



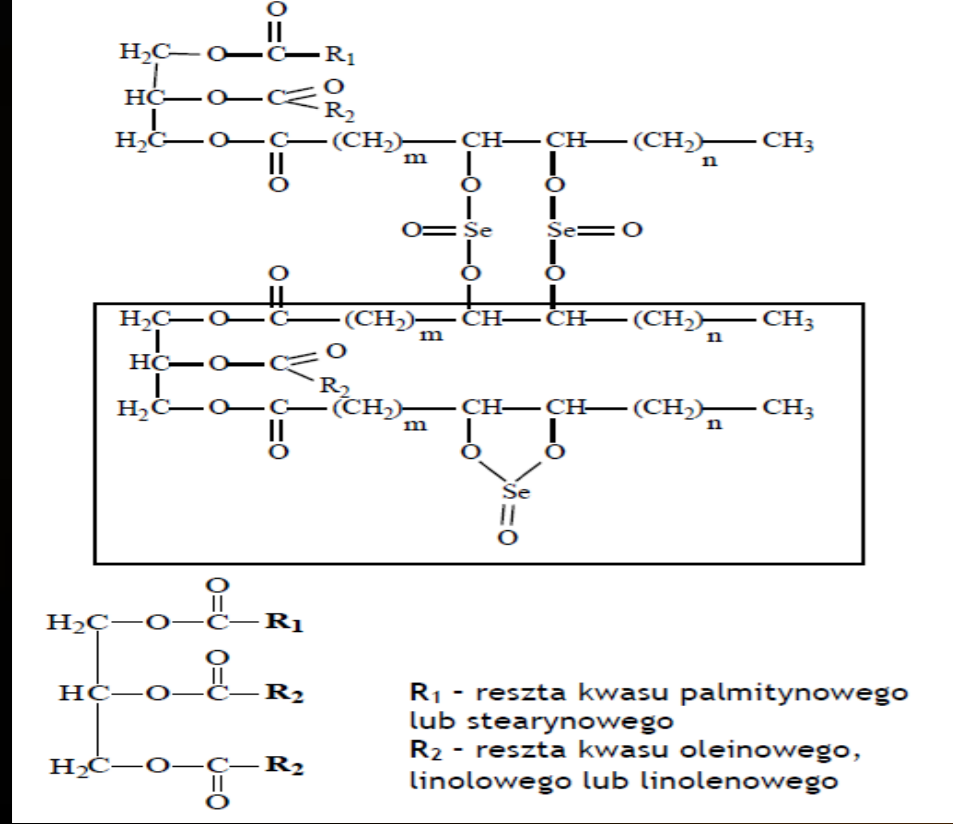
# Badanie wpływu Selolu 5% na skład jakościowy i ilościowy metabolitów dokсорubicyny i 5-fluorouracylu podczas elektrolizy w warunkach utleniania



Karolina Czyż

Praca wykonana w Zakładzie Bioanalizy i Analizy Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Suchockiego

Selol jest związkem organicznym zawierającym selen na IV stopniu utlenienia. Został zsyntetyzowany w Zakładzie Analizy Leków AM w Warszawie (obecnie Zakład Bioanalizy i Analizy Leków WUM). Jest to mieszanina selenotriglicerydów, powstałych z połączenia triglicerydów z selenem. Preparat jest chemiczną modyfikacją oleju słonecznikowego z użyciem kwasu selenowego (IV). Selol wykazuje silne działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych i brak takiego działania wobec komórek prawidłowych. Jego mechanizm przeciwnowotworowego działania jest wielokierunkowy.



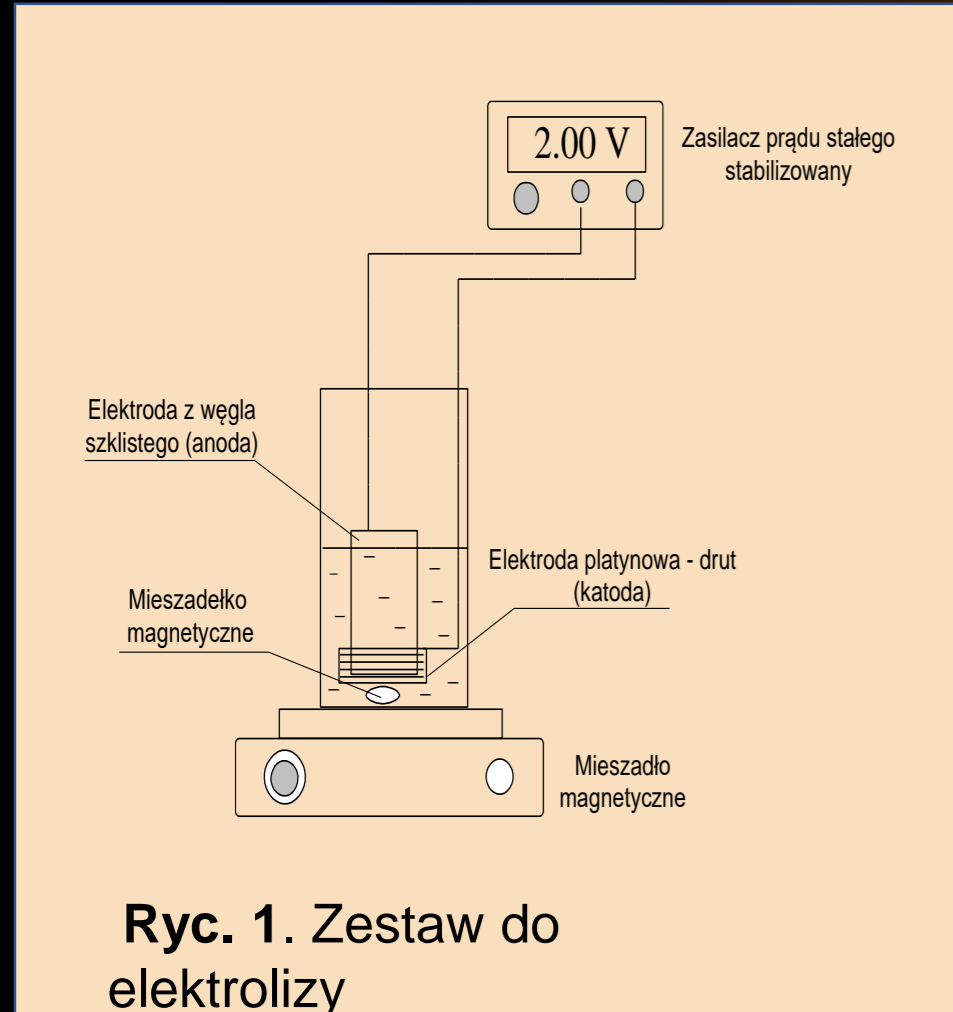
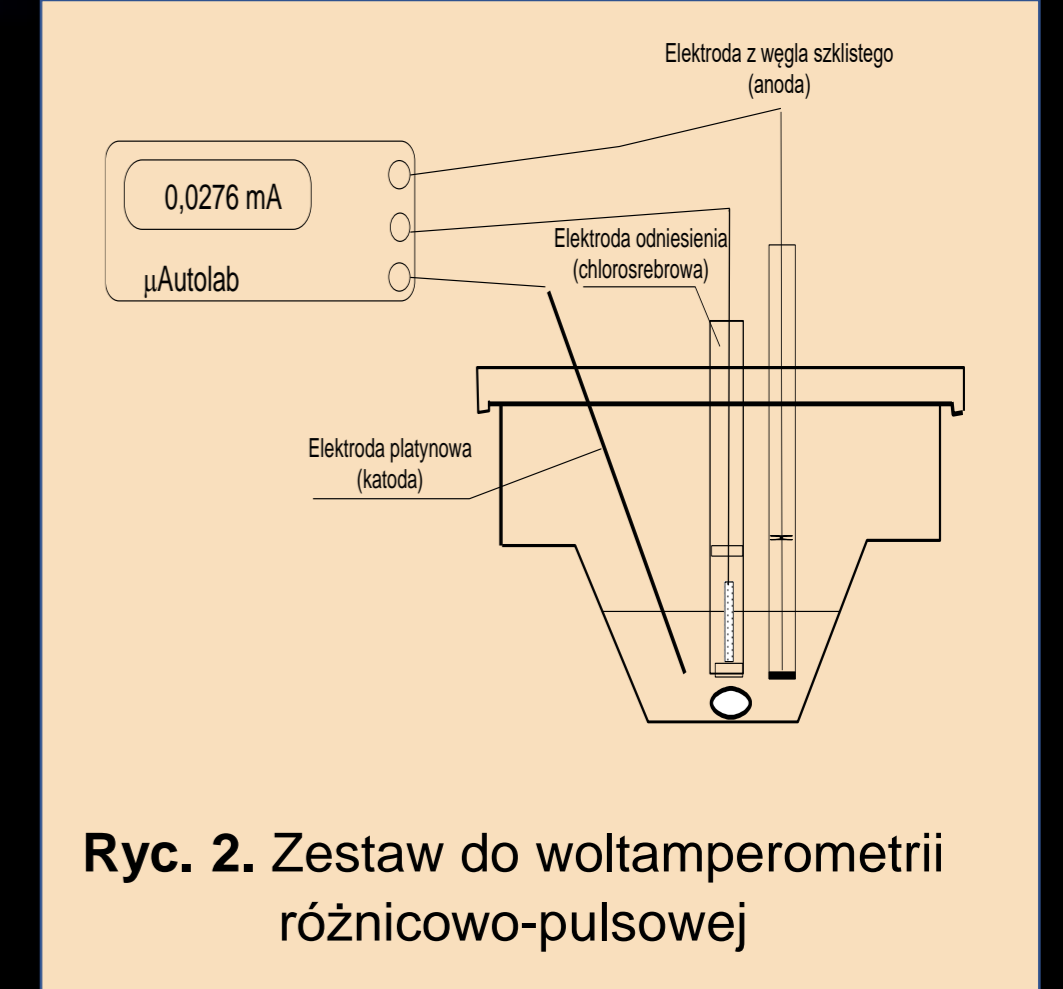
Podczas wstępnych badań interakcji Selolu z cytostatykami na szczurach stwierdzono, że podawanie zwierzęciu wcześniej traktowanemu przez 7 dni Selołem maksymalnej dawki leczniczej 5-fluorouracylu nie spowodowało zwykle obserwowanych w tych warunkach zmian w obrazie krwi. Niewielkie zmiany pojawiły się dopiero po podaniu dawki uznawanej za śmiertelną. W ostatnio prowadzonych na nowotworowych liniach komórkowych badaniach interakcji Selolu z dokсорubicyną oraz 5-fluorouracylem zaobserwowano zwiększenie siły działania cytotoksycznego na komórki nowotworowe. Szczególnie silny, bo aż dziesięciokrotny wzrost cytotoksyczności chemioterapeutyku stosowanego łącznie z Selołem stwierdzono w układzie z dokсорubicyną. Jednocześnie kontrola przeprowadzona na linii komórek prawidłowych nie wykazała żadnych uszkodzeń [1]. Wzrost siły działania cytostatycznego w obecności Selolu, potencjalnie umożliwił obniżenie dawki tych toksycznych chemioterapeutyków i znaczne ograniczenie ich działań niepożądanych. W prezentowanej pracy podjęto próbę wyjaśnienia przyczyny takiego działania Selolu. Do wyjaśnienia tego zjawiska postanowiono zastosować metodę symulacji pierwszej fazy metabolizmu ksenobiotyków na drodze elektrochemicznej.

## Cel pracy

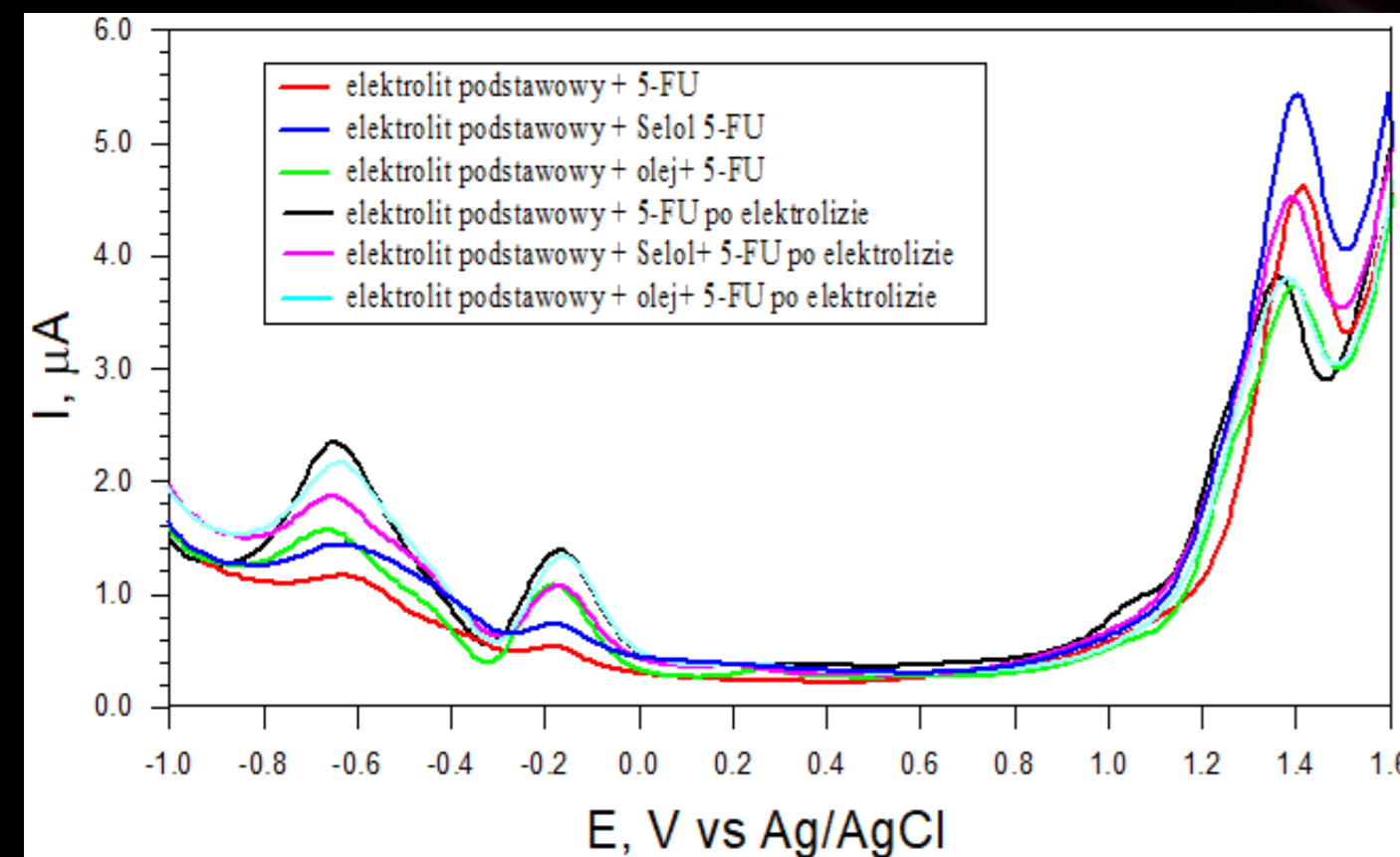
Wykorzystanie metody elektrochemicznej do symulacji pierwszej fazy metabolizmu ksenobiotyków i zbadanie różnic w składzie ilościowym metabolitów dokсорubicyny i 5-fluorouracylu w układach z Selołem 5% oraz bez Selolu.

## Metody badań

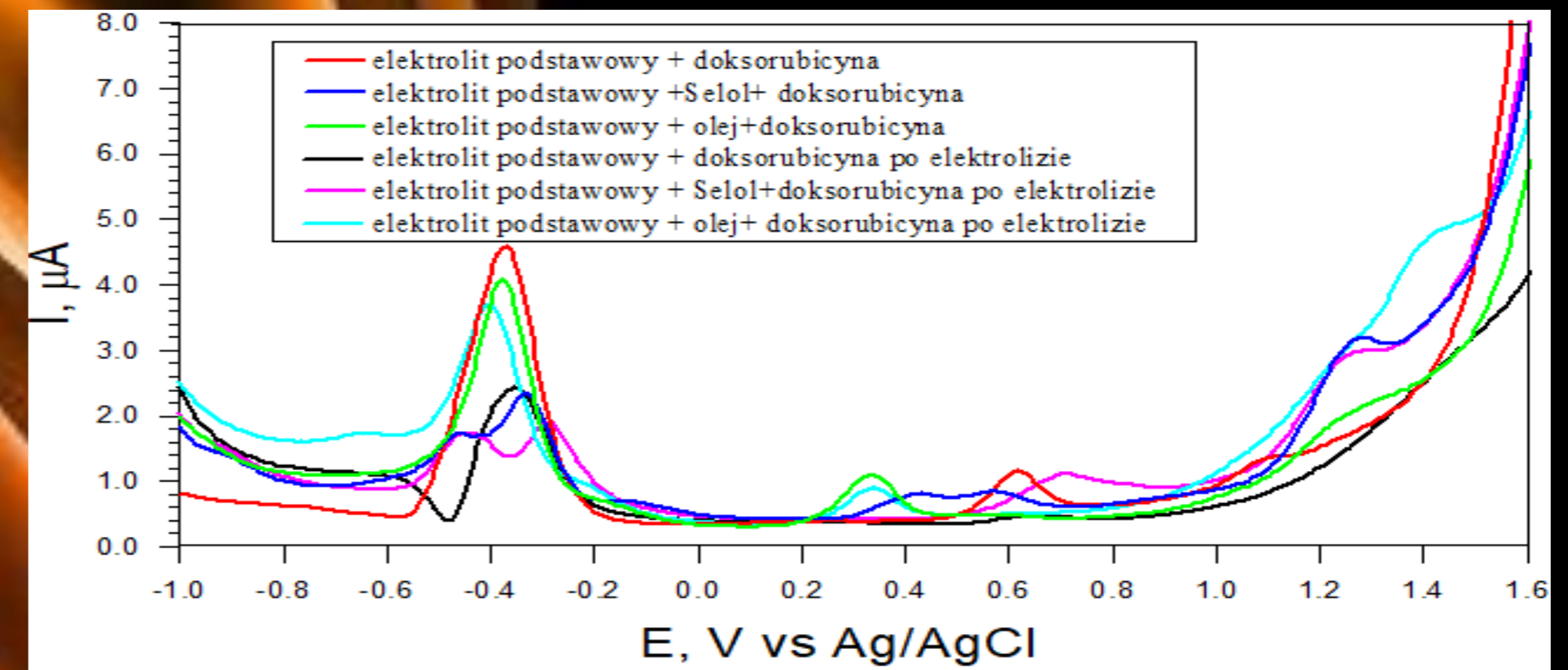
Do syntezy metabolitów dokсорubicyny i 5-fluorouracylu (5-FU) zastosowano zestaw elektrochemiczny, składający się z elektrody z węgla szklistego (elektroda pracująca) i elektrody z drutu platynowego (ryc. 1). Elektrolizę prowadzono przy napięciu 2V, w ciągu 60 min. Roztworem podstawowym był 1 mol/L roztwór mrówczanu amonu o pH 7,4 i metanol (1:1 v/v): 2 mg/ml 5-FU; 0,2 mg/ml dokсорubicyny. Selol 5% był dodawany do próbek odpowiednio w ilości 4 i 20 mg do roztworu 5-FU i 4 i 10 mg do roztworu DOX. Badania metabolitów wykonano metodami HPLC z detekcją UV (ryc. 4 i 7) oraz HPLC-MS. Pomiarów voltamperometrycznych wykonano za pomocą  $\mu$ AUTOLAB, metodą voltamperometrii różnicowo-pulsowej (ryc. 2, 3, 6). Rozdzielenie powstałych produktów przeprowadzono metodą HPLC w gradiencie z detekcją UV-VIS. Dla 5-FU wybrano długość fali 266 nm. Faza ruchoma składała się z metanolu i 0,02 M buforu z octanu amonu o pH 4,7 (2 : 98, v/v) [2]. Szybkość przepływu wynosiła 2 ml/min w warunkach izokratycznych. Do rozdzielania produktów degradacji DOX zastosowano fazę ruchomą: woda + kwas mrówkowy (999 : 1, v/v), faza A i acetonitryl + kwas mrówkowy (999: 1, v/v), faza B [3]. Szybkość elucji wynosiła 2 ml/min. Zastosowano długość fali 254 nm i elucję gradientową. Za pomocą spektrometru TOF-MS z systemem Maldi SYNAPT G2-S HDMS przeprowadzono jonizację przez elektrorozpylanie w trybie jonów dodatnich i jonów ujemnych. Zastosowano różne napięcia rozpylania. Zawartość metabolitów oznaczono metodą HPLCMS (mas Orbitrap Q Exactive Focus firmy Thermo Scientific).



## Wyniki badań



Metodą HPLC Maldi TOF MS wykryto i zidentyfikowano 13 metabolitów 5-FU. Wraz ze wzrostem stężenia Selolu 5% rośnie ilość wykrywanych metabolitów 5-FU, natomiast po wprowadzeniu 20 mg Selolu 5% wytwarzanie niektórych metabolitów jest zahamowane. Stwierdzono silne hamowanie metabolizmu 5-FU wraz ze wzrostem stężenia selolu 5% (Tab.1, ryc.4 i 5).



Ryc. 3. Voltamperogramy różnicowo pulsowe mieszanin roztworów przed i po elektrolizie (elektrolit podstawowy: dioksan + mrówczan sodu + woda + metanol) dla 5-FU. Na podstawie obliczenia pola powierzchni pików potwierdzono rozpad 5-FU i obecność metabolitów. Sygnał elektrochemiczny pochodzący od utlenionego 5-FU: 1,37V. Dalsza analiza HPLC zarejestrowała prawie wszystkie metabolity oraz zanieczyszczenia 5-FU.

Tabela 1. Zestawienie wyników oznaczania zawartości głównych metabolitów 5-FU oraz 5-FU z Selołem 5% w ilości 20 mg metodą HPLC-MS mas Orbitrap Q Exactive Focus przy jonizacji ujemnej H(-).

Wzór sumaryczny	M.c.z. oznaczona	Pole powierzchni metabolitów 5-fluorouracylu	Pole powierzchni 5-fluorouracylu z 20 mg Selolu 5%	5-FU + 20 mg Selolu 5-FU
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> FO <sub>3</sub>	108,02119	30838	26362	0,85
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	126,04287	4399	42059	9,56
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	127,01189	208992	397070	1,90
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> FN <sub>2</sub> O	129,03384	506947	508887	1,00
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	130,01776	48346	5119891	105,90
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	142,03773	214035	185967	0,87
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	151,02870	122773	38128	2,99
C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	158,04389	71300	14013	0,20

Obecność Selolu 5% prawie 106 krotnie spowalnia metabolizm 5-FU, co może być przyczyną braku działań ubocznych oraz wyższej skuteczności terapeutycznej podczas równoczesnego podawania zwierzętom laboratoryjnym obu substancji.

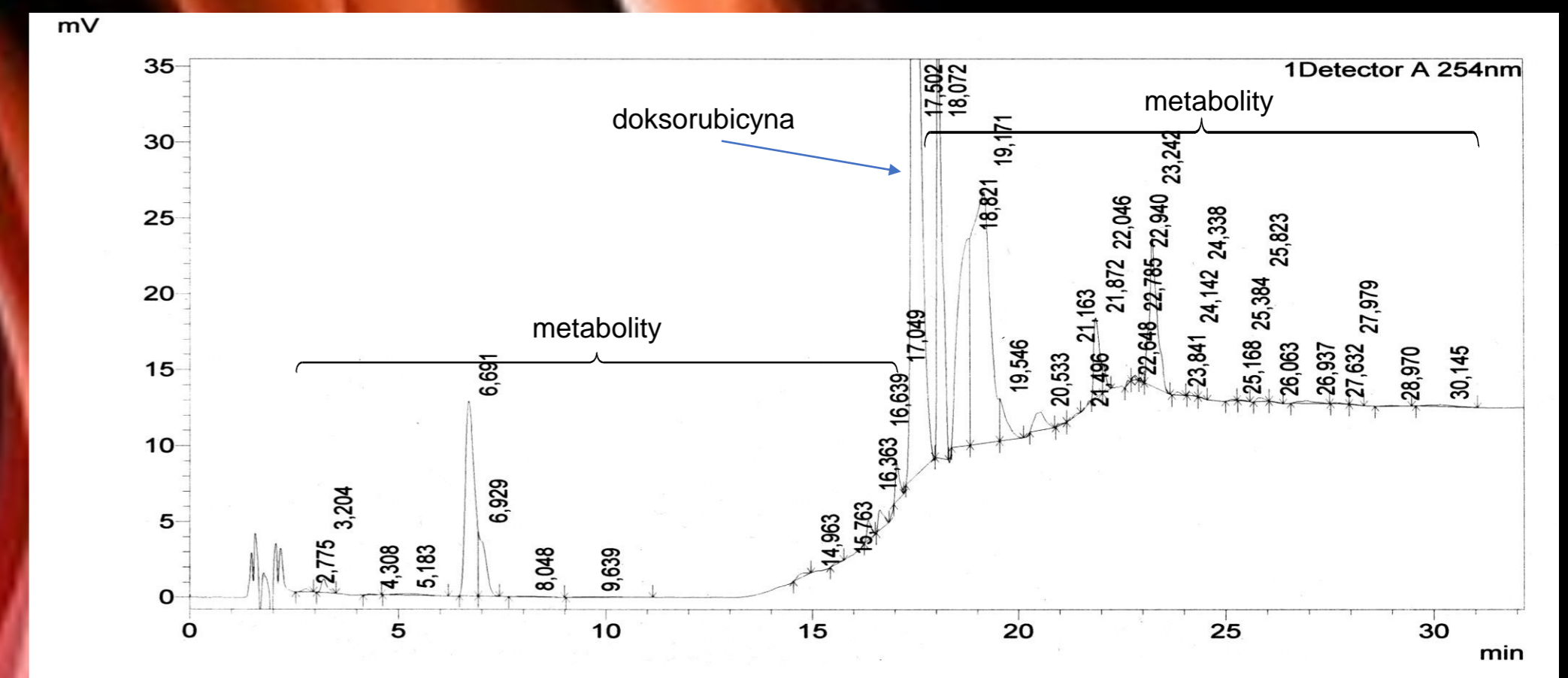
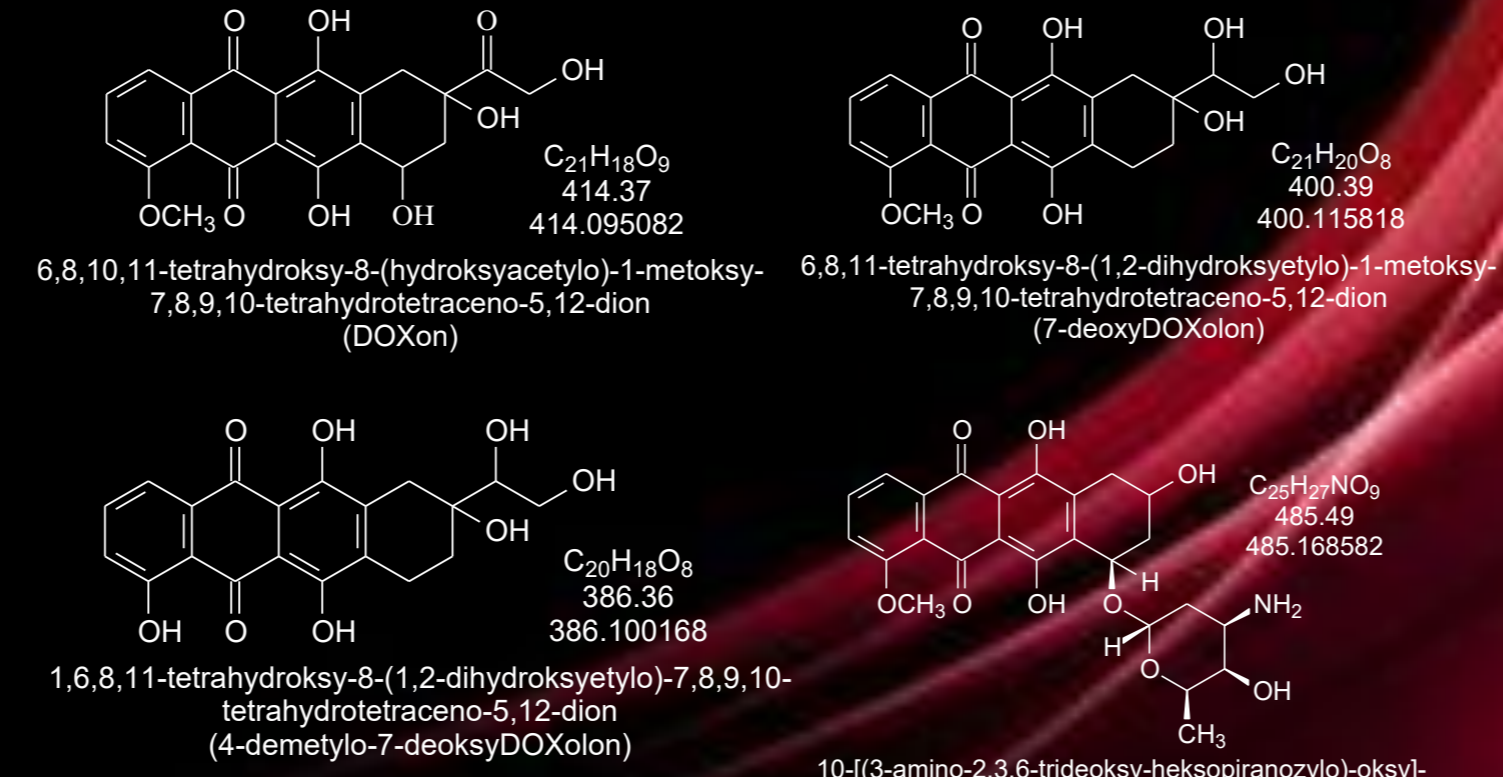
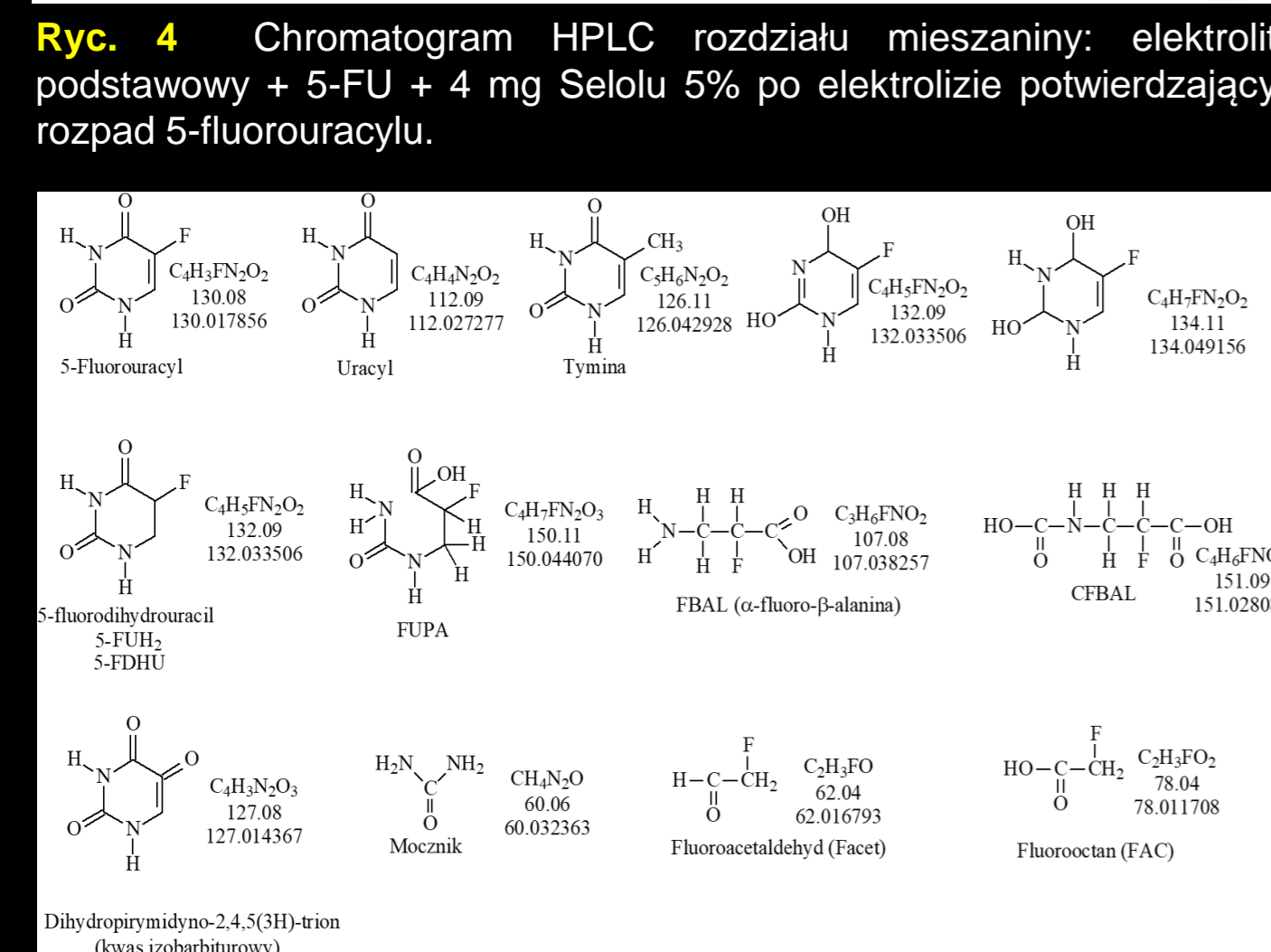
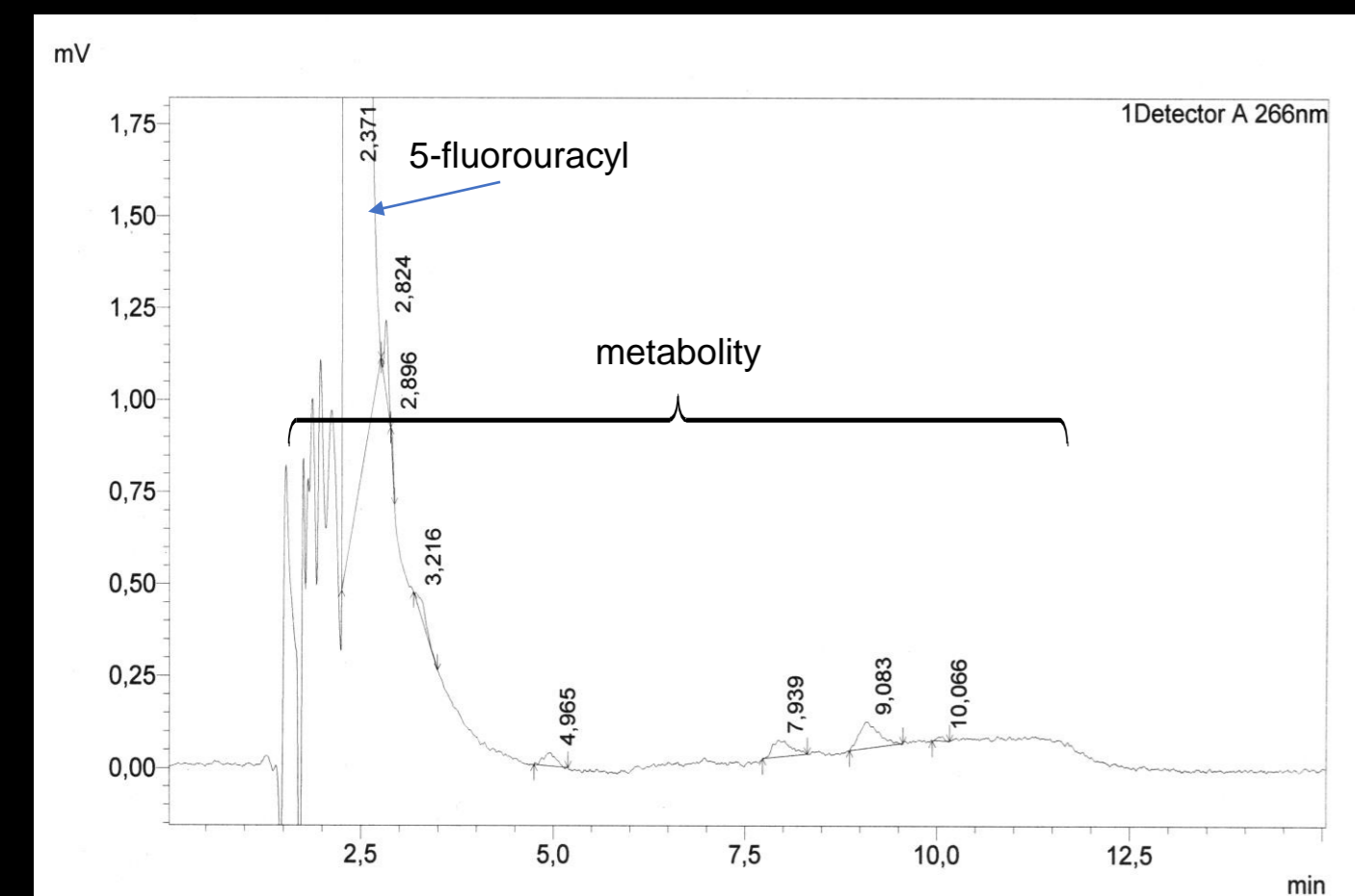


Tabela 2. Zestawienie wyników oznaczania zawartości wybranych metabolitów DOX oraz DOX z Selołem 5% w ilości 10 mg po jonizacji ujemnej H(-) metodą HPLC-MS.

Wzór sumaryczny	M.c.z. oznaczona	Pole powierzchni metabolitów dokсорubicyny	Pole powierzchni dokсорubicyny z 10 mg Selolu 5% [a.u.]	Współczynnik hamowania DOX + 10 mg Selolu DOX
C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	447,0894	8284524	7619467	0,92
C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	374,1002	373024	462214	1,24
C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	386,1001	1240	72744	1,34
C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	398,1011	53340864	71729140	0,43
C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	400,1157	741715	318472	32,88
C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	414,0955	86883	2856950	1,00
C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	416,1107	309414	310207	1,07
C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	483,1530	42118	44970	1,07
C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	485,1688	2443	37860	15,50

## Wnioski

- Selol 5% silnie zmienia metabolizm 5-fluorouracylu i dokсорubicyny.
- W obecności Selolu 5% wytwarzane są metabolity identyczne z tymi, które dotychczas wyizolowano w warunkach *ex vivo*, jednak ich skład ilościowy jest całkowicie odmienny.
- Wywołana przez Selol 5% modyfikacja metabolizmu przebiega odmiennie w przypadku 5-fluorouracylu i dokсорubicyny.
- Selol 5% bardzo silnie spowalnia tworzenie metabolitów 5-fluorouracylu, wydłuża czas jego działania i prawdopodobnie w wyniku tych zmian w nieco mniejszym stopniu niż w przypadku dokсорubicyny zmienia jego cytotoksyczność.
- Zmiany metabolizmu dokсорubicyny oraz 5-fluorouracylu wywołane obecnością Selolu 5% mogą warunkować różny stopień działania cytotoksycznego tych związków przez Selol.

Selol 5% znacznie spowalnia metabolizm trzech metabolitów DOX i jednego przyspiesza. Znikają działania uboczne DOX i aż dziesięciokrotnie wzrasta skuteczność działania cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych [1] (Tab.2, ryc. 8).

## Piśmiennictwo

[1] L. Śliwka, K. Wiktorska, P. Suchocki, M. Milczarek, S. Mielczarek, K. Lubelska, T. Cierpiat, P. Łyżwa, P. Kielbasiński, A. Jaromin, A. Flis, Z. Chilmonczyk: The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLOS ONE* 1-17 (2016).  
[2] Micoli G. et al., „Determination of 5- fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high- performance liquid chromatography with ultraviolet detection.” *Journal of Chromatography B*, 2001, 750: 25-32.  
[3] Lucas A. T. et al., „A sensitive high performance liquid chromatography assay for the quantification of doxorubicin associated with DNA in tumor and tissues.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 119: 122-129.