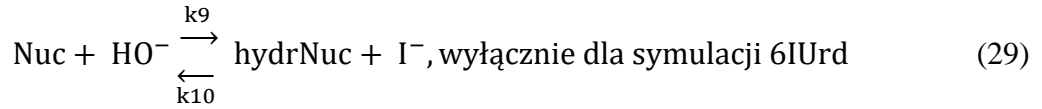
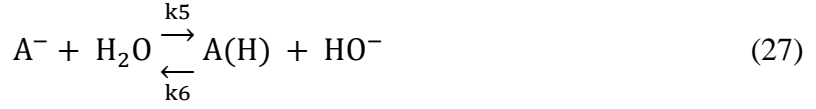
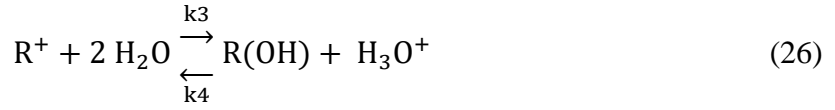
Aniony powstałe w eksperymentach wykorzystujących technikę skrzyżowanej wiązki elektronowo molekularnej są stanami metastabilnymi. Metastabilnych anionów rezonansowych nie można prawidłowo opisać metodą pola samouzgodnionego (z ang. *Self Consistent-Field*, SCF), która opiera się na zasadzie wariacyjnej. W bazie zupełnej obliczenie SCF zbiegłoby do rozwiązania będącego molekułą obojętną oraz

nieoddziałującym elektronem. Wobec tego, w celu oszacowania energii (pozycji) wybranego rezonansu cząsteczki DMSU w Projekcie B, zastosowano jeden z wariantów metody stabilizacyjnej [99].

Mianowicie, w celu oszacowania pozycji rezonansu anionowego o pożądanym cechach (np. opisywanego przez orbital antywiązący σ^* , odpowiadający wiązaniu pękającemu w trakcie fragmentacji cząsteczki) zwiększano ładunek jądra atomowego, należącego do rozrywanego w eksperymencie wiązania o wartość Δq . Nałożenie odpowiednio dużego cząstkowego ładunku dodatniego na wybrane jądro atomowe prowadzi do uzyskania stanu stabilnego elektronowo (związanego), który opisywany jest właściwie przy pomocy metody SCF. W tym wariantcie metody stabilizacyjnej dodatni ładunek na wybranym centrum atomowym stabilizuje stan niezwiązany, czyniąc go stanem stabilnym elektronowo. Wykonanie kilku tego typu obliczeń dla zwiększającego się ładunku Δq pozwala na ekstrapolację energii wiązania elektronu do wartości $\Delta q = 0$. Dla każdej wartości ładunku cząstkowego energię wiązania elektronu (D) obliczono, jako różnicę między energią cząsteczki obojętnej oraz anionorodnika w geometrii obojętnej cząsteczki ($E_{\text{neu}} - E_{\text{anrad}} = D$). W obu strukturach (obojętniej i anionowej) ładunek wybranego jądra atomowego zwiększano o tę samą wartość Δq , po czym ekstrapolowano wartość energii D do $\Delta q = 0$. Do ekstrapolacji uwzględniono wyłącznie te struktury, w których anion był stabilny elektronowo i charakteryzował się pożądanym kształtem orbitala SOMO (z ang. *single occupied molecular orbital*, pojedynczo obsadzony orbital molekularny), zbieżnym z poszukiwanym orbitalem σ^* . Obliczenia wartości energii D zostały przeprowadzone metodą MP2/cc-pVDZ, z wykorzystaniem geometrii cząsteczki DMSU zoptymalizowanej metodą MP2 w bazie aug-cc-pVTZ.

3.1.4. Profile kinetyczne

W Projekcie C modelowano również kinetykę degradacji badanych jodopochodnych deoksyurydyny i urydyny. Poniższe reakcje (25-29) przedstawiają równowagi ustalające się w wodnym roztworze zawierającym rozważane nukleozydy. (**Rysunek 37**, reakcja I-III). Przeprowadzając symulacje kinetyki hydrolizy uwzględniono również reakcję autodysocjacji wody (**Rysunek 37**, reakcja IV), a w przypadku 6IUrd, dodatkowo reakcję tworzenia 6-hydroksyurydyny (**Rysunek 37**, reakcja V):



gdzie Nuc – nukleozyd (substrat), A(H) – zasada, R(OH) – reszta cukrowa, A⁻ – forma anionowa zasady, R⁺ – forma kationowa reszty cukrowej, hydrNuc – 6-hydroksyurydyna (6OHUrd). Stałe szybkości reakcji k₁-k₁₀ zostały przedstawione w dyskusji wyników, w **Tabela 9**.

Na podstawie zamieszczonych reakcji (25-29) utworzono układ równań różniczkowych (30-37) dla trzech rozważanych związków:

$$\frac{d[\text{Nuc}]}{dt} = k_2[\text{R}^+][\text{A}^-] - k_1[\text{Nuc}] \quad (30)$$

$$\frac{d[\text{H}_3\text{O}^+]}{dt} = k_3[\text{R}^+][\text{H}_2\text{O}]^2 - k_4[\text{R(OH)}][\text{H}_3\text{O}^+] - k_7[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] + k_8[\text{H}_2\text{O}]^2 \quad (31)$$

$$\frac{d[\text{OH}^-]}{dt} = k_5[\text{A}^-][\text{H}_2\text{O}] - k_6[\text{A(H)}][\text{OH}^-] - k_7[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] + k_8[\text{H}_2\text{O}]^2 \quad (32)$$

$$\frac{d[\text{R}^+]}{dt} = -k_2[\text{R}^+][\text{A}^-] + k_1[\text{Nuc}] - k_3[\text{R}^+][\text{H}_2\text{O}]^2 + k_4[\text{R(OH)}][\text{H}_3\text{O}^+] \quad (33)$$

$$\frac{d[\text{R(OH)}]}{dt} = k_3[\text{R}^+][\text{H}_2\text{O}]^2 - k_4[\text{R(OH)}][\text{H}_3\text{O}^+] \quad (34)$$

$$\frac{d[\text{A}^-]}{dt} = -k_2[\text{R}^+][\text{A}^-] + k_1[\text{Nuc}] - k_5[\text{A}^-][\text{H}_2\text{O}] + k_6[\text{A(H)}][\text{OH}^-] \quad (35)$$

$$\frac{d[\text{A(H)}]}{dt} = k_5[\text{A}^-][\text{H}_2\text{O}] - k_6[\text{A(H)}][\text{OH}^-] \quad (36)$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}]}{dt} = -k_5[\text{A}^-][\text{H}_2\text{O}] + k_6[\text{A(H)}][\text{OH}^-] + k_4[\text{R(OH)}][\text{H}_3\text{O}^+] - k_3[\text{R}^+][\text{H}_2\text{O}]^2 + k_7[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] - k_8[\text{H}_2\text{O}]^2 \quad (37)$$

oraz dwa dodatkowe równania dla 6-jodourydyny (38,39):

$$\frac{d[\text{hydrNuc}]}{dt} = -k_{10}[\text{hydrNuc}][I^-] + k_9[\text{Nuc}][OH^-] \quad (38)$$

$$\frac{d[I^-]}{dt} = -k_{10}[\text{hydrNuc}][I^-] + k_9[\text{Nuc}][OH^-] \quad (39)$$

W celu wyznaczenia zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu, powyższy układ zwyczajnych równań różniczkowych (30-39) całkowano za pomocą programu Octave [100]. Przyjęto, że początkowe stężenie nukleozydu wynosiło 10^{-3} , a stężenia pozostałych składników układu ustalono na $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ze względu na małe stężenia reagentów przyjęto, że w trakcie badanego procesu stężenie wody jest stałe i równe $55,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [101]. Czas prowadzonej symulacji to odpowiednio 10^{10} sekund (około 317 lat) dla 5IdU, 35 sekund dla 6IdU oraz 10^6 sekund (około 11,5 dni) dla 6IUrd.

Przeprowadzenie symulacji kinetycznych wymagało wprowadzenia do modelu stałych szybkości dla reakcji (25)-(29) wprost lub odwrotnej oraz niezbędnych do ich wyznaczenia stałych równowagi.

W przypadku heterolitycznej dysocjacji wiązania N-glikozydowego (reakcja (25)) stałą dysocjacji K_{dys} wyznaczono posługując się wzorem (40):

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (40)$$

gdzie ΔG – energia swobodna reakcji (patrz **Tabela 8**), R – stała gazowa, T – temperatura. Stałą szybkości k_1 dla reakcji wprost została wyliczona w oparciu o teorię stanu przejściowego (41):

$$k_1 = \frac{kT}{h} * e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} \quad (41)$$

gdzie h – stała Plancka, k – stała Boltzmann, R – stała gazowa, T – temperatura, ΔG^* – energia aktywacji równa barierze termodynamicznej reakcji $\text{Nuc} \rightarrow \text{A}^- + \text{R}^+$ (patrz **Tabela 8**; przyjęto, że ΔG^* reakcji odwrotnej wynosi 0, gdyż jony A^- i R^+ reagują, dając cząsteczkę Nuc bez bariery kinetycznej). Stała szybkości reakcji odwrotnej, k_2 , została wyznaczona z równania (42):

$$K_n = \frac{k_n}{k_{-n}} \quad (42)$$

gdzie k_n i k_{-n} są stałymi szybkości reakcji wprost i odwrotnej (w tym przypadku k_1 i k_2), podczas gdy K_n jest stałą równowagi (w tym przypadku K_{dys}).

Dla reakcji deprotonowania hydratu karbokationu reszty cukrowej oraz reakcji protonowania anionu pochodnej uracylu za stałe szybkości, odpowiednio k_3 i k_5 (patrz równania (26) i (27)), przyjęto doświadczalne stałe szybkości przeniesienia protonu między jonem H_3O^+ lub OH^- a cząsteczką H_2O , niezależnie od rodzaju kationowego kwasu i anionowej zasady [102]. Zdecydowano się na przyjęcie eksperymentalnych stałych szybkości reakcji modelowych zamiast obliczać je bezpośrednio, ze względu na małą wiarygodność stałych szybkości wyznaczonych dla modelu nieuwzględniającego cząsteczek wody *explicite*, lecz w ramach podejścia PCM. W celu wyznaczenia stałych szybkości k_4 i k_6 reakcji odwrotnych, stałe równowagi reakcji (26) i (27) wyznaczono posługując się wartościami pK_a związków referencyjnych, odpowiednio dla $(MeO)_2CHOH$ [103] ($pK_a = -5.7$) oraz dla uracylu [104] ($pK_a = 9.45$) zgodnie z równaniem (43) [105]:

$$pK_a = pK_{ref} - \frac{\Delta\Delta G}{2.303RT} \quad (43)$$

gdzie pK_{ref} – ujemny logarytm dziesiętny stałej K_a dla związku referencyjnego, R – stała gazowa, T – temperatura, a $\Delta\Delta G$ stanowi różnicę energii swobodnych zasady i sprzężonego z nią kwasu dla par związków badany/związek referencyjny, na przykład:



gdzie U to uracyl (związek referencyjny), $6IU$ - 6-jodouracyl (związek badany), zaś $6IU^-$ i U^- to formy anionowe U i $6IU$. Wartości $\Delta\Delta G$ poszczególnych reakcji wraz z obliczonymi wartościami pK_a/pK_b zamieszczono w **Tabela 4**.

Tabela 4. Wartości pK oraz stałych równowagowych (K) reakcji dla par związków badany/związek referencyjny wraz z wartościami $\Delta\Delta G$ [kcal/mol].

Reakcja	$\Delta\Delta G$	pK	K
$5IU^- + U \rightarrow 5IU + U^-$	4,1	$pK_b = 7,53$	$K_b = 3,0 \cdot 10^{-8}$
$6IU^- + U \rightarrow 6IU + U^-$	7,3	$pK_b = 9,91$	$K_b = 1,2 \cdot 10^{-10}$
deoksyryboza ⁺ + (MeO) ₂ CHOH → deoksyryboza + (MeO) ₂ CHOH ⁺	9,1	$pK_a = -12,36$	$K_a = 2,3 \cdot 10^{12}$
ryboza ⁺ + (MeO) ₂ CHOH → ryboza + (MeO) ₂ CHOH ⁺	15,5	$pK_a = -17,09$	$K_a = 1,2 \cdot 10^{17}$

Stałe szybkości dla reakcji odwrotnych k_4 oraz k_6 zostały obliczone ze wzoru (42), w którym stałe równowagi uwzględniają stężenie wody (55,5 mol/dm³).

Stałe szybkości k_7 oraz k_8 dla autodysocjacji wody (reakcja (27)) zostały przyjęte zgodnie ze znanymi wartościami literaturowymi [101, 102]. Przyjęto:

$$k_7 = 1,4 \cdot 10^{11} \quad (\text{dla reakcji } OH^- + H_3O^+ \rightarrow 2H_2O) \quad (45)$$

$$[OH^-][H_3O^+] = 10^{-14} \text{ mol/dm}^3 \quad (46)$$

$$[H_2O] = 55,5 \text{ mol/dm}^3 \quad (47)$$

Na tej podstawie można obliczyć stałą dysocjacji wody (48):

$$K_{H_2O} = \frac{[OH^-][H_3O^+]}{[H_2O]^2} = \frac{10^{-14}}{55,5^2} \approx 3,3 \cdot 10^{-18} \quad (48)$$

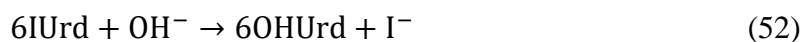
Stałą k_8 (51) można wyliczyć z zależności (49, 50):

$$k_7[H_3O^+][OH^-] = k_8[H_2O]^2 \quad (49)$$

$$\frac{[H_3O^+][OH^-]}{[H_2O]^2} = \frac{k_8}{k_7} = K_{\text{dys(wody)}} \quad (50)$$

$$k_8 = k_7 \cdot K_{\text{dys(wody)}} = 1,4 \cdot 10^{11} \cdot 3,25 \cdot 10^{-18} \approx 4,6 \cdot 10^{-7} \quad (51)$$

Stała szybkości k_9 , w przypadku związku 6IUrd, została wyliczona za pomocą wzoru (41), po przyjęciu wartości bariery kinetycznej $\Delta G^* = 11,8$ kcal/mol (wyznaczoną metodą CAM-B3LYP/DGDZVP++) dla reakcji substytucji nukleofilowej, przebiegającej według mechanizmu S₂N (52):



Stałą k_{10} dla reakcji odwrotnej obliczono z zależności (42), natomiast stałą równowagi dla tej reakcji (52) wyznaczono ze wzoru (40), przyjmując $\Delta G = -72,3$ kcal/mol, stanowiącą różnicę energii swobodnej produktów i substratów wyznaczoną metodą CAM-B3LYP/DGDZVP++ dla powyższej reakcji.

3.1.5. Stężenia równowagowe

Stężenia równowagowe poszczególnych indywiduów w roztworach wodnych 5IdU, 6IdU i 6IUrd (Projekt C) obliczono stosując następujące rozumowanie, zgodne z proponowanym mechanizmem hydrolizy (25-29):

$$C_{\text{acid}} = [\text{Cukier}^+] + [\text{Cukier(OH)}] \quad (53)$$

$$C_{\text{base}} = [\text{Zasada}^-] + [\text{Zasada(H)}] \quad (54)$$

gdzie Cukier(OH) i Zasada(H) to reszta cukrowa oraz zasada azotowa, natomiast Cukier⁺ i Zasada⁻ to odpowiednio ich forma kationowa i anionowa. Przyjmujemy, że stężenia (53,54):

$$C_{\text{acid}} = C_{\text{base}} = C \quad (55)$$

$$[\text{OH}^-] + [\text{Zasada}^-] = [\text{Cukier}^+] + [\text{H}_3\text{O}^+] \quad (56)$$

Stałe równowagi (57, 58), w tym stała dysocjacji (59) oraz iloczyn jonowy wody (60) można przedstawić następująco:

$$K_a = \frac{[\text{Cukier(OH)}][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{Cukier}^+]} \quad (57)$$

$$K_b = \frac{[\text{Zasada(H)}][\text{OH}^-]}{[\text{Zasada}^-]} \quad (58)$$

$$K_{\text{dys}} = \frac{[\text{Cukier}^+][\text{Zasada}^-]}{[\text{Nukleozyd}]} \quad (59)$$

$$K_w = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] \quad (60)$$

Dalsze wyprowadzenia prowadzą do kolejnych przekształceń (61):

$$[\text{Cukier}^+] = \frac{C_{\text{acid}}[\text{H}_3\text{O}^+]}{K_a + [\text{H}_3\text{O}^+]}, \quad [\text{Zasada}^-] = \frac{C_{\text{base}}[\text{OH}^-]}{K_b + [\text{OH}^-]} \quad (61)$$

Stężenie będzie stanowić różnicę między stężeniem początkowym a stężeniem molowym danego nukleozydu (62):

$$C = C_o - [\text{Nukleozyd}] \quad (62)$$

$$C = C_o - \frac{C_{\text{acid}}[H_3O^+]C_{\text{base}}[OH^-]}{K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])} \quad (63)$$

$$C = C_o - \frac{C_{\text{acid}}C_{\text{base}}K_w}{K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])} \quad (64)$$

Zgodnie z założeniem (55) otrzymujemy:

$$C = C_o - \frac{C^2 K_w}{K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])} \quad (65)$$

Po przekształceniu otrzymujemy postać równania kwadratowego (66):

$$\frac{C^2 K_w}{K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])} + C - C_o = 0 \quad (66)$$

Równanie (66) można rozwiązać obliczając deltę (67) oraz jedno z jej rozwiązań (dodatnie) (68):

$$\Delta = 1 + 4C_o \frac{K_w}{K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])} \quad (67)$$

$$x_1 = \frac{-1 + \sqrt{\Delta}}{2 * \frac{K_w}{K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])}} \quad (68)$$

Powyższe rozwiązanie (68) można przekształcić do prostszej postaci (69):

$$x_1 = \frac{(-1 + \sqrt{\Delta})K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])}{2K_w} \quad (69)$$

Przy założeniu, że rozwiązanie (68) jest równe zależności (55) oraz na podstawie równań (56) i (61), prowadzi to do równania (70):

$$[H_3O^+] + \frac{x_1[H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]} = [OH^-] + \frac{x_1[OH^-]}{K_b + [OH^-]} \quad (70)$$

a po podstawieniu rozwiązania x_1 (68):

$$[H_3O^+] + \frac{[H_3O^+]{(-1 + \sqrt{\Delta})K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])}}{2K_w(K_a + [H_3O^+])} = [OH^-] + \frac{[OH^-]{(-1 + \sqrt{\Delta})K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])(K_b + [OH^-])}}{2K_w(K_b + [OH^-])} \quad (71)$$

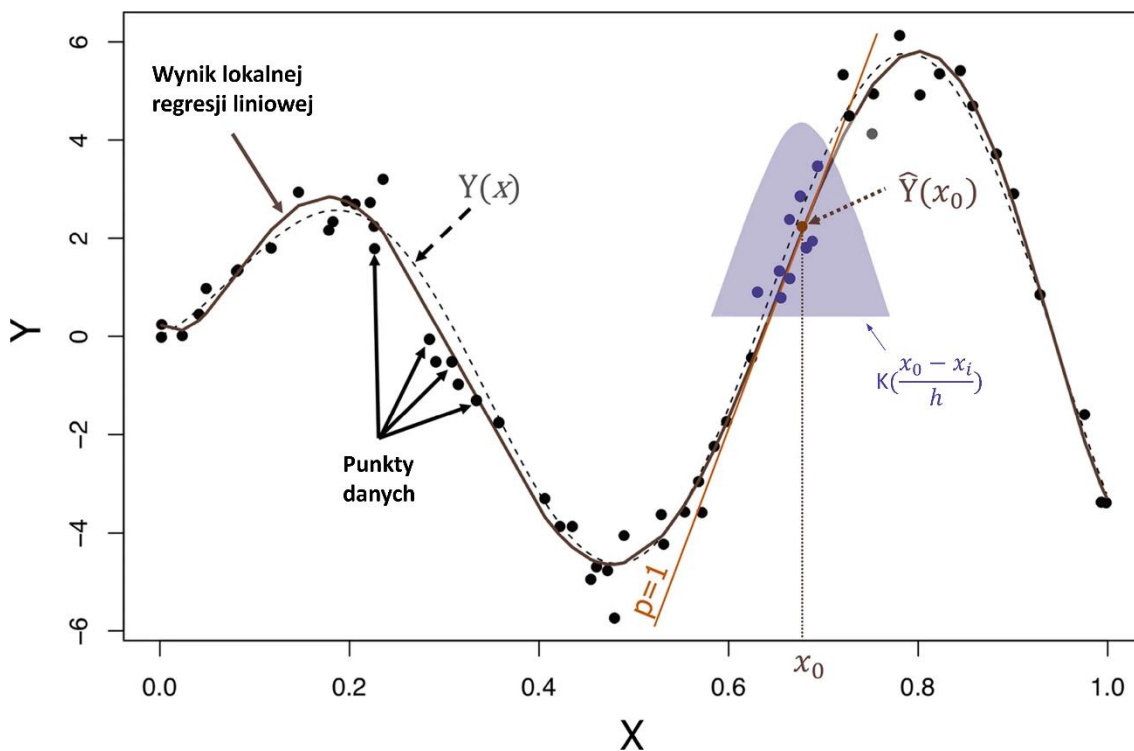
Podstawiając $[OH^-] = \frac{K_w}{[H_3O^+]}$ do powyższego równania (71), dalsze przekształcenia prowadzą do finalnego równania (72):

$$[H_3O^+] + \frac{[H_3O^+]^2(-1 + \sqrt{\Delta})K_{\text{dys}}\left(K_b + \frac{K_w}{[H_3O^+]}\right) - 2K_w^2 - (-1 + \sqrt{\Delta})K_{\text{dys}}(K_a + [H_3O^+])K_w}{2K_w[H_3O^+]} = 0 \quad (72)$$

Powyższe równanie rozwiązano, posługując się programem Octave [100], a równowagowa wartość stężenia jonów H_3O^+ pozwoliła wyznaczyć stężenia równowagowe pozostałych reagentów (Tabela 10).

3.2. Analiza chemometryczna

W Projekcie D, oprócz obliczeń kwantowochemicznych, przeprowadzono również analizę chemometryczną dla zbioru pochodnych nitroimidazoli – potencjalnych radiosensybilizatorów z klasy mimetyków tlenu. W tym celu opracowano dwa modele uczenia maszynowego, wyrażające ilościową zależność między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną związku (z ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) [106]. Każdy z nich charakteryzował inny typ mechanizmu działania mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli. Proces kalibracji modeli QSAR przeprowadzono przy użyciu algorytmu nieparametrycznej regresji lokalnie ważonej [107]. Polega ona na punktowej aproksymacji dla każdego elementu zbioru, z wykorzystaniem tzw. przesuwne okna wygładzania, w którym znajduje się zbiór elementów brany do prognoz – punkt docelowy (x_0) wraz z jego lokalnym sąsiedztwem (x_i) (Rysunek 19).



Rysunek 19. Graficzne przedstawienie algorytmu nieparametrycznej regresji ważonej [107].

Okno wygładzania (kolor fioletowy) ma określony kształt definiowany przez daną funkcję jądra (z ang. *kernel*, K , w tym przypadku zastosowano jądro gaussowskie) i szerokość definiowaną przez parametr wygładzania (z ang. *bandwidth*, h), kontrolujący zasięg lokalnego sąsiedztwa. Sąsiedzi znajdujący się bliżej punktu docelowego mają większy udział (wagę) w prognozach. Waga określa, w jakim stopniu sąsiad wpływa na aktywność danego punktu dopasowania. Do zastosowania algorytmu wykorzystano skrypt w języku programowania R [108].

Wejściowy zbiór 37 struktur nitroimidazoli podzielono na zbiór uczący oraz walidacyjny. Pierwszy z nich wykorzystano do kalibracji modeli. Z kolei zdolności przewidywania opracowanych modeli oceniono na podstawie zbioru walidacyjnego. W celu zastosowania odpowiedniej reprezentacji obu zbiorów podział przeprowadzono w oparciu o tzw. algorytm [1:X], co oznacza, że z posortowanego rosnąco wektora odpowiedzi (tutaj aktywności radiosensybilizującej związków), co X związek (tutaj co 3) został przydzielony do zbioru walidacyjnego [109]. W rezultacie w zbiorze uczącym (inaczej nazywany treningowym) znalazło się 25 związków (co stanowi 67,6% wszystkich związków), natomiast w walidacyjnym 12 (co stanowi 32,4% wszystkich związków). Oba modele QSAR bazowały na dokładnie tym samym zbiorze uczącym oraz walidacyjnym, jednak uwzględniały różne deskryptory molekularne charakterystyczne dla danego mechanizmu.

3.2.1. Deskryptory molekularne

Obliczone deskryptory molekularne stanowiły bazę dla modeli QSAR. Wszystkie zostały uzyskane przy pomocy obliczeń kwantowochemicznych metodą B3LYP/6-31++G(d,p) i dla modelu ciągłego rozpuszczalnika PCM. Wykorzystano cztery deskryptory związane z analizowanymi dwoma mechanizmami działania mimetyków tlenu, które zostały szczegółowo omówione w **Rozdziale 4.3.3**. Deskryptory przed kalibracją modeli zostały poddane standaryzacji/autoskalowaniu, którego celem jest zapewnienie współmierności zmiennych, niezależnie od skali pomiarowej, tj. jednostek w jakich oryginalnie zostały wyznaczone.

3.2.2. Walidacja modeli QSAR

Stopień jakości dopasowania, elastyczności, czy zdolności predykcyjnych modeli QSAR może być opisywany przez szereg parametrów [110]. W Projekcie D określono

standardowe statystyki modeli – współczynnik determinacji R^2 (73) oraz średni kwadratowy błąd kalibracji $RMSE_C$ (74) w ocenie jakości dopasowania danego modelu:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{obs} - y_i^{pred})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i^{obs} - \bar{y}^{obs})^2} \quad (73)$$

$$RMSE_C = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{obs} - y_i^{pred})^2}{n}} \quad (74)$$

gdzie y_i^{obs} – eksperymentalna (obserwowana) wartość dla i-tego związku, y_i^{pred} – przewidywana wartość dla i-tego związku, \bar{y}^{obs} – średnia eksperymentalna wartość dla związków zbioru treningowego, n – liczba związków w zbiorze treningowym.

W ocenie elastyczności modelu (walidacja wewnętrzna) wykorzystano współczynnik walidacji krzyżowej Q^2_{CV} (75) oraz średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej $RMSE_{CV}$ (76):

$$Q^2_{CV} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{obs} - y_i^{predcv})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i^{obs} - \bar{y}^{obs})^2} \quad (75)$$

$$RMSE_{CV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{obs} - y_i^{predcv})^2}{n}} \quad (76)$$

gdzie y_i^{predcv} – przewidywana wartość dla i-tego związku tymczasowo wyłączonego ze zbioru treningowego w metodzie walidacji krzyżowej.

Natomiast współczynnik walidacji Q^2 (77) oraz średni kwadratowy błąd walidacji $RMSE_P$ (78) wyznaczono w celu oceny zdolności prognostycznych modelu (walidacja zewnętrzna):

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{j=1}^k (y_j^{obs} - y_j^{pred})^2}{\sum_{j=1}^k (y_j^{obs} - \bar{y}^{obs})^2} \quad (77)$$

$$RMSE_P = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k (y_j^{obs} - y_j^{pred})^2}{k}} \quad (78)$$

gdzie y_j^{obs} – eksperymentalna (obserwowana) wartość dla j-tego związku, y_j^{pred} – przewidywana wartość dla j-tego związku, \bar{y}^{obs} – średnia eksperymentalna wartość dla związków zbioru walidacyjnego, k – liczba związków w zbiorze walidacyjnym.

Dodatkowo określono dla otrzymanych modeli miarę średniego błędu bezwzględnego MAE (79), mówiącego, jak daleko wartości przewidywane różnią się od

wartości rzeczywistych oraz współczynnik korelacji zgodności CCC (80), opisujący stopień odchylenia linii regresji od linii przechodzącej przez początek układu współrzędnych:

$$\text{MAE} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^{\text{obs}} - y_i^{\text{pred}}}{n} \quad (79)$$

$$\text{CCC} = \frac{2 \sum_{i=1}^n (y_i^{\text{obs}} - \bar{y}^{\text{obs}})(y_i^{\text{pred}} - \bar{y}^{\text{pred}})}{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{obs}} - \bar{y}^{\text{obs}})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i^{\text{pred}} - \bar{y}^{\text{pred}})^2 + n(\bar{y}^{\text{obs}} - \bar{y}^{\text{pred}})^2} \quad (80)$$

Niezbędnym elementem walidacji modelu jest weryfikacja dziedziny modelu, która wyznacza granice w przestrzeni cech związków (deskryptorów), w których przewidywania są wiarygodne. W celu jej określenia zastosowano metodę współczynników dźwigni (81) [111]:

$$h_i = h_i^T (X^T X)^{-1} x_i \quad (81)$$

gdzie x_i to wektor deskryptorów dla i tego związku, X to macierz deskryptorów dla zbioru uczącego. Z kolei krytyczną wartość współczynnika dźwigni h^* wyznacza się ze wzoru (82):

$$h^* = 3 \times p' / n \quad (82)$$

gdzie p to liczba deskryptorów w równaniu modelu, n to liczba związków w zbiorze treningowym.

3.2.3. Baza mimetyków tlenu

Baza danych OxyMim powstała jako odpowiedź na potrzebę zebrania danych eksperymentalnych aktywności radiosensybilizującej mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli, które w późniejszym etapie wykorzystano w modelowaniu QSAR. Została ona wykonana przy pomocy języków HTML5, CSS3 oraz skryptów JavaScript i PHP w wersji 7.3. Struktury chemiczne 2D zostały wygenerowane przy wykorzystaniu pakietu RDKit w wersji 200.03.6 [112]. Baza jest swobodnie dostępna w domenie Uniwersytetu Gdańskiego: <http://oxymim.ug.edu.pl>, a dane są udostępnione w formatach .xlsx oraz .csv.

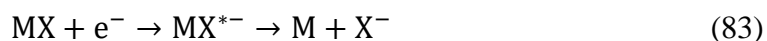
4. Dyskusja wyników

4.1. Degradacja amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu oraz *N,N*-dimetyloamidosiarczanu 5-hydroksyuracylu indukowana przyłączeniem elektronu w fazie gazowej

4.1.1. Wprowadzenie

Warunki hipoksji, które panują w środowisku komórek nowotworowych [28] i wywołują ich oporność na promieniowanie jonizujące [32], skłaniają badaczy do poszukiwania nowych związków o potencjalnych właściwościach radiosensybilizujących. Jedną z możliwości jest wykorzystanie radiosensybilizatorów z grupy analogów tyminy. Racjonalne poszukiwanie takich związków powinno być sprzężone z dogłębnym zrozumieniem mechanizmu ich działania.

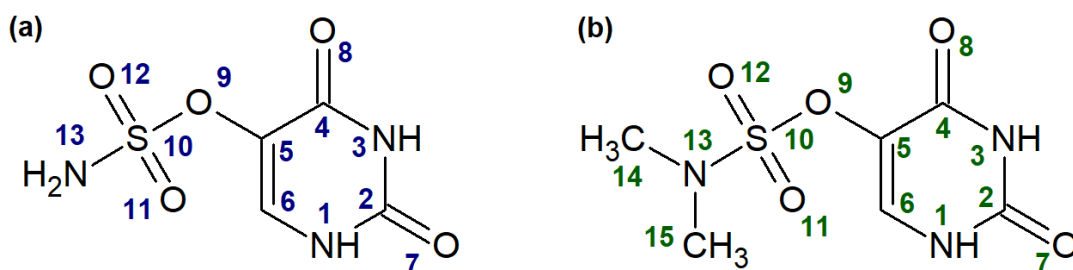
Stosowane w radioterapii promieniowanie jonizujące prowadzi do radiolizy wody. W jej wyniku powstaje szereg produktów, spośród których należy wyróżnić generowany w dużych ilościach rodnik hydroksylowy, uważany za najważniejszy czynnik uszkadzający DNA [15]. Przechodząc przez ośrodek biologiczny, promieniowanie jonizujące wytwarza również znaczne ilości niskoenergetycznych elektronów (LEE) o energiach kinetycznych poniżej 30 eV. Przy czym największa liczba spośród tych elektronów posiada energie z przedziału 9-10 eV [113]. W warunkach wysokiej próżni LEE mogą indukować uszkodzenia DNA, takie jak pęknięcia jedno- i dwuniciowe, miejsca apurynowe i apirimidynowe, modyfikacje zasad oraz reszty cukrowej [114]. Możliwą drogą wywoływania uszkodzeń w DNA stanowi proces dysocjacyjnego przyłączenia elektronów (DEA). Przyłączenie elektronu o niskiej energii do cząsteczki obojętnej (MX) powoduje powstanie przejściowego anionu TNI (MX^{*-}) (83):



który stabilizuje się w kolejnym etapie, dając anion (X^-) oraz cząsteczkę obojętną (M). Produkty DEA mogą tworzyć się na skutek pęknięcia pojedynczego wiązania, bądź bardziej złożonego procesu angażującego wielokrotne pęknięcia wiązań. Wykazano, że obecność podstawników o wysokim powinowactwie elektronowym w nukleozydach zwiększa ich podatność na DEA, a szczególnie wrażliwe na promieniowanie są halogenowe pochodne uracylu (patrz **Rozdział 1.4**).

W niniejszym rozdziale przedstawione zostały wyniki badań dwóch pochodnych uracylu – amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu (SU, **Rysunek 20a**) oraz *N,N*-dimetyloamidosiarczanu 5-hydroksyuracylu (DMSU, **Rysunek 20b**) i ich mechanizmy degradacji pod wpływem niskoenergetycznych elektronów (LEE) w fazie gazowej. W przypadku SU dodatkowo omówiono proces DEA w środowisku wodnym oraz wyniki radiolizy stacjonarnej wykonanej w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego. Rezultaty obu projektów zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej [115, 116]. W niniejszym rozdziale odpowiem na następujące pytania:

1. Dlaczego SU nie wykazuje właściwości radiosensybilizujących?
2. Czy wprowadzenie grupy metylowej (związek DMSU) wpływa jakościowo na zjawisko DEA?

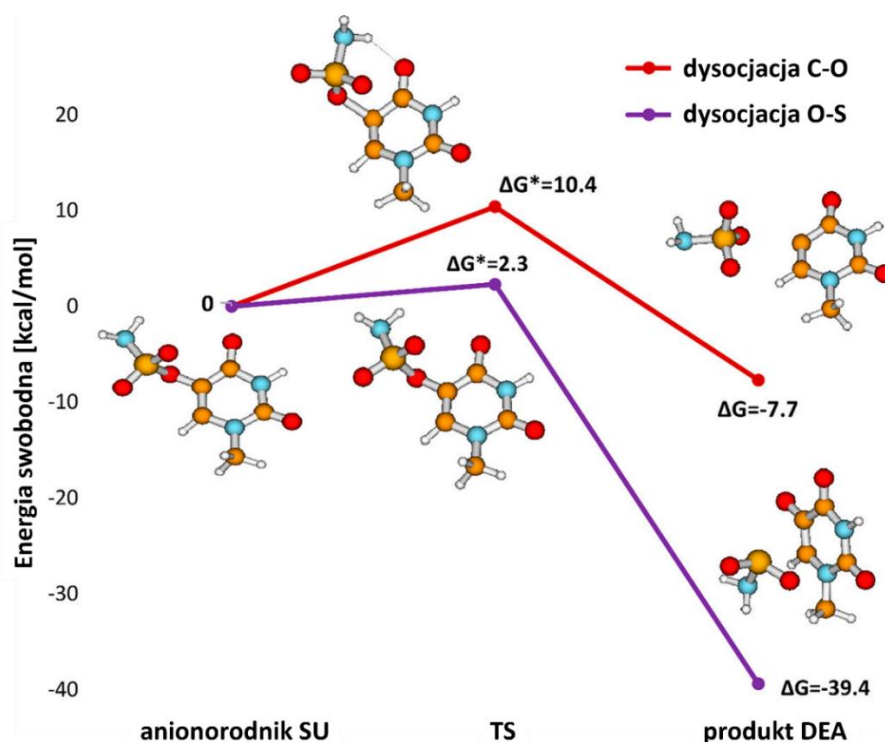


Rysunek 20. Badane pochodne (a) uracylu - amidosiarczan 5-hydroksyuracylu (SU) oraz (b) *N,N*-dimetyloamidosiarczan 5-hydroksyuracylu (DMSU).

Kanały DEA zostały zbadane eksperymentalnie przy pomocy techniki skrzyżowanych wiązek elektronowo molekularnych (z ang. *Crossed Electron-Molecular Beam*, CEMB). W eksperymencie tym aniony fragmentacyjne, wytworzone w wiązce elektronowo molekularnej w wysokiej próżni, analizowano metodą spektrometrii mas [82]. Degradację związków indukowaną przyłączeniem LEE w fazie gazowej przeprowadziła grupa S. Denifla z Uniwersytetu w Innsbrucku (Austria). Opisane wyżej badania pozwoliły uzyskać informacje o ścieżkach fragmentacji oraz mechanizmie powstawania anionów w procesie DEA, a co za tym idzie, pogłębić naszą wiedzę na temat mechanizmu uwrażliwiania nukleozydów na uszkodzenia wywoływane przez elektrony o niskiej energii.

4.1.2. Dysocjacyjne przyłączenie elektronu SU w roztworze wodnym oraz fazie gazowej (Projekt A)

Amidosiarczan 5-hydroksyuracylu (SU) został zaproponowany jako potencjalny radiosensybilizator w oparciu o kwantowochemiczne badania wstępne (profil DEA obliczony metodą M06-2x/6-31++G(d,p)) mechanizmu jego degradacji pod wpływem elektronów w fazie gazowej i roztworze wodnym [115]. W modelu obliczeniowym pierścień pirymidynowy został zmetylowany w pozycji N1 – co zapewniło zachowanie modelu wiązania N-glikozydowego, charakterystycznego dla nukleozydów (**Rysunek 21**). Rozważane były dwie ścieżki tworzenia produktów w procesie DEA: (a) poprzez dysocjację wiązania C5-O9 oraz (b) dysocjację wiązania O9-S10 (numeracja pierścienia przedstawiona na **Rysunek 20a**). Obie ścieżki są termodynamicznie korzystne ($\Delta G = -7,7$ i $\Delta G = -39,4$ kcal/mol), jednak pierwszą z nich charakteryzuje kilkukrotnie wyższa bariera aktywacyjna ($\Delta G^* = 10,4$ kcal/mol dla ścieżki (a) w porównaniu do $\Delta G^* = 2,3$ kcal/mol dla ścieżki (b)). Wstępne badania sugerowały, że SU powinien ulegać degradacji pod wpływem przyłączenia elektronu, więc może być rozpatrywany jako potencjalny radiosensybilizator. Dlatego też SU został zsyntetyzowany, a jego struktura potwierdzona przy pomocy technik ^1H NMR, HRMS oraz analizy rentgenowskiej.



Rysunek 21. Rozważane ścieżki procesu DEA dla SU w roztworze wodnym [115].

Z eksperymentu CEMB wynika, że przyłączenie elektronu w fazie gazowej do molekuly SU prowadzi do utworzenia 12 anionów fragmentacyjnych. Maksima sygnałów rezonansowych wraz z eksperymentalnymi i teoretycznymi barierami termodynamicznymi przedstawiono w **Tabela 5**. Bódźce termodynamiczne (ΔG) dla poszczególnych reakcji obliczono, posługując się metodą M062x/aug-cc-pVTZ uwzględniając warunki eksperymentalne: ciśnienie $1,58 \times 10^{-11}$ atm oraz temperaturę standardową (298,1 K) i eksperymentalną (430,15 K).

Tabela 5. Aniony fragmentacyjne powstające w eksperymencie CEMB dla SU, pozycje rezonansów oraz bariery termodynamiczne (w skali entalpii swobodnej, ΔG) powstawania poszczególnych anionów [115].

Masa m/z	Anion	Pozycje rezonansów (eV)				Bariery termodynamiczne (ΔG , w eV)	
		1.	2.	3.	4.	Eksperymentalna	Teoretyczna
						$\Delta G_{\text{exp, 430,15 K}}$	$\Delta G_{430,15 K}$
127	$C_4H_3N_2O_3^-$	~0	0,2	1,5	-	~0	-0,90
126	$C_4H_2N_2O_3^-$	~0	0,1	0,2	1,2	~0	-0,78
99	$C_3H_3N_2O_2^-$	0,1	0,8	-	-	~0	-1,70
96	$NH_2SO_3^-$	~0	0,3	1,3	-	~0	-0,65
95	$NHSO_3^-$	~0	0,2	-	-	~0	-1,41
86	$C_2H_2N_2O_2^-$	0,1	0,3	0,9	-	~0	_*
80	$NH_2SO_2^-$	~0	-	-	-	~0	-1,33
	SO_3^-					~0	-2,29
64	SO_2^-	1,1	5,8	-	-	~0	-0,45
62	NSO^-	0,6	0,8	-	-	~0,3	-2,01
48	$NH_2O_2^-$	5,0	5,4	-	-	~4,5	3,31
42	OCN^-	~0	0,4	1,3	-	~0	_**
16	NH_2^-	4,9	8,3	11,6	-	~4	2,11
	O^-					~4	2,40

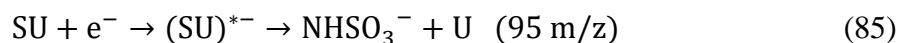
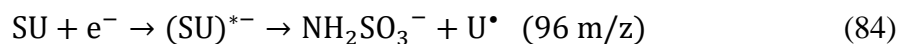
* ΔG na poziomie 3.31 eV przy ciśnieniu 1 atm oraz w temperaturze 298.15 K. Z uwagi na rozbieżność z wartością eksperymentalną pominięto dalsze obliczenia.

** Ze względu na różnorodność możliwych ścieżek reakcji pominięto dalsze obliczenia.

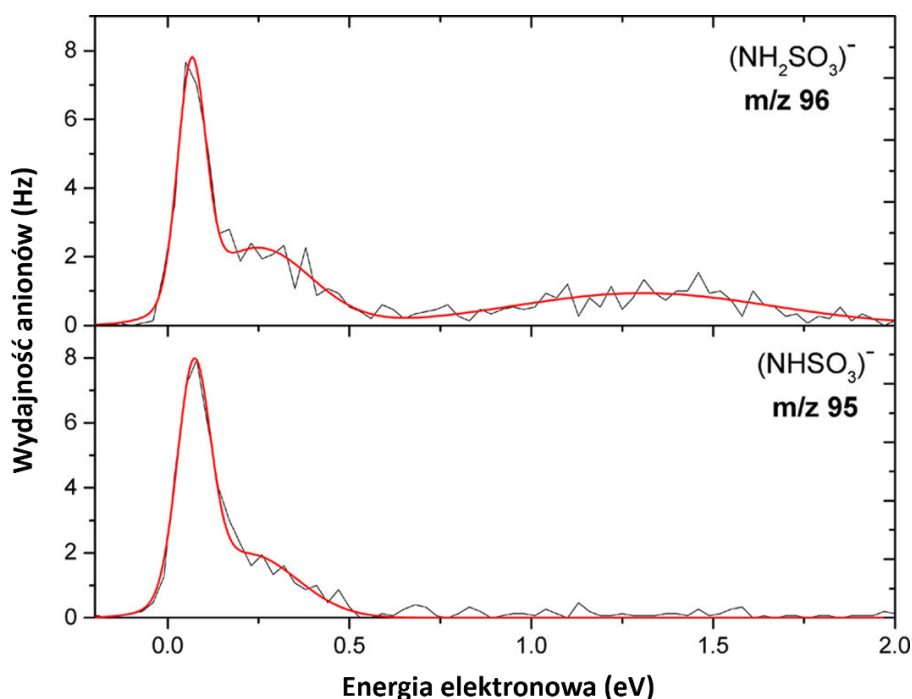
Analiza z wykorzystaniem obliczeń teoretycznych pozwoliła określić, że aniony mogą tworzyć się poprzez: (a) pęknięcie wiązania C-O, (b) pęknięcie wiązania S-O, (c) fragmentację pierścienia pirymidynowego oraz (d) fragmentację ugrupowania sulfonamidowego.

W eksperymencie CEMB zarejestrowano dwie masy, które mogą tworzyć się poprzez rozerwanie wiązania C-O: 96 oraz 95 m/z. Zależności wydajności tworzenia anionów w funkcji energii elektronu przedstawiono na **Rysunek 22**. Reakcje degradacji,

które mogą być odpowiedzialne za tworzenie się powyższych mas, można przedstawić następująco:

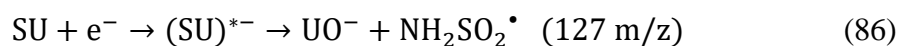


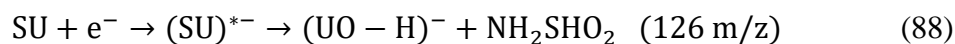
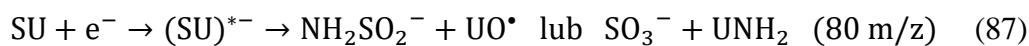
Masę 96 m/z można więc zinterpretować jako proste rozszczepienie cząsteczki na anion ugrupowania sulfonamidowego oraz rodnik uracyl-5-yłowy (84). W przypadku m/z 95 anion tworzy się poprzez dodatkową utratę atomu wodoru, w efekcie czego powstaje cząsteczka uracylu (85). Obie ścieżki degradacji są reakcjami egzoergicznymi, z przewidywanymi bodźcami termodynamicznymi reakcji prowadzących do anionów o m/z wynoszącymi 96 i 95, odpowiednio, $\Delta G_{430,15\text{K}} = -0,65 \text{ eV}$ oraz $\Delta G_{430,15\text{K}} = -1,41 \text{ eV}$. Fakt ten pozostaje w zgodzie z mierzonymi progowymi wartościami narastania sygnału masowego, które odpowiadają wartościom około 0 eV (**Tabela 5** i **Rysunek 22**).



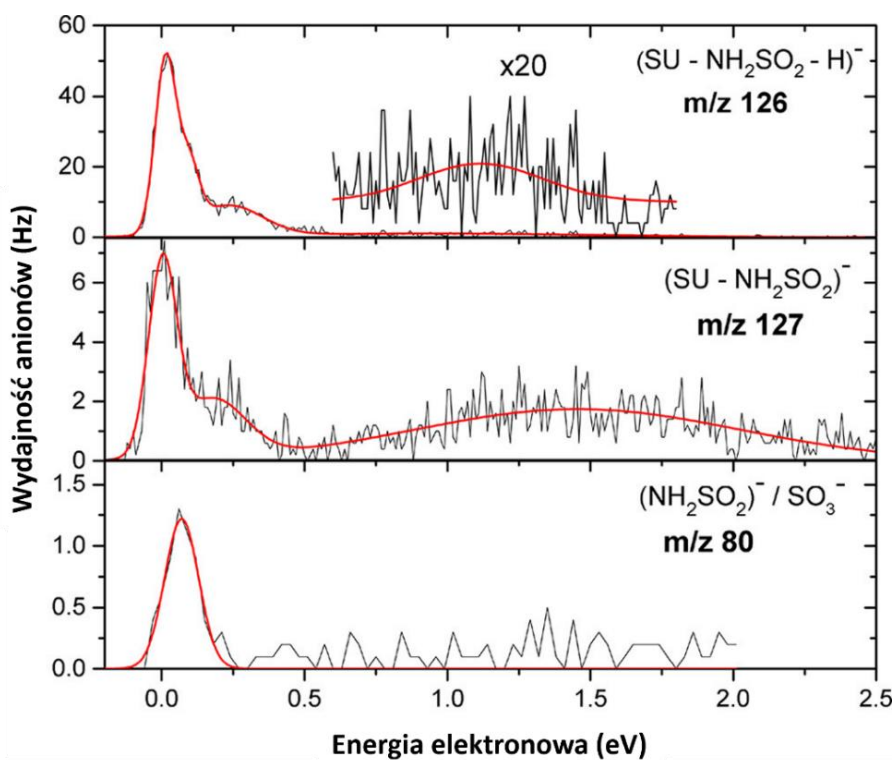
Rysunek 22. Wydajność tworzenia anionów o m/z 96 i 95 w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].

Rozerwanie wiązania S-O w anionorodniku $(\text{SU})^{\bullet-}$ powoduje powstanie trzech anionów fragmentacyjnych o wartościach m/z 127, 126 oraz 80 (**Rysunek 23**):



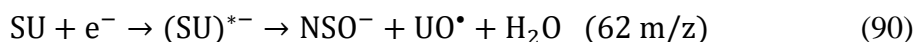


Do masy 127 m/z można przypisać anion UO^- , w tym przypadku drugi produkt stanowi rodnik fragmentu podstawnika $\text{NH}_2\text{SO}_2^\bullet$ (86). Doświadczalny próg narastania sygnału masowego obserwowany przy 0 eV jest zgodny z obliczoną wartością entalpii swobodnej odpowiedniej reakcji: $\Delta G_{430,15\text{K}} = -0,90 \text{ eV}$. To samo wiązanie S-O pęka w reakcji, w której otrzymano anion o m/z równym 80. W tym przypadku powstaje anion NH_2SO_2^- oraz rodnik – UO^\bullet (87). Anion o m/z wynoszącym 80 można też przypisać SO_3^- . Oba aniony mogą tworzyć się w wyniku reakcji egzoergicznej, będąc w zgodzie wartościami eksperymentalnymi (wartości wyznaczonych teoretycznie bodźców termodynamicznych wynoszą odpowiednio $\Delta G_{430,15\text{K}} = -1,33 \text{ eV}$ dla anionu NH_2SO_2^- i $\Delta G_{430,15\text{K}} = -2,29 \text{ eV}$ dla SO_3^-). Najwydajniejszy kanał DEA zarejestrowano dla anionu o m/z wynoszącym 126, który przypisano anionowi $(\text{UO}-\text{H})^-$, powstającemu w wyniku utraty atomu wodoru z $(\text{UO})^-$ (88). Tworzenie tego anionu jest również reakcją egzoergiczną ($\Delta G_{430,15\text{K}} = -0,78 \text{ eV}$), co jest zgodne z zaobserwowanym eksperymentalnie brakiem bariery termodynamicznej dla procesu powstawania $(\text{UO}-\text{H})^-$ ($\Delta G_{\text{exp},430,15\text{K}} = \sim 0 \text{ eV}$).

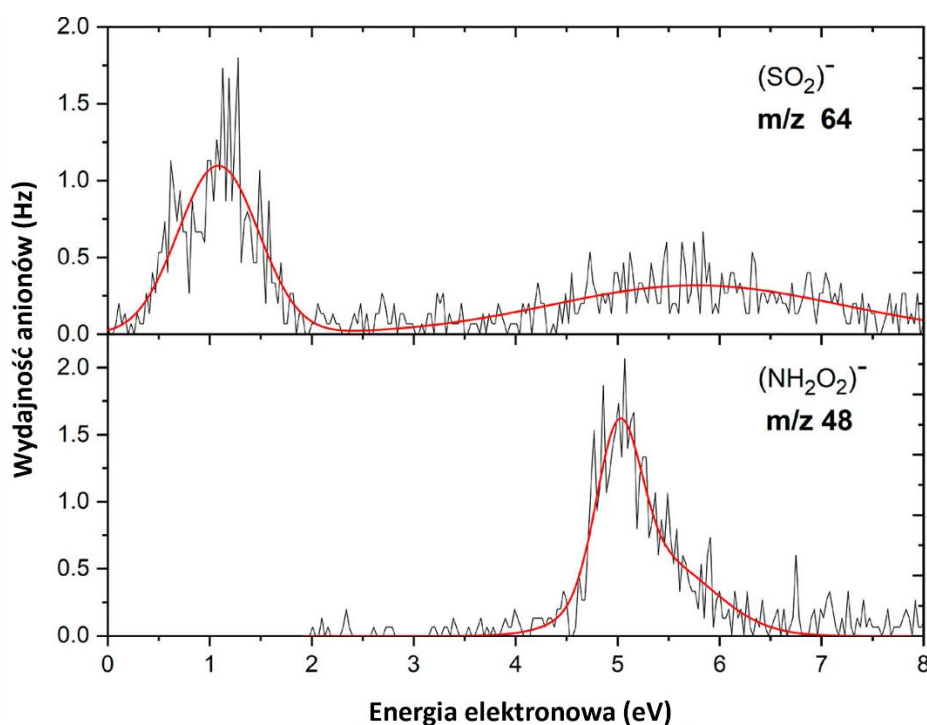


Rysunek 23. Wydajność tworzenia anionów o m/z 126, 127 i 80 w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].

W wyniku rozszczepienia pojedynczego wiązania lub wielokrotnego wiązań w podstawniku, czyli ugrupowaniu sulfonamidowym zarejestrowano cztery aniony fragmentacyjne o m/z równym 64, 48 (**Rysunek 24**), 62 (**Rysunek 25**) i 16 (**Rysunek 26**):

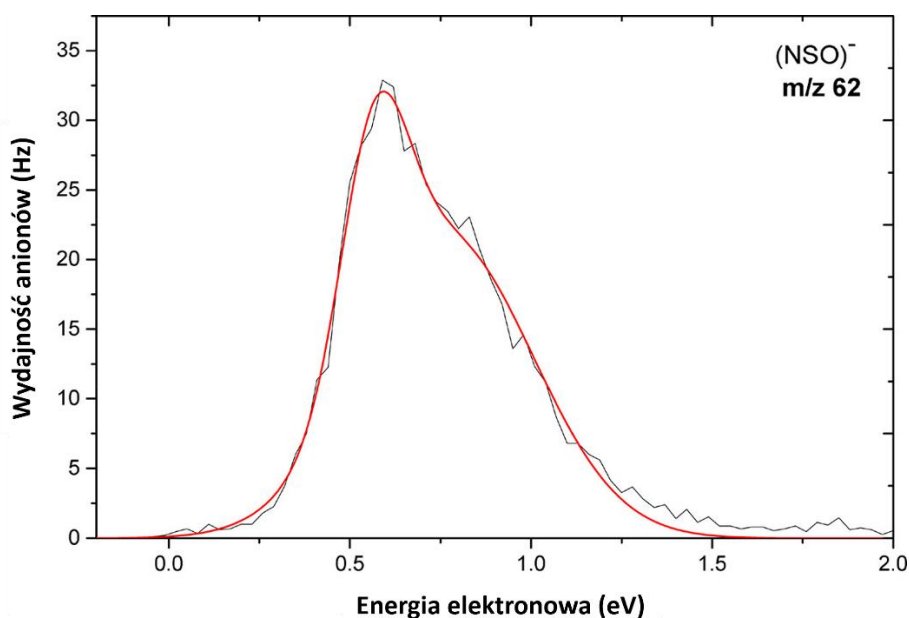


Do m/z równego 64 można przypisać anion SO_2^- . Wraz z nim powstaje obojętna cząsteczka zamkniętopowłokowa UONH_2 (89). Obliczony bodziec termodynamiczny dla tej reakcji wynosi $\Delta G_{430,15\text{K}} = -0,45 \text{ eV}$ i jest zgodny z uzyskaną doświadczalną wartością równą $\Delta G_{\text{exp},430,15\text{K}} = 0 \text{ eV}$. Anion NH_2O_2^- to odpowiednik masy 48 m/z, wraz z nim powstaje drugi produkt – rodnik UOS^\bullet (91). W przypadku m/z równego 48 progową wartość energii elektronu zaobserwowano przy $\Delta G_{\text{exp},430,15\text{K}} = 4,5 \text{ eV}$. Obliczona entalpia swobodna tworzenia anionu NH_2O_2^- wynosi $\Delta G_{430,15\text{K}} = 3,31 \text{ eV}$ (**Tabela 4**), co pozostaje w jakościowej zgodzie z wartością mierzoną.



Rysunek 24. Wydajności tworzenie anionów o m/z 64 i 48 dla DEA do SU [115].

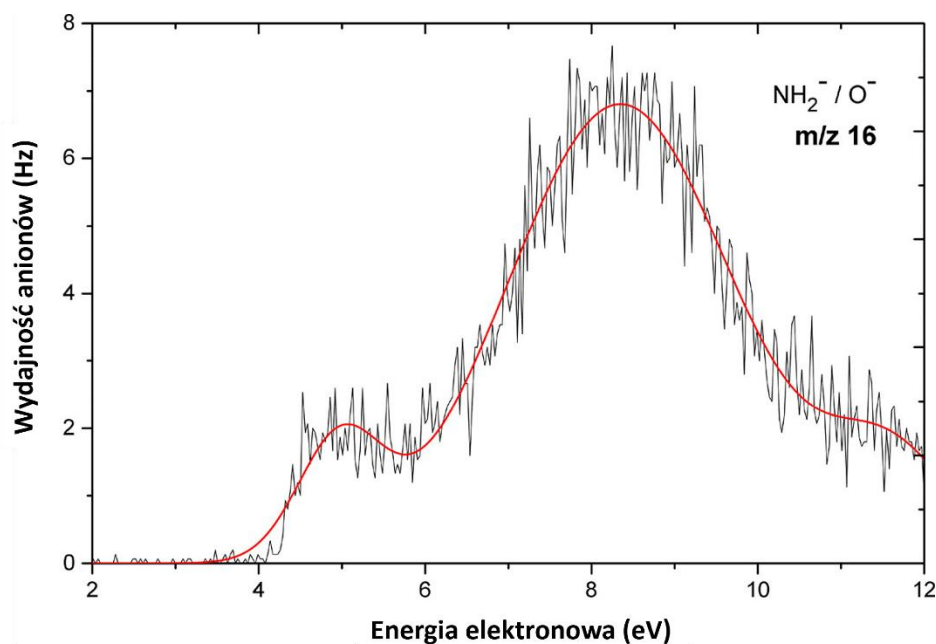
Zarejestrowany anion o m/z 62 (**Rysunek 25**), zinterpretowany jako NSO^- , stanowi drugi najliczniejszy anion fragmentacyjny (90). Reakcji egzoergiczej ($\Delta G_{430,15\text{K}} = -2,01$ eV) towarzyszy uwalnianie cząsteczki H_2O oraz rodnika UO^\bullet , a uzyskana ujemna wartość bodźca termodynamicznego jest zgodna z brakiem eksperymentalnej bariery termodynamicznej tego procesu ($\Delta G_{\text{exp},430,15\text{K}} = \sim 0$ eV).



Rysunek 25. Wydajność tworzenia anionu o m/z 62 w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].

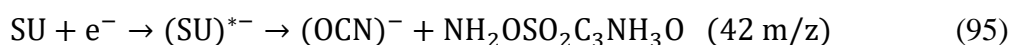
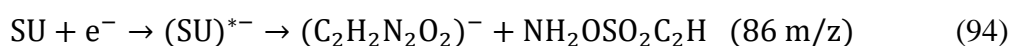
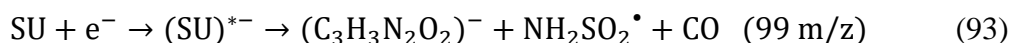
Anion o m/z 16 (**Rysunek 26**) może być interpretowany zarówno jako O^- , jak i NH_2^- (92). Rzeczywiście, obliczenia teoretyczne wskazały, że oba aniony wydają się równie prawdopodobne – wartości bodźców termodynamicznych wynoszą $\Delta G_{430,15\text{K}} = 2,11$ eV dla powstawania NH_2^- i $\Delta G_{430,15\text{K}} = 2,40$ eV dla powstawania O^- , zgadzając się jakościowo z wartością doświadczalnej bariery termodynamicznej: $\Delta G_{\text{exp},430,15\text{K}} = 4$ eV. Prawdopodobne przypisanie można wykonać poprzez porównanie uzyskanego widma tworzenia anionu z tymi, które otrzymano dla innych związków zawierających atomy tlenu i/lub grupy aminowe. Grupa Denifla badała poprzednio dysocjacyjne przyłączenie elektronu do uracylu, otrzymując rezonans przy 4,5 eV dla anionów O^- [117]. Podobny eksperyment przeprowadzono i zinterpretowano analogicznie dla DEA do waliny [118]. Wykorzystanie spektrometru masowego o wysokiej rozdzielczości pozwoliło na rozróżnienie zarejestrowanych anionów izobarycznych O^- i NH_2^- . Anion O^- powstawał jako rezonans przy 4,4 i 8,3 eV, podczas gdy anion NH_2^- był obserwowany przy 6 eV. Również w eksperymencie przeprowadzonym dla benzaldehydu obserwowano powstawanie anionu O^- przy energiach elektronu 8-9 eV (w wyniku rozerwania wiązania

C=O) [119]. W eksperymencie DEA dla SU pozycje diskutowanego rezonansu odpowiadają wartościom energii elektronu 4,9 i 8,3 eV (**Rysunek 26**), co na podstawie przytoczonych wyżej wartości literaturowych pozwala zidentyfikować ten anion jako O^- .



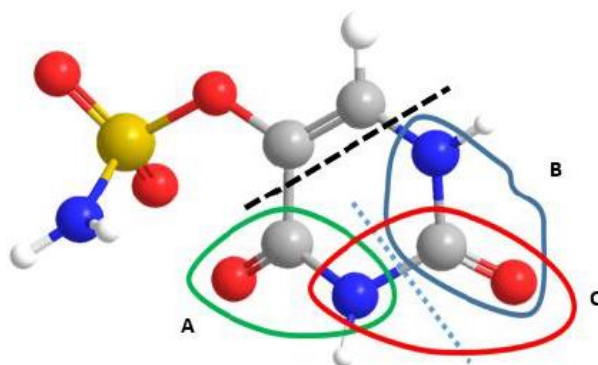
Rysunek 26. Wydajność tworzenia anionu o m/z 16 (O^-/NH_2^-) w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].

Ostatnia grupa anionów fragmentacyjnych – aniony o m/z 99, 86 i 42 m/z – może się tworzyć w wyniku dysocjacji wiązań w pierścieniu pirymidynowym (**Rysunek 28**):



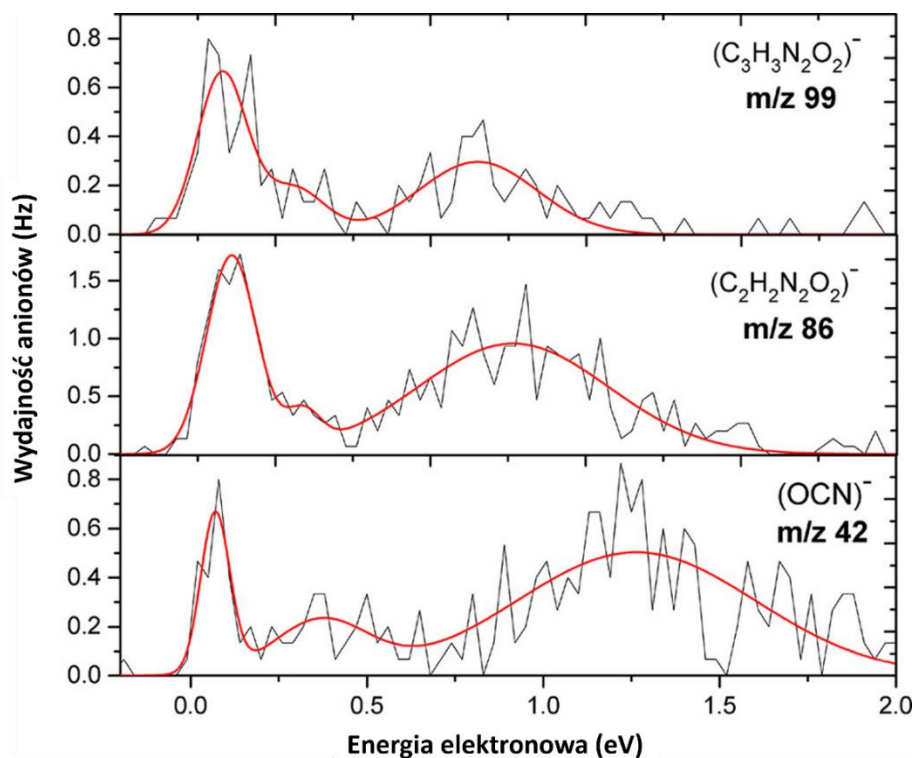
Powstawanie anionu $(C_3H_3N_2O_2)^-$ o m/z 99 jest reakcją egzoergiczną, dla której obliczony bodziec termodynamiczny wynosi $\Delta G_{430,15K} = -1,70$ eV. Reakcja fragmentacji prowadzi do otwarcia pierścienia pirymidynowego wraz z utworzeniem obojętnej cząsteczki C=O oraz rodnika $NH_2SO_2^\bullet$ (93). Anion o m/z 86 odpowiada fragmentowi $(C_2H_2N_2O_2)^-$, tworzonemu przez utratę fragmentu C_2H podczas dysocjacji rodnika uracyl-5-yłowego (94). Obliczona bariera termodynamiczna powstawania tego anionu wynosi 3,31 eV (dla ciśnienia 1 atm oraz temperatury 298,15 K) i nie zgadza się z wartością eksperymentalną (0 eV). W przypadku anionu o m/z 42, związanego

z utworzeniem OCN^- , można rozpatrywać kilka ścieżek reakcji, w zależności od miejsca rozerwania wiązania (95) (**Rysunek 27**).



Rysunek 27. Możliwe ścieżki tworzenia się anionu o masie m/z 42.

Najbardziej prawdopodobną ścieżką reakcji dla tego anionu wydaje się być ścieżka A (**Rysunek 27**, kolor zielony). Co więcej można stwierdzić, że uzyskany dla tego anionu rezonans jest podobny do obserwowanego dla tworzenia rezonansu NCO^- z hydroksymocznika [120]. Pozycje rezonansów dla NCO^- są podobne dla SU i hydroksymocznika, z wyjątkiem dodatkowego piku przy 0,1 eV, który zarejestrowano dla tego ostatniego związku. Można też przyjąć, że anion $(\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2)^-$ może być pośrednim produktem reakcji, prowadzącej do uzyskania OCN^- poprzez utratę dwóch atomów wodoru oraz rozerwania wiązania C-N. Warto również wspomnieć, iż wcześniejsze badania w grupie Denifla wykazały, że OCN^- stanowi drugi najliczniejszy anion fragmentacyjny dla uracylu i tyminy [121]. Dla tych związków pokazano, że tworzy się on w procesie dysocjacji zapoczątkowanej utratą wodoru związanego z jednym z atomów azotu zasady pirymidynowej.



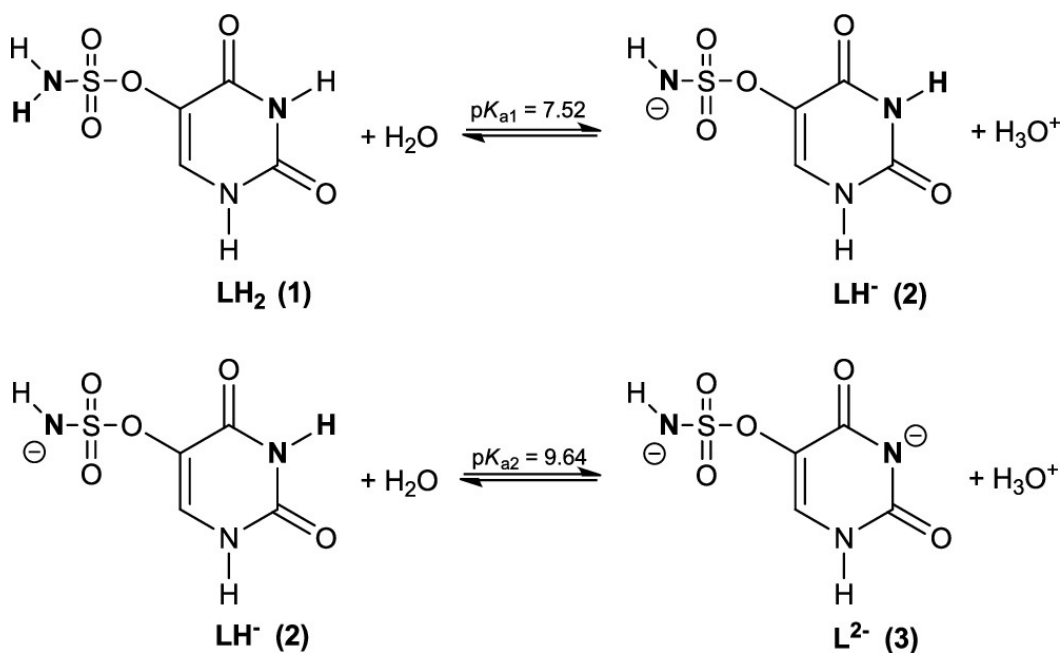
Rysunek 28. Wydajność tworzenia anionów o m/z 99, 86 i 42 w funkcji energii elektronu dla procesu DEA do SU [115].

4.1.3. Radioliza stacjonarna SU

Opierając się na przesłankach płynących z obliczeń teoretycznych, sugerujących radiosensybilizujący potencjał SU, jak również w oparciu o obiecujące wyniki eksperymentu CEMB w fazie gazowej, sugerujące łatwość degradacji SU pod wpływem elektronów, przeprowadzono dalsze badania nad SU, mające potwierdzić właściwości radiouczulające związku. Wykonano więc radiolizę stacjonarną tego związku przy dawce promieniowania X wynoszącej 140 Gy. Nie zaobserwowano jednak żadnego produktu degradacji SU. Zmiana pH roztworu, czy też zastosowanie wyższej dawki promieniowania (280 Gy), również nie wpłynęły na zmianę wyniku radiolizy. W celu weryfikacji zastosowanej procedury eksperymentalnej, przeprowadzono ponowną radiolizę roztworu zawierającego SU oraz BrU jako wzorca związku radiosensybilizującego. Eksperyment potwierdził właściwości radiosensybilizujące BrU, jednak SU ponownie okazało się być niewrażliwe na działanie promieniowania.

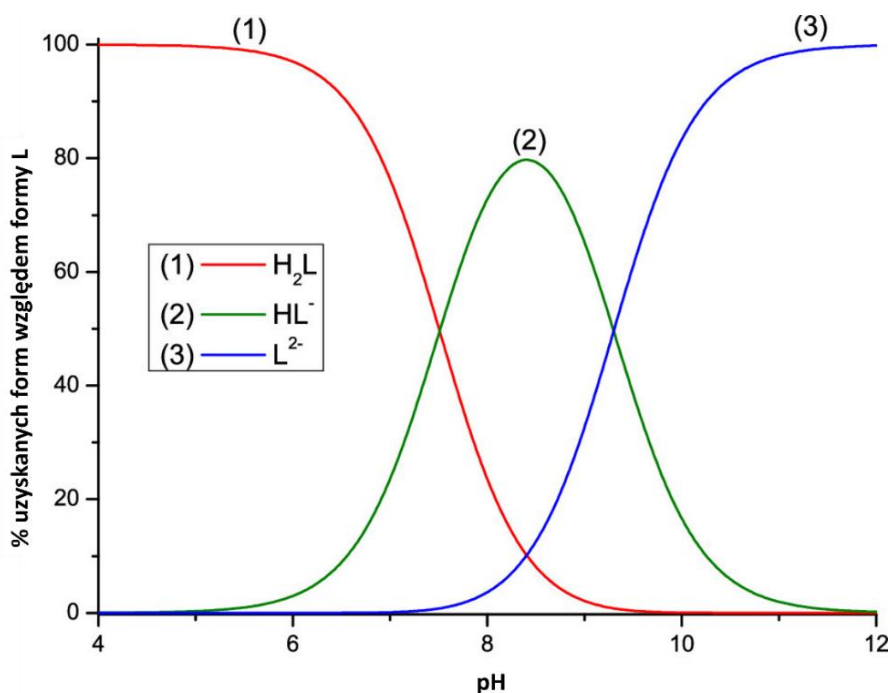
Dlaczego więc pomimo obiecującej charakterystyki DFT, SU nie wykazuje właściwości radiouczulających w warunkach radiolizy stacjonarnej w roztworze wodnym? Jedną z hipotez zakładała, że SU, jeszcze zanim zostanie poddane

napromienieniu, występuje nie w postaci obojętnej (jak założono we wstępnych obliczeniach), ale anionowej, powstającej w wyniku deprotonowania grupy aminowej w pierścieniu pirymidynowym. Forma anionowa SU mogłaby zapobiegać przyłączeniu się elektronu, z uwagi na odpychanie się ładunków ujemnych. W celu zweryfikowania tej hipotezy wyznaczono potencjometrycznie stałe dysocjacji kwasowej pK_a dla reakcji równowagowych pokazanych na **Rysunek 29** ($pK_{a1} = 7,52 (\pm 0,06)$, $pK_{a2} = 9,64 (\pm 0,04)$).



Rysunek 29. Schemat dysocjacji kwasowej SU w środowisku wodnym [115].

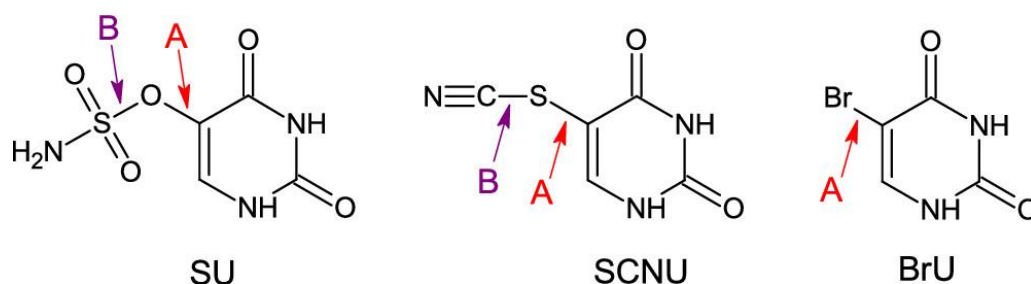
Przy pomocy programu HySS [122] oraz stosując obliczone wartości pK_a uzyskano zależność stężeń form istniejących w roztworze SU w funkcji pH (**Rysunek 30**). Przy pH=7 około 80% SU występuje w postaci obojętnej (H_2L). Hipoteza o deprotonowaniu SU jako przyczynie braku degradacji została więc odrzucona.



Rysunek 30. Zależność stężeń form SU pozostających w równowadze w funkcji pH [115].

Taka sama wydajność rozkładu BrU obserwowana dla radiolizy roztworu zawierającego wyłącznie BrU oraz dla roztworu zawierającego równomolowe ilości BrU i SU, pozornie może wskazywać, że solwatowane elektrony nie przyłączają się do SU. Jednak, oba związki charakteryzują się podobnymi wartościami adiabatycznego powinowactwa elektronowego – dla BrU to 2,31 eV, a dla SU jest to 2,43 eV (AEA wyznaczone na poziomie G2MP2). Wydajność rozkładu BrU w roztworach zawierających równo BrU, jak i SU, podobna do wydajności rozkładu roztworu zawierającego sam BrU, może sugerować, że niektóre elektrony są tymczasowo wychwytywane przez SU, a następnie przenoszone na BrU, gdzie są ostatecznie zużywane w reakcji DEA. W konsekwencji, opisane wyżej wyniki sugerują, że SU nie ulega w wodzie degradacji indukowanej elektronami.

Profile reakcji DEA dla SU (**Rysunek 21**) wyznaczono ponownie, stosując tym razem metodę G2MP2, charakteryzującą się dokładnością chemiczną (**Tabela 6**). Dla porównania, obliczenia wykonano również dla dwóch innych pochodnych uracylu – SCNU i BrU (**Rysunek 31**) – które są przykładami związków faktycznie ulegających degradacji, zgodnie z profilem przewidzianym metodą DFT. Ostatecznie porównano bodźce termodynamiczne i bariery kinetyczne rozpatrywanych ścieżek degradacji, wyznaczone z wykorzystaniem funkcjonałów M062x i B3LYP z tymi obliczonymi przy pomocy metody G2MP2.



Rysunek 31. Pochodne SU, SCNU oraz BrU. Strzałki wskazują wiązania ulegające dysocjacji w procesie DEA [115].

Tabela 6. Bariery termodynamiczne i kinetyczne [kcal/mol] dla procesu DEA anionorodników pochodnych uracylu – SU, SCNU i BrU [115].

Związek	Ścieżka degradacji	G2MP2		M062x		B3LYP	
		ΔG	ΔG^*	ΔG	ΔG^*	ΔG	ΔG^*
SU	C-O (ścieżka A)	-12.1	11.1	-7.7 ^a	10.4 ^a	-12.4	11.7
	O-S (ścieżka B)	-17.4	7.5	-39.4 ^a	2.3 ^a	-42.6	0.96
SCNU	C-S (ścieżka A)	3.6	7.9	-1.6 ^b	8.7 ^b	-3.7 ^c	3.4 ^c
	S-C (ścieżka B)	-12.1	1.6	-16.2 ^b	4.1 ^b	-	-
BrU	C-Br (ścieżka A)	-7.5	1.8	-	-	-8.0 ^d	2.5 ^d

^a Obliczenia wykonano dla amidosiarczanu 1-metylo-5-hydroksyuracylu (MetOSOU).

^b Obliczenia wykonano dla 5-tiocyanato-2'-deoksyurydyny (SCNdU) [55].

^c Obliczenia wykonano dla 1-metylo-5-tiocyanatouracylu (MetSCNU).

^d Obliczenia wykonano dla 5-bromo-1-metylouracylu (MetBrU).

Uzyskane wartości barier termodynamicznych i kinetycznych, wyznaczonych przy pomocy metody G2MP2 wyjaśniają brak degradacji SU indukowanej elektronami. Bariera aktywacyjna dla procesu zerwania wiązania O-S, które stanowi najbardziej obiecującą ścieżkę procesu DEA dla SU, jest w dużym stopniu niedoszacowana na poziomie zarówno M062x, jak i B3LYP. Bariera ta, wyznaczona na poziomie G2MP2, wyniosła $\Delta G^* = 7,5$ kcal/mol, przy czym wyznaczona przy pomocy metod DFT była co najmniej trzykrotnie niższa ($\Delta G^* = 2,3$ kcal/mol dla M062x i $\Delta G^* = 0,96$ kcal/mol dla B3LYP). Uzyskana wartość $\Delta G^* = 7,5$ kcal/mol pozornie nie wydaje się wysoka, jednak wcześniejsze badania nad właściwościami radiosensybilizującymi dla ISdU [60] oraz BrSdU [61] (**Rysunek 12**) wskazały, że energia aktywacji na takim poziomie, jest wystarczająca do całkowitego zahamowania uwalniania anionu halogenkowego w tych związkach (patrz **Rozdział 1.4.3**). Stąd bariery aktywacji odpowiednio 11,1 i 7,5 kcal/mol dla dysocjacji wiązań C-O i O-S, uzyskane na poziomie G2MP2, uzasadniają obserwowaną stabilność anionu SU w doświadczeniach radiolitycznych. Z drugiej strony, zakładane ścieżki dysocjacji są obserwowane w eksperymencie CEMB w fazie gazowej (w wyniku pęknięć odpowiednich wiązań rejestruje się masy 96 i 80 m/z) przy energii

elektronów rzędu 0 eV. Energia uzyskana przez układ w wyniku przyłączenia elektronu (AEA = 56,0 kcal/mol dla G2MP2 w roztworze) przewyższa kilkakrotnie dyskutowane bariery kinetyczne, jednak w środowisku wodnym energia ta jest zbyt szybko rozpraszana, aby umożliwić dysocjację.

Warto zauważyć, że brak jest rozbieżności między modelami DFT i G2MP2 w przypadku pozostałych dwóch pochodnych – SCNU i BrU. Dla obu układów zastosowane metody – M062x dla SCNU i B3LYP dla BrU – dają wyniki pozostające w dobrej zgodności zarówno z wynikami radiolizy, jak i z wynikami na poziomie G2MP2. Przy zastosowaniu metody G2MP2 bariery aktywacyjne zmieniają się tylko nieznacznie: z $\Delta G^* = 2,5$ kcal/mol na poziomie B3LYP do $\Delta G^* = 1,8$ kcal/mol na poziomie G2MP2 dla BrU, a dla SCNU: z $\Delta G^* = 8,7$ kcal/mol na poziomie M062x do $\Delta G^* = 7,9$ kcal/mol na poziomie G2MP2 dla ścieżki A i z $\Delta G^* = 4,1$ kcal/mol przy M062x do $\Delta G^* = 1,6$ kcal/mol przy G2MP2 dla ścieżki B. Podobne tendencje można zaobserwować dla barier termodynamicznych. Porównując wartości bodźców termodynamicznych reakcji DEA dla BrU i SCNU, uzyskanych przy pomocy metod DFT i G2MP2, widać różnice nie przekraczające kilku kcal/mol, podczas gdy różnica ta sięga nawet 25 kcal/mol dla pęknięcia wiązania O-S w SU ($\Delta G = -17,4$ kcal/mol dla G2MP2 i $\Delta G = -42,6$ kcal/mol dla B3LYP) Bariery dysocjacji wiązania S-O w anionorodniku SU przewidywaną przez metody M062x i B3LYP można więc uznać za artefakt metodyki DFT.

4.1.4. Wnioski

W Projekcie A zbadano degradację amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu (SU), indukowaną przyłączeniem niskoenergetycznych elektronów w fazie gazowej oraz dokonano charakterystyki DFT procesu DEA w roztworze wodnym. Przeprowadzono również eksperyment radiolizy stacjonarnej w wodzie w celu określenia właściwości radiouczulających SU. Pomimo obiecujących wyników teoretycznych, potwierdzonych w eksperymencie CEMB, w którym zaobserwowano wiele kanałów DEA indukowanych LEE, wyniki radiolizy w wodzie jasno pokazują, że SU nie wykazuje właściwości radiosensybilizujących. Właściwości radiosensybilizujące SU nie ujawniają się ani przy zmianie pH roztworu, ani przy wzroście dawki promieniowania. Wykluczono możliwość deprotonowania SU w wodzie, które mogłoby blokować przyłączenie elektronów. Rozwiązanie problemu przyniosło dopiero zbadanie termodynamiki i kinetyki procesu

DEA przy pomocy metody G2MP2, charakteryzującej się dokładnością chemiczną. Porównanie obliczonych wartości barier termodynamicznych oraz kinetycznych procesu DEA uzyskanych metodami M062x i G2MP2 z uzyskanymi metodą G2MP2 pozwoliło stwierdzić niską dokładność użytych modeli DFT. W szczególności wartości bodźców ΔG i ΔG^* , wyznaczonych dla degradacji SU związanej z dysocjacją wiązania S-O, sugerują, że liczbowy opis pęknięcia tego wiązania można uznać za artefakt metodyki DFT. Przykład amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu pokazał też, iż wydajny proces DEA w fazie gazowej nie gwarantuje, że dany związek będzie wykazywał pożądane właściwości również w środowisku wodnym.

4.1.5. Degradacja DMSU indukowana LEE w fazie gazowej (Projekt B)

W Projekcie B zbadano proces indukowanej LEE degradacji metylowanej pochodnej SU – DMSU w fazie gazowej. Przyłączenie elektronów o energii z zakresu 0-12 eV do DMSU (**Rysunek 20b**) prowadzi do powstawania 10 anionów fragmentacyjnych, tworzących się w wyniku pojedynczych lub wielokrotnych pęknięć wiązań w strukturze molekuly. Pozycje rezonansów, bariery termodynamiczne oraz wartości adiabatycznego powinowactwa elektronowego dla produktów powstających w procesach DEA zestawiono w **Tabela 7**. Poprawność syntezy DMSU potwierdzono przy pomocy techniki ¹H NMR oraz spektrometrii mas MS/MS. Bódźce termodynamiczne (ΔG) dla poszczególnych reakcji, uwzględniające warunki standardowe oraz eksperymentalne obliczono metodą M062x/aug-cc-pVTZ.

Tabela 7. Aniony fragmentacyjne powstające w eksperymencie CEMB dla DMSU, pozycje rezonansów i bariery termodynamiczne (w skali entalpii swobodnej, ΔG) powstawania poszczególnych anionów oraz ich adiabatyczne powinowactwa elektronowe ($AEAE$) [116].

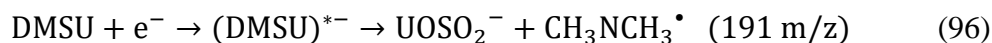
Masa (m/z)	Anion	Maksima pików rezonansowych (eV)				Bariery termodynamiczne (eV)		$AEAE$ (eV)
						$5,33 \times 10^{-11}$ atm		
		1.	2.	3.	4.	Eksperymentalna $\Delta G_{\text{exp, 386,15 K}}$	Teoretyczna $\Delta G_{386,15 K}$	
191	UOSO_2^-	0	0,1			~0	-1,78	4,11
127	UO^-	0	0,1	1,3		~0	-0,95	2,40
126	$(\text{UO-H})^-$	0	0,2	1,2		~0	-1,41 ^a	4,84 ^a
124	$(\text{CH}_3)_2\text{NSO}_3^-$	0	0,3	1,4		~0	-0,64	4,66
123	$((\text{CH}_3)_2\text{NSO}_3\text{-H})^-$	0	0,1			~0	-1,79	4,88
108	$(\text{CH}_3)_2\text{NSO}_2^-$	0	0,2	0,3	1,4	~0	-1,32	2,75
82	H_2SO_3^-	-*				-*	-1,18	-0,45
80	SO_3^-	0	0,3	1,3		~0	-2,09	5,09
66	H_2SO_2^-	-*				-*	-0,55	-0,59
64	SO_2^-	0	0,3			~0	-0,66	1,43
16	O^-	4,7	8,8			~4	2,32 ^c	1,41
15	CH_3^-	8,5				~6	3,12	0,001

*Eksperymentalnie nie wykryto, ale zbadano metodami obliczeniowymi.

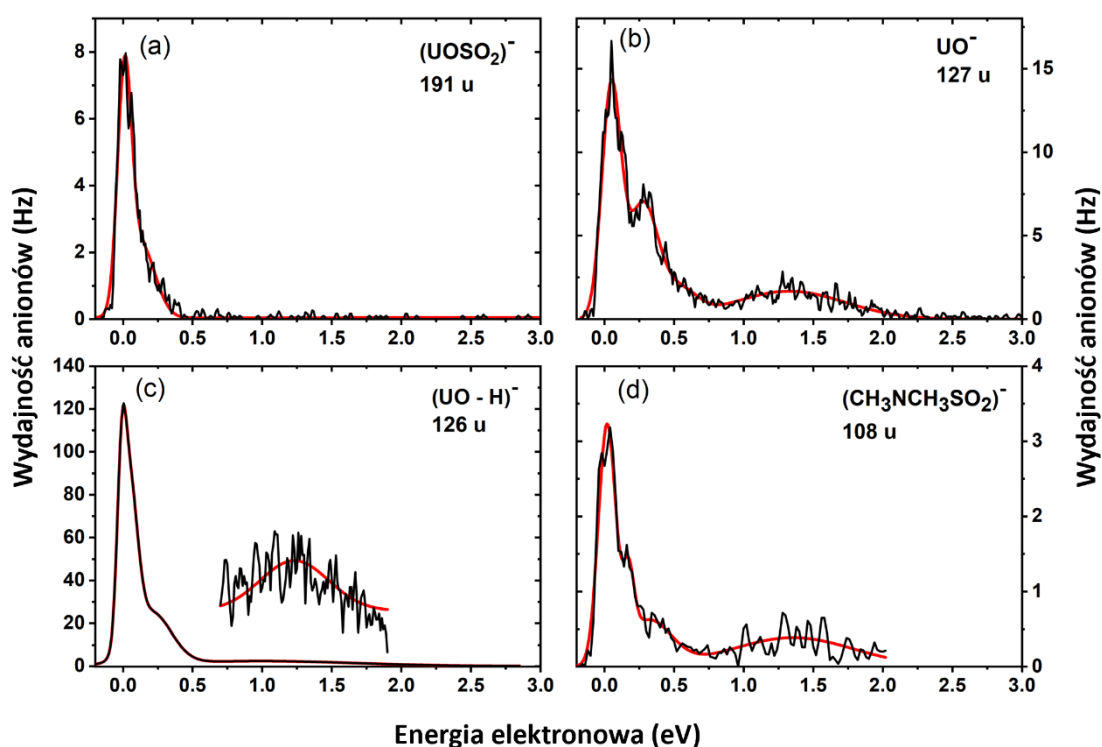
^a Przy oderwaniu atomu H od N1; bariery dla oderwania H od N3: -0,43/-0,78 eV dla 298,15/386,15 K.

^c Dla oderwania atomu O12; wartości ΔG dla alternatywnych pozycji: O7: 4,86/4,57 eV, O8: 5,12/4,83 eV, O11: 2,76/2,45 eV dla 298,15K/386,15K.

Jon o największej masie charakteryzował się m/z równym 191. Fragment ten przypisano anionowi UOSO_2^- . Zależność wydajności tworzenia tego anionu w funkcji energii elektronu przedstawiono na **Rysunek 32a**. Tworzenie anionu UOSO_2^- może przebiegać na drodze dysocjacji wiązania S-N, zgodnie z poniższą reakcją (96):

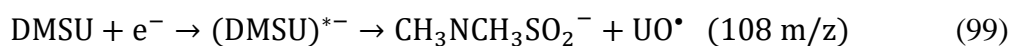
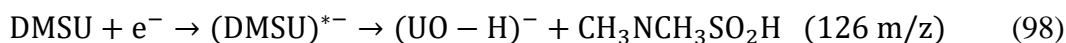


Wyznaczone przy pomocy metod chemii kwantowej bodźce termodynamiczne wskazują na to, że reakcja tworzenia UOSO_2^- jest reakcją egzoergiczną ($\Delta G_{386,15\text{K}} = -1,78 \text{ eV}$), a wartość AEA tego anionu jest stosunkowo duża i wynosi 4,11 eV.



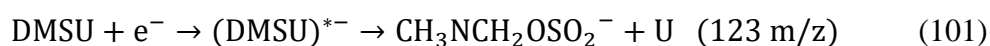
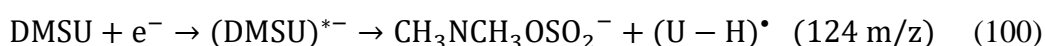
Rysunek 32. Wydajność tworzenia anionów o m/z 191, 127, 126 i 108 w funkcji energii elektronu dla DEA do DMSU [116].

Kolejne aniony fragmentacyjne, które otrzymano w przeprowadzonym eksperymencie, charakteryzowały się stosunkiem m/z odpowiednio: 127, 126 oraz 108 m/z (**Rysunek 32b-d**). Założono, że mogą one tworzyć się w następujących reakcjach:

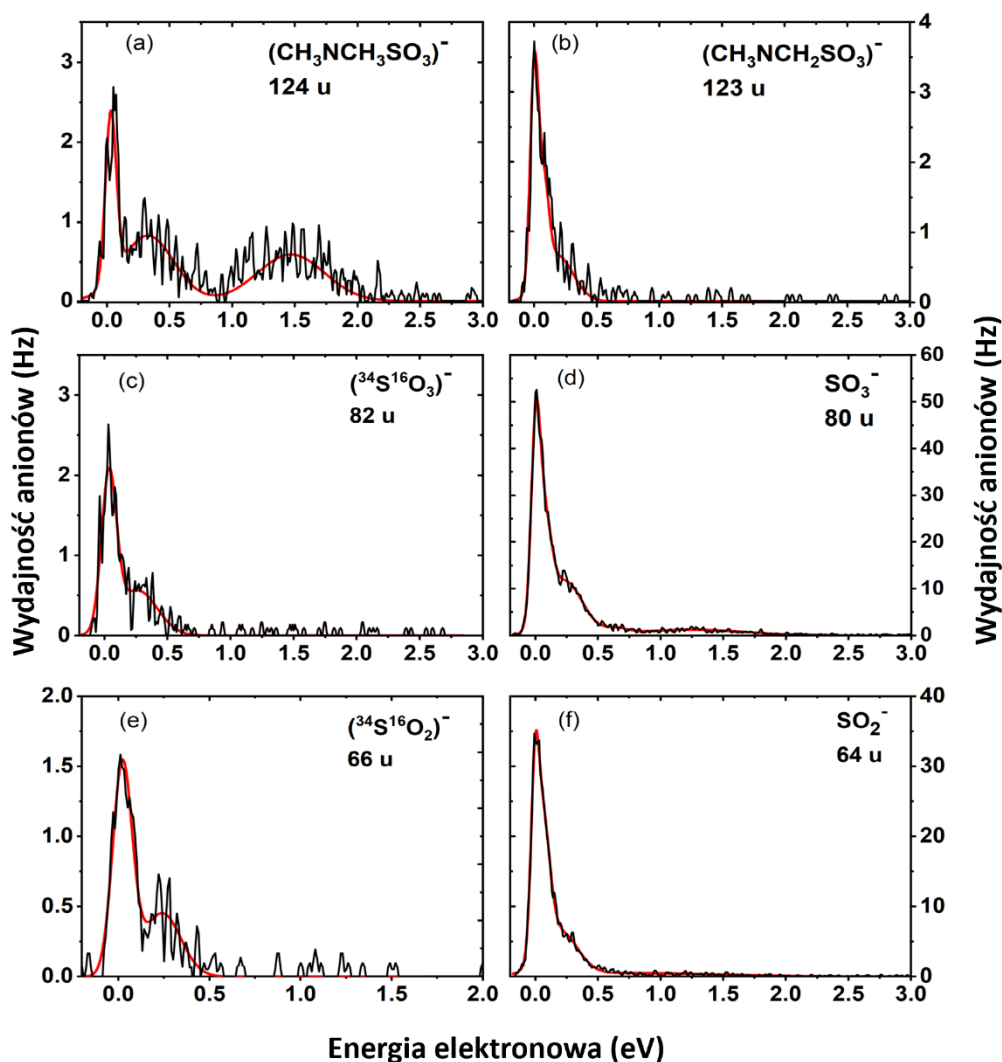


Tworzenie powyższych anionów odbywać się może na drodze dysocjacji wiązania S-O, dodatkowo sprzężonej z oderwaniem atomu wodoru w przypadku anionu o m/z 126 (98). Zgodnie z obliczeniami termodynamicznymi wszystkie reakcje są egzoergiczne, a zmiana entalpii swobodnej wynosi odpowiednio: $\Delta G_{386,15K} = -0,95$ eV dla m/z 127, $\Delta G_{386,15K} = -1,41$ eV dla m/z 126 oraz $\Delta G_{386,15K} = -1,32$ eV dla m/z 108 m/z, co jest zgodne z wynikami eksperymentalnymi, wskazującymi zerową barierę termodynamiczną ($\Delta G_{\text{exp}} \sim 0$ eV). W celu obliczenia ΔG dla tworzenia anionu o masie 126 m/z rozważano dwa miejsca utraty atomu wodoru z cząsteczki UO – z pozycji N3 ($\Delta G_{386,15K} = -0,78$ eV) oraz N1 pierścienia pirymidynowego ($\Delta G_{386,15K} = -1,41$ eV). Analogiczne rozważania nad miejscem oderwania atomu wodoru przeprowadzono wcześniej w projekcie A, dochodząc do wniosku, że oderwanie H z pozycji N1 jest preferowane termodynamicznie, więc i w przypadku DMSU ten sam wniosek wydaje się oczywisty. Obliczone AEA dla UO^- wynosi 2,40 eV i jest niemal równe wartości 2,38 eV, którą uzyskano dla struktury OTfU [123]. Warto wspomnieć, że wydajność otrzymywania anionu $(\text{UO-H})^-$, przyporządkowanego masie 126 m/z była najwyższą wydajnością zarejestrowaną w eksperymencie CEMB dla DMSU. Podobne zależności dla anionów o m/z 127 i 126, choć o znacznie mniejszej wydajności, zaobserwowano również w analogicznym eksperymencie przeprowadzonym dla SU (patrz **Rozdział 4.1.2**).

Kolejne aniony o m/z 124 oraz 123 (**Rysunek 33a,b**) mogą tworzyć się w wyniku dysocjacji wiązania O-C między podstawnikiem oraz zasadą azotową, zgodnie z poniższymi reakcjami:

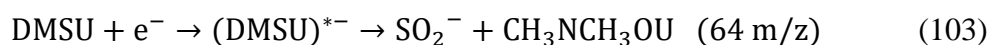
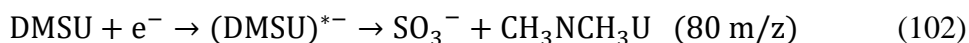


Anion o m/z 124 przypisano podstawnikowi, $\text{CH}_3\text{NCH}_3\text{SO}_2^-$, którego utworzeniu towarzyszy uwolnienie rodnika uracyl-5-yłowego (100). Tworzenie anionu fragmentacyjnego przebiega w reakcji egzoergicznej, z obliczonym progiem termodynamicznym $\Delta G_{386,15K} = -0,64$ eV. Anion o m/z 123 powstaje w wyniku utraty kolejnego atomu wodoru z grupy metylowej z anionu podstawnika o m/z 124 (101). Powstawanie tego anionu ($\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{OSO}_2^-$) jest związane ze zmianą entalpii swobodnej o $\Delta G_{386,15K} = -1,79$ eV, a jego AEA wynosi 4,88 eV.



Rysunek 33. Wydajność tworzenia anionów o m/z 124, 123, 82, 80, 66 i 64 w funkcji energii elektronu dla DEA do DMSU [116].

Przyłączenie elektronu do cząsteczki DMSU może skutkować jednoczesnym rozerwaniem wielu wiązań, a także ich reorganizacją w powstających fragmentach. Z sytuacją tą mamy do czynienia w przypadku anionów o m/z 80 i 64 (**Rysunek 33d,f**), które stanowią drugi i trzeci najbardziej korzystny kanał procesu DEA. Tworzenie tych anionów fragmentacyjnych odbywa się poprzez jednoczesne pęknięcie wiązań N-S oraz S-O (102,103):

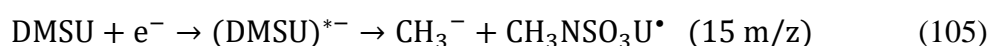
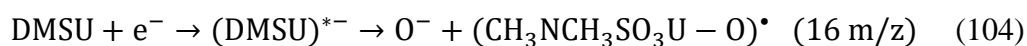


Dla masy 80 oraz 64 m/z obliczone bodźce termodynamiczne reakcji egzotermicznych wynoszą odpowiednio $\Delta G_{386,15\text{K}} = -2,09 \text{ eV}$ oraz $\Delta G_{386,15\text{K}} = -0,66 \text{ eV}$, co dobrze koreluje

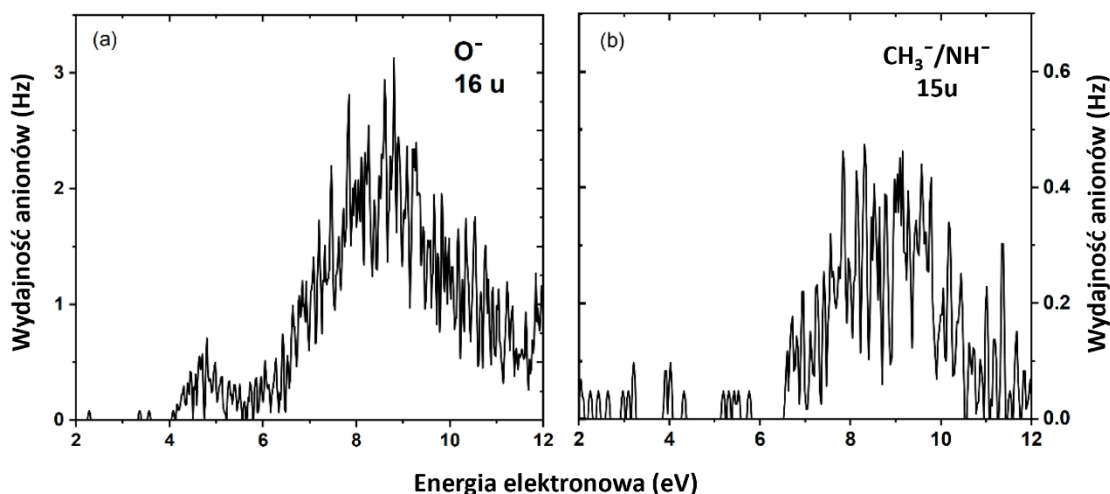
z eksperymentalnym brakiem bariery termodynamicznej ($\Delta G_{\text{exp}} = \sim 0$ eV w obu przypadkach). W przypadku SO_2^- wartość powinowactwa jest porównywalna z wartościami literaturowymi [123].

Ciekawym przypadkiem są rezonanse dla m/z 82 oraz 66 (**Rysunek 33c,e**). Bliskość grup metylowych oraz ugrupowania SO_3 pozwala założyć, że rejestrowane masy mogą odpowiadać anionom fragmentacyjnym H_2SO_3^- i H_2SO_2^- , które mogłyby powstawać na drodze przeniesienia atomów wodoru z grup metylowych do grup SO_3 , bądź SO_2 . Jednak dla tych anionów uzyskano ujemne wartości AEA (na poziomie M062x/aug-cc-pVTZ), co sugeruje, że odpowiednie aniony są stanami metastabilnymi. Samorzutne oderwanie elektronu od anionu metastabilnego następuje w fazie gazowej w ciągu ok. 10^{-14} s [30], a tak krótki czas uniemożliwiłby rejestrację odpowiedniego sygnału w eksperymencie CEMB. Przeprowadzone doświadczenie jednak jasno wskazuje na tworzenie anionów o masach 82 i 66 m/z. Uznano zatem, że masom tym można przypisać aniony $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^-$ i $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^-$. Rzeczywiście, na podstawie zarejestrowanych widm SO_3 , SO_2 dla stosunku m/z równego odpowiednio 80 i 64 (**Rysunek 33c-f**), stosunek masowy 80:82 oraz 64:66 określono na 4,4%. Jest on zgodny z naturalnym składem izotopowym izotopów ^{32}S i ^{34}S siarki [124].

Wszystkie omówione do tej pory aniony fragmentacyjne tworzą się bezbarierowo (energia elektronów 0 eV), co jest zgodne z obliczonym egzoergicznym charakterem reakcji ich tworzenia i ujemnymi wartościami bodźców termodynamicznych. Jedynie dwa aniony fragmentacyjne o m/z 16 oraz 15 zaobserwowano przy wyższych energiach elektronów — dla m/z 16 przy energii 4,7 eV i 8,8 eV, a dla m/z 15 przy energii 8,5 eV (**Rysunek 34a,b**). Wartość m/z 16 sugeruje uwolnienie anionu tlenu (104), natomiast m/z 15 może odpowiadać anionowi CH_3^- (105):



Utworzenie anionu O^- jest możliwe na cztery sposoby: pierwsze dwa dotyczą rozerwania wiązania karbonylowego C=O w pierścieniu pirymidynowym (C2=O7 i C4=O8, **Rysunek 20b**), a dwa pozostałe dotyczą wiązania S=O (S10=O11 i S10=O12, **Rysunek 20b**). Prawdopodobieństwo utworzenia anionu z atomu tlenu O9 jest niskie, ponieważ proces ten wymagałby jednoczesnego zerwania obu wiązań C5-O9 i O9-S10.



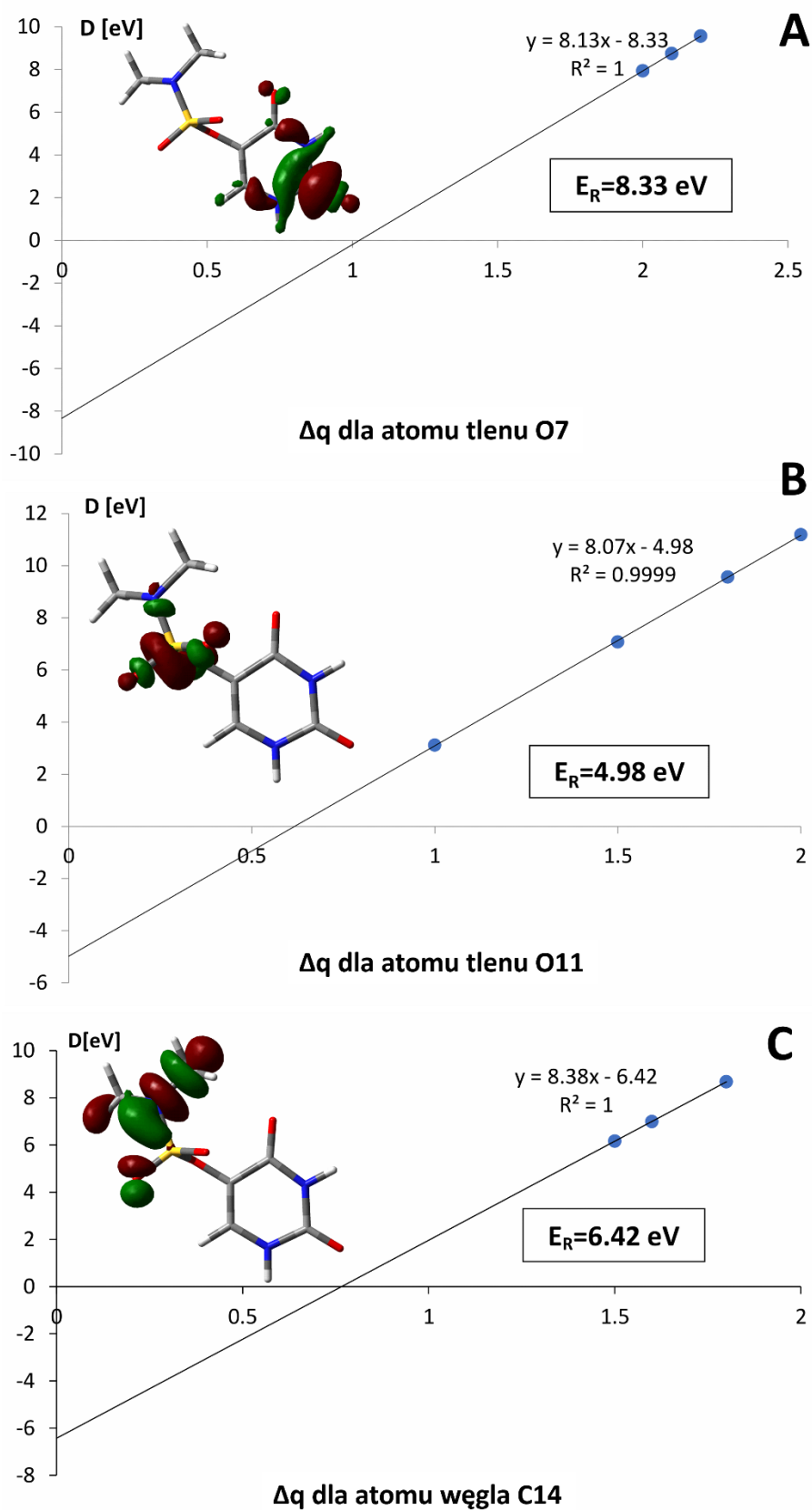
Rysunek 34. Wydajność tworzenia anionów o m/z 16 i 15 w funkcji energii elektronu dla DEA do DMSU [116].

4.1.6. Pozycje rezonansów dla anionów o m/z 16 i 15.

Aby przypisać otrzymany eksperymentalnie rezonans do miejsca fragmentacji, wyznaczono bariery termodynamiczne dla wszystkich czterech możliwych miejsc uwolnienia anionu O^- . Obliczone wartości sugerują, że tworzenie O^- z pozycji O11 i O12 jest energetycznie bardziej korzystne ($\Delta G_{386,15K}$ = odpowiednio 2,45 eV dla O11 i 2,32 eV dla O12) niż z pozycji O7 i O8 ($\Delta G_{386,15K}$ = 4,57 eV i 4,83 eV), jednak określenie prawdopodobnej ścieżki degradacji jedynie na podstawie obliczonych bodźców termodynamicznych nie pozwala na jednoznaczną interpretację eksperymentu. Dlatego zdecydowano się na oszacowanie pozycji rezonansów za pomocą tzw. metody stabilizacyjnej, która została omówiona w **Rozdziale 3.1.3**. Ekstrapolacja energii wiązania elektronu D do $\Delta q=0$ pokazała, że stan rezonansowy, odpowiadający uwolnieniu tlenu z pierścienia pirymidynowego (zarówno z pozycji O7, jak i O8) powstaje przy energii elektronów rzędu $\sim 8,3$ eV (**Rysunek 35A**), natomiast do oderwania anionu tlenu (O11 lub O12) z ugrupowania sulfonamidowego wymagana jest energia rzędu $\sim 5,0$ eV (**Rysunek 35B**). Pozycje rezonansów uzyskane metodą stabilizacji ładunku odpowiadają więc eksperymentalnym wartościom energii oderwania tlenu (4,7 oraz 8,8 eV). Obecność podobnego charakterystycznego rezonansu dla O^- odnotowano również w eksperymencie CEMB przeprowadzonym dla związku SU (patrz **Rozdział 4.1.2**).

Masę 15 m/z można interpretować jako CH_3^- lub NH^- . Początkowo założono, że powstanie anionu NH^- jest znacznie mniej prawdopodobne, z uwagi na fakt, że wymaga

dysocjacji dwóch wiązań w cząsteczce DMSU, podczas gdy powstanie anionu CH_3^- jest związane z pęknięciem jednego wiązania. Jednak wyznaczona teoretycznie wartość bodźca termodynamicznego, związanego z powstawaniem CH_3^- ($\Delta G_{386,15\text{K}} = 3,12 \text{ eV}$) była dwukrotnie niższa niż wyznaczona eksperymentalnie ($\Delta G_{\text{exp}} = 6,0 \text{ eV}$). Dlatego podjęto próbę wyjaśnienia powstawania tego anionu w oparciu o metodę stabilizacyjną. Uzyskane tą metodą pozycje rezonansowe tworzenia anionu CH_3^- wyniosły 6,21 i 6,42 eV (w zależności od rozpatrywanej grupy metylowej, **Rysunek 35C**), które były znacznie niższe, niż wartość rezonansu zarejestrowanego w eksperymencie (8,5 eV). Warto wspomnieć, że zarejestrowane w procesie DEA dla glicyny pozycje rezonansów odpowiadające anionom NH^- i CH_3^- wynosiły odpowiednio około 11 eV oraz 6 eV [125]. Poprzez analogię stwierdzono, że sygnał o masie 15 m/z jest związany raczej z uwalnianiem anionu NH^- niż CH_3^- .



Rysunek 35. Energia wiązania elektronu (D) w funkcji nadmiarowego ładunku dodatniego (Δq) na jądrach wybranych atomów. E_R oznacza pozycję rezonansu związaną z uwolnieniem: O7 (A), O11 (B) lub grupy metylowej C(14)H3 (C) [116].

4.1.7. Wnioski

W Projekcie B zbadano degradację *N,N*-dimetyloamidosiarczanu 5-hydroksyuracylu (DMSU), indukowaną przyłączeniem niskoenergetycznych elektronów w fazie gazowej. Zaobserwowano 10 anionów fragmentacyjnych, które mogą powstawać na drodze pęknięcia jednego lub wielu wiązań. Większość kanałów DEA jest obserwowanych przy energii elektronów rzędu 0 eV. Uzyskane ścieżki fragmentacji są podobne do obserwowanych wcześniej dla amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu, stąd wniosek, że metylowanie SU nie wpływa jakościowo na zjawisko DEA. Metoda stabilizacyjna pozwoliła zidentyfikować pozycje rezonansów odpowiedzialne za powstawanie anionów fragmentacyjnych o m/z 16 i 15.

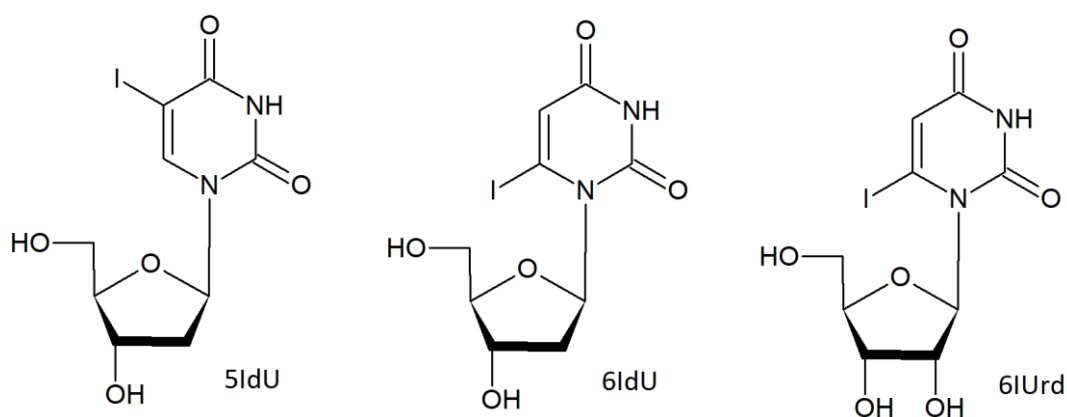
4.2. Badanie stabilności jodopochodnych deoksyurydyny i urydyny w środowisku wodnym

4.2.1. Wprowadzenie

Większość rozważanych radiosensybilizatorów z klasy pochodnych tyminy to pirymidyny podstawione atomem halogenu lub inną elektronoakceptorową grupą funkcyjną w pozycji C5. Tego rodzaju radiosensybilizatory oraz mechanizmy ich działania zostały opisane w **Rozdziale 1.4**. Inną pozycją pierścienia pirymidynowego, której modyfikację można rozważać w kontekście projektowania związków radiosensybilizujących, jest pozycja C6. Sensowność takiej modyfikacji sugerują wyniki badań teoretycznych nad 6-bromopodstawionymi pochodnymi 2'-deoksyurydyny oraz 2'-deoksycytydyny. Rzeczywiście, obliczenia wykazały, że rodnik urydyno-6-yłowy / cytydynylo-6-yłowy tworzy się przy niskiej barierze kinetycznej w trakcie dysocjacyjnego przyłączenia elektronu do odpowiednich nukleozydów i jest w stanie oderwać atom wodoru nie tylko z ugrupowania cukrowego sąsiedniego nukleozydu w nici DNA, ale również od własnej 2'-deoksyrzybozy [126,127]. Wydaje się więc, że pirymidyny modyfikowane w pozycji 6 powinny być związkami o właściwościach radiosensybilizujących porównywalnych lub lepszych od pirymidyn podstawionych w pozycji 5.

Istotną kwestię związaną z trwałością nukleozydów, stanowi ich zachowanie w środowisku wodnym żywych komórek. Jedną z podstawowych reakcji, jakim mogą ulegać nukleozydy w roztworze wodnym jest ich hydroliza, w wyniku której następuje dysocjacja wiązania N-glikozydowego. Przy czym, według Kochetkova, deoksyrbonukleozydy hydrolizują nawet 100 – 1000 razy szybciej niż rybonukleozydy [128]. Rzeczywiście, czas połowicznej przemiany $\tau_{1/2}$ dla hydrolizy 2'-deoksyurydyny (dU) wynosi 104 min, podczas gdy urydyna (Urd) poddawana działaniu wody nawet trzykrotnie dłużej, jest hydrolizowana tylko w niewielkim stopniu (5% po upływie 5 h). Również rodzaj zasady azotowej wpływa na stabilność wiązania N-glikozydowego, a tym samym na szybkość hydrolizy. Okazuje się, że hydroliza nukleozydów purynowych jest wydajniejsza niż pirymidynowych [128]. Szybkość hydrolizy zależy również od podstawników związanych z zasadą azotową. I tak, stopień degradacji wiązania N-glikozydowego dla 2'-deoksycytydyny (dC) wynosi 76%, dla dU – 3%, a dla 5XdU, gdzie X = F, Cl lub Br, 13 – 17% (hydroliza prowadzona w środowisku 5% kwasu trichlorooctowego przez 30 min w 100°C) [128].

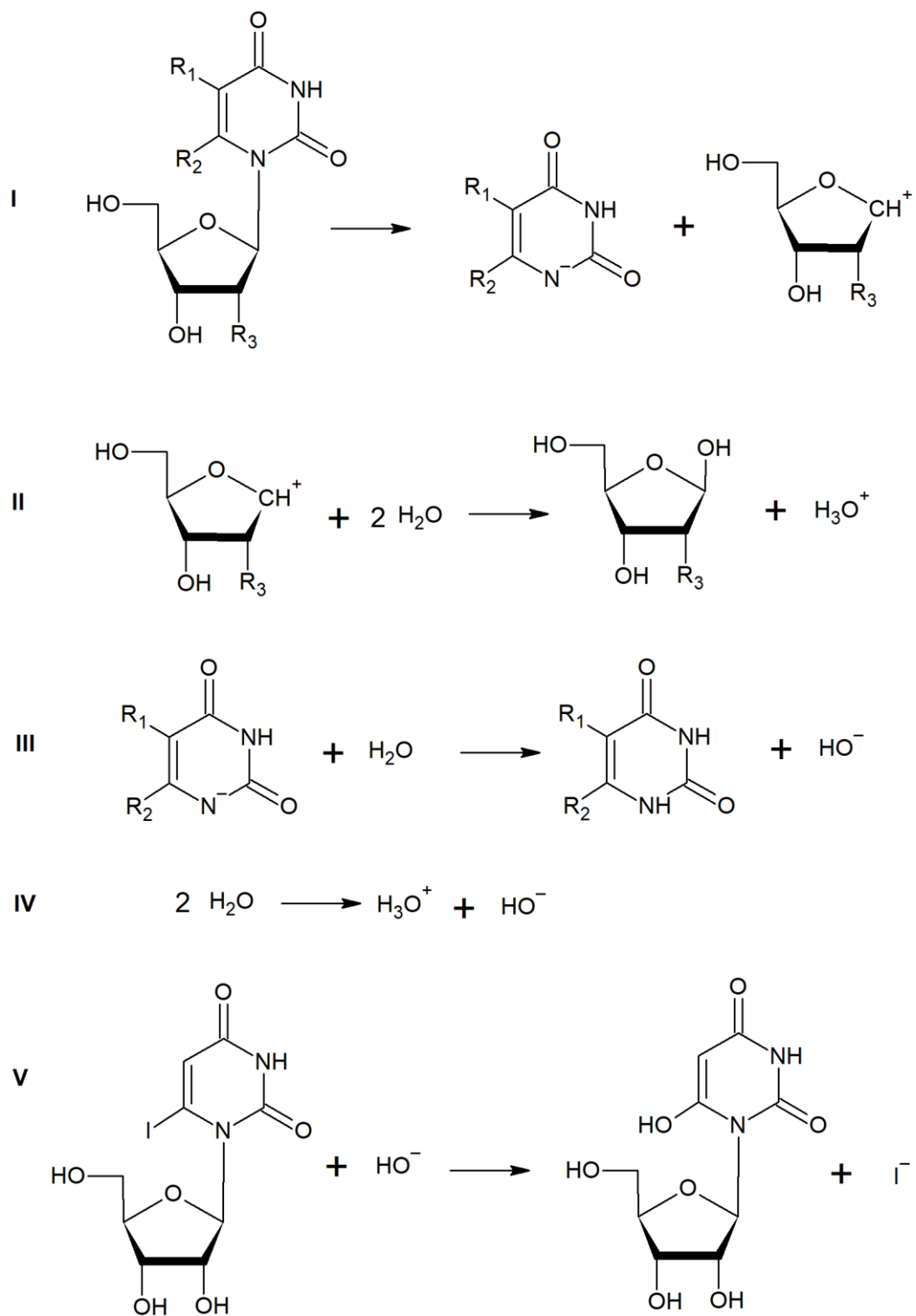
W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki badań nad stabilnością 6-jodo-2'-deoksyurydyny (6IdU, **Rysunek 36**), 6-jodourydyny (6IUrd, **Rysunek 36**) oraz 5-jodo-2'-deoksyurydyny (5IdU, **Rysunek 36**) w środowisku wodnym. Mechanizm hydrolizy badanych związków scharakteryzowano przy pomocy obliczeń kwantowochemicznych, metodą DFT. Wykonano również teoretyczne symulacje kinetyki hydrolizy dla trzech badanych pochodnych urydyny.



Rysunek 36. Struktury badanych pochodnych urydyny: 5-jodo-2'-deoksyurydyna (5IdU), 6-jodo-2'-deoksyurydyna (6IdU) oraz 6-jodourydyna (6IUrd).

4.2.2. *Możliwy mechanizm hydrolizy*

Prawdopodobny mechanizm hydrolizy 6IdU, 6IUrd oraz 5IdU przedstawiono na **Rysunek 37**. Główną reakcją (I) jest heterolityczna dysocjacja wiązania N-glikozydowego C1'-N1, w wyniku której powstają dwa produkty – karbokation reszty cukrowej oraz anion uracylu, podstawionego atomem jodu w pozycji 5 lub 6. Pełna analiza mechanizmu reakcji hydrolizy wymaga uwzględnienia reakcji następczych, jakimi są reakcje addycji wody do powstającego karbokationu reszty cukrowej (reakcja II) oraz reakcja protonowania anionu pochodnej uracylu (reakcja III), jak również autodysocjacja wody (reakcja IV).



5IdU: $R_1 = \text{I}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}$; **6IdU:** $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{I}, R_3 = \text{H}$; **6IUrd:** $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{I}, R_3 = \text{OH}$

Rysunek 37. Reakcje elementarne dla badanego mechanizmu hydrolizy. Reakcja V dotyczy wyłącznie 6IUrd.

Eksperymentalna wartość entalpii swobodnej aktywacji dla heterolitycznej dysocjacji wiązania glikozydowego C1'-N1 dla 2'-deoksyurydyny (dU) wynosi 30,5 kcal/mol [129]. Przybylski ze współpracownikami przeprowadzili badania kwantowochemiczne dla hydrolizy dU, wykorzystując metodę B3LYP/6-31+G(d,p), i uzyskali wartość energii zbliżoną do stwierdzonej eksperymentalnie, tj. 28,7 kcal/mol [130].

Dobierając metodologię badań hydrolizy jodopochodnych w ramach niniejszej pracy, wykorzystano trzy funkcjonały, przy pomocy których wyznaczono zmiany entalpii swobodnej dysocjacji wiązania C1'-N w dU (układ referencyjny) oraz w trzech diskutowanych pochodnych (**Tabela 8**).

Tabela 8. Zmiany entalpii swobodnej (ΔG) w reakcji dysocjacji wiązania N-glikozydowego C1'-N1 w dU dla wybranych funkcjonałów DFT, w kcal/mol. Wartości wyznaczone w środowisku wodnym (model PCM) i przy użyciu bazy funkcyjnej DGDZVP++.

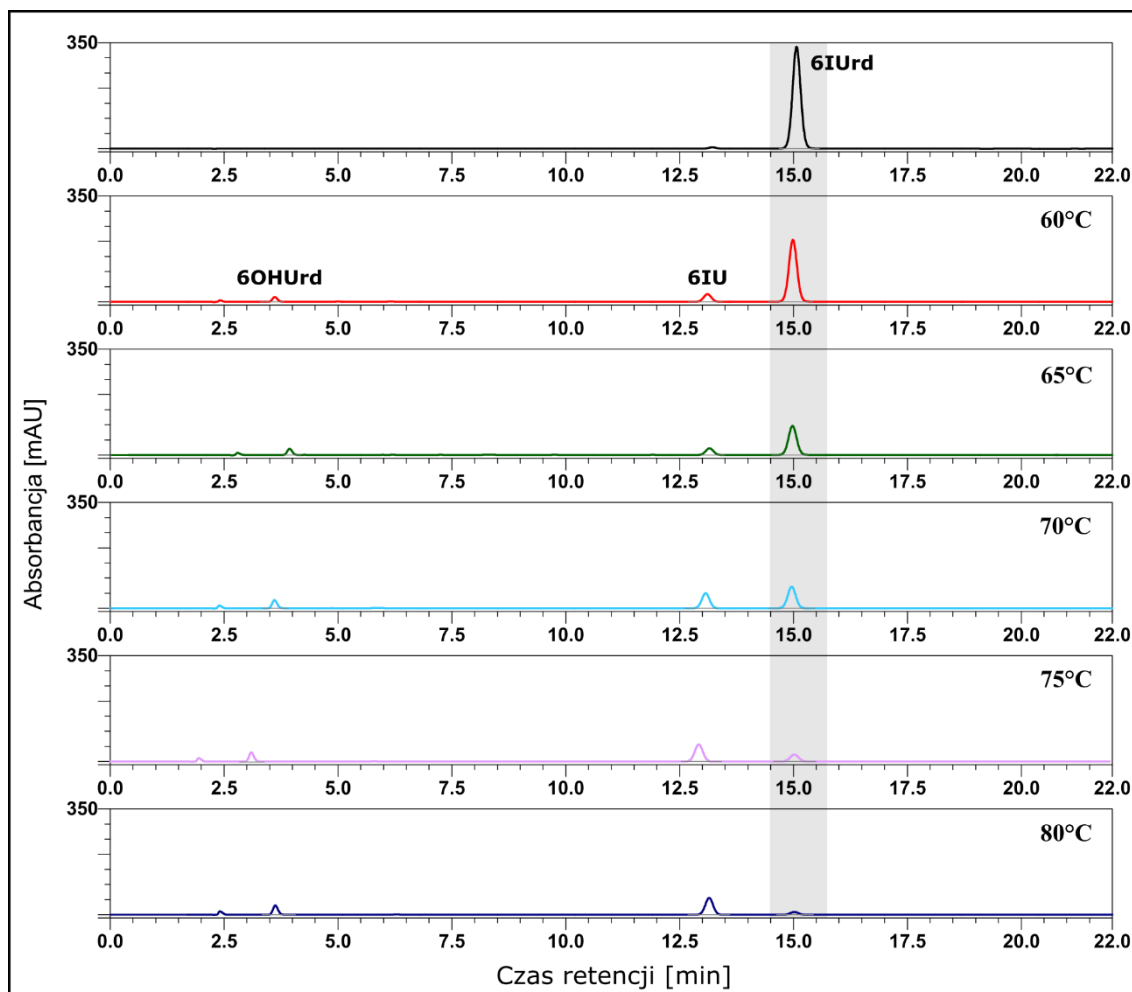
Funkcjonał	ΔG dysocjacji C1'-N1			
	dU	5IdU	6IdU	6IUrd
B3LYP	28,2	24,3	11,9	17,9
CAM-B3LYP	34,2	30,5	17,9	24,1
ω B97XD	37,2	33,5	21,5	28,7

B3LYP jest klasyczną metodą do badania dysocjacji wiązania N-glikozydowego [131-133]. Chen w celu opisanego tego typu reakcji zastosował zestaw różnego typu funkcjonałów, w tym funkcjonały hybrydowe z korekcją na niepoprawne dalekozasięgowe zachowanie funkcjonału wymiennego: CAM-B3LYP i ω B97XD. Zadowolającą dokładność uzyskał dla funkcjonału CAM-B3LYP. Jak wskazują wartości zebrane w **Tabela 8**, funkcjonały B3LYP i CAM-B3LYP prowadzą do najbardziej zbliżonego wyniku w porównaniu z wartością eksperymentalną. Z drugiej strony, jak pokazano w dalszej części tekstu, obliczenia i pomiary wykonane w ramach niniejszego projektu dla 6IUrd wykazały, że wyniki CAM-B3LYP są najbardziej spójne z danymi eksperymentalnymi. Dlatego ostateczne obliczenia teoretyczne wykonano posługując się funkcjonałem CAM-B3LYP.

Dane literaturowe pokazują, że próby syntezy 6-arylo-2'-deoksyurydyny poprzez pochodne 6-jodo-2'-deoksyurydyny skończyły się niepowodzeniem [134]. Mimo to podjęto próbę syntezy 6IdU. Rozpoczęto od potraktowania dU dwoma równoważnikami chlorku t-butylodimetylosililowego (TBDMSCl) w obecności imidazolu. Następnie dU

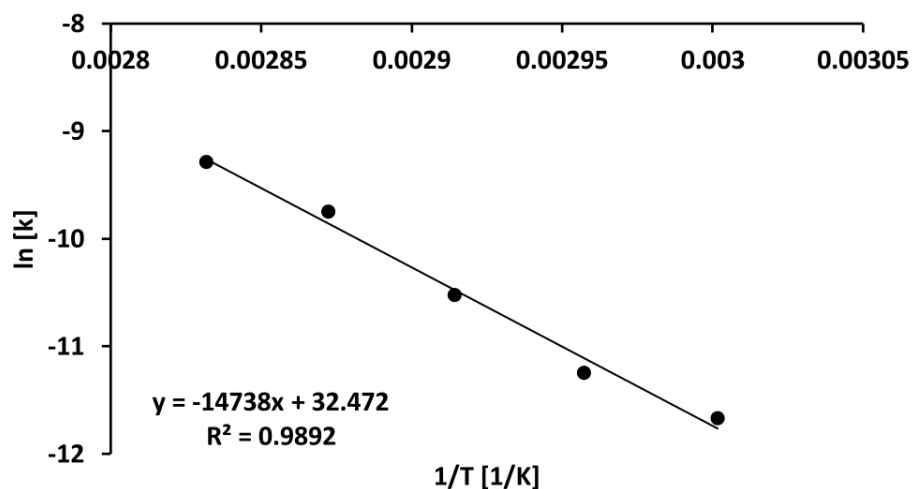
chronioną TBDMS poddano działaniu litowej pochodnej diizopropylaminy (LDA) i jodu w temperaturze -78°C , otrzymując 2',5'-di-t-butylodimetylosilylo-6-iodo-2'-deoksyurydynę. W ostatnim kroku przeprowadzono deprotekcję grup 2'- i 5'-hydroksylowych przy użyciu fluorku tetrabutylamonowego (TBAF). Postęp reakcji monitorowano przy pomocy techniki TLC. Chromatogramy TLC potwierdzały pojawianie się pożądanego produktu. Jednak próba izolacji 6IdU przy pomocy HPLC z użyciem faz odwrotnych, po której przeprowadzono liofilizację zebranej frakcji kończyła się ilościowym otrzymaniem 6-jodouracylu zamiast 6IdU, co wskazuje na znaczącą niestabilność nukleozydu w wodzie. Aby lepiej zrozumieć obserwowany brak stabilności 6IdU, zdecydowano się na syntezę podobnego związku, 6IUrd, co pozwoliło na zbadanie wpływu grupy 2'-OH na stabilność tego typu pochodnych. 6IUrd została zsyntezowana poprzez modyfikację protokołów funkcjonujących w literaturze [135,136]. Hydroliza 6IUrd prowadzi, poza głównym produktem, 6-jodouracylem, również do wytworzenia niewielkich ilości 6-hydroksyurydyny.

Zsyntezowany 6IUrd poddano badaniom kinetycznym. Aby reakcja biegła w wygodnych dla prowadzenia eksperymentu czasach, układ termostatowano w podwyższonych temperaturach, po czym po określonym czasie reakcję „przerywano”, obniżając gwałtownie temperaturę do temperatury pokojowej. Postępowanie to umożliwiło wyznaczenie doświadczalnej energii aktywacji reakcji hydrolizy 6IUrd. **Rysunek 38** pokazuje, że wzrost temperatury, dla określonego czasu prowadzenia reakcji, powoduje coraz większy zanik substratu oraz pojawienie się równoważnej ilości 6-jodouracylu (6IU, **Rysunek 38**). Obserwowano również tworzenie się niewielkiej ilości produktu ubocznego – 6-hydroksyurydyny (6OHUrd, **Rysunek 38**). Obydwa produkty zidentyfikowano przy pomocy spektrometrii mas.



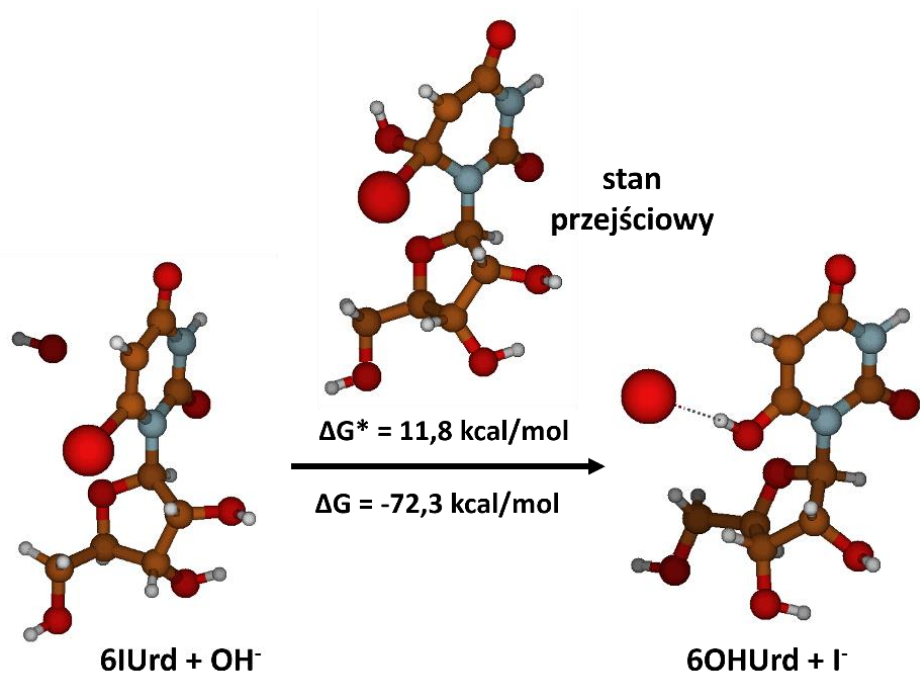
Rysunek 38. Wyniki analizy HPLC degradacji termicznej 6-jodourydyny w zakresie od 60 do 80°C po 120 min ogrzewania.

Przeprowadzona analiza HPLC pozwoliła na wyznaczenie zależności stężeń 6IUrd w funkcji czasu, a następnie doświadczalnej stałej szybkości w badanych temperaturach. Wartości stałych kinetycznych posłużyły z kolei do uzyskania wykresu Arrheniusa (**Rysunek 39**). Stałą kinetyczną w temperaturze 25°C wyznaczono z wykresu Arrheniusa, ekstrapolując wartość logarytmu ze stałej do wartości $1/T$ odpowiadającej 298 K. Na tej podstawie oszacowano doświadczalną wartość bariery aktywacyjnej hydrolizy 6IUrd w temperaturze 25°C, uzyskując 26,8 kcal/mol. Wartość ta pozostaje w dobrej zgodności z wartością obliczoną metodą CAM-B3LYP, która wynosi $\Delta G^* = 24,1$ kcal/mol (patrz **Tabela 8**).

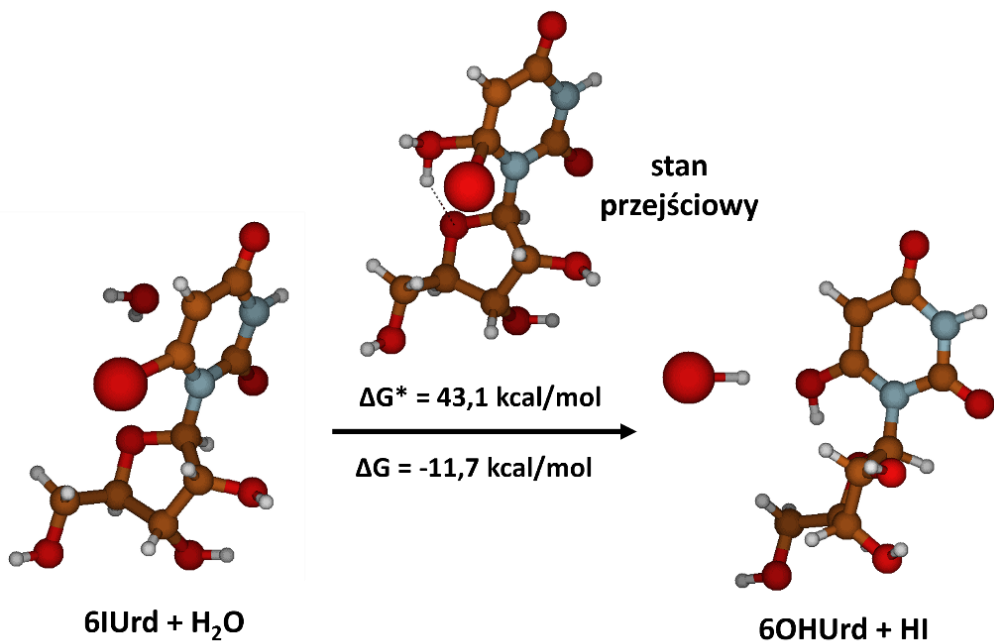


Rysunek 39. Wykres Arrheniusa – zależność logarytmu naturalnego ze stałej szybkości ($\ln k$) od odwrotności temperatury ($1/T$) dla reakcji termicznej degradacji 6IUrd w zakresie temperatur 60-80°C.

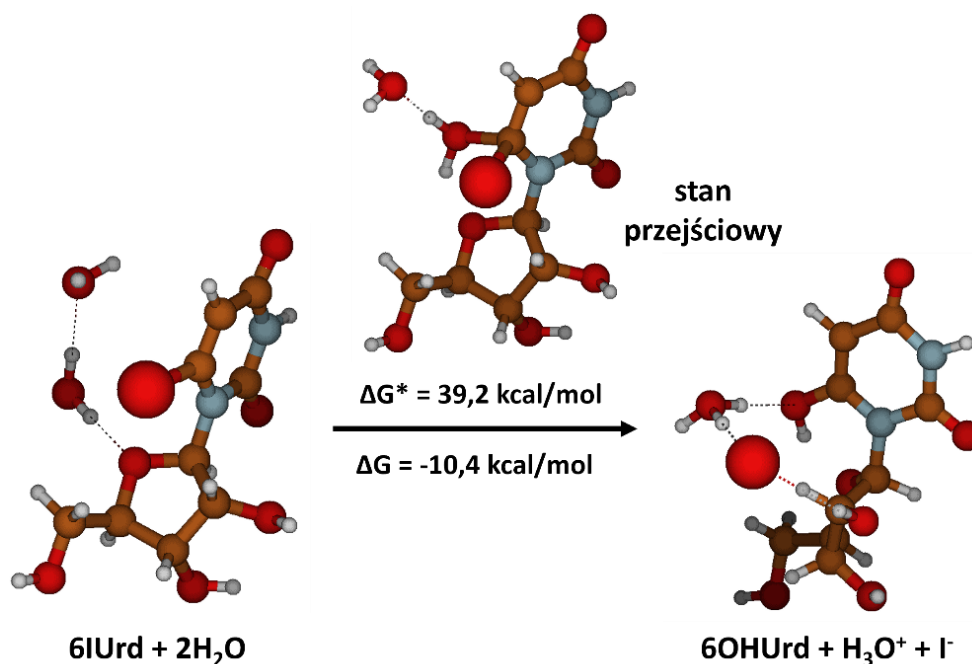
W wyniku degradacji 6IUrd powstają dwa stabilne produkty – 6-jodouracyl i 6-hydroksyurydina. Przeprowadzono więc obliczenia teoretyczne, aby określić możliwą ścieżkę tworzenia 6OHUrd. Rozważano trzy alternatywne drogi tworzenia 6OHUrd (**Rysunek 40- 41Rysunek 42**). Wszystkie trzy rozważane reakcje okazały się być termodynamicznie korzystne ($\Delta G < 0$). W wyniku reakcji 6IUrd z jedną cząsteczką wody (**Rysunek 41**), oprócz 6OHUrd, tworzy się również jodowódor (bariera kinetyczna tej reakcji wynosi $\Delta G^* = 43,1$ kcal/mol). W przypadku uwzględnienia w modelu dwóch cząsteczek wody (**Rysunek 42**) reakcja przebiega z utworzeniem kationu hydroniowego oraz anionu jodkowego z nieco niższą barierą aktywacyjną ($\Delta G^* = 39,2$ kcal/mol). Natomiast dużo niższą barierą ($\Delta G^* = 11,8$ kcal/mol) charakteryzuje się reakcja 6IUrd z anionem hydroksylowym (**Rysunek 40**). Tworzenie się 6OHUrd wydaje się więc przebiegać według mechanizmu, w którym 6IUrd reaguje z anionem OH^- (**Rysunek 37**, reakcja V).



Rysunek 40. Bodecie termodynamiczny (ΔG) oraz bariera kinetyczna (ΔG^*) tworzenia 6OHUrd w reakcji z OH⁻.



Rysunek 41. Bodecie termodynamiczny (ΔG) oraz bariera kinetyczna (ΔG^*) tworzenia 6OHUrd w reakcji z pojedynczą cząsteczką wody.



Rysunek 42. Bodziec termodynamiczny (ΔG) oraz bariera kinetyczna (ΔG^*) tworzenia 6OHUrd w reakcji z dwoma cząsteczkami wody.

4.2.3. Profile kinetyczne

Równania wyprowadzone w rozdziale 3.1.5 pozwalają określić stężenia równowagowe, jakie ustalają się w wodnych roztworach 5IdU, 6IdU oraz 6IUrd (patrz **Tabela 10**). Dane te nie mówią nic na temat czasu, po jakim stężenia te zostaną osiągnięte po przygotowaniu roztworu o określonym stężeniu początkowym nukleozydu. W tym miejscu należy podkreślić, że czas ten jest miarą stabilności związku w roztworze wodnym, decydując o praktycznym wykorzystaniu danego układu. Aby zbadać przebieg reakcji w czasie (zmiany poszczególnych stężeń w czasie), przeprowadzono symulacje kinetyczne dla wszystkich rozważanych związków. W tym celu przyjęto odpowiednie stałe szybkości reakcji elementarnych, a także stałe równowagi, które posłużyły do określenia stałych szybkości reakcji odwrotnych (**Tabela 9**). Szczegółowy sposób ich wyznaczenia przedstawiono w **Rozdziale 3.1.4**.

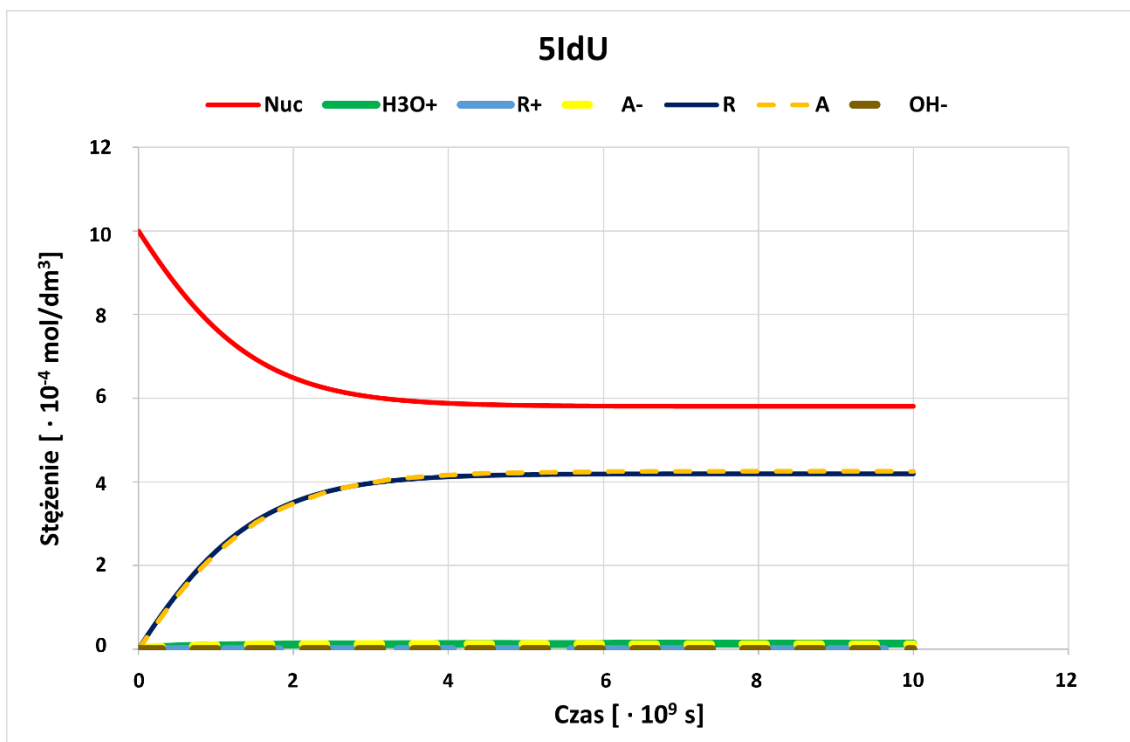
Tabela 9. Stałe szybkości poszczególnych reakcji (k_n) wraz ze stałymi równowagi (K_n). Numeracja reakcji została przedstawiona na **Rysunek 37**.

Związek	Reakcja	Stałe równowagi*	Stałe szybkości reakcji**
5IdU	I	$K_{dys} = 4,4 \cdot 10^{-23}$	$k_1 = 2,9 \cdot 10^{-10}$ $k_2 = 6,6 \cdot 10^{12}$
	II	$K_a = 7,5 \cdot 10^8$	$k_3 = 1,0 \cdot 10^{10}$ [102] $k_4 = 1,3 \cdot 10^1$
	III	$K_b = 5,4 \cdot 10^{-10}$	$k_5 = 5,0 \cdot 10^9$ [102] $k_6 = 9,3 \cdot 10^{18}$
6IdU	I	$K_{dys} = 7,6 \cdot 10^{-14}$	$k_1 = 5,0 \cdot 10^{-1}$ $k_2 = 6,6 \cdot 10^{12}$
	II	$K_a = 7,5 \cdot 10^8$	$k_3 = 1,0 \cdot 10^{10}$ [102] $k_4 = 1,3 \cdot 10^1$
	III	$K_b = 2,2 \cdot 10^{-12}$	$k_5 = 5,0 \cdot 10^9$ [102] $k_6 = 2,3 \cdot 10^{21}$
6IUrd	I	$K_{dys} = 2,2 \cdot 10^{-18}$	$k_1 = 1,4 \cdot 10^{-5}$ $k_2 = 6,6 \cdot 10^{12}$
	II	$K_a = 4,0 \cdot 10^{13}$	$k_3 = 1,0 \cdot 10^{10}$ [102] $k_4 = 2,6 \cdot 10^{-4}$
	III	$K_b = 2,2 \cdot 10^{-12}$	$k_5 = 5,0 \cdot 10^9$ [102] $k_6 = 2,3 \cdot 10^{21}$
	V	$K = 1,0 \cdot 10^{53}$	$k_9 = 1,5 \cdot 10^4$ $k_{10} = 1,5 \cdot 10^{-49}$
	IV	$K_{H_2O} = 3,3 \cdot 10^{-18}$	$k_7 = 1,4 \cdot 10^{11}$ [102] $k_8 = 4,6 \cdot 10^{-7}$

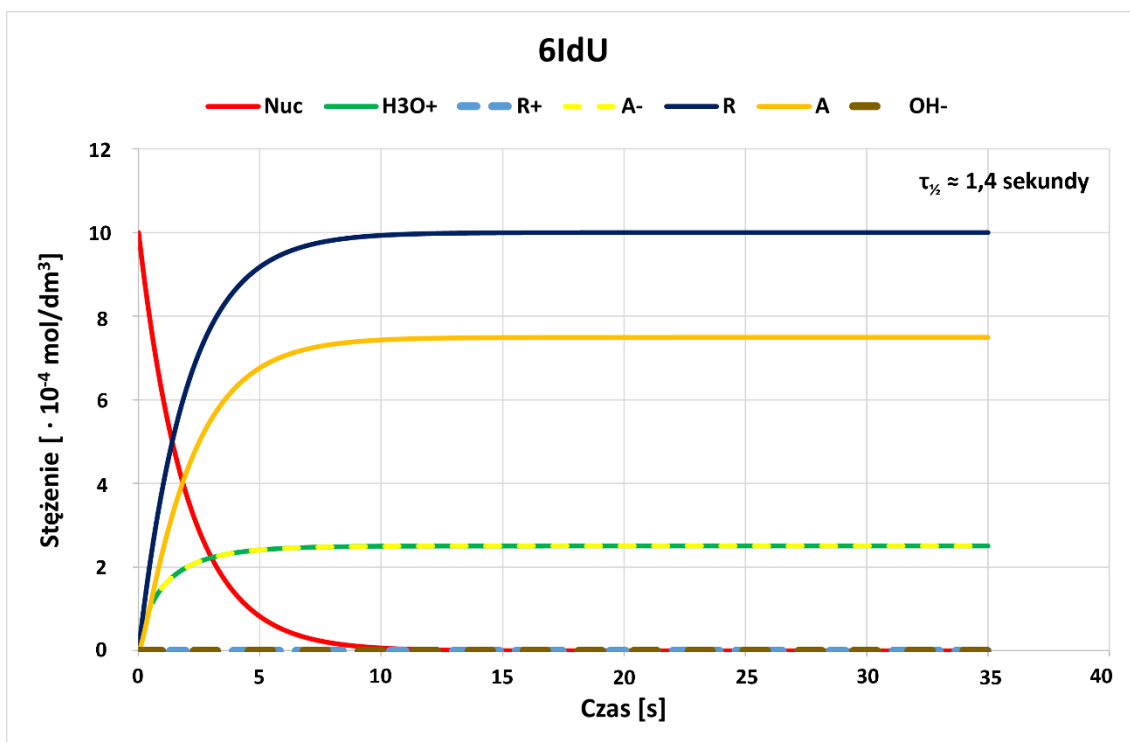
* Stałe równowagi K_a i K_b uwzględniają stężenie wody równe $55,5 \text{ mol/dm}^3$.

** Jednostka: $[s^{-1}]$ lub $[\text{dm}^3 \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}]$ w zależności od rzędu reakcji.

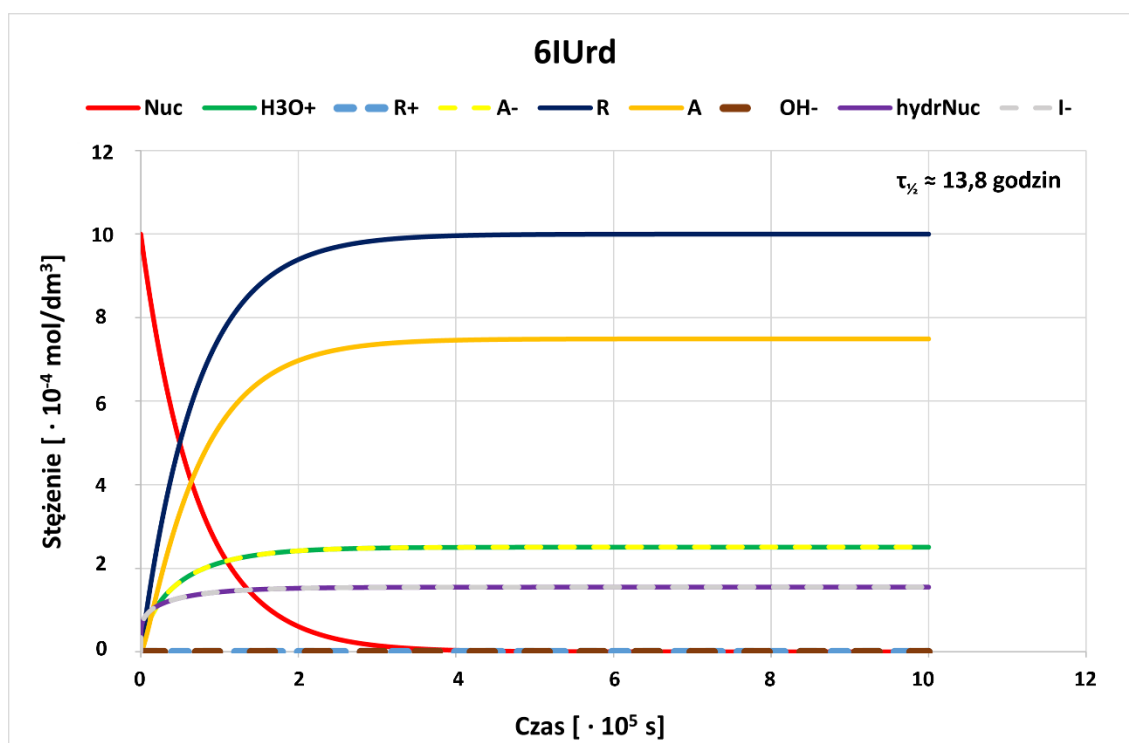
Szczegółowy opis obliczeń wymaganych do przeprowadzenia symulacji opisano w **Rozdziale 3.1.4**. W efekcie otrzymano wykresy zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu dla badanych związków (**Rysunek 43-Rysunek 45**).



Rysunek 43. Wykres zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu dla 5IdU. Nuc – nukleozyd, A – zasada, R – reszta cukrowa, A⁻ oraz R⁺ – ich formy anionowe i kationowe.



Rysunek 44. Wykres zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu dla 6IdU. Okres półtrwania oznaczono jako $\tau_{1/2}$. Nuc to nukleozyd, A – zasada, R – reszta cukrowa, A⁻ oraz R⁺ to ich formy anionowe i kationowe.



Rysunek 45. Wykres zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu dla 6IUrd. Okres półtrwania oznaczono jako $\tau_{1/2}$. Nuc to nukleozyd, A – zasada, R – reszta cukrowa, A⁻ oraz R⁺ to ich formy anionowe i kationowe, hydrNuc to 6-hydroksurydyna, I⁻ to anion jodu.

Dla wszystkich trzech układów obserwuje się spadek stężenia nukleozydu (Nuc) oraz proporcjonalny przyrost stężenia zasady (A) oraz reszty cukrowej (R). Zgodnie z danymi eksperymentalnymi (**Rysunek 38**) równowagowe stężenia 6-hydroksurydyny (hydrNuc) osiąga około 5-krotnie mniejszą wartość niż stężenie 6-jodourydyny (**Tabela 10**). W przypadku 5IdU równowaga osiągnięta jest przed całkowitym rozkładem substratu. Wykonane symulacje umożliwiają określenie czasu połowicznej przemiany $\tau_{1/2}$, czyli czasu, w którym ulega przemianie połowa początkowej ilości danego związku, a zatem i kinetycznej stabilności badanych związków. Dla 6IUrd czas ten wynosi około 13,8 godzin. Z kolei w przypadku 6IdU to niespełna 1,4 sekundy. W wodnym roztworze 5IdU stan równowagi (patrz **Tabela 10**) ustala się, zanim połowa 5IdU ulegnie przemianie i osiąga 42% początkowej wartości stężenia nukleozydu. W tym przypadku czas $\tau_{1/2}$ jest nieokreślony. Można określić czas, po którym ustala się stan równowagi (około 126 lat). Widać więc, że pochodne podstawione w pozycji 6, szczególnie 6IdU, ulegają szybkiej degradacji w środowisku wodnym, natomiast 5IdU jest trwały. Aby potwierdzić poprawność symulacji kinetycznych porównano „równowagowe stężenia kinetyczne” z faktycznymi stężeniami równowagowymi, obliczonymi przy użyciu

wzorów wyprowadzonych w **Rozdziale 3.1.5**. Jak pokazuje **Tabela 10**, wartości tych stężeń pokrywają się doskonale.

Tabela 10. Stężenia równowagowe [mol/dm³] (równowaga) oraz wynikające z symulacji kinetycznych (kinetyka; stężenia po osiągnięciu plateau, patrz rysunki 42-44) poszczególnych reagentów uczestniczących w reakcji hydrolizy jodopochodnych urydyny.

Reagent	5IdU		6IdU		6IUrd	
	równowaga	kinetyka*	równowaga	kinetyka*	równowaga	kinetyka*
nukleozyd [Nuc]	$5,8 \cdot 10^{-4}$	$5,8 \cdot 10^{-4}$	$3,6 \cdot 10^{-10}$	$9,0 \cdot 10^{-10}$	$2,4 \cdot 10^{-10}$	$4,1 \cdot 10^{-9}$
zasada [A]	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$
anion zasady [A ⁻]	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$
reszta cukrowa [R]	$4,2 \cdot 10^{-4}$	$4,2 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
kation reszty cukrowej [R ⁺]	$2,2 \cdot 10^{-21}$	$2,3 \cdot 10^{-21}$	$1,1 \cdot 10^{-19}$	$1,1 \cdot 10^{-19}$	$2,1 \cdot 10^{-24}$	$2,1 \cdot 10^{-24}$
[OH ⁻]	$8,5 \cdot 10^{-10}$	$7,8 \cdot 10^{-10}$	$4,0 \cdot 10^{-11}$	$4,0 \cdot 10^{-11}$	$4,0 \cdot 10^{-11}$	$4,0 \cdot 10^{-11}$
[H ₃ O ⁺]	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$
6OHUrd [hydrNuc]	-	-	-	-	-	$1,6 \cdot 10^{-4}$
anion jodu [I ⁻]	-	-	-	-	-	$1,6 \cdot 10^{-4}$

* Drobne różnice między równowagowymi a „kinetycznymi” stężeniami niektórych reagentów wynikają ze skończonego czasu całkowania równań kinetycznych.

4.2.4. Wnioski

W Projekcie C zbadano stabilność 6-jodopochodnych urydyny oraz 2'-deoksyurydyny w środowisku wodnym. W tym celu przeanalizowano mechanizm hydrolizy 6IdU, 6IUrd oraz 5IdU. Dodatkowym potwierdzeniem skłonności 6-jodopochodnych do ulegania hydrolizie były przeprowadzone symulacje kinetyki tej reakcji, które pokazały, jak stężenia poszczególnych reagentów zmieniają się w czasie oraz umożliwiły wyznaczenie ich czasu połowicznej przemiany (stabilności).

Uzyskane wyniki sugerują, że 6-jodo-2'-deoksyurydyna nie może być stosowana jako radiosensybilizator uszkodzeń DNA ze względu na swoją dużą niestabilność w środowisku wodnym. Oszacowany czas połowicznej przemiany 6IdU (około 1,4 sekundy) wskazuje na jej bardzo szybką degradację. Lepiej wygląda sytuacja w przypadku drugiego analogu (6IUrd), dla którego czas ten jest dłuższy i wynosi około 13,8 godzin.

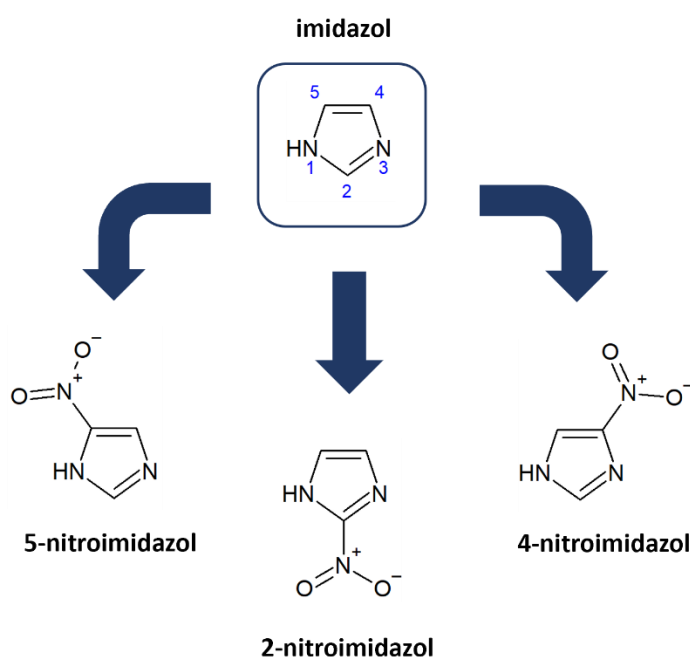
Niższa stabilność w wodzie 6-podstawionych pochodnych urydyny (6IdU oraz 6IUrd) w porównaniu z pochodną 5-podstawioną (5IdU) jest prawdopodobnie związana z większą zawadą steryczną pomiędzy podstawnikiem (atomem jodu) a pierścieniem cukrowym. Ze względu na pozycję podstawnika zawada steryczna wydaje się znacznie

mniejsza w przypadku 5IdU. Z kolei oddziaływanie między zasadą a dodatkową grupą OH w pozycji C2' w przypadku rybozy zwiększa stabilność 6Urd w porównaniu do 6IU.

4.3. Weryfikacja literaturowych mechanizmów działania mimetyków tlenu

4.3.1. Wprowadzenie

Mimetyki tlenu stanowią grupę radiosensybilizatorów, których zadaniem jest zwalczanie skutków niedotlenienia (hipoksji), charakterystycznej dla guzów litych i zwiększających znacznie ich radiooporność, poprzez „naśladowanie” działania tlenu. Najbardziej znanym przykładem mimetyków są nitroimidazole (**Rysunek 46**). Mimo wieloletnich badań nad pochodnymi nitroimidazolu jako radiosensybilizatorami, tylko nimorazol (**Rysunek 14**) jest stosowany w praktyce klinicznej, w leczeniu raka głowy i szyi w Danii [72] (patrz **Rozdział 1.5**).



Rysunek 46. Struktura imidazolu, wraz z numeracją pierścienia, oraz jego pochodne nitrowe: 2-,4- oraz 5-nitroimidazol.

Mechanizm działania nitroimidazoli jako radiosensybilizatorów pozostaje wciąż niejasny. Jedną z hipotez opiera się na mechanizmie rodnikowym uszkodzenia DNA zaproponowanym przez grupę O’Neilla [78]. Odmienne sposoby działania tych związków zostały zaprezentowane przez Edwardsa, który postulował, że w procesie radiosensybilizacji uczestniczą elektrony [79]. Oba mechanizmy zostały opisane w **Rozdziale 1.5.2**.

W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki badań mające na celu zidentyfikowanie możliwego mechanizmu działania związków z grupy nitroimidazoli:

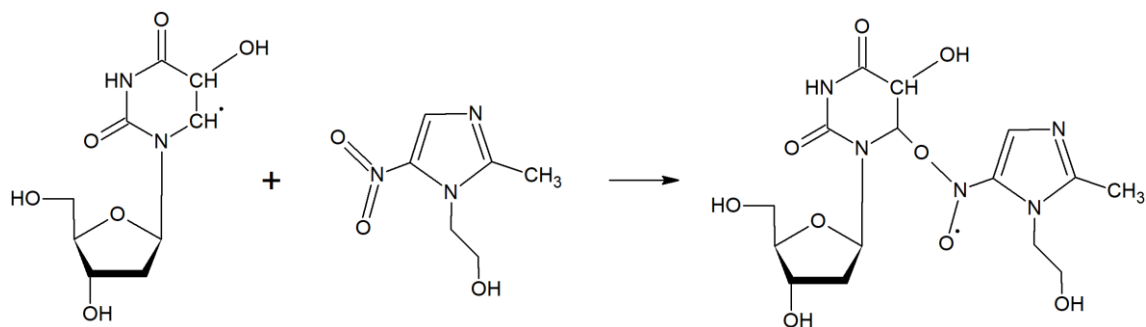
obliczenia kwantowochemiczne oraz analiza chemometryczna. Projekt D składał się z dwóch części:

1. Weryfikacja jednego z literaturowych mechanizmów działania mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli – mechanizmu rodnikowego postulowanego przez O'Neill'a przy pomocy badań kwantowochemicznych oraz ich porównanie z uzyskanymi wynikami badań radiolizy stacjonarnej wykonanych w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego.
2. Analiza chemometryczna zgromadzonych danych eksperymentalnych związanych z aktywnością radiosensybilizującą nitroimidazoli. Utworzenie dwóch modeli QSAR, opierających się o deskryptory związane z mechanizmami rodnikowym lub elektronowym działania mimetyków tlenu dla zbioru znanych nitroimidazoli.

4.3.2. Obliczenia kwantowochemiczne dla mechanizmu rodnikowego

Aby zweryfikować hipotezę O'Neill'a, wg której nitroimidazole wywołują pęknięcia nici DNA w oparciu o reakcje rodnikowe, modelowano postulowany mechanizm przy pomocy metod chemii kwantowej, a pierwszy jego etap potwierdzono przy pomocy radiolizy stacjonarnej.

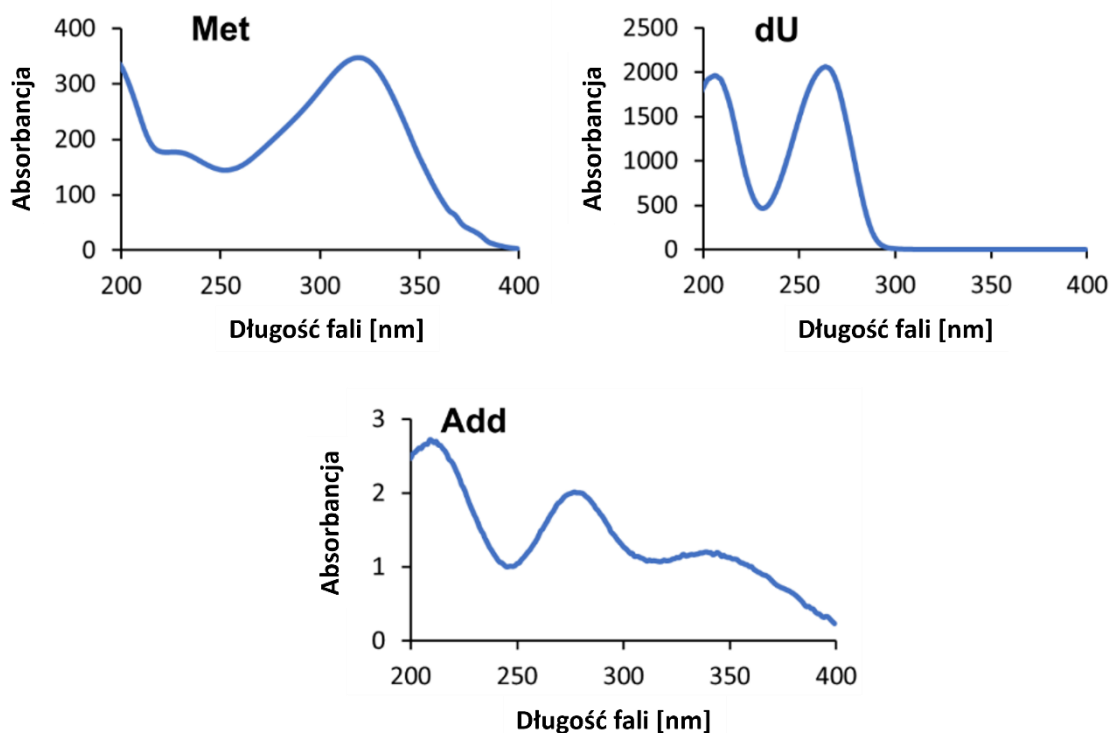
O'Neill postulował, że proces uszkodzenia DNA pod wpływem nitroimidazoli rozpoczyna się od utworzenia rodnika 5-hydroksypirymidyny, pod wpływem działania rodnika hydroksylogowego na DNA, a następnie reakcji tego rodnika z grupą nitrową cząsteczki nitroimidazolu, prowadzącą do utworzenia specyficznego adduktu (**Rysunek 47**). Możliwość utworzenia takiego adduktu sprawdzono w układzie 2'-deoksyurydyna–metronidazol (**Rysunek 47**). Dobór związków był motywowany ich komercyjną dostępnością.



Rysunek 47. Pierwszy etap mechanizmu rodnikowego - tworzenie adduktu 2'-deoksyurydyna-metronidazol.

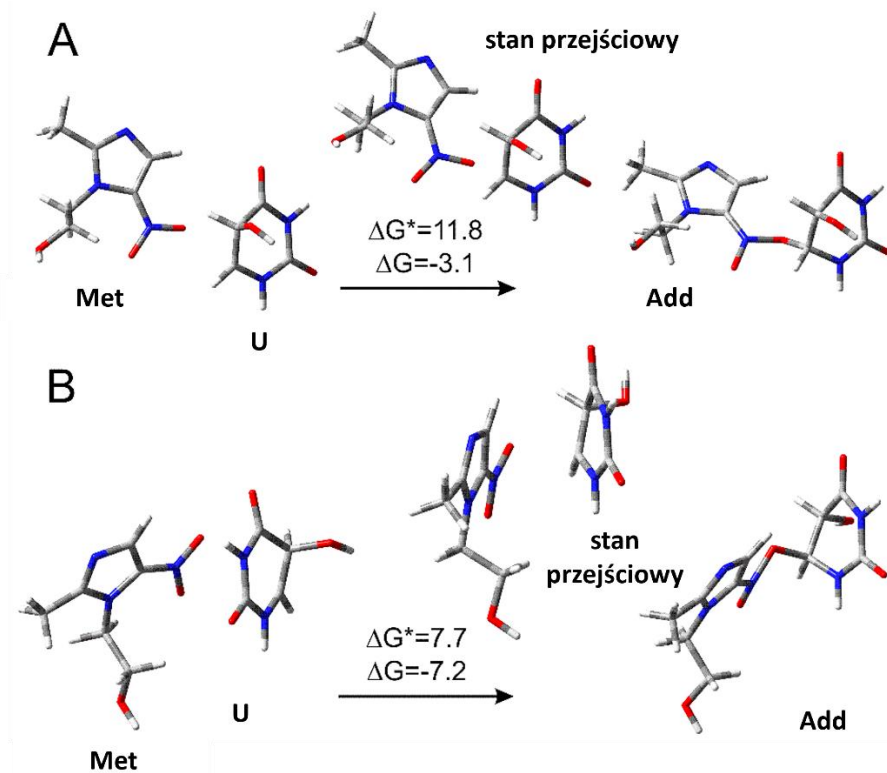
Możliwość utworzenia opisywanego adduktu została potwierdzona w eksperymencie radiolizy stacjonarnej w układzie 2'-deoksyurydyna (dU) – metronidazol (Met). Roztwór przygotowano w roztworze buforu fosforanowego (pH = 7,5) i napromieniano w temperaturze pokojowej dawką 300 Gy. Przed napromienieniem mieszaninę nasycano gazem N₂O w celu przekształcenia solwatowanych elektronów w rodniki hydroksylowe.

Na widmie UV widoczne są charakterystyczne maksima odpowiadające położeniu widm dU i Met (**Rysunek 48**). Porównując je z uzyskanym produktem radiolizy można stwierdzić, że obserwuje się powstawanie adduktu (Add), który prawdopodobnie powstaje w reakcji rodnika 5-hydroksypirymidynowego z metronidazolem – widmo Add jest złożeniem widma Met i dU (**Rysunek 48**).

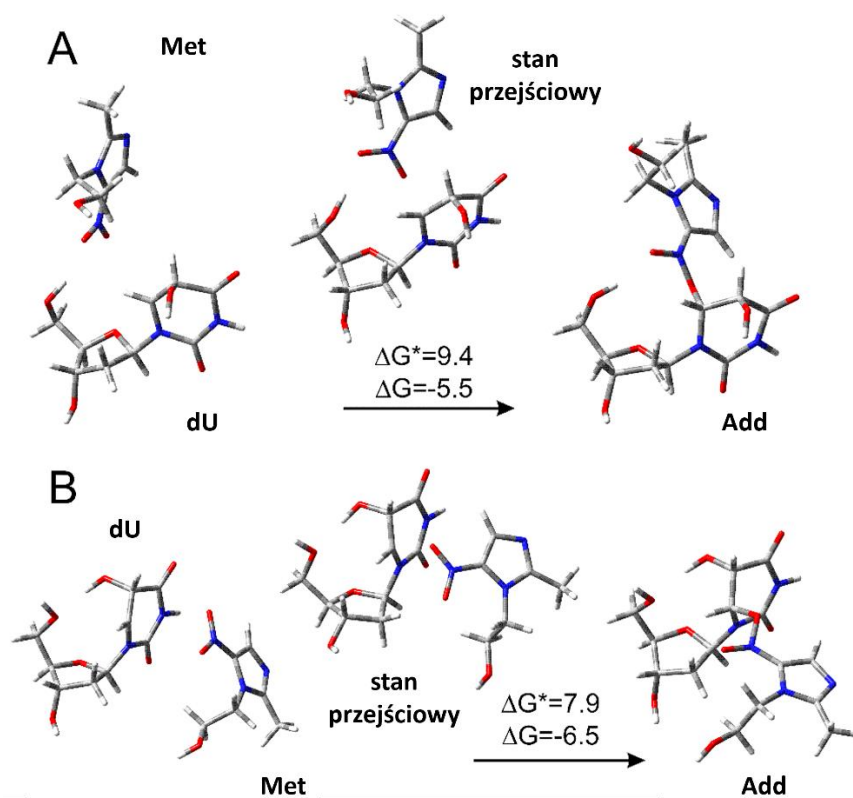


Rysunek 48. Widmo UV/VIS metronidazolu (Met) i 2'-deoksyurydyny (dU) oraz produktu pierwszego etapu mechanizmu rodnikowego – adduktu rodnika 5-hydroksy-2'-deoksyurydyny z metronidazolem (Add).

Możliwość utworzenia postulowanego adduktu została również zbadana metodą B3LYP/6-31++G(d,p) w środowisku wodnym dla modeli: (a) rodnik 5-hydroksyuracylu – metronidazol ($5\text{OHU}^\bullet\text{-Met}$, **Rysunek 49**) oraz (b) rodnik 5-hydroksy-2'-deoksyurydyny – metronidazol ($5\text{OHdU}^\bullet\text{-Met}$, **Rysunek 50**). Uzyskane wartości bodźców termodynamicznych w obu przypadkach wskazywały na reakcję egzoergiczną ($\Delta G = -7,2$ kcal/mol dla $5\text{OHU}^\bullet\text{-Met}$ vs. $\Delta G = -6,5$ kcal/mol dla $5\text{OHdU}^\bullet\text{-Met}$). Bariery aktywacyjne związane z przyłączeniem grupy nitrowej do pirymidyny również okazały się być niewysokie (odpowiednio $\Delta G^* = 7,7$ oraz $\Delta G^* = 7,9$ kcal/mol). Uzyskane podobne wartości bodźców termodynamicznych i kinetycznych sugerują ponadto, że rozszerzenie modelu o dalsze fragmenty łańcucha DNA (np. o grupę fosforową czy kolejny nukleotyd) nie powinno wpłynąć znacząco na wydajność reakcji, o ile zapewniony będzie steryczny dostęp metronidazolu do 5-hydroksyrodnika pirymidynowego. Obliczenia oraz eksperyment radiolityczny sugerują więc, że możliwe jest wytworzenie specyficznego adduktu Add na skutek reakcji rodnika 5-hydroksyuracylu z metronidazolem.



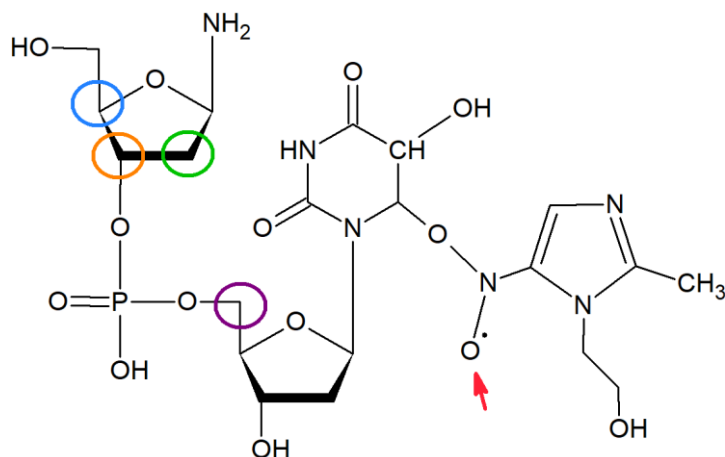
Rysunek 49. Bódźce termodynamiczne (ΔG) oraz bariery kinetyczne (ΔG^*) tworzenia adduktu metronidazol-U [kcal/mol] dla dwóch stereoizomerów (A,B).



Rysunek 50. Bódźce termodynamiczne (ΔG) oraz bariery kinetyczne (ΔG^*) tworzenia adduktu metronidazol-dU [kcal/mol] dla dwóch stereoizomerów (A,B).

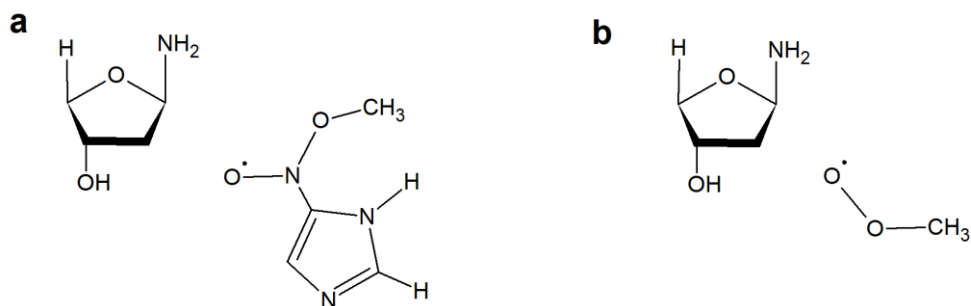
O ile udowodniona zarówno teoretycznie, jak i eksperymentalnie, możliwość powstawania adduktu 5OHdU[•]-Met sugerowałaby, że proponowany przez O'Neill'a mechanizm rodnikowy jest właśnie tym, który tłumaczy radiosensybilizujące właściwości nitroimidazoli, tak analiza kolejnych etapów tego mechanizmu nasuwa inne wnioski. Aby sprawdzić możliwość przeniesienia atomu wodoru ze szkieletu cukrowo-fosforowego na rodnik grupy nitrowej, konieczne było rozszerzenie modelu obliczeniowego tak, aby zawierał co najmniej fosforan i kolejną 2'-deoksyrybozę od strony C5'-końca (**Rysunek 51**). Na powiększonym w ten sposób modelu ponownie sprawdzono wartość bariery termodynamicznej reakcji tworzenia adduktu, która ponownie potwierdziła, że ten etap jest etapem egzoergicznym ($\Delta G = -2,3$ kcal/mol).

Jednak postulowany przez O'Neill'a kolejny etap mechanizmu, przeniesienie atomu wodoru ze szkieletu cukrowo-fosforowego, okazał się termodynamicznie niedozwolony, bez względu na pozycję wodoru, z której atom ten miał się przenieść na rodnik grupy nitrowej (**Rysunek 51**). Każda z czterech rozpatrywanych ścieżek wiąże się z wysoką barierą termodynamiczną. Omawiane bariery oszacowano na poziomie DFT na: $\Delta G_{C5'} = 22,7$ kcal/mol dla przeniesienia atomu wodoru przy atomie C5' (fioletowy znacznik na **Rysunek 51**) oraz $\Delta G_{C2'} = \Delta G_{C3'} = 26,2$ kcal/mol (przeniesienie atomu wodoru z pozycji C2' – znacznik zielony i C3' sąsiedniej deoksyrybozy – znacznik pomarańczowy). Najniższą wartość bariery termodynamicznej ($\Delta G_{C4'} = 12,0$ kcal/mol) uzyskano dla przeniesienia atomu wodoru z pozycji C4' sąsiedniej rybozy (znacznik niebieski na **Rysunek 51**). Jednak nawet ta najniższa wartość jest zdecydowanie zbyt wysoka, aby założyć faktyczną realizację tej drogi przekształcenia substratu. Ponadto, jest to pozycja najbardziej niedostępna sterycznie spośród rozpatrywanych (została wybrana ze względu na to, że była ona postulowana w oryginalnym mechanizmie O'Neill'a), więc można się spodziewać, że bariera kinetyczna dla tej reakcji byłaby nawet wyższa niż bariery kinetyczne dla pozostałych ścieżek.



Rysunek 51. Drugi etap mechanizmu rodnikowego – przeniesienie protonu. Czerwoną strzałką zaznaczono atom tlenu uczestniczący w reakcji oraz alternatywne miejsca oderwania protonu.

Aby wykluczyć, czy uzyskane niekorzystne wysokie bodźce termodynamicznie, uniemożliwiające przeniesienie atomu wodoru ze szkieletu cukrowo-fosforanowego na rodnik grupy nitrowej adduktu (zaznaczony strzałką na **Rysunek 51**), nie są artefaktem metody DFT, zweryfikowano je przy pomocy metody o dokładności chemicznej – G2MP2. Ponieważ obliczenia w metodzie G2MP2 dla pełnego modelu (**Rysunek 51**) były bardzo czasochłonne (a być może niewykonalne), zastosowano zredukowany model centrum reakcji. W zredukowanym modelu pozostawiono rodnik grupy nitrowej, przyłączonej do pierścienia imidazolowego oraz pierścień 2'-deksyrybozy, w którym grupa C5'H-OH została zastąpiona atomem wodoru, a do odtworzenia wiązania N-glikozydowego, zamiast zasady azotowej użyto grupy amonowej (**Rysunek 52a**). Analogiczny zredukowany model zbudowano też dla rodnika tlenowego, zamiast rodnika pochodzącego od mimetyku tlenu (**Rysunek 52b**). Dla zredukowanych modeli przeprowadzono optymalizację geometrii (bez więzów) dla wszystkich reagentów na obu poziomach teorii, a obliczone wartości bodźców termodynamicznych (ΔG) zestawiono w **Tabela 11**.



Rysunek 52. Zredukowany model dla przeniesienia atomu wodoru z uwzględnieniem (a) mimetyku tlenu, (b) tlenu.

Wykorzystanie metody o dokładności chemicznej nie zmieniło jakościowo wyników uzyskanych dla metody DFT. Potwierdziły one, że drugi etap mechanizmu postulowanego przez O'Neill'a jest termodynamicznie zabroniony z uwagi na zbyt duże dodatnie wartości zmian entalpii swobodnej reakcji, czy to dla metody DFT, czy G2MP2. Dlatego mechanizmu rodnikowego działania mimetyków tlenu, zaproponowanego przez O'Neill'a, nie można jednoznacznie potwierdzić w oparciu o przeprowadzone badania teoretyczne i eksperymentalne. Dodatkowych wskazówek do wyjaśnienia tego mechanizmu postanowiono szukać w metodach chemometrycznych.

Tabela 11. Wartości bodźców termodynamicznych (ΔG , w kcal/mol) dla reakcji przeniesienia protonu pomiędzy 2'-deoksyurydyną a metronidazolem dla wybranych modeli z mimetykiem tlenu lub tlenem.

Reakcja	Pełen model B3LYP/6-31++G(d,p)	Zredukowany model B3LYP/6-31++G(d,p)	Zredukowany model G2MP2
Mimetyk tlenu			
Transfer at. H z C1'	25,7*	26,3	-
Transfer at. H z C2'	26,2*	34,3	28,9
Transfer at. H z C4'	12,0*	26,9	20,3
Tlen			
Transfer at. H z C1'	-	8,7	8,4
Transfer at. H z C2'	-	14,0	13,4
Transfer at. H z C4'	-	6,9	8,7

*przeniesienie atomu wodoru dotyczy sąsiadującego cukru dla pełnego modelu (**Rysunek 51**).

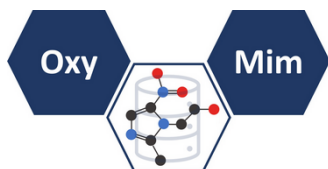
4.3.3. Analiza chemometryczna

Ostatnie lata pokazują wzrastający trend wykorzystywania technik przewidywania aktywności biologicznej molekuł [137]. Poprzez racjonalne podejście można więc ograniczyć liczbę związków poddawanych wstępnej ocenie klinicznej, czy też proponować takie o najkorzystniejszych właściwościach. W tym celu wykorzystuje się modelowanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną (QSAR). Technika ta zakłada, że różnice we właściwościach fizykochemicznych i aktywności

biologicznej związków zależą od różnic w ich strukturze. Zależność między nimi z kolei może być wyrażona w postaci modelu matematycznego. Znając dane eksperymentalne aktywności/toksyczności dostępnych dla części strukturalnie podobnych związków z badanej grupy, mamy możliwość przewidzenia aktywności biologicznej struktur, dla których brakuje danych eksperymentalnych poprzez wykorzystanie tzw. deskryptorów molekularnych, opisujących właściwości związków.

Dla nitroimidazoli już w przeszłości zaproponowano kilka takich modeli, pokazujących zależność między ich strukturą a aktywnością radiosensybilizującą [138-141], jednak analiza tych modeli wykazała, że opierały się one o dane eksperymentalne uzyskane w nieustandaryzowanych warunkach (np. dla różnych dawek promieniowania czy różnych linii komórkowych, na których były testowane). Aktywność radiouczulającą potencjalnych mimetyków tlenu można wyrazić liczbowo np. poprzez współczynnik wzmocnienia efektu sensybilizacji (SER). Można go zdefiniować jako stosunek dawki promieniowania bez zastosowania związku radiouczulającego do dawki promieniowania z zastosowanym związkiem, dającą ten sam efekt biologiczny [7]. Skuteczność radiosensybilizatora można również opisać przy pomocy parametru C1.6, który odzwierciedla stężenie danego związku, dla którego SER wynosi 1.6. W praktyce można więc stwierdzić, że im związek ma lepsze właściwości radiouczulające, tym SER jest wyższe, a C1.6 niższe.

W celu kalibracji modeli QSAR dla omawianych związków z grupy nitroimidazoli wykorzystano deskryptory molekularne, które były związane z postulowanymi w literaturze dwoma możliwymi mechanizmami działania mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli – mechanizmu rodnikowego [78] oraz mechanizmu związanego z przyłączeniem elektronu [79]. Opracowanie modelu QSAR wymaga jednak w pierwszej kolejności dogłębnej analizy literatury i zebrania dobrej jakości danych eksperymentalnych. W tym celu utworzono bazę danych, w której zestawiono informacje dotyczące 165 związków z grupy nitroimidazoli (**Rysunek 53**). Oprócz kluczowych parametrów C1.6 i/lub SER w bazie umieszczono również podstawowe dane dotyczące zgromadzonych związków, tj. nazwę systematyczną, reprezentację związku w postaci kodu SMILES, czy też informację dotyczącą wykorzystanej w eksperymencie linii komórkowej. Zebrane dane bazują na 23 wybranych publikacjach z okresu między rokiem 1976 a 2021 [68,77,138,142-161].



Database of Oxygen-Mimetics



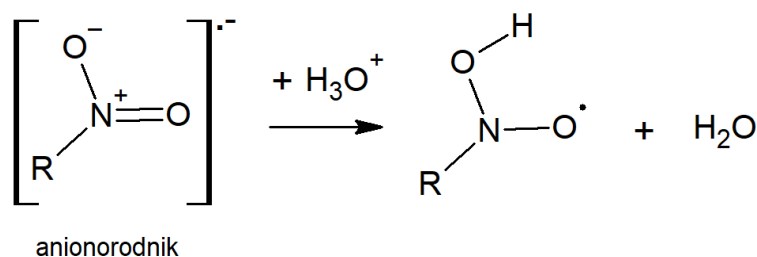
Data		Download		References		Contact	
zole	4-nitroimidazole	5-nitroimidazole	Amide group	Sulfonamide/sulfone group	More than 1 ring	Halogen atoms	

Rysunek 53. Strona domowa utworzonej bazy danych mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli, dostępnej pod adresem: <https://oxymim.ug.edu.pl>.

Zgodnie z zaleceniami OECD [162], poprawnie opracowany model QSAR powinien charakteryzować się: (1) jasno zdefiniowaną modelowaną wielkością (tj. zmienną zależną), (2) przejrzystym algorytmem, (3) precyzyjnie określoną dziedziną modelu, (4) parametrami świadczącymi o wysokiej dobroci modelu, w tym jego dopasowaniu, elastyczności i zdolnościach prognostycznych oraz (5) posiadać interpretację fizyczną, o ile to możliwe. W kontekście modelowania QSAR istotnym jest więc by m.in. dane eksperymentalne były rejestrowane w takich samych warunkach laboratoryjnych. Z uwagi na dużą różnorodność metodologii eksperymentalnej, do utworzenia modeli QSAR wykorzystano dane z jedynie dwóch publikacji, spośród tych zamieszczonych w utworzonej bazie, które opisywały najliczniejszą grupę związków (37 struktur), przy zachowaniu identycznej procedury eksperymentalnej (MIM 1-5, 7-9, 10-12, 14-16, 31-38, 42-44, 51-55, 68, 69, 72, 93-95, 97, patrz <https://oxymim.ug.edu.pl/>) [68,149]. Oba modele QSAR bazowały więc na tym samym zestawie związków, jednak każdy z nich wykorzystywał wyłącznie dwa deskryptory molekularne związane z omawianym mechanizmem działania mimetyków tlenu. W zależności od badanego procesu było to:

1. Dla mechanizmu przyłączenia elektronu:

- a) Adiabatyczne powinowactwo elektronowe (AEA) – jako wartość różnicy energii między cząsteczką obojętną a anionorodnikiem, którego sposób wyznaczenia został opisany w **Rozdziale 3.1.2**.
- b) Entalpia protonowania tlenu w grupie nitrowej rodnikoanionu pochodnej nitroimidazolu (ΔG_{prot}) – jako wartość różnicy energii swobodnej poniższej reakcji (**Rysunek 54**):

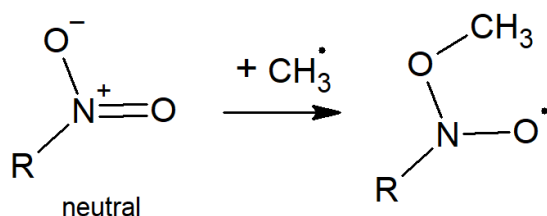


Rysunek 54. Protonowanie anionorodnika grupy nitrowej. R oznacza część imidazolową danego związku wraz z podstawnikami.

Mechanizm działania mimetyków tlenu zaproponowany przez Edwardsa jest związany z uszkodzeniem oksydacyjnym DNA. Aby anionorodnik mógł zbliżyć się do polianionu, jakim jest DNA, powinien najpierw ulec protonowaniu. Dlatego właśnie deskryptor ΔG_{prot} jest związany z tym mechanizmem.

2. Dla mechanizmu rodnikowego:

- c) Przyłączenie rodnika metylowego (ΔG_{CH_3}) – jako wartość różnicy entalpii swobodnej reakcji przedstawionej schematycznie na **Rysunek 55**, która jest odpowiednikiem tego etapu mechanizmu rodnikowego, w którym dochodzi do tworzenia adduktu pirymidyna-mimetyk (**Rysunek 47**):



Rysunek 55. Przyłączenie rodnika metylowego do grupy nitrowej mimetyku. R oznacza część imidazolową danego związku wraz z podstawnikami.

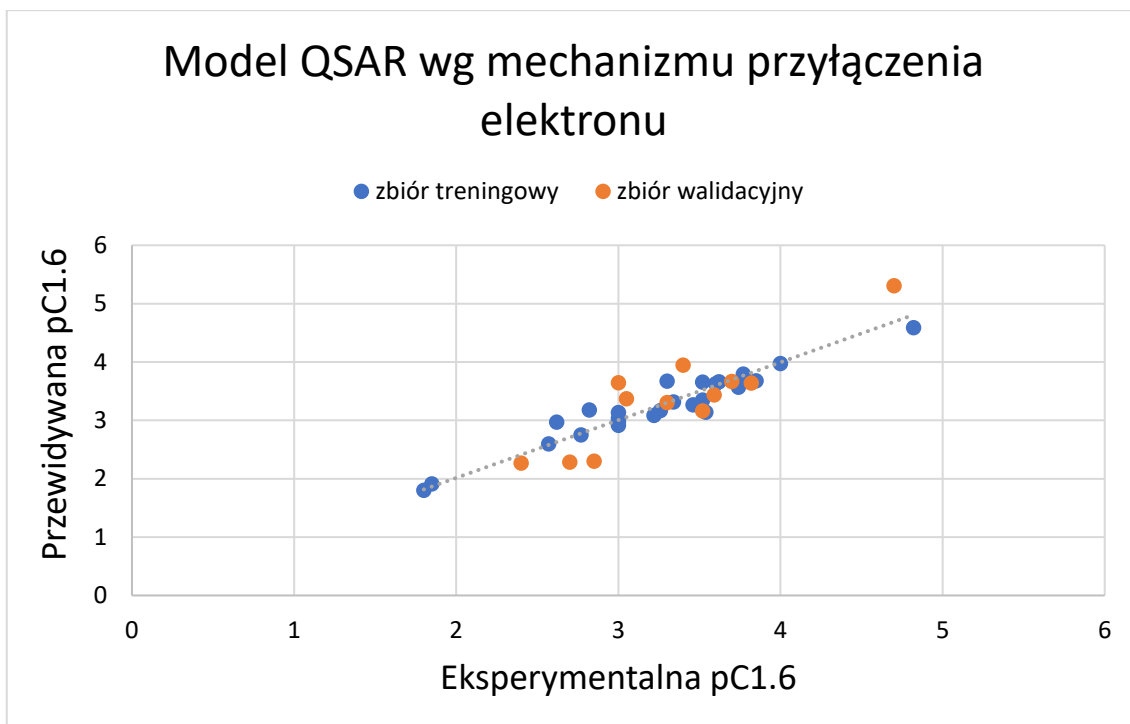
- d) Funkcja Fukui dla ataku rodnikowego – tzw. indeks reaktywności chemicznej, który pozwala przewidywać możliwy przebieg reakcji, bazując wyłącznie na własnościach reagentów [163]; dla ataku rodnikowego prezentuje się następująco (106):

$$f^0 = \frac{qk(N+1) - qk(N-1)}{2} \quad (106)$$

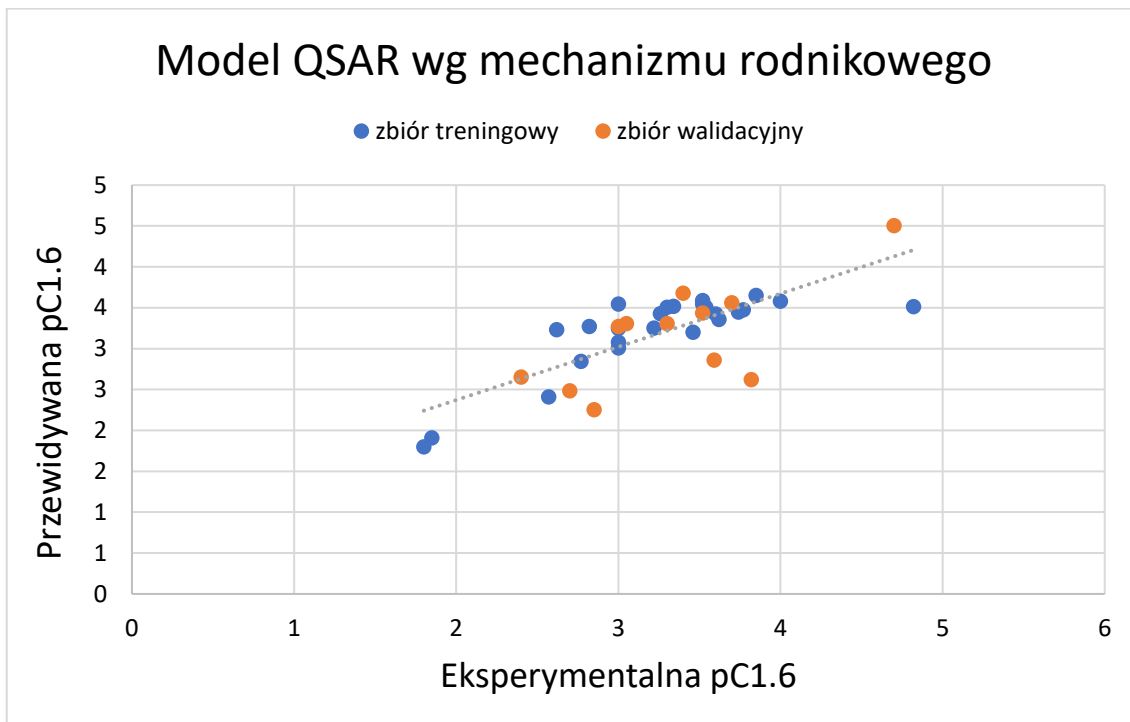
gdzie qk stanowi populację elektronową atomu k w cząsteczce neutralnej mającej N elektronów, $qk(N+1)$ to odpowiednik formy anionowej, natomiast $qk(N-1)$ formy kationowej związku. Do obliczeń wzięto pod uwagę dwa atomy tlenu z centrum reakcji w grupie nitrowej.

Aktywność biologiczna wykorzystanych do stworzenia modelu QSAR nitroimidazoli była opisywana poprzez parametr C1.6, przedstawiony w postaci logarymicznej. Im wyższa będzie wartość $pC1.6$ (ujemnego logarytmu ze stężenia związku, dla którego SER – współczynnik wzmocnienia sensybilizacji – wynosi 1.6), tym wyższa efektywność radiosensybilizująca danego związku.

Poniżej zaprezentowano wyniki charakteryzujące modele QSAR dla obu mechanizmów (**Rysunek 56**, **Rysunek 57**, **Tabela 12**). Zastosowano algorytm nieparametrycznej regresji lokalnie ważonej. Grupę 37 związków podzielono na zbiór uczący, inaczej nazywany treningowym (25 struktur) oraz walidacyjny (12 struktur). Szczegółowa metodologia została zaprezentowana w **Rozdziale 3.2**.



Rysunek 56. Zależność pomiędzy obserwowanymi a przewidywanymi przez model wartościami pC1.6 według mechanizmu przyłączenia elektronu.



Rysunek 57. Zależność pomiędzy obserwowanymi a przewidywanymi przez model wartościami pC1.6 według mechanizmu rodnikowego.

Tabela 12. Statystyki otrzymanych modeli QSAR dla przyłączenia elektronu oraz mechanizmu rodnikowego.

Parametr	Przyłączenie elektronu	Mechanizm rodnikowy
R^2	0,92	0,67
$RMSE_C$	0,18	0,37
Walidacja wewnętrzna (krzyżowa)		
Q^2_{cv}	0,65	-0,37
$RMSE_{cv}$	0,37	0,74
Walidacja zewnętrzna		
Q^2	0,80	0,48
$RMSE_P$	0,39	0,48
MAE	0,13	0,25
CCC	0,84	0,69

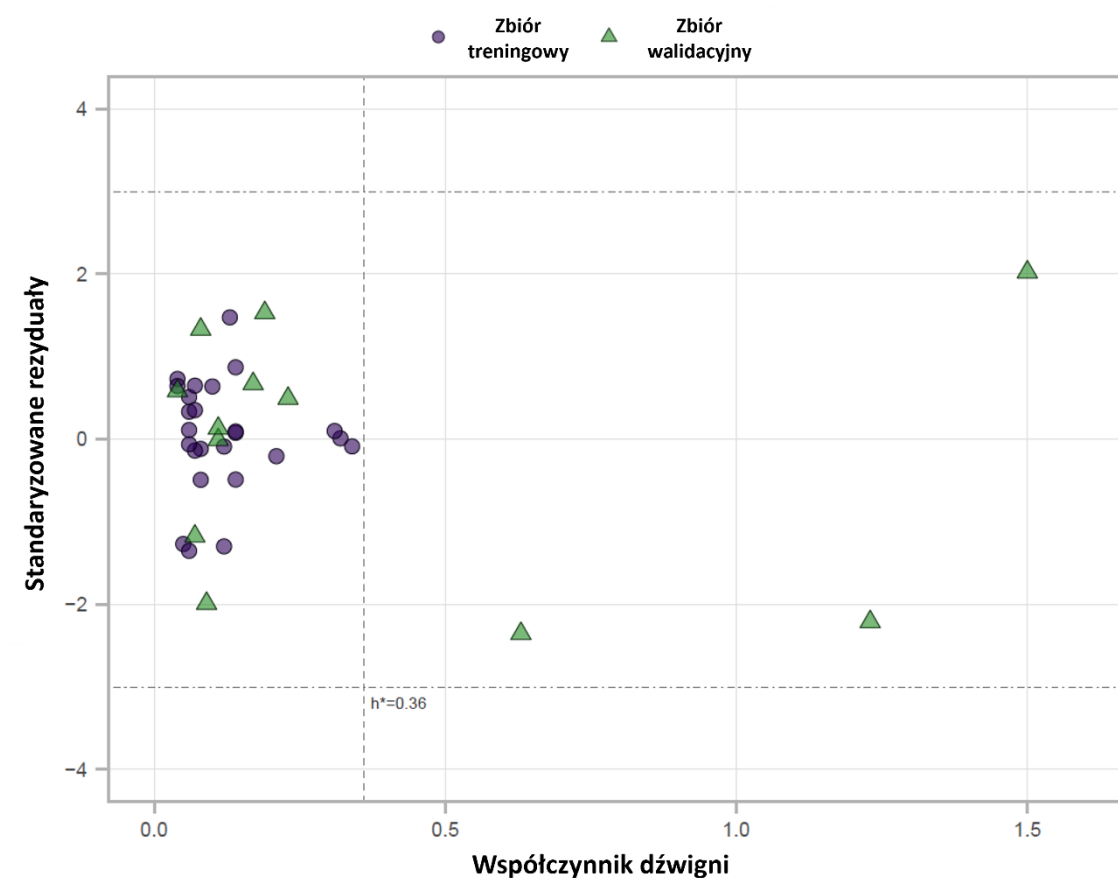
Analizując otrzymane wartości statystyk można zauważyć znaczące różnice między poszczególnymi modelami. Kluczowe parametry to te dotyczące stopnia dopasowania, elastyczności oraz zdolności predykcyjnych. Poprawny model QSAR powinien charakteryzować się wartościami współczynnika determinacji R^2 i walidacji Q^2 powyżej 0,6, natomiast średnie błędy kwadratowe powinny być do siebie zbliżone ($RMSE_C \approx RMSE_{cv} \approx RMSE_P$) [164]. Inną miarą wiarygodności modelu jest współczynnik korelacji zgodności (CCC). Pożądaną wartością progową jest 0,85 [164]. Średni błąd bezwzględny (MAE) z kolei powinien być w granicy 10% [164].

Model opisujący mechanizm przyłączenia elektronu ma zadowalające zdolności prognostyczne (Q^2 na poziomie około 0,80) oraz bardzo wysoki stopień dopasowania ($R^2 = 0,92$). Model jest również stabilny, co można określić poprzez zastosowanie walidacji krzyżowej polegającej na wyrzuceniu jednego obiektu. Współczynnik walidacji krzyżowej Q^2_{cv} w tym przypadku wynosi około 0,65 i jest na akceptowalnym poziomie. Za wyjątkiem $RMSE_C$ błędy kwadratowe są na zbliżonym poziomie. Z kolei współczynnik CCC nie osiąga wartości progowej. Błąd MAE mieści się w granicy zakładanego wymogu.

Nie można jednak powiedzieć tego samego o drugim modelu, zbudowanym w oparciu o deskryptory związane z reakcjami rodnikowymi. Wartości głównych parametrów statystycznych modelu znacząco odbiegają od zakładanej normy ($R^2 = 0,67$, $Q^2 = 0,48$, $Q^2_{cv} = -0,37$), to samo dotyczy pozostałych parametrów. Tak znaczące różnice między modelami sugerują, że prawdopodobnym mechanizmem działania mimetyków

tłenu z grupy nitroimidazoli jest mechanizm związany z przyłączeniem elektronu do danego nitroimidazolu, a nie mechanizm rodnikowy.

Przyjmując, dla analizy chemometrycznej, że model QSAR dla mechanizmu przyłączenia elektronów jest właściwy (model dla mechanizmu rodnikowego odrzucamy) określono i sprawdzono dziedzinę modelu (z ang. *applicability domain*, AD) tzn. przestrzeni zdefiniowanej przez wartości deskryptorów oraz odpowiedzi modelu, w której przewidywania są uważane za wiarygodne. Ocenę dziedziny wykonano za pomocą metody współczynników dźwigni (**Rysunek 58**):

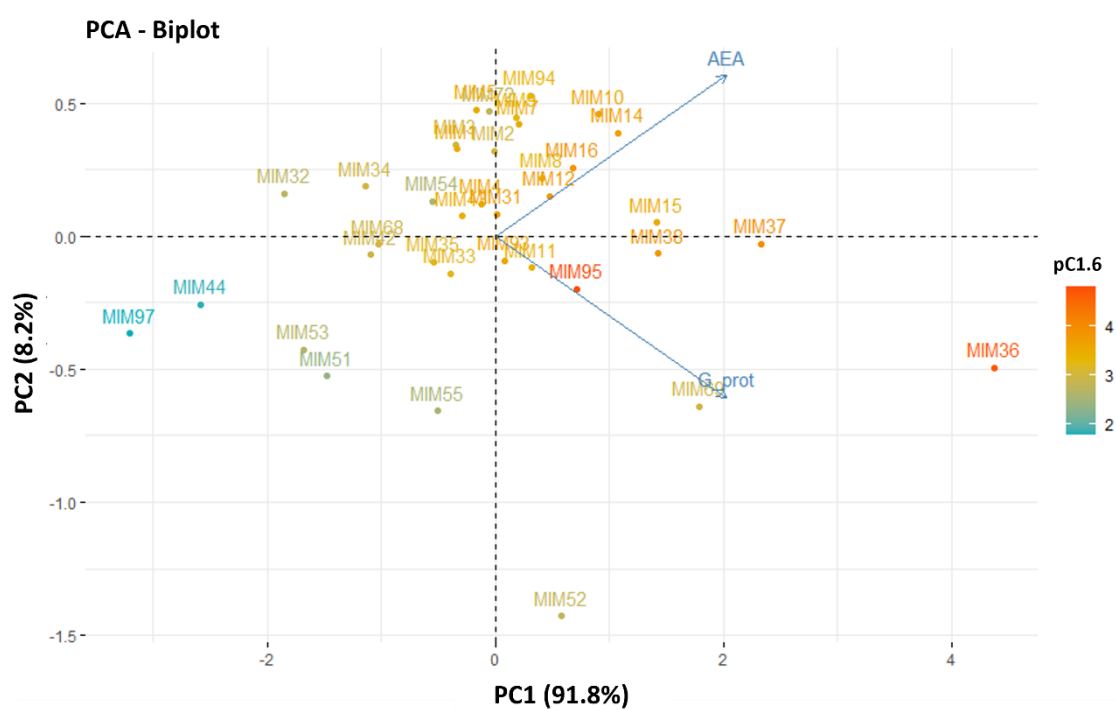


Rysunek 58. Wykres powierzchni błędów modelu w zależności od wartości deskryptorów modelu QSAR dla mechanizmu przyłączenia elektronu.

Na przedstawionym wykresie widać, że tylko trzy związki zbioru walidacyjnego (MIM36, 52, 69 patrz <https://oxymim.ug.edu.pl/>) przekroczyły granicę, wyznaczoną wartością krytycznego współczynnika dźwigni (h^*), co oznacza, że nie są one wystarczająco podobne do związków zbioru uczącego. Jednak dla tych konkretnych związków wartości deskryptorów osiągają minima/maksima, co tłumaczy ich

przekroczenie wartości h^* . Przewidywania dla tych związków powinny być jednak traktowane jako niepewne.

Zastosowanie algorytmu nieparametrycznej regresji lokalnie ważonej (patrz **Rozdział 3.2**) nie pozwala na zapisanie ogólnego równania modelu QSAR. Dlatego w celu przeprowadzenia interpretacji mechanistycznej przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA, z ang. *Principal Component Analysis*) dla parametrów opisujących mechanizm radiosensybilizacji związany z przyłączeniem elektronu [107]. Uzyskane wyniki przedstawiono graficznie na tzw. dwuwykresie (z ang. *biplot*, **Rysunek 59**).



Rysunek 59. Dwuwykres dla zmiennych AEA i ΔG_{prot} reprezentowanych przez dwie pierwsze składowe. Pierwsza główna składowa (PC1) wyjaśnia 91,8 % zmienności, natomiast druga główna składowa (PC2) 8,2 %.

Analizując rozmieszczenie związków w przestrzeni wyznaczonej przez dwie pierwsze główne składowe, można zauważyć, że pierwsza główna składowa (PC1, oś X) jest pozytywnie skorelowana z oboma deskrytorami – AEA i ΔG_{prot} . Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że PC1 różnicuje związki ze względu na wartość aktywności radiosensybilizującej pC1.6. Związki o małych wartościach PC1 (lewa strona wykresu) charakteryzują się małą wartością pC1.6, a co za tym idzie małymi wartościami AEA i ΔG_{prot} . Natomiast przesuając się wzdłuż osi X w prawą stronę, czyli wraz ze wzrostem

wartości PC1, aktywność radiosensybilizująca pC1.6 oraz wartości dodatnio skorelowanych deskryptorów: AEA i ΔG_{prot} , również rosną.

4.3.4. Wnioski

W Projekcie D podjęto próbę zweryfikowania, przy pomocy metod chemii kwantowej oraz radiolizy stacjonarnej mechanizmu rodnikowego działania mimetyków tlenu, postulowanego przez grupę O'Neill'a. Wykonano również analizę chemometryczną dostępnych w literaturze danych eksperymentalnych, związanych z właściwościami radiosensybilizującymi znanych nitroimidazoli. W oparciu o podejście mechanistyczne zaproponowano dwa modele QSAR, powiązane z mechanizmem rodnikowym oraz elektronowym, które okazały się znacząco różnić w swoich właściwościach predykcyjnych.

Wyniki badań obliczeniowych i eksperymentalnych nad mechanizmem rodnikowym potwierdziły możliwość powstawania stabilnego adduktu w wyniku reakcji rodnika 5-hydroksypirymidynowego z metronidazolem. Natomiast kolejny etap reakcji, przeniesienie atomu wodoru ze szkieletu cukrowo-fosforanowego, okazał się termodynamicznie mało prawdopodobny. Wniosek ten potwierdzają dodatkowe obliczenia metodą G2MP2, o dokładności chemicznej. Zastosowane modelowanie sugeruje, że proponowany przez O'Neilla mechanizm rodnikowego działania nitroimidazoli, w rzeczywistości nie jest realizowany.

Aby zaproponować możliwy mechanizmu działania mimetyków tlenu, opracowano dwa modele QSAR, w oparciu o podejście mechanistyczne. Model uczenia maszynowego, zbudowany w oparciu o deskryptory związane z mechanizmem przyłączenia elektronu, okazał się mieć znacznie lepsze dopasowanie do danych uczących oraz lepsze zdolności prognostyczne ($R^2 = 0,92$, $Q^2 = 0,80$), w porównaniu z modelem opartym o mechanizm rodnikowy ($R^2 = 0,67$, $Q^2 = 0,48$). Wyraźnie lepsze parametry modelu QSAR, zbudowanego w oparciu o deskryptory związane z przyłączeniem elektronu sugerują, że to właśnie ten mechanizm mógłby opisywać sposób działania mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli.

5. Podsumowanie

Radioterapia jest jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia przeciwnowotworowego. Podczas tego zabiegu komórki nowotworowe są poddawane działaniu promieniowania jonizującego, które może jednak wywołać niepożądane skutki uboczne w zdrowych tkankach. Co więcej, hipoksja, charakterystyczna zwłaszcza dla komórek guzów litych, powoduje wzrost ich radiooporności na promieniowanie jonizujące. Aby zniwelować efekt hipoksji, można wspomagać działanie promieniowania, poprzez zastosowanie radiosensybilizatorów, które zwiększają radiowrażliwość komórek nowotworowych.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej badano dwie grupy związków o potencjale radioczułym. Jedną z nich stanowiły pochodne uracylu i urydyny – amidosiarczan 5-hydroksyuracylu (SU), *N,N*-dimetyloamidosiarczan 5-hydroksyuracylu (DMSU), 5-jodo-2'-deoksyurydina (5IdU), 6-jodo-2'-deoksyurydina (6IdU) oraz 6-jodourydina (6IUrd) – które mogłyby uwrażliwić DNA komórek nowotworowych po wbudowaniu się do biopolimeru, a drugą – mimetyki tlenu z grupy nitroimidazoli.

Dla pochodnych urydyny zbadano mechanizmy degradacji indukowanej dysocjacyjnym przyłączeniem elektronu (DEA), który powstaje w wyniku radiolizy wody. Pochodna SU okazała się być jedynie pozornym radioczułym. Eksperyment przeprowadzony w fazie gazowej pozwolił zaobserwować wiele kanałów DEA indukowanego niskoenergetycznymi elektronami, co wskazywałoby na wrażliwość SU na przyłączenie elektronu. Co więcej, opis kwantowochemiczny procesu DEA w roztworze wodnym, a szczególnie korzystna termodynamicznie i kinetycznie ścieżka degradacji poprzez dysocjację wiązania S-O, również wskazywały, że pochodna ta może być potencjalnym radiosensybilizatorem uszkodzeń DNA. Jednak po poddaniu roztworu wodnego SU radiolizie stacjonarnej nie zarejestrowano żadnego produktu degradacji, który potwierdzałby właściwości radiosensybilizujące tego związku w środowisku wodnym. Zmiana pH lub dawki promieniowania nie wpłynęła jakościowo na interpretację tego eksperymentu. Ponowna charakterystyka procesu degradacji z wykorzystaniem metody G2MP2 pokazała, że otrzymany wcześniej korzystny opis ilościowy procesu DEA jest jedynie artefaktem zastosowanej metodologii DFT. Znacznie dokładniejsze, ale też bardziej kosztowne obliczenia na poziomie G2MP2 pozostają w zgodzie z wynikami eksperymentu radiolitycznego i ostatecznie odrzucają możliwość

zastosowania SU jako radioczułacza w skojarzonej radioterapii. W kolejnym projekcie, w którym rozpatrywano właściwości radioczułające metylowanej pochodnej SU – DMSU, uzyskano analogiczne ścieżki fragmentacji do tych obserwowanych wcześniej dla SU. Proces degradacji DMSU nie różnił się jakościowo od procesu degradacji SU, stąd wniosek, że metylowanie pochodnej nie wpłynęło jakościowo na zjawisko DEA.

Innymi przeanalizowanymi w ramach niniejszej pracy doktorskiej potencjalnymi radiosensybilizatorami były jodopochodne 2'-deoksyurydyny i urydyny. 6-jodo-2'-deoksyurydyna okazała się być niestabilna w środowisku wodnym, przez co nie może być stosowana jako radiosensybilizator uszkodzeń DNA. Przeprowadzone symulacje kinetyki reakcji hydrolizy 6-jodourydyny (6IUrd), 6-jodo- (6IdU) oraz 5-jodo-2'-deoksyurydyny (5IdU), pozwoliły określić czas połowicznej przemiany pochodnych podczas reakcji hydrolizy. 6-jodopochodne (6IUrd i 6IdU) miały stosunkowo niskie czasy połowicznej przemiany, co wskazuje na ich szybką degradację w reakcji z wodą (13,8 godzin dla 6IUrd i tylko 1,4 sekundy dla 6IdU). W przypadku 5IdU nie można ustalić czasu połowicznej przemiany, z uwagi na osiągnięcie stanu równowagi przy 42% stopniu rozkładu związku, który następuje po upływie około 126 lat. Wynik ten wskazuje na dużą stabilność 5IdU w środowisku wodnym. Niższa stabilność 6-jodopodstawionych pochodnych urydyny w porównaniu z 5-jodopodstawioną 5IdU może być związana z większą zawadą steryczną tych pierwszych, z uwagi na bliskość atomu jodu i reszty cukrowej nukleozydu. Z kolei oddziaływanie między zasadą a dodatkową grupą OH w pozycji 2' w przypadku rybozy zwiększa stabilność 6Urd w porównaniu do 6IdU, co w konsekwencji powoduje, że czas połowicznej przemiany 6IdU jest znacznie niższy niż $\tau_{1/2}$ dla 6IUrd.

Ostatnia część badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej była związana z mimetykami tlenu z grupy nitroimidazoli. Pomimo kilkudziesięciu lat prac nad tą grupą terapeutyków, które zaowocowały m.in. wprowadzeniem nimorazolu do praktyki klinicznej wspomagania radioterapii nowotworów głowy i szyi w Danii, molekularny mechanizm ich działania wciąż pozostaje niejasny. Dlatego przeprowadzono analizę i częściową weryfikację dwóch najbardziej obiecujących mechanizmów, proponowanych w literaturze. Jeden z tych mechanizmów to mechanizm zaproponowany przez grupę O'Neill'a, rozpoczynający się od przyłączenia rodnika hydroksylowego do pirymidyny (nazwany tu mechanizmem rodnikowym), drugi natomiast – to zaproponowany przez Edwards'a mechanizm związany z przyłączeniem

w pierwszym etapie elektronu do mimetyku tlenu (nazwany tu mechanizmem elektronowym). Przeprowadzone eksperymenty radiolityczne oraz badania kwantowochemiczne potwierdziły możliwość powstawania trwałego adduktu rodnika 5-hydroksypirymidynowego z metronidazolem, będącego pierwszym etapem postulowanego mechanizmu rodnikowego. Jednak analiza kwantowochemiczna kolejnego etapu procesu, związanego z przeniesieniem atomu wodoru z deoksyrybozy na rodnik nitrowy w addukcie pokazała, że jest to etap termodynamicznie niedozwolony, zarówno na poziomie metod DFT jak i G2MP2. Dodatkowo, przeprowadzono analizę chemometryczną zgromadzonych danych eksperymentalnych (zamieszczonych w utworzonej, publicznie dostępnej bazie danych <https://oxymim.ug.edu.pl>), związanych z właściwościami radiouczulającymi znanych nitroimidazoli. Zastosowane podejście mechanistyczne pozwoliło na utworzenie dwóch modeli QSAR, na podstawie deskryptorów związanych z dyskutowanym mechanizmem rodnikowym oraz mechanizmem przyłączenia elektronu. W przypadku drugiego wariantu mechanistycznego uzyskano model mający zadowalające zdolności prognostyczne ($R^2 = 0,92$, $Q^2 = 0,80$), w porównaniu z modelem dla mechanizmu rodnikowego ($R^2 = 0,67$, $Q^2 = 0,48$). Wydaje się więc, że to mechanizm rozpoczynający się od przyłączenia elektronu do pochodnej nitroimidazolu może uzasadniać właściwości radiouczulające tej grupy związków. Wymaga on jednak z pewnością dalszej weryfikacji eksperymentalnej i obliczeniowej.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwoliły podkreślić konieczność badania mechanizmów działania radiosensybilizatorów. Kanały DEA zidentyfikowane w fazie gazowej nie stanowią gwarancji, że badany związek będzie wykazywać pożądane działanie radiosensybilizujące w roztworze wodnym. Co więcej, wyraźna jest również potrzeba wyjścia poza ciągły model rozpuszczalnika w obliczeniach teoretycznych i uwzględnienia *explicite* wody, która stanowi naturalne środowisko żywych komórek. Pomimo wielu zalet modeli kwantowochemicznych, do wielu zastosowań okazują się one niewystarczające, dlatego celowym wydaje się wyjście poza tego typu podejście i uwzględnienie innych metod opisu, np. modelowania zależności między strukturą a aktywnością.

6. Literatura

- [1] World Health Organization, Noncommunicable diseases, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (dostęp: 28 Styczeń 2022).
- [2] Anderson B.O., Ilbawi A.M., Fidarova E., Weiderpass E., Stevens L., Abdel-Wahab M., Mikkelsen B. The Global Breast Cancer Initiative: a strategic collaboration to strengthen health care for non-communicable diseases. *The Lancet* **2021**, 22(5), 578-581.
- [3] Dagenais G.R., Leong D.P., Rangarajan S., Lanus F., Lopez-Jaramillo P., Gupta R., Diaz R., Avezum A., Oliveira G.B.F., Wielgosz A., Parambath S.R., Mony P., Alhabib K.F., Temizhan A., Ismail N., Chifamba J., Yeates K., Khatib R., Rahman O., Zatonska K., Kazmi K., Wei L., Zhu J., Rosengren A., Vijayakumar K., Kaur M., Mohan V., Yusufali A., Kelishadi R., Teo K.K., Joseph P., Yusuf S. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet* **2020**, 395(10226), 785-794.
- [4] Didkowska J., Wojciechowska U., Olasek P., Caetano dos Santos F., Michałek I. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2019 roku. Warszawa: *Krajowy Rejestr Nowotworów*, **2021**
- [5] Health at a Glance 2021: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/ae3016b9-en> (dostęp: 30 Kwiecień 2022)
- [6] Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A. Onkologia: podręcznik dla studentów i lekarzy. Kordek R. (ed.), Gdańsk: *Via Medica*, **2007**.
- [7] Joiner M., van der Kogel A. (ed.) Basic Clinical Radiobiology. London: *Hodder Arnold*, **2009**.
- [8] Ng J., Shuryak I. Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives. *Cancer Manag. Res.* **2015**, 7, 1-11.
- [9] Skwarzec B. Radiochemia środowiska. Gdańsk: *Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego*, **2021**.
- [10] Przybyszewski W.M., Wideł M., Szurko A., Maniakowski Z. Wpływ mocy dawki na komórkowe, biochemiczne i molekularne efekty promieniowania jonizującego. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2008**, 62, 468-477.
- [11] Suchorska W.M. Radiobiologia: podstawowe modele matematyczne opisujące przeżywalność komórek. *Letters in Oncology Science* **2018**, 15(2), 59-65.
- [12] von Sontag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. A Chemical Perspective. Berlin: *Springer*, **2006**.
- [13] Wang H., Mu X., He H., Zhang X.D. Cancer Radiosensitizers. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, 39(1), 24-48.
- [14] Beckman K.B., Ames B.N. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 19633-19636.
- [15] Chapman J.D., Reuvers A.P., Borsa J., Greenstock C.L. Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat. Res.* **1973**, 56(2), 291-306.
- [16] Steenken S. Purine Bases, Nucleosides, and Nucleotides: Aqueous Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and e- and OH Adducts. *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503-520.
- [17] Boudaiffa B., Cloutier P., Hunting D., Huels M.A., Sanche L. Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons. *Science* **2000**, 287(5458), 1658-1660.

- [18] Panajotovic R., Martin F., Cloutier P., Hunting D., Sanche L. Effective cross sections for production of single-strand breaks in plasmid DNA by 0.1 to 4.7 eV electrons. *Radiat. Res.* **2006**, *165*(4), 452-459.
- [19] Barrios R., Skurski P., Simons J. Mechanism for damage to DNA by low-energy electrons. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*(33), 7991-7994.
- [20] Berdys J., Anusiewicz I., Skurski P., Simons J. Damage to model DNA fragments from very low-energy (< 1 eV) electrons. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(20), 6441-6447.
- [21] Hanel G., Gstir B., Denifl S., Scheier P., Probst M., Farizon B., Farizon M., Illenberger E., Märk T.D. Electron attachment to uracil: Effective destruction at subexcitation energies. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*(18), 188104.
- [22] Bao X., Wang J., Gu J., Leszczynski J. DNA strand breaks induced by near-zero-electronvolt electron attachment to pyrimidine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*(15), 5658-5663.
- [23] Gu J., Wang J., Leszczynski J. Electron Attachment-Induced DNA Single Strand Breaks: C3'-O3' σ -Bond Breaking of Pyrimidine Nucleotides Predominates. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(29), 9322-9323.
- [24] Dąbkowska I., Rak J., Gutowski M. DNA strand breaks induced by concerted interaction of H radicals and low-energy electrons. *Eur. Phys. J. D* **2005**, *35*(2), 429-435.
- [25] Rak J., Kobyłecka M., Storoniak P. Single Strand Break in DNA Coupled to the O-P Bond Cleavage. A Computational Study. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*(8), 1911-1917.
- [26] Becker D., Bryant-Friedrich A., Trzasko C., Sevilla M.D. Electron spin resonance study of DNA irradiated with an argon-ion beam: Evidence for formation of sugar phosphate backbone radicals. *Radiat. Res.* **2003**, *160*(2), 174-185.
- [27] Zheng Y., Cloutier P., Hunting D.J., Sanche L., Wagner J.R. Chemical basis of DNA sugar-phosphate cleavage by low-energy electrons. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(47), 16592-16598.
- [28] Błaszczak-Świątkiewicz K., Olszewska P., Mikiciuk-Olasik E. Wpływ hipoksji na zmiany metabolizmu komórek nowotworowych. *Nowotwory. Journal of Oncology* **2012**, *62*(4), 283-290.
- [29] Thomlinson R.H., Gray L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer* **1955**, *9*(4), 539.
- [30] Brown J.M. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br. J. Radiol.* **1979**, *52*(620), 650-656.
- [31] Daşu A., Denekamp J. New insights into factors influencing the clinically relevant oxygen enhancement ratio. *Radiother. Oncol.* **1998**, *46*(3), 269-277.
- [32] Gasińska A., Biesaga B. Dwa oblicza hipoksji nowotworów. *Nowotwory. Journal of Oncology* **2010**, *60*(4), 332-332.
- [33] Jackson R.K., Liew L.P., Hay M.P. Overcoming radioresistance: small molecule radiosensitisers and hypoxia-activated prodrugs. *Clin. Oncol.* **2019**, *31*(5), 290-302.
- [34] Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*(26), 4066-4074.
- [35] Moulder J.E. Chemical radiosensitizers: the Journal history. *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *95*(7), 940-944.
- [36] Adams G.E. Chemical Radiosensitization of Hypoxic Cells. *Br. Med. Bull.* **1973**, *29*(1), 48-53.

- [37] Wardman P. Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **2007**, *19*, 397-417.
- [38] Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the Radiologist (6th Edition). Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*, **2006**.
- [39] Gong L., Zhang Y., Liu C., Zhang M., Han S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int. J. Nanomedicine* **2021**, *16*, 1083-1102.
- [40] Rak J., Chomicz L., Wiczek J., Westphal K., Zdrowowicz M., Wityk P., Żyndul M., Makurat S., Golon Ł. Mechanisms of Damage to DNA Labeled with Electrophilic Nucleobases Induced by Ionizing or UV Radiation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*(26), 8227-8238.
- [41] Zdrowowicz M., Chomicz-Mańka L., Butowska K., Spisz P., Falkiewicz K., Czaja A., Rak J. DNA damage radiosensitizers geared towards hydrated electrons. w: *Practical Aspects of Computational Chemistry V.*, Springer, **2022**.
- [42] Lawrence T.S., Davis M.A., Maybaum J., Stetson P.L., Ensminger W.D. The effect of single versus double-strand substitution on halogenated pyrimidine-induced radiosensitization and DNA strand breakage in human tumor cells. *Radiat. Res.* **1990**, *123*(2), 192-198.
- [43] Lawrence T.S., Davis M.A., Maybaum J., Mukhopadhyay S.K., Stetson P.L., Normolle D.P., McKeever P.E., Ensminger W.D. The potential superiority of bromodeoxyuridine to iododeoxyuridine as a radiation sensitizer in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3698-3704.
- [44] Kriss J.P., Maruyama Y., Tung L.A., Bond S.B., Révész L. The Fate of 5-Bromodeoxyuridine, 5-Bromodeoxycytidine, and 5-Iododeoxycytidine in Man. *Cancer Res.* **1963**, *23*, 260.
- [45] Sano K., Hoshino T., Nagai M. Radiosensitization of Brain Tumor Cells with a Thymidine Analogue (Bromouridine). *J. Neurosurg.* **1968**, *28*, 530-538.
- [46] Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*(5), 330-338.
- [47] Doyle T.H., Mornex F., McKenna W.G. The clinical implications of gemcitabine radiosensitization. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*(2), 226-228.
- [48] Zimbrick J.D., Ward J.F., Myers L.S., Studies on the Chemical Basis of Cellular Radiosensitization by 5-bromouracil Substitution in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **1969**, *16*(6), 505-523.
- [49] Abdoul-Carime H., Huels M.A., Bruning F., Illenberger E., Sanche L. Dissociative electron attachment to gas-phase 5-bromouracil. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2517-2521.
- [50] Wetmore S.D., Boyd R.J., Eriksson L.A. A theoretical study of 5-halouracils: electron affinities, ionization potentials and dissociation of the related anions. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *343*, 151.
- [51] Li X., Sanche L., Sevilla M.D. Dehalogenation of 5-Halouracils after Low Energy Electron Attachment: A Density Functional Theory Investigation. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 11248.
- [52] Chomicz L., Rak J., Storonik P. Electron-Induced Elimination of the Bromide Anion from Brominated Nucleobases. A Computational Study. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*(19), 5612-5619.
- [53] Smyth M., Kohanoff J. Excess Electron Localization in Solvated DNA Bases. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *106*, 238108.

- [54] Chomicz L., Zdrowowicz M., Kasprzykowski F., Rak J., Buonaugurio A., Wang Y., Bowen K.H. How to find out whether a 5-substituted uracil could be a potential DNA radiosensitizer. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2853-2857.
- [55] Zdrowowicz M., Chomicz L., Żyndul M., Wityk P., Rak J., Wiegand T.J., Hanson C.G., Adhikary A., Sevilla M.D. 5-Thiocyanato-2'-deoxyuridine as a possible radiosensitizer: electron-induced formation of uracil-C5-thiyl radical and its dimerization. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 16907.
- [56] Makurat S., Chomicz-Mańka L., Rak J. Electrophilic 5-Substituted Uracils as Potential Radiosensitizers: A Density Functional Theory Study. *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 2572-2578.
- [57] Makurat S., Zdrowowicz M., Chomicz-Mańka L., Kozak W., Serdiuk I.E., Wityk P., Kawecka A., Sosnowska M., Rak J. 5-Selenocyanato and 5-trifluoromethanesulfonyl derivatives of 2'-deoxyuridine: synthesis, radiation and computational chemistry as well as cytotoxicity. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 21378.
- [58] Wang S., Zhang M., Liu P., Xie S., Cheng F., Wang L. 5-(Halomethyl) uridine derivatives as potential antitumor radiosensitizers: A DFT study. *Chem. Phys. Lett.* **2018**, *692*, 374-381.
- [59] Wen Z., Peng J., Tuttle P.R., Ren Y., Garcia C., Debnath D., Rishi S., Hanson C., Ward S., Kumar A., Liu Y., Zhao W., Glazer P.M., Liu Y., Sevilla M.D., Adhikary A., Wnuk, S.F. Electron-mediated aminyl and iminyl radicals from C5 azido-modified pyrimidine nucleosides augment radiation damage to cancer cells. *Org. Lett.* **2018**, *20*(23), 7400-7404.
- [60] Makurat S., Spisz P., Kozak W., Rak J., Zdrowowicz M. 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine as a sensitizer of X-ray induced cancer cell killing. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1308.
- [61] Spisz P., Zdrowowicz M., Makurat S., Kozak W., Skotnicki K., Bobrowski K., Rak J. Why Does the Type of Halogen Atom Matter for Radiosensitizing Properties of 5-Substituted 4-Thio-2'-Deoxyuridines? *Molecules* **2019**, *22*, 40.
- [62] Barry C.E., Boshoff H.I.M., Dowd C.S. Prospects for Clinical Introduction of Nitroimidazole Antibiotics for the Treatment of Tuberculosis. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3239-3262.
- [63] Lau A.H., Lam N.P., Piscitelli S.C., Wilkes L., Danziger L.H. Clinical Pharmacokinetics of Metronidazole and Other Nitroimidazole Anti-Infectives. *Clin. Pharmacokinet.* **1992**, *23*(5), 328-364.
- [64] Bendesky A., Menéndez D., Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2002**, *511*(2), 133-144.
- [65] World Health Organization, Model List of Essential Medicines, 22nd edition (2021) <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02> (dostęp: 28 Luty 2022).
- [66] Land K.M., Johnson P.J., Molecular mechanisms underlying metronidazole resistance in trichomonads. *Exp. Parasitol.* **1997**, *87*, 305-308.
- [67] Foster J.L., Willson R.L. Metronidazole (Flagyl) in cancer radiotherapy. w: Chemotherapy. K. Hellmann, K., Connors T.A. (ed.), New York and London: *Plenum Press*, **1976**.
- [68] Adams G.E., Clarke E.D., Flockhart I.R., Jacobs R.S., Sehmi D.S., Stratford I.J., Wardman P., Watts M.E., Parrick J., Wallace R.G., Smithen C.E. Structure-activity Relationships in the Development of Hypoxic Cell Radiosensitizers. I. Sensitization Efficiency. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1979**, *35*(2), 133-150.
- [69] Dische S., Saunders M.I., Flockhart I.R., Lee M.E., Anderson P. Misonidazole—A drug for trial in radiotherapy and oncology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1979**, *5*(6), 851-860.

- [70] Brown J.M., Yu N.Y., Brown D.M., Lee W.W. SR-2508: A 2-nitroimidazole amide which should be superior to misonidazole as a radiosensitizer for clinical use. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1981**, 7(6), 695-703.
- [71] Nishimura Y., Nakagawa K., Takeda K., Tanaka M., Segawa Y., Tsujino K., Negoro S., Fuwa N., Hida T., Kawahara M., Katakami N., Hirokawa K., Yamamoto N., Fukuoka M., Ariyoshi Y. Phase I/II Trial of Sequential Chemoradiotherapy Using a Novel Hypoxic Cell Radiosensitizer, Doranidazole (PR-350), in Patients With Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (WJTOG-0002). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2007**, 69(3), 786-792.
- [72] Codony V.L., Tavassoli M. Hypoxia-induced therapy resistance: Available hypoxia-targeting strategies and current advances in head and neck cancer. *Transl. Oncol.* **2021**, 14, 101017.
- [73] NIMRAD (A Randomised Placebo-controlled Trial of Synchronous NIMorazole Versus RADiotherapy Alone in Patients With Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Not Suitable for Synchronous Chemotherapy or Cetuximab) (NIMRAD). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01950689?term=nimorazole&draw=2&rank=2/> (dostęp: 24 Listopad 2021).
- [74] Thomson D., Yang H., Baines H., Miles E., Bolton S., West C., Slevin N. NIMRAD – a phase III trial to investigate the use of nimorazole hypoxia modification with intensity-modulated radiotherapy in head and neck cancer. *Clin. Oncol.* **2014**, 26, 344-347.
- [75] DAHANCA 37. Re-irradiation With Proton Radiotherapy. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03981068?term=nimorazole&draw=2&rank=6/> (dostęp: 24 Listopad 2021).
- [76] Bonnet M., Hong C.R., Gu Y., Anderson R.F., Wilson W.R., Pruijn F.B., Wang J., Hicks K.O., Hay M.P. Novel nitroimidazole alkylsulfonamides as hypoxic cell radiosensitisers. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22(7), 2123-2132.
- [77] Bonnet M., Hong C.R., Wong W.W., Liew L.P., Shome A., Wang J., Gu Y., Stevenson R.J., Qi W., Anderson R.F., Pruijn F.B., Wilson W.R., Jamieson S.M.F., Hicks K.O., Hay, M.P. Next-generation hypoxic cell radiosensitizers: nitroimidazole alkylsulfonamides. *J. Med. Chem.* **2018**, 61(3), 1241-1254.
- [78] Bamatraf M.M.M., O'Neill P., Rao B.S.M. Redox dependence of the rate of interaction of hydroxyl radical adducts of DNA nucleobases with oxidants: Consequences for DNA strand breakage. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11852-11857.
- [79] Edwards D.I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, 31(1), 9-20.
- [80] Tanzer K., Feketeová L., Puschnigg B., Scheier P., Illenberger E., Denifl S. Reactions in Nitroimidazole and Methylnitroimidazole Triggered by Low-Energy (0–8 eV) Electrons. *J. Phys. Chem. A* **2015**, 119, 6668–6675.
- [81] Ribar A., Fink K., Probst M., Huber S.E., Feketeová L., Denifl, S. Isomer selectivity in low-energy electron attachment to nitroimidazoles. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23(52), 12892-12899.
- [82] Meißner R., Kočíšek J., Feketeová L., Fedor J., Fárník M., Limão-Vieira P., Illenberger E., Denifl S. Low-energy electrons transform the nimorazole molecule into a radiosensitizer. *Nat. Commun.* **2019**, 10(1), 1-7.
- [83] Hay M.P., Wilson W.R. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11(6), 393-410.
- [84] Phillips R.M. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, 77(3), 441-457.

- [85] Gaussian 09, Revision A.02, Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Petersson G.A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A., Bloino J., Janesko B.G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H.P., Ortiz J.V., Izmaylov A.F., Sonnenberg J.L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T., Ranasinghe D., Zakrzewski V.G., Gao J., Rega N., Zheng G., Liang W., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Throssell K., Montgomery, Jr. J.A., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Keith T., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Millam J.M., Klene M., Adamo C., Cammi R., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Farkas O., Foresman J.B., Fox D.J., Wallingford CT, *Gaussian, Inc.*, **2016**.
- [86] Gaussian 16, Revision C.01, Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Petersson G.A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A.V., Bloino J., Janesko B.G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H.P., Ortiz J.V., Izmaylov A.F., Sonnenberg J.L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T., Ranasinghe D., Zakrzewski V.G., Gao J., Rega N., Zheng G., Liang W., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Throssell K., Montgomery J.A. Jr., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M.J., Heyd J.J., Brothers E.N., Kudin K.N., Staroverov V.N., Keith T.A., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A.P., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Millam J.M., Klene M., Adamo C., Cammi R., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Farkas O., Foresman J.B., Fox D.J. Wallingford CT, *Gaussian, Inc.*, **2016**.
- [87] Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- [88] Zhao Y., Truhlar D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215.
- [89] Yanai T., Tew D.P., Handy N.C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *393(1-3)*, 51-57.
- [90] Frisch M.J., Head-Gordon M., Pople J.A. Direct MP2 gradient method. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *166*, 275-280.
- [91] Curtiss L.A., Raghavachari K., Pople J.A. Gaussian-2 theory using reduced Møller-Plesset orders. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1293-1298.
- [92] Ditchfield R., Hehre W.J., Pople J.A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724.
- [93] Kendall R.A., Dunning T.H., Harrison R.J. Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 6796.
- [94] Sosa C., Andzelm J., Elkin B.C., Wimmer E., Dobbs K.D., Dixon D.A. A local density functional study of the structure and vibrational frequencies of molecular transition-metal compounds. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 6630.
- [95] Rak J., Gutowski M., Thanh H.V., Błażejowski J. Theoretical studies on structure, thermochemistry, vibrational spectroscopy, and other features of ZrX₂-6 (X=F,Cl,Br,I): Coulombic energy in inorganic and organic hexahalogenozirconates, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5810.

- [96] Miertuš S., Scrocco E., Tomasi J. Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilization of ab initio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects. *Chem. Phys.* **1981**, 55, 117.
- [97] Ochterski W. Thermochemistry in Gaussian, Gaussian Inc., **2000**.
- [98] Fukui K. The path of chemical reactions - the IRC approach, *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 363.
- [99] Simons J. Resonances in Electron-Molecule Scattering, Van der Waals Complexes, and Reactive Chemical Dynamics. Washington: *American Chemical Society*, **1984**, 3-16.
- [100] Eaton J.W., Bateman D., Hauberg S., Wehbring R. GNU Octave version 5.2.0 manual: a high-level interactive language for numerical computations. **2019**.
- [101] Jencks W.P., Caplow M., Gilchrist M., Kallen R.G. Equilibrium Constants for the Synthesis of Hydroxamic Acids. *Biochemistry* **1963**, 2, 1313-1320.
- [102] Pigoń K., Ruziewicz Z. Chemia Fizyczna. t. 1, Warszawa: *PWN*, **2005**, 478-479.
- [103] Guthrie J.P., More O'Ferrall R.A., O'Donoghue A.C., Waghorne W.E., Zrinski I. Estimation of a pKa for Protonated Dimethoxycarbene. *J. Phys. Org. Chem.* **2003**, 16, 582-587.
- [104] Ilyina M.G., Khamitov E.M., Mustafin A.G., Khursan S.L. A theoretical quantitative estimation of acidity of uracil and its derivatives through the pKa values. *J. Chin. Chem. Soc.* **2018**, 65, 1447-1452.
- [105] Tran N.L., Colvin M.E. The prediction of biochemical acid dissociation constants using first principles quantum chemical simulations. *Theochem* **2000**, 532, 127-137.
- [106] Dudek A.Z., Arodz T., Gálvez J. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): a review. *Comb. Chem. High Throughput Sreen.* **2006**, 9(3), 213-228.
- [107] Gajewicz-Skretna A., Kar S., Piotrowska M., Leszczynski J. The kernel-weighted local polynomial regression (KwLPR) approach: an efficient, novel tool for development of QSAR/QSAAR toxicity extrapolation models. *J. Cheminform.* **2021**, 13(1), 1-20.
- [108] core Team R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput.*, Vienna, Austria. **2018**.
- [109] Gajewicz-Skretna A., Furuhamo A., Yamamoto H., Suzuki N. Generating accurate in silico predictions of acute aquatic toxicity for a range of organic chemicals: Towards similarity-based machine learning methods. *Chemosphere* **2021**, 280, 130681.
- [110] Gramatica P., Sangion A. A historical excursus on the statistical validation parameters for QSAR models: a clarification concerning metrics and terminology. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, 56(6), 1127-1131.
- [111] Jaworska J., Nikolova-Jeliazkova N., Aldenberg T. QSAR applicability domain estimation by projection of the training set in descriptor space: a review. *ATLA Altern* **2005**, 33(5), 445-459.
- [112] RDKit: Open-Source Cheminformatics Software. <https://www.rdkit.org/> (dostęp: 24 Listopad 2021).
- [113] Pimblott S.M., LaVerne J.A. Production of low-energy electrons by ionizing radiation. *Radiat. Phys. Chem.* **2007**, 76, 1244-1247.
- [114] Sanche L. Role of secondary low energy electrons in radiobiology and chemoradiation therapy of cancer. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, 474, 1-6.
- [115] Spisz P., Zdrowowicz M., Kozak W., Chomicz-Mańka L., Falkiewicz K., Makurat S., Sikorski A., Wyrzykowski D., Rak J., Arthur-Baidoo E., Ziegler P., Rodrigues Costa M.S., Denifl

S. Uracil-5-yl O-Sulfamate: An Illusive Radiosensitizer. Pitfalls in Modeling the Radiosensitizing Derivatives of Nucleobases. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 5600-5613.

[116] Arthur-Baidoo E., Falkiewicz K., Chomicz-Mańka L., Czaja A., Demkowicz S., Biernacki K., Kozak W., Rak J., Denifl S. Electron-induced decomposition of uracil-5-yl O-(N,N-dimethylsulfamate): role of methylation in molecular stability. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*(5), 2344.

[117] Denifl S., Ptasíńska S., Hanel G., Gstir B., Probst M., Scheier P., Märk T.D. Electron Attachment to Gas-Phase Uracil. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 6557– 6565.

[118] Denifl S., Flosadóttir H.D., Edtbauer A., Ingólfsson O., Märk T.D., Scheier P.A. Detailed Study on the Decomposition Pathways of the Amino Acid Valine upon Dissociative Electron Attachment. *Eur. Phys. J. D* **2010**, *60*, 37– 44.

[119] Ameixa J., Arthur-Baidoo A., Pereira-da-Silva J., Ryszka M., Carmichael I., Cornetta L.M., do N. Varella M.T., Ferreira da Silva F., Ptasíńska S., Denifl S. Formation of Resonances and Anionic Fragments upon Electron Attachment to Benzaldehyde. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 8171– 8181.

[120] Huber S.E., Śmiałek M.A., Tanzer K., Denifl S. Dissociative Electron Attachment to the Radiosensitizing Chemotherapeutic Agent Hydroxyurea. *J. Chem. Phys.* **2016**, *144*, 224309.

[121] Da Silva F.F., Matias C., Almeida D., García G., Ingólfsson O., Flosadóttir H.D., Ómarsson B., Ptasíńska S., Puschnigg B., Scheier P. NCO^- , a Key Fragment upon Dissociative Electron Attachment and Electron Transfer to Pyrimidine Bases: Site Selectivity for a Slow Decay Process. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24*, 1787– 1797.

[122] Alderighi L., Gans P., Ienco A., Peters D., Sabatini A., Vacca A. Hyperquad Simulation and Speciation (HySS): a Utility Program for the Investigation of Equilibria Involving Soluble and Partially Soluble Species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311–318.

[123] Ameixa J., Arthur-Baidoo E., Meißner R., Makurat S., Kozak W., Butowska K., Ferreira da Silva F., Rak J., Denifl S. Low-energy electron-induced decomposition of 5-trifluoromethanesulfonyl-uracil: A potential radiosensitizer. *Chem. Phys.* **2018**, *149*(16), 164307.

[124] Manura J.J., Manura D.J. Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter. *Sci. Instrum. Serv.* **2009**, 1996-2009.

[125] Mauracher A., Denifl S., Aleem A., Wendt N., Zappa F., Cicman P., Probst M., Märk T.D., Scheier P., Flosadóttir H.D. Ingólfsson O., Illenberger E. Dissociative electron attachment to gas phase glycine: Exploring the decomposition pathways by mass separation of isobaric fragment anions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 5680.

[126] Golon Ł., Chomicz L., Rak J. Electron-induced single strand break in the nucleotide of 5- and 6-bromouridine. A DFT study. *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *612*, 289-294.

[127] Chomicz L., Golon Ł., Rak J. The radiosensitivity of 5- and 6-bromocytidine derivatives – electron induced DNA degradation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 19424-19428.

[128] Kochetkov N.K. Organic Chemistry of Nucleic Acids: Part B. Plenum Press: London and New York, 1972, 425-445.

[129] Schroeder G.K., Wolfenden R. Rates of Spontaneous Disintegration of DNA and the Rate Enhancements Produced by DNA Glycosylases and Deaminases. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13638-13647.

[130] Przybylski J.L., Wetmore S.D. Designing an Appropriate Computational Model for DNA Nucleoside Hydrolysis: A Case Study of 2'-Deoxyuridine. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6533-6542.

- [131] Millen A.L., Archibald L.A., Hunter K.C., Wetmore S.D. A kinetic and thermodynamic study of the glycosidic bond cleavage in deoxyuridine. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*(14), 3800-3812.
- [132] Millen A.L., Wetmore S.D. Glycosidic bond cleavage in deoxynucleotides—A density functional study. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*(7), 850-863.
- [133] Li X., Sanche L., Sevilla M.D. Base release in nucleosides induced by low-energy electrons: A DFT study. *Radiat. Res.* **2006**, *165*(6), 721-729.
- [134] Kögler M., De Jonghe S., Herdewijn P. Synthesis of 6-aryl-2'-deoxyuridine nucleosides via a Liebeskind cross-coupling methodology. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*(2), 253-255.
- [135] Hayakawa H., Tanaka H., Miyasaka T. Lithiation of 5,6-dihydrouridine: a new route to 5-substituted uridines. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1675-1683.
- [136] Bello A.M., Poduch E., Fujihashi M., Amani M., Li Y., Crandall I., Hui R., Lee P.I., Kain K.C., Pai E.F., Kotra L.P. A Potent, Covalent Inhibitor of Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase with Antimalarial Activity. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 915-921.
- [137] Cherkasov A., Muratov E.N., Fourches D., Varnek A., Baskin I.I., Cronin M., Dearden J., Gramatica P., Martin Y.C., Todeschini R., Consonni V., Kuz'min V.E., Cramer R., Benigni R., Yang C., Rathman J., Terfloth L., Gasteiger J., Richard A., Tropsha, A. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*(12), 4977-5010.
- [138] Long W., Liu P. Quantitative Structure Activity Relationship Modeling for Predicting Radiosensitization Effectiveness of Nitroimidazole Compounds. *J. Radiat. Res.* **2010**, *51*, 563-572.
- [139] De P., Bhattacharyya D., Roy K. Exploration of nitroimidazoles as radiosensitizers: application of multilayered feature selection approach in QSAR modeling. *Struct. Chem.* **2020**, *31*, 1043-1055.
- [140] De P., Roy K. QSAR and QSAAR modeling of nitroimidazole sulfonamide radiosensitizers: application of small dataset modeling. *Struct. Chem.* **2021**, *32*, 631-642.
- [141] De P., Roy, K. Nitroaromatics as hypoxic cell radiosensitizers: A 2D-QSAR approach to explore structural features contributing to radiosensitization effectiveness. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *4*, 100035.
- [142] Zheng X.L., Jin Y.Z., Shen Y. Chemical Drugs for Oncotherapy Sensitization. *ShangHai Scientific and Technological Literature Publishing House*, Shanghai, 2002.
- [143] Agrawal K.C., Larroquette C.A., Garg P.K. Pharmacokinetic studies of amino acid analogues of 2-nitroimidazole, new hypoxic cell radiosensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1984**, *10*(8), 1301-1305.
- [144] Sasai K., Iwai H., Yoshizawa T., Nishimoto S., Shibamoto Y., Oya N., Shibata T., Abe M. Fluorinated 2-nitroimidazole derivative hypoxic cell radiosensitizers: Radiosensitizing activities and pharmacokinetics. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1994**, *29*(3), 579-582.
- [145] Oya N., Shibamoto Y., Shibata T., Murata R., Iwai H., Sugiyama T., Abe M. KIN-804 vs. KU-2285 as a radiosensitizer for clinical use. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1994**, *29*(3), 595-600.
- [146] Murayama C., Suzuki A., Sato C., Tanabe Y., Miyata Y., Shoji T., Suzuki T., Suzuki T., Sakaguchi M., Mori T. Radiosensitization by 2-nitroimidazole nucleoside analog rp-170: Radiosensitizing effects under both intravenous and oral administration. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1992**, *22*(3), 557-560.

- [147] Murayama C., Suzuki A., Sato C., Tanabe Y., Shoji T., Miyata Y., Nishio A., Suzuki T., Sakaguchi M., Mori T. Radiosensitization by a new potent nucleoside analog: 1-(1',3',4'-trihydroxy-2'-butoxy)methyl-2-nitroimidazole (RP-343). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1993**, *26(3)*, 433-443.
- [148] Adams G.E., Ahmed I., Clarke E.D., O'Neill P., Parrick J., Stratford I.J., Wallace R.G., Wardman P., Watts M.E. Structure-activity Relationships in the Development of Hypoxic Cell Radiosensitizers. III Effects of basic substituents in nitroimidazole sidechains. *Int. J. Radiat. Biol.* **1980**, *38*, 613-626.
- [149] Adams G.E., Flockhart I.R., Smithen C.E., Stratford I.J., Wardman P., Watts M.E. Electron-Affinic Sensitization. VII. A Correlation between Structures, One-Electron Reduction Potentials, and Efficiencies of Nitroimidazoles as Hypoxic Cell Radiosensitizers. *Radiat. Res.* **1976**, *67(1)*, 9-20.
- [150] Adams G.E., Fielden E.M., Hardy C., Millar B.C., Stratford I.J., Williamson C. Radiosensitization of hypoxic mammalian cells in vitro by some 5-substituted-4-nitroimidazoles. *Int. J. Radiat. Biol.* **1981**, *40(2)*, 153-161.
- [151] Sugie C., Shibamoto Y., Ito M., Ogino H., Suzuki H., Uto Y., Nagasawa H., Hori H. Reevaluation of the Radiosensitizing Effects of Sanazole and Nimorazole In Vitro and In Vivo. *J. Radiat. Res.* **2005**, *46(4)*, 453-459.
- [152] Adams G.E., Stratford I.J. Hypoxia-mediated nitro-heterocyclic drugs in the radio- and chemotherapy of cancer: An overview. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35(1)*, 71-76.
- [153] Winters T., Sercel A., Suto C., Elliott W., Leopold W., Leopold J., Showalter H. Design and Synthesis of 2-Nitroimidazoles with Variable Alkylating and Acylating Functionality. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62(3)*, 301-303.
- [154] Oya N., Shibamoto Y., Sasai K., Shibata T., Murata R., Takagi T., Iwai H., Suzuki T., Abe M. Optical Isomers of a new 2-nitroimidazole nucleoside analog (PR-350 series): radiosensitization efficiency and toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *33(1)*, 119-127.
- [155] Fowler J.F., Adams G.E., Denekamp J. Radiosensitizers of hypoxic cells in solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* **1976**, *3(4)*, 227-256.
- [156] Brown D.M., Parker E., Brown J.M. Structure-Activity Relationships of 1-Substituted 2-Nitroimidazoles: Effect of Partition Coefficient and Side-Chain Hydroxyl Groups on Radiosensitization in Vitro. *Radiat. Res.* **1982**, *90(1)*, 98-108.
- [157] Agrawal K.C., Sakaguchi M., Rockwell S. A New Potent radiosensitizer: 1-(2',3'-dideoxy-alpha-D-erythro-hex-2'-enopyranosyl)-2-nitroimidazole (RA-263). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1982**, *8(3-4)*, 403-407.
- [158] Wong W.W., Jackson R.K., Liew L.P., Dickson B.D., Cheng G.J., Lipert B., Gu Y., Hunter F.W., Wilson W.R., Hay M.P. Hypoxia-selective radiosensitization by SN38023, a bioreductive prodrug of DNA-dependent protein kinase inhibitor IC87361. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *169*, 113641.
- [159] Hori H., Jin C., Kiyono M., Kasai S., Shimamura M., Inayama S. Design, Synthesis, and Biological Activity of Anti-angiogenic Hypoxic Cell Radiosensitizer Haloacetylcarbamoyl-2-nitroimidazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5(3)*, 591-599.
- [160] Ohkura K., Tabata A., Uto Y., Hori H. Correlation Between Radiosensitizing Activity and the Stereo-structure of the TX-2036 Series of Molecules. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 4479-4483.
- [161] Jin C., Nagasawa H., Shimamura M., Uto Y., Inayama S., Takeuchi Y., Kirk K.L., Hori H. Angiogenesis inhibitor TX-1898: syntheses of the enantiomers of sterically diverse

haloacetylcarbamoyl-2-nitroimidazole hypoxic cell radiosensitizers. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4917-4927.

[162] OECD, Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure Activity Relationships [QSAR] Models. Paris: *Organisation for Economic Co-operation and Development*, **2007**.

[163] Thanikaivelan P., Padmanabhan J., Subramanian V., Ramasami T. Chemical reactivity and selectivity using Fukui functions: basis set and population scheme dependence in the framework of B3LYP theory. *Theor. Chem. Acc.* **2002**, *107*(6), 326-335.

[164] De P., Kar S., Ambure P., Roy K. Prediction reliability of QSAR models: an overview of various validation tools. *Arch. Toxicol.* **2022**, *96*, 1279-1295.

7. Wykaz rysunków

Rysunek 1. Krzywe przeżywalności komórek [11].	16
Rysunek 2. Wpływ promieniowania jonizującego na DNA [13].	18
Rysunek 3. Pojedynczo obsadzony orbital molekularny (SOMO) solwatowanego anionu obliczony dla odległości równowagowej R_{CO} (na dole) odpowiadający orbitalowi π^* i dla odległości R_{CO} przy rozerwanym wiązaniu C–O, odpowiadający orbitalowi σ^* (na górze) [19].	21
Rysunek 4. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowanego przyłączeniem LEE poprzez utworzenie rezonansu zlokalizowanego na grupie fosforanowej [20].	22
Rysunek 5. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowany przyłączeniem LEE dla nukleotydu (5'- lub 3'-monofosforanu). B oznacza zasadę azotową [22,23].	23
Rysunek 6. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowanego przyłączeniem LEE w 3'-monofosforanie 2'-deoksycytydyny [24].	24
Rysunek 7. Proponowany mechanizm tworzenia SSB indukowany przyłączeniem LEE zachodzący poprzez dysocjację wiązania P-O dla 3'- lub 5'-monofosforanu 2'-deoksytymidyny [25].	24
Rysunek 8. Podział radiosensybilizatorów [13,39].	27
Rysunek 9. Przykłady znanych analogów tyminy - od lewej: 5-bromo-2'-deoksyurydyna, 5-fluorouracyl, gemcytabina [41].	29
Rysunek 10. Mechanizm dysocjacyjnego przyłączenia elektronu na przykładzie 5-bromouracylu [41].	30
Rysunek 11. Propozycje nowych pochodnych uracylu [54,56].	33
Rysunek 12. Proponowane pochodne 2'-deoksyurydyny – od lewej: 5-tiocyanato-2'-deoksyurydyna (SCNdU), 5-triflano-2'-deoksyurydyna (OTfdU), 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyna (ISdU), 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyna (BrSdU) [41].	35
Rysunek 13. Metronidazol [41].	36
Rysunek 14. Przykłady znanych mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli [41].	37
Rysunek 15. Mechanizm rodnikowy według O'Neill'a [78] (A) oraz przyłączenia elektronu według Edwards'a [79] (B), gdzie M to mimetyk tlenu.	38
Rysunek 16. Mechanizm działania proleku w środowisku hipoksji. X, Y, Z to związki nitrozowe, hydroksyloaminy i aminy [41].	40
Rysunek 17. Sposób wyznaczania profilu energetycznego DEA na przykładzie BrU.	45
Rysunek 18. Sposób wyznaczania wartości AEA, VAE, VDE. M symbolizuje molekułę obojętną, a $M^{\bullet-}$ anionorodnik.	46
Rysunek 19. Graficzne przedstawienie algorytmu nieparametrycznej regresji ważonej [107].	54
Rysunek 20. Badane pochodne (a) uracylu - amidosiarczan 5-hydroksyuracylu (SU) oraz (b) <i>N,N</i> -dimetyloamidosiarczan 5-hydroksyuracylu (DMSU).	59
Rysunek 21. Rozważane ścieżki procesu DEA dla SU w roztworze wodnym [115].	60
Rysunek 22. Wydajność tworzenia anionów o m/z 96 i 95 w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].	62
Rysunek 23. Wydajność tworzenia anionów o m/z 126, 127 i 80 w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].	63
Rysunek 24. Wydajności tworzenia anionów o m/z 64 i 48 dla DEA do SU [115].	64
Rysunek 25. Wydajność tworzenia anionu o m/z 62 w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].	65
Rysunek 26. Wydajność tworzenia anionu o m/z 16 (O^-/NH_2^-) w funkcji energii elektronu dla DEA do SU [115].	66
Rysunek 27. Możliwe ścieżki tworzenia się anionu o masie m/z 42.	67
Rysunek 28. Wydajność tworzenia anionów o m/z 99, 86 i 42 w funkcji energii elektronu dla procesu DEA do SU [115].	68
Rysunek 29. Schemat dysocjacji kwasowej SU w środowisku wodnym [115].	69
Rysunek 30. Zależność stężeń form SU pozostających w równowadze w funkcji pH [115].	70

Rysunek 31. Pochodne SU, SCNU oraz BrU. Strzałki wskazują wiązania ulegające dysocjacji w procesie DEA [115].	71
Rysunek 32. Wydajność tworzenia anionów o m/z 191, 127, 126 i 108 w funkcji energii elektronu dla DEA do DMSU [116].	75
Rysunek 33. Wydajność tworzenia anionów o m/z 124, 123, 82, 80, 66 i 64 w funkcji energii elektronu dla DEA do DMSU [116].	77
Rysunek 34. Wydajność tworzenia anionów o m/z 16 i 15 w funkcji energii elektronu dla DEA do DMSU [116].	79
Rysunek 35. Energia wiązania elektronu (D) w funkcji nadmiarowego ładunku dodatniego (Δq) na jądrach wybranych atomów. E_R oznacza pozycję rezonansu związaną z uwolnieniem: O7 (A), O11 (B) lub grupy metylowej C(14)H3 (C) [116].	81
Rysunek 36. Struktury badanych pochodnych urydyny: 5-jodo-2'-deoksyurydyna (5IdU), 6-jodo-2'-deoksyurydyna (6IdU) oraz 6-jodourydyna (6IUrd).	84
Rysunek 37. Reakcje elementarne dla badanego mechanizmu hydrolizy. Reakcja V dotyczy wyłącznie 6IUrd.	85
Rysunek 38. Wyniki analizy HPLC degradacji termicznej 6-jodourydyny w zakresie od 60 do 80°C po 120 min ogrzewania.	88
Rysunek 39. Wykres Arrheniusa – zależność logarytmu naturalnego ze stałej szybkości ($\ln k$) od odwrotności temperatury ($1/T$) dla reakcji termicznej degradacji 6IUrd w zakresie temperatur 60-80°C.	89
Rysunek 40. Bodecie termodynamiczne (ΔG) oraz bariera kinetyczna (ΔG^*) tworzenia 6OHUrd w reakcji z OH^-	90
Rysunek 41. Bodecie termodynamiczne (ΔG) oraz bariera kinetyczna (ΔG^*) tworzenia 6OHUrd w reakcji z pojedynczą cząsteczką wody.	90
Rysunek 42. Bodecie termodynamiczne (ΔG) oraz bariera kinetyczna (ΔG^*) tworzenia 6OHUrd w reakcji z dwoma cząsteczkami wody.	91
Rysunek 43. Wykres zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu dla 5IdU. Nuc – nukleozyd, A – zasada, R – reszta cukrowa, A^- oraz R^+ – ich formy anionowe i kationowe.	93
Rysunek 44. Wykres zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu dla 6IdU. Okres półtrwania oznaczono jako $\tau_{1/2}$. Nuc to nukleozyd, A – zasada, R – reszta cukrowa, A^- oraz R^+ to ich formy anionowe i kationowe.	93
Rysunek 45. Wykres zmian stężeń poszczególnych reagentów w funkcji czasu dla 6IUrd. Okres półtrwania oznaczono jako $\tau_{1/2}$. Nuc to nukleozyd, A – zasada, R – reszta cukrowa, A^- oraz R^+ to ich formy anionowe i kationowe, hydrNuc to 6-hydroksyurydyna, I^- to anion jodu.	94
Rysunek 46. Struktura imidazolu, wraz z numeracją pierścienia, oraz jego pochodne nitrowe: 2-,4- oraz 5-nitroimidazol.	97
Rysunek 47. Pierwszy etap mechanizmu rodnikowego - tworzenie adduktu 2'-deoksyurydyna-metronidazol.	99
Rysunek 48. Widmo UV/VIS metronidazolu (Met) i 2'-deoksyurydyny (dU) oraz produktu pierwszego etapu mechanizmu rodnikowego – adduktu rodnika 5-hydroksy-2'-deoksyurydyny z metronidazolem (Add).	100
Rysunek 49. Bodecie termodynamiczne (ΔG) oraz bariery kinetyczne (ΔG^*) tworzenia adduktu metronidazol-U [kcal/mol] dla dwóch stereoizomerów (A,B).	101
Rysunek 50. Bodecie termodynamiczne (ΔG) oraz bariery kinetyczne (ΔG^*) tworzenia adduktu metronidazol-dU [kcal/mol] dla dwóch stereoizomerów (A,B).	101
Rysunek 51. Drugi etap mechanizmu rodnikowego – przeniesienie protonu. Czerwoną strzałką zaznaczono atom tlenu uczestniczący w reakcji oraz alternatywne miejsca oderwania protonu.	103
Rysunek 52. Zredukowany model dla przeniesienia atomu wodoru z uwzględnieniem (a) mimetyku tlenu, (b) tlenu.	104
Rysunek 53. Strona domowa utworzonej bazy danych mimetyków tlenu z grupy nitroimidazoli, dostępnej pod adresem: https://oxymim.ug.edu.pl .	106

Rysunek 54. Protonowanie anionorodnika grupy nitrowej. R oznacza część imidazolową danego związku wraz z podstawnikami.....	107
Rysunek 55. Przyłączenie rodnika metylowego do grupy nitrowej mimetyku. R oznacza część imidazolową danego związku wraz z podstawnikami.....	107
Rysunek 56. Zależność pomiędzy obserwowanymi a przewidywanymi przez model wartościami pC1.6 według mechanizmu przyłączenia elektronu.....	109
Rysunek 57. Zależność pomiędzy obserwowanymi a przewidywanymi przez model wartościami pC1.6 według mechanizmu rodnikowego.....	109
Rysunek 58. Wykres powierzchni błędu modelu w zależności od wartości deskryptorów modelu QSAR dla mechanizmu przyłączenia elektronu.....	111
Rysunek 59. Dwuwykres dla zmiennych AEA i ΔG_{prot} reprezentowanych przez dwie pierwsze składowe. Pierwsza główna składowa (PC1) wyjaśnia 91,8 % zmienności, natomiast druga główna składowa (PC2) 8,2 %.....	112

8. Wykaz tabel

Tabela 1. Dawka (Gy) zaabsorbowana przez jądro komórkowe, cytoplazmę i błonę komórkową przy dawce śmiertelnej LD ₅₀ dla komórek linii CHO [12].	17
Tabela 2. Wydajności radiacyjno-chemiczne produktów radiolizy wody w warunkach słabo jonizującego promieniowania (promieniowanie γ (⁶⁰ Co), wysokoenergetyczne elektrony) w roztworach nasyconych różnymi gazami [12].	20
Tabela 3. Zastosowane w badaniach metody obliczeniowe oraz warunki.	43
Tabela 4. Wartości pK oraz stałych równowagowych (K) reakcji dla par związków badany/związek referencyjny wraz z wartościami $\Delta\Delta G$ [kcal/mol].	51
Tabela 5. Aniony fragmentacyjne powstające w eksperymencie CEMB dla SU, pozycje rezonansów oraz bariery termodynamiczne (w skali entalpii swobodnej, ΔG) powstawania poszczególnych anionów [115].	61
Tabela 6. Bariery termodynamiczne i kinetyczne [kcal/mol] dla procesu DEA anionorodników pochodnych uracylu – SU, SCNU i BrU [115].	71
Tabela 7. Aniony fragmentacyjne powstające w eksperymencie CEMB dla DMSU, pozycje rezonansów i bariery termodynamiczne (w skali entalpii swobodnej, ΔG) powstawania poszczególnych anionów oraz ich adiabatyczne powinowactwa elektronowe (AEA _E) [116].	74
Tabela 8. Zmiany entalpii swobodnej (ΔG) w reakcji dysocjacji wiązania N-glikozydowego C1'-N1 w dU dla wybranych funkcyjałów DFT, w kcal/mol. Wartości wyznaczone w środowisku wodnym (model PCM) i przy użyciu bazy funkcyjnej DGDZVP++.	86
Tabela 9. Stałe szybkości poszczególnych reakcji (k_n) wraz ze stałymi równowagi (K_n). Numeracja reakcji została przedstawiona na Rysunek 37 .	92
Tabela 10. Stężenia równowagowe [mol/dm ³] (równowaga) oraz wynikające z symulacji kinetycznych (kinetyka; stężenia po osiągnięciu plateau, patrz rysunki 42-44) poszczególnych reagentów uczestniczących w reakcji hydrolizy jodopochodnych urydyny.	95
Tabela 11. Wartości bodźców termodynamicznych (ΔG , w kcal/mol) dla reakcji przeniesienia protonu pomiędzy 2'-deoksyurydyną a metronidazolem dla wybranych modeli z mimetykiem tlenu lub tlenem.	104
Tabela 12. Statystyki otrzymanych modeli QSAR dla przyłączenia elektronu oraz mechanizmu rodnikowego.	110

9. Spis dorobku naukowego

Publikacje w recenzowanych czasopismach

- Spisz P., Zdrowowicz M., Kozak W., Chomicz-Mańska L., **Falkiewicz K.**, Makurat S., Sikorski A., Wyrzykowski D., Rak J., Arthur-Baidoo E., Ziegler P., Rodrigues Costa M.S., Denifl S. Uracil-5-yl O-Sulfamate: An Illusive Radiosensitizer. Pitfalls in Modeling the Radiosensitizing Derivatives of Nucleobases. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 5600-5613 (DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c03844>)
- Spisz P., Kozak W., Chomicz-Mańska L., Makurat S., **Falkiewicz K.**, Sikorski A., Czaja A., Rak J., Zdrowowicz M. 5-(N-Trifluoromethylcarboxy)aminouracil as a Potential DNA Radiosensitizer and Its Radiochemical Conversion into N-Uracil-5-yloxamic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6352 (DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21176352>)
- Arthur-Baidoo E., **Falkiewicz K.**, Chomicz-Mańska L., Czaja A., Demkowicz S., Biernacki K., Kozak W., Rak J., Denifl S. Electron-induced decomposition of uracil-5-yl O-(N,N-dimethylsulfamate): role of methylation in molecular stability. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*(5), 2344 (DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22052344>)

Rozdziały w monografiach

- Zdrowowicz M., Chomicz-Mańska L., Butowska K., Spisz P., **Falkiewicz K.**, Czaja A., Rak J. DNA damage radiosensitizers geared towards hydrated electrons. w: Practical Aspects of Computational Chemistry V. Ed. J. Leszczyński oraz M. Shukla, *Springer*, **2022**, ISBN 978-3-030-83243-8.

Udział w grantach

- *"Międzywydziałowe interdyscyplinarne studia doktoranckie Chemia z Fizyką realizowane w Uniwersytecie Gdańskim"* (AKRONIM: CHEMFIZ); wykonawca w czasie trwania projektu: 01.03.18-31.12.2022 (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, WND-POWR.03.02.00-00-I059/16)
- *"Od modelu molekularnego in silico do odpowiedzi komórkowej in vitro. Modyfikowane nukleozydy jako radio- bądź/i fotosensybilizatory uszkodzeń DNA"*; wykonawca grantu Maestro w latach 2019-2021 (Narodowe Centrum Nauki, UMO-2014/14/A/ST4/00405, Kierownik: prof. dr hab. Janusz Rak)
- *"Czy 6-podstawione pochodne pirymidyn mogą sensybilizować DNA pod wpływem promieniowania jonizującego?"*, kierownik projektu w latach 2019-2020 (Badania Młodych Naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, BMN 538-8220-B258-18 i 539-8220-B258-19)

Staż naukowe

- Uniwersytet Houston, Teksas, Stany Zjednoczone, 01-02.2021
- Szkoła w zakresie molekularnej biochemii obliczeniowej, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera, Kraków, Polska, 11-14.03.2019

Referaty wygłoszone

- **Falkiewicz K.** Radiosensybilizatory – badania kwantowochemiczne i analiza chemometryczna. Szkoła letnia w ramach projektu CHEMFIZ, Rekowo Górne, Polska, 22-24.09.2021
- Chomicz-Mańka L., **Falkiewicz K.**, Torchała M., Zdrowowicz M., Rak J. *On the way to understand the mechanism of action of oxygen mimetic radiosensitizers.* 8th International Meet on Cancer & Radiology 2021, Praga, Czechy (referat wygłoszony zdalnie), 25.10.2021 (współautorstwo)
- Chomicz-Mańka L., **Falkiewicz K.**, Gajewicz-Skrętna A., Torchała M., Zdrowowicz M., Skotnicki K., Bobrowski K., Rak J. *How do nitroimidazole type oxygen mimetics work? Computational and radiation chemistry studies.* 10th Jubilee International Conference on Radiation in Various Fields of Research, Herceg Novi, Czarnogóra, 13-17.06.2022

Prezentacje posterowe

- **Falkiewicz K.**, Kozak W., Rak J. *Can 6-substituted pyrimidine nucleosides sensitize DNA to damage induced by ionizing radiation?*, 7th International Conference on Radiation in Various Fields of Research, Herceg Novi, Czarnogóra, 10-14.06.2019
- Arthur-Baidoo E., **Falkiewicz K.**, Chomicz-Mańka L., Czaja A., Demkowicz S., Biernacki K., Kozak W., Rak J., Denifl S. *Degradacja N,N-dimetyloamidosiarczanu 5-hydroksyuracylu indukowana przyłączeniem elektronu w fazie gazowej*. XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, Polska, 20-22.09.2021