



Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii

**POCHODNE PURYNOWYCH ZASAD
NUKLEINOWYCH JAKO POTENCJALNE ZWIĄZKI
UWRAŻLIWIAJĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE
NA PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE**

mgr inż. Magdalena Datta

Praca doktorska wykonana
w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych
Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: prof. dr hab. Janusz Rak

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Zdrowowicz-Żamojć

Gdańsk, 2025

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

*Wyrazy głębokiej wdzięczności kieruję do mojego **Promotora, prof. dr hab. Janusza Raka**, za opiekę naukową, inspirujące rozmowy, cenne wskazówki oraz nieocenione wsparcie na każdym etapie mojej pracy badawczej.*

*Szczególne podziękowania składam również mojej **Promotor Pomocniczej, dr Magdalenie Zdrowowicz-Żamojć**, za merytoryczne wsparcie, zaangażowanie, życzliwość i cierpliwość, które towarzyszyły mi przez cały okres mojej naukowej przygody.*

*Dziękuję **Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Fizycznej** za nieocenioną pomoc, wsparcie oraz dobre słowo, zwłaszcza w trudniejszych momentach.*

*Dziękuję **dr hab. inż. Sebastianowi Demkowiczowi, prof. PG**, oraz całemu zespołowi z Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej — **Oldze, Karolowi** — za ciepłe przyjęcie, poświęcony czas, cierpliwe dzielenie się wiedzą i wprowadzenie mnie w świat syntezy organicznej.*

***Mojej Rodzinie** dziękuję za nieustającą wiarę we mnie, bezgraniczne wsparcie, cierpliwość i miłość, które dawały mi siłę w najbardziej wymagających chwilach.*

*Na koniec, podziękowania kieruję do **Patryka** — za obecność w najtrudniejszych momentach, za wsparcie, otuchę i nieustanne przypominanie mi, bym nigdy się nie poddawała.*

Wyniki opisane w niniejszej pracy zostały opublikowane w następujących artykułach:

(P1) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl, Janusz Rak. "Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution". *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(15), **2024**

(P2) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Anna Czaja, Magdalena Zdrowowicz, Sebastian Demkowicz, Janusz Rak. "Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties". *Scientific Reports*, 15, 17535, **2025**

(P3) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak. "8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 299, 118094, **2025**

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	5
Streszczenie.....	7
Abstract.....	9
I. Wstęp.....	11
1. Radioterapia w leczeniu nowotworów.....	11
2. Promieniowanie jonizujące w radioterapii.....	11
3. Komórkowe mechanizmy obronne.....	13
4. Rola radiosensybilizatorów w leczeniu onkologicznym.....	15
5. Modyfikowane nukleozydy jako potencjalne radiouczulacze.....	16
II. Cele pracy.....	19
III. Badania własne.....	20
1. Synteza nowych pochodnych purynowych.....	20
2. Badania radiacyjne w roztworze wodnym.....	26
3. Badania in vitro nowych pochodnych 2'-deoksyadenozyny.....	36
IV. Podsumowanie.....	53
V. Literatura.....	56
VI. Wykaz rysunków.....	61
VII. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	64
1. Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution.....	64
2. Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties.....	95
3. 8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer.....	122
VIII. Oświadczenia współautorów.....	154
IX. Dorobek naukowy.....	163

Wykaz stosowanych skrótów

¹H NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu (*ang. Proton Nuclear Magnetic Resonance*)

8-BrA – 8-bromoadenina

8-SA – 6-Amino-7(H)-puryno-8(9H)-tion

ACN – acetonitryl

ASCH₃ – 8-metylotioadenina

ASCF₃ – 8-trifluorometylotioadenina

benzylOCF₃ – 4-(trifluorometoksy)toluen

BrdA – 8-bromo-2'-deoksyadenozyna

BrdU – 5-bromo-2'-deoksyurydyna

CH₃I – jodek metylu

CF₃I – trifluorojodometan

dA-NH₂ – 8-amino-2'-deoksyadenozyna

dA-NHbenzylCF₃ – 8-(4-trifluorometylo)benzyloamino-2'-deoksyadenozyna

dA-NHbenzylOCF₃ – 8-(4-trifluorometoksy)benzyloamino-2'-deoksyadenozyna

dA-NHbenzylSCF₃ – 8-(4-trifluorometylotio)benzyloamino-2'-deoksyadenozyna

DEA – dysocjacyjne przyłączenie elektronu (*ang. Dissociative Electron Attachment*)

DEF – współczynnik wzmocnienia dawki (*ang. Dose Enhancement Factor*)

DMF – dimetyloformamid

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. Deoxyribonucleic Acid*)

DSB – dwuniciowe pęknięcia DNA (*ang. Double Strand Breaks*)

dU• – rodnik 5-urydylowy

e_{aq}⁻ – solwatowany elektron (*ang. Solvated Electron*)

ESI – jonizacja przez elektrorozpylanie (*ang. Electrospray Ionization*)

HMF – fibroblasty gruczołu sutkowego (*ang. Human Mammary Fibroblasts*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. High Performance Liquid Chromatography*)

HR – rekombinacja homologiczna (*ang. Homologous Recombination*)

HRMS – wysokorozdzielcza spektrometria mas (*ang. High Resolution Mass Spectrometry*)

ICL – międzyniciowe wiązania krzyżowe (*ang. Interstrand Cross Links*)

KOH – wodorotlenek potasu

LC-MS – wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (*ang. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LEE – niskoenergetyczny electron (*ang. Low Energy Electron*)

LET – liniowy transfer energii (*ang. Linear Energy Transfer*)

MeOH – metanol

MCF-7 – komórki nowotworu piersi (*ang. Human Breast Adenocarcinoma*)

MNuc – modyfikowany nukleozyd

MS/MS – tandemowa spektrometria mas (*ang. Tandem Mass Spectrometry*)

NaOH – wodorotlenek sodu

NHEJ – niehomologiczne łączenie końców (*ang. Non-Homologous End-Joining*)

PC3 – komórki nowotworu prostaty (*ang. Human Prostate Adenocarcinoma*)

prep-HPLC – preparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. Preparative High-Performance Liquid Chromatography*)

PJ – promieniowanie jonizujące

ROS – reaktywne formy tlenu (*ang. Reactive Oxygen Species*)

RS – radiosensybilizator

SD – odchylenie standardowe (*ang. Standard Deviation*)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (*ang. Superoxide Dismutase*)

SSB – jednoniciowe pęknięcia DNA (*ang. Single Strand Breaks*)

t-BuOH – tert-butanol

TLC – cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (*ang. Thin-Layer Chromatography*)

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

Streszczenie

Nowotwory stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów w krajach rozwiniętych, ustępując jedynie chorobom układu krążenia. W związku z tym prowadzone są intensywne badania nad nowymi, bardziej skutecznymi metodami terapii onkologicznych. Ponad 80% przypadków nowotworów to nowotwory lite, które często charakteryzują się znacznym niedotlenieniem. Hipoksja obniża skuteczność promieniowania jonizującego stosowanego w radioterapii, co sprzyja rozwojowi radiooporności nowotworów.

Jednym z obiecujących podejść do rozwiązania tego problemu jest zastosowanie radiosensybilizatorów – związków zwiększających wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie. Wśród szczególnie interesujących grup radiosensybilizatorów znajdują się modyfikowane nukleozydy, które dzięki swojemu podobieństwu strukturalnemu do naturalnych nukleozydów mogą być efektywnie wbudowywane do DNA komórek nowotworowych. Ich działanie opiera się na wychwytywaniu elektronów powstających w wyniku radiolizy wody, zachodzącej po ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące. Inkorporacja takich związków do genomowego DNA czyni biopolimer bardziej podatnym na uszkodzenia radiacyjne, co w efekcie może prowadzić do śmierci komórki nowotworowej.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza nowych pochodnych adeniny oraz 2'-deoksyadenozyny, ocena ich podatności na radiolizę, a także weryfikacja ich właściwości radiosensybilizujących na poziomie komórkowym w badaniach *in vitro*. W ramach pracy opracowano i zsyntezowano pięć nowych związków: 8-metylotioadeninę, 8-trifluorometylotioadeninę, 8-trifluorometoksybenzylamino-2'-deoksyadenozynę, 8-Trifluorometylotiobenzylamino-2'-deoksyadenozynę, 8-trifluorometylobenzylamino-2'-deoksyadenozynę.

Wszystkie związki poddano działaniu promieniowania jonizującego, a następnie przeanalizowano produkty radiolizy ich wodnych roztworów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz spektrometrii mas. Uzyskane wyniki porównano z przewidywaniami teoretycznymi.

Ze względu na wysoką podatność zsyntezowanych pochodnych nukleozydu adeninowego na degradację radiacyjną w roztworach wodnych oraz fakt, że stanowią one bliższe strukturalne analogi naturalnych składników DNA niż pochodne adeniny, zostały one wybrane do dalszych badań *in vitro*. Cytotoksyczność oceniono za pomocą testu MTT na dwóch liniach komórek nowotworowych oraz jednej linii komórek zdrowych. Dodatkowo,

przeprowadzono test klonogeniczności, który potwierdził radiosensybilizujące właściwości badanych pochodnych na poziomie komórkowym.

W dalszym etapie badań skupiono się na najbardziej obiecujących związkach: dA-NHbenzylOCF₃ oraz dA-NHbenzylSCF₃. Wykonano szereg eksperymentów mających na celu poznanie mechanizmu ich działania, w tym analizy cytometryczne pozwalające ocenić wpływ badanych związków na cykl komórkowy oraz indukcję podwójnych pęknięć nici DNA. Zbadano również ich zdolność do penetracji komórki, lokalizację subkomórkową, możliwość fosforylacji oraz inkorporacji do DNA.

Podjęta tematyka badawcza ma istotne znaczenie z punktu widzenia potencjalnego zastosowania otrzymanych związków jako radiosensybilizatorów. Po pozytywnym przejściu dalszych badań, w tym in vivo oraz klinicznych, związki te mogą przyczynić się do zwiększenia skuteczności radioterapii w leczeniu nowotworów litych.

Abstract

Cancer is the second leading cause of death in developed countries, surpassed only by cardiovascular diseases. As a result, intensive research efforts are underway to develop novel and more effective oncological treatment strategies. More than 80% of cancer cases are classified as solid tumors, which are often characterized by pronounced hypoxia. This hypoxic environment reduces the effectiveness of ionizing radiation used in radiotherapy, thereby contributing to the development of tumor radioresistance.

One promising strategy to overcome this limitation is the use of radiosensitizers – compounds that enhance the sensitivity of cancer cells to radiation. Modified nucleosides, which, due to their structural similarity to natural nucleosides, can be efficiently incorporated into the genomic DNA of cancer cells, are particularly interesting in the context of radiosensitization. Their mechanism of action involves capturing of hydrated electrons generated by the radiolysis of water. Incorporation of such compounds into genomic DNA renders the biomolecule more susceptible to radiation-induced damage, ultimately leading to cancer cell death.

The objective of this doctoral dissertation was the synthesis of novel adenine and 2'-deoxyadenosine derivatives, evaluation of their susceptibility to radiolysis, and in vitro assessment of their radiosensitizing properties at the cellular level. Five novel compounds were designed and synthesized: 8-methylthioadenine, 8-trifluoromethylthioadenine, 8-trifluoromethoxybenzylamino-2'-deoxyadenosine, 8-trifluoromethylthiobenzylamino-2'-deoxyadenosine, and 8-trifluoromethylbenzylamino-2'-deoxyadenosine.

All compounds were exposed to ionizing radiation, and the resulting radiolysis products were analyzed using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. The identified products were in good agreement with theoretical predictions.

Due to their higher susceptibility to radiation-induced degradation in aqueous solutions and their closer structural resemblance to natural DNA components compared to adenine derivatives, adenine nucleoside derivatives were selected for further in vitro studies. Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay on two cancer cell lines and one normal cell line. In addition, clonogenic assays were conducted, confirming the radiosensitizing potential of these compounds at the cellular level.

Subsequent investigations concerned the most promising derivatives, dA-NHbenzylOCF₃ and dA-NHbenzylSCF₃. A series of experiments, including flow cytometric analyses of cell cycle progression and induction of DNA double-strand breaks, was performed to elucidate their mechanism of action. Furthermore, the compounds' ability to penetrate cells, their subcellular localization, phosphorylation, and incorporation into DNA were examined.

The research presented in this dissertation is of significant relevance for the potential application of the synthesized compounds as radiosensitizers. Following successful in vivo validation and clinical evaluation, these derivatives may contribute to improving the efficacy of radiotherapy in the treatment of solid tumors.

I. Wstęp

1. Radioterapia w leczeniu nowotworów

Choroby nowotworowe pozostają jednym z kluczowych problemów zdrowia publicznego na skalę globalną, głównie ze względu na utrzymującą się wysoką śmiertelność wśród pacjentów nimi dotkniętych. Według najnowszych danych opublikowanych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*), w 2022 roku odnotowano około 20 milionów nowych przypadków zachorowań, a liczba zgonów z powodu nowotworów osiągnęła 9,7 miliona. Prognozuje się, że do 2050 roku wzrost zachorowalności podwyższy się o 77% w porównaniu do roku 2022 [1].

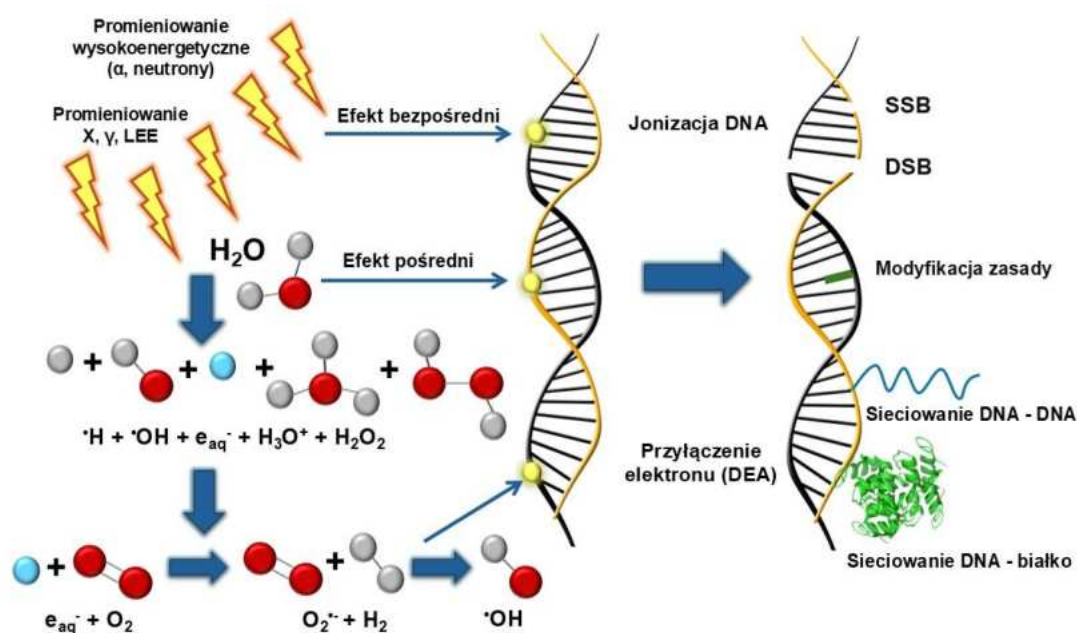
Nowotwory stanowią heterogeniczną grupę schorzeń o etiologii wielogenowej i wielokomórkowej, które mogą wywodzić się z niemal każdego rodzaju komórek i tkanek ustroju. Komórki nowotworowe charakteryzują się nieograniczonym potencjałem proliferacyjnym, zdolnością do autonomicznego i szybkiego wzrostu niezależnego od fizjologicznych mechanizmów regulacyjnych, a także wykazują potencjał do naciekania okolicznych tkanek oraz tworzenia odległych przerzutów [2].

Radioterapia stanowi jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów [3]. Szacuje się, że około 50% pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową jest poddawanych leczeniu z wykorzystaniem tej techniki, co świadczy o kluczowej roli radioterapii [4,5]. Metoda ta polega na zastosowaniu miejscowego oddziaływania wysokoenergetycznego promieniowania jonizującego (PJ), które indukuje jonizację molekularnych składników komórek i tkanek. Proces ten inicjuje szereg reakcji fizykochemicznych, prowadzących do specyficznych efektów biologicznych [6].

2. Promieniowanie jonizujące w radioterapii

PJ jest wykorzystywane od ponad wieku do leczenia nowotworów w oparciu o założenie, że szybko proliferujące komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na promieniowanie niż komórki zdrowe [7]. Wydajność indukowania zmian biologicznych jest w dużej mierze zależna od rodzaju struktury biologicznej poddawanej działaniu PJ, a jak wykazano w badaniach von Sonntag [8], jądro komórkowe otrzymuje krytyczną dawkę promieniowania niezależnie od lokalizacji źródła. Zmienność dawek pochłanianych przez cytoplazmę i błonę komórkową nie wpływa znacząco na przeżywalność komórek, co wskazuje, że głównym celem radioterapii jest DNA, a jego uszkodzenia warunkują dalsze procesy

komórkowe. PJ może oddziaływać z DNA komórkowym (ang. *Deoxyribonucleic Acid*) zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, przy czym charakter i zakres wywoływanych efektów zależą od typu promieniowania, jego energii, rodzaju i stanu metabolicznego komórek [9]. W wyniku tych interakcji dochodzi do powstania różnorodnych uszkodzeń materiału genetycznego, takich jak pęknięcia jednoniciowe (SSB, ang. *Single Strand Breaks*), dwuniciowe (DSB, ang. *Double Strand Breaks*), modyfikacje zasad azotowych, a także tworzenie wiązań krzyżowych typu DNA–DNA oraz DNA–białko (Rysunek 1), co w konsekwencji może aktywować szlaki prowadzące do śmierci komórki [10,11]. Korpuskularne promieniowania jonizujące (np. wiązka cząstek α lub neutronów) charakteryzuje się wysokim tzw. liniowym transferem energii (LET, ang. *Linear Energy Transfer*), co oznacza zdeponowanie energii w niewielkiej objętości. W tym przypadku energia promieniowania jest bezpośrednio przekazywana biomolekułom w zderzeniach, w wyniku czego dochodzi do jonizacji cząsteczek takich jak DNA [12].



Rysunek 1. Mechanizmy działania PJ w radioterapii [10,11].

Z kolei mechanizm pośredni uszkodzenia DNA (wywoływanego przez promieniowanie o niskim LET, np. promieniowanie elektromagnetyczne – γ , X, lub wiązka elektronów min. LEE – niskoenergetyczne elektrony, ang. *Low Energy Electrons*), polega na wytwarzaniu reaktywnych indywiduów – wolnych rodników, pochodzących z procesu jonizacji lub radiolizy cząsteczek wody, które stanowią około 80% masy komórki [10]. Bezpośrednie zderzenia z DNA stanowią nieistotny ułamek zdarzeń prowadzących do uszkodzenia biopolimeru. Radioliza wody skutkuje powstaniem szeregu reaktywnych produktów, w tym rodników

wodoru ($\cdot\text{H}$), solwatowanych elektronów (e_{aq}^-) oraz reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), spośród których szczególnie istotne znaczenie biologiczne przypisuje się rodnikom hydroksylowym ($\cdot\text{OH}$). Uznawane są one za najbardziej genotoksyczne i cytotoksyczne produkty radiolizy, odpowiedzialne nawet za około 65% uszkodzeń komórkowych wywołanych pośrednim działaniem PJ [13]. Rodniki $\cdot\text{OH}$ reagują z resztą deoksyrybozy, odrywając atom wodoru, co w dalszych etapach może prowadzić do przerwania integralności nici DNA. Pęknięcia SSB są szczególnie istotne w fazie replikacji, w której następuje rozplecenie helikalnej struktury DNA, czyniąc nią bardziej podatną na dalsze uszkodzenia. Należy jednak zaznaczyć, że SSB są zazwyczaj efektywnie naprawiane przez komórkowe mechanizmy naprawcze, w przeciwieństwie do pęknięć DSB, które stanowią najbardziej letalną formę uszkodzeń DNA. Dlatego też DSB są postrzegane jako główny rodzaj uszkodzeń odpowiedzialny za indukcję śmierci komórkowej w wyniku ekspozycji na PJ [10,14].

E_{aq}^- stanowią, obok rodników $\cdot\text{OH}$, jeden z głównych produktów radiolizy wody i odgrywają istotną rolę w dalszych przemianach chemicznych zachodzących w środowisku wodnym. Z perspektywy radiobiologii, są one silnymi reduktorami zdolnymi do inicjowania reakcji prowadzących do uszkodzeń biomolekuł, takich jak DNA, białka czy lipidy. Ich działanie, choć pośrednie, może skutkować powstawaniem wtórnych rodników, które uszkadzają struktury kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania komórki [8,15].

3. Komórkowe mechanizmy obronne

Komórki nowotworowe potrafią rozwijać różnorodne mechanizmy obronne, które zmniejszają ich wrażliwość na PJ stosowane w radioterapii. Te mechanizmy obejmują zarówno odpowiedzi molekularne, jak i zmiany w mikrośrodowisku guza. Jednym z kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za radiooporność jest zwiększona zdolność naprawy uszkodzeń DNA. Komórki nowotworowe mogą aktywować efektywne szlaki naprawcze, takie jak rekombinacja homologiczna (HR, ang. *Homologous Recombination*), czy niehomologiczne łączenie końców (NHEJ, ang. *Non-Homologous End-Joining*) [16,17]. W ostatniej dekadzie mechanizm HR wyróżnił się jako kluczowa ścieżka naprawy DNA w komórkach [18,19]. Odgrywa ona rolę w naprawie kilku typów uszkodzeń DNA, które stanowią zagrożenie dla integralności genomu, w tym DSB, uszkodzeń napotykanych podczas replikacji DNA i międzyniciowych wiązań krzyżowych DNA (ICL, ang. *Interstrand Cross Links*). Jest to wysoko precyzyjny mechanizm naprawczy, który wykorzystuje nieuszkodzoną siostrzaną chromatydę jako matrycę do odtworzenia pierwotnej sekwencji DNA, a szlak ten jest

aktywowany głównie w fazie S i G2 cyklu komórkowego, kiedy siostrzane chromatydy są dostępne po replikacji DNA [19].

Z kolei szlak NHEJ stanowi szybszy, choć mniej precyzyjny sposób naprawy DSB. Mechanizm ten nie wymaga obecności homologicznej sekwencji i polega na bezpośrednim łączeniu wolnych końców przerwanego DNA. NHEJ działa efektywnie przez cały cykl komórkowy [20], ale dominuje szczególnie w fazie G1, kiedy chromatydy siostrzane nie są obecne. Ponieważ szlak ten wymaga obecności obu końców przerwanego DNA, nie może on skutecznie naprawiać jednostronnych DSB, np. powstałych podczas kolizji widełek replikacyjnych. Łączenie niesparowanych końców może prowadzić do reorganizacji genomowych, takich jak translokacje. Z tego względu NHEJ odgrywa kluczową rolę głównie w naprawie klasycznych, obustronnych DSB [20,21]. W kontekście nowotworów nadmierna aktywność lub deregulacja zarówno NHEJ, jak i HR może prowadzić do zwiększonej przeżywalności komórek nowotworowych po ekspozycji na PJ, co znacząco utrudnia skuteczne leczenie radioterapeutyczne.

Kolejnym istotnym mechanizmem obronnym komórek nowotworowych przed skutkami PJ jest ochrona przed stresem oksydacyjnym. Nowotwory często wykazują zwiększoną aktywność układów antyoksydacyjnych, m.in. poprzez podwyższenie poziomu glutationu oraz nadekspresję enzymów neutralizujących ROS, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *Superoxide Dismutase*), katalaza czy peroksydazy. Ważną rolę w regulacji tej odpowiedzi odgrywa czynnik transkrypcyjny NRF2, którego aktywacja prowadzi do zwiększonej ekspresji genów chroniących komórkę przed stresem oksydacyjnym [22,23].

Dodatkowo komórki nowotworowe mogą modyfikować przebieg cyklu komórkowego, zatrzymując jego progresję na granicy faz G1/S lub G2/M, co daje im czas na efektywną naprawę uszkodzeń DNA przed kolejnym podziałem [24]. W odpowiedzi na działanie promieniowania często dochodzi także do aktywacji szlaków sygnalizacyjnych o działaniu proprzeżyciowym, takich jak PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK czy NF- κ B, które wspomagają przetrwanie komórek i hamują mechanizmy prowadzące do ich eliminacji [25–27].

Istotnym czynnikiem sprzyjającym radiooporności jest również upośledzenie mechanizmów apoptozy, spowodowane m.in. mutacjami w genie TP53 lub nadekspresją białek antyapoptycznych, takich jak Bcl-2 czy survivin [28]. W konsekwencji komórki nowotworowe

zyskują przewagę w przeżyciu pomimo znacznych uszkodzeń genomu, co znacząco utrudnia skuteczność radioterapii.

W kontekście zmian mikrośrodowiskowych komórek nowotworowych, ważnym czynnikiem jest hipoksja, czyli niedotlenienie komórkowe, które jest jednym z kluczowych parametrów wpływających na skuteczność radioterapii. Występuje powszechnie w nowotworach ludzkich i zwierzęcych, będąc wynikiem ograniczonej dyfuzji tlenu, jego intensywnego zużycia przez komórki położone blisko naczyń krwionośnych oraz niedostatecznej perfuzji krwi w obrębie guza [29]. Warto podkreślić, że hipoksja jest charakterystyczna dla guzów litych, które stanowią około 80% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów [30]. Komórki nowotworowe znajdujące się w środowisku hipoksyjnym są bardziej odporne na promieniowanie. Udowodniono, że przy stężeniach tlenu poniżej 0,02% (0,15 mm Hg) oporność komórek na promieniowanie wzrasta 2–3-krotnie w porównaniu do warunków normotlenowych [31,32]. Mechanizm ten związany jest z brakiem możliwości utrwalenia uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem. W warunkach normoksji proces ten wspomagany jest przez cząsteczkowy tlen, który działa jako „utrwalacz” powstałych uszkodzeń. W efekcie, różnice w skuteczności zabijania komórek pomiędzy warunkami normotlenowymi, a hipoksyjnymi mogą być bardzo znaczące, zwłaszcza przy wyższych dawkach promieniowania. Warto podkreślić, że stopień hipoksji nowotworów klinicznych często osiąga poziomy poniżej 1% tlenu (ok. 8 mm Hg) [32], co już znacząco wpływa na ich radiooporność. Co więcej, komórki hipoksyczne są często w stanie spoczynku mitotycznego, a także są trudno dostępne dla leków cytotoksycznych, co czyni je nie tylko opornymi na radioterapię, ale również na wiele form chemioterapii [31,33].

4. Rola radiosensybilizatorów w leczeniu onkologicznym

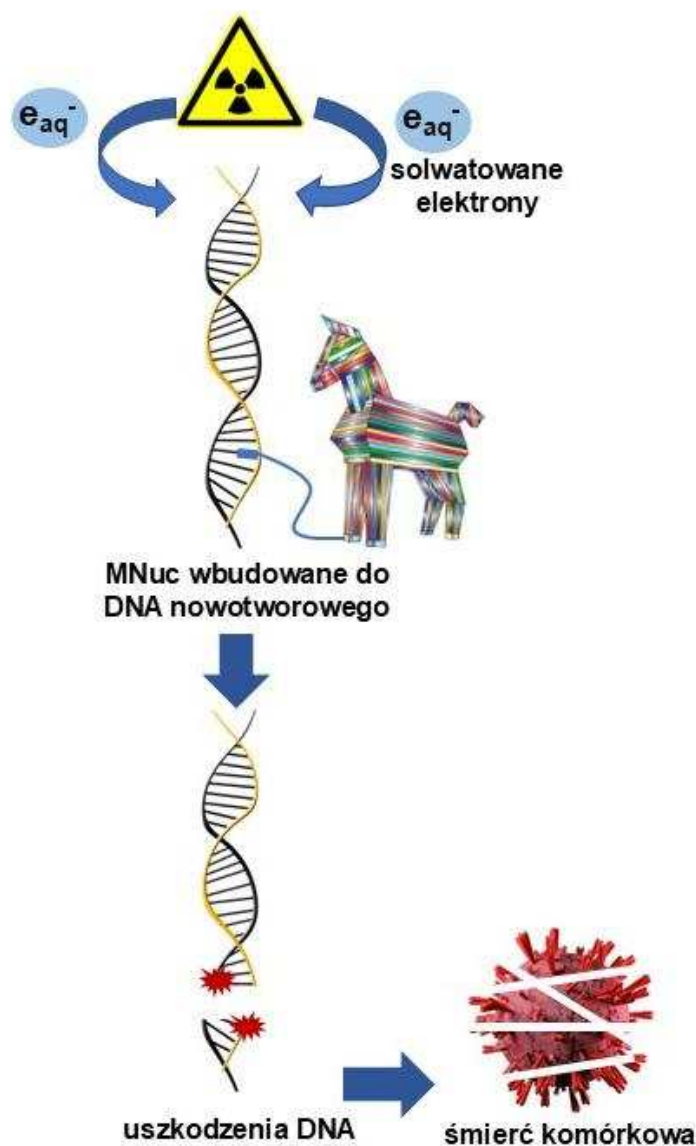
Radiooporność komórek nowotworowych stanowi istotne ograniczenie skuteczności radioterapii ze względu na to, że stosowane dawki promieniowania mogą być niewystarczające do indukcji śmierci komórkowej. Dodatkowo, stosowanie coraz wyższych dawek PJ może negatywnie oddziaływać na zdrowe komórki i tkanki [34]. Jednym z obiecujących podejść mających na celu zwiększenie skuteczności i bezpieczeństwa radioterapii jest wykorzystanie radiosensybilizatorów (RS) – związków chemicznych, które zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na działanie PJ [35,36]. Skuteczne radiouczulacze powinny charakteryzować się wysoką selektywnością wobec komórek nowotworowych oraz zdolnością do efektywnej kumulacji w obrębie guza. Kluczowe jest, aby ich działanie nie wiązało się z toksycznością wobec zdrowych komórek i tkanek, gdyż głównym założeniem stosowania RS jest zwiększenie

wrażliwości komórek nowotworowych na działanie PJ, przy jednoczesnym ograniczeniu jego szkodliwego wpływu na otaczające, niezmienione chorobowo struktury [31].

Spośród wielu grup RS jedynie mimetyki tlenu oraz analogi zasad azotowych wydają się wykazywać najwyższy potencjał do zastosowania w praktyce klinicznej [37]. Mimetyki tlenu to związki, które wykorzystują obecność hipoksji w komórkach nowotworowych i „naśladują” działanie tlenu w warunkach niedotlenienia, zwiększając tym samym skuteczność PJ [34]. Natomiast analogi zasad azotowych wykorzystują intensywny metabolizm i szybkie podziały komórek nowotworowych, co sprzyja ich łatwiejszej inkorporacji do materiału genetycznego. Dzięki temu zwiększają one podatność tych komórek na uszkodzenia indukowane PJ.

5. Modyfikowane nukleozydy jako potencjalne radiouczulacze

Szczególnie obiecującą grupą RS są modyfikowane nukleozydy (MNuc, ang. *Modified Nucleosides*) [38]. Dzięki strukturze zbliżonej do natywnych nukleozydów, MNuc mogą być wbudowane do genomowego DNA komórek nowotworowych podczas procesów replikacji lub naprawy nici. Skuteczna inkorporacja tych związków prowadzi do zaburzenia funkcji DNA, co w rezultacie powoduje śmierć komórki [34]. Modyfikacja MNuc polega na wprowadzeniu grup funkcyjnych, które w reakcji z produktami działania PJ zwiększają liczbę uszkodzeń DNA nowotworowego, jednocześnie zachowując podobieństwo do struktury naturalnych nukleozydów. Mechanizm ich działania związany jest z dysocjacyjnym przyłączeniem elektronu (DEA, ang. *Dissociative Electron Attachment*), jednym z głównych produktów radiolizy wody [39]. Dlatego też, aby zwiększyć podatność na degradację indukowaną elektronami, wprowadzony podstawnik powinien charakteryzować się silnymi właściwościami elektroujemnymi [40]. Chociaż e_{aq}^- powstają podczas radiolizy wody z taką samą wydajnością co rodniki $\cdot OH$ [8], to nie prowadzą one do pęknięć nici DNA w ramach wtórnych reakcji, pomimo że mogą przyłączać się do jego struktury [41]. W związku z tym, wprowadzenie MNuc jako RS do nici DNA komórek nowotworowych wydaje się być dobrze uzasadnione. Warto podkreślić, że wprowadzana do komórek guza pochodna nukleozydu, sama z siebie nie powinna wykazywać właściwości cytotoksycznych, lecz dopiero po zastosowaniu bodźca w postaci PJ powinna prowadzić do degradacji materiału genetycznego i w konsekwencji śmierci komórek nowotworowych [38,42]. Na Rysunku 2 przedstawiono mechanizm „konია trojańskiego” jaki może pojawić się przy zastosowaniu MNuc w roli RS.



Rysunek 2. Mechanizm działania RS – koncepcja „konja trojańskiego” [42].

Najlepiej poznanymi przedstawicielami RS z grupy MNuc są halogenopochodne pirymidyny, w szczególności 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU), której właściwości uwrażliwiające na PJ zostały po raz pierwszy opisane już w latach 60. XX wieku [43]. Mechanizm działania BrdU opiera się prawdopodobnie na szybkiej reakcji zmodyfikowanej zasady azotowej z e_{aq}^- . Po przyłączeniu elektronu do cząsteczki BrdU powstaje anionorodnik, następnie dochodzi do eliminacji jonu bromkowego, co z kolei prowadzi do powstania wysoce reaktywnego rodnika 5-urydylowego ($dU\cdot$) [44]. Jeżeli taki rodnik powstanie w strukturze DNA, może dojść do wtórnego transferu atomu wodoru z sąsiadującego fragmentu cukrowego, co w efekcie skutkuje przerwaniem nici DNA [45].

W badaniach *in vitro* wykazano, że BrdU zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie ponad trzykrotnie w porównaniu z komórkami kontrolnymi [43]. Pomimo obiecujących wyników, kliniczne zastosowanie tego związku pozostaje ograniczone ze względu na jego krótki okres półtrwania i niską biodostępność. BrdU ulega bowiem szybkiemu dehalogenowaniu przy udziale wątrobowej syntazy tymidylanowej, co znacząco redukuje jego stężenie we krwi już w ciągu kilku minut od podania, uniemożliwiając osiągnięcie skutecznych stężeń w komórkach nowotworowych [46,47]. W związku z tym, pomimo że BrdU wykazuje niemal idealne właściwości radiosensybilizujące w warunkach laboratoryjnych, nie nadaje się do zastosowania jako kliniczny RS [48].

II. Cele pracy

MNuc stanowią obiecującą grupę potencjalnych RS, które mogą przyczynić się do zwiększenia skuteczności i bezpieczeństwa radioterapii nowotworów. Warto zaznaczyć, że w literaturze naukowej opisano jedynie nieliczne przykłady pochodnych zasad purynowych, takie jak halogenowe analogi 2'-deoksyadenozyny, stosowanych w kontekście radiosensybilizacji, pomimo że w dwuniciowym DNA zasady purynowe występują w takiej samej liczbie jak pirymidynowe. Co istotne, wyniki badań teoretycznych wskazują, że odpowiednio zmodyfikowane puryny mogą zwiększać podatność DNA na oddziaływanie e_{aq}^- , co otwiera nowe perspektywy dla ich zastosowania jako RS [44,49,50].

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, synteza oraz ocena właściwości nowych pochodnych zasad purynowych jako potencjalnych RS uwrażliwiających komórki nowotworowe na działanie PJ.

W toku prac badawczych zrealizowano następujące cele:

- Synteza dwóch pochodnych adeniny: 8-metylotioadeniny ($ASCH_3$) oraz 8-trifluorometylotioadeniny ($ASCF_3$) [**P1 i wyniki nieopublikowane**];
- Synteza trzech pochodnych 2'-deoksyadenozyny: 8-(4-trifluorometoksy)benzylamino-2'-deoksyadenozyny ($dA-NHbenzylOCF_3$), 8-(4-trifluorometylotio)benzyloamino-2'-deoksyadenozyny ($dA-NHbenzylSCF_3$) oraz 8-(4-trifluorometylo)benzyloamino-2'-deoksyadenozyny ($dA-NHbenzylCF_3$) [**P2, P3 oraz wyniki nieopublikowane**];
- Zbadanie potencjału pochodnych adeniny i 2'-deoksyadenozyny na degradację indukowaną e_{aq}^- z wykorzystaniem eksperymentu radiolizy stacjonarnej [**P1, P2, P3 oraz wyniki nieopublikowane**];
- Weryfikacja właściwości radiosensybilizujących pochodnych 2'-deoksyadenozyny względem dwóch linii komórek nowotworowych: nowotworu prostaty (PC3) oraz nowotworu piersi (MCF-7) na PJ [**P2, P3 oraz wyniki nieopublikowane**].

III. Badania własne

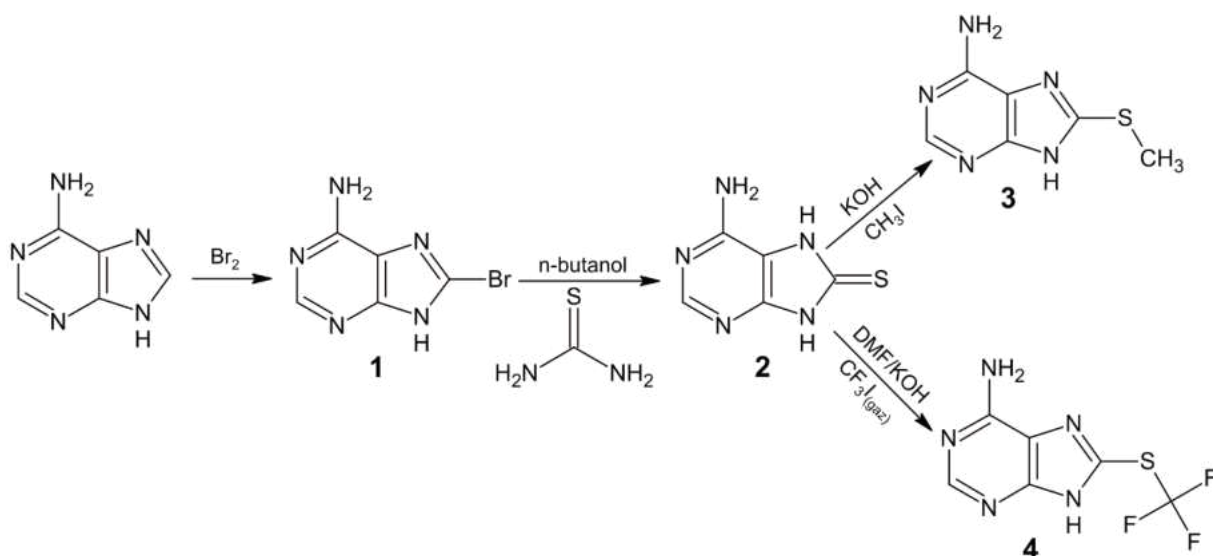
1. Synteza nowych pochodnych purynowych

Otrzymywanie modyfikowanych nukleozydów powinno opierać się na wprowadzeniu do ich struktury grup silnie elektroujemnych, które zwiększają powinowactwo cząsteczki do elektronu, a tym samym sprzyjają degradacji indukowanej przez wychwyt elektronu. Niestety, zasady purynowe – w tym adenina – wykazują znacznie mniejszą podatność na modyfikacje chemiczne w porównaniu do zasad pirymidynowych, takich jak uracyl. Analiza potencjalnych miejsc modyfikacji chemicznej wskazuje, że pozycja C8 w pierścieniu purynowym adeniny jest najbardziej podatna na podstawienia. Wynika to zarówno z jej względnej reaktywności chemicznej, jak i korzystnej dostępności przestrzennej. Co istotne, modyfikacje w tej pozycji nie zakłócają tworzenia się wiązań wodorowych w schemacie Watsona-Cricka w dwuniciowym DNA, a jednocześnie umożliwiają wprowadzanie grup aromatycznych lub hydrofobowych, które mogą wpływać na właściwości fizykochemiczne i biologiczne cząsteczki.

Synteza pochodnych adeniny

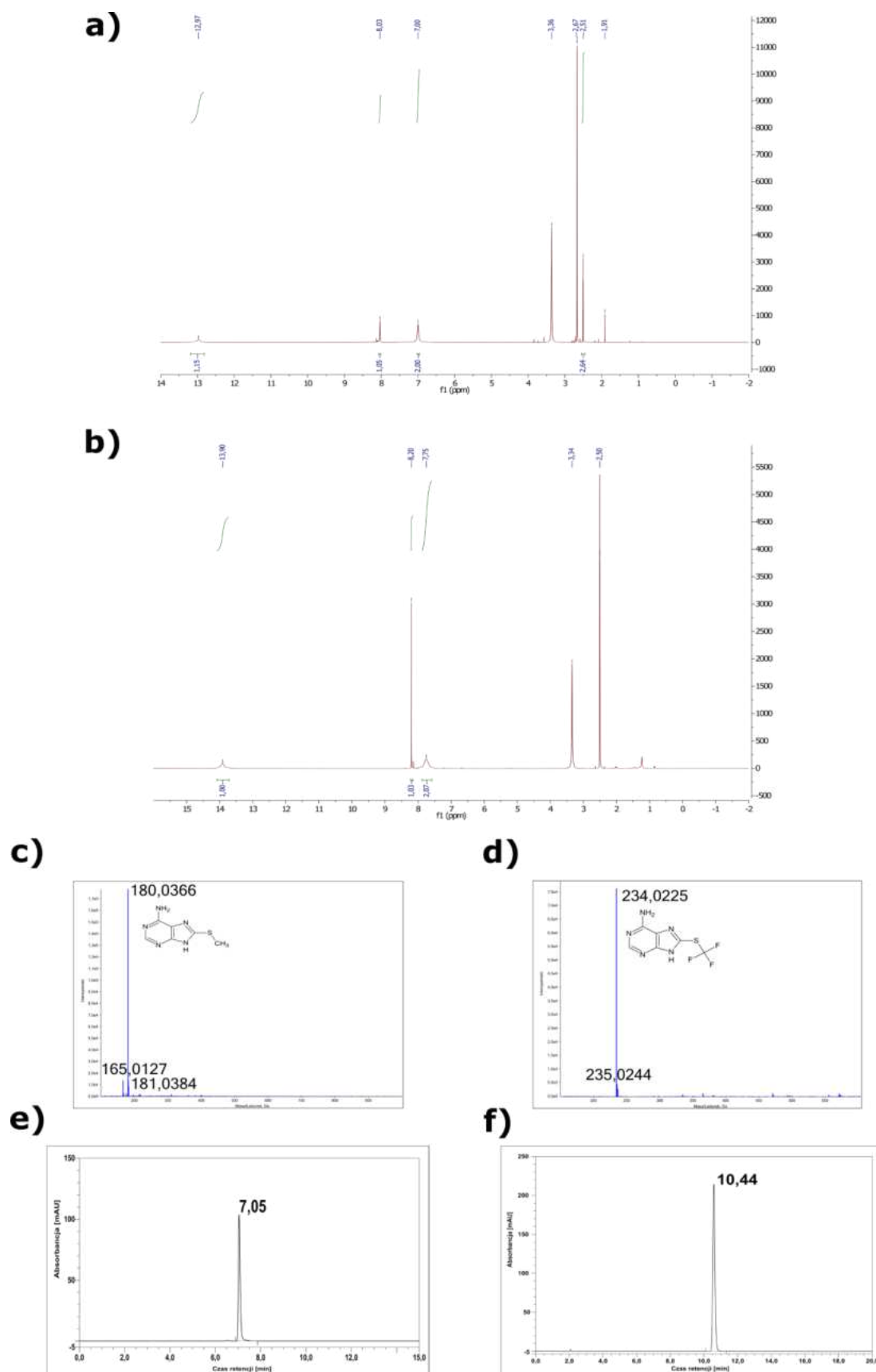
Kierując się powyższymi przesłankami otrzymano dwie nowe pochodne adeniny: ASCH₃ oraz ASCF₃ (**Rysunek 3 oraz Rysunek 1 w P1**). W oparciu o dostępną literaturę naukową oraz publikację Janeba, Z., i wsp. [51], zastosowano jedną z najczęściej wykorzystywanych metod funkcjonalizacji pozycji C8 pierścienia purynowego, jaką jest bromowanie. Działając na adeninę bromem w środowisku wodnego roztworu amoniaku, otrzymano 8-bromoadeninę (8-BrA) **1** z wydajnością 74%. Następnie, modyfikując procedurę opisaną w innej publikacji Janeba, Z., i wsp. [52], uzyskany produkt poddano działaniu mocznika w n-butanolu, w warunkach wrzenia rozpuszczalnika przez 28 godzin, co pozwoliło uzyskać 6-amino-7(H)-purino-8(9H)-tion (8-SA) **2** z wydajnością 52%. Ostatni etap syntezy prowadzący do uzyskania ASCH₃ **3** oraz ASCF₃ **4** różnił się w zależności od pochodnej. Pochodną **3** otrzymano stosując zmodyfikowaną metodę opisaną przez Janeba, Z., i wsp. [52], gdzie reakcja z jodkiem metylu (CH₃I) w środowisku 1,5 M roztworu wodorotlenku potasu (KOH) i w temperaturze 15 °C doprowadziła do uzyskania finalnego produktu – ASCH₃ (wydajność 60%). Ostatni etap syntezy prowadzący do otrzymania drugiej pochodnej **4**, został przeprowadzony z pomocą dr inż. Karola Biernackiego z Politechniki Gdańskiej. Reakcja była prowadzona w warunkach bezwodnych, gdzie 8-SA rozpuszczono w bezwodnym dimetyloformamidzie (DMF), dodano KOH, a następnie przez noc przepuszczano przez roztwór gazowy trifluorjodometan (CF₃I). Po nasyceniu roztworu gazem, mieszaninę

mieszano w szczelnie zamkniętym układzie w temperaturze 90 °C przez kolejne 72 godziny, osiągając wydajność reakcji około 26%.



Rysunek 3. Schemat otrzymywania pochodnych ASCH_3 oraz ASCF_3 .

Każdy z otrzymanych produktów głównych został oczyszczony z wykorzystaniem chromatografii typu „flash” przy użyciu automatycznego systemu oraz preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (prep-HPLC). Pochodne zidentyfikowano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu (^1H NMR) oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS). Dodatkowo określono czystość każdej z finalnych pochodnych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (**Rysunek 4**).



Rysunek 4. Charakterystyka pochodnych ASCH₃ i ASCF₃. **a)** Widmo ¹H NMR dla ASCH₃; **b)** Widmo ¹H NMR dla ASCF₃; **c)** Widmo MS dla ASCH₃ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **d)** Widmo

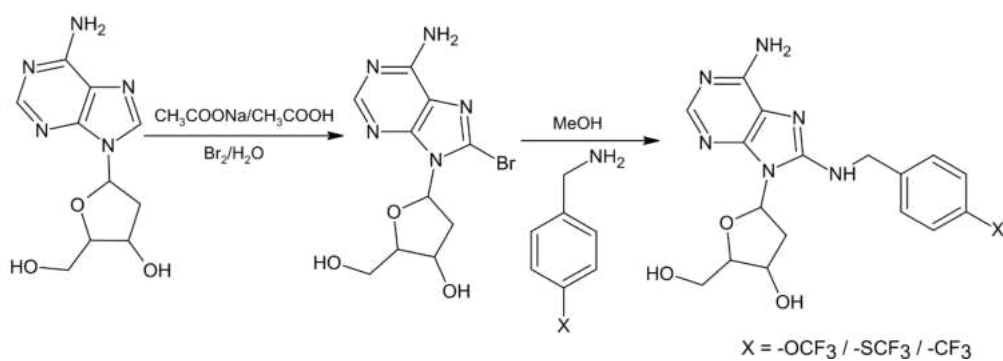
MS dla $ASCF_3$ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **e**) Chromatogram HPLC dla $ASCH_3$ (czystość = 99%); **f**) Chromatogram HPLC dla $ASCF_3$ (czystość = 98%).

Synteza pochodnych 2'-deoksyadenozyny

W kontekście modyfikowanego nukleozydu adeninowego zaproponowano syntezę trzech pochodnych: dA-NHbenzylOCF₃, dA-NHbenzylSCF₃ i dA-NHbenzylCF₃.

W tym celu wykorzystano metodę opisaną przez Vivet-Boudou i wsp. [53], opartą na reakcji 8-bromo-2'-deoksyadenozyny z odpowiednią aminą, prowadzącą do otrzymania 2'-deoksyadenozyny podstawionej w pozycji C8 pierścienia purynowego. Jak wspomniano wcześniej, nukleozyd wykazujący właściwości radiosensybilizujące powinien charakteryzować się zdolnością do wiązania nadmiarowego elektronu, dlatego zdecydowano o wprowadzeniu silnie elektroujemnego podstawnika w części aminowej. Wprowadzenie grupy -CF₃ (o stałej Hammetta σ_p wynoszącej 0,54 [54]) jest uzasadnione nie tylko wysoką elektroujemnością atomów fluoru, ale także silnymi efektami indukcyjnymi wywieranymi przez ten podstawnik. Właściwości te zwiększają powinowactwo cząsteczki do elektronu oraz stabilność powstającego anionu odchodzącego. Warto również podkreślić, że benzyloaminy zawierające podstawniki -OCF₃ -SCF₃ oraz -CF₃ w pozycji para w pierścieniu są komercyjnie dostępne, co dodatkowo zwiększa dostępność i praktyczność tej strategii syntezy.

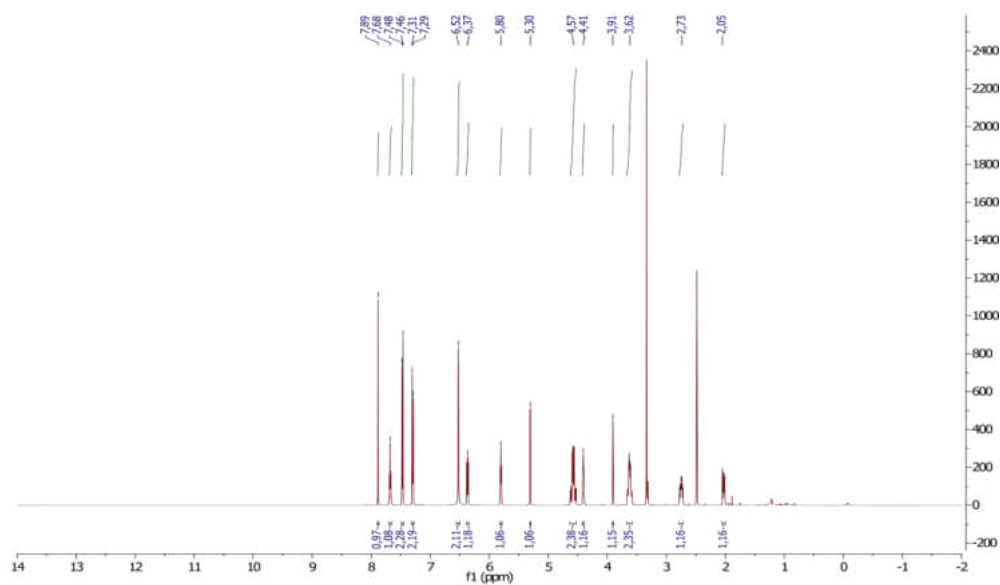
Syntezę rozpoczęto od otrzymania bromowanej w pozycji C8 2'-deoksyadenozyny (BrdA), którą uzyskano w środowisku buforu octanowego o pH = 4 poprzez dodanie roztworu bromu do podgrzewanego roztworu 2'-deoksyadenozyny. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC, ang. *Thin-Layer Chromatography*) do momentu całkowitego zaniku substratu, co nastąpiło po około 1,5 godziny. Po zakończeniu bromowania mieszaninę reakcyjną odbarwiono 40% roztworem pirosiarczynu sodu, a następnie zobojętniono wodnym roztworem wodorotlenku sodu (NaOH) do pH = 7. W kolejnym etapie, prowadzącym do uzyskania docelowych pochodnych, BrdA rozpuszczono w metanolu (MeOH), po czym dodano nadmiar odpowiedniej benzyloaminy w stosunku molowym 1:8. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 48 godzin (**Rysunek 5**). Każdą z pochodnych otrzymano z wydajnością około 30%.



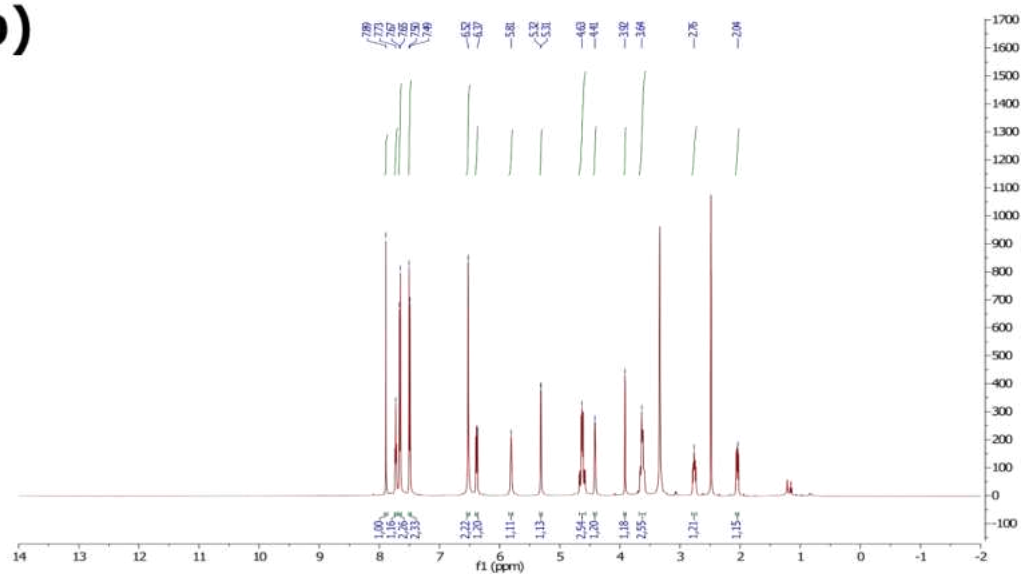
Rysunek 5. Schemat otrzymywania pochodnych 2'-deoksyadenozyny.

Otrzymane związki główne zostały oczyszczone przy użyciu chromatografii typu flash z zastosowaniem automatycznego systemu oraz prep-HPLC. Struktury uzyskanych pochodnych potwierdzono z wykorzystaniem ¹H NMR oraz HRMS, a czystość każdego z produktów końcowych określono poprzez analizę HPLC, co przedstawiono na **Rysunku 6**.

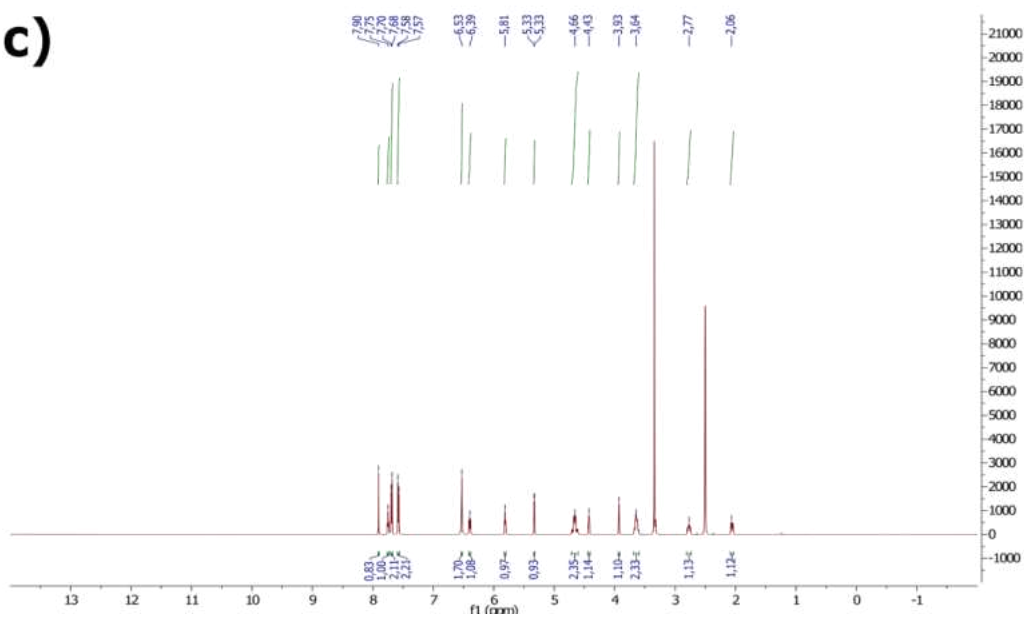
a)

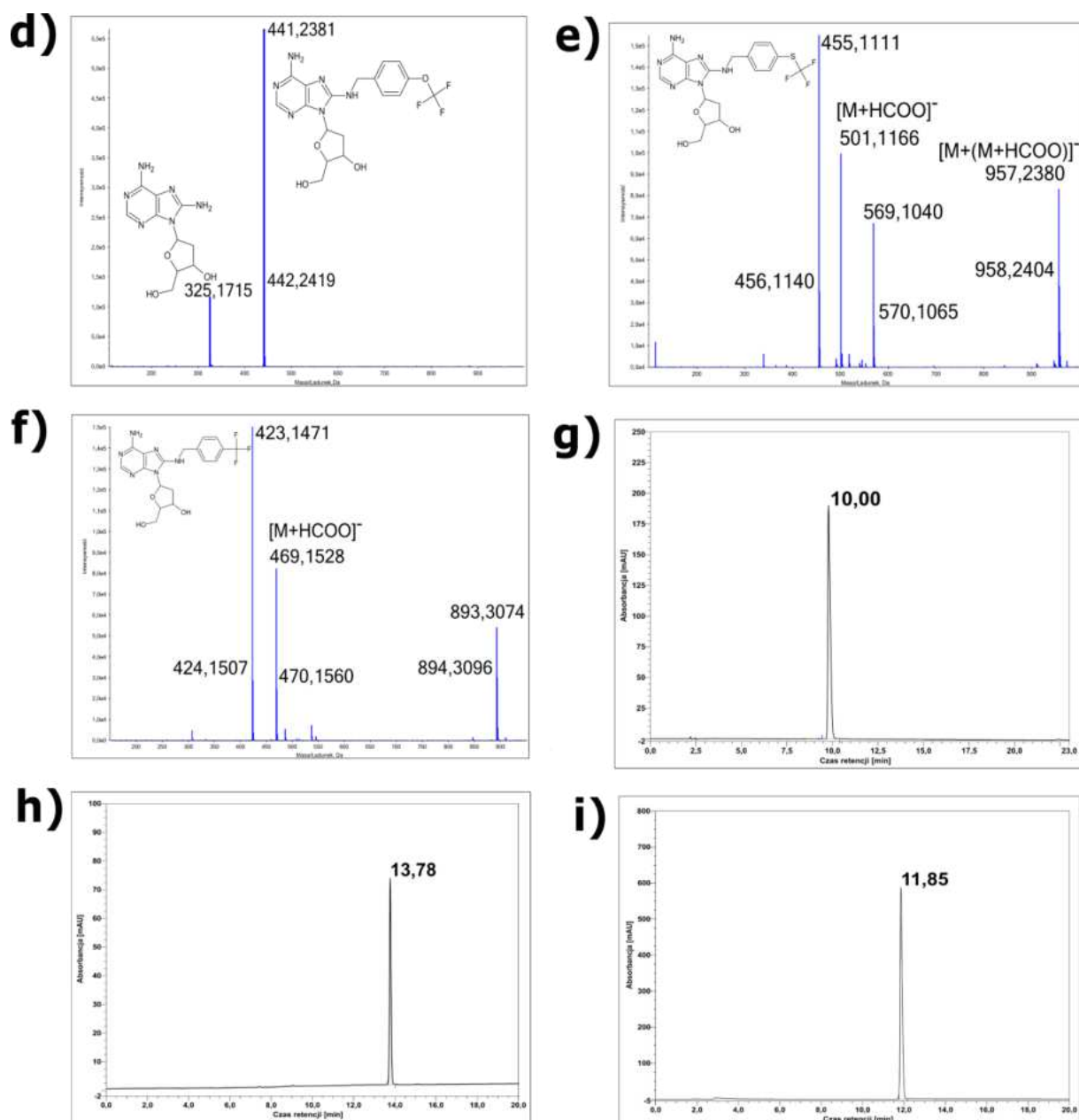


b)



c)





Rysunek 6. Charakterystyka pochodnych 2'-deoksyadenozyny. **a)** Widmo ¹H NMR dla dA-NHbenzylOCF₃; **b)** Widmo ¹H NMR dla dA-NHbenzylSCF₃; **c)** Widmo ¹H NMR dla dA-NHbenzylCF₃; **d)** Widmo MS dla dA-NHbenzylOCF₃ zarejestrowane w trybie jonizacji dodatniej; **e)** Widmo MS dla dA-NHbenzylSCF₃ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **f)** Widmo MS dla dA-NHbenzylCF₃ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **g)** Chromatogram HPLC dla dA-NHbenzylOCF₃ (czystość = 99 %); **h)** Chromatogram HPLC dla dA-NHbenzylSCF₃ (czystość = 98 %); **i)** Chromatogram HPLC dla dA-NHbenzylCF₃ (czystość = 97 %).

2. Badania radiacyjne w roztworze wodnym

W procesie projektowania nowych RS należących do grupy MNuc, przed przystąpieniem do badań *in vitro* konieczne jest zweryfikowanie, czy nowo zsyntezowane związki ulegają degradacji indukowanej DEA w środowisku wodnym. W tym celu przeprowadzono radiolizę stacjonarną wodnego roztworu badanej pochodnej w warunkach symulujących środowisko komórkowe. Roztwór zawierał nowo zsyntezowany związek w stężeniu 10^{-4} M, 30 mM tert-butanol (t-BuOH) jako zmiatacz rodników $\cdot\text{OH}$ oraz bufor fosforanowy (10 mM, pH = 7) odzwierciedlający fizjologiczne pH komórki. Przed napromienianiem próbki były poddawane przepłukiwaniu argonem przez 3 minuty w celu usunięcia tlenu rozpuszczonego w roztworze, aby odwzorować warunki hipoksji charakterystyczne dla guzów litych. Napromienianie przeprowadzono w komorze CellRad wyposażonej w lampę rentgenowską (Faxitron, X-ray Corporation, Tucson, AZ, USA), dostarczając całkowitą dawkę 500 Gy przy mocy dawki 5,81 Gy/min. Lampa pracowała przy napięciu 130 kV i natężeniu 5 mA, a w torze promieniowania zastosowano filtr aluminiowy o grubości 0,5 mm.

Zastosowanie tak wysokich dawek PJ, jak 500 Gy, w stacjonarnej radiolizie wodnego roztworu nukleozydu jest niezbędne do wytworzenia wystarczającego stężenia produktów radiolizy, umożliwiającego ich wiarygodne wykrycie i analizę. Ma to szczególne znaczenie ze względu na ograniczenia czułości technik analitycznych, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS). Należy podkreślić, że 1 Gy PJ generuje jedynie około 2×10^{-7} M uwodnionych elektronów [55], co stanowi stosunkowo niskie stężenie. Dla porównania, systemy komórkowe reagują już na znacznie niższe dawki promieniowania (1–10 Gy), ponieważ pierwotne uszkodzenia są potęgowane przez następujące po uszkodzeniu DNA procesy biochemiczne.

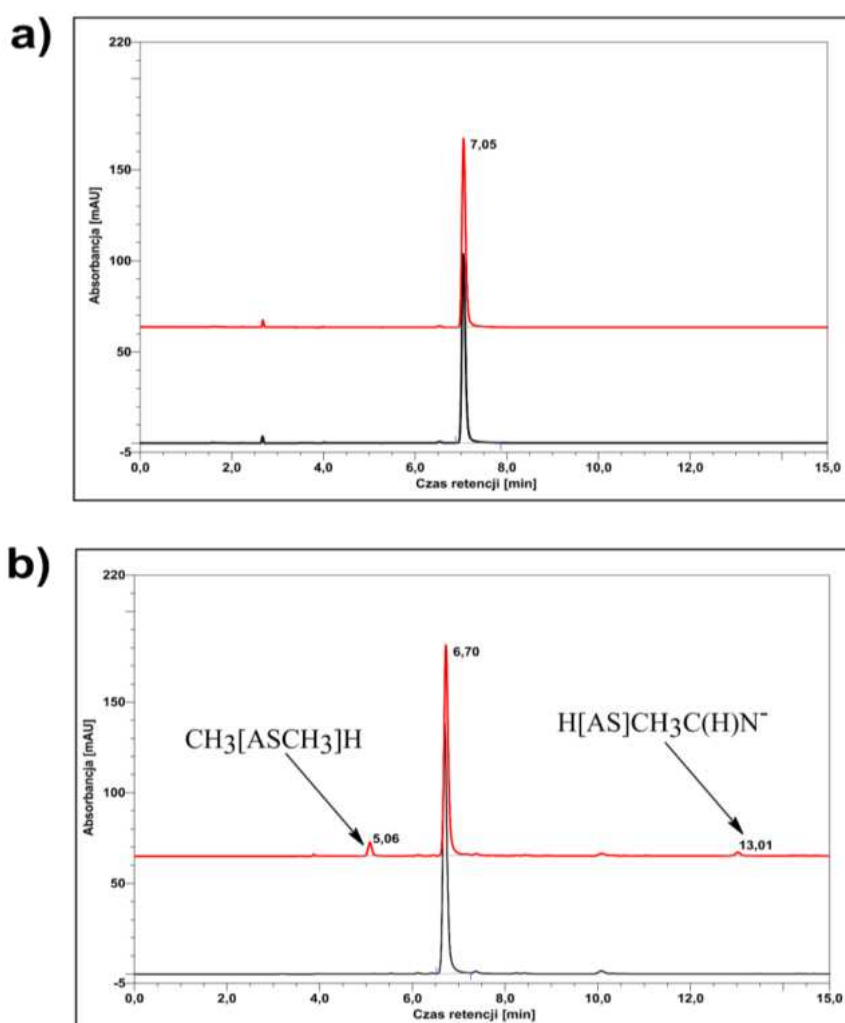
Warto dodać, że we wszystkich przypadkach stacjonarnej radiolizy mechanizmy reakcji prowadzące do otrzymania stabilnych produktów były modelowane i weryfikowane za pomocą obliczeń metodami chemii kwantowej, przeprowadzonych w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Radioliza stacjonarna pochodnych adeniny

Wyniki eksperymentu stacjonarnej radiolizy przeprowadzonej dla pierwszej pochodnej adeniny – ASCH₃ okazały się dość zaskakujące. Napromienienie wodnego roztworu tej pochodnej nie doprowadziło do jej degradacji ani do powstania produktów radiolizy (**Rysunek**

7a oraz Rysunek 7 w P1), pomimo że profil reakcji DEA, obliczony metodą MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM, oraz niska bariera energetyczna dysocjacji (wynosząca zaledwie 3,4 kcal/mol) sugerowały możliwość zajścia tego procesu.

Jedną z możliwych hipotez tłumaczących uzyskanie takich wyników jest protonowanie pierwotnego anionorodnika powstałego w wyniku przyłączenia elektronu do cząsteczki ASCH₃. Jest to konkurencyjny proces, który hamuje dysocjację związku indukowaną przyłączeniem solwatowanego elektronu.



Rysunek 7. Analiza HPLC pochodnej ASCH₃ przed napromienieniem (czarna linia) i po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia) **a)** w roztworze wodnym i **b)** w bezwodnym ACN.

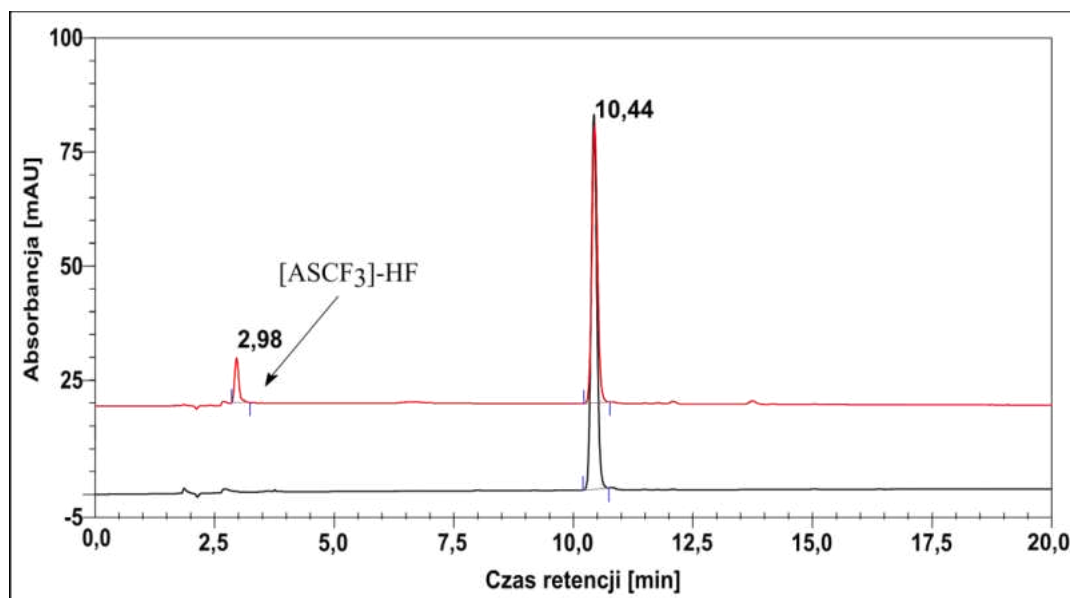
W celu weryfikacji postawionej hipotezy przeprowadzono eksperyment stacjonarnej radiolizy w środowisku aprotycznym, jakim jest acetonitryl (ACN), w którym wspomniane wcześniej protonowanie nie powinno zachodzić. Przygotowano roztwór ASCH₃ w bezwodnym ACN, poddano go procesowi odtleniania, a następnie napromieniono taką samą dawką PJ jak

w przypadku roztworu wodnego. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że w tych warunkach dochodzi do dysocjacji cząsteczki indukowanej przyłączeniem elektronu, o czym świadczy obecność nowych pików na chromatogramie, o czasach retencji 5,06 oraz 13,01 min (**Rysunek 7b i Rysunek 9 w P1**), odpowiadających produktom radiolizy.

Widma tandemowej spektrometrii mas MS/MS zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej wykazały, że pierwszy z produktów o m/z równym 196,0312 najprawdopodobniej powstaje w wyniku addycji dwóch fragmentów generowanych podczas radiolizy ACN – rodnika metylowego $\cdot\text{CH}_3$ oraz atomu wodoru H do struktury ASCH_3 . Fragmentacja tego jonu odpowiada przejściu m/z 196,0655 $\rightarrow$ 181,0393 i może być interpretowana jako transformacja strukturalna $\text{CH}_3[\text{ASCH}_3]\text{H} \rightarrow \text{ASCH}_3\text{H}$, która wskazuje na odszczepienie grupy metylowej (**Rysunki S5–S6 w części eksperymentalnej materiałów uzupełniających dla P1**). Z kolei drugi produkt o m/z 208,0315 najprawdopodobniej stanowi wynik procesu DEA, w którym pochodna ASCH_3 ulega degradacji indukowanej przyłączeniem elektronu. Proces ten prowadzi do rozerwania wiązania $\text{S}-\text{CH}_3$ ($\Delta G_r = -24,48$ kcal/mol) oraz addycji rodników $\text{CH}_3\text{C}(\text{H})\text{N}$ i $\text{H}^\cdot$, powstających w wyniku radiolizy ACN. Potwierdza to fragmentacja odpowiadająca przejściom m/z 208,0683 $\rightarrow$ 180,0683 $\rightarrow$ 165,0416, co może świadczyć o sekwencji przemian $\text{H}[\text{AS}]\text{CH}_3\text{C}(\text{H})\text{N}^- \rightarrow \text{ASCH}_3 \rightarrow \text{AS}^-$, gdzie następuje eliminacja grupy CNH_2 , a dalsze odszczepienie grupy metylowej skutkuje powstaniem anionu 8-tioadeniny (**Rysunki S7–S8 w części eksperymentalnej materiałów uzupełniających dla P1**).

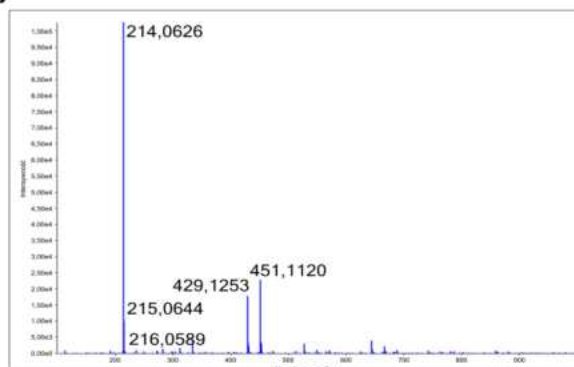
Z kolei wyniki eksperymentu radiolizy stacjonarnej dla drugiej pochodnej adeniny – ASCF_3 przeprowadzonej w roztworze wodnym okazały się zgodne z przewidywaniami teoretycznymi. W wyniku napromienienia wodnego roztworu związku, pod wpływem elektronu nastąpił jego rozpad tworząc produkt radiolizy o czasie retencji 2,98 min (**Rysunek 8**) i m/z równym 214,0178 (**Rysunek 9a**), która najprawdopodobniej wskazuje na oderwanie neutralnej cząsteczki HF ze struktury ASCF_3 . W pierwszym etapie proces ten może przebiegać poprzez rozerwanie wiązania $\text{C}-\text{F}$ ($\Delta G_r = -53,87$ kcal/mol), prowadzące do utworzenia rodnika $\text{ASCF}_2^\cdot$ oraz anionu fluorkowego F^- . Ponieważ w środowisku reakcji obecny jest $t\text{-BuOH}$, który w wyniku interakcji z rodnikami $\cdot\text{OH}$ (powstającymi pod wpływem promieniowania) generuje rodniki $\cdot t\text{-BuOH}$, w kolejnym etapie mogą one wchodzić w reakcję z rodnikiem $\text{ASCF}_2^\cdot$. W efekcie rodnik $\cdot t\text{-BuOH}$ może abstrahować atom wodoru z pozycji C9 rodnika $\text{ASCF}_2^\cdot$ ($\Delta G_r = -48,02$ kcal/mol), co prowadzi do utworzenia wiązania pomiędzy atomem węgla C9 a atomem węgla grupy $-\text{CF}_2$, a w konsekwencji do cyklizacji cząsteczki. Hipotezę wspiera obserwowana fragmentacja, w której następuje przejście jonu o m/z 214,0519 $\rightarrow$ 150,0760

(Rysunek 9b), które może świadczyć o sekwencji przemian $[\text{ASCF}_3]\text{-HF} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{-N}=\text{C}(\text{NH})\text{-S-CF}_2$ gdzie w warunkach jonizacji dochodzi do pęknięcia pierścienia purynowego i powstania otwartego fragmentu z podstawnikiem $-\text{SCF}_2$.

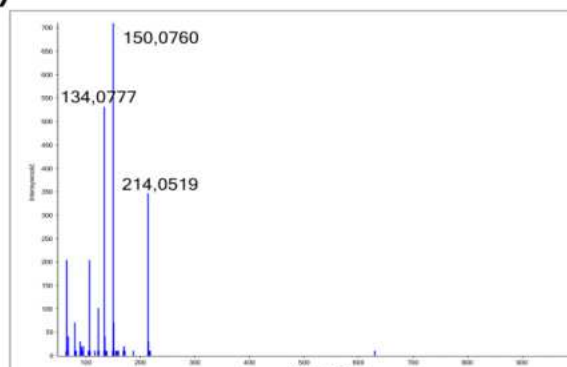


Rysunek 8. Analiza HPLC wodnego roztworu pochodnej ASCF_3 przed napromienieniem (czarna linia) i po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia).

a)



b)

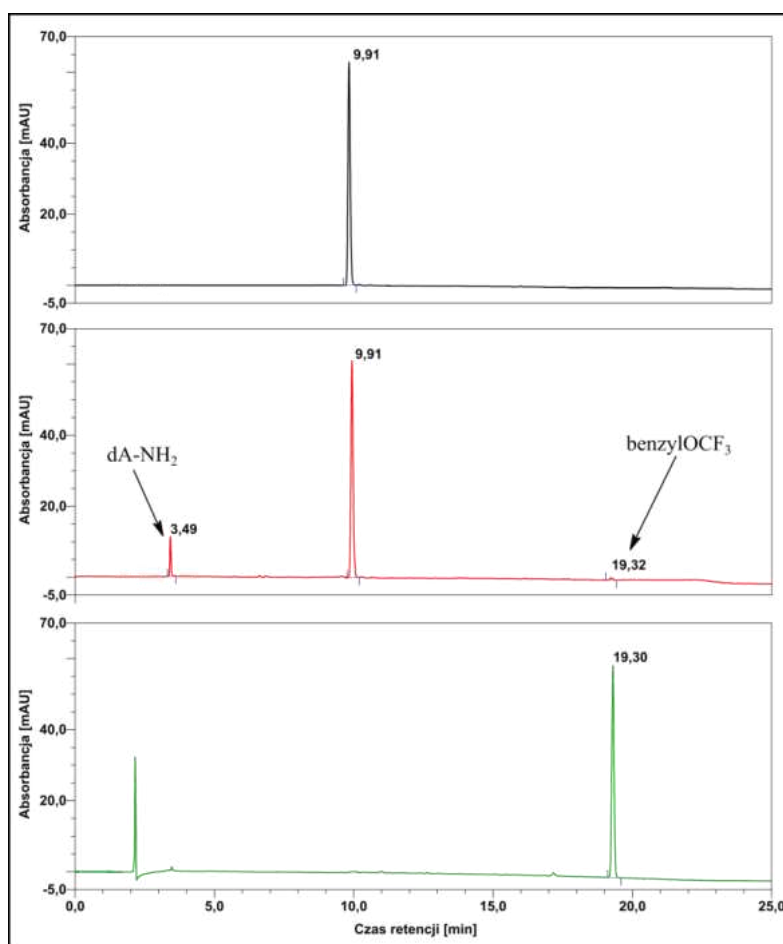


Rysunek 9. a) Widmo MS produktu radiolizy ASCF_3 o czasie retencji 2,98 min i **b)** widmo MSMS jonu o masie 214,0178 Da zarejestrowane w trybie jonów ujemnych.

Radioliza stacjonarna pochodnych 2'-deoksyadenozyny

W przypadku pierwszej pochodnej 2'-deoksyadenozyny – dA-NHbenzylOCF_3 zastosowanie dawki PJ o wartości 500 Gy doprowadziło do degradacji zsyntezowanego związku oraz powstania dwóch produktów o czasie retencji 3,49 min oraz 19,32 min (**Rysunek 10 i Rysunek 3 w P2**). Analiza przy użyciu technik LC-MS i MS/MS przeprowadzona w trybie jonizacji dodatniej, potwierdziła, że pierwszym produktem o $m/z = 267,1797$ (**Rysunek S5**

w materiałach uzupełniających dla P2) powstałym w wyniku napromieniania jest 8-amino-2'-deoksyadenozyna (dA-NH_2). Powstanie tego produktu zostało potwierdzone przez obliczenia kwantowochemiczne metodą B3LYP/6-31++G(d,p)/PCM, które wykazały, że energia swobodna reakcji wynosi $\Delta G_r = -30,0$ kcal/mol. Dodatkowo, transformacja kationu o m/z 267,1797 $\rightarrow$ 151,0891 odpowiada sekwencji przemian strukturalnych $\text{dA-NH}_2 \rightarrow \text{ANH}_2$ co wskazuje na odszczepienie pierścienia deoksyrybozy i utworzenie kationu 8-aminoadeniny (**Rysunek S6 w materiałach uzupełniających dla P2**). Drugi z produktów – rodnik benzyloCF₃ prawdopodobnie stabilizuje się poprzez przyłączenie wolnego atomu wodoru pochodzącego z radiolizy wody lub poprzez oderwanie atomu wodoru z cząsteczki t-BuOH, tworząc trwały związek, który nie daje sygnału w ESI-MS. W związku z tym jego bezpośrednia detekcja w analizie LC-MS okazała się niemożliwa. Potwierdzenie obecności benzyloCF₃ uzyskano poprzez porównanie czasu retencji komercyjnie dostępnego wzorca 4-trifluorometoksytoluenu w analizie HPLC (**Rysunek 10 oraz Rysunek 3 w P2**).



Rysunek 10. Analiza HPLC wodnego roztworu dA-NHbenzyloCF_3 przed napromienieniem (czarna linia), po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia) oraz wodnego roztworu wzorca 4-trifluorometoksytoluenu (zielona linia).

Eksperyment radiolizy stacjonarnej drugiej pochodnej – dA-NHbenzylSCF₃ wykazał zupełnie inny profil produktów degradacji indukowanej przyłączeniem elektronu w porównaniu do analogicznej pochodnej z podstawnikiem -OCF₃. Wprowadzenie grupy -SCF₃ w pozycji para pierścienia benzyłowego doprowadziło do powstania czterech produktów radiolizy o czasach retencji: 4,93 min, 7,09 min, 7,18 min oraz 11,87 min (**Rysunek 11 oraz Rysunek 4 w P3**).

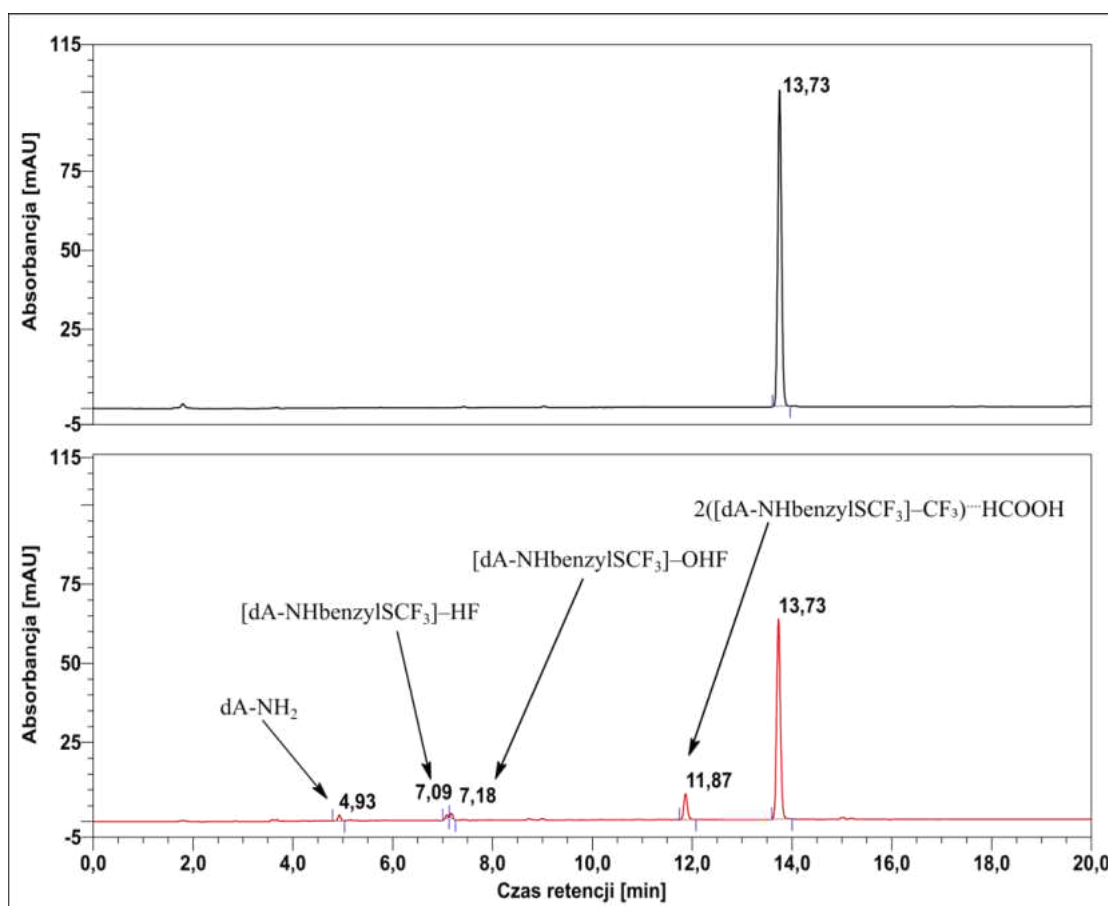
Analiza LC-MS przeprowadzona po napromienieniu wodnego roztworu tej pochodnej wykazała, że pierwszy z produktów o czasie retencji 4,93 min i $m/z = 265,1047$ (**Rysunek S6 w materiałach uzupełniających dla P3**) odpowiada również dA-NH₂, czyli produktowi obserwowanemu w radiolizie dA-NHbenzylOCF₃ (**Rysunek S6 w materiałach uzupełniających dla P3**). Fragmentacja tego jonu, zarejestrowana metodą MS/MS w trybie jonów ujemnych, wykazuje przejścia m/z 265,1019 → 175,0715 → 149,0560, które odpowiadają sekwencji przemian strukturalnych dA-NH₂ → ANH₂CH=CH₂ → ANH₂ (**Rysunek S7 w materiałach uzupełniających dla P3**). Proces ten obejmuje początkowe rozerwanie pierścienia deoksyrybozy, a następnie jego całkowitą utratę, prowadząc do powstania adeniny podstawionej w pozycji C8 grupą -NH₂. Wykonane obliczenia kwantowochemiczne metodą MPW1K(PCM)/6-31++G(d,p) potwierdzają możliwość zajścia tego procesu ze względu na ΔG_r reakcji równą -16,7 kcal/mol.

Drugi produkt radiolizy, o czasie retencji 7,09 min, został zidentyfikowany jako [dA-NHbenzylSCF₃]-HF. Powstaje on w wyniku oderwania anionu fluorkowego po przyłączeniu elektronu ($\Delta G_r = -94,6$ kcal/mol), a następnie oderwania atomu wodoru z części cukrowej ($\Delta G_r = -11,5$ kcal/mol). W tym etapie prawdopodobnie uczestniczą rodniki •t-BuOH, które powstają podczas radiolizy i jednocześnie wychwytyują rodniki •OH. Obecność tego produktu potwierdza sygnał masowy o $m/z = 435,1078$, zarejestrowany w trybie jonizacji ujemnej (**Rysunek S8 w materiałach uzupełniających dla P3**). Po przeniesieniu atomu wodoru na rodnik •t-BuOH cząsteczka najprawdopodobniej stabilizuje się poprzez reakcję cyklizacji ($\Delta G_r = -36,1$ kcal/mol). Fragmentacja MS/MS przebiega zgodnie z przejściem m/z 435,1030 → 319,0574, co sugeruje przemianę strukturalną [dA-NHbenzylSCF₃]-HF → dA-NHCH₂CCH₂CH₃, podczas której następuje pęknięcie pierścienia benzyłowego i odszczepienie reszty CH₂=C(CH₃)-SCF₂ (**Rysunek S9 w materiałach uzupełniających dla P3**).

Kolejny produkt, o czasie retencji 7,18 min, został przypisany strukturze [dA-NHbenzylSCF₃]-OHF. W tym przypadku przyłączenie elektronu prowadzi również do egzoergicznej ($\Delta G_r = -94,6$ kcal/mol) utraty anionu fluorkowego jak w przypadku produktu

drugiego, po której najprawdopodobniej dochodzi do ataku fragmentu rodnikowego $\bullet\text{CF}_2$ (produktu utraty F^-) na część cukrową, w reakcji typu $\text{S}_{\text{N}}2$. Skutkuje to uwolnieniem rodnika hydroksylowego i utworzeniem stabilnej, cyklicznej cząsteczki $[\text{dA-NHbenzylSCF}_3]\text{-OHF}$, co potwierdza modelowanie DFT przewidujące wartość $\Delta G_{\text{r}} = -3,2$ kcal/mol dla procesu cyklizacji. Obecność tego produktu potwierdza sygnał o $m/z = 419,1122$ (**Rysunek S10 w materiałach uzupełniających dla P3**). Fragmentacja jonu przebiega zgodnie z przejściem $m/z \quad 419,1107 \rightarrow 303,0647$, odpowiadającym przemianie strukturalnej $[\text{dA-NHbenzylSCF}_3]\text{-OHF} \rightarrow [\text{dA-OH}]\text{NHCH}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3$, w której również następuje pęknięcie pierścienia benzylowego i odszczepienie grupy $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-SCF}_2$ (**Rysunek S11 w materiałach uzupełniających dla P3**).

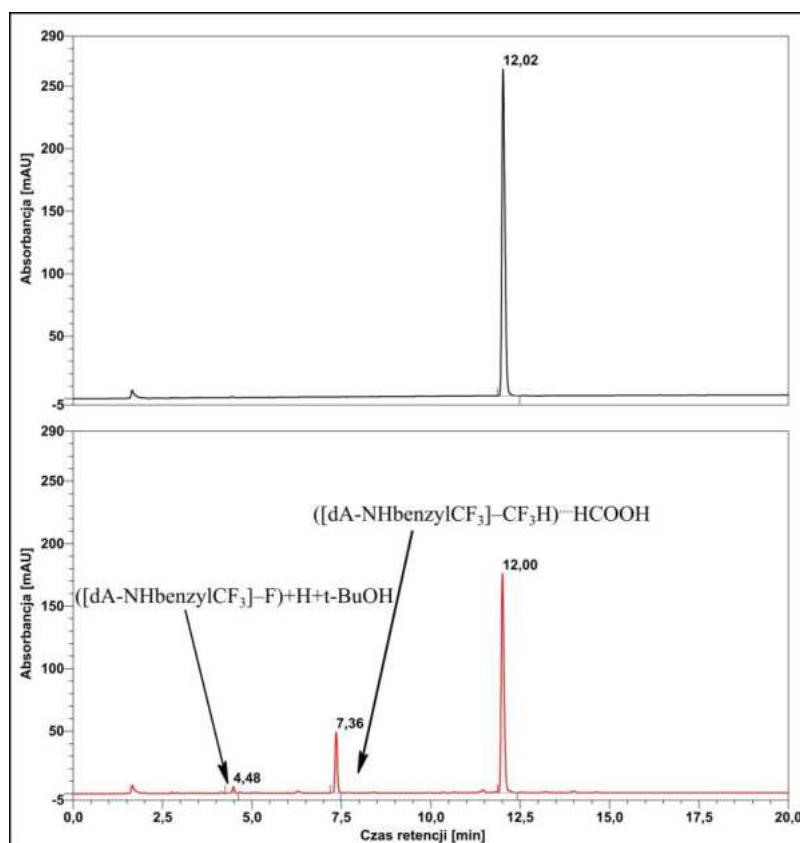
Najbardziej intensywny sygnał HPLC, o czasie retencji 13,73 min, odpowiada dimerowi utworzonemu z dwóch cząsteczek $[\text{dA-NHbenzylSCF}_3]\text{-CF}_3$, połączonych mostkiem disiarczkowym. Produkt ten wykrywany jest w analizie LC-MS jako addukt z kwasem mrówkowym, który stanowi składnik fazy ruchomej: $2([\text{dA-NHbenzylSCF}_3]\text{-CF}_3)\cdots\text{HCOOH}$. Po przyłączeniu elektronu do cząsteczki dA-NHbenzylSCF_3 dochodzi do uwolnienia rodnika $\bullet\text{CF}_3$ ($\Delta G_{\text{r}} = -13,0$ kcal/mol), a powstały anion tiolowy ulega natychmiastowej protonacji przy obojętnym pH. W obecności utleniających rodników $\bullet\text{t-BuOH}$, dwie cząsteczki tiolu – dA-NHbenzylSH mogą utworzyć dimer związany mostkiem disiarczkowym. Addukt tego dimeru z anionem mrówczanowym jest obserwowany jako sygnał masowy o $m/z = 819,2434$ (**Rysunek S12 w materiałach uzupełniających dla P3**). Fragmentacja MS/MS tego jonu przebiega zgodnie z przejściem $m/z \quad 819,2434 \rightarrow 773,0845$, co odpowiada utracie anionu mrówczanowego (**Rysunek S13 w materiałach uzupełniających dla P3**).



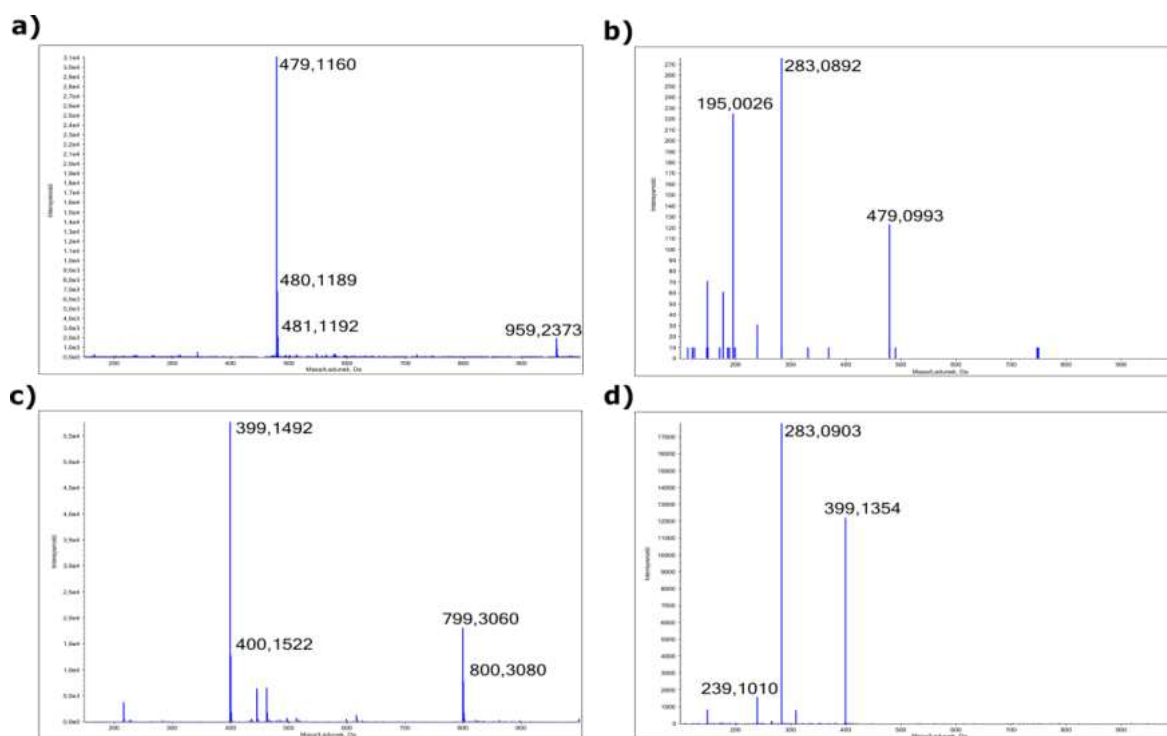
Rysunek 11. Analiza HPLC wodnego roztworu dA-NHbenzylSCF₃ przed napromienieniem (czarna linia), po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia).

Ostatni eksperyment radiolityczny wykonano dla pochodnej dA-NHbenzylCF₃, gdzie uzyskane produkty również różniły się od tych powstałych podczas radiolizy dwóch wcześniejszych pochodnych. Dawka PJ równa 500 Gy doprowadziła do degradacji wodnego roztworu dA-NHbenzylCF₃ i utworzenia dwóch produktów radiolizy o czasach retencji 4,48 i 7,36 min na chromatogramie HPLC (**Rysunek 12**). Pierwszy z produktów odpowiada strukturze [dA-NHbenzylCF₃-F]+H+t-BuOH. W pierwszym etapie reakcji indukowanej przez PJ prawdopodobnie dochodzi do oderwania anionu fluorkowego od anionorodnika [dA-NHbenzylCF₃] ($\Delta G_r = -1,3$ kcal/mol wyznaczone metodą M06-2X/6-31++G**), czego efektem jest utworzenie rodnika dA-NHbenzylCF₂•. Następnie rodnik ten reaguje z t-BuOH obecnym w roztworze, dochodzi do przeniesienia atomu wodoru z cząsteczki t-BuOH, co prowadzi do powstania stabilnej cząsteczki dA-NHbenzylCF₂H. W końcowym etapie stabilny produkt tworzy kompleks z t-BuOH, który w widmie MS rejestrowany jest jako sygnał o $m/z = 479,1160$ (**Rysunek 13a**). Powstanie takiego produktu potwierdza fragmentacja jonu 479,1160 zachodząca zgodnie z przejściem m/z 479,0993 $\rightarrow$ 283,0892, które może być

interpretowane jako transformacja strukturalna $[\text{dANHbenzylCF}_3\text{-F}]+\text{H}+\text{t-BuOH} \rightarrow \text{A-NHbenzylCH}_2\text{OCH}_3$, co odpowiada oderwaniu grupy $-\text{CF}_2$ i cząsteczki t-BuOH z podstawionego pierścienia benzyłowego, a także pęknięciu pierścienia deoksyrybozy, pozostawiając fragment $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ przy reszcie adeniny (**Rysunek 13b**). Z kolei sygnał o najwyższej intensywności przypisano produktowi $[\text{dA-NHbenzylCF}_3\text{-CF}_3\text{H}]\cdots\text{HCOOH}$, który mógłby powstawać przez oderwanie grupy trifluorometylowej i atomu wodoru od anionorodnika, a następnie utworzeniu kompleksu z obecnym w fazie ruchomej kwasem mrówkowym. Ten produkt jest obserwowany jako sygnał przy m/z 399,1492 (**Rysunek 13c**). Fragmentacja MS/MS tego jonu przebiega według przejść m/z 399,1354 $\rightarrow$ 283,0903 $\rightarrow$ 239,1010, co może być interpretowane jako transformacja strukturalna $[\text{dA-NHbenzylCF}_3\text{-CF}_3\text{H}]\cdots\text{HCOOH} \rightarrow \text{A-NHbenzylCH}_2\text{OCH}_3 \rightarrow \text{A-NHbenzyl}$. W pierwszym etapie dochodzi do utraty cząsteczki kwasu mrówkowego oraz pęknięciu pierścienia deoksyrybozy, pozostawiając fragment $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ przy reszcie adeniny i ostatecznie otrzymaniu adeniny podstawionej grupą benzyłową (**Rysunek 13d**).



Rysunek 12. Analiza HPLC wodnego roztworu dA-NHbenzylCF_3 przed napromienieniem (czarna linia), po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia).



Rysunek 13. a) Widmo MS produktu radiolizy dA-NHbenzylCF₃ o czasie retencji 4,48 min, b) widmo MSMS jonu o masie 479,0993 Da, c) widmo MS produktu radiolizy dA-NHbenzylCF₃ o czasie retencji 7,36 min i d) widmo MSMS jonu o masie 399,1492 Da zarejestrowane w trybie jonów ujemnych.

3. Badania in vitro nowych pochodnych 2'-deoksyadenozyny

Ostatnim etapem niniejszych badań było zweryfikowanie, czy zsyntezowane związki wykazują aktywność na poziomie komórkowym oraz czy mogą uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie PJ. Należy również podkreślić, że obecność m.in. mechanizmów naprawy DNA w komórkach może znacząco wpłynąć na efektywność radiosensybilizacji, która może przebiegać odmiennie niż w roztworze wodnym.

W badaniach in vitro skupiono się wyłącznie na pochodnych 2'-deoksyadenozyny, ponieważ stanowią one strukturalne bliższe analogi naturalnych składników DNA niż pochodne adeniny. Obecność reszty deoksyrybozy pozwala lepiej odzwierciedlić zachowanie tych cząsteczek w środowisku komórkowym, zwłaszcza w kontekście ich interakcji z DNA oraz potencjalnego wpływu na kluczowe procesy biologiczne.

Analiza cytotoksyczności

Związek, jako potencjalny RS, nie powinien wykazywać toksyczności wobec komórek nowotworowych ani zdrowych bez udziału PJ. Jego cytotoksyczność względem komórek nowotworowych powinna pojawiać się wyłącznie po ekspozycji na promieniowanie. W celu

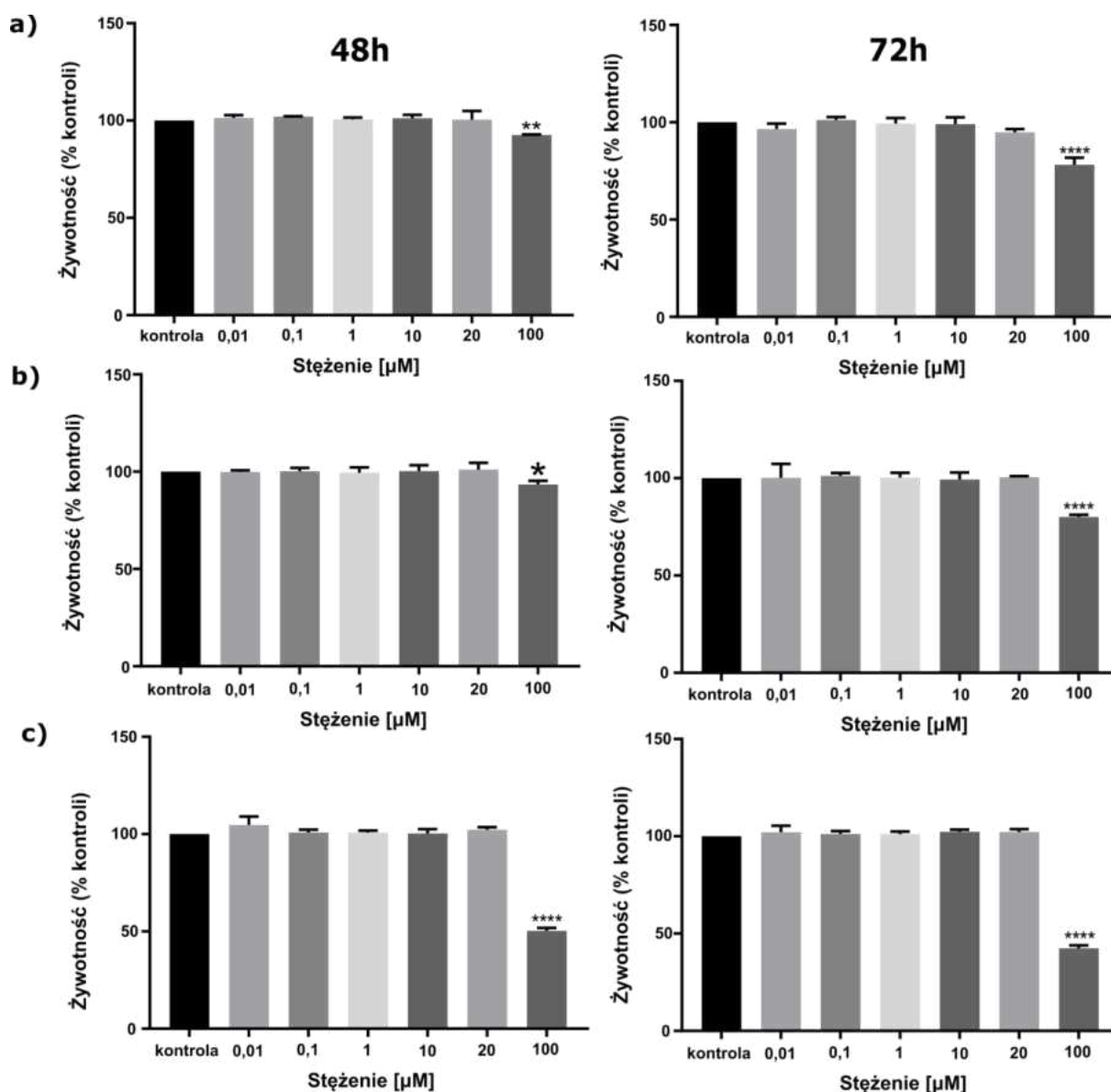
weryfikacji tego założenia przeprowadzono ocenę toksyczności pochodnych z wykorzystaniem testu MTT. Do badań wykorzystano dwie linie komórek nowotworowych: nowotworu prostaty (PC3), która służy jako model najczęściej występującego nowotworu u mężczyzn [56] i nowotworu piersi (MCF-7), która reprezentuje najczęstszy nowotwór u kobiet [57], jak również jedną z dwóch linii komórek zdrowych: keratynocytów (HaCaT) lub fibroblastów gruczołu sutkowego (HMF).

Uzyskane wyniki wskazują, że pochodna dA-NHbenzylOCF₃ wykazuje wyraźnie wyższą toksyczność wobec komórek nowotworowych linii PC3 niż wobec komórek MCF-7. W przypadku PC3 zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie żywotności komórek przy stężeniu 100 µM zarówno po 48 h (86,3 % ± 3,4 %; p < 0,0001), jak i po 72 h inkubacji (80,8 % ± 3,2 %; p < 0,0001), a także przy 20 µM po 72 h (88,5 % ± 0,2 %; p < 0,01). Dla komórek MCF-7 istotny efekt cytotoksyczny odnotowano jedynie przy stężeniu 100 µM, po 48 h żywotność obniżyła się do 91,9 % ± 1,2 % (p < 0,5), a po 72 h spadła do 87,5 % ± 1,3 % (p < 0,0001). Również w przypadku zdrowej linii komórkowej HaCaT wykazano istotne statystycznie zmniejszenie żywotności przy 100 µM do 84,2 % ± 4,1 % po 48 h (p < 0,001) i do 76,3 % ± 5,1 % po 72 h (p < 0,0001) inkubacji (**Rysunek 4 w P2**).

Wyniki uzyskane dla pochodnej dA-NHbenzylSCF₃ są porównywalne z wynikami dla dA-NHbenzylOCF₃, jednak obecność atomu siarki w strukturze związku przekłada się na wyraźnie silniejsze działanie cytotoksyczne względem obu badanych linii komórek nowotworowych. Dla linii PC3 stężenie 100 µM obniża żywotność do 71,7 % ± 1,7 % po 48 h i 63,2 % ± 0,7 % po 72 h (p < 0,0001), a 20 µM do 83,2 % ± 4,0 % po 72 h. Z kolei dla linii MCF-7 redukcja żywotności następuje również jedynie przy stężeniu 100 µM, do 83,1 % ± 1,8 % po 48 h (p < 0,0001) i do 67,7 % ± 3,0 % po 72 h. W komórkach HMF stężenie 100 µM zmniejsza żywotność do 74,3 % ± 2,1 % (48 h) i 60,8 % ± 0,9 % (72 h), a także stężenie 20 µM po 72 h działa cytotoksycznie (92,8 % ± 1,2 %, p < 0,01)) (**Rysunek 6 w P3**).

W przypadku trzeciej pochodnej dA-NHbenzylCF₃ zaobserwowano istotnie słabsze działanie toksyczne w porównaniu do wcześniejszych dwóch związków. Jedynie najwyższe zastosowane stężenie (100 µM) powodowało istotne obniżenie żywotności w komórkach PC3 do 92,59 % ± 0,22 % po 48 godzinach inkubacji (p < 0,01) oraz do 78,24 % ± 2,96 % po 72 godzinach (p < 0,0001), a w przypadku komórek MCF-7 odnotowano spadek żywotności do 93,46 % ± 1,49 % po 42 h (p < 0,05) oraz do 80,11 % ± 0,91 % po 72 h (p < 0,0001). Zaskakujące okazało się działanie tej pochodnej na komórki linii HaCaT – stężenie 100 µM prowadziło do znacznego obniżenia żywotności do 50,37 % ± 1,14 % po 42 h oraz do 42,41 %

$\pm 1,23$ % po 72 h (w obu przypadkach $p < 0,0001$) (**Rysunek 14**). Wyniki te wskazują na wyraźnie wyższą toksyczność dA-NHbenzylCF₃ względem linii HaCaT, w porównaniu z pochodną dA-NHbenzylOCF₃.



Rysunek 14. Żywotność komórek a) PC3, b) MCF7 oraz c) HaCaT po 48 i 72 godzinach traktowania dA-NHbenzylCF₃. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD) z trzech niezależnych eksperymentów wykonanych w trzech powtórzeniach. Istotne statystycznie różnice występują pomiędzy hodowlami traktowanymi badanym związkiem a kontrolą (hodowla traktowana rozpuszczalnikiem): **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Analiza klonogeniczności

Jedną z podstawowych metod potwierdzenia działania związku jako radiosensybilizatora jest test klonogeny, który umożliwia precyzyjną ocenę uwrażliwienia

komórek na PJ na poziomie komórkowym. Test ten [58] pozwala określić, czy dany związek wpływa na przeżywalność oraz zdolność komórek nowotworowych do tworzenia kolonii po ekspozycji na promieniowanie. Na podstawie danych cytotoksyczności wybrano takie stężenie pochodnych, które nie powoduje statystycznie istotnego spadku żywotności komórek PC3 i MCF-7 po 48 godzinach inkubacji z danym związkiem.

Inkubacja z 20 μ M roztworem pochodnej dA-NHbenzylOCF₃ spowodowała zmniejszenie przeżywalności komórek PC3 z 88,8 % $\pm$ 1,3 % do 73,9 % $\pm$ 0,7 % przy dawce 1 Gy, z 61,1 % $\pm$ 0,3 % do 53,3 % $\pm$ 1,8 % przy dawce 3 Gy oraz z 49,5 % $\pm$ 1,1 % do 37,1 % $\pm$ 0,5 % przy dawce 4 Gy porównując do działania samego PJ. Natomiast w przypadku komórek MCF-7 odnotowano spadek przeżywalności z 87,5 % $\pm$ 0,6 % do 84,4 % $\pm$ 0,9 % przy 1 Gy, z 68,5 % $\pm$ 0,9 % do 64,3 % $\pm$ 0,3 % przy 3 Gy oraz z 56,4 % $\pm$ 0,6 % do 47,3 % $\pm$ 0,5 % przy 4 Gy.

Z kolei pochodna dA-NHbenzylSCF₃ obniżyła przeżywalność komórek PC3 z 87,1 % $\pm$ 0,3 % do 73,2 % $\pm$ 0,6 % przy dawce 1 Gy, z 66,5 % $\pm$ 0,6 % do 47,8 % $\pm$ 1,0 % przy 3 Gy oraz z 49,4 % $\pm$ 0,2 % do 30,2 % $\pm$ 1,0 % przy dawce 4 Gy. W przypadku komórek MCF-7 po zastosowaniu 1 Gy przeżywalność spadła z 88,0 % $\pm$ 1,4 % do 80,7 % $\pm$ 1,3 %, przy 3 Gy z 72,9 % $\pm$ 0,8 % do 55,8 % $\pm$ 0,4 %, a przy 4 Gy z 64,4 % $\pm$ 2,6 % do 49,1 % $\pm$ 0,7 %.

Trzecia pochodna, dA-NHbenzylCF₃, wykazała najslabsze działanie uwrażliwiające komórki obu linii nowotworowych w porównaniu do analogów benzylowych zawierających grupy -OCF₃ i -SCF₃. Co istotne, wyraźniejszy efekt uwrażliwiający 20 μ M roztworu tej pochodnej zaobserwowano dopiero przy wyższych dawkach PJ. Przy dawce 3 Gy przeżywalność spadła z 65,0 % $\pm$ 0,5 % do 62,7 % $\pm$ 0,4 % w komórkach PC3 oraz z 72,5 % $\pm$ 0,4 % do 69,3 % $\pm$ 1,3 % w komórkach MCF-7. Podobnie, przy dawce 4 Gy przeżywalność zmniejszyła się z 51,4 % $\pm$ 0,3 % do 47,3 % $\pm$ 1,0 % w przypadku linii PC3 oraz z 61,3 % $\pm$ 1,1 % do 57,2 % $\pm$ 0,8 % w linii MCF-7. Przy niższych dawkach promieniowania różnice w przeżywalności między komórkami poddanymi jedynie napromienianiu a tymi traktowanymi zarówno promieniowaniem, jak i związkiem były minimalne.

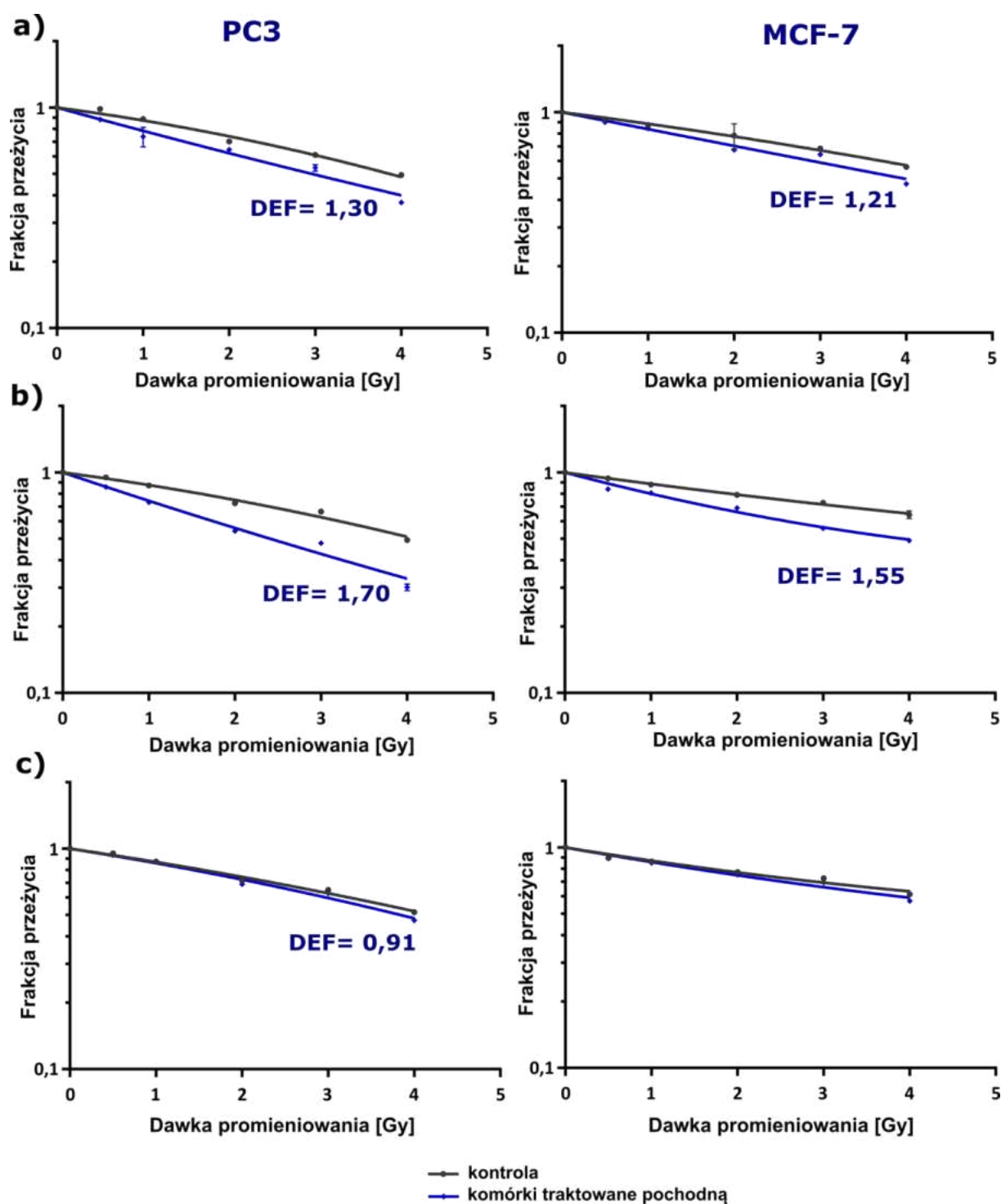
Dodatkowo sporządzono wykresy przedstawiające frakcje przeżywających komórek PC3 oraz MCF-7 (**Rysunek 15**, **Rysunek 5 w P2** i **Rysunek 7 w P3**) poddanych działaniu różnych dawek PJ po uprzedniej inkubacji z badanym związkiem. Na podstawie krzywych przeżywalności obliczono parametry wrażliwości komórek na promieniowanie, takie jak wartości α (współczynnik liniowy) oraz β (współczynnik kwadratowy), poprzez dopasowanie

punktów doświadczalnych do modelu liniowo-kwadratowego przeżywalności. Średnie wartości α i β dla pochodnej dA-NHbenzylOCF₃ wyniosły odpowiednio: 0,118 i 0,016 dla komórek kontrolnych PC3; 0,247 i -0,004 dla komórek PC3 traktowanych pochodną, 0,115 i 0,006 dla komórek kontrolnych MCF-7 oraz 0,177 i -0,0007 dla komórek MCF-7 inkubowanych z dA-NHbenzylOCF₃. Z racji tego, że uzyskanie ujemnych wartości parametru β z radiobiologicznego punktu widzenia jest niefizycznie, dopasowanie krzywych dla komórek traktowanych pochodną dA-NHbenzylOCF₃ przeprowadzono przy założeniu β równego zero (model liniowy). Taka procedura skutkowała nieznaczną zmianą wartości α : 0,246 dla komórek PC3 oraz 0,181 dla komórek MCF-7. Warto również zauważyć, że wartość α wzrosła 2,1-krotnie w przypadku komórek PC3 oraz 1,5-krotnie dla komórek MCF-7 (stosunek wartości α dla komórek traktowanych i nietraktowanych związkiem).

Wartości parametrów α i β dla dA-NHbenzylSCF₃ przedstawiały się następująco: 0,114 i 0,014 dla kontrolnych komórek PC3; 0,265 i 0,009 dla komórek PC3 traktowanych 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃; 0,085 i 0,008 dla kontrolnych komórek MCF-7 oraz 0,181 i 0,005 dla komórek MCF-7 inkubowanych z 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃. W tym przypadku wartość α wzrosła 2,3-krotnie dla komórek PC3 oraz 2,1-krotnie dla komórek MCF-7.

Z kolei dla dA-NHbenzylCF₃ wartości parametrów α i β wynosiły odpowiednio: 0,132 i 0,008 dla komórek kontrolnych PC3; 0,141 i 0,010 dla komórek PC3 traktowanych 20 μ M dA-NHbenzylCF₃; 0,116 i -0,008 dla komórek kontrolnych MCF-7 oraz 0,159 i -0,007 dla komórek MCF-7 inkubowanych z 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃. Z racji ujemnych wartości parametru β dla komórek linii MCF-7 traktowanych pochodną, również dopasowano krzywe przeżycia przy założeniu $\beta = 0$, co skutkowało niewielką zmianą wartości α dla tej linii komórkowej: 0,145 dla komórek kontrolnych MCF-7 oraz 0,160 dla komórek MCF-7 inkubowanych z pochodną. W przypadku dA-NHbenzylCF₃ wartość α wzrosła jedynie 1,1-krotnie dla komórek obu linii.

Warto podkreślić, że dla każdej z badanych pochodnych zaobserwowano wzrost parametru α , co wskazuje, że ich działanie radiouwrażliwiające związane jest przede wszystkim ze zwiększeniem wartości tego liniowego parametru. Sugeruje to, że pochodne benzyłowe przyczyniają się do nasilonego występowania bezpośrednio letalnych uszkodzeń komórkowych indukowanych promieniowaniem [59,60].



Rysunek 15. Krzywe zależności dawka – odpowiedź dla zmniejszonego przeżycia komórek PC3 oraz komórek MCF-7 po zastosowaniu zależnego od dawki traktowania pochodną **a)** dA-NHbenzylOCF₃, **b)** dA-NHbenzylSCF₃, **c)** dA-NHbenzylCF₃ o stężeniu 20 μ M lub bez jej zastosowania. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach. DEF- współczynnik wzmocnienia dawki.

Dla każdej z pochodnych wyznaczono także współczynnik wzmocnienia dawki (DEF, ang. *Dose Enhancement Factor*), który określa wzrost skuteczności dawki promieniowania w obecności związku, w porównaniu do napromieniania bez RS. DEF wyniósł odpowiednio: dla dA-NHbenzylOCF₃ 1,30 (linia PC3) oraz 1,21 (linia MCF-7), dla dA-NHbenzylSCF₃ 1,70 (linia PC3) oraz 1,55 (linia MCF-7), a dla dA-NHbenzylCF₃ 0,91 (linia PC3). Dla linii MCF-7 nie udało się wyznaczyć współczynnika DEF, ponieważ krzywe przeżywalności komórek w warunkach kontrolnych i w obecności dA-NHbenzylCF₃ były praktycznie identyczne, co wskazuje na brak istotnego efektu radiosensybilizacji.

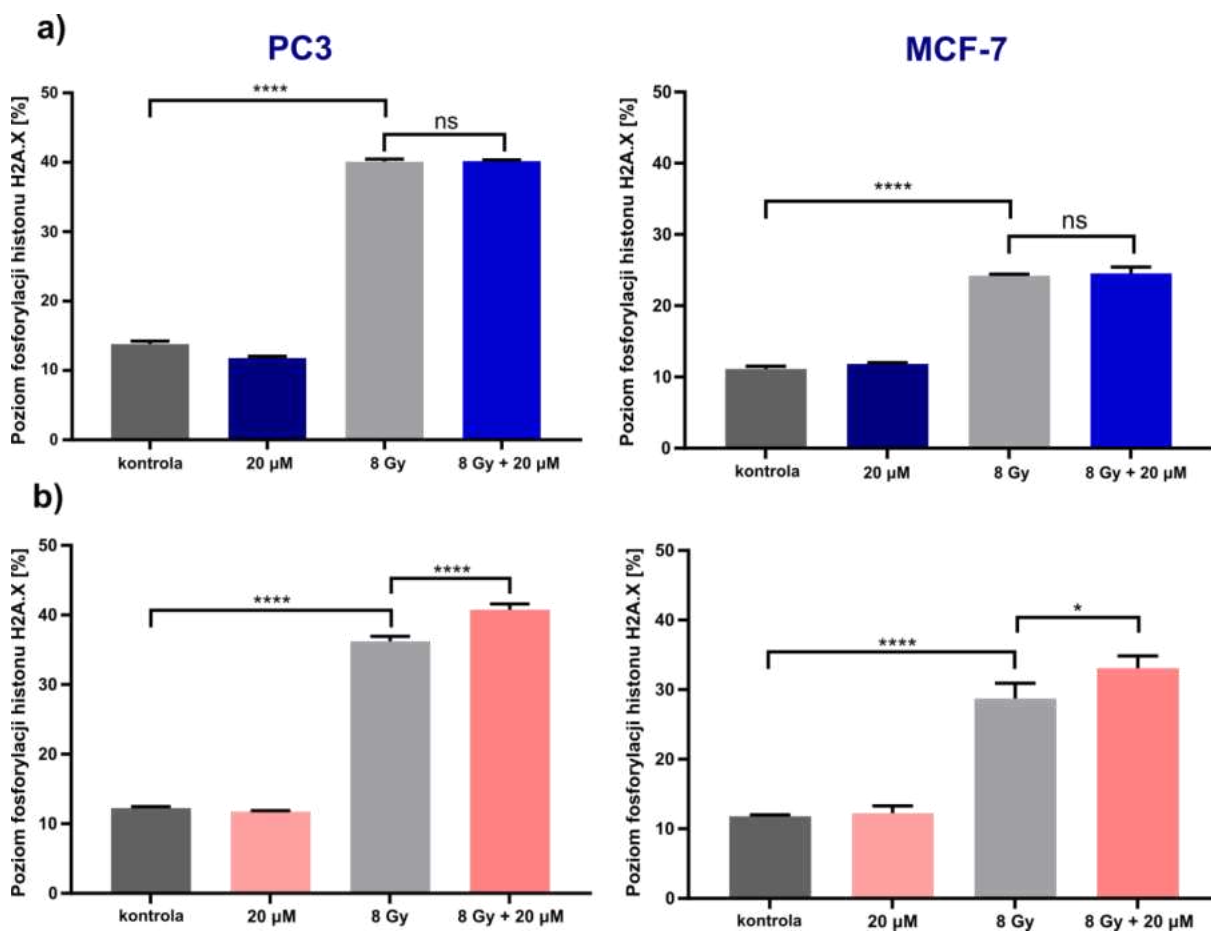
Analiza mechanizmu działania pochodnych

W kolejnym etapie badań skoncentrowano się na analizie prawdopodobnego mechanizmu działania pochodnych benzytowych wobec komórek PC3 oraz MCF-7. Ze względu na wyniki testu klonogenego, który wykazał wyraźnie wyższe właściwości uwrażliwiające dla pochodnych dA-NHbenzylOCF₃ oraz dA-NHbenzylSCF₃, to właśnie te związki wybrano do badań nad mechanizmem działania.

Początkowo, przeprowadzono analizę mającą na celu ocenę wzrostu ilości DSB po napromieniowaniu komórek nowotworowych w obecności badanych pochodnych PJ. Jak wspomniano wcześniej, DSB są jednym z najistotniejszych bezpośrednich efektów działania PJ, a dane literaturowe wskazują, że to właśnie one w największym stopniu przyczyniają się do śmierci komórki wywołanej promieniowaniem [61,62]. W niniejszym badaniu stopień uszkodzenia DNA określono na podstawie cytometrycznej analizy fosforylacji histonu H2A.X, który stanowi swoisty marker tego typu uszkodzeń [63].

Wyniki eksperymentu przeprowadzonego po 2 h od napromienienia linii komórek PC3 i MCF-7 dawką 8 Gy wykazały, że ani 20 µM roztwór pochodnej dA-NHbenzylOCF₃, ani jego połączenie z PJ nie wpływały na wzrost poziomu fosforylacji histonu H2A.X. Oznacza to, że związek ten nie indukuje większej ilości DSB w porównaniu do działania samego promieniowania w obu badanych liniach komórkowych (**Rysunek 16a i Rysunek 6 w P2**). Jedynie samodzielne zastosowanie PJ skutkowało istotnym statystycznie ($p < 0,0001$) wzrostem fosforylacji histonu H2A.X i powstawania DSB w porównaniu do kontroli w obu liniach. Natomiast roztwór pochodnej dA-NHbenzylSCF₃ o tym samym stężeniu, choć stosowany samodzielnie również nie powodował istotnego wzrostu fosforylacji H2A.X, wykazał umiarkowany efekt uwrażliwiający w połączeniu z napromienianiem dawką 8 Gy. W takim wariancie odnotowano wzrost odsetka komórek γH2A.X-pozytywnych w linii PC3

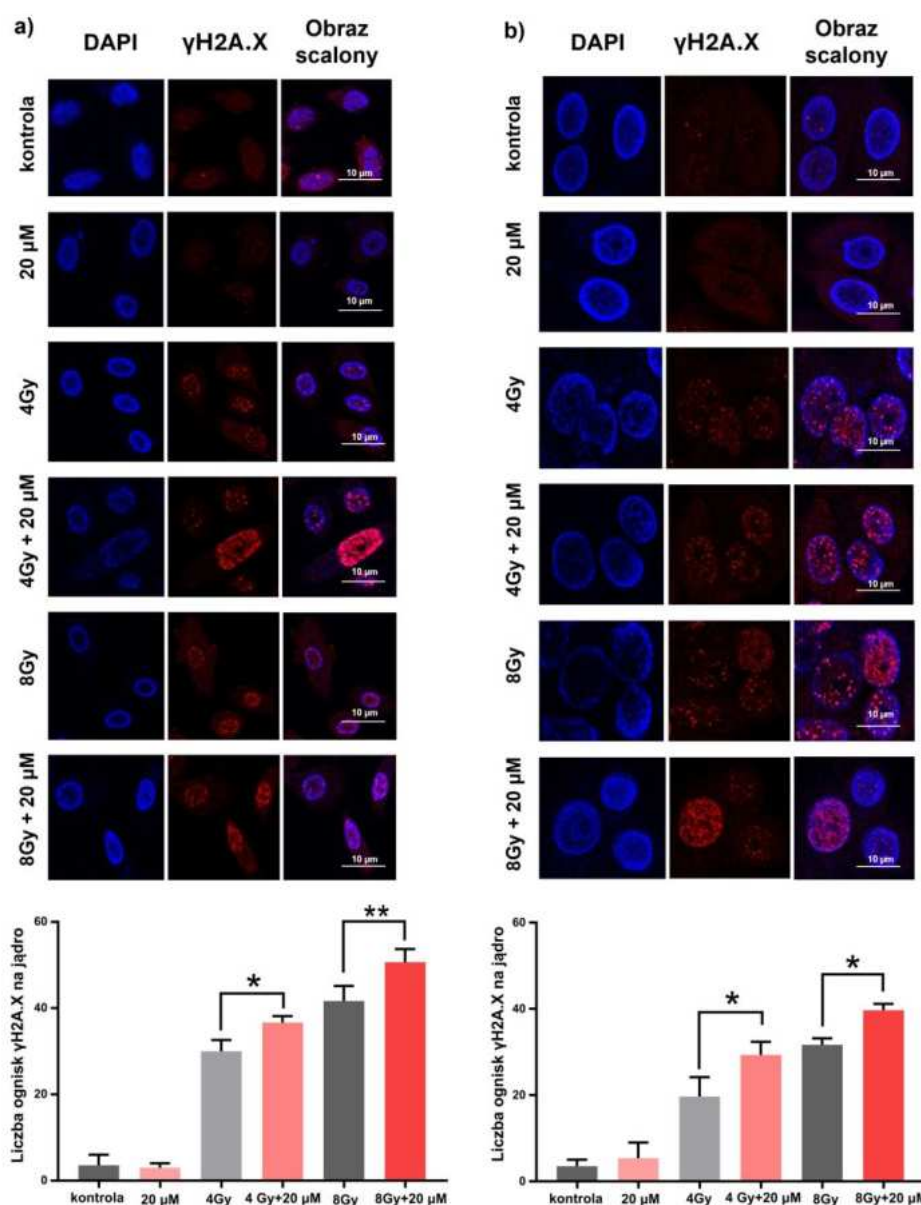
z $36,22 \% \pm 0,57 \%$ (komórki napromienione) do $40,79 \% \pm 0,66 \%$, a w linii MCF-7 z $28,72 \% \pm 1,81 \%$ do $32,82 \% \pm 1,76 \%$ (**Rysunek 16b i Rysunek 8 w P3**). Szczegółowe wykresy punktowe oraz strategia bramkowania zostały przedstawione na **Rysunku S14 oraz w Tabeli S5 w materiałach uzupełniających dla P3**.



Rysunek 16. Analiza fosforylacji histonu H2A.X przeprowadzona metodą cytometrii przepływowej dla linii komórkowych PC3 oraz MCF-7 traktowanych **a)** dA-NHbenzylOCF₃ lub **b)** dA-NHbenzylSCF₃. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów, z których każdy wykonano w trzech powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami oznaczono jako **** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$; ns – nieistotne statystycznie.

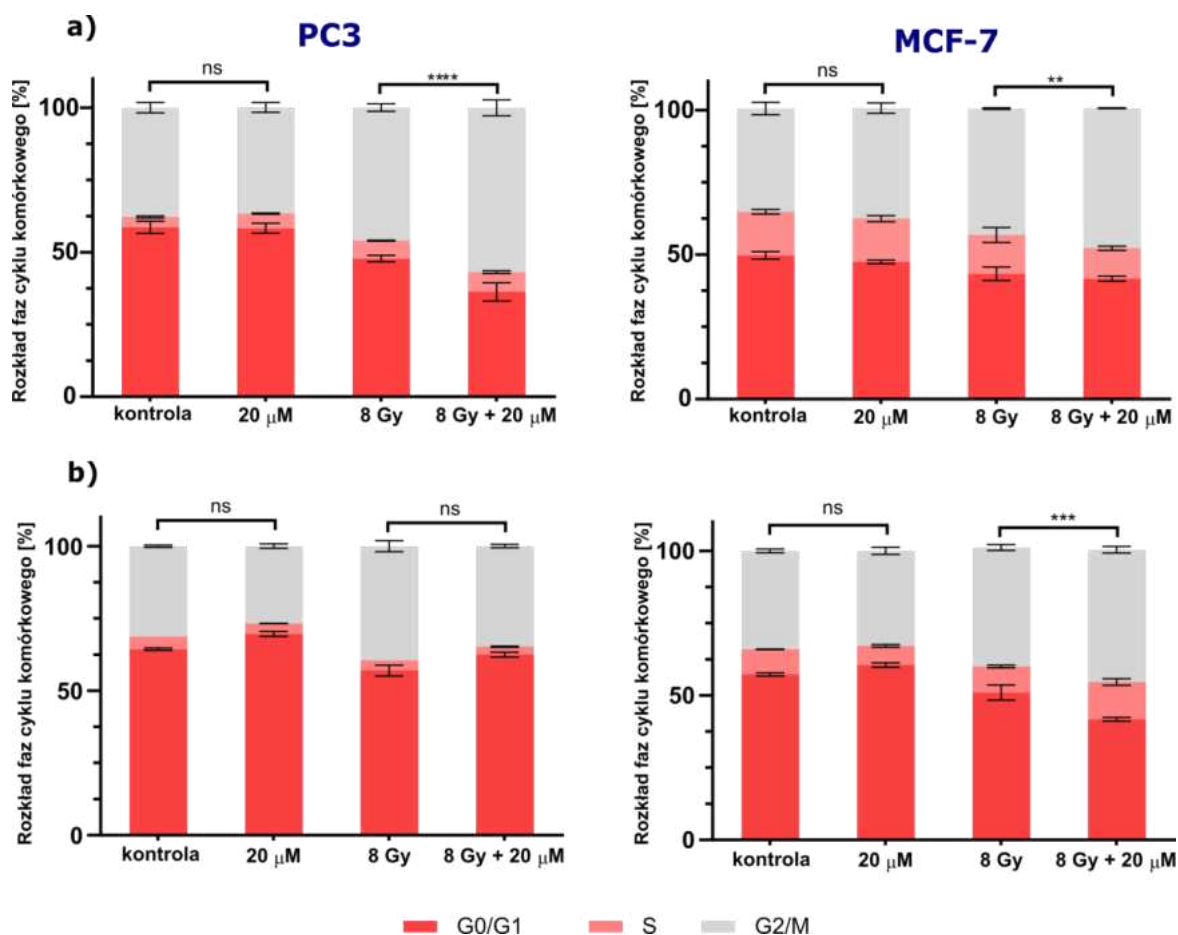
W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w teście cytometrycznym dla γ H2A.X, przeprowadzono również mikroskopową analizę immunofluorescencyjną ognisk γ H2A.X dla pochodnej dA-NHbenzylSCF₃. Metoda ta uznawana jest za bardziej czułą w wykrywaniu uszkodzeń DNA [64]. Analizę przeprowadzono po 2 godzinach od napromienienia komórek PC3 i MCF-7 dawkami 4 Gy i 8 Gy. W komórkach PC3 połączenie dawki 4 Gy z dA-NHbenzylSCF₃ spowodowało wzrost liczby ognisk γ H2A.X z $30,15 \pm 2,16$ do $37,05 \pm 4,67$ ($p < 0,05$). Zastosowanie wyższej dawki promieniowania, 8 Gy w połączeniu z pochodną

zwiększyło liczbę ognisk z $42,38 \pm 2,87$ do $51,60 \pm 2,49$ ($p < 0,01$), w porównaniu do samego napromieniania (**Rysunek 17a i Rysunek 9a w P3**). Podobną tendencję zaobserwowano w komórkach MCF-7 (**Rysunek 17b i Rysunek 9b w P3**), choć ogólna liczba ognisk γ H2A.X była nieco niższa, co może wskazywać na bardziej efektywne mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA w tej linii komórkowej. Zastosowanie $20 \mu\text{M}$ dA-NHbenzylSCF₃ w połączeniu z dawką 4 Gy zwiększyło liczbę ognisk z $20,25 \pm 3,68$ do $29,80 \pm 2,49$, natomiast przy dawce 8 Gy liczba ognisk wzrosła z $32,30 \pm 1,25$ do $40,10 \pm 1,50$. W obu przypadkach różnice były statystycznie istotne ($p < 0,05$). Uzyskane wyniki sugerują, że dA-NHbenzylSCF₃ zwiększa radiosensytywność obu linii komórkowych w połączeniu z PJ, przy czym efekt ten jest bardziej wyraźny w komórkach PC3 w porównaniu do komórek MCF-7. Wyniki analiz cytometrycznych oraz immunofluorescencyjnych pozostają ze sobą zgodne i wskazują, że działanie pochodnej dA-NHbenzylSCF₃ może być związane z indukcją DSB po skojarzonym z PJ zastosowaniu związku. Zaobserwowany efekt był wyraźniejszy w komórkach PC3 w porównaniu do linii MCF-7.



Rysunek 17. Reprezentatywne obrazy ognisk γ H2A.X uwidocznionych metodą immunofluorescencji w komórkach **a)** PC3 oraz **b)** MCF-7. Grupy eksperymentalne obejmowały: kontrolę (komórki nietraktowane i niepoddane napromienianiu), komórki traktowane 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃, komórki napromieniane dawką 4 Gy, komórki traktowane 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ w połączeniu z napromienianiem 4 Gy, komórki napromieniane 8 Gy oraz komórki traktowane 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ w połączeniu z napromienianiem 8 Gy. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (panele po lewej stronie) w celu uwidocznienia morfologii komórek. Przeprowadzono ilościową analizę ognisk γ H2A.X, wyrażając wyniki jako liczbę ognisk przypadających na jedno jądro komórkowe. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD. Istotność statystyczną oznaczono jako ** $p < 0,01$ oraz * $p < 0,05$.

W celu lepszego zrozumienia mechanizmu uwrażliwiania komórek nowotworowych na PJ przez badane pochodne, przeprowadzono analizę ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego w liniach komórkowych PC3 i MCF-7 z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Powszechnie wiadomo, że PJ zakłóca cykl komórkowy, spowalniając przechodzenie przez określone jego fazy [65]. Co więcej, komórki wykazują największą wrażliwość na PJ w fazach G2/M, mniejszą w fazie G1, a najmniejszą w końcowej części fazy S [66]. W związku z tym, uwrażliwiacz może działać poprzez modulowanie cyklu komórkowego w taki sposób, aby zwiększyć liczbę komórek znajdujących się w fazach najbardziej podatnych na promieniowanie. Analiza cyklu komórkowego w komórkach PC3 wykazała, że zastosowanie 20 μ M dA-NHbenzylOCF₃ w połączeniu z dawką PJ równą 8 Gy, zmniejszyło odsetek komórek w fazie G0/G1 z 47,8 % $\pm$ 1,1 % do 36,3 % $\pm$ 3,3 % oraz zwiększyło udział komórek w najbardziej wrażliwej na promieniowanie fazie G2/M z 46,1 % $\pm$ 1,2 % do 56,8 % $\pm$ 2,8 % w porównaniu do samego promieniowania (**Rysunek 18a i Rysunek 7a w P2**). Podobny efekt zaobserwowano w komórkach linii MCF-7, gdzie działanie skojarzone zmniejszyło populację komórek w fazie G0/G1 z 43,3 % $\pm$ 2,4 % do 41,7 % $\pm$ 0,9 % oraz zwiększyło odsetek komórek w fazie G2/M z 43,8 % $\pm$ 0,2 % do 48,4 % $\pm$ 0,1 % w porównaniu do promieniowania zastosowanego samodzielnie (**Rysunek 18a i Rysunek 7b w P2**). Ponadto, pochodna dA-NHbenzylOCF₃ zastosowana jako samodzielny czynnik nie wykazywała istotnego wpływu na przebieg cyklu komórkowego w żadnej z badanych linii. Wyniki te sugerują, że związek wywiera silniejszy wpływ na regulację cyklu komórkowego w komórkach PC3 niż w komórkach MCF-7.



Rysunek 18. Ilościowa analiza rozkładu faz cyklu komórkowego dla komórek linii PC3 oraz MCF-7, po traktowaniu komórek 20 μ M roztworem **a)** dA-NHbenzylOCF₃ (histogramy przedstawiono na Rysunku S8 w materiałach uzupełniających dla P2); **b)** dA-NHbenzylSCF₃ (histogramy przedstawiono na Rysunku S15 w materiałach uzupełniających dla P3). Dane zaprezentowano jako średnia $\pm$ SD. Istotność statystyczna różnic w populacjach komórek znajdujących się w fazie G2/M pomiędzy wskazanymi grupami została oznaczona jako **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$ oraz ** $p < 0,01$; ns – nieistotne statystycznie.

Odmienne wyniki uzyskano natomiast dla drugiej pochodnej dA-NHbenzylSCF₃. Analiza cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych PC3 wykazała, że zastosowanie 20 μ M roztworu pochodnej spowodowało zmniejszenie populacji komórek w fazie G2/M z 31,27 % $\pm$ 0,39 % do 26,77 % $\pm$ 0,78 % oraz zwiększenie populacji komórek w fazie G0/G1 z 64,31 % $\pm$ 0,41 % do 69,65 % $\pm$ 0,84 % w porównaniu do komórek nietraktowanych i nienapromienionych (różnica istotna statystycznie, $p < 0,0001$). Zastosowanie promieniowania i dA-NHbenzylSCF₃ również zmniejszyło odsetek komórek w fazie G2/M z 39,54 % $\pm$ 1,93 % do 34,79 % $\pm$ 0,62 % oraz zwiększyło populację komórek w fazie G0/G1 z 56,93 % $\pm$ 1,92 % do 62,45 % $\pm$ 0,83 % ($p < 0,0001$). W komórkach PC3 jedynie samo promieniowanie zwiększało udział komórek w fazie G2/M w porównaniu z kontrolą. Natomiast

w kontekście komórek linii MCF-7 działanie skojarzone związku i PJ zmniejszyła populację komórek w fazie G0/G1 z $50,98 \% \pm 2,62 \%$ (tylko napromienione) do $41,40 \% \pm 0,02 \%$, przy jednoczesnym zwiększeniu populacji komórek w fazie S z $9,00 \% \pm 0,44 \%$ do $12,85 \% \pm 1,15 \%$ oraz w fazie G2/M z $41,21 \% \pm 1,01 \%$ do $45,75 \% \pm 1,13 \%$. Co ciekawe, traktowanie komórek samą pochodną również zwiększyło odsetek komórek w fazie G0/G1 z $57,21 \% \pm 0,55 \%$ do $60,54 \% \pm 0,75 \%$ w porównaniu z kontrolą (komórki nietraktowane i nienapromienione) w tej linii.

Otrzymane wyniki sugerują, że badana pochodna nie wywiera istotnego wpływu na rozkład faz cyklu komórkowego w linii PC3, o czym świadczy zwiększenie udziału komórek w fazie G0/G1 po traktowaniu zarówno samym związkiem, jak i w połączeniu z PJ. Z drugiej strony, zaobserwowany w linii MCF-7 wzrost liczby komórek w fazach S i G2/M po zastosowaniu pochodnej i napromienianiu jest nieoczekiwany. Pomimo, że zmiana ta jest istotna statystycznie ($p < 0,0001$), nie stwierdzono wyraźnego aresztu komórkowego, czyli zatrzymania cyklu komórkowego w którejkolwiek z tych faz, które mogłoby prowadzić do znaczącego wzrostu populacji komórek w fazach S i G2/M. Na podstawie tych danych można zatem stwierdzić, że mechanizm działania dA-NHbenzylSCF₃ jest odmienny niż pochodnej dA-NHbenzylOCF₃ i najprawdopodobniej nie opiera się na regulacji cyklu komórkowego w liniach komórkowych PC3 i MCF-7.

Lokalizacja pochodnych w komórce

Istotnym elementem w badaniach nad mechanizmem działania pochodnych benzylowych jest określenie ich lokalizacji subkomórkowej, a także ustalenie formy, w jakiej związki te występują wewnątrz komórek. Kluczowe znaczenie ma stwierdzenie, czy związki te ulegają fosforylacji przez kinazy komórkowe oraz czy mogą być wbudowywane do genomowego DNA, co w takim przypadku wskazywałoby na ich wpływ na kluczowe procesy komórkowe, takie jak replikacja czy naprawa DNA.

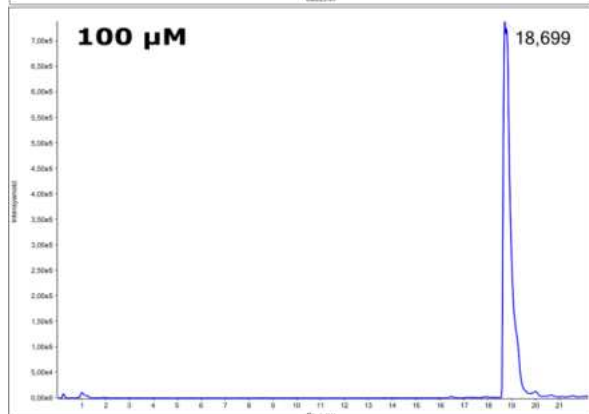
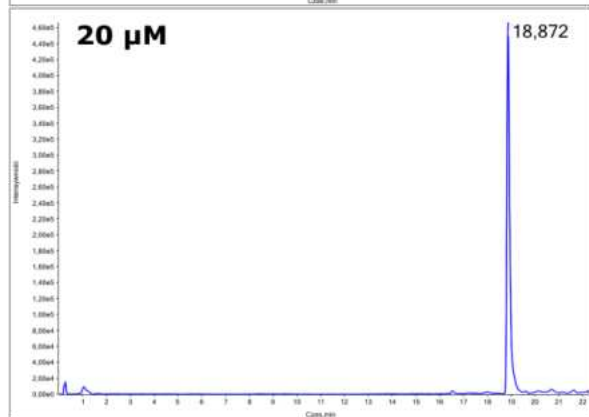
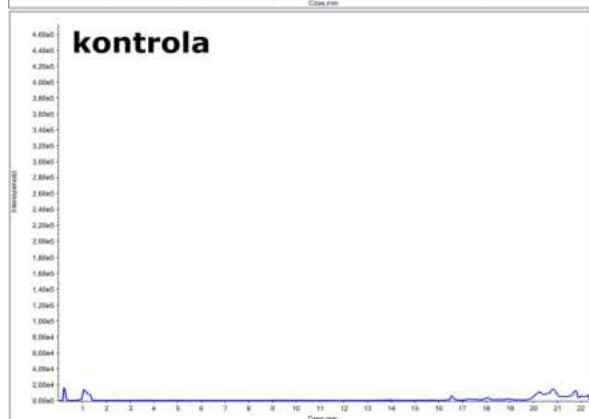
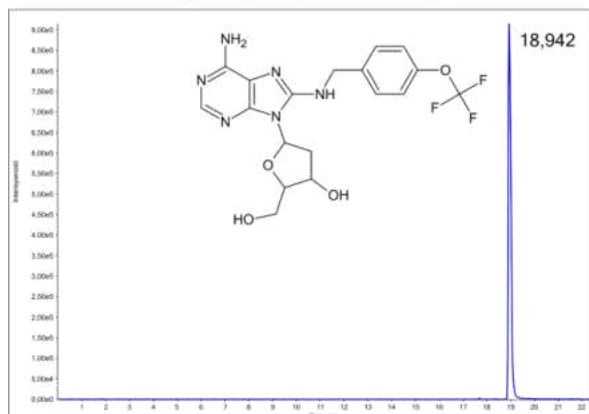
W celu oceny, czy badane nukleozydy przenikają do wnętrza komórki oraz w jakim stopniu lokalizują się w poszczególnych frakcjach subkomórkowych, przeprowadzono izolację frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej. Komórki po 48-godzinnej inkubacji z $20 \mu\text{M}$ lub $100 \mu\text{M}$ roztworem dA-NHbenzylOCF₃ lub dA-NHbenzylSCF₃ poddano trypsynizacji i wirowaniu w celu uzyskania osadów komórkowych. Następnie przeprowadzono frakcjonowanie przy użyciu zestawu Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (Abcam, UK) zgodnie z protokołem producenta, co pozwoliło na oddzielenie składników cytoplazmatycznych od jądrowych. Do

komórek dodano bufor cytoplazmatyczny zawierający inhibitory proteaz i DTT, co umożliwiło uzyskanie ekstraktu cytoplazmatycznego. Pozostałe osady komórkowe poddano następnie ekstrakcji jądrowej przy użyciu lodowatego buforu, mieszając i inkubując je cyklicznie na lodzie, w efekcie czego uzyskano frakcję jądrową. Każdą z frakcji podzielono na dwie części: jedną przeznaczono do bezpośredniej analizy z wykorzystaniem LC-MS, natomiast drugą poddano trawieniu do poziomu nukleozydów z wykorzystaniem zestawu Nucleoside Digestion Mix Kit (New England Biolabs, USA), zgodnie z protokołem producenta. Takie podejście umożliwiło określenie całkowitej zawartości danej pochodnej zarówno w postaci wolnej jak i jej form fosforylowanych (mono-, di- lub trifosforanów) obecnych wewnątrz komórki. Analiza wykazała obecność sygnałów odpowiadających zarówno dA-NHbenzylOCF₃ (**Rysunek 19a i Rysunek 8 w P2**) jak i dA-NHbenzylSCF₃ (**Rysunek 19b i Rysunek 11 w P3**) w frakcjach cytoplazmatycznej oraz jądrowej, co jednoznacznie potwierdza zdolność obu pochodnych do przenikania przez błonę komórkową oraz ich dystrybucję w obrębie komórki, w tym akumulację w jądrze.

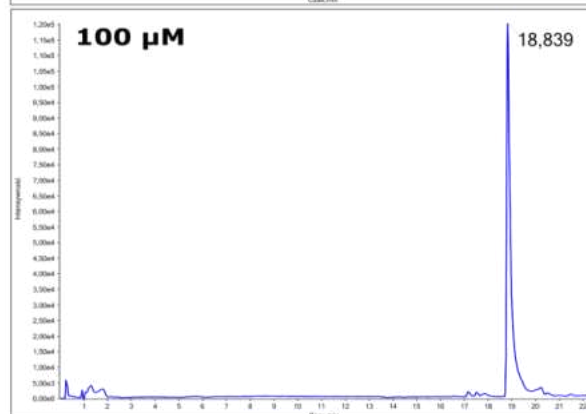
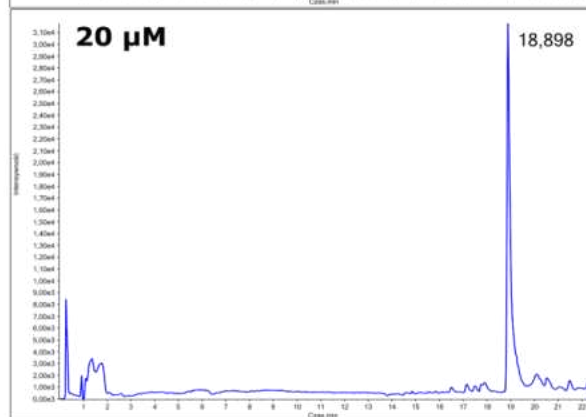
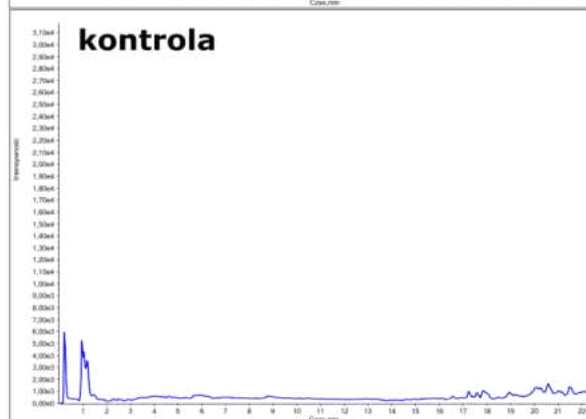
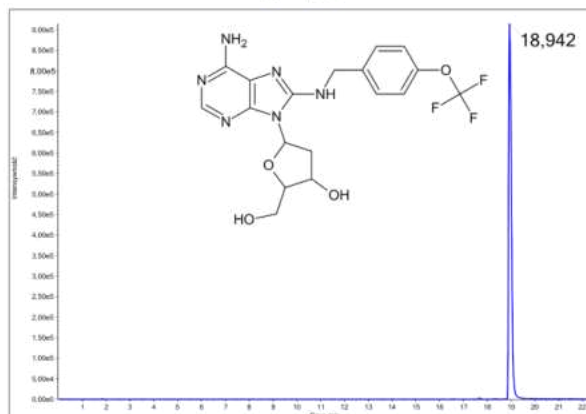
Na podstawie analizy powierzchni pików odpowiadających dA-NHbenzylOCF₃ oraz dA-NHbenzylSCF₃ w frakcjach cytoplazmatycznej i jądrowej, a także przy użyciu wzorcowego roztworu nukleozydu o stężeniu 10⁻⁴ M i znanych objętościach końcowych obu frakcji, oszacowano stosunki molowe obu pochodnych w analizowanych frakcjach. Dla dA-NHbenzylOCF₃ stosunek molowy zawartości we frakcji cytoplazmatycznej do jądrowej wynosił 26:1 przy stężeniu 20 μM oraz 22:1 przy stężeniu 100 μM. Podobnie, dla dA-NHbenzylSCF₃ oszacowano stosunki 3,5:1 i 5,3:1 przy stężeniach odpowiednio 20 μM i 100 μM. Wyniki te wskazują na wyraźnie wyższą akumulację obu pochodnych w cytoplazmie w porównaniu z jądrem komórkowym, co sugeruje, że ich lokalizacja subkomórkowa ogranicza się głównie do frakcji cytoplazmatycznej. Wyższą akumulację w tej frakcji wykazuje pochodna dA-NHbenzylOCF₃.

a)

frakcja cytoplazmatyczna

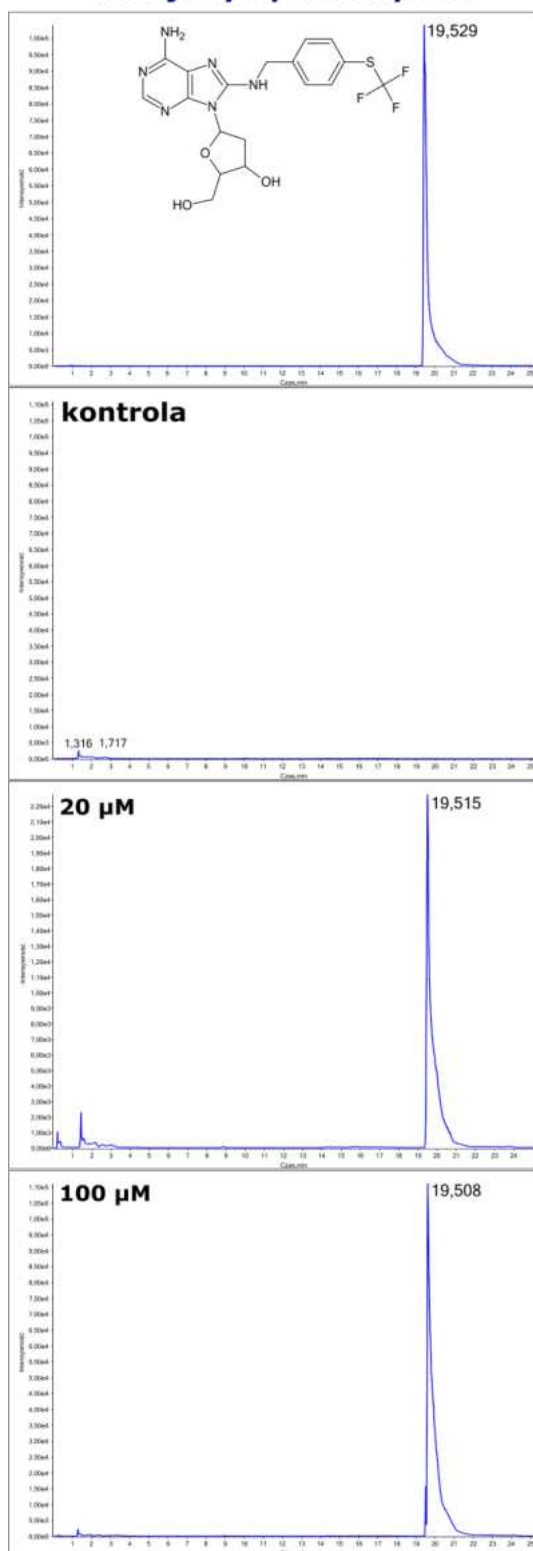


frakcja jądrowa

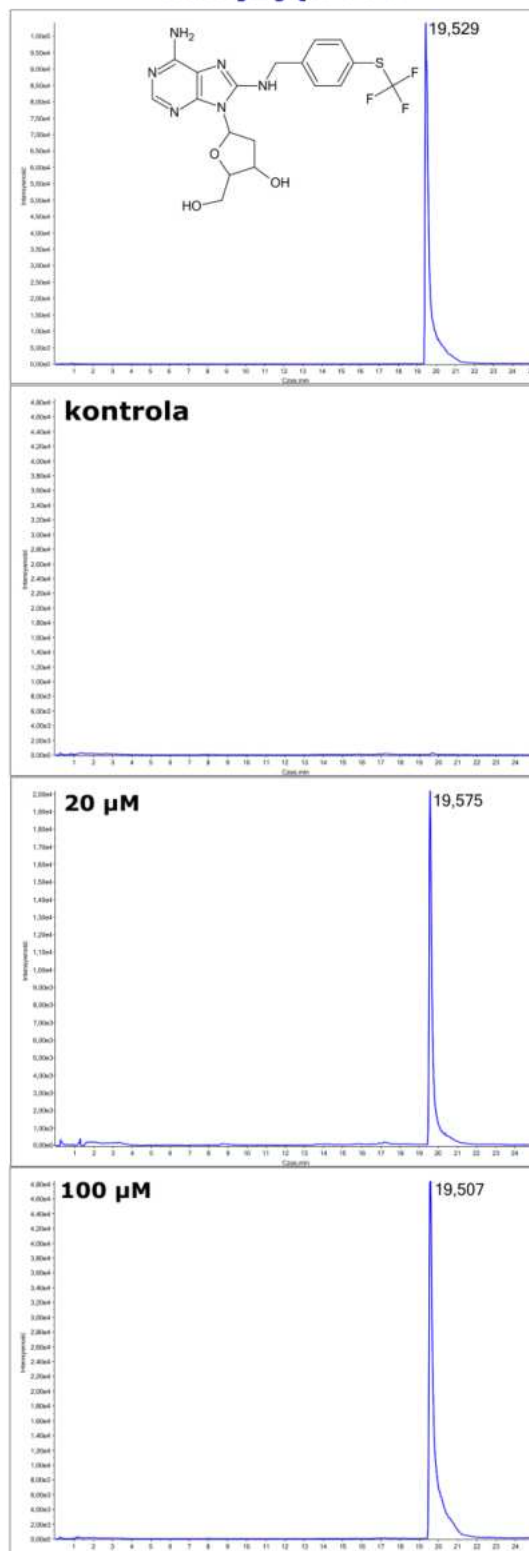


b)

frakcja cytoplazmatyczna



frakcja jądrowa



Rysunek 19. Chromatogramy XIC frakcji cytoplazmatycznej oraz frakcji jądrowej dla **a)** dA-benzylNHOCF₃ i **b)** dA-NHbenzylSCF₃. kontrola – próbka niepoddana działaniu związku; 20 μM – próbka z dodatkiem 20 μM roztworu pochodnej; 100 μM – próbka z dodatkiem 100 μM roztworu pochodnej.

Jak już wcześniej wspomniano, nukleozydy mogą ulegać częściowej fosforylacji w warunkach komórkowych. W związku z tym, obecność mono-, di- i tri-fosforanowych form dA-NHbenzylOCF₃ oraz dA-NHbenzylSCF₃ została zweryfikowana przy użyciu spektrometrii mas w trybie monitorowania wybranych jonów. Nie odnotowano jednak sygnałów odpowiadających fosforylowanym pochodnym badanych związków.

W celu potwierdzenia tych wyników, frakcje cytoplazmatyczne i jądrowe poddano trawieniu enzymatycznemu z zastosowaniem zestawu wspomnianego wyżej – Nucleoside Digestion Mix Kit, który umożliwia przekształcenie nukleotydów do odpowiadających im nukleozydów. Tak przygotowane próbki analizowano następnie metodą LC-MS w trybie XIC (ang. *eXtracted Ion Chromatogram*). Porównanie widm masowych wykazało, że intensywność piku odpowiadającego dA-NHbenzylOCF₃ oraz dA-NHbenzylSCF₃ nie uległa zmianie po trawieniu enzymatycznym, co jednoznacznie potwierdza, że oba związki występują w komórce wyłącznie w formie niefosforylowanej.

Brak fosforylowanych form analizowanych związków w komórce sugeruje również brak możliwości ich inkorporacji do genomowego DNA. W ramach weryfikacji tego założenia przeprowadzono eksperyment trawienia DNA komórek linii PC3 do nukleozydów, inkubowanych wcześniej przez 48 h z roztworem pochodnej dA-NHbenzylOCF₃ lub dA-NHbenzylSCF₃ o stężeniu 20 μM i 100 μM. Stopień inkorporacji oceniono za pomocą techniki HPLC, analizując roztwory nukleozydów otrzymane po trawieniu DNA oraz porównując je z roztworem wzorcowym zawierającym dA, dG, dC, T i daną pochodną w stężeniu 10⁻⁴ M każdego składnika. Na chromatogramach uzyskanych lizatów nie zaobserwowano obecności piku odpowiadającego dA-NHbenzylOCF₃ (**Rysunek 9 w P2**) ani dA-NHbenzylSCF₃ (**Rysunek S18 w materiałach uzupełniających dla P3**). Wyniki te jednoznacznie wskazują, że związki te nie są wcielane do DNA komórek PC3.

IV. Podsumowanie

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej obejmuje zagadnienia związane z otrzymaniem nowych RS z grupy MNuc, stanowiących obiecującą klasę związków do zastosowania w terapii onkologicznej w skojarzeniu z PJ. Celem badań było zaproponowanie nowych pochodnych adeniny i 2'-deoksyadenozyny jako potencjalnych RS oraz weryfikację ich działania zarówno w roztworach wodnych, jak i w komórce.

W toku badań uzyskano następujące wyniki:

1. opracowano metodę syntezy pochodnych adeniny, uzyskując dwa nowe związki: ASCH₃ oraz ASCF₃, których struktury zostały potwierdzone przy użyciu szeregu technik analitycznych;
2. opracowano metodę otrzymywania pochodnych 2'-deoksyadenozyny z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych benzyloamin, uzyskując trzy nowe związki: dA-NHbenzylOCF₃, dA-NHbenzylSCF₃ oraz dA-NHbenzylCF₃. Struktury wszystkich pochodnych potwierdzono metodami analitycznymi;
3. przeprowadzono eksperyment radiolizy stacjonarnej wodnego roztworu ASCH₃, w którym wykazano, że związek ten nie ulega rozpadowi pod wpływem nadmiarowego elektronu. Przyczyną tego zjawiska może być konkurencyjna reakcja protonowania, hamująca dysocjację ASCH₃ po napromienieniu. Hipotezę tę potwierdzono, wykonując analogiczny eksperyment w środowisku aprotycznym (bezwodny ACN), gdzie po zastosowaniu PJ pochodna uległa degradacji, tworząc dwa produkty rozpadu;
4. wykonano eksperyment radiolizy stacjonarnej w wodzie dla drugiej pochodnej adeniny ASCF₃, który wykazał degradację związku pod wpływem e_{aq}⁻ z utworzeniem jednego produktu rozpadu;
5. przeprowadzono radiolizę stacjonarną wodnych roztworów wszystkich pochodnych nukleozydu adeninowego: dA-NHbenzylCF₃, dA-NHbenzylOCF₃, dA-NHbenzylSCF₃. We wszystkich przypadkach zaobserwowano degradację związków z powstaniem różnych produktów radiolizy, co może wynikać z obecności atomów siarki lub tlenu w ich strukturze;
6. zbadano toksyczność pochodnych nukleozydu względem komórek nowotworowych linii PC3, MCF-7 oraz jednej z linii komórek zdrowych (HMF/HaCaT) z wykorzystaniem testu

MTT. We wszystkich przypadkach zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie żywotności komórek, szczególnie przy najwyższym stężeniu 100 μM po 48 i 72 godzinach inkubacji, przy czym najwyższą toksyczność wykazywała pochodna dA-NHbenzylSCF₃ w porównaniu do pozostałych związków;

7. przeprowadzono test klonogeny na liniach komórkowych PC3 i MCF-7 który wykazał, że roztwory wszystkich pochodnych w stężeniu 20 μM powodują statystycznie istotne obniżenie żywotności komórek, przy czym największe obniżenie żywotności zaobserwowano dla dA-NHbenzylSCF₃, a najmniejsze dla dA-NHbenzylCF₃;
8. określono tworzenie DSB po zastosowaniu PJ w połączeniu z pochodną dA-NHbenzylOCF₃ lub dA-NHbenzylSCF₃, wykorzystując cytometryczną analizę poziomu fosforylacji histonu H2A.X. Uzyskane wyniki wykazały, że pochodna dA-NHbenzylOCF₃ nie wpływa na powstawanie DSB. Natomiast dA-NHbenzylSCF₃ w połączeniu z PJ indukuje DSB zarówno w komórkach PC3, jak i MCF-7, przy czym efekt ten był nieco silniejszy w komórkach PC3, co potwierdzono wykorzystując mikroskopową analizę immunofluorescencyjną ognisk $\gamma\text{H2A.X}$;
9. zbadano wpływ promieniowania jonizującego w skojarzeniu z pochodnymi dA-NHbenzylOCF₃ oraz dA-NHbenzylSCF₃ na regulację cyklu komórkowego. W przypadku pochodnej dA-NHbenzylOCF₃ zaobserwowano, że w połączeniu z PJ powoduje ona zmniejszenie populacji komórek PC3 i MCF-7 w fazie G0/G1 oraz zwiększenie ich liczby w najbardziej radiowrażliwej fazie G2/M. Efekt ten był bardziej wyraźny w komórkach PC3, co jednoznacznie wskazuje na zdolność tej pochodnej do regulowania cyklu komórkowego. Dla pochodnej dA-NHbenzylSCF₃ nie zaobserwowano analogicznego działania. Działanie skojarzone pochodnej i PJ nie powodowało zwiększenia liczby komórek PC3 w fazie G2/M, a jedynie niewielki wzrost populacji komórek MCF-7 w fazach S i G2/M. Brak wyraźnego aresztu komórkowego wskazuje, że wpływ tej pochodnej na regulację cyklu komórkowego jest prawdopodobnie niewielki;
10. przeprowadzono eksperyment mający na celu określenie lokalizacji subkomórkowej pochodnych dA-NHbenzylOCF₃ oraz dA-NHbenzylSCF₃, a także ich formy występowania w komórce. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że obie pochodne lokalizują się zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym, jednak dominującą lokalizacją jest frakcja cytoplazmatyczna, co sugeruje ograniczoną akumulację w jądrze. Co istotne, znacznie wyższą akumulację w cytoplazmie wykazuje pochodna dA-NHbenzylOCF₃.

Dodatkowo wykazano, że obie pochodne nie ulegają fosforylacji ani nie są wcielone do DNA, co sugeruje, że ich mechanizm działania nie polega na klasycznej inkorporacji do materiału genetycznego komórki, jak ma to miejsce w przypadku niektórych analogów nukleozydowych (np. BrdU). Nie można jednak wykluczyć, że związki te mogą wchodzić w interakcje z DNA w sposób pośredni, np. poprzez generację reaktywnych form zdolnych do indukowania uszkodzeń struktury helisy, co znajduje odzwierciedlenie w wynikach testów komórkowych.

Przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie nowych związków o interesującym profilu biologicznym i radiochemicznym. Wyniki wskazują na potencjał wybranych pochodnych jako kandydatów do dalszych badań przedklinicznych, zwłaszcza w kontekście terapii skojarzonej z PJ. Obserwowane różnice w aktywności biologicznej oraz mechanizmach działania poszczególnych związków podkreślają znaczenie struktury chemicznej dla ich funkcji biologicznej. Uzyskane dane stanowią solidną podstawę do pogłębionych analiz mechanizmów molekularnych oraz ewentualnej optymalizacji struktur chemicznych w celu zwiększenia ich skuteczności i selektywności działania przeciwnowotworowego.

V. Literatura

- [1] World Health Organization, *Global cancer burden growing, amidst mounting need for services* [online], Komunikat prasowy, 1 lutego 2024, Lyon, Francja; Genewa, Szwajcaria: World Health Organization, 2024, dostęp: 08.04.2025, dostępny w Internecie: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
- [2] C.P. Wild, The global cancer burden: necessity is the mother of prevention, *Nat Rev Cancer*, 19(3), 123–124, 2019.
- [3] J. Holland, New treatment modalities in radiation therapy, *J Intraven Nurs*, 24(2), 95–101, 2001.
- [4] L. Chomicz-Mańka, P. Wityk, Ł. Golon, M. Zdrowowicz, J. Wiczek, K. Westphal, M. Żyndul, S. Makurat, J. Rak, Consequences of electron attachment to modified nucleosides incorporated into DNA, in: *Handbook of Computational Chemistry*, 2017.
- [5] G. Delaney, S. Jacob, C. Featherstone, M. Barton, The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines, *Cancer*, 104(6), 1129–1137, 2005.
- [6] J.F. Ward, DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 35, 95–125, 1988.
- [7] J. Bernier, E.J. Hall, A. Giaccia, Radiation oncology: a century of achievements, *Nat Rev Cancer*, 4(9), 737–747, 2004.
- [8] C. von Sonntag, *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*, 2006.
- [9] P. Zuziak, A. Bielaska, A. Mikołajczak, M. Mendowski, K. Kliniec, Ionizing radiation and radiobiological effects in the human body, *Postępy Biologii Komórki*, 49(3), 2022.
- [10] R. Baskar, J. Dai, N. Wenlong, R. Yeo, K.W. Yeoh, Biological response of cancer cells to radiation treatment, *Front Mol Biosci*, 1(24), 2014.
- [11] R. Baskar, K.A. Lee, R. Yeo, K.W. Yeoh, Cancer and radiation therapy: current advances and future directions, *Int J Med Sci*, 9(3), 193–199, 2012.
- [12] S. Lehnert, *Biomolecular action of ionizing radiation*, 2007.
- [13] J.D. Chapman, A.P. Reuvers, J. Borsa, C.L. Greenstock, Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro, *Radiat Res*, 56(2), 291–306, 1973.
- [14] D.R. Raleigh, D.A. Haas-Kogan, Molecular targets and mechanisms of radiosensitization using DNA damage response pathways, *Future Oncol*, 9(2), 219–233, 2013.
- [15] E. Alizadeh, T.M. Orlando, L. Sanche, Biomolecular damage induced by ionizing radiation: The direct and indirect effects of low-energy electrons on DNA, *Annu Rev Phys Chem*, 66, 379–398, 2015.

- [16] L.H. Thompson, D. Schild, The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells, *Biochimie*, 81(1–2), 87–105, 1999.
- [17] P.A. Jeggo, M. Löbrich, How cancer cells hijack DNA double-strand break repair pathways to gain genomic instability, *Biochem J*, 471(1), 1–11, 2015.
- [18] F. Liang, M. Han, P.J. Romanienko, M. Jasin, Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5172–5177, 1998.
- [19] M.E. Moynahan, M. Jasin, Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3), 196–207, 2010.
- [20] K. Rothkamm, I. Krüger, L.H. Thompson, M. Lübrich, Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol Cell Biol*, 23(16), 5706–5715, 2003.
- [21] A.J. Davis, D.J. Chen, DNA double strand break repair via non-homologous end-joining, *Transl Cancer Res*, 2(3), 130–143, 2013.
- [22] G.M. Denicola, F.A. Karreth, T.J. Humpton, A. Gopinathan, C. Wei, K. Frese, D. Mangal, K.H. Yu, C.J. Yeo, E.S. Calhoun, F. Scrimieri, J.M. Winter, R.H. Hruban, C. Iacobuzio-Donahue, S.E. Kern, I.A. Blair, D.A. Tuveson, Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis, *Nature*, 475(7354), 106–109, 2011.
- [23] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach?, *Nat Rev Drug Discov*, 8(7), 579–591, 2009.
- [24] M. Goldstein, M.B. Kastan, The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy, *Annu Rev Med*, 66, 129–143, 2015.
- [25] J.S. Russell, P.J. Tofilon, Radiation-induced activation of nuclear factor- κ B involves selective degradation of plasma membrane-associated I κ B α , *Mol Biol Cell*, 13(10), 3431–3440, 2002.
- [26] S.Q. Zhang, A. Kovalenko, G. Cantarella, D. Wallach, Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation, *Immunity*, 12(3), 301–311, 2000.
- [27] A.L. Hein, M.M. Ouellete, Y. Yan, Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (Review), *Int J Oncol*, 45(5), 1813–1819, 2014.
- [28] J.S. Murley, R.C. Miller, R.R. Weichselbaum, D.J. Grdina, TP53 mutational status and ROS effect the expression of the survivin-associated radio-adaptive response, *Radiat Res*, 188(5), 579–590, 2017.
- [29] P. Vaupel, A. Mayer, Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome, *Cancer Metastasis Rev*, 26(2), 225–239, 2007.
- [30] J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions, *Nat Rev Cancer*, 8, 755–768, 2008.
- [31] A.C. Begg, F.A. Stewart, C. Vens, Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs, *Nat Rev Cancer*, 11(4), 239–253, 2011.

- [32] B.G. Wouters, J.M. Brown, Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the “hypoxic fraction” in determining tumor response to fractionated radiotherapy, *Radiat Res*, 147(5), 541–550, 1997.
- [33] O. Trédan, C.M. Galmarini, K. Patel, I.F. Tannock, Drug resistance and the solid tumor microenvironment, *J Natl Cancer Inst*, 99(19), 1441–1454, 2007.
- [34] H. Wang, X. Mu, H. He, X.D. Zhang, Cancer Radiosensitizers, *Trends Pharmacol Sci*, 39(1), 24–48, 2018.
- [35] P. Wardman, Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy, *Clin Oncol*, 19(6), 397–417, 2007.
- [36] G.E. Adams, Chemical radiosensitization of hypoxic cells, *Br Med Bull*, 29(1), 48–53, 1973.
- [37] E.J. Hall, A.J. Giaccia, Radiobiology for the radiologist: Seventh edition, 2012.
- [38] J. Rak, L. Chomicz, J. Wicz, K. Westphal, M. Zdrowowicz, P. Wityk, M. Zyndul, S. Makurat, Ł. Golon, Mechanisms of damage to DNA labeled with electrophilic nucleobases induced by ionizing or UV radiation, *J Phys Chem B*, 119(26), 8227–8238, 2015.
- [39] J.D. Zimbrick, J.F. Ward, L.S. Myers, Studies on the chemical basis of cellular radiosensitization by 5-bromouracil substitution in DNA, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 16(6), 505–523, 1969.
- [40] M.A. Shenoy, B.B. Singh, Chemical radiosensitizers in cancer therapy, *Cancer Invest*, 10(6), 533–551, 1992.
- [41] K. Westphal, J. Wicz, J. Miloch, G. Kciuk, K. Bobrowski, J. Rak, Irreversible electron attachment-a key to DNA damage by solvated electrons in aqueous solution, *Org Biomol Chem*, 13(41), 10362–10369, 2015.
- [42] P. Spisz, M. Zdrowowicz, S. Makurat, W. Kozak, K. Skotnicki, K. Bobrowski, J. Rak, Why Does the Type of Halogen Atom Matter for the Radiosensitizing Properties of 5-Halogen Substituted 4-Thio-2'-Deoxyuridines?, *Molecules* 24(15), 2819, 2019.
- [43] B. Djordjevic, W. Szybalski, Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity, *J Exp Med* 112(3), 509–531, 1960.
- [44] L. Chomicz, J. Rak, P. Storoniak, Electron-induced elimination of the bromide anion from brominated nucleobases. A computational study, *J Phys Chem B*, 116(19), 2012.
- [45] Y. Park, K. Polska, J. Rak, J.R. Wagner, L. Sanche, Fundamental mechanisms of DNA radiosensitization: damage induced by low-energy electrons in brominated oligonucleotide trimers, *J Phys Chem B*, 116(32), 9676–9682, 2012.
- [46] O. Gudjonssona, M. Bergström, S. Kristjansson, F. Wu, G. Nyberg, K.J. Fasth, B. Långström, Analysis of ⁷⁶Br-BrdU in DNA of brain tumors after a PET study does not support its use as a proliferation marker, *Nucl Med Biol*, 28(1), 59–65, 2001.

- [47] J.P. Kriss, Y. Maruyama, L.A. Tung, S.B. Bond, L. Révész, The fate of 5-Bromodeoxyuridine, 5-Bromodeoxycytidine, and 5-Iododeoxycytidine in man, *Cancer Res*, 23, 260–268, 1963.
- [48] T.L. Phillips, C.B. Scott, S.A. Leibel, M. Rotman, I.J. Weigensberg, Results of a randomized comparison of radiotherapy and bromodeoxyuridine with radiotherapy alone for brain metastases: Report of RTOG trial 89-05, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33(2), 339–348, 1995.
- [49] M. Wieczór, P. Wityk, J. Czub, L. Chomicz, J. Rak, A first-principles study of electron attachment to the fully hydrated bromonucleobases, *Chem Phys Lett*, 595–596, 133–137, 2014.
- [50] P. Wityk, M. Wieczór, S. Makurat, L. Chomicz-Mańka, J. Czub, J. Rak, Dominant Pathways of Adenosyl Radical-Induced DNA Damage Revealed by QM/MM Metadynamics, *J Chem Theory Comput*, 13(12), 6415–6423, 2017.
- [51] Z. Janeba, A. Holý, M. Masojídková, Synthesis of acyclic nucleoside and nucleotide analogs derived from 6-amino-7H-purin-8(9H)-one, *Collect Czechoslov Chem Commun*, 65, 2000.
- [52] Z. Janeba, A. Holý, M. Masojídková, Synthesis of acyclic nucleoside and nucleotide analogs derived from 6-amino-7H-purine-8(9H)-thione and 8-(methylsulfanyl)adenine, *Collect Czechoslov Chem Commun*, 65, 2000.
- [53] V. Vivet-Boudou, C. Isel, M. Sleiman, R. Smyth, N. Gaied, P. Barhoum, G. Laumond, G. Bec, M. Götte, J. Mak, A.M. Aubertin, A. Burger, R. Marquet, 8-modified-2'-deoxyadenosine analogues induce delayed polymerization arrest during HIV-1 reverse transcription, *PLoS One*, 6(11), e27456, 2011.
- [54] C. Hansch, A. Leo, R.W. Taft, A survey of hammett substituent constants and resonance and field parameters, *Chem Rev*, 91(2), 1991.
- [55] J.W.T., & W.R.J. Spinks, *An Introduction to Radiation Chemistry* (3rd ed.), 1990.
- [56] M.E. Kaighn, K.S. Narayan, Y. Ohnuki, J.F. Lechner, L.W. Jones, Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), *Invest Urol*, 17(1), 16–23, 1979.
- [57] A. Booms, G.A. Coetzee, S.E. Pierce, MCF-7 as a model for functional analysis of breast cancer risk variants, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 28(10), 1735–1745, 2019.
- [58] N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat Protoc*, 1(5), 2315–2319, 2006.
- [59] C.M. van Leeuwen, A.L. Oei, J. Crezee, A. Bel, N.A.P. Franken, L.J.A. Stalpers, H.P. Kok, The alfa and beta of tumours: A review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies, *Radiat Oncol*, 13(1), 2018.
- [60] T. Matsui, E. Nuryadi, S. Komatsu, Y. Hirota, A. Shibata, T. Oike, T. Nakano, Robustness of clonogenic assays as a biomarker for cancer cell radiosensitivity, *Int J Mol Sci*, 20(17), 4148, 2019.

- [61] M. Toulany, Targeting DNA double-strand break repair pathways to improve radiotherapy response, *Genes (Basel)*, 10(1), 25, 2019.
- [62] T.J. McMillan, S. Tobi, S. Mateos, C. Lemon, The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49(2), 373–377, 2001.
- [63] K. Khan, S. Tewari, N.P. Awasthi, S.P. Mishra, G.R. Agarwal, M. Rastogi, N. Husain, Flow cytometric detection of gamma-H2AX to evaluate DNA damage by low dose diagnostic irradiation, *Med Hypotheses*, 115, 22–28, 2018.
- [64] A. Reddig, C.E. Rübe, S. Rödiger, P. Schierack, D. Reinhold, D. Roggenbuck, DNA damage assessment and potential applications in laboratory diagnostics and precision medicine, *J Lab Precis Med*, 3, 31, 2018.
- [65] E.J. Bernhard, A. Maity, R.J. Muschel, W.G. McKenna, Effects of ionizing radiation on cell cycle progression - a review, *Radiat Environ Biophys*, 34(2), 79–83, 1995.
- [66] T.M. Pawlik, K. Keyomarsi, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59(4), 928–942, 2004.

VI. Wykaz rysunków

Rysunek 1. Mechanizmy działania PJ w radioterapii.

Rysunek 2. Mechanizm działania RS – koncepcja „konia trojańskiego”.

Rysunek 3. Schemat otrzymywania pochodnych $ASCH_3$ oraz $ASCF_3$.

Rysunek 4. Charakterystyka pochodnych $ASCH_3$ i $ASCF_3$. **a)** Widmo 1H NMR dla $ASCH_3$; **b)** Widmo 1H NMR dla $ASCF_3$; **c)** Widmo MS dla $ASCH_3$ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **d)** Widmo MS dla $ASCF_3$ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **e)** Chromatogram HPLC dla $ASCH_3$ (czystość = 99%); **f)** Chromatogram HPLC dla $ASCF_3$ (czystość = 98%).

Rysunek 5. Schemat otrzymywania pochodnych 2'-deoksyadenozyny.

Rysunek 6. Charakterystyka pochodnych 2'-deoksyadenozyny. **a)** Widmo 1H NMR dla dA-NHbenzylOCF₃; **b)** Widmo 1H NMR dla dA-NHbenzylSCF₃; **c)** Widmo 1H NMR dla dA-NHbenzylCF₃; **d)** Widmo MS dla dA-NHbenzylOCF₃ zarejestrowane w trybie jonizacji dodatniej; **e)** Widmo MS dla dA-NHbenzylSCF₃ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **f)** Widmo MS dla dA-NHbenzylCF₃ zarejestrowane w trybie jonizacji ujemnej; **g)** Chromatogram HPLC dla dA-NHbenzylOCF₃ (czystość = 99 %); **h)** Chromatogram HPLC dla dA-NHbenzylSCF₃ (czystość = 98 %); **i)** Chromatogram HPLC dla dA-NHbenzylCF₃ (czystość = 97 %).

Rysunek 7. Analiza HPLC pochodnej $ASCH_3$ przed napromienieniem (czarna linia) i po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia) a) w roztworze wodnym i b) w bezwodnym ACN.

Rysunek 8. Analiza HPLC wodnego roztworu pochodnej $ASCF_3$ przed napromienieniem (czarna linia) i po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia).

Rysunek 9. **a)** Widmo MS produktu radiolizy $ASCF_3$ o czasie retencji 2,98 min i **b)** widmo MSMS jonu o masie 214,0178 Da zarejestrowane w trybie jonów ujemnych.

Rysunek 10. Analiza HPLC wodnego roztworu dA-NHbenzylOCF₃ przed napromienieniem (czarna linia), po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia) oraz wodnego roztworu wzorca 4-trifluorometoksytoluenu (zielona linia).

Rysunek 11. Analiza HPLC wodnego roztworu dA-NHbenzylSCF₃ przed napromienieniem (czarna linia) i po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia).

Rysunek 12. Analiza HPLC wodnego roztworu dA-NHbenzylCF₃ przed napromienieniem (czarna linia) i po napromienieniu dawką 500 Gy (czerwona linia).

Rysunek 13. **a)** Widmo MS produktu radiolizy dA-NHbenzylCF₃ o czasie retencji 4,48 min, **b)** widmo MSMS jonu o masie 479,0993 Da, **c)** widmo MS produktu radiolizy dA-NHbenzylCF₃ o czasie retencji 7,36 min i **d)** widmo MSMS jonu o masie 399,1492 Da zarejestrowane w trybie jonów ujemnych.

Rysunek 14. Żywotność komórek a) PC3, b) MCF7 oraz c) HaCaT po 48 i 72 godzinach traktowania dA-NHbenzylCF₃. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD) z trzech niezależnych eksperymentów wykonanych w trzech powtórzeniach. Istotne statystycznie różnice występują pomiędzy hodowlami traktowanymi badanym związkiem a kontrolą (hodowla traktowana rozpuszczalnikiem): ****p < 0,0001; **p < 0,01; *p < 0,05.

Rysunek 15. Krzywe zależności dawka – odpowiedź dla zmniejszonego przeżycia komórek PC3 oraz komórek MCF-7 po zastosowaniu zależnego od dawki traktowania pochodną **a)** dA-NHbenzylOCF₃, **b)** dA-NHbenzylSCF₃, **c)** dA-NHbenzylCF₃ o stężeniu 20 μ M lub bez jej zastosowania. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach. DEF- współczynnik wzmocnienia dawki.

Rysunek 16. Analiza fosforylacji histonu H2A.X przeprowadzona metodą cytometrii przepływowej dla linii komórkowych PC3 oraz MCF-7 traktowanych **a)** dA-NHbenzylOCF₃ lub **b)** dA-NHbenzylSCF₃. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów, z których każdy wykonano w trzech powtórzeniach. Statystycznie istotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami oznaczono jako ****p < 0,0001; *p < 0,05; ns – nieistotne statystycznie.

Rysunek 17. Reprezentatywne obrazy ognisk γ H2A.X uwidocznionych metodą immunofluorescencji w komórkach a) PC3 oraz b) MCF-7. Grupy eksperymentalne obejmowały: kontrolę (komórki nieleczone i niepoddane napromienianiu), leczenie 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃, napromienianie dawką 4 Gy, leczenie 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ w połączeniu z napromienianiem 4 Gy, napromienianie 8 Gy oraz leczenie 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ w połączeniu z napromienianiem 8 Gy. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (panele po lewej stronie) w celu uwidocznienia morfologii komórek. Przeprowadzono ilościową analizę ognisk γ H2A.X, wyrażając wyniki jako liczbę ognisk przypadających na jedno jądro komórkowe. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD. Istotność statystyczną oznaczono jako **p < 0,01 oraz *p < 0,05. Pasek skali – 10 μ m.

Rysunek 18. Ilościowa analiza rozkładu faz cyklu komórkowego dla komórek linii PC3 oraz MCF-7, po traktowaniu komórek 20 μ M roztworem **a)** dA-NHbenzylOCF₃ (**histogramy przedstawiono na Rysunku S8 w materiałach uzupełniających dla P2**); **b)** dA-NHbenzylSCF₃ (**histogramy przedstawiono na Rysunku S15 w materiałach uzupełniających dla P3**). Dane zaprezentowano jako średnia $\pm$ SD. Istotność statystyczna

różnic w populacjach komórek znajdujących się w fazie G2/M pomiędzy wskazanymi grupami została oznaczona jako **** $p < 0,0001$; *** $p < 0.001$ oraz ** $p < 0,01$; ns – nieistotne statystycznie.

Rysunek 19. Chromatogramy XIC frakcji cytoplazmatycznej oraz frakcji jądrowej dla **a)** dA-benzylNHOCF₃ i **b)** dA-NHbenzylSCF₃. kontrola – próbka niepoddana działaniu związku; 20 μ M – próbka z dodatkiem 20 μ M roztworu pochodnej; 100 μ M – próbka z dodatkiem 100 μ M roztworu pochodnej.

VII. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

(P1) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl, Janusz Rak. “Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 128 (15), **2024**

Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution

Magdalena Datta,^{||} Adrian Szczyrba,^{||} Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl,^{*} and Janusz Rak^{*}



Cite This: *J. Phys. Chem. B* 2024, 128, 3621–3630



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: 8-Thiomethyladenine (ASCH₃), a potentially radiosensitizing modified nucleobase, has been synthesized in a reaction between 8-thioadenine and methyl iodide. Despite favorable dissociative electron attachment (DEA) characteristics, the radiolysis of an aqueous solution of ASCH₃ with a dose of X-ray amounting to as much as 300 Gy leads to no effects. Nevertheless, crossed electron-molecule beam experiments in the gas phase on ASCH₃ confirm the theoretical findings regarding the stability of its radical anion, namely, the most abundant reaction channel is related to the dissociation of the S-CH₃ bond in the respective anion. Furthermore, electron-induced degradation of ASCH₃ has been observed in aprotic acetonitrile, which is strong evidence for the involvement of proton transfer (PT) in stabilizing the radical anion in an aqueous solution. These findings demonstrate that PT in water can be the main player in deciding the radiosensitizing properties of modified nucleobases/nucleosides.



1. INTRODUCTION

Employing ionizing radiation (IR) radiotherapy is one of the most suitable modalities used against cancer.¹ Its effectiveness is based on the interaction between cellular DNA and products of water radiolysis, mainly hydroxyl radicals. However, in solid tumors (which constitute ca. 80% of all tumor cases) the level of oxygen is significantly lower (hypoxia) than that in normoxic cells, which diminishes the effectiveness of IR due to the so-called oxygen effect, i.e. hypoxia makes the cells threefold less sensitive to IR compared to those with physiological level of oxygen.² One should remember that IR itself may introduce mutations to the genomic DNA that in the worst case lead to secondary cancer. Taking into account the fact that cells in surrounding tissues are usually at physioxia, the risk of their damage seems to be higher than that for tumor cells. To overcome this problem, one can introduce specific compounds to radiotherapy that sensitize cancer cells to IR despite their lower level of dissolved oxygen. Modified nucleosides (NBs) belong to hypoxic cell radiosensitizers that utilize the second most abundant product of water radiolysis, i.e. hydrated electrons.³ It is worth noticing that after incorporation into DNA and attachment of electrons, NBs form radical anions that are kinetically and thermodynamically unstable.⁴ Indeed, a well-known 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), a representative of hypoxic cell radiosensitizers, dissociates after electron attachment, forming the bromide anion and a reactive uracil-S-yl radical.⁵ The latter stabilizes in a series of secondary reactions, ultimately leading to a DNA strand break. Hence, the transformation of a native nucleoside in a derivative with high electron affinity and low

stability in the radical anion form is the main idea behind radiosensitizing NBs.⁶

Radiosensitizing NBs⁷ proposed so far are mainly derivatives of uridine. Analogs of purine nucleosides are quite scarce. To this end, one can enumerate mainly bromoderivatives of adenosine and guanosine.⁸ Low-energy electron (LEE) attachment studies were carried out with 8-bromoadenine^{9–12} and 2-fluoroadenine.¹³ Similarly, LEE-induced damage to short single-stranded oligonucleotides labeled with 8-bromoadenine or 8-bromoguanine was studied under ultrahigh vacuum^{14,15} while the impact of solvated electrons in an aqueous solution on those sequences was elucidated in radiolytic investigations.¹⁶ Since there are no fundamental reasons against radiosensitizing purine nucleosides with other modifications than halogens and working out such systems would extend quite a limited radiosensitizer pool, we decided to synthesize potentially radiosensitizing derivatives of adenosine, 8-thiomethyladenine (ASCH₃), and characterize its properties in the gas phase and aqueous solution. Indeed, the gas phase experiments (crossed electron-molecule beam (CEMB) measurements) coupled to quantum-chemical (QM) calculations confirmed the propensity to dissociative electron attachment (DEA) of the above-mentioned derivative. However, the aqueous phase studies did not demonstrate

Received: February 18, 2024

Revised: March 18, 2024

Accepted: March 20, 2024

Published: April 5, 2024



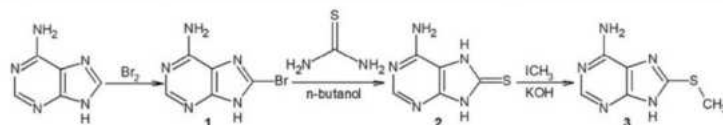


Figure 1. Synthesis of 8-thiomethyladenine.

ASCH₃ susceptibility to damage by electron attachment. In the discussion below, we suggest that this unexpected behavior is probably caused by the protonation of the ASCH₃ nucleobase in an aqueous solution. This hypothesis was confirmed by radiolysis in aprotic acetonitrile. The experimental results followed by QM calculations at the density functional theory level seem to confirm our suppositions.

Adenine, a purine nucleobase, does not undergo chemical modifications as easily as uracil. On the other hand, it was demonstrated that 8-brominated guanosine is prone to the DEA process.¹⁷ Analysis of chemical modification possibilities suggests adenine substitution at the C8 position is the most facile. Therefore, we first obtained 8-bromo-adenine (8BrA) from adenine, then transformed 8BrA into 6-amino-7-(H)-purine-8(9H)-thione (8SA), and finally converted 8SA to 8-methylthioadenine.¹⁸ Designing this potentially radiosensitive derivative, i.e., a system of high susceptibility to DEA, we considered the Hammett inductive constant of a substituent (for the –SCH₃ group it amounts to 0.25,¹⁹ which implies that such a modification of adenine should lead to thermodynamically stable radical anion²⁰). Additionally, the S–C bond energy is similar to that of the C–Br bond, suggesting, thus, a low-barrier dissociation,²¹ a second requirement for efficient DEA. Taking into account the above reasoning, it appears that ASCH₃ should possess significant radiosensitizing features.

2. METHODS

2.1. Synthesis. 2.1.1. Synthesis of 8-Bromo-adenine 1.

The compound was prepared from adenine according to a published procedure described by Janeba²² in 74% yield (lit. yield 60%) ¹H NMR δH (500 MHz, DMSO- d₆): 13.63 (brs, 1H, NH), 8.11 (s, 1H, CH), 7.47 (brs, 2H, NH₂) (see Figures 1 and S1).

2.1.2. Synthesis of 6-Amino-7-(H)-purine-8(9H)-thione 2.

The compound was obtained via the modified procedure described by Janeba.²³ To the solution of 8-bromo-adenine (2.0 g, 9 mmol) in n-butanol (50 mL) was added thiourea (5.67 g, 70 mmol), and the mixture was refluxed for 28 h. After this time, the obtained precipitate was drained under reduced pressure and recrystallized from water (yield 52%). ¹H NMR δH (500 MHz, DMSO- d₆): 12.97 (brs, 1H, NH), 12.49 (brs, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, CH), 7.14 (brs, 2H, NH₂) (see Figures 1 and S2).

2.1.3. Synthesis of 8-Thiomethyladenine 3.

The compound was obtained via the modified procedure described by Janeba.²³ To a spherical round bottomed flask were added 6-amino-7H-purine-8(9H)-thione (250 mg, 1.495 mmol), methyl iodide (236 mg, 1.660 mmol), and 1.5 M aqueous solution of KOH (8.5 mL) and the mixture was stirred in a closed flask for 1 h at 15 °C. Then, the mixture was neutralized with acetic acid, and the obtained precipitate was drained under reduced pressure and purified using a Pure Chromatography System (Flash) with 60% yield. ¹H NMR δH (500 MHz, DMSO- d₆): 12.99 (brs, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, CH), 7.00

(brs, 2H, NH₂), 2.67 (s, 3H, CH₃) (see Figures 1 and S3). HRMS, theoretical mass [M-1][–] = 180.0349 Da; experimental mass [M-1][–] = 180.0366 Da (see Figure S4).

2.2. Crossed Electron-Molecule Beam Experiment.

DEA to ASCH₃ in the gas phase was studied in a CEMB experiment, which was described in detail in ref 24. The effusive beam of ASCH₃ molecules in the gas phase was produced by sublimation of the solid sample in a resistively heated copper oven inside of the vacuum chamber. The experiments were performed at chamber pressure and sample temperature of about 5 × 10^{–8} mbar and 367 K, respectively. The sample vapor entered the interaction region with the electron beam through a capillary of 1 mm diameter. The monochromatized electron beam was produced by a hemispherical electron monochromator. In the present experiment, the energy resolution of the electron beam was about 130 meV at full width half-maximum. The electron current was about 35 nA and was monitored with a picoammeter. The anions formed upon electron attachment were extracted from the interaction region by a weak electrostatic field into a quadrupole mass filter where they were mass-selected and subsequently detected by a channeltron-type secondary electron multiplier in single pulse counting mode. Before the measurements of negative ions, the temperature dependence of the electron ionization mass spectrum at the electron energy of 70 eV was measured. This measurement aimed to ensure that no significant thermal decomposition occurred until the sublimation temperature was chosen for the negative ion measurements. The electron energy scale and energy resolution were determined by measuring the well-known ion yield for the formation Cl[–]/CCl₄ at 0 eV.²⁵

2.3. Quantum Chemical Calculations. DEA profiles and proton affinities were calculated using the fully optimized geometries of the reactants at the MPW1K level,²⁶ employing the 6-31++G(d,p) basis set.^{27,28} The polarization continuum model (PCM) was used to mimic the solvent.²⁹ All of the optimized geometries were found to be geometrically stable, as verified by harmonic frequency analysis (all force constants were positive for minima, while only one of them was negative for the first-order transition states). Additionally, the intrinsic reaction coordinate procedure³⁰ was used to ensure that the obtained transition state connects the proper minima. The Gibbs free energies of particular elementary reactions (ΔG_s) and activation free energies (ΔG_s[‡]) were estimated as ΔE_s (electronic energy change) between the product and substrate (or between the substrate and transition state for activation energy) corrected for zero-point vibration terms, thermal contributions to energy, the pV term, and the entropy term. These terms were calculated in the rigid rotor-harmonic oscillator approximation for T = 298 K and p = 1 atm.³¹

For the interpretation of CEMB experiments, unconstrained geometry optimizations of the species involved in the fragmentation reactions were carried out at the M06-2X³² level using the aug-cc-pVTZ³³ basis set. The electronic energies (E) corrected for the zero point energy (ZPE) were

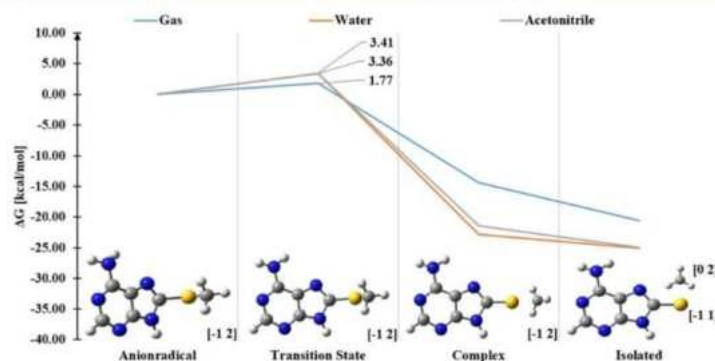


Figure 2. DEA (in the Gibbs free energy scale) profiles of the ASCH_3 anion radical under three different conditions. Marked as blue: gas phase, orange: water (PCM), and gray: acetonitrile (PCM). The charge and multiplicity of particular species are shown in the square brackets.

employed in calculations of thermodynamic thresholds. The energy difference, $\Delta E(\text{ZPE})$, serves as the determinant for the thermodynamic threshold in cases where no transition state exists during the substrate-to-product transformation such as homolytic bond dissociation. However, if a transition state is present, its electronic energy surpasses that of the substrate. Therefore, even for an exothermic DEA process (negative $\Delta E(\text{ZPE})$), the excess electron energy that induces the DEA reaction may exceed zero eV. Similarly, for endothermic processes, the presence of a transition state increases the threshold beyond $\Delta E(\text{ZPE})$. Consequently, to induce an electron-attachment-initiated reaction with a bottleneck step involving a transition state, the excess electron must possess kinetic energy equal to the difference between the energy of the substrate and that of the transition state. Identifying and characterizing transition states becomes crucial for accurately estimating experimental thresholds.²⁴

All the calculations were performed with the Gaussian 16 suite of programs.³⁴

2.4. Stationary Radiolysis of 8-Thiomethyladenine.

2.4.1. Water Solution. Radiolysis of a 10^{-4} M solution of 8-thiomethyladenine was performed in Eppendorf probes, in the presence of 0.03 M *tert*-BuOH as an $\cdot\text{OH}$ free radical scavenger and phosphorus buffer (10 mM, pH 7) using CellRad X-ray Cabinet (Faxitron X-ray Corporation). The voltage and current of the X-ray tube were equal to 130 kV and 0.1 mA, respectively. A 0.5 mm Al filter was used. The samples were deoxygenated by purging with argon for 3 min and exposed to 300 Gy (5.83 Gy min^{-1}) of radiation dose. The radiation-chemical yield of solvated electrons in water, $G(e_{\text{solv}})$ is equal to $2.8 \times 10^{-7} \text{ mol/J}$.³⁵

2.4.2. Acetonitrile. Radiolysis of a 10^{-4} M solution of 8-thiomethyladenine in dry ACN was performed in small flasks, using a CellRad X-ray Cabinet (Faxitron X-ray Corporation). The tube voltage, current, and filter were set as for radiolysis in water. The samples were deoxygenated by purging with argon for 3 min and exposed to 300 Gy (5.83 Gy min^{-1}) of radiation dose. The radiation-chemical yield of solvated electrons in ACN, $G(e_{\text{solv}})$ is equal to $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol/J}$.³⁶ Then, each of the samples was evaporated under a vacuum, and the obtained residue was dissolved in the same amount of water.

2.5. Potentiometric Titration of 8-Thiomethyladenine Solution. Potentiometric titrations were performed at 298.15

K, using a new Cerko Lab System EQSOL software based on an algorithm presented by Kostrowicki and Liwo,^{37,38} fitted with a 5 mL Hamilton's syringe, a pH combined electrode (Hydromet ERH-13-6) calibrated according to IUPAC recommendations,³⁹ and a self-made measuring cell (30 mL) equipped with a magnetic stirrer. The temperature was controlled by using a Lauda E100 circulation thermostat. The composition of the titrant solution is as follows: 1 mM 8-thiomethyladenine and 5 mM HClO_4 . The solutions were potentiometrically titrated with a standardized 24 mM NaOH solution in the pH range from 3 to 11. The experiment consisted of injecting 0.02 mL of the titrant at 2 min intervals into the reaction cell, which initially contained 5.0 mL of the titrant solution. The dissociation constants were refined by least-squares calculations using the Hyperquad2008 (ver. 5.2.19) computer program.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. CEMB Experiments for ASCH_3 . The DEA profile for ASCH_3 calculated at the MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM level is depicted in Figure 2. The kinetic barrier of 1.8 kcal/mol and the thermodynamic stimulus of -20.6 kcal/mol suggest an efficient DEA process in the gas phase. These computational findings were confirmed using CEMB experiments. Briefly, a molecular beam of ASCH_3 was crossed with a beam of electrons of well-defined energy, and the molecular fragment anions were analyzed with a mass spectrometer to study the fragmentation yield versus the incident electron energy in the electron energy range from ~ 0 to 14 eV.

The most intense CEMB signal originates from the AS^- anion (Figure 3b). Two other fragment anions ($(\text{ASCH}_2)^-$ and $(\text{NH}_2)^-$), however of much lower intensity, were recorded in the CEMB experiment (see the anion efficiency curves depicted in Figure 3a,c).

The experimental thresholds for each anion fragment are listed in Table 1 and are compared with the computationally obtained values. The parent anion [mass-to-charge ratio (m/z) equal to 181] was not observable within the detection limit of the apparatus.

The adiabatic electron affinity of ASCH_3 was computed to be approximately 1.22 eV (see Figure 4) at the M06-2X/aug-cc-pVTZ level which is close to the energy of transition state for the AS^- release from the ASCH_3 radical anion (see Figure

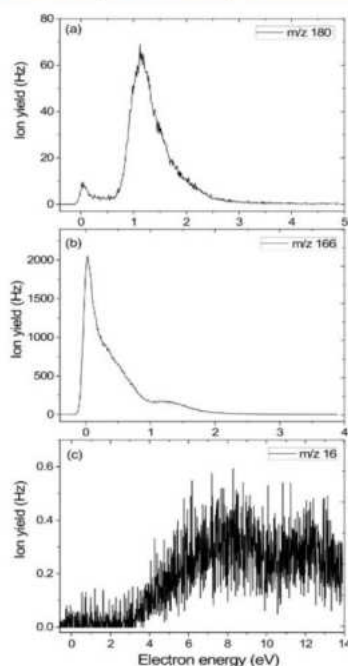


Figure 3. Anion efficiency curves of the fragment anions formed upon electron attachment to ASCH_3 , (a) ASCH_2^- (m/z 180), (b) AS^- (m/z 166), and (c) NH_2^- (m/z 16).

Table 1. Summary of the Observed Fragment Anions in Terms of Masses, Structural Assignments, and Their Corresponding Maxima on the Anion Efficiency Curves, as well as the Experimental and Calculated Thresholds (ΔE_0)

mass (m/z)	anion	peak positions (eV)	T (K)	threshold (eV)	
				exp.	theory
180	$(\text{ASCH}_2)^-$	1.1 1.4 1.6	367	0.7	0.81 ^a 1.71 ^b 2.71 ^c 3.64 ^d
166	$(\text{AS})^-$	≈ 0 0.3 1.2	367	≈ 0	-0.17
16	$(\text{NH}_2)^-$	7.7 12.0	365	4.0	4.11

^aReaction 1a. ^bReaction 1b. ^cReaction 1c. ^dReaction 1d (see Figure S).

6). The lacking energy of 0.22 eV (the difference between 1.22 eV and the energy of TS for the AS^- release (see Figure 6, TS_166 structure)) can originate from vibrational excitation of ASCH_3 molecules due to the heating process in the molecular beam oven.⁴⁰ This situation indicates that the energy released due to the electron attachment process makes overcoming the kinetic barrier probable and, in consequence, may lead to a dramatic shortening of the lifetime of the ASCH_3 anion which justifies the lack of the ASCH_3^{*-} signal in the CEMB experiment.

Electron attachment to ASCH_3 leads to the formation of three fragment anions, which have been presented in Figure 5

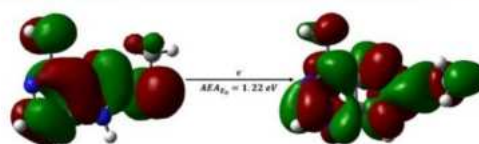
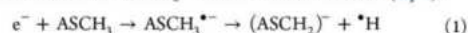


Figure 4. Adiabatic electron affinity (AEA_{f0}) in terms of the zero-point energy-corrected difference between the electronic energies of the neutral and anion radical calculated at the M06-2X/aug-cc-pVTZ level. The following color codes were used to indicate particular atoms: white for H, gray for C, blue for N, and yellow for S. A LUMO/SOMO orbital was superimposed on the structures of the ASCH_3 neutral form (left) and the anion radical (right).

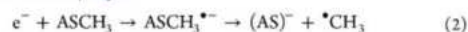
illustrating the structures of possible anion radicals/neutrals following the dissociation process.

The heaviest anion at m/z 180 (Figure 3a) was recorded upon the cleavage of the C–H or N–H bond, leading to the formation of the ASCH_2^- anion and the H radical (eq 1):



The reaction energy for the release of ASCH_2^- spans a range from 0.81 to 3.64 eV depending on the site of C–H/N–H rupture (Table 1). The activation energy of the most favorable reaction (thermodynamic stimulus of 0.81 eV) amounts to 2.17 eV (Figure 6, TS_180a structure). The difference between this activation energy and AEA is equal to 0.95 eV and is near the threshold energy of the main peak (0.7 eV) in the anion efficiency curve for ASCH_2^- formation. The minor first peak in the ion yield at about zero eV can be ascribed to an impurity.

The second heaviest fragment anion, yet forming with the highest yield (that significantly exceeds the second most abundant anion in intensity, see Figure 3b), is observed at m/z 166 following DEA to ASCH_3 . This anion is generated through the cleavage of the S–CH₃ bond, as illustrated in Figure 3b and described by eq 2:



The formation of this anion is favorable (thermodynamic threshold of -0.17 eV, see Table 1) and has a low activation barrier of 0.22 eV (see Figure 6 TS_166). As pointed out above, the first peak in the anion efficiency curve of $(\text{AS})^-$ can be ascribed to vibrationally excited molecules before the electron attachment event. In this case, sufficient internal energy is present in the neutral molecule to overcome the barrier after the attachment of an $\sim$ zero eV electron. The $(\text{AS})^-$ ion yield shown in Figure 3b also indicates an abundant shoulder in the tail of the zero eV peak. Multi-Gaussian peak fit analysis of the ion yield reveals an underlying peak near 0.3 eV. In contrast to the zero eV peak, this ion signal can be associated with electron attachment to neutral molecules in the vibrational ground state. In this case, the initial kinetic energy of the electron is deposited as the excitation energy in the ASCH_3^{*-} transient negative ion and leads to the decay over the barrier.

The lightest anion formed upon DEA to ASCH_3 was registered at m/z equal to 16 (see Figure 5, reaction 3). This species results from the C–N bond cleavage between the C6 atom of the purine ring and the $-\text{NH}_2$ group and may be written as follows (eq 3):

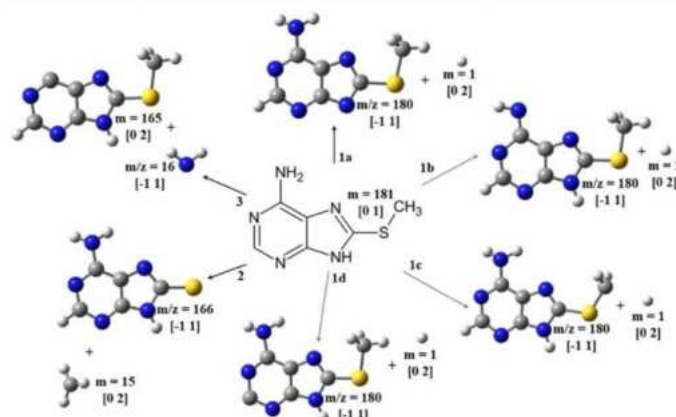


Figure 5. Dissociation pathways in the ASCH_3 molecule upon low-energy electron attachment. The experimentally detected fragments are denoted with a mass-to-charge ratio of 180 (1a-d), 166 (2), and 16 (3). The charge and multiplicity are shown in parentheses for each structure. The following color codes were used to indicate particular atoms: white for H, gray for C, blue for N, and yellow for S.

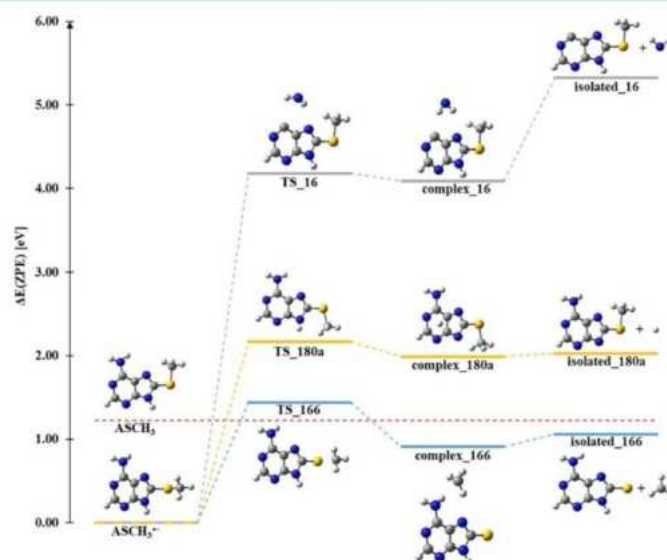
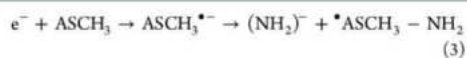


Figure 6. Single bond cleavage pathways, leading from ASCH_3 anion radical to the most abundant anionic products at m/z 16, m/z 166, and m/z 180(a). TS_x , complex_x , and isolated_x , where x refers to the value of m/z , stand for the transition state, product complex, and isolated monomers, respectively.



This reaction involves 2.96 eV of energy (activation barrier, see TS_{16} in Figure 6) and the threshold is equal to 4.11 eV (from the neutral form of the ASCH_3). This finding agrees well with the experimentally determined threshold, which was found at 4.0 eV (see Table 1 and Figure 3c). Above this threshold, the $(\text{NH}_2)^-$ anion is formed over a wide energy range up to the maximum energy measured (14 eV) but its

overall intensity is very low compared with the other two fragment anions detected.

The results of the experimental studies in the gas phase and quantum chemical calculations stand in good agreement. A significant prevalence of an anion with a mass-to-charge ratio of 166 observed in the CEMB experiments may suggest that it also occurs as the primary species during the DEA process in the aqueous phase.

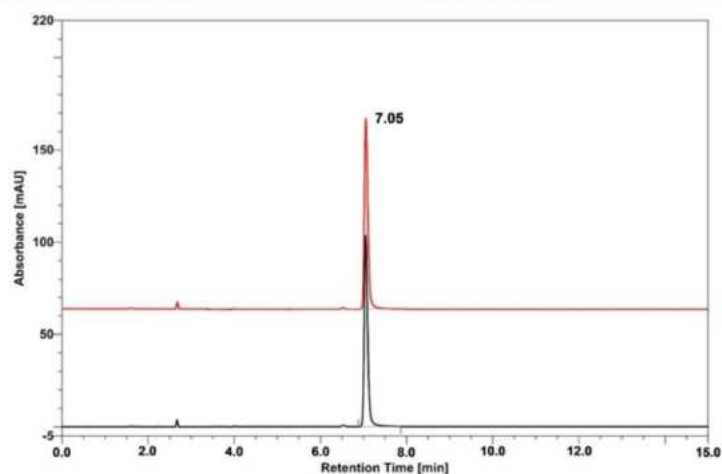


Figure 7. HPLC analysis of ASCH_3 in water before (black line) and after irradiation with a dose equal to 300 Gy (red line).

Table 2. pK_a Values (Standard Deviation Values in Parentheses) of the Adenine Derivative (ASCH_3)

no.	equilibrium model	equilibrium expression	pK_a value
1	$\text{H}_2(\text{ASCH}_3)^{2+} = \text{H}^+ + \text{H}(\text{ASCH}_3)^+$	$K_{a1} = [\text{H}^+][\text{H}(\text{ASCH}_3)^+]/[\text{H}_2(\text{ASCH}_3)^{2+}]$	4.53 (0.10)
2	$\text{H}(\text{ASCH}_3)^+ = \text{H}^+ + (\text{ASCH}_3)$	$K_{a2} = [\text{H}^+][(\text{ASCH}_3)]/[\text{H}(\text{ASCH}_3)^+]$	8.83 (0.09)
3	$\text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^-$	$K_{\text{H}_2\text{O}} = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$	14.00 (const.)

3.2. Radiolysis of ASCH_3 in Water or Acetonitrile. An effective radiosensitizer for cancer hypoxic cells has to act in an aqueous solution, i.e., in a physiological environment.⁴¹ Therefore, to demonstrate that solvated electrons trigger electron attachment-induced chemistry, radiolysis of an aqueous ASCH_3 solution was conducted under reducing conditions. The experiment was performed in the presence of tertbutyl alcohol (*tert*-BuOH) as the $\cdot\text{OH}$ radicals scavenger and phosphorus buffer (10 mM, pH 7) to keep the pH of the solution at the physiological level. Before irradiation with a dose of 300 Gy (5.83 Gy min^{-1}), the samples were deoxygenated by purging with argon to mimic the hypoxic conditions characteristic of solid tumors. As depicted in Figure 7, the result of the above-described radiolytic experiment proved to be quite surprising (taking into account the outcome of CEMB experiments combined with the QM calculations). Namely, the stationary radiolysis of the aqueous ASCH_3 solution does not lead to its degradation, although the DEA profile obtained at the MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM method indicates that the DEA process should proceed as the kinetic barrier of the dissociation process amounts to only 3.4 kcal/mol (Figure 2).

A hypothesis that might explain the findings described above could be a protonation of the primary radical anion formed due to electron attachment to the ASCH_3 molecule. Indeed, such a protonation enlarges the barrier for electron transfer from the SOMO π orbital of the primary anion to the respective σ^* orbital, i.e., for the process that is responsible for electron attachment-induced dissociation. Protonation of radical anions was invoked in the past to explain the hindering of the DEA process in native nucleotides⁴² or halo-thiouridines.⁴³

To determine the protonation state of ASCH_3 under the experimental conditions, potentiometric measurements were conducted. The equilibrium model presented in Table 2 has given the best fitting of calculated data to the potentiometric titration ones. The results indicate that ASCH_3 exists as the monoprotonated species at physiological pH (see Figure 8), with the proton most likely linked at the N1 position, as indicated by the relative theoretical stabilities gathered in Table 3.

The discrepancy between the low theoretical activation barrier and lack of radiolytic degradation, as well as the protonation of ASCH_3 at physiological pH, suggests that the

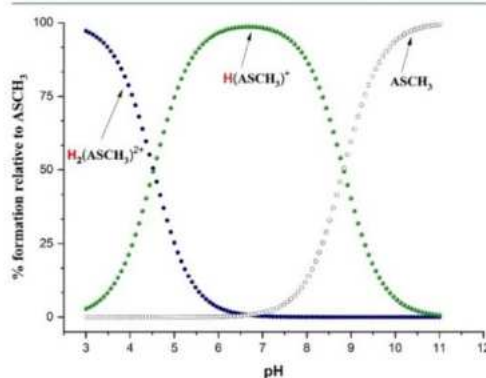


Figure 8. Species distributions of ASCH_3 as a function of pH.

Table 3. Relative Gibbs Free Energy (ΔG) for ASCH_3 Protonated at Chosen Sites^a

position	ΔG [kcal/mol]
N1	0.0
N3	1.9
N7	4.9

^aValues were calculated for 298 K and at the MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM level.

formation of the neutral radical $\text{ASCH}_3(+\text{H})$, i.e., electron attachment to protonated ASCH_3 , may inhibit the DEA process.

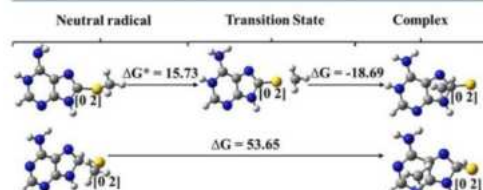
To confirm this hypothesis, radiolytic studies were also performed in an aprotic solvent, acetonitrile (ACN), where protonation of the neutral form of ASCH_3 or its anion cannot take place. A solution of ASCH_3 was prepared in dry ACN, deoxygenated, and irradiated with the same dose as for the aqueous solution. The results of the experimental studies, presented in Figure 9, demonstrate that under these conditions dissociation of the compound induced by electron attachment does take place [see new peaks (retention times equal to 5.06 and 13.01 min) in the chromatogram shown in Figure 9].

The MS/MS spectra in negative ionization mode show that the observed at 5.06 min peak (TIC; MS spectrum) corresponds to the m/z 196.03 $\rightarrow$ 181.03 transition may be explained by $\text{CH}_3[\text{ASCH}_3]\text{H} \rightarrow \text{ASCH}_3\text{H}$ structural transformation, while the second peak at 13.01 min (TIC–MS spectrum) corresponding to the m/z 208.03 $\rightarrow$ 180.06 $\rightarrow$ 165.04 transition may indicate the $\text{H}[\text{AS}]\text{CH}_3\text{C}(\text{H})\text{N}^- \rightarrow \text{ASCH}_3 \rightarrow \text{AS}^-$ transformation (see Figures S5–S8 in the Experimental section (e) in the Supporting Information).

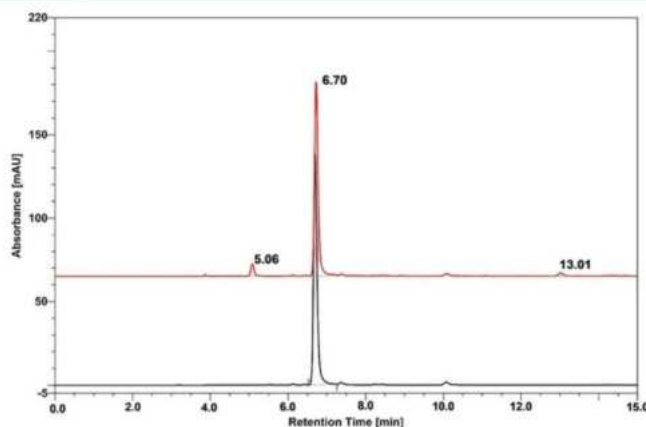
The first product with m/z of 196.03 is related to the attachment of two individuals derived from the stationary radiolysis of acetonitrile, a methyl radical $\cdot\text{CH}_3$, and hydrogen atom H to the structure of 8-thiomethyladenine. Detachment of the methyl group from the structure gives a mass equal to 181.03 Da. The second product with m/z equal to 208.03 is probably a product of DEA, where the thiomethyl derivative undergoes electron-induced degradation involving the break-

age of the S–CH₃ bond and addition of $\text{CH}_3\text{C}(\text{H})\text{N}$ and $\text{H}^\bullet$ radicals to the intermediate structure (the latter radicals forms in the radiolysis of ACN).³⁶ Elimination of the CNH_2 group leads to the anion of m/z equal to 180 and the subsequent removal of the CH_3 group gives the structure characterized by m/z of 165 anion, which corresponds to the 8-thioadenine anion, as in the experiment performed in the gas phase.

When considering the DEA process for the radical anion of ASCH_3 in an aqueous solution, the activation barrier at the MPW1K/6-31++G(d,p) level is only 3.4 kcal/mol ($\Delta G^\ddagger$, see Figure 2). In the case of the radical anion protonated at N1, the barrier increases to 15.7 kcal/mol (see the upper panel of Figure 10). In this scenario, when the radical anion is

**Figure 10.** Gibbs free energy profiles for the dissociation of the ASCH_3 radical anion protonated at N1 (top panel) and N2 (bottom panel), calculated for 298 K at the MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM level.

protonated at the N1 position, one might still expect products of the radiolysis of the aqueous ASCH_3 solution since with the kinetic barrier of only 15.7 kcal/mol, and according to transition state theory, the half lifetime of the $\text{ASCH}_3(+\text{H})$ radical protonated at N1 amounts to c. 0.04 s at 298 K. However, as indicated by Figure 7 this is not the case (no radiolysis products are observed). Hence, one can explain the lack of radiolytic reactivity of ASCH_3 either by referring to competitive processes like (i) hydrogen atom transfer between $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ and the *tert*-BuOH radical (no kinetic barrier, $\Delta G_r = -82.8$ kcal/mol at the MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM level); the latter species forms in a significant amount during

**Figure 9.** HPLC analysis of ASCH_3 in ACN before (black line) and after irradiation with a dose equal to 300 Gy (red line).

scavenging the $\text{OH}^\bullet$ radicals or (ii) the $\text{N1} \rightarrow \text{C8}$ tautomerization of the $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ radical. As far as the latter process is concerned, one should note that $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ protonated at C8 is by as much as 13.6 kcal/mol more stable than that protonated at N1 (Table 4). In water proton transfer

Table 4. Relative Gibbs Free Energy of Tautomerization (ΔG_i) of the $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ Radical for 298 K, Calculated at the MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM Level

site of protonation	ΔG_i [kcal/mol]
N1	13.6
N3	11.8
N7	8.7
C2	6.9
C6	19.1
C8	0.0
NH_2 group	28.6

(PT) between N1 and C8 sites can be realized by a sequence of proton hops between hydrogen-bonded water molecules. A bottleneck PT is the first reaction in the sequence, i.e., a transfer of proton between $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ and the neighbor water molecule (ca. 18.3 kcal/mol at the MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM level), leading to the formation of the radical anion and H_3O^+ cation. The AIMD simulations indicate that the formation of the $\text{H}_3\text{O}^+/\text{OH}^-$ anion pair from two water molecules requires a 23.8 kcal/mol⁴⁴ barrier to be overcome in a water solution. Assuming, thus, 18.3 kcal/mol (see above) as a limiting value for the kinetic barrier of PT in the ASCH_3 system, one can calculate that the equilibrium concentration of $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ protonated at C8 will be attained after ca. 0.36 s [assuming pseudo-first-order kinetics for PT (the concentration of water in the water solution is constant and amounts to ca. 55.5 kcal/mol), the activation barrier of 18.3 kcal/mol, and 99% degree of conversion]. As depicted in Figure 10, the barrier of S-CH₃ bond dissociation increases from 15.3 kcal/mol in $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ protonated at N1 to 53.7 kcal/mol in $\text{ASCH}_3(\text{H})^\bullet$ protonated at C8. The latter value shows that the S-CH₃ dissociation is completely hindered at 298 K for the $\text{ASCH}_3(+\text{H})^\bullet$ radical protonated at C8. It seems, therefore, that both processes (i) and (ii) may explain the lack of radiolytic reactivity of ASCH_3 in an aqueous solution.

4. CONCLUSIONS

The findings presented in this paper lead to the conclusion that effective radiosensitization using derivatives of nucleic bases is not solely determined by the molecular structure of the potential sensitizer that ensures the low stability of its radical anion and facilitates dissociation, as previously assumed. The protonation of the radical anion, especially involving proton-acceptor centers responsible for localizing the excess electron, leads to a significant increase in the barriers of the DEA process. In extreme cases, this completely inhibits the dissociation of the compound, depriving it of radiosensitizing properties. The same effect (protonation of radical anions) may be responsible for inhibiting the formation of single-strand breaks in aqueous solutions of native DNA, a damage type induced in DNA by electrons under anhydrous conditions. In the future design of new radiosensitizers, it seems necessary to consider not only the molecule's affinity to an electron and the ease of the DEA process but also their potential for protonation in an aqueous solution.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcb.4c01033>.

XYZ geometries of all stationary points, details of LC/MS measurements, and ¹H NMR and MS spectra (PDF)
Raw data originating from the CEMB experiments (XLSX)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Stephan Denifl – Institut für Ionenphysik und Angewandte Physik and Center for Biomolecular Sciences Innsbruck, Universität Innsbruck, A-6020 Innsbruck, Austria;

orcid.org/0000-0001-6072-2070;

Email: stephan.denifl@uibk.ac.at

Janusz Rak – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland; orcid.org/0000-0003-3036-0536; Email: janusz.rak@ug.edu.pl

Authors

Magdalena Datta – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland

Adrian Szczyrba – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland

Magdalena Zdrowowicz – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland

Dariusz Wyrzykowski – Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk 80-308, Poland; orcid.org/0000-0002-3823-3286

Olga Ciupak – Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, 80-233 Gdańsk, Poland

Sebastian Demkowicz – Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, 80-233 Gdańsk, Poland; orcid.org/0000-0002-4252-4297

Farhad Izadi – Institut für Ionenphysik und Angewandte Physik and Center for Biomolecular Sciences Innsbruck, Universität Innsbruck, A-6020 Innsbruck, Austria

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcb.4c01033>

Author Contributions

[†]M.D. and A.S. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Polish National Science Center (NCN) under the CEUS-UNISONO Grant No. UMO-2020/02/Y/ST4/00110 (J.R.). S.D. acknowledges support from the Austrian Science Fund (FWF) [Grant-DOI 10.55776/15390]. Calculations have been carried out using resources provided by the Wrocław Centre for Networking and Supercomputing (<http://wcss.pl>) (Grant 209).

■ REFERENCES

- (1) Wardman, P. Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **2007**, *19* (6), 397.
- (2) Muz, B.; de la Puente, P.; Azab, F.; Azab, A. K. The Role of Hypoxia in Cancer Progression, Angiogenesis, Metastasis, and Resistance to Therapy. *Hypoxia* **2015**, No. 3, 83.

- (3) Wang, H.; Mu, X.; He, H.; Zhang, X. D. Cancer Radiosensitizers. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39* (1), 24.
- (4) Adams, G. E.; Dewey, D. L. Hydrated Electrons and Radiobiological Sensitisation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *12* (6), 473.
- (5) Izadi, F.; Szczyrba, A.; Datta, M.; Ciupak, O.; Demkowicz, S.; Rak, J.; Denifl, S. Electron-Induced Decomposition of 5-Bromo-4-Thiouracil and 5-Bromo-4-Thio-2'-Deoxyuridine: The Effect of the Deoxyribose Moiety on Dissociative Electron Attachment. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (10), 8706.
- (6) Zdrowowicz, M.; Chomicz-Mańka, L.; Butowska, K.; Spisz, P.; Falkiewicz, K.; Czaja, A.; Rak, J. DNA Damage Radiosensitizers Geared Towards Hydrated Electrons. In *Practical Aspects of Computational Chemistry V*; Springer: Cham, 2022.
- (7) Rak, J.; Chomicz, L.; Wicz, J.; Westphal, K.; Zdrowowicz, M.; Wityk, P.; Zyndul, M.; Makurat, S.; Golon, L. Mechanisms of Damage to DNA Labeled with Electrophilic Nucleobases Induced by Ionizing or UV Radiation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (26), 8227.
- (8) Chomicz, L.; Leszczynski, J.; Rak, J. Electron-Induced Degradation of 8-Bromo-2'-Deoxyadenosine 3',5'-Diphosphate, a DNA Radiosensitizing Nucleotide. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (29), 8681.
- (9) Schürmann, R.; Bald, I. Real-Time Monitoring of Plasmon Induced Dissociative Electron Transfer to the Potential DNA Radiosensitizer 8-Bromoadenine. *Nanoscale* **2017**, *9* (5), 1951.
- (10) Schürmann, R.; Tanzer, K.; Dabkowska, I.; Denifl, S.; Bald, I. Stability of the Parent Anion of the Potential Radiosensitizer 8-Bromoadenine Formed by Low-Energy (<3 eV) Electron Attachment. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (23), 5730.
- (11) Schürmann, R.; Tsering, T.; Tanzer, K.; Denifl, S.; Kumar, S. V. K.; Bald, I. Resonant Formation of Strand Breaks in Sensitized Oligonucleotides Induced by Low-Energy Electrons (0.5–9 eV). *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56* (36), 10952.
- (12) Vogel, S.; Ebel, K.; Heck, C.; Schürmann, R. M.; Milosavljević, A. R.; Giuliani, A.; Bald, I. Vacuum-UV Induced DNA Strand Breaks-Influence of the Radiosensitizers 5-Bromouracil and 8-Bromoadenine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21* (4), 1972.
- (13) Rackwitz, J.; Kopyra, J.; Dabkowska, I.; Ebel, K.; Ranković, M. L.; Milosavljević, A. R.; Bald, I. Sensitizing DNA Towards Low-Energy Electrons with 2-Fluoroadenine. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55* (35), 10248.
- (14) Polska, K.; Rak, J.; Bass, A. D.; Cloutier, P.; Sanche, L. Electron Stimulated Desorption of Anions from Native and Brominated Single Stranded Oligonucleotide Trimers. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136* (7), 1.
- (15) Kim, J.; Kim, J.-H.; Do, J. Y.; Lee, J. Y.; Yanai, R.; Lee, I.-K.; Suk, K.; Park, D. H. Key Role of Microglial Matrix Metalloproteinases in Choroidal Neovascularization. *Front. Cell Neurosci.* **2021**, *15*, No. 638098.
- (16) Westphal, K.; Wicz, J.; Miloch, J.; Kciuk, G.; Bobrowski, K.; Rak, J. Irreversible Electron Attachment – a Key to DNA Damage by Solvated Electrons in Aqueous Solution. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (41), 10362.
- (17) Ioele, M.; Bazzanini, R.; Chatgililoglu, C.; Mulazzani, Q. G. Chemical Radiation Studies of 8-Bromoguanosine in Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (9), 1900 DOI: 10.1021/ja991785f.
- (18) Cresswell, R. M.; Strauss, T.; Brown, G. B. Some 2-Substituted Aminopurines and Purine Analogs. *J. Med. Chem.* **1963**, *6* (6), 817.
- (19) Yadav, V. K. *Steric and Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*; Springer: Singapore, 2021.
- (20) 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* (17), 2853.
- (21) Luo, Y. R. *Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies*; CRC Press, 2007.
- (22) Janeba, Z.; Holý, A.; Masojdková, M. Synthesis of Acyclic Nucleoside and Nucleotide Analogs Derived from 6-Amino-7H-Purin-8(9H)-One. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2000**, *65* (7), 1126.
- (23) Janeba, Z.; Holý, A.; Masojdková, M. Synthesis of Acyclic Nucleoside and Nucleotide Analogs Derived from 6-Amino-7H-Purine-8(9H)-Thione and 8-(Methylsulfonyl)Adenine. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2000**, *65* (11), 1698.
- (24) Saqib, M.; Arthur-Baidoo, E.; Izadi, F.; Szczyrba, A.; Datta, M.; Demkowicz, S.; Rak, J.; Denifl, S. Dissociative Electron Attachment to 5-Iodo-4-Thio-2'-Deoxyuridine: A Potential Radiosensitizer of Hypoxic Cells. *J. Phys. Chem. Lett.* **2023**, *14* (40), 8948.
- (25) Klar, D.; Ruf, M. W.; Hotop, H. Dissociative Electron Attachment to CCl₄ Molecules at Low Electron Energies with MeV Resolution. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *205* (1–3), 93.
- (26) Lynch, B. J.; Fast, P. L.; Harris, M.; Truhlar, D. G. Adiabatic Connection for Kinetics. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (21), 4811.
- (27) Hehre, W. J.; Ditchfield, K.; Pople, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56* (5), 2257.
- (28) 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* (2), 724.
- (29) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (8), 2999.
- (30) Fukui, K. The Path of Chemical Reactions - The IRC Approach. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14* (12), 363.
- (31) Wong, M. W.; Wiberg, K. B.; Frisch, M. Hartree-Fock Second Derivatives and Electric Field Properties in a Solvent Reaction Field: Theory and Application. *J. Chem. Phys.* **1991**, *95* (12), 8991.
- (32) 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* (1–3), 215.
- (33) Woon, D. E.; Dunning, T. H. Gaussian Basis Sets for Use in Correlated Molecular Calculations. III. The Atoms Aluminum through Argon. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (2), 1358.
- (34) 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. *Gaussian 16, Revision C.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2016.
- (35) von Sonntag, C. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*; Springer: Berlin, 2006.
- (36) Grills, D. C.; Lyman, S. V. Radiolytic Formation of the Carbon Dioxide Radical Anion in Acetonitrile Revealed by Transient IR Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (15), 10011.
- (37) Kostrowicki, J.; Liwo, A. A General Method for the Determination of the Stoichiometry of Unknown Species in Multicomponent Systems from Physicochemical Measurements. *Comput. Chem.* **1987**, *11* (3), 195.
- (38) Kostrowicki, J.; Liwo, A. Determination of Equilibrium Parameters by Minimization of an Extended Sum of Squares. *Talanta* **1990**, *37* (6), 645.

- (39) Brandariz, I.; Barriada, J. L.; Vilarinho, T.; Sastre De Vicente, M. E. Comparison of Several Calibration Procedures for Glass Electrodes in Proton Concentration. *Monatsh. Chem.* **2004**, *135* (12), 1475.
- (40) Meißner, R.; Feketeová, L.; Illenberger, E.; Denifl, S. Reactions in the Radiosensitizer Misonidazole Induced by Low-Energy (0–10 eV) Electrons. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (14), 3496.
- (41) Fowler, J. F.; Adams, G. E.; Denekamp, J. Radiosensitizers of Hypoxic Cells in Solid Tumours. *Cancer Treat. Rev.* **1976**, *3* (4), 227.
- (42) Chomicz-Mañka, L.; Czaja, A.; Falkiewicz, K.; Zdrowowicz, M.; Biernacki, K.; Demkowicz, S.; Izadi, F.; Arthur-Baidoo, E.; Denifl, S.; Zhu, Z.; Tufekci, B. A.; Harris, R.; Bowen, K. H.; Rak, J. Intramolecular Proton Transfer in the Radical Anion of Cytidine Monophosphate Sheds Light on the Sensitivities of Dry vs Wet DNA to Electron Attachment-Induced Damage. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (16), 9059.
- (43) Spisz, P.; Zdrowowicz, M.; Makurat, S.; Kozak, W.; Skotnicki, K.; Bobrowski, K.; Rak, J. Why Does the Type of Halogen Atom Matter for the Radiosensitizing Properties of 5-Halogen Substituted 4-Thio-2'-Deoxyuridines? *Molecules* **2019**, *24* (15), 2819.
- (44) Åqvist, J.; Warshel, A. Simulation of Enzyme Reactions Using Valence Bond Force Fields and Other Hybrid Quantum/Classical Approaches. *Chem. Rev.* **1993**, *93* (7), 2523.



CAS BIOFINDER DISCOVERY PLATFORM™

**PRECISION DATA
FOR FASTER
DRUG
DISCOVERY**

CAS BioFinder helps you identify
targets, biomarkers, and pathways

Unlock insights

CAS
A Division of the
American Chemical Society

Supporting Information

Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution

Magdalena Datta,^{1,#} Adrian Szczyrba,^{1,#} Magdalena Zdrowowicz,¹ Dariusz Wyrzykowski,¹

Olga Ciupak,² Sebastian Demkowicz,² Farhad Izadi,³ Stephan Denifl,^{3*} Janusz Rak^{1*}

¹*Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, Gdańsk 80-308, Poland*

²*Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland*

³*Institut für Ionenphysik und Angewandte Physik and Center for Biomolecular Sciences Innsbruck, Universität Innsbruck, Technikerstrasse 25, A-6020 Innsbruck, Austria*

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Electronic mails: janusz.rak@ug.edu.pl (J. Rak), stephan.denifl@uibk.ac.at (S. Denifl)

These authors contributed equally.

XYZ of stationary points

a) DEA profiles

For the names of XYZ stationary geometries see Figure 2 in the main text. The solvent is indicated in brackets.

Anionradical (ACN)

Total Electronic Energy: -904.780553154

C	-2.032848	0.880117	0.051513
C	-0.745297	0.385708	-0.174690
C	-0.626912	-1.016664	-0.124235
N	-1.608172	-1.876593	0.116627
C	-2.788588	-1.268768	0.318729
N	-3.041239	0.026445	0.297901
N	0.671677	-1.266914	-0.382529
C	1.313097	-0.038777	-0.704728
N	0.428922	0.983268	-0.469856
S	3.024533	0.117254	-0.419698
C	3.234404	0.276367	1.393626
N	-2.296248	2.236985	0.082954
H	4.295145	0.421610	1.584684
H	2.900231	-0.623407	1.902142
H	2.682733	1.136261	1.761560
H	1.062190	-2.173610	-0.550688
H	-3.630310	-1.919488	0.513808
H	-3.255341	2.464673	-0.112390
H	-1.654895	2.787658	-0.460917

TS (ACN)

Total Electronic Energy: -904.772411582

C	-2.104938	0.887866	0.072123
C	-0.816580	0.388296	-0.115838
C	-0.700034	-1.005272	-0.077153
N	-1.687967	-1.869731	0.121935
C	-2.864088	-1.265378	0.287320
N	-3.119270	0.034272	0.272151
N	0.612872	-1.246997	-0.289241
C	1.262682	-0.021211	-0.494164
N	0.381820	0.988903	-0.350405
S	2.946096	0.091195	-0.599440
C	3.856363	0.262199	1.343011
N	-2.365321	2.229707	0.107305
H	4.911731	0.351607	1.106274
H	3.622367	-0.644050	1.888885
H	3.449802	1.156255	1.800290
H	1.047853	-2.145370	-0.370034
H	-3.714255	-1.913773	0.449860
H	-3.320229	2.486959	-0.062021
H	-1.690179	2.817176	-0.346239

Complex (ACN)

Total Electronic Energy: -904.799635380

C	-1.823853	0.395743	-0.759480
C	-0.518043	-0.010356	-0.480596
C	-0.378141	-0.952819	0.529893
N	-1.360670	-1.495763	1.244020
C	-2.547955	-1.032539	0.883914
N	-2.830350	-0.137874	-0.057734
N	0.958958	-1.174513	0.603307
C	1.584391	-0.382258	-0.341501
N	0.698957	0.335057	-1.010548
S	3.289311	-0.403791	-0.535211
N	-2.108487	1.335823	-1.688180
C	0.932285	2.951838	1.959577
H	0.927500	2.291632	1.108181
H	0.027711	3.454488	2.257976
H	1.841552	3.110347	2.514498
H	1.434055	-1.800958	1.224430
H	-3.398511	-1.431167	1.419863
H	-3.060838	1.414619	-1.989021
H	-1.401408	1.564927	-2.359457

Anion (ACN)

Total Electronic Energy: -864.962766288

C	-1.747049	0.855040	-0.005524
C	-0.428116	0.397984	-0.006636
C	-0.263605	-0.980917	-0.001206
N	-1.233745	-1.891502	0.002723
C	-2.434967	-1.334207	0.003904
N	-2.740947	-0.040513	0.001290
N	1.081779	-1.161633	0.001477
C	1.687423	0.080770	-0.001118
N	0.782241	1.043030	-0.006418
S	3.397015	0.240252	0.002702
N	-2.059108	2.169298	-0.048301
H	1.573535	-2.034659	0.006336
H	-3.276507	-2.013398	0.009228
H	-3.000653	2.428886	0.175002
H	-1.342277	2.832360	0.174289

Radical (ACN)

Total Electronic Energy: -39.8364589997

H	-0.932545	-0.538242	-0.000612
H	0.932415	-0.538467	-0.000612
H	0.000130	1.076726	-0.000612
C	0.000000	-0.000003	0.000306

Anionradical (H₂O)

Total Electronic Energy: -904.782123897

C	-2.033506	0.879889	0.051615
C	-0.745958	0.385926	-0.174939
C	-0.626797	-1.016354	-0.125058
N	-1.607832	-1.876644	0.115854
C	-2.788342	-1.269520	0.318758
N	-3.041405	0.025606	0.298504
N	0.671763	-1.266153	-0.383514
C	1.312989	-0.037871	-0.704844
N	0.428367	0.984032	-0.469507
S	3.024608	0.118328	-0.419634
C	3.236141	0.274383	1.393768
N	-2.297355	2.236514	0.083976
H	4.298021	0.411747	1.583807
H	2.896206	-0.623878	1.900959
H	2.691189	1.137812	1.763409
H	1.063047	-2.172774	-0.550629
H	-3.629706	-1.920599	0.514126
H	-3.256845	2.464312	-0.109516
H	-1.657570	2.787930	-0.461003

TS (H₂O)

Total Electronic Energy: -904.773927071

C	-2.105259	0.887826	0.072225
C	-0.816926	0.388377	-0.116258
C	-0.700051	-1.005109	-0.077950
N	-1.687751	-1.869784	0.121509
C	-2.863857	-1.265748	0.287881
N	-3.119207	0.033868	0.273046
N	0.612823	-1.246818	-0.290418
C	1.262525	-0.021096	-0.495007
N	0.381605	0.989172	-0.350717
S	2.946159	0.092035	-0.598825
C	3.857418	0.261097	1.343207
N	-2.365987	2.229417	0.107739
H	4.911972	0.356894	1.105455
H	3.628862	-0.648262	1.886172
H	3.446889	1.151417	1.804263
H	1.047689	-2.145303	-0.371328
H	-3.713774	-1.914295	0.451018
H	-3.321326	2.486546	-0.059644
H	-1.692345	2.817371	-0.347434

Complex (H₂O)

Total Electronic Energy: -904.801249223

C	1.778553	-0.815167	0.615479
C	0.457145	-0.614366	0.211981
C	0.284607	0.081555	-0.977167
N	1.249607	0.569793	-1.752659
C	2.453608	0.316565	-1.262901
N	2.767082	-0.335711	-0.147488
N	-1.061601	0.133888	-1.146888
C	-1.659066	-0.514887	-0.082664
N	-0.748325	-0.978024	0.754579
S	-3.366617	-0.648230	0.037423
N	2.096422	-1.445541	1.767975
C	-0.256608	4.059957	1.299188
H	0.047598	3.364740	0.535078
H	0.004847	5.101160	1.215412
H	-0.823605	3.712941	2.146397
H	-1.559022	0.563425	-1.903236
H	3.291150	0.682340	-1.841095
H	3.044300	-1.749343	1.882388
H	1.388879	-1.996359	2.214155

Anion (H₂O)

Total Electronic Energy: -864.964447014

C	-1.747049	0.855040	-0.005524
C	-0.428116	0.397985	-0.006636
C	-0.263606	-0.980917	-0.001206
N	-1.233746	-1.891502	0.002723
C	-2.434967	-1.334206	0.003905
N	-2.740946	-0.040514	0.001290
N	1.081780	-1.161633	0.001477
C	1.687424	0.080769	-0.001117
N	0.782242	1.043031	-0.006418
S	3.397015	0.240252	0.002702
N	-2.059108	2.169298	-0.048301
H	1.573535	-2.034659	0.006336
H	-3.276507	-2.013398	0.009228
H	-3.000652	2.428886	0.175002
H	-1.342277	2.832360	0.174289

Radical (H₂O)

Total Electronic Energy: -39.8364767514

H	-0.926907	-0.548109	0.000583
H	0.938144	-0.528645	0.000583
H	-0.011238	1.076776	0.000583
C	0.000000	-0.000004	-0.000291

Anionradical (GAS)

Total Electronic Energy: -904.687452947

C	-1.930236	1.019023	-0.000116
C	-0.717120	0.318479	-0.000274
C	-0.807745	-1.061925	-0.000026
N	-1.920677	-1.788613	0.000200
C	-2.994947	-1.013467	0.000225
N	-3.067460	0.311676	0.000078
N	0.489625	-1.490622	0.000223
C	1.278873	-0.365343	-0.000161
N	0.591319	0.735429	-0.000350
S	3.011343	-0.512449	-0.000235
C	3.441756	1.244872	0.000570
N	-1.987733	2.353241	-0.000372
H	4.526855	1.286651	0.000623
H	3.053448	1.732634	0.890292
H	3.053497	1.733456	-0.888714
H	0.799228	-2.441758	-0.000358
H	-3.947177	-1.527402	0.000296
H	-2.876982	2.813095	0.001139
H	-1.149374	2.904886	0.000711

TS (GAS)

Total Electronic Energy: -904.691857327

N	0.382276	0.988532	0.322983
C	-0.811354	0.386974	0.092492
C	-0.703161	-1.009163	0.053966
N	0.611747	-1.244558	0.256649
C	1.262672	-0.014991	0.455532
N	-1.697268	-1.869005	-0.125911
C	-2.872955	-1.256622	-0.266144
N	-3.125798	0.044216	-0.248713
C	-2.100818	0.885382	-0.076893
N	-2.346835	2.238617	-0.098375
S	2.939730	0.068498	0.625443
C	3.858870	0.278465	-1.330811
H	4.907989	0.422821	-1.090446
H	3.397623	1.153136	-1.772210
H	3.669828	-0.636962	-1.879524
H	1.057994	-2.134851	0.337514
H	-3.730003	-1.902049	-0.407494
H	-3.282810	2.488779	0.158996
H	-1.624676	2.788274	0.330777

Complex (GAS)

Total Electronic Energy: -904.713224581

C	1.664040	0.848368	-0.089038
C	0.496009	0.094265	-0.070158
C	0.674682	-1.284420	0.038540
N	1.837238	-1.922812	0.121894
C	2.865966	-1.087075	0.099163
N	2.849418	0.237597	0.003657
N	-0.586164	-1.777673	0.049427
C	-1.487859	-0.718587	-0.042672
N	-0.826768	0.430569	-0.118284
S	-3.161240	-1.006476	-0.041564
N	1.643442	2.206950	-0.230741
C	-1.693463	3.743476	0.214791
H	-1.685150	4.396699	-0.643293
H	-1.827988	4.175160	1.193761
H	-1.661525	2.668550	0.088412
H	-0.870795	-2.733165	0.121532
H	3.847158	-1.538437	0.170146
H	2.471829	2.679162	0.074294
H	0.769900	2.657063	-0.025239

Anion (GAS)

Total Electronic Energy: -864.872827417

C	-1.741982	0.844334	-0.014932
C	-0.426240	0.398517	-0.024169
C	-0.262681	-0.986713	-0.013493
N	-1.236227	-1.891228	0.001798
C	-2.437722	-1.330779	0.016273
N	-2.744456	-0.037843	0.012149
N	1.080021	-1.154625	-0.008170
C	1.692913	0.099977	-0.005562
N	0.770055	1.053885	-0.017172
S	3.386730	0.226183	0.014712
N	-2.042769	2.178586	-0.061186
H	1.593295	-2.012270	0.005830
H	-3.279439	-2.010863	0.035828
H	-2.947281	2.423331	0.291899
H	-1.286360	2.787433	0.190414

Radical (GAS)

Total Electronic Energy: -39.8364761306

H	-0.542000	0.929742	0.000459
H	-0.534181	-0.934256	0.000459
H	1.076181	0.004514	0.000459
C	-0.000000	0.000000	-0.000230

For the names of XYZ stationary geometries see Figure 10 in the main text. The protonation site is indicated in brackets.

Neutral form

Total Electronic Energy: -904.721364892

C	-1.939433	1.014090	0.002102
C	-0.720922	0.324627	0.002327
C	-0.800541	-1.057866	0.000659
N	-1.911582	-1.787832	-0.000683
C	-2.994068	-1.026444	-0.001488
N	-3.070932	0.300856	-0.000894
N	0.495156	-1.481602	-0.000673
C	1.276616	-0.359647	0.000012
N	0.588291	0.746138	0.001832
S	3.010235	-0.505410	-0.001445
C	3.466516	1.232672	0.000855
N	-2.015309	2.351287	0.023187
H	4.551516	1.250591	0.000715
H	3.092463	1.725191	0.891152
H	3.092200	1.727674	-0.887953
H	0.810369	-2.434280	-0.001804
H	-3.941772	-1.546902	-0.003843
H	-2.907816	2.792377	-0.079920
H	-1.189101	2.905393	-0.081404

Cation (N1)

Total Electronic Energy: -905.168318031

N	0.619821	0.745059	-0.000062
C	-0.677598	0.322192	-0.000200
C	-0.758849	-1.060387	-0.000048
N	0.524252	-1.482132	0.000145
C	1.312438	-0.361437	0.000045
N	-1.872543	-1.805588	0.000038
C	-2.953654	-1.098476	0.000030
N	-2.982913	0.259217	-0.000082
C	-1.874930	1.041362	-0.000039
N	-1.962327	2.354555	0.000042
S	3.038792	-0.505593	-0.000003
C	3.489664	1.234396	0.000009
H	4.574504	1.252128	-0.000413
H	3.115551	1.725695	0.890789
H	3.114854	1.725841	-0.890403
H	0.834310	-2.438163	-0.000066
H	-3.919147	-1.576722	0.000038
H	-2.837304	2.844190	0.000639
H	-1.118796	2.897049	0.000124
H	-3.891091	0.695790	-0.000002

Anionradical

Total Electronic Energy: -904.782123897

C	-2.033506	0.879889	0.051615
C	-0.745958	0.385926	-0.174939
C	-0.626797	-1.016354	-0.125058
N	-1.607832	-1.876644	0.115854
C	-2.788342	-1.269520	0.318758
N	-3.041405	0.025606	0.298504
N	0.671763	-1.266153	-0.383514
C	1.312989	-0.037871	-0.704844
N	0.428367	0.984032	-0.469507
S	3.024608	0.118328	-0.419634
C	3.236141	0.274383	1.393768
N	-2.297355	2.236514	0.083976
H	4.298021	0.411747	1.583807
H	2.896206	-0.623878	1.900959
H	2.691189	1.137812	1.763409
H	1.063047	-2.172774	-0.550629
H	-3.629706	-1.920599	0.514126
H	-3.256845	2.464312	-0.109516
H	-1.657570	2.787930	-0.461003

Neutral radical (N1)

Total Electronic Energy: -905.260418923

N	0.482734	0.923193	-0.365055
C	-0.747140	0.371392	-0.184484
C	-0.640894	-1.003588	-0.044170
N	0.681088	-1.273165	-0.143087
C	1.326623	-0.088759	-0.330104
N	-1.650564	-1.900630	0.162409
C	-2.808900	-1.315525	0.253292
N	-3.028096	0.000405	0.139151
C	-2.040730	0.959473	-0.162262
N	-2.397369	2.290159	0.068806
S	3.057133	0.005045	-0.525497
C	3.581838	0.447927	1.150198
H	4.661946	0.556866	1.112532
H	3.325512	-0.334555	1.856408
H	3.137952	1.391022	1.450101
H	1.116385	-2.175184	-0.077994
H	-3.686540	-1.916756	0.438366
H	-2.088402	2.902844	-0.667460
H	-2.049287	2.651906	0.948058
H	-3.971020	0.337877	0.217561

Transition State (N1)

Total Electronic Energy: -905.227236

C	0.000000	0.000000	0.000000
C	0.000000	0.000000	1.386544
C	1.273802	0.000000	2.019336
N	2.474433	-0.044219	1.421784
C	2.396011	-0.079905	0.113780
N	1.255297	-0.064377	-0.570255
N	1.009109	0.026980	3.318854
C	-0.370368	0.079253	3.502007
N	-0.981991	0.037954	2.298683
S	-1.079808	0.025876	5.025868
N	-1.061332	0.007620	-0.888757
C	-1.439428	-2.148702	5.529475
H	-1.879538	-2.038227	6.510776
H	-0.451451	-2.585113	5.512990
H	-2.113277	-2.487288	4.756655
H	1.685899	0.045995	4.060494
H	3.300874	-0.124544	-0.470562
H	-1.852290	0.511277	-0.522198
H	-1.376058	-0.918422	-1.151777
H	1.288423	-0.061201	-1.576094

Complex (N1)

Total Electronic Energy: -905.254806057

C	-1.480281	-0.904198	0.578087
C	-0.193191	-0.408180	0.389291
C	-0.035806	0.972672	0.389332
N	-0.997484	1.893351	0.548063
C	-2.174163	1.382376	0.715754
N	-2.431849	0.050984	0.733859
N	1.281721	1.159620	0.195667
C	1.892233	-0.081707	0.084407
N	0.991805	-1.047744	0.202259
S	3.570372	-0.231727	-0.167899
N	-1.792801	-2.188765	0.610555
C	-1.787588	0.047385	-3.265525
H	-0.754585	0.314163	-3.411314
H	-2.541883	0.815005	-3.228174
H	-2.066252	-0.987409	-3.159157
H	1.762676	2.038421	0.139618
H	-3.032266	2.018596	0.854306
H	-1.063365	-2.864871	0.487074
H	-2.728736	-2.518915	0.745037

H	-3.388501	-0.229558	0.878096
---	-----------	-----------	----------

Neutral radical (C8)

Total Electronic Energy: -905.283076904

N	0.445700	0.977566	-0.812375
C	-0.644195	0.361319	-0.373344
C	-0.484834	-1.044344	-0.276387
N	0.762768	-1.301490	-0.683461
C	1.427597	-0.055650	-0.995504
N	-1.411196	-1.889253	0.134780
C	-2.557513	-1.280795	0.456276
N	-2.853338	0.007005	0.413131
C	-1.908675	0.865522	0.001136
N	-2.188116	2.168421	-0.043603
S	2.934461	0.224304	0.007212
C	2.228020	0.269614	1.660580
H	3.059391	0.394698	2.347809
H	1.720922	-0.662038	1.893963
H	1.547516	1.107886	1.771429
H	1.206771	-2.199774	-0.683588
H	-3.351125	-1.931293	0.796510
H	-3.094658	2.494205	0.228925
H	-1.500060	2.828263	-0.347902
H	1.806745	-0.050568	-2.018379

Complex (C8)

Total Electronic Energy: -905.165170

N	0.200853	-1.551334	0.013537
C	0.358351	-0.653774	0.979570
C	1.668675	-0.642808	1.518232
N	2.344795	-1.594120	0.862495
C	1.493409	-2.151934	-0.158717
N	2.089976	0.153359	2.481878
C	1.131563	0.969849	2.930365
N	-0.127217	1.065914	2.537214
C	-0.552103	0.260990	1.552389
N	-1.816719	0.347182	1.141652
S	2.121498	-1.927006	-1.861834
C	0.260794	4.304506	0.119617
H	1.064013	5.013181	0.230718
H	0.150746	3.499287	0.826446
H	-0.433281	4.401773	-0.698022
H	3.328836	-1.768099	0.936724
H	1.425669	1.642501	3.723875
H	-2.435942	1.007593	1.569262
H	-2.157450	-0.240817	0.407011
H	1.431012	-3.242212	-0.07886

b) Thermodynamic Thresholds

For the names of XYZ stationary geometries see Figures 5 and 6. The figure to which the structure refers is indicated in brackets.

ASCH3 (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.828964

C	-0.009580	0.006449	0.031428
C	-0.006292	0.004895	1.431528
C	1.241643	-0.000965	2.034950
N	2.422211	-0.004948	1.423421
C	2.285198	0.000112	0.103274
N	1.158792	0.007111	-0.613599
N	0.974709	0.001080	3.383105
C	-0.394144	0.009372	3.513565
N	-1.021718	0.012226	2.371614
S	-1.119641	0.014884	5.102098
C	-2.852326	0.013815	4.595412
N	-1.156703	-0.012899	-0.682300
H	-3.432132	0.012987	5.514240
H	-3.064687	-0.875218	4.010231
H	-3.066374	0.903015	4.011133
H	1.654375	-0.003882	4.124831
H	3.203162	-0.000348	-0.471510
H	-1.100571	0.117641	-1.676373
H	-2.031836	0.122216	-0.209692

ASCH3^{•-} (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.819057

C	0.003938	0.102180	-0.076291
C	-0.146033	0.355886	1.291387
C	0.965558	0.001210	2.085876
N	2.103450	-0.529530	1.652445
C	2.109242	-0.709895	0.315649
N	1.144043	-0.426777	-0.546748
N	0.606902	0.345500	3.347598
C	-0.659205	1.007924	3.289969
N	-1.139315	0.922267	2.013243
S	-1.644356	1.109668	4.703076
C	-2.494697	-0.546205	4.816554
N	-1.037903	0.369943	-0.967816
H	-3.186693	-0.504915	5.658203
H	-1.763673	-1.335838	4.976308
H	-3.039356	-0.718449	3.891570
H	1.219956	0.358503	4.142019
H	3.017382	-1.130158	-0.101633
H	-0.702299	0.590521	-1.893790
H	-1.672853	1.065708	-0.600262

TS_180a (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.783693409

N	0.257538	1.217438	0.010538
C	-0.865117	0.427767	0.022428
C	-0.508944	-0.930453	-0.006649
N	0.858790	-1.007876	-0.051143
C	1.219985	0.307474	-0.028851
N	-1.399207	-1.936559	-0.022815
C	-2.651098	-1.518868	-0.006811
N	-3.119117	-0.258851	0.031053
C	-2.222834	0.726155	0.051889
N	-2.671235	2.031810	0.133067
S	2.906520	0.788393	-0.143326
C	3.699318	-0.774022	0.309167
H	4.772374	-0.592876	0.286697
H	3.430712	-1.545840	-0.407943
H	3.391350	-1.074502	1.307657
H	1.395965	-1.740061	-1.226688
H	-3.414776	-2.289738	-0.028103
H	-3.603387	2.165045	-0.223844
H	-1.991815	2.713637	-0.166505

complex_180a (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.789582874

N	0.268867	1.203668	0.064410
C	-0.853022	0.417794	0.059398
C	-0.485224	-0.943824	0.048438
N	0.871170	-1.026755	0.050052
C	1.221672	0.271568	0.057165
N	-1.387088	-1.948677	0.025818
C	-2.636521	-1.529427	0.001850
N	-3.107674	-0.268491	-0.000580
C	-2.211120	0.715051	0.034750
N	-2.661189	2.025077	0.078018
S	2.916483	0.779132	0.022578
C	3.708627	-0.843529	-0.003490
H	4.782497	-0.668135	-0.031934
H	3.390440	-1.400763	-0.879837
H	3.439126	-1.407286	0.884976
H	0.313529	0.045507	-2.479706
H	-3.401381	-2.299931	-0.023861
H	-3.575324	2.149991	-0.326109
H	-1.967696	2.694933	-0.217463

m/z = 180a (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -904.288288

N	-0.027059	0.025896	-0.001626
C	-0.013032	0.034164	1.370171
C	1.319298	-0.001594	1.835567
N	2.152679	-0.026839	0.765960
C	1.281677	-0.009444	-0.257362
N	1.635063	-0.018313	3.149042
C	0.581916	-0.008474	3.941523
N	-0.723977	0.018228	3.617188
C	-1.025281	0.046392	2.319790
N	-2.361783	0.118382	1.951522
S	1.921888	-0.036418	-1.906598
C	0.366641	0.015181	-2.821123
H	-0.188080	0.914279	-2.566892
H	-0.242023	-0.851383	-2.577326
H	0.783768	-0.027873	5.008547
H	-2.986490	-0.265631	2.642448
H	-2.530759	-0.193368	1.007577
H	0.621670	0.013055	-3.879206

m = 1 (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -0.498206

H	0.000000	0.000000	0.000000
---	----------	----------	----------

TS_166 (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.814954295

N	0.388524	0.990366	-0.329984
C	-0.810026	0.384918	-0.097667
C	-0.700405	-1.013865	-0.056649
N	0.619911	-1.251440	-0.261742
C	1.274682	-0.014891	-0.459645
N	-1.699467	-1.873593	0.127286
C	-2.877733	-1.257937	0.269544
N	-3.129538	0.047963	0.249947
C	-2.098821	0.885682	0.073286
N	-2.333154	2.250154	0.095485
S	2.953409	0.065644	-0.640568
C	3.808849	0.284063	1.378071
H	4.869189	0.415774	1.181280
H	3.576820	-0.630809	1.912272
H	3.326726	1.166896	1.781412
H	1.073551	-2.144158	-0.330292
H	-3.736701	-1.903427	0.414897
H	-3.268368	2.506629	-0.177062
H	-1.598963	2.786833	-0.342012

complex_166 (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.832937

N	0.913096	0.490728	-0.599415
C	0.153908	0.112311	0.478613
C	0.847973	-0.762556	1.318476
N	2.061348	-0.902262	0.720547
C	2.081004	-0.133275	-0.452272
N	0.376817	-1.317326	2.435775
C	-0.876905	-0.951004	2.686253
N	-1.657041	-0.134357	1.977635
C	-1.148056	0.413316	0.865957
N	-1.924564	1.293034	0.148741
S	3.463174	-0.103762	-1.446417
C	-0.796234	2.027398	-3.084916
H	-1.362690	1.423235	-3.775885
H	-0.993655	3.086860	-3.039582
H	0.010718	1.592398	-2.509930
H	2.839616	-1.461040	1.021112
H	-1.326580	-1.371320	3.579210
H	-2.915076	1.198489	0.297626
H	-1.629913	1.455420	-0.804102

m/z = 166 (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -865.000617

N	-0.022969	0.030065	0.021025
C	-0.006845	0.035434	1.391413
C	1.295495	0.010717	1.899299
N	2.079801	-0.002351	0.789809
C	1.256683	0.005123	-0.348726
N	1.632718	-0.009441	3.189182
C	0.568173	-0.012591	3.986877
N	-0.721011	0.005526	3.645491
C	-1.021375	0.036880	2.341389
N	-2.345903	0.101887	1.964174
S	1.947976	-0.021029	-1.905094
H	3.082278	-0.027157	0.738205
H	0.771074	-0.036173	5.051972
H	-2.993498	-0.266603	2.640567
H	-2.511433	-0.159303	1.004363

m = 15 (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -39.825355

C	0.384879	0.222210	0.093916
H	-0.083455	-0.048183	1.024652
H	1.085889	-0.449532	-0.370942
H	0.153638	1.165173	-0.370942

TS_16 (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.710722152

N	0.524590	0.580913	-0.180955
C	-0.840592	0.242672	-0.143008
C	-0.961963	-1.131212	0.053807
N	0.327229	-1.625705	0.134957
C	1.152079	-0.534927	-0.011819
N	-2.096522	-1.809530	0.144591
C	-3.139123	-0.979806	0.021715
N	-3.145584	0.338605	-0.167249
C	-1.980922	1.060501	-0.266511
S	2.899450	-0.742207	0.044440
C	3.349352	0.998168	-0.124926
N	-0.901369	3.577576	0.425092
H	4.435418	1.040521	-0.099298
H	2.920053	1.568573	0.693207
H	2.969308	1.384462	-1.065599
H	0.599550	-2.579356	0.296391
H	-4.113813	-1.458654	0.086228
H	-1.486279	3.598091	-0.412443
H	-0.146832	2.956280	0.119875

complex_16 (see Figure 6)

Total Electronic Energy: -904.713577

N	-0.449699	0.268999	-0.587536
C	-0.559862	-0.237452	0.724146
C	0.714390	-0.558156	1.188742
N	1.592312	-0.248103	0.165141
C	0.812518	0.239535	-0.856850
N	1.007149	-1.059900	2.378623
C	-0.113730	-1.222177	3.094301
N	-1.372510	-0.954080	2.758862
C	-1.707467	-0.430019	1.523967
S	1.561251	0.754821	-2.364935
C	0.052257	1.254706	-3.220665
N	-3.692335	0.685009	-0.761175
H	0.356213	1.609649	-4.202252
H	-0.442504	2.043320	-2.661710
H	-0.618390	0.405208	-3.308507
H	2.590913	-0.359149	0.171691
H	0.039237	-1.632283	4.090669
H	-3.384645	0.292583	0.149854
H	-2.775712	0.766139	-1.216057

m/z = 16 (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -55.871919

N	0.004905	0.000000	0.003959
H	-0.006856	0.000000	1.028378
H	1.003766	0.000000	-0.223743

m = 165 (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -848.771341

N	-0.007298	0.002765	-0.012189
C	-0.028480	-0.001462	1.366639
C	1.280047	-0.003525	1.884648
N	2.091507	0.000646	0.781035
C	1.258973	0.004460	-0.315915
N	1.625441	-0.007865	3.162189
C	0.590911	-0.010236	3.986757
N	-0.701011	-0.009083	3.606869
C	-0.991190	-0.004932	2.358010
S	1.936930	0.010159	-1.921352
C	0.391061	0.012499	-2.856178
H	0.678364	0.015872	-3.903881
H	-0.183809	0.900476	-2.614439
H	-0.183147	-0.877392	-2.619975
H	3.098100	0.001720	0.778702
H	0.795035	-0.014116	5.048322

m/z = 180b (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -904.254969

N	0.009794	-0.006748	-0.039591
C	-0.014887	-0.013323	1.351127
C	1.269632	-0.003960	1.854615
N	2.095351	0.008533	0.744997
C	1.268225	0.006040	-0.349227
N	1.664125	-0.006290	3.137987
C	0.581897	-0.019798	3.930568
N	-0.697525	-0.030190	3.626956
C	-1.114006	-0.027213	2.291599
N	-2.356949	-0.035789	1.936103
S	1.935886	0.019147	-1.980105
C	0.365992	0.012618	-2.870416
H	-0.212131	0.890609	-2.598420
H	-0.199732	-0.876029	-2.607116
H	0.804737	-0.023509	4.996722
H	-2.905740	-0.044484	2.794323
H	0.609002	0.019553	-3.930226
H	3.098994	0.017812	0.758652

m/z = 180c (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -904.216527

N	-0.129435	0.037164	0.118908
C	-0.062086	0.034602	1.493383
C	1.255656	0.011061	1.947785
N	2.000453	0.006368	0.804866
C	1.124192	0.018319	-0.278598
N	1.647319	-0.015094	3.222224
C	0.615201	-0.025100	4.059225
N	-0.687601	-0.008784	3.770135
C	-1.042743	0.028483	2.480600
N	-2.373465	0.091081	2.156596
S	1.811830	-0.001588	-1.920227
C	0.614532	-0.004478	-3.160222
H	0.021501	0.907333	-3.164806
H	0.004997	-0.905373	-3.144059
H	3.002546	-0.017442	0.732588
H	0.859134	-0.054272	5.115304
H	-3.008970	-0.238746	2.862496
H	-2.591411	-0.137266	1.199680

m/z = 180d (see Figure 5)

Total Electronic Energy: -904.181724

N	-0.008277	0.030614	-0.052105
C	-0.014880	0.041974	1.344878
C	1.271233	0.000658	1.867179
N	2.085748	-0.030516	0.733056
C	1.253798	-0.011535	-0.354000
N	1.641053	-0.012963	3.129648
C	0.623022	0.005013	4.069635
N	-0.695069	0.039675	3.593731
C	-1.017416	0.065913	2.317368
N	-2.363625	0.148770	1.957716
S	1.923164	-0.045065	-1.982414
C	0.366696	0.037336	-2.890547
H	-0.165349	0.946135	-2.625431
H	-0.249644	-0.821681	-2.642747
H	-2.960834	-0.167634	2.707134
H	0.623281	0.034822	-3.947125
H	3.089658	-0.059708	0.735533
H	-2.576226	-0.256516	1.059350

Experimental

a) Synthesis of 8-bromoadenine

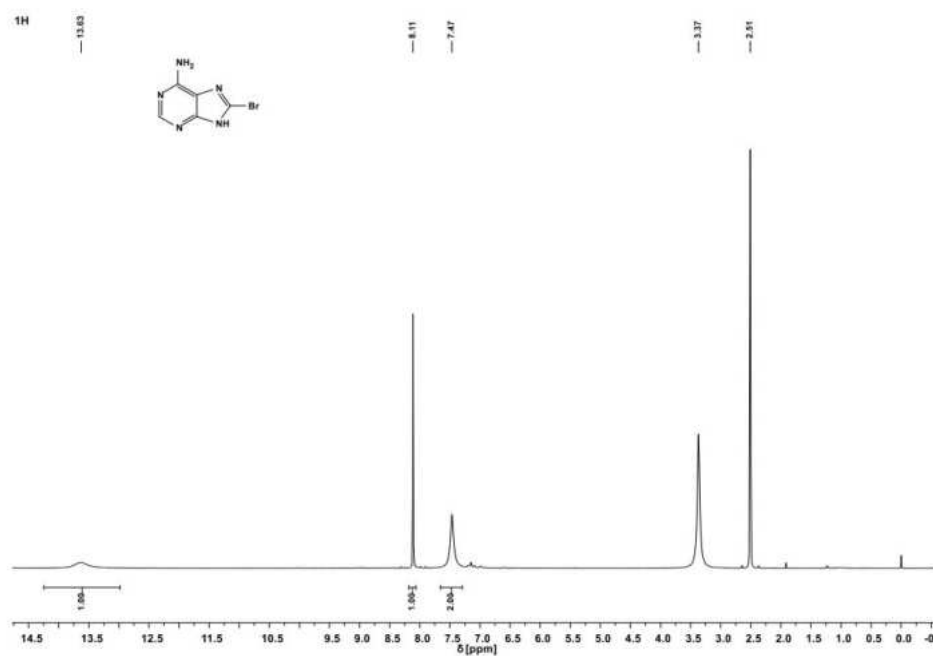


Figure S1. ^1H NMR spectrum of 8-bromoadenine.

b) Synthesis of 6-amino-7(*H*)-purine-8(*9H*)-thione

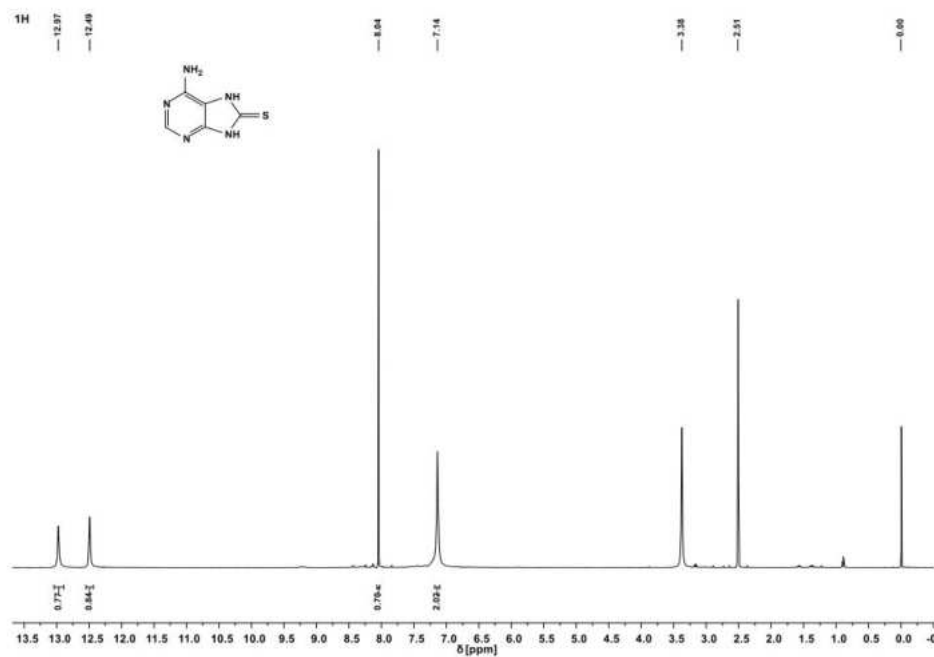


Figure S2. ^1H NMR spectrum of 6-amino-7(*H*)-purine-8(9*H*)-thione.

c) Synthesis of 8-thiomethyladenine

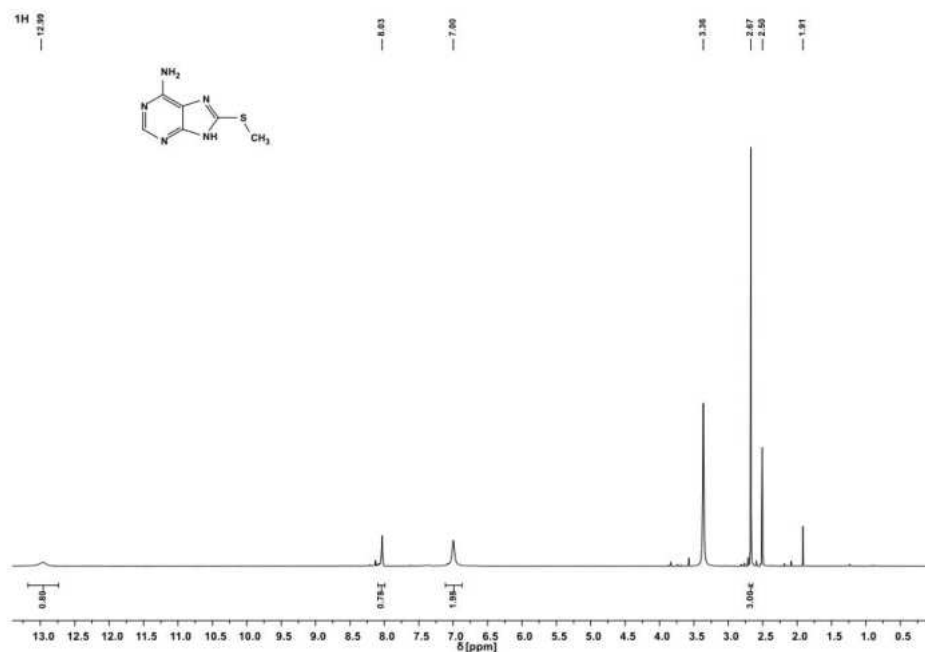


Figure S3. ^1H NMR spectrum of 8-thiomethyladenine.

d) HPLC analysis

HPLC Dionex UltiMate 3000 System with Diode Array Detector was used to analyse the irradiated and non-irradiated samples, which were separated by a Wakopak Handy ODS (4.6 x 150 mm, 5 μm in particle size and 100 Å in pore size) reverse-phase column and flow rate 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The program of analysis was set to linear gradient 0-35% of phase B in 20 minutes (phase A: 0.1% formic acid in deionized water and phase B: 80% acetonitrile in deionized water).

e) LC-MS analysis

LC-MS analysis of synthesized product and radiolysis products have been recorded using a Nexera X2 Ultrapformance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled to a Triple

TOF 5600+ tandem mass spectrometer (SCIEX), equipped with a duo-electrospray interface, operated in the negative ionization mode.

Chromatographic conditions: A C18 column (Kinetex Phenomenex; C18; 2.1×150 mm; 2.6 μm , 100 $\text{\AA}$) was used for chromatographic separation with a flow rate equal 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and injection volume of 50 μL ; the analysis program was set to linear gradient 0-35% of phase B for 20 minutes and 25°C; phase A: 0.1% HCOOH in deionized water, phase B: 80% ACN in deionized water. During analysis, the eluent was directed to waste for 1 min after injection.

MS and MS/MS conditions: the spray voltage was -4.5 kV, the source temperature was 300°C and the nebulizer gas (N_2) pressure was 25 psi.

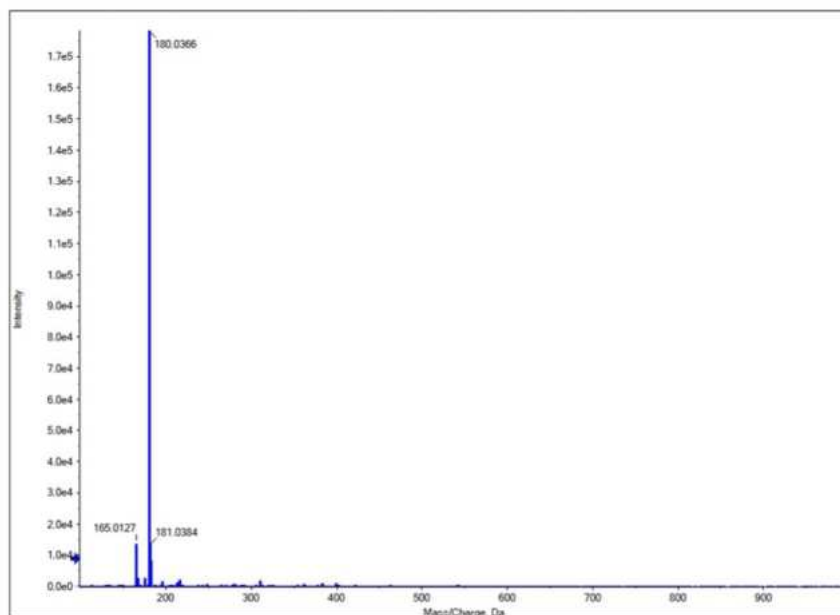


Figure S4. MS spectrum of 8-thiomethyladenine.

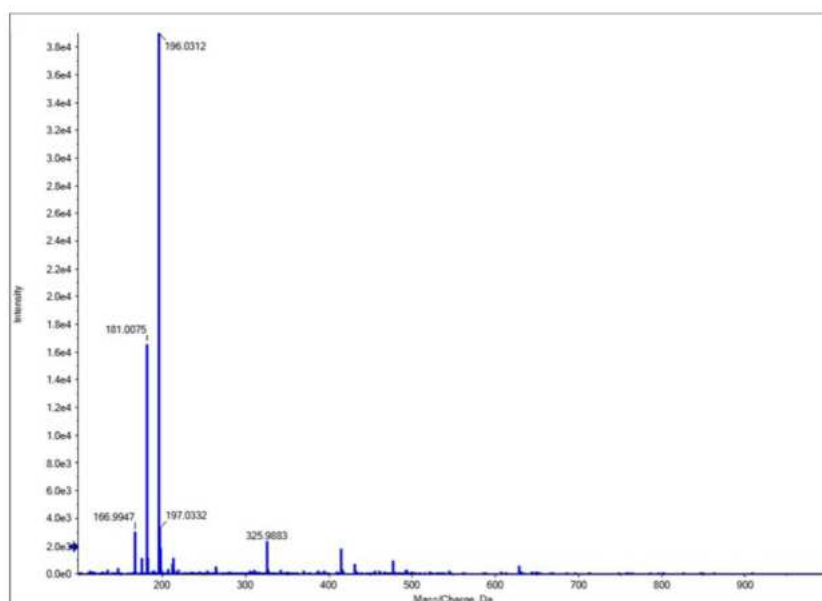
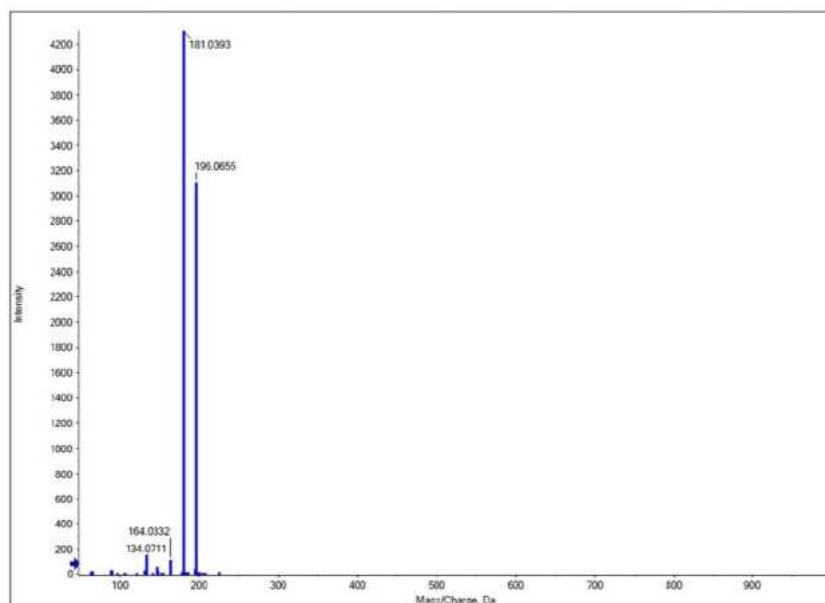


Figure S5. MS spectrum corresponding with a peak at 5.06 min (see Figure 9 in the main text).



S18

Figure S6. MS/MS spectrum corresponding with m/z equal 196 Da.

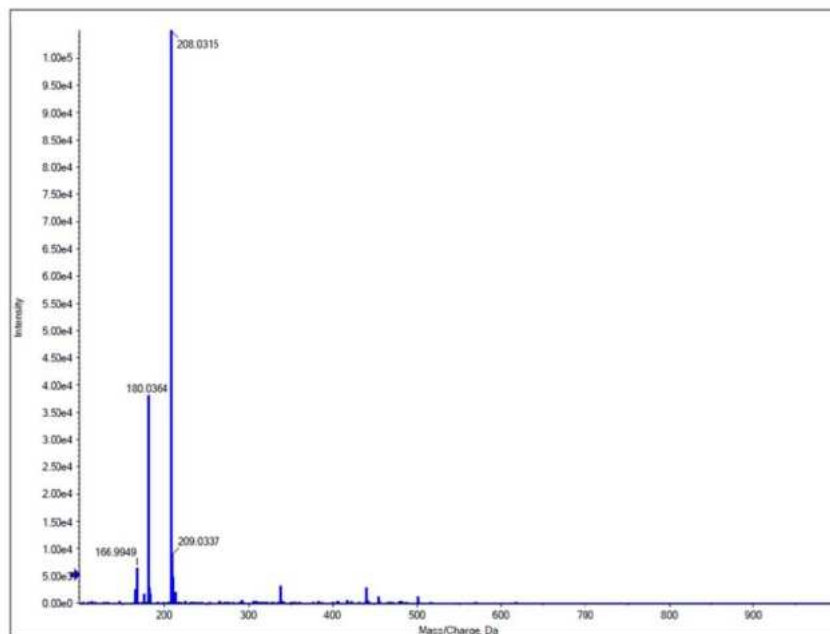


Figure S7. MS spectrum corresponding with a peak at 13.01 min (see Figure 9 in the main text).

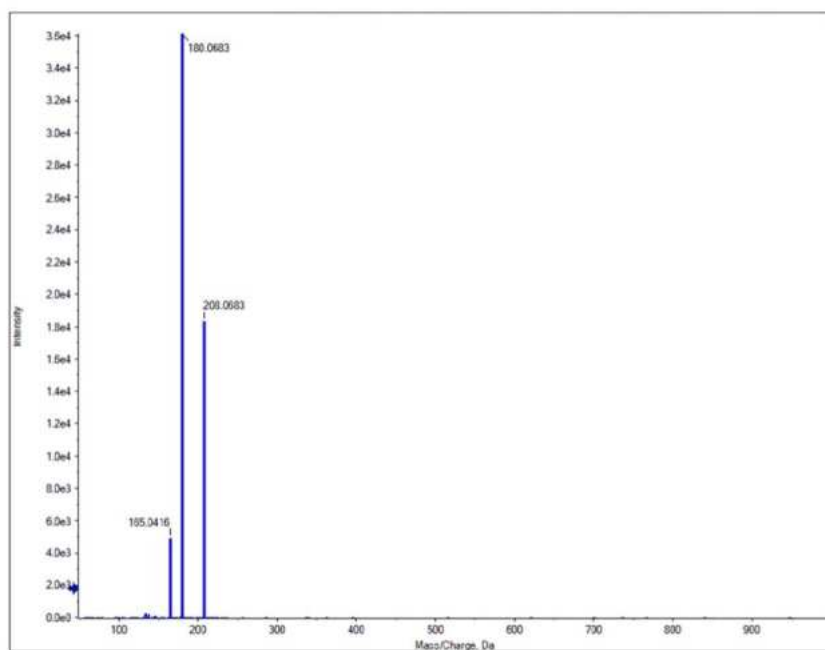


Figure S8. MS/MS spectrum corresponding with m/z equal 208 Da.

(P2) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Anna Czaja, Magdalena Zdrowowicz, Sebastian Demkowicz, Janusz Rak. “Substituted benzylamino-2’-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties”. *Scientific Reports*, 15, 17535, **2025**



OPEN Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties

Magdalena Datta¹, Adrian Szczyrba¹, Anna Czaja¹, Magdalena Zdrowowicz¹, Sebastian Demkowicz² & Janusz Rak¹✉

To verify whether the recently synthesized nucleoside, 8-(4-Trifluoromethoxy)benzylamino-2'-deoxyadenosine, can sensitize tumorous cells to X-rays, radiolytic and in vitro studies have been conducted. Molecular modeling demonstrated that excess electrons should lead to efficient dissociative electron attachment (DEA) to dA-NHbenzylOCF₃, resulting in a radical product that can potentially damage DNA. The computationally predicted DEA process was confirmed via stationary radiolysis of a dA-NHbenzylOCF₃ water solution followed by LC-MS analysis of the obtained radiolyses. Moreover, dA-NHbenzylOCF₃ was tested against its cytotoxicity and clonogenicity. We showed that the modified nucleoside is not cytotoxic to PC3, MCF-7, and HaCaT cell lines. Additionally, the clonogenic test exhibited a statistically significant radiosensitization of PC3 and MCF-7 cells to X-rays. On the other hand, flow cytometry assays demonstrated that the action of dA-NHbenzylOCF₃ is related to its influence on the cell cycle rather than the level of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation. Our findings indicate that the compound enters the cell and predominantly localizes in the cytoplasm, with a notable amount also detected in the nucleus. Moreover, we established that the compound is not phosphorylated by cellular kinases nor integrated into genomic DNA by the replication machinery.

Keywords Radiosensitizing nucleosides, Dissociative electron attachment, Clonogenic assay, MTT test, Cell cycle

Modified nucleosides like 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) sensitize DNA to ionizing radiation-induced damage^{1,2}. Although ionizing radiation (IR) is one of the most commonly used modalities in anti-cancer treatment,³ IR's mutagenic aftereffect reaction,⁴ and so-called oxygen effect^{5,6} (related to hypoxia of solid tumors) makes cancerous cells resistant to IR. Hence, the importance of developing an efficient radiosensitizer is difficult to overestimate. The BrdU mentioned above increases the sensitivity of cancer cells by more than three times compared to the control⁷. Unfortunately, BrdU is swiftly metabolized due to efficient hepatic dehalogenation by thymidylate synthetase which shortens its in vivo half-life to a couple of minutes,^{8,9} which prevents achieving therapeutic levels of the radiosensitizers in cancer cells in vivo. Thus, despite almost ideal in vitro radiosensitizing activity, BrdU is useless as a radiosensitizer¹⁰ due to its fast metabolism. Therefore, efforts to design radiosensitizers resistant to metabolism, which would guarantee their cellular delivery in an intact form to cancer tissue are worth undertaking.

The radiosensitizing action of some modified nucleosides is related to their reaction with solvated electrons¹¹. Interaction between the latter and DNA is inconsequential as far as the damage of biopolymer is concerned^{12,13}. It is worth noticing, however, that solvated electrons are produced during water radiolysis in an amount similar to that of hydroxyl radicals, the major DNA-damaging species⁴. Therefore, the involvement of hydrated electrons in DNA damage would significantly increase the efficiency of radiotherapy. Indeed, when working as a radiosensitizer, BrdU and similar nucleosides undergo DEA, which produces reactive radicals localized to nucleosides and capable of damaging DNA¹². Thus, when designing a new radiosensitizer one has to introduce

¹Laboratory of Biological Sensitizers, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk, Poland. ²Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland. ✉email: janusz.rak@ug.edu.pl

to the nucleoside a substituent that increases its electron affinity and makes the modified nucleoside prone to the dissociative electron attachment (DEA) process^{14,15}.

Most of the proposed to date nucleoside modifications are based on pyrimidine skeleton¹⁶. Pyrimidine derivatives seem to be a natural choice since pyrimidine nucleosides possess higher electron affinities than purine ones¹⁷ and one of the first radiosensitizers 5-bromo-2'-deoxyuracil is a uracil derivative. However, there are no fundamental reasons to exclude purine nucleosides from the set of potential radiosensitizers. Indeed, we demonstrated in the past that trimeric oligonucleotides labeled with 8-bromo-adenosine or 8-bromo-guanosine are prone to DEA under ultra-high vacuum^{18,19}. In this communication, we report on another adenosine derivative, 8-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)-2'-deoxyadenosine (dA-NHbenzylOCF₃) with radiosensitizing properties.

Results and discussion

Theoretical calculations

Before synthesizing the title compound, quantum chemical calculations on DEA profiles were carried out. In brief, dA-NHbenzylOCF₃ degradation induced by the attachment of an electron was described at the density functional theory (DFT) level using the B3LYP functional^{20–22} and 6–31++G(d, p) basis set^{23,24}. The computational model was simplified by replacing the deoxyribose in the dA-NHbenzylOCF₃ molecule with a methyl group. This simplification was successfully applied to many previously studied systems^{25–29}. Finally an implicit solvent model (PCM,³⁰ water) was used to account for the aqueous environment.

Figure 1 depicts energetic characteristics (in the free energy scale) calculated for the DEA path involving dA-NHbenzylOCF₃. Electron attachment was predicted to be a highly favorable process with the thermodynamic stimulus of c. 38 kcal/mol (Fig. 1). For unsubstituted species, i.e. for 8-benzylamino-2'-deoxyadenosine electron affinity is smaller and amounts to c. 36 kcal/mol which agrees with the general influence of electron-withdrawing substituent on electron attachment. Moreover, the thermodynamic barrier that separates radical anion, a product of electron attachment, from the DEA-produced product complex (see Fig. 1) assumes a negative value (−0.5 kcal/mol; Fig. 1) which suggests that the radical anion is unstable and dissociates immediately after electron attachment. The computational model predicts the cleavage of the C–N bond between the substituted benzyl fragment and the 8-aminoadenine one (see Fig. 1). Bond dissociation is governed by the electron affinities of the two fragments. Indeed, at the B3LYP/6–31++G(d, p)/PCM level adiabatic electron affinities of substituted benzyl and 8-aminoadenine radicals are equal to 3.16 and 4.19 eV, respectively. The formation of the product complex is associated with a favorable free energy of reaction equal to c. −30 kcal/mol (see Fig. 1). Altogether, these computational arguments imply an efficient DEA for dA-NHbenzylOCF₃.

To confirm the computational findings, we synthesized dA-NHbenzylOCF₃ by reacting 8-bromo-2'-deoxyadenosine with 4-(trifluoromethoxy)benzylamine in a methanolic solution (see Fig. 2). The compound was purified with flash chromatography (for purity see Fig S1), and its identity was confirmed by ¹H-NMR, C-NMR, and HRMS (for NMR and MS spectra, see the Supporting Information, Figs S2–S4).

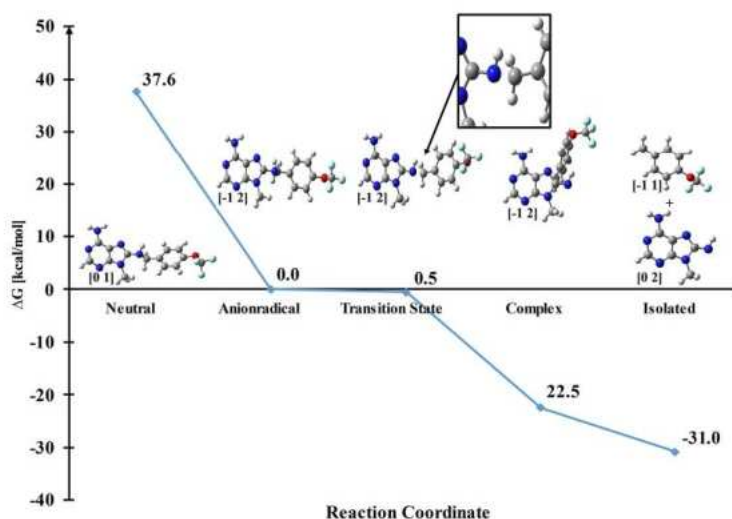


Fig. 1. DEA profile for dA-NHbenzylOCF₃ calculated at the B3LYP/6–31++G(d, p) level. The charge and multiplicity of individual species are indicated in square brackets. Gray color-carbon, blue color-nitrogen, red color-oxygen, white color-hydrogen, light blue color-fluorine atoms. The inset shows a molecular fragment where the cleavage of the C–N bond occurs due to DEA.

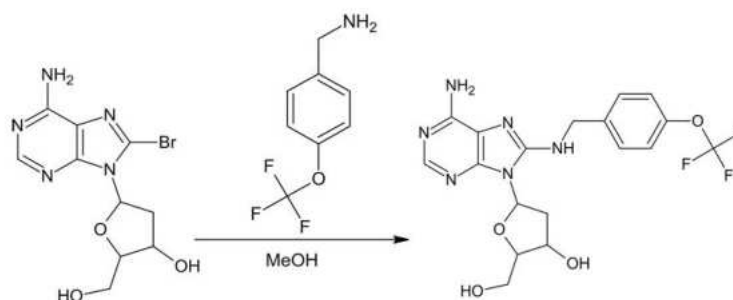


Fig. 2. Synthesis of 8-(4-(Trifluoromethoxy)benzylamino)-2'-deoxyadenosine.

The first reason to propose this at first glance exotic derivative was practical, i.e. the ease of synthesis of adenine modification. Namely, we used the method described by Vivet-Boudou et al.³¹ which utilizes a reaction between 8-bromo-2'-deoxyadenosine and the respective amine giving 2'-deoxyadenosine substituted at 8 position. Since a radiosensitizing nucleoside should bind the excess electron¹⁴, we also decided to use the strong electron-withdrawing $-\text{OCF}_3$ substituent in the amine moiety (note, that benzylamine substituted with $-\text{OCF}_3$ is commercially available).

Stationary radiolysis

The radiolysis of water solution of dA-NHbenzylOCF₃ was conducted with the addition of tert-butanol as an OH free radical scavenger and phosphate buffer (10 mM, pH 7) which corresponds to physiological level of pH. Samples were irradiated with a dose of 500 Gy with using of a CellRad X-ray cabinet. The applied dose of ionizing radiation leads to the degradation of the synthesized compound and produces a product with a retention time of 3.49 min (see Fig. 3). The radiolyte was analyzed using LCMS and LCMS/MS techniques. These analyses unambiguously demonstrated that the observed product is 8-amino-2'-deoxyadenosine. The MS signal registered at $m/z = 267.1797$ (recorded in positive ionization mode; see Fig S5 in the Supporting Information) corresponds to the protonated form of 8-amino-2'-deoxyadenosine, and the way it is fragmented in the MS/MS experiment (the cation of $m/z = 151.0891$ is due to the protonated 8-aminoadenine that originates from the fragmentation of the protonated 8-amino-2'-deoxyadenosine; see Fig S6 in the Supporting Information) is consistent with 8-amino-2'-deoxyadenosine as the radiolysis product. Note that the radiolytic degradation remains in full agreement with the quantum chemical prediction. As indicated in Fig. 1 electron attachment to the studied nucleoside leads to a barrier-free cleavage of the C-N bond resulting in the 8-amino-2'-deoxyadenosine anion and 4-(trifluoromethoxy)toluene (benzylOCF₃) radical. Under the experimental conditions, the former species is easily protonated, and in the form of protonated 8-amino-2'-deoxyadenosine determined in the LCMS analysis. The latter radical product is probably stabilized by attaching a free hydrogen atom coming from water radiolysis or abstracting a hydrogen atom from the tert-butanol molecule, ultimately forming benzylOCF₃, which is inert toward electrospray ionization. Its absorption is also quite weak in the entire UV region, which makes the identification of benzylOCF₃ demanding. However, as indicated by Fig. 3, HPLC UV signals related to both DEA stable products, 8-amino-2'-deoxyadenosine and benzylOCF₃, are observed in the RP-HPLC chromatogram (Fig. 3, middle panel).

Cytotoxicity analysis

It is important to note that potential radiosensitizers can be considered suitable for in vitro application only with their low cytotoxicity, as they should become toxic only after exposure to ionizing radiation. Therefore, we performed the widely accepted cell viability test, namely the MTT assay³². Three cell lines were chosen for this test: PC3, a human prostate cancer cell line, which serves as a model for the most common cancer in males; MCF-7, a human breast cancer cell line representing the most common cancer in females; and HaCaT, a healthy, immortalized human keratinocyte cell line.

The MTT test (see Fig. 4) showed that for the PC3 line, the reduction in cell viability generated by dA-NHbenzylOCF₃ compared to cell viability in the control variant (cells not treated with the tested derivative) is statistically significant ($p < 0.0001$) at a concentration of 100 μM after both 48 and 72 h of incubation and at a concentration of 20 μM after 72 h of incubation (statistically significant ($p < 0.01$)). For 48-hour incubation, the 100 μM dA-NHbenzylOCF₃ solution reduces cell viability to $86.3 \pm 3.4\%$, and for 72-hour incubation to $80.8 \pm 3.2\%$, respectively. While a concentration of 20 μM reduces cell viability to $88.5 \pm 0.2\%$. In the case of the MCF-7 cell line, a statistically significant reduction in viability is observed in a concentration of 100 μM of dA-NHbenzylOCF₃ at both incubation times. For 48-hour incubation, the 100 μM dA-NHbenzylOCF₃ solution reduces cell viability to $91.9 \pm 1.2\%$ ($p < 0.5$), and for 72-hour incubation to $87.5 \pm 1.3\%$ ($p < 0.0001$), respectively. In contrast, no statistically significant decrease in MCF-7 cell viability was observed in the range of dA-NHbenzylOCF₃ concentrations tested. Therefore, it can be concluded that the tested compound is less toxic against breast cancer cells than prostate cancer cells. Relative to cells of the HaCaT line, the reduction in viability generated by the tested compound is also statistically significant at a concentration of 100 μM after both

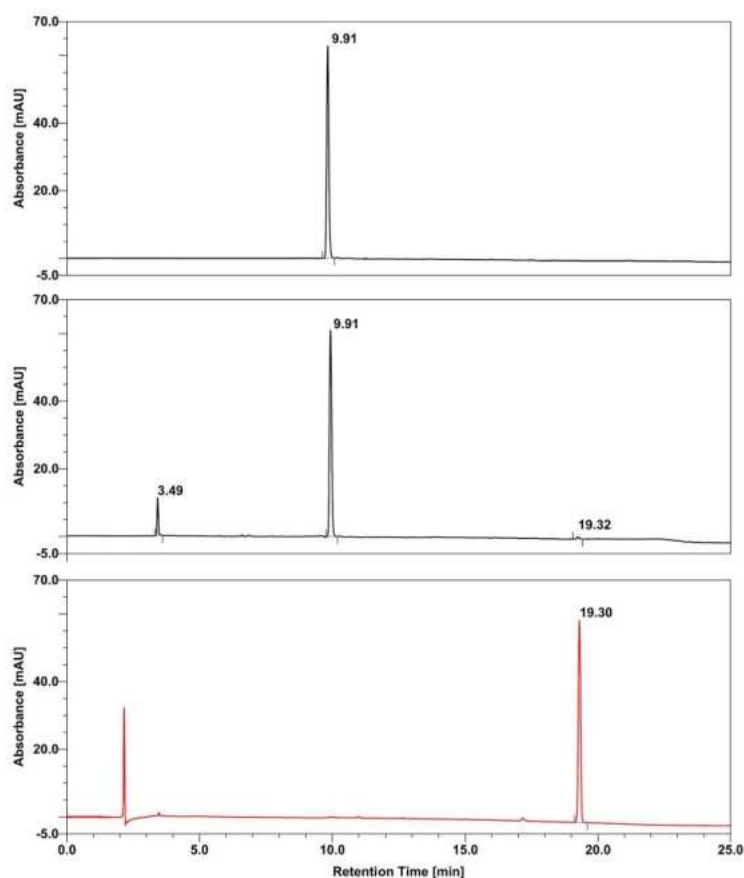


Fig. 3. HPLC analysis of dA-NHbenzylOCF₃ in water before (upper panel), and after X-ray irradiation with a dose equal to 500 Gy (middle panel). HPLC chromatogram for the solution of 4-(trifluoromethoxy)toluene is depicted in the lower panel.

48 ($p < 0.001$) and 72 h ($p < 0.0001$) of incubation. For 48-hour incubation, a solution of dA-NHbenzylOCF₃ at a concentration of 100 μ M reduces cell viability to $84.2 \pm 4.1\%$, and for 72-hour incubation to $76.3 \pm 5.1\%$, respectively.

Clonogenic assay

The clonogenic assay is the gold standard for assessing cell survival in vitro following radiation exposure³². It measures the ability of a single cell to grow into a colony after being exposed to a defined dose of radiation. This assay was conducted to assess the effect of dA-NHbenzylOCF₃ on the survival and colony formation ability of PC3 prostate cancer cells and MCF-7 breast cancer cells following exposure to ionizing radiation. Incubation with the dA-NHbenzylOCF₃ derivative reduced the survival of prostate cancer cells from $88.8\% \pm 1.3$ to $73.9\% \pm 0.7\%$ for a dose of 1 Gy, from $61.1\% \pm 0.3$ to $53.3\% \pm 1.8\%$ for a dose of 3 Gy, and from $49.5\% \pm 1.1$ to $37.1\% \pm 0.5\%$ for a dose of 4 Gy. However, in the context of MCF-7 cells, dA-NHbenzylOCF₃ reduced the survival from $87.5 \pm 0.6\%$ to $84.4 \pm 0.9\%$ for a dose of 1 Gy, from $68.5\% \pm 0.9$ to $64.3\% \pm 0.3\%$ for a dose of 3 Gy, and from $56.4\% \pm 0.6$ to $47.3\% \pm 0.5\%$ for a dose of 4 Gy. Figure 5 shows the survival fractions of PC3 cells (Fig. 5a) and MCF-7 cells (Fig. 5b) irradiated with different doses of ionizing radiation pre-incubated with the tested compound. Based on survival curves, the parameters for cellular radiosensitivity, such as α (coefficient for linear killing), and β (coefficient for quadratic killing) values, were calculated by a fitting using the linear-quadratic model. Average α and β values were as follows: 0.118 and 0.016 (untreated PC3 cells), 0.247 and -0.004 (PC3 cells treated with 20 μ M of dA-NHbenzylOCF₃), 0.115 and 0.006 (untreated MCF-7 cells), 0.177 and -0.0007 (MCF-7 cells

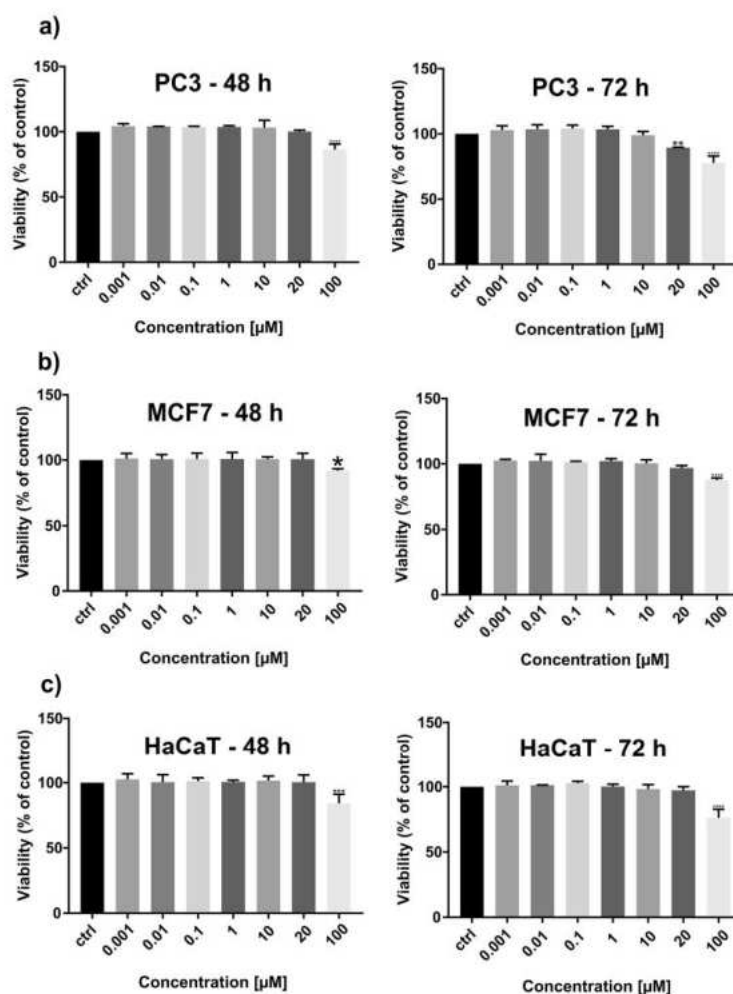


Fig. 4. The viability of (a) PC3, (b) MCF-7 and (c) HaCaT cells after 48 h and 72 h treatment with dA-NHbenzylOCF₃. The results are shown as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. A statistically significant difference is present between treated cultures compared with control (culture treated with vehicle), **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

treated with 20 μM of dA-NHbenzylOCF₃). Since, from a radiobiological point of view, the negative values of the β parameters are not realistic, the fitting for curves corresponding to the survival of dA-NHbenzylOCF₃-treated cells has been performed with β forced to zero. Such a procedure results in a slight change of α values: 0.246 for PC3 cells and 0.181 for MCF-7 cells. Radiosensitization by the studied derivative is mainly due to an increase in the α linear parameter, which suggests an increase in the number of directly lethal events by dA-NHbenzylOCF₃^{33,34}. It should be also noticed that the α value is enhanced by a factor of 2.1 (the ratio of α for curve corresponding to cells treated with dA-NHbenzylOCF₃ and untreated one) in case of PC3 line and by 1.5 for MCF-7 line. Additionally, the dose enhancement factor (DEF), defined as the increase in the effectiveness of the radiation dose in the presence of dA-NHbenzylOCF₃ compared to irradiation without the radiosensitizer, was determined to be 1.30 and 1.21 for PC3 and MCF-7 cell line, respectively ($\text{DEF} = \text{ID}_{50}(-\text{treatment}) / \text{ID}_{50}(+\text{treatment})$), where ID_{50} means radiation dose causing 50% growth inhibition³⁵. The above results prove that the titled derivative has a stronger impact on cells from the PC3 line than the MCF-7 line.

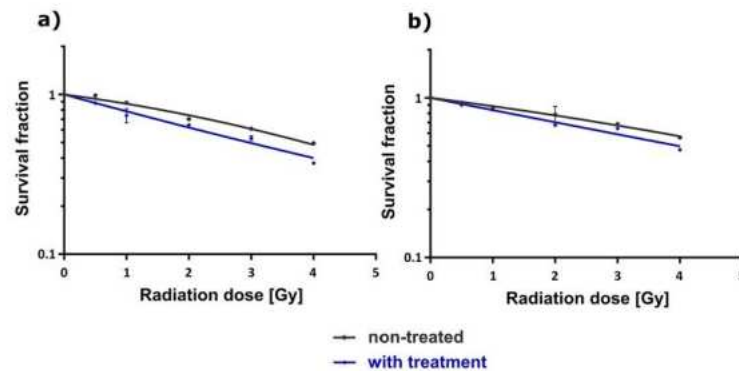


Fig. 5. Dose-response curves for reduced survival of (a) PC3 cells and (b) MCF-7 cells following dA-NHbenzylOCF₃ dose-dependent treatment of cultures non-treated or treated with dA-NHbenzylOCF₃ (20 μ M). The results are shown as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate.

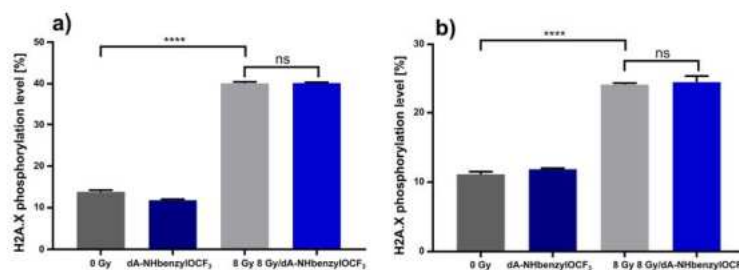


Fig. 6. Analysis of H2A.X histone phosphorylation in (a) PC3 and (b) MCF-7 cells by flow cytometry. Data are presented as the mean $\pm$ SD from three independent experiments conducted in triplicate. The level of H2A.X phosphorylation represents the percentage of the cell population with fluorescence exceeding the gating threshold for the H2A.X marker.

Histone H2A.X phosphorylation

To rationally improve the radiosensitizing ability of the tested compound, knowledge concerning the mechanism of radiosensitization seems to be indispensable. Double-strand DNA breaks (DSBs) are among the most toxic forms of damage and constitute the primary lethal injury caused by ionizing radiation. Moreover, modified nucleosides, like BrdU, after incorporation into DNA and activation by attachment of solvated electrons lead to DNA strand breaks. Thus, their basic mode of action is related to the increased formation of DNA strand breaks. Hence, we analyzed the process of H2A.X histone phosphorylation, which is a marker of DSBs³⁷ using cytometric analysis. Figure 6 shows the results of the experiment for both PC3 and MCF-7 cell lines treated with dA-NHbenzylOCF₃ and/or irradiated with 8 Gy (for dot plots and gating strategy see Fig S7 in the Supporting Information). It is noted that dA-NHbenzylOCF₃ causes no effect on H2A.X phosphorylation level, compared to the control variant, as well as combining this compound with irradiation did not show a statistically significant effect in comparison to the irradiation variant in PC3 (see Fig. 6a) and MCF-7 (see Fig. 6b). Only irradiation alone shows the statistical significance ($p < 0.0001$) effect of appearing histone H2A.X phosphorylation and double-strand break formation, compared to the control variant in both lines. This indicates that the radiosensitizing mechanism of action of dA-NHbenzylOCF₃ is not associated with the occurrence of DNA double-strand breaks in cancer cells.

Cell cycle analysis

To further elucidate the radiosensitizing mechanism of dA-NHbenzylOCF₃, we investigated the effect of the compound on cell cycle progression in PC3 and MCF-7 cells using flow cytometry. It is well-known that ionizing radiation interferes with the cell cycle, slowing the progression of particular cell-cycle phases³⁸. Moreover, cells are most sensitive to IR in the G2/M phases, less sensitive in the G1 phase, and least sensitive during the latter part

of the S phase³⁹. Thus, a radiosensitizer can work by modulating the cell cycle to increase the population of cells in the most radio-responsive phases. Analysis of the cell cycle in PC3 cells (see Fig. 7a) revealed that treatment with 20 μ M dA-NHbenzylOCF₃, combined with 8 Gy of ionizing radiation, reduced the fraction of cells in the G0/G1 phase from 47.8% $\pm$ 1.1 to 36.3% $\pm$ 3.3% and increased the proportion of cells in the most radiosensitive G2/M phase from 46.1% $\pm$ 1.2 to 56.8% $\pm$ 2.8%, compared to radiation alone. A similar effect was observed in the MCF-7 cell line (see Fig. 7b), where the combination therapy decreased the G0/G1 cell population from 43.3% $\pm$ 2.4 to 41.7% $\pm$ 0.9% and increased the G2/M phase population from 43.8% $\pm$ 0.2 to 48.4% $\pm$ 0.1%, compared to radiation alone. Furthermore, dA-NHbenzylOCF₃ alone did not significantly affect the cell cycle compared to the control in either cell line. These results suggest that the compound exhibits a stronger influence on cell cycle regulation in PC3 cells than in MCF-7 cells.

Further verification of the radiosensitization mechanism

To gain a deeper insight into the mechanism of dA-NHbenzylOCF₃ radiosensitivity, we decided to verify whether the compound enters the cell, where it accumulates, whether it is phosphorylated by cellular kinases, and whether it is incorporated into genomic DNA.

Localization of radiosensitizer in the cell

To verify if the nucleoside enters the cell and to learn its subcellular localization a cell fractionation assay (for the protocol, see the Cell fractionation assay section below) was performed to isolate the cytoplasmic and nuclear fractions. Both fractions were divided into two parts: one was directly analyzed using high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (LC-MS), and the other was digested into nucleosides using the Nucleoside Digestion Mix Kit (New England Biolabs, US) according to the manufacturer's protocol (for details see Methods: The Nucleoside digestion section). Such an approach allowed us to determine the total pool of the derivative in the nucleoside form (in case the derivative was phosphorylated and was present inside the cell in the mono-, di- or triphosphate form). The obtained results confirmed the presence of a peak corresponding to dA-NHbenzylOCF₃ in both the cytoplasmic (see Fig. 8a) and nuclear (see Fig. 8b) fractions, indicating that the derivative is present in both cytoplasm and nucleus which proves that the studied radiosensitizer enters the cell.

Based on the peak areas corresponding to dA-NHbenzylOCF₃ in both fractions and in the standard nucleoside solution at a concentration of 10^{-4} M, as well as knowing the final volume of both fractions, the molar ratio of the derivative present in the cytoplasmic and nuclear fractions was estimated. For a concentration of 20 μ M, the molar ratio of dA-NHbenzylOCF₃ in the cytoplasmic to nuclear fraction was 26:1, while at a concentration of 100 μ M, it was 22:1. These results demonstrate that a higher concentration of the derivative was observed in the cytoplasmic fraction, suggesting that the compound primarily localizes in the cytoplasm.

Nucleosides may undergo at least partial phosphorylation under cellular conditions. Therefore, the presence of mono-, di-, and tri-phosphorylated forms of dA-NHbenzylOCF₃ was tested by using the selected-ion monitoring mode of MS. However, no masses corresponding to the phosphorylated dA-NHbenzylOCF₃ were detected. To further validate this observation, cytoplasmic and nuclear fractions were subjected to the action of the mentioned above Nucleoside Digestion Mix Kit which converts nucleotides to nucleosides. Subsequently, the fractionated and digested samples were analyzed using the XIC (eXtracted Ion Chromatogram) mode of MS. The results showed that the peak area of dA-NHbenzylOCF₃ remained unchanged compared to the undigested sample, confirming thus that the compound is present in the cell exclusively in its unphosphorylated form.

Radiosensitizer incorporation into cellular DNA

The lack of phosphorylated forms of dA-NHbenzylOCF₃ suggests that it is not incorporated into cellular DNA. To confirm this supposition, we decided to digest DNA down to nucleosides (for details see the DNA digestion section of Methods). In order to determine the degree of incorporation of the derivative into genomic DNA, the nucleoside solution obtained after DNA digestion was analyzed using high-performance liquid chromatography

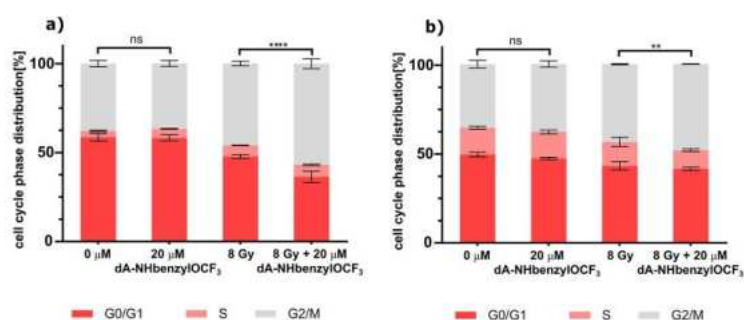


Fig. 7. Quantitative analysis of cell cycle distribution for (a) PC3 and (b) MCF-7 cell lines (for histograms see Fig S8 in Supporting Information). Data are presented as mean $\pm$ SD. Statistical significance for differences in G2/M phase cell populations between the specified groups is indicated as **** $p < 0.001$, and ** $p < 0.01$.

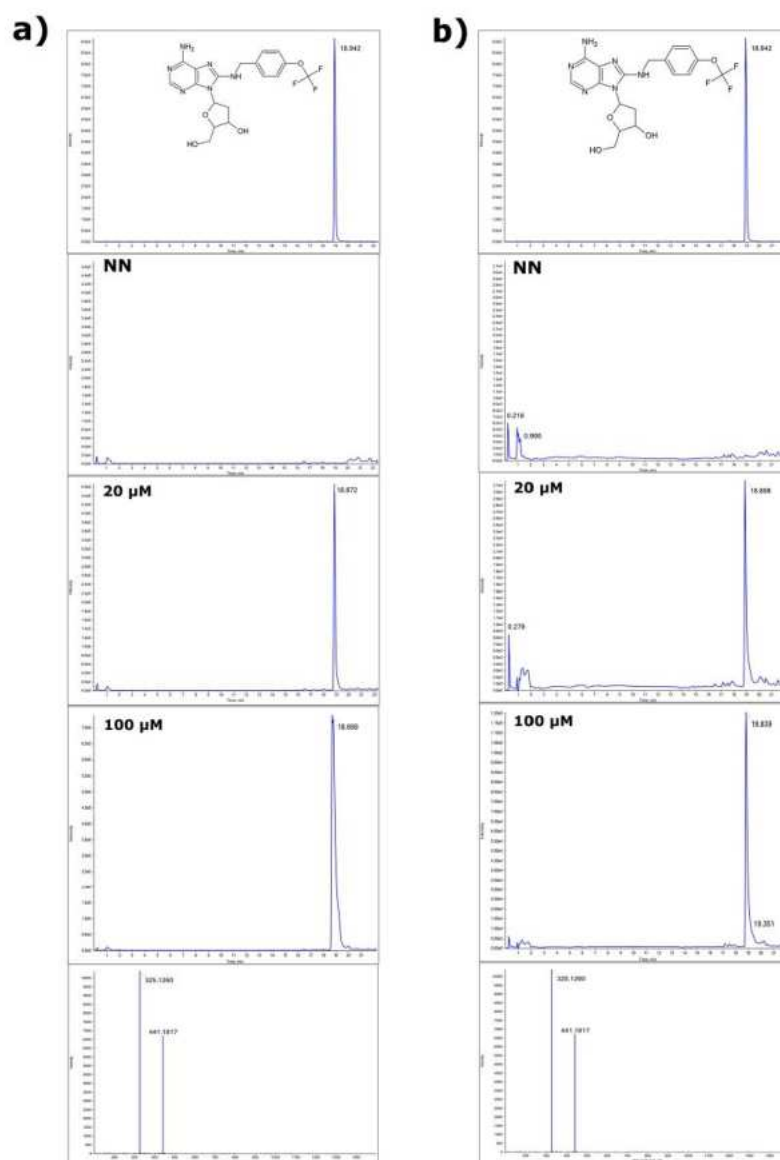


Fig. 8. XIC chromatograms of (a) cytoplasmic and (b) nuclear fractions. NN- untreated sample (control); 20 μ M -sample with the addition of 20 μ M of the tested compound; 100 μ M – sample with the addition of 100 μ M of the tested compound.

(analysis method: isocratic elution with 0% phase B for 10 min, followed by a linear gradient from 0 to 100% phase B between 10 and 30 min). Additionally, a standard solution containing dA, dG, dC, T and dA-NHbenzylOCF₃ at a concentration of 10⁻⁴ M of each was prepared for HPLC analysis. The results obtained (see Fig. 9) indicate the absence of peak corresponding to dA-NHbenzylOCF₃ (retention time: 19.67 min in the reference mixture) in DNA obtained from the cells incubated with the tested compound. Thus, dA-NHbenzylOCF₃ is not incorporated

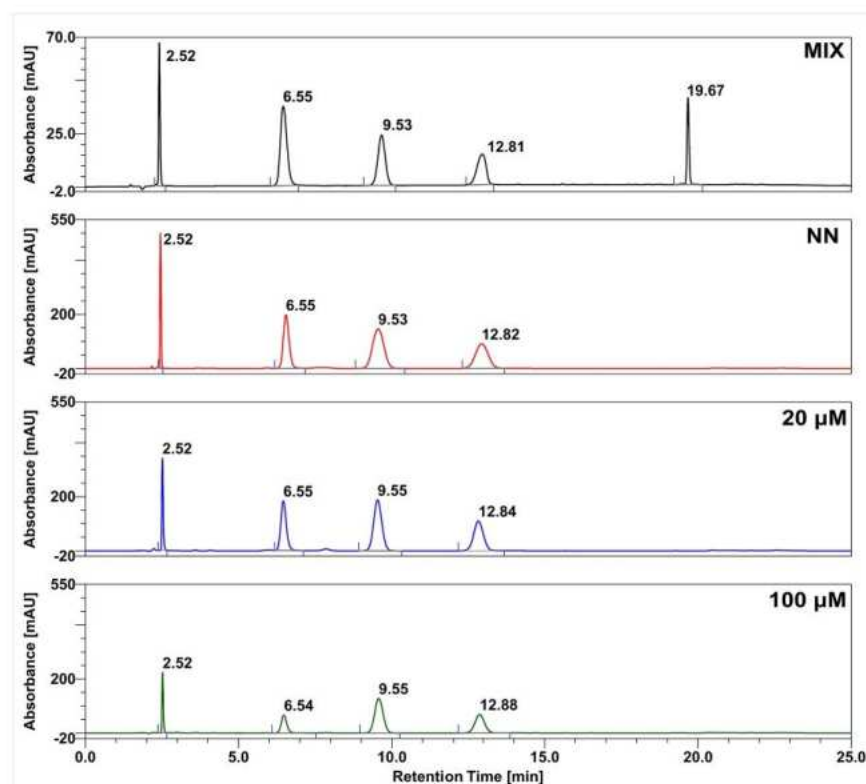


Fig. 9. Chromatograms of standard mix solution (black line) and the digested genomic DNA from untreated PC3 cells (red line), from PC3 cells treated with 20 μ M of dA-NHbenzylOCF₃ (blue line), and from PC3 cells treated with 100 μ M of dA-NHbenzylOCF₃ (green line).

into the genomic DNA of PC3 cancer cells (at least to the degree that overcomes the HPLC detection limit). Additionally, the samples were analyzed using LC-MS in the selected ion mode, where the MS detector was set to search for the cation with m/z equal to 441, corresponding to the mass of dA-NHbenzylOCF₃ in positive ionization mode. As a reference, a mixture containing dA-NHbenzylOCF₃ was used. The specified mass was not observed in the treated samples, further confirming the results obtained with the HPLC analysis.

Conclusions

In summary, we chemically synthesized a new derivative of 2'-deoxyadenosine with a (4-Trifluoromethoxy) benzylamine substituent at its 8-position. The electron-withdrawing effect of this substituent increases the nucleoside's electron affinity, facilitating the electron attachment process. Moreover, as indicated by the computational DEA profile, when the radical anion forms, it dissociates without a kinetic barrier into the 8-aminoadenine anion. This theoretical finding is corroborated by stationary radiolysis, which demonstrates the same bond-breakage in the substituent. In vitro studies conducted on three cell lines reveal low toxicity of the modified nucleoside, which is an essential requirement for any radiosensitizer with practical applications. In contrast to brominated/iodinated nucleosides like BrdU/IdU, dA-NHbenzylOCF₃ does not increase the number of double-strand breaks (DSBs) in irradiated cells, as indicated by flow cytometry analysis of H2A.X histone phosphorylation. It appears that the primary mode of action of the studied nucleoside is partially related to cell cycle modulation. Indeed, using flow cytometry to analyze the cell cycle, we observed a statistically significant increase in the population of cells in the radiosensitive G2/M phase. We also demonstrated that the compound enters the cell, and it accumulates mainly in cytoplasm although a significant amount of the derivative was also observed in the nucleus compartment. Additionally, we proved that that compound is neither phosphorylated by the cellular kinases nor incorporated into genomic DNA by cellular replication machinery.

To further optimize the radiosensitizing properties of such types of compounds, ongoing studies in our laboratory are focused on adenosine derivatives with other electron-withdrawing substituents in the aminobenzyl group attached to the 8 position of the nucleoside.

Methods

General methods and materials

Reagents for synthesis were purchased from Sigma-Aldrich and Ambeed. All reagents for maintaining the cells culture were obtained from ThermoFisher. PC3 and MCF-7 cell lines were obtained from ATCC, while cells of the HaCaT line were obtained from CLS. All cytometric tests were performed according to the manufacturer's instructions (Luminex). Purification of the sample was carried out using Flash Chromatography - Büchi FlashPure Cartridges (silica gel 40 µm irregular) on a Büchi Pure Chromatography System with an integrated UV and ELSD detector. The purity of the sample was determined by reversed-phase RP-HPLC high-performance liquid chromatography, using a Dionex Ultimate 3000 chromatograph with a diode array detector (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) and a Wakopak Handy ODS analytical column (150 × 4.6 mm). The mobile phase was a system of solvents A and B, applied in a 20-minutes gradient of 0–100% phase B, where: A – 0.1% HCOOH and 0.1% ACN in water; B – 80% ACN. The volumetric flow rate of eluent was 1 mL/min. Detection was carried out at a wavelength of 280 nm. The LC/MS and LCMS/MS measurements were performed using a TripleTOF 5600+ (SCIEX, Framingham, MA, USA) high-resolution mass spectrometer coupled to a UPLC system (Nexera X2, Shimadzu, Canby, OR, USA). NMR spectra were measured in DMSO-d₆ using 500 MHz spectrometer (Varian Unity Inova).

Synthesis

To a spherical round bottomed flask equipped with a magnetic stirrer 8-bromo-2'-deoxyadenosine (0.12 g, 0.363 mmol), benzylamine-OCF₃ (1.39 g, 7.26 mmol) and methanol (6 mL) were added and refluxed for 28 h. Then, the mixture was evaporated under reduced pressure and purified using column chromatography (Flash system) on a solid phase. The program was set to linear gradient 0–35% of phase B, where A – methylene chloride,

B – methanol. Detection was done at 260 and 280 nm. Yield 40%. Purity confirmed by HPLC: 98% ¹H NMR δH (500 MHz, DMSO-d₆): 7.89 (1 H, s, CH(6)), 7.68 (1 H, t, J = 6.0 Hz, NH(19)), 7.47 (2 H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H(22/24)), 7.30 (2 H, d, J = 8.2 Hz, Ar-H (23/25)), 6.52 (2 H, bs, NH₂ (10)), 6.37 (1 H, dd, J = 9.3, 5.8 Hz, CH(14)), 5.80 (1 H, dd, J = 5.8, 4.2 Hz, OH (18)), 5.30 (1 H, d, J = 3.7 Hz, OH(16)), 4.57 (2 H, qd, J = 15.7, 5.9 Hz, CH₂(20)), 4.43–4.36 (1 H, m, CH (11)), 3.93–3.86 (1 H, m, CH (13)), 3.67–3.54 (2 H, m, CH₂ (17)), 2.73 (1 H, ddd, J = 12.9, 9.3, 5.8 Hz, CH 15)), 2.05 (1 H, ddd, J = 13.0, 5.9, 1.6 Hz, CH (15)); C NMR: 152.91; 151.35; 149.83; 149.11; 147.54; 147.53; 139.89; 129.37; 121.33; 117.30; 88.01; 83.61; 71.94; 62.21; 45.02; 38.23. HRMS (ESI): m/z calcd. for C₁₇H₃F₃N₇O₄ 441.14, found 441.23 [M + H]⁺.

Quantum chemical calculations

To simplify the model the deoxyribose moiety in dA-NHbenzylOCF₃ was replaced by a methyl group. DEA profile was calculated using the fully optimized geometries of the reactants at the B3LYP level,²¹ employing the 6–31++G(d, p) basis set²³. The Polarization Continuum Model (PCM) was used to mimic the solvent³⁰. All the optimized geometries were found to be geometrically stable, as verified by harmonic frequency analysis (all force constants were positive for minima, while one and only one was negative for the first-order transition states). Additionally, the intrinsic reaction coordinate⁴⁰ (IRC) procedure was used to ensure that the obtained transition state connects the proper minima. The Gibbs free energies of particular elementary reactions and activation free energies were estimated as electronic energy change between the product and substrate (or between the substrate and transition state for activation energy) corrected for zero-point vibration terms, thermal contributions to energy, the pV term and the entropy term. These terms were calculated in the rigid rotor-harmonic oscillator approximation for T = 298 K and p = 1 atm.⁴¹

All computations were carried out using Gaussian 09⁴² and visualized using GaussView 6.0⁴³.

Stationary radiolysis

Radiolysis of an aqueous solution of dA-NHbenzylOCF₃ at a concentration of 10^{−4} M was conducted with the addition of tert-butanol (30 mM) as an •OH free radical scavenger and phosphate buffer (10 mM, pH 7) in Eppendorf tubes. Samples were purged with argon for 3 min and subsequently irradiated with a dose of 500 Gy using a CellRad X-ray Cabinet (Faxitron, X-ray Corporation, Tucson, AZ, USA) at a dose rate of 5.81 Gy/min. The voltage and current of the X-ray tube were equal to 130 kV and 5 mA, respectively. A 0.5 mm Al filter was used.

Cell culture

PC3 and MCF-7 cell lines were obtained from ATCC, while cells of the HaCaT line were obtained from CLS. PC3 cells were cultured in F-12 K medium, MCF-7 cells were cultured in RPMI medium and HaCaT cells were cultured in DMEM high glucose medium. Each medium was supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) and antibiotics (penicillin and streptomycin) at a concentration of 100 U mL^{−1}. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The plates with cells were irradiated using a CellRad X-ray cabinet (Faxitron, X-ray Corporation, Tucson, AZ, USA). dA-benzylNHOCF₃ was resuspended in DMSO for molecular biology for treatment in all cellular experiments performed.

MTT test

Cells were seeded at a density of 4000 per well into 96-well plates and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. After 24 h of incubation, the cells were treated with the tested compound at concentrations ranging

from 0.001 to 100 μM or 1% DMSO as a control and incubated for 48 and 72 h. Then a solution of MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added at a concentration of 4 mg/mL (25 μL per well), and after 2 h of incubation the resulting product - formazan was dissolved in DMSO. The absorbance at 570 nm (with a reference wavelength of 660 nm) was measured using an EnSpire microplate reader (Perkin Elmer). The viability of control cells was taken as 100%. Experiments were performed independently three times in triplicate. Statistical analysis of the results was performed using GraphPad Prism 7 Software, <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>.

Clonogenic assay

Cells from the PC3 and MCF-7 lines were seeded into 60-mm diameter dishes at concentration of 10^5 cells per dish and incubated (37 °C, 5% CO_2) with 20 μM dA-NHbenzylOCF₃ solution. After 48 h of incubation with the tested compound, the cultures were exposed to ionizing radiation (X-rays) in the dose range of 0–4 Gy. After 6 h of irradiation, cells were trypsinized and seeded at a density of 600 cells per 60 mm diameter plates. After 14 days, the resulting colonies were fixed with 6.0% (v/v) glutaraldehyde and 0.5% crystal violet. The stained colonies were evaluated and counted using a GelCount Oxford Optronix automated colony counter. The experiment was conducted in triplicate. The control consisted of cultures not exposed to ionizing radiation. The survival curves were fitted using the linear-quadratic model with the use of GraphPad Prism 7 Software ($\text{SF} = \exp(-(\alpha \cdot \text{D} + \beta \cdot \text{D}^2))$ where "D" is the dose and " α " and " β " are the optimized parameters). The survival data are presented in a semi-logarithmic plot of the surviving fraction against the dose.

Histone H2A.X phosphorylation

PC3 and MCF-7 cells were allocated into four groups: (i) the control group (treated with vehicle – 1% DMSO), (ii) the group treated with 20 μM dA-NHbenzylOCF₃, (iii) the irradiated group (8 Gy), and (iv) the group treated with 20 μM dA-NHbenzylOCF₃ and irradiated with 8 Gy. Following irradiation, the cells were incubated for 2 h, then dissociated using accutase solution, fixed, and permeabilized. Subsequently, the cells were stained with an Alexa Fluor 488 conjugated antibody and analyzed using a Guava easyCyt flow cytometer (Incyte 3.3. Software, https://www.merckmillipore.com/PL/pl/20130828_204624). All procedures (fixation, permeabilization, staining) were optimized and conducted according to the manufacturer's instructions (FlowCelect Histone H2A.X Phosphorylation Assay Kit, Luminex). Unirradiated and untreated controls were used to establish the threshold gating for determining the fraction of $\gamma\text{H2A.X}$ (H2A.X histone phosphorylated at serine 139) positive cells. The experiment was performed in triplicate.

Cell cycle analysis

PC3 and MCF-7 cells were assigned to four groups as described in Histone H2A.X phosphorylation method. The cells were incubated with the studied compound for 48 h. The concentration of dA-NHbenzylOCF₃ was determined based on preliminary studies to balance efficacy and toxicity. Cells were dissociated using accutase solution 24 h after irradiation, fixed in ice-cold 70% ethanol, and stained with propidium iodide (Guava Cell Cycle Reagent, Luminex) for 30 min, following the manufacturer's instructions. Post-staining, samples were analyzed via flow cytometry (Guava easyCyt 12, Merck Millipore). Cells were gated on a scatter plot of FSC (Forward Scatter) versus DNA to exclude cell aggregates and debris. The proportions of cells in various cell cycle phases were assessed using Incyte 3.3. Software.

Cell fractionation assay

PC3 cells were seeded in 100 mm dishes at a density of 2×10^6 in three variants: (i) control – cells without addition of the nucleoside, (ii) cells treated with 20 μM dA-NHbenzylOCF₃, and (iii) cells treated with 100 μM dA-NHbenzylOCF₃. The cells were incubated for 48 h, trypsinized, and centrifuged to obtain cell pellets. Fractionation was performed using the Nuclear/Cytosol Fractionation Kit according to the manufacturer's protocol (Abcam, UK). 200 μL of cytosol extraction buffer containing 2 μL of protease inhibitor cocktail and 1 μL DTT (1 M) was added to the collected cells, and samples were centrifuged at 500 $\times g$ for 3 min at 4 °C. The supernatant was removed. An additional 200 μL of cytosol extraction buffer was added, and the samples were resuspended using vortexing and incubated on ice for 10 min. Then, 11 μL of ice-cold lysis buffer was added to each sample, vortexed, and incubated on ice for 1 min. Subsequently, the cell samples were centrifuged for 5 min at maximal speed in a microcentrifuge (16,000 $\times g$), and the supernatant fractions (cytoplasmic extract) were transferred to clean Eppendorf tubes and kept on ice. The remaining cell pellets were resuspended in 100 μL of ice-cold nuclear extraction buffer (containing 2 μL protease inhibitor cocktail and 1 μL DTT (1 M)). Samples were vortexed for 15 s and returned to ice. This step was repeated every 10 min for a total of 40 min. After this, the samples were centrifuged (16,000 $\times g$ for 10 min), and the supernatants were transferred to clean Eppendorf tubes (nuclear extract) and kept on ice.

DNA digestion

The PC3 cells were seeded in 100 mm dishes at a density of 2×10^6 in three variants: (i) control – cells without compound addition, (ii) cells treated with 20 μM of dA-NHbenzylOCF₃, and (iii) cells treated with 100 μM of dA-NHbenzylOCF₃. The cells were incubated for 48 h and then harvested on ice mechanically using a cell scraper. The collected cell pellets were subjected to purification and DNA isolation using the GeneMATRIX kit according to the manufacturer's protocol (EURx, Poland). A lysis buffer and RNase, which catalyzes RNA degradation, were added to the cell pellet containing the tested derivative. Subsequently, after the addition of proteinase K, the samples were incubated at 70 °C for 10 min in a thermocycler (Mastercycler Gradient). The lysate was then transferred to a tube with a specialized membrane, washed with appropriate washing solutions, and centrifuged. The final step involved the digestion of DNA into nucleosides. In this case, 10 μL of 10x concentrated reaction

buffer containing 30 mM sodium acetate (pH 5.0) and 1 mM zinc acetate were added to samples with DNA fragments to a final volume equal to 100 μ L. Then, two enzymes – 1 μ L (0.2 U) of Nuclease P1 and 1 μ L (0.005 U) of Spleen were added, and samples were incubated at 37 °C for 2 h. The second step collects the addition of 7.5 μ L of 20x concentrated digestion buffer (1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris with a pH 8.9 and 40 μ L DTPA), 40.5 μ L water to final volume equals 150 μ L and 1 μ L of DNase to each sample and incubated in 37 °C for 1 h. After this time, enzymes were added sequentially: 2 μ L BAP, followed by incubation for 1 h at 37 °C, and then 2 μ L SVP, with another incubation under the same conditions for 1 h.

Nucleoside digestion

The Nucleoside Digestion Kit (New England Biolabs, US) was used according to the manufacturer's protocol. 5 μ L of 10x nucleoside digestion mix buffer and 2.5 μ L of nucleoside digestion mix were added to the cell samples. The solutions were incubated at 37 °C for 1 h, lyophilized, and analyzed by LC-MS.

Statistical analysis

Mean values were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's or Tukey's multiple comparison tests. Data are presented as means with standard deviations (SD) derived from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software. Levels of statistical significance were denoted as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information file.

Received: 4 November 2024; Accepted: 18 April 2025

Published online: 20 May 2025

References

- Rak, J. et al. Mechanisms of damage to DNA labeled with electrophilic nucleobases induced by ionizing or UV radiation. *J. Phys. Chem. B* **119**(26), 8227–8238. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03948> (2015).
- Makurat, S. et al. Guanine dianions hydrated by one to four water molecules. *J. Phys. Chem. Lett.* **13**(14), 3230–3236. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.2c00512> (2022).
- Lehnert, S. Biomolecular action of ionizing radiation. <https://doi.org/10.1667/rrxx07.1> (2007).
- von Sonntag, C. Free-Radical-Induced DNA damage and its repair. <https://doi.org/10.1007/3-540-30592-0> (2006).
- Dasu, A. & Denekamp, J. New insights into factors influencing the clinically relevant oxygen enhancement ratio. *Radiother Oncol.* **46**(3), 269–277. [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(97\)00185-0](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(97)00185-0) (1998).
- Oronsky, B. T., Knox, S. J. & Scicinski, J. Six degrees of separation: The oxygen effect in the development of radiosensitizers. *Transl Oncol.* **4**(4), 189–198. <https://doi.org/10.1593/tlo.11166> (2011).
- Djordjevic, B. & Szybalski, W. Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity. *J. Exp. Med.* **112**(3), 509–531. <https://doi.org/10.1084/jem.112.3.509> (1960).
- Gudjonsson, O. et al. Analysis of 76Br-BrdU in DNA of brain tumors after a PET study does not support its use as a proliferation marker. *Nucl. Med. Biol.* **28**(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(00\)00193-1](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(00)00193-1) (2001).
- 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.* **23**, 260–268 (1963).
- Phillips, T. L., Scott, C. B., Leibel, S. A., Rotman, M. & Weigensberg, I. J. Results of a randomized comparison of radiotherapy and bromodeoxyuridine with radiotherapy alone for brain metastases: Report of RTOG trial 89–05. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **33**(2), 339–348. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00168-X](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00168-X) (1995).
- Chomicz-Mańka, L., Rak, J. & Storonik, P. Electron-induced elimination of the bromide anion from brominated nucleobases. A computational study. *J. Phys. Chem. B* **116**(19), 5612–5619. <https://doi.org/10.1021/jp3008738> (2012).
- Cecchini, S., Girouard, S., A. Huel, M., Sanche, L. & J. Hunting, D. Interstrand cross-links: A new type of γ -ray damage in bromodeoxyuridine-substituted DNA. *Biochemistry* **44**(6), 1932–1940. <https://doi.org/10.1021/bi048105s> (2005).
- Westphal, K. et al. Irreversible electron attachment – a key to DNA damage by solvated electrons in aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.* **13**(41), 10362–10369. <https://doi.org/10.1039/c5ob01542a> (2015).
- Makurat, S., Chomicz-Mańka, L. & Rak, J. Electrophilic 5-substituted uracils as potential radiosensitizers: Density functional theory study. *ChemPhysChem* **17**(16), 2572–2578. <https://doi.org/10.1002/cphc.201600240> (2016).
- Chomicz, L. et al. How to find out whether a 5-substituted uracil could be a potential DNA radiosensitizer. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**(17), 2853–2857. <https://doi.org/10.1021/jz401358w> (2013).
- Zdrowowicz, M. et al. DNA damage radiosensitizers geared towards hydrated electrons. *Pract. Aspects Comput. Chem. V* https://doi.org/10.1007/978-3-030-83244-5_4 (2022).
- Wesolowski, S. S., Leininger, M. L., Pentchev, P. N. & Schaefer, H. F. Electron affinities of the DNA and RNA bases. *J. Am. Chem. Soc.* **123**(17), 4023–4028. <https://doi.org/10.1021/ja003814a> (2001).
- Polska, K., Rak, J., Bass, A. D., Cloutier, P. & Sanche, L. Electron stimulated desorption of anions from native and brominated single stranded oligonucleotide trimers. *J. Chem. Phys.* **136**(7), 075101. <https://doi.org/10.1063/1.3685587> (2012).
- Park, Y., Polska, K., Rak, J., Wagner, J. R. & Sanche, L. Fundamental mechanisms of DNA radiosensitization: Damage induced by low-energy electrons in brominated oligonucleotide trimers. *J. Phys. Chem. B* **116**(32), 9676–9682. <https://doi.org/10.1021/jp304964r> (2012).
- Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**(7), 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913> (1993).
- Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. Gen. Phys.* **38**(6), 3098–3100. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098> (1988).
- Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**(2), 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785> (1988).
- Hehre, W. J., Ditchfield, K. & Pople, J. A. Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.* **56**(5), 2257–2261. <https://doi.org/10.1063/1.1677527> (1972).

24. 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.* **54**(2), 724–728. <https://doi.org/10.1063/1.1674902> (1971).
25. Makurat, S., Spisz, P., Kozak, W., Rak, J. & Zdrochowicz, M. 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine as a sensitizer of x-ray induced cancer cell killing. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(6), 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms20061308> (2019).
26. Sosnowska, M., Makurat, S., Zdrochowicz, M. & Rak, J. 5-selenocyanatouracil: a potential hypoxic radiosensitizer. Electron attachment induced formation of selenium centered radical. *J. Phys. Chem. B.* **121**(25), 6139–6147. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b03633> (2017).
27. Spisz, P. et al. Why does the type of halogen atom matter for the radiosensitizing properties of 5-halogen substituted 4-thio-2'-deoxyuridines? *Molecules* **24**(15), 2819. <https://doi.org/10.3390/molecules24152819> (2019).
28. Makurat, S. et al. 5-selenocyanato and 5-trifluoromethanesulfonyl derivatives of 2'-deoxyuridine: Synthesis, radiation and computational chemistry as well as cytotoxicity. *RSC Adv.* **8**(38), 21378–21388. <https://doi.org/10.1039/c8ra03172j> (2018).
29. Spisz, P. et al. Uracil-5-yl o-sulfamate: An illusive radiosensitizer. Pitfalls in modeling the radiosensitizing derivatives of nucleobases. *J. Phys. Chem. B.* **124**(27), 5600–5613. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c03844> (2020).
30. Cossi, M., Barone, V., Cammi, R. & Tomasi, J. Ab initio study of solvated molecules: A new implementation of the polarizable continuum model. *Chem. Phys. Lett.* **255**(4–6), 327–335. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(96\)00349-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(96)00349-1) (1996).
31. Vivet Boudou, V. et al. 8-modified-2'-deoxyadenosine analogues induce delayed polymerization arrest during hiv-1 reverse transcription. *PLoS One* **6**(11), e27456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027456> (2011).
32. Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. & Blázquez-Castro, A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* **120**(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005> (2018).
33. Matsui, T. et al. Robustness of clonogenic assays as a biomarker for cancer cell radiosensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(17), 4148. <https://doi.org/10.3390/ijms20174148> (2019).
34. van Leeuwen, C. M. et al. The Alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiat. Oncol.* **13**(96). <https://doi.org/10.1186/s13014-018-1040-z> (2018).
35. Franken, N. A. Pet al cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (review). *Int. J. Oncol.* **42**(15), 1501–1515. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1857> (2013).
36. Pauwels, B. et al. The radiosensitising effect of gemcitabine and the influence of the rescue agent amifostine in vitro. *Eur. J. Cancer* **39**(6), 838–846. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(2003\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(2003)00036-6) (2003).
37. Taneja, N. et al. Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J. Biol. Chem.* **279**(3), 2273–2280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310030200> (2004).
38. Bernhard, E. J., Maity, A., Muschel, R. J. & McKenna, W. G. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression—a review. *Radiat. Environ. Biophys.* **34**(2), 79–83. <https://doi.org/10.1007/BF01275210> (1995).
39. Pawlik, T. M. & Keyomarsi, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **59**(4), 928–942. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005> (2004).
40. Fukui, K. The path of chemical reactions - the IRC approach. *Acc. Chem. Res.* **14**(12), 363–368. <https://doi.org/10.1021/ar00072a001> (1981).
41. Wong, M. W., Wiberg, K. B. & Frisch, M. Hartree-Fock second derivatives and electric field properties in a solvent reaction field: Theory and application. *J. Chem. Phys.* **95**(12), 8991–8998. <https://doi.org/10.1063/1.461230> (1991).
42. Frisch, M. J. et al. Gaussian 09, Rev. D.01. (Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2016).
43. Dennington, R., Keith, T. A. & Millam, J. M. GaussView 6. (Gaussian, 2016).

Acknowledgements

This work was supported by the Polish National Science Center (NCN) under the Program Ceus-Unisono, Grant No. UMO-2020/02/Y/ST4/0011 (J. Rak) and Department of Chemistry University of Gdańsk under the Young Scientists Research Program, Grant No. 539-T080-B985-23 (M. Datta). Calculations have been carried out using a local computer cluster.

Author contributions

Conceptualization: J.R., M.D., and M.Z. Formal analysis: M.D. and J.R. Investigation: M.D., A.S., A.C., and S.D. Methodology: M.D., A.C., A.S., and S.D. Project administration: M.D. and J.R. Resources: J.R., M.D. Supervision: J.R. Original draft preparation: M.D., J.R., A.S., A.C., S.D., and M.Z.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-025-99262-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2025

Supporting Information

Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties

Magdalena Datta,^a Adrian Szczyrba,^a Anna Czaja,^a Magdalena Zdrowowicz,^a Sebastian Demkowicz,^b Janusz Rak^{a,*}

^a Laboratory of Biological Sensitizers, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk, Poland

^b Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

*Correspondence: janusz.rak@ug.edu.pl

Purity

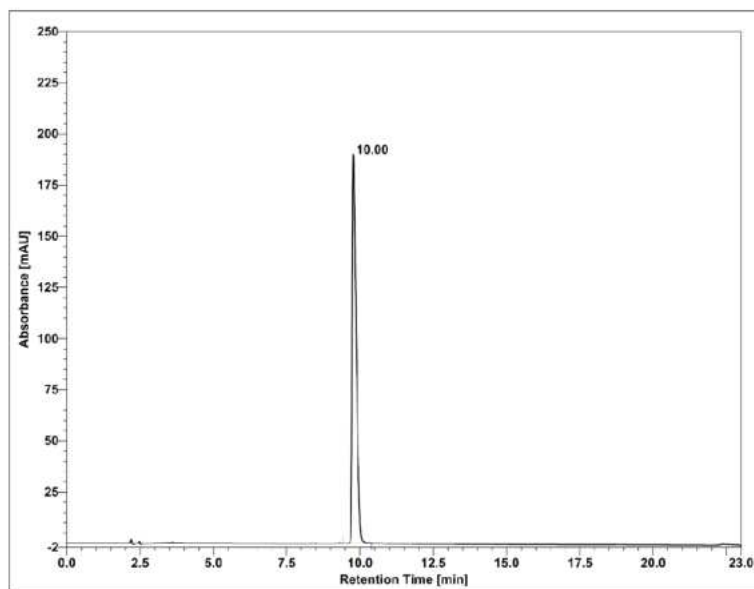


Fig S1. Chromatogram HPLC of pure dA-NHbenzylOCF₃.

Identification

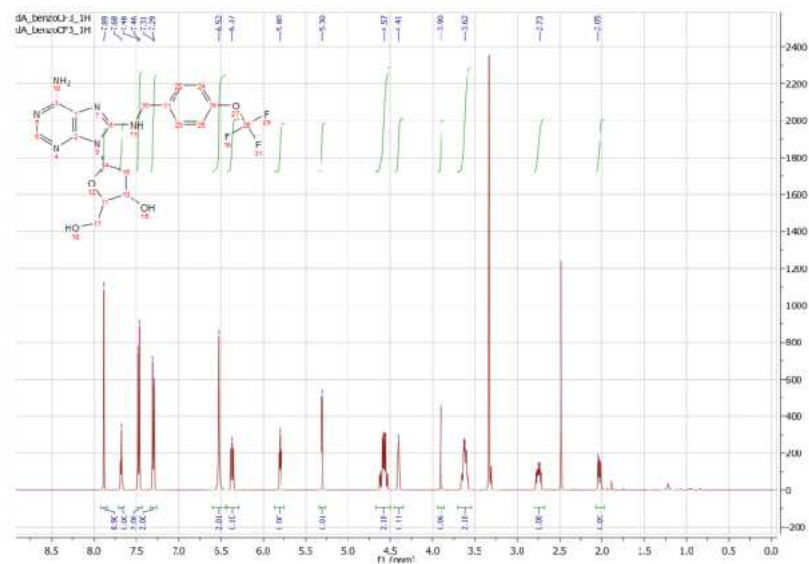


Fig S2. ^1H NMR spectrum of dA-NHbenzylOCF₃.

Table S1. Proton assignments.

Assign.	Shift (ppm)	Assign.	Shift (ppm)
CH (6)	7.89	OH (16)	5.30
NH (19)	7.68	CH ₂ (20)	4.57
Ar-H (22/24)	7.47	CH (11)	4.43-4.36
Ar-H (23/25)	7.30	CH (13)	3.93-3.86
NH ₂ (10)	6.52	CH ₂ (17)	3.67-3.54
CH (14)	6.37	CH (15)	2.73
OH (18)	5.80	CH (15)	2.05

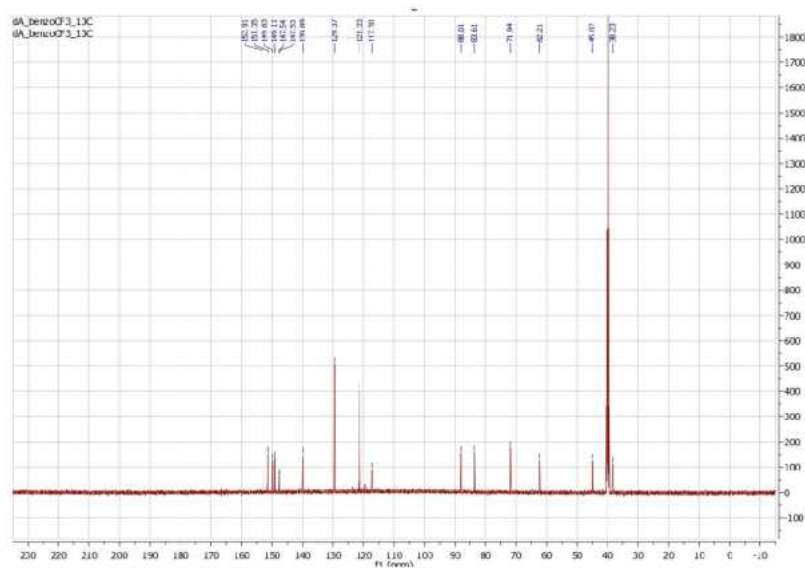


Fig S3. ^{13}C NMR spectrum of dA-NHbenzylOCF₃.

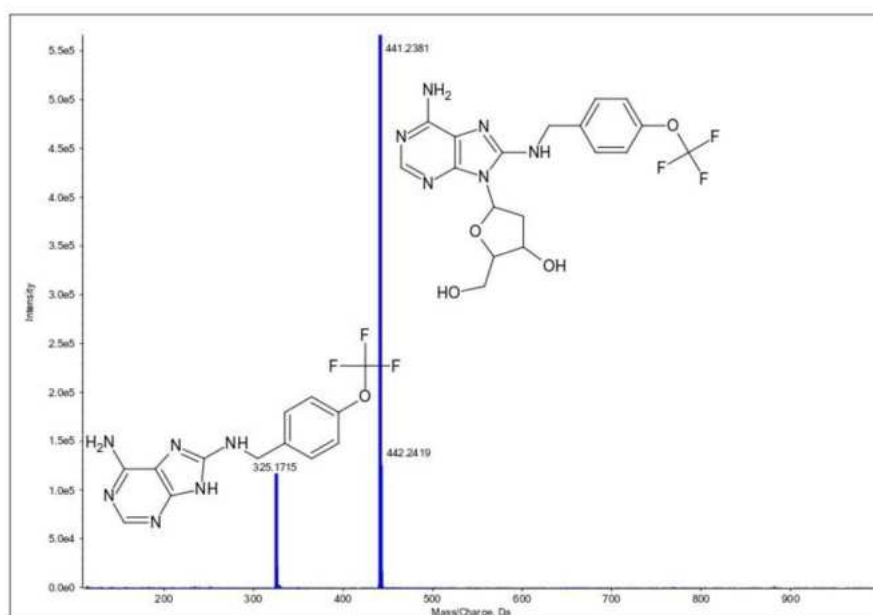


Fig S4. MS spectrum of dA-NHbenzylOCF₃ recorded in positive ionization mode. Theoretical mass $[\text{M}+1]^+ = 441.1492$ Da, experimental mass $[\text{M}+1]^+ = 441.2381$ Da.

XYZ geometries of stationary points:

Neutral

Electronic Energy: -1244.701482 Ha

C	0.083080	-0.008191	-0.186072
C	0.185660	-0.800296	0.954198
C	1.430490	-0.948684	1.567024
C	2.569088	-0.316667	1.050348
C	2.430511	0.473056	-0.098613
C	1.194498	0.636409	-0.728699
C	3.913568	-0.475681	1.724531
N	4.299210	0.782636	2.415083
C	5.507308	0.842070	3.089556
N	6.725774	0.727852	2.435818
C	7.692249	0.919202	3.404175
C	6.995081	1.156507	4.593302
N	5.628023	1.092055	4.384404
N	9.024288	0.901857	3.253731
C	9.659903	1.146157	4.407065
N	9.124470	1.384432	5.615300
C	7.778176	1.395034	5.738245
C	6.976414	0.604282	1.004354
N	7.236877	1.598276	6.970842
H	6.254350	1.820883	7.038121
H	7.839527	1.962865	7.695061
H	10.746200	1.154098	4.364056
H	6.216941	1.162725	0.454723
H	6.969228	-0.441801	0.686038
H	7.958772	1.029158	0.795868
H	3.562939	1.079919	3.049489
H	4.677034	-0.710559	0.980340
H	3.876431	-1.312071	2.434760
H	-0.698020	-1.289139	1.349630

H	1.511089	-1.567363	2.456131
H	3.298707	0.972011	-0.518600
H	1.123489	1.249143	-1.617868
O	-1.219303	0.061847	-0.716991
C	-1.521856	0.806597	-1.794088
F	-2.836456	0.670554	-2.026049
F	-1.264635	2.126342	-1.622399
F	-0.861813	0.421521	-2.914339

Anionradical

Electronic Energy: -1244.754373 Ha

C	0.278135	-0.382906	-0.323159
C	0.147303	-0.255219	1.057267
C	1.305295	-0.176517	1.833707
C	2.583341	-0.232137	1.248382
C	2.670228	-0.371097	-0.150280
C	1.524936	-0.453684	-0.941924
C	3.819142	-0.093418	2.088636
N	4.30204	1.334111	2.103821
C	5.476380	1.557540	2.879503
N	6.730569	1.255618	2.250620
C	7.631910	0.992635	3.242502
C	6.889859	1.002783	4.450517
N	5.573139	1.274997	4.227916
N	8.956068	0.799628	3.128441
C	9.556356	0.589582	4.332364
N	8.978705	0.578800	5.537554
C	7.643683	0.789191	5.625863
C	7.073642	1.545285	0.872554
N	7.035519	0.713552	6.886462
H	6.181019	1.256618	6.952493

H	7.671143	0.927440	7.647587
H	10.631870	0.429918	4.309443
H	6.162074	1.517135	0.275239
H	7.776130	0.796240	0.499384
H	7.535495	2.537686	0.773564
H	3.556609	1.933819	2.432855
H	4.634735	-0.694193	1.672801
H	3.627707	-0.448315	3.110748
H	-0.836912	-0.226901	1.512222
H	1.213575	-0.082559	2.912522
H	3.647050	-0.424782	-0.622787
H	1.592841	-0.576913	-2.017514
O	-0.890760	-0.543653	-1.115195
C	-1.477165	0.560829	-1.608747
F	-2.546622	0.178486	-2.327018
F	-1.907351	1.415920	-0.646884
F	-0.665555	1.281518	-2.422982

Transition State

Electronic Energy: -1244.753780 Ha

C	-0.000493	0.000219	0.000062
C	-0.000102	-0.000111	1.406197
C	1.265834	-0.000788	2.019437
N	2.450912	0.006681	1.392304
C	2.316503	0.008999	0.052266
N	1.180583	0.005476	-0.659631
N	-1.008877	-0.012253	2.345108
C	-0.372066	-0.059847	3.530703
N	1.022321	-0.032752	3.371248
N	-0.922663	-0.025437	4.779761
C	-0.914989	1.518390	5.518422
C	-1.815047	1.577653	6.655728
C	-3.199623	1.923906	6.497557

C	-4.097729	1.852925	7.549788
C	-3.648735	1.397335	8.807640
C	-2.302011	1.046396	9.015690
C	-1.408852	1.120598	7.958066
O	-4.548359	1.419902	9.922651
C	-5.253967	0.311966	10.173142
F	-4.485738	-0.776687	10.449776
C	2.024265	-0.152180	4.418112
N	-1.165309	0.051202	-0.736845
F	-6.033069	0.538334	11.251419
F	-6.073310	-0.059196	9.151990
H	-2.002883	-0.268255	-0.267820
H	-1.084865	-0.250972	-1.699312
H	3.239150	0.010015	-0.522957
H	1.539133	-0.540665	5.313982
H	2.480409	0.816392	4.646056
H	2.807050	-0.842902	4.095152
H	-1.915024	-0.234355	4.690320
H	0.138491	1.630848	5.774793
H	-1.194506	2.187761	4.700922
H	-5.134916	2.147143	7.418453
H	-3.549108	2.273856	5.528002
H	-0.368820	0.847395	8.122552
H	-1.973121	0.725298	9.999999

Complex

Electronic Energy: -1244.782044 Ha

C	3.731099	-1.788179	0.777481
C	3.694098	-0.391531	0.693229
C	4.488948	0.176826	-0.324782
N	5.252436	-0.494480	-1.194709
C	5.201227	-1.827391	-1.010117
N	4.497615	-2.495851	-0.088041

N	3.031126	0.573089	1.417770
C	3.41966	1.764484	0.861252
N	4.36390	1.533393	-0.217253
N	3.076631	2.997602	1.178486
C	0.231428	0.292715	-1.219349
C	-1.111269	0.008669	-0.899552
C	-1.526384	-0.178384	0.455547
C	-2.847466	-0.457584	0.774046
C	-3.787250	-0.549060	-0.256637
C	-3.431907	-0.389094	-1.599009
C	-2.110164	-0.109707	-1.915107
O	-5.119824	-0.908739	0.061354
C	-6.003085	0.077431	0.308219
F	-6.177508	0.913923	-0.744616
C	4.919322	2.561582	-1.031797
N	2.962813	-2.491798	1.693594
F	-7.188194	-0.488404	0.587592
F	-5.653238	0.856190	1.361576
H	2.691247	-1.968355	2.516542
H	3.300881	-3.423437	1.901200
H	5.804050	-2.430622	-1.684925
H	4.155488	3.167591	-1.528853
H	5.543443	2.078457	-1.785156
H	5.539521	3.224003	-0.419339
H	2.434054	2.947875	1.969526
H	0.536763	0.431431	-2.251268
H	0.986310	0.377812	-0.443715
H	-3.156140	-0.606814	1.803051
H	-0.787988	-0.103118	1.247927
H	-1.823564	0.018363	-2.954656
H	-4.184768	-0.486313	-2.373697

Isolated – anion

Electronic Energy: -561.562160 Ha

C	-0.001169	-0.034002	-0.010020
N	0.007050	-0.031181	1.336559
C	1.244459	-0.018897	1.845320
C	2.446285	-0.013729	1.105647
C	2.296976	-0.016405	-0.285976
N	1.056167	-0.025808	-0.831225
N	3.548980	0.002069	1.929315
C	3.044861	0.008367	3.202197
N	1.626450	-0.006280	3.164096
C	0.757933	-0.000393	4.322380
N	3.667451	0.024798	4.362829
N	3.386336	-0.066114	-1.144047
H	4.670250	0.033775	4.174276
H	0.944735	-0.876673	4.951091
H	0.922560	0.897638	4.926324
H	-0.277043	-0.018093	3.977199
H	4.253827	0.282757	-0.755885
H	3.200796	0.268544	-2.081492
H	-0.978994	-0.040900	-0.485872

Isolated – radical

Electronic Energy: -683.21988 Ha

F	0.000708	-0.002048	-0.001912
F	-0.000629	0.001888	2.180676
F	1.883776	-0.000159	1.101386
C	0.620977	-0.493830	1.082364
O	0.578677	-1.838057	1.010492
H	3.084777	-2.672408	1.067044
H	-0.656444	-2.667620	3.193965
C	1.172771	-2.583754	2.057427
C	2.506575	-2.982125	1.930806

C	0.380925	-2.979417	3.139229	C	2.306646	-4.197911	4.054836
H	4.102637	-4.091143	2.832734	C	2.876604	-5.004643	5.059466
C	3.066912	-3.776948	2.920248	H	3.911243	-5.324205	4.996721
C	0.943314	-3.774154	4.127472	H	2.293670	-5.323117	5.916663
H	0.338159	-4.086483	4.973216				

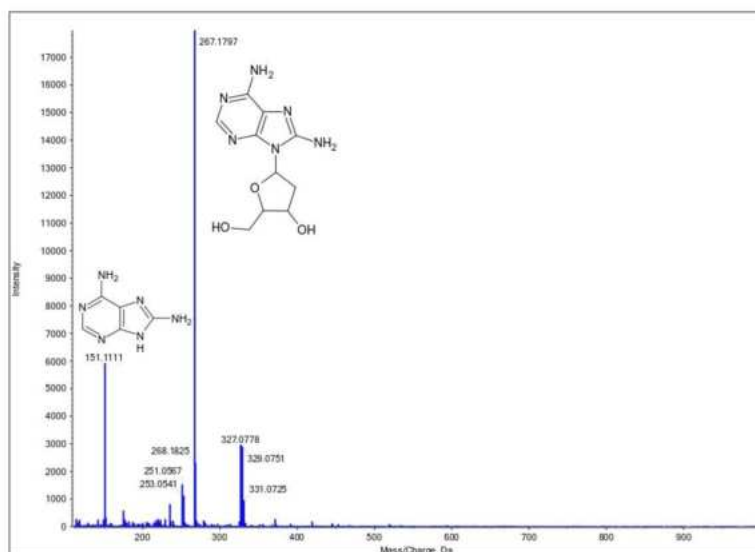


Fig S5. MS spectrum of the radiolysis product (8-amino-2'-deoxyadenosine) of the titled derivative in positive ionization mode. Theoretical mass $[M+1]^+ = 267.1200$ Da, experimental mass $[M+1]^+ = 267.1797$ Da.

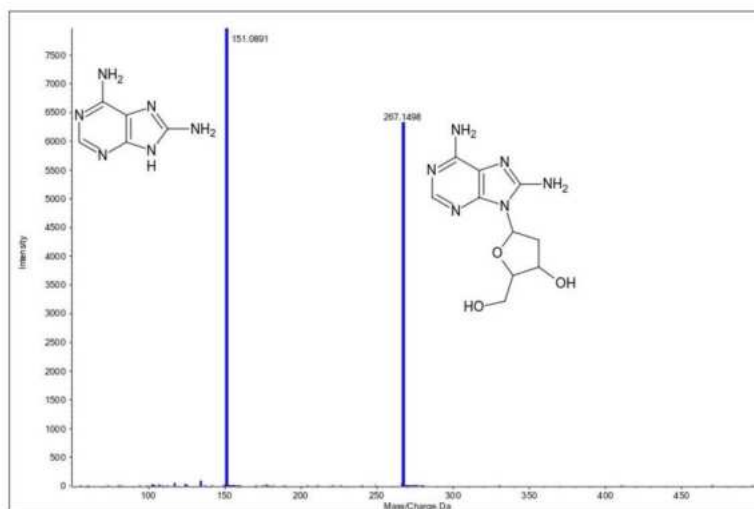
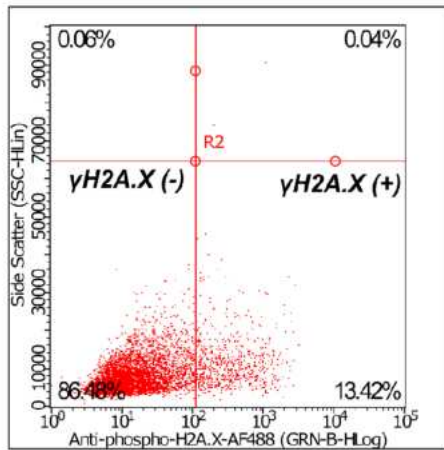


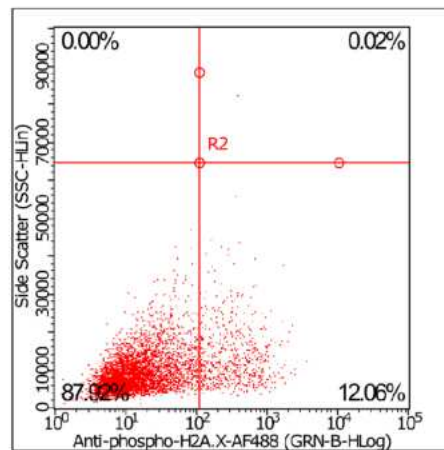
Fig S6. MSMS spectrum of the radiolysis product (8-amino-2'-deoxyadenosine) of the titled derivative in positive ionization mode.

a)

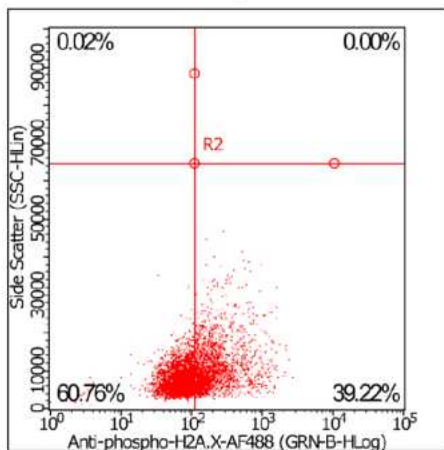
0 Gy



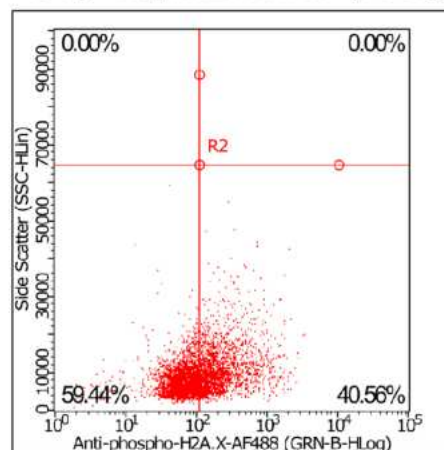
20 μ M dA-NHbenzylOCF₃



8 Gy



8 Gy + 20 μ M dA-NHbenzylOCF₃



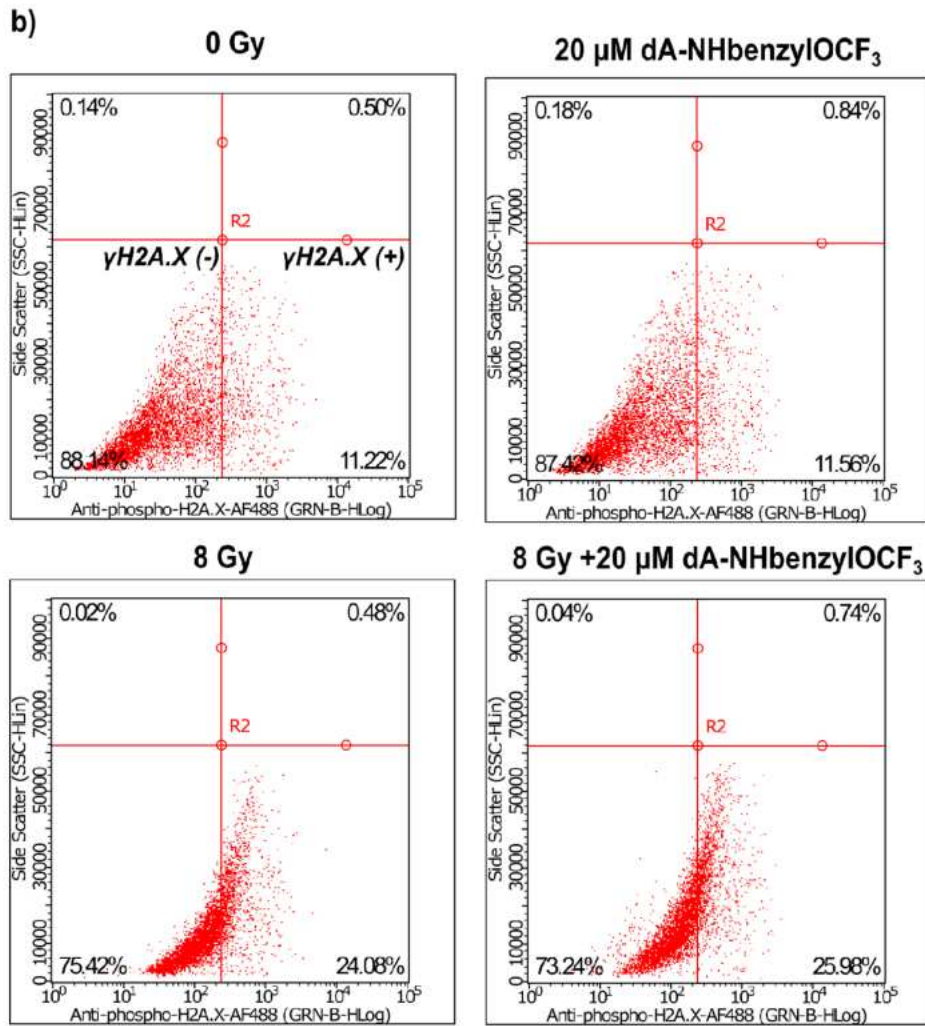


Fig S7. Cytometric analysis of H2A.X phosphorylation for a) PC3 and b) MCF-7 lines. Viable cells are selected based on the scatter plot of FSC (forward scatter) versus SSC (side scatter) to exclude cell debris and aggregates. On the bivariate dot plot of SSC versus 488 nm laser area (Alexa Fluor 488-A), γ H2A.X-positive cells are shown in the right quadrants, while γ H2A.X-negative cells are shown in the left quadrants within the control cell population. The same gating strategy is used for both treated and irradiated cells.

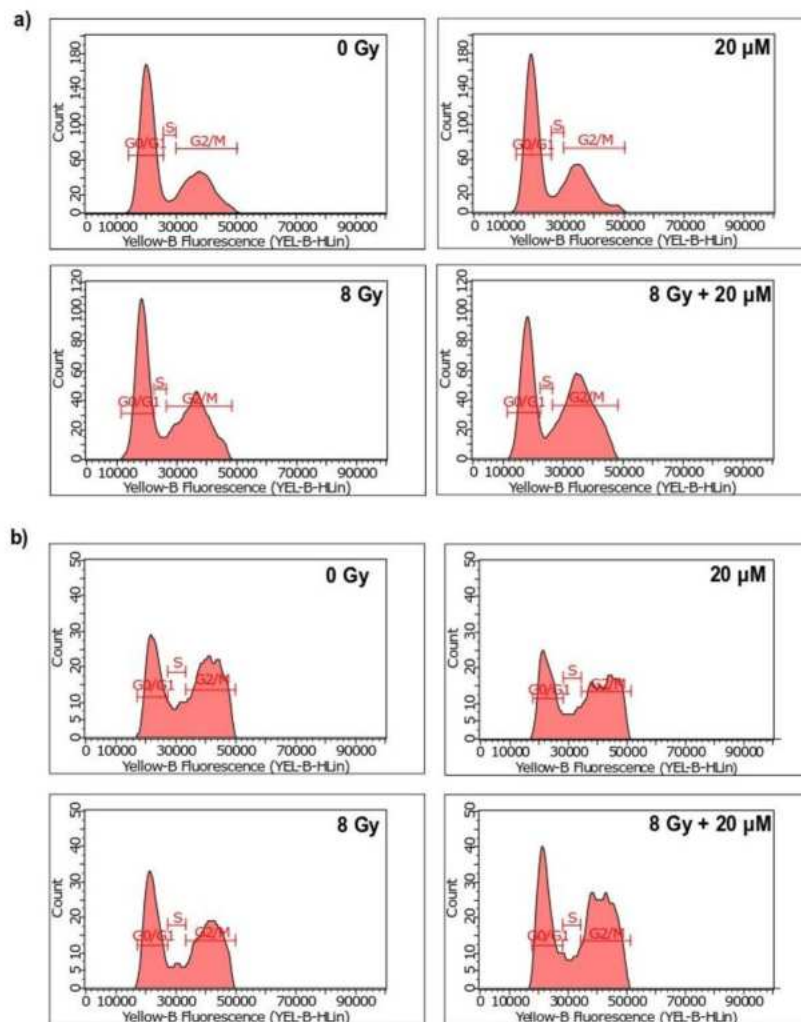


Fig S8. Impact of dA-NHbenzylOCF₃ on a) PC3 and b) MCF-7 cell cycle distribution. Cells were pretreated with the derivative for 48 hours prior to exposure to either 0 Gy or 8 Gy radiation, and the cell cycle phase distribution was analyzed using flow cytometry.

(P3) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak. "8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 299, 118094, **2025**



Research paper

8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer

Magdalena Datta^a, Adrian Szczyrba^a, Patryk Nowak^b, Magdalena Zdrowowicz^a, Michał Rychłowski^c, Sebastian Demkowicz^d, Artur Sikorski^b, Janusz Rak^{a,*}

^a Laboratory of Biological Sensitizers, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, 80-308, Gdańsk, Poland

^b Laboratory of Crystallochemistry, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, 80-308, Gdańsk, Poland

^c Laboratory of Recombinant Vaccines, Intercollegiate Faculty of Biotechnology of University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Abrahama 58, 80-307, Gdańsk, Poland

^d Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233, Gdańsk, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Radiosensitizing nucleosides

Stationary radiolysis

DEA

MTT test

Clonogenic assay

DSBs

Apoptosis

ABSTRACT

DNA damage induced by hydroxyl radicals may be insufficient to achieve optimal radiotherapy outcomes in solid tumors. To counteract this limitation, radiosensitizers are used in conjunction with ionizing radiation. In this study, we identify 8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine (dA-NHbenzylSCF₃) as a potential radiosensitizer through computational modeling. Its efficacy is further substantiated by stationary radiolysis experiments and *in vitro* studies using prostate (PC3) and breast cancer (MCF-7) cell lines. Importantly, the compound exhibits no cytotoxic effects on these cancer cells or human mammary fibroblasts (HMF). Clonogenic assay demonstrates a significant reduction in cell survival following irradiation. Flow cytometry analyses indicate that dA-NHbenzylSCF₃ enhances DNA double-strand break formation (DSBs) and induces apoptosis without perturbing cell cycle progression. Cellular uptake studies reveal its predominant cytoplasmic localization, with partial nuclear distribution. Furthermore, the compound is neither phosphorylated by cellular kinases nor incorporated into genomic DNA. These findings underscore dA-NHbenzylSCF₃ as a promising radiosensitizer for improving radiotherapy outcomes.

1. Introduction

Cancer remains the second leading cause of mortality in developed countries, following cardiovascular diseases. Solid tumors, which constitute over 80 % of cancer cases, often present a microenvironment that limits the efficacy of ionizing radiation (IR) [1] - a key modality in radiotherapy [2]. Furthermore, IR exposure can induce genomic DNA mutations, potentially leading to secondary malignancies while normal tissues are often more sensitive to radiation-induced damage than tumor cells. To overcome these challenges, the incorporation of radiosensitizing agents into radiotherapy has been proposed as a strategy to enhance tumor cell susceptibility to IR while minimizing adverse effects on surrounding healthy tissues [3,4]. One of the most well-known radiosensitizers from the group of modified nucleosides is 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) [5]. The sensitization mechanism of this derivative is likely related to the rapid reaction of the modified nucleobase with hydrated electrons, which are among the main products

of water radiolysis that occurs during cell exposure to IR [6]. The primary anions generated by electron attachment to BrdU undergo the elimination of a bromide anion, leading to the formation of the highly reactive uridine-5-yl radical (dU•) [7]. If this type of radical is generated in DNA, a secondary hydrogen atom transfer from the adjacent sugar moiety can ultimately result in DNA strand breakage [8]. BrdU enhances the sensitivity of cancer cells more than 3 times compared to control [9]. However, despite its promising radiosensitizing properties *in vitro*, the clinical application of BrdU has been hindered by its rapid metabolism and elimination from the body. The compound undergoes efficient dehalogenation by hepatic thymidylate synthase, reducing its systemic half-life to a few minutes and limiting its bioavailability in tumor cells. As a result, reaching therapeutically relevant concentrations of BrdU *in vivo* remains a significant challenge [10,11]. Therefore, despite exhibiting near-ideal radiosensitizing activity *in vitro*, BrdU is ineffective as a radiosensitizer [12]. Consequently, ongoing research is directed toward discovering novel compounds with effective radiosensitizing properties

* Corresponding author.

E-mail address: janusz.rak@ug.edu.pl (J. Rak).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118094>

Received 13 May 2025; Received in revised form 14 August 2025; Accepted 22 August 2025

Available online 22 August 2025

0223-5234/© 2025 Elsevier Masson SAS. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

in both cell-based assays and animal studies. In the current study, we present a newly synthesized purine analogue, 8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine (dA-NHbenzylSCF₃), and investigate its potential as a radiosensitizer. The research focuses on a preliminary evaluation of the compound's cytotoxic and radiosensitizing activity under normoxic conditions, which serve as a standard in vitro reference [13,14]. These results provide a foundation for future studies under hypoxic conditions to more closely mimic the tumor microenvironment and further explore the therapeutic potential of dA-NHbenzylSCF₃.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis and crystallography

The target derivative was synthesized through the reaction of 8-bromo-2'-deoxyadenosine with 4-(Trifluoromethylthio)benzylamine, where the bromine atom was replaced by the benzylamine moiety (see Fig. 1). The initial rationale for proposing this unconventional derivative was not only practical, specifically the simplicity of synthesizing the adenine modification. We employed the method outlined by Vivet-Boudou et al. [15], which involves a reaction between 8-bromo-2'-deoxyadenosine and the corresponding amine, resulting in a 2'-deoxyadenosine derivative with an 8-position substitution. Since a radiosensitizing nucleoside must be capable of capturing excess electrons, we chose to incorporate the strong electron-withdrawing -SCF₃ group in the amine. The introduction of a -CF₃ group (with a Hammett constant σ_p of 0.54 [16]) is justified not only by the high electronegativity of fluorine atoms, but also by the strong inductive effects exerted by this substituent. These properties enhance the electron affinity of the molecule and increase the stability of the leaving anion. The structure of the synthesized compound was confirmed by NMR spectroscopy (¹H NMR, ¹³C NMR, see Fig. S1–S2 in SI) and HRMS mass spectrometry (see Fig. S3 in SI), while its purity was verified via HPLC analysis (see Fig. S4 in SI). Additionally, crystallographic studies were performed to confirm the molecular structure of the synthesized derivative and to determine the crystal form of the compound (see Fig. S5 in SI), which was crystallized from a solvent system consisting of methanol and methylene chloride in a 1:1 vol ratio at 4 °C.

The X-ray analysis confirmed the expected structure of the synthesized compound. Single-crystal X-ray diffraction measurements revealed that dA-NHbenzylSCF₃ crystallizes in the hexagonal P6₄ space group with three molecules in the asymmetric unit (see Fig. 2a and Fig. 2b and Table S1).

The crystal structure consists of bihelical motifs packed parallel to each other, forming a highly ordered arrangement around the 6₄ axis. When viewed along the *c*-axis, the helices project as rings (see Fig. 3a), however, in three dimensions, they form a continuous spiral structure with fluorine atoms directed toward the center (see Fig. 3b). The

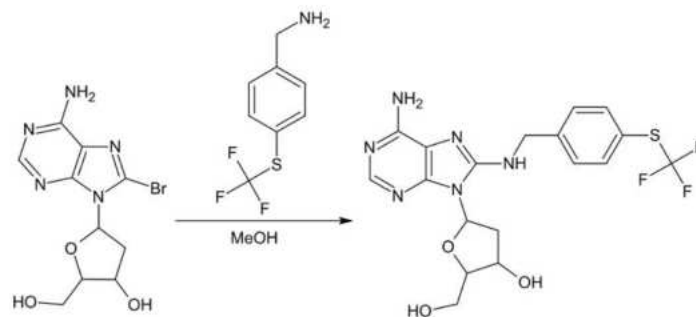


Fig. 1. Scheme of dA-NHbenzylSCF₃ synthesis.

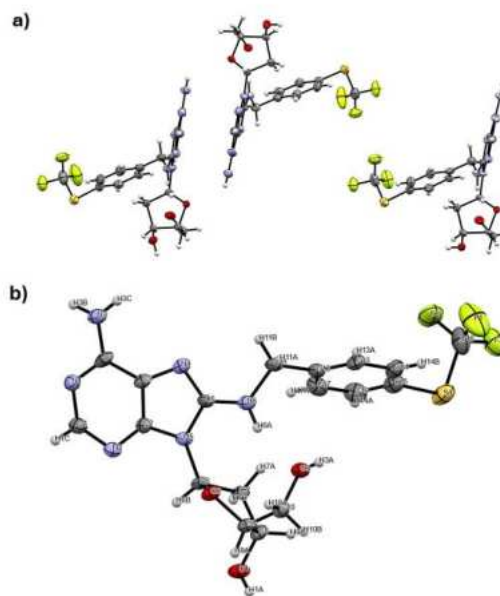


Fig. 2. The view of a) the asymmetric part of the unit cell of dA-NHbenzylSCF₃ and b) the molecular structure of one molecule of the dA-NHbenzylSCF₃ (thermal ellipsoids are shown at the 50 % probability level).

stability and cohesion of the three-dimensional framework are reinforced by a network of hydrogen bonds such as O–H...N, N–H...O, C–H...N hydrogen bonds (see Table S2) as well as π ... π stacking interactions between purine rings (see Table S3), and C–F...F–C interactions (see Table S4).

2.2. Stationary radiolysis

The studied compound was exposed to IR in an X-ray CellRad chamber (Faxitron). For this purpose, an aqueous solution of dA-NHbenzylSCF₃ at a concentration of 10^{−4} M was prepared, with the addition of tert-butanol (0.03 M) as a free radical scavenger and phosphate buffer (pH = 7) to simulate the physiological pH of the cell. The sample was purged with argon and irradiated with a dose of 500 Gy. A high radiation dose, such as 500 Gy, is essential in the stationary

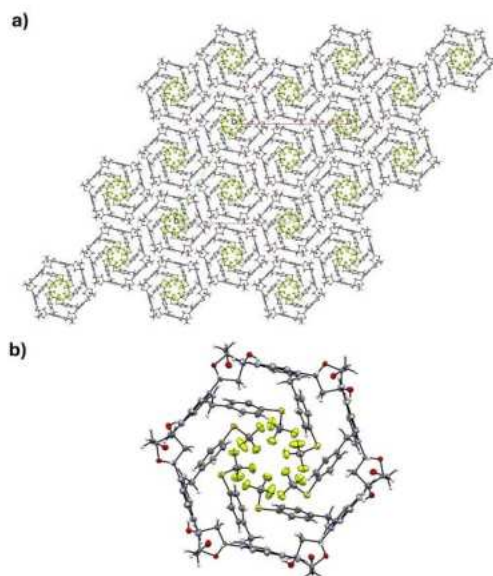


Fig. 3. Crystal packing viewed a) along the *c*-axis and b) helical structure of dA-NHbenzylSCF₃.

radiolysis of an aqueous nucleoside solution to generate a sufficient concentration of radiolysis products for reliable detection and analysis. This is particularly crucial due to the inherent detection limits of analytical techniques like LC-MS. Notably, 1 Gy of IR produces only

approximately 2×10^{-7} M of solvated electrons [17], a relatively low concentration. In contrast, cellular systems respond to much lower doses (1–10 Gy), as primary damage is amplified by biochemical processes that follow DNA damage.

The results indicate that IR led to the decomposition of the synthesized compound and the formation of four radiolysis products with retention times of 4.93 min, 7.09 min, 7.18 min, and 11.87 min (see Fig. 4). At the assumed DFT level the adiabatic electron affinity of dA-NHbenzylSCF₃ equals 44.5 kcal/mol. Since the hydration free energy of the electron amounts to 38.8 kcal/mol [18], the thermodynamic driving force for the formation of the dA-NHbenzylSCF₃ anion, due to the attachment of solvated electron is, thus, negative; hence, the anion should form spontaneously.

The radiolyte was analyzed using the LC-MS method. The radiolysis product with a retention time of 4.93 min (see Fig. 4) corresponds to the mass of [dA-NHbenzylSCF₃]-benzylSCF₃. Consequently, the C–N bond between the dA-NH residue and benzylSCF₃ group is cleaved upon electron attachment, producing a mass spectral signal at $m/z = 265.1047$ (see Fig. S6 in the SI). The fragmentation pattern of this ion, recorded by the MS/MS technique, corresponds to the transition $265.1019 \rightarrow 175.0715 \rightarrow 149.0560$, which can be explained by the following structural transformation: [dA-NHbenzylSCF₃]-benzylSCF₃ $\rightarrow$ ANHCH₂CH₂ $\rightarrow$ ANH₂ (see Fig. S7 in the SI). As indicated by the MPW1K (PCM)/6–31++G(d,p) calculations, the C–N bond cleavage in the dA-NHbenzylSCF₃ anion is associated with a kinetic barrier of 10.1 kcal/mol and thermodynamic driving force of -16.7 kcal/mol, supporting its occurrence under experimental conditions.

Another radiolysis product, with a retention time of 7.09 min (see Fig. 4), corresponds to [dA-NHbenzylSCF₃]-HF. This product results from the loss of a fluoride anion upon electron attachment, followed by the abstraction of a hydrogen atom from the sugar moiety. DFT calculations confirm these experimental findings. Indeed, the release of the fluoride anion from the dA-NHbenzylSCF₃ anion is associated with a kinetic barrier of 11.4 kcal/mol and a huge thermodynamic driving force of -94.6 kcal/mol. In the subsequent abstraction of the hydrogen

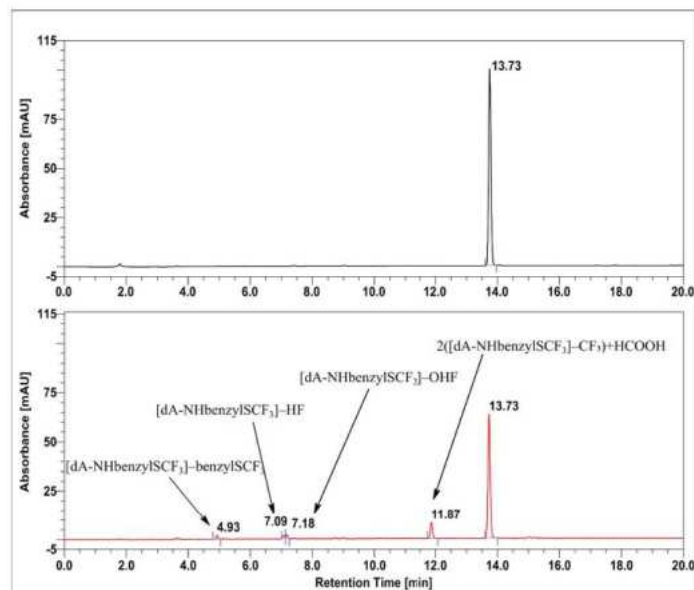


Fig. 4. HPLC analysis of dA-NHbenzylSCF₃ in water before (black line) and after irradiation with a dose equal to 500 Gy (red line).

atom, *tert*-butyl radicals produced during radiolysis, while scavenging OH radicals, are probably involved. The free energy of hydrogen atom transfer between [dA-NHbenzylSCF₃]-F and the *tert*-butyl radical amounts to -11.5 kcal/mol at the MPW1K(PCM)/6-31++G(d,p) level) which supports the postulated reaction. A biradical product of H atom transfer [dA-NHbenzylSCF₃]-HF is likely stabilized by a cyclization reaction since its $\Delta G_r = -36.1$ kcal/mol. The formation of [dA-NHbenzylSCF₃]-HF is evidenced by a mass spectral signal at $m/z = 435.1078$, detected in negative polarity (see Fig. S8 in the SI). The MS/MS fragmentation pattern of this ion follows the transition $435.1030 \rightarrow 319.0574$, suggesting the following structural transformation [dA-NHbenzylSCF₃]-HF $\rightarrow$ dA-NHCH₂CCH₂CH₃ (see Fig. S9 in the SI).

The HPLC signal with a retention time of 7.18 min is associated with [dA-NHbenzylSCF₃]-OHF. Here, upon electron attachment, the highly exergonic loss of a fluoride anion (see above) is likely followed by the S_N2-type attack of a CF₂ radical fragment (product of the loss of the F⁻ anion) on the sugar moiety, resulting in the release of hydroxyl radical and formation of a cyclic, stable [dA-NHbenzylSCF₃]-OHF molecule. DFT modeling predicts a thermodynamic driving force of 3.2 kcal/mol for this transformation. This product is observed as a mass spectral signal at $m/z = 419.1122$ (see Fig. S10 in the SI). The fragmentation pattern of this ion follows the transition $419.1107 \rightarrow 303.0647$, which corresponds to the [dA-NHbenzylSCF₃]-OHF $\rightarrow$ [dA-OH]NHCH₂CCH₂CH₃ structural transformation (see Fig. S11 in the SI).

The most intense HPLC signal, with a retention time of 13.73 min, corresponds to a dimer originating from two [dA-NHbenzylSCF₃]-CF₃ molecules linked by a disulfide bridge. This product is detected in the LC-MS analysis as an adduct with formic acid (a component of the mobile phase): 2([dA-NHbenzylSCF₃]-CF₃)⁻ HCOOH. Upon electron attachment to dA-NHbenzylSCF₃, the neutral •CF₃ radical is released leaving behind the corresponding thiol anion (see Fig. 5), which is immediately protonated at the neutral pH. The MPW1K(PCM)/6-31++G(d,p) calculations predict a kinetic barrier of only 1.2 kcal/mol for the release of the •CF₃ radical upon electron attachment to dA-NHbenzylSCF₃, with a thermodynamic driving force of -13.0 kcal/mol (see Fig. 5), which explains a substantial efficiency of this reaction. In the presence of oxidative *tert*-butanol radicals, two such thiol molecules, dA-NHbenzylSH, may form a dimer bound by a disulfide bridge. The adduct of this dimer with the formate anion is observed in the MS spectra, with a mass signal at $m/z = 819.2434$ (see Fig. S12 in the SI). The MS/MS fragmentation follows the transition $819.2434 \rightarrow 773.0845$, which corresponds to the release of the formic acid molecule (see Fig. S13 in the SI).

2.3. Cytotoxicity analysis

The compound, a potential radiosensitizer, is not expected to demonstrate inherent toxicity towards either cancerous or healthy cells. Its cytotoxic activity against cancer cells is expected to be triggered exclusively upon exposure to IR. To evaluate this, a toxicity assessment of the derivative was conducted using the MTT assay across various cell lines, including prostate cancer (PC3), breast cancer (MCF-7), and human mammary fibroblasts (HMF). The results (see Fig. 6) indicate that for the PC3 cell line, the decrease in cell viability induced by dA-NHbenzylSCF₃, in comparison to the control (cells not exposed to the derivative), was statistically significant ($p < 0.0001$) at the highest concentration of 100 μ M after both 48 and 72 h of incubation. Similarly, a concentration of 20 μ M showed a significant reduction in viability after 72 h of incubation. Specifically, for the 48-h incubation period, the 100 μ M dA-NHbenzylSCF₃ solution reduced cell viability to $71.7 \pm 4.17 \%$, while after 72 h, viability dropped to $63.2 \pm 0.7 \%$. At a concentration of 20 μ M, viability was reduced to $83.2 \pm 4.0 \%$ after 72 h. In contrast, for the MCF-7 cell line, only the 100 μ M concentration of the compound led to a reduction in cell viability across all incubation periods. After 24 h of incubation, viability was reduced to $93.0 \pm 3.0 \%$ ($p < 0.01$), after 48 h to $83.1 \pm 1.8 \%$ ($p < 0.0001$), and after 72 h to $67.7 \pm 3.0 \%$. In comparison to the HMF cell line, the tested compound significantly reduces cell viability at a concentration of 100 μ M across all incubation periods of 24, 48, and 72 h ($p < 0.0001$). At 24 h, a 100 μ M concentration reduces cell viability to $85.3 \pm 1.3 \%$; at 48 h, to $74.3 \pm 2.1 \%$; and at 72 h, to $60.8 \pm 0.9 \%$. Furthermore, after 72 h of incubation, a 20 μ M solution of dA-NHbenzylSCF₃ also results in a reduction of cell viability to $92.8 \pm 1.2 \%$ ($p < 0.01$).

2.4. Clonogenicity

One of the primary methods for confirming that a compound functions as a radiosensitizer is the clonogenic assay, which allows for the precise evaluation of sensitization to IR at the cellular level. This assay [19] assesses whether the compound influences the survival and colony-forming capacity of cancer cells following exposure to IR. In our study, we selected only cancer cells for the clonogenic assay, as they exhibit characteristics that favour radiosensitization, including rapid proliferation, impaired DNA repair, and hypoxic regions [20]. These features make them more responsive to treatment compared to healthy, slowly dividing cells such as fibroblasts (e.g., HMF). Additionally, due to differences in proliferation rates, the intracellular uptake of modified nucleosides is significantly higher in cancer cells [21]. As a result, the

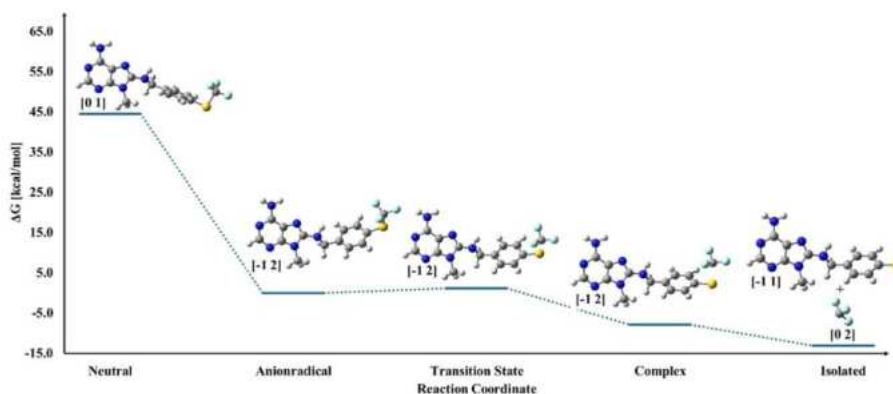


Fig. 5. DEA (in the Gibbs free energy scale) profile for dA-NHbenzylSCF₃ leading to the ([dA-NHbenzylSCF₃]-CF₃) anion.

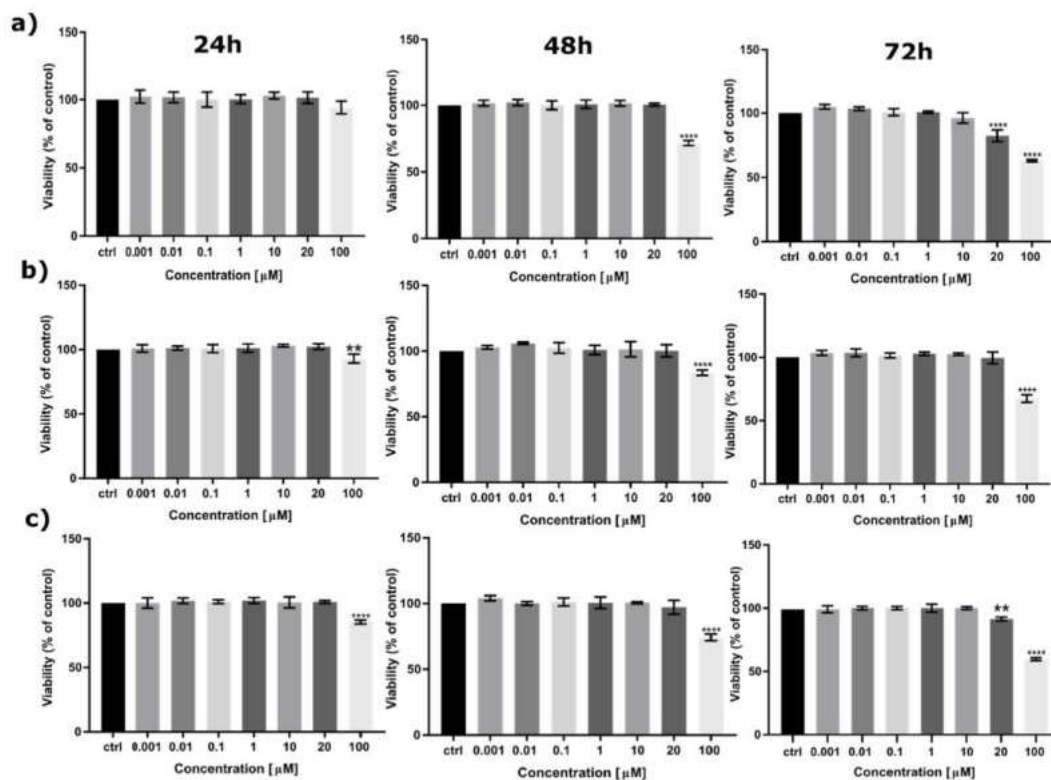


Fig. 6. The viability of a) PC3, b) MCF-7, and c) HMF cells after 24, 48 and 72 h treatment with dA-NHbenzylSCF₃. The results are shown as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. A statistically significant difference is present between treated cultures compared with control (culture treated with vehicle), ****p < 0.0001; **p < 0.01.

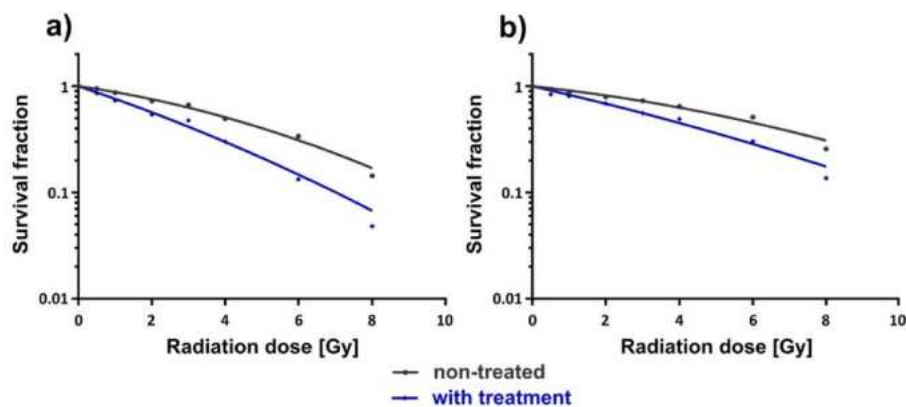


Fig. 7. Dose-response curves for reduced survival of a) PC3 cells and b) MCF-7 cells following dA-NHbenzylSCF₃ dose-dependent treatment of cultures non-treated or treated with dA-NHbenzylSCF₃ (20 μM). The results are shown as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate.

effective dose reaching healthy cells is likely much lower and difficult to quantify, making clonogenic assessment in these cells unreliable for evaluating radiosensitizing potential. Based on the cytotoxicity data, a concentration of dA-NHbenzylSCF₃ was selected that does not cause a statistically significant decrease in the viability of both PC3 and MCF-7 cells after 48 h of incubation with the derivative. Incubation with 20 μ M of this purine derivative reduced the survival of PC3 cells from 87.1 % $\pm$ 0.3 % to 73.2 % $\pm$ 0.6 % for a dose of 1 Gy, from 66.5 % $\pm$ 0.6 % to 47.8 % $\pm$ 1.0 % for a 3 Gy dose, from 33.9 % $\pm$ 1.2 % to 13.3 % $\pm$ 0.2 % for a 6 Gy dose, and from 14.4 % $\pm$ 0.4 % to 4.8 % $\pm$ 0.2 % for a 8 Gy dose. In contrast, the reduction in survival is less pronounced in MCF-7 cells compared to PC3 cells. At a radiation dose of 1 Gy, dA-NHbenzylSCF₃ reduced the survival from 88.0 % $\pm$ 1.4 % to 80.7 % $\pm$ 1.3 %, from 72.9 % $\pm$ 0.8 % to 55.8 % $\pm$ 0.4 % for a 3 Gy dose, for a 6 Gy from 51.2 % $\pm$ 1.2 % to 30.4 % $\pm$ 1.1 %, and for 8 Gy dose from 25.8 % $\pm$ 1.0 % to 13.7 % $\pm$ 0.4 %. Fig. 7 presents the survival fractions of PC3 cells (Fig. 7a) and MCF-7 cells (Fig. 7b) that were pre-incubated with the tested compound and subsequently irradiated with different doses of IR. The survival curves were used to calculate cellular radiosensitivity parameters, specifically the α coefficient (representing linear cell killing) and the β coefficient (representing quadratic cell killing), by fitting the data to the linear-quadratic model. The calculated average α and β values were as follows: 0.114 and 0.014 for untreated PC3 cells, 0.265 and 0.009 for PC3 cells treated with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃, 0.085 and 0.008 for untreated MCF-7 cells, and 0.181 and 0.005 for MCF-7 cells treated with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃. Regardless of the fitting method employed, it is important to note that dA-NHbenzylSCF₃-induced radiosensitization is primarily associated with an increase in the α linear parameter, indicating a higher occurrence of lethal events [22,23] directly induced by this derivative. This finding is consistent with our results on DSB formation, as detailed in the following section. It is also worth noting that the α value increased by a factor of 2.3 (the ratio of α for curve corresponding to cells treated with dA-NHbenzylSCF₃ and untreated one) in PC3 cells and 2.1 in MCF-7. Furthermore, the dose enhancement factor (DEF), which quantifies the increase in radiation effectiveness in the presence of dA-NHbenzylSCF₃ compared to irradiation without the radiosensitizer, was calculated as 1.70 for PC3 cells and 1.55 for MCF-7 cells. DEF was determined using the formula ($\text{DEF} = \text{ID}_{50}(-\text{treatment}) / \text{ID}_{50}(+\text{treatment})$), where ID_{50} represents the radiation dose required to achieve 50 % growth inhibition [24]. These findings indicate that the tested derivative exerts a stronger radiosensitizing effect on PC3 cells than on MCF-7 cells.

2.5. Histone H2A.X phosphorylation

DNA double-strand breaks (DSBs) represent a critical direct consequence of cellular exposure to IR. Relevant evidence indicates that DSBs are a major form of damage contributing to radiation-induced cell death [25,26]. In this study, the extent of DNA breaks was assessed by cytometric analysis of histone H2A.X phosphorylation, which serves as a marker for this type of damage. Cells were fixed 2 h after irradiation, a commonly used time point to evaluate early DNA damage responses. Since γ H2AX levels typically peak within 30 min to 2 h post-irradiation [27,28], this assay reflects the induction of DNA damage rather than its repair. As shown in Fig. 8, treatment with dA-NHbenzylSCF₃ alone did not result in a significant increase in H2A.X phosphorylation in either cell line 2 h after irradiation. However, when followed by irradiation with an 8 Gy dose, this purine derivative increased the percentage of γ H2A.X-positive cells in the PC3 cell line from 36.22 % $\pm$ 0.57 % (untreated and irradiated) to 40.79 % $\pm$ 0.66 %, and in the MCF-7 cell line from 28.72 % $\pm$ 1.81 % (untreated and irradiated) to 32.82 % $\pm$ 1.76 %. For detailed dot plots and gating strategy, refer to Fig. S14 and Table S5 in the SI.

Additionally, we analyzed the phosphorylation of the γ H2A.X histone 24 h after irradiation to assess whether the DNA damage induced by the compound is persistent and not repaired by the cellular repair mechanisms in both cancer cell lines. The results indicate that in PC3 cells, the level of γ H2A.X phosphorylation is lower after irradiation alone and irradiation combined with the compound. However, upon treatment with dA-NHbenzylSCF₃, the phosphorylation level remains sustained, showing a slight increase (from 34.61 % $\pm$ 1.18 % to 38.11 % $\pm$ 0.83 %) compared to irradiation alone. In contrast, MCF-7 cells exhibited different results, the level of γ H2A.X phosphorylation following both irradiation alone and combined treatment with the compound remained comparable to the control (untreated and non-irradiated cells), suggesting that MCF-7 cells are capable of efficiently repairing DNA damage. This observation was further supported by the return of γ H2A.X levels to baseline between 6 and 24 h post-irradiation [29]. This could be attributed to their proficient DNA repair machinery, including an active homologous recombination (HR) pathway and the presence of functional p53 protein, which can arrest the cell cycle and promote DNA repair processes. For statistical analysis, detailed dot plots and gating strategy, refer to Fig. S15 in the SI.

2.6. Immunofluorescence microscopy

To validate the results obtained from the cytometric assay for γ H2A.X, a microscopic immunofluorescence analysis of γ H2A.X foci was also

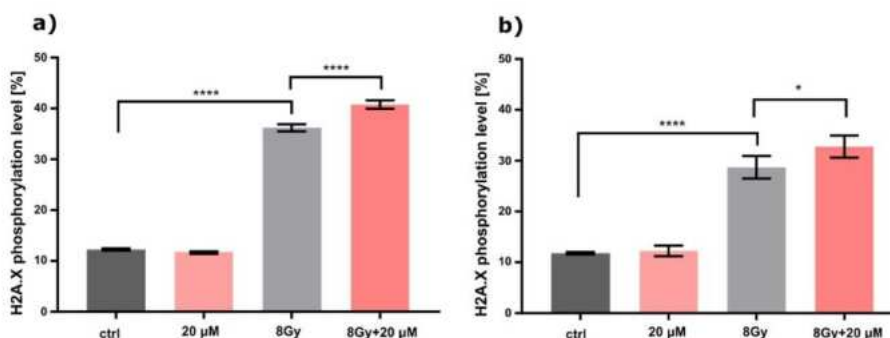


Fig. 8. Flow cytometric analysis of histone H2A.X phosphorylation for a) PC3 and b) MCF-7 cell lines. The experiment was conducted 2 h after irradiation with an 8 Gy dose. Data are expressed as the mean $\pm$ SD from three independent experiments, each conducted in triplicate. Statistically significant difference between the positive compared groups is indicated as * p < 0.05; **** p < 0.0001.

performed, as this method is considered more sensitive for detecting DNA damage. The analysis was conducted 2 h after irradiation of PC3 and MCF-7 cells with doses of 4 Gy and 8 Gy. In PC3 cells, the combination of 4 Gy irradiation with dA-NHbenzylSCF₃ led to an increase in the number of γ H2A.X foci from 30.15 ± 2.16 to 37.05 ± 4.67 ($p < 0.05$). A higher radiation dose of 8 Gy in combination with the compound further increased the number of foci from 42.38 ± 2.87 to 51.60 ± 2.49 ($p < 0.01$), compared to irradiation alone (Fig. 9a). Similarly, in MCF-7 cells, a comparable trend was observed (Fig. 9b), although the overall number of γ H2A.X foci was slightly lower, which may indicate

more efficient DNA damage repair mechanisms in this cell line. Treatment with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ combined with 4 Gy increased the number of foci from 20.25 ± 3.68 to 29.80 ± 2.49 , while the combination with 8 Gy increased foci from 32.30 ± 1.25 to 40.10 ± 1.50 . In both cases, the differences were statistically significant ($p < 0.05$).

Similarly to the flow cytometry assay, immunofluorescence staining was also performed 24 h after irradiation for both cell lines. The results were consistent with those obtained by flow cytometry, showing a decrease in the number of γ H2A.X foci per nucleus in both cell lines, with only a minor effect observed following treatment with the

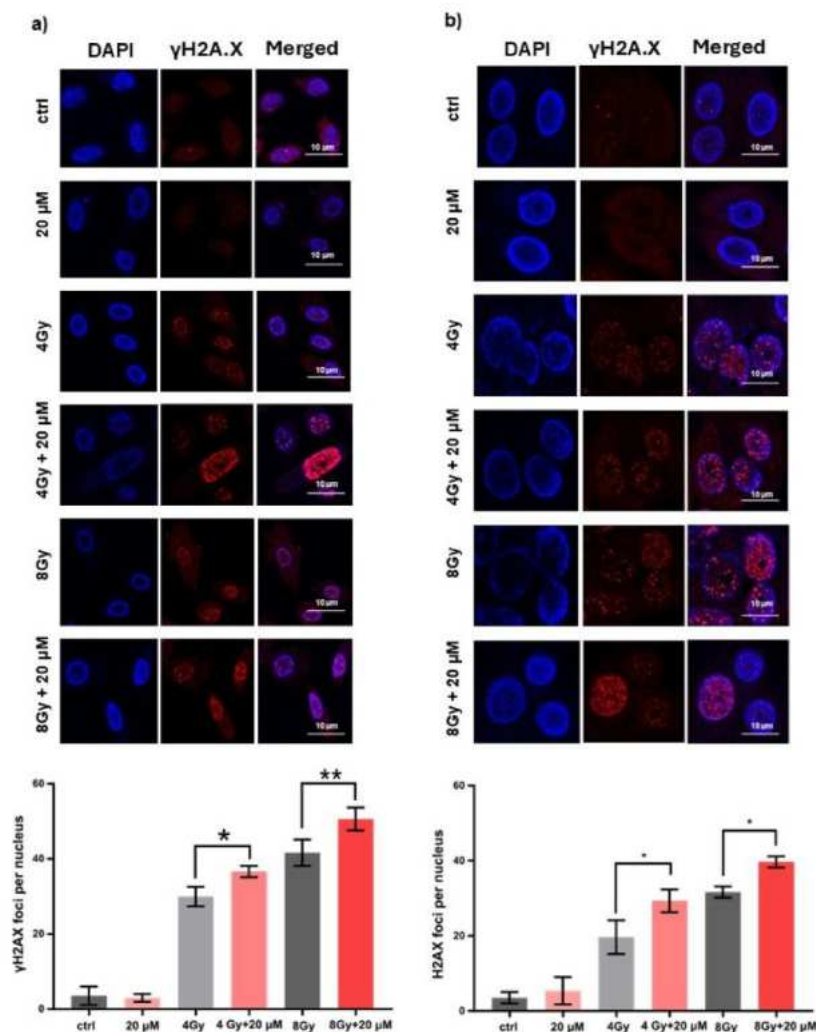


Fig. 9. Representative images of γ H2A.X foci visualized by immunofluorescence staining in a) PC3 cells and b) MCF-7 cells. The experimental groups included: control (untreated and unirradiated), treatment with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃, irradiation with 4 Gy, treatment with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ combined with 4 Gy of IR, irradiation with 8 Gy, and treatment with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ combined with 8 Gy of IR. Nuclei were counterstained with DAPI (left panels) to visualize cellular morphology. Quantification of γ H2A.X foci was performed and expressed as the number of foci per nucleus. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical significance was indicated as ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$. Scale bar = 10 μ m.

compound (see Table S6 in the SI). While flow cytometry showed that the mean cellular γ H2A.X signal in MCF-7 returned close to baseline after 24 h (Fig. S15), quantitative foci analysis still detected a small but significant residual increase in the number of discrete γ H2A.X foci (Table S6). This apparent discrepancy reflects the different readouts and sensitivities of the two assays: flow cytometry integrates global γ H2A.X intensity per cell and becomes less sensitive to sparse, low-intensity lesions at late time points, whereas microscopy resolves individual foci and thus can capture residual, punctate damage [30]. Notably, both approaches consistently indicate a marked decline from 2 h to 24 h and only a minor effect of dA-NHbenzylSCF₃ after 24 h in MCF-7.

These findings suggest that dA-NHbenzylSCF₃ potentiates radiation-induced DNA damage in both PC3 and MCF-7 cells, with a stronger effect in the more radiosensitive PC3 line. The more pronounced and sustained increase in γ H2A.X foci at early time points, particularly after higher radiation doses, indicates that the compound may impair DNA repair processes, thereby enhancing the cytotoxic impact of ionizing radiation.

2.7. Cell cycle analysis

To further elucidate the mechanism of action of the title derivative, a cytometric assay was performed to evaluate the effects of dA-NHbenzylSCF₃ on cell cycle distribution following pre-irradiation of cells with an 8 Gy dose (see Fig. 10). Cell cycle analysis in PC3 cancer cells demonstrated that a 20 μ M concentration of dA-NHbenzylSCF₃ decreased the G2/M phase population from 31.27 % $\pm$ 0.39 % to 26.77 % $\pm$ 0.78 % and increased the G0/G1 phase population from 64.31 % $\pm$ 0.41 % to 69.65 % $\pm$ 0.84 %, compared to the untreated and unirradiated cells (statistically significant, $p < 0.0001$). The combined treatment of irradiation and dA-NHbenzylSCF₃ further reduced the G2/M phase population from 39.54 % $\pm$ 1.93 % to 34.79 % $\pm$ 0.62 % and elevated the G0/G1 phase population from 56.93 % $\pm$ 1.92 % to 62.45 % $\pm$ 0.83 % ($p < 0.0001$). Notably, in PC3 cells, radiation alone increased the proportion of cells in the G2/M phase, the most radiosensitive cell cycle phase, compared to controls. In contrast, in the MCF-7 cell line, combined treatment with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ and 8 Gy irradiation decreased the G0/G1 phase population from 50.98 % $\pm$ 2.62 % (irradiated only) to 41.40 % $\pm$ 0.02 %, while increasing the S phase population from 9.00 % $\pm$ 0.44 % to 12.85 % $\pm$ 1.15 % and the G2/M phase population from 41.21 % $\pm$ 1.01 % to 45.75 % $\pm$ 1.13 %. Interestingly, treatment with the derivative alone also increased the G0/G1 phase population from 57.21 % $\pm$ 0.55 % to 60.54 % $\pm$ 0.75 % compared to

the control (untreated and unirradiated cells) in the MCF-7 line.

These findings suggest that the title derivative does not significantly impact cell cycle distribution in the PC3 cell line, as evidenced by an increase in the G0/G1 phase following treatment with the derivative alone or in combination with IR. On the other hand, the increase in S and G2/M phase populations observed in the MCF-7 cell line after treatment with the derivative and subsequent irradiation is somewhat unexpected. Although the increase is statistically significant ($p < 0.0001$), there is no clear cell cycle arrest in either phase that would lead to a substantial rise in the S and G2/M populations. Therefore, based on these data, it can be concluded that the mechanism of action of dA-NHbenzylSCF₃ is unlikely to involve cell cycle regulation in PC3 and MCF-7 cell lines.

2.8. Cell death analysis

To evaluate cell death following combined treatment with radiation and dA-NHbenzylSCF₃, flow cytometry analysis was performed using MitoSense Red/7-Aminoactinomycin-D (7-AAD) staining, as well as 7-AAD/Annexin V. MitoSense Red is a mitochondrial dye that accumulates within mitochondria and serves as an indicator of changes in mitochondrial membrane potential. It is a crucial marker of mitochondrial dysfunction and is considered an early hallmark of apoptosis. Additionally, Annexin V is a calcium-dependent phospholipid-binding protein with a high affinity for phosphatidylserine (PS), which is located in the outer leaflet of the cell membrane and serves as one of the early markers of apoptosis. In the other hand, 7-AAD is a viability dye that detects changes in cell membrane permeability, which typically occur at later stages of apoptosis as well as in necrotic cells. Thus, the accumulation of MitoSense Red and Annexin V in cells, and the staining with 7-AAD allow for the differentiation of viable, apoptotic (early or late), and dead cells. Cell death was analyzed only on PC3 cancer cells, because MCF-7 cells exhibit resistance to apoptosis. Primarily, they lack functional caspase-3 due to a 47-base pair deletion in exon 3 of the CASP3 gene, which results in the formation of a premature stop codon and prevents the synthesis of full-length caspase-3, a key effector in the apoptotic pathway [31]. Furthermore, MCF-7 cells often display over-expression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-xL, leading to the attenuation of the mitochondrial apoptosis pathway [32]. Combined treatment of PC3 cells with dA-NHbenzylSCF₃ and radiation decreased the viable cell population from 87.40 % $\pm$ 0.10 % to 86.92 % $\pm$ 0.10 % compared to the control population (non-treated or irradiated) and increased apoptotic cells from 2.05 % $\pm$ 0.23 % to 5.36 % $\pm$ 0.06 %, as well as dead cell population from 2.05 % $\pm$ 0.23 % to 5.36 % $\pm$ 0.06 %

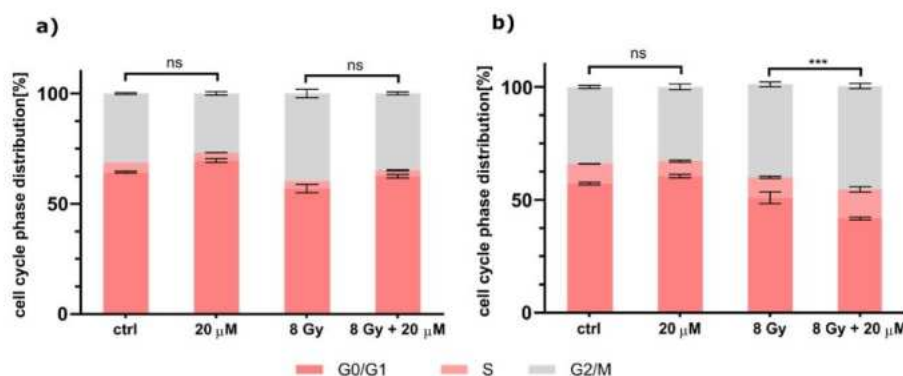


Fig. 10. Quantitative analysis of cell cycle distribution for a) PC3 and b) MCF-7 cell lines (for histograms see Fig. S16 in SI). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Statistical significance in the G2/M phase populations between groups is denoted as *** $p < 0.001$.

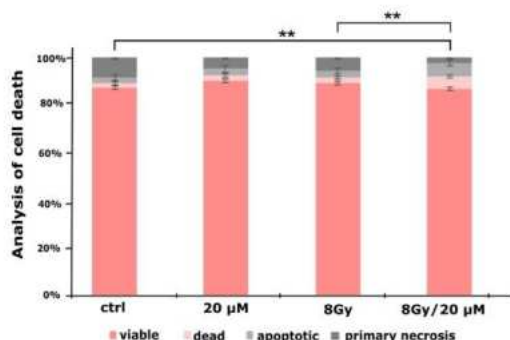


Fig. 11. Quantitative analysis of PC3 cell death. Plots show the percentage of positive cells for apoptosis and cell death. The results are shown as the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. The statistically significant difference in populations of both apoptotic and dead cells is present at $^{**}p < 0.01$. For dot plots provide a comparison of 7-AAD vs. Annexin V see Fig. S18 in SI.

(see Fig. 11). Additionally, the conducted analysis distinguished that, in comparison to the control, the combined action of IR and the tested compound increased cell population in early apoptosis only to a very small extent (from $3.78\% \pm 0.16\%$ to $4.43\% \pm 0.06\%$), and increased cells being in late apoptosis from $1.55\% \pm 0.03\%$ to $2.07\% \pm 0.19\%$ (see Fig. S17 in the SI). It is worth noting that the applied 72-h incubation protocol (48 h with the compound followed by 24 h post-irradiation) allows for the detection of early and intermediate stages of cell death, although it does not necessarily result in a marked decrease in overall cell viability, particularly when cells remain in early apoptotic stages or have not yet been cleared. Nevertheless, the observed increase in apoptotic and dead cell populations indicates a consistent and biologically significant cytotoxic effect, supporting the hypothesis of a potential synergistic interaction between the tested compound and ionizing radiation. These findings justify further long-term and mechanistic studies to fully elucidate the extent and nature of the compound's cytotoxic activity.

2.9. Subcellular localization of dA-NHbenzylSCF₃

The next experiment aimed to determine whether the nucleoside enters the cell and to investigate its subcellular localization. To achieve this, a cell fractionation assay was conducted to isolate cytoplasmic and nuclear fractions and then analyzed via LC-MS method. Detection was carried out in negative ionization mode using the product ion scan, where an ion at m/z 455 was identified, corresponding to the mass of dA-NHbenzylSCF₃. The results confirmed the presence of a peak corresponding to dA-NHbenzylSCF₃ in both the cytoplasmic (see Fig. 12a) and nuclear (see Fig. 12b) fractions, demonstrating that the radiosensitizer enters the cell and is distributed across both compartments. By analyzing the peak areas corresponding to dA-NHbenzylSCF₃ in both fractions and a standard nucleoside solution at a concentration of 10^{-4} M, along with the known final volumes of each fraction, the molar ratio of the derivative in the cytoplasmic and nuclear fractions was determined. At a concentration of $20 \mu\text{M}$, the ratio of dA-NHbenzylSCF₃ in the cytoplasmic to nuclear fraction was 3.5:1, whereas at $100 \mu\text{M}$, it was 5.3:1. These findings indicate a higher accumulation of the derivative in the cytoplasmic fraction, suggesting that the compound predominantly localizes in the cytoplasm. Additionally, it was hypothesized that the nucleoside might undergo partial phosphorylation under cellular conditions. To test this, the presence of mono-, di-, and tri-phosphorylated forms of dA-NHbenzylSCF₃ was investigated using selected-ion

monitoring mode in MS. However, no signals corresponding to phosphorylated derivatives were detected. To further verify this finding, the cytoplasmic and nuclear fractions were subjected to enzymatic digestion using the Nucleoside Digestion Mix Kit, which hydrolyzes nucleotides into nucleosides. Subsequent LC-MS analysis in extracted ion chromatogram (XIC) mode revealed that the peak areas of dA-NHbenzylSCF₃ remained unchanged compared to undigested samples. These results confirm that the compound remains in its unphosphorylated form within the cell.

2.10. DNA digestion

The absence of phosphorylated forms of dA-NHbenzylSCF₃ suggests that the compound is not incorporated into cellular DNA. To verify this hypothesis, genomic DNA was enzymatically digested into nucleosides. The resulting nucleoside mixture was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the extent of derivative incorporation. Additionally, a standard nucleoside solution (MIX) containing dA, dG, dC, T, and dA-NHbenzylSCF₃, each at a concentration of 10^{-4} M, was prepared for comparison. The results (see Fig. S19 in the SI) revealed no detectable peak corresponding to dA-NHbenzylSCF₃ (retention time: 20.61 min in the reference standard) in DNA extracted from cells incubated with the compound. This indicates that dA-NHbenzylSCF₃ is not incorporated into the genomic DNA of PC3 cancer cells, at least not beyond the detection limit of HPLC. Moreover, LC-MS analysis was performed in the selected ion mode, with the MS detector targeted to identify the anion at m/z 455.1111 corresponding to the mass of dA-NHbenzylSCF₃ in the negative ionization mode. A reference mixture containing dA-NHbenzylSCF₃ was used for comparison. The absence of this mass in the treated samples further validated the results obtained from HPLC analysis.

3. Conclusion

In summary, we chemically synthesized a novel 2'-deoxyadenosine derivative with a (4-Trifluorothio)benzylamine substituent at the 8-position. The electron-withdrawing effect of this substitution enhances the nucleoside's electron affinity, facilitating the electron attachment process. Additionally, radiation studies utilizing IR indicate the degradation of the title compound and the formation of four radiolysis products upon irradiation, which was further confirmed by the quantum chemically calculated DEA profile for this derivative.

In vitro studies demonstrate the low toxicity of dA-NHbenzylSCF₃ toward three model cell lines: prostate cancer, breast cancer, and human mammary fibroblasts. These findings support the classification of this derivative as a potential radiosensitizer and justify subsequent *in vivo* studies. To further investigate the compound's mechanism of action, flow cytometry analyses were conducted, revealing a statistically significant increase in double-strand breaks (DSBs) compared to IR alone, as indicated by H2A.X histone phosphorylation. This observation was further supported by γ H2AX immunofluorescence staining, which demonstrated a higher number of DNA damage foci per nucleus after combined treatment with the derivative and ionizing radiation, in comparison to radiation treatment alone. Additionally, the tested compound increased apoptotic cell population (early and late apoptosis) and dead cells after using IR, compared to the control (untreated and unirradiated cells). Moreover, flow cytometry analysis demonstrated that the derivative does not significantly affect cell cycle regulation in PC3 and MCF-7 cell lines, as no clear cell cycle arrest was observed despite statistically significant changes in phase distribution in the case of the MCF-7 line. Thus, the primary mechanism of dA-NHbenzylSCF₃ appears to be associated with the induction of DNA double-strand breaks and apoptosis. We also established that the compound enters cells and localizes predominantly in the cytoplasm, although its presence was also detected in the nuclear compartment. Additionally, the compound is neither phosphorylated by cellular kinases nor incorporated into DNA.

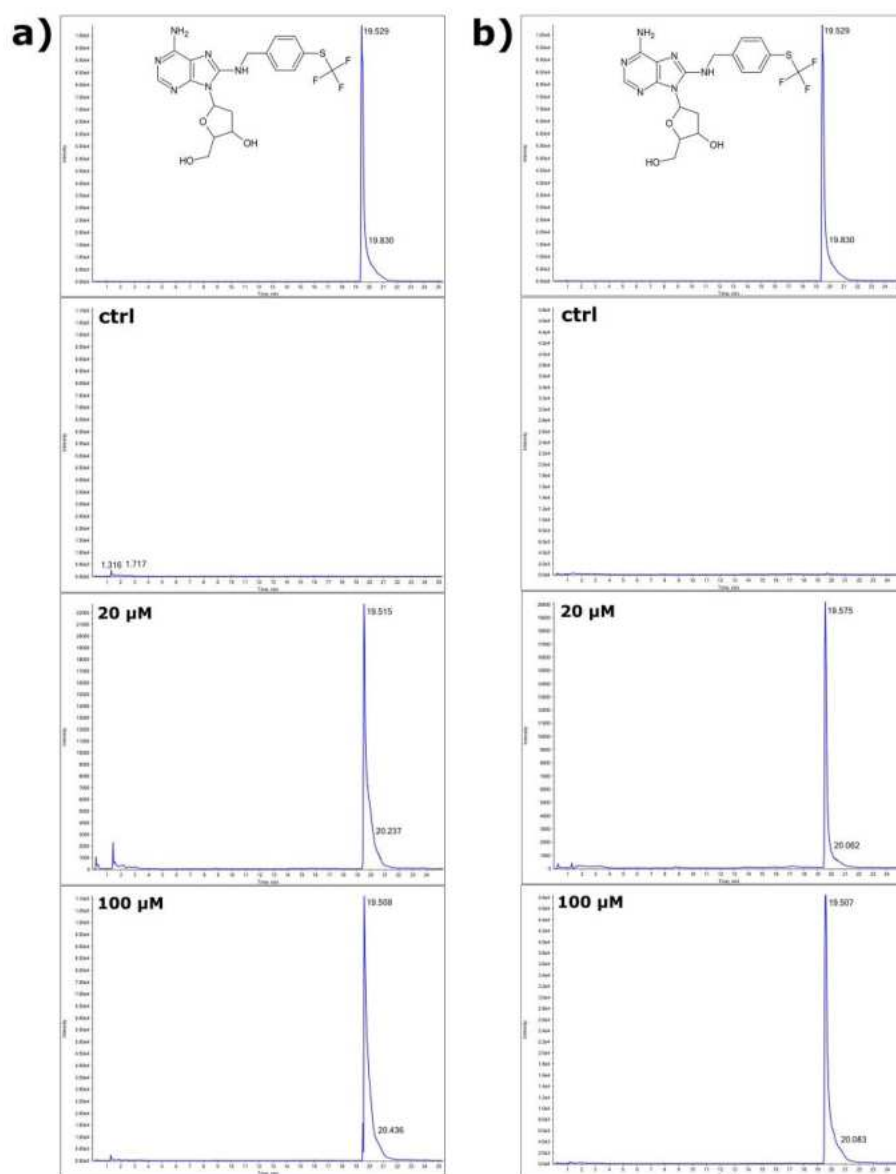


Fig. 12. XIC chromatograms of a) cytoplasmic and b) nuclear fractions. ctrl – untreated sample (control); 20 μM – sample with addition of 20 μM of tested compound; 100 μM – sample with addition of 100 μM of tested compound.

To further enhance the radiosensitizing properties of this class of compounds, ongoing studies in our laboratory focus on adenosine derivatives featuring alternative electron-withdrawing substituents in the aminobenzyl group at the 8-position of the nucleoside.

4. Experimental and theoretical section

4.1. Reagents and materials

8-bromo-2'-deoxyadenosine (Sigma-Aldrich), 4-(Trifluoromethylthio) benzylamine (Sigma-Aldrich), methanol (Sigma-Aldrich), methylene chloride (StanLab), F12k medium (Thermo Fisher), RPMI medium

(Thermo Fisher), distilled water (Thermo Fisher), PBS pH 7.2 (10x) (Thermo Fisher), accutase solution (Sigma-Aldrich), fetal bovine serum (Thermo Fisher), dimethyl sulfoxide for molecular biology (Sigma-Aldrich), glutaraldehyde solution 25 % in H₂O (Sigma-Aldrich), crystal violet solution (Sigma-Aldrich), MTT salt (VWR), Guava Cell Cycle Reagent (Cyttek), Guava Histone H2A.X Phosphorylation Assay Kit (Cyttek), Guava MitoDamage Kit (Cyttek), dimethyl sulfoxide (POCH).

4.2. Synthesis

To a spherical round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer 8-bromo-2'-deoxyadenosine (0.24 g, 0.73 mM), 4-(Trifluoromethylthio)benzylamine (1.20 g, 5.80 mM) and methanol (12 mL) were added and refluxed for 28 h. Then, the mixture was evaporated under reduced pressure and purified using column chromatography (Flash system) on a solid phase. The program was set to the linear gradient of 0–35 % of phase B, where A – methylene chloride, B – methanol. Detection was done at 260 and 280 nm. Yield 30 %. ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 7.89 (s, 1H); 7.73 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H); 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H); 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H); 6.52 (s, 2H); 6.38 (dd, *J* = 9.2, 5.8 Hz, 1H); 5.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H); 5.31 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H); 4.69–4.55 (m, 2H); 4.41 (dd, *J* = 5.7, 3.3 Hz, 1H); 3.91 (q, *J* = 2.4 Hz, 1H); 3.69–3.57 (m, 2H); 2.76 (ddd, *J* = 12.8, 9.3, 5.8 Hz, 1H), 2.08–2.01 (m, 1H). ¹³C NMR: 152.9; 151.4; 149.9; 149.1; 144.4; 136.7; 128.9; 121.3; 117.3; 88.0; 83.7; 71.9; 62.2; 45.2; 38.3. HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₁₀H₁₉F₃N₆O₃S 455.1118, found 455.1111 [M – H]⁺ (see Figs. S1–S3 in SI); C₁₀H₁₉F₃N₆O₃S, needles; hexagonal; space group P6₃ (No. 172), *a* = 31.6495(6), *b* = 31.6495(6), *c* = 10.1666(2) Å, *V* = 8819.4(4) Å³, *Z* = 18, ρ_{calc} = 1.547 g cm^{−3}, Mo-K α radiation (λ = 0.71073 Å), μ = 0.229 mm^{−1}, F(000) = 4248, T = 120(2)K (Table S1).

All compounds are >95 % pure by HPLC.

4.3. Apparatus

HPLC analyses were determined by reversed-phase RP-HPLC high-performance liquid chromatography, using a Dionex Ultimate 3000 chromatograph (Thermo Scientific) and a Wakopak Handy ODS analytical column (150 × 4.6 mm). The mobile phase was a system of solvents A and B, applied in a 20-min gradient of 0–70 % phase B, where: A - 0.1 % HCOOH and 0.1 % ACN in water; B - 80 % ACN. The volumetric flow rate of eluents was 1 mL/min. Detection was carried out at a wavelength of 280 nm. NMR spectra were measured in DMSO-*d*₆ using a 500 MHz spectrometer (Varian Unity Inova). The HRMS and MS/MS measurements were performed using TripleTOF 5600+ (SCIEX, Framingham, MA, USA) high-resolution mass spectrometer coupled to UPLC system (Nexera X2, Shimadzu, Canby, OR, USA). Experiment of stationary radiolysis and cell irradiation experiments in biological tests were conducted by CellRad X-ray cabinet (Faxitron, X-ray Corporation, Tucson, AZ, USA). The absorbance was measured using an EnSpire microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Cell colonies were counted with using automated colony counter (GelCount Oxford Optonix). Cytometric tests were performed by flow cytometer (Guava easyCyte 12, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Crystallographic measurements were conducted on an STOE IPDS II diffractometer with Mo K α (λ = 0.71073 Å) radiation. Crystal images were captured using a Discovery Femto Polar Digital Microscope with a 3 MP Digital Camera (Optimus Prime, Levenhuk, US). Immunofluorescence imaging was performed using a Leica TCS SP8X confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.4. Crystallography

The crystallization of the obtained compound was carried out using a solvent system of methanol and methylene chloride in a 1:1 vol ratio at 4 °C. The process employed the slow evaporation method over three days, resulting in the formation of colorless, saber-shaped crystals. A

good quality single crystal of dA-NHbenzylSCF₃ has been selected for the X-ray diffraction experiments at T = 120(2)K (see Table S1). It was mounted with epoxy glue at the tip of a glass capillary. The diffraction data were collected on an STOE IPDS II diffractometer with Mo K α (λ = 0.71073 Å) radiation. Data collection and image processing was performed with X-Area 1.75 (STOE & Cie GmbH, 2015) [33]. The structural resolution procedure was carried out using the SHELX package [34]. The structure was solved with direct methods that carried out refinements by full-matrix least squares on F² using the SHELXL-2017/1 program [34]. A hydrogen atom bound to the aromatic carbon atom was placed geometrically and refined using a riding model with C–H = 0.93 Å and U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(C). All hydrogen atoms bound to nitrogen atoms were placed geometrically and refined freely with U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(N). All interactions were calculated using the PLATON program [35]. The ORTEP II [36], PLUTO-78 [37], and Mercury [38] programs were used to prepare the molecular graphics.

Full crystallographic details of the title compound have been deposited in the Cambridge Crystallographic Data Center (Deposition No. CCDC 2434569), and they may be obtained from <http://www.ccdc.cam.ac.uk> (email deposit@ccdc.cam.ac.uk or The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, U.K.).

4.5. Theoretical calculations

To mimic the N-glycosidic bond in our considerations we used methyl (instead of deoxyribose) group connected to N9 atom of A-benzylNHSCF₃. DEA profiles were calculated using the fully optimized geometries of the reactants at the MPW1K [39] level with the 6–31++G(d,p) [40,41] basis set. The polarization continuum model (PCM) was used to simulate the solvent environment [42]. Geometrical stability of all optimized structures was confirmed through harmonic frequency analysis, where all force constants were positive for minima, and only one was negative for the first-order transition states. Additionally, the intrinsic reaction coordinate (IRC) procedure [43] was employed to ensure that the identified transition state connects the correct minima. All calculations were performed using the Gaussian09 suite of programs [44].

4.6. Stationary radiolysis

The radiolysis of an aqueous solution containing 10^{−4} M dA-NHbenzylSCF₃ was performed in the presence of tert-butanol (0.03 M) as a scavenger for •OH radicals and phosphate buffer (10 mM, pH = 7), all within Eppendorf tubes. Prior to irradiation, the samples were purged with argon for 3 min. The irradiation was carried out using a CellRad X-ray Cabinet, delivering a total dose of 500 Gy at a rate of 5.81 Gy/min. The X-ray tube operated at 130 kV and 5 mA, with a 0.5 mm aluminium filter in place.

4.7. Cell culture

PC3 and MCF-7 cell lines were sourced from ATCC, while HMF cells were obtained from CLS. PC3 cells were cultured in F12K medium, MCF-7 cells in RPMI medium, and HMF cells in a dedicated fibroblast medium. All media were supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin and streptomycin) at a concentration of 100 U/mL, while in fibroblast medium, fibroblast growth supplement was also added. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. Cell plates were irradiated using a CellRad X-ray cabinet. dA-NHbenzylSCF₃ was dissolved in molecular biology-grade DMSO for use in all cellular experiments.

4.8. Cytotoxicity tests

Cells were seeded at a density of 4000 cells per well in 96-well plates and incubated at 37 °C under 5 % CO₂. After 24 h, the cells were treated

with the dA-NHbenzylSCF₃ at concentrations ranging from 0.001 to 100 μ M, or 1 % DMSO as a control, and incubated for 24, 48, or 72 h. Following incubation, MTT reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added at a final concentration of 4 mg/mL (25 μ L per well). After 2 h of incubation, the formazan product was solubilized in DMSO. Absorbance was measured at 570 nm with a reference wavelength of 660 nm using an EnSpire microplate reader (PerkinElmer). Control cell viability was defined as 100 %. Experiments were conducted independently in triplicate, and statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software.

4.9. Clonogenic test

PC3 and MCF-7 cells were plated in 60-mm dishes at a density of 10^5 cells per dish and incubated at 37 °C in an atmosphere containing 5 % CO₂ with 20 μ M of dA-NHbenzylSCF₃. After 48 h of treatment, the cultures were subjected to IR (X-rays) with doses ranging from 0 to 8 Gy. Six hours post-irradiation, the cells were trypsinized and reseeded at a density of 800 cells per 60-mm dish. Fourteen days later, the colonies formed were fixed using a solution of 6.0 % (v/v) glutaraldehyde and stained with 0.5 % crystal violet. Colony formation was then analyzed and counted with a GelCount automated colony counter from Oxford Optronix. The experiment was repeated three times, and control samples were those not exposed to radiation. The survival curves were fitted using the linear-quadratic model with the use of GraphPad Prism ($SF = \exp(-(\alpha \cdot D + \beta \cdot D^2))$ where "D" is the dose and " α " and " β " are the optimized parameters). The survival data are presented in a semi-logarithmic plot of the surviving fraction against the dose. The average plating efficiencies for the controls with and without pre-treatment are equal to 44.8 % (0 μ M), 33.4 % (20 μ M) for PC3 cells, and 33.8 % (0 μ M), 31.6 % (20 μ M) for MCF-7 cells.

4.10. Histone H2A.X phosphorylation

PC3 and MCF-7 cells were assigned to four groups: (I) control (treated with 1 % DMSO vehicle), (II) treated with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃, (III) irradiated with 8 Gy, and (IV) treated with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃ followed by 8 Gy irradiation. After radiation exposure, the cells were incubated for 2 h, dissociated using accutase, and then fixed and permeabilized. The cells were stained with an Alexa Fluor® 488-conjugated antibody and analyzed using a Guava easyCyte flow cytometer. All steps, including fixation, permeabilization, and staining, were optimized and performed according to the manufacturer's protocol (Guava Histone H2A.X Phosphorylation Assay Kit, Merck). Non-irradiated and untreated control cells were used to define threshold gating for identifying γ H2A.X-positive cells (histone H2A.X phosphorylated at serine 139). The experiment was repeated in triplicate.

4.11. Immunofluorescence microscopy

Cells were divided into four groups as previously described, cultured on polymer coverslips (μ -slide, ibidi, Gräfelfing, Germany) and irradiated with a dose of 4 and 8 Gy. Two hours and 24 h post-irradiation, they were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS for 10 min and then permeabilized with 0.2 % Triton X-100 in PBS for 5 min. After washing with PBS, the cells were incubated for 1 h with a rabbit anti- γ H2A.X (phospho S139) primary antibody (1:4000, Abcam, Cambridge, UK) in 5 % FBS in PBS solution, followed by incubation for 1 h with an anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 546 (1:1000, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) in 5 % FBS in PBS solution. Imaging was performed using a Leica TCS SP8X confocal laser scanning microscope equipped with a 63 $\times$ oil immersion objective (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Nuclear DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The number of γ H2A.X foci per nucleus was quantified using ImageJ software by analyzing at least 80 to 100 cells per sample.

4.12. Cell cycle analysis

PC3 and MCF-7 cells were divided into four groups as described above. The cells were treated with dA-NHbenzylSCF₃ for 48 h, followed by X-ray irradiation. Twenty-four hours post-irradiation, the cells were dissociated with accutase, fixed in 70 % ice-cold ethanol, and stained with propidium iodide (Guava Cell Cycle Reagent, Merck) in the dark for 30 min, following the manufacturer's instructions. Samples were analyzed by flow cytometry, with gating on a forward scatter (FSC) vs. DNA plot to exclude cell aggregates and debris. The cell cycle phase distribution was determined using InCyte 3.3 software.

4.13. Cell death analysis

PC3 cells were categorized into four groups, as outlined above. Seventy-two hours after radiation exposure, both adherent cells and the supernatant containing potentially non-adherent (dead or dying) cells were collected for analysis. Cells were dissociated using an accutase solution and stained with the MitoDamage Working Solution (containing MitoSense Red Dye, Annexin V, CF™488A, and 1 $\times$ Assay Buffer HSC), followed by a 15-min incubation in a 37 °C CO₂ incubator. After this time, samples were centrifuged, washed with 1X Assay Buffer, stained with 7-AAD, and subsequently analyzed using a Guava easyCyte flow cytometer, following the manufacturer's instructions (Guava MitoDamage Kit, Merck).

4.14. Fractionation studies

PC3 cells were seeded in 100 mm culture dishes at a density of 2×10^6 cells per dish under three variants: (i) control – untreated cells, (ii) cells treated with 20 μ M dA-NHbenzylSCF₃, and (iii) cells treated with 100 μ M dA-NHbenzylSCF₃. Following a 48-h incubation, the cells were trypsinized and centrifuged to obtain cell pellets. Fractionation was performed using the Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (Abcam, UK) according to the manufacturer's instructions. To the collected cells, 200 μ L of cytosol extraction buffer containing 2 μ L of a protease inhibitor cocktail and 1 μ L of 1 M DTT was added. The samples were centrifuged at 500 $\times$ g for 3 min at 4 °C, and the supernatant was removed. An additional portion of 200 μ L of cytosol extraction buffer was added, followed by resuspension via vortexing and incubation on ice for 10 min. Subsequently, 11 μ L of ice-cold lysis buffer was added to each sample, vortexed, and incubated on ice for 1 min. The samples were then centrifuged at 16,000 $\times$ g for 5 min, and the supernatant (cytoplasmic extract) was transferred to clean Eppendorf tubes and kept on ice. The remaining cell pellets were resuspended in 100 μ L of ice-cold nuclear extraction buffer containing 2 μ L of a protease inhibitor cocktail and 1 μ L of 1 M DTT. The samples were vortexed for 15 s and returned to ice. This process was repeated every 10 min for a total of 40 min. Afterward, the samples were centrifuged at 16,000 $\times$ g for 10 min, and the resulting supernatant (nuclear extract) was transferred to clean Eppendorf tubes and kept on ice. Each sample, including both cytoplasmic and nuclear fractions, was divided into two portions: one was directly analyzed using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS), while the other underwent enzymatic digestion to nucleosides. For nucleoside digestion, the Nucleoside Digestion Mix Kit (New England Biolabs, US) was used following the manufacturer's protocol. To the cell samples, 5 μ L of 10x nucleoside digestion mix buffer and 2.5 μ L of nucleoside digestion mix were added. The solutions were incubated at 37 °C for 1 h, lyophilized, and subsequently analyzed by LC-MS. The analysis was performed using isocratic elution with 0 % phase B for 10 min, followed by a linear gradient from 0 % to 100 % phase B over 20 min (10–30 min).

4.15. DNA digestion

The PC3 cells were seeded in 100 mm dishes at a density of 2×10^6 and divided into three experimental groups: (i) control – untreated cells,

(ii) cells exposed to 20 μM of dA-NHbenzylSCF₃, and (iii) cells exposed to 100 μM of dA-NHbenzylSCF₃. Following 48 h of incubation, cells were harvested on ice using a cell scraper. The collected pellets underwent purification and DNA extraction using the GeneMATRIX kit, following the manufacturer's instructions (EURx, Poland). The lysis process involved adding a lysis buffer and RNase to degrade RNA, followed by the addition of proteinase K, with samples incubated at 70 °C for 10 min in a thermocycler (Mastecycler Gradient). The lysate was transferred to a specialized membrane-containing tube, washed with appropriate solutions, and centrifuged. To digest DNA into nucleosides, 10 μL of 10x concentrated reaction buffer (30 mM sodium acetate, pH 5.0, and 1 mM zinc acetate) was added to DNA fragments, adjusting the final volume to 100 μL . The digestion reaction included the addition of 1 μL (0.2 U) of Nuclease P1 and 1 μL (0.005 U) of Spleen, followed by incubation at 37 °C for 2 h. In the next step, 7.5 μL of 20x digestion buffer (1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris, pH 8.9, and 40 μL DTPA), along with 40.5 μL of water, was added to each sample to reach a final volume of 150 μL . Subsequently, 1 μL of DNase was introduced, and the samples were incubated at 37 °C for 1 h. The enzymatic digestion was finalized by sequentially adding 2 μL of BAP, followed by 1-h incubation at 37 °C, and then 2 μL of SVP, with another hour-long incubation under the same conditions.

4.16. Statistical analysis

Statistical analysis of the mean values was performed using one-way ANOVA, followed by either Dunnett's or Tukey's multiple comparison tests. Data are expressed as means with standard deviations (SD) from a minimum of three independent experiments. Statistical significance was evaluated using GraphPad Prism 7 software, with significance levels indicated as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

CRedit authorship contribution statement

Magdalena Datta: Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Adrian Szczyrba:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Patryk Nowak:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Magdalena Zdrowowicz:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Michał Rychłowski:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Sebastian Demkowicz:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Artur Sikorski:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Janusz Rak:** Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was partially supported by grant No. 533-OC20-GS50-24 (UGrants 2024, University of Gdansk) and the National Science Centre, Poland (NCN) under the Program Ceus-Unisono, grant No. UMO-2020/02/Y/ST4/00110. Calculations have been carried out using resources provided by the Wrocław Centre for Networking and Supercomputing (<http://wcss.pl>), grant No. 209. We thank Prof. Anna Dolega (Technical University of Gdańsk) for providing access to the X-ray diffractometer.

Appendix B. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118094>.

Abbreviations

PC3	prostate cancer cells
MCF-7	breast cancer cells
HMF	human mammary fibroblasts
DSBs	DNA double strand breaks
DEA	dissociative electron attachment
MeOH	methanol
HRMS	high resolution mass spectrometry
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab, The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, *Hypoxia* 3 (2015) 1–15, <https://doi.org/10.2147/hp.s93413>.
- [2] P. Wardman, Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy, *Clin. Oncol.* 19 (6) (2007), <https://doi.org/10.1016/j.clon.2007.03.010>.
- [3] G.E. Adams, Chemical radiosensitization of hypoxic cells, *Br. Med. Bull.* 29 (1) (1973), <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a070956>.
- [4] J.F. Fowler, G.E. Adams, J. Denekamp, Radiosensitizers of hypoxic cells in solid tumours, *Cancer Treat. Rev.* 3 (4) (1976), [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(76\)80012-6](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(76)80012-6).
- [5] M. Zdrowowicz, P. Spisz, A. Hać, A. Herman-Antosiewicz, J. Rak, Influence of hypoxia on radiosensitization of cancer cells by 5-Bromo-2'-deoxyuridine, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (3) (2022) 1429, <https://doi.org/10.3390/ijms23031429>.
- [6] C. von Sonntag, Free-radical-induced DNA damage and its repair, <https://doi.org/10.1007/3-540-30592-0>, 2006.
- [7] L. Chomicz, J. Rak, P. Storoniak, Electron-induced elimination of the bromide anion from brominated nucleobases. A computational study, *J. Phys. Chem. B* 116 (19) (2012), <https://doi.org/10.1021/jp3008738>.
- [8] Y. Park, K. Polaka, J. Rak, J.R. Wagner, L. Sanchez, Fundamental mechanisms of DNA radiosensitization: damage induced by low-energy electrons in brominated oligonucleotide trimers, *J. Phys. Chem. B* 116 (32) (2012), <https://doi.org/10.1021/jp304964z>.
- [9] B. Djordjevic, W. Szybalski, Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity, *J. Exp. Med.* 112 (1960), <https://doi.org/10.1084/jem.112.3.509>.
- [10] O. Gudjonsson, M. Bergström, S. Kristjansson, F. Wu, G. Nyberg, K.J. Faath, B. Långström, Analysis of 76Br-BrdU in DNA of brain tumors after a PET study does not support its use as a proliferation marker, *Nucl. Med. Biol.* 28 (1) (2001), [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(00\)00193-1](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(00)00193-1).
- [11] J.P. Kites, Y. Maruyama, L.A. Tung, S.B. Bond, L. Révész, The fate of 5-bromo-deoxyuridine, 5-bromodeoxycytidine, and 5-iododeoxycytidine in man, *Cancer Res.* 23 (1963).
- [12] T.L. Phillips, C.B. Scott, S.A. Leibel, M. Rotman, I.J. Weigenberg, Results of a randomized comparison of radiotherapy and bromodeoxyuridine with radiotherapy alone for brain metastases: report of RTOG trial 89-05, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33 (2) (1995), [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00168-X](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00168-X).
- [13] A.B. Rode, B.M. Kim, S.H. Park, I.S. Hong, S.H. Hong, Potent radiosensitizing agents: 5-Methylselenenyl- and 5-phenylselenenyl-methyl-2'-deoxyuridine, *Bioorg Med Chem Lett* 21 (4) (2011) 1151–1154, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.102>.
- [14] T.J. Kinsella, M.T. Kinsella, Y. Seo, G. Berch, 5-Iodo-2'-Pyrimidinone-2'-Deoxyribose-Mediated cytotoxicity and radiosensitization in U87 human glioblastoma xenografts, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 69 (4) (2007) 1254–1261, <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.06.004>.
- [15] V. Vivet-Boudou, C. Isel, M. Sleiman, R. Smyth, N. Gaid, P. Barhoum, G. Laumond, G. Bec, M. Götte, J. Mak, A.M. Aubertin, A. Burger, R. Marquet, 8-modified-2'-deoxyadenosine analogues induce delayed polymerization arrest during hiv-1 reverse transcription, *PLoS One* 6 (11) (2011), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027456>.
- [16] C. Hansch, A. Leo, R.W. Taft, A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters, *Chem Rev* 91 (2) (1991), <https://doi.org/10.1021/cr00002a004>.
- [17] J.W.T., W.R.J. Spinks, *An Introduction to Radiation Chemistry*, third ed., 1990.
- [18] H.A. Schwarz, Enthalpy and entropy of formation of the hydrated electron, *J. Phys. Chem.* 95 (17) (1991), <https://doi.org/10.1021/j100170a058>.

- [19] N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat. Protoc.* 1 (5) (2006), <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [20] R.X. Huang, P.K. Zhou, DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer, *Signal Transduct Target Ther* 5 (1) (2020), <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-z>.
- [21] G. Smith, R. Sala, L. Carroll, K. Behan, M. Glaser, E. Robins, Q.D. Nguyen, E. O. Aboagye, Synthesis and evaluation of nucleoside radiotracers for imaging proliferation, *Nucl. Med. Biol.* 39 (5) (2012) 652–665, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.12.002>.
- [22] N.A.P. Franken, A.L. Oei, H.P. Kok, H.M. Rodermond, P. Sminia, J. Crezee, L.J. A. Stalpers, G.W. Barendsen, Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model, *Int. J. Oncol.* 42 (5) (2013), <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1857> (Review).
- [23] C.M. van Leeuwen, A.L. Oei, J. Crezee, A. Bel, N.A.P. Franken, L.J.A. Stalpers, H. P. Kok, The alpha and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies, *Radiat. Oncol.* 13 (2018), <https://doi.org/10.1186/s13014-018-1040-z>.
- [24] B. Pauwels, A.E.C. Koest, C.M.J. De Pooter, H.A.J. Lambrechts, G.G.O. Pattyn, F. Lardon, J.B. Vermorken, The radiosensitising effect of gemcitabine and the influence of the rescue agent amifostine in vitro, *Eur. J. Cancer* 39 (6) (2003), [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(03)00002-9).
- [25] M. Toulany, Targeting DNA double-strand break repair pathways to improve radiotherapy response, *Genes* 10 (1) (2019), <https://doi.org/10.3390/genes10010025>.
- [26] T.J. McMillan, S. Tobi, S. Mateos, C. Lemon, The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 49 (2001), [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(00\)01467-X](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(00)01467-X).
- [27] R. Wanotayan, S. Wongsanit, K. Boonsirichai, K. Sukapirom, S. Buppaungkul, P. Charoenphun, P. Songprakhon, K. Jangpatrapongsa, P. Uttayarat, Quantification of histone H2AX phosphorylation in white blood cells induced by ex vivo gamma irradiation of whole blood by both flow cytometry and foci counting as a dose estimation in rapid triage, *PLoS One* 17 (3) (2022) e0265643, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265643>.
- [28] Y. Lee, Q. Wang, I. Shuryak, D.J. Brenner, H.C. Turner, Development of a high-throughput γ -H2AX assay based on imaging flow cytometry, *Radiat. Oncol.* 14 (150) (2019), <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1344-7>.
- [29] L. Wu, L. Shao, N. An, J. Wang, S. Pazhanisamy, W. Feng, M. Hauer-Jensen, S. Miyamoto, D. Zhou, IKK β regulates the repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation in MCF-7 breast cancer cells, *PLoS One* 6 (4) (2011) e18447, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018447>.
- [30] A. Reddig, D. Roggenbuck, D. Reinhold, Comparison of different immunoassays for γ H2AX quantification, *J. Lab. Prec. Med.* 3 (2018), <https://doi.org/10.21037/jlpm.2018.09.01>.
- [31] R.U. Jänicke, MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3, *Breast Cancer Res. Treat.* 115 (3) (2009), <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0217-9>.
- [32] T. Tian, MCF-7 cells lack the expression of Caspase-3, *Int. J. Biol. Macromol.* 231 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123310>.
- [33] STOE & Cie GmbH, X-area 1.75, 2015.
- [34] G.M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL, *Acta Crystallogr. C Struct. Chem.* 71 (2015), <https://doi.org/10.1107/S2053222914024218>.
- [35] A.L. Spek, Structure validation in chemical crystallography, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65 (2) (2009), <https://doi.org/10.1107/S090744490904362X>.
- [36] C.K. Johnson, ORTEP II, 1976.
- [37] S.C.S. Motherwell, PLUTO-78, Program for Drawing and Molecular Structure, 1978, Cambridge, U.K.
- [38] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. Van De Streek, P.A. Wood, Mercury CSD 2.0 - new features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (6) (2008), <https://doi.org/10.1107/S0021899507067908>.
- [39] B.J. Lynch, P.L. Fast, M. Harris, D.G. Truhlar, Adiabatic connection for kinetics, *J. Phys. Chem. A* 104 (21) (2000), <https://doi.org/10.1021/jp000497z>.
- [40] R. Ditchfield, W.J. Hehre, J.A. Pople, Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules, *J. Chem. Phys.* 54 (2) (1971), <https://doi.org/10.1063/1.1674902>.
- [41] W.J. Hehre, K. Ditchfield, J.A. Pople, Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules, *J. Chem. Phys.* 56 (5) (1972), <https://doi.org/10.1063/1.1677527>.
- [42] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, *Chem. Rev.* 105 (8) (2005), <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [43] K. Fukui, The path of chemical reactions - the IRC approach, *Acc. Chem. Res.* 14 (12) (1981), <https://doi.org/10.1021/ac00072a001>.
- [44] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, J. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian09 Revision D.01, Gaussian Inc, Wallingford CT, 2010, Gaussian 09 Revision C.01.

**8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as
potential radiosensitizer**

Magdalena Datta ^a, Adrian Szczyrba ^a, Patryk Nowak ^b, Magdalena Zdrowowicz ^a, Michał Rychłowski ^c, Sebastian Demkowicz ^d, Artur Sikorski ^b, Janusz Rak ^{a,*}

^a Laboratory of Biological Sensitizers, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk, Poland

^b Laboratory of Crystallochemistry, Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk, Poland

^c Laboratory of Recombinant Vaccines, Intercollegiate Faculty of Biotechnology of University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Abrahama 58, 80-307 Gdańsk, Poland

^d Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Poland

List of Figures

Fig. S1 ¹ H NMR spectrum of dA-NHbenzylSCF ₃	S3
Fig. S2 ¹³ C NMR spectrum of dA-NHbenzylSCF ₃	S3
Fig. S3 MS spectrum of dA-NHbenzylSCF ₃	S4
Fig. S4 Chromatogram HPLC of pure dA-NHbenzylSCF ₃	S4
Fig. S5 Crystals of dA-NHbenzylSCF ₃	S5
Fig. S6 MS spectrum of a product with a mass of 265 Da.....	S5
Fig. S7 MSMS spectrum of a product with a mass of 265 Da.....	S6
Fig. S8 MS spectrum of a product with a mass of 435 Da.....	S6
Fig. S9 MSMS spectrum of a product with a mass of 435 Da.....	S7

Fig. S10 MS spectrum of a product with a mass of 419 Da.....	S7
Fig. S11 MSMS spectrum of a product with a mass of 419 Da.....	S8
Fig. S12 MS spectrum of a product with a mass of 819 Da.....	S8
Fig. S13 MSMS spectrum of a product with a mass of 819 Da.....	S9
Fig. S14 Cytometric analysis of H2A.X phosphorylation.....	S12
Fig. S15 Cytometric analysis of H2A.X phosphorylation 24 h after irradiation.....	S13
Fig. S16 Cell cycle distribution.....	S15
Fig. S17 Quantitative analysis of PC3 cell death and dot plots provide comparison of MitoSense Red vs. 7-AAD.....	S16
Fig. S18 Dot plots provide comparison of 7-AAD vs. Annexin V.....	S17
Fig. S19 Chromatograms after digestion to nucleosides.....	S17

List of Tables

Table S1. Crystal data and structure refinement parameters for the title compound.....	S9
Table S2. Hydrogen bond geometry interactions in the crystal structure of the title compound.....	S10
Table S3. $\pi \cdots \pi$ stacking interactions in the crystal structure of title compound.....	S11
Table S4. C–F $\cdots$ F–C interactions in the crystal structure of title compound.....	S11
Table S5. Quantitative, cytometric analysis of H2A.X phosphorylation.....	S12
Table S6. Quantification of γ H2A.X nuclear foci at 24 h after irradiation.....	S14

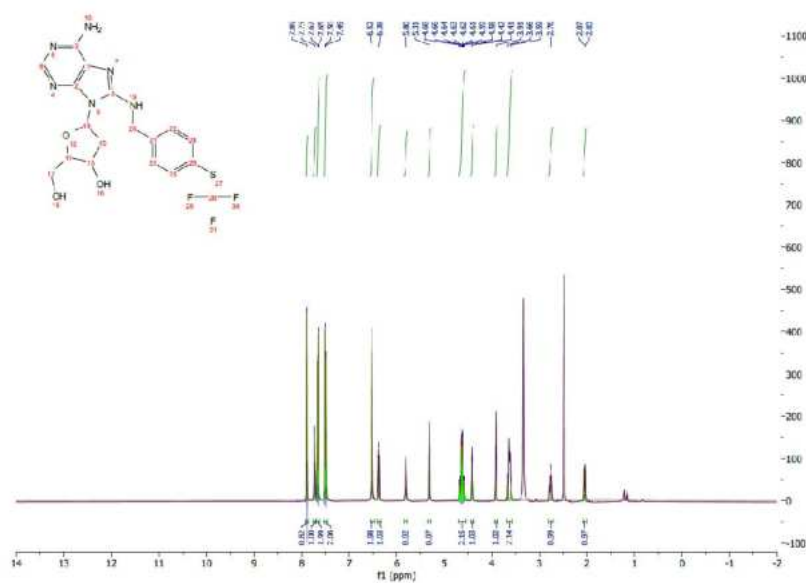
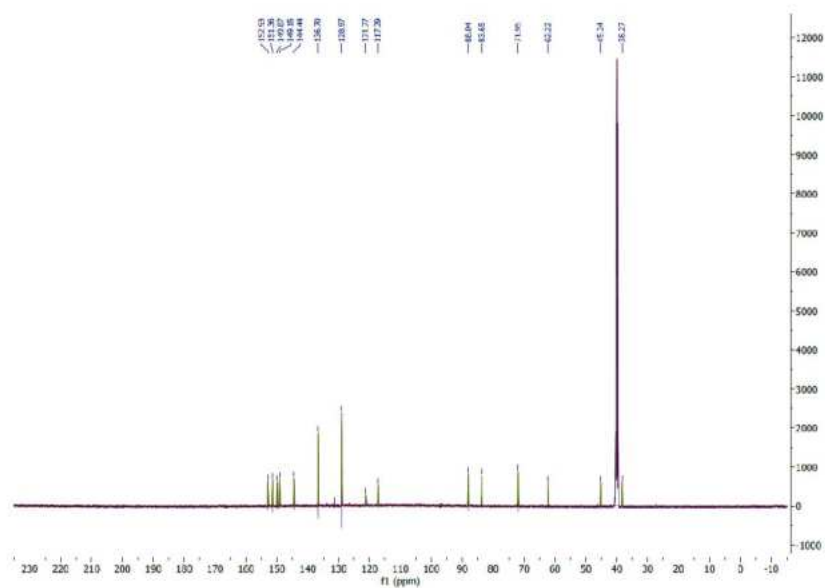


Fig. S1 ¹H NMR spectrum of dA-NHbenzylSCF₃.



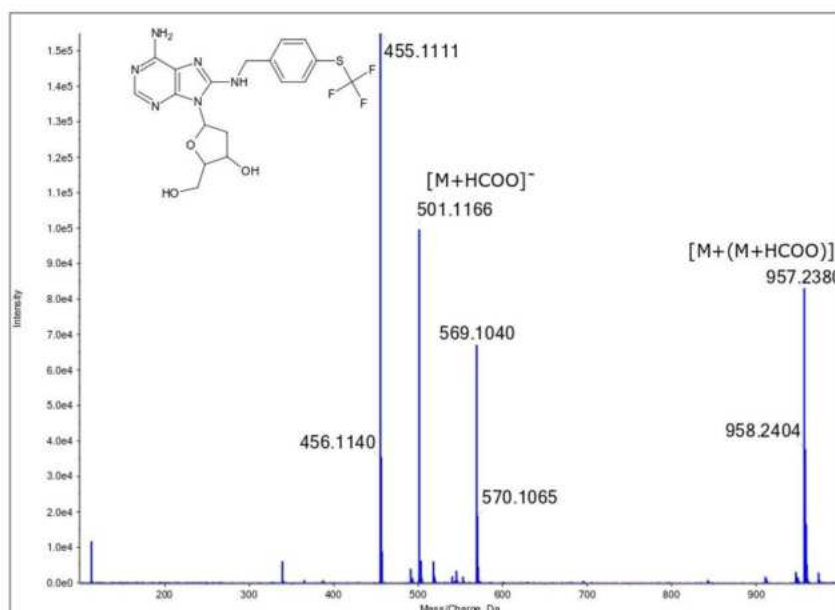


Fig. S3 MS spectrum of dA-NHbenzylSCF₃ recorded in the negative ionization mode. Theoretical mass [M-1]⁻ = 455.1118 Da, experimental mass [M-1]⁻ = 455.1111 Da.

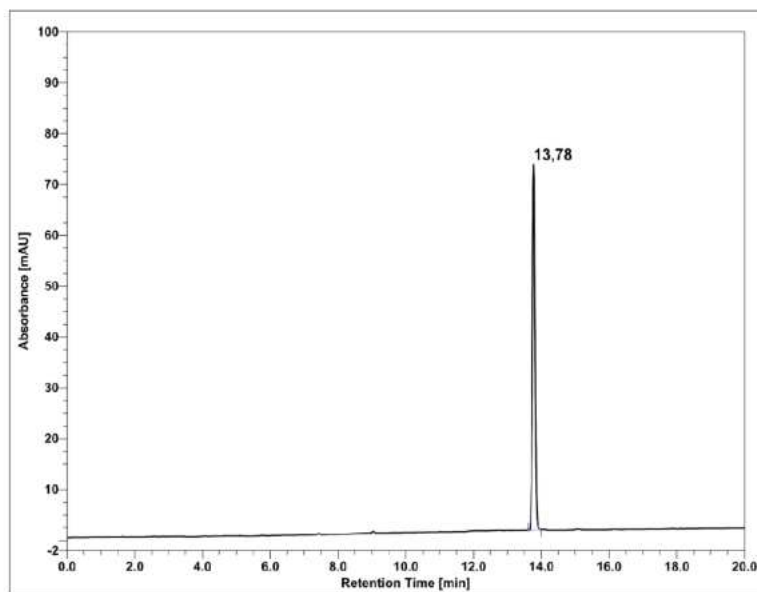


Fig. S4 Chromatogram HPLC of pure dA-NHbenzylSCF₃.



Fig. S5 Crystals of dA-NHbenzylSCF₃

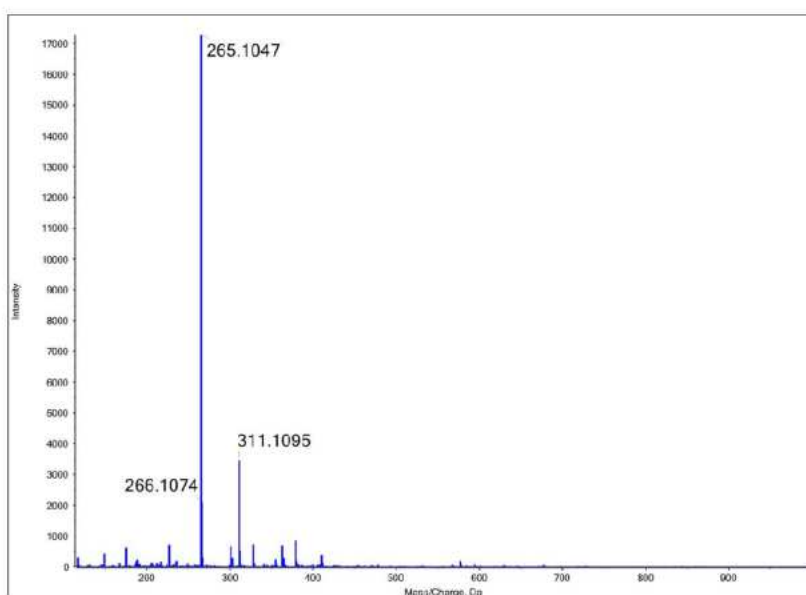


Fig. S6 MS spectrum of a product with a mass of 265 Da registered in the negative ionization mode.

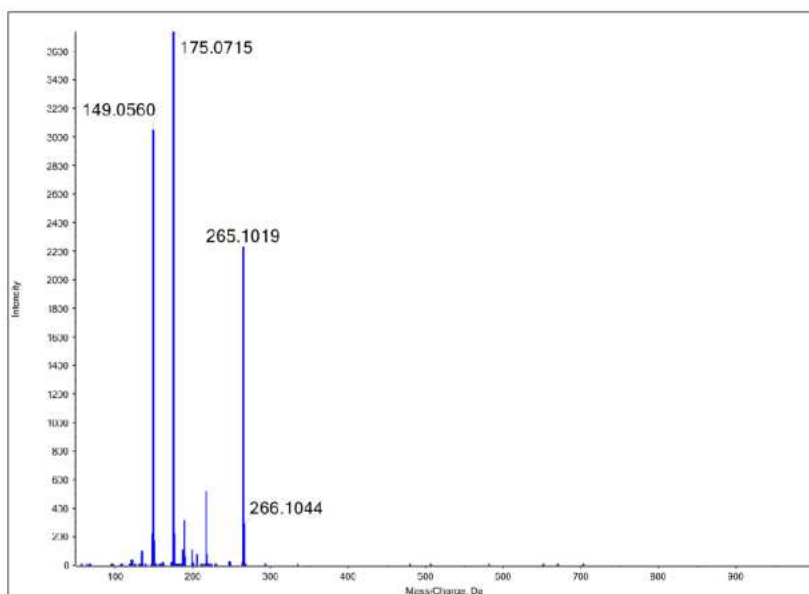


Fig. S7 MSMS spectrum of a product with a mass of 265 Da registered in the negative ionization mode.

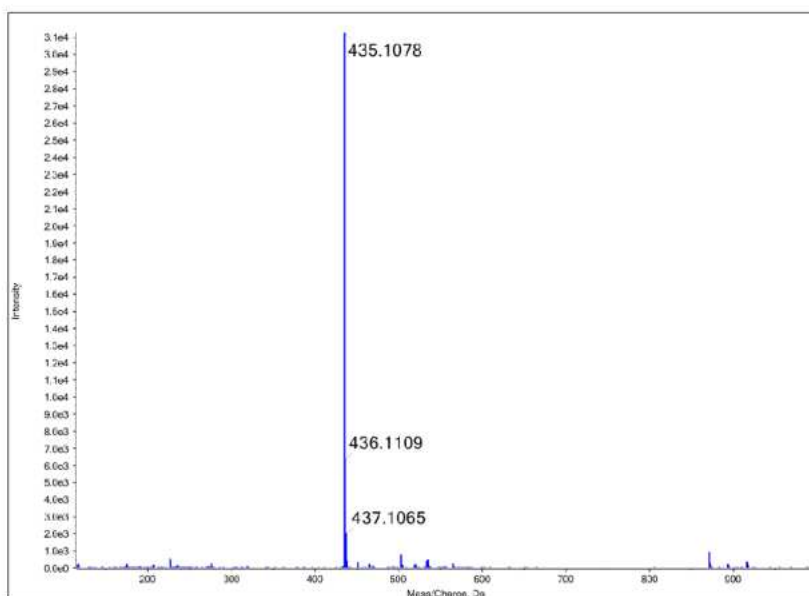


Fig. S8 MS spectrum of a product with a mass of 435 Da registered in the negative ionization mode.

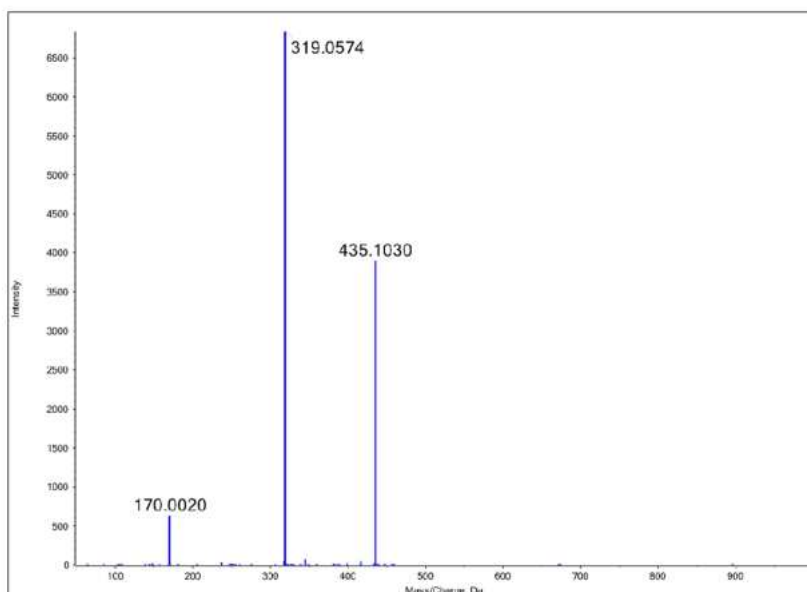


Fig. S9 MSMS spectrum of a product with a mass of 435 Da registered in the negative ionization mode.

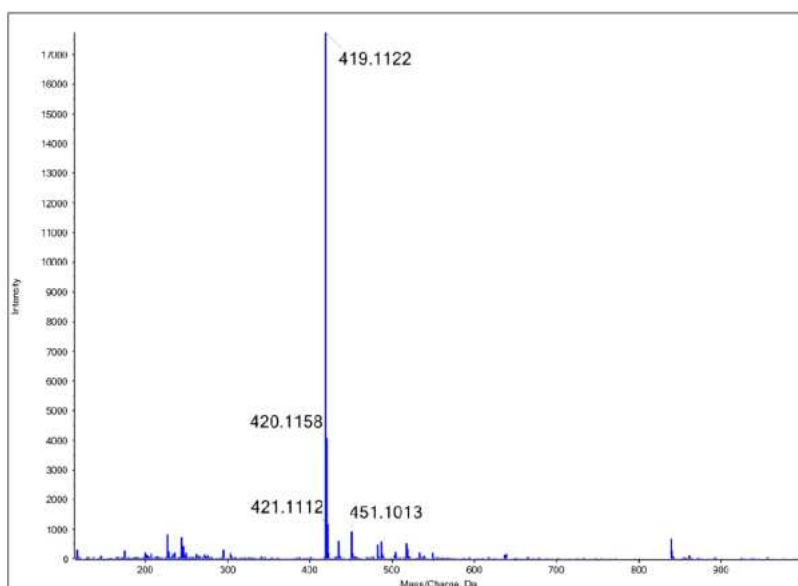


Fig. S10 MS spectrum of a product with a mass of 419 Da registered in the negative ionization mode.

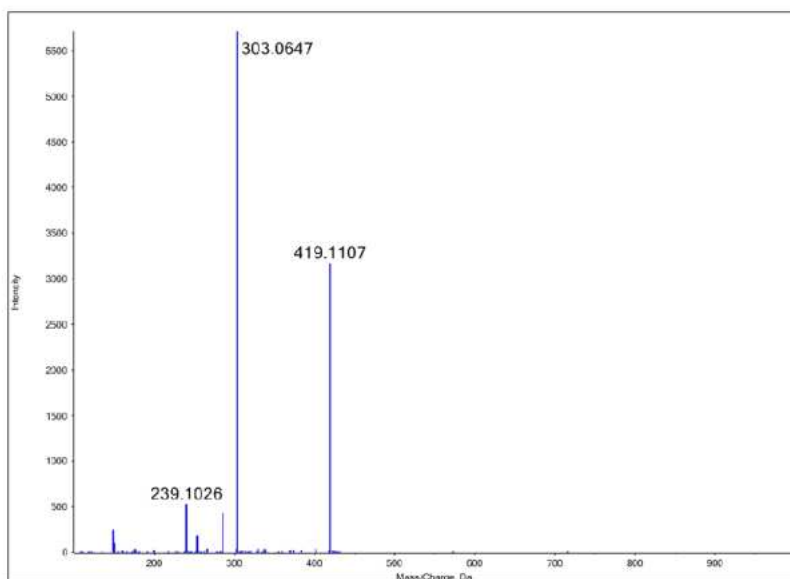


Fig. S11 MSMS spectrum of a product with a mass of 419 Da registered in the negative ionization mode.

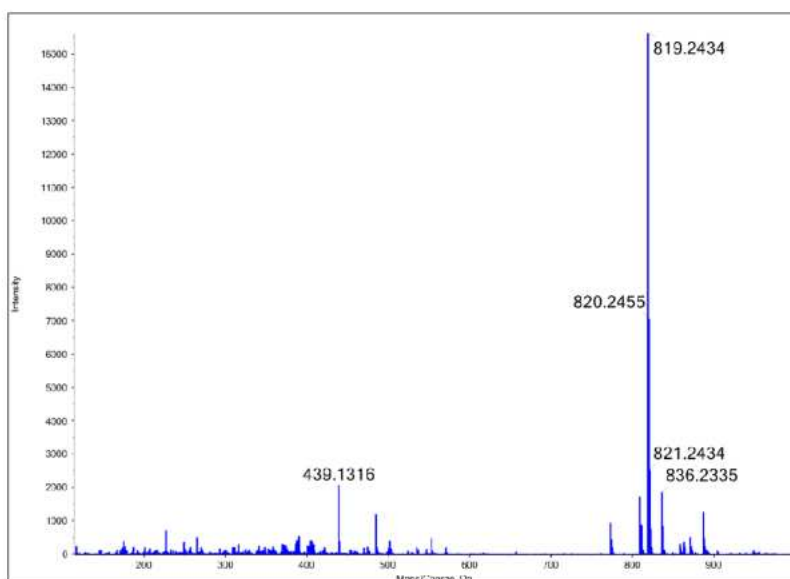


Fig. S12 MS spectrum of a product with a mass of 819 Da registered in the negative ionization mode.

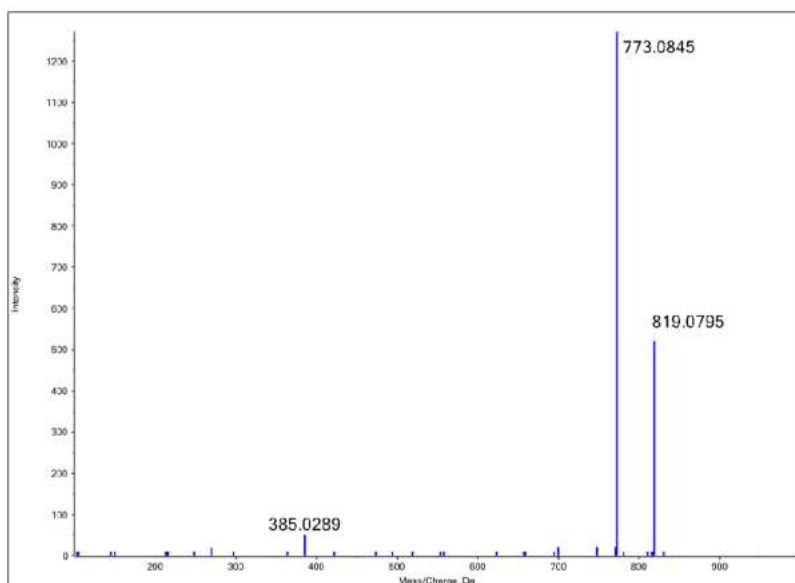


Fig. S13 MSMS spectrum of a product with a mass of 819 Da registered in the negative ionization mode.

Table S1. Crystal data and structure refinement parameters for the title compound

Compound	dA-NHbenzylSCF ₃
Chemical formula	C ₁₈ H ₁₉ F ₃ N ₆ O ₃ S
FW/g·mol ⁻¹	456.45
Crystal system	hexagonal
Space group	<i>P</i> 6 ₄
<i>a</i> /Å	31.6495(6)
<i>b</i> /Å	31.6495(6)
<i>c</i> /Å	10.1666(2)
α /°	90
β /°	90
γ /°	120
<i>V</i> /Å ³	8819.4(4)
<i>Z</i>	18
<i>T</i> /K	120(2)
λ_{Mo} /Å	0.71073
ρ_{calc} /g·cm ⁻³	1.547
<i>F</i> (000)	4248
μ /mm ⁻¹	0.229

θ range/ $^{\circ}$	1.97–25.00
Completeness $\theta/\%$	99.9
Reflections collected	48576
Reflections unique	10323
Data/restraints/parameters	10323/1/883
Goodness of fit on F^2	1.146
Final R_1 value ($I > 2\sigma(I)$)	0.0643
Final wR_2 value ($I > 2\sigma(I)$)	0.1168
Final R_1 value (all data)	0.1091
Final wR_2 value (all data)	0.1384
CCDC number	2434569

Table S2. Hydrogen bond geometry interactions in the crystal structure of the title compound.

D–H $\cdots$ A	$d(D-H)$ ($\text{\AA}$)	$d(H\cdots A)$ ($\text{\AA}$)	$d(D\cdots A)$ ($\text{\AA}$)	$\angle D-H\cdots A$ ($^{\circ}$)
O1–H1 $\cdots$ N4 ⁱ	0.87(9)	1.83(10)	2.705(11)	175(8)
O3–H3 $\cdots$ N1 ⁱⁱ	0.80(11)	1.99(14)	2.741(13)	156(13)
N3–H3B $\cdots$ O1 ⁱⁱⁱ	1.03(9)	1.98(9)	2.996(10)	170(8)
O21–H21 $\cdots$ N44 ^{iv}	0.78(10)	1.97(10)	2.729(10)	167(10)
O23–H23 $\cdots$ N41 ^v	0.90(10)	1.84(10)	2.737(11)	173(8)
N23–H23A $\cdots$ O2 ^{vi}	0.84(10)	2.39(11)	3.036(12)	134(9)
N23–H23B $\cdots$ O41 ^{vii}	0.97(10)	2.05(10)	3.015(10)	172(13)
O41–H41 $\cdots$ N24 ^{iv}	0.71(10)	2.05(11)	2.746(10)	166(13)
O43–H43 $\cdots$ N21 ^v	0.93(10)	1.86(10)	2.783(11)	173(7)
N43–H43B $\cdots$ O21 ^{vii}	0.82(10)	2.23(9)	3.018(9)	162(9)
C13–H13 $\cdots$ N2 ^{viii}	0.95	2.57	3.461(12)	156
C50–H50B $\cdots$ N2 ^{iv}	0.99	2.54	3.512(12)	169
C53–H53 $\cdots$ N42 ^{viii}	0.95	2.58	3.477(12)	157

Symmetry codes: (i) $x-y, x, -1/3+z$; (ii) $x-y, x, 2/3+z$; (iii) $y, -x+y, 1/3+z$; (iv) $1-x+y, 1-x, -1/3+z$; (v) $1-x+y, 1-x, 2/3+z$; (vi) x, y, z ; (vii) $1-y, x-y, 1/3+z$; (viii) $x, y, 1+z$

Table S3. $\pi\cdots\pi$ stacking interactions in the crystal structure of title compound.

Cg(I) $\cdots$ Cg(J)	$d(Cg(I)\cdots Cg(J))$ ($\text{\AA}$)	Slippage
Cg2 $\cdots$ Cg8 ⁱ	3.804(6)	1.785
Cg3 $\cdots$ Cg4 ⁱⁱ	3.921(6)	1.539
Cg3 $\cdots$ Cg8 ⁱ	3.503(5)	1.057
Cg8 $\cdots$ Cg14 ⁱⁱⁱ	3.973(6)	1.585
Cg13 $\cdots$ Cg9 ⁱⁱⁱ	3.861(6)	1.540
Cg13 $\cdots$ Cg13 ^{iv}	3.455(5)	0.992

S10

Symmetry codes: (i) x,y,z; (ii) y,-x+y,-2/3+z; (iii) 1-y,x-y,-2/3+z; (iv) 2-x,1-y,z;

Cg describes geometric centres of selected 5-membered and 6-membered rings: N4/C3/C2/N5/C5 for Cg2; N1/C1/N2/C2/C3/C4 for Cg3; C12/C13/C14/C15/C16/C17 for Cg4; N24/C23/C22/N25/C25 for Cg7; N21/C21/N22/C22/C23/C24 for Cg8; C32/C33/C34/C35/C36/C37 for Cg9; N44/C43/C42/N45/C45 for Cg12; N41/C41/N42/C42/C43/C44 for Cg13; C52/C53/C54/C55/C56/C57 for Cg14;

Table S4. C–F···F–C interactions in the crystal structure of title compound.

C–X···Y–C	X···Y (Å)	< C–X···Y (°)	< C–Y···X (°)
C18–F1···F2–C18 ⁱ	2.812	127.52	88.47
C18–F1···F3–C18 ⁱ	2.808	162.83	88.14
C18–F2···F2–C18 ⁱⁱ	2.927	145.34	145.34
C38–F21···F41–C58 ⁱⁱⁱ	2.909	162.02	83.04
C38–F21···F42–C58 ⁱⁱⁱ	2.769	137.55	89.49
C38–F22···F42–C58 ^{iv}	2.971	138.95	149.84
C38–F22···F43–C58	2.817	86.00	118.07
C38–F23···F43–C58	2.769	87.58	157.15

Symmetry codes: (i) y,-x+y,1/3+z; (ii)-x,-y,z; (iii)1-x+y,1-x,-1/3+z; (iv) x,y,z; (v) 1-y,x-y,1/3+z

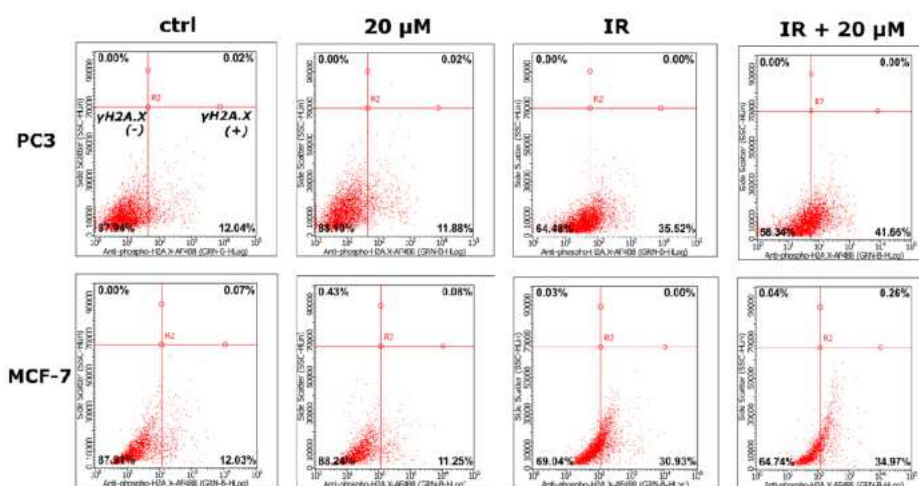


Fig. S14 Cytometric analysis of H2A.X phosphorylation conducted for both PC3 and MCF-7 cell lines. Viable cells were identified by selecting them based on a scatter plot comparing forward scatter (FSC) to side scatter (SSC), effectively excluding cell debris and aggregates. In the bivariate dot plot of SSC versus Alexa Fluor 488-A (488 nm laser area), γ H2A.X-positive cells were located in the right quadrants, while γ H2A.X-negative cells were positioned in the left quadrants, corresponding to the control cell population. This gating strategy was consistently applied to both treated and irradiated cells.

Table S5. Quantitative, cytometric analysis of H2A.X phosphorylation.

Cell line	Histone H2A.X phosphorylation (population of positive cells) [%]			
	0 Gy	20 μ M	8 Gy	8 Gy + 20 μ M
PC3	12.25 $\pm$ 0.17	11.77 $\pm$ 0.09	36.22 $\pm$ 0.57	40.79 $\pm$ 0.66
MCF-7	11.81 $\pm$ 0.18	12.29 $\pm$ 0.85	28.72 $\pm$ 1.81	32.82 $\pm$ 1.76

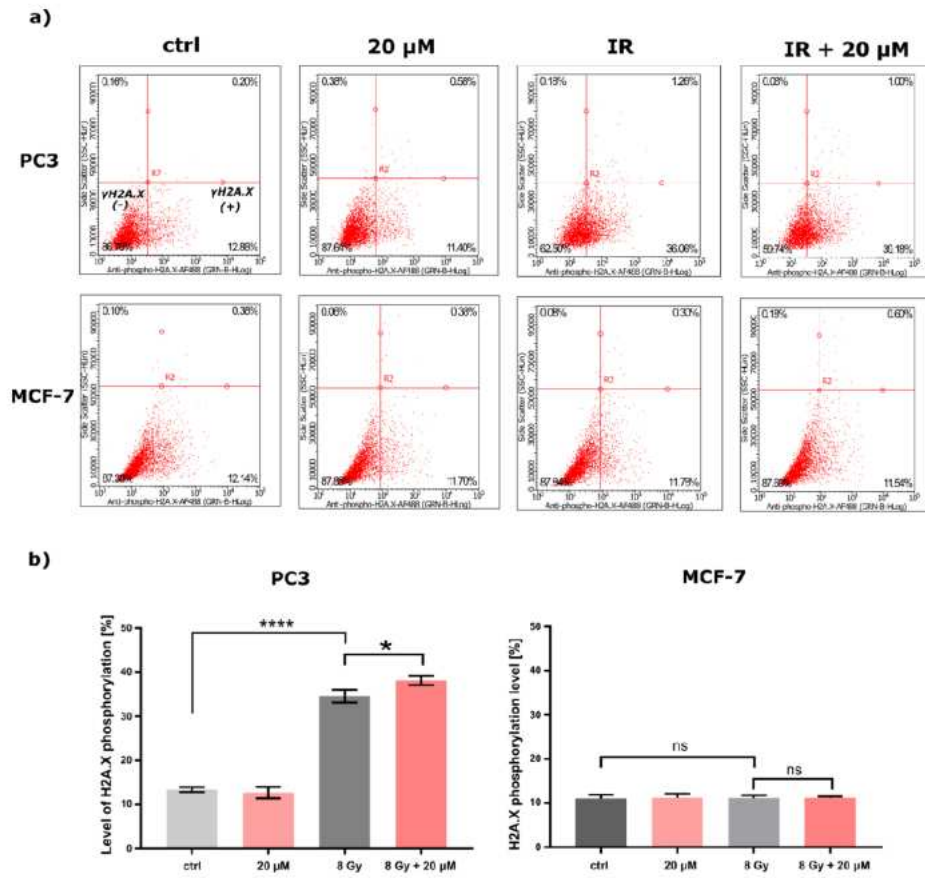


Fig. S15 a) Cytometric analysis of H2A.X phosphorylation conducted 24 h after irradiation for both PC3 and MCF-7 cell lines. Viable cells were identified by selecting them based on a scatter plot comparing forward scatter (FSC) to side scatter (SSC), effectively excluding cell debris and aggregates. In the bivariate dot plot of SSC versus Alexa Fluor 488-A (488 nm laser area), γ H2A.X-positive cells were located in the right quadrants, while γ H2A.X-negative cells were positioned in the left quadrants, corresponding to the control cell population. This gating strategy was consistently applied to both treated and irradiated cells. b) Statistical analysis of histone H2A.X phosphorylation for PC3 and MCF-7 cell lines. Data are expressed as the mean $\pm$ SD from three independent experiments, each conducted in triplicate. Statistically significant difference between the positive compared groups is indicated as * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; ns – nonstatistical.

Table S6. Quantification of γ H2A.X nuclear foci at 24 h after irradiation.

Cell line	γ H2A.X foci per nucleus 24h after irradiation.					
	0 Gy	20 μ M	4Gy	4Gy + 20 μ M	8Gy	8Gy + 20 μ M
PC3	2.33 $\pm$ 1.04	2.10 $\pm$ 1.14	7.85 $\pm$ 0.61	10.15 $\pm$ 3.13	11.43 $\pm$ 2.86	15.58 $\pm$ 5.31
MCF-7	1.90 $\pm$ 0.16	2.70 $\pm$ 0.41	8.25 $\pm$ 3.18	11.50 $\pm$ 3.51	13.10 $\pm$ 2.69	15.60 $\pm$ 4.49

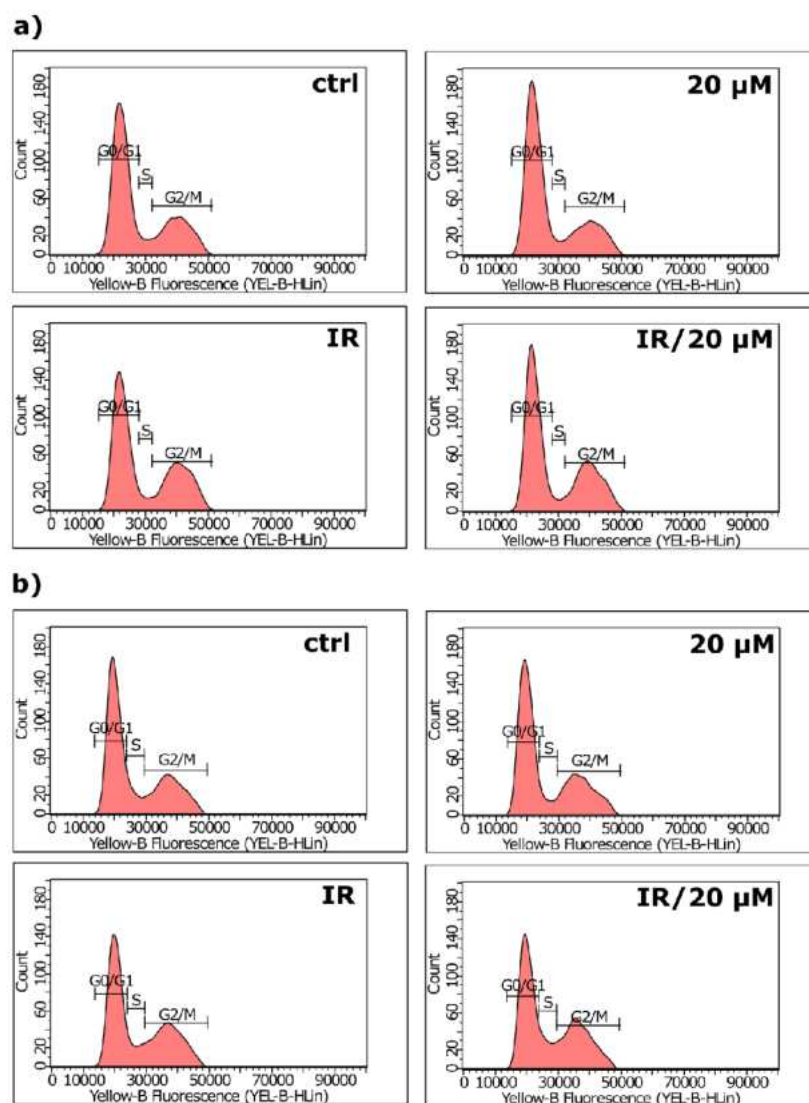


Fig. S16 Effect of dA-NHbenzylSCF₃ on cell cycle distribution in a) PC3 and b) MCF-7 cells. Cells were pretreated with the compound for 48 hours before being exposed to either 0 Gy or 8 Gy radiation. Flow cytometry was then used to analyze the distribution of cells across different phases of the cell cycle.

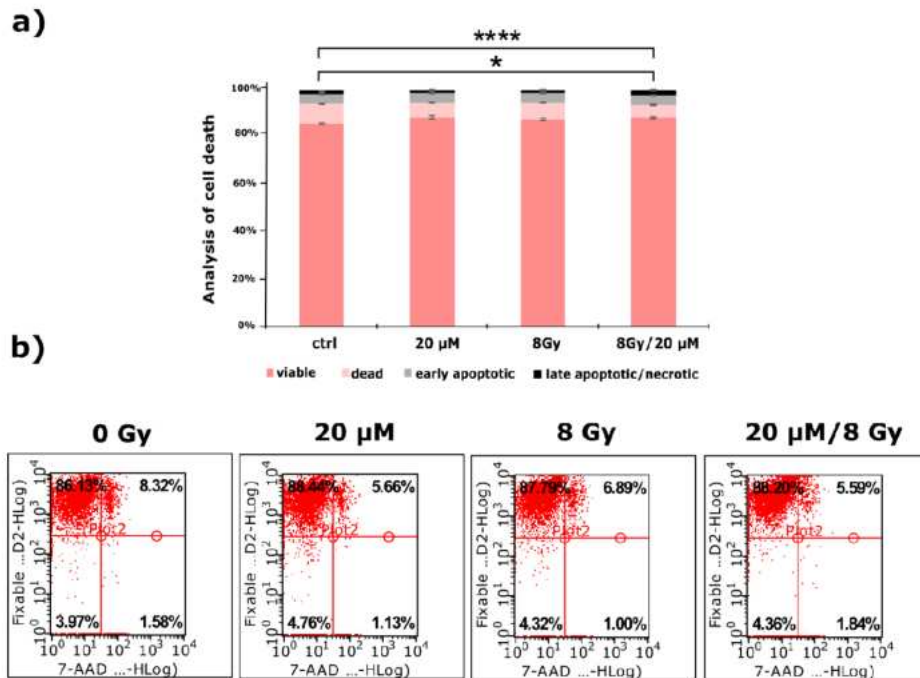


Fig. S17 a) Quantitative analysis of PC3 cell death. Plots show the percentage of positive cells for early/late apoptosis and cell death. The results are shown as the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant difference between early apoptotic cells is present at * $p < 0.5$, while between late apoptotic cells at *** $p < 0.001$. b) Dot plots provide comparison of MitoSense Red vs. 7-AAD. Q1 upper left quadrant, viable (MitoSense Red+ 7-AAD-), Q2 lower left quadrant, early apoptotic (MitoSense Red- 7-AAD-), Q3 lower right quadrant, late apoptotic/necrotic (MitoSense Red- 7-AAD+), and Q4 upper right quadrant, dead cells (MitoSense Red+ 7-AAD+).

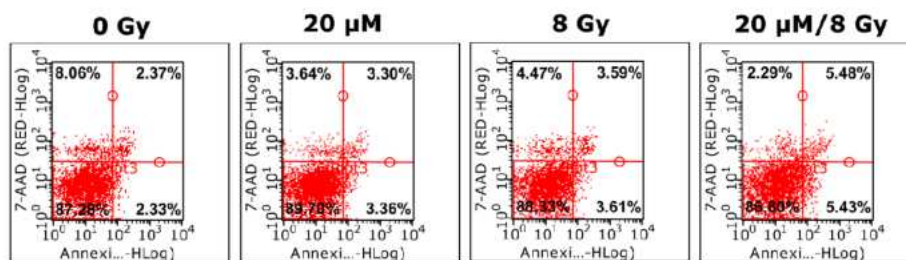


Fig. S18 Dot plots provide comparison of 7-AAD vs. Annexin V. Q2 lower left quadrant, viable (7-AAD⁻ Annexin V⁻), Q3 lower right quadrant (7-AAD⁻ Annexin V⁺) apoptotic, Q4 upper right quadrant, dead cells (7-AAD⁺ Annexin V⁺).

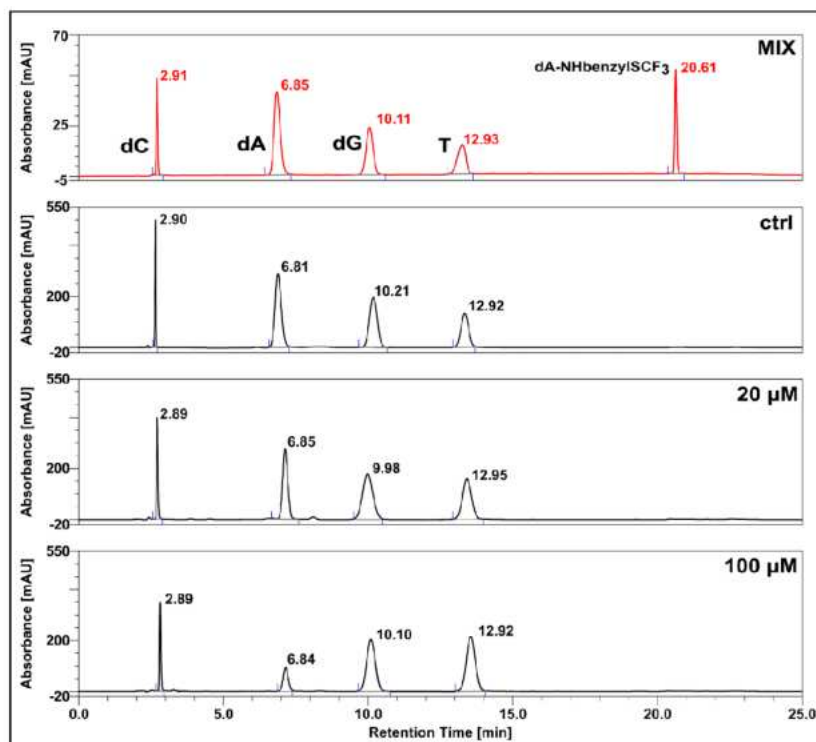


Fig. S19 Chromatograms after digestion to nucleosides. Chromatogram of standard mix solution (MIX) and the digested genomic DNA from untreated PC3 cells (ctrl), from PC3 cells treated with 20 μM of dA-NHbenzylSCF₃, and from PC3 cells treated with 100 μM of dA-NHbenzylSCF₃.

VIII. Oświadczenia współautorów publikacji

Gdańsk, 23.08.2025

Magdalena Datta
ul. Ujeścisko 7c/6, 80-130 Gdańsk
690-661-394
magdalena.datta@phdstud.ug.edu.pl

OŚWIADCZENIE WŁASNE

Ja, niżej podpisana Magdalena Datta oświadczam, iż mój wkład w publikację stanowiącą część rozprawy doktorskiej obejmował:

Tytuł: *"Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution"*.

Autorzy: Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl, Janusz Rak

Opublikowana: *The Journal of Physical Chemistry B*, 128 (15), 2024

Zadania: synteza pochodnej adeniny – ASCH₃; oczyszczenie pochodnej ASCH₃; identyfikacja zsyntezowanej struktury z wykorzystaniem NMR oraz LCMS; przeprowadzenie badań radiolitycznych (radioliza stacjonarna w roztworze wodnym i suchym acetonitrylu); identyfikacja i interpretacja produktów radiolizy z wykorzystaniem LCMS; pisanie i edycja manuskryptu publikacji.

Tytuł: *"Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties"*.

Autorzy: Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Anna Czaja, Magdalena Zdrowowicz, Sebastian Demkowicz, Janusz Rak

Opublikowana: *Scientific Reports*, 15, 17535, 2025

Zadania: synteza pochodnej 2'-deoksyadenozyny – dA-NHbenzylOCF₃; oczyszczenie pochodnej dA-NHbenzylOCF₃; identyfikacja zsyntezowanej struktury z wykorzystaniem NMR oraz LCMS; przeprowadzenie badań radiolitycznych w roztworze wodnym; identyfikacja i interpretacja produktów radiolizy z wykorzystaniem LCMS; zbadanie toksyczności pochodnej z wykorzystaniem testu MTT i potencjału radiouwrażliwiania komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące poprzez test klonogeniczności; wykonanie analiz cytometrycznych (fosforylacja histonu H2A.X oraz cykl komórkowy); wykonanie eksperymentów określających lokalizację pochodnej w komórce; pisanie i edycja manuskryptu publikacji.

Tytuł: " 8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer".

Autorzy: Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak

Opublikowana: *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2025,

doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118094

Zadania: synteza pochodnej 2'-deoksyadenozyny – dA-NHbenzylSCF₃; oczyszczenie pochodnej dA-NHbenzylSCF₃; identyfikacja zsyntezowanej struktury z wykorzystaniem NMR oraz LCMS; przeprowadzenie badań radiolitycznych w roztworze wodnym; identyfikacja i interpretacja produktów radiolizy z wykorzystaniem LCMS; zbadanie toksyczności pochodnej z wykorzystaniem testu MTT i potencjału radiouwrażliwiania komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące poprzez test klonogeniczności; wykonanie analiz cytometrycznych (fosforylacja histonu H2A.X, cykl komórkowy oraz śmierć komórkowa); wykonanie mikroskopowej analizy immunofluorescencyjnej ognisk γH2AX; wykonanie eksperymentów określających lokalizację pochodnej w komórce; pisanie i edycja manuskryptu publikacji.


podpis

prof. dr hab. Janusz Rak

Gdańsk, 25 sierpnia 2025 roku

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład do niżej wymienionych publikacji, składających się na pracę doktorską mgr inż. Magdaleny Datty, polegał na uczestniczeniu w: planowaniu projektów, interpretowaniu wyników eksperymentów oraz przygotowaniu poszczególnych manuskryptów.

- 1) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl, Janusz Rak. "Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution". *The Journal of Physical Chemistry B*, 128 (15), **2024**
- 2) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Anna Czaja, Magdalena Zdrowowicz, Sebastian Demkowicz, Janusz Rak. "Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties". *Scientific Reports*, 15, 17535, **2025**
- 3) Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak. "8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer". *European Journal of Medicinal Chemistry*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118094>, **2025**

KIEROWNIK
Katedra Chemii Fizycznej
prof. dr hab. Janusz Rak

-1-



UNIWERSYTET GDAŃSKI

Dr Magdalena Zdrowowicz-Żamojć
Katedra Chemii Fizycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 27.08.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład do niżej wymienionych publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Datty, polegał na udziale w: planowaniu projektów, interpretacji wyników eksperymentalnych oraz przygotowaniu manuskryptów.

Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl, Janusz Rak. "Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution". *The Journal of Physical Chemistry B*, 128 (15), **2024**

Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Anna Czaja, Magdalena Zdrowowicz, Sebastian Demkowicz, Janusz Rak. "Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties". *Scientific Reports*, 15, 17535, **2025**

Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak. "8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 118094, **2025**

Magdalena Zdrowowicz-Żamojć

mgr farm. Adrian Szczyrba

Gdańsk, 28 sierpnia 2025 roku

Katedra Chemii Fizycznej

adrian.szczyrba@phdstud.ug.edu.pl

+48 666 500 824

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład do niżej wymienionych publikacji, składających się na pracę doktorską mgr inż. Magdaleny Datty, polegał na uczestniczeniu w: kwantowochemicznej interpretacji wyników eksperymentów radiolizy stacjonarnej oraz przygotowaniu poszczególnych manuskryptów.

1. Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl, Janusz Rak. "Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution". The Journal of Physical Chemistry B, 128 (15), **2024**
2. Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Anna Czaja, Magdalena Zdrowowicz, Sebastian Demkowicz, Janusz Rak. "Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties". Scientific Reports, 15, 17535, **2025**
3. Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak. "8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer". European Journal of Medicinal Chemistry, 299, 118094, **2025**



Adrian Szczyrba

Gdańsk, dnia 19.08.2025

Dr hab. inż. Sebastian Demkowicz
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk
Tel 609503079
Mail sebastian.demkowicz@pg.edu.pl

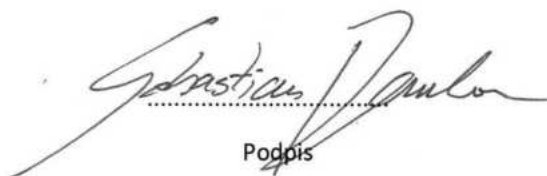
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w publikacje:

1. Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Magdalena Zdrowowicz, Dariusz Wyrzykowski, Olga Ciupak, Sebastian Demkowicz, Farhad Izadi, Stephan Denifl, Janusz Rak. Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(15), **2024**
2. Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Anna Czaja, Magdalena Zdrowowicz, Sebastian Demkowicz, Janusz Rak. Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties", *Scientific Reports* 15, 17535 (**2025**)
3. "8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer"

jest następujący:

Przygotowanie strategii syntetycznej, nadzór nad etapem otrzymywania docelowych związków, współredagowanie manuskryptów



Podpis

Gdańsk, 23.08.2025

Patryk Nowak
ul. Wołkowyska 15/1
80-283 Gdańsk
660-498-009
patryk.nowak@phdstud.ug.edu.pl

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w publikację: Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak. „8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2025, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118094> polegał na otrzymaniu kryształu badanej pochodnej oraz przygotowaniu i opisie jej struktury krystalicznej.



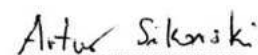
Podpis

Gdańsk, 23.08.2025

Dr hab. Artur Sikorski, prof. UG
Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
Ul. W. Stwosza 63
80-308 Gdańsk
+48 58 523 5112,
artur.sikorski@ug.edu.pl

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w publikację: Magdalena Datta, Adrian Szczyrba, Patryk Nowak, Magdalena Zdrowowicz, Michał Rychłowski, Sebastian Demkowicz, Artur Sikorski, Janusz Rak. „8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2025, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.118094> polegał na opracowaniu danych pomiarowych uzyskanych z eksperymentu przeprowadzonego metodą dyfrakcji promieniowania na monokryształach, rozwiązaniu oraz udokładnieniu struktury krystalicznej tytułowego związku.



Podpis

Innsbruck, dated 24.7.2025.....

.....
first name(s) and surname of the co-author
Stephan Denifl

.....
correspondence address
Department of Ion Physics and Applied Physics, University of Innsbruck, Technikerstrasse 25,
A-6020 Innsbruck, Austria

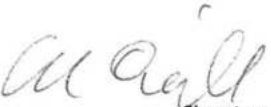
.....
phone number / e-mail address

+43(0)512 507 52665, Stephan.Denifl@uibk.ac.at

STATEMENT

My contribution to the publication entitled: "Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution" is as follows:

1. Supervision of the crossed electron–molecule beam experiments
2. Interpretation of the data from the crossed electron–molecule beam experiments
3. Editing of manuscript draft


Signature

IX. Dorobek naukowy

Publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. Szczyrba A., **Datta M.**, Chen J., Biernacki K., Demkowicz S., Denifl S., Rak J.. Dissociative electron attachment to 8-(trifluoromethyl)thioadenine a potential radiosensitizer. *The Journal of Physical Chemistry Letters* (w przygotowaniu).
2. **Datta M.**, Chomicz-Mańka L., Pryba P., Masłowska N., Demkowicz S., Rak J., Zdrowowicz M. Studies on 8-(4-Trifluoromethyl)benzylamino-2'-deoxyadenosine as a potent radiosensitizer. Computational and experimental studies. *The Journal of Physical Chemistry B* (w przygotowaniu).
3. Szczyrba A., Nguyen V. T. T., Chen J., Biernacki K., Makurat S., Kočišek J., **Datta M.**, Demkowicz S., Denifl S., Rak J. Dissociative electron attachment in 1,3-dimethylo-5-thiocyanatouracil at different hydration conditions. *Angewandte* (w przygotowaniu).
4. Kowalska A., Adamska E., Wcisło A., Sroczyński M., **Datta M.**, Rak J., Skowron P., Grobelna B. Synthesis and characterization of Au@SiO₂ core-shell nanostructures for improved delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. (w recenzji)
5. Zdrowowicz M., **Datta M.**, Biernacki K., Manikowska A., Mykowska E., Demkowicz S., Rak J. Radiosensitization of cancer cells by 5-selenocyanato- and 5-trifluoromethanesulfonyl- derivatives of 2'-deoxyuridine. *Radiation Research*. (w recenzji)
6. Nowak P., **Datta M.**, Szczyrba A., Rak J., Sikorski A. Tautomerism and supramolecular patterns in the crystals of Schiff bases derived from condensation of 2,3-dihydroxybenzaldehyde with isomeric aminobenzoic acids. *ChemPlusChem*, **2025**, e202500309.
7. Czaja A., **Datta M.**, Zdrowowicz M., Rak J. 4-thio-2'-deoxyuridines as photosensitizers for the photodynamic therapy of prostate cancer. An in vitro study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2025**, 345(15), 126802.
8. Ciupak O., Demkowicz S., Rachoń J., Biernacki K., Czubak P., Martyna A., Masłyk M., Kubiński K., **Datta M.**, Rak J., Daško, M. Novel nonsteroidal steroid sulfatase

inhibitors containing glutamic acid unit. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2025**, 291, 1–15.

9. Detlaff G., Zdrowowicz M., Paduszyńska M., **Datta M.**, Grzywacz D., Kamysz W., Rak J., Nowacki A., Myszka H., Liberek B. Insight into the course of the ferrier rearrangement used to obtain untypical diosgenyl saponins. *Journal of Organic Chemistry*, **2024**, 89, 15026–15040.
10. Stolarek M., Kamiński K., Kaczor-Kamińska M., Obłozza M., Bonarek P., Czaja A., **Datta M.**, Łach W., Brela M., Sikorski A., Rak J., Nowakowska, M., Szczubiałka K. Light-controlled anticancer activity and cellular uptake of a photoswitchable cisplatin analogue. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2024**, 67, 19103–19120.
11. Izadi F., Szczyrba A., **Datta M.**, Ciupak O., Demkowicz S., Rak J., Denifl S. Electron-induced decomposition of 5-bromo-4-thiouracil and 5-bromo-4-thio-2'-deoxyuridine: the effect of the deoxyribose moiety on dissociative electron attachment. *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**, 24, 1–14.
12. Saqib M., Arthur-Baidoo E., Izadi F., Szczyrba A., **Datta M.**, Demkowicz S., Rak J., Denifl S. Dissociative electron attachment to 5-Iodo-4-thio-2'-deoxyuridine: a potential radiosensitizer of hypoxic cells. *Journal of Physical Chemistry Letters*, **2023**, 14, 8948–8955.
13. Zdrowowicz M., **Datta M.**, Rychłowski M., Rak J. Radiosensitization of PC3 prostate cancer cells by 5-thiocyanato-2'-deoxyuridine. *Cancers*, **2022**, 14, 1–13.

Granty badawcze

1. **2025**, kierownik projektu BMN 2025 nr 539-T080-B201-25, pt.: „Mechanizm uwrażliwiania komórek nowotworowych linii PC3 na promieniowanie jonizujące przez 8-Trifluorotmetyloiobenzylamino-2'-deoksyadenozynę”, finansowanym przez Wydział Chemii UG.
2. **2024**, kierownik projektu Ugrants-start4 nr 533-0C20-GS50-24, pt.: „8-(4-Trifluorometylotio)benzyloamino-2'-deoksyadenozyna: purynowy nukleozyd jako potencjalny radiosensybilizator”, finansowanym przez Uniwersytet Gdański w ramach Inicjatywy Doskonałości Uczelnia Badawcza (IDUB);

3. **2023**, kierownik projektu BMN 2023 nr 539-T080-B985-23, pt.: „Badania in vitro radiouczulających właściwości 8-trifluorooksobenzylamino-2'-deoksyadenozyny”, finansowanym przez Wydział Chemii UG;
4. **2021-2025**, stypendysta – doktorant w projekcie CEUS-UNISONO nr 2020/02/Y/ST4/00110, pt.: „Radiosensybilizujące pochodne zasad pirymidynowych lub purynowych: spektrometria mas i metody kwantowochemiczne w badaniach nad oddziaływaniami z niskoenergetycznymi elektronami w fazie gazowej, klastrach z wodą oraz roztworze”, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

Zgłoszenia patentowe

1. Zgłoszenie patentowe wynalazku pt. „Kompleks cis-PtCl₂(cis-PS1)₂ przeznaczony do stosowania w radioterapii nowotworów”, nr zgłoszenia: P.452844, **2025**.
2. Zgłoszenie patentowe wynalazku pt. „Koniugat Au@SiO₂/antybiotyk, sposób jego otrzymywania oraz jego zastosowanie”, nr zgłoszenia: P.452353, **2025**.
3. Zgłoszenie patentowe wynalazku pt. „Pochodna 2'-deoksyadenozyny w postaci 8-(4-trifluorotio)benzyloamino-2'-deoksyadenozyny, sposób jej otrzymywania oraz jej zastosowanie jako radiosensybilizatora”, nr zgłoszenia: P.450925, **2025**.
4. Zgłoszenie patentowe wynalazku pt. „Pochodna 2'-deoksyadenozyny w postaci 8-benzylo(4-trifluorometoksy)-2'-deoksyadenozyny, sposób jej otrzymywania oraz jej zastosowanie jako radiosensybilizator”, nr zgłoszenia: P.448242, **2024**.

Konferencje

Referaty ustne:

1. Chernoloz T., Nowak W., **Datta M.**, Jędrzejewski T., Spisz P., Rak J., Wrotek S. *Opracowanie modeli badawczych in vitro dla efektu abskopalnego i efektu sąsiada z uwzględnieniem frakcjonowania*. XXIII Konferencja "Biotechnologia na Politechnice Bydgoskiej a wyzwania współczesnego świata", Bydgoszcz, Polska, **2025**.
2. Chomicz-Mańka L., **Datta M.**, Szczyrba A., Czaja A., Falkiewicz K., Zdrowowicz M., Wyrzykowski D., Biernacki K., Ciupak O., Demkowicz S., Izadi F., Baidoo E. A., Denifl S., Zhu Z., Tufekci B. A., Harris R., Bowen K., Rak J. *The crucial role of intra-/intermolecular proton transfer in suppressing dissociative electron attachment to DNA-*

related systems. Current Trends in Theoretical Chemistry Conference IX (CTTC IX), Kraków, Polska, **2024**.

3. Kowalska A., Adamska E., **Datta M.**, Synak A., Rak J., Grobelna B. *Nanostruktury Au@SiO₂ jako nanonośniki - od syntezy poprzez charakterystykę nanomateriału do potencjalnych zastosowań medycznych*. XX Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów i Studentów „Na pograniczu Chemii, Biologii i Farmacji”, Jarnołtówek, Polska, **2024**.
4. **Datta M.**, Szczyrba A., Zdrowowicz M., Ciupak O., Wyrzykowski D., Demkowicz S., Rak J. *8-benzylamino-2'-deoxyadenosine as a potential radiosensitizer of DNA damage*. 11th International Conference on Radiation, Natural Sciences, Medicine, Engineering, Technology and Ecology (RAD 2023), Herceg Novi, Czarnogóra, **2023**.
5. **Datta M.**, Szczyrba A., Demkowicz S., Rak J. *8-monosubstituted derivatives of 2'-deoxyadenosine as potential radiosensitizers. radiation and computational studies*. 1st International Scientific Conference for Doctoral Students and Young Scientists "OncoPhD", Lublin, Polska, **2023**.
6. Szczyrba A., **Datta M.**, Saqib M., Denifl S., Rak J. *Dissociative Electron Attachment to 5ISdU a potential radiosensitizer of cancer cells. A comparative experimental and DFT study*. 1st International Scientific Conference for Doctoral Students and Young Scientists "OncoPhD", Lublin, Polska, **2023**.

Postery:

1. **Datta M.**, Szczyrba A., Zdrowowicz M., Rak J. *Exploring dA-NHbenzylSCF₃ as a novel radiosensitizer: insights from in vitro studies*. Young Medicinal Chemists's Symposium (EFMC-YMCS 2025), Porto, Portugal, **2025**.
2. Szczyrba A., **Datta M.**, Chen J., Biernacki K., Demkowicz S., Denifl S., Rak J. *Enhancing radiosensitivity through DEA: investigation of ASCF₃ a potential sensitizer of hypoxic cells via crossed electron-molecule beam experiments and quantum chemical calculations*. Young Medicinal Chemists's Symposium (EFMC-YMCS 2025), Porto, Portugal, **2025**.
3. Szczyrba A., Nguyen V. T. T., Chen J., Biernacki K., Makurat S., Kočišek J., **Datta M.**, Demkowicz S., Denifl S., Rak J. *The influence of hydration level on dissociative electron attachment to 1,3-Dimethylo-5-Thiocyaantouracil – computational and*

experimental studies. Modelling and Design of Molecular Materials (MDMM 2025), Wrocław, Polska, **2025**.

4. **Datta M.**, Nowak P., Demkowicz S., Sikorski A., Rak J. *8-(4-Trifluorometylotio)benzyloamino-2'-deoksyadenozyna: potencjalnie radiosensybilizująca pochodna*. 66 Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław, Polska, **2025**.
5. Masłowska N., Zdrowowicz M., **Datta M.**, Pryba P., Rak J. *Potencjalny radiosensybilizator uszkodzeń DNA - 8-(4-Trifluorometylo)benzyloamino-2'-deoksyadenozyna*. Chemia-Biznes-Środowisko (ChemBiś 2025), Gdańsk, Polska, **2025**.
6. **Datta M.**, Rak J. *In vitro studies of a new potential radiosensitizing agent against breast (MCF-7) cancer cell line*. 11th EFMC Young Medicinal Chemists's Symposium (EFMC-YMCS 2024), Rzym, Włochy, **2024**.
7. Ciupak O., Daśko M., Biernacki K., Demkowicz S., Rachoń J., **Datta M.**, Rak J., Czubak P., Martyna A., Masłyk M., Kubiński K. *Structural analogs of folic acid as novel steroid sulfatase (STS) inhibitors*. 11th EFMC Young Medicinal Chemists's Symposium (EFMC-YMCS 2024), Rzym, Włochy, **2024**.
8. **Datta M.**, Czaja A., Demkowicz S., Rak J. *Radiosensitizing properties of 8-(4-trifluoromethoxy)benzylamino-2'-deoxyadenosine against PC3 prostate cancer cells*. VI Konferencja Naukowa Chemia-Biznes-Środowisko (ChemBiś 2024), Gdańsk, Polska, **2024**.
9. Stolarek M., Kamiński K., Kamińska-Kaczor M., Obłozą M., Bonarek P., Czaja A., **Datta M.**, Łach W., Brela M., Sikorski A., Rak J., Nowakowska M., Szczubiałka K. *An innovative platinum(II) complex with photo switchable anti-cancer properties*. 4th Frontiers in Photochemistry Conference, Lizbona, Portugalia, **2024**.
10. Stolarek M., Kamiński K., Kamińska-Kaczor M., Bonarek P., Czaja A., **Datta M.**, Łach W., Brela M., Sikorski A., Rak J., Nowakowska M., Szczubiałka K. *Kompleks platyny (II) o modulowanej światłem cytotoksyczności względem komórek nowotworowych*. Krakowskie Forum Biomedyczne, Kraków, Polska, **2024**.
11. Szczyrba A., Sappati S., **Datta M.**, Wyrzykowski D., Romanowska S., Czub J., Rak J. *Is protonation of radical anions of 5-bromo- and 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine in an aqueous solution a primary reason for their different X-ray radiation-induced*

reactivity? Current Trends in Theoretical Chemistry Conference IX (CTTC IX), Kraków, Polska, **2024**.

12. Szczyrba A., **Datta M.**, Rak J. *8-substituted adenine derivatives as potential radiosensitizers: a computational study*. Modeling Interactions in Biomolecules IX (MIB'23), Průhonice, Czechy, **2023**.
13. **Datta M.**, Zdrowowicz M., Ciupak O., Demkowicz S., Szczyrba A., Rak J. Modified 2'-deoxyadenosine as a potential radiosensitizer – attempts at synthesis and stationary radiolysis. 10th Jubilee International Conference on Radiation in Various Fields of Research - Spring Edition (RAD 2022), Herceg Novi, Czarnogóra, **2022**.
14. **Datta M.**, Szczyrba A., Zdrowowicz M., Ciupak O., Demkowicz S., Rak J. *Stationary radiolysis of adenine derivative - a potential radiosensitizer*. Modelling and Design of Molecular Materials (MDMM 2022), Gdańsk, Polska, **2022**.
15. **Datta M.**, Zdrowowicz M., Rak J. *5-Tiocyaniano-2'-deoksyurydyna jako radiosensybilizator uszkodzeń DNA - badania in vitro*. III Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko" (ChemBiŚ 2021), Online, Polska, **2021**.

Nagrody i wyróżnienia

1. Dyplom za zajęcie III miejsca w konkursie na najlepszy poster z badań własnych zaprezentowany podczas konferencji naukowej Chemia-Biznes-Środowisko (Chembiś 2024), Gdańsk, Polska, **2024**.
2. Dyplom za zajęcie I miejsca w konkursie na najlepszy poster z badań własnych zaprezentowany podczas konferencji naukowej Chemia-Biznes-Środowisko (Chembiś 2021), Online, Polska, **2021**.

Działalność pozanaukowa

1. Organizacja „Zjazdu absolwentów z okazji 55 rocznicy powstania Uniwersytetu Gdańskiego”, Gdańsk, Polska, **2025**
2. Organizacja Dnia Otwartego Wydziału Chemii UG. Gdańsk, Polska, **2023, 2024**.
3. Organizacja konferencji “Modeling and Design of Molecular Materials (MDMM 2022)”, Gdańsk, Polska, **2022**.
4. Organizacja konferencji „Chemia-Biznes-Środowisko (Chembiś 2018)”, Gdańsk, Polska, **2018**.