

# Chimica & Analitica

## 4-TIOTIMIDINA E SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

Ramona Abbattista<sup>a,#\*</sup>, Vito Rizzi<sup>a</sup>, Pinalysa Cosma<sup>a,b</sup>, Paola Fini<sup>a,b</sup>,  
Angela Agostiano<sup>a,b</sup>, Tommaso R.I. Cataldi<sup>a,c</sup>, Ilario Losito<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

<sup>b</sup>Consiglio Nazionale delle Ricerche CNR-IPCF, UOS Bari

<sup>c</sup>Centro Interdipartimentale SMART, Bari

#ramona.abbattista@gmail.com

DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/CI.2019.6.5.38>

*La sinergia fra spettroscopia UV-Vis e spettrometria di massa con ionizzazione electrospray (ESI-MS) è stata sfruttata in questo lavoro per dimostrare la capacità del nucleoside solforato 4-tio-(2'-deossi)-timidina (S<sup>4</sup>-TdR) di evidenziare, attraverso la rivelazione dei suoi prodotti di ossidazione, la presenza in soluzione acquosa di specie reattive dell'ossigeno (ROS) di interesse nell'ambito della terapia fotodinamica (PDT), quali acqua ossigenata e radicale ossidril.*

### 4-Thiothymidine and Reactive Oxygen Species

In this work the synergy between UV-Vis Spectroscopy and ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) has been exploited to prove the ability of the sulfur-containing nucleoside 4-thio-(2'-deoxy)-thymidine (S<sup>4</sup>-TdR) to emphasize, through the detection of its oxidation products, the presence in aqueous solution of Reactive Oxygen Species (ROS) with relevance in the context of PhotoDynamic Therapy (PDT), namely hydrogen peroxide and hydroxyl radical.

**F**ra le terapie che fanno uso di radiazioni per la cura di tumori e altre patologie, soprattutto a carico della pelle, la Terapia FotoDinamica (PDT) si basa sull'effetto sinergico di un fotosensibilizzatore (PS), somministrato localmente o in maniera sistemica, di un'opportuna radiazione (ultravioletta o visibile) e dell'ossigeno, dalla cui combinazione deriva la formazione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), in grado di attaccare le cellule tumorali [1,2]. La rivelazione di ROS, fondamentale per valutare l'efficacia della terapia, è purtroppo ostacolata dai brevi tempi di vita di tali specie e dalla presenza di una serie di molecole antiossidanti nell'ambiente intracellulare. Per questo motivo, accanto a metodi diretti, come quello basato sulla Risonanza di Spin Elettronico (ESR) [3], sono emersi negli ultimi anni metodi indiretti di rivelazione, ossia basati sull'impiego di specie chimiche in grado di reagire con le ROS, indicandone la presenza attraverso la formazione di loro sottoprodotti.

Grazie alla sua bassa auto-ossidabilità ed elevata fotostabilità, uno dei nucleosidi solforati già impiegati con successo come fotosensibilizzatori nell'ambito della PDT basata su luce ultravioletta, la 4-tio-(2'-deossi)-timidina (S<sup>4</sup>-TdR) [4,5,6], è stato recentemente studiato nei nostri laboratori come rivelatore indiretto dell'ossigeno in stato di singoletto, generato in seguito all'attivazione del fotosensibilizzatore Rosa Bengala mediante luce visibile (si veda la Fig. 1) [7].

\*La Divisione di Chimica Analitica della SCI ha assegnato alla dott. Abbattista il premio "Miglior tesi di Laurea" 2018.

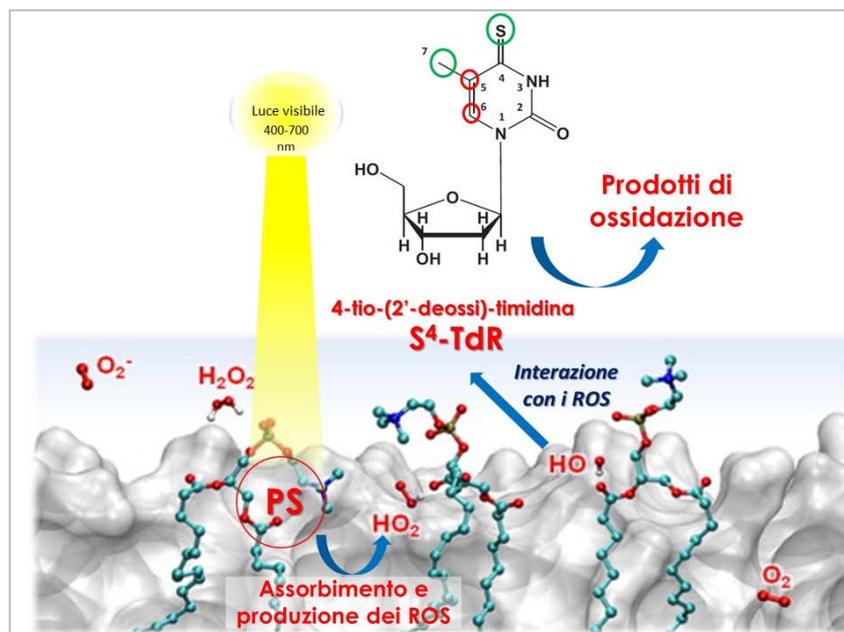


Fig. 1 - Rappresentazione schematica di un approccio di Terapia FotoDinamica in cui un fotosensibilizzatore (PS) assorbito in una membrana cellulare genera ROS durante l'esposizione a luce visibile e la 4-tio-(2'-deossi)-timidina ( $S^4$ -TdR) viene impiegata come rivelatore indiretto dei ROS attraverso la formazione dei suoi prodotti di ossidazione. È evidenziata la formula di struttura della  $S^4$ -TdR, con indicazione dei siti soggetti a reazione sia in presenza di  $H_2O_2$  che di radicale  $\bullet OH$  (in verde) e quelli reagenti solo in presenza di  $\bullet OH$  (in rosso)

Proseguendo tale ricerca, nel presente lavoro verrà descritto lo studio, basato sulla sinergia fra spettroscopia di assorbimento molecolare nell'UV-Visibile e spettrometria di massa in trasformata di Fourier con sorgente a ionizzazione elettrospray, adoperata in modalità singola e tandem (ESI-FTMS, FT MS/MS), dei prodotti di ossidazione derivanti dalla reazione fra  $S^4$ -TdR e altre due ROS di interesse nel contesto della PDT, ossia acqua ossigenata e radicale ossidrilico, quest'ultimo generato *in situ* grazie all'impiego del reagente di Fenton [ $H_2O_2$  e ioni  $Fe(II)$ ].

## Parte sperimentale

### Misure basate sulla spettroscopia di assorbimento molecolare nell'UV-visibile

La reattività della  $S^4$ -TdR nei confronti dell'acqua ossigenata o del radicale ossidrilico ( $\bullet OH$ ), generato tramite la reazione di Fenton, è stata inizialmente studiata, a temperatura ambiente, mediante misure di spettroscopia di assorbimento molecolare nell'UV-Visibile, effettuate nell'intervallo 250-400 nm con uno spettrofotometro Varian Cary 5 ad intervalli di tempo regolari (5 o 10 minuti) su un arco temporale di 1-2 ore. Sono state considerate, a tal fine, miscele di reazione inizialmente contenenti il nucleoside a concentrazione 1 mM e l' $H_2O_2$  a concentrazione variabile fra 5 e 300 mM, accompagnata da  $Fe(II)$  a concentrazione  $10^{-5}$  M nel caso della generazione di radicali ossidrilici.

### Misure basate sulla spettrometria di massa a ionizzazione Elettrospray

Le misure di tipo ESI-MS sono state effettuate, per tempi crescenti, su aliquote di miscele di reazione analoghe a quelle del paragrafo precedente, preventivamente diluite 1:1 (v/v) con metanolo di grado LC-MS, per promuovere il processo ESI, e sottoposte ad aggiunta di ioni  $Na^+$  a concentrazione 0,5 mM, allo scopo di favorire la formazione di addotti sodiati delle specie di interesse, non potendo procedere alla loro protonazione forzata, a causa della formazione di sottoprodotti in soluzione acida. Le analisi, sono state effettuate, sempre in polarità positiva,

con uno spettrometro di massa Thermo Q-Exactive, dotato di sorgente di ionizzazione HESI (Heated Electropray Ionization), analizzatore ibrido quadrupolo-Orbitrap, capace di raggiungere un potere risolvete massimo pari a 140.000 (misurato a rapporto  $m/z$  200) e un'accuratezza migliore di 2 ppm, e una cella ad alta energia collisionale (HCD) per le misure MS/MS. A titolo di confronto, sono state effettuate in parallelo anche acquisizioni MS/MS e MS<sup>3</sup> a più bassa energia collisionale, usando uno spettrometro a trappola ionica lineare a doppio stadio Thermo VelosPro.

### Risultati e discussione

Come mostrato in Fig. 2A, gli spettri di assorbimento molecolare hanno consentito di seguire, in termini qualitativi, l'evoluzione dell'interazione tra la 4-tiotimidina e l'acqua ossigenata, evidenziando il progressivo decremento e spostamento verso il rosso della banda di assorbimento principale del nucleoside (337 nm) e, in parallelo, l'incremento della banda di assorbimento a 270 nm, correlata alla timidina (TdR), il cui ruolo come prodotto principale della reazione è stato confermato dalle misure ESI-MS, come mostrato in Fig. 2B.

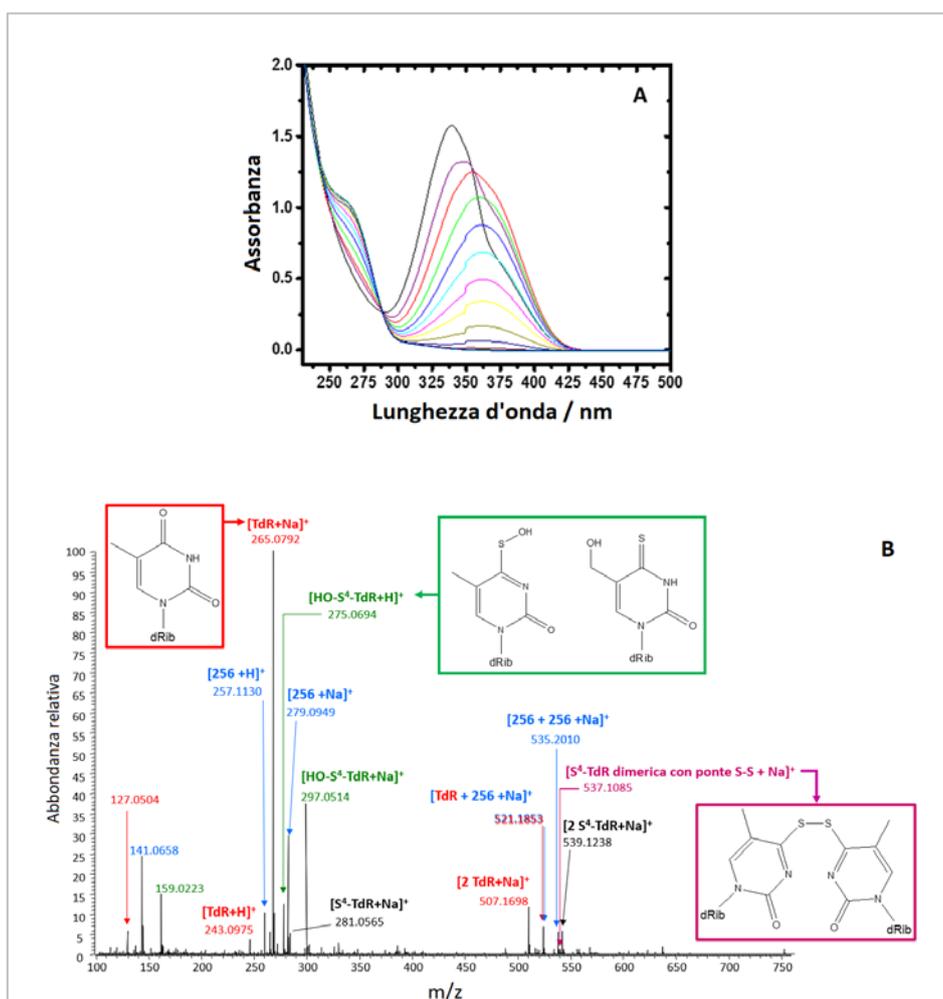


Fig. 2 - A) Confronto tra gli spettri di assorbimento UV-Vis, ottenuti ogni 5 minuti, per 60 minuti, da una soluzione acquosa contenente inizialmente S<sup>4</sup>-TdR 1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 mM. B) Spettro ESI-FTMS ad alta risoluzione, ottenuto con uno spettrometro quadrupolo-Orbitrap, relativo ad una miscela contenente S<sup>4</sup>-TdR 1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 mM dopo 30 minuti di reazione. Negli inserti sono evidenziate le strutture ipotizzate per i principali prodotti di reazione, ossia la timidina (TdR) e le forme idrossilate (HO-S<sup>4</sup>-TdR) e dimerica con ponte S-S della tiotimidina; nelle strutture il gruppo dRib corrisponde al 2'-deossi-ribosio. Il codice colore raggruppa i segnali correlati alla stessa specie chimica. Si veda il testo per ulteriori dettagli

Le analisi ESI-MS e MS/MS hanno evidenziato anche la formazione di ulteriori prodotti, in particolare i derivati della S<sup>4</sup>-TdR idrossilati sul gruppo SH (derivante dall'equilibrio tautomerico a carico del gruppo C=S) o su quello metilico, le cui strutture sono riportate nelle Fig. 2B e nello schema generale di reazione in Fig. 3. Lo schema evidenzia la formazione della timidina come risultato dell'idrolisi del derivato della S<sup>4</sup>-TdR idrossilato sul gruppo SH, una reazione già nota in letteratura. In esso è indicato anche un ulteriore prodotto di reazione, ossia il dimero della 4-tiotimidina derivante dalla formazione di un legame S-S fra due sue molecole. La Fig. 2B consente di apprezzare la complessità degli spettri ESI-MS relativi alle miscele di reazione in esame, legata alla presenza di segnali dovuti anche a dimeri non covalenti sodiati, ad addotti protonati delle specie monomeriche principali e a ioni a basso rapporto *m/z* derivanti dalla frammentazione in sorgente di questi ultimi, ossia dal distacco dell'anello deossi-ribosico (si vedano gli ioni a rapporto *m/z* nominale 127, 141 e 159 in Fig. 2B). In più, lo spettro in Figura 2B evidenzia la presenza di segnali legati agli addotti sodiati e protonato di un composto di massa nominale 256, che un'elaborazione approfondita dei dati MS ed MS/MS ha consentito di riconoscere come un sottoprodotto della reazione fra il metanolo, usato come co-solvente per il processo ESI, e la 4-tiotimidina idrossilata sul gruppo SH [8].

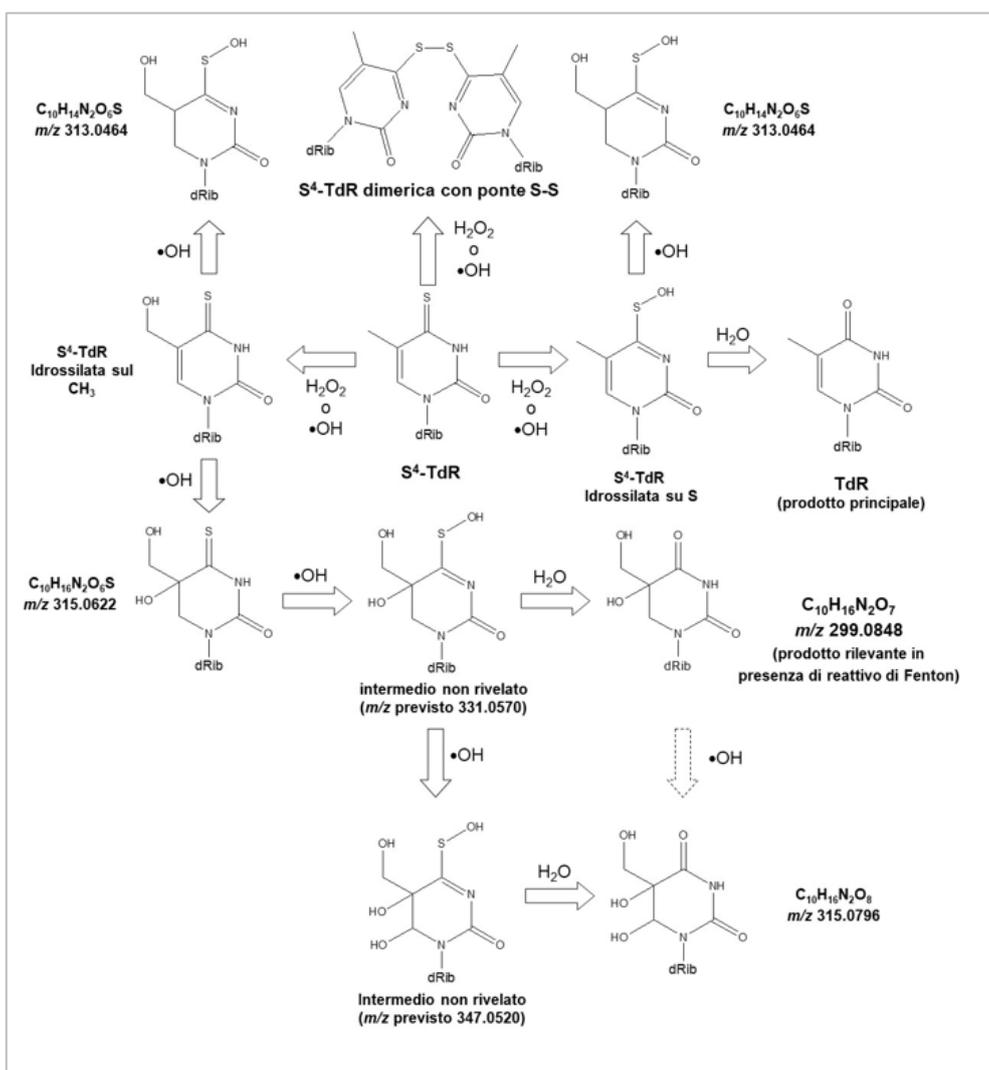


Fig. 3 - Schema generale ipotizzato per spiegare la reattività della 4-tio-(2'-deossi)-timidina in presenza di sola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o di reagente di Fenton, ossia di radicali •OH. I processi verificatisi esclusivamente in presenza di reattivo di Fenton sono evidenziati dall'indicazione dei soli radicali ossidrilici sulle frecce corrispondenti

Nel caso della reazione fra S<sup>4</sup>-TDR e radicale ossidrilico, generato *in situ* mediante l'impiego del reattivo di Fenton, gli spettri di assorbimento molecolare hanno mostrato, a parità di concentrazione iniziale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un più rapido decremento della banda di assorbimento del nucleoside, suggerendo una cinetica di reazione più veloce legata alla presenza del radicale. Le misure ESI-MS e MS/MS hanno confermato tale risultato e, in aggiunta, hanno evidenziato la formazione di quattro nuovi derivati, specifici della reazione con il radicale ossidrilico, oltre agli stessi prodotti generati in presenza della sola acqua ossigenata. Come mostrato in Fig. 3, tali derivati hanno evidenziato la presenza di nuovi percorsi di reazione, segnatamente l'attacco del radicale •OH agli atomi di carbonio 5 e/o 6 dell'anello tiotiminico. Fra loro spicca la timidina idrossilata sul gruppo metilico e sul carbonio 5, il cui precursore potrebbe essere, come indicato nello schema in figura, la 4-tiotimidina bis-idrossilata corrispondente, poiché un test *ad hoc* ha evidenziato la totale assenza di reattività della timidina nei confronti dei radicali ossidrilici.

### Conclusioni

Grazie all'uso combinato di spettroscopia di assorbimento molecolare e spettrometria di massa, il presente lavoro ha evidenziato il potenziale della 4-tio-(2'-deossi)-timidina come "sonda" molecolare per il riconoscimento di specie reattive dell'ossigeno attraverso la caratterizzazione dei prodotti da essa derivanti per reazione con tali specie. Tale risultato può essere considerato un interessante punto di partenza per studi futuri destinati a riconoscere le ROS correlate all'applicazione della terapia fotodinamica o di approcci simili in sistemi biologici.

### BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup>T. Patrice, *Photodynamic Therapy*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), 2003.
- <sup>2</sup>P. Agostinis, K. Berg *et al.*, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, **61**, 250.
- <sup>3</sup>D. Wang, L. Zhao, L.H. Guo, H. Zhang, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 10535.
- <sup>4</sup>J. Fajer, *J. Photosynthesis Res.*, 2004, **80**, 165.
- <sup>5</sup>E. Gemenetzidis, O. Shavorskaya, Y.Z. Xu, G. Trigiante, *J. Derm. Treat.*, 2011, **24**, 209.
- <sup>6</sup>X.H. Zhang, A.L. Wang, D.P. Li, Y.Z. Xu, *Prog. Chem.*, 2010, **22**, 784.
- <sup>7</sup>V. Rizzi, I. Losito *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 26307.
- <sup>8</sup>V. Rizzi, I. Losito, R. Abbattista, P. Fini, A. Agostiano, T.R.I. Cataldi, P. Cosma, *J. Mol. Liq.*, 2018, **264**, 398.