



Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii

POCHODNE HALOGENOWE 4-TIOURYDINY JAKO FOTOSENSYBILIZATORY USZKODZEŃ DNA

mgr Anna Czaja

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

Pięknie dziękuję!

Prof. dr hab. Januszowi Rakowi, mojemu Promotorowi za nieocenioną opiekę naukową, dzięki której praca nad doktoratem stała się nie tylko naukowym wyzwaniem, ale też wyjątkową lekcją. Jestem wdzięczna za nieustanne wsparcie – merytoryczne i osobiste, za inspirujące rozmowy, motywowanie do działania oraz wszystkie cenne rady i wskazówki.

Dr Magdalenie Zdrowowicz-Żamojć, mojej Promotor Pomocniczej za ciepło i dobre słowo, na które zawsze mogę liczyć. Dziękuję za codzienną pomoc i wsparcie, godziny rozmów, bezcenne rady i przede wszystkim za piękny czas spędzony w laboratorium i możliwość nauki.

Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Fizycznej, która była dla mnie nie tylko miejscem pracy, ale i przestrzenią, w której czułam się częścią świetnego zespołu. Dziękuję za wsparcie, życzliwość, atmosferę współpracy i przyjaźni oraz szczególnie za podnoszenie na duchu w trudniejszych momentach.

Mojej Rodzinie i Przyjaciółom, którzy zawsze byli blisko, dodawali mi sił i odwagi w dążeniu do celu. Dziękuję za cierpliwość i wyrozumiałość i za to, że nigdy nie przestaliście we mnie wierzyć.

Kindze za cały ogrom cierpliwości oraz wyrozumiałość i wsparcie okazywane na każdym etapie studiów. Dziękuję za to, że byłaś przy mnie w najtrudniejszych chwilach, dodając otuchy i wiary w moje możliwości.

*Pracę pragnę zadedykować Mamie –
z wdzięcznością za wszystko, czego mnie nauczyłaś i ufnością, że nade mną czuwasz.*

STRESZCZENIE	7
ABSTRACT	9
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	11
1. WPROWADZENIE	15
1.1 Terapia fotodynamiczna	15
1.1.1 Grupy fotosensybilizatorów, ograniczenia PDT oraz cechy idealnego fotouczulacza	19
1.1.2 Mechanizmy działania terapii fotodynamicznej	23
1.1.3 Fotosensybilizatory wykorzystywane w onkologii ze szczególnym uwzględnieniem leczenia raka prostaty	25
1.2 Modyfikowane nukleozydy oraz zasady azotowe jako fotosensybilizatory	27
1.2.1 Tiopochodne nukleozydów oraz zasad azotowych	28
1.2.2 Halogenowane pochodne 2'-deoksyurydyny	31
1.2.3 Halogeno-tionukleozydy – fotochemiczne właściwości	33
1.3 Uszkodzenia natywnego i modyfikowanego DNA indukowane promieniowaniem ultrafioletowym	35
1.3.1 Wpływ promieniowania ultrafioletowego na DNA	36
1.3.2 Indukowane promieniowaniem UV pęknięcia nici w modyfikowanym DNA	37
1.3.3 Indukowane promieniowaniem UV sieciowania w modyfikowanym DNA	39
2. CELE PRACY	41
3. METODOLOGIA	43
3.1 Fotoliza stacjonarna modyfikowanych nukleozydów	43
3.2 Fotoliza oligonukleotydów znakowanych 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyną	45
3.3 Badania komórkowe nad właściwościami fotosensybilizującymi 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny	49
4. BADANIA WŁASNE	53
4.1 Fotoliza stacjonarna 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny i 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny – fotochemia pochodnych indukowana promieniowaniem z zakresu UVA	53
4.1.1 Fotoliza BrSdU oraz ISdU w skali analitycznej – identyfikacja fotoproduktów	54
4.1.2 Charakterystyka powstających po naświetleniu produktów dla BrSdU oraz ISdU	62

4.1.3	Obliczenia kwantowochemiczne – porównanie teoretycznych i eksperymentalnych widm absorpcyjnych	91
4.1.4	Dyskusja wyników	98
4.2	Uszkodzenia modelowego DNA punktowo znakowanego BrSdU indukowane promieniowaniem z zakresu UVA	101
4.2.1	Charakterystyka i oczyszczenie oligonukleotydów znakowanych 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyną oraz hybrydyzacja nici komplementarnych	101
4.2.2	Właściwości fotochemiczne punktowo znakowanych 5-bromo-2'-deoksyurydyną modelowych fragmentów DNA	107
4.2.3	Wydajność kwantowa reakcji fotochemicznych dla modyfikowanych dupleksów	114
4.2.4	Trawienie enzymatyczne fotoproduktów w celu identyfikacji uszkodzeń DNA	115
4.2.5	Dyskusja wyników	120
4.3	Właściwości fotosensybilizujące 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny i 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny na poziomie komórkowym	123
4.3.1	Cytotoksyczność BrSdU oraz ISdU wobec komórek nowotworu prostaty – test MTT	123
4.3.2	Właściwości fotosensybilizujące BrSdU oraz ISdU – test klonogeniczności	125
4.3.3	Wpływ BrSdU lub ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA na cykl komórek PC3 oraz śmierć komórkową	127
4.3.4	Analiza podwójnych pęknięć nici DNA indukowanych promieniowaniem UVA w połączeniu z fotosensybilizatorami	131
4.3.5	Wpływ UVA w połączeniu z fotosensybilizatorami BrSdU oraz ISdU na powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach PC3	135
4.3.6	Dyskusja wyników	136
5.	PODSUMOWANIE	139
6.	WYKAZ RYSUNKÓW	143
7.	WYKAZ TABEL	147
8.	LITERATURA	148
9.	PUBLIKACJA WCHODZĄCA W SKŁAD PRACY DOKTORSKIEJ	158
10.	DOROBK NAUKOWY	176

Streszczenie

Współczesna onkologia, w szczególności wykorzystująca radio- czy fototerapię, stoi przed ogromnym wyzwaniem – jak skutecznie i selektywnie eliminować komórki nowotworowe, minimalizując jednocześnie uszkodzenia zdrowych tkanek. W odpowiedzi na te wyzwania dynamicznie rozwija się terapia fotodynamiczna (PDT), która łączy światło, fotosensybilizator oraz obecny w tkankach tlen, by wywołać reakcje prowadzące do śmierci komórek nowotworowych. Choć koncepcja ta wydaje się obiecująca, jej skuteczność ogranicza hipoksja – niedotlenienie charakterystyczne dla mikrośrodowiska guzów litych. W tym kontekście poszukiwanie nowych, bardziej efektywnych fotosensybilizatorów, zdolnych do działania również w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, staje się jednym z kluczowych kierunków badań.

Niniejsza praca koncentruje się na dwóch syntetycznych analogach urydyny: 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydynie (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydynie (ISdU). Związki te, dzięki obecności atomu siarki i halogenu, wykazują unikalne właściwości fotochemiczne, umożliwiające ich selektywne wzbudzanie światłem UVA – promieniowaniem o większej zdolności penetracji tkanek i mniejszej cytotoksyczności wobec zdrowych komórek niż fotony z zakresu UVB/UVC. Celem pracy było zbadanie mechanizmu fotosensybilizującego działania BrSdU i ISdU w roztworach modyfikowanych nukleozydów (MN), punktowo znakowanego DNA oraz w komórkach eukariotycznych.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono fotolizę stacjonarną BrSdU i ISdU w roztworach buforowanych, identyfikując szereg produktów reakcji, w tym dimerowe struktury disiarczkowe. Analizy HPLC, LC-MS, ^1H NMR oraz obliczenia TD-DFT pozwoliły na precyzyjne określenie ich struktur i potwierdziły wysoką fotoreaktywność badanych związków. Część fotoproduktów wykazywała różnice w stabilności w zależności od zastosowanej dawki promieniowania UVA, ulegając reakcjom wtórnym.

Kolejna część rozprawy została poświęcona ocenie fotochemicznych właściwości BrSdU w kontekście struktury DNA. W tym celu wykorzystano syntetyczne modele dwuniciowych oligonukleotydów z punktową modyfikacją BrSdU. W przeciwieństwie do klasycznych halogenowanych nukleozydów jak 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU) i 5-jodo-2'-deoksyurydyna (IdU), BrSdU nie inicjowała pęknięć nici DNA poprzez mechanizm dalekozasięgowego transferu elektronu. Zamiast tego obserwowano tworzenie stabilnych

fotoadduktów zawierających kowalencyjne wiązania między zasadami azotowymi, co sugeruje alternatywny mechanizm działania związany z obecnością atomu siarki w cząsteczce MN. Wyniki te rzucają nowe światło na fotochemię pochodnych halogenowanych 4-tiourydyny i ich potencjalne zastosowanie w terapii nowotworów.

W trzecim etapie oceniono działanie BrSdU i ISdU jako fotosensybilizatorów względem ludzkich komórek nowotworu prostaty. Związki te nie wykazywały cytotoksyczności, jednak w połączeniu z promieniowaniem UVA prowadziły do istotnego spadku żywotności komórek, szczególnie w przypadku ISdU. Szczegółowych informacji dotyczących mechanizmu synergicznego działania badanych nukleozydów i promieniowania UVA dostarczyły wyniki testów cytometrycznych, w których obserwowano: (1) zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, co jest typową odpowiedzią na poważne uszkodzenia DNA i mechanizmem ochronnym przed replikacją uszkodzonego materiału genetycznego; (2) indukcję wczesnej apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki, co potwierdza skuteczność działania PS w połączeniu z UVA; (3) wzrost poziomu γ H2A.X, markera podwójnych pęknięć nici DNA, wskazujący na poważne uszkodzenia genomu; (4) zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu, co sugeruje udział mechanizmów oksydacyjnych w cytotoksycznym działaniu BrSdU/ISdU i promieniowania.

Podsumowując, przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują, że 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyna oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyna to związki o wyjątkowych właściwościach fotochemicznych i fotobiologicznych, mogące znaleźć zastosowanie jako nowoczesne fotosensybilizatory w terapii fotodynamicznej nowotworów. Ich zdolność do selektywnego działania pod wpływem promieniowania UVA, nawet w warunkach hipoksji, czyni je szczególnie atrakcyjnymi w kontekście terapii fotodynamicznej guzów litych. Wyniki te stanowią podstawę do dalszych badań, w tym pogłębionych analiz mechanizmów reakcji fotochemicznych w warunkach biologicznych oraz porównań z klasycznymi fotosensybilizatorami. Szczególnie interesującym kierunkiem wydaje się zastosowanie obliczeń kwantowo-chemicznych do porównania reaktywności stanów wzbudzonych BrSdU i BrdU, co może pomóc w zrozumieniu wpływu obecności atomu siarki w cząsteczkach MN na fotoreaktywność i selektywność działania związków. W dłuższej perspektywie, opracowanie tego typu fotosensybilizatorów może przyczynić się do stworzenia bardziej precyzyjnych, skutecznych i bezpiecznych strategii leczenia nowotworów z wykorzystaniem światła.

Abstract

Modern oncology, particularly in the fields of radiotherapy and phototherapy, faces a challenge: how to effectively and selectively eliminate cancer cells while minimizing damage to healthy tissues. In response to these needs, photodynamic therapy (PDT) has emerged as a rapidly advancing treatment modality. PDT combines light, a photosensitizer, and molecular oxygen within tissues to initiate reactions leading to cancer cell death. Despite its potential, the effectiveness of PDT is limited by hypoxia – a characteristic oxygen deficiency in the microenvironment of solid tumors. Therefore, the development of novel, more efficient photosensitizers working under hypoxia is timely and well justified.

This PhD thesis investigates two synthetic uridine analogs: 5-bromo-4-thio-2'-deoxyuridine (BrSdU) and 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine (ISdU). Due to the presence of sulfur and halogen atoms, these compounds exhibit distinctive photochemical properties that enable their selective activation by UVA light – radiation known for its deeper tissue penetration and reduced cytotoxicity toward healthy cells. The aim of the study was to elucidate the photosensitizing mechanism of BrSdU/ISdU using the models of increasing complexity: isolated modified nucleosides, site-specifically modified DNA, and, finally, living cells.

In the first stage of the study, stationary photolysis of BrSdU and ISdU was performed in buffered solutions, leading to the identification of multiple photoreaction products, including disulfide dimers. Comprehensive structural characterization was achieved through HPLC, LC-MS, and ¹H NMR analyses, supported by TD-DFT calculations, which together confirmed the high photoreactivity of the studied compounds. Notably, the stability of certain photoproducts varied with increasing UVA irradiation dose, indicating possible secondary reactions.

The next part focused on investigating the photochemical properties of BrSdU when incorporated into DNA. Synthetic double-stranded oligonucleotide models containing site-specific BrSdU modifications were employed. Unlike classical halogenated nucleosides such as BrdU and IdU, BrSdU did not induce DNA strand breaks via long-range photoinduced electron transfer. Instead, stable photoadducts featuring covalent bonds between nucleobases were observed, indicating an alternative reaction pathway likely involving the sulfur atom. These results provide new insights into the unique photochemistry

of halogenated 4-thiouridine derivatives and highlight their potential for application in cancer therapies.

As the final phase of the study, the photosensitizing effects of BrSdU and ISdU were investigated at a cellular level using human prostate cancer cells. Both compounds were non-cytotoxic on their own. However, when combined with UVA irradiation, they significantly decreased cell viability, especially ISdU. Flow cytometry provided detailed insights into the photosensitizers and UVA light synergistic mechanism of action, revealing: (1) cell cycle arrest in the G2/M phase, a typical response to severe DNA damage that serves as a protective mechanism by preventing the replication of compromised genetic material; (2) induction of early apoptosis, confirming the effectiveness of PS combined with UVA; (3) increased γ H2A.X levels, a marker of DNA double-strand breaks and (4) elevated reactive oxygen species (ROS), suggesting oxidative mechanisms in the cytotoxic effects of BrSdU/ISdU and UVA action.

In conclusion, this research clearly demonstrates that BrSdU and ISdU exhibit photochemical and photobiological properties, making them promising candidates as next-generation photosensitizers in photodynamic cancer therapy. Their selective activation by UVA light and effectiveness even under hypoxic conditions make them well-suited for the treatment of solid tumors. These findings provide a strong foundation for further studies, including detailed analyses of photoreaction mechanisms in biological environments and comparative analyses with classical photosensitizers. An interesting direction involves quantum-chemical calculations comparing the excited states of BrSdU and BrdU, which may help elucidate the role of the sulfur atom in determining photoreactivity and selectivity. Ultimately, the development of such compounds may contribute to more precise, effective, and safer light-based cancer treatment strategies.

Wykaz stosowanych skrótów

(6-4)PP – pirymidyna(6-4)pirymidynon

7-ADD – 7-aminoaktynomycyna D

8-oxo-dG – 8-oksy-2'-deoksyguanozyna

8-oxoG – 8-oksyguanina

ACN – acetonitryl

ALA – kwas 5-aminolewulinowy

BrdU – 5-bromo-2'-deoksyurydyna

BrSdU – 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyna

BrU – 5-bromouracyl

CPD – dimery cyklobutanowe (z ang. cyclobutane pyrimidine dimers)

dA – 2'-deoksyadenozyna

dC – 2'-deoksycytydyna

DCF – 2',7'-dichlorofluoresceina

DCF-DA – dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny

DCFH – 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina

dG – 2'-deoksyguanozyna

DHPLC – denaturująca wysokosprawna chromatografia cieczowa

dI – 2'-deoksyinosyna

diSU – 2,4-ditiouracyl

DMSO – dimetylosulfotlenek

DOX – doksorubicyna

DSB – dwuniciowe pęknięcia DNA (z ang. *double strand-breaks*)

dsDNA – dwuniciowe DNA (z ang. *double-strand DNA*)

dT – 2'-deoksytymidyna

EMA – Europejska Agencja Leków (z ang. *European Medicines Agency*)

ET – dalekozasięgowy transfer elektronów (z ang. *long-range electron transfer*)

FDA – Agencja Żywności i Leków (z ang. *US Food and Drug Administration*)

FSC – wykres przedniego rozproszenia światła (z ang. *forward scatter*)

FU – 5-fluorouracyl

GSO₂ – guanino-6-sulfinian

GSO₃ – guanino-6-sulfonian

HFIP – heksafluoroizopropanol

HpD – pochodne hematoporfiryn (z ang. *hematoporphyrin derivatives*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (z ang. *International Agency for Research on Cancer*)

IdU – 5-jodo-2'-deoksyurydyna

ILC – sieciowanie międzycieniowe (z ang. *interstrand cross-link*)

ISC – przejście międzysystemowe (z ang. *intersystem crossing*)

ISdU – 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyna

IU – 5-jodouracyl

LC-MS – ultrasprawa chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas

MAL – metylo-5-aminolewulinian

MDR – oporność wielolekowa (z ang. *multi drug resistant*)

MN – modyfikowane nukleozydy

MTT – (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy

NER – naprawa przez wycięcie nukleotydu (z ang. *nucleotide excision repair*)

NN – próbka nienaświetlona

ODN – oligonukleotydy

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem

PCM – wodny modelu ciągły

PDT – terapia fotodynamiczna (z ang. *photodynamic therapy*)

PE – wydajność wysiewu (z ang. *plating efficiency*)

PpIX – protoporfiryna IX

PS – fotosensybilizator

RFT – reaktywne formy tlenu

SdT – 4-tio-2'-deoksytymidyna

SdU – 4-tio- 2'-deoksyurydyna

SF – frakcja komórek przeżywających dana dawkę promieniowania (z ang. *survival fraction*)

SSB – jednoniciowe pęknięcie DNA (z ang. *single strand-breaks*)

SSC – rozproszenie boczne (z ang. *side scatter*)

ssDNA – pojedyncza nić DNA (z ang. *single-strand DNA*)

SU – 4-tiouracyl

TD-DFT – teoria funkcjonału gęstości zależnego od czasu (z ang. *time-dependent density functional theory*)

TEA – trietyloamina

TEAA – octan trietyloaminy

TIC – chromatogram prądu jonowego (z ang. *total ion chromatogram*)

UPLC – ultrasprawa chromatografia cieczowa

UV – promieniowanie ultrafioletowe

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

Wprowadzenie

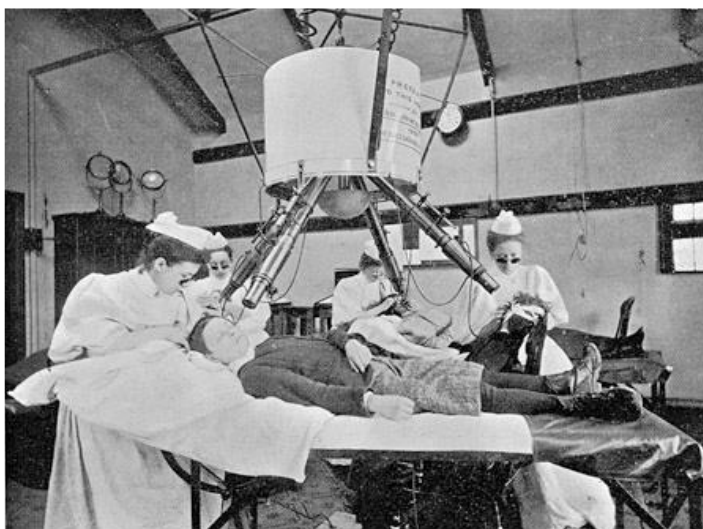
8.1 Terapia fotodynamiczna

Na całym świecie rośnie zachorowalność na nowotwory, co nieuchronnie niesie za sobą wzrost śmiertelności. Według najnowszych szacunków Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) u jednej na pięć żyjących osób rozwinie się w przyszłości nowotwór. W międzynarodowym raporcie GLOBOCAN 2022, zawierającym szacunkowe dane dotyczące zapadalności oraz umieralności spowodowanej 36 rodzajami raka w 185 krajach IARC podaje, że w 2022 roku pojawiło się około 20 milionów nowych przypadków zachorowań na nowotwory, a do 2050 roku ta liczba może wzrosnąć o 77%. Zarówno działania prewencyjne, czyli ograniczenie kluczowych czynników ryzyka powstawania raka m. in. palenia papierosów, otyłości czy infekcji oraz badania przesiewowe, jak i rozwijanie metod leczenia nowotworów, są kluczowe dla spowolnienia rozwoju tych chorób.¹

Jednym z wielu sposobów walki z chorobami nowotworowymi jest – wykorzystująca światło, terapia fotodynamiczna (*photodynamic therapy, PDT*).^{2,3,4} W odróżnieniu od fototerapii bazującej na absorpcji światła przez komórki i tkanki, PDT opiera się na wzbudzaniu promieniowaniem związku wprowadzonego do komórek i należy do metod foto-chemioterapeutycznych. Działanie terapii fotodynamicznej wymaga połączenia trzech komponentów: (1) związku chemicznego uczulającego komórki na promieniowanie, zwanego fotosensybilizatorem (PS); (2) promieniowania (światła) o długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji PS oraz (3) rozpuszczonego w komórkach tlenu.²

Już starożytne cywilizacje, takie jak egipska, chińska czy indyjska zauważyły pozytywny wpływ światła w leczeniu wielu chorób i schorzeń, a z czasem nauczyły się wykorzystywać je do m.in. maskowania objawów bielactwa.^{5,6} Dużo później, w XVII i XIX wieku we Francji ekspozycją na światło leczono gruźlicę, skorbut czy reumatyzm.⁷ Jednak dopiero XX wiek przyniósł zrozumienie działania światła w leczeniu chorób, co zaowocowało przyznaniem Nagrody Nobla w 1903 roku lekarzowi Nielsowi Finsenowi za metodę leczenia gruźlicy skóry (łupież rumieniowy) z zastosowaniem promieniowania UV.⁸ Dodatkowo Finsen jako pierwszy, wprowadził do fototerapii lecznicze łukowe lampy węglowe (Rysunek 1).^{5,9,10} Koncepcja śmierci komórkowej indukowanej synergicznym działaniem światła i związków chemicznych została zaproponowana na początku XX wieku. W 1900

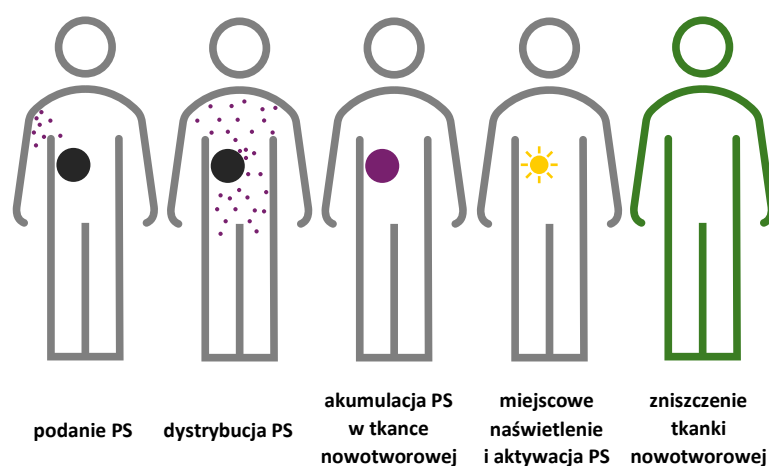
roku uczeń profesora Hermana von Tappeinera opisał śmiertelny dla pierwotniaków efekt połączenia światła i akrydyny.¹¹ Kilka lat później Herman von Tappeiner wraz z dermatologiem Albertem Jesionkiem zastosowali eozynę jako fotouczulacz w leczeniu nowotworów skóry, a w 1907 roku po raz pierwszy wprowadzili termin „działanie fotodynamiczne” oraz pokazali, że tlen jest integralnym komponentem fotosensybilizacji.^{12,13}



Rysunek 1. Zestaw aparatury zaprojektowany przez Finsena do leczenia tocznia.⁹

Niezaprzeczalnie największym osiągnięciem w rozwoju PDT było odkrycie hematoporfiryny (nazwa nadana w 1871 roku) w 1841 roku przez Scherera, który wyizolował ten związek z krwi. We wczesnych latach XX wieku właściwości fotosensybilizujące hematoporfiryny były szeroko badane. Niemiecki lekarz Betz jako pierwszy w 1912 roku badał fototoksyczne efekty działania hematoporfiryny, narażając się, przy okazji tych badań, na działanie światła i leku, co spowodowało u niego obrzęk i hiperpigmentację.^{5,9} Kolejnymi ważnym etapem rozwoju metody PDT było zaobserwowanie akumulacji hematoporfiryny w tkankach nowotworowych oraz późniejsze stwierdzenie, że stosowany preparat stanowi mieszaninę pochodnych hematoporfiryn (*hematoporphyrin derivatives*, HpD).^{5,14} Nowożytną erę PDT rozpoczął Dougherty w Buffalo, USA w latach siedemdziesiątych oczyszczając HpD, a tym samym izolując jej dimer: Photofrin – pierwszy fotosensybilizator zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków (*US Food and Drug Administration*, FDA) w 1995 roku, dla terapii nowotworowych.⁹ Od tego momentu PDT jest szeroko rozwijana, a jej kliniczne zastosowania wykraczają poza terapię nowotworów. Dziś Photofrin jest używany na całym świecie w leczeniu raka przelyku, oskrzeli i płuc. Od odkrycia leku klinicznie zatwierdzono używanie wielu nowych związków, takich jak: kwas 5-aminolewulinowy (ALA) i metyl-5-aminolewulinian (MAL), odpowiednio Levulan i Metvix jako prekursory porfiryn; Temoprofin (też pod nazwą Foscan) – pochodna chloryny czy Redaporfin z grupy bakteriochloryn.^{15,16}

Terapia fotodynamiczna jest obecnie stosowana jako alternatywna terapia wielu chorób nowotworowych.¹⁷⁻¹⁹ Działanie PDT opiera się na interakcji między fotosensybilizatorem, światłem o określonej długości fali oraz tlenem molekularnym, co sprzyja selektywnemu niszczeniu chorej tkanki.²⁰ Leczenie PDT rozpoczyna się od podania fotosensybilizatora – miejscowo lub systemowo, który selektywnie gromadzi się w docelowej tkance. Po upływie odpowiedniego czasu PS zostaje aktywowany poprzez naświetlenie wybranego obszaru ciała światłem o odpowiedniej długości. Wybór długości fali jest ściśle uzależniony od widma absorpcyjnego danego PS. W PDT długości te mieszczą się najczęściej w zakresie od 600 do 850 nm. Po zaabsorbowaniu fotonu PS przechodzi do elektronowych stanów wzbudzonych. Do stanu podstawowego, S_0 , fotosensybilizator może powrócić poprzez emisję światła w zjawisku fluorescencji, bezpromienistej dezaktywacji czy w wyniku przejścia międzysystemowego (*intersystem crossing*, ISC) do stanu trypletowego, T_1 , po którym następuje emisja fotonu w zjawisku fosforescencji lub bezpromieniście poprzez ISC do stanu S_0 i konwersja wewnętrzna. W długo żyjącym stanie trypletowym PS może reagować z biomolekułami lub z tlenem cząsteczkowym obecnym w komórce, w obu przypadkach prowadząc do powstania genotoksycznych reaktywnych form tlenu (RFT).^{2,3,11,16} Skutkiem działania PDT jest utlenianie szerokiego spektrum składników komórkowych, w tym kwasów nukleinowych, lipidów czy białek, co wywołuje poważne zmiany w szlakach sygnalizacyjnych lub w regulacji ekspresji genów (Rysunek 2).^{21,22}



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie działania terapii fotodynamicznej.

Terapia fotodynamiczna działa jako bardziej efektywne, zlokalizowane, mniej inwazyjne, kontrolowalne i skuteczne podejście terapeutyczne w porównaniu z wieloma innymi metodami. Ostatnio PDT coraz częściej stosuje się w połączeniu z tradycyjnymi lub

nietradycyjnymi procedurami terapeutycznymi, które wykazują synergę i przynoszą obiecujące rezultaty, czyniąc leczenie bardziej skutecznym i obciążonym mniejszą liczbą skutków ubocznych.³ PDT może być stosowana w połączeniu z chemioterapią, co prowadzi do zmniejszenia dawki wymaganego chemoterapeutyku, tym samym obniżając jego toksyczność. Kombinacja ta może również pomóc w zwalczaniu oporności wielolekowej (*multi drug resistant*, MDR) komórek nowotworowych. Photofrin w połączeniu z cisplatyną wykazał synergiczny efekt w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. Zastosowanie tej terapii przyczyniło się do znacznej redukcji guza oraz zwiększenia przeżywalności pacjentów.²³ W leczeniu tego typu nowotworu testowano też połączenie PDT z chirurgią. U pacjentów, którzy byli poddawani PDT po operacji, wykazano mniejsze ryzyko nawrotu nowotworu i dłuższe okresy przeżycia bez progresji raka w porównaniu do osób tylko operowanych. Tutaj również wykorzystano Photofrin.²⁴ Wreszcie, nawet terapie celowane na geny związane z opornością na leki – siRNA, są kojarzone z terapią fotodynamiczną. Pierwsza faza badań klinicznych u pacjentów z rakiem trzustki wykorzystująca Temoporfin i siRNA ukierunkowany na gen KRAS (gen kodujący białko, którego mutacje często odpowiadają za niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych), wykazała zmniejszenie guza i zahamowanie wzrostu nowotworu.²⁵ Skojarzenie terapii fotodynamicznej z innymi terapiami przeciwnowotworowymi już zaowocowało wieloma sukcesami. Zmniejszanie rozmiaru guzów oraz hamowanie ich wzrostu, obniżenie dawek leków i fotosensybilizatorów, a co za tym idzie – zmniejszenie toksyczności oraz skutków ubocznych terapeutyków czy przewyciężanie oporności nowotworów na terapię to tylko kilka nieocenionych zalet diskutowanego połączenia różnych metod leczniczych.^{2,3,4}

Obecnie terapia fotodynamiczna znajduje zastosowanie głównie w leczeniu onkologicznym, co jednak nie przeszkadzało pionierom tej metody wykorzystywać ją w leczeniu innych chorób (Tabela 1). Kilka przykładów zastosowania PDT w chorobach nienowotworowych to: (1) choroby skóry: PDT może być wykorzystywana w terapii chorób skóry, takich jak jej łojotokowe zapalenie, trądzik różowaty czy łuszczyca. Kwas 5-aminolewulinowy lub metyl-5-aminolewulinian aplikowane na skórę, a następnie aktywowane światłem, co prowadzi do zredukowania stanu zapalnego i poprawy stanu skóry;²⁶ (2) choroby oczu: PDT w leczeniu chorób oczu, takich jak zwyrodnienie plamki żółtej lub śródmiąższowe zapalenie rogówki skutecznie redukuje lub hamuje postęp schorzenia;²⁷ (3) choroby bakteryjne: terapia fotodynamiczna wspomaga leczenie infekcji bakteryjnych, zwłaszcza tych opornych na antybiotyki. Przykładami takich infekcji są

zakażenia skórne, układu moczowego czy jamy ustnej;²⁸ (4) kardiologia: PDT jest wykorzystywana w leczeniu chorób naczyń wieńcowych i innych schorzeń sercowo-naczyniowych, a szczególne zastosowanie fotosensybilizatorów ma miejsce w redukcji stresu oksydacyjnego i leczeniu zapalenia mięśnia sercowego po zawale.^{29,30}

Tabela 1. Liczba trwających badań klinicznych z wykorzystaniem terapii fotodynamicznej w różnych stanach chorobowych (z clinicaltrials.gov).³¹

Stan chorobowy	Liczba badań
Nowotwory	345
choroby dermatologiczne	189
choroby ust	115
choroby oczu	100
choroby kardiologiczne	19

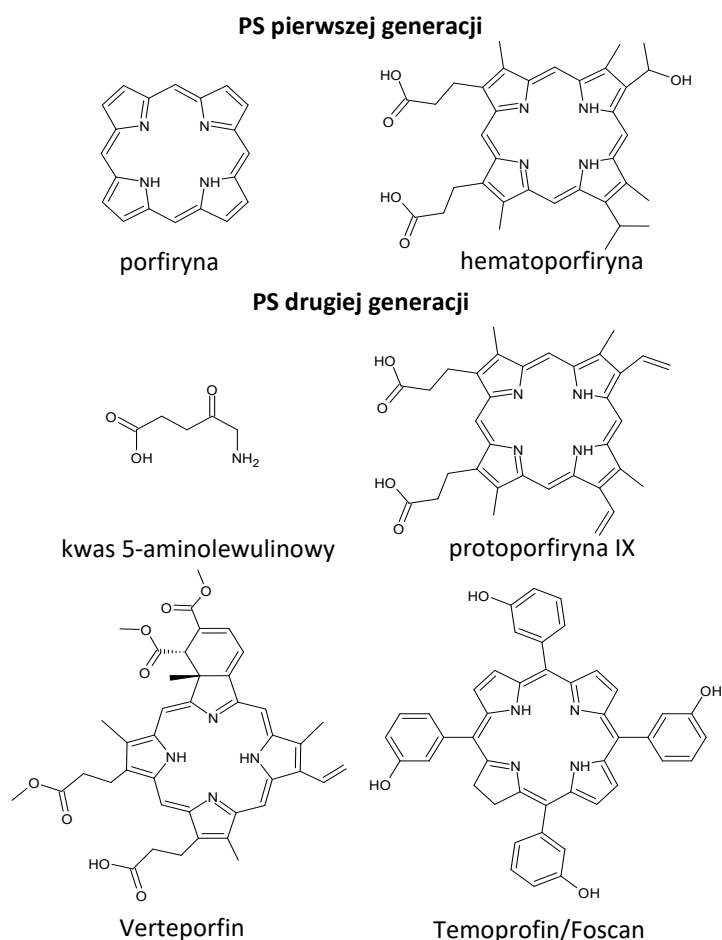
8.1.1 Grupy fotosensybilizatorów, ograniczenia PDT oraz cechy idealnego fotouczulacza

Wraz z rozwojem badań naukowych nad fotouczulaczami oraz badań klinicznych z zastosowaniem terapii fotodynamicznej pojawiła się cała gama fotosensybilizatorów. PS stosowane w terapii przeciwnowotworowej zostały podzielone na kilka grup. Naturalnie występujące porfiryny i ich pochodne stanowią pierwszą generację fotouczulaczy, do których należą pochodne hematoporfiryny oraz Photofin II, czyli oczyszczona forma HpD (Rysunek 3).³² Oprócz wcześniej wspomnianych zastosowań, leki te używano w leczeniu raka jelita grubego, mózgu czy piersi. Pierwsza generacja PS charakteryzuje się wieloma ograniczeniami związanymi z rozbudowaną strukturą chemiczną opartą o cząsteczkę tetrapiruolu, hydrofobowym charakterem oraz cytotoksycznością.^{33,34}

Znaczący przełom w rozwoju PDT miał miejsce wraz z wprowadzeniem drugiej generacji fotosensybilizatorów. Nowe związki z grupy ftalocyjanin oraz chloryn wykazują zwiększoną selektywność wobec zmienionych nowotworowo komórek oraz absorpcję światła o dłuższych falach, co skutkuje głębszą penetracją tkanek. Najbardziej znanym lekiem z tej grupy jest kwas 5-aminolewulinowy (Rysunek 3) będący prekursorem protoporfiryny IX (PpIX) – silnego fotouczulacza.³³ Dużą zaletą PpIX jest stosunkowo krótki czas eliminacji, w porównaniu z innymi PS, ponieważ jest ona również substratem w syntezie hemu w komórkach.³⁵ Kolejną cechą leku jest jego wydajniejsza akumulacja w komórkach nowotworowych, w porównaniu ze zdrowymi. Zmieniony metabolizm tych

pierwszych skutkuje mało efektywną produkcją hemu, przez co PpIX jest wydajnie akumulowana, podczas gdy zdrowe komórki ją metabolizują.³⁶ Inne PS drugiej generacji stosowane w praktyce to m. in. Temoprofin/Foscan (meta-tetrahydroksyfenylochloryna) z grupy chloryn, Motexafin Lutetium z aromatyczną metaloporfiryną w strukturze czy Verteporfin pochodzący z grupy benzoporfiryn (Rysunek 3).³²

Ostatnie prace nad projektowaniem nowych fotosensybilizatorów doprowadziły do powstania trzeciej generacji tych związków. Substancje oparte na już znanych strukturach porfiryn, chloryn czy ftalocyjanin są łączone z białkami, aminokwasami, przeciwciałami czy węglowodanami w celu poprawy ich celowanego działania. Wprowadzono też zaawansowane systemy dostarczania leku, często z zastosowaniem nanocząstek.³⁷ Fotouczulacze trzeciej generacji są wciąż udoskonalane, co sprawia, że ta grupa związków dynamicznie się rozwija. Dążenie do zwiększenia stężenia leku w zmienionych komórkach czy zmniejszenia ogólnoustrojowej toksyczności jest motorem ciągłego rozwoju tej klasy fotosensybilizatorów.¹⁶



Rysunek 3. Wzory strukturalne wybranych fotosensybilizatorów należących do pierwszej oraz drugiej generacji.

Mimo wielu zalet, terapia fotodynamiczna jest obarczona kilkoma ograniczeniami, takimi jak:

- wciąż niewielka liczba dostępnych komercyjnie leków fotouczulających,
- ograniczona penetracja światła – najczęściej stosowane długości fali promieniowania docierają do tkanek położonych w odległości 10 mm w głąb eksponowanej powierzchni,
- zależność skuteczności terapii od ilości tlenu cząsteczkowego obecnego w komórkach. Warto zauważyć, że guzy lite, stanowiące ok. 80% wszystkich nowotworów, charakteryzują się hipoksją, czyli niedotlenieniem, co znacznie ogranicza efektywność PDT,³⁸

- konieczność unikania światła w okresie akumulacji PS – w zależności od właściwości farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych uczulacza czas ten może się różnić, jednak przedwczesna ekspozycja na światło może aktywować lek nieskumulowany w zmienionej tkance,
- utrzymująca się skórna nadwrażliwość na światło,
- skomplikowany proces doboru dawki PS i parametrów naświetlania, które muszą być dostosowane do wielkości guza, jego lokalizacji oraz natlenienia tkanek,³⁹
- skutki uboczne terapii, takie jak ból podczas leczenia, który doświadcza około 60% pacjentów (najczęściej spowodowany dyfuzją PS lub tlenu singletowego do sąsiadujących komórek, np. neuronów), rumień oraz obrzęk w naświetlanym miejscu, pokrzywka, alergiczne zapalenie skóry, immunosupresja i karcynogeneza skóry.⁴⁰

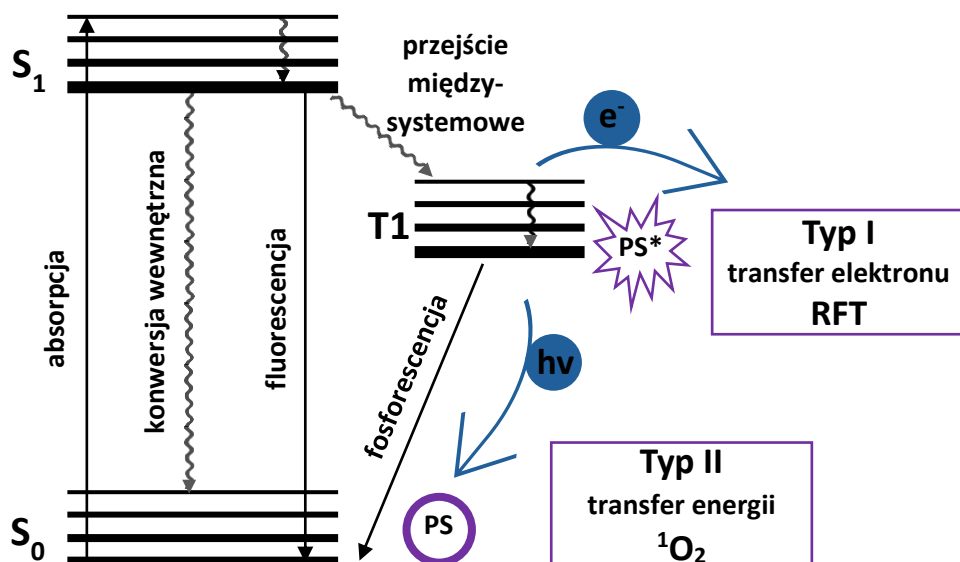
Ograniczenia oraz skutki uboczne terapii fotodynamicznej motywują badaczy do ciągłego ulepszania i poszukiwania nowych fotosensybilizatorów. Mając na uwadze wady PDT możliwe jest sporządzenie listy cech „idealnego” fotosensybilizatora:

- brak wewnętrznej toksyczności/mutagenności,
- selektywna akumulacja w tkance nowotworowej,
- brak aktywacji PS przez światło otoczenia (dienne) – fotosensybilizator powinien być aktywowany tylko przez konkretną długość fali,
- odpowiednia trwałość PS w tkankach, umożliwiającą wielokrotne naświetlanie bez niepożądanego wysokiego trwania leku w organizmie,
- brak wczesnych i późnych efektów ubocznych, zarówno ogólnoustrojowych jak i mających wpływ na struktury lokalne,
- łatwość podawania leku.^{41,42}

8.1.2 Mechanizmy działania terapii fotodynamicznej

Skuteczność terapii fotodynamicznej wynika z synergicznego działania trzech czynników: fotosensybilizatora, światła o określonej długości fali oraz tlenu. Fotosensybilizator absorbuje promieniowanie odpowiadające jego maksimum absorpcji.² Absorpcja fotonu wywołuje przejście elektronowe cząsteczki fotosensybilizatora ze stanu podstawowego (S_0) do stanu wzbudzonego elektronowo (S_1). Cząsteczka w krótko żyjącym stanie S_1 może tracić nadmiar energii poprzez emisję fotonu w procesie fluorescencji lub jej przekazanie w postaci ciepła na drodze konwersji wewnętrznej. Jednocześnie PS we wzbudzonym stanie singletowym poprzez przejście międzysystemowe może osiągnąć długo żyjący stan trypletowy (T_1) o niższej niż S_1 energii.^{43,44} Stan trypletowy może emitować foton fosforescencji (przejście wzbronione ze względu na spin, o niskiej wydajności) lub poprzez przeniesienie energii przekazać energię wzbudzenia na inne indywidua obecne w środowisku reakcji (Rysunek 4).⁴⁵

Najbardziej znane są dwa mechanizmy działania PDT, w których fotosensybilizator oddziałuje bezpośrednio z biomolekułami (mechanizm typu I) lub z tlenem cząsteczkowym (mechanizm typu II).⁴⁵ Reakcje typu I obejmują przeniesienie elektronu lub atomu wodoru na biomolekuły (np. w błonie komórkowej) generując anionorodniki lub rodniki obojętne. Reakcje następce anionorodnika z tlenem cząsteczkowym prowadzą do powstania reaktywnych form tlenu, w tym anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), który sam nie powoduje znacznych uszkodzeń oksydacyjnych, ale ulega reakcji dysmutacji z utworzeniem nadtlenu wodoru (H_2O_2). W obecności jonów metali przejściowych czy reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym, nadtlenek wodoru staje się źródłem rodnika hydroksylowego ($OH^{\cdot}$) – znanego czynnika cytotoksycznego. Rodnik hydroksylowy może oddziaływać z tlenem czy tlenkiem azotu tworząc odpowiednio tlen singletowy (1O_2) lub nadtlenoazotyny. Wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy może też oddziaływać z substratami organicznymi, np. kwasami tłuszczowymi generując biodegradacyjne reakcje łańcuchowe. Z kolei fotosensybilizatory działające wg mechanizmu typu II przenoszą nadmiar energii na tlen cząsteczkowy z utworzeniem tlenu singletowego (anihilacja tryplet-tryplet). W terapii fotodynamicznej przyjmuje się, że to właśnie ten mechanizm odpowiada za większość powstających RFT.^{2,3,9,15,43,46}



Rysunek 4. Mechanizmy typu I oraz II działania fotosensybilizatorów pokazane na diagramie Jabłońskiego. S_0 – stan podstawowy; S_1 – pierwszy stan singletowy; T_1 – pierwszy stan trypletowy; PS – fotosensybilizator w stanie podstawowym; PS^* – fotosensybilizator w stanie wzbudzonym.

Tlen singletowy, inne reaktywne formy tlenu oraz rodniki oddziałują z substratami biologicznymi takimi jak lipidy, białka czy DNA. W DNA mogą ulegać uszkodzeniom oksydacyjnym zarówno zasady azotowe, jak i reszty cukrowe – m.in. poprzez tworzenie krzyżowych wiązań DNA z białkami lub utlenianie wiązań w obrębie szkieletu cukrowego. Mimo występujących w komórkach mechanizmów naprawczych DNA, nadmierna ilość uszkodzeń prowadzi do powstawania mutacji lub śmierci komórkowej.^{43,47} Spośród czterech zasad obecnych w kwasach nukleinowych guanina jest najbardziej podatna na utlenianie przez 1O_2 . 8-Oksyguanina (8-oxoG) oraz 8-oksy-2'-deoksyguanozyna (8-oxo-dG) to najczęstsze produkty oksydacji tej zasady, często wykorzystywane jako biomarkery stresu oksydacyjnego.⁴⁸

Reaktywne formy tlenu powstające w wyniku reakcji typu I i II są odpowiedzialne za śmierć komórek i terapeutyczne działanie PDT. Reakcja fotochemiczna może przebiegać według obu mechanizmów jednocześnie, a ich proporcje są uzależnione od m. in. typu PS i jego cech, dostępności substratu oraz warunków środowiskowych.⁴⁹ W terapii fotodynamicznej to mechanizm typu II uznaje się za dominujący, a tlen singletowy za główny czynnik cytotoksyczny. Dlatego wydajność kwantowa tworzenia tlenu singletowego jest jednym z ważniejszych parametrów fotouczulaczy i zależy od wydajności kwantowej

oraz czasu życia ich wzbudzonego stanu trypletowego.^{50,51} Z powodu krótkiego czasu życia RFT oraz ich wysokiej reaktywności, jedynie komórki znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie PS, są podatne na działanie terapii. Czynniki takie jak rodzaj fotouczulacza, jego lokalizacja wewnątrz- i zewnątrzkomórkowa, całkowita dawka światła, dostępność tlenu i czas od podania leku do ekspozycji na światło warunkują zakres uszkodzeń i śmierć komórkową w terapii fotodynamicznej.^{43,45,52}

W literaturze wspomina się też o innym mechanizmie działania PDT, znanym jako typ III. W przeciwieństwie do poprzednich typów, działanie PS w mechanizmie III nie jest zależne od obecności tlenu w komórce, a od bezpośredniego oddziaływania wzbudzonego PS z określonymi biomolekułami.^{53,54} Takie działanie PS ma przewagę nad mechanizmami typu I i II, gdyż omija „wąskie gardło” terapii związane z dostępnością tlenu w komórkach nowotworowych, charakteryzujących się hipoksją.⁵⁵ Przykładem takiego fotouczulacza jest NBEX (X = S, Se, Te) należący do klasy barwników N-heterocyklicznych. Posiada on zdolność do selektywnego wiązania RNA w środowisku komórkowym bez zaangażowania innych komponentów. Badania *in vivo* potwierdziły akumulację fotouczulacza w tkance guza oraz jego wiązanie z RNA, co ostatecznie prowadziło do zniszczenia komórek nowotworowych w warunkach niedotlenienia.⁵⁴

8.1.3 Fotosensybilizatory wykorzystywane w onkologii ze szczególnym uwzględnieniem leczenia raka prostaty

Obecnie terapia fotodynamiczna (PDT) nie jest stosowana jako leczenie konwencjonalne, takie jak chirurgia, radioterapia czy chemioterapia. Wykorzystuje się ją natomiast jako metodę uzupełniającą, alternatywną lub specyficzną – w wybranych przypadkach klinicznych bądź w leczeniu paliatywnym.⁵⁶ Jednak w badaniach klinicznych PDT jest szeroko wykorzystywana – indywidualnie bądź w połączeniu z innymi terapiami. Najczęstsze wykorzystywanie terapii fotodynamicznej można zauważyć w leczeniu nowotworów skóry, z uwagi na ich dostępność. Photofrin oraz ALA i jego pochodne zostały szeroko zbadane w leczeniu płytkich i powierzchownych nowotworów skóry, jak rak podstawnokomórkowy czy rógowacenie słoneczne. Rezultaty stosowania PDT są porównywalne lub lepsze od konwencjonalnego leczenia, np. 5-fluorouracylem (FU).⁵⁷ Dodatkowym atutem stosowania PDT jest mniejsza inwazyjność terapii w porównaniu z np. chirurgicznym leczeniem, szczególnie na widocznych obszarach ciała takich jak szyja, twarz czy dekolt.⁵⁸ PDT znajduje też zastosowanie w leczeniu wczesnych stadiów raka przewodu

pokarmowego oraz stanów przedrakowych, jak przełyk Barretta, najczęściej z użyciem Photofrin.⁵⁹ Skuteczne zastosowanie kliniczne terapii z zastosowaniem fotouczulaczy odnotowano przy leczeniu nowotworów głowy i szyi. Wczesne stadia nowotworów jamy ustnej, gardła i krtani są skutecznie eliminowane lub hamowane z zachowaniem mowy czy połykania. W badaniach z zastosowaniem PS drugiej generacji – ALA i Foscan, odnotowano wysokie wskaźniki odpowiedzi na leczenie, sięgające 85% w przypadku zmian wczesnych oraz całkowitą redukcję masy guza u 43% pacjentów z zaawansowaną chorobą.⁶⁰ PDT wykorzystuje się też w walce z nowotworami płuc, pęcherza moczowego, mózgu, nieoperacyjnego nowotworu dróg żółciowych i innych.^{3,61-62}

5 FAKTÓW O NOWOTWORZE PROSTATY

dane światowe z 2022 roku



Rysunek 5. Fakty dotyczące nowotworu prostaty.⁶³

Według statystyk przeprowadzonych przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organization*, WHO) spośród wszystkich nowotworów z wyłączeniem nieczerniakowatego raka skóry, to właśnie nowotwór prostaty jest drugim najczęściej diagnozowanym u mężczyzn na całym świecie (Rysunek 5).⁶⁴ Wybór odpowiedniego leczenia zależy od stopnia zaawansowania raka, charakterystyki guza czy wyników przeprowadzonych badań. Najczęstszymi metodami leczenia są chirurgia, czyli usunięcie gruczołu krokowego, radioterapia czy hormonoterapia. Metody te często niosą za sobą wiele skutków ubocznych, takich jak bezpłodność, zaburzenia erekcji i nietrzymanie moczu w przypadku prostatektomii czy przejście komórek nowotworowych w stadium niewrażliwe na działania hormonów – androgenów.^{65,66} Dla pacjentów z nowotworem o lekkim stopniu złośliwości lub we wczesnym stadium choroby, terapia fotodynamiczna staje się metodą leczenia pozwalającą na wyeliminowanie raka przy minimalnym uszkodzeniu zdrowych tkanek prostaty, co zmniejsza ryzyko działań niepożądanych. Padeliporfina (WST09/Tookad), czyli bakteriofeoforbid (porfirynowy kompleks palladu), to leki zatwierdzone przez Europejską Agencję Leków (*European Medicines Agency*, EMA) do leczenia niskiego ryzyka jednostronnego gruczolaka gruczołu krokowego przy stosowaniu

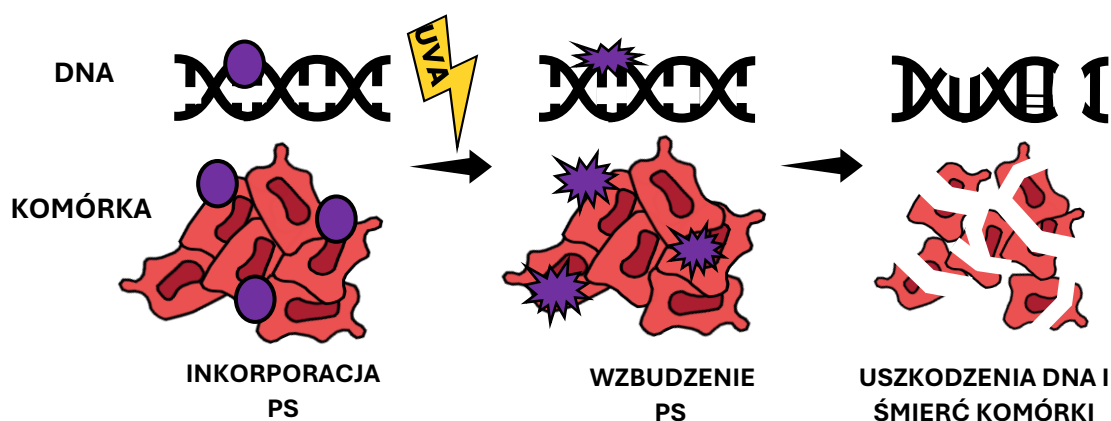
naczyniowej terapii fotodynamicznej.⁶¹ Tookad absorbuje światło w zakresie bliskiej podczerwieni (763 nm), co pozwala na głęboką penetrację tkanek. Leczenie charakteryzuje się wysoką skutecznością przy minimalnym ryzyku poważnych powikłań. Badanie kliniczne fazy III pokazało, że terapia prowadzi do znacznego zmniejszenia progresji raka w porównaniu do grupy kontrolnej (aktywny nadzór). Po 2 latach od zakończenia leczenia u 76% pacjentów nie doszło do powrotu nowotworu, co potwierdza skuteczność leczenia raka prostaty we wczesnym stadium.^{58,67} W 2022 roku niemieccy lekarze przeprowadzili badanie podsumowujące początkowe doświadczenie z lekiem Tookad i porównali je z stosowaniem prostatektomii radykalnej. Po 12 i 24 miesiącach od zakończenia terapii PDT, rak prostaty o lekkim i średnim zaawansowaniu uległ wznowie u 27% pacjentów. Żaden z pacjentów leczonych chirurgicznie nie miał nawrotu. Porównanie skutków ubocznych pokazało, że zachowanie funkcji erekcyjnej w przypadku pacjentów PDT wystąpiło w 71% przypadków, a dla chirurgicznych tylko 31%. U ponad 90% pacjentów po prostatektomii występowało nietrzymanie moczu.⁶⁸

Pomimo, że terapia fotodynamiczna w leczeniu zmian nowotworowych została opisana już na początku XX wieku, jej wprowadzenie do powszechnej praktyki postępuje stosunkowo wolno. Często ograniczeniem jest użycie zaawansowanych technologii naświetlania i skomplikowana dozymetria, wymagająca zatrudnienia wysoko wyspecjalizowanego personelu. Problemem jest też brak wystarczającej ilości badań klinicznych III fazy, które mogłyby udowodnić wyższą skuteczność PDT w porównaniu z innymi metodami. Bardziej precyzyjna dozymetria, rozwój technologii naświetlania oraz ulepszone fotosensybilizatory otwierają dla terapii fotodynamicznej drogę do szerokiego stosowania w onkologii.⁵⁶

8.2 Modyfikowane nukleozydy oraz zasady azotowe jako fotosensybilizatory

Modyfikowane nukleozydy (MN) wrażliwe na dysocjacyjne przyłączenie elektronu, to grupa związków będących radiosensybilizatorami uwrażliwiającymi komórki nowotworowe na działanie promieniowania jonizującego, stosowanego w radioterapii. Związki te mogą wykazywać również właściwości fotosensybilizujące.^{69,70} Niektóre MN dzięki swojemu podobieństwu do natywnych nukleozydów są wcielane do nici DNA podczas jego biosyntezy czy naprawy. Ponadto MN wykazują selektywność względem komórek nowotworowych dzięki ich niekontrolowanym podziałom oraz szybkiemu wzrostowi, co przekłada się na wyższy stopień inkorporacji w porównaniu z komórkami

zdrowymi. Aby znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej związki tego typu nie mogą wykazywać toksyczności, a uszkodzenia nici DNA muszą powstawać dopiero po zastosowaniu promieniowania (Rysunek 6).⁷¹ Na szczególną uwagę jako fotosensybilizatory zasługują tionukleozydy, które dzięki obecności atomu siarki absorbują promieniowanie z zakresu UVA – niskotoksyczne względem natywnego DNA.⁷² Jedną z zasad nukleinowych, której fotosensybilizujące działanie potwierdzono na wielu liniach komórkowych oraz w modelu zwierzęcym raka pęcherza moczowego jest 4-tio-2'-deoksytymidyna (SdT).⁷³⁻⁷⁶



Rysunek 6. Schemat obrazujący działanie modyfikowanych nukleozydów jako fotosensybilizatorów.

8.2.1 Tiopochodne nukleozydów oraz zasad azotowych

4-tiotymidyna

4-Tio-2'-deoksytymidyna to analog nukleozydu tyminy różniący się od natywnego odpowiednika podstawieniem siarki w miejscu tlenu przy węglu C4 (Rysunek 7). Siarkowa pochodna tymidyny po raz pierwszy została zsyntezowana w 1959 roku, a jej trifosforan 9 lat później.^{77,78} Szereg późniejszych badań z użyciem polimerazy DNA I potwierdził możliwość włączania SdT do DNA.⁷⁹ W 1989 roku pokazano możliwość syntezy modyfikowanych oligonukleotydów metodą amidofosforynową, tym samym otwierając drogę do badania DNA znakowanego pochodnymi zasad nukleinowych.⁸⁰ Doniesienia z lat 90-tych wskazują na fotochemiczne sieciowania DNA przez wcieloną do biopolimeru SdT.⁸¹ Reakcję fotosieciowania obserwowano już wcześniej w natywnym DNA, ale przy

wzbudzeniu molekuly promieniowaniem UVC i UVB – z uwagi na maksima absorpcji pirymidyn i puryn. Swoje specyficzne wlasciwosci fotochemiczne 4-tiotymidyna zawdziacza nieco odmiennej strukturze elektronowej. Wiazanie podwójne C=S jest slabszym wiazaniem niz C=O wystepujace w kanonicznej tymidynie. Ta roznica powoduje mniejsza roznicę energii między orbitalami molekularnymi biorącymi udział w przejściu elektronowym, co skutkuje zwiększoną długością fali wzbudzenia.⁸² Efektem jest przesunięcie maksima absorpcji z 260 nm do 340 nm, czyli do zakresu UVA. Te mniej energetyczne, dłuższe fale są bardzo słabo absorbowane przez natywne DNA i powodują stosunkowo niewielkie bezpośrednie uszkodzenia biopolimeru.⁸³

Badania nad możliwością zastosowania tiotymidyny w terapii fotodynamicznej rozpoczęła grupa Karrana. Udowodniono, że SdT wciela się do DNA ludzkich zdrowych komórek (około 0,5% cząsteczek tymidyny zostaje zastąpionych jej modyfikowanym analogiem) i znacząco uwrażliwia komórki na promieniowanie UVA.⁸⁴ Późniejsze prace nad identyfikacją i zrozumieniem mechanizmu działania SdT pokazały, że powstające fotoprodukty są podobne do adduktów tymidyny po naświetleniu promieniowaniem UVB. Ponadto wykluczono udział tlenu singletowego oraz reaktywnych form tlenu w mechanizmie działania pochodnej.⁷⁵ Fotosensybilizujące właściwości tiotymidyny zostały też zbadane w eksperymencie *in vivo* z wykorzystaniem szczurów z zaimplantowanymi komórkami raka pęcherza moczowego. W badaniu potwierdzono brak toksyczności pochodnej oraz jej efektywniejszą inkorporację do chorych komórek, w porównaniu z badanymi zdrowymi organami. Połączenie działania SdT z promieniowaniem UVA spowodowało regresję guza.⁷⁶ Zbadano też stopień penetracji miejscowo zastosowanej tiotymidyny oraz jej działanie fotouczulające na wycinkach ludzkiego nowotworu skóry: raka podstawnokomórkowego oraz kolczystokomórkowego *ex vivo*, a także na normalnej skórze. Wyniki pokazały, że wewnątrzogniskowe stężenie SdT oraz penetracja promieniowania UVA są wystarczające do aktywowania efektu PDT i indukcji śmierci komórek. Ponadto pokazano, że wycinki skóry normalniej nie były znacząco dotknięte leczeniem.⁸⁵

Porównując listę wymagań dla idealnego fotosensybilizatora z właściwościami SdT, wyraźnie widać jak ważną rolę pochodna ta może odgrywać w terapii fotodynamicznej. Właściwości 4-tiotymidyny istotne z punktu widzenia terapii PDT można opisać następująco:

- brak toksyczności względem komórek bez zastosowania promieniowania,
- możliwość inkorporacji do DNA komórek podczas ich proliferacji czy naprawy – szybszy podział komórek nowotworowych skutkuje większym poziomem inkorporacji związku, w porównaniu ze zdrowymi komórkami,
- brak wcielania przez komórki nieproliferujące, jak neurony – pozwala uniknąć bólu pojawiającego się przy klasycznej PDT,
- fotowrażliwość na promieniowanie z zakresu UVA – nietoksycznego dla natywnego DNA,
- niewielka cząsteczka, nieposiadająca ładunku, o dobrej rozpuszczalności w wodzie i łatwej przepuszczalności przez błony komórkowe,
- aktywacja cząsteczki i działanie fotouwrażliwiające nie wymagają obecności tlenu, co znacznie poprawia efektywność PDT z uwagi na niedotlenienie większości rodzajów komórek nowotworowych.⁴¹

6-tioguanina

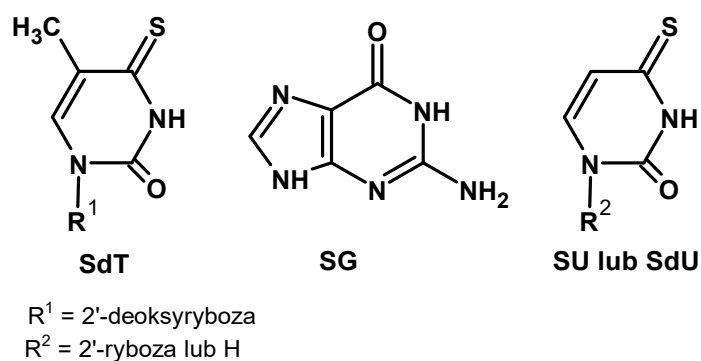
6-Tioguanina (SG) jest obok azatiopryny oraz merkaptopuryny, silnym lekiem przeciwnowotworowym, przeciwzapalnym oraz immunosupresyjnym (Rysunek 7).⁸⁶ SG w formie proleku jest, na drodze enzymatycznej, transformowana do nukleotydu i wbudowywana do cząsteczki kwasu nukleinowego (substytucja około 0,2% kanonicznej guaniny w DNA).⁸⁷ Oprócz cytotoksycznego działania (metylacja *in situ* czy sieciowanie międzyniciowe (*interstrand cross-link*, ICL w DNA) tioguanina absorbuje w zakresie UVA (maksimum przy 340 nm) i może być aktywowana fotochemicznie. Te właściwości z perspektywy rutynowego zastosowania leku są niepożądane – u pacjentów po transplantacji zwiększają ryzyko zachorowania na nowotwory skóry ok. 100-krotnie.⁸⁸

Mechanizm fototoksycznego działania SG jest wciąż dyskutowany. Badania wskazują, że fotochemiczne działanie tioguaniny odbywa się głównie przez mechanizm typu II fotosensybilizacji, czyli generowanie tlenu singletowego. 6-Tioguanina łatwiej ulega utlenieniu niż kanoniczne zasady DNA, co sprawia, że jest szczególnie podatna na działanie reaktywnych form tlenu. Już w latach 60-tych zidentyfikowano główne produkty naświetlania wodnego roztworu SG za pomocą UVA. Są to guanino-6-sulfonian (GSO₂)

i guanino-6-sulfonian (GSO_3).⁸⁹ Te produkty utleniania tioguaniny obserwuje się też w badaniach nad fotosensybilizacją modelowych oligonukleotydów znakowanych SG czy w badaniach *in vitro*. Inne potwierdzone uszkodzenia to pęknięcia nici DNA, wiązania krzyżowe między kwasem nukleinowym i białkiem, utlenianie białek czy sieciowanie międzyniciowe w obrębie DNA.⁹⁰ Cała gama genotoksycznych uszkodzeń powoduje zatrzymanie replikacji i transkrypcji DNA oraz śmierć komórki.^{91,92}

4-tiouracyl oraz 4-tio-2'-deoksyurydyna

Kolejną szerzej zbadaną zasadą jest 4-tiouracyl (SU) oraz jego nukleozyd (Rysunek 7). Od ponad 60 lat SU jest wykorzystywany w eksperymentach nad fotosieciowaniem RNA, w celu badania struktur RNA oraz interakcji RNA-białko.^{93,94} Obecnie 4-tiouracyl oraz 4-tio-2'-deoksyurydyna (SdU) są wykorzystywane w metodzie PAR-CLIP umożliwiającej badanie wiązania białek z konkretnymi sekwencjami RNA w transkryptomie ludzkim.⁹⁵ Grupa Polluma wykazała, że 2,4-ditiouracyl (diSU) przewyższa aż trzykrotnie monosiakrowaną pochodną pod względem wydajności sieciowania RNA przy 365 nm.⁹⁶ Pozwala to na zastosowanie niższych dawek promieniowania oraz stężeń fotouczulacza. Zarówno SU jak i diSU zmniejszają proliferację komórek po zastosowaniu promieniowania z zakresu UVA, co czyni z tych związków aktywne fotosensybilizatory.⁸⁴ Naświetlanie mono oraz ditiouracylu prowadzi do generowania tlenu singletowego, co wskazuje na działanie pochodnych zgodnie z mechanizmem typu II.⁹⁷



Rysunek 7. Struktury tionukleozydów o właściwościach fotosensybilizujących.

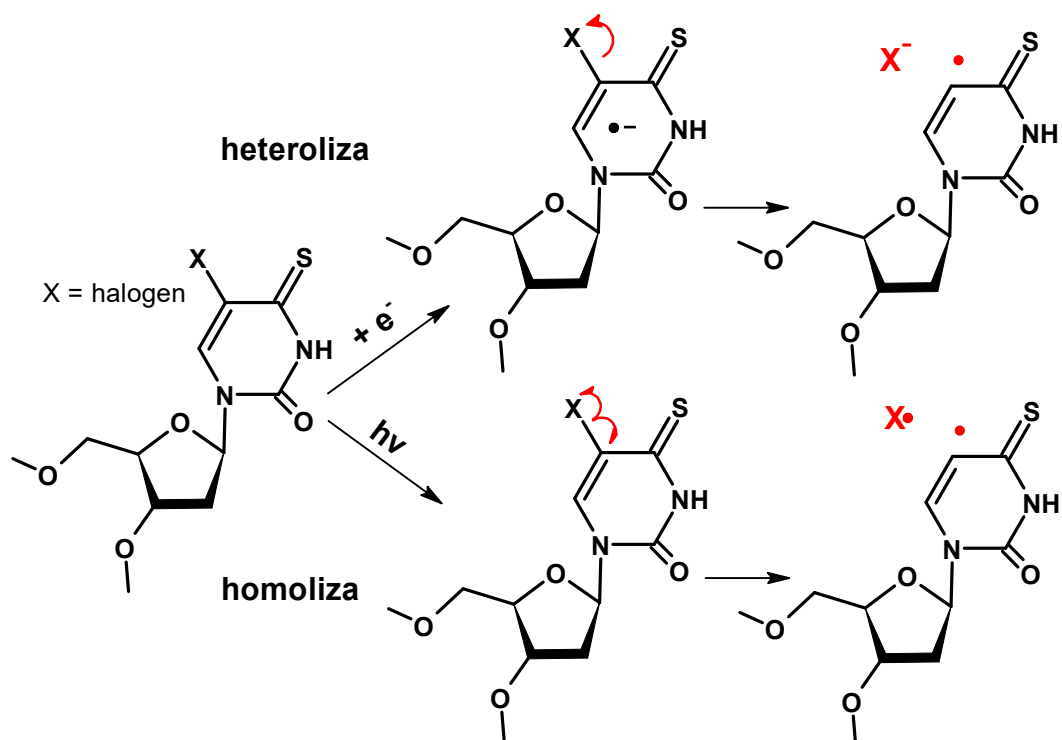
8.2.2 Halogenowane pochodne 2'-deoksyurydyny

Halogenowane pirymidyny takie jak 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU) lub 5-jodo-2'-deoksyurydyna (IdU) dobrze znane jako radiosensybilizatory to też fotoreaktywne analogi

uracylu. Właściwości fotouczulające pochodnych zbadano na poziomie chemicznym oraz biologicznym.⁹⁸⁻¹⁰¹ Inkorporacja BrdU do komórkowego DNA może zachodzić na poziomie od 10 do nawet 30%, w zależności od rodzaju komórek oraz warunków wcielenia, a modyfikowane DNA zachowuje swoje biologiczne właściwości.¹⁰² Halogenowane pochodne zwiększają podatność komórek na fotochemiczne pękanie DNA – jednoniciowe (*single strand-break*, SSB) lub dwuniciowe (*double strand-break*, DSB), a sama modyfikacja wprowadza do biomolekuły miejsca alkalicznie labilne, podatne na degradację.⁹⁸ Halogenowane pochodne, w odróżnieniu od tiopochodnych nukleozydów wykazują absorpcję w obrębie 280 nm, przez co ich aktywacja fotochemiczna zachodzi przy zastosowaniu promieniowania UVB – toksycznego również dla natywnego DNA.

Badania powstających uszkodzeń pozwalają zgłębić sposób działania halogenowych fotosensybilizatorów. Pękanie nici DNA jest wywoływane fotoindukowanym dalekozasięgowym transferem elektronu (*long-range electron transfer*, ET), wzdłuż podwójnej helisy DNA. Utworzenie rodnikaanionu halogenouracylu skutkuje uwolnieniem anionu halogenkowego i rodnika urydylowego.¹⁰³ Kolejne oderwanie atomu wodoru od sąsiedniej reszty cukrowej prowadzi do powstania 2'-deoksyrybolaktonu czy erytrozy – markerów fotouszkodzeń DNA.¹⁰⁴ Badania na modelach modyfikowanych oligonukleotydów pozwoliły zaobserwować tworzenie wewnątrz i międzyniciowych sieciowań DNA, powstających przez atak rodnika urydylowego na sąsiednią zasadę z utworzeniem kowalencyjnego dimeru zasad.¹⁰⁵ Czynniki, takie jak tlen oraz sekwencja oligonukleotydów odgrywają kluczową rolę w fotochemicznym działaniu tych fotouczulaczy.^{71,106}

Fotoreaktywność BrdU jak i IdU w nici DNA jest związana z powstawaniem fotochemicznie indukowanego rodnika urydylowego w pozycji C5, który może odrywać atom wodoru znajdujący się w reszcie cukrowej sąsiedniego od strony 5' nukleozydu w tej samej nici DNA. Tworzenie wspomnianego rodnika odbywa się na drodze homolitycznej lub/i heterolitycznej (Rysunek 8).¹⁰⁶ Do heterolitycznej dysocjacji wiązania C5-X potrzebny jest elektron pochodzący z dalekozasięgowego transferu elektronu z guaniny, którego efektywność silnie zależy od sekwencji DNA. Ten rodzaj fotolizy obserwuje się dla BrdU, która pełni rolę akceptora elektronu. W przypadku IdU pod wpływem wzbudzenia zachodzi też bezpośrednia homolityczna dysocjacja wiązania jod-węgiel, dlatego nawet dla sekwencji niepodatnej na transfer elektronu, nadal obserwuje się tworzenie rodnika urydylowego.¹⁰⁶



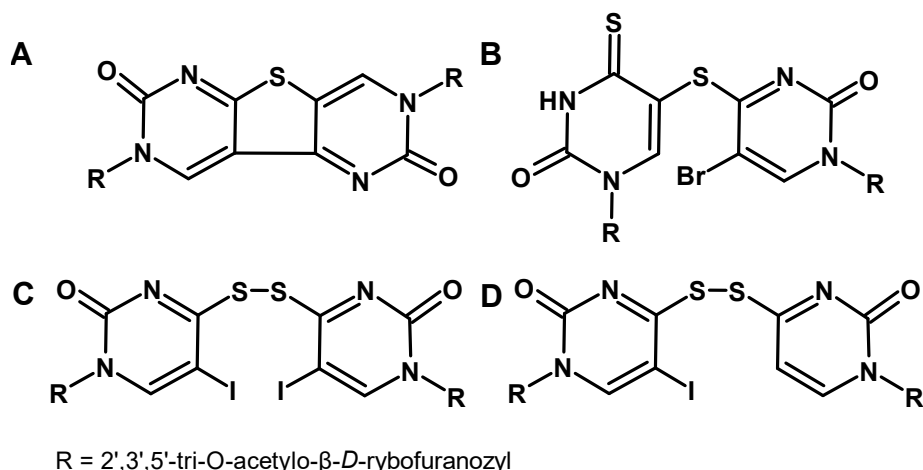
Rysunek 8. Mechanizm tworzenia rodników urydylowych w DNA znakowanym 5-halogeno-2'-deoksyurydyną. Heteroliza wiązania zachodzi dla bromopochodnych oraz jodopochodnych, natomiast homoliza jest charakterystyczna dla jodopochodnych.

8.2.3 Halogeno-tionukleozydy – fotochemiczne właściwości

Halogenopochodne 2'-deoksyurydyny wzmacniają toksyczny dla DNA wpływ promieniowania UVB i UVC. Wprowadzenie do cząsteczki drugiej modyfikacji w postaci atomu siarki w pozycji 4 pierścienia urydynowego zmienia widmo absorpcyjne cząsteczki i przesunęło jego maksimum w stronę fal dłuższych. Umożliwia to wzbudzenie takich analogów promieniowaniem z zakresu UVA, tym samym niwelując efekt filtra wewnętrznego związanego z absorpcją promieniowania przez samo DNA. Tego typu tio-pochodnymi są 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyna (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyna (ISdU).⁴¹ Oba związki wykazują właściwości fotosensybilizujące wobec takich linii komórkowych jak HeLa (ludzki nowotwór szyjki macicy), HEK293 (embrionalne komórki nerki) czy ludzkie fibroblasty.^{107,108} Warto zauważyć, że jodopochodna efektywniej zwiększa śmiertelność komórek w porównaniu do bromopochodnej, mimo, że jej inkorporacja do nici DNA jest mniej wydajna. Brem i inni zbadali poziomy wcielenia tych pochodnych do komórek HeLa i wynoszą one 0,045-0,06% dla BrSdU oraz 0,025-0,033% dla ISdU.¹⁰⁷ Obserwowane na poziomie komórkowym

fotouszkodzenia: sieciowania międzyniciowe, pojedyncze pęknięcia nici i sieciowania białko-DNA wskazują na synergiczne działanie obu podstawników – atomu siarki oraz halogenu. Inaczej niż dla 4-tio-2'-deoksytymidyny czy 6-tioguaniny, mechanizm fotosensybilizacji nie jest jasno określony dla BrSdU i ISdU. Brem pokazał, że z jednej strony fotosensybilizacja w obecności D₂O wydłużającej czas półtrwania tlenu singletowego, zwiększa ilość ICLs, a z drugiej nie powoduje wzrostu ilości 8-oxoG – markera oksydacyjnych fotouszkodzeń DNA.¹⁰⁷

Grupa Skalskiego zbadała fotochemię halogenotiopochodnych urydyny, w których grupy hydroksylowe reszty cukrowej zastąpiono grupą acylową, a naświetlanie przeprowadzano w mieszaninie woda:acetonitryl (1:1, v:v). Dla 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny stwierdzono powstawanie czterech stabilnych fotoproduktów: (1) jonu jodkowego, (2) 2',3',5'-tri-O-acetylo-4-tiourydyny i (3, 4) disulfidów, symetrycznego bis-(2',3',5'-tri-O-acetylo-5-jodo-4-tiourydyny) i asymetrycznego z resztą 4-tiourydyny oraz 5-jodo-4-tiourydyny (Rysunek 9C i 9D). Powstawanie fotoproduktów niezawierających halogenu wskazuje, że rozerwanie wiązania C5-I jest pierwotnym etapem fotochemicznym, a atom siarki jest reaktywnym centrum cząsteczki.¹⁰⁹ Dla bromopochodnej wskazano tworzenie głównie dwóch fotoadduktów – pierwszy powstający na drodze [2+2] fotoaddycji z utratą atomów bromu i utworzeniem wiązań C4-S-C5' oraz C5-C4' oraz drugi przez połączenie dwóch cząsteczek wiązaniem C4-S-C5' z utratą cząsteczki HBr (Rysunek 9A i 9B).¹¹⁰ Dla wodnych roztworów ISdU Brem i inni zaobserwowali powstawanie (oprócz niezidentyfikowanych fotoproduktów) 4-tio-2'-deoksyurydyny (SdU) oraz 2'-deoksyurydyny. W przypadku BrSdU zaobserwowano wymianę atomu siarki na atom tlenu.¹⁰⁷



Rysunek 9. Struktury wybranych fotoproduktów powstających podczas fotolizy roztworów:
A, B – BrSdU oraz C, D – ISdU.^{109,110}

8.3 Uszkodzenia natywnego i modyfikowanego DNA indukowane promieniowaniem ultrafioletowym

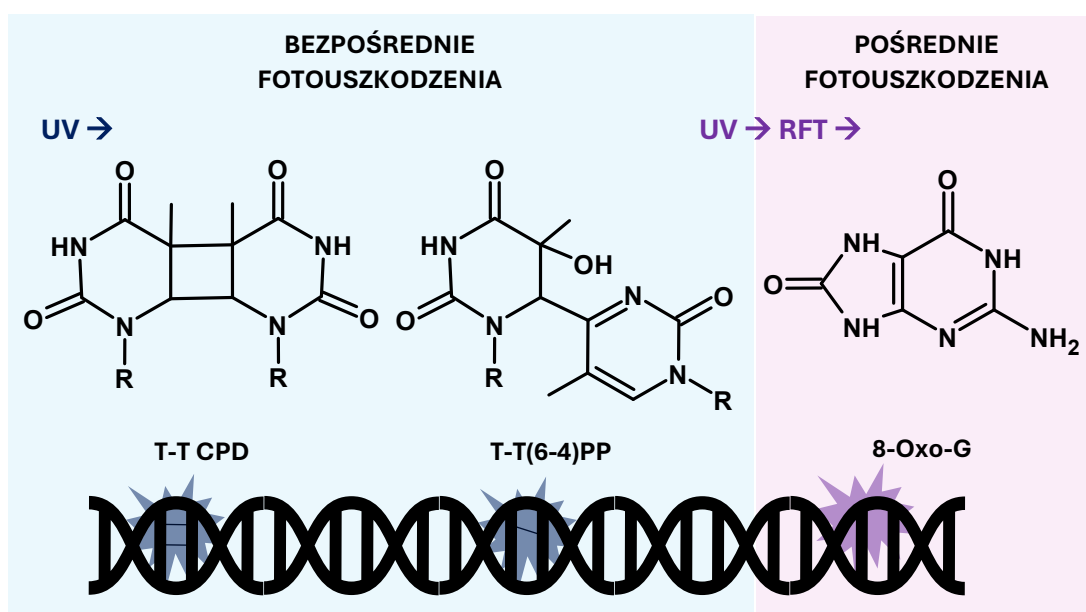
Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest niejonizującym promieniowaniem elektromagnetycznym o długości fal od 10 do 400 nm – krótszych niż światło widzialne i dłuższych niż promieniowanie rentgenowskie. UV dociera do Ziemi ze Słońca i stanowi ok. 10% energii słonecznej. Sztucznie jest wytwarzane przez różnego rodzaju lampy czy lasery. Z punktu widzenia człowieka istnieją zarówno korzyści (np. produkcja witaminy D), jak i zagrożenia związane z ekspozycją na promieniowanie UV (oparzenia, przedwczesne starzenie się skóry czy zachorowanie na raka).¹¹¹

Uszkodzenia DNA stanowią jeden z głównych efektów działania promieniowania UV w różnych organizmach, takich jak sinice, bakterie, rośliny, zwierzęta czy człowiek. Wszystkie komórki biologiczne są bogate w elementy pochłaniające promieniowanie, takie jak białka czy właśnie kwasy nukleinowe. Dodatkowo wiele organizmów produkuje pigmenty pochłaniające promieniowanie – u ludzi jest to melanina. Niemniej, te mechanizmy ochronne nie są w stanie całkowicie zapobiec oddziaływaniu promieniowania UV z innymi biomolekułami. Uszkodzenia DNA mają skutki zarówno cytotoksyczne jak i genotoksyczne.¹¹²

8.3.1 Wpływ promieniowania ultrafioletowego na DNA

Uszkodzenia kwasów nukleinowych różnią się w zależności od długości fali (energii) promieniowania (UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (100-280 nm)), a samo oddziaływanie światła z biomolekułą może odbywać się w sposób bezpośredni lub pośredni. Efekt bezpośredni obserwuje się, gdy DNA pochłania energię promieniowania, co inicjuje reakcje chemiczne w obrębie nici. Podstawową reakcją jest fotohydratacja, czyli przyłączenie wody do podwójnego wiązania C5=C6 w zasadzie azotowej i jest to dominująca reakcja dla uracylu i jego pochodnych.¹¹³ Utworzenie czterocząłowego pierścienia między atomami węgla C5 i C6 dwóch sąsiednich zasad pirymidynowych w reakcji [2+2] cykloaddycji prowadzi do powstania dimerów cyklobutanowych (*cyclobutane pyrimidine dimers*, CPD).¹¹⁴ Inne uszkodzenia to produkty typu pirymidyna(6-4)pirymidynon ((6-4)PP), które powstają również w reakcji [2+2] cykloaddycji wiązania podwójnego C5=C6 z końca 5' oraz grupy karbonylowej C4=O innej zasady z końca 3', prowadząc do wytworzenia niestabilnego oksetanu.¹¹⁵ W reakcji z cytozyną z końca 3' bierze udział grupa iminowa z utworzeniem azetydyny, a w przypadku modyfikacji siarką wiązania C4=S powstaje relatywnie stabilny tietan. Niestabilne produkty pośrednie szybko przekształcają się przez otwarcie pierścienia do 4-(5-hydroksy-5,6-dihydropirymidyn-6-yl)pirymidyn-2-onów, po czym następuje oderwanie cząsteczki wody w obecności kwasu z utworzeniem (6-4)PP, a przy dalszym naświetlaniu promieniowaniem UVA, przekształcenie cząsteczki do izomerów Dewara (reakcja odwracalna).¹¹⁶ Wzbudzenie elektronowe cytozyny prowadzi do jej deaminacji do uracylu. W przypadku, gdy cytozyna bierze udział w innej reakcji fotochemicznej, powstały produkt może ulegać dalszej deaminacji. To ważne uszkodzenie, ponieważ w układach dwuniciowych tymidyna tworzy komplementarne wiązania wodorowe z adeniną, a cytozyna z guaniną – zamiana strukturalna prowadzi do błędów w kodowaniu zasad podczas syntezy czy replikacji DNA. Pośrednie uszkodzenia biopolimeru są wynikiem wtórnych reakcji chemicznych indukowanych przez reaktywne formy tlenu czy rodniki powstające podczas fotosensybilizacji cząsteczek zawartych w komórce, takich jak woda, białka czy lipidy.¹¹⁷ Wcześniej wspomniana 8-oksy-2'-deoksyguanozyna jest markerem oksydacyjnych uszkodzeń DNA, a jej prekursor to guanina, czyli zasada o najniższym potencjale jonizacji wśród składników DNA. Oprócz guaniny powstające w reakcji fotochemicznej modyfikacje obejmują też pozostałe zasady, prowadząc do punktowych mutacji, czy błędnego parowania zasad, a oksydacja rybozy/deoksyrybozy prowadzi do SSB. Powstają też fotoprodukty typu

CPD.^{117,118} Fotouszkodzenia różnicują się w zależności od długości fali promieniowania, co koreluje z zakresem absorpcji DNA. Promieniowanie UVB odpowiada za powstawanie CPD czy uszkodzeń typu pirymidyna(6-4)pirymidynon w stosunku ilościowym około 3:1. Mogą powstawać też oksydacyjne uszkodzenia zasad lub reszty cukrowej. DNA nie pochłania znaczących ilości promieniowania UVA, ale generuje genotoksyczne produkty pośrednie odpowiadające za powstawanie CPD (z przewagą dimerów tymina-tymina), oksydację guaniny i innych zasad i pęknięcia nici, przy czym dwa pierwsze uszkodzenia występują najczęściej (Rysunek 10). Konsekwencje biologiczne fotouszkodzeń DNA przejawiają się w mutacjach, niestabilności genomu i wzroście ryzyka pojawienia się nowotworu.¹¹⁹



Rysunek 10. Uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem ultrafioletowym.

8.3.2 Indukowane promieniowaniem UV pęknięcia nici w modyfikowanym DNA

Fotoreakcje 5-halogenouracylu w oligonukleotydach o określonych sekwencjach są badane od wielu lat. Na początku lat 90. grupa Saito podjęła próbę zrozumienia mechanizmów będących podstawą eksperymentalnie obserwowanych fotoindukowanych pęknięć w nici DNA.^{104,120} Badania wykazały, że naświetlenie krótkich oligonukleotydów o sekwencji $d(GCA^XUGC)_2$, gdzie $X = Br$ lub I , prowadzi do powstania 2'-deoksyrybolaktonu czy erytrozy, z równoczesnym uwolnieniem adeniny. Tworzenie fotoproduktów wytłumaczono mechanizmem, w którym zachodzi oderwanie atomu wodoru z atomu węgla C1' lub C2' reszty cukrowej zasady znajdującej się po stronie 5' XU przez

fotchemicznie generowany rodnik uracylowy. Oba szlaki są konkurencyjne i zależą od stężenia tlenu w środowisku reakcji.¹²¹ Efektywne fotchemicznie generowanie 2'-deoksyrybolaktonu czy erytrozy obserwowano tylko w dwuniciowych oligonukleotydach z sekwencją 5'-A^{Br}U. Oligonukleotydy zawierające zasadę G w miejscu A wykazywały niską fotoreaktywność.¹⁰⁴ Ten i inne wyniki badań potwierdziły zależność reakcji fotchemicznych w DNA od sekwencji, co opisała grupa Greenberga.¹⁰³ Dzięki staraniom wielu grup badawczych pokazano, że wynik fotoreakcji zależy przede wszystkim od sekwencji zasad w duplesie, a co za tym idzie wydajności transferu elektronu.^{103,122-124} Fotoreakcje oligonukleotydów zawierających 5-bromouracyl były intensywnie badane z wykorzystaniem różnych sekwencji. Wykazano, że wydajność transferu elektronu zależy od potencjału jonizacji donora. Rzeczywiście ilość fotoproduktów zawierających rybolakton wzrastała wraz ze spadkiem potencjału jonizacji zasady pełniącej funkcję donora elektronu.¹²⁵

Mechanizm powstawania pęknięć nici przez dalekozasięgowy transfer elektronu w modyfikowanych oligonukleotydach obejmuje początkowy transfer elektronu od guaniny (donora elektronów) do elektronowo wzbudzonego BrU (akceptora elektronów) przez sekwencję zbudowaną z cząsteczek adeniny. Reszty adeniny pełnią tutaj rolę mostka dla transferu elektronu z G do BrU, jednocześnie przeciwdziałając powrotnemu przeniesieniu elektronu. Wydajność tworzenia rybolaktonu zwiększa się wraz z ilością par komplementarnych zasad (A-T)ⁿ w mostku, osiągając maksimum dla n=2. Wynika to między innymi z konkurencyjności pomiędzy transferem elektronu do BrU i powrotnym przeniesieniem elektronu. Brak cząsteczek adeniny pomiędzy donorem, a akceptorem elektronu uniemożliwia powstanie rybolaktonu, co wskazuje, że pary A-T pośredniczą w transferze elektronu. Guanina zarówno z nici sensownej jak i komplementarnej, może brać udział w procesie przeniesienia elektronu.^{123,125}

W przypadku znakowania DNA 5-jodouracylem wydajność tworzenia fotoproduktów nie zależy od liczby par A-T w mostku, jak dla sekwencji znakowanych bromopochodną. Wskazuje to na współistnienie przynajmniej dwóch mechanizmów fotoreakcji. Pierwszy opiera się na heterolitycznym rozerwaniu wiązania C5-I (jak w przypadku bromopochodnej). Drugi – niezależny od odległości między G a IU, opiera się na rozerwaniu homolitycznym wiązania C5-I (Rysunek 8). Szybkość tych procesów jest zależna od sekwencji. W przypadku braku donora elektronów w sąsiedztwie akceptora, generowanie rodnika

uracylowego odbywa się przez szlak homolityczny. Ostatnio sekwencja 5'-(G/C)AA^XUT-3' została zidentyfikowana jakonajbardziej promująca (sekwencja „hot-spot”) proces dalekozasięgowego transferu elektronu.^{71,106,126}

8.3.3 Indukowane promieniowaniem UV sieciowania w modyfikowanym DNA

Pod wpływem promieniowania UV halogenonukleozydy, oprócz pęknięć nici DNA mogą też powodować jego wewnątrznicowe sieciowanie (*intrastrand cross-link*) poprzez tworzenie kowalencyjnych wiązań między sąsiednimi zasadami, takimi jak cytozyna, guanina czy adenina.^{71,105} Hong i Wang wskazali na tworzenie pięciu różnych produktów fotosieciowania w sekwencji z motywem 5'-A^{Br}CA, gdzie najczęstszym fotouszkodzeniem był dimer d(A[8-5]C).¹²⁷ Zaproponowano mechanizm powstawania tych wewnątrznicowych sieciowań DNA, obejmujący transfer elektronu z adeniny sąsiadującej z 5-bromocytozyną i późniejszą eliminację jonu bromkowego przez powstający anionorodnik 5-bromocytozyny prowadzący do utworzenia rodnika cytozyny. Oddziaływanie rodnika cytozyny z węglem C2 lub C9 sąsiedniej adeniny prowadzi do deprotonacji i utworzenia wiązania kowalencyjnego między węglem C5 cytozyny a adeniną.¹²⁷ W sekwencjach zawierających BrU również obserwuje się wewnątrznicowe wiązania sieciujące, zarówno dla dinukleotydów czy długich 80-merowych sekwencji.^{99,124,128} Zbadano też wpływ oddziaływań warstwowych między zasadami nukleinowymi a halogenowanymi nukleotydami. Sekwencje z guaniną jako sąsiadującą zasadą sprzyjają powstawaniu sieciowań bardziej niż te z adeniną.⁹⁹ Indukowane UV uszkodzenia w obrębie DNA, które zawiera halogen mogą obejmować też sieciowanie międzyniciowe, czyli tworzenie się kowalencyjnych wiązań między dwiema komplementarnymi nićmi DNA. Zastosowywanie promieniowania z zakresu UVC wobec natywnego DNA również powoduje sieciowania, a ich liczba wzrasta wraz z zawartością par zasad A-T.^{122,129} Kolejnym czynnikiem wpływającym na powstawanie międzyniciowych sieciowań jest deformacja helisy.¹³⁰

Związkami, które również promują fotoindukowane sieciowania międzyniciowe w DNA są wcześniej wspomniane tionukleozydy – 6-tioguanina, 4-tiotymidyna czy halogenotipirymidyny. Promieniowanie UVA wydajnie inicjuje sieciowanie międzyniciowe zarówno w dwuniciowych oligonukleotydach zawierających wielokrotną sekwencję TG jak i w warunkach *in vitro*. Większość sieciowań międzyniciowych (ICL) powstaje poprzez tworzenie mostków disiarczkowych, a samo sieciowanie promuje

mnogość blisko położonych reszt TG. W przypadku punktowo znakowanego polimeru dochodzi do sieciowań przez atom siarki. Tworzenie wiązań sieciujących zachodzi efektywnie i jest wykrywane nawet w komórkach z niskim poziomem TG przy zastosowaniu umiarkowanych dawek UVA. Pochodna TG może indukować sieciowanie w DNA nawet bez naświetlania UVA z udziałem reaktywnych form tlenu. Możliwe jest, że indukowane TG ICL powstają poprzez rodnik tiolowy, ale mechanizm fotosieciowania nie został jeszcze opisany. Sieciowań wewnątrznicowych dla DNA modyfikowanego TG nie zaobserwowano.^{73,92}

4-Tiotymidyna to kolejna pochodna, która wzbudzana promieniowaniem generuje sieciowania międzyniciowe w znakowanym DNA. Dla SdT tworzenie uszkodzeń jest w znacznej mierze niezależne od sekwencji, chociaż mniej efektywne generowanie ICL obserwuje się, gdy zmieniony nukleotyd sąsiaduje z tyminą. Tutaj opisana właściwość najprawdopodobniej wynika z preferencyjnego tworzenia wiązania wewnątrznicowego. Sieciowania międzyniciowe są wydajnie fotoindukowane, gdy komplementarną zasadą dla SdT jest adenina. W przypadku zamiany natywnej zasady na guaninę nie obserwuje się ICL. Traktowanie komórek fotouczulaczem oraz promieniowaniem UVA (nawet w dawkach mniejszych niż 10 kJ/m²) również prowadzi do sieciowania wewnątrznicowego. 4-Tiotymidyna preferencyjnie tworzy wewnątrznicowe wiązania sieciujące z tymidyną zlokalizowaną po stronie 5' z utworzeniem struktury tietanu. W przeciwieństwie do oksetanu indukowanego promieniowaniem UV, który szybko przechodzi w formę z otwartym pierścieniem, tietan jest strukturą bardziej stabilną. Wykryte w ludzkich komórkach tietany są wolniej likwidowane przez mechanizm naprawy DNA (poprzez tzw. wycinanie nukleotydów (*nucleotide excision repair*, NER)).⁷³⁻⁷⁵

W literaturze nie odnotowano doniesień dotyczących powstawania ICL w oligonukleotydach znakowanych BrSdU lub ISdU. Uszkodzenia te widać natomiast w przeprowadzonych badaniach *in vitro*. Spekuluje się, że formowanie ICL jest inicjowane przez oderwanie atomu halogenu z utworzeniem rodnika tiolowego lub rodnika uracylowego.^{73,107}

Cele pracy

Terapia fotodynamiczna jest alternatywną wobec radioterapii metodą leczenia nowotworów, wykorzystującą światło zamiast wysokoenergetycznego i toksycznego promieniowania jonizującego. Podobnie jak radiosensybilizatory odgrywają kluczową rolę w radioterapii, fotosensybilizatory pełnią analogiczną funkcję w terapii fotodynamicznej. Zgodnie z ogólnie przyjętą zasadą mechanizm terapii fotodynamicznej opiera się na interakcji fotosensybilizatora, tlenu molekularnego oraz światła o określonej długości fali, co prowadzi do selektywnego uszkodzania chorej tkanki. Warto podkreślić, że większość dotychczas odkrytych i stosowanych fotosensybilizatorów działa poprzez mechanizm fotouczulania typu II, w którym generowany jest tlen singletowy. Hipoksja, czyli niskie stężenie tlenu w komórkach nowotworowych, stanowi jednak cechę charakterystyczną guzów litych, odpowiadających za ponad 80% przypadków. W związku z tym badania nad fotosensybilizatorami aktywnymi w warunkach hipoksji wydają się nie tylko aktualne – zważywszy, że nowotwory są główną przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych – lecz także w pełni uzasadnione.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmu fotosensybilizującego modyfikowanych nukleozydów (MN) 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny/5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny. Badania prowadzono zarówno w roztworach, jak i w modelowych fragmentach DNA oraz w komórkach.

Szczegółowe cele badawcze realizowane w ramach doktoratu można przedstawić w postaci następujących punktów:

1. Określenie fotochemicznych właściwości 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU) poprzez fotolizę stacjonarną wodnych roztworów MN i identyfikację fotoproduktów z wykorzystaniem metod analitycznych oraz kwantowo-chemicznych.
2. Zbadanie fotochemicznie indukowanych uszkodzeń modelowych fragmentów DNA znakowanych BrSdU, zarówno wrażliwych jak i niewrażliwych na dalekozasięgowy transfer elektronu.
3. Analiza fotosensybilizującego mechanizmu działania BrSdU oraz ISdU w ludzkich komórkach nowotworu prostaty.

W pierwszym etapie zbadano właściwości fotochemiczne modyfikowanych nukleozydów, BrSdU oraz ISdU w eksperymencie fotolizy stacjonarnej. Zaobserwowano wysoką fotoreaktywność halogenotiopochodnych urydyny przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 350 nm, co sugeruje właściwości fotouczulające badanych tiopochodnych (**Rozdział 4.1**).

Następnie przetestowano właściwości fotosensybilizujące 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny włączonej do modelowego oligonukleotydu. Fotoliza roztworu wodnego znakowanego fragmentu ujawniła powstawanie fotoproduktów. Otrzymane wyniki porównano dla trzech różnych sekwencji DNA (**Rozdział 4.2**).

Końcowym krokiem prowadzącym do potwierdzenia właściwości fotouczulających BrSdU i ISdU oraz ustalenia sposobu ich działania na poziomie komórkowym były badania *in vitro*. Obie pochodne wydajnie uczulają komórki nowotworu prostaty na promieniowanie ultrafioletowe, a badania za pomocą cytometrii przepływowej pozwoliły na wgląd w mechanizm działania związków w komórce (**Rozdział 4.3**).

Metodologia

8.4 Fotoliza stacjonarna modyfikowanych nukleozydów

5-Bromo-4-tio-2'-deoksyurydynę (BrSdU) **a** oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydynę (ISdU) **b** zsyntezowano wg wcześniej opublikowanych protokołów syntezy.^{131,132} Oba związki oczyszczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, czystość >99%) i potwierdzono ich tożsamość porównując ze wzorcem. Pozostałe nukleozydy zakupiono w firmie Sigma Aldrich: 4-tio-2'-deoksyurydyna (SdU) **a3**, 2'-deoksyurydyna (dU) **a1**, 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU) **a2** i 5-jodo-2'-deoksyurydyna (IdU) **b2**.

Naświetlanie w skali analitycznej

Roztwory BrSdU **a** i ISdU **b** o stężeniu 10 mM w buforze fosforanowym (10 mM, pH 7) umieszczono w kwarcowych kuwetach (1 × 1 cm) i naświetlono promieniowaniem UVA w dawkach: 0, 5, 10, 20, 30 i 40 kJ/m². Do naświetlania wykorzystano komorę (Opsytec Dr. Grobel, BS-04) wyposażoną w świetłówki UVA (zakres długości fal emisji wynosił od 300 do 400 nm, z maksimum przy 350 nm). Zmierzona za pomocą miernika mocy/energii Maestro11, wyposażonego w fotodetektor 11PD (Standa) średnia intensywność promieniowania UVA w komorze wynosiła 20 W/m². Dla dawek 5, 10, 20, 30 i 40 kJ/m² czas naświetlania wynosił odpowiednio 250, 500, 1000, 1500 i 2000 sekund. Postęp fotoreakcji mierzono poprzez analizę HPLC próbek fotolitu pobieranych w określonych odstępach czasu. Eksperyment powtórzono trzykrotnie. Dawka naświetlania (dawka UVA) została obliczona w następujący sposób:

$$\text{dawka UVA} \left[\frac{J}{m^2} \right] = \text{natężenie UVA} \left[\frac{W}{m^2} \right] \times \text{czas [s]} \quad (1)$$

Analiza instrumentalna

Analizę HPLC przeprowadzono przy użyciu chromatografu Dionex UltiMate 3000 z detektorem DAD, monitorując absorbancję przy 260/330 nm. Do separacji składników wykorzystano kolumnę C18 (Wakopak Handy ODS, 4,6 × 150 mm, 5 μm, 100 Å) oraz następujący program analizy: od 0 do 50% fazy B (faza A: 0,1% kwas mrówkowy (HCOOH), faza B: 80% acetonitryl (ACN)) w 30 minut w 25°C przy przepływie 1 ml/min. Do rozdziału semipreparatywnego wykorzystano aparat HPLC Shimadzu LC 20AD z detektorem SPD M20A. Fotolit rozdzielono za pomocą kolumny semipreparatywnej

Synergy Polar-RP (Phenomenex; 10×150 mm, $5 \mu\text{m}$, $110 \text{ \AA}$). Zastosowano przepływ 4 ml/min , a program analizy, fazy ruchome oraz temperaturę jak wyżej. Analizę LC-MS (spektrometria mas sprzężoną z chromatografią cieczową) przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru mas TripleTOF 5600+ (SCIEX) ze źródłem jonów DuoSpray (ESI), pracującym w trybie negatywnej jonizacji oraz ultrasprawnego chromatografu cieczowego (UPLC) Nexera X2, (Shimadzu). Warunki rozdziału nie zostały zmienione z wyjątkiem kolumny chromatograficznej (Phenomenex, Kinetex, $2,1 \times 150$ mm, $1,7 \mu\text{m}$, $100 \text{ \AA}$) oraz przepływu – $0,3 \text{ ml/min}$. Masy rejestrowano od 3 minuty analizy chromatograficznej, aby wyeliminować początkowe sygnały pochodzące od rozpuszczalnika czy buforu, nieistotne z punktu widzenia analizy, a także w celu zminimalizowania efektu supresji jonów oraz ochrony detektora. Parametry analizy masowej: ciśnienie gazu rozpylającego (N_2) 25 psi, napięcie $-4,5 \text{ kV}$, natężenie przepływu 11 l/min , temperatura źródła 300°C . Dla analiz MS/MS energia kolizji wynosiła 30 eV a napięcie fragmentatora 120 V . Widma absorpcyjne zarejestrowano podczas analiz HPLC. Widma $^1\text{H NMR}$ otrzymano z wykorzystaniem spektrometru Varian Inova 500 (500 MHz) w temperaturze 25°C i zwizualizowano przy pomocy programu MestReNova v.14.0.0 (Mestrelab Research). Przesunięcia chemiczne na widmach NMR przedstawiono w ppm w odniesieniu do przesunięcia DMSO- d_6 przy $2,50 \text{ ppm}$. Stałe sprzężenia (J) podano w hertzach.

Generowanie fotoproduktów i ich separacja w skali preparatywnej

Roztwory BrSdU **a** oraz ISdU **b** o stężeniu 50 mM w buforze fosforanowym (10 mM , pH 7) umieszczono w kwarcowych kuwetach ($1 \times 1 \text{ cm}$) i naświetlono w komorze UVA w dawce umożliwiającej wydajne generowanie poszczególnych fotoproduktów. Fotoprodukty wyizolowano z wykorzystaniem semipreparatywnej techniki HPLC. Zebrane roztwory poddano suszeniu sublimacyjnemu. Wybrane fotoprodukty analizowano stosując następujące techniki: HPLC, LC-MS, MS/MS, UV oraz $^1\text{H NMR}$.

Obliczenia teoretyczne widm absorpcji fotoproduktów

Obliczenia przy pomocy teorii funkcjonału gęstości zależnej od czasu (TD-DFT, *time-dependent density functional theory*)^{133,134} dla BrSdU i produktów fotolizy BrSdU przeprowadzono z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP¹³⁵ oraz baz funkcyjnych 6-31++G(d,p),¹³⁶⁻¹³⁸ a dla ISdU i produktów fotolizy ISdU baz DGDZVP++,^{139,140} wykorzystując geometrie zoptymalizowane na tym samym poziomie teorii. Obliczenia oraz

ich interpretację wykonała dr Samantę Makurat z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Funkcjonał B3LYP został wybrany spośród kilku przetestowanych (B3LYP,¹³⁵ CAM-B3LYP,¹⁴¹ M06-2X,¹⁴² PBE0,¹⁴³ ωB97XD¹⁴⁴) jako najlepiej odwzorowujący wyniki eksperymentalne dla substratów reakcji fotochemicznej – BrSdU oraz ISdU. Niestandardowy zestaw baz DGDZVP wzbogacony o funkcje dyfuzyjne (++)^{137,138,145} został przygotowany zgodnie z literaturą,^{139,140} ponieważ jod nie występuje w bazie funkcyjnej 6-31++G(d,p).¹⁴⁶ Obie bazy są bazami o tej samej jakości i zawierają funkcje dyfuzyjne oraz polaryzacyjne. Środowisko wodne symulowano przy użyciu modelu PCM.¹⁴⁷ W celu dopasowania przejść teoretycznych do zakresu eksperymentalnie rejestrowanych widm absorpcyjnych, w ramach obliczeń TD-DFT uwzględniono do 100 stanów wzbudzonych. Wszystkie obliczenia wykonano przy użyciu pakietu Gaussian09.¹³⁸ Widma zostały wygenerowane za pomocą programu Multiwfn.¹⁴⁸

8.5 Fotoliza oligonukleotydów znakowanych 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyną

Oczyszczanie oligonukleotydów

Oligonukleotydy (ODN) punktowo znakowane BrSdU wraz z nićmi komplementarnymi otrzymano dzięki uprzejmości prof. Ryszarda Kierzka z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu: **ODN1** 5'-TAT CTA GAC AGG AAU^{BrSdU} TAC TCA TAT CAG TCA-3'; **ODN2** 5'-TGA CTG ATA TGA GTA ATT CCT GTC TAG ATA-3'; **ODN3** 5'-TAT CTA GAC AGC AAU^{BrSdU} AAC TCA TAT CAG TCA-3'; **ODN4** 5'-TGA CTG ATA TGA GTT ATT GCT GTC TAG ATA-3'; **ODN5** 5'-TAT CTA GAC ACA GGU^{BrSdU} TAC TCA TAT CAG TCA-3'; **ODN6** 5'-TGA CTG ATA TGA GTA ACC TGT GTC TAG ATA-3'. Po uwolnieniu oligonukleotydów ze złoża i deprotekcji grup ochronnych (30% woda amoniakalna, 48 godzin, temperatura pokojowa) materiał oczyszczono za pomocą denaturującej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (DHPLC). Identyfikacji poszczególnych ODN dokonano na podstawie widm MS. Frakcje zawierające wybrane ODN zebrano i zliofilizowano, a następnie przygotowano ich wodne roztwory o odpowiednim stężeniu (patrz *określenie stężenia oligonukleotydów*).

Analiza instrumentalna

Masy pojedynczych nici DNA (*single-strand DNA*, ssDNA) rejestrowano z użyciem aparatury LC-MS: spektrometr mas TripleTOF 5600+, SCIEX, źródło jonów DuoSpray

(ESI) pracującym w trybie negatywnej jonizacji oraz UPLC Nexera X2, Shimadzu. Warunki rozdziału w programie analizy 15-30% fazy B w 10 minut/30-45% fazy B (faza A: 400 mM heksafluoroizopropanol (HFIP), 15 mM trietyloamina (TEA), faza B: 400 mM HFIP, 15 mM TEA w mieszaninie woda:metanol 50:50, v/v) w 50 minut w 70°C przy przepływie 0,1 ml/min na kolumnie C18 (Acquity BEH; 1 × 50 mm; 1,7 μm, 130 Å). Masy rejestrowano od 2 minuty analizy w zakresie 600-2000 Da. Parametry analizy masowej: ciśnienie gazu rozpylającego (N₂) 25 psi, napięcie -4,5 kV, natężenie przepływu 11 l/min, temperatura źródła 400°C, energia kolizji wynosiła 9 eV a napięcie fragmentatora 150 V. Dekonwolucję widm masowych przeprowadzono za pomocą programu Bio Tool Kit, PeakView. Analizę DHPLC przeprowadzono z użyciem aparatu Dionex UltiMate 3000 z detektorem DAD ustawionym na 260 nm. Do separacji składników wykorzystano kolumnę C18 (XBridge BEH 4,6 × 50 mm; 2,5 μm, 130 Å) oraz program analizy: 25-60% fazy B (faza A: 100 mM octan trietyloaminy TEAA, faza B: 100 mM TEAA, 20% ACN) w 40 minut w 70°C przy przepływie 0,5 ml/min. Oczyszczanie semipreparatywne wykonano przy wykorzystaniu aparatu Dionex UltiMate 3000 z detektorem DAD ustawionym na 260/280 nm. Do separacji składników wykorzystano kolumnę C18 (XBridge BEH 10 × 50 mm; 2,5 μm, 130 Å) oraz program analizy: 20-50% fazy B (faza A: 100 mM TEAA, faza B: 100 mM TEAA, 20% ACN) w 30 minut w 70°C przy przepływie 3 ml/min. Roztwory po trawieniu analizowano przy użyciu LC-MS (jak wyżej) z wykorzystaniem kolumny C18 (Kinetex Phenomenex; 2.1 × 150 mm; 2,6 μm, 100 Å) oraz programu do rozdziału chromatograficznego: 2% fazy B od 0 do 30 minut, a następnie 2-20% fazy B od 25 do 80 minut (faza A: 0,1% HCOOH, faza B: 80% ACN) w 25°C. Parametry analizy MS, jak wyżej. Analizy przeprowadzone w innym programie niż zdefiniowany tutaj, opisano pod poszczególnymi rysunkami w rozdziale 4. Badania własne.

Określenie stężenia oligonukleotydów

Do wyznaczenia współczynnika ekstynkcji ϵ oligonukleotydów zastosowano kalkulator internetowy ATDBIO wykorzystujący w obliczeniach metodę najbliższego sąsiada.¹⁴⁹ Aby uwzględnić wpływ nukleozydu BrSdU (reszta niezdefiniowana w programie ATDBIO) na współczynnik ekstynkcji oligonukleotydu, ϵ wyznaczono najpierw dla sekwencji, w której w miejscu BrSdU znalazła się dT, a następnie do tak wyznaczonego ϵ dodano poprawkę będącą różnicą wartości współczynników ekstynkcji BrSdU ($\epsilon_{\text{BrSdU}} = 16700 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ – wyznaczony przez grupę Skalskiego) i dT ($\epsilon_{\text{dT}} = 8700 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$). Równanie (2) przedstawia przykładowe obliczenie współczynnika ekstynkcji dla **ODN1**. Ten sam

kalkulator wykorzystano do obliczenia mas teoretycznych oligonukleotydów (dla znakowanych nici masę dT zamieniono na masę BrSdU). Pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm (średnia z trzech pomiarów) do wyznaczenia stężenia poszczególnych roztworów oligonukleotydów wykonywano z użyciem spektrofotometru NanoDrop 1000, ThermoFisher. Stężenie ODN obliczono na podstawie prawa Lamberta-Beera (3).

$$\varepsilon_{ODN1} = 304400 - 8700 + 16700 = 312400 [dm^3/mol \cdot cm] \quad (2)$$

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad (3)$$

gdzie: ε = molowy współczynnik absorpcji [$dm^3/mol \cdot cm$]; l = grubość warstwy absorbującej [cm]; c = stężenie roztworu [mol/dm^3]

Hybrydyzacja nici DNA

Dwuniciowy DNA (*double-strand DNA*, dsDNA) otrzymano w procesie hybrydyzacji dwóch komplementarnych oligonukleotydów. Każdorazowo przygotowano 200 μl mieszaniny zawierającej równomolowe (15 μM) ilości ODN znakowanego i komplementarnego oraz bufor fosforanowy (10 mM, pH 7). Przygotowaną próbkę inkubowano w termocyklerze (Eppendorf Mastercycler Gradient) w cyklu: inkubacja 90°C przez 1 minutę; chłodzenie do 50°C przez 10 minut, inkubacja 4°C przez 30 minut. DNA oczyszczono metodą ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem mikrokolumnienek wirówkowych (Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit). Do elucji zastosowano 10 mM bufor fosforanowy (pH 7). Stężenia dsDNA obliczono na podstawie zmierzonej absorbancji oraz wyznaczonego współczynnika ekstynkcji, podobnie jak dla jednoniciowych oligonukleotydów. Dodając odpowiednie ilości buforu przygotowano roztwory o stężeniu 10 μM .

Wydajność kwantowa fotolizy na podstawie zaniku nici znakowanej

Roztwory dsDNA o stężeniu 10 μM w buforze fosforanowym (10 mM, pH 7) w objętości 50 μl naświetlano w kwarcowych kapilarach (3 $\times$ 3 mm). Do naświetlania wykorzystano wysokociśnieniową lampę rtęciową z monochromatorem siatkowym (M250 Optel), wyodrębniając promieniowanie o długości fali 350 nm. Zmierzone za pomocą miernika mocy/energii Maestro11, wyposażonego w fotodetektor 11PD (Standa) średnie natężenie promieniowania monochromatycznego wynosiło 3,35 W/cm². Dla dawki 25 kJ/m² czas naświetlania wynosił 7463 sekund. Obliczenia dawek wykonano zgodnie z równaniem (1). Eksperyment powtórzono trzykrotnie, a roztwory kontrolne oraz fotolity poddano analizie

DHPLC. W obliczeniach wydajności kwantowej (Φ) posługiwano się poniższymi zależnościami:

$$\Phi = \frac{n_{\text{cząst}}}{n_{\text{foton}}} \quad (4)$$

$$n_{\text{cząst}} = c \times V \times \%_{\text{zaniku}} \quad (5)$$

$$E_{\text{foton}} = \frac{h \times c'}{\lambda} \quad (6)$$

$$n_{\text{foton}} = \frac{I \times A \times t}{E_{\text{foton}} \times N_A} \quad (7)$$

gdzie: $n_{\text{cząst}}$ = liczba przereagowanych cząsteczek [mol]; n_{foton} = liczba moli zaabsorbowanych fotonów [E]; c = początkowe stężenie nici znakowanej [10×10^{-6} mol/l]; V = objętość próbki [50×10^{-6} dm³]; $\%_{\text{zaniku}}$ = procent zaniku nici znakowanej zarejestrowany w analizach HPLC (patrz Tabela 7); E_{foton} = energia pojedynczego fotonu [J]; h = stała Plancka [$6,626 \times 10^{-34}$ J·s]; c' = prędkość światła [3×10^8 m/s]; λ = długość fali promieniowania [$3,5 \times 10^{-7}$ m]; I = natężenie promieniowania [$3,35$ W/m²]; A = powierzchnia naświetlanej próbki [$1,668 \cdot 10^{-5}$ m²]; t = czas ekspozycji na promieniowanie [7463 s]; N_A = liczba Avogadro [$6,022 \times 10^{23}$].

Fotoliza znakowanego DNA

Roztwory dsDNA o stężeniu 10 μ M w buforze fosforanowym (10 mM, pH 7) w objętości 50 μ l naświetlano w kwarcowych kapilarach (3 $\times$ 3 mm) promieniowaniem UVA (warunki jak w opisie 3.1 *Naświetlanie w skali analitycznej*) w dawkach: 45 oraz 90 kJ/m² dla **ODN1:ODN2** i 90 i 180 kJ/m² dla **ODN3:ODN4** oraz **ODN5:ODN6**. Czas naświetlania dla poszczególnych dawek wynosił 2250, 4500 i 9000 sekund. Obliczenia dawek wykonano zgodnie ze wzorem (1). Eksperyment powtórzono trzykrotnie. Roztwory kontrolne oraz fotolity poddano analizie DHPLC i LC-MS.

Trawienie fotoproduktów

Dimer **ODN3:ODN4** poddano fotolizie w komorze UVA używając wysokich dawek (do 270 kJ/m²) w celu wygenerowania znaczącej ilości fotoproduktu. Powstały produkt wyizolowano przy pomocy metody DHPLC i zliofilizowano. Przygotowano wodny roztwór fotoproduktu i określono jego stężenie z użyciem spektrofotometru NanoDrop. Przyjęto, że

współczynnik ekstynkcji dla produktu jest podobny do macierzystego dsDNA i wykorzystano go w celu oszacowania stężenia materiału do trawienia. Fotoprodukt z fotolizy **ODN3:ODN4** o stężeniu 15 μM (oraz próbkę kontrolną z wodą), poddano trawieniu enzymatycznemu wg protokołu:¹²⁸

- Do 90 μl próbki fotolitu dodano 10 μl buforu reakcyjnego, składającego się z: 30 mM octanu sodu (pH 5) oraz 1 mM octan cynku. Objętość całkowita roztworu do trawienia to 100 μl . Następnie dodano enzymy: nukleazę P1 (0,2 U) oraz fosfodiesterazę II (0,005 U; *calf spleen phosphodiesterase*) i inkubowano roztwór w termocyklerze (Eppendorf Mastercycler Gradient) w 37°C przez 2 godziny.
- Do mieszaniny dodano 7,5 μl drugiego buforu reakcyjnego – 1 mM chlorek wapnia, 10 mM tris-HCl (pH 8,9), 10 mM chlorek magnezu oraz 40 μl kwasu pentetynowego DTPA. Objętość zwiększono o 42,5 μl wody i dodano deoksyrybonukleazę I (40 U). Próbkę inkubowano w 37°C przez kolejną 1 godzinę.
- Dodano bakteryjną alkaliczną fosfatazę (1,1 U; *bacterial alkaline phosphatase*), a następnie inkubowano roztwór w 37°C przez 1 godzinę.
- Dodano fosfodiesterazę I (0,00005 U; *snake venom phosphodiesterase I*) i inkubowano mieszaninę w 37°C przez 1 godzinę.

Roztwór po trawieniu poddano analizie LC-MS.

8.6 Badania komórkowe nad właściwościami fotosensybilizującymi 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny

Komórki nowotworu prostaty PC3 (zakupione z banku ATCC) hodowano w pożywce F12k suplementowanej 10% roztworem PBS oraz antybiotykami (penicyliną oraz streptomycyną, 100 U/ml) oraz inkubowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂.

Test cytotoksyczności

Komórki posiano na 96-dołkowe płytki w ilości 4×10^3 komórek na dołek i inkubowano przez 24 godziny. Następnie medium zastąpiono świeżą porcją zawierającą 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydynę oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydynę w stężeniach od 10^{-4} do 10^{-9} M. Tak

przygotowane płytki inkubowano przez kolejne 24 i 48 godzin. Następnie do komórek dodano roztwór soli MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-2,5-tetrazoliowy) w PBS o stężeniu 4 mg/ml. Po 4 godzinach inkubacji medium zastąpiono 100 µl roztworu dimetylosulfotlenku (DMSO) w celu rozpuszczenia utworzonych kryształów formazanu. Absorbancję zmierzono przy długości fali 570 nm (660 nm jako referencyjna długość fali) używając czytnika płytek (TECAN Infinite M200PRO). Żywotność komórek kontrolnych (nietraktowanych) określono jako 100%. Przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty w trzech powtórzeniach.

Naświetlanie promieniowaniem UVA

Do naświetlania wykorzystano komorę (Opsytec Dr. Grobel, BS-04) wyposażoną w świetlówki UVA (zakres długości fal emisji wynosił od 300 do 400 nm, z maksimum przy 350 nm). Zmierzona za pomocą miernika mocy/energii Maestro11, wyposażonego w fotodetektor 11PD (Standa) średnia intensywność promieniowania UVA w komorze wynosiła 20 W/m². Dla dawek 5, 10 i 15 kJ/m² czas naświetlania wynosił odpowiednio 250, 500 i 750 sekund. Dawka naświetlania została obliczona zgodnie z równaniem (1).

Test klonogeniczności

Komórki wysiano na płytki do hodowli komórkowej o średnicy 10 cm w ilości 1×10^5 z dodatkiem BrSdU lub ISdU w stężeniach 50 oraz 100 µM lub wody jako kontroli. Po 48 godzinach inkubacji komórki naświetlono promieniowaniem UVA w komorze w dawkach: 0, 5, 10 oraz 15 kJ/m². Po naświetleniu wszystkich płytek, komórki przesiano w ilości 300 komórek na płytki o średnicy 10 cm. Po 13 dniach inkubacji utworzone kolonie komórek wybarwiono i utrwalono 6% aldehydem glutarowym oraz 0,5% fioletem krystalicznym. Kolonie (składające się z przynajmniej 50 komórek) zliczono manualnie z użyciem odwróconego mikroskopu (Olympus, IX73). Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach, a warianty nietraktowane oraz nie naświetlone wykorzystano jako kontrolę. Średnie wydajności wysiewu (*plating efficiency*, PE) oraz frakcje komórek przeżywających daną dawkę promieniowania (*survival fraction*, SF) obliczono jak niżej:

$$PE = \frac{\text{liczba utworzonych kolonii}}{\text{liczba wysianych komórek}} \times 100\% \quad (8)$$

$$SF = \frac{\text{liczba utworzonych kolonii po naświetleniu}}{\text{liczba wysianych komórek} \times PE} \times 100\% \quad (9)$$

Cytometryczne oznaczenie cyklu komórkowego oraz śmierci komórkowej

Komórki do testów przygotowano następująco: komórki posiane w ilości 2×10^5 inkubowano w obecności BrSdU lub ISdU w stężeniach 50 oraz 100 μM lub wody jako kontroli przez 48 godzin. Następnie komórki naświetlono promieniowaniem UVA w dawkach 0 lub 10 kJ/m^2 . Po 24 godzinach inkubacji komórki przemyto roztworem PBS, oddzielono od podłoża za pomocą akutazy i przygotowano do odpowiednich testów cytometrycznych. Do oceny cyklu komórkowego, komórki utrwalono 70% roztworem zimnego etanolu oraz wybarwiano jodkiem propidyny przez 30 minut (według komercyjnego protokołu Guava Cell Cycle Reagent, Luminex). Komórki poddano analizie cytometrycznej (Guava easyCyte 12, Merck Millipore). Strategię bramkowania oparto na porównaniu wykresu przedniego rozproszenia światła (*forward scatter*, FSC) z zawartością DNA w próbkach. Analizę fluorescencji przeprowadzono przy użyciu światła laserowego o długości 488 nm. Histogram przedstawiał podział populacji na fazy G1, S i G2/M. Do oceny śmierci komórkowej komórki wybarwiono i poddano analizie cytometrycznej zgodnie z protokołem (Guava MitoDamage Kit, Luminex). Tutaj użyto dwóch barwników – 7-aminoaktynomycyny D (7-ADD), która monitoruje zmiany przepuszczalności błony komórkowej typowe dla późnej apoptozy i komórek nekrotycznych oraz jodku 1,1',3,3,3',3'-heksametyloindodikarbocyjaniny (MitoSense Red), rozpoznającego zmiany potencjału mitochondrialnego. Synergiczne działanie tych barwników dostarcza pełny obraz kondycji komórek i mitochondriów. Dane analizowano w oparciu o dedykowany moduł w programie InCyte 3.3 identyfikując populację komórek na wykresie FSC względem rozproszenia bocznego (*side scatter*, SSC). Na dwuwymiarowych wykresach fluorescencji 7-AAD względem MitoSense Red wyróżniono komórki w poszczególnych etapach śmierci. Staurosporyna, dobrze znany wyzwalacz apoptozy (50 μM , 24 godziny inkubacji), została użyta jako kontrola pozytywna.¹⁵⁰ Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Cytometryczna analiza fosforylacji histonu H2A.X

Komórki PC3 hodowano zgodnie z powyższym opisem, a następnie naświetlono promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m^2 i inkubowano przez 2 lub 24 godziny. Komórki oddzielone od podłoża za pomocą akutazy, zostały utrwalone i permeabilizowane, a następnie wybarwione znakowanymi przeciwciałami. Wszystkie manipulacje przeprowadzono zgodnie z komercyjnym protokołem (FlowCollect Histone H2A.X Phosphorylation Assay Kit, Luminex). Wybarwione komórki poddano analizie za pomocą

cytometrii przepływowej. Komórki były identyfikowane na wykresie FSC względem SSC, co umożliwiało wykluczenie szczątków komórkowych i agregatów. Następnie na dwuwymiarowym wykresie SSC względem światła laserowego o długości 488 nm rozróżniano komórki γ -H2AX-dodatnie i ujemne. Nienaświetlone oraz nietraktowane badanymi związkami hodowle komórkowe służyły jako kontrola. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Detekcja reaktywnych form tlenu (RFT)

Komórki PC3 w ilości 2×10^5 wysiano na płytki do hodowli i podzielono na trzy grupy: (1) komórki traktowane BrSdU lub ISdU w stężeniach 50 i 100 μ M; (2) grupa kontrolna, gdzie do komórek dodano wodę oraz (3) pozytywna kontrola dla RFT, w której komórki traktowano 15 μ M roztworem doksorubicyny (DOX). Po 48 godzinach inkubacji komórki naświetlono promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m². Po kolejnych 24 godzinach inkubacji pożywkę zastąpiono świeżo przygotowanym medium (bez PBS) zawierającym 5 μ M diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (roztwór w metanolu; DCF-DA) i inkubowano przez 25 minut. Następnie komórki dwukrotnie przemyto roztworem PBS i oddzielono od podłoża za pomocą akutazy. Po usunięciu medium komórki zawieszono w roztworze PBS i wykonano analizę cytometryczną. Populacje komórek były identyfikowane na wykresie FSC względem SSC. Analizę fluorescencji przeprowadzono używając światła laserowego o długości 488 nm. Histogram przedstawiał intensywność generowania RFT. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Analiza statystyczna wyników

Program GraphPad Prism został wykorzystany do statystycznej analizy danych z wszystkich eksperymentów biologicznych. Uzyskane wyniki poddano jednoczynnikowej (dla testu MTT) lub dwuczynnikowej (pozostałe testy) analizie statystycznej ANOVA z poprawkami Browna-Forsythea/Šidáka/Tukeya lub Dunnetta. Poziom istotności statystycznej przedstawiono jako: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Badania własne

8.7 Fotoliza stacjonarna 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny i 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny – fotochemia pochodnych indukowana promieniowaniem z zakresu UVA

Modyfikowane nukleozydy są szeroko stosowane w badaniach biologicznych ze względu na unikalne właściwości fotochemiczne. Wprowadzone do pierścienia zasady modyfikacje atomami bromu, jodu czy siarki uwrażliwiają molekułę na działanie promieniowania z szerokiego zakresu UV. W 5-bromo-2'-deoksyurydynie czy 5-jodo-2'-deoksyurydynie obecność atomu bromu zmienia właściwości fotochemiczne przesuwając maksimum pasma absorpcji do 280 nm. MN po ekspozycji na promieniowania UVB ulegają reakcjom fotochemicznym prowadzącym do dysocjacji wiązania halogen-węgiel czy powstawania dimerów typu 5,5'-diuracylowego. Ze względu na niższą energię wiązania C-I w porównaniu z wiązaniem C-Br, IdU charakteryzuje się wyższą fotolabilnością, co oznacza, że szybciej i efektywniej ulega rozpadowi pod wpływem promieniowania UV. Rozerwanie wiązania halogen-węgiel prowadzi do powstania rodnika urydyłowego w pozycji C5 i może odbywać się na drodze homolitycznej i heterolitycznej, przy czym dla bromopochodnej zachodzi tylko w sposób heterolityczny.^{71,106,109,110}

Ze względu na wysoką fotoreaktywność oraz zdolność do selektywnego wzbudzenia tiopochodne uracylu, urydyny i innych zasad nukleinowych stanowią obiecujące związki fotosieciujące. Zastąpienie atomu tlenu atomem siarki w pozycji C4 pierścienia pirymidynowego zmienia rozkład elektronowy cząsteczki prowadząc do obniżenia różnicy energii stanu wzbudzonego i podstawowego, a w konsekwencji przesunięcia maksimum absorpcji ku dłuższym falom – 330-370 nm. To przesunięcie ma ogromne znaczenie, ponieważ pozwala na wzbudzenie cząsteczki promieniowaniem UVA, nieszkodliwym dla natywnych nukleozydów i zdrowych tkanek. Siarka jako pierwiastek cięższy od tlenu faworyzuje konwersję singlet-tryplet w stanie wzbudzonym. Wysoce reaktywny wzbudzony stan trypletowy inicjuje biologicznie istotne reakcje fotochemiczne. Z tego stanu mogą zachodzić trzy typy reakcji: (1) fotoaddycja poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych między siarką a zasadami nukleinowymi lub aminokwasami; (2) fotoreakcje typu I oraz typu II obejmujące transfer elektronu lub energii do tlenu cząsteczkowego z utworzeniem tlenu singletowego, rodnika hydroksylowego czy anionu nadadtlenkowego; (3) procesy

fotoredukcji oraz fotooksydacji prowadzące do powstawania adduktów tiolowych, fotohydratów czy utlenionych form siarki takich jak sulfotlenki, kwasy sulfonowe.^{72,74}

W poniższym rozdziale określone zostały fotochemiczne właściwości 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny przy użyciu fotolizy stacjonarnej buforowanych roztworów badanych związków oraz identyfikacji fotoproduktów. Zsyntetyzowane pochodne zostały oczyszczone za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Roztwory buforowane BrSdU i ISdU naświetlano promieniowaniem UVA w kilku dawkach, a postęp fotolizy monitorowano za pomocą metody HPLC. Stosunki m/z dla odpowiednich fotoproduktów zarejestrowano z użyciem techniki LC-MS. Produkty fotodegradacji BrSdU oraz ISdU wyizolowano z uzyskanych fotolitów za pomocą techniki HPLC. W celu określenia struktur otrzymanych fotoproduktów dokonano ich charakterystyki rejestrując: widma MS, widma fragmentacyjne MS/MS, widma absorpcyjne oraz widma ¹H NMR, a poszczególne produkty porównano ze wzorcami. Dodatkowo, eksperymentalne widma absorpcyjne porównano z widmami absorpcyjnymi przewidzianymi teoretycznie metodą TD-DFT.

8.7.1 Fotoliza BrSdU oraz ISdU w skali analitycznej – identyfikacja fotoproduktów

Roztwory BrSdU **a** i ISdU **b** w kwarcowych kapilarach o stężeniu 10⁻³ M w 10 mM buforze fosforanowym naświetlono promieniowaniem UVA w dawkach: 0, 5, 10, 20, 30 i 40 kJ/m². Otrzymane fotolity poddano analizie HPLC (Rysunek 13 oraz 15). Rozdział chromatograficzny roztworu po fotolizie BrSdU pokazał 6 głównych fotoproduktów, z których część okazała się stabilna, a pozostałe ulegały wtórnym reakcjom fotochemicznym lub rozpadowi, wraz ze zwiększaniem dawki promieniowania. W przypadku ISdU zaobserwowano 7 fotoproduktów – 3 niestabilne i 4 stabilne wraz ze wzrostem dawki UVA (Rysunek 11).

Tabela 2. Zidentyfikowane produkty fotolizy roztworów BrSdU i ISdU. W tabeli porównano eksperymentalne wartości m/z z teoretycznymi, obliczonymi na podstawie struktury chemicznej z wykorzystaniem oprogramowania ChemSketch (ACD/Labs) oraz przedstawiono proponowaną strukturę chemiczną poszczególnych fotoproduktów (R = 2'-deoksyryboza).

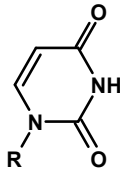
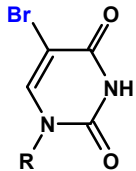
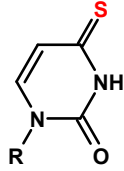
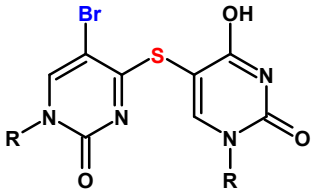
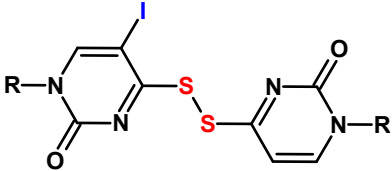
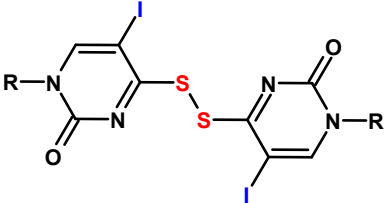
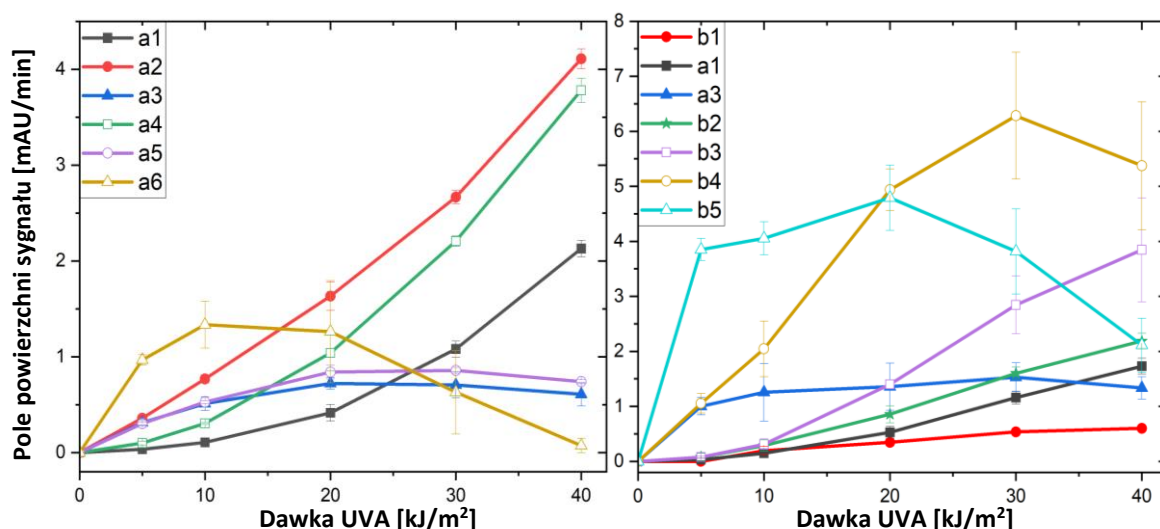
Fotoprodukt	Nazwa zwyczajowa	Eksperym. m/z (M-H) ⁻	Teoret. m/z (M-H) ⁻	Struktura
a1	2'-deoksyurydyna dU	227,0688	227,0673 C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	
a2	5-bromo-2'-deoksyurydyna BrdU	304,9780	304,9778 C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₅	
a3	4-tio-2'-deoksyurydyna SdU	243,0455	243,0445 C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₄ S	
a4	dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-hydroksy)- dideoksyurydynowy BrSdU-OHdU	547,0100	547,0140 C ₁₈ H ₂₁ BrN ₄ O ₉ S	

Tabela 2. Zidentyfikowane produkty fotolizy roztworów BrSdU i ISdU. W tabeli porównano eksperymentalne wartości m/z z teoretycznymi, obliczonymi na podstawie struktury chemicznej z wykorzystaniem oprogramowania ChemSketch (ACD/Labs) oraz przedstawiono proponowaną strukturę chemiczną poszczególnych fotoproduktów (R = 2'-deoksyryboza).

Fotoprodukt	Nazwa zwyczajowa	Eksperym. m/z (M-H) ⁻	Teoret. m/z (M-H) ⁻	Struktura
a5	dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-tio)-dideoksyurydynowy BrSdU-SdU	562,9871	562,9911 C ₁₈ H ₂₁ BrN ₄ O ₈ S ₂	
a6	disulfid 5,5'-dibromo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny BrSdU-BrSdU	642,8954	642,8971 C ₁₈ H ₂₀ Br ₂ N ₄ O ₈ S ₂	
b1	jon jodkowy I⁻	126,9055	126,9055	
b2	5-jodo-2'-deoksyurydyna IdU	352,9739	352,9640 C ₉ H ₁₁ IN ₂ O ₅	
b3	disulfid 4,4'-ditio-dideoksyurydyny SdU-SdU	485,0936	485,0806 C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₈ S ₂	

Tabela 2. Zidentyfikowane produkty fotolizy roztworów BrSdU i ISdU. W tabeli porównano eksperymentalne wartości m/z z teoretycznymi, obliczonymi na podstawie struktury chemicznej z wykorzystaniem oprogramowania ChemSketch (ACD/Labs) oraz przedstawiono proponowaną strukturę chemiczną poszczególnych fotoproduktów (R = 2'-deoksyryboza).

Fotoprodukt	Nazwa zwyczajowa	Eksperym. m/z (M-H) ⁻	Teoret. m/z (M-H) ⁻	Struktura
b4	disulfid 5-jodo-4,4'- ditio-dideoksyurydyny ISdU-SdU	610,9934	610,9772 C ₁₈ H ₂₁ I ₁ N ₄ O ₈ S ₂	
b5	disulfid 5,5'-dijodo-4,4'- ditio-dideoksyurydyny ISdU-ISdU	736,8941	736,8739 C ₁₈ H ₂₀ I ₂ N ₄ O ₈ S ₂	



Rysunek 11. Zależność pola powierzchni poszczególnych sygnałów fotoproduktów zarejestrowanych przy 260 nm od dawki promieniowania UVA dla fotolizy: A – BrSdU oraz B – ISdU. Poszczególnym wykresom przypisano symbole fotoproduktów (a1 dU; a2 BrdU; a3 SdU; a4 BrSdU-OHdU; a5 BrSdU-SdU; a6 BrSdU-BrSdU; b1 I; b2 IdU; b3 SdU-SdU; b4 ISdU-SdU oraz b5 ISdU-ISdU).

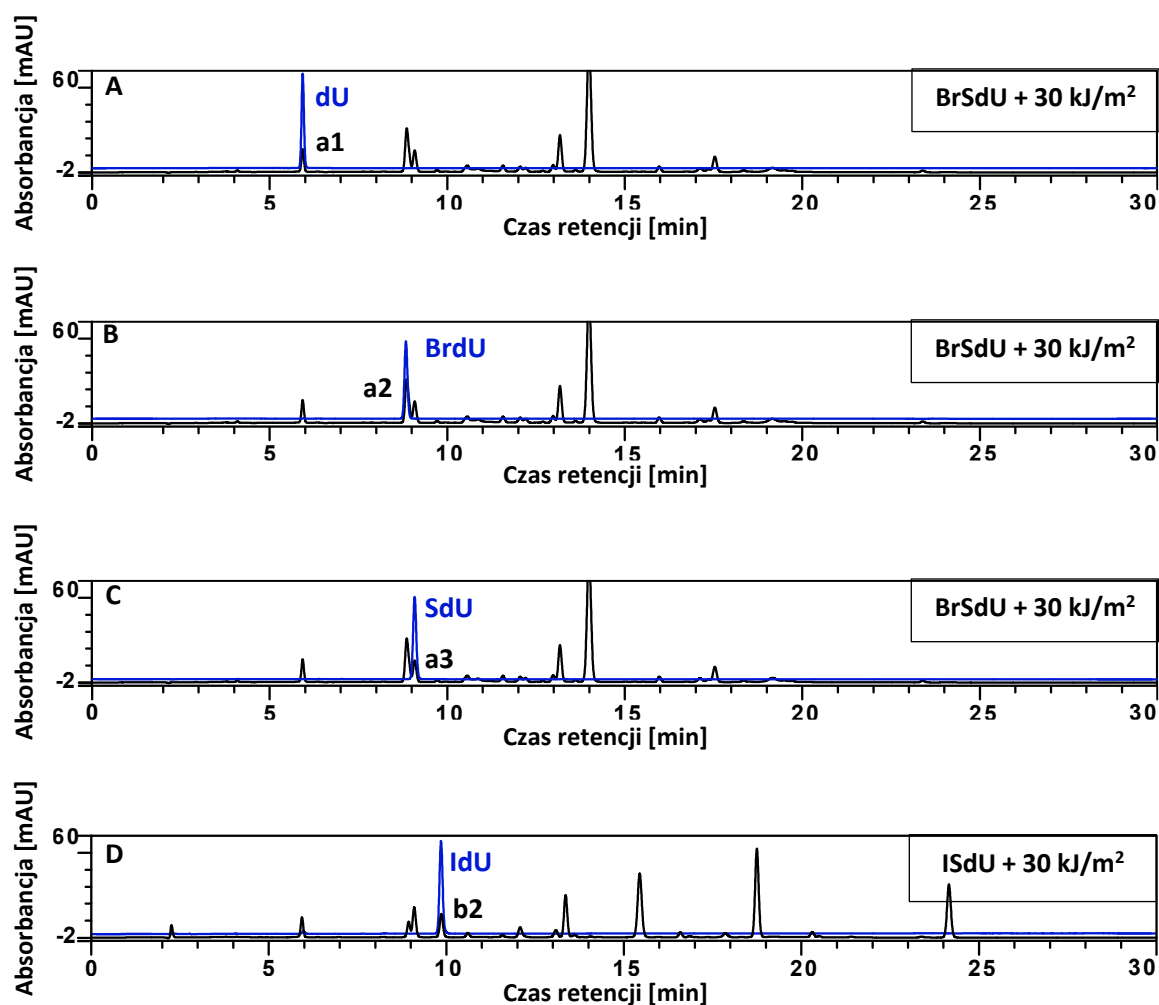
Struktury fotoproduktów dU **a1**, BrdU **a2**, SdU **a3**, I **b1** i IdU **b2** potwierdzono metodą porównania ze wzorcem. Dzięki fotolizie w skali preparatywnej możliwa była izolacja fotoproduktów BrSdU-OHdU **a4**, BrSdU-SdU **a5**, SdU-SdU **b3** i ISdU-ISdU **b5** oraz przeprowadzenie analizy ^1H NMR. Struktury tych związków rozwiązano z pomocą widm MS, MS/MS oraz ^1H NMR. Struktury wyjątkowo niestabilnych produktów BrSdU-BrSdU **a6** i ISdU-SdU **b4** zaproponowano na podstawie widm MS i MS/MS oraz literatury. Struktury oraz sygnały m/z dla poszczególnych związków przedstawiono w Tabeli 2.

8.7.2 Charakterystyka powstających po naświetleniu produktów dla BrSdU oraz ISdU

*Fotoprodukty dU **a1**, BrdU **a2**, SdU **a3** oraz IdU **b2***

Fotoprodukty dU **a1**, BrdU **a2**, SdU **a3** oraz IdU **b2** zidentyfikowano kolejno jako 2'-deoksyurydynę, 5-bromo-2'-deoksyurydynę, 4-tio-2'-deoksyurydynę oraz 5-jodo-2'-deoksyurydynę na podstawie analizy porównawczej ze wzorcami poszczególnych substancji. Zarejestrowane czasy retencji podczas analizy HPLC dla sygnałów fotoproduktów **a1**, **a2**, **a3** oraz **b2** odpowiadają czasom retencji wzorców dU, BrdU, SdU oraz IdU (Rysunek 12). Analizy przeprowadzono w tych samych warunkach chromatograficznych. Dodatkowo zarejestrowane widma absorpcyjne korelują z literaturowymi danymi dla dU, BrdU SdU oraz IdU (Rysunek 13: a1, a2, a3; Rysunek 15: b2).

Naświetlanie buforowanych roztworów zarówno BrSdU jak i ISdU prowadzi do fotodegradacji wiązania węgiel-halogen w pozycji C5 pierścienia urydynowego. Jest to typowy mechanizm dla fotochemii halogenopochodnych. W wyniku degradacji powstaje rodnik urydylowy otwierający drogę do dalszych reakcji fotochemicznych molekuł. Zaobserwowanymi produktami tej reakcji są dU **a1** oraz SdU **a3**. Dla wspólnego fotoproduktu obu MN – 2'-deoksyurydyny zachodzi reakcja utleniania grupy tiokarbonylowej do karboksylowej (Tabela 2). W obu przypadkach ilość SdU **a3** wzrasta wraz ze zwiększaniem dawki promieniowania, ale po przekroczeniu 30 kJ/m² sygnały chromatograficzne wyraźnie maleją. Ilość dU **a1** wraz z zwiększaniem dawki UVA rośnie wydajniej dla fotolizy BrSdU niż ISdU (Rysunek 11).



Rysunek 12. Porównanie chromatogramów roztworu BrSdU (A, B, C) oraz ISdU (D) po fotolizie (dawka UVA 30 kJ/m^2 ; czarna linia) z roztworami wzorców substancji (niebieska linia): A – dU, B – BrdU, C – SdU i D – IdU.

Fotoliza obu badanych modyfikowanych nukleozydów prowadzi również do powstawania związków halogenopochodnych, w których atom siarki został zastąpiony atomem tlenu (Tabela 2). Dla BrSdU w roztworze po fotolizie zaobserwowano wzrost ilości produktu **a2** BrdU wraz z rosnącą dawką UVA. Inaczej jest w przypadku fotolizy ISdU – tutaj fotoprodukt **b2** IdU przy niższych dawkach UVA powstaje mało wydajnie, a jego ilość wzrasta po przekroczeniu 20 kJ/m^2 (Rysunek 11).

Fotoprodukt BrSdU-OHdU **a4**

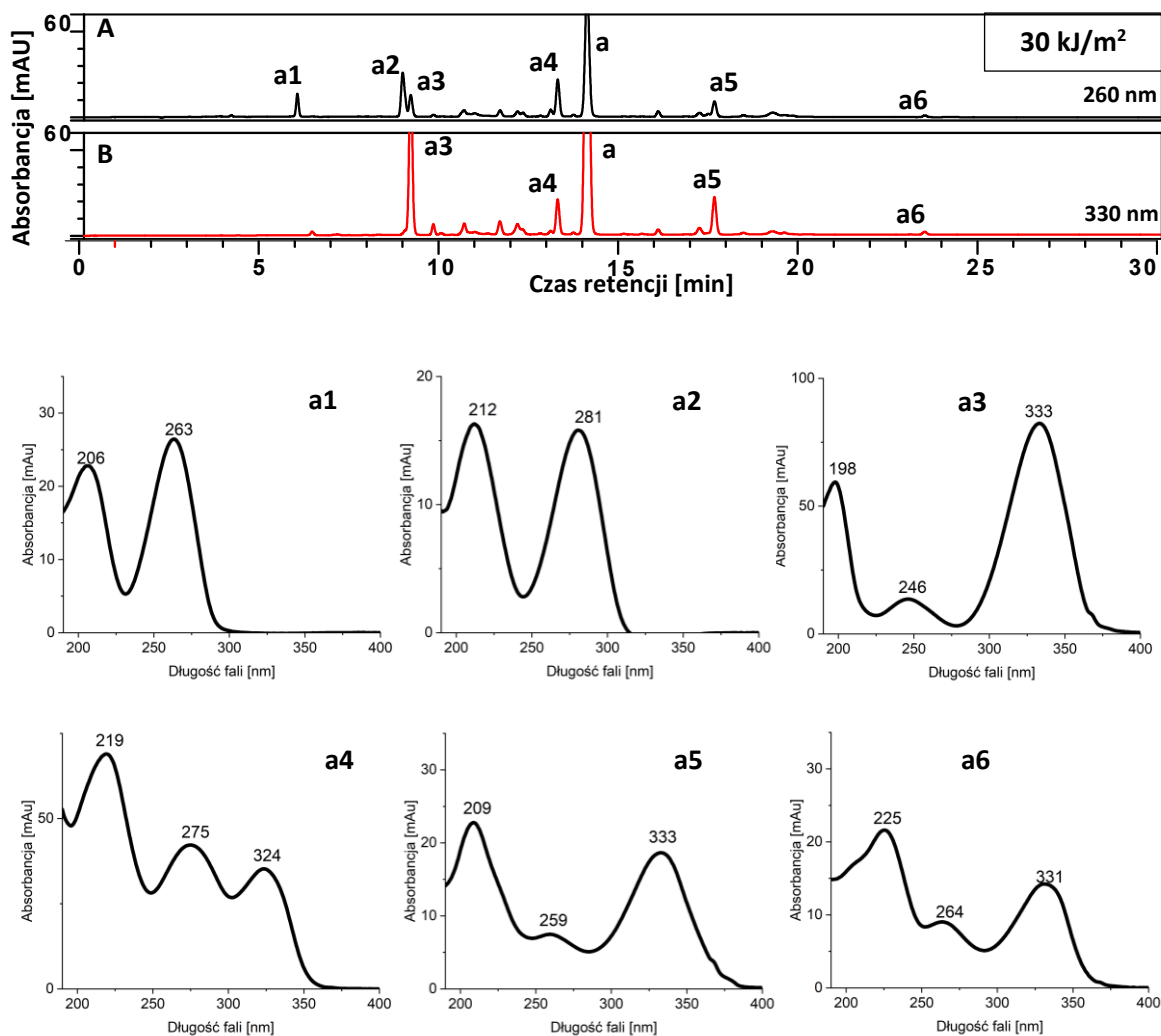
Fotoprodukt BrSdU-OHdU **a4** został zidentyfikowany poprzez interpretację widm MS, MS/MS oraz ^1H NMR jako dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-hydroksy)-dideoksyurydynowy, BrSdU-OHdU. Obliczony stosunek masy $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_4\text{O}_9\text{S}$ do ładunku m/z : $[\text{M}-\text{H}]^- =$

547,0140 odpowiada wynikowi eksperymentalnemu: 547,0100 (Tabela 2). Widmo fragmentacyjne pozwoliło na identyfikację charakterystycznych fragmentów cząsteczki (Rysunek 16), a magnetyczny rezonans jądrowy potwierdził pozycje poszczególnych podstawników (^1H NMR δ_{H} (500MHz, DMSO- d_6) 11.78 (1H, s, OH), 8.58 (1H, s, Ar-H), 8.39 (1H, s, Ar-H), 6.13 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, CH), 5.92 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, CH), 5.26 (2H, d, $J = 3.7$ Hz, OH), 5.23 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, OH), 5.10 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, OH), 4.23 – 4.16 (2H, m, CH), 3.85 – 3.75 (2H, m, CH), 3.69 – 3.47 (4H, m, CH), 2.29 – 2.23 (1H, m, CH), 2.18 – 2.05 (3H, m, CH); Rysunek 22).

Fotoprodukt BrSdU-OHdU **b4** to dimer, który powstał z cząsteczki BrSdU i cząsteczki 5-hydroksyurydyny. Pojawienie się 5-hydroksyurydyny w fotolicie wydaje się zgodne z faktem, że dla uracylu oraz urydyny fotohydratacja jest jedną z dominujących reakcji fotochemicznych w roztworach wodnych. Wraz ze zwiększaniem dawki promieniowania ilość dimeru **a2** wzrasta wykładniczo (Rysunek 11).

*Fotoprodukt BrSdU-(S)dU **a5***

Fotoprodukt BrSdU-(S)dU **a5**, podobnie jak BrSdU-OHdU **a4**, został zidentyfikowany na podstawie analizy zarejestrowanych widm MS, MS/MS oraz ^1H NMR jako dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-tio)-dideoksyurydynowy, BrSdU-(S)dU. Obliczona wartość stosunku masy do ładunku dla cząsteczki o wzorze sumarycznym $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_4\text{O}_8\text{S}_2$ wynosi $m/z = 562,9911$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ i jest zgodna z wynikiem eksperymentalnym 562,9871 (Tabela 2). Fragmentacja cząsteczki zarejestrowana przy użyciu spektrometrii mas pozwoliła na identyfikację specyficznych fragmentów (Rysunek 17). Analiza widma ^1H NMR dodatkowo potwierdziła pozycje podstawników w strukturze cząsteczki (^1H NMR δ_{H} (500MHz, DMSO- d_6) 13.09 (1H, bs, NH), 8.57 (1H, s, Ar-H), 8.50 (1H, s, Ar-H), 6.07 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, CH), 5.93 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, CH), 5.34 – 5.14 (3H, m, OH), 5.09 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, OH), 4.20 (2H, d, $J = 2.9$ Hz, CH), 3.87 – 3.75 (2H, m, CH), 3.71 – 3.44 (4H, m, CH), 2.28 – 2.14 (3H, m, CH), 2.12 – 2.01 (1H, m, CH); Rysunek 23).



Rysunek 13. Chromatogramy roztworu BrSdU **a** naświetlonego promieniowaniem UVA w dawce 30 kJ/m^2 zarejestrowane przy: A – 260 nm (czarna linia) i B – 330 nm (czerwona linia) oraz widma absorpcyjne dla powstających fotoproduktów. Poszczególnym sygnałom oraz widmom przypisano symbole fotoproduktów (a1 dU; a2 BrdU; a3 SdU; a4 BrSdU-OHdU; a5 BrSdU-SdU; a6 BrSdU-BrSdU).

Dimer BrSdU-(S)dU **a5** składa się z cząsteczki BrSdU, która reaguje z rodnikiem tiourydynowym utworzonym najprawdopodobniej w reakcji dehalogenacji wzbudzonej BrSdU. Ilość fotoproduktu BrSdU-(S)dU **a5** wzrasta wraz z dawką UVA do 30 kJ/m^2 , po czym maleje, wskazując na niestabilność związku lub wtórne reakcje fotochemiczne (Rysunek 11).

Fotoprodukt BrSdU-BrSdU a6

Ostatni zinterpretowany produkt BrSdU-BrSdU **a6** z fotolizy roztworu BrSdU to disulfid 5,5'-dibromo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny, BrSdU-BrSdU. Związek ten okazał się wysoce niestabilny w roztworze, co uniemożliwiło rejestrację widma ^1H NMR. Z tego powodu jego strukturę zaproponowano na podstawie widm MS oraz MS/MS. Obliczony stosunek masy $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ do ładunku m/z : $[\text{M}-\text{H}]^- = 642,8971$ odpowiada wynikowi eksperymentalnemu: 642,8954 (Tabela 2). Na widmie fragmentacyjnym można dostrzec fragmenty wskazujące na symetrię związku – połowa masy jonu pseudomolekularnego (Rysunek 18). Obserwowano wzrost ilości dimeru BrSdU-BrSdU **a6** wraz ze zwiększaniem dawki UVA do wartości 20 kJ/m^2 . Po przekroczeniu tej dawki fotoprodukt ulegał dalszym reakcjom lub rozpadowi (Rysunek 11).

Fotoprodukt I⁻ b1

Pierwszy z pojawiających się na chromatogramie z fotolizy ISdU produkt **b1** to jon jodkowy. Został zidentyfikowany na podstawie zarejestrowanego widma masowego oraz danych literaturowych.¹⁰⁹ Obliczona wartość stosunku masy do ładunku dla jonu wynosi m/z : $[\text{M}]^- = 126,9055$ i jest zgodna z wynikiem eksperymentalnym 126,9055 (Tabela 2). Jon jodkowy jest nieorganicznym fotoproduktem i pochodzi z reakcji dehalogenacji ISdU. Ilość fotoproduktu I^- **b1** wzrasta wraz ze zwiększaniem dawki UVA (Rysunek 11).

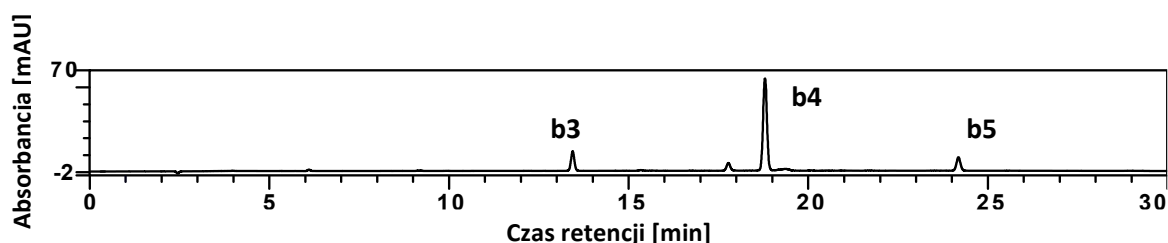
Fotoprodukt SdU-SdU b3

Jednym z obserwowanych dimerów po fotolizie roztworu ISdU jest disulfid 4,4'-ditio-dideoksyurydyny, SdU-SdU. Przypisanie struktury fotoproduktu przeprowadzono dzięki wynikom spektrometrii mas, widm fragmentacyjnych (Rysunek 19) oraz widma ^1H NMR (^1H NMR δ_{H} (500MHz, DMSO- d_6) 8.38 (2H, d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, Ar-H), 6.77 (2H, d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, Ar-H), 5.99 (2H, t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, CH), 5.27 (2H, d, $J = 4.4 \text{ Hz}$, OH), 5.06 (2H, t, $J = 5.2 \text{ Hz}$, OH), 4.25 – 4.13 (2H, m, CH), 3.86 (2H, q, $J = 3.7 \text{ Hz}$, CH), 3.59 (2H, q, $J = 6.0, 4.5 \text{ Hz}$, CH), 3.54 (2H, q, $J = 7.3, 5.9 \text{ Hz}$, CH), 2.38 – 2.23 (2H, m, CH), 2.12 – 1.94 (2H, m, CH); Rysunek 24). Obliczony stosunek masy $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ do ładunku m/z : $[\text{M}-\text{H}]^- = 485,0806$ odpowiada wynikowi eksperymentalnemu: 485,0936 (Tabela 2). Wyniki magnetycznego rezonansu jądrowego bardzo dobrze obrazują symetrię dimeru, który składa się z dwóch cząsteczek SdU połączonych mostkiem disiarczkowym. Również na fragmentacyjnym widmie masowym można wyodrębnić masę będącą połową masy jonu pseudomolekularnego.

Po fotochemicznym rozpadzie wiązania C5-I może utworzyć się rodnik przy węglu C5 pierścienia pirymidynowego, a następnie ulec przeniesieniu na atom siarki.¹⁰⁹ Reakcja dwóch rodników tiolowych może prowadzić do powstania dimeru przez wiązanie S-S. Dimer ten powstaje wydajniej wraz ze wzrostem dawki naświetlania i nie ulega rozpadowi (Rysunek 11).

*Fotoprodukt ISdU-SdU **b4***

Kolejnym powstającym w fotolizie roztworu ISdU dimerem jest disulfid 5-jodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny, ISdU-SdU **b4**, który został zaproponowany na podstawie wyników analizy masowej oraz masowej analizy fragmentacyjnej (Rysunek 20). Obliczona wartość stosunku masy do ładunku dla jonu wynosi $m/z: [M-H]^- = 610,9772$ i jest zgodna z wynikiem eksperymentalnym 610,9934 (Tabela 2). Z uwagi na wysoką niestabilność fotoproduktu rejestracja widma 1H NMR się nie powiodła. Zaobserwowano rozpad produktu ISdU-SdU **b4** po liofilizacji do związku SdU-SdU **b3** oraz ISdU-ISdU **b5** (Rysunek 14). Po dłuższym przechowywaniu roztworu w temperaturze pokojowej widać też rozpad związku do 2'-deoksyurydyny. Dodatkowo na widmach 1H NMR, które próbowano zarejestrować dla fotoproduktu **b4** można wskazać sygnały odpowiadające wszystkim trzem fotoproduktom: **b3**, **b4** oraz **b5**.



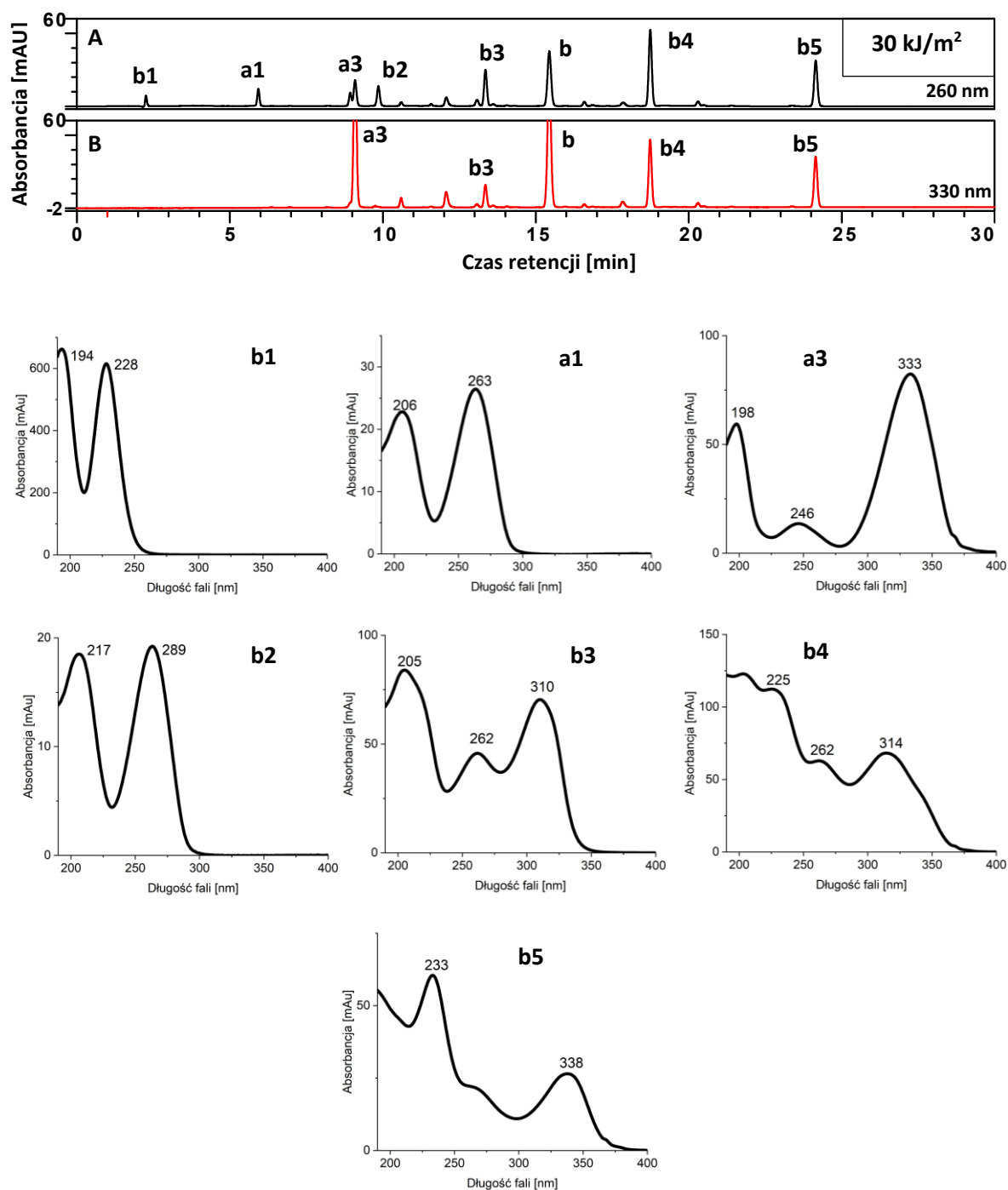
*Rysunek 14. Chromatogram roztworu fotoproduktu ISdU-SdU **b4** w buforze fosforanowym (10 mM, pH 7) po oczyszczeniu na HPLC oraz liofilizacji.*

Disulfid ISdU-SdU **b4** może powstawać w wyniku rekombinacji dwóch rodników tiolowych pochodzących z różnych cząsteczek: ISdU oraz SdU. Zajście takiej reakcji dowodzi współistnienia obu typów rodników tiolowych w środowisku reakcji. Fotoprodukt ISdU-SdU **b4** powstaje wydajnie ze wzrostem dawki do 30 kJ/m², po czym jego ilość maleje, potwierdzając obserwowaną niestabilność związku. (Rysunek 11).

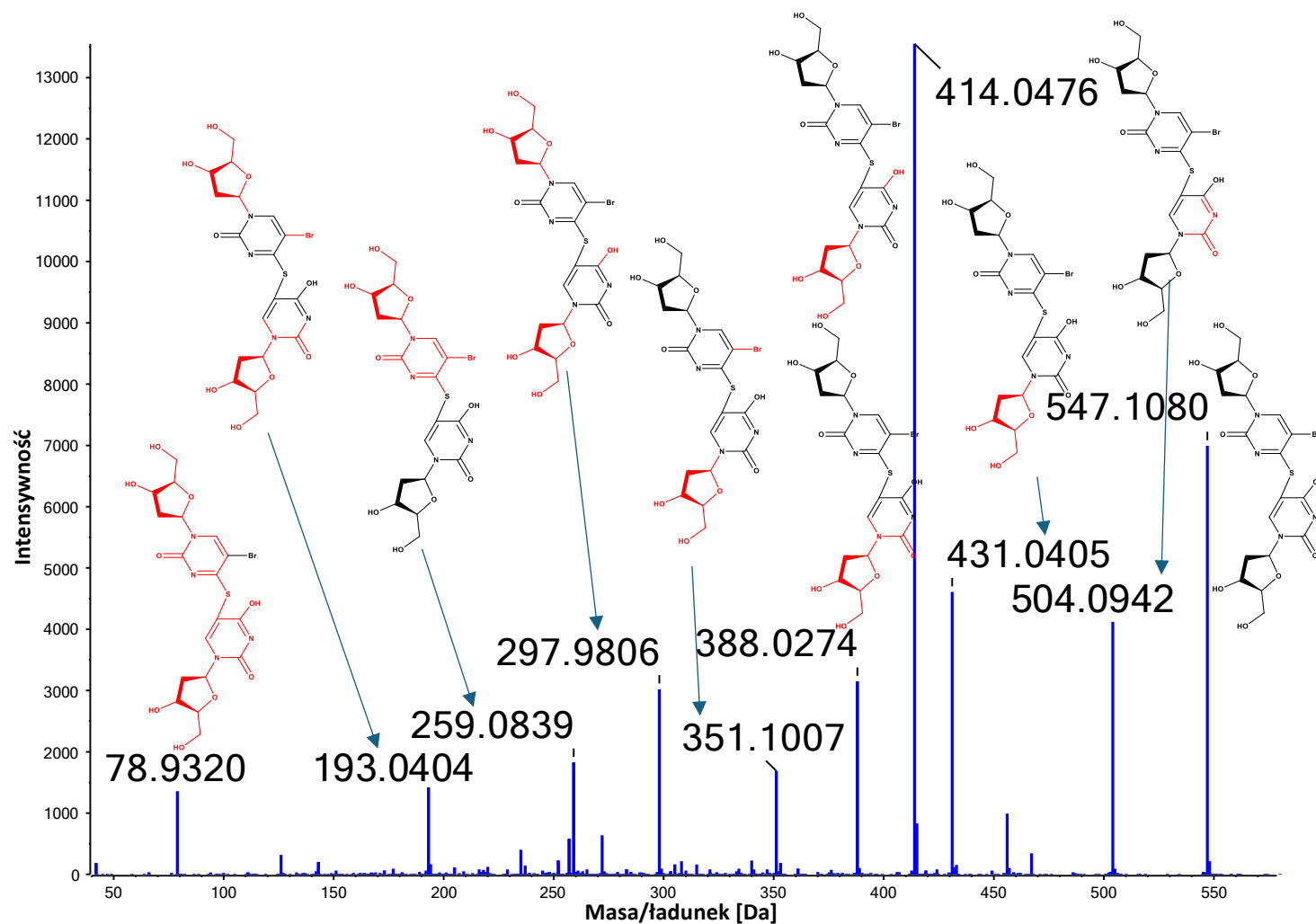
*Fotoprodukt ISdU-ISdU **b5***

Kolejnym fotoproduktem jest disulfid 5,5'-dijodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny, ISdU-ISdU, który zidentyfikowano na podstawie zarejestrowanych widm MS, MS/MS (Rysunek 21) oraz ^1H NMR. Obliczony stosunek masy $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{I}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ do ładunku m/z : $[\text{M-H}]^- = 736,8739$ odpowiada wynikowi eksperymentalnemu: 736,8941 (Tabela 2). Zarejestrowane widmo fragmentacyjne pozwoliło na potwierdzenie obecności charakterystycznych fragmentów cząsteczki (Rysunek 21), a magnetyczny rezonans jądrowy wskazał pozycje poszczególnych podstawników (^1H NMR δ_{H} (500MHz, DMSO- d_6) 8.63 (2H, s, Ar-H), 5.93 (2H, t, $J = 5.8$ Hz, CH), 5.26 (4H, t, $J = 5$ Hz, OH), 4.22 – 4.16 (2H, m, CH), 3.83 (2H, q, $J = 3.6$ Hz, CH), 3.66 (2H, dt, $J = 12.1, 3.8$ Hz, CH), 3.55 (2H, dt, $J = 12.1, 3.8$ Hz, CH), 2.31 – 2.21 (2H, m, CH), 2.15 – 2.06 (2H, m, CH); Rysunek 25).

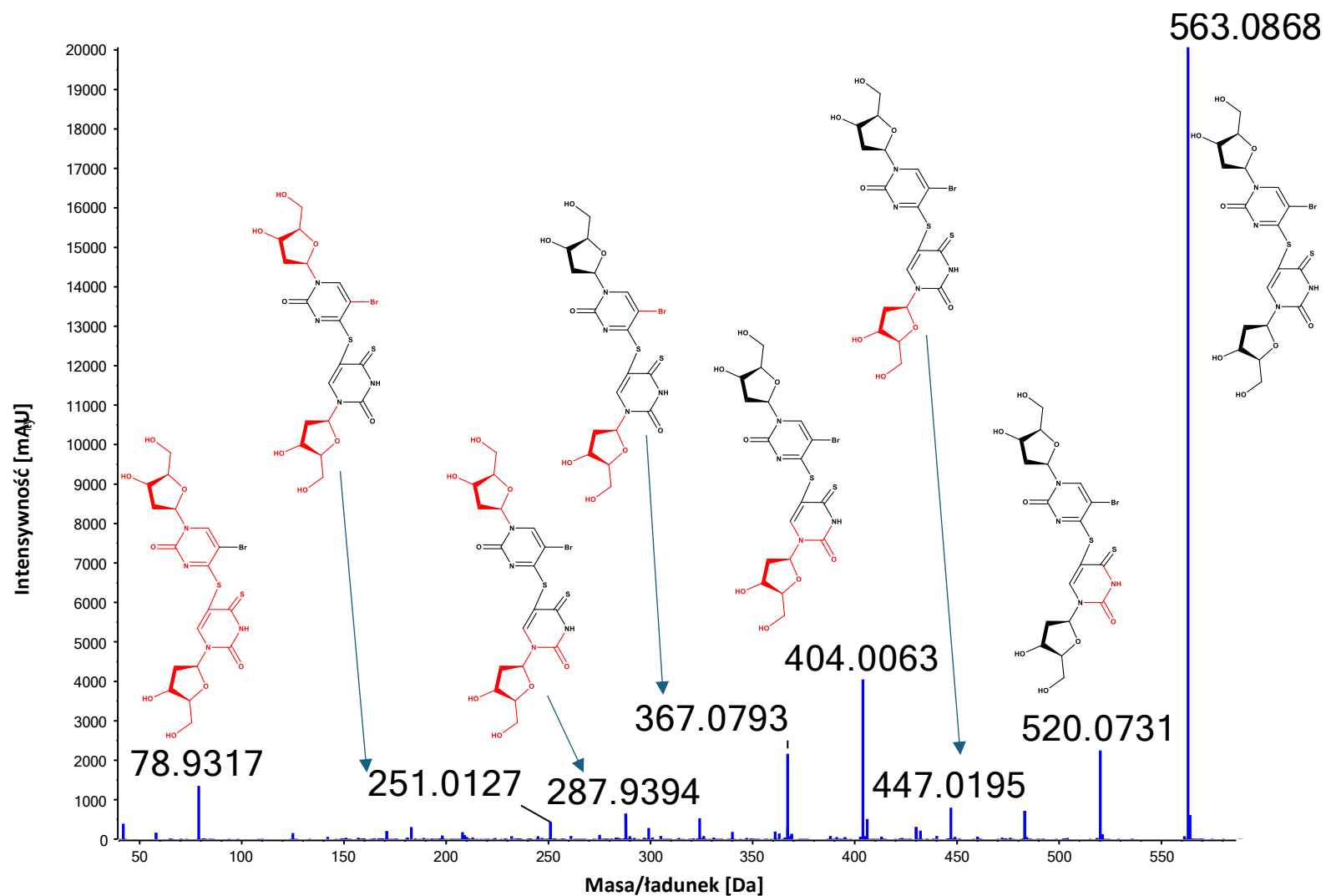
Za powstanie produktu ISdU-ISdU **b5** odpowiedzialne są dwa identyczne tiouronidki cząsteczek ISdU, które w wyniku rekombinacji mogą tworzyć mostek disiarczkowy i w konsekwencji dimer ISdU-ISdU **b5**. Ilość fotoproduktu wzrasta wraz ze zwiększaniem dawki do 20 kJ/m^2 , a następnie gwałtownie maleje, najprawdopodobniej wskutek wtórnych reakcji fotochemicznych (Rysunek 11).



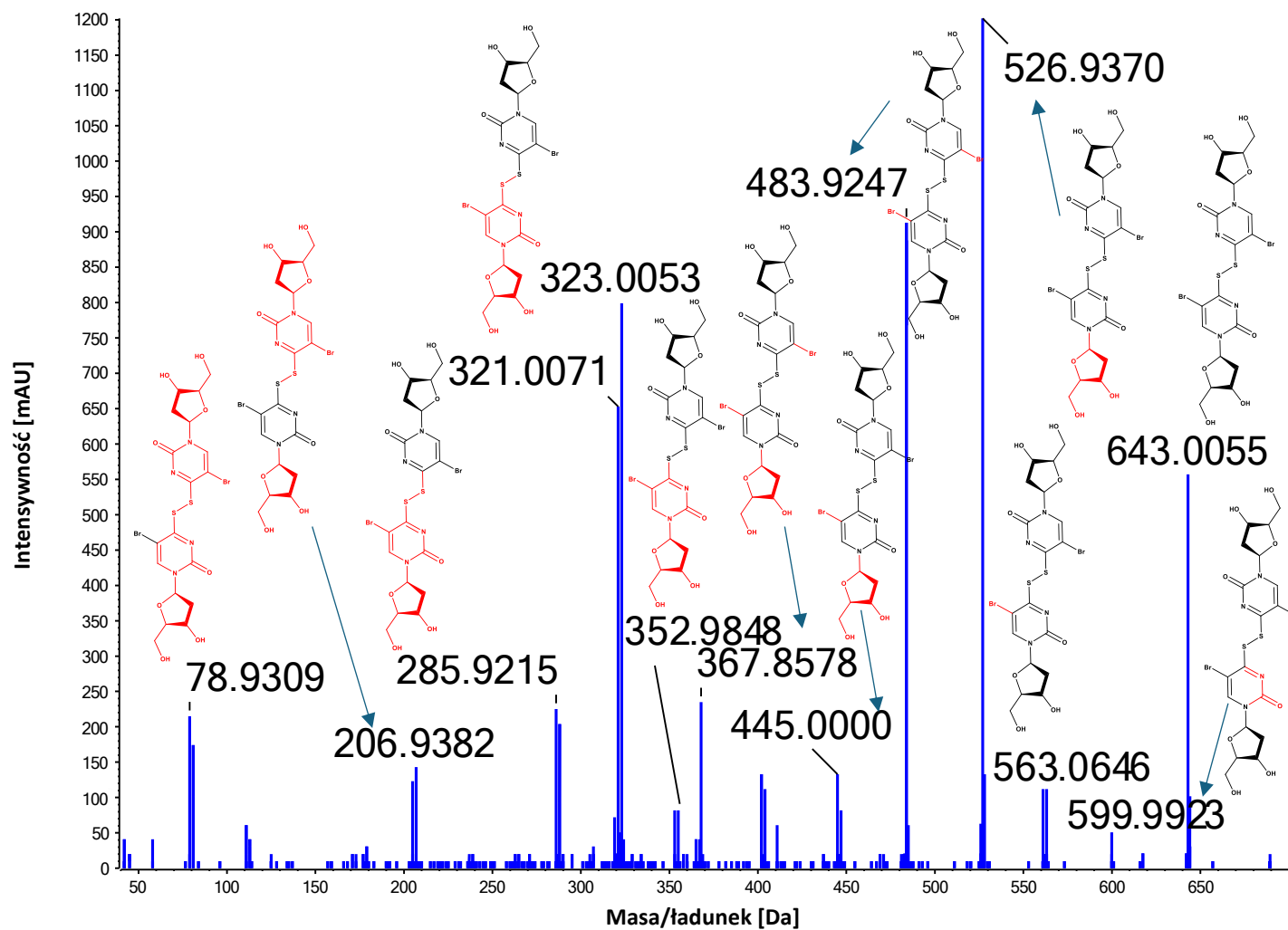
Rysunek 15. Chromatogramy roztworu ISdU **b** naświetlonego promieniowaniem UVA w dawce 30 kJ/m² zarejestrowane przy: A – 260 nm (czarna linia) i B – 330 nm (czerwona linia) oraz widma absorpcyjne dla powstających fotoproduktów. Poszczególnym sygnałom oraz widmom przypisano symbole fotoproduktów (b1 I; b2 IdU; b3 SdU-SdU; b4 ISdU-SdU oraz b5 ISdU-ISdU).



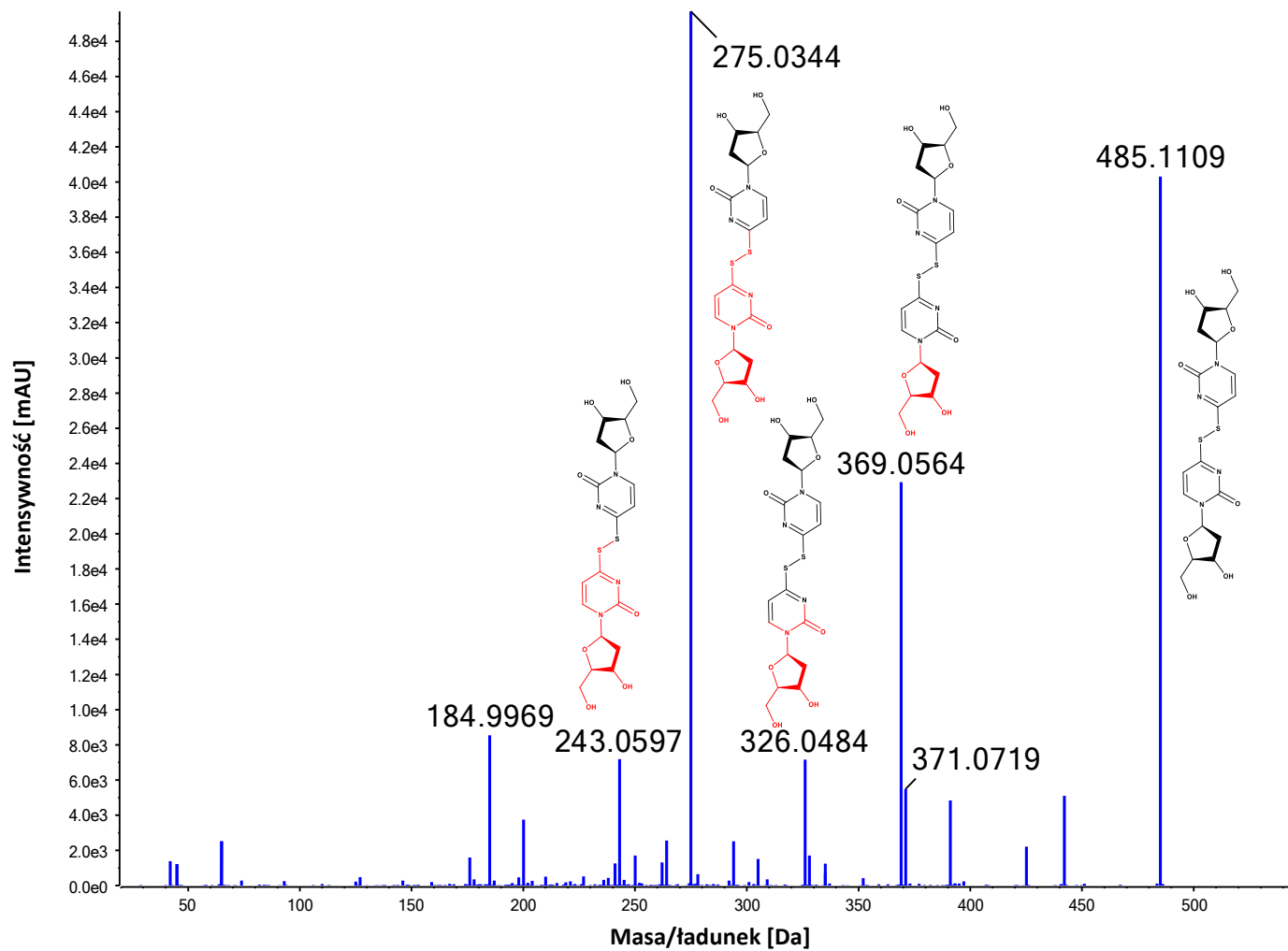
Rysunek 16. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu a4 BrSdU-OHdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).



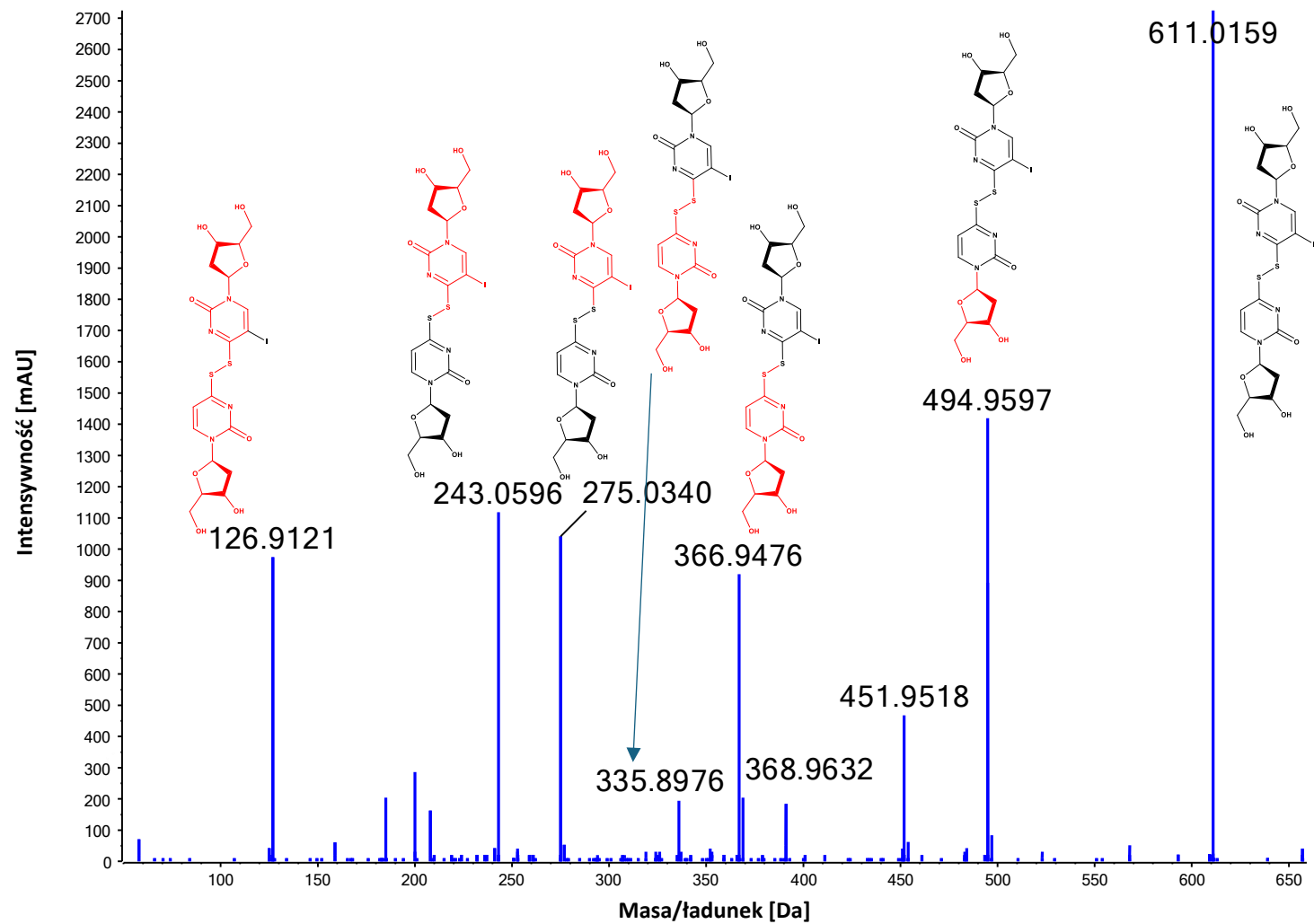
Rysunek 17. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu a5 BrSdU-SdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).



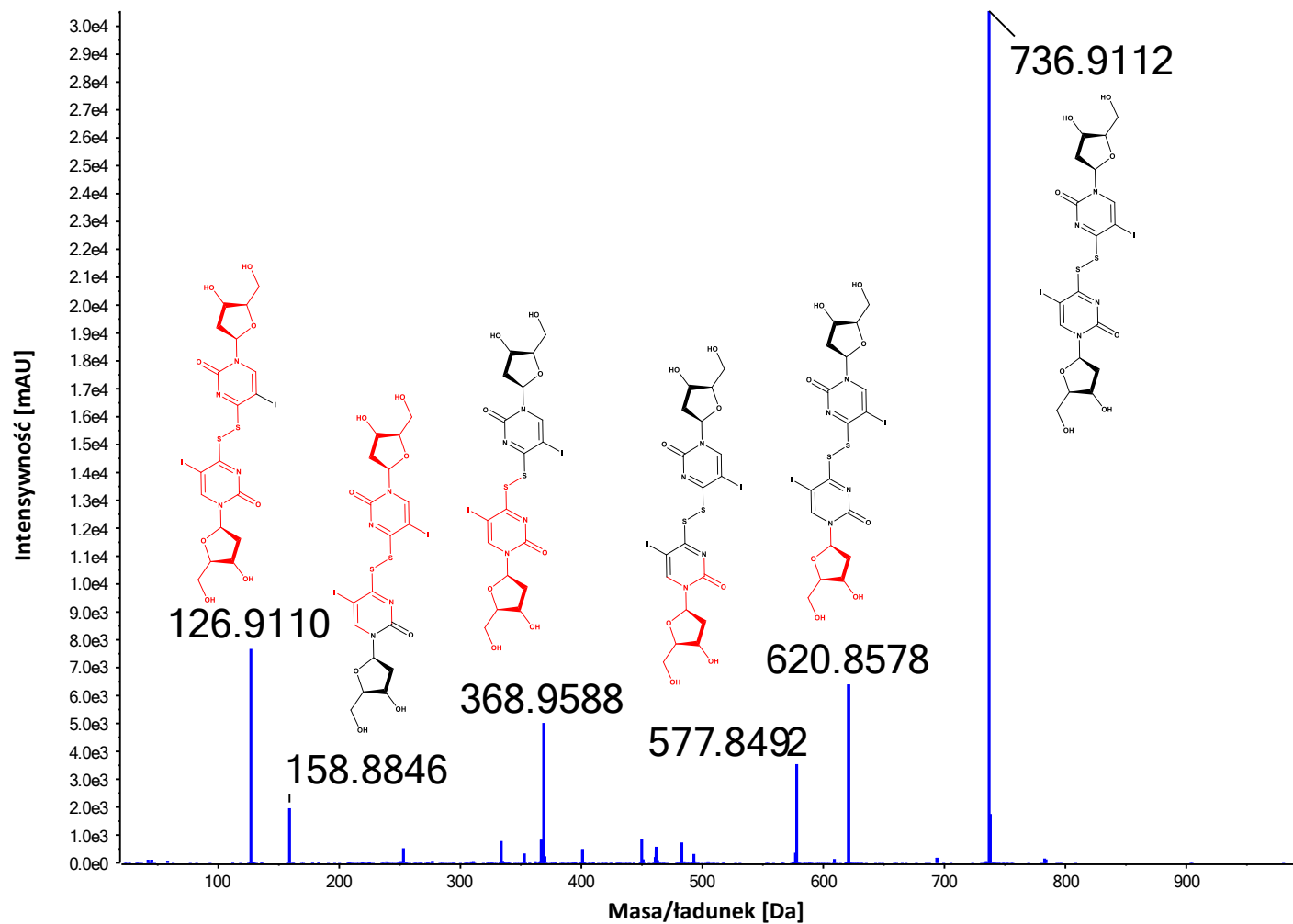
Rysunek 18. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu a6 BrSdU-BrSdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).



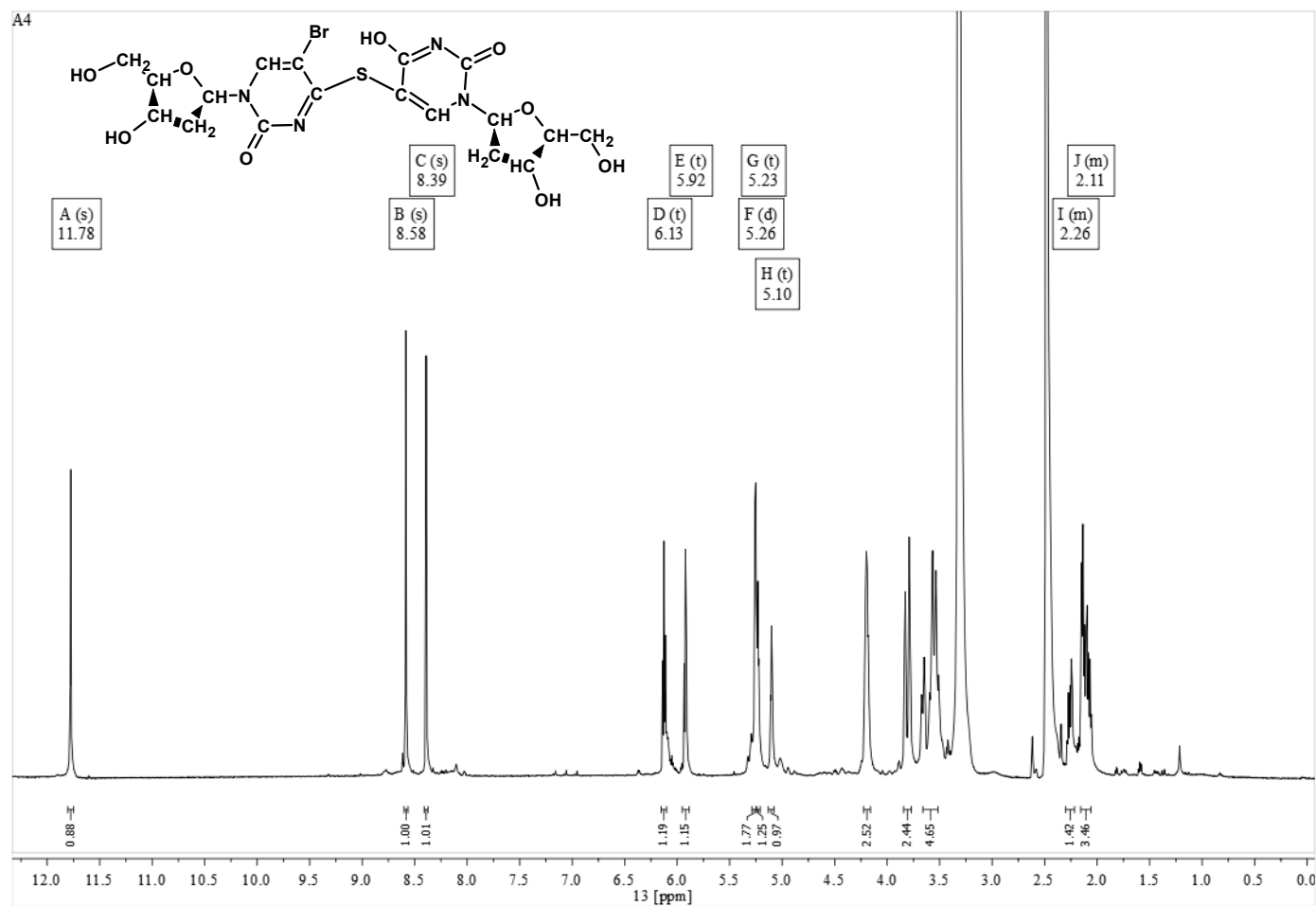
Rysunek 19. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu b3 SdU-SdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).



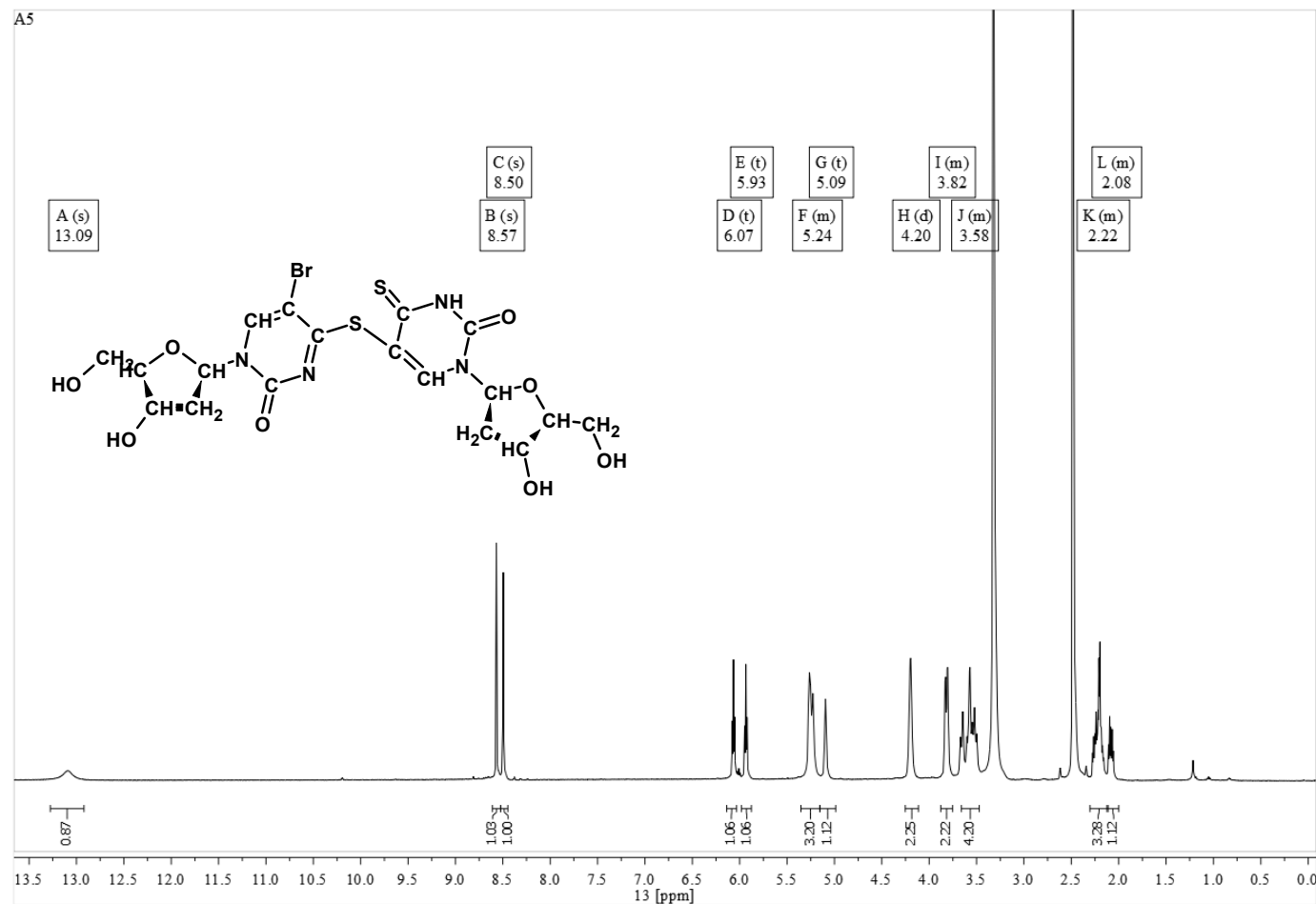
Rysunek 20. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu b4 ISdU-SdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).



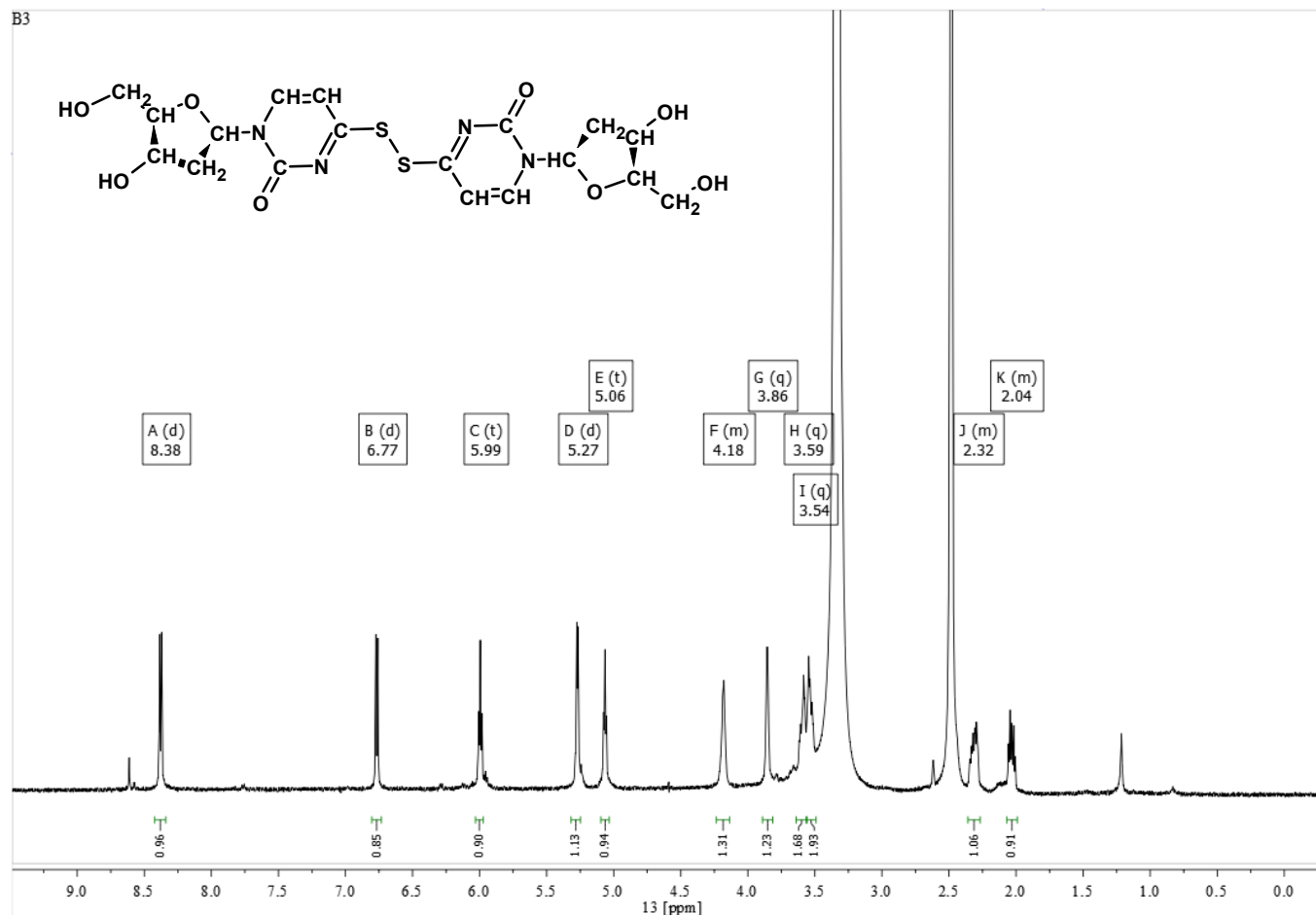
Rysunek 21. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu b5 ISdU-ISdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).



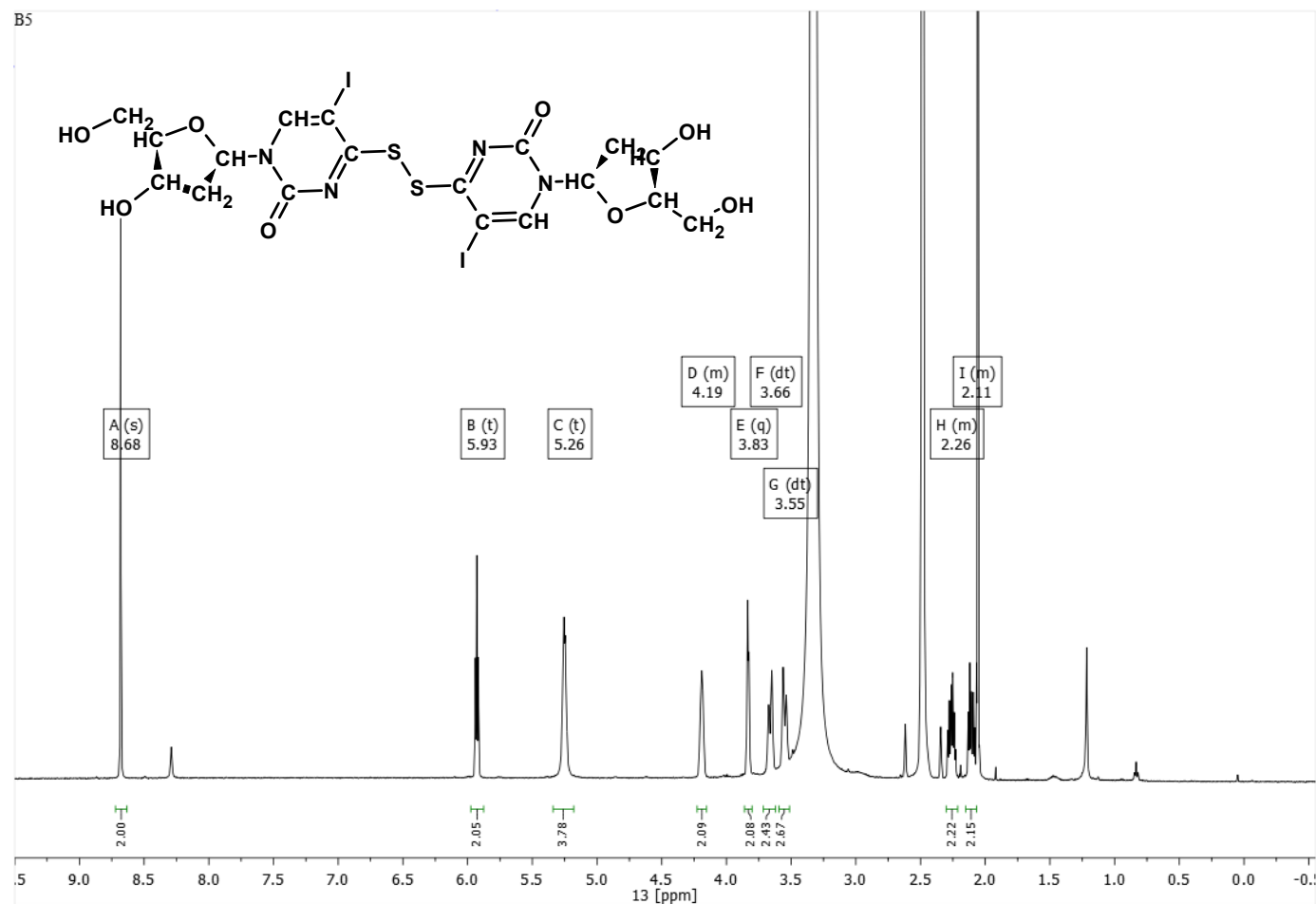
Rysunek 22. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu *a4* BrSdU-OHdU. ^1H NMR δH (500MHz, DMSO- d_6) 11.78 (1H, s, OH), 8.58 (1H, s, Ar-H), 8.39 (1H, s, Ar-H), 6.13 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, CH), 5.92 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, CH), 5.26 (2H, d, $J = 3.7$ Hz, OH), 5.23 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, OH), 5.10 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, OH), 4.23 – 4.16 (2H, m, CH), 3.85 – 3.75 (2H, m, CH), 3.69 – 3.47 (4H, m, CH), 2.29 – 2.23 (1H, m, CH), 2.18 – 2.05 (3H, m, CH).



Rysunek 23. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu a5 BrSdU-SdU. ^1H NMR δH (500MHz, DMSO- d_6) 13.09 (1H, bs, NH), 8.57 (1H, s, Ar-H), 8.50 (1H, s, Ar-H), 6.07 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, CH), 5.93 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, CH), 5.34 – 5.14 (3H, m, OH), 5.09 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, OH), 4.20 (2H, d, $J = 2.9$ Hz, CH), 3.87 – 3.75 (2H, m, CH), 3.71 – 3.44 (4H, m, CH), 2.28 – 2.14 (3H, m, CH), 2.12 – 2.01 (1H, m, CH).



Rysunek 24. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu b3 SdU-SdU. (500MHz, DMSO- d_6) 8.38 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, Ar-H), 6.77 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, Ar-H), 5.99 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, CH), 5.27 (2H, d, $J = 4.4$ Hz, OH), 5.06 (2H, t, $J = 5.2$ Hz, OH), 4.25 – 4.13 (2H, m, CH), 3.86 (2H, q, $J = 3.7$ Hz, CH), 3.59 (2H, q, $J = 6.0, 4.5$ Hz, CH), 3.54 (2H, q, $J = 7.3, 5.9$ Hz, CH), 2.38 – 2.23 (2H, m, CH), 2.12 – 1.94 (2H, m, CH).



Rysunek 25. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu b5 ISdU-ISdU. (^1H NMR δH (500MHz, DMSO- d_6) 8.63 (2H, s, Ar-H), 5.93 (2H, t, $J = 5.8$ Hz, CH), 5.26 (4H, t, $J = 5$ Hz, OH), 4.22 – 4.16 (2H, m, CH), 3.83 (2H, q, $J = 3.6$ Hz, CH), 3.66 (2H, dt, $J = 12.1, 3.8$ Hz, CH), 3.55 (2H, dt, $J = 12.1, 3.8$ Hz, CH), 2.31 – 2.21 (2H, m, CH), 2.15 – 2.06 (2H, m, CH).

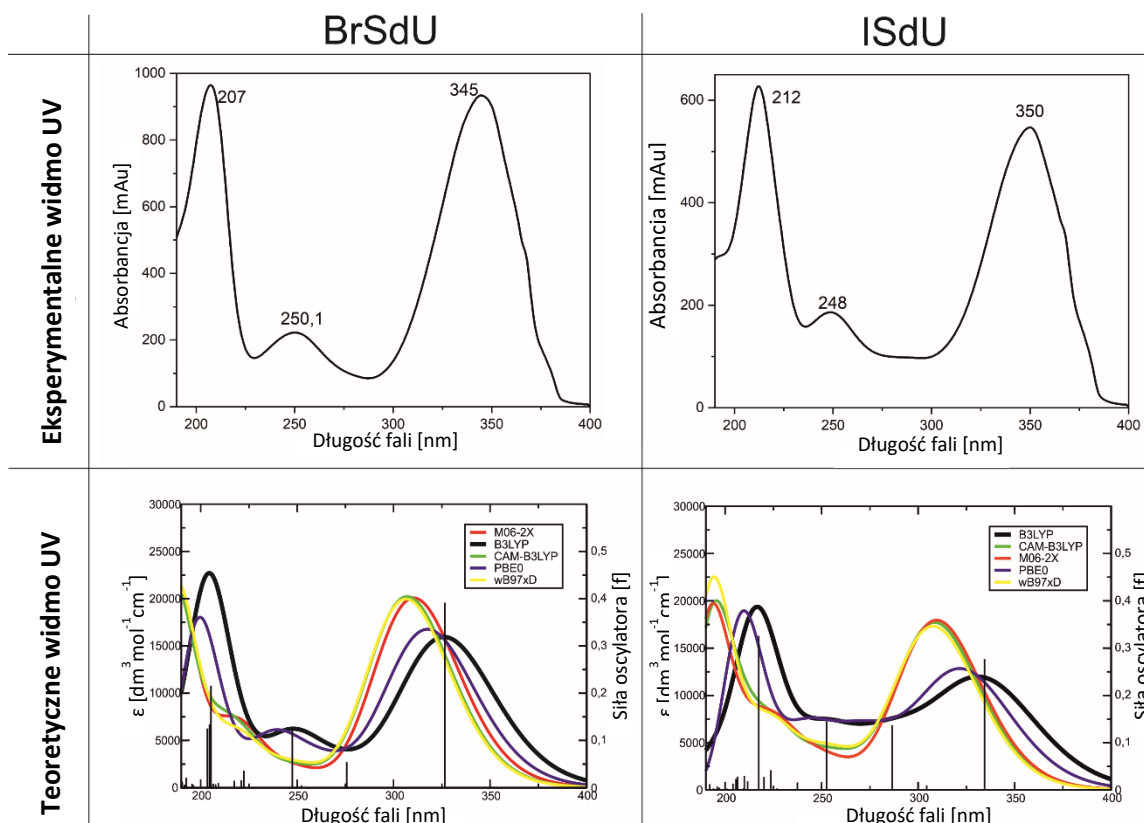
8.7.3 Obliczenia kwantowochemiczne – porównanie teoretycznych i eksperymentalnych widm absorpcyjnych

Dodatkowym narzędziem do identyfikacji poszczególnych struktur produktów fotolizy BrSdU oraz ISdU były obliczenia wykonane na poziomie teorii funkcjonału gęstości zależnej od czasu (metoda TD-DFT) w pakiecie Gaussian09. Obliczone widma absorpcyjne dla substratów fotoreakcji (BrSdU i ISdU) oraz fotoproduktów porównano z widmami eksperymentalnymi zarejestrowanymi podczas analiz chromatograficznych.

Aby jak najlepiej odwzorować dane eksperymentalne widm absorpcyjnych substratów fotoreakcji, do optymalizacji geometrii oraz obliczeń widma wykorzystano pięć różnych funkcjonałów: B3LYP, CAM-B3LYP, M06-2X, PBE0 oraz ω B97XD w połączeniu z odpowiednimi bazami funkcyjnymi. Dla BrSdU wykorzystano standardową bazę 6-31++G(d,p). Z uwagi na brak bazy 6-31++G(d,p) dla jodu, przy obliczeniach dla ISdU użyto bazy DGDZVP, która podobnie jak baza 6-31G(d,p) jest bazą z podwójnie rozszczepioną powłoką i funkcjami polaryzacyjnymi, do której dodano funkcje dyfuzyjne (DGDZVP++). Wszystkie obliczenia były prowadzone w wodzie w modelu ciągłym rozpuszczalnika (PCM). Porównanie wyników teoretycznych widm absorpcyjnych BrSdU i ISdU z eksperymentalnymi wskazuje, że funkcjonał B3LYP najtrafniej opisuje pozycje i względne intensywności pasm absorpcji – szczególnie w zakresie 345-350 nm (Rysunek 26; Tabela 3). Inne testowane funkcjonały, M06-2X, CAM-B3LYP i ω B97XD, dają znaczne przesunięcia maksimum absorpcji w stronę krótszych fal, co skutkuje przeszacowaniem energii wzbudzenia. Funkcjonał PBE0 oddaje wyniki z umiarkowaną zgodnością w porównaniu do danych eksperymentalnych, ale jest mniej precyzyjny niż B3LYP np. w przypadku niskoenergetycznego przejścia $n \rightarrow \pi^*$.

Tabela 3. Położenie maksimów absorpcji (nm) oraz ich intensywności dla różnych metod obliczeniowych porównane z wartościami eksperymentalnymi. Wszystkie obliczenia przeprowadzono z uwzględnieniem solwatacji w wodzie (model PCM) oraz z zastosowaniem bazy 6-31++G(d,p) dla BrSdU lub DGDZVP++ dla ISdU w programie Gaussian09. Dla wyników teoretycznych dodatkowo pokazano stany o sile oscylatora $f > 0,05$ lub te, które są najbliższe wartościom eksperymentalnym.

		Wartości maksimów absorpcji				
Związek	Eksperyment	B3LYP	CAM-B3LYP	M06-2X	PBE0	wB98xD
BrSdU	345nm 250nm 207nm	326,50nm	307,07nm	310,48nm	317,77nm	306,45nm
		f=0,3916	f=0,4996	f=0,4961	f=0,4128	f=0,4934
		275,70nm	250,57nm	250,54nm	264,80nm	249,79nm
		f=0,0543	f=0,0520	f=0,0462	f=0,0647	f=0,0583
		247,56nm	222,04nm	223,59nm	239,05nm	221,38nm
		f=0,1265	f=0,1123	f=0,1095	f=0,1045	f=0,1189
		205,46nm	204,96nm	213,30nm	211,78nm	209,81nm
		f=0,2160	f=0,0847	f=0,0380	f=0,0394	f=0,0226
		204,71nm	190,14nm	206,87nm	207,53nm	199,74nm
		f=0,1348	f=0,1340	f=0,0458	f=0,0196	f=0,0859
		203,62nm	186,79nm	191,76nm	199,03nm	189,55nm
		f=0,1256	f=0,0677	f=0,1079	f=0,2067	f=0,1201
			186,69nm	189,17nm	198,28nm	186,06nm
ISdU	350nm 248nm 212nm		f=0,1036	f=0,1540	f=0,1208	f=0,2751
			186,14nm	188,04nm		
			f=0,1409	f=0,1213		
		334,52nm	308,72nm	309,71nm	323,24nm	307,95nm
		0,2767	f=0,4365	f=0,4426	f=0,3087	f=0,4265
		286,63nm	255,26nm	251,33nm	273,62nm	257,26nm
		0,1368	f=0,0718	f=0,0477	f=0,1361	f=0,0412
		252,68nm	226,93nm	227,20nm	243,23nm	252,82nm
		0,1445	f=0,1378	f=0,1407	f=0,1156	f=0,0606
		217,56nm	216,57nm	215,66nm	213,52nm	225,68nm
		0,3258	f=0,0294	f=0,0337	f=0,0453	f=0,1474
			207,06nm	210,68nm	211,57nm	202,21nm
			f=0,0791	f=0,0285	f=0,0330	f=0,0837
			204,78nm	208,46nm	208,66nm	198,54nm
			f=0,0509	f=0,0339	f=0,3814	f=0,0729
			193,37nm	204,46nm		192,14nm
			f=0,3698	f=0,0467		f=0,3910
				192,80nm		
				f=0,3942		

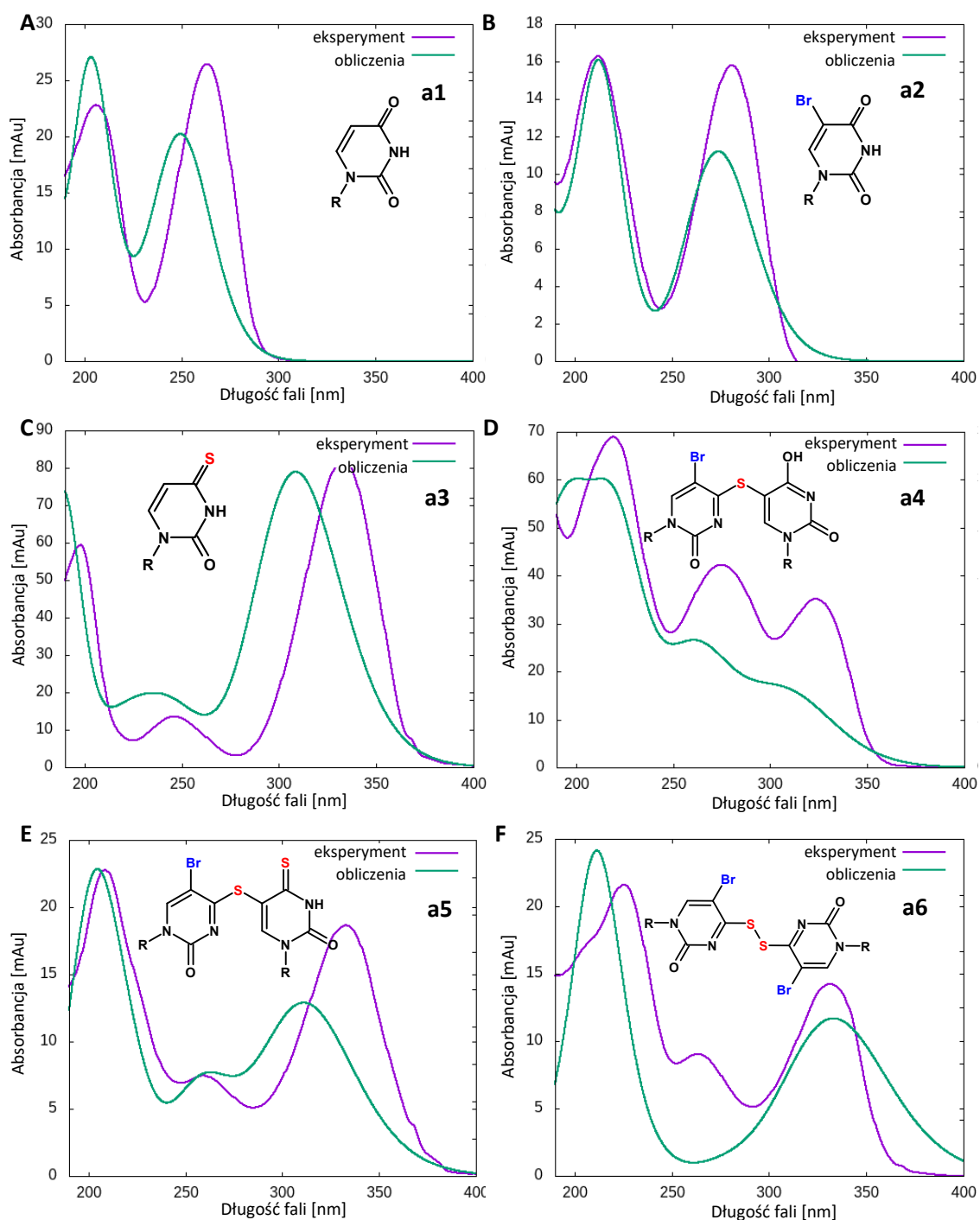


Rysunek 26. Widma absorpcyjne dla BrSdU oraz ISdU zarejestrowane eksperymentalnie (górny panel) oraz obliczone teoretycznie z użyciem różnych funkcjonałów (dolny panel).

Metodę TD-DFT wykorzystującą funkcjonał B3LYP zastosowano do przewidzenia widm absorpcyjnych dla produktów fotolizy BrSdU oraz ISdU. Rysunki 27 oraz 28 przedstawiają porównanie widm uzyskanych eksperymentalnie oraz obliczeniowo dla wszystkich fotoproduktów.

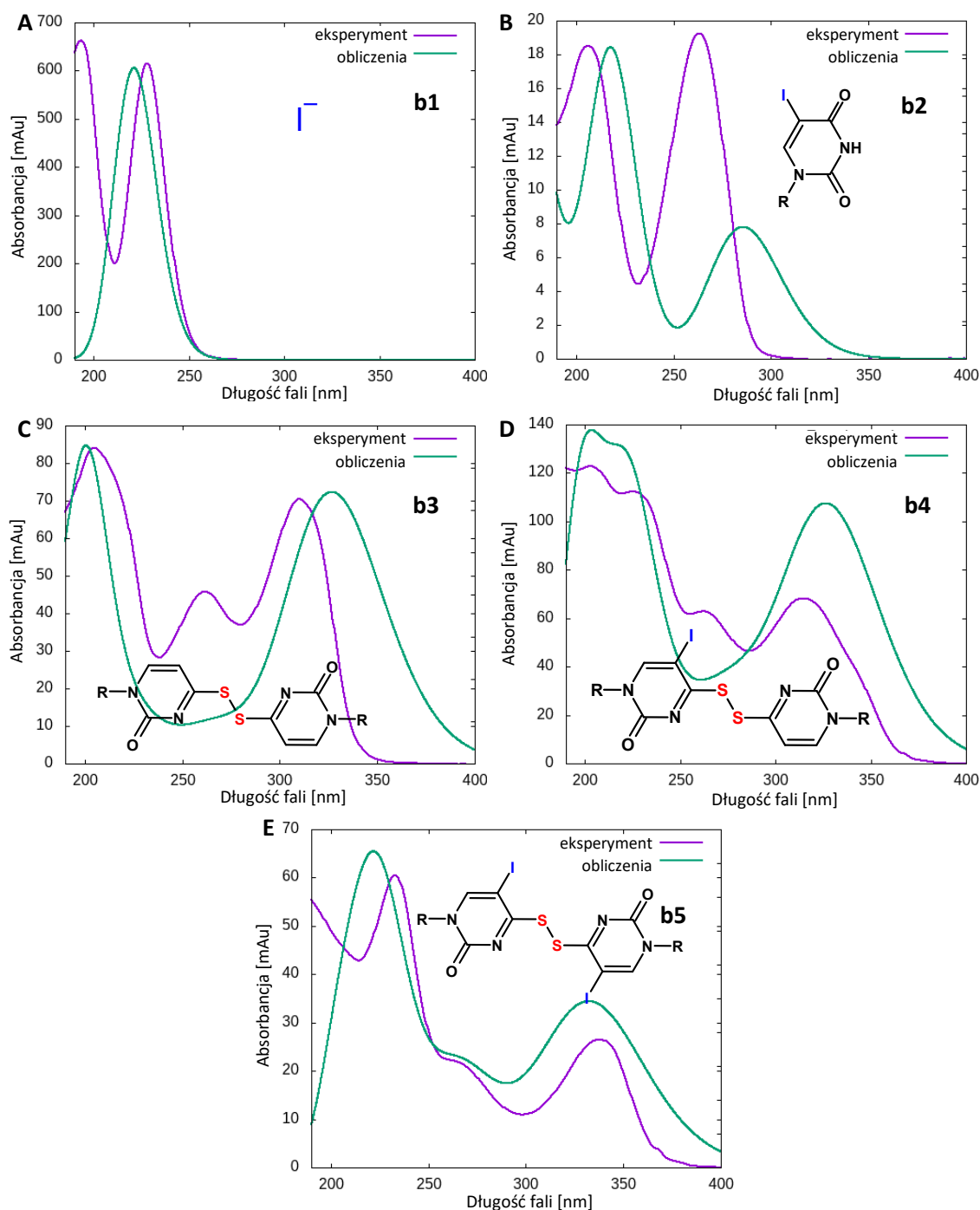
Fotoliza roztworu BrSdU prowadzi do powstania sześciu głównych fotoproduktów, a ISdU siedmiu (z czego dwa są wspólne z produktami bromopochodnej). Dla fotoproduktów, które zostały zidentyfikowane na podstawie wzorców, czyli dU **a1** (Rysunek 27a), BrdU **a2** (Rysunek 27b), SdU **a3** (Rysunek 27c) oraz IdU **b2** (Rysunek 28b) widma eksperymentalne charakteryzują się dwoma głównymi pasmami absorpcyjnymi (dla **a3** SdU rozróżniamy trzy maksima). Obliczenia TD-DFT bardzo dobrze odwzorowują położenie tych pasm, choć obserwuje się niewielkie różnice w ich intensywności. Zbieżność kształtu sugeruje poprawność identyfikacji produktu. Dla produktów dU **a1**, BrdU **a2** oraz SdU **a3** obserwuje się przesunięcia hipsochromowe widma teoretycznego względem obliczonego, co jest cechą obliczeń TD-DFT. Dodatkowo funkcjonał B3LYP posiada tendencję do niedoszacowywania długości fali (przeszacowywania energii przejść). Inaczej jest

w przypadku fotoproduktu IdU **b2**, dla którego widmo obliczone jest przesunięte w kierunku fal dłuższych niż eksperymentalne (Rysunek 28B). Tego typu przesunięcie może wynikać z obecności ciężkiego atomu jodu, który znacząco wpływa na charakter stanów elektronowych układu oraz ograniczenia zastosowanego poziomu teorii. Widmo eksperymentalne fotoproduktu BrSdU-OHdU **a4** (Rysunek 27D) charakteryzuje się trzema wyraźnymi maksimami i taka sama ilość przejść jest odzwierciedlona na obliczonym widmie. Dla tego drugiego obserwuje się przesunięcie hipsochromowe oraz wyraźne obniżenie intensywności pasm przy około 270 oraz 320 nm. Podobnie można opisać porównanie widm absorpcyjnych eksperymentalnego z obliczonym dla produktu BrSdU-SdU **a5** (Rysunek 27E). Obserwuje się podobne przesunięcie oraz obniżenie maksimów. Ostatni fotoprodukt dla BrSdU to disulfid BrSdU-BrSdU **a6** (Rysunek 27F). Tutaj widmo eksperymentalne posiada trzy maksima, ale tylko z dwoma pokrywa się widmo teoretyczne – przy 225 nm i 331 nm. Dla pierwszego obserwuje się przesunięcie hipsochromowe, natomiast kolejne maksimum teoretyczne jest znacznie bardziej rozciągnięte w porównaniu do zmierzonego. Obecność mostka disiarczkowego wpływa na redystrybucję gęstości elektronowej w cząsteczce, co może dodatkowo wzmacniać efekt przesunięcia i zmieniać intensywność obserwowanych pasm.



Rysunek 27. Porównanie widm absorpcyjnych eksperymentalnych (fioletowa linia) z obliczonymi teoretycznie (zielona linia; DT-DFT, B3LYP, baza funkcyjna 6-31++G(d,p)) dla produktów fotolizy BrSdU: A – a1 dU; B – a2 BrdU; C – a3 SdU; D – a4 BrSdU-OHdU; E – a5 BrSdU-SdU oraz F – a6 BrSdU-BrSdU. Przy poszczególnych widmach przedstawiono struktury fotoproduktów (R = 2'-deoksyryboza).

Zarejestrowane widmo absorpcyjne fotoproduktu I⁻ **b1** (Rysunek 28A) pochodzącego z fotolizy ISdU posiada maksimum w okolicy 228 nm. Na widmie teoretycznym jest ono lekko przesunięte w stronę krótszych fal. Mimo niedoskonałości metody TD-DFT, widmo teoretyczne bardzo dobrze przewiduje wynik eksperymentalny. Widmo eksperymentalne SdU-SdU **b3** (Rysunek 28C) charakteryzuje się dwoma pasmami: pierwsze intensywne przy 246 nm oraz drugie, szersze, z maksimum w okolicy 333 nm. Widmo obliczeniowe dobrze odwzorowuje ogólny profil spektralny, ale można zauważyć też przesunięcie batochromowe względem eksperymentu – maksimum absorpcji pojawia się przy dłuższej długości fali niż w eksperymencie. Może to wynikać z niedoszacowania energii przejść $n \rightarrow \pi^*$ przez zastosowaną metodę. Związek ISdU-SdU **b4** (Rysunek 28D) posiada widmo absorpcyjne z trzema maksimumami, a dla ostatniego widoczny jest wpływ ciężkiego atomu – jodu, w porównaniu do widma SdU-SdU **b3**. Obserwowane pasma na widmach teoretycznych i eksperymentalnych mają podobny przebieg. Główne maksimum o wysokiej energii jest dobrze odwzorowane, natomiast niższe pasma są nieznacznie przesunięte batochromowo na widmie obliczonym. Dodatkowo, intensywność absorpcji na widmie teoretycznym jest przeszacowana w zakresie 300–340 nm. Może to wynikać z obecności jodu zwiększającego polaryzowalność układu. Dla fotoproduktu ISdU-ISdU **b5** (Rysunek 28E) obliczone widmo bardzo dobrze oddaje ogólny kształt i położenie pasm. Wyżej energetyczne pasmo na widmie teoretycznym jest przesunięte hipsochromowo, pozostałe pasma są zgodne z eksperymentem.



Rysunek 28. Porównanie widm absorpcyjnych eksperymentalnych (fioletowa linia) z obliczonymi teoretycznie (zielona linia; DT-DFT, B3LYP, baza funkcyjna DGDZVP++) dla produktów fotolizy ISdU: A – b1 I⁻; B – b2 IdU; C – b3 SdU-SdU; D – b4 ISdU-SdU oraz E – b5 ISdU-ISdU (produkty fotolizy wspólne z BrSdU a1 oraz a3 przedstawiono na Rysunku 27). Przy poszczególnych widmach przedstawiono struktury fotoproduktów (R = 2'-deoksyryboza).

8.7.4 Dyskusja wyników

Fotoliza 5-halogenowanych tiopochodnych urydyny (BrSdU oraz ISdU) w buforze fosforanowym prowadzi do licznych przemian fotochemicznych. W wyniku ekspozycji na promieniowanie UVA zaobserwowano szereg produktów – zarówno prostych monomerycznych, jak i bardziej złożonych dimerów, których identyfikację przeprowadzono na podstawie porównania z wzorcami (dla części związków), analiz HPLC, spektrometrii mas (MS, MS/MS) oraz spektroskopii ^1H NMR. Z wykorzystaniem metod TD-DFT zostały też obliczone teoretyczne widma absorpcyjne otrzymanych fotoproduktów. Ich porównanie z danymi eksperymentalnymi jest dodatkowym dowodem potwierdzającym poprawność proponowanych struktur.

Wspólnymi fotoproduktami dla obu modyfikowanych nukleozydów są 2'-deoksyurydyna (dU **a1**) oraz 4-tio-2'-deoksyurydyna (SdU **a3**), powstające najprawdopodobniej w wyniku homolitycznego rozpadu wiązania C-X i utworzenia rodnika urydylowego. W dalszych etapach reakcji może dochodzić do utlenienia grupy tiokarbonylowej lub rekombinacji rodników tiolowych, prowadzących do powstawania szeregu dimerów disiarczkowych. Generowanie dU **a1** zachodzi efektywniej dla BrSdU niż ISdU, wraz ze wzrostem dawki promieniowania. SdU **a3** powstaje wydajnie zarówno w wyniku fotolizy BrSdU jak i ISdU. Pośród produktów fotolizy obu MN znajdują się ich halogenowe odpowiedniki. Dla BrSdU obserwujemy pojawianie się 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU **a2**), a dla ISdU 5-jodo-2'-deoksyurydyny (IdU **b2**). Oba związki wraz ze wzrostem dawki promieniowania powstają wydajnie dla obu badanych MN. Pozostałymi produktami fotolizy BrSdU są dimery: BrSdU-OHdU **a4** (dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-hydroksy)-dideoksyurydynowy), BrSdU-(S)dU **a5** (dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-tio)-dideoksyurydynowy i BrSdU-BrSdU **a6** (disulfid 5,5'-dibromo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny). Powstawanie tych produktów może być związane z rekombinacją rodników tiolowych, a także występowaniem reakcji fotohydratacji dla BrSdU-OHdU **a4** i dalszych przemian cząsteczkowych. Produkt **a4** jest stabilny, a jego ilość wrasta wraz z dawką UVA, natomiast pozostałe dwa **a5** oraz **a6** są fotoproduktami niestabilnymi. Związek **a6** najwydajniej powstaje przy niskich dawkach UVA, a po przekroczeniu 20 kJ/m^2 jego ilość spada. W fotolizie ISdU zaobserwowano dwa symetryczne dimery: SdU-SdU **b3** (disulfid 4,4'-ditio-dideoksyurydyny) i ISdU-ISdU **b5** (disulfid 5,5'-dijodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny) oraz jeden niesymetryczny ISdU-SdU **b4** (disulfid 5-jodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny). Produkty **b4** oraz **b5** okazały się niestabilne

po naświetlaniu wyższymi dawkami promieniowania UVA, w odróżnieniu od **b3**, którego ilość wzrastała wraz ze wzrostem dawki.

Otrzymane wyniki fotolizy BrSdU oraz ISdU warto porównać z wynikami badań fotochemicznych grupy Skalskiego.^{109,110} W badaniach tych grupy hydroksylowe reszty cukrowej zastąpiono grupą acylową, a naświetlanie przeprowadzano w mieszaninie woda:acetonitryl (1:1, v:v). W przypadku bromopochodnej zaobserwowano głównie tworzenie dwóch typów fotoadduktów. Pierwszy z nich powstaje w wyniku reakcji [2+2] fotoaddycji, której towarzyszy eliminacja atomów bromu oraz utworzenie wiązań C4–S–C5' i C5–C4'. Drugi produkt powstaje poprzez połączenie dwóch cząsteczek za pośrednictwem wiązania C4–S–C5' z utworzeniem dimeru BrSdU-SdU. Porównując rezultaty grupy poznańskiej z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy można zauważyć, że fotoprodukt BrSdU-SdU **a5** odpowiada strukturze opisywanej przez grupę Skalskiego. W przypadku fotolizy ISdU, autorzy pracy wykazali powstawanie jonu jodkowego, SdU oraz dimerów ISdU-SdU oraz ISdU-ISdU – wszystkie te fotoprodukty powstawały również w warunkach zastosowanych w niniejszej pracy. Skalski i współpracownicy zaproponowali mechanizm indukowanego fotochemicznie pęknięcia wiązania C5-I z utworzeniem krótko żyjącego rodnika urydylowego, po którym następuje przeniesienie atomu wodoru $N3-H \rightarrow C5-H$, sprzężone z przeniesieniem rodnika na atom siarki. Powstawanie fotoproduktów niezawierających halogenu wskazuje, że rozerwanie wiązania C5-I jest pierwotnym etapem fotochemicznym, a atom siarki jest reaktywnym centrum cząsteczki.

Porównanie widm UV produktów fotolizy buforowanych roztworów BrSdU oraz ISdU zarejestrowanych podczas analiz chromatograficznych z wynikami teoretycznymi uzyskanymi metodą TD-DFT to kolejna metoda pozwalająca na identyfikację fotoproduktów. Do obliczeń wykorzystano funkcjonal B3LYP najlepiej oddający wyniki eksperymentalne zarówno pod względem pozycji pasm absorpcyjnych, jak i ich względnych intensywności. Świadczy to o właściwym doborze metodologii obliczeniowej do analizy badanych układów. Wysokie podobieństwo między obliczonymi a eksperymentalnymi widmami absorpcji dla większości produktów fotolizy zarówno BrSdU jak i ISdU pozwala na wiarygodną identyfikację struktur fotoproduktów powstałych w warunkach fotolizy stacjonarnej. Widma struktur potwierdzonych na podstawie porównania ze wzorcem, takie jak dU **a1**, BrdU **a2**, IdU **b1**, stanowią przykład bardzo dobrej korelacji, potwierdzającej poprawność przypisania struktury do danego widma. Również widma obliczeniowe

fotoproduktów bardziej złożonych: BrSdU-OHdU **a4**, BrSdU-(S)dU **a5** czy ISdU-ISdU **b5** wykazują wysoką zgodność z widmami eksperymentalnymi zarówno pod względem liczby pasm, intensywności, jak i ich położenia.

W przypadku większości fotoproduktów obserwowano dobrą zgodność ogólnego kształtu widm oraz liczby pasm absorpcyjnych. Główne przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$, zlokalizowane w zakresie wyższych energii, były relatywnie dobrze odwzorowywane w obliczeniach. Większe rozbieżności dotyczyły pasm o niższej energii, zwykle przypisywanych przejściom $n \rightarrow \pi^*$. W kilku przypadkach porównywania widm teoretycznych z doświadczalnymi, np. dla SdU **a3**, SdU-SdU **b3** czy ISdU-SdU **b4** zaobserwowano niewielkie przesunięcia hipsochromowe czy batochromowe maksimów absorpcji lub niedokładne odwzorowanie intensywności pasm. Dla widm fotoproduktów zawierających atomy jodu rozbieżności były bardziej wyraźne niż dla związków zawierających wyłącznie siarkę lub brom. Obecność ciężkich atomów zwiększa polaryzowalność układu i wpływa na lokalizację poziomów energetycznych, co nie zawsze może być w pełni odwzorowywane przez standardowe funkcjonały. Dodatkowo, zastosowany model rozpuszczalnika upraszcza oddziaływania cząsteczek z otoczeniem, co może prowadzić do niedoszacowania efektów specyficznych ich interakcji. Pomimo tych różnic, uzyskane widma obliczeniowe mieszczą się w akceptowalnych granicach i potwierdzają przypisania struktur poszczególnym fotoproduktom.

8.8 Uszkodzenia modelowego DNA punktowo znakowanego BrSdU indukowane promieniowaniem z zakresu UVA

Halogenowane pochodne 4-tio-2'-deoksyurydyny – BrSdU i ISdU po wbudowaniu do DNA mogą inicjować różne ścieżki reakcji fotochemicznych indukowane promieniowaniem UVA. W przypadku 6-tioguaniny czy 4-tiotymidyny dobrze poznanym mechanizmem fotouczulania jest generowanie tlenu singletowego, jednak w warunkach hipoksji, typowych dla nowotworów litych, proces ten może nie być wydajny. Obecność atomu siarki w pierścieniu zasady sprzyja też powstawaniu wiązań sieciujących DNA.^{74,84,89,90} Z drugiej strony, fotochemia oligonukleotydów znakowanych BrdU czy IdU jest dobrze opisana w literaturze i dotyczy przede wszystkim mechanizmu dalekozasięgowego transferu elektronu prowadzącego do pęknięć nici DNA. Szczególnie podatne na ET są sekwencje zawierające fragment 5'-(G/C)AAXUT-3'.¹²⁵ Można więc przypuszczać, że w przypadku BrSdU i ISdU, w zależności od sekwencji nukleotydowej, będą dominowały produkty typu sieciowania i/lub jednoniciowe pęknięcia DNA (SSB). Włączenie badanych nukleozydów do biopolimeru daje możliwość bezpośredniej interakcji MN z matrycą DNA, co zwiększa prawdopodobieństwo powstawania stabilnych, trudnych do naprawy uszkodzeń. Analiza fotoreaktywności BrSdU i ISdU w modelowych oligonukleotydach pozwala nie tylko zidentyfikować dominujące mechanizmy uszkodzeń, ale również ocenić potencjał tych fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej nowotworów.

8.8.1 Charakterystyka i oczyszczenie oligonukleotydów znakowanych 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyną oraz hybrydyzacja nici komplementarnych

Do badań nad fotochemią DNA znakowanego 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyną wykorzystano sześć syntetycznych oligonukleotydów (ODN) składających się z 30 zasad, z których trzy zawierały punktowe podstawienie BrSdU w jednej, ściśle określonej pozycji. Oligonukleotydy dobrano parami tak, aby utworzyły dwuniciowe struktury DNA (dsDNA), w których tylko jedna z nici jest modyfikowana. Otoczenie miejsca podstawienia BrSdU zostało celowo zróżnicowane, by umożliwić ocenę wpływu lokalnego kontekstu sekwencyjnego na efektywność i rodzaj fotoreakcji, w szczególności mechanizmu dalekozasięgowego transferu elektronu (ET). Do badań wybrano następujące sekwencje (Tabela 4):

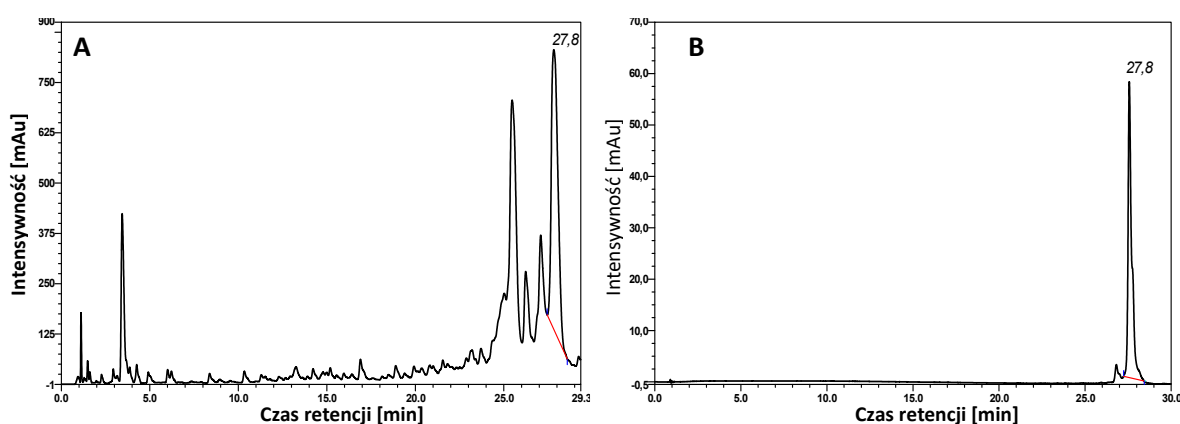
- **ODN1** (5'-TAT CTA GAC AGG AAU^{BrSdU} TAC TCA TAT CAG TCA-3') oraz komplementarną do niej **ODN2** (5'-TGA CTG ATA TGA GTA ATT CCT GTC TAG ATA-3'). Dupleks **ODN1:ODN2** reprezentuje sekwencję najbardziej podatną na dalekozasięgowy transferu elektronu. Otoczenie modyfikowanej urydyny przyjmuje układ tzw. „hot-spot” dla mechanizmu ET.
- **ODN3** (5'-TAT CTA GAC AGC AAU^{BrSdU} AAC TCA TAT CAG TCA-3') oraz komplementarną do niej **ODN4** (5'-TGA CTG ATA TGA GTT ATT GCT GTC TAG ATA-3'). Po hybrydyzacji nici modyfikowana urydyna znajduje się w otoczeniu układu sprzyjającego dla ET. Tutaj donorem elektronu może być guanina obecna w nici komplementarnej. Ten układ zasad sprzyja zajściu dalekozasięgowego transferu elektronu w sekwencji znakowanej BrdU.¹⁵¹
- **ODN5** (5'-TAT CTA GAC ACA GGU^{BrSdU} TAC TCA TAT CAG TCA-3') oraz komplementarną do niej **ODN6** (5'-TGA CTG ATA TGA GTA ACC TGT GTC TAG ATA-3'). Obecność guanin od strony 5' znakowanej urydyny powinna hamować zajście dalekozasięgowego transferu elektronu – oderwany elektron może ulec rekombinacji, zanim nastąpi oderwanie atomu halogenu (wsteczny transfer elektronu).¹²³

Tak zaprojektowane 30-merowe sekwencje powinny umożliwić systematyczne porównanie wpływu otoczenia znakowanej zasady na efektywność fotoreakcji całego biopolimeru.

Tabela 4. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w badaniach ze wskazaniem podatności na fotochemicznie indukowany dalekozasięgowy transfer elektronu.

Nazwa	Sekwencja (5'→3')	Wrażliwość dupleksu na ET
ODN1	TAT CTA GAC AGG AAU ^{BrSdU} TAC TCA TAT CAG TCA	Wysoka
ODN2	ATA GAT CTG TCC TTA ATG AGT ATA GTC AGT	
ODN3	TAT CTA GAC AGC AAU ^{BrSdU} AAC TCA TAT CAG TCA	Średnia
ODN4	ATA GAT CTG TCG TTA TTG AGT ATA GTC AGT	
ODN5	TAT CTA GAC ACA GGU ^{BrSdU} TAC TCA TAT CAG TCA	Niska
ODN6	ATA GAT CTG TGT CCA ATG AGT ATA GTC AGT	

Wszystkie wykorzystane w badaniach oligonukleotydy zostały zsyntezowane metodą amidofosforynową na podłożu stałym przez prof. Ryszarda Kierzka z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Po uwolnieniu biopolimerów ze złoża i deprotekcji grup ochronnych przeprowadzono oczyszczanie chromatograficzne. W tym celu wykorzystano denaturującą wysokosprawną chromatografię par jonowych w układzie faz odwróconych. Odpowiednie frakcje zidentyfikowano w oparciu o analizę widm masowych. Ze względu na wysoką fotowrażliwość modyfikowanych biopolimerów po rozpuszczeniu w wodzie, wszystkie operacje wykonywano w warunkach ograniczonego dostępu światła, z użyciem materiałów laboratoryjnych zabezpieczających przed promieniowaniem UV i widzialnym.



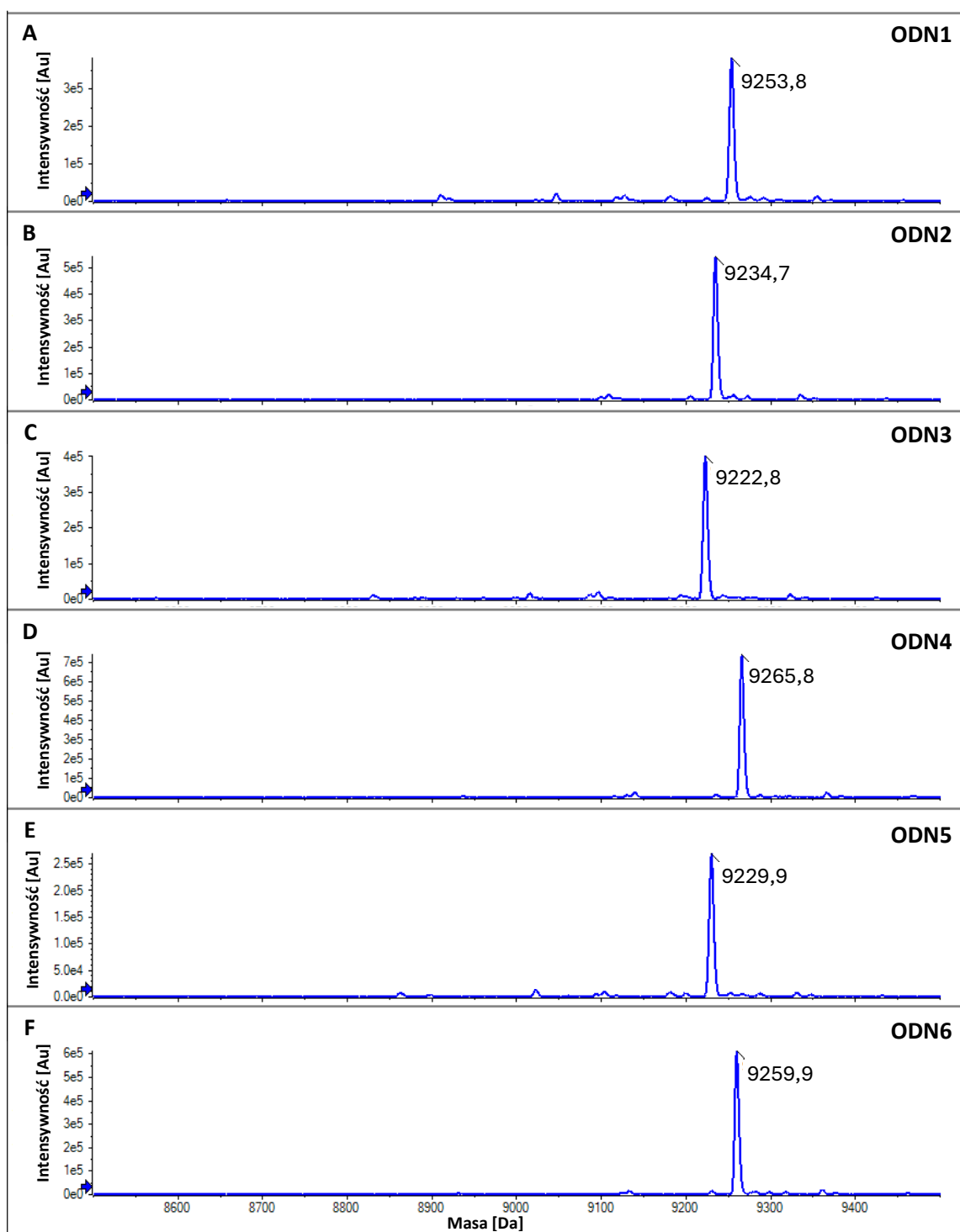
Rysunek 29. Chromatogramy wodnych roztworów ODN1: A – przed oczyszczaniem metodą DHPLC oraz B – po oczyszczaniu i liofilizacji. Przy czasie retencji 27,8 min wskazano sygnał odpowiadający fragmentowi DON1. Chromatogramy zarejestrowano przy 260 nm.

Rysunek 29 przedstawia reprezentatywne chromatogramy przed (A) i po oczyszczeniu (B) dla oligonukleotydu **ODN1**. Wszystkie modyfikowane oligonukleotydy cechowały się podobnym poziomem zanieczyszczeń w materiale wyjściowym. Czasy retencji poszczególnych oczyszczonych oligonukleotydów w warunkach denaturującej chromatografii cieczowej były następujące: **ODN1** – 27,8 min, **ODN2** – 24,7 min, **ODN3** – 26,7 min, **ODN4** – 25,0 min, **ODN5** – 27,5 min oraz **ODN6** – 24,3 min (w programie analizy DHPLC dla oczyszczania). Różnice te odzwierciedlają zarówno wpływ sekwencji zasad, jak i obecność modyfikacji w postaci BrSdU zwiększającej hydrofobowość cząsteczki.

Identyfikację oczyszczonych oligonukleotydów wykonano na podstawie analizy masowej sprzężonej z chromatografią par jonowych (TEA/HFIP). Zarejestrowane widma poddano dekonwolucji, a uzyskane wartości mas porównano z teoretycznymi masami molowymi obliczonymi na podstawie sekwencji nukleotydowej z uwzględnieniem modyfikacji (Rysunek 30 oraz Tabela 5). Otrzymane masy (w Da) były następujące: **ODN1** – 9253,8; **ODN2** – 9234,7; **ODN3** – 9222,8; **ODN4** – 9265,8; **ODN5** – 9229,9 oraz **ODN6** – 9259,9 i pozwoliły na identyfikację analizowanych nici. Zebrane frakcje poszczególnych ODN zamrożono, a następnie za pomocą suszenia sublimacyjnego usunięto rozpuszczalnik. Do wyznaczenia stężeń roztworów wykorzystano prawo Lamberta-Beera. W Tabeli 5 zestawiono dane obejmujące: masy molowe (teoretyczne i potwierdzone eksperymentalnie), współczynniki ekstynkcji oraz stężenia roztworów uzyskanych po liofilizacji.

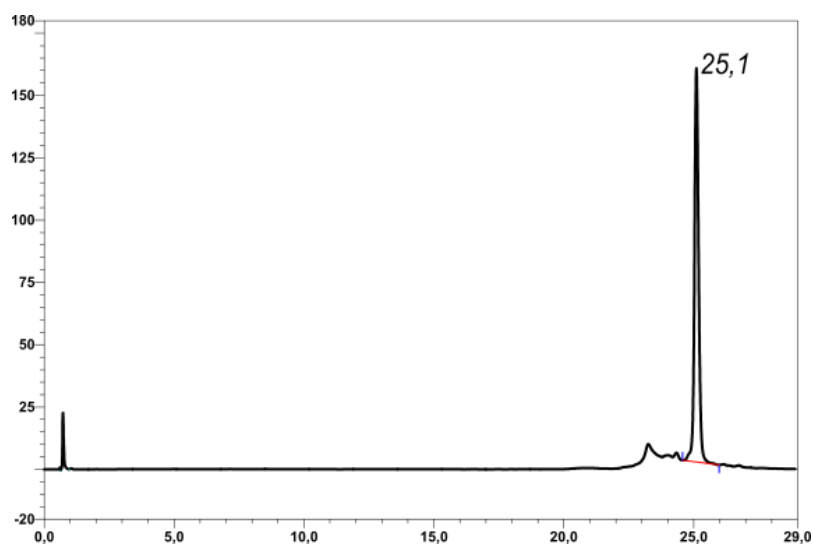
Tabela 5. Zestawienie teoretycznych (ATDBIO) i eksperymentalnych mas molowych, molowych współczynników ekstynkcji (ϵ) oraz stężeń roboczych dla poszczególnych oligonukleotydów znakowanych BrSdU i nici komplementarnych. Wartości ϵ obliczono metodą najbliższego sąsiada (ATDBIO), z uwzględnieniem korekty dla podstawienia BrSdU. Stężenia obliczono na podstawie pomiaru absorbancji przy 260 nm i zależności wynikającej z prawa Lamberta-Beera.

Nazwa	Masa eksperymentalna [Da]	Masa teoretyczna [Da]	ϵ [dm ³ /mol·cm]	Stężenie [μM]
ODN1	9253,8	9253,9	312400	26,39
ODN2	9234,7	9235	300800	138,98
ODN3	9222,8	9222,9	312400	43,50
ODN4	9265,8	9266,0	298600	109,51
ODN5	9229,9	9229,9	307400	86,71
ODN6	9259,9	9260,0	302400	169,13



Rysunek 30. Widma masowe po dekonwolucji zarejestrowane podczas analizy LC-MS dla: A – ODN1, B – ODN2, C – ODN3, D – ODN4, E – ODN5, F – ODN6. Widoczne sygnały odpowiadają wartościom mas molowych zgodnym z teoretycznymi masami wyznaczonymi na podstawie sekwencji nukleotydowych z uwzględnieniem modyfikacji BrSdU.

Dwuniciowe cząsteczki DNA (dsDNA) o długości 30 zasad otrzymano poprzez hybrydyzację komplementarnych oligonukleotydów w warunkach kontrolowanej inkubacji termicznej, która inicjowała rozplatanie nici w 90°C, a następnie utworzenie wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami podczas kontrolowanego schładzania dupleksu. Pozytywny przebieg hybrydyzacji potwierdzono w analizie HPLC dla **ODN1:ODN2** w temperaturze pokojowej, podczas której zarejestrowano jeden sygnał dla dupleksu (Rysunek 31).



Rysunek 31. Chromatogram roztworu ODN1:ODN2 po hybrydyzacji (Dionex Ultimate 3000 z detektorem DAD ustawionym na 260 nm, kolumna C18 (XBridge OST; 4,6×50 mm; 2,5 μm, 100 Å), program gradientowy: 25-80% fazy B (faza A: 100 mM TEAA, faza B: 100 mM TEAA, 20% ACN) w 40 min w 25°C przy przepływie 1 ml/min).

Dla każdego roztworu dsDNA wyznaczono molowe współczynniki ekstynkcji korzystając z metody opisanej dla pojedynczych oligonukleotydów (ATDBIO), które wynosiły odpowiednio: **ODN1:ODN2** – 485 500, **ODN3:ODN4** – 483 800 oraz **ODN5:ODN6** – 487 400 dm³/mol·cm. Stężenia końcowe roztworów w buforze fosforanowym dsDNA po oczyszczeniu dostosowano do 10 μM, na podstawie pomiarów absorbancji przy 260 nm i prawa Lamberta-Beera.

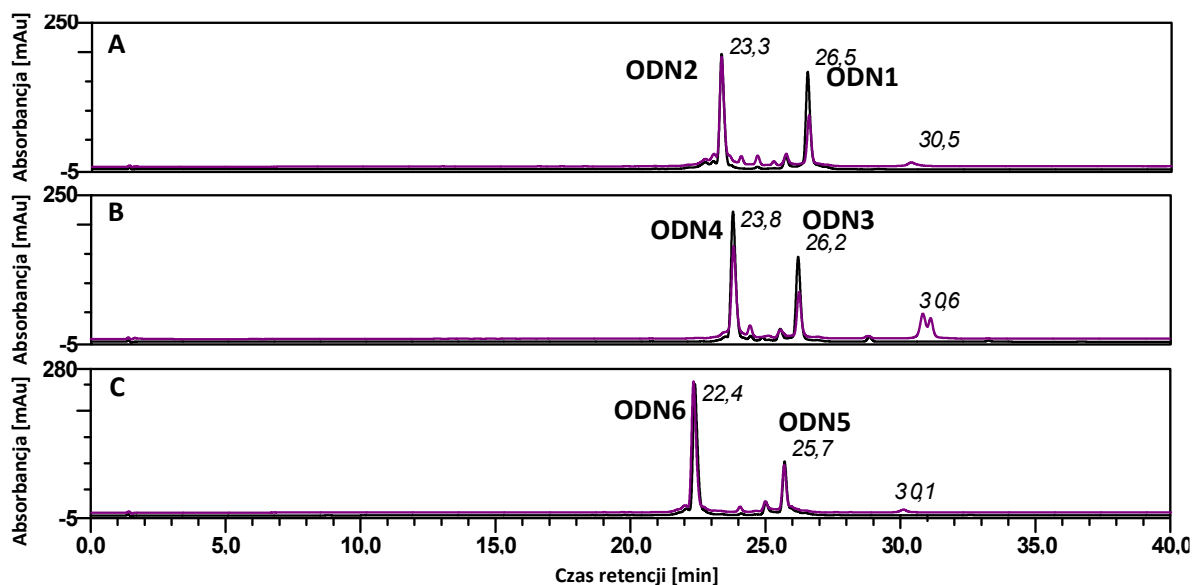
8.8.2 Właściwości fotochemiczne punktowo znakowanych 5-bromo-2'-deoksyurydyną modelowych fragmentów DNA

W celu zbadania reaktywności fotochemicznej dwuniciowych DNA punktowo znakowanych BrSdU w kontekście dalekozasięgowego transferu elektronu wykonano fotolizy stacjonarne buforowanych roztworów modelowych oligonukleotydów. Szczególną uwagę poświęcono roli lokalnego układu zasad w sąsiedztwie BrSdU, w tym obecności adeniny lub guaniny, które zgodnie z literaturą mogą warunkować zajście dalekozasięgowego transferu elektronu prowadzącego do powstawania pęknięć nici. Wyniki oraz efektywność fotolizy zostały zbadane poprzez:

- ocenę zaniku sygnału znakowanej oraz komplementarnej nici za pomocą chromatografii cieczowej oraz tworzenia fotoproduktów,
- wskazanie produktów fotoreakcji oraz ich identyfikację w analizach DHPLC i LC-MS,
- obliczenie wydajności kwantowej reakcji fotochemicznych dla poszczególnych dsDNA.

Dwuniciowe oligonukleotydy poddano fotolizie stacjonarnej w komorze z wykorzystaniem lamp emitujących promieniowanie z zakresu UVA. Roztwory (15 μ M) znakowanego DNA w 10 mM buforze fosforanowym naświetlano dawką UVA wynoszącą 90 kJ/m². Wskazana dawka została wybrana jako optymalna dla powstawania fotoproduktów podczas fotolizy badanych sekwencji. W celu ilościowej oceny fotochemicznej reaktywności modyfikowanego DNA przeprowadzono analizę próbek przed (próbki nienaświetlone, NN) i po naświetleniu z użyciem denaturującej chromatografii cieczowej. Analizie poddano trzy pary dwuniciowych oligonukleotydów: **ODN1:ODN2**, **ODN3:ODN4** oraz **ODN5:ODN6**, dla których porównano pola powierzchni sygnałów odpowiadających nici znakowanej, nici komplementarnej oraz potencjalnemu produktowi sieciowania (Rysunek 32 i Tabela 6). Fotoliza duplexu **ODN1:ODN2** prowadzi do znaczącego zaniku sygnału znakowanej nici DNA – średnio o 58,14±1,68% w porównaniu do kontroli NN. Zanik sygnału nici komplementarnej wynosił 15,93±0,51%, w porównaniu do próbki nienaświetlonej. Na chromatogramie dla próbki po traktowaniu UVA można zaobserwować nowy sygnał o czasie retencji 30,5 min, którego pole powierzchni wynosi średnio 2,381±0,06 mAU·min. Sygnał ten nie występuje w próbce kontrolnej, co wskazuje

na powstawanie produktu lub produktów o bardziej rozbudowanej strukturze niż dsDNA – najprawdopodobniej produktów sieciowania (Rysunek 32A). W przypadku **ODN3:ODN4** zaobserwowano zanik sygnału nici znakowanej o $45,19 \pm 6,27\%$, a nici komplementarnej o $19,30 \pm 1,71\%$ – w porównaniu do analizy próbki nienaświetlonej. Średnie pole powierzchni dla sygnału fotoproduktu wynosi $15,119 \pm 2,14 \text{ mAU} \cdot \text{min}$ i jest ponad 6-krotnie większe od fotoproduktu fotolizy **ODN1:ODN2**. Chociaż zanik nici znakowanej jest niższy, znacznie intensywniejszy sygnał dla produktu sieciowania sugeruje, że w tym układzie zachodzi wydajniejsza reakcja sieciowania, być może o odmiennym przebiegu mechanistycznym (Rysunek 32B). Dodatkowo zanik nici komplementarnej jest znaczący, co może świadczyć o powstawaniu również produktów sieciowania międzyniciowego. Para **ODN5:ODN6**, w której modyfikowana dU sąsiaduje z dwiema guaninami, wykazała najniższy poziom reaktywności. Zanik sygnału znakowanej nici wyniósł $9,62 \pm 1,83\%$, a dla nici komplementarnej tylko $1,51 \pm 3,28\%$. Na chromatogramie produkt sieciowania jest widoczny, ale wykazuje bardzo niską intensywność – średnie pole powierzchni piku o czasie retencji 30,1 min to $1,466 \pm 0,02 \text{ mAU} \cdot \text{min}$ (Rysunek 32C). Dodatkowo, zarejestrowane sygnały pośrednie między nicią komplementarną i znakowaną we wszystkich analizach mogą pochodzić od częściowo zdegradowanych substratów, w których promieniowanie może prowadzić do zmian strukturalnych np. wymiany bromu na atom wodoru.



Rysunek 32. Chromatogramy DHPLC zarejestrowane dla dsDNA przed (czarne linie) i po fotolizie (90 kJ/m^2 UVA; fioletowe linie) dla roztworów: A – ODN1:ODN2, B – ODN3:ODN4, C – ODN5:ODN6.

Analiza DHPLC jednoznacznie wykazała, że reaktywność fotochemiczna znakowanych BrSdU fragmentów DNA jest zależna od lokalnej sekwencji. Choć największy zanik modyfikowanej nici występuje w próbce **ODN1:ODN2**, to największe pole powierzchni odpowiadające produktowi sieciowania zarejestrowano dla **ODN3:ODN4**. Układ **ODN5:ODN6** jest fotochemicznie najmniej aktywny. Obserwowane wyniki nie są zgodne z mechanizmem dalekozasięgowego transferu elektronu, ponieważ dla żadnej z badanych sekwencji nie zaobserwowano tworzenia fotoindukowanych pęknięć nici DNA (brak charakterystycznych sygnałów o krótszych czasach retencji).

Tabela 6. Zestawienie pól powierzchni sygnałów dla nici komplementarnej, nici znakowanej BrSdU oraz fotoproduktów zarejestrowanych podczas analiz chromatograficznych przed i po fotolizie dupleksów ODN1:ODN2, ODN3:ODN4 i ODN5:ODN6. Dla każdej próbki przedstawiono średnie wartości pola powierzchni sygnału, odchylenie standardowe oraz procentowy zanik intensywności sygnałów nici DNA.

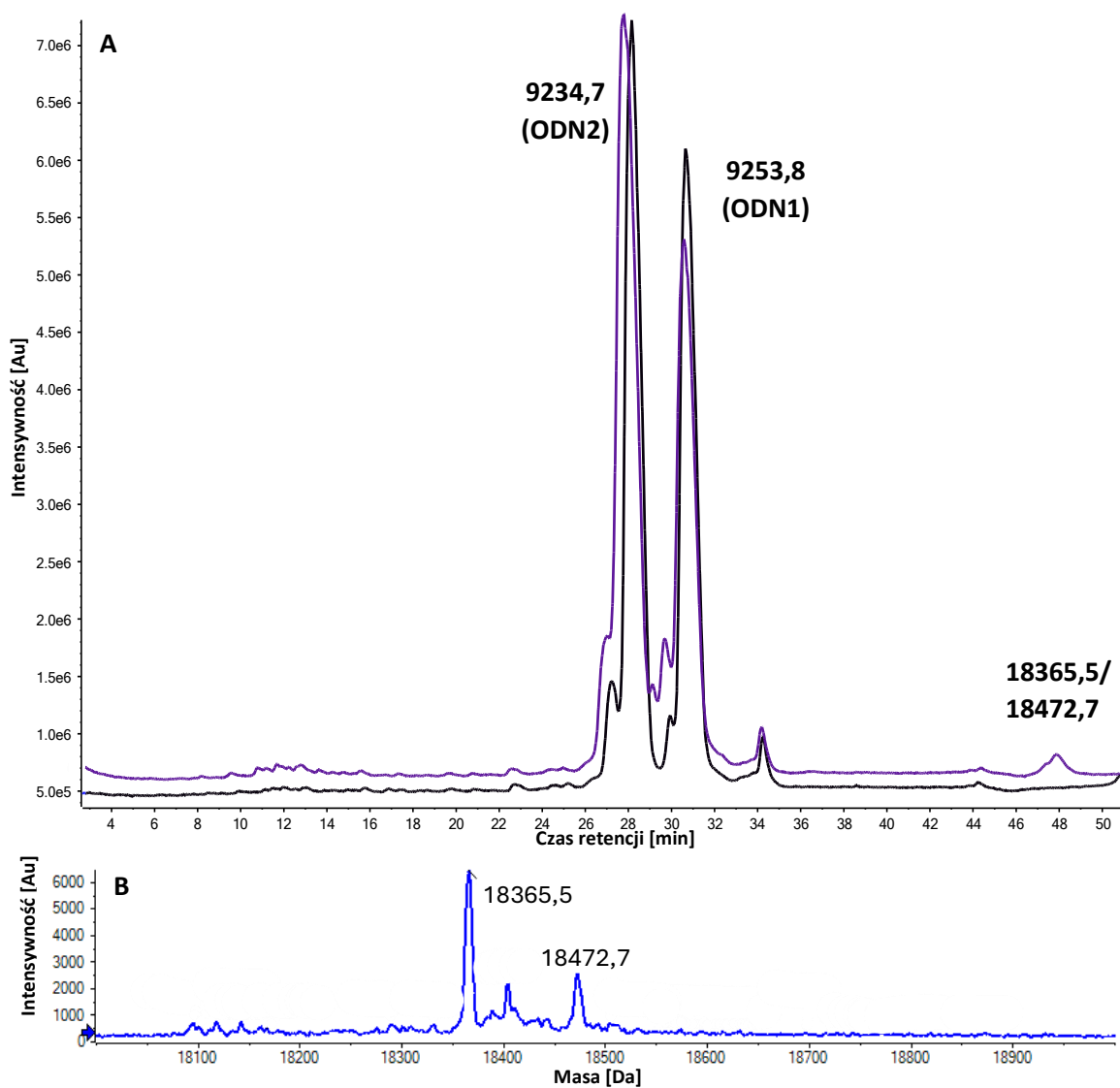
	Model DNA	Nić komplementarna	Nić znakowana	Fotoprodukt
ODN1:ODN2	NN [mAU·min]	38,131	37,091	-
	90 kJ/m ² [mAU·min]	32,055 ± 0,19	15,526 ± 0,62	2,381 ± 0,06
	% Zaniku	15,93 ± 0,51%	58,14 ± 1,68%	-
ODN3:ODN4	NN [mAU·min]	43,025	30,031	-
	90 kJ/m ² [mAU·min]	34,721 ± 0,73	16,460 ± 1,88	15,119 ± 2,14
	% Zaniku	19,30 ± 1,71%	45,19 ± 6,27%	-
ODN5:ODN6	NN [mAU·min]	49,022	18,347	-
	90 kJ/m ² [mAU·min]	48,279 ± 1,61	16,582 ± 0,34	1,466 ± 0,02
	% Zaniku	1,51 ± 3,28%	9,62 ± 1,83%	-

W celu identyfikacji produktów powstających podczas stacjonarnej fotolizy dwuniciowego DNA punktowo znakowanego BrSdU, przeprowadzono analizę LC-MS. Analizie poddano próbki trzech dupleksów: **ODN1:ODN2**, **ODN3:ODN4** oraz

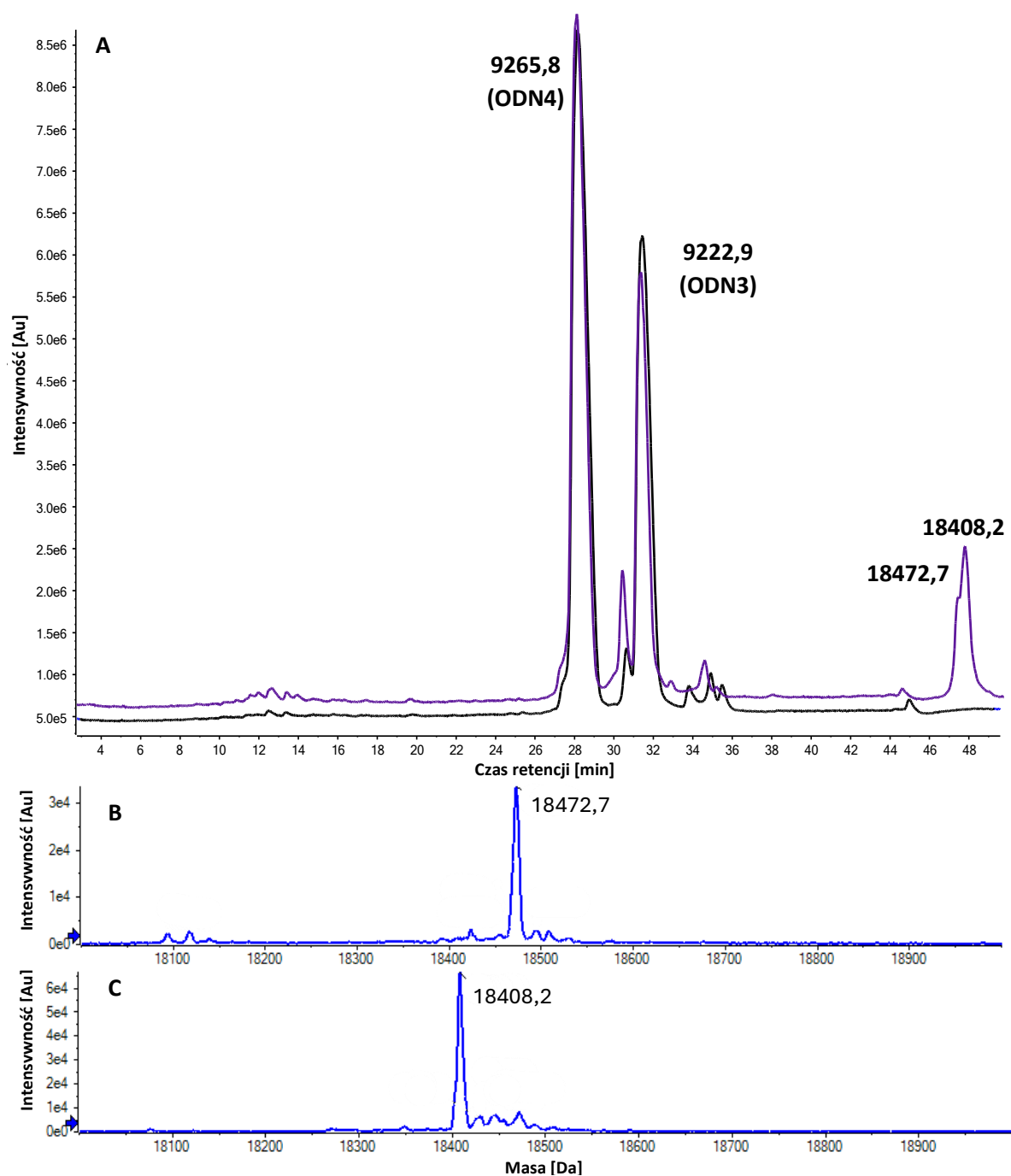
ODN5:ODN6, zarówno przed fotolizą (NN), jak i po ekspozycji na promieniowanie UVA (90 kJ/m²). Poszczególne masy sygnałów zarejestrowanych na chromatogramach prądu jonowego (TIC, *Total Ion Chromatogram*) poddano dekonwolucji, co pozwoliło na precyzyjne określenie mas molowych analitów.

W próbce kontrolnej dupleksu **ODN1:ODN2** (Rysunek 33) zarejestrowano sygnały odpowiadające obu pojedynczym niciom DNA. Po fotolizie pojawiają się dodatkowe sygnały o masach 18365,5 oraz 18472,7 Da. W porównaniu do masy nienaświetlonego dsDNA wynoszącej 18488,9 Da, masy fotoproduktów są niższe o 123,4 oraz 16,2 Da i wskazują na eliminację fragmentów nici znakowanej lub komplementarnej. Dwuniciowy oligonukleotyd **ODN2:ODN3** (Rysunek 34) to zdecydowanie najbardziej wrażliwy fotochemicznie dupleks spośród badanych układów. W próbce NN widoczne są dwa dominujące sygnały odpowiadające pojedynczym niciom dsDNA. Po naświetleniu można zaobserwować nowe sygnały o masach 18408,2 oraz 18472,7 Da. Podobnie jak w przypadku **ODN1:ODN2**, masy te są nieco niższe niż masa dupleksu (18488,9 Da), co potwierdza powstawanie produktów reakcji sieciowania. Obliczone różnice mas wynoszą dokładnie 80,7 16,2 Da. Masa 80,7 Da wyraźnie wskazuje zajście procesu fotodehalogenacji z odejściem cząsteczki HBr. Para **ODN5:ODN6** (Rysunek 35) wykazuje niewielką podatność na fotodegradację. Widma przed fotolizą pokazują dobrze rozdzielone sygnały dla obu nici. Po fotolizie pojawiają się śladowe sygnały o masach 18467,7 oraz 18473,2 Da. W porównaniu do naświetlanego dupleksu o masie 18489,9 Da, różnice wynoszą 22,2 oraz 16,7 Da. Tutaj można podejrzewać tworzenie sieciowania wewnątrznicowego z jednoczesnym odejściem fragmentów o niewielkiej masie, jednak niska intensywność sygnałów fotoproduktów potwierdza bardzo ograniczoną fotoreaktywność układu.

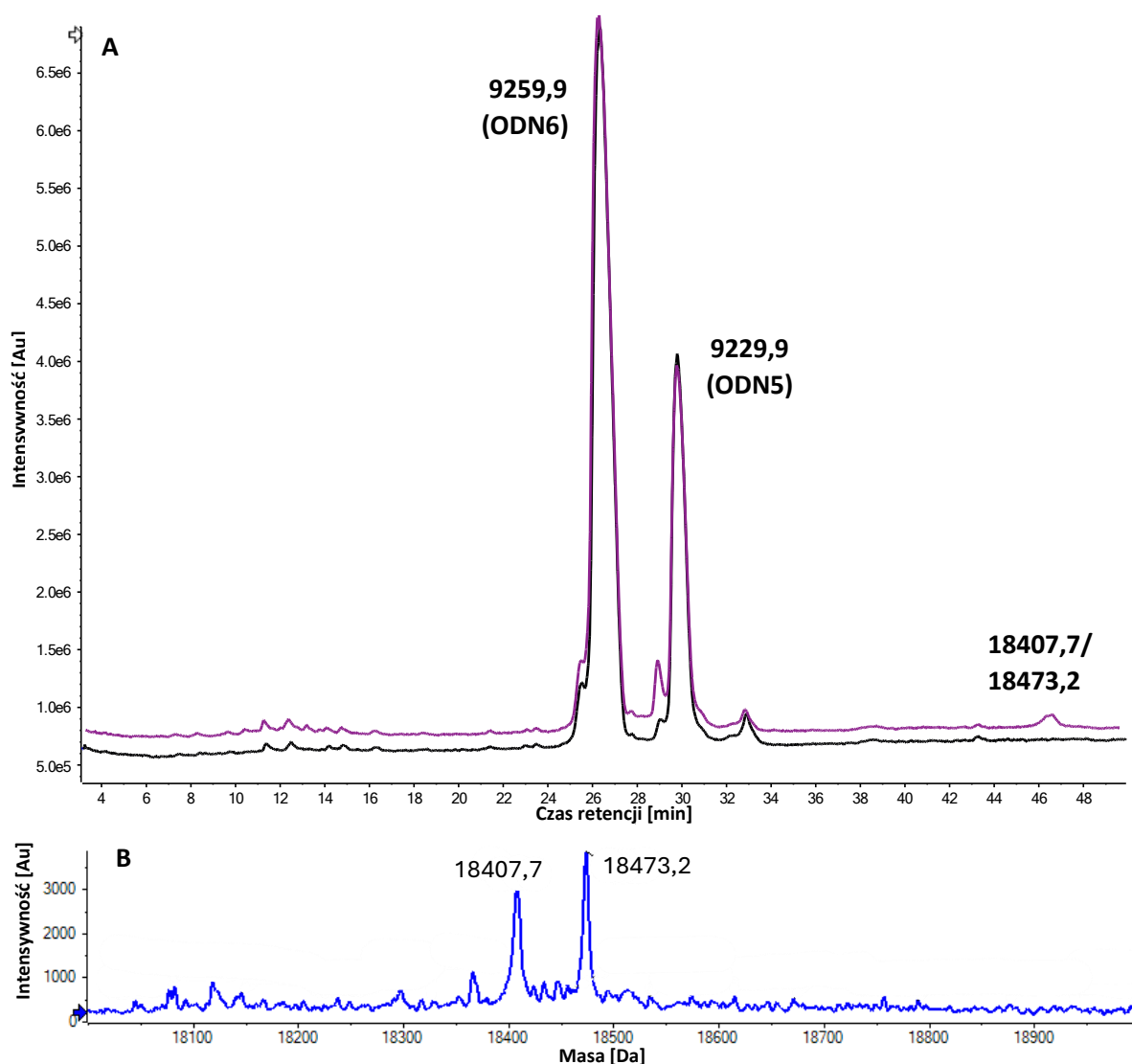
Analiza LC-MS dostarczyła bezpośrednich dowodów na powstawanie trwałych produktów sieciowania nici DNA w wyniku fotolizy dupleksów zawierających BrSdU. Obecność fotoproduktów o masach niewiele niższych od dsDNA sugeruje powstawanie kowalencyjnych dimerów na drodze fotodehalogenacji BrSdU lub eliminacji innych fragmentów. Najbardziej intensywne sygnały dla produktów sieciowania zaobserwowano w układach **ODN1:ODN2** i **ODN3:ODN4**, natomiast w przypadku **ODN5:ODN6** fotoprodukty obserwowano w śladowych ilościach. Uzyskane wyniki wskazują, że dominującym następstwem fotolizy badanych układów dsDNA nie są pęknięcia nici, lecz tworzenie kowalencyjnych wiązań – najprawdopodobniej międzyniciowych.



Rysunek 33. Wynik analizy LC-MS dla roztworów ODN1:ODN2: A – chromatogram TIC przed (czarna linia) i po (fioletowa linia) naświetleniu UVA (90 kJ/m^2). Wskazano sygnały odpowiadające pojedynczym niciom: ODN1 (9253,8 Da) i ODN2 (9234,7 Da) oraz powstającym fotoproduktom (18365,5/18472,7 Da); B – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktów.



Rysunek 34. Wynik analizy LC-MS dla roztworów ODN3:ODN4: A – chromatogram TIC przed (czarna linia) i po (fioletowa linia) naświetleniu UVA (90 kJ/m^2). Wskazano sygnały odpowiadające pojedynczym niciom: ODN3 (9222,9 Da) i ODN2 (9265,8 Da) oraz powstającym fotoproduktom (18408,2/18472,7 Da); B – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktu o masie 18472,7 Da oraz C – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktu o masie 18408,2 Da.



Rysunek 35. Wynik analizy LC-MS dla roztworów ODN5:ODN6: A – chromatogram TIC przed (czarna linia) i po (fioletowa linia) naświetleniu UVA (90 kJ/m^2). Wskazano sygnały odpowiadające pojedynczym niciom: ODN5 (9229,9 Da) i ODN6 (9259,9 Da) oraz powstającym fotoproduktom (18407,7/18473,2 Da); B – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktów.

Na chromatogramach fotolitów trzech różnych modeli dsDNA zawierających modyfikację BrSdU nie zaobserwowano żadnych sygnałów odpowiadających fragmentom o niższej masie niż poszczególne nici – znakowana i komplementarna. Dla żadnej z badanych sekwencji – bardziej i mniej podatnych na ET nie zaobserwowano fragmentów oligonukleotydów wskazujących na pęknięcia jednoniciowe. Wyniki analiz DHPLC oraz LC-MS jednoznacznie wskazują na tworzenie trwałych produktów sieciowania. Jednym z możliwych wyjaśnień braku ET w przypadku znakowanego dsDNA jest obecność atomu

siarki, który zmienia rozkład elektronowy stanu wzbudzonego BrSdU w porównaniu do BrdU. Tworzenie kowalencyjnych połączeń może być też reakcją konkurencyjną i zachodzić szybciej niż transfer elektronu między zasadami DNA.

8.8.3 Wydajność kwantowa reakcji fotochemicznych dla modyfikowanych dupleksów

W celu oceny efektywności fotolizy w badanych modelach DNA punktowo znakowanych BrSdU obliczono wydajność kwantową (Φ) procesu na podstawie wyników fotolizy roztworów, prowadzonej przy użyciu promieniowania monochromatycznego o długości fali 350 nm w dawce 25 kJ/m². Obliczenia wydajności kwantowej procesu fotolizy oparto na zaniku nici znakowanej wyznaczonym jako pole powierzchni sygnału chromatograficznego podczas analiz DHPLC fotolitów (Tabela 7).

Wartości wydajności kwantowej procesu fotolizy wyznaczone dla trzech badanych układów mieszczą się w zakresie od 1×10^{-5} do $6,5 \times 10^{-5}$. Najwyższą wartość wydajności zaobserwowano dla układu **ODN1:ODN2** wynoszącą $6,21 \times 10^{-5}$, natomiast najniższą wydajność rzędu $1,28 \times 10^{-5}$ dla układu **ODN5:ODN6**. Model **ODN3:ODN4** wykazywał się pośrednią wydajnością fotochemiczną, której wartość wynosiła $3,56 \times 10^{-5}$. Zaobserwowane różnice w wartościach Φ mogą być konsekwencją lokalnego otoczenia modyfikowanej urydyny (BrSdU) w helikalnej strukturze DNA.

Tabela 7. Zestawienie procentowego zaniku intensywności sygnału nici znakowanej BrSdU zarejestrowanego podczas analiz chromatograficznych przed i po fotolizie (25 kJ/m²; 350 nm) dupleksów ODN1:ODN2, ODN3:ODN4 i ODN5:ODN6. Dla każdego modelu DNA obliczono wydajność kwantową procesu fotolizy (Φ).

Model DNA		Niść znakowana
ODN1:ODN2	% Zaniku	$15,15 \pm 4,99\%$
	Φ	$6,21 \times 10^{-5}$
ODN3:ODN4	% Zaniku	$8,67 \pm 5,28\%$
	Φ	$3,56 \times 10^{-5}$
ODN5:ODN6	% Zaniku	$3,11 \pm 1,50\%$
	Φ	$1,28 \times 10^{-5}$

8.8.4 Trawienie enzymatyczne fotoproduktów w celu identyfikacji uszkodzeń DNA

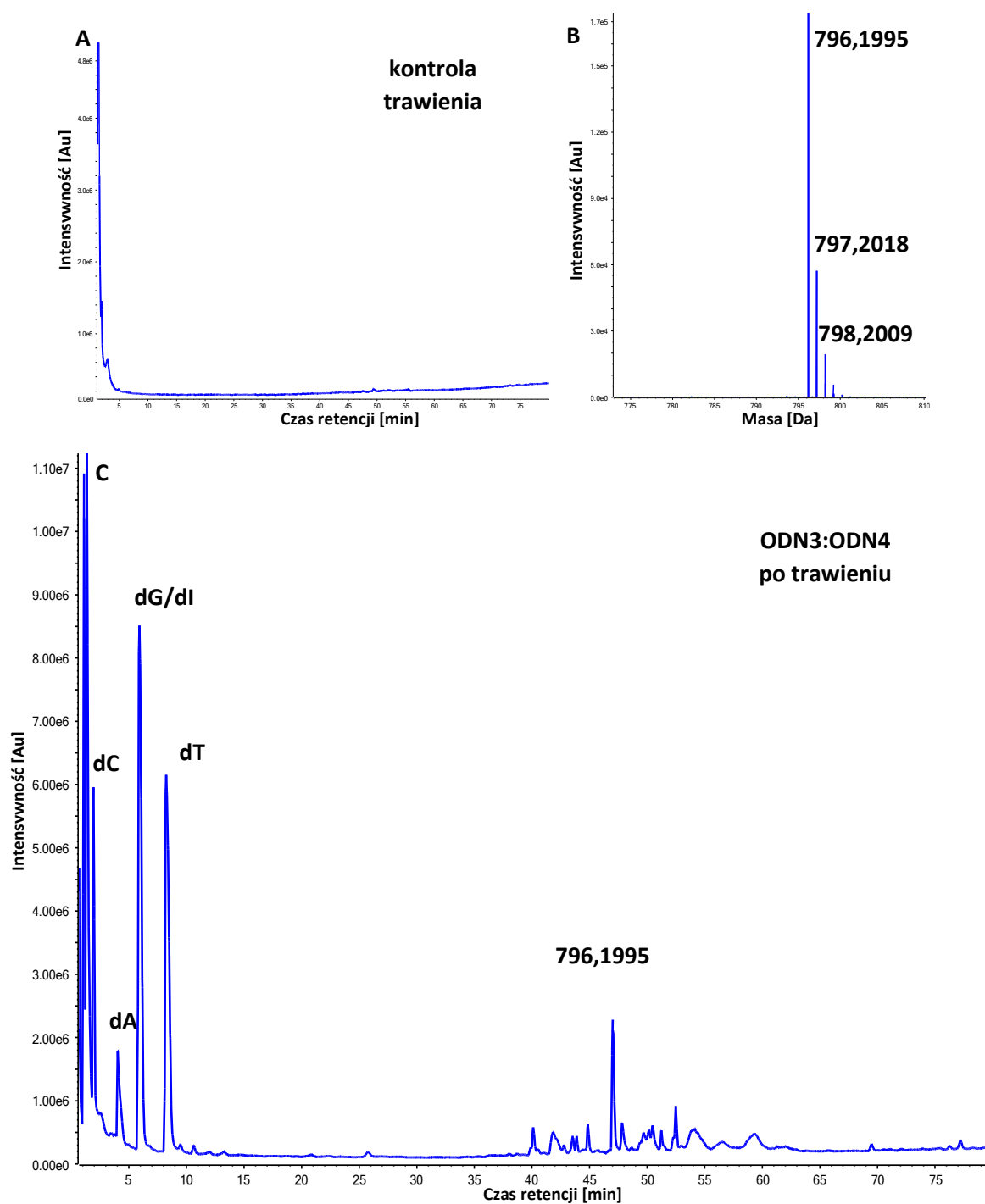
W przeprowadzonych badaniach nad fotochemicznymi właściwościami dwuniciowego DNA znakowanego BrSdU wykazano, że niektóre z testowanych sekwencji, a w szczególności układ **ODN3:ODN4**, prowadzą do efektywnego powstawania trwałych fotoproduktów. Analizy DHPLC oraz LC-MS po naświetlaniu wykazały, że w przypadku tej pary oligonukleotydów pojawiają się nowe, intensywniejsze sygnały o dłuższym czasie retencji i większej masie niż masa dupleksu. Brak obserwacji krótszych fragmentów biopolimeru, które mogłyby odpowiadać pękniętej nici pokazuje, że proces fotolizy nie prowadzi do degradacji łańcucha DNA w procesie ET, lecz do tworzenia fotoproduktów z wiązaniami sieciującymi między zasadami nukleotydów. Dupleks **ODN3:ODN4** wybrano jako modelowy do dalszych badań nad identyfikacją fotouszkodzenia. Frakcję zawierającą dominujące fotoprodukty wyizolowano metodą DHPLC i poddano suszeniu sublimacyjnemu. Przeprowadzono enzymatyczne trawienie otrzymanej próbki. Następnie uzyskane produkty analizowano metodami DHPLC oraz LC-MS w celu identyfikacji zarówno natywnych nukleozydów, jak i nowych cząsteczek o wyższych masach odpowiadających potencjalnym produktom fotolizy.

Reakcję trawienia przeprowadzono z użyciem enzymów podczas kilkustopniowej inkubacji ze związkiem. Enzymy nukleaza P1 oraz fosfodiesteraza II odpowiadały za hydrolizę wiązań fosfodiestrowych. Fosfataza alkaliczna, to enzym, dzięki któremu usunięte zostały reszty fosforanowe z wolnych końców 5'. Kolejna nukleaza – deoksyrybonukleaza I hydrolizowała wiązania fosfodiestrowe dsDNA do krótkich oligonukleotydów lub nukleotydów z grupą fosforanową przy końcu 5'. Bakteryjna alkaliczna fosfataza katalizowała usuwanie reszt fosforanowych, a fosfodiesteraza I odpowiadała za hydrolizę wiązań fosfodiestrowych od końca 3'. Poszczególne inkubacje prowadzono w odpowiednich buforach (zawierających m.in. octan sodu, octan cynku, a także jony magnezu i wapnia), każdorazowo w temperaturze 37 °C, przez 1-2 godziny.¹²⁸

W przypadku natywnego DNA trawienie enzymatyczne prowadzi do uwolnienia nukleozydów: 2'-deoksyadenozyny (dA), 2'-deoksycytydyny (dC), 2'-deoksyguanozyny (dG), 2'-deoksytymidyny (dT) oraz 2'-deoksyinozyny (dI). Ten ostatni jest wynikiem aktywności stosowanej w trawieniu fosfodiesterazy II, która nieodwracalnie deaminuje dA przekształcając ją w dI.¹⁵² 2'-Deoksyinozyna w chromatografii cieczowej współeluuje z 2'-deoksyguanozyną.

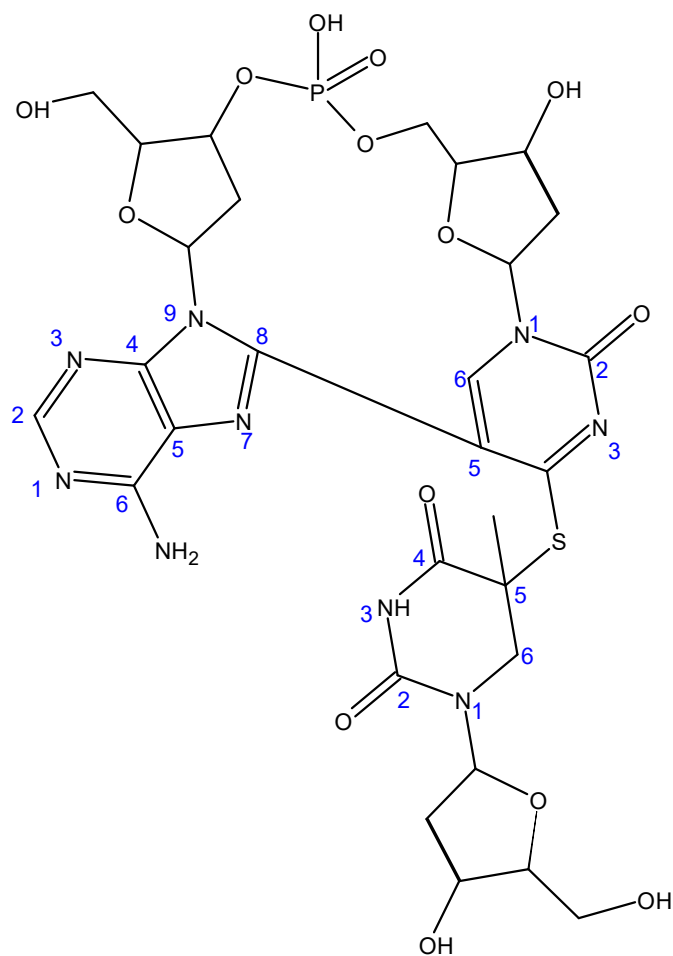
Analiza LC-MS roztworu fotoproduktu dupleksu **ODN3:ODN4** po enzymatycznym trawieniu pozwoliła na ocenę składu hydrolizatu. W celu kontroli jakości trawienia enzymatycznego oraz wykluczenia produktów z medium reakcyjnego, przeprowadzono równoległe trawienie próbki kontrolnej zawierającej wodę zamiast wyizolowanego fotoproduktu. Zarejestrowany chromatogram TIC dla kontroli (Rysunek 36A) pokazuje sygnały o krótkim czasie retencji, które odpowiadają składnikom buforu reakcyjnego. Chromatogram prądu jonowego dla właściwej próbki (Rysunek 36C) wskazuje na obecność w materiale potrawiennym zarówno natywnych nukleozydów, jak i szeregu molekuł eluujących przy dłuższych czasach retencji. Zarejestrowane widma masowe dla sygnałów do 12 minuty na chromatogramie wskazały na powstawanie: 2'-deoksyadenozyny ($[M-H]^-_{\text{eksper}}=250,1051$; $[M-H]^-_{\text{teoret}}=250,0946$), 2'-deoksycytydiny ($[M-H]^-_{\text{eksper}}=226,0950$; $[M-H]^-_{\text{teoret}}=226,0833$), 2'-deoksyguanozyny ($[M-H]^-_{\text{eksper}}=266,1006$; $[M-H]^-_{\text{teoret}}=266,0895$) lub inozyny ($[M-H]^-_{\text{eksper}}=250,1051$; $[M-H]^-_{\text{teoret}}=250,0786$) i tymidyny ($[M-H]^-_{\text{eksper}}=241,0946$; $[M-H]^-_{\text{teoret}}=241,0830$). Potwierdzenie obecności nukleozydów świadczy o skuteczności działania enzymów trawiących DNA i potwierdza, że część materiału uległa całkowitemu strawieniu.

Podczas analizy LC-MS zarejestrowano też sygnały, których masy nie odpowiadają znanym cząsteczkom budulcowym DNA i nie występują w próbkach kontrolnych. Obserwowane masy pseudomolekularne w granicach od 480 do 860 Da przekraczają wartości mas charakterystycznych dla pojedynczych nukleozydów, co wskazuje na obecność diemrów lub trimerów nukleotydowych – prawdopodobnie powiązanych trwale wiązaniami kowalencyjnymi (Rysunek 38C). Powstające sieciowania są niespecyficzne dla wykorzystanych w procedurze trawienia enzymów. Na chromatogramie prądu jonowego szczególnie wyraźny jest sygnał o m/z równym 796,1995. Rozkład izotopowy zarejestrowany na widmie masowym wyklucza obecność atomu bromu (brak charakterystycznych różnic mas o 2 Da) wskazując na zajście procesu dehalogenacji. Rozkład izotopowy wskazuje na obecność atomu siarki w strukturze (Rysunek 38B).



Rysunek 36. Wyniki trawienia enzymatycznego wyizolowanego produktu fotolizy ODN3:ODN4: A – chromatogram prądu jonowego dla próbki kontrolnej po trawieniu; B – powiększony fragment widma masowego fotoproduktu o m/z równym 796,1995; C – chromatogram prądu jonowego dla fotoproduktu duplexu ODN3:ODN4 po trawieniu enzymatycznym. Na rysunku C wskazano sygnały odpowiadające natywnym nukleozydom.

Mając na uwadze ułożenie przestrzenne zasad nukleinowych w helisie, którą tworzy dupleks **ODN3:ODN4** oraz otoczenie modyfikowanej zasady, najbardziej prawdopodobnym fotoproduktem, którego masa pseudomolekularna wynosi 796,1995 Da jest addukt składający się z SdU, tymidyny i adenozyiny (SdU-dA-dT; Rysunek 37). Taka struktura może powstawać w wyniku fotochemicznego sieciowania prowadzącego do utworzenia kowalencyjnych wiązań między tymi trzema zasadami. Wcześniejsze wyniki analiz LC-MS dla dupleksu **ODN3:ODN4** przed i po fotolizie wskazały, że różnica mas między dominującym fotoproduktem a cząsteczką **ODN3:ODN4** wynosi 80,7 Da i odpowiada masie cząsteczki HBr. Przedstawiona na rysunku 37 struktura adduktu SdU-dA-dT stanowi propozycję opartą na zbieżności wyników spektrometrii mas dla strawionego fragmentu jak i całego dupleksu po fotolizie, braku charakterystycznego dla bromu izotopowego rozkładu widma masowego adduktu oraz wyników fotolizy stacjonarnej dla nukleozydu BrSdU (rozdział 4.1.1). Po absorpcji promieniowania przez nukleotyd BrSdU w dupleksie DNA następuje jego wzbudzenie prowadzące do rozerwania wiązania C5-Br z utworzeniem rodnika urydylowego. Prawdopodobnym miejscem ataku utworzonego rodnika jest pozycja C8 lub N7 pierścienia purynowego sąsiadującej adenozyiny w tej samej nici. W przypadku utworzenia wiązania między atomem węgla 2'-deoksyurydyny w pozycji C5 i adeniny C8 może dojść do oderwania atomu wodoru, a więc sumarycznie do eliminacji cząsteczki HBr. Z kolei wzbudzenie zlokalizowane na wiązaniu C4=S. może prowadzić do reakcji tymidyną nici komplementarnej. Potencjalnymi reaktywnymi miejscami w adeninie są pozycje C5 oraz C6 w pierścieniu pirymidynowym. Dokładne określenie struktury oraz konfiguracji przestrzennej tego fotoproduktu wymaga dalszych analiz. Nie można też wykluczyć innych struktur o tej samej masie, np. adduktów powstałych z udziałem innych zasad lub udziału reszt cukrowych w tworzeniu wiązań. Zaproponowaną strukturę należy traktować jako modelową, reprezentującą dominujący fotoprodukt dupleksu **ODN3:ODN4**, którą najlepiej tłumaczą zarejestrowane wyniki.



Rysunek 37. Proponowana struktura fotoproduktu powstającego w wyniku fotolizy DNA znakowanego BrSdU. Produkt stanowi addukt (trimer), w którym SdU tworzy kowalencyjne połączenia z adeniną z tej samej nici (wiąźanie C5–C8) oraz z tymidyną z nici komplementarnej (wiąźanie C6–C5). Strukturę przedstawiono z numeracją atomów dla zasad azotowych i należy ją traktować jako schematyczną (brak optymalizacji geometrycznej struktury, w celu przejrzystej prezentacji).

8.8.5 Dyskusja wyników

W niniejszym rozdziale opisano badania nad fotochemicznymi właściwościami oligonukleotydów punktowo znakowanych 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyną. Analizie poddano trzy różne sekwencje dsDNA różniące się podatnością na dalekozasięgowy transfer elektronu. Modyfikowane biomolekuły naświetlono promieniowaniem UVA, a następnie zbadano powstające fotoprodukty z wykorzystaniem denaturującej wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. W celu identyfikacji powstałych uszkodzeń struktury DNA, wyizolowane fotoprodukty poddano trawieniu enzymatycznemu.

Wyniki przeprowadzonej fotolizy DNA zawierających modyfikację BrSdU wskazują na nietypowy przebieg reakcji fotochemicznej, w porównaniu z klasycznymi halogenowanymi pochodnymi urydyny, takimi jak BrdU, która pod wpływem promieniowania UVA indukuje transfer elektronu z odległej guaniny, co prowadzi do pęknięć nici DNA. Po naświetleniu nie zaobserwowano fragmentów DNA krótszych niż wyjściowe oligonukleotydy. Oznacza to, że proces pęknięcia nici charakterystyczny dla mechanizmu ET nie zachodzi efektywnie w badanych układach. Westphal wraz z współautorami opisują badania nad fotochemią znakowanych BrdU kwasów nukleinowych, w których otoczenie modyfikowanej zasady było identyczne, jak dla modelu **ODN3:ODN4**. Wyniki autorów pracy wykazały, że BrdU w sekwencji 5'-AGC AAU^{BrSdU}AAC-3' może inicjować ET prowadzący do przerwania modyfikowanej nici DNA z utworzeniem fragmentów o długości 14 oraz 15 zasad.¹⁵¹ Dla dsDNA **ODN1:ODN2** o sekwencji uznawanej za „hot-spot” dla dalekozasięgowego transferu elektronu (5'-GAAU^{BrSdU}T-3') również nie zaobserwowano fotoindukowanego przerwania nici znakowanej. Watanabe i współautorzy w swoich badaniach niejednokrotnie wskazywali SSB jako produkt fotolizy oligonukleotydów modyfikowanych BrdU czy IdU, przy zachowaniu tego schematu sekwencji.^{120,125}

Brak reakcji degradacyjnych tworzenia SSB może świadczyć o istotnym wpływie atomu siarki, obecnego w pozycji C4 pierścienia pirymidynowego BrSdU, na jego fotofizyczne i fotochemiczne właściwości. Atom siarki jako ciężki heteroatom może promować przejścia między stanami singletowymi i trypletowymi, co dodatkowo wpływa na kierunek dalszych przemian fotochemicznych. W celu wyjaśnienia braku ET dla badanych modeli DNA uzasadnione byłoby przeprowadzenie porównawczych obliczeń kwantowo-chemicznych w stanie wzbudzonym dla modeli BrSdU i BrdU w kontekście ich oddziaływań z sąsiednimi

zasadami w DNA. Porównanie rozmieszczenia orbitali HOMO i LUMO, ich energii oraz lokalizacji przestrzennej mogłoby wyjaśnić, dlaczego BrSdU nie inicjuje dalekozasięgowego transferu elektronu prowadzącego do pęknięć nici, mimo że z chemicznego punktu widzenia zawiera ten sam halogen, który w BrdU odpowiada za dehalogenację i dalsze reakcje rodnikowe. W szczególności należałoby zwrócić uwagę na wpływ obecności atomu siarki na fotoreaktywność 2'-deoksyurydyny, zwłaszcza w odniesieniu do możliwych szlaków reakcji rodnikowych i zachowania stanów wzbudzonych.

Zarówno analiza HPLC, jak i wysokorozdzielcza spektrometria mas dostarczyły jednoznacznych dowodów na powstawanie stabilnych produktów fotoreakcji o wyższej masie cząsteczkowej niż wyjściowe dwuniciowe oligonukleotydy. Obserwowane przesunięcia czasów retencji na chromatogramach oraz zarejestrowane masy potwierdzają, że fotoliza BrSdU w strukturze DNA nie prowadzi do degradacji nici, lecz do ich kowalencyjnego połączenia. Masy zarejestrowane po naświetleniu wszystkich modeli dsDNA były niższe od odpowiadających im wyjściowych dupleksów, co wskazuje na powstanie produktów sieciowania. Fotoprodukty tego typu powstawały najwydajniej dla pary **ODN3:ODN4** a najmniej wydajnie dla **ODN5:ODN6**. Trawienie enzymatyczne przeprowadzone dla produktu sieciowania po fotolizie **ODN3:ODN4** pozwoliło na zaproponowanie jednego z możliwych połączeń kowalencyjnych między trzema zasadami. Taki addukt może powstawać w wyniku fotochemicznej dehalogenacji BrSdU i addycji do atomu C8 adeniny (sieciowanie wewnątrznicowe), a następnie utworzenia wiązania z tymidyną z nici komplementarnej (sieciowanie międzynicowe). Reakcje sieciowania w DNA zawierającym tiomodyfikację zasad są znane.^{74,86,92} Brem i współautorzy wykazali, że DNA zawierające pojedynczą modyfikację SdU, po ekspozycji na promieniowanie UVA ulega efektywnym reakcjom sieciowania.¹⁰⁷

Zebrane dane eksperymentalne jednoznacznie wskazują, że obecność BrSdU w badanych modelach DNA promuje tworzenie sieciowań między zasadami azotowymi, co może prowadzić do zakłóceń replikacji, transkrypcji oraz uruchamiania ścieżek naprawy DNA. Takie produkty sieciowania znacząco różnią się od typowych uszkodzeń dla halogenowanych pochodnych urydyny, które najczęściej prowadzą do fragmentacji nici. W przypadku DNA znakowanego BrSdU dominującym efektem działania promieniowania UVA jest tworzenie strukturalnych, stabilnych fotoadduktów, a nie degradacja. Mechanizm

ten należy rozpatrywać w kontekście wpływu obecności atomu siarki na właściwości fotochemiczne cząsteczki oraz na kierunek przemian zachodzących w stanie wzbudzonym.¹⁵³ Z biologicznego punktu widzenia powstawanie uszkodzeń typu sieciowanie ma szczególne znaczenie, gdyż stanowią one poważne wyzwanie dla systemów naprawczych komórki. W odróżnieniu od pęknięć jednoniciowych czy modyfikacji zasad, sieciowania prowadzą do fizycznej blokady helikazy podczas replikacji i transkrypcji, a ich usunięcie wymaga złożonych mechanizmów naprawy z udziałem wielu białek. Trudność w efektywnej eliminacji uszkodzeń tego typu sprzyja uruchamianiu ścieżek prowadzących do apoptozy.¹⁵⁴

8.9 Właściwości fotosensybilizujące 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny i 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny na poziomie komórkowym

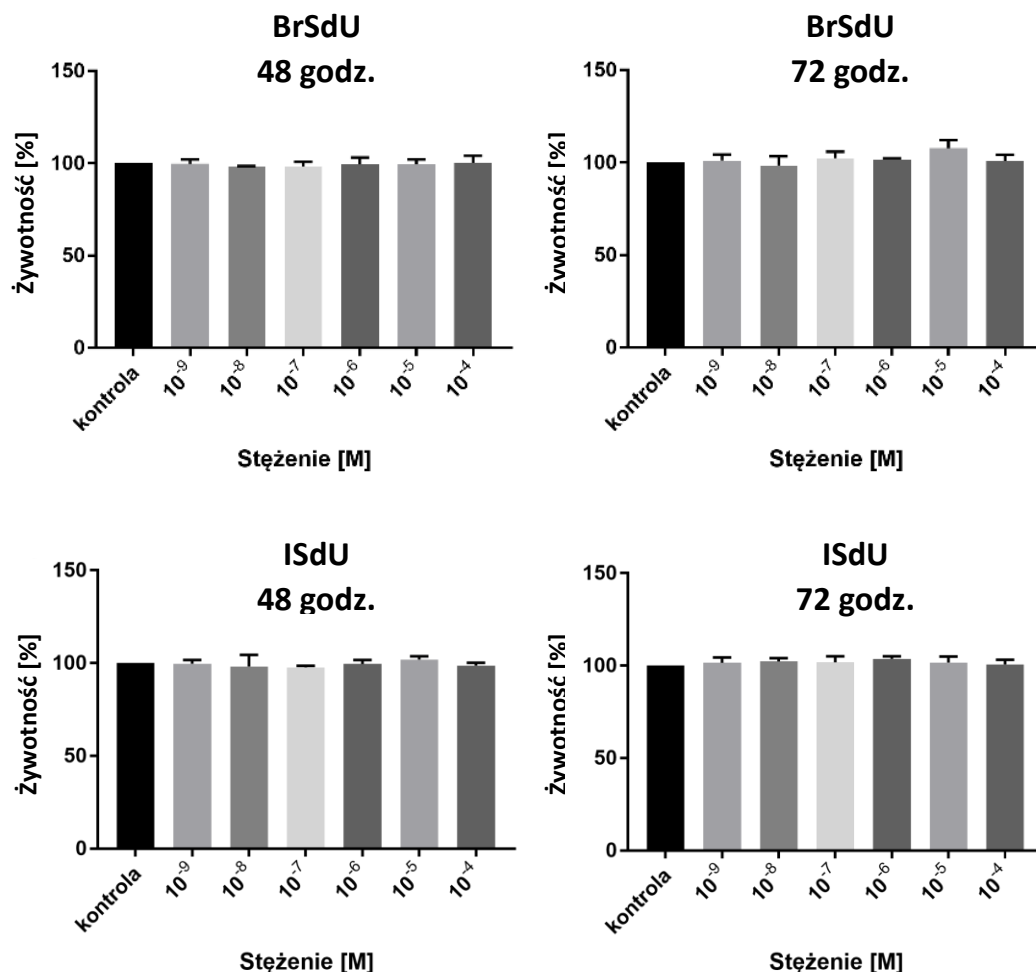
Zarówno BrSdU, jak i ISdU działają jako fotosensybilizatory, zwiększając wrażliwość DNA na promieniowanie UVA.^{107,108} Obserwowane w komórce fotouszkodzenia to sieciowanie DNA czy pojedyncze pęknięcia nici. W przeciwieństwie do znanych tlenozależnych mechanizmów działania 4-tio-2'-deoksytymidyny czy 6-tioguaniny, sposób działania BrSdU i ISdU jako fotosensybilizatorów nie został dotąd jednoznacznie wyjaśniony. Literatura z jednej strony wskazuje na mechanizm tworzenia ICL zależny od tlenu, a z drugiej nie obserwuje się powstawania 8-oksoguaniny – markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA.¹⁰⁷

W tym rozdziale przedstawiono badania obrazujące właściwości fotouczulające BrSdU i ISdU wobec ludzkiego gruczolaka prostaty IV stopnia (linia komórkowa PC3). Fotosensybilizacja została zbadana z wykorzystaniem testu klonogeniczności. Dodatkowo przeanalizowano wpływ fotouczulaczy i promieniowania UVA na cykl komórkowy, szlaki śmierci komórkowej, powstawanie dwuniciowych pęknięć DNA oraz stres oksydacyjny – stosując technikę cytometrii przepływowej. Przeprowadzone badania umożliwiają lepsze zrozumienie mechanizmów działania BrSdU i ISdU na poziomie komórkowym.

8.9.1 Cytotoksyczność BrSdU oraz ISdU wobec komórek nowotworu prostaty – test MTT

Modyfikowane nukleozydy jako fotosensybilizatory powinny wykazywać się jak najmniejszą toksycznością wobec komórek, a efekt cytotoksyczny pojawiać się dopiero po aktywowaniu PS promieniowaniem. W pierwszym etapie badań określono cytotoksyczność BrSdU oraz ISdU wobec komórek gruczolaka prostaty. Do oceny aktywności metabolicznej komórek wykorzystano test MTT oparty na zdolności enzymu (dehydrogenazy mitochondrialnej) do przekształcenia soli tetrazolowej w postać formazanu. Ilość barwnej zredukowanej soli jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Test wykonano dla dwóch wariantów czasowych: 48 oraz 72 godziny oraz szeregu stężeń związków: od 0,001 μ M do 100 μ M. Żywotność komórek przedstawiono jako procent w stosunku do kontroli. Zarówno związek BrSdU oraz ISdU nie powoduje statystycznie istotnego (poziom istotności $p < 0,05$) obniżenia aktywności metabolicznej komórek PC3 w porównaniu z nietraktowaną kontrolą (Rysunek 38). Otrzymane wyniki wskazują, że

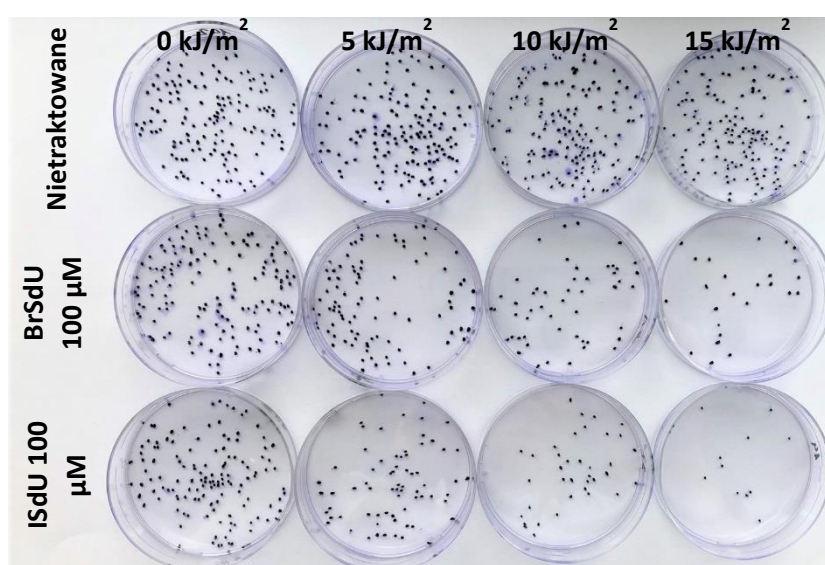
badane MN charakteryzują się brakiem toksyczności w danych warunkach i badanym zakresie stężeń. Czyni je to obiecującymi kandydatami do dalszych badań jako potencjalne związki zwiększające wrażliwość komórek na promieniowanie.



Rysunek 38. Żywotność komórek PC3 po 48 oraz 72 godzinach od traktowania BrSdU lub ISdU w stężeniach od 10^{-4} do 10^{-9} M. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskane na podstawie trzech niezależnych eksperymentów, z których każdy wykonano w trzech powtórzeniach.

8.9.2 Właściwości fotosensybilizujące BrSdU oraz ISdU – test klonogeniczności

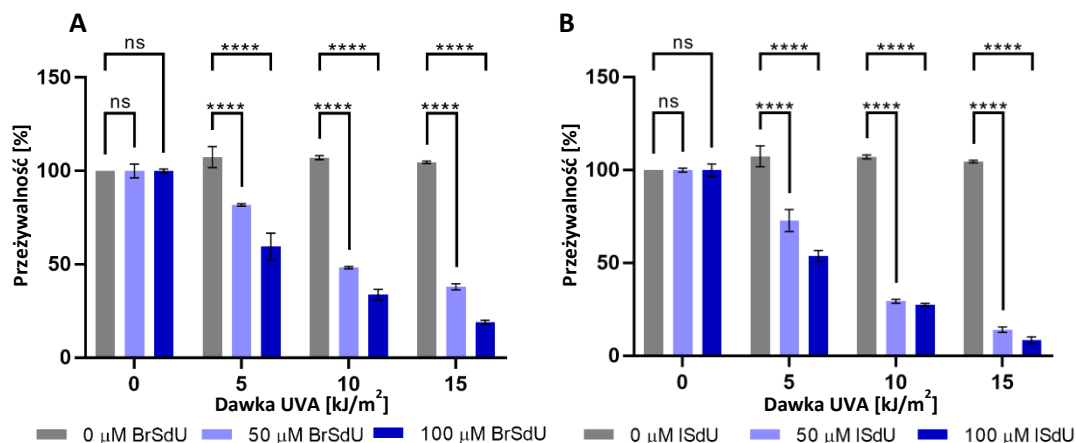
Aby ocenić przeżywalność komórek traktowanych BrSdU lub ISdU oraz poddanych działaniu promieniowania ultrafioletowego z zakresu UVA, wykonano test klonogeniczności. Jest to metoda powszechnie stosowana w tego rodzaju badaniach, ponieważ pozwala na ocenę zdolności pojedynczej komórki do proliferacji i tworzenia kolonii.¹⁵⁵ Eksperyment przeprowadzono na komórkach PC3, które poddano działaniu BrSdU lub ISdU w stężeniach 0, 50 i 100 μM oraz promieniowaniu UVA w dawkach 0, 5, 10 oraz 15 kJ/m^2 .



Rysunek 39. Zdjęcie płytek hodowlanych z utrwalonymi i wybarwionymi koloniami komórek PC3 podczas testu klonogeniczności. Na zdjęciu wskazano płytki z komórkami nietraktowanymi, traktowanymi 100 μM BrSdU i 100 μM ISdU oraz wpływ promieniowania na liczbę utworzonych kolonii.

Obie badane pochodne statystycznie istotnie ($p < 0,0001$) zwiększają wrażliwość komórek PC3 na działanie promieniowania UVA (Rysunek 39). Efekt fotosensybilizujący zależy zarówno od stosowanej dawki uczulacza (50 lub 100 μM) jak i dawki promieniowania (0, 5, 10, 15 kJ/m^2). Wykonany test klonogeniczności pokazał, że traktowanie komórek związkami BrSdU lub ISdU w stężeniu 50 μM i naświetlenie promieniowaniem o najniższej zastosowanej dawce 5 kJ/m^2 zmniejsza przeżywalność komórek odpowiednio do $81,8 \pm 0,7\%$ oraz do $72,9 \pm 5,9\%$. Dla tego samego stężenia związków zwiększenie dawki promieniowania do 15 kJ/m^2 zmniejsza przeżywalność komórek – dla BrSdU do $38,0 \pm 1,7\%$, a dla ISdU

14,1±1,5%. Przeżywalność przy zastosowaniu tych samych dawek promieniowania (5 oraz 15 kJ/m²) oraz wyższego stężenia związków (100 μM) dla BrSdU wynosi odpowiednio 59,5±7,2% oraz 19,0±1,1%, a dla ISdU 53,8±2,9% oraz 8,4±1,8% (Rysunek 40).



Rysunek 40. Zmiany przeżywalności komórek PC3 po traktowaniu: A – BrSdU oraz B – ISdU (stężenia 50 i 100 μM) w zależności od dawki promieniowania UVA (0, 5, 10 oraz 15 kJ/m²). Istotna statystycznie różnica między wskazanymi grupami występuje na poziomie ****: $p < 0,0001$; ns – statystycznie nieistotne. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość ± standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie dwóch niezależnych eksperymentów, z których każdy wykonano w dwóch powtórzeniach.

Średnie wydajności wysiewu (PE) dla kontroli (0 kJ/m²) wynoszą 47,17±0,2%, dla komórek traktowanych BrSdU 50,50±1,8% (50 μM) i 46,50±0,5% (100 μM) oraz ISdU 44,83±0,5% (50 μM) i 45,83±1,5% (100 μM; Tabela 8). Zbliżone wartości wydajności wysiewu potwierdzają, że badane związki powodują obniżenie przeżywalności dopiero w kombinacji z promieniowaniem. Traktowanie komórek zarówno BrSdU jak i ISdU powoduje znaczne zmniejszenie przeżywalności ($p < 0,0001$) komórek po naświetleniu, przy czym dla pochodnej ISdU efekt ten jest silniejszy. Badane MN są więc związkami o wysokim potencjale fotosensybilizującym.

Tabela 8. Średnie wydajności wysiewu komórek PC3 uzyskane podczas testu klonogeniczności.

Dawka [kJ/m ²]	Wydajność wysiewu [%]				
	0 μM BrSdU/ISdU	50 μM BrSdU	100 μM BrSdU	50 μM ISdU	100 μM ISdU
0	47,17 ± 0,17	50,50 ± 1,83	46,50 ± 0,50	44,83 ± 0,50	45,83 ± 1,50
5	50,67 ± 2,67	41,33 ± 0,33	27,67 ± 3,33	32,67 ± 2,67	24,67 ± 1,33
10	50,50 ± 0,50	24,33 ± 0,33	15,67 ± 1,33	13,17 ± 0,50	12,67 ± 0,33
15	49,33 ± 0,33	19,17 ± 0,83	8,83 ± 0,50	6,33 ± 0,67	3,83 ± 0,83

8.9.3 Wpływ BrSdU lub ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA na cykl komórek PC3 oraz śmierć komórkową

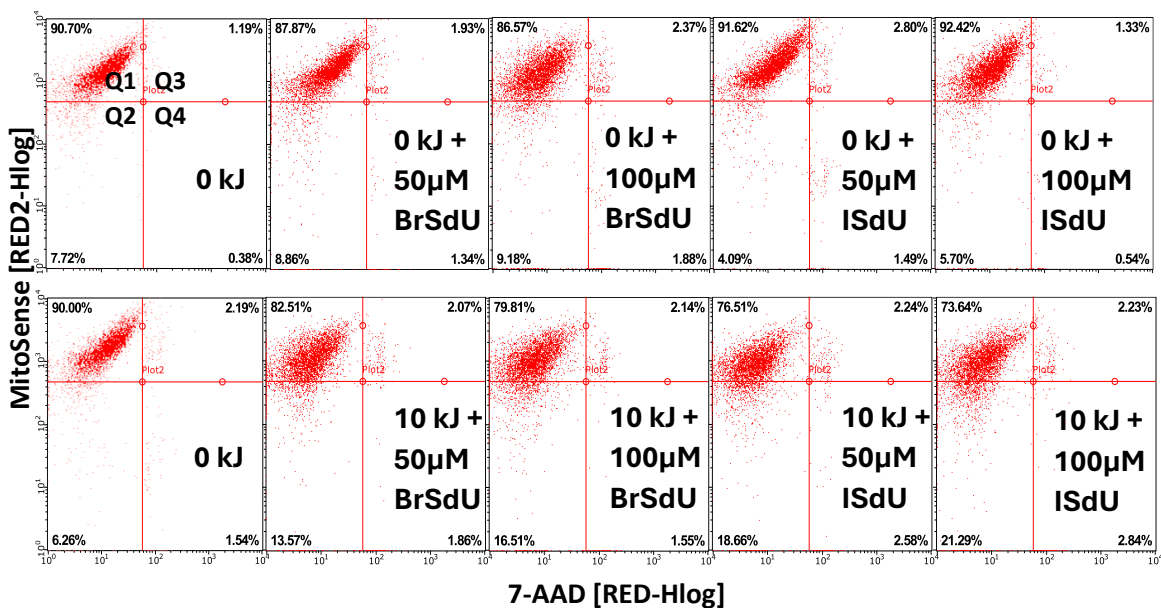
Cykl komórkowy to seria biochemicznych i molekularnych zmian o charakterze cyklicznym zachodzących w komórkach, a jego analiza może dostarczyć informacji na temat działania fotouczulaczy. W celu zbadania tych procesów przeprowadzono analizę cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz jodku propidyny. Jodek propidyny wiąże się z DNA w stosunku stechiometrycznym, dzięki czemu mierzona intensywność fluorescencji jest bezpośrednio proporcjonalna do ilości materiału genetycznego w komórce. W trakcie cyklu komórkowego zawartość DNA ulega zmianom: w fazie G1 komórki zawierają dwie kopie chromosomów, natomiast w fazie G2/M ilość kwasów nukleinowych jest podwojona. Z kolei w fazie S poziom fluorescencji przyjmuje wartości pośrednie między fazami G1 a G2/M, co umożliwia rozróżnienie poszczególnych etapów cyklu komórkowego.¹⁵⁶

Synergiczne działanie BrSdU i ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M z przyspieszeniem fazy G0/G1, w porównaniu do nietraktowanej i nienaświetlonej kontroli (Rysunek 41). Populacja w fazie G2/M dla komórek traktowanych wyższym stężeniem oraz naświetlonych stanowi 48,62±0,72% dla BrSdU i 47,7±0,75% dla ISdU ($p<0,01$) ogółu populacji. Frakcja komórek w fazie G2/M dla komórek nienaświetlonych, ale traktowanych 100 μM BrSdU wynosi 40,89±1,38%, a dla komórek poddanych działaniu ISdU 40,09±1,38%. Ponadto, w przypadku komórek PC3 frakcja w fazie G2/M utrzymuje się na zbliżonym poziomie zarówno po zastosowaniu samego związku chemicznego lub tylko promieniowania UVA – nie zaobserwowano istotnych różnic ($p<0,05$).

W celu zbadania śmierci komórkowej po traktowaniu komórek PC3 fotouczulaczami oraz promieniowaniem, przeprowadzono analizę wykorzystującą barwienie komórek za pomocą MitoSense Red i 7-AAD z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Barwnik MitoSense Red pozwala na ocenę zmian w potencjale błony mitochondrialnej, co stanowi wczesny wskaźnik apoptozy oraz dysfunkcji mitochondriów. Natomiast 7-AAD umożliwia wykrycie zmian w przepuszczalności błony komórkowej, które pojawiają się na późniejszych etapach apoptozy oraz w komórkach nekrotycznych.¹⁵⁷ Połączenie obu barwników umożliwia rozróżnienie komórek żywych, znajdujących się we wczesnej i późnej fazie apoptozy, a także komórek martwych (Rysunek 42).

Synergiczne działanie fotouczulaczy oraz promieniowania UVA wpływa na zmniejszenie liczby komórek żywych, co znajduje potwierdzenie w statystycznie istotnym spadku ich żywotności – z $90,00 \pm 0,01\%$ (komórki traktowane promieniowaniem UVA) do $80,76 \pm 0,90\%$ dla BrSdU w stężeniu $100 \mu\text{M}$ oraz $78,35 \pm 0,99\%$ dla ISdU w tym samym stężeniu (Rysunek 43). Zmiany te są skorelowane z istotnym wzrostem liczby komórek we wczesnej fazie apoptozy. W przypadku wyższych stężeń BrSdU i ISdU odnotowano istotne statystycznie zwiększenie liczby komórek wczesnoapoptycznych ($p < 0,0001$) – odpowiednio do $15,14 \pm 1,37\%$ i $20,54 \pm 0,75\%$ – w porównaniu do kontroli naświetlonej ($6,26 \pm 0,02\%$) (Tabela 9). Dla BrSdU w stężeniu $100 \mu\text{M}$ zaobserwowano również statystycznie istotny wzrost liczby komórek we wczesnej fazie apoptozy nawet bez ekspozycji na promieniowanie ($p < 0,05$).

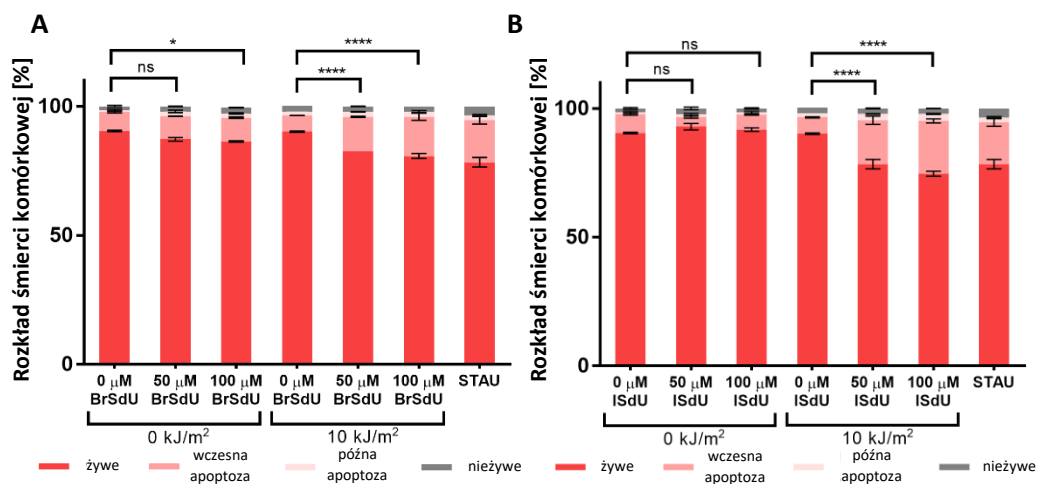
Jednocześnie, w warunkach przeprowadzonego eksperymentu, połączenie działania fotouczulaczy z promieniowaniem UVA nie wpływało istotnie na liczbę komórek znajdujących się w późnej fazie apoptozy ani na liczbę komórek martwych. Wyraźne zmiany w tej grupie komórek zaobserwowano dopiero po zastosowaniu kontrolnego indykatora apoptozy – staurosporyny.



Rysunek 42. Analiza cytometryczna śmierci komórkowej komórek PC3 traktowanych BrSdU lub ISdU oraz promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m². Przykładowe wykresy punktowe przedstawiają porównanie barwienia MitoSense Red i 7-AAD. Rozkład komórek: Q1 – komórki żywe, Q2 – komórki we wczesnej fazie apoptozy, Q3 – komórki w późnej fazie apoptozy, Q4 – komórki martwe.

Tabela 9. Ilościowa cytometryczna analiza śmierci komórkowej komórek PC3 traktowanych BrSdU lub ISdU oraz promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m².

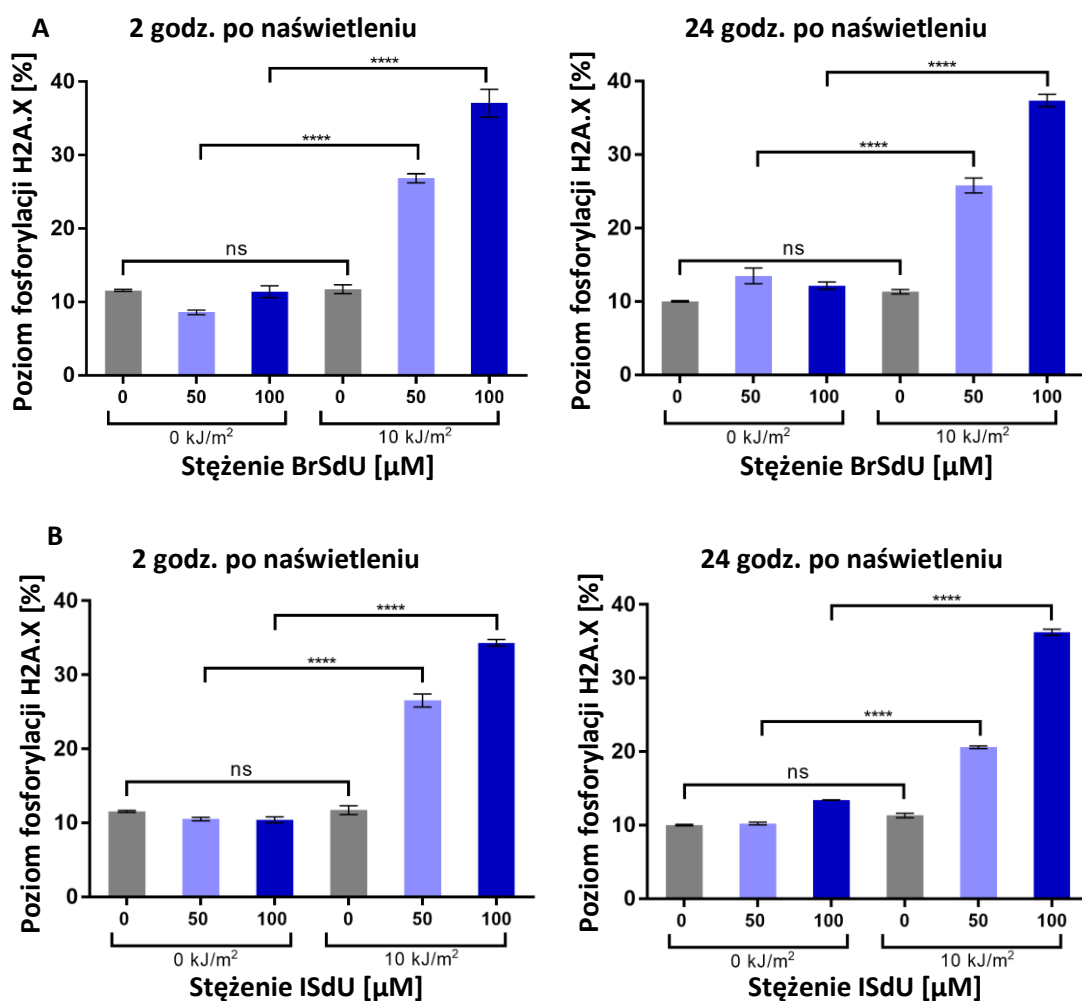
Dawka [kJ/m ⁻²]	Żywe komórki [%]	Wczesno-apoptyczne komórki [%]	Późno-apoptyczne komórki [%]	Komórki martwe [%]
0	90,43 ± 0,27	7,33 ± 0,4	0,73 ± 0,35	1,52 ± 0,33
0 + 50 μM BrSdU	90,36 ± 3,84	8,94 ± 0,08	1,84 ± 0,50	2,03 ± 0,10
0 + 100 μM BrSdU	86,93 ± 0,24	9,05 ± 0,57	1,66 ± 0,23	2,27 ± 0,11
0 + 50 μM ISdU	92,91 ± 1,29	3,68 ± 0,42	1,09 ± 0,41	2,34 ± 0,47
0 + 100 μM ISdU	91,74 ± 0,69	5,79 ± 0,09	0,94 ± 0,40	1,54 ± 0,20
10	90,00 ± 0,01	6,26 ± 0,02	1,54 ± 0,00	2,19 ± 0,01
10 + 50 μM BrSdU	82,53 ± 0,02	13,36 ± 0,22	1,95 ± 0,08	2,16 ± 0,09
10 + 100 μM BrSdU	80,76 ± 0,95	15,14 ± 1,37	1,97 ± 0,42	2,14 ± 0,03
10 + 50 μM ISdU	90,00 ± 1,84	17,06 ± 1,61	2,49 ± 0,10	2,11 ± 0,14
10 + 100 μM ISdU	78,35 ± 0,99	20,54 ± 0,75	2,68 ± 0,17	2,16 ± 0,08
Staurosporyna	78,30 ± 1,83	16,26 ± 1,51	1,94 ± 0,32	3,51 ± 0,00



Rysunek 43. Analiza cytometryczna śmierci komórek PC3 traktowanych A – BrSdU i B – ISdU oraz naświetlonych promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m^2 (staurosporyna (STAU) została wykorzystana jako pozytywna kontrola apoptozy). Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Różnice populacji w we wczesnej fazie apoptozy dla wskazanych grup są statystycznie istotne na poziomie: *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$; ns-statystycznie nieistotne.

8.9.4 Analiza podwójnych pęknięć nici DNA indukowanych promieniowaniem UVA w połączeniu z fotosensybilizatorami

Powstawanie podwójnych pęknięć DNA powoduje fosforylację histonu H2A.X w jądrze komórkowym, który określa się mianem $\gamma\text{H2A.X}$ – molekularnego markera DSB. W celu oceny wpływu modyfikowanych nukleozydów w połączeniu z promieniowaniem UVA wykonano analizę cytometryczną poziomu $\gamma\text{H2A.X}$. Poziom markera został wyznaczony dla komórek traktowanych BrSdU lub ISdU po 2 i 24 godzinach od naświetlania promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m^2 (sposób bramkowania pokazano na Rysunku 45).



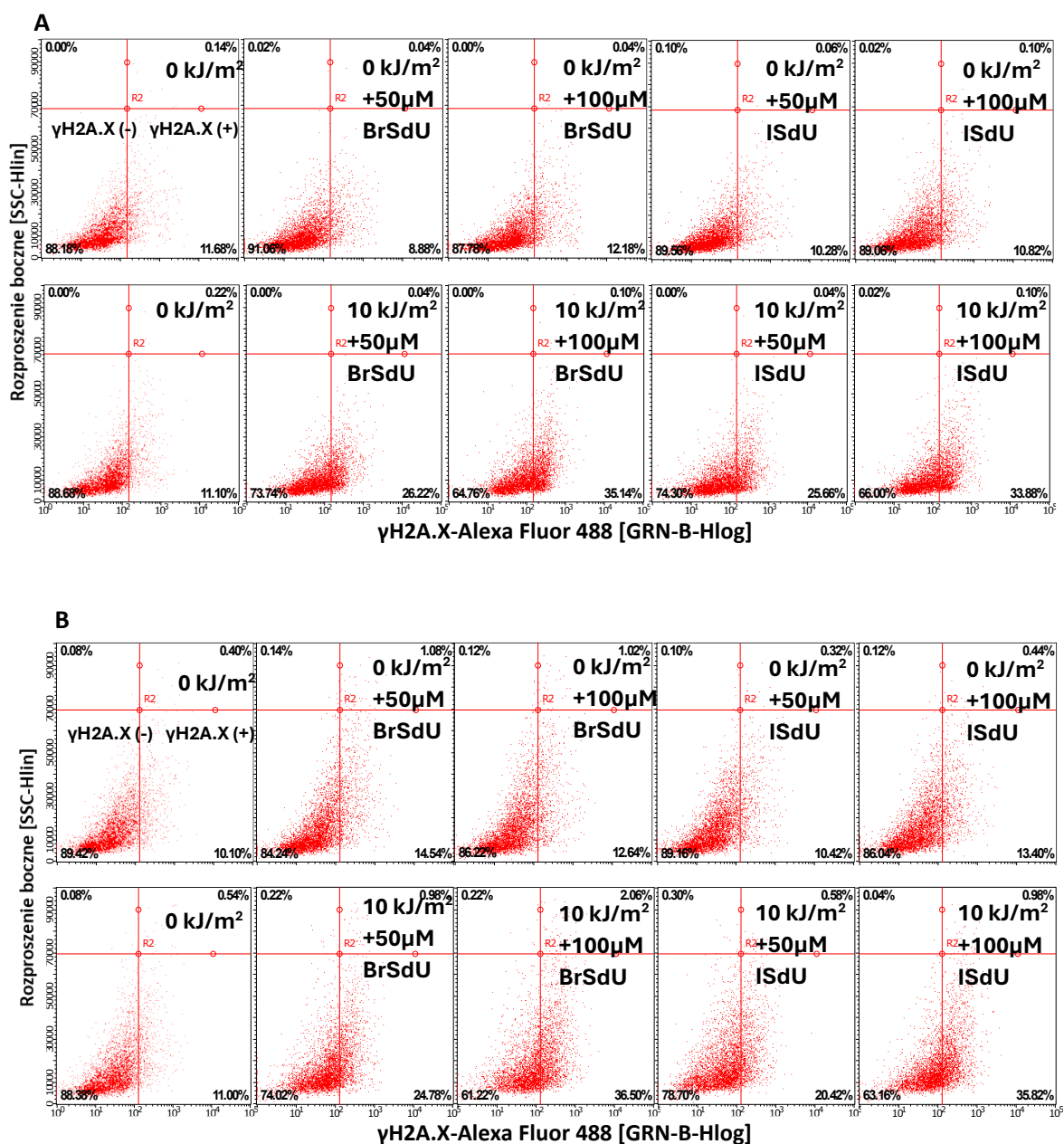
Rysunek 44. Analiza fosforylacji histonu H2A.X metodą cytometrii przepływowej w komórkach PC3 po ekspozycji na promieniowanie o dawce 10 kJ/m² oraz A – BrSdU i B – ISdU. Poziom γ H2A.X zmierzono po 2 i 24 godzinach od napromienienia (poziom γ H2A.X oznacza procent populacji komórek, w której odpowiedź fluorescencyjna przekracza ustalony próg dla markera H2A.X). Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Różnice w fosforylacji H2A.X pomiędzy wskazanymi grupami są statystycznie istotne na poziomie **** $p < 0,0001$; ns – statystycznie nieistotne.

Statystycznie istotny ($p < 0,0001$) wzrost poziomu γ H2A.X zaobserwowano dla komórek napromienionych i traktowanych MN, w porównaniu do nietraktowanej kontroli (Rysunek 44). Zgodnie z oczekiwaniami działanie samego promieniowania nie generuje podwójnych pęknięć nici. Po 2 godzinach od naświetlenia w komórkach traktowanych 100 μ M BrSdU i ISdU poziom γ H2A.X zwiększył się odpowiednio z $11,70 \pm 0,60\%$ (tylko UVA) do

37,05±1,91% i 34,33±0,45% (Tabela 10). Również komórki traktowane połową dawki PS wykazują wzrost poziomu badanego markera do 26,84±0,62% dla BrSdU i 26,54±0,88% dla ISdU. Warto podkreślić, że nawet po 24 godzinach od naświetlenia, czyli czasie, w którym może dojść do naprawy potencjalnie letalnych uszkodzeń materiału genetycznego,¹⁵⁸ populacja γ H2A.X-pozytywnych komórek wynosi 37,36±0,86% po traktowaniu 100 μ M BrSdU oraz 36,24±0,42% dla 100 μ M ISdU, w porównaniu do naświetlonej kontroli (11,31±0,31%). Dla dawki fotosensybilizatora wynoszącej 50 μ M wzrost poziomu fosforylacji względem wariantu tylko napromienianego również pozostaje statystycznie istotny, mimo to procesy naprawy DSB są zauważalne dla tego stężenia modyfikowanych nukleozydów (porównując poziom γ H2A.X po 2 i 24 godzinach od napromieniania). Przy połowie dawki BrSdU poziom γ H2A.X wynosi 25,79±1,01% (13,48±1,06% bez UVA), a dla ISdU 20,61±0,19% (10,23±0,19% bez UVA). Wyniki te sugerują, że działanie fotosensybilizujące BrSdU i ISdU wiąże się z powstawaniem podwójnych pęknięć nici DNA w komórkach PC3.

Tabela 10. Ilościowa cytometryczna analiza poziomu γ H2AX w komórkach PC3 traktowanych BrSdU lub ISdU oraz promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m².

Populacja pozytywna (fosforylacja histonu H2A.X)		
Dawka [kJ/m ²]	2 godz. po naświetleniu [%]	24 godz. po naświetleniu [%]
0 kJ	11,55 ± 0,13	10,00 ± 0,10
0 + 50 μ M BrSdU	8,57 ± 0,31	13,48 ± 1,06
0 + 100 μ M BrSdU	11,38 ± 0,8	12,15 ± 0,49
0 + 50 μ M ISdU	10,51 ± 0,23	10,23 ± 0,19
0 + 100 μ M ISdU	10,41 ± 0,41	13,43 ± 0,03
10	11,7 ± 0,6	11,31 ± 0,31
10 + 50 μ M BrSdU	26,84 ± 0,62	25,79 ± 1,01
10 + 100 μ M BrSdU	37,05 ± 1,91	37,36 ± 0,86
10 + 50 μ M ISdU	26,54 ± 0,88	20,61 ± 0,19
10 + 100 μ M ISdU	34,33 ± 0,45	36,24 ± 0,42



Rysunek 45. Analiza fosforylacji histonu H2A.X metodą cytometrii przepływowej po: A – 2 i B – 24 godzinach od naświetlenia – przykładowe wykresy. Strategię bramkowania oparto na wykresie rozproszenia bocznego SSC względem powierzchni sygnału lasera bocznego (466 nm). Na dwuwymiarowym wykresie punktowym SSC względem Alexa Fluor 488, komórki γ -H2AX-dodatnie przedstawione są w prawych dolnych kwadrantach, a komórki γ -H2AX-ujemne przedstawione w lewych. Takie samo bramkowanie zostało zastosowane dla komórek kontrolnych oraz kolejnych próbek.

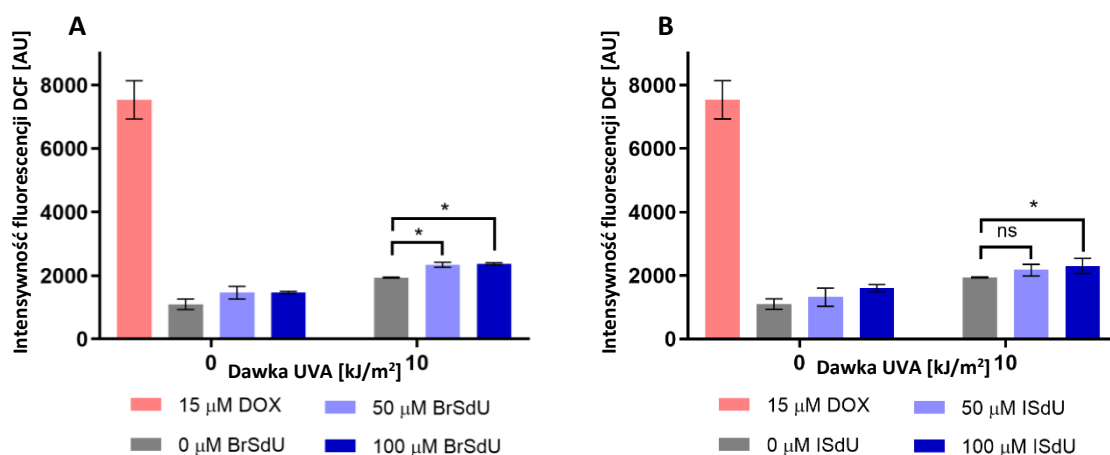
8.9.5 Wpływ UVA w połączeniu z fotosensybilizatorami BrSdU oraz ISdU na powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach PC3

Do detekcji stresu oksydacyjnego zastosowano diacetat 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny. Związek ten, po deacetylacji przez esterazy wewnątrzkomórkowe, przekształca się w niefluorescencyjną 2',7'-dichlorodihydrofluoresceinę (DCFH), która następnie, w wyniku reakcji z reaktywnymi formami tlenu, tworzy fluorescencyjną 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF).¹⁵⁹ Badania przeprowadzono z użyciem cytometru przepływowego.

Przedstawione na Rysunku 46 wyniki pokazują wpływ BrSdU oraz ISdU wraz z promieniowaniem UVA na poziom reaktywnych form tlenu w komórkach PC3. W obu przypadkach jako pozytywną kontrolę stresu oksydacyjnego zastosowano doksorubicynę (15 μM), która wywołała znaczne zwiększenie intensywności monitorowanej fluorescencji.

Dla związku BrSdU (Rysunek 46A), zaobserwowano, że sama inkubacja komórek z fotosensybilizatorem (50 μM i 100 μM) nie prowadzi do istotnego wzrostu poziomu RFT. Poziomy DCF istotnie wzrosł ($p < 0,05$) po aktywacji fotosensybilizatora promieniowaniem UVA (10 kJ/m^2) – dla obu dawek BrSdU. Wzrost intensywności fluorescencji DCF wskazuje na zwiększenie ilości generowanych RFT, osiągając dla stężeń 50 μM i 100 μM BrSdU odpowiednio 121% i 122% wartości kontrolnych (jako kontrolę przyjęto komórki naświetlone). Dla ISdU (Rysunek 46B) zaobserwowano podobny trend w produkcji reaktywnych form tlenu, choć efekt ten jest mniej wyraźny. Sama obecność ISdU nie wpływała znacząco na stres oksydacyjny, zarówno przy dawce 50 μM , jak i 100 μM . Po ekspozycji na promieniowanie UVA, istotne zwiększenie RFT ($p < 0,05$) zaobserwowano tylko dla 100 μM ISdU, gdzie poziom reaktywnych form tlenu osiągnął 118% względem naświetlonej kontroli. Dla 50 μM stężenia ISdU zmiana fluorescencji DCF nie jest statystycznie istotna.

Wyniki te wskazują, że BrSdU w większym stopniu niż ISdU wpływa na stres oksydacyjny w odpowiedzi na promieniowanie UVA. Ponadto, obserwowany wzrost poziomu RFT potwierdza możliwość udziału mechanizmów zależnych od tlenu w uszkodzeniach komórkowych wywoływanych przez badane związki.



Rysunek 46. Efekt synergicznego działania promieniowania UVA w dawce 10 kJ/m² z A – BrSdU i B – ISdU na stres oksydacyjny w komórkach PC3. Doksorubicyna (DOX) reprezentuje pozytywną kontrolę produkcji RFT. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Różnice w intensywności fluorescencji DCF pomiędzy wskazanymi grupami są statystycznie istotne na poziomie * $p < 0,05$; ns – statystycznie nieistotne.

8.9.6 Dyskusja wyników

Obecne metody leczenia raka prostaty, takie jak prostatektomia, radio- i chemioterapia oraz terapia hormonalna, często wiążą się z poważnymi skutkami ubocznymi. Na przykład terapia hormonalna może prowadzić do rozwoju oporności komórek na androgeny.^{65,66} W związku z tym terapia fotodynamiczna może stanowić alternatywną metodę ogniskowego leczenia raka prostaty. Wykonany test MTT dla BrSdU/ISdU potwierdził brak cytotoksyczności wobec komórek PC3, nawet przy wyższych stężeniach fotouczulaczy (100 µM). Kluczową obserwacją jest zdolność badanych modyfikowanych nukleozydów do wywoływania silnych efektów fotosensybilizujących w obecności promieniowania UVA w różnych dawkach, co przejawia się w znacznej redukcji przeżywalności komórek obserwowanej w teście klonogeniczności. Co ciekawe, efekt fotosensybilizujący dla ISdU przy dawce 15 kJ/m² UVA był około dwukrotnie większy niż dla BrSdU (mimo wydajniejszej inkorporacji do nici DNA bromopochodnej niż jodopochodnej).¹⁰⁷ Brem i współpracownicy sugerują, że ta zmienność może być związana z różnicami w procesach dehalogenacji. Generowanie rodników uracylu zachodzi poprzez mechanizmy homolityczne lub heterolityczne, przy czym BrSdU preferuje szlak heterolityczny, natomiast ISdU wykorzystuje zarówno heterolizę, jak i homolizę wiązania.¹⁰⁶

Badania cyklu komórkowego dostarczyły dodatkowych informacji na temat mechanizmu działania fotosensybilizatorów. Aby zapobiec poważnym uszkodzeniom DNA, komórki mogą zatrzymać się na określonych etapach cyklu komórkowego. Promieniowanie ultrafioletowe (UVB) powoduje zatrzymanie cyklu na etapie G2/M, by uniemożliwić mitotyczny podział uszkodzonego genomu.^{160,161,162} Ekspozycja komórek PC3 na BrSdU lub ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA prowadzi do podobnego zatrzymania cyklu w fazie G2/M, przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby komórek w fazie G0/G1. Zaobserwowano również niewielkie zmiany w fazie S, szczególnie po traktowaniu hodowli 100 μ M ISdU i naświetleniu. Komórki posiadają zdolność wykrywania uszkodzeń takich jak pęknięcia podwójnej nici za pomocą mechanizmów punktów kontrolnych cyklu komórkowego, zatrzymując replikację w celu umożliwienia naprawy. Zatrzymanie w fazie S jest kluczowym mechanizmem odpowiedzi na problemy replikacyjne DNA.¹⁶³ Kombinacja fotosensybilizatorów z promieniowaniem UVA znacząco zmienia rozkład cyklu komórkowego badanej linii PC3 zakłócając mechanizmy replikacyjne.

Analiza śmierci komórkowej związanej ze szlakiem mitochondrialnym to kolejny wkład do informacji o mechanizmie działania badanych fotosensybilizatorów. Zarówno BrSdU jak i ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA inicjują procesy wczesnej apoptozy, przy czym jodopochodna wykazuje wyższą efektywność. Chociaż nie zaobserwowano oznak późnej apoptozy po 24 godzinach od naświetlenia komórek, możliwe jest, że zmiany te rozwijają się w dłuższym czasie lub aktywowane są alternatywne ścieżki śmierci komórkowej, niewykrywane w przyjętym przedziale czasowym.

Po inkorporacji modyfikowanych nukleozydów do DNA oczekuje się, że promieniowanie UVA wywoła uszkodzenia biopolimeru. Tionukleozydy, po wzbudzeniu światłem, mogą indukować tworzenie sieciowań w nici DNA. Z kolei obecność atomu halogenu w cząsteczce uracylu czyni DNA podatnym na dalekozasięgowy transfer elektronu, prowadzący do powstawania pojedynczych pęknięć nici, które mogą przekształcać się w letalne podwójne pęknięcia. Tutaj oceniano wpływ BrSdU i ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA na tworzenie DSB. Oba fotouczulacze uszkadzają DNA poprzez indukowanie powstawania podwójnych pęknięć nici, co potwierdzono wzrostem poziomu γ H2A.X. Takie działanie może sugerować udział procesu transferu elektronów w uszkodzeniach DNA. Z drugiej strony badania grupy Brema ujawniają powstawanie pęknięć nici DNA, ale tylko pojedynczych lub miejsc alkalicznie labilnych

w komórkach HeLa traktowanych BrSdU/ISdU (100 μ M) i UVA (15 lub 30 kJ/m²). Brem i współpracownicy nie zaobserwowali powstawania DSB. Dyskutując wyniki tych doświadczeń trzeba pamiętać o różnicach eksperymentalnych – grupa Brema wymieniła medium hodowlane na świeże, bez dodatku MN przed naświetleniem.¹⁰⁷

Oceniając stres oksydacyjny można zauważyć, że BrSdU w połączeniu z UVA znacząco zwiększa powstawanie RFT, natomiast ISdU wykazuje taki efekt tylko przy wyższej dawce uczulacza (100 μ M). Niemniej jednak, poziom RFT indukowany przez modyfikowane nukleozydy jest znacznie niższy niż wywoływany przez doksorubicynę – klasyczny lek oksydacyjny. Wcześniejsze badania grupy Brema sugerują częściowo tlenozależny mechanizm działania BrSdU/ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA. Wyniki testu kometowego w D₂O wskazują, że głównym rodzajem powstających uszkodzeń są międzyniciowe wiązania krzyżowe DNA. Nie zaobserwowano powstawania 8-oksoguaniny, czyli oksydacyjnego markera uszkodzeń kwasów nukleinowych. Grupa Brema wskazuje mechanizm działania BrSdU i ISdU w połączeniu z promieniowaniem UVA jako tylko częściowo zależny od obecności tlenu w środowisku komórkowym, co koreluje z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy. Uzyskane wyniki podkreślają selektywny charakter działania fotosensybilizatorów oraz promieniowania UVA w modulacji odpowiedzi komórkowej zależnej od RFT.

Podsumowanie

Nowotwory stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie, a jednocześnie notuje się systematyczny wzrost liczby nowych przypadków. W poszukiwaniu skuteczniejszych i bardziej selektywnych metod leczenia coraz większą uwagę poświęca się terapii fotodynamicznej. PDT wykorzystuje światło o odpowiedniej długości fali, fotosensybilizator oraz tlen obecny w tkankach w celu wywołania cytotoksycznych reakcji prowadzących do śmierci komórek nowotworowych. Jednym z głównych ograniczeń tej metody jest hipoksja – niedotlenienie charakterystyczne dla nowotworów litych, która znacząco redukuje skuteczność terapii zależnych od tlenu. Stąd ciągle zainteresowanie fotosensybilizatorami, które mogą działać w warunkach hipoksji.

W niniejszej pracy przeprowadzono kompleksowe badania nad właściwościami fotochemicznymi 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU), z uwzględnieniem ich fotoreaktywności w roztworze, działania na poziomie komórkowym oraz – dla BrSdU, w znakowanych oligonukleotydach. Praca wpisuje się w badania nad modyfikowanymi nukleozydami, które dzięki zdolnościom do selektywnego wzbudzenia światłem UVA, stanowią potencjalne narzędzia w terapii fotodynamicznej. Badania eksperymentalne składające się na niniejszą rozprawę obejmowały trzy główne części. Pierwszą z nich była fotoliza stacjonarna modyfikowanych nukleozydów, pozwalająca na scharakteryzowanie reakcji fotochemicznych jakim ulegają badane nukleozydy w roztworze wodnym w warunkach beztlenowych. Kolejny etap obejmował fotolizę dwuniciowych oligonukleotydów punktowo znakowanych BrSdU, co umożliwiło analizę wpływu lokalnej sekwencji biopolimeru na typ i wydajność reakcji indukowanej fotchemicznie, gdy modyfikowany nukleozyd znajduje się w dwuniciowym DNA. Ostatnia część badań obejmowała ocenę właściwości fotosensybilizujących BrSdU i ISdU w modelu komórkowym ludzkiego gruczołakoraka prostaty.

Fotoliza stacjonarna buforowanych roztworów BrSdU oraz ISdU doprowadziła do powstania szeregu produktów reakcji fotochemicznych. Głównymi produktami fotolizy BrSdU są 2'-deoksyurydyna, 4-tio-2'-deoksyurydyna, 5-bromo-2'-deoksyurydyna, a także szereg dimerów, w tym dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-hydroksy)-dideoksyurydynowy, dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-tio)-dideoksyurydynowy i disulfid 5,5'-dibromo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny. Ich identyfikacja została przeprowadzona metodami HPLC, LC-MS, spektroskopii NMR oraz dzięki porównaniu eksperymentalnych widm absorpcyjnych

z obliczonymi metodą TD-DFT. Analogiczne badania przeprowadzone dla ISdU wykazały powstawanie produktów dehalogenacji oraz symetrycznych i niesymetrycznych dimerów disiarczkowych w tym 2'-deoksyurydyny, 4-tio-2'-deoksyurydyny, 5-jodo-2'-deoksyurydyny, disulfidu 4,4'-ditio-dideoksyurydyny, disulfidu 5,5'-dijodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny oraz disulfidu 5-jodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny. Produkty fotolizy różniły się stabilnością, a niektóre ulegały wtórnym reakcjom fotochemicznym.

W drugiej części badań opisano wyniki fotolizy modelowych układów dsDNA punktowo znakowanych BrSdU. Sekwencje oligonukleotydów różniły się podatnością na dalekozasięgowy transfer elektronu (ET), który w oligonukleotydach znakowanych BrdU lub IdU prowadzi do jednoniciowych pęknięć. Po ekspozycji oligonukleotydów na promieniowanie UVA nie zaobserwowano produktów degradacji nici (brak krótszych fragmentów ssDNA), co wyklucza udział mechanizmu ET, mimo obecności bromu w strukturze biomolekuły. Obserwacje te wskazują, że obecność atomu siarki zmienia właściwości fotochemiczne cząsteczki w stanie wzbudzonym ograniczając jej zdolność do przyjęcia elektronu od sąsiednich zasad purynowych. Zarówno analiza DHPLC, jak i spektrometria mas wskazały na powstawanie stabilnych produktów o nieco niższej masie cząsteczkowej niż natywne duplekisy, co wskazuje na tworzenie kowalencyjnych wiązań między zasadami. Masy fotoproduktów oraz ich trwałość wskazują na obecność sieciowania międzyniciowego. Trawienie enzymatyczne wyizolowanego fotoproduktu dla jednego z badanych dupleksów (ODN2:ODN3) pozwoliło zaproponować możliwą strukturę produktu powstającego w reakcji fotochemicznej. Produkt ten prawdopodobnie powstaje w wyniku utworzenia wiązania pomiędzy fragmentem SdU (po fotodehalogenacji) i adenozyną obecną w tej samej nici oraz tymidyną nici komplementarnej.

W ostatnim etapie projektu oceniono potencjał BrSdU i ISdU jako fotosensybilizatorów wobec ludzkiej linii nowotworu prostaty PC3. W testach oceniających cytotoksyczność PS nie zaobserwowano statystycznie istotnego zmniejszenia przeżywalności komórek. Dopiero synergiczne działanie BrSdU lub ISdU z promieniowaniem UVA skutkuje zmniejszeniem populacji komórek, a efekt cytotoksyczny jest zależny od dawki promieniowania. Testy klonogeniczności wykazały znaczną redukcję przeżywalności komórek, szczególnie w przypadku pochodnej ISdU. Różnica skuteczności działania PS może wynikać z odmiennych mechanizmów dehalogenacji. Dalsze badania cytometryczne komórek traktowanych fotosensybilizatorami oraz promieniowaniem UVA dostarczyły informacji

o zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G2/M, indukowaniu wczesnej apoptozy, zwiększeniu poziomu γ H2A.X, czyli markera podwójnych pęknięć nici DNA oraz zwiększeniu poziomu reaktywnych form tlenu, głównie dla wyższych dawek PS. Zgromadzone wyniki są istotne dla zrozumienia mechanizmów działania modyfikowanych nukleozydów jako fotosensybilizatorów. Można również stwierdzić, że BrSdU oraz ISdU wykazują potencjał fotosensybilizujący wobec komórek nowotworu prostaty.

Podsumowując, wyniki zawarte w rozprawie wskazują, że BrSdU oraz ISdU jako analogi urydyny cechują wyjątkowe właściwości fotochemiczne. Obserwowane efekty są istotne w kontekście projektowania nowych fotosensybilizatorów działających selektywnie pod wpływem promieniowania UVA. Wnioski z badań komórkowych sugerują, że BrSdU i ISdU są obiecującymi kandydatami do dalszych badań nad nowymi strategiami terapii fotodynamicznej nowotworów. W przyszłości zasadne byłoby rozszerzenie badań o kwantowochemiczne modelowanie losów wzbudzonych elektronowo BrSdU i ISdU w modelowych dwuniciowych oligonukleotydach. Tego typu obliczenia mogą wyjaśnić molekularny mechanizm fotosensybilizacji indukowanej przez badane halogenotiopochodne oraz umożliwić optymalizację struktury tych cząsteczek, co może prowadzić do opracowania bardziej wydajnych fotosensybilizatorów.

Wykaz rysunków

Rysunek 1. Zestaw aparatury zaprojektowany przez Finsena do leczenia toczenia. ⁹	16
Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie działania terapii fotodynamicznej.....	17
Rysunek 3. Wzory strukturalne wybranych fotosensybilizatorów należących do pierwszej oraz drugiej generacji.....	21
Rysunek 4. Mechanizmy typu I oraz II działania fotosensybilizatorów pokazane na diagramie Jabłońskiego. S_0 – stan podstawowy; S_1 – pierwszy stan singletowy; T_1 – pierwszy stan trypletowy; PS – fotosensybilizator w stanie podstawowym; PS^* – fotosensybilizator w stanie wzbudzonym.	24
Rysunek 5. Fakty dotyczące nowotworu prostaty.	26
Rysunek 6. Schemat obrazujący działanie modyfikowanych nukleozydów jako fotosensybilizatorów.	28
Rysunek 7. Struktury tionukleozydów o właściwościach fotosensybilizujących.....	31
Rysunek 8. Mechanizm tworzenia rodników urydylowych w DNA znakowanym 5-halogeno-2'-deoksyurydyną. Heteroliza wiązania zachodzi dla bromopochodnych oraz jodopochodnych, natomiast homoliza jest charakterystyczna dla jodopochodnych.	33
Rysunek 9. Struktury wybranych fotoproduktów powstających podczas fotolizy roztworów: A, B – BrSdU oraz C, D – ISdU. ^{109,110}	35
Rysunek 10. Uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem ultrafioletowym.....	37
Rysunek 11. Zależność pola powierzchni poszczególnych sygnałów fotoproduktów zarejestrowanych przy 260 nm od dawki promieniowania UVA dla fotolizy: A – BrSdU oraz B – ISdU. Poszczególnym wykresom przypisano symbole fotoproduktów (a1 dU; a2 BrdU; a3 SdU; a4 BrSdU-OHdU; a5 BrSdU-SdU; a6 BrSdU-BrSdU; b1 I; b2 IdU; b3 SdU-SdU; b4 ISdU-SdU oraz b5 ISdU-ISdU).	61
Rysunek 12. Porównanie chromatogramów roztworu BrSdU (A, B, C) oraz ISdU (D) po fotolizie (dawka UVA 30 kJ/m ² ; czarna linia) z roztworami wzorców substancji (niebieska linia): A – dU, B – BrdU, C – SdU i D – IdU.....	63
Rysunek 13. Chromatogramy roztworu BrSdU a naświetlonego promieniowaniem UVA w dawce 30 kJ/m ² zarejestrowane przy: A – 260 nm (czarna linia) i B – 330 nm (czerwona linia) oraz widma absorpcyjne dla powstających fotoproduktów. Poszczególnym sygnałom oraz widmom przypisano symbole fotoproduktów (a1 dU; a2 BrdU; a3 SdU; a4 BrSdU-OHdU; a5 BrSdU-SdU; a6 BrSdU-BrSdU).....	65
Rysunek 14. Chromatogram roztworu fotoproduktu ISdU-SdU b4 w buforze fosforanowym (10 mM, pH 7) po oczyszczeniu na HPLC oraz liofilizacji.	67
Rysunek 15. Chromatogramy roztworu ISdU b naświetlonego promieniowaniem UVA w dawce 30 kJ/m ² zarejestrowane przy: A – 260 nm (czarna linia) i B – 330 nm (czerwona linia) oraz widma absorpcyjne dla powstających fotoproduktów. Poszczególnym sygnałom oraz widmom przypisano symbole fotoproduktów (b1 I; b2 IdU; b3 SdU-SdU; b4 ISdU-SdU oraz b5 ISdU-ISdU).....	69
Rysunek 16. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu a4 BrSdU-OHdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).	71

Rysunek 17. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu a5 BrSdU-SdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).	73
Rysunek 18. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu a6 BrSdU-BrSdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).	75
Rysunek 19. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu b3 SdU-SdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).	77
Rysunek 20. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu b4 ISdU-SdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).	79
Rysunek 21. Widmo MS/MS (jonizacja negatywna) fotoproduktu b5 ISdU-ISdU wraz z przedstawioną identyfikacją jonów fragmentacyjnych (grupy utracone w procesie fragmentacji zaznaczono kolorem czerwonym).	81
Rysunek 22. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu a4 BrSdU-OHdU. ^1H NMR δH (500MHz, DMSO- d_6) 11.78 (1H, s, OH), 8.58 (1H, s, Ar-H), 8.39 (1H, s, Ar-H), 6.13 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, CH), 5.92 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, CH), 5.26 (2H, d, $J = 3.7$ Hz, OH), 5.23 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, OH), 5.10 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, OH), 4.23 – 4.16 (2H, m, CH), 3.85 – 3.75 (2H, m, CH), 3.69 – 3.47 (4H, m, CH), 2.29 – 2.23 (1H, m, CH), 2.18 – 2.05 (3H, m, CH).	83
Rysunek 23. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu a5 BrSdU-SdU. ^1H NMR δH (500MHz, DMSO- d_6) 13.09 (1H, bs, NH), 8.57 (1H, s, Ar-H), 8.50 (1H, s, Ar-H), 6.07 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, CH), 5.93 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, CH), 5.34 – 5.14 (3H, m, OH), 5.09 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, OH), 4.20 (2H, d, $J = 2.9$ Hz, CH), 3.87 – 3.75 (2H, m, CH), 3.71 – 3.44 (4H, m, CH), 2.28 – 2.14 (3H, m, CH), 2.12 – 2.01 (1H, m, CH).	85
Rysunek 24. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu b3 SdU-SdU. (500MHz, DMSO- d_6) 8.38 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, Ar-H), 6.77 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, Ar-H), 5.99 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, CH), 5.27 (2H, d, $J = 4.4$ Hz, OH), 5.06 (2H, t, $J = 5.2$ Hz, OH), 4.25 – 4.13 (2H, m, CH), 3.86 (2H, q, $J = 3.7$ Hz, CH), 3.59 (2H, q, $J = 6.0, 4.5$ Hz, CH), 3.54 (2H, q, $J = 7.3, 5.9$ Hz, CH), 2.38 – 2.23 (2H, m, CH), 2.12 – 1.94 (2H, m, CH).	87
Rysunek 25. Widmo ^1H NMR dla fotoproduktu b5 ISdU-ISdU. (^1H NMR δH (500MHz, DMSO- d_6) 8.63 (2H, s, Ar-H), 5.93 (2H, t, $J = 5.8$ Hz, CH), 5.26 (4H, t, $J = 5$ Hz, OH), 4.22 – 4.16 (2H, m, CH), 3.83 (2H, q, $J = 3.6$ Hz, CH), 3.66 (2H, dt, $J = 12.1, 3.8$ Hz, CH), 3.55 (2H, dt, $J = 12.1, 3.8$ Hz, CH), 2.31 – 2.21 (2H, m, CH), 2.15 – 2.06 (2H, m, CH). ..	89
Rysunek 26. Widma absorpcyjne dla BrSdU oraz ISdU zarejestrowane eksperymentalnie (górny panel) oraz obliczone teoretycznie z użyciem różnych funkcjonałów (dolny panel).	93
Rysunek 27. Porównanie widm absorpcyjnych eksperymentalnych (fioletowa linia) z obliczonymi teoretycznie (zielona linia; DT-DFT, B3LYP, baza funkcyjna 6-31++G(d,p)) dla produktów fotolizy BrSdU: A – a1 dU; B – a2 BrdU; C – a3 SdU; D – a4 BrSdU-OHdU; E – a5 BrSdU-SdU oraz F – a6 BrSdU-BrSdU. Przy poszczególnych widmach przedstawiono struktury fotoproduktów ($R = 2'$ -deoksyrboza).	95
Rysunek 28. Porównanie widm absorpcyjnych eksperymentalnych (fioletowa linia) z obliczonymi teoretycznie (zielona linia; DT-DFT, B3LYP, baza funkcyjna DGDZVP++) dla produktów fotolizy ISdU: A – b1 I; B – b2 IdU; C – b3 SdU-SdU; D – b4 ISdU-SdU	

oraz E – b5 ISdU-ISdU (produkty fotolizy wspólne z BrSdU a1 oraz a3 przedstawiono na Rysunku 27). Przy poszczególnych widmach przedstawiono struktury fotoproduktów (R = 2'-deoksyryboza).	97
Rysunek 29. Chromatogramy wodnych roztworów ODN1: A – przed oczyszczaniem metodą DHPLC oraz B – po oczyszczaniu i liofilizacji. Przy czasie retencji 27,8 min wskazano sygnał odpowiadający fragmentowi DON1. Chromatogramy zarejestrowano przy 260 nm.	103
Rysunek 30. Widma masowe po dekonwolucji zarejestrowane podczas analizy LC-MS dla: A – ODN1, B – ODN2, C – ODN3, D – ODN4, E – ODN5, F – ODN6. Widoczne sygnały odpowiadają wartościom mas molowych zgodnym z teoretycznymi masami wyznaczonymi na podstawie sekwencji nukleotydowych z uwzględnieniem modyfikacji BrSdU.	105
Rysunek 31. Chromatogram roztworu ODN1:ODN2 po hybrydyzacji (Dionex Ultimate 3000 z detektorem DAD ustawionym na 260 nm, kolumna C18 (XBridge OST; 4,6×50 mm; 2,5 μm, 100 Å), program gradientowy: 25-80% fazy B (faza A: 100 mM TEAA, faza B: 100 mM TEAA, 20% ACN) w 40 min w 25°C przy przepływie 1 ml/min).	106
Rysunek 32. Chromatogramy DHPLC zarejestrowane dla dsDNA przed (czarne linie) i po fotolizie (90 kJ/m ² UVA; fioletowe linie) dla roztworów: A – ODN1:ODN2, B – ODN3:ODN4, C – ODN5:ODN6.	108
Rysunek 33. Wynik analizy LC-MS dla roztworów ODN1:ODN2: A – chromatogram TIC przed (czarna linia) i po (fioletowa linia) naświetleniu UVA (90 kJ/m ²). Wskazano sygnały odpowiadające pojedynczym niciom: ODN1 (9253,8 Da) i ODN2 (9234,7 Da) oraz powstającym fotoproduktom (18365,5/18472,7 Da); B – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktów.	111
Rysunek 34. Wynik analizy LC-MS dla roztworów ODN3:ODN4: A – chromatogram TIC przed (czarna linia) i po (fioletowa linia) naświetleniu UVA (90 kJ/m ²). Wskazano sygnały odpowiadające pojedynczym niciom: ODN3 (9222,9 Da) i ODN2 (9265,8 Da) oraz powstającym fotoproduktom (18408,2/18472,7 Da); B – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktu o masie 18472,7 Da oraz C – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktu o masie 18408,2 Da.	112
Rysunek 35. Wynik analizy LC-MS dla roztworów ODN5:ODN6: A – chromatogram TIC przed (czarna linia) i po (fioletowa linia) naświetleniu UVA (90 kJ/m ²). Wskazano sygnały odpowiadające pojedynczym niciom: ODN5 (9229,9 Da) i ODN6 (9259,9 Da) oraz powstającym fotoproduktom (18407,7/18473,2 Da); B – widmo masowe po dekonwolucji dla fotoproduktów.	113
Rysunek 36. Wyniki trawienia enzymatycznego wyizolowanego produktu fotolizy ODN3:ODN4: A – chromatogram prądu jonowego dla próbki kontrolnej po trawieniu; B – powiększony fragment widma masowego fotoproduktu o m/z równym 796,1995; C – chromatogram prądu jonowego dla fotoproduktu dupleksu ODN3:ODN4 po trawieniu enzymatycznym. Na rysunku C wskazano sygnały odpowiadające natywnym nukleozydom.	117
Rysunek 37. Proponowana struktura fotoproduktu powstającego w wyniku fotolizy DNA znakowanego BrSdU. Produkt stanowi addukt (trimer), w którym SdU tworzy kowalencyjne połączenia z adeniną z tej samej nici (wiązanie C5–C8) oraz z tymidyną z nici komplementarnej (wiązanie C6–C5). Strukturę przedstawiono z numeracją atomów	

dla zasad azotowych i należy ją traktować jako schematyczną (brak optymalizacji geometrycznej struktury, w celu przejrzystej prezentacji).....	119
Rysunek 38. Żywotność komórek PC3 po 48 oraz 72 godzinach od traktowania BrSdU lub ISdU w stężeniach od 10^{-4} do 10^{-9} M. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskane na podstawie trzech niezależnych eksperymentów, z których każdy wykonano w trzech powtórzeniach.	124
Rysunek 39. Zdjęcie płytek hodowlanych z utrwalonymi i wybarwionymi koloniami komórek PC3 podczas testu klonogeniczności. Na zdjęciu wskazano płytki z komórkami nietraktowanymi, traktowanymi 100 μ M BrSdU i 100 μ M ISdU oraz wpływ promieniowania na liczbę utworzonych kolonii.	125
Rysunek 40. Zmiany przeżywalności komórek PC3 po traktowaniu: A – BrSdU oraz B – ISdU (stężenia 50 i 100 μ M) w zależności od dawki promieniowania UVA (0, 5, 10 oraz 15 kJ/m^2). Istotna statystycznie różnica między wskazanymi grupami występuje na poziomie ****: $p<0,0001$; ns-statystycznie nieistotne. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie dwóch niezależnych eksperymentów, z których każdy wykonano w dwóch powtórzeniach.	126
Rysunek 41. Analiza cytometryczna cyklu komórek PC3 traktowanych BrSdU lub ISdU oraz promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m^2 : A – histogramy wybarwionych komórek PC3 pokazujące rozkład zawartości DNA; B – analiza ilościowa rozkładu cyklu komórkowego. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Różnice populacji w fazie G2/M dla wskazanych grup są statystycznie istotne na poziomie **: $p<0,01$; ns-statystycznie nieistotne.	128
Rysunek 42. Analiza cytometryczna śmierci komórkowej komórek PC3 traktowanych BrSdU lub ISdU oraz promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m^2 . Przykładowe wykresy punktowe przedstawiają porównanie barwienia MitoSense Red i 7-AAD. Rozkład komórek: Q1 – komórki żywe, Q2 – komórki we wczesnej fazie apoptozy, Q3 – komórki w późnej fazie apoptozy, Q4 – komórki martwe.	130
Rysunek 43. Analiza cytometryczna śmierci komórek PC3 traktowanych A – BrSdU i B – ISdU oraz naświetlonych promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m^2 (staurosporyna (STAU) została wykorzystana jako pozytywna kontrola apoptozy). Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Różnice populacji w we wczesnej fazie apoptozy dla wskazanych grup są statystycznie istotne na poziomie: *: $p<0,05$; ****: $p<0,0001$; ns-statystycznie nieistotne.	131
Rysunek 44. Analiza fosforylacji histonu H2A.X metodą cytometrii przepływowej w komórkach PC3 po ekspozycji na promieniowanie o dawce 10 kJ/m^2 oraz A – BrSdU i B – ISdU. Poziom γ H2A.X zmierzono po 2 i 24 godzinach od napromienienia (poziom γ H2A.X oznacza procent populacji komórek, w której odpowiedź fluorescencyjna przekracza ustalony próg dla markera H2A.X). Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Różnice w fosforylacji H2A.X pomiędzy wskazanymi grupami są statystycznie istotne na poziomie **** $p<0,0001$; ns – statystycznie nieistotne.....	132
Rysunek 45. Analiza fosforylacji histonu H2A.X metodą cytometrii przepływowej po: A – 2 i B – 24 godzinach od naświetlenia – przykładowe wykresy. Strategię bramkowania oparto na wykresie rozproszenia bocznego SSC względem powierzchni sygnału lasera bocznego (466 nm). Na dwuwymiarowym wykresie punktowym SSC względem Alexa	

Fluor 488, komórki γ -H2AX-dodatnie przedstawione są w prawych dolnych kwadrantach, a komórki γ -H2AX-ujemne przedstawione w lewych. Takie samo bramkowanie zostało zastosowane dla komórek kontrolnych oraz kolejnych próbek.	134
Rysunek 46. Efekt synergicznego działania promieniowania UVA w dawce 10 kJ/m ² z A – BrSdU i B – ISdU na stres oksydacyjny w komórkach PC3. Dokсорubicyna (DOX) reprezentuje pozytywną kontrolę produkcji RFT. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia wartość $\pm$ standardowe odchylenie, uzyskana na podstawie trzech niezależnych eksperymentów. Różnice w intensywności fluorescencji DCF pomiędzy wskazanymi grupami są statystycznie istotne na poziomie * p<0,05; ns – statystycznie nieistotne.....	136

Wykaz tabel

Tabela 1. Liczba trwających badań klinicznych z wykorzystaniem terapii fotodynamicznej w różnych stanach chorobowych (z clinicaltrials.gov).....	19
Tabela 2. Zidentyfikowane produkty fotolizy roztworów BrSdU i ISdU. W tabeli porównano eksperymentalne wartości m/z z teoretycznymi, obliczonymi na podstawie struktury chemicznej z wykorzystaniem oprogramowania ChemSketch (ACD/Labs) oraz przedstawiono proponowaną strukturę chemiczną poszczególnych fotoproduktów (R = 2'-deoksyryboza).....	55
Tabela 3. Położenie maksimów absorpcji (nm) oraz ich intensywności dla różnych metod obliczeniowych porównane z wartościami eksperymentalnymi. Wszystkie obliczenia przeprowadzono z uwzględnieniem solwatacji w wodzie (model PCM) oraz z zastosowaniem bazy 6-31++G(d,p) dla BrSdU lub DGDZVP++ dla ISdU w programie Gaussian09. Dla wyników teoretycznych dodatkowo pokazano stany o sile oscylatora $f > 0,05$ lub te, które są najbliższe wartościom eksperymentalnym.	92
Tabela 4. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w badaniach ze wskazaniem podatności na fotochemicznie indukowany dalekozasięgowy transfer elektronu.	102
Tabela 5. Zestawienie teoretycznych (ATDBIO) i eksperymentalnych mas molowych, molowych współczynników ekstynkcji (ϵ) oraz stężeń roboczych dla poszczególnych oligonukleotydów znakowanych BrSdU i nici komplementarnych. Wartości ϵ obliczono metodą najbliższego sąsiada (ATDBIO), z uwzględnieniem korekty dla podstawienia BrSdU. Stężenia obliczono na podstawie pomiaru absorbancji przy 260 nm i zależności wynikającej z prawa Lamberta-Beera.....	104
Tabela 6. Zestawienie pól powierzchni sygnałów dla nici komplementarnej, nici znakowanej BrSdU oraz fotoproduktów zarejestrowanych podczas analiz chromatograficznych przed i po fotolizie dupleksów ODN1:ODN2, ODN3:ODN4 i ODN5:ODN6. Dla każdej próbki przedstawiono średnie wartości pola powierzchni sygnału, odchylenie standardowe oraz procentowy zanik intensywności sygnałów nici DNA.....	109
Tabela 7. Zestawienie procentowego zaniku intensywności sygnału nici znakowanej BrSdU zarejestrowanego podczas analiz chromatograficznych przed i po fotolizie (25 kJ/m ² ; 350 nm) dupleksów ODN1:ODN2, ODN3:ODN4 i ODN5:ODN6. Dla każdego modelu DNA obliczono wydajność kwantową procesu fotolizy (Φ).	114
Tabela 8. Średnie wydajności wysiewu komórek PC3 uzyskane podczas testu klonogeniczności.	127

Tabela 9. Ilościowa cytometryczna analiza śmierci komórkowej komórek PC3 traktowanych BrSdU lub ISdU oraz promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m². 130

Tabela 10. Ilościowa cytometryczna analiza poziomu γ H2AX w komórkach PC3 traktowanych BrSdU lub ISdU oraz promieniowaniem UVA w dawce 10 kJ/m². 133

Literatura

- ¹ Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* (2024) PMID: 38572751.
- ² dos Santos A.F., de Almeida D.Q., Terra L.F., Baptista M.S., Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review. *J. Cancer Metastasis Treat.* (2019) 5(25)
- ³ Mariño-Ocampo N., Dibona-Villanueva L., Escobar-Álvarez E., Guerra-Díaz D., Zúñiga-Núñez D., Fuentealba D., Robinson-Duggon J. Recent photosensitizer developments, delivery strategies and combination-based approaches for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* (2023) 99(2), 469-497.
- ⁴ Jiang W., Liang M., Lei Q., Li G., Wu S. The current status of photodynamic therapy in cancer treatment. *Cancers* (2023) 15(3), 585.
- ⁵ Moan J., Peng Q. European society photobiology. Photodynamic therapy (comprehensive series in photochemical and photobiological sciences). Chapter 1: an outline of the history of PDT. *The royal society of chemistry* (2003) s. 1-9.
- ⁶ McDonagh A.F. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. *J. Perinatol.* (2001) 21(1), 7-12.
- ⁷ Cauvin J. F. *Des bienfaits de l'insolation* (1815).
- ⁸ Finsen N.R. Remarks on the red-light treatment of small-pox: is the treatment of small-pox patients in broad daylight warrantable? *British medical journal* (1903) 1(2214), 1297.
- ⁹ Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharm.* (2021) 13(9), 1332.
- ¹⁰ Abdel M. H. Photodynamic Therapy: From Theory to Application. *Springer* (2014) 1-23
- ¹¹ Raab O. Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Zeitschr Biol.* (1900) 39, 524-546.
- ¹² von Tappeiner H., Jesionek A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Muench Med. Wochenschr.* (1903) 47, 2042-2044.
- ¹³ von Tappeiner H., Jodlbauer A. Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. *Vogel* (1907).
- ¹⁴ Lipson R.L., Baldes E.J., Olsen A.M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Nat. Cancer Inst.* (1961) 26, 1-8

-
- ¹⁵ Karges J. Clinical development of metal complexes as photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2022) 61(5), e202112236.
- ¹⁶ Alvarez N., Sevilla A. Current advances in photodynamic therapy (PDT) and the future potential of PDT-combinatorial cancer therapies. *Int. J. Mol. Sci.* (2024) 25(2), 1023.
- ¹⁷ Rizvi I., Celli J.P., Evans C.L., Abu-Yousif A.O., Muzikansky A., Pogue B.P., Finkelstein D., Hasan T. Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. *Cancer Res.* (2010) 70(93), 19-28.
- ¹⁸ Ahn T.G., Lee B.R., Choi E.Y., Kim D.W., Han S.J. Photodynamic therapy for breast cancer in a BALB/c mouse model. *J. Gynecol. Oncol.* (2012) 23, 115-9.
- ¹⁹ Montazerabadi A.R., Sazgarnia A., Bahreyni-Toosi M.H., Ahmadi A., Shakeri-Zadeh A., Aledavood A. Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2012) 9, 46-51.
- ²⁰ Agostinis P., Buytaert E., Breysens H., Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2004) 3, 721-9.
- ²¹ Klotz L.O., Kröncke K.D., Sies H. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2003) 2, 88-94.
- ²² Oleinick N.L., Morris R.L., Nieminen A. Photodynamic therapy-induced apoptosis. *Apoptosis, Senescence, and Cancer* (2007) s. 557-78.
- ²³ Kato H., Furuse K., Sato M. Photodynamic therapy for lung cancer. *Photodiagn. Photodyn.* (2013) 10(2), 127-131.
- ²⁴ Simone C.B., Friedberg J.S., Glatstein E., Stevenson J.P., Sterman D.H., Hahn S.M. Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* (2016) 11(11), 1903-1909.
- ²⁵ Huang H.C., Mallidi S., Liu J., Chiang C.T., Mai Z., Goldschmidt R., Ebrahim-Zadeh N., Rizvi I., Hasan T. Photodynamic therapy synergizes with irinotecan to overcome compensatory mechanisms and improve treatment outcomes in pancreatic cancer. *Cancer Res.* (2016) 76(5), 1066-1077.
- ²⁶ Babilas P., Landthaler M., Szeimies R.M. Photodynamic therapy in dermatology. *Eur. J. Dermatol.* (2006) 16(4), 340-348.
- ²⁷ Axer-Siegel R., Ehrlich R., Rosenblatt I., Kramer M., Priel E., Yassur Y., Weinberger D. Photodynamic therapy for occult choroidal neovascularization with pigment epithelium detachment in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* (2004) 122(4), 453-459.
- ²⁸ Pérez-Laguna V., Gilaberte Y., Millán-Lou M.I., Agut M., Nonell S., Rezusta A., Hamblin M.R. A combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infections: a systematic review. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2019) 18, 1020-1029.
- ²⁹ Chen Z., Woodburn K.W., Shi C., Adelman D.C., Rogers C., Simon D.I. Photodynamic therapy with motexafin lutetium induces redox-sensitive apoptosis of vascular cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2001) 21(5), 759-764.
- ³⁰ Wańczura P., Aebisher D., Kłosowicz M., Myśliwiec A., Dynarowicz K., Bartusik-Aebisher D. Application of photodynamic therapy in cardiology. *Int. J. Mol. Sci.* (2024) 25(6), 3206.

-
- ³¹ <https://clinicaltrials.gov/> (dostęp: 02.07.2025).
- ³² Kou J., Dou D., Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget* (2017) 8, 81591.
- ³³ Park J., Lee Y.K., Park I.K., Hwang S.R. Current limitations and recent progress in nanomedicine for clinically available photodynamic therapy. *Biomedicines* (2021) 9, 85.
- ³⁴ Abrahamse H., Hamblin M.R., New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* (2016) 473, 347.
- ³⁵ Sachar M., Anderson K.E., Ma X. Protoporphyrin IX: the good, the bad, and the ugly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2016) 356, 267–275.
- ³⁶ Kitajima Y., Ishii T., Kohda T., Ishizuka M., Yamazaki K., Nishimura Y., Tanaka T., Dan S., Nakajima M. Mechanistic study of PpIX accumulation using the JFCR39 cell panel revealed a role for dynamin 2-mediated exocytosis. *Sci. Rep.* (2019) 9, 8666.
- ³⁷ Huang X., Zhang S., Tang, Y., Zhang X., Bai Y., Pang H. Advances in metal–organic framework-based nanozymes and their applications. *Coord. Chem. Rev.* (2021) 449, 214216.
- ³⁸ Visvader J.E., Lindeman G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* (2008) 8(10), 755–768.
- ³⁹ Lima E., Reis L.V. Photodynamic therapy: from the basics to the current progress of N-heterocyclic-bearing dyes as effective photosensitizers. *Mol.* (2023) 28(13), 5092.
- ⁴⁰ Borgia F., Giuffrida R., Caradonna E., Vaccaro M., Guarneri F., Cannavò S.P. Early and late onset side effects of photodynamic therapy. *Biomed.* (2018) 6(1), 12.
- ⁴¹ Trigiante G., Xu Y.Z. 4-thiothymidine and its analogues as UVA-activated photosensitizers. In *Photodynamics Therapy: Fundamentals, Applications and Health Outcomes* (Edited by A. G. Hugo). Nova Science Publishers, Incorporated (2015) s. 193–206.
- ⁴² Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C.J., Sibata C.H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* (2004) 1(1), 27–42.
- ⁴³ Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* (2004) 1(4), 279–293.
- ⁴⁴ Steiner U.E. Fundamentals of Photophysics, Photochemistry, and Photobiology. In *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*. Springer (2014) s. 25–58.
- ⁴⁵ Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* (2009) 96(1), 1–8.
- ⁴⁶ Baptista M.S., Cadet J., Di Mascio P., Ghogare A.A., Greer A., Hamblin M.R., Lorente C., Nunez S.C., Ribeiro M.S., Thomas A.H., Vignoni M., Yoshimura T.M. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: Guidelines and mechanistic pathways. *Photochem. Photobiol.* 2017 93(4), 912–919.
- ⁴⁷ Buchko G.W., Wagner J.R., Cadet J., Raoul S., Weinfeld M. Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine. *Biochim. Biophys. Acta* (1995) 1263, 17–24.
- ⁴⁸ Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* (2003) 17(10), 1195–1214.

-
- ⁴⁹ Dolmans D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* (2003) 3, 380–387.
- ⁵⁰ You Q., Li N. Photodynamic therapies: basic mechanism, applications and functional nanomaterial-based drug delivery system for cancer. In Fitzgerald F. *Photodynamic Therapy (PDT): Principles, Mechanisms and Applications*. Nova Science Publishers, Inc. (2017).
- ⁵¹ Rocha L.G.B. Development of a novel photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Ph.D. Thesis, University of Coimbra* (2015).
- ⁵² Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers. Med. Sci.* (2009) 24(2), 259–68.
- ⁵³ Allison R.R., Sibata C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* (2010) 7, 61–75.
- ⁵⁴ Yao Q., Fan J., Long S., Zhao X., Li H., Du J., Shao K., Peng X. The concept and examples of type-III photosensitizers for cancer photodynamic therapy. *Chem.* (2022) 8, 197–209.
- ⁵⁵ Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer-a review of the current clinical status. *Front. Chem.* (2021) 9, 686303.
- ⁵⁶ Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W. Gollnick, S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J, Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J. Clin.* (2011) 61(4), 250–281.
- ⁵⁷ Zhao B., He Y. Recent Advances in the Prevention and Treatment of Skin Cancer Using Photodynamic Therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* (2010) 10, 1797–1809.
- ⁵⁸ Algorri J.F., Ochoa M., Roldan-Varona P., Rodriguez-Cobo L., Lopez-Higuera J.M. Photodynamic therapy: a compendium of latest reviews. *Cancers* (2021) 13(17), 4447.
- ⁵⁹ Hahn S, Glatstein E. The emergence of photodynamic therapy as a major modality in cancer treatment. *Rev. Contemp. Pharmacother.* (1999) 10, 69–74.
- ⁶⁰ D’Cruz A.K., Robinson M.H., Biel M.A., mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck* (2004) 26, 232–240.
- ⁶¹ Kim T.E., Chang J.E. Recent studies in photodynamic therapy for cancer treatment: From basic research to clinical trials. *Pharmaceutics*, (2023) 15(9), 2257.
- ⁶² Alsaab H.O., Alghamdi M.S., Alotaibi A.S., Alzhrani R., Alwuthaynani F., Althobaiti Y.S., Almalki A.H., Sau S., Iyer A.K. Progress in clinical trials of photodynamic therapy for solid tumors and the role of nanomedicine. *Cancers* (2020) 12(10), 2793.
- ⁶³ <http://gco.iarc.fr/en> (dostęp: 02.07.2025).
- ⁶⁴ World Health Organization (WHO) „Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019” (2020). <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death> (dostęp: 02.07.2025).
- ⁶⁵ Gheewala T., Skwor T., Munirathinam G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. *Oncotarget* (2017) 8(18), 30524.
- ⁶⁶ Tai S., Sun Y., Squires J.M., Zhang H., Oh W.K., Liang C.Z., Huang J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma *The Prostate* (2017) 71(15), 1668–1679.

-
- ⁶⁷ Azzouzi A.R., Barret E., Moore C.M., Villers A., Allen C., Scherz A., Muir G., de Wildt M., Barber N.J., Lebdaï S., Emberton M. TOOKAD® Soluble vascular-targeted photodynamic therapy (VTP) for low-risk prostate cancer: a prospective, randomised, open-label, phase 3 trial. *BJU international* (2017) 112(6), 766-774.
- ⁶⁸ Flegar L., Buerk B., Proschmann R., Propping S., Groeben C., Baunacke M., Herout R., Huber J., Thomas C., Borkowetz A. Vascular-targeted photodynamic therapy in unilateral low-risk prostate cancer in Germany: 2-yr single-centre experience in a real-world setting compared with radical prostatectomy. *Eur. Urol. Focus* (2022) 8, 121–7.
- ⁶⁹ Wang H., Mu X., He H., Zhang X.D. Cancer Radiosensitizers. *Trends Pharmacol. Sci.* (2018) 39, 24–48.
- ⁷⁰ 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) s. 125-169.
- ⁷¹ Rak J., Chomicz L., Wiczek J., Westphal K., Zdrowowicz M., Wityk P., Żyndul M., Makurat S., Golon Ł. Mechanisms of damage to DNA labeled with electrophilic nucleobases induced by ionizing or UV radiation. *J. Phys. Chem. B.* (2015) 119(26), 8227-8238.
- ⁷² Ashwood B., Pollum M., Crespo-Hernández C.E. Photochemical and photodynamical properties of sulfur-substituted nucleic acid bases *Photochem. Photobiol.* (2019) 95(1), 33-58.
- ⁷³ Brem R., Guven M., Karran P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. *Free Radic. Biol. Med.* (2017) 107, 101-109.
- ⁷⁴ Reelfs O., Karran P., Young A.R. 4-thiothymidine sensitization of DNA to UVA offers potential for a novel photochemotherapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2012) 11(1), 148-154.
- ⁷⁵ Reelfs O., Macpherson P., Ren X., Xu Y.Z., Karran P., Young A.R. Identification of potentially cytotoxic lesions induced by UVA photoactivation of DNA 4-thiothymidine in human cells. *Nucleic Acids Res.* (2011) 39(22), 9620-9632.
- ⁷⁶ Pridgeon S.W., Heer R., Taylor G.A., Newell D.R., O'toole K., Robinson M., Xu Y-Z., Karran P., Boddy, A.V. Thiothymidine combined with UVA as a potential novel therapy for bladder cancer. *Br. J. Cancer.* (2011) 104(12), 1869-1876.
- ⁷⁷ Fox J.J., Van Praag D., Wempen I., Doerr I.L., Cheong L., Knoll J.E., Eidinoff M.L., Bendich A., Brown, G.B. Thiation of nucleosides. II. Synthesis of 5-methyl-2'-deoxycytidine and related pyrimidine nucleosides1. *J. Am. Chem. Soc.* (1959) 81(1), 178-187.
- ⁷⁸ Scheit K.G. The synthesis of 4-thiouridine-5'-diphosphate, 4-thiouridine-5' - triphosphate and desoxy-4-thiothymidine-5'-triphosphate. *Chem. Ber.* (1968) 101(4), 1141-7.
- ⁷⁹ Hofer B., Koster H. Enzymatic synthesis, ligation, and restriction of DNA containing deoxy-4-thiothymidine. *Nucleic Acids Res.* (1981) 9(4), 753-67.
- ⁸⁰ Connolly B.A., Newman P.C. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 4-thiothymidine, 5-methyl-2-pyrimidinone-1-beta-D(2'-deoxyribose) and 2-thiothymidine. *Nucleic Acids Res.* (1989) 17(13), 4957-74.
- ⁸¹ Nikiforov T.T., Connolly B.A. Oligodeoxynucleotides containing 4-thiothymidine and 6-thiodeoxyguanosine as affinity labels for the Eco RV restriction endonuclease and modification methylase. *Nucleic Acids Res.* (1992) 20(6), 1209-14.

-
- ⁸² Harada Y., Okabe C., Kobayashi T., Suzuki T., Ichimura T., Nishi N., Xu Y.Z. Ultrafast intersystem crossing of 4-thiothymidine in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Lett.* (2010) 1(2), 480-484.
- ⁸³ Cadet J., Douki T. Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin, *J. Invest. Dermatol.* (2011) 131, 1005–1007.
- ⁸⁴ Massey A., Xu Y.Z., Karran P. Photoactivation of DNA thiobases as a potential novel therapeutic option. *Curr. Biol.* (2001) 11(14), 1142-1146.
- ⁸⁵ Gemenetzidis E., Shavorskaya O., Xu Y.Z., Trigiante G. Topical 4-thiothymidine is a viable photosensitizer for the photodynamic therapy of skin malignancies. *J. Dermatolog. Treat.* (2013) 24(3), 209-214.
- ⁸⁶ Karran P., Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat. Rev. Cancer.* (2008) 8(1), 24-36.
- ⁸⁷ O'Donovan P., Perrett C.M, Zhang X., Montaner B., Xu Y-Z., Harwood C.A, McGregor J.M, Walker S.L, Hanaoka F.P, Karran P. Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Sci.* (2005) 309, 1871–1874.
- ⁸⁸ Euvrard S., Kanitakis J., Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* (2003) 348, 1681–1691.
- ⁸⁹ Brem R., Li F., Karran P. Reactive oxygen species generated by thiopurine/UVA cause irreparable transcription-blocking DNA lesions. *Nucleic Acids Res.* (2009) 37(6), 1951-1961.
- ⁹⁰ Brem R., Daehn I., Karran P. Efficient DNA interstrand crosslinking by 6-thioguanine and UVA radiation. *DNA repair* (2011) 10(8), 869-876.
- ⁹¹ Attard N R., Karran P. UVA photosensitization of thiopurines and skin cancer in organ transplant recipients. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2012) 11(1), 62-68.
- ⁹² Brem R., Karran P. Multiple forms of DNA damage caused by UVA photoactivation of DNA 6-thioguanine. *Photochem. Photobiol.* (2012) 88(1), 5-13.
- ⁹³ Peak M.J., Midden W.R., Babasick D.M., Haugen D.A. Photochemistry of 4-thiouridine and thymine. *Photochem. Photobiol.* (1988) 48(2), 229-232.
- ⁹⁴ Ortiz-Rodríguez L.A., Crespo-Hernández C.E. Thionated organic compounds as emerging heavy-atom-free photodynamic therapy agents. *Chem. Sci.* (2020) 11(41), 11113-11123.
- ⁹⁵ Hafner M., Landthaler M., Burger L., Khorshid M., Hausser J., Berninger P., Rothballer A., Ascano J.M., Jungkamp A.C., Munschauer M., Ulrich A., Wardle G.S., Dewell S., Zavolan M., Tuschl T. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* (2010) 141(1), 129-141.
- ⁹⁶ Pollum M., Lam M., Jockusch S., Crespo-Hernández C.E. Dithionated nucleobases as effective photodynamic agents against human epidermoid carcinoma cells. *Chem. Med. Chem.* (2018) 13(10), 1044-1050.
- ⁹⁷ Pollum M. Applying fundamental photochemistry to drive drug development: The Photo-dynamics and reactions of sulfursubstituted nucleic acids. *Doctor of Philosophy, Case Western Reserve University, USA*, (2017) s. 55-87.
- ⁹⁸ Cadet J., Berger M., Decarroz C., Wagner J.R., Van Lier J.E., Ginot Y.M., Vigny P. Photosensitized reactions of nucleic acids. *Biochimie* (1986) 68(6), 813-834

-
- ⁹⁹ Zeng Y., Wang Y. UVB-induced formation of intrastrand cross-link products of DNA in MCF-7 cells treated with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Biochemistry* (2007) 46(27), 8189-8195.
- ¹⁰⁰ Hicke B.J., Willis M.C., Koch T.H., Cech T.R. Telomeric protein-DNA point contracts identified by photo-crosslinking using 5-bromodeoxyuridine. *Biochemistry* (1994) 33(11), 3364-3373.
- ¹⁰¹ Hutchinson F., Köhnlein W. The Photochemistry of 5-bromouracil and 5-iodouracil in DNA. In *Progress in molecular and subcellular biology* (1980) Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. s. 1-42.
- ¹⁰² Dolbeare F., Gratzner H., Pallavicini M.G., Gray J.W. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1983) 80(18), 5573-5577.
- ¹⁰³ Chen T., Cook G.P., Koppisch A.T., Greenberg M.M. Investigation of the origin of the sequence selectivity for the 5-halo-2'-deoxyuridine sensitization of DNA to damage by UV-irradiation. *J. Am. Chem. Soc.* (2000) 122, 3861-3866.
- ¹⁰⁴ Sugiyama H., Tsutsumi Y., Fujimoto K., Saito I. Photoinduced deoxyribose C2' oxidation in DNA. Alkali-dependent cleavage of erythrose-containing sites via a retroaldol reaction. *J. Am. Chem. Soc.* (1993) 115, 4443-4448.
- ¹⁰⁵ Zeng Y., Wang Y. Sequence-dependent formation of intrastrand crosslink products from the UVB irradiation of duplex DNA containing a 5-bromo-2'-deoxyuridine or 5-bromo-2'-deoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* (2006) 34(22), 6521-6529.
- ¹⁰⁶ Tashiro R., Sugiyama H. Photoreaction of DNA containing 5-halouracil and its products. *Photochem. Photobiol.* (2022) 98(3), 532-545.
- ¹⁰⁷ Brem R., Zhang X., Xu Y.Z., Karran P. UVA photoactivation of DNA containing halogenated thiopyrimidines induces cytotoxic DNA lesions. *J. Photochem. Photobiol. B* (2015) 145, 1-10.
- ¹⁰⁸ Zhang X.H., Yin H.Y., Trigiante G., Brem R., Karran P., Pitak M.B., Coles S.J., Xu Y.Z. 5-Iodo-4-thio-2'-deoxyuridine: Synthesis, Structure, and Cytotoxic Activity. *Chem. Let.* (2015) 44(2), 147-149.
- ¹⁰⁹ Wenska G., Taras-Goślińska K., Skalski B., Hug G.L., Carmichael I., Marciniak B. Generation of thiyl radicals by the photolysis of 5-iodo-4-thiouridine. *J. Org. Chem.* (2005) 70(3), 982-988.
- ¹¹⁰ Wenska G., Taras-Goślińska K., Lamparska-Kupsik K., Skalski B., Gdaniec M., Gdaniec Z. Photochemical transformations of 5-halogeno-4-thiouridines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2002) 1, 53-57.
- ¹¹¹ Haigh J.D. The Sun and the Earth's Climate: Absorption of solar spectral radiation by the atmosphere. *Living Rev. Sol. Phys.* (2007) 4(2), 2
- ¹¹² Sinha R.P., Häder D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2002) 1(4), 225-236.
- ¹¹³ Cadet J., Berger M., Douki T., Morin B., Raoul S., Ravanat J. L., Spinelli S. Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biological chemistry* (1997) 378(11), 1275-1286.

-
- ¹¹⁴ Cadet J., Voituriez L., Hruska F.E., Kan L.S., Leeuw F.A.D., Altona C. Characterization of thymidine ultraviolet photoproducts. Cyclobutane dimers and 5, 6-dihydrothymidines. *Canadian journal of chemistry* (1985) 63(11), 2861-2868.
- ¹¹⁵ Warren M.A., Murray J.B., Connolly B.A. Synthesis and characterisation of oligodeoxynucleotides containing thio analogues of (6-4) pyrimidine-pyrimidinone photo-dimers. *J. Mol. Biol.* (1998) 279(1), 89-100.
- ¹¹⁶ Taylor J.S., Cohrs M.P. DNA, light, and Dewar pyrimidinones: the structure and biological significance to TpT3. *J. Am. Chem. Soc.* (1987) 109(9), 2834-2835.
- ¹¹⁷ Ravanat J.L., Douki T., Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* (2001) 63(1-3), 88-102.
- ¹¹⁸ Cadet J., Mouret S., Ravanat J.L., Douki T. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochem. Photobiol.* (2012) 88(5), 1048-1065.
- ¹¹⁹ Vechtomova Y.L., Telegina T.A., Buglak A.A., Kritsky M.S. UV radiation in DNA Damage and repair involving DNA-photolyases and cryptochromes. *Biomedicines* (2021) 9, 1564.
- ¹²⁰ Sugiyama H., Tsutsumi Y., Saito I. Highly Sequence-selective photoreaction of 5-bromouracil-containing deoxyhexanucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* (1990) 112, 6720-6721.
- ¹²¹ Sugiyama H., Fujimoto K., Saito I. Stereospecific 1,2-HydrideShift in ribonolactone formation in the photoreaction of 2'-iododeoxyuridine. *J. Am. Chem. Soc.* (1995) 117, 2945-2946.
- ¹²² Cecchini S., Masson C., La Madeleine C., Huels M.A., Sanche L., Wagner J.R., Hunting D.J., Interstrand cross-link induction by UV radiation in bromodeoxyuridine-substituted DNA: dependence on DNA conformation. *Biochemistry* (2005) 44, 16957-16966.
- ¹²³ Watanabe T., Bando T., Xu Y., Tashiro R., Sugiyama H. Efficient generation of 2'-deoxyuridin-5-yl at 5'-(G/C) AAXUXU-3'(X= Br, I) sequences in duplex DNA under UV irradiation. *J. Am. Chem. Soc.* (2005) 127, 44-45.
- ¹²⁴ Wicz J., Miloch J., Rak J. UV-induced strand breaks in double-stranded DNA labeled with 5-bromouracil: frank or secondary? *J. Phys. Chem. Lett.* (2013) 4, 4014-4018.
- ¹²⁵ Watanabe T., Tashiro R., Sugiyama H. Photoreaction at 5'-(G/C)AA(Br)UT-3' sequence in duplex DNA: efficient generation of uracil-5-yl radical by charge transfer. *J. Am. Chem. Soc.* (2007) 129, 8163-8168.
- ¹²⁶ Tashiro R., Nakamura K., Sugiyama H. Photoreaction of iodouracil in DNA duplex; C-I bond is cleaved via two different pathways 'homolysis and heterolysis'. *Tetrahedron Lett.* (2008) 49, 428-431.
- ¹²⁷ Hong H., Wang Y. Formation of intrastrand cross-link products between cytosine and adenine from UV irradiation of d((Br)CA) and duplex DNA containing a 5-bromocytosine. *J. Am. Chem. Soc.* (2005) 127, 13969-13977.
- ¹²⁸ Zdrowowicz M., Michalska B., Żylicz-Stachula A., Rak J. Photoinduced single strand breaks and intrastrand cross-links in an oligonucleotide labeled with 5-bromouracil. *J. Phys. Chem. B* (2014) 118, 5009-5016.
- ¹²⁹ Nejedlý K., Kittner R., Pospíšilová Š., Kypr J. Crosslinking of the complementary strands of DNA by UV light: dependence on the oligonucleotide composition of the UV irradiated DNA. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* (2001) 1517, 365-375.

-
- ¹³⁰ Nowak-Karnowska J., Chebib Z., Milecki J., Franzen S., Skalski B. Highly efficient fluorescent interstrand photo-crosslinking of DNA duplexes labeled with 5-fluoro-4-thio-2'-O-methyluridine. *ChemBio-Chem* (2014) 15, 2045–2049.
- ¹³¹ 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? *Mol.* (2019) 24, 2819.
- ¹³² Makurat S., Spisz P., Kozak W., Rak J., Zdrowowicz M. 5-Iodo-4-thio-2'-deoxyuridine as a sensitizer of X-ray induced cancer cell killing, *Int. J. Mol. Sci.* (2019) 20, 1308.
- ¹³³ Jacquemin D., Wathelet V., Perpète E.A., Adamo C. Extensive TD-DFT benchmark: singlet-excited states of organic molecules. *J. Chem. Theory. Comput.* (2009) 5(9), 2420–2435.
- ¹³⁴ Botti S., Schindlmayr A., Del Sole R., Reining L. Time-dependent density-functional theory for extended systems. *Rep. Prog. Phys.* (2007) 70(3), 357.
- ¹³⁵ Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* (1993) 98(7), 5648–5652.
- ¹³⁶ Ditchfield R., Hehre W.J., Pople J.A. Self-Consistent molecular orbital methods. 9. extended gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.* (1971) 54, 724.
- ¹³⁷ Clark T., Chandrasekhar J., Spitznagel G.W., Schleyer P.R. efficient diffuse function-augmented basis-sets for anion calculations. III. The 3-21+G basis set for 1st-row elements, Li-F. *J. Comput. Chem.* (1983) 4(3), 294–301.
- ¹³⁸ Frisch M.J., Pople J.A., Binkley J.S. Self-consistent molecular orbital methods. 25. supplementary functions for gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.* (1984) 80, 3265–69.
- ¹³⁹ Godbout N., Salahub D.R., Andzelm J., Wimmer E. Optimization of gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. part I. boron through neon, optimization technique and validation. *Can. J. Chem.* (1992) 70(2), 560–571.
- ¹⁴⁰ Sosa C., Andzelm J., Elkin B.C., Wimmer E., Dobbs K.D., Dixon D.A. A local density functional study of the structure and vibrational frequencies of molecular transition-metal compounds. *J. Phys. Chem.* (1992) 96(16), 6630–6636.
- ¹⁴¹ Yanai T., Tew D.P., Handy N.C. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* (2004) 393(1–3), 51–57.
- ¹⁴² 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), 215–247.
- ¹⁴³ Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *J. Chem. Phys.* (1999) 110(13), 6158–6170.
- ¹⁴⁴ Chai J.D., Head-Gordon M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2008) 10, 6615–6620.
- ¹⁴⁵ Yurieva A.G., Poleshchuk O.K., Filimonov V.D. Comparative analysis of a full-electron basis set and pseudopotential for the iodine atom in DFT quantum-chemical calculations of iodine-containing compounds. *J. Struct. Chem.* (2008) 49, 548–552.

- ¹⁴⁶ Rak J., Gutowski M., Dokurno P., Thanh H.V., Błażejowski J. Theoretical studies on structure, thermochemistry, vibrational spectroscopy, and other features of ZrX₂-6 (X=F, Cl, Br, I): coulombic energy in inorganic and organic hexahalogenozirconates. *J. Chem. Phys.* (1994) 100, 5810–5820.
- ¹⁴⁷ Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* (2005) 105, 2999-3093
- ¹⁴⁸ Lu T., Chen F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.* (2012) 33(5), 580-592.
- ¹⁴⁹ <https://atdbio.com/tools/oligo-calculator> (dostęp: 02.07.2025)
- ¹⁵⁰ Belmokhtar C.A., Hillion J., Ségal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Oncogene* (2001) 20(26), 3354-3362.
- ¹⁵¹ Westphal K., Zdrowowicz M., Zylicz-Stachula A., Rak J. Chemically–enzymatic synthesis of photosensitive DNA. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* (2017) 167, 228-235.
- ¹⁵² Letsinger R.L. Deaminase activity of commercial spleen phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1968) 30, 273–277.
- ¹⁵³ Deans A.J., West S.C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer* (2011) 11(7), 467-480.
- ¹⁵⁴ Muniandy P.A., Liu J., Majumdar A., Liu S.T., Seidman M.M. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (2010) 45(1), 23-49.
- ¹⁵⁵ Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.* (2006) 1(5), 2315–2319.
- ¹⁵⁶ Rosenberg M., Azevedo N. F., Ivask A. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Sci. Rep.* (2019) 9(1), 6483.
- ¹⁵⁷ <https://cytekbio.com/products/guava-mitodamage-kit?variant=40651392385060> (dostęp: 02.07.2025)
- ¹⁵⁸ Steel G.G. Basic clinical radiobiology (2002) London, New York.
- ¹⁵⁹ LeBel C.P., Ischiropoulos H, Bondy S.C, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* (1992) 5, 227-231.
- ¹⁶⁰ Pavey S., Russell T., Gabrielli B., G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation, *Oncogene* (2001) 20(43), 6103–6110.
- ¹⁶¹ Blackford A.N., Jackson S.P., ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the DNA damage response, *Mol. Cell.* (2017) 66, 801–817.
- ¹⁶² Van Oosten M., Rebel H., Friedberg E.C., Van Steeg H., Van Der Horst G.T.J., Van Kranen H.J., Westerman A., Van Zeeland A.A., Mullenders L.H.F., De Gruijl F.R., Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2000) 97, 11268–11273.
- ¹⁶³ Taylor W.R., Grabovich A., Targeting the cell cycle to kill cancer cells, *Pharmacology: Principles and Practice* (2009) 433–433.

Publikacja wchodząca w skład pracy doktorskiej

Czaja A., Datta M., Rak J., Zdrowowicz M. Halogen substituted 4-thio-2'-deoxyuridines as photosensitizers for the photodynamic therapy of prostate cancer. An in vitro study. (2025) *Spectrochim. Acta - A: Mol. Biomol. Spectrosc.* (2025) 345, 1-10.



Halogen substituted 4-thio-2'-deoxyuridines as photosensitizers for the photodynamic therapy of prostate cancer. An in vitro study

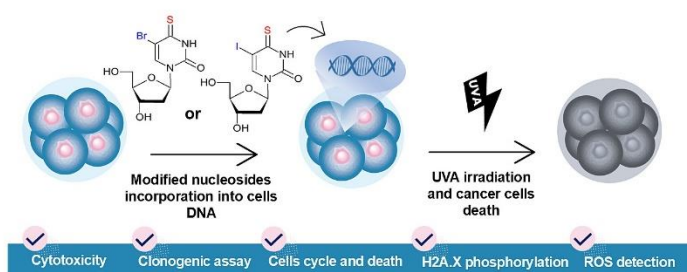
Anna Czaja, Magdalena Datta, Janusz Rak^{*}, Magdalena Zdrowowicz^{*}

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

HIGHLIGHTS

- BrSdU and ISdU are effective UVA-activated photosensitizers.
- MTT tests confirm that BrSdU/ISdU exhibit negligible dark cytotoxicity in PC3 cells.
- Clonogenic assays reveal that UVA irradiation of labeled cells reduces survival.
- Exposure of PC3 cells to BrSdU or ISdU, in combination with UVA induced G2/M arrest.
- Exposure of PC3 cells to BrSdU or ISdU, in combination with UVA causes DSBs.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Photosensitizer
 Photodynamic therapy
 Modified nucleosides
 Clonogenic assay
 Reactive oxygen species
 Double strand breaks

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive modality that employs a photosensitizer (PS) and light exposure source within the PS's optimal absorption range to induce selective cytotoxic effects. This study investigates 5-bromo-4-thio-2'-deoxyuridine (BrSdU) and 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine (ISdU), both modified nucleoside (MN)-based photosensitizers. The presence of the sulfur atom in their thionucleoside structures shifts their maximum absorption to approximately 350 nm, enabling efficient activation under UVA irradiation and minimizing the inner filter effect observed with conventional halogenated nucleosides. MTT assays confirm that BrSdU and ISdU exhibit negligible dark cytotoxicity in PC3 prostate cancer cells. In contrast, clonogenic assays reveal that UVA irradiation of BrSdU/ISdU-labeled cells significantly enhances cell lethality. Mechanistic analysis demonstrates that the combined treatment induces (1) a decrease in viable cell population with a concomitant increase in early apoptotic cells, (2) G2/M phase cell cycle arrest, (3) elevated levels of DNA double-strand breaks compared to UVA-only controls, and (4) no significant alteration in intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. These results suggest that BrSdU and ISdU function as effective UVA-activated

Abbreviations: 7AAD, 7- aminoactinomycin-D; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; BrSdU, 5-bromo-4-thio-2'-deoxyuridine; BrU, 5-bromouracil; CLs, cross-links; DCF, 2',7'- dichlorodihydrofluorescein; DCFH-DA, 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate; dG, 2'-deoxyguanine; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOX, doxorubicin; DPCs, DNA-protein crosslinks; DSB, double-strand break; ET, electron transfer; FBS, fetal bovine serum; HPLC, high-performance liquid chromatography; IdU, 5-iodo-2'-deoxyuridine; ISdU, 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine; IU, 5-iodouracil; LC-MS, liquid chromatography mass spectrometry; PS, photosensitizer; ROS, reactive oxygen species; ³SdT, 4-thio-2'-deoxythymidine; SSB, single-strand break; SU, 4-thiouridine; STAU, staurosporine.

^{*} Corresponding authors.

E-mail addresses: janusz.rak@ug.edu.pl (J. Rak), magdalena.zdrowowicz@ug.edu.pl (M. Zdrowowicz).

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126802>

Received 22 April 2025; Received in revised form 26 July 2025; Accepted 6 August 2025

Available online 8 August 2025

1386-1425/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

photosensitizers, mediating DNA-targeted photodynamic damage through mechanisms largely independent of ROS generation, and hold promise for further development in targeted cancer therapies.

1. Introduction

Photodynamic therapy is an alternative therapeutic modality to radiotherapy that employs non-ionizing low toxicity light instead of highly cytotoxic ionizing radiation to target and destroy cancer cells. Just as a radiosensitizer is central to the efficacy of radiotherapy, a photosensitizer (PS) plays a comparable role in photodynamic therapy [1,2]. It is important to emphasize that the majority of currently developed photosensitizers exert their therapeutic effect through the generation of singlet oxygen via the type II photochemical mechanism [3]. In this process, photoexcitation of the PS is followed by efficient intersystem crossing to a relatively long-lived triplet excited state. This triplet state can then transfer its energy to ground-state molecular oxygen, which naturally exists in a triplet configuration, thereby generating highly reactive singlet oxygen species. However, a significant limitation of this mechanism is its dependence on molecular oxygen. Hypoxia – characterized by reduced oxygen availability – is a well-established hallmark of solid tumors, which account for over 80 % of all cancer cases [4]. Consequently, the efficiency of type II-mediated photodynamic therapy is severely compromised under hypoxic conditions. This underscores the urgent need to develop alternative photosensitizers capable of functioning effectively in oxygen-deprived environments – a critical consideration given that cancer remains the leading cause of mortality in developed nations [5,6].

Certain photosensitizing nucleosides can be incorporated into DNA strands without disrupting the native function of the biomolecule, thereby inducing cytotoxic effects only upon UV irradiation [5,7]. For instance, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) efficiently label cellular DNA increasing cells' photosensitivity [8]. Extensive studies on BrdU/IdU-labeled oligonucleotides have demonstrated a sequence-dependent photoinduced long-range electron transfer (ET) from a distant 2'-deoxyguanine (dG) to the excited halogenated nucleoside, resulting in the formation of a single-strand break (SSB) [9–12]. Moreover, *in vitro* studies confirmed the synergistic effect of halogen and sulfur atoms in photosensitizing nucleoside derivatives [13,14]. The combination of 5-bromo-4-thio-2'-deoxyuridine (BrSdU) or 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine (ISdU) with UVA irradiation induces lethal DNA lesions in HeLa cells including strand breaks, DNA cross-links (CLs), and DNA-protein crosslinks (DPCs) [13,14]. Introducing a sulfur atom shifts' absorption of the PS to 350 nm (this wavelength exhibits low toxicity to native DNA [15]), creating sufficient spectral distance between the absorption maxima of DNA (260 nm) and PS, thereby preventing the inner filter effect [15]. For instance, 4-thiouridine (SU; absorption maximum around 350 nm) is a well-known photosensitizer of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$, type II mechanism) [15–18] whose photosensitizing properties have been reported already in the 90s. of the last century. Other thionucleosides, such as 6-thioguanine, in addition to their chemotherapeutic actions against acute myeloid leukemia, exhibit photosensitive properties primarily through a type II mechanism [19–21]. However, even for the most widely studied 4-thio-2'-deoxythymidine (^4SdT), whose therapeutic action was confirmed on several cancer cell lines *in vitro* [18,22,23], and in an animal model of bladder cancer [24], its photosensitizing mechanism is still discussed [22]. Photolysis of ^4SdT aqueous solution in the presence of molecular oxygen generates reactive oxygen species (ROS) not formed in the cell cultures incubated with ^4SdT [25]. Similarly, *in vitro* studies on the ^4SdT modified oligonucleotides show DNA lesions that do not originate from ROS-dependent mechanisms [23,26].

It is worth notice that modified nucleosides can serve as substrates for mammalian thymidine kinase, an enzyme whose elevated activity is a common characteristic of cancer cells, reflecting their high

proliferative potential [27–29]. Consequently, modified nucleosides are expected to preferentially target tumor cells while minimizing cytotoxicity in normal tissues. Given current knowledge of photodynamic therapy applications, intravenous administration is likely the preferred route for delivering modified nucleosides, particularly for systemic malignancies such as prostate cancer [30,31]. For example, in a rat bladder carcinoma model, intravenous ^4SdT achieved approximately threefold higher incorporation into tumor DNA compared to normal bladder epithelium. When combined with UVA irradiation via a fiber optic device, tumor growth was inhibited in 60 % of animals treated, compared to 100 % tumor incidence in the control group. Additionally, ^4SdT was rapidly cleared from UVA-exposed tissues such as skin and eyes, with DNA substitution level dropping below detection within 20 h, suggesting reduced risk of prolonged photosensitivity relative to conventional PDT [24]. In anatomically sensitive areas like the prostate, site-specific light delivery is crucial to avoid damage to adjacent organs. Advances in fiber optic and microendoscopic technologies have greatly improved the precision of photodynamic therapy. These technologies enable precise delivery of laser light via interstitial, endoscopic, intra-operative, or laparoscopic systems, allowing for targeted light application within tissues. These approaches permit localized activation of the photosensitizer while maintaining systemic administration of the modified nucleosides [31].

In the present study, we investigate the photosensitizing properties of BrSdU and ISdU in human prostatic adenocarcinoma (PC3 cell line) using a clonogenic assay. Furthermore, we evaluate the effects of photosensitizers and UVA irradiation on the cell cycle, cell death pathways, DNA double-strand break (DSB) formation, and oxidative stress through flow cytometry. These analyses provide a comprehensive understanding of the cellular mechanisms underlying the photosensitizing actions of BrSdU and ISdU.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetonitrile, methanol, and ethanol were obtained from POCH (Gliwice, Poland). Formic acid, DMSO, glutaraldehyde, crystal violet, Accutase, streptomycin, penicillin, MTT salt, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Fetal bovine serum (FBS), F12k medium, ultrapure water were obtained from Gibco (Life Technologies Limited, Paisley, Scots, UK). Kits for flow cytometry: Guava Cell Cycle Reagent, Guava MitoDamage Kit, FlowCollect Histone H2A.X Phosphorylation Assay Kit (Luminex, Austin, TX, USA).

2.2. Modified nucleosides synthesis

Modified nucleosides, BrSdU and ISdU, were synthesized following the protocol described by Makurat et al. [32], and Spisz et al. [33]. The purity of the obtained compounds was confirmed with the reversed-phase HPLC method (Fig. S1; a Dionex UltiMate 3000 system) with a diode array detector set on 260 nm (Sunnyvale, CA, USA). A C18 column (Wakopak Handy ODS, 4.6 × 150 mm, 5 µm in particle size and 100 Å in pore size) was used for the separation of compounds with a gradient elution of phase B (80 % acetonitrile) and phase A (0.1 % formic acid with 1 % acetonitrile) from 0 to 50 % phase B in 30 min and flow rate 1 mL × min⁻¹. The oven temperature was set to 25 °C. To confirm the identity of the synthesized compounds, the solutions of ISdU and BrSdU were analyzed by LC-MS (Fig. S2) using TripleTOF 5600+ (SCIEX, Framingham, MA, USA) mass spectrometer operated in negative mode

and coupled with UHPLC system (Nexera X2, Shimadzu, Canby, OR, USA). Separation conditions were C18 column (Phenomenex, Kinetex, 2.1×150 mm, $1.7 \mu\text{m}$ in particle size and $100 \text{ \AA}$ in pore size), gradient elution of phase B and phase A from 0 to 50 % phase B in 30 min, and flow rate of $0.3 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$. The oven temperature was set to 25°C . The effluent was diverted to waste for 1 min after injection. Mass spectrometry analysis conditions: the spray voltage was -4.5 kV , the nebulizer gas (N_2) pressure was 25 psi, the flow rate was $11 \text{ L} \times \text{min}^{-1}$, and the source temperature was 400°C . Each spectrum was obtained by averaging three scans and the time of each scan was 0.25 s.

2.3. Cell culture

Prostate cancer cells (PC3, obtained from ATCC) were grown in F12k medium supplemented with 10 % FBS and antibiotics (streptomycin and penicillin, $100 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$). The cells were incubated at 37°C with 5 % CO_2 in a humidified atmosphere. BrSdU and ISdU were dissolved in ultrapure water for biological experiments.

2.4. Cytotoxicity assay

To determine the cytotoxicity level for BrSdU and ISdU, the MTT test was employed. The PC3 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^3 per well and incubated for 24 h. After this time, the medium was replaced with a fresh one including an increasing concentration (10^{-4} – 10^{-9} M) of BrSdU or ISdU. The cells were incubated with nucleosides for 24 and 48 h. Then the aqueous MTT salt solution ($4 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) was added to each well and the cells were incubated for 4 h. Next, the medium was replaced by $100 \mu\text{L}$ DMSO to dissolve the formed formazan crystals. The absorbance was measured at 570 nm (reference wavelength was 660 nm) using a TECAN microplate reader (Infinite M200PRO). The viability of control cells (untreated cells) was assumed as 100 %. The data were obtained from three independent experiments.

2.5. Irradiations

The irradiation chamber (Opsytec Dr. Grobel, BS-04) equipped with UVA bulbs (emission wavelengths ranged from 300 to 400 nm with a maximum at 350 nm) was employed for cell irradiation. The average UVA intensity in the chamber was $20 \text{ W} \times \text{m}^{-2}$ measured by Maestro11 laser power/energy meter, equipped with an 11PD photodetector (Standa, Lithuania). For 5, 10 and $15 \text{ kJ} \times \text{m}^{-2}$ the irradiation time was set at 250, 500 and 750 s , respectively. The irradiation dose (UVA dose) was calculated as follows:

$$\text{UV dose} \left[\frac{\text{J}}{\text{m}^2} \right] = \text{UVA intensity} \left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2} \right] \times \text{time} [\text{s}] \quad (1)$$

2.6. Clonogenic assay

PC3 cells were seeded in the plates at 1×10^5 with the addition of BrSdU or ISdU in 50 and $100 \mu\text{M}$ concentrations. After 48 h of incubation, the cells were irradiated with UVA doses of 0, 5, 10, and $15 \text{ kJ} \times \text{m}^{-2}$. After irradiation, cells were plated at a density of 300 cells per 10 cm diameter dish and incubated for 13 days. Then, the formed colonies were stained and fixed with 6.0 % (v/v) glutaraldehyde and 0.5 % crystal violet. Cell colonies were counted manually, and their size was assessed by an inverted microscope (Olympus, IX73, Tokyo, Japan). The experiment was performed in duplicate, using untreated and non-irradiated cells as the control. Plating efficiencies (PE) and survival fraction (SF) were counted as follows:

$$\text{PE} = \frac{\text{formed colonies number}}{\text{seeded colonies number}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{SF} = \frac{\text{number of colonies formed after irradiation}}{\text{seeded colonies number}} \times 100\% \quad (3)$$

2.7. Flow cytometry tests to assess cell cycle phases and death

PC3 cells were prepared in the same manner for all assays: the cells at 2×10^5 density were seeded and grown in the presence of BrSdU/ISdU ($50 \mu\text{M}/100 \mu\text{M}$) or vehicle (H_2O) as a control for 48 h. Next, the cells were UVA irradiated with $10 \text{ kJ} \times \text{m}^{-2}$ dose. After 24 h of incubation, cells were washed with PBS, dissociated with Accutase solution, and prepared for each assay. To assess the cell cycle, the cells were fixed with 70 % cold ethanol and stained with propidium iodide for 30 min (according to the commercial protocol; Guava Cell Cycle Reagent, Luminex, Austin, TX, USA). The fixed cells were analyzed by flow cytometry (Guava easyCyte 12, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The gating strategy was based on a forward scatter plot FSC versus DNA content in cell samples. The Incyte 3.3 software was used to estimate the percentages of a cell population in the different phases of the cell cycle. For the cell death assay, cells were stained and analyzed with flow cytometry according to the commercial protocol (Guava MitoDamage Kit, Luminex, Austin, TX, USA). Here, two dyes were used – a 7-Aminoactinomycin-D (7-AAD) which monitors permeability changes of the cell membrane typically for late apoptosis and necrotic cells and 1,1',3,3',3',3'-hexamethylindodicarbocyanine iodide (MitoSense Red) that recognizes the mitochondrial potential changes. Simulative dye action provides a complete picture of cell and mitochondrial health. Staurosporine, a well-known apoptosis inducer [34] ($50 \mu\text{M}$, 24 h of incubation) was used as a positive control. All experiments were carried out in triplicate.

2.8. Histone H2A.X phosphorylation assay

PC3 cells were grown as described above, and UVA irradiated with $10 \text{ kJ} \times \text{m}^{-2}$ dose and incubated for 2 or 24 h. Cells dissociated with Accutase solution were fixed, then permeabilized with labeled antibodies according to the commercial protocol (FlowCelect Histone H2A.X Phosphorylation Assay Kit, Luminex, Austin, TX, USA). The stained cells were analyzed by flow cytometry, and the gating strategy is shown in Fig. S5. Untreated cell cultures were used as controls. All experiments were carried out in triplicate.

2.9. Reactive oxygen species detection

1×10^5 PC3 cells were seeded in the plates and divided into three groups: (1) treated cells with BrSdU or ISdU in 50 and $100 \mu\text{M}$ concentrations, (2) a control cell group, where H_2O was added, and (3) positive control for ROS where cells were treated with $15 \mu\text{M}$ doxorubicin (DOX). After 48 h of incubation, the cells were UVA irradiated with a $10 \text{ kJ} \times \text{m}^{-2}$ dose. After 24 h of incubation, the culture medium was replaced with a freshly prepared (without PBS) containing $5 \mu\text{M}$ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (10 mM methanol solution) and incubated for 25 min. Then, the cells were two-timed washed with PBS and dissociated with the Accutase solution. The cells were transferred into the centrifuge tubes, all medium was discarded, and cells were suspended in PBS solution for cytometric analysis. An excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of $583/26 \text{ nm}$ (yellow-B spectral band) were set and forward and side scatter were gated on the main cell population. All experiments were carried out in triplicate.

2.10. Statistical analysis

GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used to analyze biological data. The results for treated and untreated samples were statistically evaluated using a one-way or two-way ANOVA test followed by the Brown-Forsythe/Sidak's/Tukey's or Dunnett's test. The level of statistical significance is represented as: *; $p < 0.05$; **; $p < 0.01$; ***; $p < 0.001$; ****; $p < 0.0001$.

3. Results

The photosensitizing properties of ISdU/BrSdU in the UVA region have already been studied *in vitro* in mouse embryonic fibroblasts, human fibroblasts, and HeLa cell models [14]. Survival fraction (HeLa) after irradiation with the pre-defined doses of radiation from the 320–400 nm spectral region, strand break formation employing the comet assay, and crosslinks generation were quantified in those studies. The choice of fibroblasts for the *in vitro* PDT model seems quite natural. Indeed, light has quite a limited penetration depth, to about 1–2 mm [35], which suggests the applicability of PDT only for superficial lesions. However, due to the advent of flexible fiber optics light can be introduced practically into any organ in the body [36,37]. Considering this, we conducted similar *in vitro* studies on prostate cancer cells. Prostate cancer is, after breast cancer, the second most frequent reason for death worldwide [6]. On the other hand, the employment of surgery or radiotherapy exposes normal structures like nerves, bladder, or rectum to damage [38,39]. The intrinsic limitation in the PDT-mediated damage by visible light has, thus, the potential of restricting the treatment to the prostate while sparing the surrounding normal tissues.

3.1. Cytotoxicity assay results for PC3 cells treated with BrSdU and ISdU

MTT assay allows us to determine the impact of the studied compounds' on cell viability [40]. Modified nucleosides should be marginally cytotoxic without radiation exposure. The impact of studied derivatives was examined via incubation with PC3 cells in six concentrations (from 10^{-9} – 10^{-4} M) for 48 and 72 h. The results show that both derivatives do not produce a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the PC3 cell's metabolic activity in the tested concentration range (see Fig. 1). Brem et al. also showed nontoxicity of BrSdU and ISdU to HeLa

cells, using 50 and 100 μM drugs concentrations [14].

3.2. Clonogenic assay

In the next step, we assessed the effect of BrSdU and ISdU on PC3 cells' ability to resume proliferation after irradiation. For this purpose, the clonogenic assay was performed [41]. The tested derivatives, BrSdU and ISdU, significantly enhance PC3 cells' sensitivity to UVA radiation (see Fig. S3). The photosensitizing effect depends on the photosensitizer concentration (50 or 100 μM) and the radiation dose (0, 5, 10, 15 $\text{kJ} \times \text{m}^{-2}$). Our clonogenicity studies have shown that treatment of cells with BrSdU and ISdU in 50 μM concentration and 5 $\text{kJ} \times \text{m}^{-2}$ of UVA reduced cell survival to $81.8 \pm 0.7\%$ and $72.9 \pm 5.9\%$, respectively. For the same drug concentration and increased radiation dose to 15 $\text{kJ} \times \text{m}^{-2}$ a further reduction in cell survival, to $38.0 \pm 1.7\%$ and $14.1 \pm 1.5\%$ for BrSdU and ISdU, respectively, was observed. Using 5 and 15 $\text{kJ} \times \text{m}^{-2}$ UVA doses and 100 μM of the modified nucleosides the survival fraction decreased to $59.5 \pm 7.2\%$ and $19.0 \pm 1.1\%$ for BrSdU and $53.8 \pm 2.9\%$ and $8.4 \pm 1.8\%$ for ISdU (Fig. 2). Both studied compounds induce a significant ($p < 0.0001$) reduction in PC3 cells' survival after irradiation, but the photosensitizing effect is stronger for ISdU (see Fig. 2). The same was observed in Brem et al. work where the photosensitizing properties of BrSdU and ISdU (100 μM) were studied via HeLa cells. After 14 $\text{kJ} \times \text{m}^{-2}$ UVA irradiation, the cell survival fraction for BrSdU was about 40 % and for ISdU 30 % [14].

3.3. The effects of BrSdU and ISdU treatment on the PC3 cell cycle and cell death

The cell cycle is a series of biochemical and molecular cyclic changes that occur in the cells and investigation of these changes gives

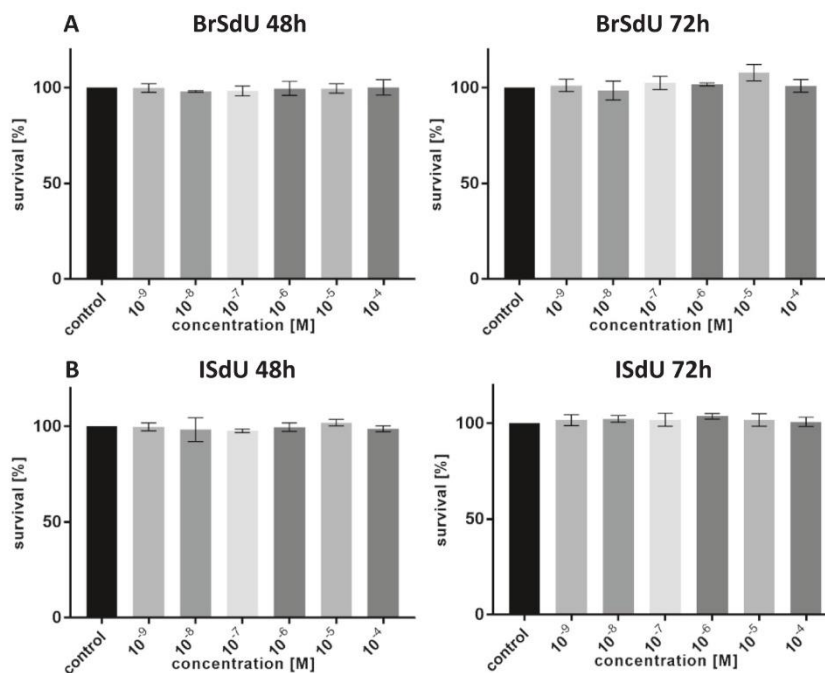


Fig. 1. PC3 cells viability after treatment: A – BrSdU and B – ISdU in a concentration range from 0.001 to 100 μM , after 48 and 72 h of incubation. The results come from three independent experiments and are presented as a mean $\pm$ SD.

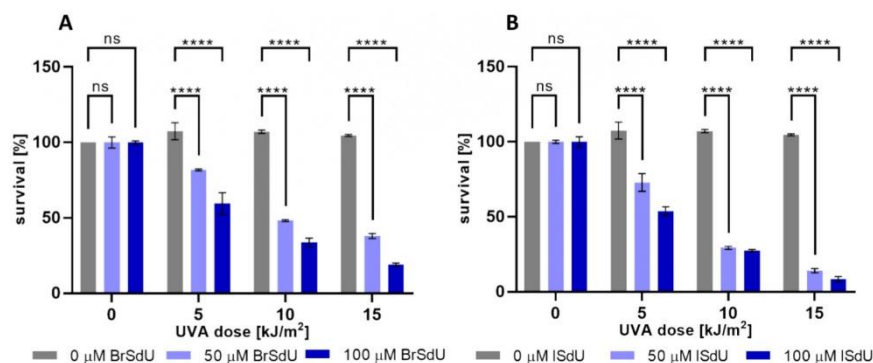


Fig. 2. PC3 cells survival change after treatment: A – BrSdU and B – IsdU (50 μ M and 100 μ M solutions) and UVA radiation in 5, 10, and 15 kJ. The average plating efficiencies for the unirradiated controls are equal to 47 % (untreated), 50 % (BrSdU, 50 μ M), 46 % (BrSdU, 100 μ M), 45 % (IsdU, 50 μ M), and 46 % (IsdU, 100 μ M; Table S1). ****; $p < 0.0001$; ns – not significant.

information about photosensitizers action. To establish these changes a cell cycle assay using flow cytometry was performed. BrSdU and IsdU treatment combined with UVA radiation results in a cell fraction decrease in the G0/G1 phase and an increase in the G2/M phase, compared to the untreated and unirradiated control (Fig. 3). For cells treated with higher concentration (100 μ M) of BrSdU and IsdU and UVA irradiated, the fraction in G2/M phase amounts to 48.62 ± 0.72 % and 47.7 ± 0.75 %, respectively ($p < 0.01$). The cell fraction in the G2/M phase for unirradiated cells but treated with 100 μ M BrSdU assumes 40.89 ± 1.38 % and 40.09 ± 1.38 % for those treated with IsdU. In addition, the cell fraction in the G2/M phase remains at a similar level for PC3 cells either treated with drug only or with UVA radiation – there are no significant changes ($p < 0.05$).

To assess cell death after combined treatment with PSs and radiation, cells were examined using MitoSense/7AAD staining and flow cytometry. Staining with MitoSense Red reflects changes in mitochondrial membrane potential which is an early indicator of apoptosis and mitochondrial dysfunction. On the other hand, 7-AAD dye tracks changes in cell membrane permeability, observed later in apoptosis and necrotic cells. The combined staining allows for the identification of viable, early apoptotic, late apoptotic, and dead cells. The synergistic action of PSs and UVA radiation affects the population of viable cells, showing a statistically significant reduction from 90 ± 0.01 % (UVA treated) to 80.76 ± 0.90 % for 100 μ M BrSdU and 78.35 ± 0.99 % for 100 μ M IsdU (Fig. 4 and Fig. S4). These changes are associated with alterations in the cells' quantity in the early stage of apoptosis. The number of those cells increases significantly ($p < 0.0001$) for higher concentrations of BrSdU – 15.14 ± 1.37 % and IsdU – 20.54 ± 0.75 % compared to irradiated control – 6.26 ± 0.02 % (Table S2). For BrSdU (100 μ M), there is also a statistically significant ($p < 0.05$) increase in early apoptotic cells without radiation exposure. Nevertheless, the action of photosensitizers and UVA radiation does not statistically impact on the quantity of late apoptotic or dead cells, within the experiment range (the change for the latter is evident in the case of the applied positive control for apoptosis – staurosporine).

3.4. Analysis of histone H2A.X phosphorylation

The formation of the double-strand breaks triggers phosphorylation of the H2A.X histone, producing γ H2A.X – a molecular marker. To investigate the influence of the PC3 cells treatment with modified nucleosides combined with UVA radiation on the DSBs formation, a flow cytometric analysis was performed. The level of γ H2A.X was determined 2 and 24 h after irradiation of cells treated with the studied compounds and control cultures. Fig. 5 shows the H2A.X phosphorylation level. One

can observe a statistically significant ($p < 0.0001$) increase of γ H2A.X for the irradiated cells treated with BrSdU and IsdU compared to the non-irradiated controls (for the gating strategy see Fig. S5). The UVA radiation itself – as expected, does not generate DSBs. After 2 h of UVA irradiation of the cells treated with 100 μ M BrSdU and IsdU, the γ H2A.X level changes from 11.38 ± 0.8 % (only irradiation) to 37.05 ± 1.91 % and from 10.41 ± 0.41 % to 34.33 ± 0.45 %, respectively (Table S3). Cells exposed to 50 μ M BrSdU and IsdU in combination with radiation cause a significant increase of histone γ H2A.X phosphorylation level to 26.84 ± 0.62 % and 26.54 ± 0.88 %, respectively. It is worth emphasizing that even after 24 h from irradiation (at this time potentially lethal damage repair is complete [42]), the population of positive cells in the irradiated culture assumes 11.31 ± 0.31 %, while it increases to 37.36 ± 0.86 % for the cells irradiated and pretreated with 100 μ M BrSdU and to 36.24 ± 0.42 % in case of 100 μ M IsdU pretreatment. For a photosensitizer dose of 50 μ M the enhancement of phosphorylation level compared to the irradiated-only variant stays also extremely statistically significant (Table S3). Additionally, the DSBs repair processes are noticeable for 50 μ M concentration of modified nucleosides comparing the γ H2A.X level after 2 and 24 h from irradiation. Notably, the phosphorylation range after strand break repair stays extremely statistically significant. For a half dose of BrSdU the γ H2A.X level remains at 25.79 ± 1.01 % (13.48 ± 1.06 % with no UVA) and for IsdU at 20.61 ± 0.19 % (10.23 ± 0.19 % with no UVA). These results suggest that the BrSdU and IsdU photosensitizing action is related to the DSB formation in PC3 cells.

3.5. Reactive oxygen species detection

Intracellular ROS levels were determined by flow cytometry using the DCF-DA-based method (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate is a well-known indicator for reactive oxygen species in cells, which reduced form 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) is highly fluorescent [43]). The results demonstrated that the combined action of BrSdU and radiation significantly ($p < 0.05$) increased ROS levels in the case of both tested doses of the photosensitizer (Fig. 6, for the gating strategy see Fig. S6). When compared to the irradiated control (set at 100 %), BrSdU elevated ROS levels to 121 % and 122 % for the 50 μ M and 100 μ M doses, respectively. Simultaneous action of radiation and IsdU also significantly ($p < 0.05$) increased the ROS level but only in the case of 100 μ M photosensitizer dos. In this case, ROS levels reached 118 % relative to the irradiated control.

A partially ROS-dependent mechanism of action of BrSdU/IsdU and UVA treatment of HeLa cells was proposed by Brem et al. The comet assay in D₂O indicates DNA interstrand cross-links formation, but the 8-oxoguanine – a common marker of DNA oxidative lesions, was not

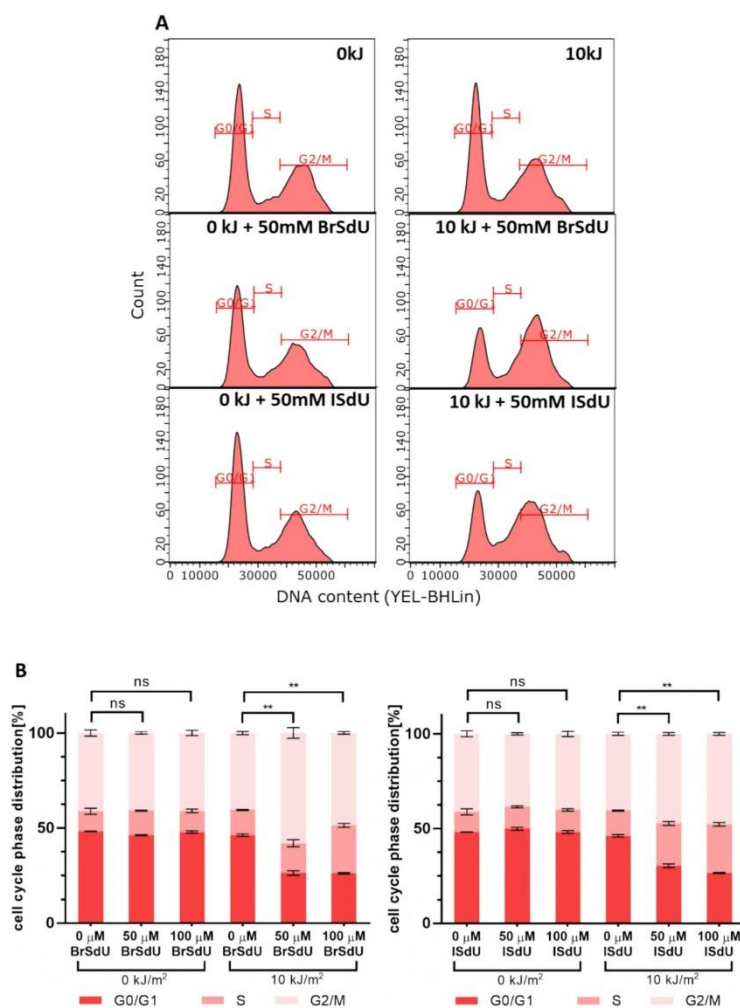


Fig. 3. Flow cytometry analysis of PC3 cell cycle for variants treated with BrSdU and ISdU and 10 kJ UVA radiation: A – histogram of stained PC3 cells showing DNA content distribution. G0/G1 and G2/M phase histogram peaks are separated by the S-phase distribution; B – quantitative analysis of cell cycle distribution. The results come from three independent experiments and are presented as a mean $\pm$ SD. The differences in cell populations in the G2/M phase for indicated groups are statistically significant. ** $p < 0.01$; ns-not significant.

observed at a significant level [14].

4. Discussion

Current treatments for prostate cancer, such as prostatectomy, radio/chemotherapy, and hormone therapy, often come with significant side effects. Hormone therapy, for example, may lead to cells becoming insensitive to androgens [44,45]. Thus, photodynamic therapy could serve as an alternative focal treatment for combating prostate cancer. The performed MTT assay for BrSdU/ISdU confirmed no cytotoxic effects against PC3 cells, even at higher compound concentrations (100 μ M). Clonogenic assays further demonstrated the photosensitizing properties of BrSdU and ISdU when combined with different UVA radiation doses. Interestingly, the photosensitizing effect was approximately twice as efficient for ISdU at $15 \text{ kJ} \times \text{m}^{-2}$ UVA compared to the BrSdU photosensitizing effect. As Brem and coworkers discussed, this

may be related to different dehalogenation processes [14]. Uracil radical generation occurs via homolytic or heterolytic pathways, with BrSdU favoring the heterolytic pathway, whereas both heterolysis and homolysis are involved for ISdU [46].

Cell cycle investigations provided further insights into the photosensitive mechanisms of the studied photosensitizers. To prevent detrimental DNA damage, cells can be arrested at specific stages of the cell cycle. Generally, ultraviolet radiation induces G2/M cell cycle arrest to halt the mitotic division of the damaged genome [47–49]. Exposing PC3 cells to BrSdU or ISdU in combination with UVA radiation led to a similar G2/M arrest, accompanied by a reduction of the G0/G1 phase. Slight differences in the S phase were also observed for the 100 μ M concentration of ISdU and UVA treatment. The cell detects damage like DSBs through checkpoint mechanisms and halts replication to allow repair. S phase arrest is a critical cellular mechanism to manage DNA replication issues [50]. Photosensitizer combination with UVA radiation

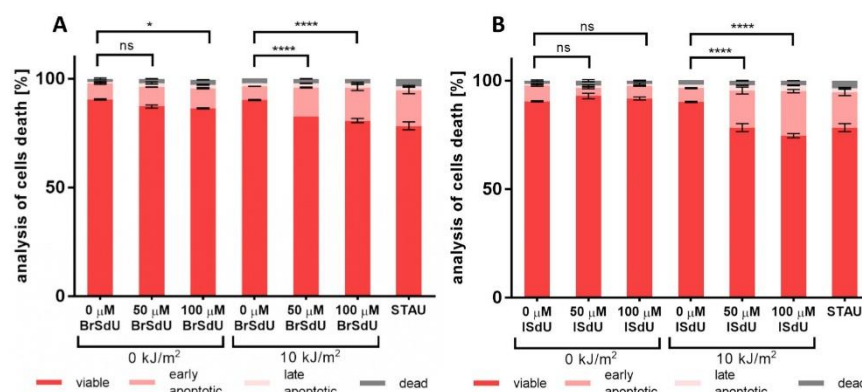


Fig. 4. Flow cytometry analysis of cell death for variants treated with A – BrSdU and B – ISdU and 10 kJ UVA radiation (STAU was used as an apoptosis-positive control). The results come from three independent experiments and are presented as a mean $\pm$ SD. The differences in cell populations in the early apoptotic stage for indicated groups are statistically significant: * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; ns-not significant.

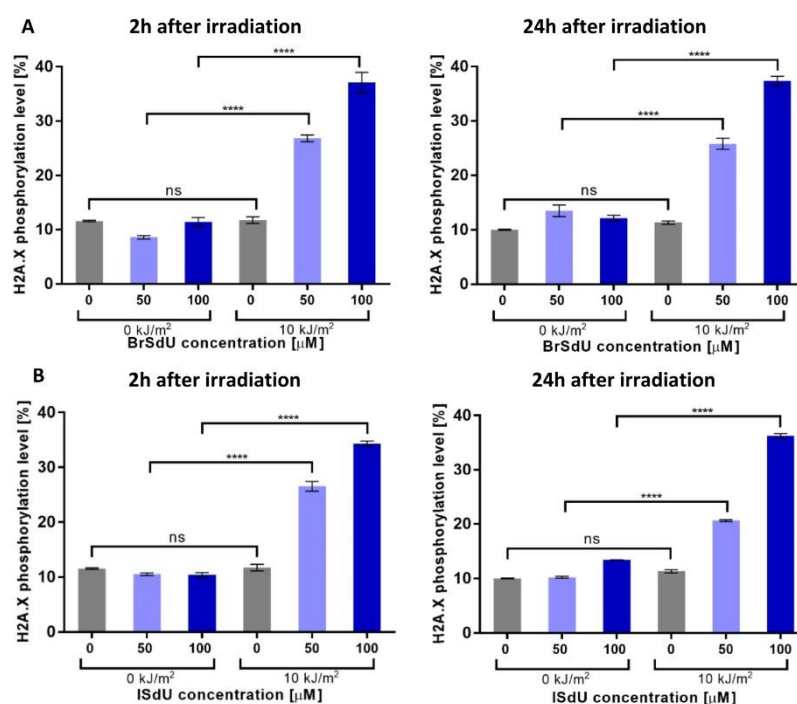


Fig. 5. Flow cytometry analysis of H2A.X phosphorylation in PC3 cells after exposure to 10 kJ radiation and A – BrSdU and B – ISdU. γ H2A.X was measured after 2 and 24 h after radiation (γ H2A.X level stands for cell population percentage where the fluorescence response transcends the gating limit for the H2A.X label). The results come from three independent experiments and are presented as a mean $\pm$ SD. The differences in H2A.X phosphorylation for indicated groups are statistically significant: **** $p < 0.0001$; ns-not significant.

significantly changes the cell cycle distribution.

Another insight into the mechanism of action was gained through cell death analysis based on mitochondrial pathways. Cells treated with both PSs and UVA entered the early apoptosis stage, with ISdU showing greater efficiency in this process. While late apoptosis and cell death are desired outcomes, examination of the intrinsic apoptosis pathway 24 h

after treatment did not reveal these responses.

The current study did not directly quantify the incorporation efficiency of these modified nucleosides into the DNA of PC3 cells. However, previous reports, including those by Brem et al. [14] have demonstrated that halogenated thionucleosides are incorporated into the cellular DNA of HeLa cells. HeLa cells grown for 48 h in medium

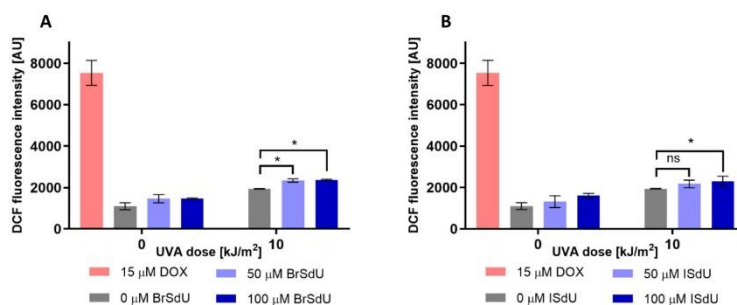


Fig. 6. Effects of A – BrSdU and B – ISdU treatment on ROS generation in PC3 cells. Quantitative analysis of ROS levels after treatment with drugs or/and UVA (doxorubicin was used as a ROS-positive control). A statistically significant difference between the indicated groups at the level * $p < 0.05$, ns-not significant.

containing 100 μM BrSdU showed substitution of DNA thymidine with the modified nucleoside at levels ranging from 0.045 % to 0.06 %. Under the same conditions, ISdU incorporation was slightly lower, ranging from 0.025 % to 0.033 %. The incorporation of BrSdU and ISdU into the DNA of MCF-7 breast cancer cells was also evaluated by Spisz et al. [33]. The conditions used to test the possibility of DNA incorporation, as well as the resulting data, were similar to those described by Brem [14]. When incorporated into DNA, modified nucleosides are expected to induce UVA-triggered biopolymer damage. Thionucleosides, when photoexcited, trigger cross-linking within DNA [22,23]. In contrast, a halogen atom in uracil makes the DNA molecule susceptible to long-range electron transfer, leading to single-strand breaks that may convert into lethal double-strand breaks [9–12]. In this study, we examined the impact of BrSdU/ISdU and UVA treatment on the formation of double-strand breaks. Exposure of PC3 cells to the drugs combined with UVA treatment increased H2A.X histone levels, which correlates with DSBs formation. This might suggest that the electron transfer process plays a role in DNA damage formation. However, contrasting findings from Brem et al. revealed the formation of DNA single-strand breaks or alkali-labile sites in HeLa cells treated with BrSdU/ISdU (100 μM) and UVA radiation (15 or 30 $\text{kJ} \times \text{m}^{-2}$) but did not detect DSBs under these conditions. Importantly, their experimental protocol involved replacing the cell medium before irradiation with fresh medium lacking photosensitizers [14]. Thus, we speculate that the formation of DSBs is likely due to the direct action of BrSdU and ISdU within the cellular environment, emphasizing the critical role of these modified nucleosides in mediating DNA damage.

The combination of BrSdU treatment with UVA further enhances ROS production. In the case of ISdU, a significant ROS-related interaction was observed only for the higher dose of photosensitizer. However, the extent of ROS production with modified nucleosides is notably smaller compared to the significant levels induced by the ROS-generating drug doxorubicin. Previous research by Brem et al. proposed a partially ROS-dependent mechanism for BrSdU/ISdU in the presence of UVA [14]. These findings underscore the selective effects of photosensitizers and UVA in modulating ROS-mediated cellular responses.

5. Conclusions

In this study, we investigate the photosensitizing effects of BrSdU and ISdU combined with UVA radiation on PC3 cells. MTT assays confirmed that even at high concentrations (100 μM), neither compound exhibited cytotoxicity in PC3 cells. However, clonogenic assays demonstrated the photosensitization properties of BrSdU and ISdU across various UVA doses, with ISdU showing approximately twice the efficacy of BrSdU. This difference may be attributed to variations in dehalogenation processes, where uracil radical generation occurs

through either homolytic or heterolytic pathways. Furthermore, cell cycle analysis by flow cytometry provided additional insights into the photosensitization mechanism. (1) Exposure of PC3 cells to BrSdU or ISdU, in combination with UVA-induced G2/M phase arrest. (2) Analysis of cell death pathways, based on mitochondrial processes, revealed that both PSs combined with UVA triggered early apoptosis, with ISdU demonstrating greater effectiveness. (3) The formation of double-strand breaks was assessed, showing that exposure to BrSdU/ISdU and UVA resulted in increased $\gamma\text{H2A.X}$ histone levels, indicative of DSB formation. (4) Cytometric analysis of reactive oxygen species formation showed a statistically significant increase in ROS production for both BrSdU and ISdU, observed only at higher concentrations of the photosensitizers.

These findings are critical for understanding the photosensitizing mechanisms of modified nucleosides and suggest that their effectiveness, while differential, can still be achieved under the hypoxic conditions typical of solid tumors. In summary, this study confirms the photosensitizing potential of BrSdU and ISdU against prostate cancer and highlights their ability to mitigate the hypoxic limitations often encountered in conventional cancer therapies.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Janusz Rak reports financial support was provided by Republic of Poland Ministry of Science and Higher Education. If there are other authors, they 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 supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education under Grant No. DS 531-T080-D494-25 (J.R.), Young Scientists Research Grant (BMN) 2021 and 2022, University of Gdansk, Faculty of Chemistry.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126802>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] H. Wang, X. Mu, H. He, X.D. Zhang, Cancer Radiosensitizers, *Trends Pharmacol. Sci.* 39 (2018) 24–48, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.003>.
- [2] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S. M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 250–281, <https://doi.org/10.3322/CAAC.20114>.
- [3] M.S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A.A. Ghogare, A. Greer, M.R. Hamblin, C. Lorente, S.C. Nunez, M.S. Ribeiro, A.H. Thomas, M. Vignoni, T.M. Yoshimura, Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways, *Photochem. Photobiol.* 93 (2017) 912–919, <https://doi.org/10.1111/PHP.12716>.
- [4] J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions, *Nat. Rev. Cancer* 8 (10) (2008) 755–768, <https://doi.org/10.1038/nrc2499>.
- [5] J. Rak, L. Chomicz, J. Wicz, K. Westphal, M. Zdrozowicz, P. Wityk, M. Zyndul, S. Makurat, L. Golon, Mechanisms of damage to DNA labeled with electrophilic nucleobases induced by ionizing or UV radiation, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 8227–8238, <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.5B03948>.
- [6] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249, <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.
- [7] M. Zdrozowicz, L. Chomicz-Mańka, K. Butowska, P. Spisz, K. Falkiewicz, A. Czaja, J. Rak, DNA damage Radiosensitizers geared towards hydrated electrons, *Practical Aspects Computational Chem.* V (2022) 125–169, https://doi.org/10.1007/978-3-030-83244-5_4.
- [8] K. Fujimoto, Y.K. Takematsu, A. Shigeno, M. Furusawa, T. Sakamoto, Short oligonucleotide prodrug having 5 fluoro and 5 iodouracil inhibits the proliferation of cancer cells in a photo-responsive manner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3736–3738, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.002>.
- [9] K. Westphal, S. Makurat, J. Rak, The sequence dependence of photoinduced single strand break in 5 bromo 2' deoxyuridine labeled DNA supports that electron transfer is responsible for the damage, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 9169–9174, <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.7B07338>.
- [10] K. Westphal, M. Zdrozowicz, A. Zylicz-Stachula, J. Rak, Chemically–enzymatic synthesis of photosensitive DNA, *J. Photochem. Photobiol. B* 167 (2017) 228–235, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.01.005>.
- [11] T. Watanabe, R. Tashiro, H. Sugiyama, Photoreaction at 5' (G/C)AABrUT 3' sequence in duplex DNA: Efficient generation of uracil-5-yl radical by charge transfer, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 8163–8168, <https://doi.org/10.1021/ja0692736>.
- [12] T. Watanabe, T. Bando, Y. Xu, R. Tashiro, H. Sugiyama, Efficient generation of 2'-deoxyuridin-5-yl at 5'-(G/C)AA xUxU-3' (X = Br, I) sequences in duplex DNA under UV irradiation, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 44–45, <https://doi.org/10.1021/JA0454743>.
- [13] X.H. Zhang, H.Y. Yin, G. Trigiante, R. Brem, P. Karran, M.B. Pitak, S.J. Coles, Y. Z. Xu, 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine: synthesis, structure, and cytotoxic activity, *Chem. Lett.* 44 (2) (2014) 147–149, <https://doi.org/10.1246/CL.140965>.
- [14] R. Brem, X. Zhang, Y.Z. Xu, P. Karran, UV photoactivation of DNA containing halogenated thiopyrimidines induces cytotoxic DNA lesions, *J. Photochem. Photobiol. B* 145 (2015) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.02.012>.
- [15] B. Ashwood, M. Pollum, C.E. Crespo Hernández, Photochemical and photodynamical properties of sulfur-substituted nucleic acid bases, *Photochem. Photobiol.* 95 (2019) 33–58, <https://doi.org/10.1111/PHP.12975>.
- [16] A. Favre, 4-thiouridine as an intrinsic photoaffinity probe of nucleic acid structure and interactions, *Bioorganic photochemistry* 1 (1990) 379–425.
- [17] K. Heilhoff, R.W. Redmond, S.E. Braslavsky, M. Rougée, C. Salet, A. Favre, R. V. Bensasson, Quantum yields of triplet and o2(1Δg) formation of 4 thiouridine in water and acetonitrile, *Photochem. Photobiol.* 51 (1990) 635–641, <https://doi.org/10.1111/PHP.1990.51.6.635>.
- [18] R. Brem, M. Guven, P. Karran, Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA, *Free Radic. Biol. Med.* 107 (2017) 101–109, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.488>.
- [19] P. Karran, N. Attard, Thiopyrimidines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer, *Nat. Rev. Cancer* 8 (1) (2008) 24–36, <https://doi.org/10.1038/nrc2292>.
- [20] Y. Zhang, X. Zhu, J. Smith, M.T. Haygood, R. Gao, Direct observation and quantitative characterization of singlet oxygen in aqueous solution upon UVA excitation of 6-thioguanines, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 1889–1894, <https://doi.org/10.1021/JP109590T>.
- [21] M. Pollum, L.A. Ortiz-Rodríguez, S. Jockusch, C.E. Crespo Hernández, The triplet state of 6-thio-2'-deoxyguanosine: intrinsic properties and reactivity toward molecular oxygen, *Photochem. Photobiol.* 92 (2016) 286–292, <https://doi.org/10.1111/PHP.12563>.
- [22] O. Reelfs, P. Karran, A.R. Young, 4-thiothymidine sensitization of DNA to UVA offers potential for a novel photochemotherapy, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 148–154, <https://doi.org/10.1039/C1PP05188A> /METRICS.
- [23] O. Reelfs, P. MacPherson, X. Ren, Y.Z. Xu, P. Karran, A.R. Young, Identification of potentially cytotoxic lesions induced by UVA photoactivation of DNA 4 thiothymidine in human cells, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 9620–9632, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR674>.
- [24] S.W. Pridgeon, R. Heer, G.A. Taylor, D.R. Newell, K. O'Toole, M. Robinson, Y. Z. Xu, P. Karran, A.V. Boddy, Thiothymidine combined with UVA as a potential novel therapy for bladder cancer, *Br. J. Cancer* 104 (12) (2011) 1869–1876, <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.180>.
- [25] M.A. Warren, J.B. Murray, B.A. Connolly, Synthesis and characterisation of oligodeoxynucleotides containing thio analogues of (6-4) pyrimidine pyrimidinone photo-dimers, *J. Mol. Biol.* 279 (1998) 89–100, <https://doi.org/10.1006/JMBI.1998.1719>.
- [26] Y. Harada, T. Suzuki, T. Ichimura, Y.Z. Xu, Triplet formation of 4-thiothymidine and its photosensitization to oxygen studied by time-resolved thermal lensing technique, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 5518–5524, <https://doi.org/10.1021/JP0678094>.
- [27] L.S. Lee, Y.C. Cheng, Human deoxythymidine kinase II: substrate specificity and kinetic behavior of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia, *Biochemistry* 15 (1976) 3686–3690, <https://doi.org/10.1021/B100662A007>.
- [28] W.H. Prusoff, B. Goz, Halogenated pyrimidine Deoxyribonucleosides, *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents* (1975) 272–347, https://doi.org/10.1007/978-3-642-65806-8_15.
- [29] M. Hengstschläger, M. Pfeilstöcker, E. Wawra, Thymidine kinase expression, *Adv. Exp. Med. Biol.* 431 (1998) 455–460, https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5381-6_90.
- [30] E.S.J. Arnér, S. Eriksson, Mammalian deoxyribonucleoside kinases, *Pharmacol. Ther.* 67 (1995) 155–186, [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00015-9](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00015-9).
- [31] A.F. dos Santos, D.R.Q. de Almeida, L.F. Terra, M.S. Baptista, L. Labriola, Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review, *J. Cancer Metastasis Treat.* 5 (25) (2019), <https://doi.org/10.20517/2394.4722.2018.83>.
- [32] S. Makurat, P. Spisz, W. Kozak, J. Rak, M. Zdrozowicz, 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine as a sensitizer of X ray induced cancer cell killing, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1308–1320, <https://doi.org/10.3390/IJMS20061308>.
- [33] P. Spisz, M. Zdrozowicz, S. Makurat, W. Kozak, K. Skotnicki, J. Rak, Why does the type of halogen atom matter for the radiosensitizing properties of 5-halogen substituted 4 thio 2' deoxyuridines? *Mol* 24 (2019) 2819–2824, <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24152819>.
- [34] C.A. Belmokhtar, J. Hillion, E. Ségal Bendirdjian, Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Oncogene* 20 (26) (2001) 3354–3362, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204436>.
- [35] X. Tang, T. Yang, D. Yu, H. Xiong, S. Zhang, Current insights and future perspectives of ultraviolet radiation (UV) exposure: friends and foes to the skin and beyond the skin, *Environ. Int.* 185 (2024) 108535, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108535>.
- [36] J.F. Algorri, J.M. López-Higuera, L. Rodríguez-Cobo, A. Cobo, Advanced light source technologies for photodynamic therapy of skin cancer lesions, *Pharmaceutics* 15 (2023) 2075, <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15082075>.
- [37] E. Lima, L.V. Reis, Photodynamic therapy: from the basics to the current progress of N-heterocyclic-bearing dyes as effective photosensitizers, *Molecules* 28 (2023) 5092, <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28135092>.
- [38] B. Gunnars, P. Nygren, B. Glimelius, Assessment of quality of life during chemotherapy, *Acta Oncol.* 40 (2001) 175–184, <https://doi.org/10.1080/02841860121325>.
- [39] V. Dilalla, G. Chaput, T. Williams, K. Sultanem, Radiotherapy side effects: integrating a survivorship clinical lens to better serve patients, *Curr. Oncol* 27 (2020) 107, <https://doi.org/10.3747/CO.27.6233>.
- [40] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [41] 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) 2315–2319, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [42] G.G. Steel, *Basic clinical radiobiology*. London, New York, 2002.
- [43] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231, <https://doi.org/10.1021/TX00026A012>.
- [44] T. Gheewala, T. Skwor, G. Munirathnam, T. Gheewala, T. Skwor, G. Munirathnam, Photosensitizers in prostate cancer therapy, *Oncotarget* 8 (2017) 30524–30538, <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15496>.
- [45] S. Tai, Y. Sun, J.M. Squires, H. Zhang, W.K. Oh, C.Z. Liang, J. Huang, PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma, *Prostate* 71 (2011) 1668, <https://doi.org/10.1002/PROS.21383>.
- [46] R. Tashiro, H. Sugiyama, Photoreaction of DNA containing 5-Halouracil and its products, *Photochem. Photobiol.* 98 (2022) 532–545, <https://doi.org/10.1111/PHP.13521>.
- [47] S. Pavey, T. Russell, B. Gabrielli, G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation, *Oncogene* 20 (43) (2001) 6103–6110, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204707>.

References

- [1] H. Wang, X. Mu, H. He, X.D. Zhang, Cancer Radiosensitizers, *Trends Pharmacol. Sci.* 39 (2018) 24–48, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.003>.
- [2] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S. M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 250–281, <https://doi.org/10.3322/CAAC.20114>.
- [3] M.S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A.A. Ghogare, A. Greer, M.R. Hamblin, C. Lorente, S.C. Nunez, M.S. Ribeiro, A.H. Thomas, M. Vignoni, T.M. Yoshimura, Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways, *Photochem. Photobiol.* 93 (2017) 912–919, <https://doi.org/10.1111/PHPP.12716>.
- [4] J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions, *Nat. Rev. Cancer* 8 (10) (2008) 755–768, <https://doi.org/10.1038/nrc2499>.
- [5] J. Rak, L. Chomicz, J. Wiczek, K. Westphal, M. Zdrozowicz, P. Wityk, M. Zyndul, S. Makurat, L. Golon, Mechanisms of damage to DNA labeled with electrophilic nucleobases induced by ionizing or UV radiation, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 8227–8238, <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.5B03948>.
- [6] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249, <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.
- [7] M. Zdrozowicz, L. Chomicz-Mańska, K. Butowska, P. Spisz, K. Falkiewicz, A. Czaja, J. Rak, DNA damage Radiosensitizers geared towards hydrated electrons, *Practical Aspects Computational Chem.* V (2022) 125–169, https://doi.org/10.1007/978-3-030-83244-5_4.
- [8] K. Fujimoto, Y.K. Takematsu, A. Shigeno, M. Furusawa, T. Sakamoto, Short oligonucleotide prodrug having 5 fluoro and 5 iodouracil inhibits the proliferation of cancer cells in a photo-responsive manner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3736–3738, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.002>.
- [9] K. Westphal, S. Makurat, J. Rak, The sequence dependence of photoinduced single strand break in 5 bromo 2' deoxyuridine labeled DNA supports that electron transfer is responsible for the damage, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 9169–9174, <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.7B07338>.
- [10] K. Westphal, M. Zdrozowicz, A. Zyliz-Stachula, J. Rak, Chemically–enzymatic synthesis of photosensitive DNA, *J. Photochem. Photobiol. B* 167 (2017) 228–235, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.01.005>.
- [11] T. Watanabe, R. Tashiro, H. Sugiyama, Photoreaction at 5' (G/C)AABrUT 3' sequence in duplex DNA: Efficient generation of uracil-5-yl radical by charge transfer, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 8163–8168, <https://doi.org/10.1021/ja0692736>.
- [12] T. Watanabe, T. Bando, Y. Xu, R. Tashiro, H. Sugiyama, Efficient generation of 2'-deoxyuridin-5-yl at 5'-(G/C)AA xUxU-3' (X = Br, I) sequences in duplex DNA under UV irradiation, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 44–45, <https://doi.org/10.1021/JA0454743>.
- [13] X.H. Zhang, H.Y. Yin, G. Trigiant, R. Brem, P. Karran, M.B. Pitak, S.J. Coles, Y. Z. Xu, 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine: synthesis, structure, and cytotoxic activity, *Chem. Lett.* 44 (2) (2014) 147–149, <https://doi.org/10.1246/CL.140965>.
- [14] R. Brem, X. Zhang, Y.Z. Xu, P. Karran, UVA photoactivation of DNA containing halogenated thiopyrimidines induces cytotoxic DNA lesions, *J. Photochem. Photobiol. B* 145 (2015) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.02.012>.
- [15] B. Ashwood, M. Pollum, C.E. Crespo Hernández, Photochemical and photodynamical properties of sulfur-substituted nucleic acid bases, *Photochem. Photobiol.* 95 (2019) 33–58, <https://doi.org/10.1111/PHPP.12975>.
- [16] A. Favre, 4-thiouridine as an intrinsic photoaffinity probe of nucleic acid structure and interactions, *Bioorganic photochemistry* 1 (1990) 379–425.
- [17] K. Heihoff, R.W. Redmond, S.E. Braslavsky, M. Rougée, C. Salet, A. Favre, R. V. Bensasson, Quantum yields of triplet and o2(1Δg) formation of 4 thiouridine in water and acetonitrile, *Photochem. Photobiol.* 51 (1990) 635–641, <https://doi.org/10.1111/PHPP.1990.51.6.635>.
- [18] R. Brem, M. Guven, P. Karran, Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA, *Free Radic. Biol. Med.* 107 (2017) 101–109, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.488>.
- [19] P. Karran, N. Attard, Thiopyrimines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy related cancer, *Nat. Rev. Cancer* 8 (1) (2008) 24–36, <https://doi.org/10.1038/nrc2292>.
- [20] Y. Zhang, X. Zhu, J. Smith, M.T. Haygood, R. Gao, Direct observation and quantitative characterization of singlet oxygen in aqueous solution upon UVA excitation of 6-thioguanines, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 1889–1894, <https://doi.org/10.1021/JP1095901>.
- [21] M. Pollum, L.A. Ortiz-Rodríguez, S. Jockusch, C.E. Crespo-Hernández, The triplet state of 6-thio-2'-deoxyguanosine: intrinsic properties and reactivity toward molecular oxygen, *Photochem. Photobiol.* 92 (2016) 286–292, <https://doi.org/10.1111/PHPP.12563>.
- [22] O. Reelfs, P. Karran, A.R. Young, 4 thiothymidine sensitization of DNA to UVA offers potential for a novel photochemotherapy, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 148–154, <https://doi.org/10.1039/C1PP05188A> /METRICS.
- [23] O. Reelfs, P. MacPherson, X. Ren, Y.Z. Xu, P. Karran, A.R. Young, Identification of potentially cytotoxic lesions induced by UVA photoactivation of DNA 4 thiothymidine in human cells, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 9620–9632, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR674>.
- [24] S.W. Pridgeon, R. Heer, G.A. Taylor, D.R. Newell, K. O'Toole, M. Robinson, Y. Z. Xu, P. Karran, A.V. Boddy, Thiothymidine combined with UVA as a potential novel therapy for bladder cancer, *Br. J. Cancer* 104 (12) (2011) 1869–1876, <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.180>.
- [25] M.A. Warren, J.B. Murray, B.A. Connolly, Synthesis and characterisation of oligodeoxynucleotides containing thio analogues of (6,4) pyrimidine pyrimidinone photo-dimers, *J. Mol. Biol.* 279 (1998) 89–100, <https://doi.org/10.1006/JMBI.1998.1719>.
- [26] Y. Harada, T. Suzuki, T. Ichimura, Y.Z. Xu, Triplet formation of 4 thiothymidine and its photosensitization to oxygen studied by time-resolved thermal lensing technique, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 5518–5524, <https://doi.org/10.1021/JP0678094>.
- [27] L.S. Lee, Y.C. Cheng, Human deoxythymidine kinase II: substrate specificity and kinetic behavior of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia, *Biochemistry* 15 (1976) 3686–3690, <https://doi.org/10.1021/B100662A007>.
- [28] W.H. Prusoff, B. Goz, Halogenated pyrimidine Deoxyribonucleosides, Antineoplastic and Immunosuppressive Agents (1975) 272–347, https://doi.org/10.1007/978-3-642-65806-8_15.
- [29] M. Hengstschläger, M. Pfeilstöcker, E. Wawra, Thymidine kinase expression, *Adv. Exp. Med. Biol.* 431 (1998) 455–460, https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5381-6_90.
- [30] E.S.J. Arnér, S. Eriksson, Mammalian deoxyribonucleoside kinases, *Pharmacol. Ther.* 67 (1995) 155–186, [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00015-9](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00015-9).
- [31] A.F. dos Santos, D.R.Q. de Almeida, L.F. Terra, M.S. Baptista, L. Labriola, Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review, *J. Cancer Metastasis Treat.* 5 (25) (2019), <https://doi.org/10.20517/2394.4722.2018.83>.
- [32] S. Makurat, P. Spisz, W. Kozak, J. Rak, M. Zdrozowicz, 5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine as a sensitizer of X ray induced cancer cell killing, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1308–1320, <https://doi.org/10.3390/IJMS20061308>.
- [33] P. Spisz, M. Zdrozowicz, 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? *Mol. Sci.* (2019) 2819–2824, <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24152819>.
- [34] C.A. Behnokhtar, J. Hillion, E. Ségal Bendirjian, Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Oncogene* 20 (26) (2001) 3354–3362, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204436>.
- [35] X. Tang, T. Yang, D. Yu, H. Xiong, S. Zhang, Current insights and future perspectives of ultraviolet radiation (UV) exposure: friends and foes to the skin and beyond the skin, *Environ. Int.* 185 (2024) 108535, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108535>.
- [36] J.F. Algorri, J.M. López-Higuera, L. Rodríguez-Cobo, A. Cobo, Advanced light source technologies for photodynamic therapy of skin cancer lesions, *Pharmaceutics* 15 (2023) 2075, <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15082075>.
- [37] E. Lima, L.V. Reis, Photodynamic therapy: from the basics to the current progress of N-heterocyclic-bearing dyes as effective photosensitizers, *Molecules* 28 (2023) 5092, <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28135092>.
- [38] B. Gunnars, P. Nygren, B. Glimelius, Assessment of quality of life during chemotherapy, *Acta Oncol.* 40 (2001) 175–184, <https://doi.org/10.1080/02841860121325>.
- [39] V. Dilalla, G. Chaput, T. Williams, K. Sultanem, Radiotherapy side effects: integrating a survivorship clinical lens to better serve patients, *Curr. Oncol.* 27 (2020) 107, <https://doi.org/10.3747/CO.27.6233>.
- [40] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [41] 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) 2315–2319, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [42] G.G. Steel, *Basic clinical radiobiology*, London, New York, 2002.
- [43] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231, <https://doi.org/10.1021/TX00026A012>.
- [44] T. Gheewala, T. Skwor, G. Mimirathnam, T. Gheewala, T. Skwor, G. Mimirathnam, Photosensitizers in prostate cancer therapy, *Oncotarget* 8 (2017) 30524–30538, <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15496>.
- [45] S. Tai, Y. Sun, J.M. Squires, H. Zhang, W.K. Oh, C.Z. Liang, J. Huang, PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma, *Prostate* 71 (2011) 1668, <https://doi.org/10.1002/PROS.21383>.
- [46] R. Tashiro, H. Sugiyama, Photoreaction of DNA containing 5-Halouracil and its products, *Photochem. Photobiol.* 98 (2022) 532–545, <https://doi.org/10.1111/PHPP.13521>.
- [47] S. Pavey, T. Russell, B. Gabrielli, G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation, *Oncogene* 20 (43) (2001) 6103–6110, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204707>.

- [48] A.N. Blackford, S.P. Jackson, ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response, *Mol. Cell* 66 (2017) 801–817, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
- [49] Van Oosten, H., Rebel, E.C., Friedberg, H., Van Steeg, G.T.J., DerVan Horst, H.J., Van Kranen, A., Westerman, A.A., Van Zeeland, L.H.F., Mullenders, F.R., De Gruijl, Differential role of transcription coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 11268–11273. <https://doi.org/10.1073/pnas.200226697>.
- [50] W.R. Taylor, A. Grabovich, Targeting the cell cycle to kill Cancer cells, in: *Pharmacology: Principles and Practice*, 2009, p. 433, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00017-8>.

Halogen substituted 4-thio-2'-deoxyuridines as photosensitizers for the photodynamic therapy of prostate cancer. An *in vitro* study

Anna Czaja, Magdalena Datta, Janusz Rak*, Magdalena Zdrowowicz*

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

anna.czaja@phdstud.ug.edu.pl; magdalena.datta@phdstud.ug.edu.pl

*To whom correspondence should be addressed, e-mail: janusz.rak@ug.edu.pl,
magdalena.zdrowowicz-zamojc@ug.edu.pl

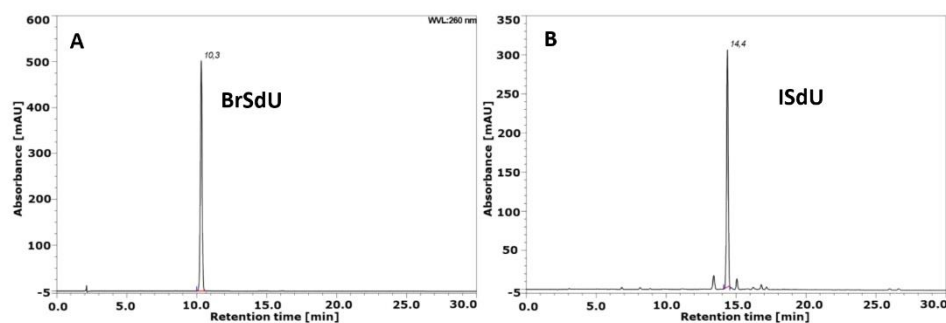


Fig. S1. The chromatograms for A – BrSdU and B – ISdU water solutions.

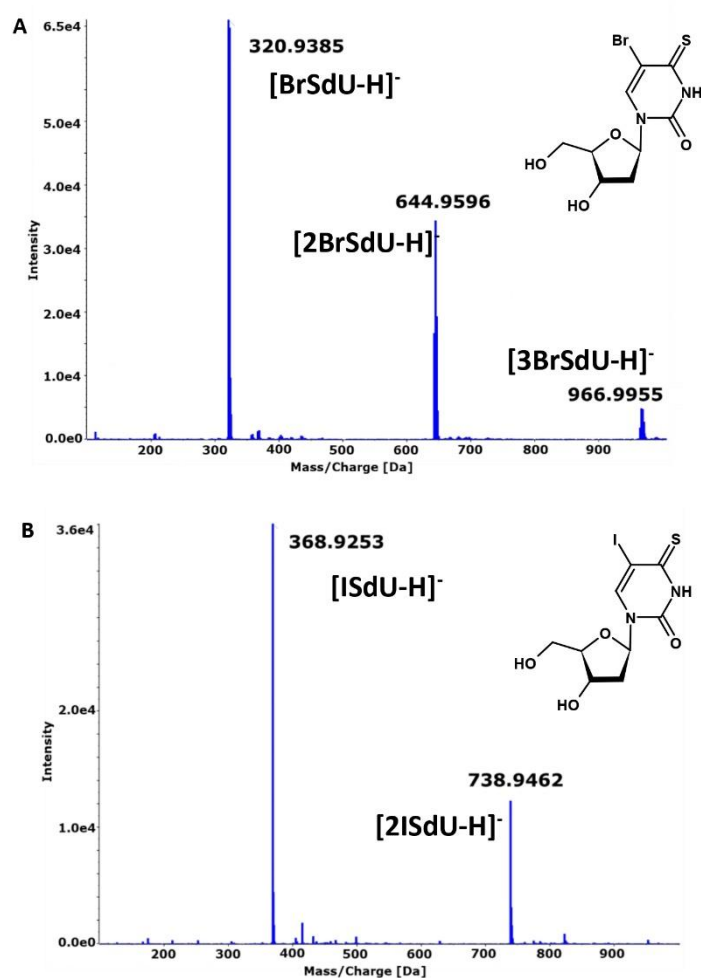


Fig. S2. The mass spectra in negative ionization mode of A – BrSdU ([BrSdU-H]⁻_{calc}=320.9550) and B – ISdU ([ISdU-H]⁻_{calc}= 368.9411). The structures are shown on the spectra.

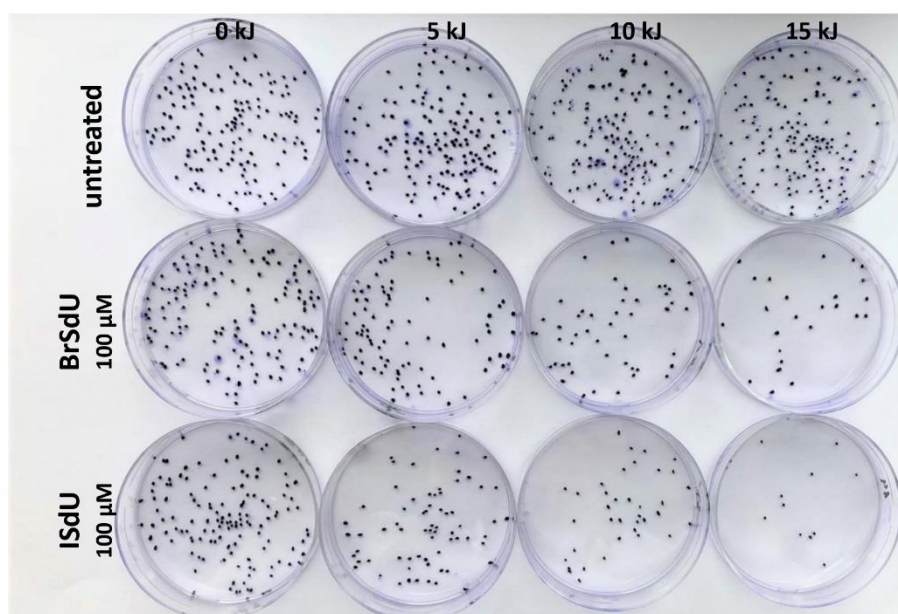


Fig. S3. The picture of cell dishes with stained colonies was obtained from the clonogenic assay.

Tab. S1. Average plating efficiencies [%] of PC3 cells obtained from the clonogenic assay.

dose [kJ × m ⁻²]	Plating efficiencies [%]				
	0 μM	50 μM	100 μM	50 μM	100 μM
	BrSdU/ISdU	BrSdU	BrSdU	ISdU	ISdU
0	47.17	50.50	46.5	44.83	45.83
5	50.67	41.33	27.67	32.67	24.67
10	50.50	24.33	15.67	13.17	12.67
15	49.33	19.17	8.83	6.33	3.83

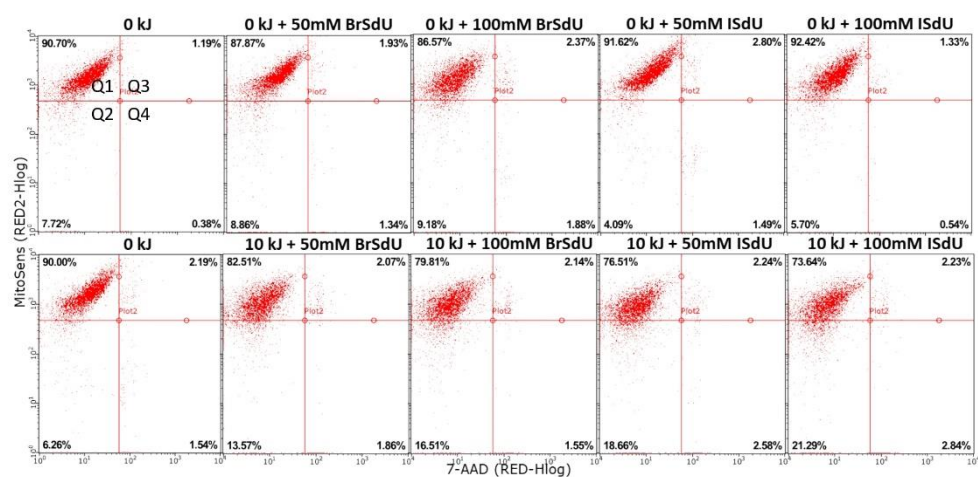


Fig. S4. Flow cytometry analysis of cell death. Dot plots compare MitoSens Red vs. 7-AAD staining. Cells distribution: Q1 – viable cells, Q2 – early apoptotic cells, Q3 – late apoptotic cells, Q4 – dead cells.

Tab. S2. Quantitative cytometric analysis of histone cell death pathways.

	viable cells [%]	early apoptotic cells [%]	late apoptotic cells [%]	death cells [%]
0 kJ	90.43 ± 0.27	7.33 ± 0.4	0.73 ± 0.35	1.52 ± 0.33
0 kJ + 50 μ M BrSdU	90.36 ± 3.84	8.94 ± 0.08	1.84 ± 0.50	2.03 ± 0.10
0 kJ + 100 μ M BrSdU	86.93 ± 0.24	9.05 ± 0.57	1.66 ± 0.23	2.27 ± 0.11
0 kJ + 50 μ M ISdU	92.91 ± 1.29	3.68 ± 0.42	1.09 ± 0.41	2.34 ± 0.47
0 kJ + 100 μ M ISdU	91.74 ± 0.69	5.79 ± 0.09	0.94 ± 0.40	1.54 ± 0.20
10 kJ	90.00 ± 0.01	6.26 ± 0.02	1.54 ± 0.00	2.19 ± 0.01
10 kJ + 50 μ M BrSdU	82.53 ± 0.02	13.36 ± 0.22	1.95 ± 0.08	2.16 ± 0.09
10 kJ + 100 μ M BrSdU	80.76 ± 0.95	15.14 ± 1.37	1.97 ± 0.42	2.14 ± 0.03
10 kJ + 50 μ M ISdU	90.00 ± 1.84	17.06 ± 1.61	2.49 ± 0.10	2.11 ± 0.14
10 kJ + 100 μ M ISdU	78.35 ± 0.99	20.54 ± 0.75	2.68 ± 0.17	2.16 ± 0.08
staurosporine	78.30 ± 1.83	16.26 ± 1.51	1.94 ± 0.32	3.51 ± 0.00

Tab. S3. Quantitative cytometric analysis of histone H2A.X phosphorylation.

Positive cells population (γ H2A.X phosphorylation)		
	2 h from irradiation [%]	24 h from irradiation [%]
0 kJ	11.55 ± 0.13	10 ± 0.1
0 kJ + 50 μ M BrSdU	8.57 ± 0.31	13.48 ± 1.06
0 kJ + 100 μ M BrSdU	11.38 ± 0.8	12.15 ± 0.49
0 kJ + 50 μ M ISdU	10.51 ± 0.23	10.23 ± 0.19
0 kJ + 100 μ M ISdU	10.41 ± 0.41	13.43 ± 0.03
10 kJ	11.7 ± 0.6	11.31 ± 0.31
10 kJ + 50 μ M BrSdU	26.84 ± 0.62	25.79 ± 1.01
10 kJ + 100 μ M BrSdU	37.05 ± 1.91	37.36 ± 0.86
10 kJ + 50 μ M ISdU	26.54 ± 0.88	20.61 ± 0.19
10 kJ + 100 μ M ISdU	34.33 ± 0.45	36.24 ± 0.42

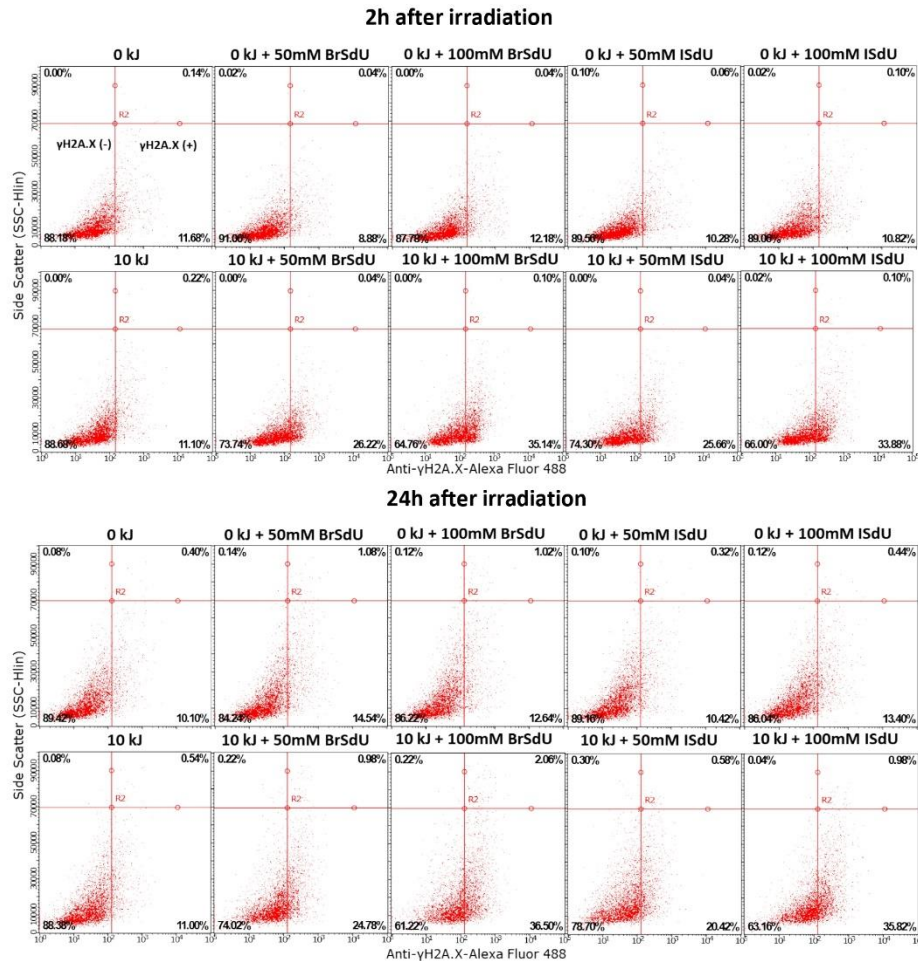


Fig. S5. Flow cytometry analysis of H2A.X phosphorylation for 2 and 24 h after irradiation. The gating strategy was based on a side scatter plot SSC versus a 488 nm laser area. γ H2AX negative population is indicated in the lower-left square and γ H2AX positive population is indicated in the lower-right square for the control cell and the same gating is applied for the next samples.

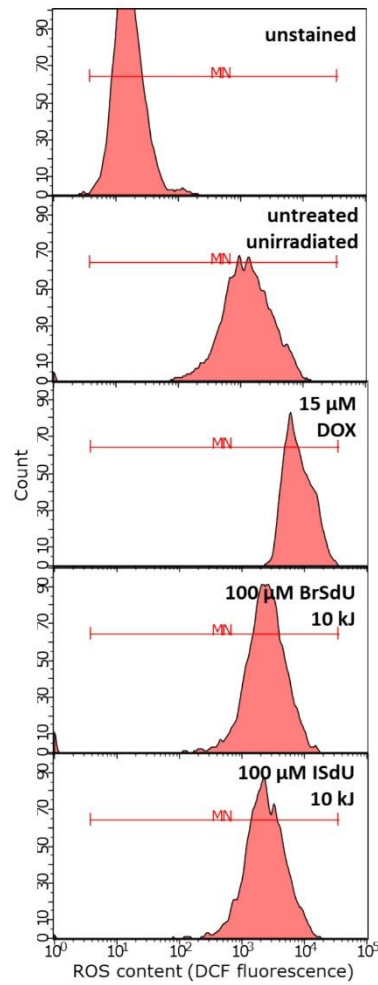


Fig. S6. The histogram representing ROS level in cells in flow cytometry analysis. Respectively: unstained control, untreated and unirradiated control, DOX treated positive control, 100 μ M BrSdU and 10 kJ treated cells and 100 μ M ISdU and 10 kJ treated cells.

Dorobek naukowy

Publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. P. Spisz, W. Kozak, L. Chomicz-Mańka, S. Makurat, K. Falkiewicz, A. Sikorski, A. Czaja, J. Rak, M. Zdrowowicz. 5-(N-trifluoromethylcarboxy)aminouracil as a potential DNA radiosensitizer and its radiochemical conversion into N-uracil-5-yloxamic acid, 2020, Journal of Molecular Sciences, 21(17), 1-17
2. E. Arthur-Baidoo, K. Falkiewicz, L. Chomicz-Mańka, A. Czaja, S. Demkowicz, K. Biernacki, W. Kozak, J. Rak, S. Denifl. Electron-induced decomposition of uracil-5-yl O-(N,N-dimethylsulfamate): role of methylation in molecular stability, 2021, International Journal of Molecular Sciences, 22(5), 1-13
3. M. Zdrowowicz-Żamojć, L. Chomicz-Mańka, K. Butowska, P. Spisz, K. Falkiewicz, A. Czaja, J. Rak. DNA damage radiosensitizers geared towards hydrated electrons, 2021, In Practical aspects of computational chemistry V, Springer International Publishing, 125-169
4. L. Chomicz-Mańka, A. Czaja, K. Falkiewicz, M. Zdrowowicz-Żamojć, K. Biernacki, S. Demkowicz, F. Izadi, E. Arthur-Baidoo, S. Denifl, Z. Zhu, B. A. Tufekci, R. Harris, K. H. Bowen, J. Rak. 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, 2023, Journal of the American Chemical Society, 145(16), 9059-9071
5. K. Biernacki, O. Ciupak, M. Daśko, J. Rachoń, D. J. Flis, J. Budka, I. Inkielewicz-Stepniak, A. Czaja, J. Rak, S. Demkowicz. Development of potent and effective SARS-CoV-2 main protease inhibitors based on maleimide analogs for the potential treatment of COVID-19, 2024, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 39(1), 1-10
6. M. Stolarek, K. Kaminski, M. Kaczor-Kaminska, M. Obłóza, P. Bonarek, A. Czaja, M. Datta, W. Łach, M. Brela, A. Sikorski, J. Rak, M. Nowakowska, K. Szczubiałka. Light-controlled anticancer activity and cellular uptake of a photoswitchable cisplatin analogue, 2024, Journal of Medicinal Chemistry, 67(21), 19103-19120

7. M. Datta, A. Szczyrba, A. Czaja, M. Zdrowowicz, S. Demkowicz, J. Rak. Substituted benzylamino-2'-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties, 2025, Scientific Reports, 15(1), 17535

Projekty badawcze

1. 2018-2020, stypendystka w projekcie MAESTRO nr UMO-2014/14/A/ST4/00405 pt.: „Od modelu in silico do odpowiedzi komórkowej in vitro. Modyfikowane nukleozydy jako radio- bądź/i fotosensybilizatory uszkodzeń DNA” finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki.
2. 2021, kierownicza projektu BMN nr 539-T080-B880-21 pt.: „Synteza oraz badania radiacyjne nowych kompleksów rutenu z radiosensybilizującymi ligandami o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym” finansowanym przez Wydział Chemii UG.
3. 2022, kierownicza projektu BMN nr 539-T080-B010-22 pt.: „Halogenotiopochodne nukleozydów jako sensybilizatory fotouszkodzeń – badania komórkowe” finansowanym przez Wydział Chemii UG.
4. 2023, kierownicza projektu BMN nr 539-T080-B982-23 pt.: „Halogenotiopochodne nukleozydów jako sensybilizatory fotouszkodzeń – mechanizm działania na poziomie komórkowym” finansowanym przez Wydział Chemii UG.
5. 2024, kierownicza projektu BMN nr 539-T080-B115-24 pt.: „Fotochemia 5-bromo- oraz 5- jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny – fotoliza w roztworze buforowym oraz identyfikacja fotoproduktów” finansowanym przez Wydział Chemii UG.

Zgłoszenia patentowe

1. 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.
2. Zgłoszenie patentowe wynalazku pt. „Kompleks cis-PtCl₂(cis-PS1)₂ przeznaczony do stosowania w radioterapii nowotworów”, nr zgłoszenia: P.452844, 2025.

Konferencje

Referaty ustne

1. A. Czaja, M. Zdrowowicz-Żamojć, J. Rak. Halogen substituted 4-thio-2'-deoxyuridines as photosensitizers. In vitro studies, 2023, 11th International Conference on Radiation, Natural Sciences, Medicine, Engineering, Technology and Ecology, Herceg Novi, Czarnogóra
2. L. Chomicz-Mańka, A. Czaja, K. Falkiewicz, M. Zdrowowicz, K. Biernacki, S. Demkowicz, F. Izadi, E. Arthur-Baidoo, S. Denifl, Z. Zhu, B.A. Tufekci, R. Harris, K.H. Bowen, J. Rak. How does nature defeat the devastating force of solvated electrons? 2023, Modeling Interactions in Biomolecules IX 2023, Průhonice, Czechy
3. L. Chomicz-Mańka, M. Datta, A. Szczyrba, A. Czaja, K. Falkiewicz, M. Zdrowowicz, D. Wyrzykowski, K. Biernacki, O. Ciupak, S. Demkowicz, F. Izadi, E.A. Baidoo, S. Denifl, Z. Zhu, B.A. Tufekci, R. Harris, K. Bowen, J. Rak. 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

Postery

1. A. Czaja. Chemiczno-enzymatyczna synteza fragmentu DNA punktowo znakowanego foto/radiosensybilizatorem, 2020, II Konferencja Naukowa Studentów "Młodzi Zdolni", Łódź
2. A. Czaja, M. Zdrowowicz-Żamojć, W. Kozak, J. Rak. Chemiczno-enzymatyczna synteza fragmentu DNA punktowo znakowanego 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyną, 2021, XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń
3. E. Arthur-Baidoo, K. Falkiewicz, L. Chomicz-Mańka, A. Czaja, S. Demkowicz, K. Biernacki, W. Kozak, J. Rak, S. Denifl. Degradacja N,N-dimetyloamidosiarcznanu 5-hydroksyuracylu indukowana przyłączeniem elektronu w fazie gazowej, 2021, XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń

4. A. Czaja, M. Zdrowowicz-Żamojć, J. Rak. Photodamage of DNA labeled with the halogenated thionucleosides, 2022, 10th Jubilee International Conference on Radiation in Various Fields of Research - Spring Edition, Herceg Novi, Czarnogóra
5. A. Czaja, P. Spisz, A. Chylewska, A. Sikorski, K. Biernacki, S. Demkowicz, J. Rak. Ruthenium complexes as potential radiosensitizers for use in radiotherapy, 2022, Modeling and Design of Molecular Materials, Gdańsk
6. M. Stolarek, K. Kamiński, M. Kaczor-Kamińska, P. Bonarek, A. Czaja, M. Datta, W. Łach, M. Brela, A. Sikorski, J. Rak, M. Nowakowska, K. Szczubiałka. Kompleks platyny (II) o modulowanej światłem cytotoksyczności względem komórek nowotworowych, 2024, Krakowskie Forum Biomedyczne 2024. Kraków
7. K. Kamiński, M. Kaczor-Kamińska, M. Obłóza, P. Bonarek, A. Czaja, M. Datta, W. Łach, M. Brela, A. Sikorski, J. Rak, M. Nowakowska, K. Szczubiałka. An innovative platinum(II) complex with photo switchable anti-cancer properties, 2024, 4th Frontiers in Photochemistry Conference 2024, Lisbona, Portugalia
8. M. Datta, A. Czaja, S. Demkowicz, J. Rak. Radiosensitizing properties of 8-(4-trifluoromethoxy)benzylamino-2'-deoxyadenosine against PC3 prostate cancer cells 2024, VI Konferencja Naukowa Chemia-Biznes-Środowisko 2024, Gdańsk

Nagrody i wyróżnienia

Nagroda im. Prof. Leszka Łankiewicza za najlepszą pracę magisterską o charakterze interdyscyplinarnym wykonaną na Wydziale Chemii UG, 2020

Nagroda Rektora II stopnia dla studentów, Uniwersytet Gdański, 2020

Nagroda główna w kat. Najlepszy poster, II Konferencja Naukowa Studentów "Młodzi Zdolni", Łódź, 2020

Działalność pozanaukowa

Prowadzenie warsztatów „Widzenie barw i promieniowanie elektromagnetyczne” podczas Dni Otwartych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 16.03.2023

Wiceprezes Bałtyckiego Stowarzyszenia Chemików w latach 2018-2023

Organizacja konferencji międzynarodowej Modeling and Design of Molecular Materials,
19-22.09.2022, Gdańsk

Organizacja konferencji III Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, 18-19.06.2021

Organizacja konferencji I Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, 26-27.09.2020