

BADANIA RADIACYJNE I BIOLOGICZNE POCHODNYCH URACYLU W KONTEKŚCIE WSPOMAGANIA RADIOTERAPII

Paulina Spisz

Choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zgonów. Stosowane tradycyjnie metody leczenia, takie jak radioterapia, chemioterapia, czy interwencja chirurgiczna często nie przynoszą pożądanego efektu. Co więcej, wymienione metody niosą za sobą wiele niebezpiecznych i uciążliwych skutków ubocznych, które obniżają jakość życia, zarówno podczas terapii, jak i po jej zakończeniu, a w skrajnych przypadkach mogą prowadzić do śmierci.

Niemal 50% pacjentów dotkniętych chorobą nowotworową leczonych jest przy pomocy radioterapii, tj. określonych dawek promieniowania jonizującego. Zabieg ten uszkadza DNA żywych komórek albo w sposób bezpośredni – poprzez jonizację samej biomolekuły, albo pośredni – poprzez działanie produktów radiolizy wody. Najbardziej genotoksycznymi produktami radiolizy są rodniki hydroksylowe ($\cdot\text{OH}$). W tym miejscu warto podkreślić, że komórki nowotworowe tworzące guzy lite, odznaczają się obniżonym stężeniem tlenu, co nawet 2 – 3 krotnie zmniejszenia ich wrażliwość na promieniowanie jonizujące. Ponadto, w warunkach hipoksji elektrony hydratowane (również powstające w trakcie radiolizy wody) generowane są równie licznie co rodniki $\cdot\text{OH}$.

Wprowadzenie do terapii przeciwnowotworowej sensybilizatorów uszkodzenia DNA, indukowanego promieniowaniem jonizującym, wydaje się być obiecującą alternatywą dla klasycznej radioterapii. Niniejsza praca doktorska dotyczy grupy radiosensybilizatorów działających w warunkach hipoksji. Są nimi modyfikowane nukleozydy, których mechanizm działania opiera się na koncepcji "Konia Trojańskiego". W idealnym przypadku, modyfikowany nukleozyd ulegając wcieleniu do DNA (maszynaria enzymatyczna używana

do biosyntezy DNA nie powinna odróżniać pochodnej nukleozydu od jego formy natywnej), nie zaburza funkcji biopolimeru. Dopiero działanie promieniowania jonizującego zapoczątkowuje kaskadę zdarzeń, której finalnym skutkiem może być śmierć komórki.

Modyfikacja struktury chemicznej nukleozydu ma na celu zwiększenie właściwości elektrofilowych związku, czyniących z niego pułapkę elektronową. Przyłączenie hydratowanego elektronu (powstającego wskutek radiolizy wody) do modyfikowanego nukleozydu, stanowiącego element DNA, powinno prowadzić do powstania niestabilnego anionu, który dysocjując generuje reaktywny rodnik wewnątrz cząsteczki biopolimeru. To ostatnie indywiduum może na drodze transferu atomu wodoru z reszty cukrowej sąsiedniego nukleozydu indukować uszkodzenia DNA, takie jak pęknięcia nici, sieciowanie, czy też cyklizację puryn.

Należy podkreślić, że liczba modyfikowanych nukleozydów stosowanych w terapii przeciwnowotworowej jest zaskakująco mała. Przyczyną tego zjawiska może być nie do końca poznany mechanizm ich działania. Biorąc pod uwagę potencjał modyfikowanych nukleozydów jako radiosensybilizatorów, a także wciąż rosnące zapotrzebowanie na nowe efektywne terapie przeciwnowotworowe, istotne staje się poszukiwanie związków o lepszych właściwościach uczulających.

Niniejsza praca przedstawia wyniki badań nad właściwościami radiosensybilizującymi czterech pochodnych uracylu: 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU), 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU), 5-(*N*-trifluorometylokarboksy)-aminouracylu (CF₃CONHU) oraz *O*-amidosiarczanu 5-hydroksyuracylu (SU).

Przeprowadzona w przypadku ISdU i BrSdU radioliza ich roztworów wodnych potwierdza, że oba związki ulegają degradacji indukowanej promieniowaniem jonizującym. Jednak tylko w przypadku jodotio pochodnej zidentyfikowano produkt dysocjacyjnego

przyłączenia elektronu, który uważany jest za przyczynę uszkodzeń DNA. Wyniki te znalazły odzwierciedlenie

w przeprowadzonych testach komórkowych. Test klonogeniczności, przeprowadzony na komórkach MCF-7 traktowanych ISdU, pokazuje obniżenie przeżywalności nawet przy najniższej stosowanej dawce promieniowania – 0,5 Gy. Co więcej, analiza cytometryczna fosforylacji histonu H2A.X, który jest markerem pęknięć dwuniciowych DNA, potwierdza, że zwiększona wrażliwość komórek na działanie promieniowania jonizującego, przynajmniej częściowo, związana jest z generowaniem tego typu uszkodzeń. ISdU powoduje również zwiększenie liczby komórek wczesno-apoptycznych, co stanowi kolejne potwierdzenie jej właściwości radiosensybilizujących.

W przypadku drugiego analogu, BrSdU, nie zaobserwowano różnic w populacji komórek pozytywnych względem γ H2A.X, czy też wczesno-apoptycznych pomiędzy komórkami traktowanymi badanym związkiem a kontrolą. Za różnice w zachowaniu ISdU i BrSdU wydaje się odpowiadać wysokość bariery aktywacyjnej w procesie DEA, która wynosi 12,6 i 26 kJ · mol⁻¹ (na poziomie B3LYP(PCM)/DGDZVP++), odpowiednio dla BrSdU i ISdU. Znacząco większa bariera w przypadku BrSdU prawdopodobnie wydłuża czas życia anionorodnika BrSdU⁻ na tyle, że ulega on reakcjom protonowania, uniemożliwiającym proces dysocjacji, co pozbawia BrSdU właściwości sensybilizujących.

Również w przypadku radiolizy stacjonarnej wodnego roztworu kolejnej pochodnej, 5-(*N*-trifluorometylokarboksy)-aminouracylu (CF₃CONHU), obserwowano degradację prowadzącą do powstania produktu DEA. Przeprowadzony test klonogeniczności wskazuje na obniżenie przeżywalności komórek PC3 traktowanych CF₃CONHU i promieniowaniem jonizującym, co potwierdza potencjał radiosensybilizujący badanego związku.

Ostatnia pochodna, *O*-amidosiarczan 5-hydroksyuracylu (SU), charakteryzuje się korzystnym profilem DEA, obliczonym metodą M06-2X/6-31++G(d,p). Proces dysocjacyjnego przyłączenia elektronu w fazie gazowej przebiega w sposób skomplikowany i zależny od energii niskoenergetycznych elektronów, prowadząc do wielu produktów związanych z degradacją zarówno podstawnika, jak i pierścienia uracylu. Jednak radioliza stacjonarna roztworu wodnego SU wskazuje, iż związek jest odporny na działanie hydratowanych elektronów. Ani zmiana pH, ani stosowanie wyższej dawki promieniowania nie zmieniają wyników eksperymentu radiolitycznego. Przyczyną rozbieżności między wynikami eksperymentu a obliczonym profilem DEA okazała się niedokładność stosowanego modelu DFT – w szczególności błąd opisu dysocjacji wiązania S–O. SU jest zatem przykładem związku, który sugeruje konieczność stosowania również dokładniejszych metod teoretycznych, takich jak modele ekstrapolacyjne (np. G2), przy weryfikacji właściwości radiosensybilizujących nukleozydów.

Przedstawione badania pozwoliły na wskazanie dwóch analogów, ISdU i CF₃CONHU, jako potencjalnych uczulaczy. W przypadku pierwszego związku wyniki są na tyle obiecujące, że zastosowanie go jako radiosensybilizatora zostało objęte zgłoszeniem patentowym. Otrzymane rezultaty prowadzą również do wyjaśnienia kilku szczegółów mechanistycznych procesu DEA, a także udoskonalenia modelu teoretycznego stosowanego do weryfikacji radiosensybilizujących właściwości modyfikowanych nukleozydów. Dalsze badania tej grupy pochodnych, rozszerzające procedurę stosowaną w niniejszej pracy o weryfikację: stabilności hydrolitycznej proponowanych modyfikacji strukturalnych, łatwości ich fosforylacji enzymatycznej, akceptowalności odpowiednich trifosforanów przez polimerazy DNA, a wreszcie wydajności procesu DEA powinny doprowadzić do otrzymania nukleozydu(ów), który zasadniczo poprawi skuteczność radioterapii.