

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Magdaleny Zdrowowicz pt.

„Pochodne zasad nukleinowych jako substancje uwrażliwiające DNA na promieniowanie elektromagnetyczne”

Radioterapia należy do podstawowych metod leczenia nowotworów. Ekspozycja tkanek na promieniowanie wysokoenergetyczne skutkuje radiolizą wody. W przypadku niedotlenienia, charakterystycznego dla nowotworów litych, ich wrażliwość na produkty radiolizy wody jest 2,5-3 razy niższa niż komórek o przeciętnym poziomie natlenienia. Dlatego też efektywna radioterapia powinna być skojarzona z użyciem radiosensybilizatorów, tj. związków chemicznych, które uwrażliwiają komórki, szczególnie te zmienione nowotworowo, na działanie promieniowania jonizującego. Szczególnie obiecującymi kandydatami na efektywne promienioczułacz DNA są modyfikowane nukleozydy. Modyfikacja strukturalna powinna polegać na wprowadzeniu podstawnika zwiększającego podatność na degradację indukowaną elektronami, które w procesie radiolizy niskoutlenowanej wody powstają równie licznie jak silnie genotoksyczne rodniki hydroksylowe, z taką różnicą, że te pierwsze nie wywołują uszkodzeń niemodyfikowanego DNA. Analogi nukleozydów na poziomie komórkowym, dzięki podobieństwu strukturalnemu do ich naturalnych odpowiedników, powinny być wbudowywane w strukturę DNA na etapie replikacji lub naprawy biopolimeru, jednak same nie powinny wykazywać działania cytotoksycznego. Dopiero po pojawieniu się bodźca w postaci promieniowania, powinny powodować degradację materiału genetycznego, prowadzącą do śmierci komórki nowotworowej. Ze względu na liczne i niekontrolowane podziały, charakterystyczne dla komórek nowotworowych, powinny one być wbudowywane w znacznie większym stopniu w przypadku tkanki nowotworowej w porównaniu z tkanką zdrową. Modyfikacje strukturalne prowadzą często do pojawienia się fotoreaktywności pochodnych w zakresie bliskiego

nadfioletu, co z kolei otwiera drogę do wzbogacenia nimi terapii fotodynamicznej, znacznie bezpieczniejszej niż radioterapia. Pomimo tak korzystnych charakterystyk, pochodne zasad nukleinowych nie znajdują satysfakcjonującego zastosowania w praktyce klinicznej. Gama tego typu związków jest zadziwiająco skromna a mechanizm ich działania nie do końca poznany. W związku z tym, celem niniejszej pracy doktorskiej z jednej strony było wyjaśnienie mechanizmu fotouwrażliwiania DNA przez bromonukleozydy, z drugiej natomiast zaproponowanie nowych pochodnych zasad nukleinowych o potwierdzonym potencjale radiosensybilizującym.

Pierwszym etapem podczas realizacji wyznaczonych celów było zbadanie fotoindukowanej degradacji fragmentów DNA o długości 80 par zasad, wielokrotnie znakowanych bromopochodnymi nukleozydów pirymidynowych – 5-bromo-2'-deoksyurydyną (BrdU) oraz 5-bromo-2'-deoksycytydyną (BrdC). W tym celu opracowano protokoły enzymatycznego znakowania fragmentu DNA badanymi pochodnymi, na drodze amplifikacji *in vitro*, metodą PCR. Analiza fotoindukowanych uszkodzeń fragmentu DNA i sekwencji do nich prowadzących, pozwoliła ustalić, że tworzenie się wtórnych, pojedynczych pęknięć nici stanowi główny mechanizm uszkodzeń zmodyfikowanego DNA i jest konsekwencją dalekozasięgowego transferu elektronu pomiędzy wzbudzoną BrdU/BrdC a odległą guaniną. Udało się również zidentyfikować struktury innych produktów fotodegradacji – wewnątrznicowych dimerów pirymidynowych, w których zasady nukleinowe połączone są wiązaniem kowalencyjnym (sieciowanie wewnątrznicowe).

W kolejnym etapie, zbadano podatność czterech bromopochodnych nukleozydów (BrdX) na degradację indukowaną rodnikami 2-hydroksypropylowymi (OHisp[•]), stanowiącymi model wtórnych rodników organicznych, generowanych w komórce na skutek ekspozycji na promieniowanie. Wykazano, że w przypadku bromopirymidyn – BrdU i BrdC produktami omawianej reakcji rodnikowej, powstającymi w porównywalnych ilościach są

debromowany nukleozyd (dX) oraz jego addukt z OHisop[•]. Natomiast faworyzowanym produktem tej samej reakcji dla bromopuryn - BrdG i BrdA jest addukt, a debromowany nukleozyd powstaje w śladowych ilościach. Rezultaty tego eksperymentu poparte obliczeniami kwantowo-chemicznymi doprowadziły do ustalenia mechanizmu tej rodnikowej reakcji, zgodnie z którym zidentyfikowane addukty tworzą się na drodze substytucji rodnikowej. Debromowane nukleozydy powstają natomiast na skutek transferu elektronu pomiędzy OHisop[•] a bromonukleozydem. Co ważne, proces ten przebiega przez stadium reaktywnego rodnika zlokalizowanego na zasadzie nukleinowej, odpowiedzialnego za główne uszkodzenia nici DNA. Wyniki badań ilościowych sugerują, że bromopirymidyny powinny być bardziej efektywnymi sensybilizatorami rodnikowych uszkodzeń DNA niż bromopuryny.

Ostatnią częścią projektu doktorskiego stanowiły studia nad właściwościami radiouczulającymi, nie opisanymi dotąd w literaturze, sensybilizatorów – tio- i selenocyjanianowych pochodnych uracylu. Związki te zostały zaprojektowane w oparciu o badania kwantowo-chemiczne pierwszego, kluczowego etapu indukowanej przyłączeniem elektronu degradacji, prowadzącej do powstania reaktywnego rodnika 5-urydylowego. Syntezę badanych pochodnych przeprowadzono stosując metodę polegającą na utworzeniu w środowisku bezwodnego kwasu octowego chlororodanu/ chloroselenocyjanianu, do którego wprowadzono natywną zasadę nukleinową/nukleozyd (uracyl/2'-deoksyurydyna). Potencjał sensybilizujący pochodnej tiocyjanianowej (SCNU) został potwierdzony w eksperymencie spektroskopii fotoelektronowej (PES). Dalsze badania pozwoliły zbadać mechanizm degradacji SCNdU, wywołanej przyłączeniem elektronu. Badanie ESR, dzięki zastosowaniu bardzo niskich temperatur pomiarów, pozwoliło zaobserwować kolejne etapy reakcji rodnikowych, a przeprowadzenie stacjonarnej radiolizy roztworu SCNdU i zbadanie radiolitu, pozwoliły zidentyfikować końcowe, stabilne produkty indukowanej elektronem degradacji SCNdU. Okazało się, że badany analog pod wpływem nadmiarowego elektronu ulega dwóm

niezależnym drogą degradacji. Pierwsza z nich przebiega z utworzeniem dwóch silnie cytotoksycznych indywiduów: anionu cyjankowego i rodnika 5-tiourydylowego (U-S•), stabilizującego się w wyniku dimeryzacji (dU-S-S-dU). Druga natomiast prowadzi do generacji równie toksycznego rodnika 5-urydylowego, stabilizującego się w wyniku utworzenia 2'-deoksyurydyny. Podobne podejście zastosowano w przypadku pochodnej selenocyjanianowej (SeCNU). Analiza produktów degradacji tej pochodnej, spowodowanej przyłączeniem nadmiarowego elektronu poparta obliczeniami kwantowo-chemicznymi, pozwoliła ustalić, że pierwotnym produktem tego procesu jest rodnik U-Se•, który następnie stabilizuje się przez dimeryzację (dU-S-S-dU) i reakcję z rodnikiem •OtBu (którego źródłem był alkohol *tert*-butylowy, użyty jako zmiatacz rodników hydroksylowych w warunkach eksperymentu). Dodatkowo wykazano, że badane pochodne charakteryzują się stosunkowo niską cytotoksycznością. Przeprowadzone badania czynią z tio- i selenocyjanianopochodnych uracylu niezwykle obiecujące radiosensybilizatory, który po wprowadzeniu do DNA będą prawdopodobnie powodować tworzenie się cytotoksycznych uszkodzeń, takich jak: pęknięcia nici, sieciowanie wewnątrz- i międzyniciowe w obrębie DNA, a także sieciowanie typu białko-DNA.