

PRACE ORYGINALNE
ginekologia

Wpływ wybranych związków pirymidynowych na aktywność fosforylasy tymidynowej komórek endometrialnych prawidłowych i nowotworowych

Influence of the selected pyrimidine compounds on the activity of thymidine phosphorylase from normal and tumor endometrial cells

Miszczak-Zaborska Elżbieta¹, Smolarek Monika¹, Dramiński Marcin², Kubiak Robert³, Józwiak Barbara¹, Bartkowiak Jacek¹

¹ Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej w Łodzi,

² Zakład Chemii Ogólnej, Katedra Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Bydgoszczy

³ Zakład Patologii Nowotworów, Katedra Onkologii UM w Łodzi,

Streszczenie

Cel pracy: Ocena wpływu wybranych związków pirymidynowych na aktywność enzymu fosforylasy tymidynowej (TP) komórek endometrialnych prawidłowych oraz nowotworowych.

Materiały i metody: Zbadano wpływ 28 związków na aktywność TP w cytosolu komórek endometrialnych mierzoną metodą spektrofotometryczną. Jedną grupę badaną stanowiły kobiety w wieku pomenopauzalnym leczone chirurgicznie z powodu raka endometrium - adenocarcinoma endometrialis (Adeno Ca E) a drugą kobiety poddane zabiegowi ginekologicznemu w związku z nieonkologicznymi dolegliwościami.

Wyniki: Najsilniejszym inhibitorem TP zarówno w prawidłowym endometrium jak i w raku endometrium był zsyntetyzowany 5-bromo-6-acetyloaminouracyl, który w 0,2mM stężeniu przy 0,2mM stężeniu tymidyny jako substratu zmniejszał aktywność TP w cytosolu o około 80%. 5-bromo-6-aminouracyl, 5-nitrouacyl i 5-bromouracyl zmniejszały tę aktywność również w sposób statystycznie istotny. Spośród zsyntetyzowanych pochodnych 1-N-alliloksymetylopirymidynowych aktywność TP w endometrium najsilniej hamowała 1-N-alliloksymetylotymina, a w raku endometrium 1-N-alliloksymetylo-4-hydroksy-5-nitro-6-oksopirymidyna. Najsukuteczniejszym aktywatorem TP w raku endometrium była 5-bromodeoksyurydyna i zsyntetyzowany 1-N-alliloksymetylo-5-nitrouacyl (zwiększały one aktywność enzymu w stosunku do kontroli o około 100%). 5-fluorodeoksyurydyna, 5-jododeoksyurydyna oraz 2'-deoksyurydyna aktywowały enzym również istotnie statystycznie. Aktywatory działały silniej w raku endometrium aniżeli w prawidłowym endometrium.

Wnioski: Zsyntetyzowany 5-bromo-6-acetyloaminouracyl znacznie hamował aktywność TP komórek endometrialnych dlatego mógłby znaleźć zastosowanie w ograniczaniu angiogenezy w raku endometrium. Z kolei podwyższająca aktywność TP komórek raka endometrium 5-bromodeoksyurydyna i zsyntetyzowany 1-N-alliloksymetylo-5-nitrouacyl mogłyby zwiększyć wydajność terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem cytostatyków. Wnioski te muszą być potwierdzone przez analizę większej liczby przypadków chorych na raka endometrium.

Słowa kluczowe: fosforylaza tymidynowa / nowotwory endometrium /

Adres do korespondencji:

Elżbieta Miszczak-Zaborska
Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej w Łodzi,
Łódź, ul. Mazowiecka 6/8
tel. 0 42 678 24 65,
e-mail: zaborska@zdn.umed.lodz.pl

Otrzymano: 28.06.2008
Zaakceptowano do druku: 27.07.2009

Abstract

Objectives: The aim of this study was to evaluate the influence of the selected pyrimidine compounds on the activity of thymidine phosphorylase (TP) of normal and tumor endometrial cells.

Materials and methods: Influence of 28 chemical compounds on the TP activity in the cytosol of the endometrial cells was studied by the spectrophotometric method.

The studied group comprised postmenopausal women with endometrial cancer: adenocarcinoma endometrialis (Adeno Ca E). The second group included women with normal endometrium after surgery due to non-oncologic reasons.

Results: The most potent inhibitor of TP activity from cancer and endometrium was synthesized 5-bromo-6-acetyloaminouracil, which at the 0,2mM concentration, by 0,2mM concentration thymidine reduced the cytosol TP activity by about 80%. 5-bromo-6-aminouracil, 5-nitrouracil and 5-bromouracil reduced this TP activity in statistically significant manner. From among synthesized 1-N-allyloxymethylpyrimidine derivatives 1-N-allyloxymethylthymine was the strongest inhibitor of the TP activity in endometrium, and 1-N-allyloxymethyl-4-hydrokxy-5-nitro-6-oxypyrimidine in endometrial cancer, respectively. The most potent activators of TP in endometrial cancer was 5-bromodeoxyuridine and 1-N-allyloxymethyl-5-nitrouracil, which increased the TP activity about 100%. 5-fluorodeoxyuridine, 5-jododeoxyuridine and 2'-deoxyuridine activated the TP in statistically significant manner too, but stronger in case of endometrial cancer than in normal endometrium.

The synthesized 5-bromo-6-acetyloaminouracil strongly inhibited the TP activity of endometrial cells and might be useful in reducing endometrial cancer angiogenesis. On the other hand 5-bromodeoxyuridine and the synthesized 1-N-allyloxymethyl-5-nitrouracil might increase the effect of antitumor therapy with the cytostatics.

These conclusions ought to be confirmed by analyzing more tumor cases.

Key words: **thymidine phosphorylase / endometrial neoplasms /**

Wstęp

Ponieważ neowaskularyzacja jest przełomowym etapem w rozwoju guza, szukanie przyczyn wyzwalających procesy angiogenezy i sposobów jej przerywania jest współcześnie istotne w zabiegach zmierzających do hamowania wzrostu nowotworowego. Badania angiogenezy prowadzone były od połowy lat sześćdziesiątych, ale dopiero w osiemdziesiątych latach nastąpił gwałtowny ich wzrost, co było spowodowane odkryciem i zsekwencjonowaniem kilku czynników wzrostowych, endogennych inhibitorów angiogenezy i innych cząsteczek macierzy zewnątrzkomórkowej. Zainteresowanie fosforylazą tymidynową nastąpiło w połowie lat dziewięćdziesiątych, gdy zaczęto ją identyfikować z płytkopochodnym czynnikiem wzrostowym komórek śródbłonna (PD-ECGF) wpływającym na angiogenezę [1-6]. Stwierdziliśmy w naszym laboratorium, że aktywność TP w raku *endometrium* jest wyższa aniżeli w prawidłowym *endometrium* i dodatnio skorelowana z ekspresją białka PD-ECGF oraz z gęstością mikronaczyń, co sugeruje, że jest ona czynnikiem angiogennym (w druku). Z tego względu, poszukujemy skutecznych inhibitorów tego enzymu.

Fluoropirymidyny reprezentują najczęściej zalecaną na świecie grupę leków przeciwnowotworowych. Koncepcja użycia fluoropirymidyn pojawiła się w późnych latach pięćdziesiątych [7]. TP katalizuje pierwszy etap konwersji zasad pirymidynowych oraz nukleozydowych metabolitów takich jak 5-fluorouracyl (5-FU), 5-fluoro-5'-deoksyurydyna (5-F-5'dUrd), tegafur (FT, 1-tetrahydro-2-furanylo-5-fluorouracyl) do antynowotworowych nukleotyduw ingerujących w replikację DNA i syntezę RNA [7]. Odkryto, że kapecytabina (karbaminian fluoropirymidyny będący prekursorem 5-fluorouracylu) po podaniu *per os* wchłania się dobrze i jest pozbawiona działania cytotoksycznego w pierwszym etapie przemiany. Kapecytabina jest początkowo metabolizowana w wątrobie przez esterazę karboksylową do 5-F-5'dCyt, następnie ulega przemianie w 5-F-5'dUrd pod wpływem deaminazy cytidyny, występującej głównie w wątrobie i w tkankach nowotwo-

rowych. Dalsza aktywacja katalityczna 5-F-5'dUrd następuje pod wpływem TP. Ta sekwencyjna enzymatyczna biotransformacja kapecytabiny do 5-FU prowadzi do zwiększenia stężenia leku w tkance nowotworowej [8]. Stosowana jest obecnie w połączeniu z innymi lekami i radioterapią [9, 10]. Biorąc pod uwagę powyższe wzrost aktywności TP w tkance nowotworowej wydawał się nam być drogą poprawiającą skuteczność działania leków fluoropirymidynowych.

Odpowiednia modulacja aktywności TP w guzach *endometrium* może okazać się więc nowym sposobem leczenia raka *endometrium*.

Cel pracy

Ze względu na fakt, iż TP jest potencjalnym czynnikiem zaangażowanym w kancerogenezę oraz z drugiej strony w metabolizm cytostatyków, poszukuje się związków modulujących aktywność tego enzymu. Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych związków pirymidynowych na aktywność TP w raku *endometrium* i prawidłowym *endometrium*.

Materiały i metody

Pierwszą grupę badaną stanowiły kobiety w wieku pomenopauzalnym leczone chirurgicznie z powodu raka *endometrium adenocarcinoma endometrialis* (Adeno Ca E), w stopniu zaawansowania klinicznego FIGO I. W skład drugiej grupy wchodziły kobiety poddane zabiegowi ginekologicznemu w związku z nieonkologicznymi dolegliwościami, w I Klinice Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Po pobraniu odpowiedniego fragmentu tkanki materiał zamrażano (-80°C).

Rozpoznanie histopatologiczne dokonywane były bezpośrednio po zabiegu operacyjnym. Przeprowadzono oznaczenia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych CD31 celem obliczenia ilości mikronaczyń, oraz z użyciem przeciwciał monoklonalnych TP/PD-ECGF celem badania ekspresji

Wpływ wybranych związków pirymidynowych na aktywność fosforylasy tymidynowej komórek endometrialnych prawidłowych i nowotworowych.

białka enzymatycznego i oznaczenia aktywności właściwej TP (w druku). Na ich podstawie do badań wpływu związków pirymidynowych na aktywność TP w cytosolu komórek endometrialnych wybrano guzy charakteryzujące się wysoką aktywnością właściwą TP skorelowaną z wysoką ekspresją TP/PD-ECGF i gęstością mikronaczyń.

Zamrożone fragmenty guzów *endometrium* oraz *endometrium* homogenizowano w temp. 4°C w czterech objętościach buforu 1mM Tris maleinowego (pH 6,5) z dodatkiem glicerolu do 10% objętości. Aktywność TP oznaczano w cytosolu komórek metodą spektrofotometryczną [11].

Badania wpływu wybranych związków na aktywność TP prowadzone były w analogiczny sposób jak oznaczanie aktywności TP bez udziału badanych związków, z tą różnicą, że mieszanina inkubacyjna w końcowej objętości 0,5ml zawierała odpowiednio dobrane w wyniku wcześniejszych doświadczeń stężenie substratu (0,2mM stężenie tymidyny) oraz badanego związku (pochodna pirymidynowa o stężeniu 0,2mM).

Aktywność enzymatyczną TP w obecności badanych związków określano w µmolach tyminy uwolnionej w ciągu jednej godziny reakcji, w temperaturze 37°C w przeliczeniu na mililitr próby. Kontrolę (K) stanowiła aktywność enzymatyczna TP oznaczona bez dodatku badanych związków. Otrzymane wyniki podano w % aktywności w stosunku do tej kontroli.

Stosowane w pracy odczynniki to pochodne pirymidynowe o potencjalnych właściwościach inhibitorowych lub aktywatorowych wobec TP. Pochodziły one z firmy Sigma, Fluka, lub z syntezy. Metoda syntezy opracowana została w Zakładzie Chemii Ogólnej Akademii Medycznej im. L. Rydygiera w Bydgoszczy pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Dramińskiego.

Zbadano wpływ następujących związków na aktywność enzymu:

1. * 4,6-dihydroksy-5-nitropirymidyna
2. * 5-bromo-6-aminouracyl
3. * 6-acetyloaminouracyl
4. * 5-bromo-6-propionylaminouracyl
5. * 5-bromo-6-acetyloaminouracyl
6. uracyl
7. * 1-N-alliloksymetylo-5-nitrouuracyl
8. * 1-N-alliloksymetylo-5-bromouracyl
9. * 1-N-alliloksymetylotymina
10. * 1-N-alliloksymetylo-5,6-trimetylenouracyl
11. * 1-N-alliloksymetylo-5,6-tetrametylenouracyl
12. * 1-N-alliloksymetylo-6-acetoaminouracyl
13. * 1-N-alliloksymetylo-4-hydroksy-5-nitro-6-oksopirymidyna
14. 5-nitrouuracyl
15. 5-bromouracyl
16. * 5,6-trimetylenouracyl
17. * 5,6-tetrametylenouracyl
18. 5-aminouracyl
19. urydyna
20. 5-metylourydyna
21. 5-fluorodeoksyurydyna
22. 2'-deoksyurydyna
23. 5-jododeoksyurydyna
24. 5-fluouracyl
25. 5-bromo-2'-deoksyurydyna
26. 2'3'-dideoksyurydyna

27. 5-bromourydyna
28. 3'azido3'deoksytymidyna

* Związki zsyntetyzowane na potrzeby prezentowanej pracy.

W analizie statystycznej uwzględniono średnią statystyczną, odchylenie standardowe oraz test t-Studenta. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną.

Wyniki

Aktywność enzymatyczna TP w cytosolu komórek endometrialnych badana była względem 0,2mM tymidyny jako substratu w obecności związków o stężeniu 0,2mM i określana w µmolach tyminy uwolnionej w ciągu jednej godziny reakcji, w temperaturze 37°C w przeliczeniu na mililitr próby. Otrzymane wyniki porównano z kontrolą, dla której przyjęto 100% aktywności. Kontrolę stanowiła aktywność enzymatyczna TP oznaczona bez dodatku badanych związków. Otrzymane wyniki podano w % aktywności TP, który jest średnią z prób uzyskanych z guzów od trzech kobiet.

Wpływ zsyntetyzowanych pochodnych uracylu na aktywność TP w raku *endometrium*

Spośród tej grupy związków inhibitorami TP są 5-bromo-6-aminouracyl (2) oraz 5-bromo-6-acetyloaminouracyl (5). Zmniejszają one aktywność TP o około 70-80%. 6-acetyloaminouracyl (3) nieznacznie podwyższa aktywność TP (o około 6%). 5-bromo-6-acetyloaminouracyl jest najsilniejszym inhibitorem zarówno w raku *endometrium* jak i *endometrium*. (Rycina 1, 5).

Wpływ zsyntetyzowanych pochodnych 1-N-alliloksymetylopierymidynowych na aktywność TP w raku *endometrium*

Z tej grupy związków 1-N-alliloksymetylo-4-hydroksy-5-nitro-6-oksopirymidyna (13) hamuje aktywność TP o około 15%. Pozostałe związki w stężeniu 0,2mM i przy stężeniu tymidyny 0,2mM nie hamują aktywności enzymu. (Rycina 2).

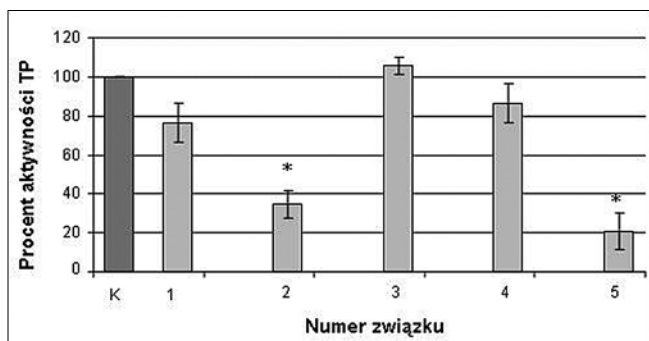
1-N-alliloksymetylo-5-nitrouuracyl (5) podwyższa aktywność enzymu w raku *endometrium* o około 100%, natomiast nie wpływa istotnie na aktywność TP w *endometrium*. (Rycina 2, 5).

Wpływ związków komercyjnie dostępnych o potencjalnych właściwościach inhibitorowych na aktywność TP w raku *endometrium*

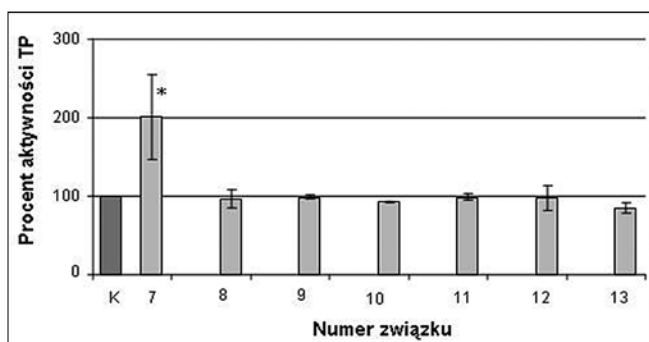
Spośród tej grupy związków najsukuteczniejszymi inhibitorami TP są 5-nitrouuracyl (14) oraz 5-bromouracyl (15), gdyż hamują aktywność TP odpowiednio o około 70 i 50%. Aminouracyl (18) oraz 5-fluouracyl (24) hamują aktywność enzymu również statystycznie istotnie. Adekwatna sytuacja ma miejsce w przypadku działania tych związków w *endometrium*. (Rycina 3, 5).

Wpływ związków komercyjnie dostępnych o potencjalnych właściwościach aktywatorowych na TP w raku *endometrium*

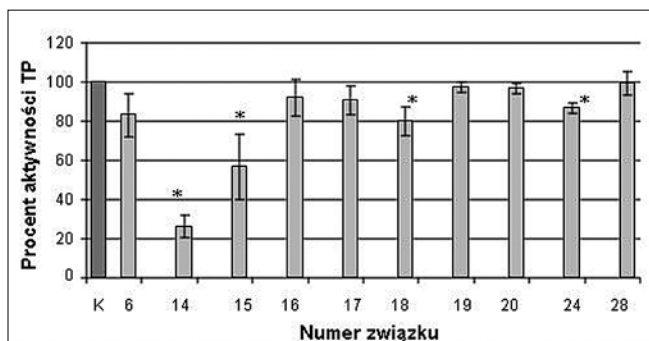
Najsilniejszymi aktywatorami TP w raku *endometrium* są: 5-bromodeoksyurydyna (25) 5-fluorodeoksyurydyna (21). Podwyższają one aktywność enzymu w stosunku do kontroli o około 100%. 5-jododeoksyurydyna (23) aktywuje enzym również w sposób statystycznie istotny. 5-bromodeoksyurydyna aktywuje enzym najsilniej również w *endometrium*. (Rycina 4, 5).



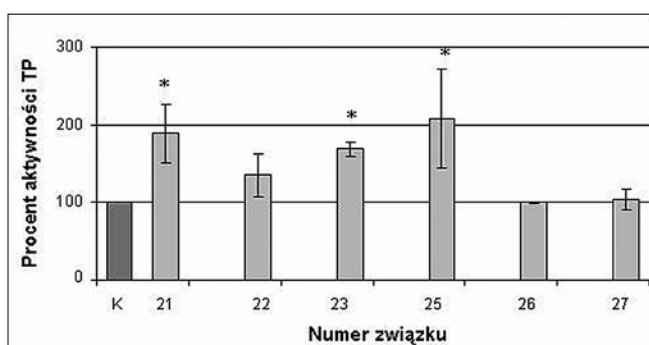
Rycina 1. Wpływ zsyntetyzowanych pochodnych uracylu na aktywność TP w raku *endometrium* (n = 3), * p<0,05.



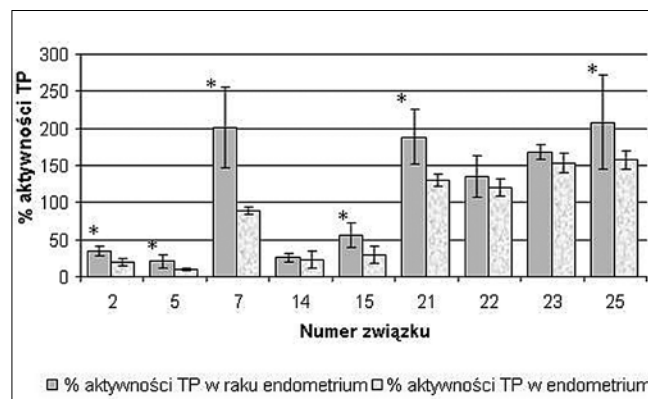
Rycina 2. Wpływ zsyntetyzowanych pochodnych 1-N-alliloksymetylopimidynowych na aktywność TP w raku *endometrium* (n = 3), * p<0,05.



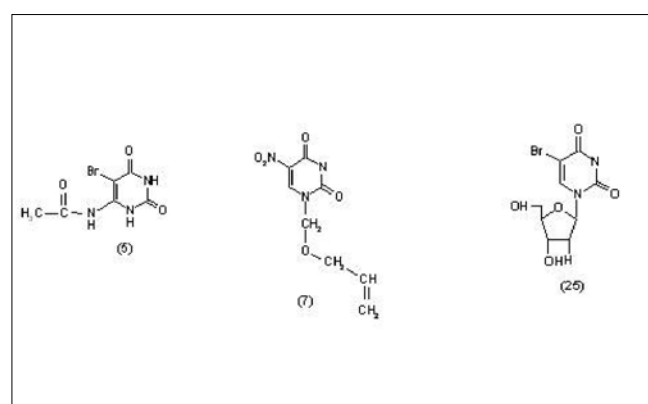
Rycina 3. Wpływ związków komercyjnie dostępnych o potencjalnych właściwościach inhibitorowych na aktywność TP w raku *endometrium* (n = 3), * p<0,05.



Rycina 4. Wpływ związków komercyjnie dostępnych o potencjalnych właściwościach aktywatorowych na TP w raku *endometrium* (n = 3), * p<0,05.



Rycina 5. Związki najsilniej modulujące aktywność TP w endometrium i raku *endometrium* (n = 3), * p<0,05.



Rycina 6. Wzory związków najsilniej modulujących aktywność TP w raku *endometrium* i prawidłowym *endometrium*.

Porównanie działania badanych związków na aktywność fosforylasy tymidynowej w endometrium i raku *endometrium*

Dodane pochodne pirymidynowe skuteczniej aktywują TP w raku *endometrium* niż w *endometrium*. Istotne statystycznie różnice (p<0,05) występują w działaniu 1-N-alliloksymetylo-5-nitrouacylu (7), oraz 5-bromodeoksyurydyny (25), 5-fluorodeoksyurydyny (21). Wśród związków hamujących aktywność TP istotne statystycznie różnice między rakiem *endometrium* i prawidłowym *endometrium* występują w działaniu 5-bromo-6-acetyloaminouracylu (5), 5-bromo-6-aminouracylu (2) i 5-bromouracylu (15) (p<0,05), natomiast brak jest tych różnic dla 5-jododeoksyurydyny (23) i 2'-deoksyurydyny (p>0,05). (Rycina 5).

Wzory związków najsilniej modulujących aktywność TP w *endometrium* prawidłowym i nowotworowym przedstawiono na rycinie 6.

Nie umieszczono danych dotyczących pozostałych badanych związków ze względu na brak istotnych różnic statystycznych w ich działaniu na TP raka *endometrium* i prawidłowego *endometrium*.

Wpływ wybranych związków pirymidynowych na aktywność fosforylasy tymidynowej komórek endometrialnych prawidłowych i nowotworowych.

Dyskusja

W cytosolu komórek ssaków występują dwie fosforylasy nukleozydów pirymidynowych: tymidynowa [EC.2.4.2.4.] TP i urydynowa [EC. 2.4.2.3.] UP [12, 13]. Enzymy te odgrywają znaczną rolę w metabolizmie nukleozydów, jak również w procesie odzysku („szlak oszczędzania”) zasad pirymidynowych [14], uczestniczą więc także w metabolizmie komórek nowotworowych. Inhibitory tych enzymów znalazły początkowo zastosowanie w chemioterapii zmniejszając *in vivo* rozkład analogów nukleozydów pirymidynowych wykazujących aktywność antyrakową [15, 16]. Znane były głównie inhibitory UP, będące pochodnymi uracylu z różnymi podstawnikami w pozycji 5, które były testowane przede wszystkim na materiale zwierzęcym [17, 18, 19]. W obecnej pracy zbadany został wpływ pochodnych uracylu, które były najsilniejszymi inhibitorami TP guza łagodnego - mięśniaka macicy [20], na aktywność TP w cytosolu raka *endometrium*, który jest guzem złośliwym. Z tej puli związków 5-nitrouracyl oraz 5-bromouracyl hamowały aktywność enzymu również skutecznie w komórkach endometrialnych. Wcześniejsze nasze doświadczenia prowadzone były po oczyszczeniu TP z mięśniaka gładkomórkowego macicy przez frakcjonowanie do nasycenia 40% siarczanem amonu i chromatografię na DEAE-Sefarozie. Użyliśmy w ten sposób prawie 40-krotny wzrost aktywności TP w preparacie enzymatycznym, co umożliwiło wyznaczenie typu inhibicji i stałych inhibitorowych poprzez zastosowanie różnych stężeń badanego związku i substratu [20]. Opierając się na tych doświadczeniach postanowiliśmy zsyntetyzować nowe pochodne pirymidynowe o potencjalnych właściwościach inhibitorowych TP, celem zbadania ich wpływu na aktywność TP w cytosolu guza złośliwego. Spośród tej puli związków 5-bromo-6-aminouracyl (2) oraz 5-bromo-6-acetyloaminouracyl (5) zmniejszały aktywność TP przy 0,2mM stężeniu inhibitora i 0,2mM stężeniu tymidyny o około 70%. 5-bromo-6-acetyloaminouracyl był najsilniejszym inhibitorem zarówno w raku *endometrium* jak i *endometrium*.

Obecnie wiadomo, że TP utożsamiana jest z płytkopochodnym czynnikiem wzrostowym komórek śródbłonna (PD-ECGF) i w tkance nowotworowej jest aktywowana przez chemiczny i fizyczny stres [21, 22]. Indukcja ta chroni komórki guza przed apoptozą i pomaga przetrwać niekorzystne warunki, poprzez zwiększenie metabolizmu nukleozydowego oraz angiogenezy. Z tego względu, poszukiwane są w dalszym ciągu skuteczne inhibitory tego enzymu. Znalaziono kilka nowych związków, które hamowały aktywność TP ograniczając wzrost guza i proces angiogenezy, oraz tłumiły odporność komórek na apoptozę wywołaną brakiem tlenu [23]. Donoszono, o zsyntetyzowanym chlorowodorku 5-chloro-6-[1-(2-iminopirolidyno) metylo] uracylu (TPI), który był 1000 razy bardziej aktywny niż 5-bromo-6-aminouracyl [24]. W odróżnieniu od badań aktywności TPI prowadzonych w ludzkiej linii komórkowej [24], nasze eksperymenty były wykonywane bezpośrednio w cytosolu komórek rakowych otrzymanym od pacjentek poddanych operacji.

Opierając się na wcześniejszych naszych badaniach pochodnych alliloksymetylowych, które w pewnym stopniu hamowały aktywność TP w mięśniaku macicy [20], zostały zsyntetyzowane potencjalne inhibitory TP zawierające grupę alliloksymetylową, celem przetestowania ich wpływu na aktywność TP w cytosolu guzów złośliwych człowieka. Otrzymane wyniki wskazały, że z tej grupy związków najsilniej aktywność TP hamowała jedynie

1-N-alliloksymetylotymina (9) w *endometrium*, a 1-N-alliloksymetylo-4-hydroksy-5-nitro-6-oksopirymidyna w raku *endometrium* zmniejszała aktywność TP jedynie około 15%. Pozostałe związki w stężeniu 0,2mM i przy stężeniu tymidyny 0,2mM wykazały niski procent hamowania enzymu. Zasługiwały one jednak na uwagę, ze względu na obecność podstawnika alliloksymetylowego, który mógłby ułatwiać przedostanie się związków przez błonę komórkową.

Cytostatyki wrażliwe na działanie TP to fluoropirymidyny. Spośród nich 5'-dFUrd, 5-FU, FT są szeroko używane w leczeniu guzów stałych takich jak raki sutka, okrężnicy, odbytu czy żołądka [25-31]. Wzrost ekspresji białka TP w komórkach raka jelita grubego, podnosił ich odpowiedź na leczenie 5-FU zarówno *in vitro*, jak i w komórkach zwierząt [7]. TP była głównym enzymem odpowiedzialnym za fosforolizę 5'-dFUrd i 5-FdUrd do 5-FU zarówno w wątrobie ludzi, jak i wątrobie myszy [31] czy w komórkach raka naskórka człowieka [25]. Fosforoliza ta była katalizowana w guzach ludzkich przez TP, a w guzach zwierzęcych przez fosforylazę urydynową (UP) [26, 32, 33]. Ponieważ aktywność fosforylazowa jest większa w guzach niż w tkankach niezmiennych chorobowo, 5'-dFUrd była efektywnie zamieniana do 5-FU dopiero w guzach docelowych [26]. Również oczyszczona z raka wątroby ludzkiej TP zamieniała FT do 5-FU aktywniej niż z wątroby zdrowej, czy krwi [26]. Dlatego poszukiwano sposobów podwyższających aktywność TP, na przykład efekt terapeutyczny 5'-dFUrd zwiększano przez transfekcję TP do komórek [29]. Oprócz transfekcji stosowano też dodatkowy kosubstrat oraz aktywatory TP, takie jak interferony (IFN). Substraty dla TP mogły służyć jako donory 2'-deoksyrybozy w następnej reakcji syntezy i razem z IFN i 5-FU zwiększać aktywność TP istotną w tworzeniu 5-FdUrd. Takimi substratami były np. 5-etoksy-2'-deoksyurydyna i 5-propynyloksy-2'-deoksyurydyna. 5-FU w połączeniu z nukleozydem i IFN działał bardziej efektywnie niż bez tych czynników i był znacznie mniej toksyczny [34]. W prezentowanej pracy aktywność enzymu była podwyższona w cytosolu komórek raka *endometrium* o prawie 100% przez 5-bromo 2'-deoksyurydynę i zsyntetyzowany 1-N-alliloksymetylo-5-nitrouracyl. 5-fluorodeoksyurydyna, 5-jododeoksyurydyna oraz 2'-deoksyurydyna aktywowały enzym również istotnie statystycznie. Aktywatory działały silniej w raku *endometrium* aniżeli w prawidłowym *endometrium*.

Opierając się na literaturze wydaje się, że spełniały one rolę kosubstratów [34]. Z drugiej strony jednak Drabikowska i wsp. [19, 35] oraz Niedźwiecki i wsp. [17] stwierdzili, że acyklonukleozydy były inhibitorami UP i nie hamowały aktywności TP. Inne syntetyczne acyklonukleozydy o potencjalnych właściwościach cytostatycznych i przeciwwirusowych również nie hamowały aktywności TP [36-39]. Pochodne alliloksymetylowe stosowane w naszych badaniach są acyklonukleozydami, które obniżały aktywność TP w mięśniaku i mięśniówce macicy [20] oraz w pewnym stopniu w raku *endometrium* i *endometrium* prawidłowym, a jeden z nich podwyższał tą aktywność istotnie.

Ponieważ TP jest zaangażowana w proces aktywacji 5-FU oraz jego pochodnych, wysoka aktywność enzymu może korzystnie wpływać na wzrost efektywności działania leków przeciwnowotworowych [40]. U pacjentów z wyższą ekspresją TP w tkance nowotworowej uzyskuje się lepsze efekty leczenia. Jednak nie wszystkie badania to potwierdzają. Równowaga ryzyko/korzyść między angiogenezą a aktywacją leków przeciwnowotworowych

wyduje się przesuwac w kierunku wzrostu agresywności guzów z późniejszym spadkiem przeżywalności pacjentów mimo podania im pochodnych 5-fluorouracylu [41]. Sprzeczności te może wyjaśniać fakt, że odpowiedź na leki przeciwnowotworowe jest uzależniona od współdziałania wielu czynników. Dlatego też wysoka ekspresja TP w guzach, jako pojedynczy czynnik nie jest wystarczająca do zagwarantowania powodzenia leczenia.

Dlatego też, z powodu swojego podwójnego charakteru enzymp ten jest obiektem intensywnych badań.

Opierając się na publikacji Ciccolini i wsp. fosforylazę tymidynową można nazwać molekularnym Dr Jekyll i Mr Hyde [41]. Z jednej strony enzym ten bierze udział w metabolizmie cytotatyków, dzięki czemu przyczynia się do wzrostu wrażliwości komórek nowotworowych na terapię lekową, z drugiej strony jednak, TP jest potencjalnym czynnikiem angiogennym chroniącym komórki nowotworowe przed apoptozą. Przeprowadzone wcześniejsze nasze doświadczenia wskazały, że TP w raku *endometrium* jest czynnikiem angiogennym gdyż istniała korelacja między aktywnością TP, a wysoką ekspresją białka TP/PD-ECGF i gęstością mikronaczyń w guzie (art. w druku).

Wnioski

Zsyntetyzowany 5-bromo-6-acetyloaminouracyl, znacznie hamował aktywność TP w cytosolu komórek endometrialnych prawidłowych i nowotworowych, co mogłoby znaleźć zastosowanie w ograniczeniu angiogenezy raka *endometrium*. Związkiem znacznie podwyższającym aktywność TP w cytosolu komórek endometrialnych nowotworowych był zsyntetyzowany 1-N-allyloksymetylo-5-nitrouacyl, który mógłby zwiększyć wydajność terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem cytostatyków.

Wnioski te muszą być potwierdzone przez analizę większej liczby przypadków chorych na raka *endometrium*.

Praca została wykonana w ramach grantu KBN 4 T09B 038 22

Piśmiennictwo

- Moghaddam A, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry*. 1992, 31,12141-12146.
- Usuki K, Saras J, Waltenberger J, [et al.]. Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992, 184, 1311-1316.
- Sumizawa T, Furukawa T, Haraguchi M, [et al.]. Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biochem*. 1993, 114, 9-14.
- Usuki K, Gonez L J, Wernstedt C, [et al.]. Structural properties of 3.0 kb and 3.2 kb transcripts encoding platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in A431 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1994, 1222, 411-414.
- Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, [et al.]. Angiogenic activity of enzyme. *Nature*. 1994, 368,198.
- Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, [et al.]. Angiogenic activity of enzymes. *Nature*. 1994, 368, 198.
- Focher F, Spadari S. Thymidine phosphorylase: a two-face Janus in anticancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2001, 1, 141-153.
- Verweij J. Rational design of new tumor-activated (TH) cytotoxic agents. *Oncology*. 1999, 57, 9-15.
- Rothenberg M, Cox J, Butts C, [et al.]. Capecitabine plus oxalipatin (XELOX) versus 5-fluorouracil/folinic acid plus oxalipatin (FOLFOX-4) as second-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III noninferiority study. *Ann Oncol*. 2008,19, 1720-1726.
- Fakh M, Bullardunn K, Yang G, [et al.]. Phase II Study of Weekly Intravenous Oxalipatin Combined with Oral Daily Capecitabine and Radiotherapy with Biologic Correlates in Neoadjuvant Treatment of Rectal Adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008, 72,650-657.
- Miszczak-Zaborska E, Wójcik-Krowiranda K, Kubiak R, [et al.]. The activity of thymidine phosphorylase as a new ovarian tumor marker. *Gynecol Oncol*. 2004, 94, 86-92.
- Krenitsky T, Barclay M, Jacques J. Specificity of mouse uridine phosphorylase. Chromatography, purification and properties. *J Biol Chem*. 1964, 239, 805-812.
- Grancharov K, Mladenova J, Golovinsky E. Inhibition of uridine phosphorylase by some pyrimidine derivatives. *Biochem Pharmacol*. 1991, 41, 1769-1772.
- Perignon J, Bories D, Houllier A, [et al.]. Metabolism of pyrimidine bases and nucleosides by pyrimidine-nucleoside phosphorylases in cultured human lymphoid cells. *Biochim Biophys Acta*. 1987, 928, 130-136.
- Woodman P, Sarraf A, Heidelberger C. Inhibition of nucleoside phosphorylase cleavage of 5-fluoro-2'-deoxyuridine by 2,4-pyrimidinedione derivatives. *Biochem Pharmacol*. 1980, 29, 1059-1063.
- Woodman P, Sarraf A, Heidelberger C. Specificity of pyrimidine nucleoside phosphorylases and the phosphorylation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Cancer Res*. 1980, 40, 507-511.
- Niedzwicki J, Chu S, el Kouni M, [et al.]. 5-benzylacetyluridine and 5-benzylacetyluridine, potent inhibitors of uridine phosphorylase. *Biochem Pharmacol*. 1982, 31, 1857-1861.
- Niedzwicki J, el Kouni M, Chu S, [et al.]. Pyrimidine acyclonucleosides, inhibitors of uridine phosphorylase. *Biochem Pharmacol*. 1981, 30, 2097-2101.
- Drabikowska A, Lissowska L, Veres Z, [et al.]. Inhibitor properties of some 5-substituted uracil acyclonucleosides, and 2,2'-anhydrouridines versus uridine phosphorylase from *E. coli* and mammalian sources. *Biochem Pharmacol*. 1987, 36, 4125-4128.
- Miszczak-Zaborska E, Wozniak K. The activity of thymidine phosphorylase obtained from human uterine leiomyomas and studied in the presence of pyrimidine derivatives. *Z Naturforsch C*. 1997, 52, 670-675.
- Brown N, Jones A, Fujiyama C, [et al.]. Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Cancer Res*. 2000, 60, 6298-6302.
- Sengupta S, Sellers L, Matheson H, [et al.]. Thymidine phosphorylase induces angiogenesis in vivo and in vitro: an evaluation of possible mechanisms. *Br J Pharmacol*. 2003, 139, 219-231.
- Matsushita S, Nitanda T, Furukawa T, [et al.]. The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors. *Cancer Res*. 1999, 59, 1911-1916.
- Ciccolini J, Evrard A, Cuq P. Thymidine phosphorylase and fluoropyrimidines efficacy: a Jekyll and Hyde story. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004, 4, 71-81.
- Haraguchi M, Furukawa T, Sumizawa T, [et al.]. Sensitivity of human KB cells expressing platelet-derived endothelial cell growth factor to pyrimidine antimetabolites. *Cancer Res*. 1993, 53, 5680-5682.
- Hara Y. [5'-Deoxy-5-fluorouridine enzymatic activation from the masked compound to 5-fluorouracil in human malignant tissues] *Gan To Kagaku Ryoho*. 1984, 11, 2133-2143.
- Tevearai H, Laurent L, Suardet L, [et al.]. Interactions of interferon-alpha 2a with 5'-deoxy-5-fluorouridine in colorectal cancer cells in vitro. *Eu. Cancer*. 1992, 28, 368-372.
- Schwartz E, Baptiste N, Wadler S, [et al.]. Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil. *J Biol Chem*. 1995, 270, 19073-19077.
- Patterson A, Zhang H, Moghaddam A, [et al.]. Increased sensitivity to the prodrug 5'-deoxy-5-fluorouridine and modulation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine sensitivity in MCF-7 cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer*. 1995, 72, 669-675.
- Higley B, Oakes J, DeMello J, [et al.]. Pyrimidine nucleoside phosphorylase activity in tumour and matched normal gastrointestinal mucosa. *Gut*. 1982, 23, 1072-1076.
- el-Kouni M, el-Kouni M, Naguib F. Differences in activities and substrate specificity of human and murine pyrimidine nucleoside phosphorylases: implications for chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Cancer Res*. 1993, 53, 3687-3693.
- Razzell W. Pyrimidine nucleoside and deoxynucleoside phosphorylases. *Methods Enzymol*. 1967, 12A, 118-125.
- Miwa M, Cook A, Ishitsuka H. Enzymatic cleavage of various fluorinated pyrimidine nucleosides to 5-fluorouracil and their antiproliferative activities in human and murine tumor cells. *Chem Pharm Bull*. 1986, 34, 4225-4232.
- Schwartz E, Baptiste N, Megati S, [et al.]. 5-Ethoxy-2'-deoxyuridine, a novel substrate for thymidine phosphorylase, potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil when used in combination with interferon, an inducer of thymidine phosphorylase expression. *Cancer Res*. 1995, 55, 3543-3550.
- Drabikowska A, Lissowska L, Draminski M, [et al.]. Acyclonucleoside analogues consisting of 5- and 5,6-substituted uracils and different acyclic chains: inhibitory properties vs purified *E. coli* uridine phosphorylase. *Z Naturforsch C*. 1987, 42, 288-296.
- Naguib F, Levesque D, Wang E, [et al.]. 5-Benzylbarbituric acid derivatives, potent and specific inhibitors of uridine phosphorylase. *Biochem Pharmacol*. 1993, 46, 1273-1283.
- Moukha-Chafiq O, Taha M, Mouna A, [et al.]. Synthesis and biological evaluation of some alpha-[6-(1'-carbamoylalkylthio)-1 H-pyrazolo[3,4-D]pyrimidin-4-yl]thioalkylcarboxamide acyclonucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007, 26, 335-345.
- Kabbaj Y, Lazrek H, Barascut J, [et al.]. Synthesis and biological activity of some unsaturated 6-azauracil acyclonucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005, 24, 161-172.
- Bu W, Settembre E, el Kouni M, [et al.]. Structural basis for inhibition of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by 5-substituted acyclouridines. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2005, 61, 863-872.
- Toi M, Atiqur Rahman M, Bando H, [et al.]. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol*. 2005, 6, 158-166.
- Ciccolini J, Evrard A, Cuq P. Thymidine phosphorylase and fluoropyrimidines efficacy: a Jekyll and Hyde story. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004, 4, 71-81.