



UNIWERSYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH

SZKOŁA DOKTORSKA

SEKCJA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH

DYSCYPLINA: NAUKI BIOLOGICZNE

Wiktoria Krakowiak

**UWRAŻLIWIANIE OPORNYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH
PIERSI ZA POMOCĄ NANOCZĄSTEK ZŁOTA W TERAPII
BOROWO-NEUTRONOWEJ (BNCT)**

Praca doktorska napisana pod kierunkiem

Dr hab. Haliny Lisowskiej, prof. UJK

Dr Karoliny Wójciuk (NCBJ w Otwocku)

Kielce rok 2025

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję wszystkim osobom, które bezpośrednio przyczyniły się do powstania mojej pracy doktorskiej, jak i również wszystkim tym, którzy wspierali mnie w trudnych chwilach dobrym słowem bądź radą.

*Serdeczne podziękowania kieruję w stronę moich promoterek **dr hab. prof. UJK Haliny Lisowskiej** oraz **dr Karoliny Wójciuk** za wszelką pomoc i rady w trakcie wykonywania badań oraz powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej. Dziękuję za poświęcony mi czas na konsultacje związane z tematyką badawczą.*

*Ogromne podziękowania kieruję w stronę **prof. zw. dr hab. Annie Lankoff** za poświęcony mi czas na konsultacje związane z pisanem pracy oraz bezcenne podpowiedzi przy analizie wyników. Dziękuję również **prof. zw. dr hab. Andrzejowi Wójcikowi** za wszelkie wskazówki i porady odnośnie pracy doktorskiej.*

*Chciałabym również podziękować za nieocenioną pomoc **mgr Michałowi Doroszowi**, który czuwał nad aspektami związanymi z pracą reaktora w ośrodku badawczym Narodowego Centrum Badań Jądrowych w Otwocku.*

*Ogromne podziękowania kieruję do **dr Magdaleny Płódowskiej** oraz **dr Anety Węgierek-Ciuk**, które ogromnie mi pomogły w trakcie wykonywania badań biologicznych, jak i w późniejszej analizie wyników. Dziękuję również koleżankom z Instytutu Biologii: **mgr Karolinie Kordos-Pustule** i **mgr Kindze Pasińskiej**, które wspierały mnie dobrym słowem i okazywały mi ogromną życzliwość.*

*Podziękowania składam na ręce **moich rodziców**, którzy nieustannie wspierali mnie we wszystkich etapach mojego życia, dzięki Wam osiągnęłam tak dużo. Dziękuję również **mojemu partnerowi Pawłowi** oraz **siostrze Oliwii** za wspieranie mnie w trudnych momentach i motywację do dalszej pracy.*

Spis treści

Wykaz używanych skrótów	7
1. Wstęp	9
1.1. Terapia borowo-neutronowa – Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)	9
1.2. Farmakologiczne związki chemiczne zawierające izotop ^{10}B	12
1.2.1. BPA – <i>p</i> -borofenyloalanina	16
1.3. Fizyka terapii borowo-neutronowej	17
1.3.1. Neutrony	17
1.3.2. Promieniowanie neutronowe	18
1.3.3. Źródła promieniowania neutronowego	19
1.3.4. Reaktor badawczy MARIA w Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Otwocku – charakterystyka i wykorzystanie reaktora	20
1.4. Badania kliniczne i wykorzystanie BNCT w leczeniu nowotworów	21
1.4.1. Leczenie glejaka wielopostaciowego i innych typów nowotworów za pomocą terapii borowo-neutronowej	22
1.5. Nowotwory piersi	30
1.5.1. Luminalne nowotwory piersi	31
1.5.2. HER-2 dodatnie nowotwory piersi	32
1.5.3. Trójemne nowotwory piersi (triple-negative breast cancer - TNBC)	33
1.5.4. Leczenie nowotworów piersi za pomocą BNCT	34
1.6. Nanocząstki złota i ich wpływ na zwiększenie efektywności radioterapii	34
1.6.1. Interakcja nanocząstek złota z promieniowaniem neutronowym	36
2. Cel pracy	37
3. Materiały i metody	38
3.1. Charakterystyka linii komórkowych MDA-MB-231 i MCF-7 oraz ich warunki hodowli <i>in vitro</i>	38
3.2. Źródło neutronów – reaktor badawczy MARIA	39

3.2.1. Sposób napromieniania komórek nowotworowych piersi w poczie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA	39
3.2.2. Przygotowanie komórek do napromieniania w reaktorze MARIA	39
3.2.3. Dawki promieniowania mieszanego	40
3.3. Nośnik izotopu ^{10}B - BPA - <i>p</i> -borofenyloalanina	41
3.4. Nanocząstki złota	41
3.5. Oznaczanie cytotoksyczności nanocząstek złota i BPA na komórki MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu MTT	41
3.6. Cytometryczna analiza poziomu wnikania nanocząstek złota do komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7	43
3.7. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na rozkład komórek MDA-MB-231 i MCF-7 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego	44
3.8. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na przeżywalność komórkową w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu klonogenego	46
3.9. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na indukcję uszkodzeń chromosomów w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu mikrojądrowego.....	48
3.10. Analiza wpływu nanocząstek złota oraz BPA w terapii borowo-neutronowej na indukcję podwójnoniciowych pęknięć DNA w komórkach MDA-MB-231 za pomocą testu $\gamma\text{-H2AX}$	49
3.11. Analiza wpływu nanocząstek złota oraz BPA w przypadku terapii borowo-neutronowej na indukcję apoptozy w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu z aneksyną V i jodkiem propidyny.....	51
3.12. Analiza statystyczna	53
4. Wyniki	54
4.1. Analiza wpływu nanocząstek złota i <i>p</i> -borofenyloalaniny na aktywność metaboliczną komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7.....	54
4.1.1. Analiza wyników testu MTT na linii komórkowej MDA-MB-231	54

4.1.2. Analiza wyników testu MTT na linii komórkowej MCF-7	60
4.2. Analiza wnikania nanocząstek złota do komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7 hodowanych <i>in vitro</i>	65
4.2.1. Analiza wnikania nanocząstek złota w trójujemnych komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231	65
4.2.2. Analiza wnikania nanocząstek złota w luminalnych komórkach nowotworowych piersi MCF-7	66
4.3. Przebieg cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych piersi hodowanych <i>in vitro</i> traktowanych nanocząstkami złota i <i>p</i> -borofenyloalaniną oraz poddanych działaniu wiązki neutronów	67
4.3.1. Wyniki rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w linii nowotworowej MDA-MB-231	67
4.3.2. Wyniki rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w linii nowotworowej MCF-7	74
4.4. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na przeżywalność komórek nowotworowych piersi hodowanych <i>in vitro</i>	81
4.4.1. Wyniki przeżywalności komórkowej na trójujemnej linii nowotworowej piersi MDA-MB-231	81
4.4.2. Wyniki przeżywalności komórkowej na luminalnej linii nowotworowej piersi MCF-7	88
4.5. Analiza częstości mikrojąder w komórkach nowotworowych piersi hodowanych <i>in vitro</i>	94
4.5.1. Wyniki częstości występowania mikrojąder w trójujemnej linii nowotworowej piersi MDA-MB-231	94
4.5.2. Wyniki częstości występowania mikrojąder w luminalnej linii nowotworowej piersi MCF-7	101
4.6. Analiza intensywności fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach nowotworowych piersi hodowanych <i>in vitro</i>	108
4.6.1. Wyniki intensywności fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach linii nowotworowej MDA-MB-231	108

4.6.2. Wyniki intensywności fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach linii nowotworowej MCF-7	113
4.7. Analiza poziomu apoptozy w komórkach nowotworowych piersi hodowanych <i>in vitro</i>	118
4.7.1. Wyniki analizy częstości apoptozy w komórkach linii nowotworowej MDA-MB-231	118
4.7.2. Wyniki analizy częstości apoptozy w komórkach linii nowotworowej MCF-7	129
5. Dyskusja wyników	139
5.1. Zbadanie właściwości cytotoksycznych nanocząstek złota na komórki nowotworowe piersi MDA-MB-231 i MCF-7 oraz ich wnikania do komórek za pomocą współczynnika SSC	140
5.2. Zbadanie genotoksyczności nanocząstek złota na komórki nowotworowe piersi MDA-MB-231 i MCF-7 w terapii borowo-neutronowej	144
5.3. Zbadanie przeżywalności komórkowej linii nowotworowych MDA-MB-231 i MCF-7 po zastosowaniu nanocząstek złota jako promieniowrażliwiacza w terapii borowo-neutronowej	149
6. Wnioski	151
7. Bibliografia	154
Streszczenie	169
Abstract	172
Suplement	175
Wyniki analizy post-hoc Tukey'a	175
Spis rycin	191
Dorobek publikacyjny	200

Wykaz używanych skrótów

BBB (*ang. blood-brain barrier*) bariera krew-mózg

BNCT (*ang. Boron Neutron Capture Therapy*) terapia borowo-neutronowa

BPA (*ang. boronphenylalanine*) borofenyloalanina

geny BRCA1, BRCA2 (*ang. breast cancer gene 1/2*) geny supresorowe nowotworów piersi

BSH merkaptoundekahydro-closo-dodekakarboran disodowy

CIRT (*ang. carbon ion radiation therapy*) radioterapia z użyciem jonów węgla

DSB (*ang. double-strand breaks*) podwójnoniciowe pęknięcia DNA

EC₅₀ (*ang. half maximal effective concentration*) stężenie substancji wywołujące odpowiedź biologiczną na poziomie połowy wartości dawki maksymalnej

gen EGF (*ang. epidermal growth factor*) naskórkowy czynnik wzrostu

receptor EGFR (*ang. epidermal growth factor receptor*) receptor naskórkowego czynnika wzrostu

FISH (*ang. fluorescence in situ hybridization*) fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

FNT (*ang. fast neutron therapy*) terapia prędkimi neutronami

FUS (*ang. focused ultrasound treatment*) terapii zogniskowanych ultradźwięków

GBM (*ang. glioblastoma multiforme*) glejak wielopostaciowy

GNPs (*ang. gold nanoparticles*) nanocząstki złota

receptor HER-2 (*ang. human epidermal growth factor 2*) ludzki naskórkowy czynnik wzrostu 2

HIFU (*ang. high-intensity focused ultrasound*) pulsacyjne skupione ultradźwięki o wysokiej intensywności

High-LET (*ang. high linear energy transfer*) cząsteczki wysokoenergetyczne

HNSCC (*ang. head and neck squamous carcinoma*) nowotwór płaskonabłonkowy głowy i szyi

HPV (*ang. Human Papillomavirus*) wirus brodawczaka ludzkiego

IC₅₀ (*ang. half maximal inhibitory concentration*) połowa maksymalnego stężenia hamującego danej substancji

gen IDH1 (*ang. isocitrate dehydrogenase 1*) gen dehydrogenazy izocytrynianu 1

IGFBP BP-2, IGFBP BP-4, IGFBP BP-5 białka wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 2, 4 i 5

LAT-1 transporter w błonie komórkowej

MAPK (*ang. mitogen-activated protein kinases*) kinazy aktywowane mitogenami

MN (*ang. micronucleus*) mikrojądro

mTOR (*ang. mammalian target of rapamycin kinase*) kinaza białkowa mTOR

OD (*ang. optical density*) gęstość optyczna

p53 białko o własnościach supresora nowotworowego

PE (*ang. plating efficiency*) wydajność klonowania

PET (*ang. positron emission tomography*) pozytonowa tomografia emisyjna

PT (*ang. proton therapy*) terapia protonowa

gen PDGFRA (*ang. platelet-derived growth factor receptor alpha*) gen kodujący receptor alfa dla płytkopochodnego czynnika wzrostu

ROS (*ang. reactive oxygen species*) reaktywne formy tlenu

SD (*ang. standard deviation*) odchylenie standardowe

SF (*ang. surviving fraction*) frakcja przeżywalności

TGF- α (*ang. transforming growth factor alpha*) transformujący czynnik wzrostu alfa

TNBC (*ang. triple-negative breast cancer*) trójujemne nowotwory piersi

VEGF-A (*ang. vascular endothelial growth factor A*) czynnik wzrostu śródbłónka naczyńowego A

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

gen WNT7B gen sygnalizacyjny WNT

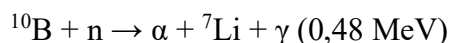
γ -H2AX wariant histonu H2AX

1. Wstęp

1.1. Terapia borowo-neutronowa – Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)

Terapia borowo-neutronowa (ang. *Boron Neutron Capture Therapy* – BNCT) jest odmianą radioterapii, a dokładniej hadronoterapii, w której wykorzystuje się wiązkę cząstek o wysokim LET. Do metod hadronoterapii należą również: protonoterapia (ang. *proton therapy* – PT), radioterapia z użyciem jonów węgla (ang. *carbon ion radiation therapy* – CIRT) oraz terapia prędkimi neutronami (ang. *fast neutron therapy* – FNT) (1).

Historia BNCT rozpoczęła się w latach 30. XX wieku (1932 r.), kiedy James Chadwick odkrył cząstkę subatomową z grupy hadronów o ładunku neutralnym, czyli neutron. W roku 1935, Joseph H. Taylor i Maurice Goldhaber opisali reakcję wychwytu neutronów na jądrze izotopu ^{10}B , której ogólny przebieg przedstawiony jest poniżej (Reakcja 1.) (2):

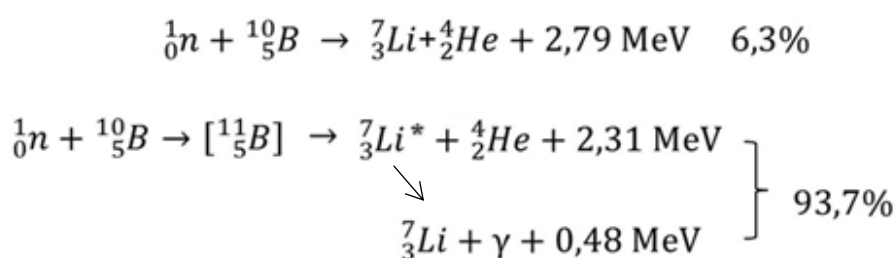


Reakcja 1. Reakcja wychwytu neutronów przez jądro izotopu ^{10}B .

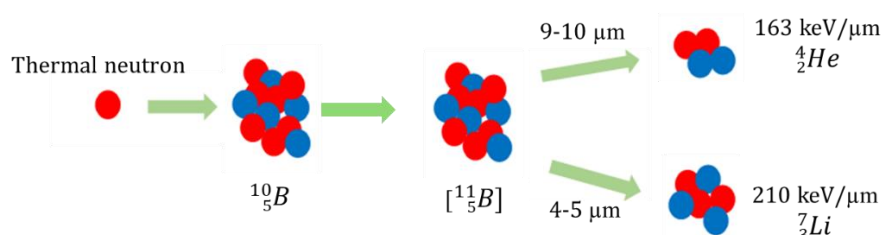
W 1936 roku, Gordon L. Locher zaproponował wykorzystanie tej reakcji w terapiach nowotworowych. Cała idea miała się opierać na selektywnym transporcie związku izotopu ^{10}B przez błonę komórkową do wnętrza komórki, a następnie napromienieniu wiązką neutronów termicznych (3).

Terapia borowo-neutronowa polega głównie na zdolności wychwytu neutronów przez jądro izotopu ^{10}B oraz na reakcjach rozpadu, które zachodzą w trakcie napromieniania komórek nowotworowych. Rozpad jądra ^{10}B prowadzi do wytworzenia wysokoenergetycznych (ang. *high linear energy transfer* - high-LET) cząstek alfa (${}^4\text{He}$) i litu (${}^7\text{Li}$). Cząstki te mają odpowiednio zasięg odrzutu $9 \mu\text{m}$ i $5 \mu\text{m}$, czyli mieszczą się w średnicy pojedynczej komórki nowotworowej. Ta charakterystyczna cecha powstałych w reakcji cząstek umożliwia zdeponowanie ich wysokiej energii powstałej podczas rozpadu jądra niemal wyłącznie wewnątrz komórki nowotworowej, w której ta reakcja zaszła. Dzięki temu, komórki zdrowe są chronione przed powstałymi produktami reakcji zachodzącej na jądrze izotopu ^{10}B (4).

a)



b)



Rycina 1. Reakcje przebiegające w trakcie BNCT: a) Reakcja wychwytu neutronu na atomie ${}^{10}\text{B}$ i jej następstwa; b) Model reakcji rozpadu ${}^{10}\text{B}$ z podanymi energiami wytworzonych cząstek (źródło: rycina wykonana na podstawie artykułu Wang et. al. (5)).

BNCT jest terapią bimodalną, co oznacza, że składa się z dwóch etapów. Pierwszym etapem jest podanie pacjentowi farmaceutyku z izotopem ${}^{10}\text{B}$ w odpowiednim stężeniu. Po upływie odpowiedniego czasu od podania związku ${}^{10}\text{B}$, pacjent jest poddawany działaniu wiązki neutronów termicznych (6).

Pierwsze próby kliniczne zostały przeprowadzone w 1951 roku w ośrodku badawczym Brookhaven Graphite Research Reactor, gdzie badania rozpoczęto na pacjencie chorym na glejaka wielopostaciowego. Badania kliniczne prowadzono tam do 1961 roku w trzech seriach eksperymentalnych. Jako nośnik izotopu ${}^{10}\text{B}$ wykorzystano prosty nieorganiczny związek tetraboranu sodu, czyli borax. W ten sposób przeprowadzono terapię na 40 pacjentach. W większości przypadków zanotowano rozległe skutki uboczne terapii takie jak odczyn popromienny skóry głowy (7). Otrzymane wyniki nie były satysfakcjonujące, ponieważ terapia borowo-neutronowa nie dawała lepszych rezultatów niż tradycyjna radioterapia (8).

W tym samym czasie, badania nad BNCT rozpoczęto również w Massachusetts Institute of Technology. W tej serii badań klinicznych zastosowano alternatywny związek z izotopem ${}^{10}\text{B}$ dekahydrodekarboran disodowy ($\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$), który ma w swojej budowie strukturalnej 10 atomów boru oraz jest mniej toksyczny niż wcześniej używany borax i jego pochodne.

Pomimo tego, zaobserwowano wiele skutków ubocznych, w tym nawet martwicę mózgu (9). Nieudane próby kliniczne zakończyły badania eksperymentalne nad BNCT w USA.

Pomimo tych niepowodzeń, w 1968 roku w Japonii, Hiroshi Hatanaka zsyntetyzował nowy związek chemiczny zawierający stabilny izotop ^{10}B w swojej strukturze molekularnej, czyli merkaptoundekahydro-*closo*-dodekakarboran disodowy ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$; BSH). Związek ten obecnie używa się jako główny nośnik izotopu ^{10}B w badaniach klinicznych nad BNCT (10). Pierwsze eksperymenty po zsyntetyzowaniu BSH przeprowadzono na pacjentach z glejakiem wielopostaciowym po wycięciu guza. W tych przypadkach, BNCT zostało zastosowane jako śródoperacyjna radioterapia, co oznaczało, że miejsce po wyciętym guzie poddawano bezpośredniemu napromienieniu wiązką neutronów termicznych. BSH było podawane domięscowo do płynu mózgowo-rdzeniowego, aby uniknąć bariery krew-mózg (BBB – ang. *blood-brain barrier*). Pacjenci byli napromieniani od 1974 roku w reaktorze badawczym Uniwersytetu w Kyoto (11). Badania te dostarczyły obiecujących wyników, w których Hatanaka odnotował wskaźnik 5-letniej przeżywalności dla 58% pacjentów (12). Pomimo tego, że te eksperymenty nie spełniały kryteriów randomizowanych, kontrolowanych badań klinicznych, otrzymane wyniki przez Hatanakę i współpracowników spowodowały, że w Europie i USA ponownie zaczęto rozważać zastosowanie kliniczne terapii (6).

W 1987 roku w Japonii, Doktor Yutaka Mishima, profesor Uniwersytetu Medycznego w Kobe rozpoczął badania kliniczne z zastosowaniem BNCT na pacjencie ze złośliwą odmianą czerniaka, w których użył nowego nośnika izotopu ^{10}B , którym była *p*-borofenyloalanina (BPA) (13). Ten eksperyment pokazał, że BNCT może być metodą terapii używaną nie tylko w leczeniu glejaka wielopostaciowego, ale również innych nowotworów. W przypadku nośników izotopu ^{10}B , do tej pory jedynymi dopuszczanymi farmaceutykami w badaniach klinicznych są BSH i BPA, które są najlepiej przebadane pod kątem tej terapii (6).

Mimo, że przez ostatnie 60 lat przeprowadzono wiele badań i prób klinicznych nad zastosowaniem BNCT w leczeniu pacjentów onkologicznych, wciąż istnieją problemy do rozwiązania. Dotyczą one między innymi słabych wyników z pierwszych przeprowadzonych badań klinicznych, czy też braku kontrolowanych badań klinicznych, które dawałyby realne perspektywy dla BNCT. Oprócz tego, terapia wymaga specyficznej infrastruktury badawczej, takiej jak reaktory jądrowe, co ogranicza jej dostępność kliniczną. Ten problem mogą rozwiązywać generatory neutronów, które coraz częściej są używane w prowadzonych badaniach klinicznych jako źródło wiązki neutronów. Oprócz tego, od lat 70. XX wieku, nadal

wykorzystuje się te same nośniki ^{10}B . Prowadzone są ostatnio badania nad nowymi nośnikami, które mogłyby zastąpić do tej pory używane BSH i BPA, ale nie zostały one jeszcze poddane pełnej walidacji klinicznej. Główną wadą w odniesieniu do terapii borowo-neutronowej jest niedobór rzetelnych badań statystycznych ze względu na brak ukierunkowania nośnika na konkretny fenotyp nowotworu z powodu nielicznej próby badawczej (7).

Zastosowanie BNCT w leczeniu klinicznym wymaga rozwiązania problemów związanych w szczególności z dwoma aspektami tej terapii. Istnieje potrzeba dostarczenia bardziej selektywnego nośnika izotopu ^{10}B oraz epitermicznej wiązki neutronów o odpowiednich właściwościach do leczenia. Wiązka neutronów powinna być zmonochromatyzowana w jak największym stopniu. Poza tym, jest konieczność ograniczenia wpływu promieniowania γ i neutronów termicznych. Kolejnym ważnym aspektem, który należy ustabilizować w celu zminimalizowania negatywnych skutków promieniowania jest równomierny rozkład neutronów termicznych w komórkach nowotworowych oraz w okolicach guza (14). Aktualnie prowadzonych jest wiele badań nad akceleratorami, które dostarczyłyby odpowiednią wiązkę neutronów o wymaganych parametrach. Obecnie, badania kliniczne nad BNCT są prowadzone na różnych odmianach akceleratorów, takich jak akcelerator liniowy, akcelerator tandemowy z izolacją próżniową, akcelerator elektrostatyczny bezpośredniego działania oraz z użyciem reaktorów jądrowych (15). Konieczna jest analiza wyników otrzymanych z badań klinicznych prowadzonych za pomocą poszczególnych źródeł promieniowania neutronowego w celu porównania ich skuteczności oraz parametrów wiązki.

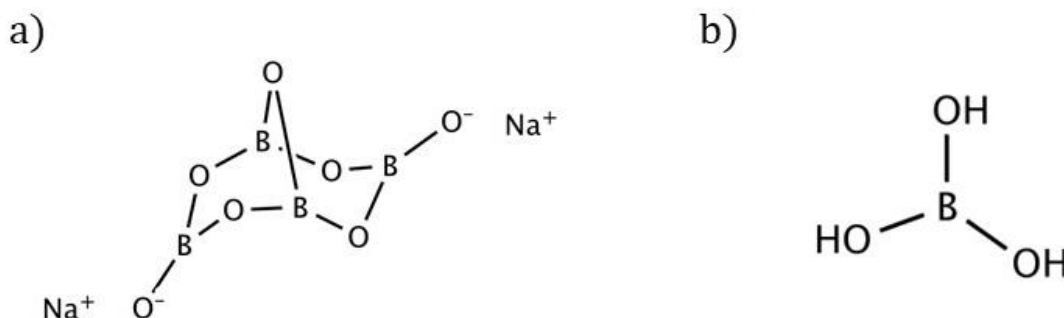
1.2. Farmakologiczne związki chemiczne zawierające izotop ^{10}B

BNCT opiera się na zastosowaniu izotopu ^{10}B , który po wychwyceniu neutronów termicznych ulega reakcji jądrowej prowadzącej do zniszczenia komórek nowotworowych. Bor, należący do grupy 13. i okresu 2. układu okresowego pierwiastków, jest jedynym niemetalem wśród borowców, co nadaje mu unikatowe właściwości chemiczne. Pod kątem chemicznych właściwości, bor jest podobny do węgla i krzemu, ponieważ tworzy borowodory – związki analogiczne do węglowodorów i krzemowodorów. Bor tworzy silne wiązania kowalencyjne, co umożliwia jego integrację ze strukturami organicznymi. Elektryczność boru w skali Paulinga wynosi 2,04. Ta właściwość oraz duży przekrój dla wychwyty neutronów powoduje, że bor jest często wykorzystywany w chemii medycznej, ponieważ można go zsyntetyzować z innymi związkami organicznymi (6). Przykładowe właściwości fizyczne boru: ciepło parowania – 489,7 kJ/mol, ciepło właściwe – 1026 J/kg $^{-1}$ ·K $^{-1}$, twardość w skali Mohsa – 9,3. Bor posiada dwa stabilne izotopy występujące w przyrodzie ^{10}B i ^{11}B , które w złożach są

zazwyczaj w ilości odpowiednio 20% i 80%. W BNCT wykorzystuje się ^{10}B , ponieważ to ten izotop wykazuje się wysokim przekrojem czynnym na wychwyt neutronów termicznych (~ 3837 barnów), co czyni go szczególnie skutecznym w indukowaniu reakcji jądrowych o działaniu cytotoksycznym (6).

Nośniki izotopu ^{10}B , które są wykorzystywane w BNCT muszą spełniać szereg wymogów, aby zostały dopuszczone do badań. Farmaceutyki z borem powinny mieć niskie powinowactwo wychwytu w tkance prawidłowej przy wysokim wskaźniku wychwytu w tkance nowotworowej. Oprócz tego, stosunek stężenia izotopu ^{10}B w komórkach nowotworowych do stężenia w komórkach zdrowych oraz stosunek stężenia izotopu ^{10}B w komórkach nowotworowych do stężenia znajdującego się we krwi powinien być nie mniejszy niż 3. Ponadto, skuteczny nośnik izotopu ^{10}B powinien charakteryzować się niską toksycznością oraz utrzymywać stabilne stężenie w obrębie tkanki nowotworowej podczas całego procesu napromieniania. Dodatkowo, muszą się charakteryzować efektywną eliminacją z krwioobiegu i tkanek prawidłowych. Wyróżnia się trzy grupy nośników izotopu ^{10}B , które wykazują zróżnicowane właściwości pod względem swoistej przenikalności do wnętrza komórek nowotworowych oraz różną toksyczność (4).

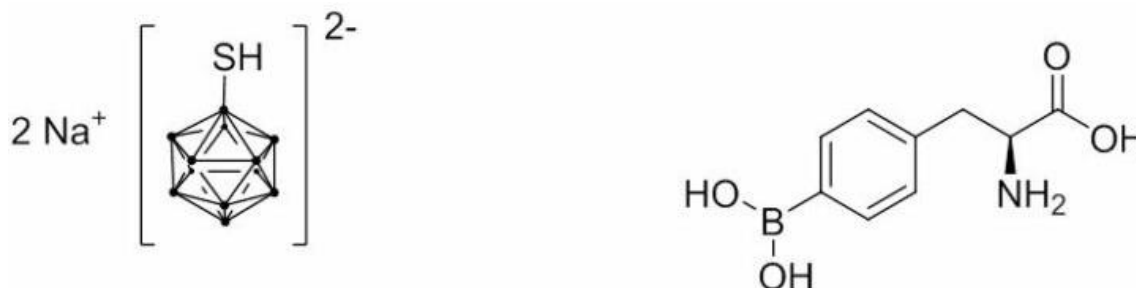
Do pierwszej generacji nośników zalicza się kwas borowy i jego pochodne, jak na przykład borax, czyli sól sodowa kwasu borowego. Związki te zastosowano jako pierwsze z izotopem ^{10}B w BNCT. Charakteryzowały się one niskim współczynnikiem specyficzności dla komórek nowotworowych, co powodowało wiele poważnych problemów w trakcie prowadzenia badań klinicznych w latach 50. i 60. XX wieku. Kwas borowy i jego pochodne najczęściej występowały w formie białych kryształów, w których atomy były stabilizowane wiązaniami wodorowymi. Kwas borowy jest bardzo słabym kwasem, który powstaje w wyniku reakcji hydrolizy związków nieorganicznych zawierających atom boru lub w wyniku znacznego obniżenia pH do wartości kwasowych wodnego roztworu boraksu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Reaguje silnie z alkoholami tworząc estry (6).



Rycina 2. Wzór chemiczny (a) tetraboranu sodu (borax) oraz (b) kwasu borowego (źródło: wykonanie własne; Chems sketch).

Do drugiej generacji związków zawierających izotop ^{10}B zalicza się merkaptoundekahydro-*closo*-dodekarboran disodowy ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, BSH) oraz L-borofenyloalaninę ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{BNO}_4$, BPA), która jest pochodną aminokwasu fenyloalaniny. Aktualnie te dwa związki chemiczne są najczęściej używane w badaniach naukowych i badaniach klinicznych dotyczących BNCT (16, 17). Najczęściej używa się kompleksu fruktozowego z BPA (BPA-F), połączenia BPA i BSH lub ^{18}F -BPA w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) do oznaczania wychwytu komórkowego izotopu ^{10}B . PET jest metodą, która łatwo pozwala ocenić akumulację BPA w tkankach guza na podstawie stosunku guz/tkanka prawidłowa (T/N) lub guz/krew (T/B). Umożliwia to dobór najbardziej odpowiedniego związku z izotopem ^{10}B dla określonego typu nowotworu. Ze względu na to, że BPA jest pochodną aminokwasu, jego transport do wnętrza komórki nowotworowej jest regulowany przez system transbłonowy LAT-1, który w wielu typach nowotworów ma zwiększoną ekspresję. LAT-1 wykazuje zdecydowanie większą ekspresję w komórkach nowotworowych o zwiększonym zapotrzebowaniu na aminokwasy, głównie leucynę, niż w komórkach zdrowych. Wysoką ekspresją LAT-1 charakteryzują się: większość nowotworów piersi, nowotwory płuc, gleejaki czy nowotwory jelita grubego i żołądka. Głównym problemem odnośnie borofenyloalaniny jest to, że jest ona usuwana z komórki przez system antyportowy, co utrudnia utrzymanie jednakowej efektywności terapii. W przeciwieństwie do BPA, BSH przenika do wnętrza komórki na zasadzie mechanizmu biernej dyfuzji. Co więcej, nie przenika przez BBB, gdy jest ona nienaruszona. W przypadku kiedy dochodzi do rozwoju złośliwego guza mózgu, BSH przenika przez naruszoną barierę krew-mózg kumulując się w tkankach nowotworowych (18). BSH w swojej budowie strukturalnej zawiera 12 atomów izotopu ^{10}B i jest anionowym dwudziestocianem boranu. BSH stosuje się głównie w przypadku leczenia

glejaka wielopostaciowego, które jest wykonywane na otwartej czaszce. Najprostszą metodą podania BSH jest iniekcja preparatu bezpośrednio do zmiany chorobowej (6).



Rycina 3. Wzór strukturalny (a) BSH oraz (b) L-borofenyloalaniny (źródło: wykonanie własne; Chems sketch).

Trzecią grupą nośników izotopu ^{10}B są tak zwane związki trzeciej generacji. Uważa się, że są one najbardziej odpowiednie do terapii BNCT ze względu na najwyższy poziom równomiernego rozmieszczenia atomu boru w komórkach nowotworowych po dokowaniu nośnika. Nośniki trzeciej generacji są cząsteczkami o wysokiej masie cząsteczkowej i w swojej budowie strukturalnej mają jeden lub więcej wielościennych anionów boranu albo więcej organicznych karboranów o małej czy też dużej masie cząsteczkowej. Są one połączone ze związkami lub grupami funkcyjnymi skierowanymi przeciwko komórkom nowotworowym poprzez stabilne wiązania chemiczne (14). Do grupy trzeciej generacji zalicza się: borowane aminokwasy (19), borowany receptor folanu (20), borowane peptydy i lipopeptydy (21, 22), borowane interkalatory DNA (23), borowany naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) lub borowane przeciwciała monoklonalne receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) (24), immunoliposomy zawierające izotop ^{10}B (25), liposomy modyfikowane (26) lub liposomy transferyny glikolu polietylenowego (27), nukleozydy karboranylowe (28), nanocząstki z dołączonym atomem izotopu ^{10}B (29) oraz nanorurki z azotku boru (30). Przy tego typu nośnikach problemem może być ich sprawna dyfuzja bezpośrednio przez błonę komórkową lub za pomocą transporterów błonowych ze względu na dużą masę cząsteczkową. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że elektroporacja i pulsacyjne skupione ultradźwięki o wysokiej intensywności (ang. *high-intensity focused ultrasound* – HIFU) mogą znacznie zwiększyć dostarczanie wysokocząsteczkowych związków boru do komórek nowotworowych, a także zoptymalizować jakościowo mikrodystrybucję nośników ^{10}B (31). Z innych eksperymentów wynika, że w przypadku nowotworów mózgu, efektywność translokacji terapeutycznego izotopu ^{10}B do komórek nowotworowych można zwiększyć za pomocą terapii zogniskowanych ultradźwięków (ang. *focused ultrasound treatment* – FUS). Ta metoda

umożliwia związkom o dużej masie cząsteczkowej, takim jak karborany wielkocząsteczkowe, zawierającym ^{10}B przeniknięcie przez BBB (32). Nośniki izotopu ^{10}B trzeciej generacji są obiecującymi związkami ze względu na ich wyższą specyficzność wobec komórek nowotworowych, ich jąder komórkowych lub DNA, co daje możliwość obniżenia stężenia podawanego farmaceutyku przy zachowaniu tej samej skuteczności BNCT.

W 2020 roku, naukowcy z ośrodka badawczego w Japonii dokonali nowego odkrycia w zakresie nośników izotopu ^{10}B trzeciej generacji. Wykryto, że mieszane związki poli(alkoholu winylowego) i BPA tworzą związek kompleksowy PVA-BPA, dzięki któremu związek ^{10}B jest dłużej akumulowany w komórkach nowotworowych. Co więcej, PVA nie wpływa na strukturę fenyloalaniny w strukturze BPA. Ponadto, białko transbłonowe LAT-1 wspomaga transport kompleksu PVA-BPA przez błonę komórkową w pęcherzykach endosomalnych, co zapobiega uruchomieniu się mechanizmu antyportu. Dodatek PVA jest dość prostym rozwiązaniem, które zwiększa potencjał terapeutyczny BPA w terapii BNCT (33). PVA-BPA jak na razie ma tylko zastosowanie w badaniach klinicznych.

1.2.1. BPA – *p*-borofenyloalanina

BPA jest pochodną aminokwasu fenyloalaniny. Opis syntezy tego związku został przedstawiony w 1958 roku w Japonii. Struktura molekularna borofenyloalaniny jest zbliżona do struktury tyrozyny, ponieważ jest ona pochodną fenyloalaniny. *P*-borofenyloalanina (BPA), strukturalna pochodna fenyloalaniny, była pierwotnie badana jako potencjalny substrat tyrozynazy w komórkach czerniaka. Jednak, nowsze badania sugerują, że jej mechanizm jest bardziej złożony i obejmuje preferencyjny transport za pośrednictwem układu LAT-1. BPA gromadzi się zarówno w nowotworach melanotycznych, jak i amelanotycznych, a także w wielu innych odmianach nowotworów złośliwych (34). Wychwyt komórkowy jest selektywny dla L-stereoizomeru, co wskazuje na aktywny mechanizm transportu, a nie bierną dyfuzję związku przez błonę komórkową. Zwiększone tempo podziałów komórkowych, jak i katabolizm nie są brane pod uwagę ze względu na zwiększoną akumulację w komórkach nowotworowych, co prowadzi do podejrzenia, że neutralny szlak aminokwasowy jest mniej selektywny w przypadku nowotworów niż w tkance zdrowej (6). Ze względu na słabą rozpuszczalność BPA, często stosuje się połączenie z fruktozą w celu wytworzenia odpowiedniego roztworu do infuzji. BPA-F jest najczęstszą formą nośnika izotopu ^{10}B ze względu na stabilność tej struktury i dobrą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach polarnych oraz małą toksyczność dla pacjentów.

Właściwości BPA w warunkach pokojowych:

- forma fizyczna: białe kryształki bezzapachowe,
- rozpuszczalność: rozpuszczalny w środowisku lekko kwasowym lub lekko zasadowym (zbliżonym do obojętnego),
- temperatura topnienia: 283-293 °C,
- gęstość: 0,89 g/cm³ (6).

Transport L-BPA i jego losy metaboliczne badano w ludzkich komórkach nowotworowych czerniaka błony naczyniowej oraz wyizolowanych z pierwotnego wyluszczonego guza. Wyniki badań pokazały, że BPA jest aktywnie transportowany do komórek czerniaka, ale nie jest tam metabolizowany (35). Zbadano również mechanizm transportu BPA przez błonę komórkową w warunkach *in vitro* przy użyciu komórek glejaka szczura. Wykazano w tym eksperymencie, że borofenyloalanina jest aktywnie transportowana przez system L, który może być dalej stymulowany przez aminokwasy zgromadzone w komórce przez układ transportu aminokwasów L (36).

Kinashi wraz ze współpracownikami zbadali mutagenne działanie BPA i BSH na komórkach jajnika chomika chińskiego. Inkubowano te komórki z BPA lub BSH wzbogaconym o ¹⁰B i wystawiano je później na działanie wiązki neutronów termicznych. Mutagenność mierzono poprzez występowanie mutacji locus fosforybozylotransferazy hipoksantynowoguaninowej. Wyniki badania wykazały, że po 20 godzinach inkubacji BPA był mniej mutagenny niż BSH. Według autorów tego badania, wyniki sugerują, że zatrzymywanie BPA i BSH w komórce powoduje zwiększenie efektywności działania neutronów na komórki nowotworowe oraz zmniejsza ryzyko wystąpienia nieprawidłowej naprawy po napromienieniu (11).

1.3. Fizyka terapii borowo-neutronowej

1.3.1. Neutrony

W celu zrozumienia wyjątkowej roli neutronów w fizyce jądrowej i cząstek należy omówić ich podstawowe właściwości. Masa neutronu jest prawie taka sama jak protonu i wynosi 1,0087. Ładunek elektryczny neutronu przyjmuje się za równy zero ($0,2 \pm 0,8 \cdot 10^{-21} e$). Pomimo braku ładunku elektrycznego neutron charakteryzuje się momentem magnetycznym μ_n równym $-1,913$ magnetonów Bohra. Neutron posiada również spin równy $\frac{1}{2}$. Swobodny neutron jest cząstką nietrwałą charakteryzującą się czasem życia wynoszącym $878,4 \pm 0,5$ s (37). Neutrony oddziałują za pośrednictwem czterech fundamentalnych oddziaływań: silnego

(w jądrach atomowych), elektromagnetycznego, słabego oraz grawitacyjnego (38). Szczególnie istotną cechą neutronu jest brak ładunku elektrycznego, co umożliwia jego wykorzystanie w procesach wychwytu radiacyjnego, w których to neutron zostaje pochłonięty przez jądro atomowe. W wyniku absorpcji neutronu przez jądro atomowe wzrasta liczba neutronów oraz liczba masowa nuklidu, prowadząc do powstania nowego izotopu. Neutrony wykazują także charakter dualistyczny korpuskularno-falowy, zgodnie z hipotezą de Broglie'a, co znajduje zastosowanie m.in. w interferometrii neutronowej. Właściwość ta odgrywa istotną rolę w reakcjach jądrowych inicjowanych przez neutrony (39).

Przykładem praktycznego wykorzystania tych własności neutronu jest BNCT, w której wykorzystujemy reakcję radiacyjnego wychwytu neutronu na jądrze izotopu ^{10}B (Ryc.1). W wyniku absorpcji powstaje niestabilny izotop ^{11}B , który ulega natychmiastowemu rozpadowi do cząstek ^7Li oraz ^4He (cząstka alfa) oraz następuje emisja nadmiaru energii w formie kwantu gamma. W fizyce jądrowej, ze względu na skalę w jakiej zachodzą zjawiska, do opisu prawdopodobieństwa zajścia konkretnej reakcji jądrowej stosuje się pojęcie mikroskopowego przekroju czynnego¹ (ang. *microscopic cross-section*). Mikroskopowy przekrój zależy od energii neutronu. Mikroskopowy przekrój czynny (σ) jest parametrem uzależnionym od nuklidu i energii neutronu. Przykładowo dla reakcji wychwytu radiacyjnego neutronu termicznego o energii 0,253 eV przez izotop ^{10}B jest równy 3848 ± 38 barna (40, 41).

W eksperymentach stosuje się neutrony o szerokim zakresie energii, od kilku MeV do ułamków eV (poniżej 0,025 eV). Różne strumienie neutronów są sklasyfikowane jako prędkie ($E_n > 1$ MeV), średniej energii ($1 \text{ MeV} \geq E_n > 1$ eV) i wolne ($E_n < 1$ eV). Można również zaklasyfikować wolne neutrony do następujących podgrup:

- epitermalnych ($1 \text{ eV} \geq E_n > 0.025 \text{ eV}$);
- termalnych ($\sim 0.025 \text{ eV}$);
- zimnych ($0.025 \text{ eV} \geq E_n > 0.5 \text{ } \mu\text{eV}$);
- megazimnych ($0.5 \text{ } \mu\text{eV} > E_n \geq 100 \text{ neV}$);
- ultrazimnych ($< 100 \text{ neV}$) (38).

1.3.2. Promieniowanie neutronowe

Neutrony zazwyczaj wytwarza się w reaktorach badawczych lub w źródłach spalacyjnych. Obecnie obserwuje się dynamiczny rozwój akceleratorowych źródeł neutronów,

¹ Pojęcie fizyczne, odnoszące się do prawdopodobieństwa zajścia określonej reakcji (np. zderzenia, wychwytu) między cząstkami na poziomie mikroskopowym. Jest to miara efektywnego obszaru oddziaływania (40, 41).

co świadczy o intensywnym postępie w dziedzinie fizyki neutronowej. W kontekście terapii BNCT największe zapotrzebowanie dotyczy neutronów epitermalnych. Aktualnie na świecie działa lub jest w budowie około 42 ośrodki, w których neutrony termiczne wykorzystywane są w celach medycznych. W reaktorach jądrowych neutrony powstają w wyniku reakcji rozszczepienia jąder, np. ^{235}U . W procesie tym jądro uranu wychwytuje neutron i rozszczepia się z uwolnieniem średnio 200 MeV energii na jedno rozszczepienie oraz emitując przeciętnie średnio 2,43 neutrony wtórne. Strumień neutronów termicznych jest w równowadze z moderatorem w temperaturze pokojowej o wartości 293,6K (20,46°C) oraz przy $E_T=2,53 \cdot 10^{-2}$ eV. Przy takiej energii neutronów wartość prędkości neutronów w rozkładzie prędkości Maxwella osiąga $2200 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Neutrony powstałe w wyniku reakcji rozszczepienia zaliczane są do tzw. neutronów prędkich, w związku z czym w reaktorach często stosuje się tzw. moderatory, które w wyniku oddziaływania neutronów z jądrami pierwiastków, z których są złożone, obniżają energię neutronu z zakresu neutronów prędkich do zakresu energii neutronów termicznych. Najczęściej jako moderator wykorzystuje się wodę (lekką, jak i ciężką), beryl lub grafit (38).

W badaniach klinicznych nad BNCT najczęściej używa się neutronów uzyskanych z reakcji rozszczepienia zachodzącej w reaktorach jądrowych (42). Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań i obliczeń, stworzono listę ogólnych wymagań określających niezbędne parametry dla wiązki neutronów używanej w BNCT (43):

- strumień neutronów epitermalnych $\approx 10^9 \text{ neutronów} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (w przypadku zastosowania terapeutycznego);
- energia neutronów: od 1 eV do 10,0 keV;
- moc dawki gamma: $1,0 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$;
- moc dawki neutronów szybkich: $0,5 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$;
- natężenie strumienia neutronów: stosunek $(J \cdot \Phi^{-1}) \geq 0,8$.

Widmo neutronowe powinno być jak najbardziej monoenergetyczne. W przypadku BNCT musi się mieścić w odpowiednich zakresach energetycznych (6).

1.3.3. Źródła promieniowania neutronowego

Obecnie prowadzone są intensywne badania nad zastosowaniem akceleratorów do prowadzenia badań i terapii nowotworów w klinikach onkologicznych (44). Ograniczona dostępność do reaktorów badawczych stanowi główną barierę w rozwoju BNCT co z kolei jest powodem rosnącego zainteresowania akceleratorami jako alternatywnymi źródłami neutronów

(45). Postęp BNCT wymaga instalacji źródeł neutronów termicznych w środowiskach klinicznych. Najbardziej odpowiednie byłyby akceleratory cząstek o niskiej energii, które mogą być zbudowane w kosztach podobnych do konwencjonalnej radioterapii. Ponadto, obecność tych urządzeń zlokalizowanych w centrach medycznych umożliwia poprawę jakościowego gromadzenia danych oraz ułatwia przeprowadzenie całego procesu leczenia. Akceleratory produkujące neutrony mają więcej zalet niż reaktory jądrowe, m.in. akceleratory są łatwiejsze w obsłudze ze względu na swój mniejszy rozmiar. Zapas paliwa w reaktorach i obecność promieniowania mieszanego powoduje, że paliwo staje się bardziej aktywne radiacyjnie ze względu na produkty rozszczepienia i muszą być one wyłączane w ściśle kontrolowanych warunkach.

1.3.4. Reaktor badawczy MARIA w Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Otwocku – charakterystyka i wykorzystanie reaktora

Reaktor badawczy MARIA jest obecnie jedynym eksploatowanym reaktorem jądrowym w Polsce zbudowanym w latach 1970 - 1974. Produkuje unikatowy strumień neutronów, który wykorzystywany jest do produkcji radioizotopów, m.in. napromieniania płytek uranowych, z których wydobywa się izotop ^{99}Mo , używany w terapiach nowotworowych czy też do modyfikacji materiałów, np. barwienia topazów czy neutronowego domieszkowania krzemu (ang. NTD – *neutron transmutation doping*).

MARIA jest reaktorem kanałowo-basenowym. Aktualnie pracuje na paliwie uranowym (U_3Si_2 – krzemian uranu lub UO_2 – tlenek uranu) wzbogaconym do poziomu poniżej 20% ^{235}U . Element paliwowy w tym reaktorze zbudowany jest z 5-6 koncentrycznie ułożonych rur, których grubość wynosi 2 mm i oddzielonych przez wodne szczeliny o grubości 2,5 mm. Woda w elemencie paliwowym pełni dwie funkcje: chłodzi układ oraz spowalnia neutrony prędkie. Warstwa paliwowa ma grubość 0,8 mm i jest umieszczona pomiędzy dwoma innymi warstwami, tak zwanymi powłokami paliwowymi (ang. *fuel cladding*), które zapobiegają uwalnianiu się produktów zachodzących reakcji jądrowych do chłodziwa. Rdzeń reaktora zawiera około 10-12 kg izotopu ^{235}U . Regulacja strumienia neutronów, w tym i moderowanie neutronów, zachodzi poprzez użycie wody i bloków berylowych, które otaczają elementy paliwowe. Rdzeń reaktora jest otoczony przez reflektor grafitowy, który odbija część neutronów z powrotem do rdzenia, pozwalając na lepsze gospodarowanie strumieniem neutronów poprzez zapobieganie ich ucieczce. Reaktor MARIA może osiągnąć moc termalną do 30 MW. Biologiczną ochronę w reaktorze stanowi 7 metrów wody oraz grube na 2 metry, betonowe ściany basenu reaktora. System chłodzący elementy paliwowe i system chłodzący

basenu są oddzielone od siebie, co zwiększa bezpieczeństwo pracy tego reaktora. Oprócz tego, osobno występuje wtórny system chłodzący całego reaktora.

Największa moc strumienia neutronów termicznych w reaktorze MARIA wynosi $3 \cdot 10^{14} \text{ n} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, neutronów prędkich – $1 \cdot 10^{14} \text{ n} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, a moc neutronów termicznych przy ujściu z kanałów poziomych – $5 \cdot 10^9 \text{ n} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

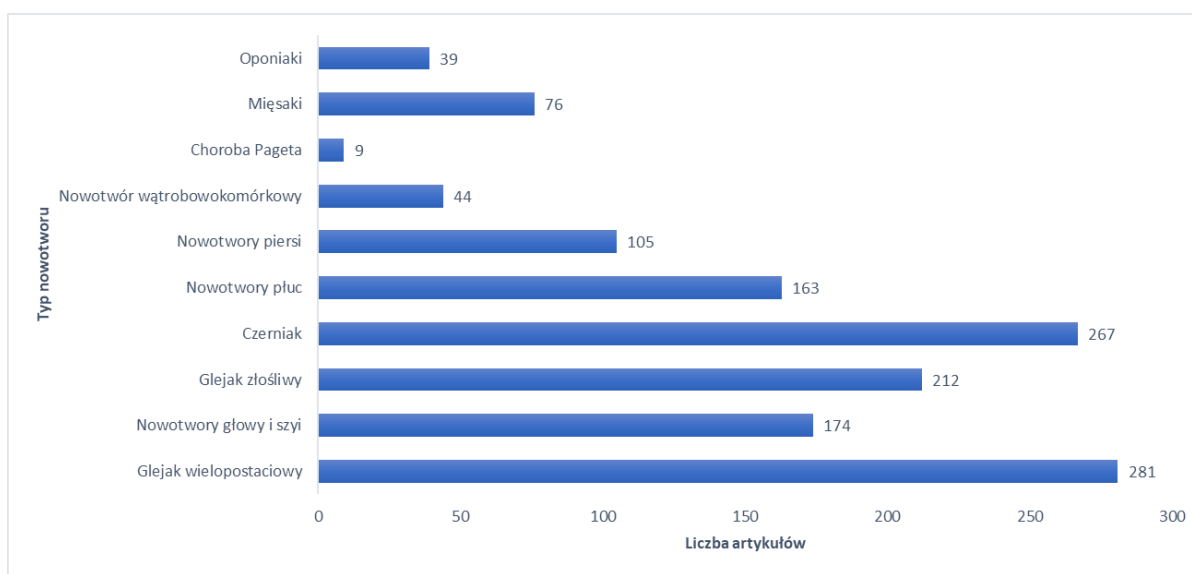
Budowa rdzenia reaktora badawczego MARIA umożliwia zmianę konfiguracji prętów paliwowych. Ten system ułatwia również adaptację reaktora do danego cyklu produkcyjnego. Napromienianie materiału odbywa się w rdzeniu, gdzie zlokalizowane są pionowe kanały umieszczone w blokach berylowych i w systemie tak zwanej poczty hydraulicznej. Oprócz tego, do napromienienia używa się również specjalnie przystosowanych kanałów paliwowych. Każdy z tych kanałów jest wykorzystywany w celu napromieniania innych materiałów tarczowych ze względu na różne właściwości wiązki neutronów w każdym z nich. Aktualnie używa się poszczególnych kanałów np.: do produkcji izotopów, modyfikacji minerałów czy materiału badawczego neutronami prędkimi czy też do napromieniania materiału biologicznego w systemie poczty hydraulicznej. Reaktor MARIA jest również wyposażony w 7 kanałów poziomych, których zadaniem jest doprowadzenie wiązki neutronów z wcześniej ustalonymi parametrami do hal fizycznych. Kanał H2, gdzie dociera strumień neutronów epitermicznych o energii 0,5 eV – 10 keV wraz z dużą gęstością strumienia jest przeznaczony do badań biologicznych nad terapią borowo-neutronową.

1.4. Badania kliniczne i wykorzystanie BNCT w leczeniu nowotworów

Terapia borowo-neutronowa jest wysoce obiecującą odmianą radioterapii z zakresu hadronoterapii. BNCT łączy samo w sobie podejście tradycyjnej radioterapii z farmakoterapią. Jest to terapia dwuetapowa, w której najpierw musi zostać podany farmaceutyk z izotopem ^{10}B , a następnie pacjent poddawany jest działaniu promieniowania neutronowego. Selektywna dyfuzja związków boru do komórek nowotworowych zwiększa efektywność rozpadu neutronów. Pomimo tego, może zakończyć się niepowodzeniem ze względu na niespecyficzne właściwości związków izotopu ^{10}B . Pomimo tego, nadal występują problemy związane z wysokim stężeniem związków boru we krwi (w przypadku podania dożylnego farmaceutyku) lub w przestrzeniach międzykomórkowych, a co za tym idzie niewystarczającą dawką promieniowania dostarczonego do komórek nowotworowych (15). Wymaga to prowadzenia dalszych badań nad zwiększeniem efektywności terapii borowo-neutronowej i umożliwienia użycia tej metody leczenia na skalę światową. BNCT aktualnie stosuje się w badaniach klinicznych i w leczeniu następujących nowotworów: glejaka wielopostaciowego (46),

nowotworu gruczołów ślinowych (47), nowotworów głowy i szyi (48), nawracającego nowotworu płuc (49), złośliwego oponiaka (47), wieloogniskowego nowotworu wątroby (50) i pozasutkową chorobą Pageta (51).

Liczba badań nad BNCT stale rośnie wraz z coraz większym udziałem badań klinicznych. Coraz szersze zastosowanie znajduje BNCT w leczeniu innych nowotworów niż glejak wielopostaciowy.



Rycina 4. Liczba artykułów odnośnie badań klinicznych prowadzonych na poszczególnych typach nowotworów z wykorzystaniem BNCT (źródło: Pubmed i Science Direct – rok 2023).

1.4.1. Leczenie glejaka wielopostaciowego i innych typów nowotworów za pomocą terapii borowo-neutronowej

Początkowo terapia borowo-neutronowa była wykorzystywana głównie w celu leczenia glejaka wielopostaciowego (GBM). GBM jest najczęściej występującym nowotworem mózgu u osób dorosłych i zaliczany jest do guzów typu neuroepitelialnego. Ze względu na złe rokowania dla pacjentów z tym typem nowotworu, jest istotna potrzeba rozwoju metod terapii glejaka, które będą się cechowały większą skutecznością leczenia. Glejak wielopostaciowy jest nowotworem, który według klasyfikacji WHO (ang. *World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia) dzieli się na 4 stopnie w zależności od typu histologicznego. Stopień I jest najniższym stopniem złośliwości, natomiast stopień IV – najwyższym stopniem złośliwości (52). GBM stanowią ponad 30% wszystkich pierwotnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego i są drugim najczęściej występującym nowotworem złośliwym u dzieci. Przeżywalność po zastosowaniu standardowych terapii wynosi około 12-15 miesięcy. W przypadku glejaków o wysokim stopniu złośliwości odnotowano 2-letnie

przeżycie całkowite (53). Glejaki wielopostaciowe różnie reagują na leczenie, co jest uzależnione od podtypu nowotworu. Uwarunkowane jest to występującymi mutacjami w kluczowych genach czy też różnicami w ekspresji genów charakterystycznych dla danego podtypu GBM. Markerami klasyfikacji glejaków są mutacje aktywujące najczęściej D842V, między innymi geny PDGFRA (ang. *platelet-derived growth factor receptor alpha*), EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*), IDH1 (ang. *isocitrate dehydrogenase 1*) i NF1 (54).

Pierwsze badania nad leczeniem glejaka wielopostaciowego za pomocą terapii borowo-neutronowej przeprowadzono w USA w latach 50. i 60. XX wieku. Zakończyły się one niepowodzeniem spowodowanym nieodpowiednim doбором nośnika izotopu ^{10}B i zaprzestano dalszych badań. Nie zaobserwowano w tym eksperymencie żadnego zwiększenia przeżywalności wśród pacjentów ze względu na natychmiastowy nawrót nowotworu po leczeniu. Zauważalne były nasilone działania niepożądane obejmujące m.in. nieuleczalne oparzenia skóry czy głębokie owrzodzenia (55). W Japonii w latach 60. XX wieku rozpoczęto badania odnośnie leczenia GBM za pomocą BNCT. Jako nośnik izotopu ^{10}B zastosowano BSH i pierwsze badania przeprowadzono na pacjentach ze stopniem III i IV glejaka. Uzyskane wyniki były obiecujące, wykazały poprawę przeżywalności, co zachęciło do dalszych badań nad terapią borowo-neutronową. W późniejszych badaniach, Mishima wraz ze współpracownikami zastosował kolejny nośnik izotopu ^{10}B , czyli BPA w leczeniu czerniaka za pomocą BNCT (13). Obecnie Japonia jest wiodącym krajem w leczeniu glejaka wielopostaciowego tą metodą (7).

W Tabeli 1. przedstawiono przykłady przeprowadzonych dotychczas badań klinicznych odnośnie glejaka wielopostaciowego oraz nowotworów głowy i szyi.

Tabela 1. Wykaz przykładowych przeprowadzonych badań klinicznych w przypadku leczenia za pomocą BNCT glejaka wielopostaciowego oraz nowotworów głowy i szyi.

Typ nowotworu	Rodzaj nośnika ^{10}B	Dawka nośnika	Dawka promieniowania	Liczba pacjentów	Przeżywalność pacjentów (mediana)	Lata prowadzenia badań	Naukowcy prowadzący badania
<i>Złośliwe guzy mózgu i oponiaki wysokiego stopnia</i>	BPA	$200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} + 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ w trakcie napromieniania	do 12 Gy	167	10,8 miesiąca	2002-2014	Miyatake et al. (47, 57)
<i>Nowo zdiagnozowany glejak wielopostaciowy</i>	BSH i BPA	BSH- $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BPA- $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	20 – 30 Gy	21 (rok 2002-2006)	15,6 miesiąca 23,5 miesiąca (przy dodatkowym promieniowaniu X)		
<i>Nowo zdiagnozowany glejak wielopostaciowy</i>	Sulfhidrylo-boran	$5 \text{ g} \cdot \text{ciało}^{-1}$	30 Gy (15 frakcji; intraoperacyjnie)	7	11,9 miesiąca	do 2009	Kawabata et al. (46, 58)
<i>Nowo zdiagnozowany glejak wielopostaciowy</i>	<i>p</i> -dihydroksybo-rylofenyloalalaninę	$250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	30,6 Gy (17 frakcji)	8			

<i>Nowo zdiagnozowany glejak wielopostaciowy</i>	BSH	100 mg·kg ⁻¹	dawka była obliczana indywidualnie dla każdego pacjenta	23	19,5 miesiąca	1998-2014	Kageji et al. (58)
<i>Nawrót glejaka wielopostaciowego</i>	L-BPA- fruktoza	od 290 mg·kg ⁻¹ do 400 mg·kg ⁻¹	od 50 do 98 Gy	30	7 miesięcy	2003-2008	Kankaanranta et al. (59)
<i>Glejak wielopostaciowy</i>	BPA + bevacyzumab (Avastin)	BPA Avastin - 10mg·kg ⁻¹	od 28 do 64 Gy	7	15,1 miesiąca	2013-2014	Shiba et al. (60)
<i>Nawrotowy nowotwór płaskonabłonkowy głowy i szyi</i>	L-BPA- fruktoza	350-400 mg·kg ⁻¹	od 56 do 74 Gy	79	2 lata (u 21% pacjentów)	2003-2012	Kankaanranta et al. (48, 62)
<i>Nowotwory głowy i szyi</i>	L-BPA- fruktoza	400 mg·kg ⁻¹	20 Gy	17	2 lata (u 47% pacjentów)	2010-2013	Wang et al. (49, 63)

Nowotwór płaskonabłonkowy głowy i szyi (ang. *head and neck squamous carcinoma* – HNSCC) należy do najczęstszych nowotworów złośliwych, charakteryzujących się wysoką zachorowalnością i znaczną śmiertelnością. HNSCC rozwijają się z komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego wyściełających powierzchnię błony śluzowej głowy i szyi, w wyjątkowych przypadkach może się rozwinąć z komórek gruczołu ślinowego. Do głównych czynników ryzyka HNSCC zalicza się przewlekłe narażenie na dym tytoniowy oraz spożycie alkoholu etylowego, które wykazują działanie synergistyczne w kontekście kancerogenezy. Istotną rolę w patogenezie HNSCC odgrywają również czynniki wirusowe – szczególnie onkogenne wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) czy też wirus Epsteina-Barra. Na świecie diagnozuje się rocznie około 650 000 przypadków HNSCC, z czego ponad 330 000 kończy się zgonem pacjenta (14).

Leczenie HNSCC obejmuje zazwyczaj skojarzenie metod klasycznych, takich jak resekcja chirurgiczna, radioterapia czy chemioterapia oparta na pochodnych platyny (np. cisplatyna). W zakresie terapii celowanych jedynym zarejestrowanym przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) lekiem jest cetuksymab - przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko EGFR. Mimo początkowej skuteczności, leczenie cetuksymabem często napotyka na problem oporności, co znacząco ogranicza jego długoterminową efektywność kliniczną. Oprócz tego, HNSCC są wysoce odporne na chemioterapię i radioterapię, co skłania do poszukiwania alternatywnych metod leczenia. Jedną z nich jest BNCT która zyskuje na znaczeniu jako strategia precyzyjnego niszczenia komórek nowotworowych. Badania *in vitro* wykazały, że BNCT może skutecznie hamować proliferację komórek raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, zarówno w sposób zależny, jak i niezależny od ekspresji białka supresorowego p53 (63). Komórki z mutacją w genie kodującym białko p53 są bardziej odporne na leczenie BNCT niż komórki typu dzikiego. Do czynników ograniczających należą opóźniona apoptoza i brak zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁, co przyczynia się do powstawania oporności na leczenie (64). Przykłady dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych dotyczących leczenia nowotworów głowy i szyi za pomocą BNCT podano w Tabeli 1.

Kolejnym nowotworem, do którego leczenia można wykorzystać terapię borowo-neutronową jest czerniak skóry szczególnie jego podtypy odporne na immunoterapię. Prace badawcze w tym zakresie prowadzone są m.in. w Argentynie (Tabela 2). Oprócz tego, prowadzone są eksperymenty z zastosowaniem BNCT do leczenia nowotworów płuc,

hepatocarcinoma (rak wątrobowokomórkowy), kostniakomięsaków, oponiaków oraz pozasutkowej odmiany choroby Paget’a.

W Tabeli 2. podano przykładowe badania kliniczne przeprowadzone na pacjentach z nowotworami skóry i innymi wyżej podanymi odmianami nowotworów.

Tabela 2. Wykaz przykładowych przeprowadzonych badań klinicznych dotyczących leczenia nowotworów skóry oraz innych nowotworów za pomocą BNCT.

Typ nowotworu	Rodzaj nośnika ^{10}B	Dawka nośnika	Dawka promieniowania	Liczba pacjentów	Przeżywalność pacjentów (mediana lub średnia)	Lata prowadzenia badań	Naukowcy prowadzący badania
<i>Czerniak skóry</i>	L- ^{10}BPA -fruktoza	$14 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$	24 RBE-Gy	7	ogólna odpowiedź na leczenie – 69,3%	2003-2007	Gonzalez et al. (65,66)
<i>Czerniak skóry</i>	L-BPA-fruktoza	$350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	20 RBE-Gy	1	zmiana została usunięta	2013-2016	Yong et al. (67)
<i>Złośliwa odmiana oponiaka</i>	^{18}F -BPA z użyciem metody PET	brak informacji	brak informacji	7	odpowiedź całkowita na terapię	2005-2007	Miyatake et al. (68)
<i>Złośliwa odmiana oponiaka</i>	^{18}F -BPA z użyciem metody PET	$200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} + 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (w trakcie napromieniania)	do 15 Gy	20	14,1 miesiąca	2005-2011	Kawabata et al. (69)
<i>Rozsiany nowotwór płuc</i>	L-BPA-fruktoza	250 lub 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	brak informacji	2	regresja postępu leczenia po 6 miesiącach	do 2006	Suzuki et al. (25,70)
<i>Nowotwór wątrobowokomórkowy – marskość wątroby</i>	BPA i BSA	BPA- $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BSA- $1 \text{ g} \cdot \text{ciało}^{-1}$	2,7 Gy-Eq	1	3,5 miesiąca	2006	Suzuki et al.(71)
<i>Nowotwór wątrobowokomórkowy</i>	^{10}BSH -WOW (water-in-oil-in-water)	podanie dożylnie-brak dawki	5 Gy-Eq	1	7 miesięcy	2006	Yanagie et al. (50)

<i>Kostniakomięsak</i>	18F- ¹⁰ BPA z użyciem metody PET	500 mg·kg ⁻¹ +100 mg·kg ⁻¹ w trakcie napromieniania	30 Gy	1	poprawa funkcjonowania pacjentki	2013	Futamura et al. (72,73)
<i>Choroba Pageta</i>	L- ¹⁰ BPA	200 mg·kg ⁻¹ (podawane przez 3h)	20 Gy-Eq	4	6 miesięcy	2005-2014	Hiratsuka et al. (51)

1.5. Nowotwory piersi

Nowotwory piersi są jednym z najczęściej występujących odmian nowotworów wśród kobiet (74). Metody leczenia są wysoko rozwinięte, jednakże, pomimo tego jest potrzeba dalszego rozwoju i prowadzenia badań nad skuteczniejszymi terapiami. Nowotwory piersi dalej pozostają jako jeden z głównych problemów zdrowotnych na całym świecie (75). Jeśli nie zajdą zmiany w metodach leczenia pacjentów z nowotworami piersi, za kilka lat wskaźniki zachorowalności, jak i śmiertelności znacząco wzrosną (75, 76). W USA szacuje się, że co roku wskaźnik zachorowalności wzrasta o 0,3% (76).

Najlepszą dotychczas metodą leczenia jest terapia skojarzona łącząca radio- i chemioterapię. Chemioterapia polega głównie na leczeniu indywidualnie dostosowanym do pacjenta z danym typem nowotworu piersi. Pomimo tego, niektóre odmiany nowotworów piersi są odporne na to leczenie, w szczególności podtypy trójujemne (TNBC – ang. *triple-negative breast cancer*), które są najbardziej niebezpieczne dla życia pacjenta (75).

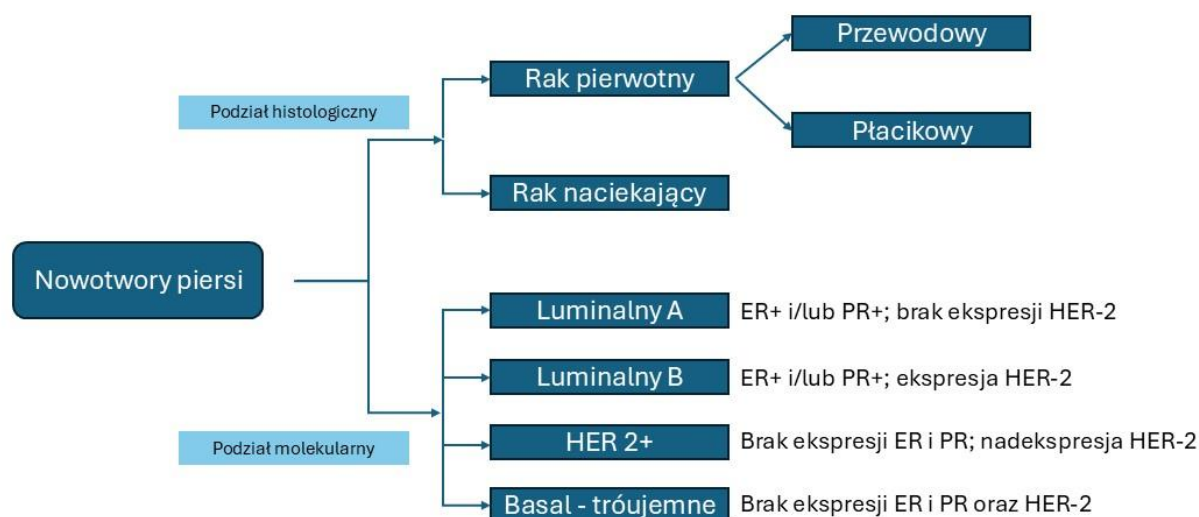
Nowotwory piersi dzieli się pod kątem rozpoznania histologicznego oraz molekularnego na różne odmiany. Istnieje kilka podtypów nowotworów piersi, których klasyfikacja molekularna oparta jest na ekspresji poszczególnych receptorów komórkowych: progesteronowego, estrogenowego i HER-2. Każda z odmian nowotworu piersi charakteryzuje się inną promieniowrażliwością i opornością na dotychczas stosowane terapie (76, 78).

Nowotwory piersi dzielimy ze względu na obecność markerów prognostycznych na następujące podtypy: luminalne (A lub B), HER-2 dodatnie i trójujemne (podstawowe lub z niskim poziomem kładyny) (78). Inny podział nowotworów piersi dotyczy obecności ekspresji receptorów: estrogenowego (ER), progesteronowego (PR), HER-2 (receptor naskórkowego czynnika wzrostu 2) oraz ekspresję genu Ki-67 (79). W celu określenia odmiany nowotworu można wykorzystać dwie metody diagnostyczne: markery immunohistochemiczne i testy genowe. Taka klasyfikacja ma znaczenie prognostyczne i predykcyjne dla doboru odpowiedniej terapii dla danej odmiany nowotworu piersi.

Techniki immunohistochemiczne klasyfikują odmiany nowotworów piersi na podstawie obecności receptorów komórkowych ER, PR i HER-2. Luminalne podtypy nowotworów dzielą się na typ A i B. Do typu luminalnego A zaliczamy nowotwory odznaczające się obecnością receptorów ER i/lub PR oraz brakiem ekspresji HER-2. Typ luminalny B odznacza się obecnością receptorów ER i/lub PR oraz ekspresją HER-2. Odmiana HER-2 dodatnia charakteryzuje się brakiem receptorów ER i PR oraz nadekspresją HER-2.

Natomiast, odmiana trójjemna nowotworu piersi (TNBC) odznacza się brakiem ekspresji wszystkich receptorów ER, PR i HER-2 (80).

Rozwój nowotworu piersi typu trójjemnego postępuje najszybciej i komórki nowotworowe rozprzestrzeniają się po organizmie tworząc przerzuty do innych narządów. Pacjenci z nowotworami typu luminalnego A czy B oraz HER-2 dodatniego są podatni na leczenie terapiami hormonalnymi i dają dobre prognozy w porównaniu z pacjentami z TNBC. Markery receptorów komórkowych pomagają określić, którzy pacjenci prawdopodobnie zareagują na terapie celowane, na przykład z użyciem tamoksifenu lub inhibitorów aromatazy w przypadku ER+/PR+, trastuzumabu lub lapatynibu u pacjentów z HER-2+. Pacjenci z odmianą trójjemną mają tylko możliwość leczenia chemioterapią alternatywną (80).



Rycina 5. Podział nowotworów piersi ze względu na podłoże molekularne i histologiczne (źródło: wykonanie własne).

1.5.1. Luminalne nowotwory piersi

Luminalne nowotwory piersi są uznawane za dodatnie pod względem występowania hormonalnych receptorów estrogenowych (ER) i/lub progesteronowych (PR) oraz, w większości przypadków, niższym od innych podtypów nowotworów piersi poziomem ekspresji receptora HER-2. Stanowią one jedną z najliczniej diagnozowanych grup nowotworów piersi, która charakteryzuje się specyficznymi cechami fenotypowymi, molekularnymi i klinicznymi. Wyróżniamy dwie główne podgrupy nowotworów luminalnych typu A i B (79).

Podtyp luminalny A charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji receptora estrogenowego i niską proliferacją komórkową, która jest mierzona za pomocą wskaźnika genu Ki-67. Ten typ nowotworu piersi ma korzystniejsze rokowania i rzadko kiedy daje przerzuty. Nowotwory luminalne podtypu B mają wyższy wskaźnik proliferacji komórkowej oraz większą ekspresję receptorów HER-2. Są zatem bardziej agresywne i dają gorsze rokowania niż podtyp A.

Nowotwory typu luminalnego wykrywa się za pomocą metod immunohistochemicznych (wykrywanie obecności receptorów hormonalnych ER i/lub PR, ekspresji HER-2 oraz wskaźnika Ki-67), analizy molekularnej (np. profilowania genetycznego) i obrazowania (np. rezonansu magnetycznego) (81).

Najczęstszymi metodami leczenia luminalnych nowotworów piersi są:

- terapia hormonalna – używa się np. tamoksyfenu, inhibitorów aromatazy, fulwestrantu;
- chemioterapia – częściej zalecana przy podtypie B;
- terapie celowane – z użyciem leków celowanych takich jak trastuzumab (79).

Luminalne typy nowotworów piersi są zróżnicowaną grupą pod kątem molekularnym, co wpływa na dobór metod leczenia, które muszą być zindywidualizowane. Właściwa klasyfikacja nowotworów umożliwia precyzyjny dobór terapii i osiągnięcie wysokiej skuteczności leczenia.

1.5.2. HER-2 dodatnie nowotwory piersi

Nowotwory HER-2 dodatnie (ang. *human epidermal growth factor*) charakteryzują się nadekspresją genu HER-2. Cechuje je agresywny przebieg kliniczny ze zwiększonym ryzykiem przerzutów na inne tkanki oraz słabsze rokowanie w porównaniu do podtypu luminalnego (80).

HER-2 jest receptorem transbłonowym, który odpowiada za prawidłowy przebieg wzrostu i proliferacji komórkowych. Należy do rodziny receptorów ErbB, w której są również HER-1 (EGFR), HER-3 i HER-4. Aktywacja receptora HER-2 przebiega za pomocą dimeryzacji z innymi członkami rodziny ErbB, ponieważ nie posiada naturalnego liganda. Nadekspresja HER-2 spowodowana jest amplifikacją locus 17q12 w genie ERBB2. Szacuje się, że około 15-20% nowotworów piersi stanowią te podtypu HER-2 dodatniego (82).

Nowotwory piersi HER-2 dodatnie można wykryć za pomocą metod immunohistochemicznych (IHC) i przy użyciu hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ

(ang. *fluorescence in situ hybridization* - FISH). W przypadku leczenia, najczęściej stosowane są terapie ukierunkowane molekularnie przy użyciu leków takich jak: trastuzumab, pertuzumab, T-DM1 (ang. *trastuzumab emtasine*) czy też inhibitory kinazy tyrozynowej (83).

HER-2 dodatkowo nowotwory piersi przyczyniły się w dużym stopniu do rozwoju terapii celowanej. Postępy naukowe w zakresie diagnostyki molekularnej oraz terapii nowotworowych dają coraz lepsze rokowania dla pacjentek z tym podtypem nowotworu. Pomimo tego, niezbędne jest dalsze badanie mechanizmów oporności komórkowej czy też rozwój nowych metod terapeutycznych.

1.5.3. Trójjemne nowotwory piersi (triple-negative breast cancer - TNBC)

Najbardziej agresywną odmianą nowotworów piersi jest odmiana trójjemna (TNBC), która charakteryzuje się brakiem ekspresji receptorów ER, PR i HER-2. Około 15-20% przypadków nowotworów piersi jest klasyfikowana jako TNBC. Nowotwory te odznaczają się wczesnymi przerzutami w obrębie organizmu, przerzutami na narządy trzewne, szybkim rozwojem choroby, krótkim czasem odpowiedzi na stosowane terapie celowane i niskimi wskaźnikami przeżywalności (80). Pomimo wielu skutecznych metod terapii nowotworów piersi odmian luminalnych i HER-2 dodatnich, TNBC dalej sprawia dużo problemów w doborze skutecznego leczenia. Dotychczasowe osiągnięcia w dziedzinie metod diagnostyki molekularnej nowotworów trójjemnych oraz rozwój sekwencjonowania genomu, umożliwiły dokładniejsze określenie potencjalnych celów molekularnych w leczeniu TNBC (80).

TNBC jest nowotworem heterogennym, który różni się pod kątem molekularnym, biologicznym i klinicznym od innych nowotworów piersi. Brak receptorów hormonalnych powoduje, że TNBC nie reagują na terapie hormonalne ani celowane. Z molekularnego punktu widzenia są związane z kilkoma specyficznymi szlakami sygnałowymi, takimi jak aktywacja kinaz białkowych (kinaza aktywowana przez mitogen – MAPK oraz kinaza mTOR), które najprawdopodobniej sprzyjają proliferacji komórek nowotworowych. Oprócz tego, występowanie mutacji w genach TP53 (gen supresorowy) oraz BRCA1 i BRCA2 są dość często spotykane w przypadku TNBC i wpływają na rozwój oraz progresję choroby (84).

Aktualnie prowadzonych jest wiele badań klinicznych w odniesieniu do potencjalnych metod leczenia trójjemnych nowotworów piersi takich jak: inhibicja PARP u pacjentek z mutacją BRCA, immunoterapia z inhibitorami punktów kontrolnych, środki celowane w receptor androgenowy czy też koniugaty przeciwciało-lek skierowane na szlak AKT. Te nowatorskie terapeutyczne podejścia dają nadzieję na poprawę skuteczności leczenia

i poprawy wyników wyleczalności wśród pacjentów z TNBC (80). Jednakże, jak na razie najczęściej stosowaną metodą leczenia pozostaje chemioterapia, ponieważ te typy nowotworów są wrażliwe na związki cytotoksyczne takie jak karboplatyna czy doksorubicyna.

Nowatorskie badania prowadzi się również w odniesieniu do leczenia nowotworów piersi za pomocą radioterapii. Duże nadzieje pokłada się w leczeniu hadronoterapią to jest m.in. terapią borowo-neutronową czy protonoterapią.

1.5.4. Leczenie nowotworów piersi za pomocą BNCT

Terapię borowo-neutronową można również zastosować do leczenia nowotworów piersi. Przeprowadzono dotychczas niewiele badań klinicznych związanych z leczeniem nowotworów piersi z zastosowaniem terapii borowo-neutronowej. Jednakże, otrzymane wyniki są obiecujące. Ta terapia może stanowić doskonałą opcję leczenia nowotworów piersi z nadekspresją HER-2, co sugerują uzyskane wyniki z badań przedklinicznych. W tym przypadku zaproponowano immunoliposomy znakowane trastuzumabem jako nośniki ^{10}B ze względu na ich selektywność w celowaniu w komórki z nadekspresją HER-2. Niezależnie od tego, istnieje dalsza potrzeba przeprowadzenia badań w zakresie leczenia nowotworów piersi za pomocą BNCT (25).

Pojawiające się dotychczas dane z prowadzonych badań klinicznych nad BNCT wskazują, że terapia z udziałem BPA może z powodzeniem zostać użyta do leczenia nowotworów piersi z nadekspresją transportera LAT-1. Jeśli uda się stworzyć nowe związki z izotopem ^{10}B , które będą dopuszczone do wykorzystania w BNCT (substancje oparte na liposomach lub nanocząstkach skierowanych na receptory hormonalne), wówczas istnieje możliwość leczenia BNCT także pacjentów z nowotworami piersi z niską ekspresją LAT-1 (85).

1.6. Nanocząstki złota i ich wpływ na zwiększenie efektywności radioterapii

Nanocząstki złota (ang. *GNPs, gold nanoparticles*) są cząstkami o rozmiarach z zakresu nanometrycznego, które znalazły szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach naukowych ze względu na swoje nietypowe właściwości fizykochemiczne. Coraz częściej wykorzystywane są w terapiach nowotworowych w celu zwiększenia efektywności terapii, co jest związane między innymi z ich wysoką biokompatybilnością i zdolnością do tak zwanej funkcjonalizacji powierzchni.

Nanocząstki złota cechują się wieloma unikatowymi właściwościami fizykochemicznymi takimi jak:

- silny efekt wzmocnienia radiacji – uwarunkowany jest wysoką liczbą atomową złota ($Z=79$), co powoduje, że doskonale absorbuje promieniowanie rentgenowskie i gamma;
- możliwością precyzyjnej funkcjonalizacji – powierzchnia GNPs może ulegać modyfikacjom przy użyciu ligandów, przeciwciał czy też peptydów, co umożliwia celowane dostarczanie nanocząstek do komórek nowotworowych;
- unikalne właściwości optyczne – nanocząstki złota wykazują zdolność do absorpcji światła z zakresu bliskiej podczerwieni, co umożliwia ich wykorzystywanie np. w fotochemicznych technikach obrazowania guza i badań biodystrybucji leków;
- nie wchodzi w reakcje metaboliczne – złoto jest metalem szlachetnym, ponieważ występuje w szeregu aktywności metali za wodorem;
- biokompatybilnością i stabilnością nanocząstek – charakteryzują się stabilnością w środowisku biologicznym (86).

Nanocząstki złota, wprowadzane w miejscu guza, są wykorzystywane w radioterapiach w celu zwiększenia ich efektywności. Biorąc pod uwagę mechanizm działania GNPs, w radioterapii są odpowiedzialne za wzmocnienie dawki promieniowania poprzez absorpcję promieniowania jonizującego i przekształcenie go w strumień elektronów wtórnych, co doprowadza do uszkodzenia DNA komórek nowotworowych. Wytwarzane są również reaktywne formy tlenu (ROS - ang. *reactive oxygen species*), których powstawanie może być katalizowane poprzez obecność nanocząsteczek. W konsekwencji doprowadza to między innymi do uszkodzenia integralności błon komórkowych. Nanocząstki mogą wpływać na mikrośrodowisko guza. Doprowadza to do zmian pH lub do niedotlenienia, co zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie. Nanocząstki mogą być także celowo ukierunkowane na specyficzne biomarkery obecne na błonach komórkowych komórek nowotworowych. W ten sposób negatywny wpływ radioterapii na zdrowe komórki jest zminimalizowany (87).

Dotychczas przeprowadzone badania kliniczne wykazały, że nanocząstki złota zwiększają uszkodzenia DNA poprzez miejscowe zwiększenie dawki promieniowania. Doprowadza to do zwiększenia liczby dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach nowotworowych. Nanocząstki złota zmniejszają oporność nowotworów na leczenie, hamują proliferację komórek nowotworowych poprzez wpływ na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, indukują apoptozę i wpływają na metabolizm komórki (88).

1.6.1. Interakcja nanocząstek złota z promieniowaniem neutronowym

Promieniowanie neutronowe jest rzadziej stosowane w praktyce klinicznej jako terapia przeciwnowotworowa. Mimo to posiada ono unikalne właściwości, takie jak zdolność do głębokiej penetracji tkanek czy też interakcji z jądrami atomowymi wybranych pierwiastków. Zdolność ta wykorzystywana jest między innymi w terapii borowo-neutronowej. Nanocząstki złota mogą zwiększać skuteczność BNCT poprzez generowanie hipertermii, która zwiększa stopień uszkodzenia komórek nowotworowych. W obecności nanocząstek, neutrony mogą inicjować reakcje jądrowe prowadzące do emisji cząstek alfa, beta lub gamma. Dzięki temu, możliwe jest dodatkowe wzmocnienie efektu terapeutycznego BNCT (88, 89).

Mechanizmy wpływające na interakcję między nanocząstkami złota a neutronami obejmują:

- wychwyt neutronów – neutrony wchodzące w interakcję z atomami złota ^{197}Au wytwarzają radioaktywny izotop ^{198}Au , który emituje promieniowanie gamma stosowane w terapii neutronowej i analizie aktywacyjnej;
- rozpraszanie neutronów – neutrony oddziałują z nanocząstkami złota jako cząstki elektrycznie obojętne, w tym poprzez rozpraszanie nieelastyczne prowadząc do wzbudzenia jąder złota i emisji promieniowania gamma;
- zwiększona powierzchnia oddziaływania ze względu na nanorozmiar cząstek złota wpływa na ich właściwości jądrowe i efekty rezonansowe w wychwytach neutronów, prowadząc do zmian przekrojów czynnych reakcji jądrowych (90).

Badania przedkliniczne wykazały zwiększoną skuteczność terapeutyczną połączenia nanocząstek złota z neutronami. Najlepszą skuteczność osiągnięto w leczeniu guzów głęboko położonych, takich jak guzy mózgu czy trzustki. Jednak, wdrożenie tej metody w praktyce klinicznej wymaga dalszych badań. Jest to niezbędne w celu pełnego zrozumienia mechanizmów działania nanocząstek złota i zapewnienia bezpieczeństwa dla pacjentów (90).

Ze względu na powyżej wymienione właściwości GNPs, postanowiono zbadać ich wpływ na efektywność terapeutyczną terapii borowo-neutronowej w leczeniu nowotworów piersi. Nanocząstki złota mają zmniejszyć ekspozycję pacjenta na promieniowanie w przyszłych badaniach nad ich zastosowaniem w BNCT.

2. Cel pracy

Głównym celem pracy było zbadanie możliwości zwiększenia skuteczności terapii borowo-neutronowej za pomocą nanocząstek złota w komórkach nowotworowych piersi typu trójujemnego MDA-MB-231 i luminalnego MCF-7. Cele szczegółowe pracy to:

1. Opracowanie protokołu napromieniania komórek w poczcie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA w Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Świerku w celu prowadzenia badań odnośnie wpływu terapii borowo-neutronowej na komórki.
2. Ustalenie optymalnych stężeń nanocząstek złota oraz BPA do dalszych badań poprzez analizę wnikania nanocząstek złota do komórek MDA-MB-231 i MCF-7 oraz analizę właściwości cytotoksycznych nanocząstek złota i BPA w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu MTT oraz testu aneksynowego z jodkiem propidyny.
3. Zbadanie wpływu terapii borowo-neutronowej z zastosowaniem nanocząstek złota na poziom uszkodzeń i naprawy DNA w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7, ocenianych za pomocą testu γ -H2AX oraz testu mikrojądrowego.
4. Analiza wpływu terapii borowo-neutronowej z nanocząstkami złota na przeżywalność oraz przebieg cyklu komórkowego komórek MDA-MB-231 i MCF-7.
5. Analiza porównawcza efektywności terapii borowo-neutronowej z nanocząstkami złota w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7, w odniesieniu do różnych rozmiarów nanocząstek złota (50 nm i 100 nm).

3. Materiały i metody

3.1. Charakterystyka linii komórkowych MDA-MB-231 i MCF-7 oraz ich warunki hodowli *in vitro*

Badania przeprowadzono na ludzkich liniach komórek nowotworowych piersi. Wykorzystano linię MCF-7 (nr kat. HTB-22™) reprezentującą typ luminalny nowotworu piersi oraz linię komórkową trójujemną – MDA-MB-231 (nr kat. CRM-HTB-26™). Linie komórkowe otrzymano z Uniwersytetu w Sztokholmie (Szwecja).

Komórki linii nowotworowej piersi MCF-7 wyprowadzono z gruczołu piersiowego od 69-letniej kobiety chorej na gruczolakoraka. Komórki MCF-7 są sklasyfikowane jako komórki nowotworu piersi typu luminalnego z nadekspresją transportera LAT-1. W tych komórkach występuje ekspresja receptora estrogenowego oraz ekspresja genów insulinopodobnych czynników wzrostu IGFBP BP-2, IGFBP BP-4 i IGFBP BP-5 (91). Linia MCF-7 wykazuje również ekspresję onkogenu WNT7B, który odpowiada za aktywację beta-katenin w komórkach gruczolakoraka. Komórki hodowano w pożywce Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (CORNING, nr kat. 10-010-CV) z dodatkiem 10% surowicy bydlęco-cielecej (Gibco, nr kat. 10270-106) i mieszaną antybiotyków penicylina/streptomycyna (Gibco, nr kat. 15140-122). Pożywka MEM zawierała między innymi: zestaw aminokwasów, takich jak arginina, fenyloalanina (~32 mg·L⁻¹), glutamina, leucyna, itd., glukozę, wodorowęglan sodu, chlorek sodu i potasu, kwas foliowy czy też tiaminę. Komórki linii MCF-7 przechowywano w inkubatorze przeznaczonym do hodowli komórkowych *in vitro* w temperaturze 37°C z 5% CO₂.

Komórki linii nowotworowej piersi MDA-MB-231 należą do trójujemnej odmiany nowotworów piersi, w których nie występuje ekspresja trzech receptorów hormonalnych - receptora β-estrogenowego, receptora progesteronowego i receptora HER-2 przy jednoczesnej nadekspresji transportera LAT-1. MDA-MB-231 została wyprowadzona z gruczołu sutkowego od 51-letniej kobiety z gruczolakorakiem. Markerami ekspresji w tych komórkach są: nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF – ang. *epidermal growth factor*) i transformujący czynnik wzrostu α (TGF-α – ang. *transforming growth factor alpha*). W komórkach występuje również ekspresja genu WNT7B (92). Jako podłoże hodowlane do komórek MDA-MB-231 użyto Dulbecco's Modification Eagle's Medium (DMEM) (CORNING, nr kat. 10-014-CV) uzupełnionego surowicą bydlęco-cielecą w 10%-ach (Gibco, nr kat. 10270-106) i dodatkiem mieszaniny antybiotyków penicylina/streptomycyna (Gibco, nr kat. 15140-122). Pożywka DMEM w porównaniu do MEM ma około 4-krotnie wyższe sumarycznie stężenie

aminokwasów i witamin oraz zawiera dodatkowe składniki takie jak żelazo. W przypadku zawartości fenyloalaniny w pożywce wynosiła $\sim 66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Komórki MDA-MB-231 przechowywano w inkubatorze do hodowli komórkowych *in vitro* w temperaturze 37°C z 5% CO_2 .

3.2. Źródło neutronów – reaktor badawczy MARIA

Źródłem promieniowania mieszanego (stosunek promieniowania gamma do promieniowania neutronowego – 50%:50%), które wykorzystano w badaniach był reaktor badawczy MARIA zlokalizowany w Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Świerku.

3.2.1. Sposób napromieniania komórek nowotworowych piersi w poczcie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA

Do napromieniania komórek wykorzystano system poczty hydraulicznej reaktora badawczego MARIA. Kanały poczty hydraulicznej są wykorzystywane do krótkotrwałych ekspozycji. Próbkę z komórkami umieszczano w specjalnych zasobnikach, a następnie w kanale poczty. Całość procesu trwała 10-12 sekund, w którym to czasie zachodziło napromienienie próbek w rdzeniu reaktora. Dawka promieniowania neutronowego, którą komórki otrzymywały w trakcie cyklu mieściła się w zakresie 0,4-2,8 Gy. Napromienienie próbek biologicznych odbywało się w trakcie rozruchu reaktora w celu uzyskania niskiej dawki promieniowania.

3.2.2. Przygotowanie komórek do napromieniania w reaktorze MARIA

W celu przygotowania komórek do eksperymentu, wysiewano je na 20 szalek w gęstości 500 000 komórek na szalkę. Następnie, po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji komórek (około 80%), wylewano pożywkę i dodawano pożywkę z nanocząstkami złota (GNPs) (8 μl GNPs na 1 ml pożywki). Pożywkę wymieniało się 4h i 24h przed napromienianiem. Natomiast, roztwór BPA dodawano 4h przed napromienianiem.

Komórki po inkubacji z nanocząstkami złota i z BPA przygotowane do napromieniania w poczcie hydraulicznej. Opracowano protokół odpowiedniego napromieniania komórek w zasobniku skonstruowanym do umieszczenia próbek biologicznych w poczcie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA. Komórki odrywano za pomocą trypsyny, a następnie wirowano przez 10 min (900 obrotów $\cdot \text{min}^{-1}$). Zlewano nadsącz i resztę pożywki z komórkami przenoszono do probówek Eppendorfa o pojemności 20 μl . Zawiesinę komórek wirowano w ultrawirówce przez 30 sekund, a następnie, maksymalnie odciągano nadsącz, aby zminimalizować wpływ efektu zachodzącej radiolizy środowiska wodnego wzmacniającej odpowiedź komórkową. W pojedynczym zasobniku mieściło się 9 probówek typu Eppendorf

ułożonych pionowo. Po napromienieniu, do probówek dodawano 100 µl pożywki, a następnie przenoszono zawiesiny komórkowe do nowych szalek z pożywką (5 ml).

3.2.3. Dawki promieniowania mieszanego

W poniższej tabeli przedstawiono dane dotyczące dawek promieniowania mieszanego, którymi były traktowane komórki nowotworowe piersi MDA-MB-231 i MCF-7.

Tabela 3. *Dawki promieniowania mieszanego (neutronowe + gamma – stosunek promieniowania 50%:50%), którymi traktowano komórki nowotworowe piersi MDA-MB-231 i MCF-7 uzyskiwane w poczcie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA. Dane uzyskane z odczytu TLD. Obliczenia dawki efektywnej zostały wykonane zgodnie z dokumentem ICRP Publication 116. Do obliczeń wykorzystano geometrię izotopową. Obliczenia wykonano dla neutronów w zakresie energii: $1 \cdot 10^{-9}$ –0,5 MeV. Niepewność obliczeń oszacowano dodając do niepewności pomiaru i obliczeń strumienia neutronów termicznych, stałą niepewność 5% wynikający z analizy rozdziału 4.3.2. oraz z konserwatywnego podejścia.*

DATA	ZASOBNIKI Z KOMÓRKAMI		
	1 (dawka/dawka efektywna)	2 (dawka/dawka efektywna)	3 (dawka/dawka efektywna)
17/12/2021	2,09 Gy/1,15	2,09 Gy/1,15	1,7 Gy/4,2
3/01/2022	1,48 Gy/0,7	2,42 Gy/0,82	2,23 Gy/0,75
4/02/2022	1,20 Gy/5,1	0,76 Gy/0,71	1,44 Gy/0,79
9/03/2022	1,49 Gy/0,7	1,13 Gy/4,99	0,96 Gy/6,28
17/03/2022	0,43 Gy/4,4	1,21 Gy/5,94	1,21 Gy/5,94
01/04/2022	2,83 Gy/0,78	2,18 Gy/0,72	0,91 Gy/5,8
06/04/2022	1,25 Gy/0,64	1,11 Gy/4,66	1,98 Gy/6,07
19/04/2022	1,25 Gy/6,07	1,18 Gy/0	2,54 Gy/4,72
27/05/2022	1,04 Gy/5,49	1,34 Gy/0,71	1,43 Gy/0,71
03/06/2022	1,28 Gy/0,64	1,31 Gy/0,86	0,65 Gy/5,97

3.3. Nośnik izotopu ^{10}B - BPA - *p*-borofenyloalanina

Jako nośnik izotopu ^{10}B w badaniach użyto *p*-borofenyloalaniny (BPA; Interpharma Praha, Czechy). Preparat był dodatkowo wzbogacony izotopem ^{10}B . BPA rozpuszczano w wodzie destylowanej (30 mg w 1 ml H_2O) podgrzewając do temperatury 60°C . Następnie, ustalano pH na poziomie 7,3-7,4, ponieważ BPA najefektywniej działa w takich zakresach pH (6). W ten sposób otrzymano zawiesinę borofenyloalaniny, którą następnie dodawano do komórek w objętości 34 μl na 5 ml pożywki (stężenie molowe: $4,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). BPA przygotowywano przed każdym eksperymentem ze względu na krótki czas trwałości związku.

3.4. Nanocząstki złota

W badaniach wykorzystano dwa rozmiary nanocząstek złota: 50 nm i 100 nm. Rozmiary nanocząstek dobrano pod kątem selektywnej przepuszczalności błony komórkowej. Nanocząstki złota o rozmiarze 50 nm stabilizowano w 0,1 mM roztworze PBS (Sigma Aldrich, nr kat. 753645, Niemcy; producent: CytoDiagnostics, Inc.). Stężenie GNPs w zawiesinie producenta wynosiło $3,5+10^{10}$ nanocząstek $\cdot\text{mL}^{-1}$. Wartość polidispersyjności nanocząstek wynosiła $\leq 0,2$, a wartość $\text{OD}^2 = 1$. Rozmiar rdzenia GNPs wynosił 47-53 nm, a średnica hydrodynamiczna (Z) – 51-63 nm. Nanocząstki o rozmiarze 100 nm stabilizowano w buforze cytrynianu (Sigma Aldrich, nr kat. 742031, Niemcy; producent: CytoDiagnostics, Inc.). Stężenie GNPs mieściło się w zakresie $3,45+9^{10} - 4,22+9^{10}$ nanocząstek $\cdot\text{mL}^{-1}$. Wartość polidispersyjności nanocząstek wynosiła 0,1, a wartość $\text{OD} = 1$. Rozmiar rdzenia GNPs wynosił 98-110 nm, a średnica hydrodynamiczna (Z) – 108-125 nm. Nanocząstki otrzymano przez redukcję prekursorów soli metali za pomocą środków redukujących, takich jak redukcja cytrynianem związku HAuCl_4 w wodzie. Do każdego eksperymentu przygotowywano nową zawiesinę nanocząstek w pożywce. Dodawano 8 μl GNPs na 1 ml medium przed dodaniem pożywki do komórek. Zawiesin nanocząstek nie poddawano sonifikacji.

3.5. Oznaczanie cytotoksyczności nanocząstek złota i BPA na komórki MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu MTT

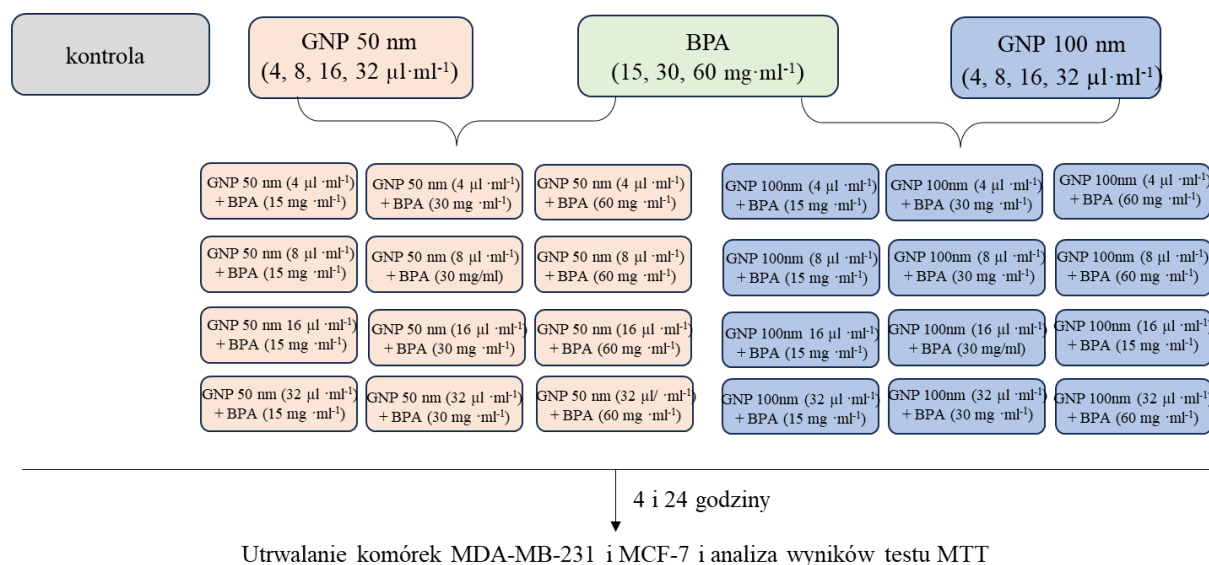
Test MTT jest to powszechnie stosowana metoda kolorymetryczna służąca do określania aktywności metabolicznej komórek. Test ten opiera się na analizie zdolności oksydoredukcyjnej mitochondriów komórkowych do redukcji soli tetrazolowej (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylotetrazoliowy) rozpuszczalnej w wodzie do fioletowego formazanu, nierozpuszczalnego w wodzie.

² OD – ang. *optical density* – gęstość optyczna

Komórki wysiewano na płytkę 96-dołkową. Badano różne stężenia GNPs ($4 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$; $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$; $16 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$; $32 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) z inkubacją 4h i 24h oraz BPA ($15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Do wykonania testu cytotoksyczności użyto Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche, nr kat. 11465007001, Niemcy). Po upływie doby od rozsiania komórek, dodawano GNPs i inkubowano 24h, do których dodawano BPA po 20h. Do reszty prób badawczych, dodawano GNPs i inkubowano 4h z BPA. Po upływie inkubacji z nanocząstkami i BPA, wykonywano test MTT zgodnie z instrukcją. Dodawano roztwór soli tetrazolowej do komórek i inkubowano je w 37°C przez 4h. Po upływie tego czasu dodawano SDS, a następnie po 4h mierzono absorbancję w spektrofotometrze UV-Vis przy długości fali 570 nm. Wyniki przedstawiono jako procentową aktywność metaboliczną danej próby badanej względem próby kontrolnej wyliczoną za pomocą poniższego wzoru:

$$\text{aktywność metaboliczna (\%)} = \frac{\text{aktywność metaboliczna badanej próby}}{\text{aktywność metaboliczna próby kontrolnej}} \cdot 100\%$$

Test MTT został wykonany w celu ustalenia optymalnego stężenia BPA i GNPs do dalszych eksperymentów z wykorzystaniem BNCT. W pracy testowano trzy stężenia BPA (15 , 30 , $60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), cztery stężenia GNPs (4 , 8 , 16 , $32 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) oraz dwa rozmiary GNPs (50 i 100 nm). Schemat eksperymentu przedstawiono na Rycinie 6.



Rycina 6. Schemat eksperymentu testu cytotoksyczności w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Na podstawie wyników testu MTT oraz dostępnej literatury do dalszych badań wybrano stężenie BPA $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz stężenie GNPs – $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Dodatkowo wyliczono wartości IC_{50} dla poszczególnych prób. IC_{50} (ang. *half maximal inhibitory concentration*) jest to połowa maksymalnego stężenia hamującego danej substancji, która umożliwia określenie potencjału substancji w hamowaniu określonej funkcji biologicznej czy biochemicznej. Wzór na wyliczenie IC_{50} :

$$IC_{50} = \frac{(Y-C)}{M}$$

gdzie:

$Y=50$,

C i M – wartości wyliczone z linii trendu.

W niektórych próbach eksperymentalnych wyliczano wartość EC_{50} ze względu na rosnącą aktywność metaboliczną komórek. EC_{50} (ang. *half maximal effective concentration*) jest to miara stężenia substancji badanej wywołującej odpowiedź biologiczną komórki na poziomie połowy wartości dawki maksymalnej. Najczęściej stosowanym wzorem na wyliczenie EC_{50} jest czteroparametrowe równanie Hill'a:

$$Y = \text{minimalna odpowiedź} + \frac{\text{maksymalna odpowiedź} - \text{minimalna odpowiedź}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{X}\right)^n}$$

gdzie:

Y - odpowiedź biologiczna,

X – zastosowane stężenie substancji,

n – współczynnik nachylenia krzywej (współczynnik Hill'a).

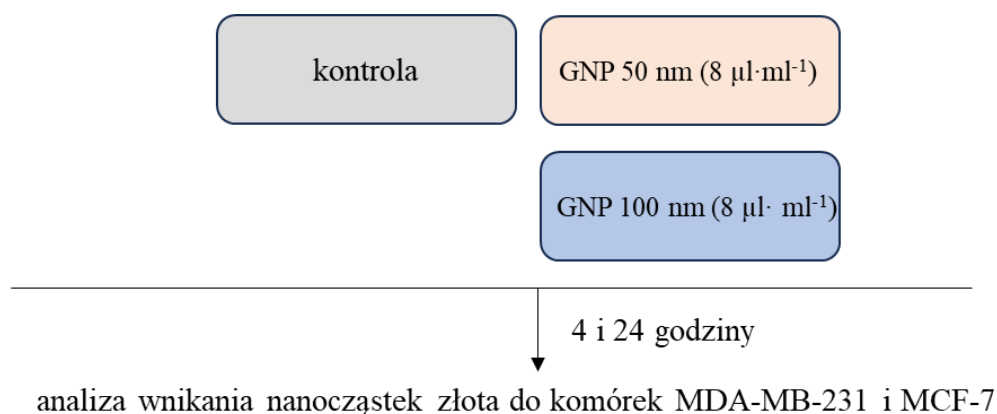
Model Hill'a dopasowuje się do danych pochodzących z regresji nieliniowej w celu wyliczenia EC_{50} .

3.6. Cytometryczna analiza poziomu wnikania nanocząstek złota do komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7

Wnikanie nanocząstek złota o rozmiarach 50 nm i 100 nm badano za pomocą cytometrii przepływowej. Pomiarów dokonano przy użyciu dwóch wskaźników SSC (*side scatter*) i FSC (*forward scatter*) (93). Metoda polega na analizie poziomu rozproszenia światła laserowego, które pada na komórkę w trakcie pomiaru. Detektor SSC jest umieszczony w sposób prostopadły do wiązki światła laserowego padającego na komórkę. Światło załamuje się

w różnych kierunkach przechodząc przez struktury komórki, czyli ziarnistości cytoplazmy i organelle. Im bardziej komórka ma skomplikowaną budowę, tym więcej światła załamuje się w różnych kierunkach i trafia na detektor boczny. Miara wnikanía GNPów do komórek jest stosunek SSC komórek traktowanych nanocząstkami do SSC komórek kontrolnych (94). Natomiast, detektor przedni FSC ustawiony jest naprzeciw wiązki światła laserowego padającego na komórkę. Odpowiada on za analizę wiązki, która została ugięta na powierzchni komórki. Powoduje to, że im większa intensywność i kąt wiązki, która pada na detektor, tym większa powierzchnia komórki.

Komórki MDA-MB-231 i MCF-7 wysiano na odpowiednią liczbę szalek w gęstości $5 \cdot 10^5$ na 5 ml pożywki. Po 24h od założenia hodowli traktowano je nanocząstkami złota odpowiednio o rozmiarze 100 nm i 50 nm w stężeniu $8 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$. Komórki inkubowano z dodanymi GNPami 4h lub 24h. Po inkubacji komórki płukano 3-krotnie w PBS. Następnie, odrywano komórki od podłoża szalki za pomocą trypsyny, wirowano je i zawieszano w 1 ml PBS-u. Pomiarów dokonywano za pomocą cytometru przepływowego BD LSR II (Becton Dickinson, USA), który jest wyposażony w laser o długości fali 488 nm, detektor diodowy FSC i detektor SSC w postaci fotopowielacza. Dane z tych pomiarów zbierano dla 20 000 komórek. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach dla każdej z badanych linii komórkowych.

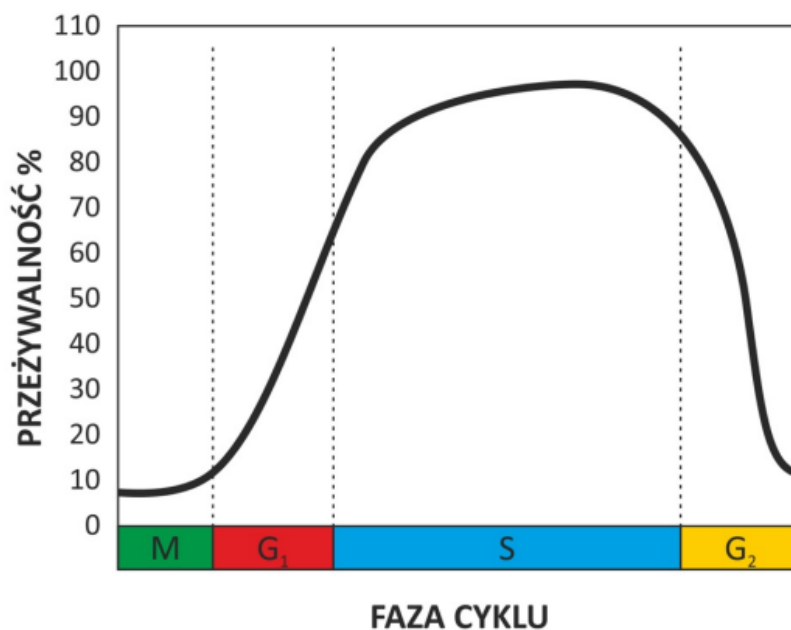


Rycina 7. Schemat eksperymentu do analizy wnikanía nanocząstek złota (współczynnik SSC) w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

3.7. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na rozkład komórek MDA-MB-231 i MCF-7 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego

Analiza przebiegu cyklu komórkowego pozwala m.in. na ocenę zatrzymania komórek w fazach cyklu pod wpływem czynnika fizycznego lub chemicznego w porównaniu do

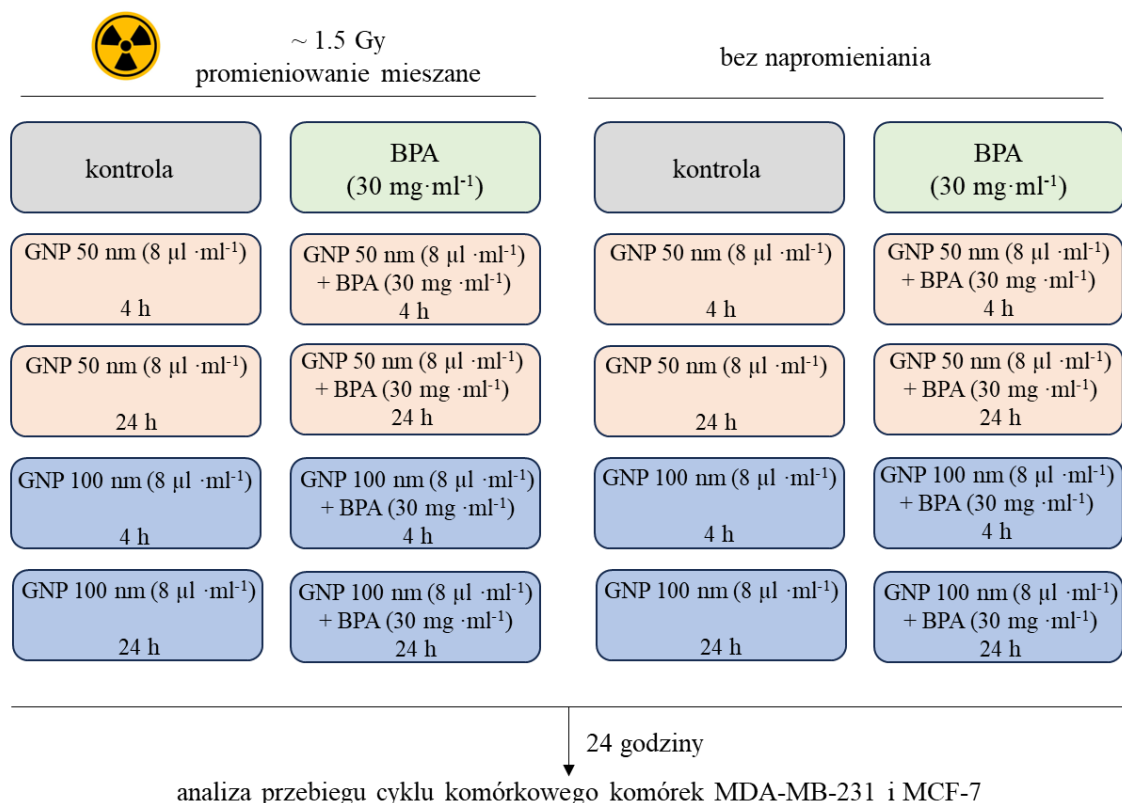
komórek kontrolnych. Cykl komórkowy dzielimy na cztery fazy: G₁, S, G₂ oraz M, czyli mitozę (właściwy podział komórkowy). Niektóre komórki mogą znajdować się w fazie spoczynkowej G₀ (komórki nieproliferujące). Promieniowrażliwość komórek jest zależna od fazy cyklu komórkowego, w której aktualnie się znajdują. Największą podatnością na działanie promieniowania charakteryzują się komórki w fazie G₂ oraz w mitozie, a najmniejszą w późnej fazie S (95).



Rycina 8. Schemat przedstawiający wrażliwość komórek na promieniowanie jonizujące w zależności od fazy cyklu komórkowego (źródło: na podstawie artykułu (95)).

W celu zbadania progresji cyklu komórkowego, po 24h od napromienienia, komórki zbierano za pomocą trypsynizacji do probówek i wirowano 900 obrotów·min⁻¹ przez 10 min, a następnie usuwano nadsącz. Osad komórkowy płukano 2-krotnie PBS, po czym utrwalano w 1 ml zimnego 80%-owego etanolu i inkubowano przez 60 min w temperaturze 4°C. Po inkubacji, komórki ponownie 2-krotnie płukano PBS-em. Komórkowe DNA barwiono roztworem jodku propidyny PI (50 mg·ml⁻¹ w PBS, Sigma Aldrich, nr kat. 81845, Szwajcaria) w obecności RNAzy o stężeniu 50 mg·ml⁻¹. Zawiesinę komórek inkubowano z PI i RNAzą przez 60 minut w temperaturze 37°C, a następnie płukano 2-krotnie PBS-em i przenoszono 300 µl zawiesiny do probówek cytometrycznych. DNA analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR II (Becton Dickinson, USA). Dane uzyskiwano przy użyciu programu BD FACSDiVa (v 6.0, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) i analizowano w oprogramowaniu Modfit LT (Verity Software House, Topsham, USA). Dane z cyklu

komórkowego zbierano dla populacji 20 000 komórek. Określono procentową ilość komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego G₀/G₁, S i G₂/M. Przeprowadzono trzy niezależne powtórzenia eksperymentu dla każdej z badanych linii komórkowych.



Rycina 9. Schemat eksperymentu progresji cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

3.8. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na przeżywalność komórkową w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu klonogenego

Test przeżywalności komórkowej, inaczej nazywany testem klonogennym, jest jednym z podstawowych testów radiobiologicznych określającym zdolność komórek do proliferacji i tworzenia kolonii. W teście klonogennym wysiewa się określoną liczbę komórek, a następnie pozostawia na 2-3 tygodnie (zależy od linii komórkowej i warunków napromieniania) w inkubatorze w celu wyhodowania kolonii.

Do oceny zdolności proliferacyjnych komórek wykorzystano parametr PE (ang. *plating efficiency*), czyli wydajność klonowania, który opisany jest przez wzór:

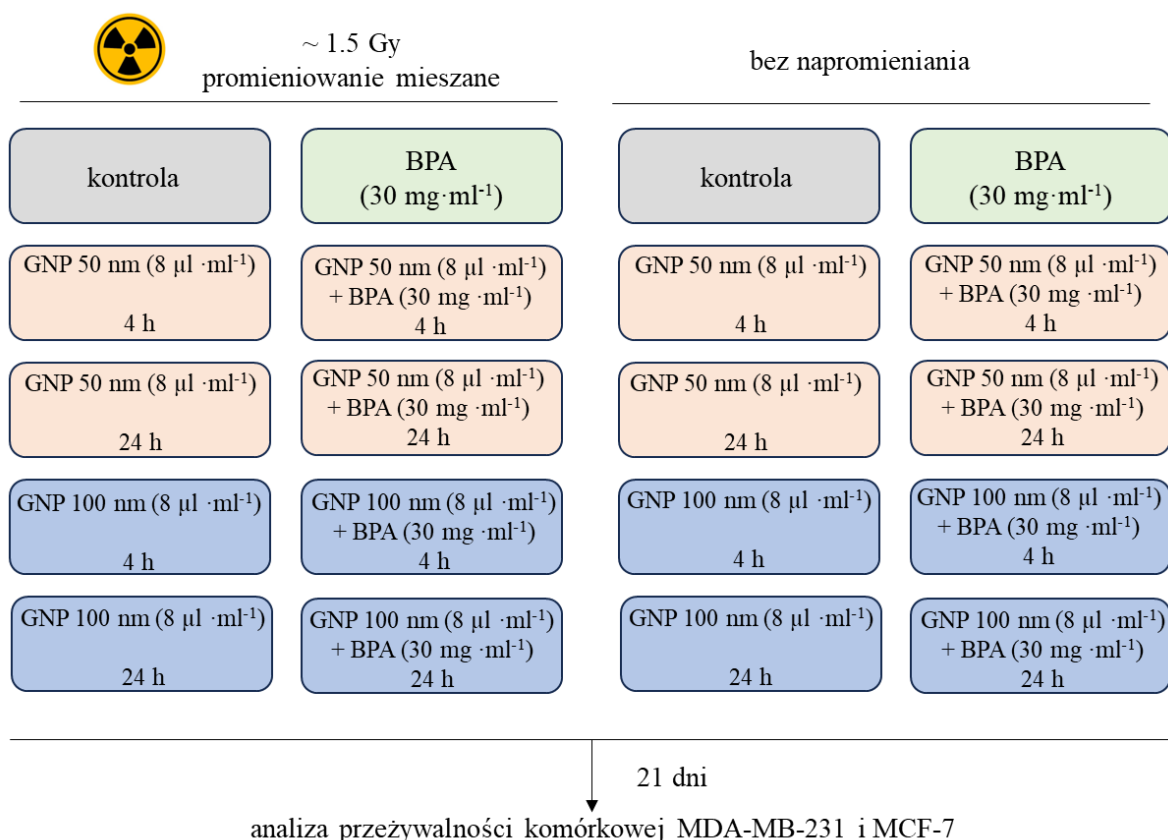
$$PE = \frac{\text{liczba powstałych kolonii}}{\text{liczba wysianych komórek}}$$

Natomiast, przeżywalność komórkową określa wzór:

$$SF = \frac{\text{wydajność klonowania komórek napromienionych}}{\text{wydajność klonowania komórek kontrolnych}}$$

gdzie SF oznacza przeżywalność komórkową (ang. *surviving fraction*). Komórki kontrolne są komórkami, które nie zostały poddane działaniu promieniowania.

Po ekspozycji na promieniowanie mieszane, komórki przygotowano według schematu przedstawionego na Rycinie 10. Komórki wysiewano do płytek 6-dółkowych, zawierających 3 ml pożywki w liczbach: 100 komórek w dołkach w panelu kontrolnym (próby nienapromienione) oraz 400 komórek w dołkach w panelu traktowanym promieniowaniem mieszanym (próby napromienione). Komórki inkubowano 21 dni. Następnie, kolonie barwiono 5%-owym roztworem Giemsy (nr kat. 121601164, Chempur). Kolonie zliczano manualnie po wybarwieniu. Przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty dla każdej z linii komórkowych.



Rycina 10. Schemat eksperymentu przeżywalności komórkowej (test klonogeny) w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

3.9. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na indukcję uszkodzeń chromosomów w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu mikrojądrowego

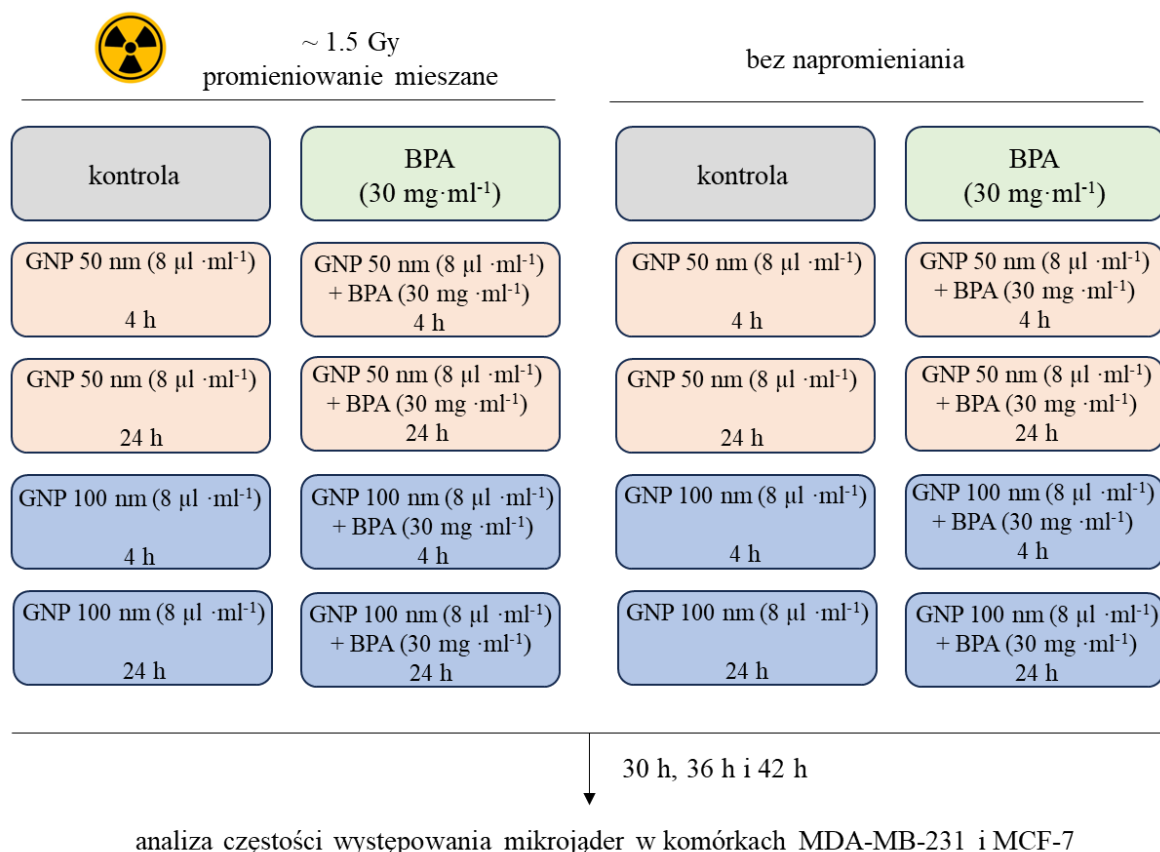
Test mikrojądrowy jest to test cytogenetyczny, który umożliwia zbadanie wpływu różnych czynników genotoksycznych, takich jak substancje chemiczne czy promieniowanie jonizujące, na DNA komórkowe. Mikrojądra to struktury pozajądrowe zawierające fragmenty chromatyny, które powstają na skutek pęknięć DNA (uszkodzenia klastogenne). Natomiast, mikrojądra powstające na skutek nondysjunkcji chromosomów (uszkodzenia aneugenne) zawierają całe chromosomy. Powstają one na skutek niestabilności genomu lub uszkodzenia materiału genetycznego. Mikrojądra mogą również powstać na skutek naturalnych procesów zachodzących w komórce jak starzenie się czy też metabolizm.

W badaniach odnoszących się do uszkodzeń spowodowanych promieniowaniem jonizującym wykorzystuje się test mikrojądrowy, w którym blokuje się cytokinę komórki. W celu zahamowania cytokinezy, stosuje się cytochalazynę B, która hamuje polimeryzację włókien aktynowych i tworzenie kurczliwych mikrofilamentów biorących udział w procesie mitozy, ale nie hamuje kariokinezy. W związku z tym powstają komórki dwujądrowe, w których analizuje się mikrojądra powstałe w wyniku uszkodzenia materiału genetycznego. Test ten ma szerokie zastosowanie w badaniach cytogenetycznych i biodozymetrycznych. Można uzyskać z niego informacje odnośnie:

- poziomu uszkodzeń DNA i ich naprawy;
- osobniczej promieniowrażliwości;
- reakcji tkanek na promieniowanie u pacjentów leczonych radioterapią;
- przewidywania choroby nowotworowej;
- charakterystyki uszkodzeń cytogenetycznych powstałych po chemio- i radioterapii (96).

Po ekspozycji na promieniowanie mieszane, komórki wysiewano na szalki, przewożono w inkubatorze do Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach i dodawano cytochalazynę B (stężenie końcowe: $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich, Niemcy). Następnie, komórki inkubowano i zbierano w trzech punktach czasowych od napromienienia: 30h, 36h i 42h. Komórki traktowano najpierw roztworem hipotonicznym KCl (0,14 M), a następnie utrwalano w utrwalaczach: jednokrotnie w I utrwalaczu (0,9% NaCl, metanol i kwas octowy – stosunek objętościowy: 13:12:3) oraz trzykrotnie w II utrwalaczu (metanol i kwas octowy – stosunek

objętościowy: 4:1). Utrwalone komórki nakraplano na szkiełka mikroskopowe. Po wyschnięciu, preparaty barwiono 10%-owym roztworem barwnika Giemsy (nr kat. 121601164, Chempur) oraz kodowano. Mikrojądra analizowano w binukleatach (komórki dwujądrowe) za pomocą mikroskopu świetlnego przy powiększeniu 40x. Zanalizowano 1000 binukleatów na jedną próbę. Wykonano trzy niezależne powtórzenia z każdą badaną linią komórkową.



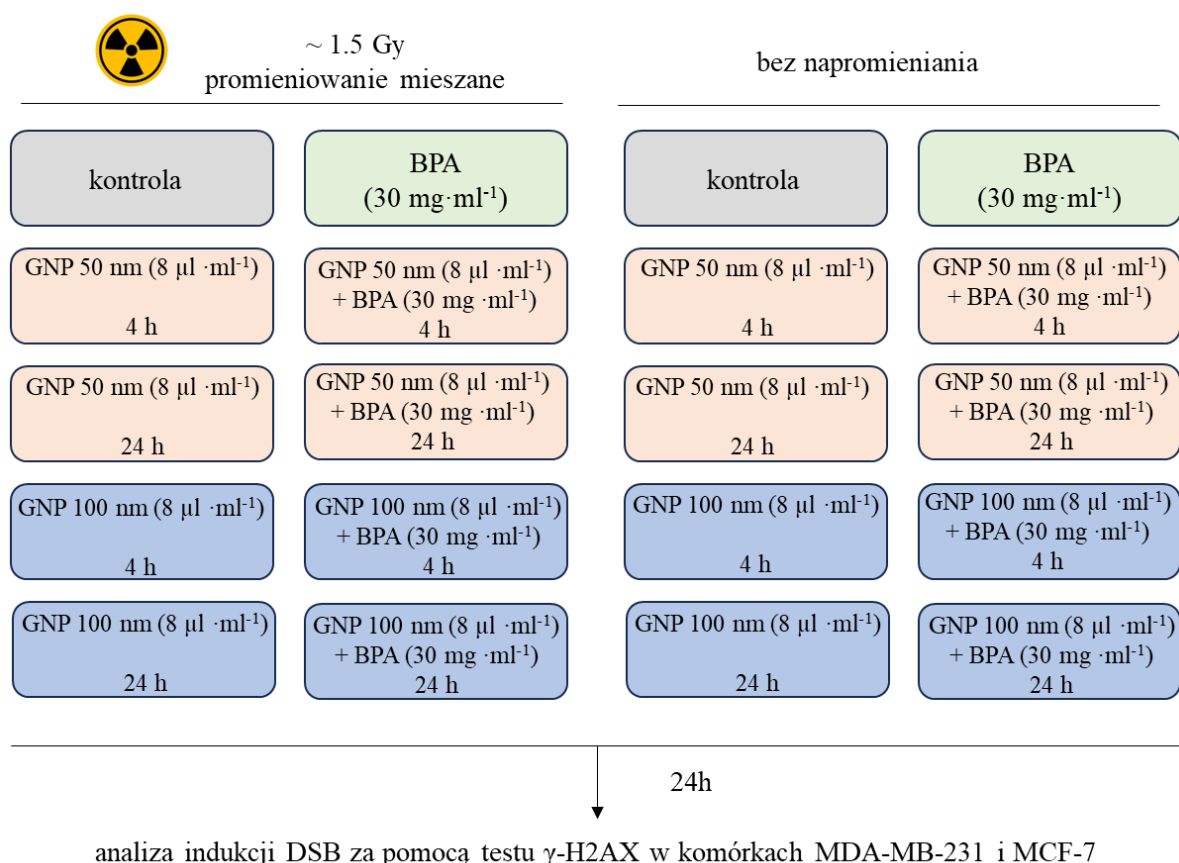
Rycina 11. Schemat eksperymentu kinetyki powstawania mikrojąder w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

3.10. Analiza wpływu nanocząstek złota oraz BPA w terapii borowo-neutronowej na indukcję podwójnoniciowych pęknięć DNA w komórkach MDA-MB-231 za pomocą testu γ -H2AX

Test ognisk naprawczych γ -H2AX jest testem umożliwiającym zlokalizowanie podwójnoniciowych uszkodzeń DNA (DSB – ang. *double strand breaks*). Z tego powodu, znakowanie obecności DSB przeciwciałem fluorescencyjnym pomaga w określeniu częstości wystąpienia uszkodzeń DNA oraz możliwości naprawy materiału genetycznego. Test γ -H2AX umożliwia prowadzenie badań między innymi nad osobniczą promieniowrażliwością pacjentów poddawanych leczeniu radioterapią.

Test ten można wykonać różnymi metodami, jednakże w każdej z nich używa się przeciwciała fluorescencyjnego skierowanego przeciwko ufosforylowanej serynie-139. Pierwszą metodą jest wykonanie testu na szkiełkach, gdzie następnie ogląda się komórki z wyznakowanym histonem γ -H2AX pod mikroskopem fluorescencyjnym licząc częstość występowania ognisk naprawczych, czyli miejsc podwójnoniciowego pęknięcia DNA. Jest to pomiar jakościowy. Drugą metodą jest mierzenie poziomu fluorescencji w danej ilości komórek za pomocą cytometrii przepływowej (LSR II, Becton Dickinson, USA), która jest pomiarem ilościowym. W przedstawionych badaniach wykorzystano metodę mierzenia poziomu fluorescencji za pomocą cytometrii przepływowej.

Po napromienieniu komórki wysiewano na szalki i przewożono do Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Po 24h od napromienienia, komórki utrwalano przy użyciu zestawu BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeablization Kit (nr kat. 554714; Becton Dickinson, USA). Następnie, dodawano przeciwciało mysie Alexa Fluor 647 anti-H2AX (nr kat. 560447; BD Pharmingen) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, zawiesinę komórek przenoszono do probówek cytometrycznych i mierzono poziom fluorescencji za pomocą cytometru przepływowego (Becton Dickinson, USA). Dane uzyskano przy użyciu programu BD FACSDiVa (v 6.0, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Poziom fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX zbierano dla populacji 20 000 komórek. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

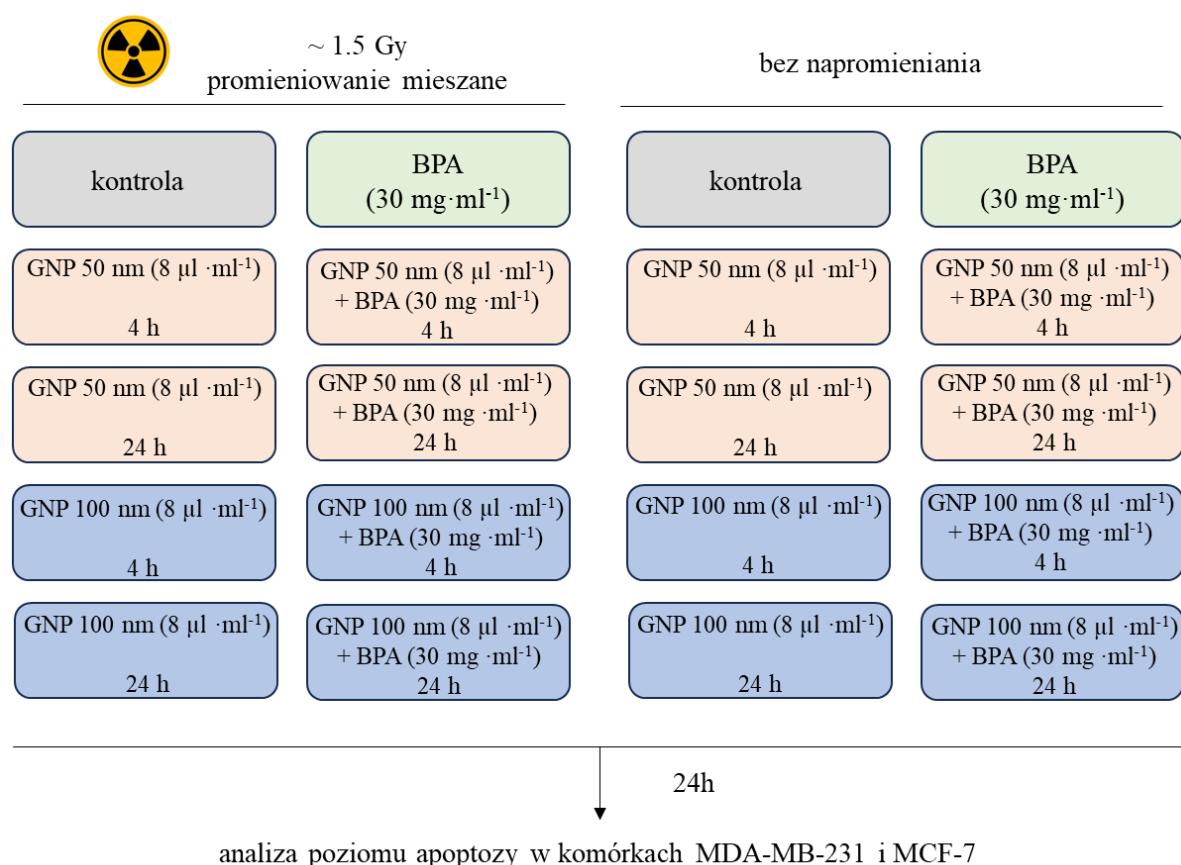


Rycina 12. Schemat eksperymentu ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

3.11. Analiza wpływu nanocząstek złota oraz BPA w przypadku terapii borowo-neutronowej na indukcję apoptozy w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą testu z aneksyną V i jodkiem propidyny

Apoptoza to programowana śmierć komórki w trakcie, której budowa morfologiczna ulega daleko idącym zmianom. Wyróżnia się 4 populacje komórek: komórki żywe (annexin-/IP-), komórki we wczesnej apoptozie (annexin+/IP-), komórki w późnej apoptozie (annexin+/IP+) oraz komórki nekrotyczne (annexin-/IP+). Wyodrębnienie tych subpopulacji jest możliwe dzięki dodaniu aneksyny V (A) i jodku propidyny (PI), które wybarwiają odpowiednio komórki oraz materiał genetyczny. Aneksyna V to białko, które wiąże się z fosfatydyloseryną znajdującą się po zewnętrznej stronie błony komórkowej w komórkach apoptotycznych. Jodek propidyny jest powszechnie używanym środkiem interkalującym, który stosuje się do barwienia komórek, jak i kwasów nukleinowych wnikać do wnętrza komórek martwych.

Napromienione komórki wysiewano na szalki i przewożono do Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, gdzie wykonywano pomiary poziomu apoptozy za pomocą cytometru przepływowego (LSR II, Becton Dickinson, USA). Po 24h od napromienienia komórki utrwalono za pomocą zestawu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (nr kat. 559763; BD Pharmingen). Dwukrotnie płukano komórki w PBS-ie, wirowano ($900 \text{ obrótów} \cdot \text{min}^{-1}$ przez 10 min) i dodawano 100 μl Binding Buffer. Otrzymaną zawiesinę przenoszono do probówek cytometrycznych, a następnie, dodawano po 5 μl barwników jodku propidyny oraz aneksyny V i inkubowano komórki 30 minut w ciemności. Po upływie tego czasu zawiesinę komórek analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Dane uzyskano przy użyciu programu BD FACSDiVa (v 6.0, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Dane poziomu apoptozy zbierano dla 20 000 komórek. Otrzymano wyniki dotyczące procentowego poziomu komórek żywych, komórek we wczesnej apoptozie, komórek późnoapoptotycznych i komórek nekrotycznych w mierzonej populacji. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.



Rycina 13. Schemat eksperymentu mierzącego poziom apoptozy w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

3.12. Analiza statystyczna

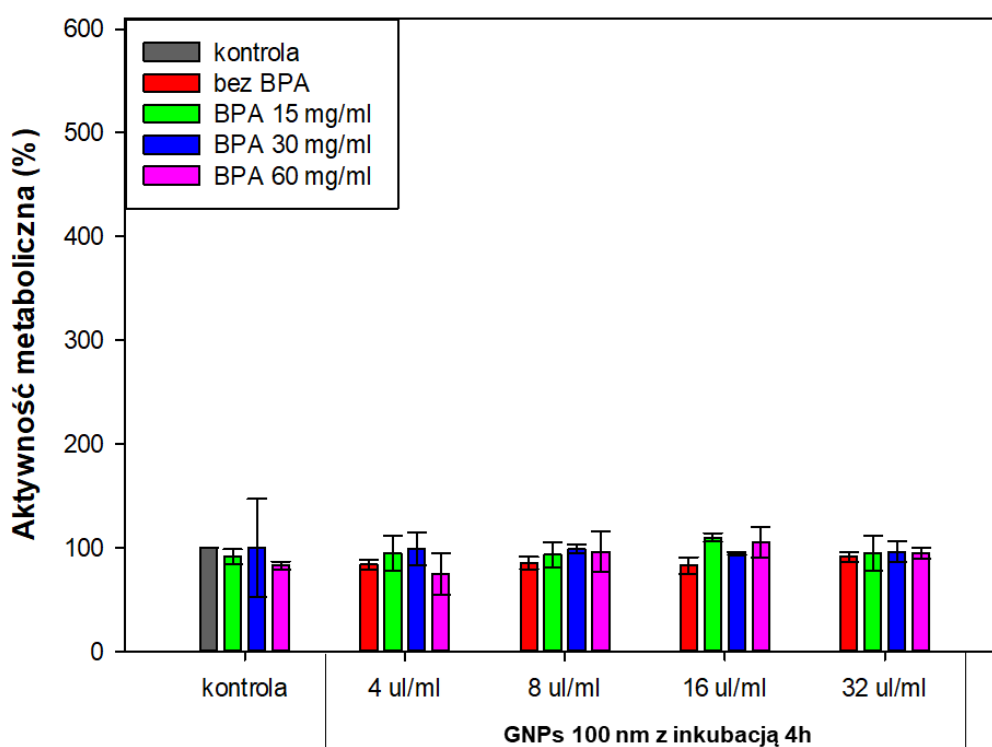
Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z 3 niezależnych eksperymentów z odchyleniami standardowymi (SD). Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.3 i Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc.). Do analizy wielu różnych prób eksperymentalnych wykorzystano test ANOVA, czyli test analizy wariancji wieloczynnikowej. W przypadku przedstawionych poniżej wyników badań wykorzystano odmianę jednoczynnikową i odmianę dwuczynnikową z analizą post-hoc Tukey'a. Głównym celem tych testów jest zmierzenie wpływu zmiennych niezależnych (czynniki) na poziom zmiennej zależnej (zmiennej mierzonej). Analiza wariancji to stosunek wariancji, którą obliczono pomiędzy poszczególnymi grupami, a średnią wariancją, którą zaobserwowano wewnątrz grup badanych. Poziom istotności dla testu ANOVA ustalono na poziomie 0,05.

4. Wyniki

4.1. Analiza wpływu nanocząstek złota i *p*-borofenyloalaniny na aktywność metaboliczną komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7

4.1.1. Analiza wyników testu MTT na linii komórkowej MDA-MB-231

Wyniki uzyskane z testu MTT odnośnie aktywności metabolicznej komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 przedstawiono na Rycinach 14 - 17. Test MTT wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Badano wpływ różnych stężeń GNPs oraz BPA poprzez pomiary absorbancji dotyczących aktywności metabolicznej żywych komórek

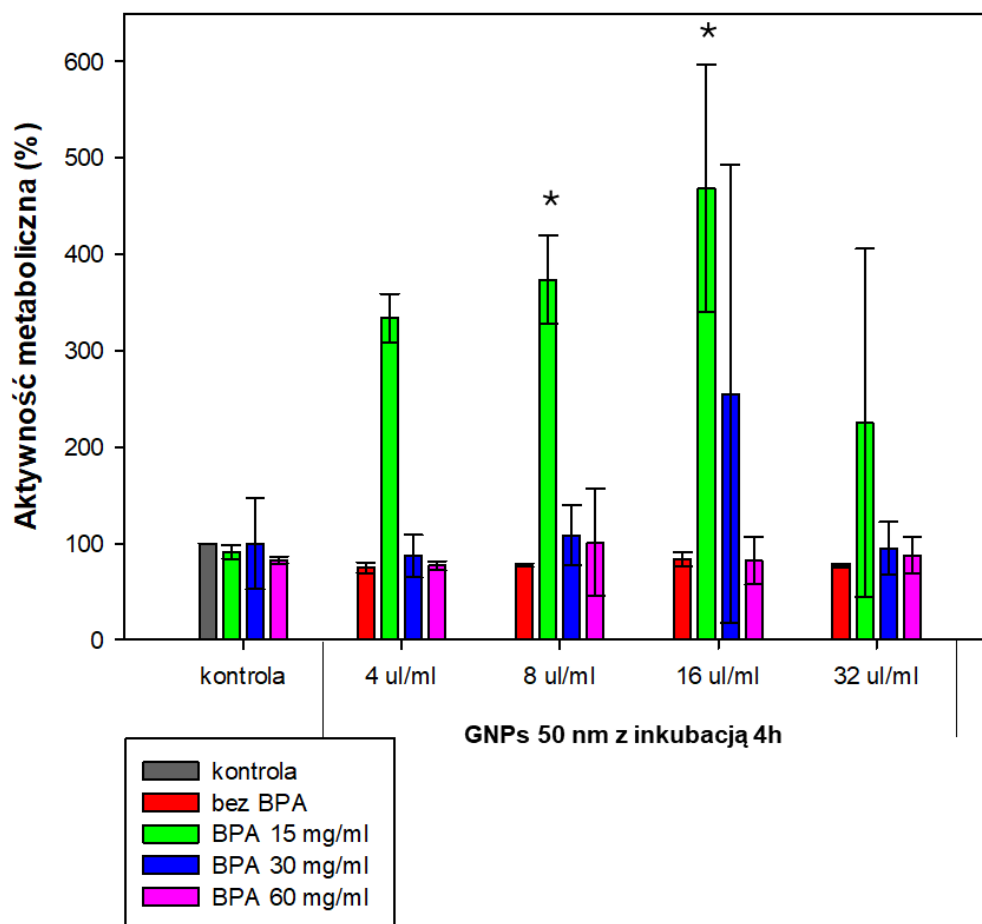


Rycina 14. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 4-godziną oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*: $p^3 < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej) – brak prób istotnych statystycznie

³ p – wartość p – jest to wartość w analizie statystycznej, która wskazuje nam istotność statystyczną wyników. Wskazuje na prawdopodobieństwo uzyskania wyniku takiego samego jak otrzymany lub o skrajnej wartości.



Rycina 15. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 4-godziną oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej)

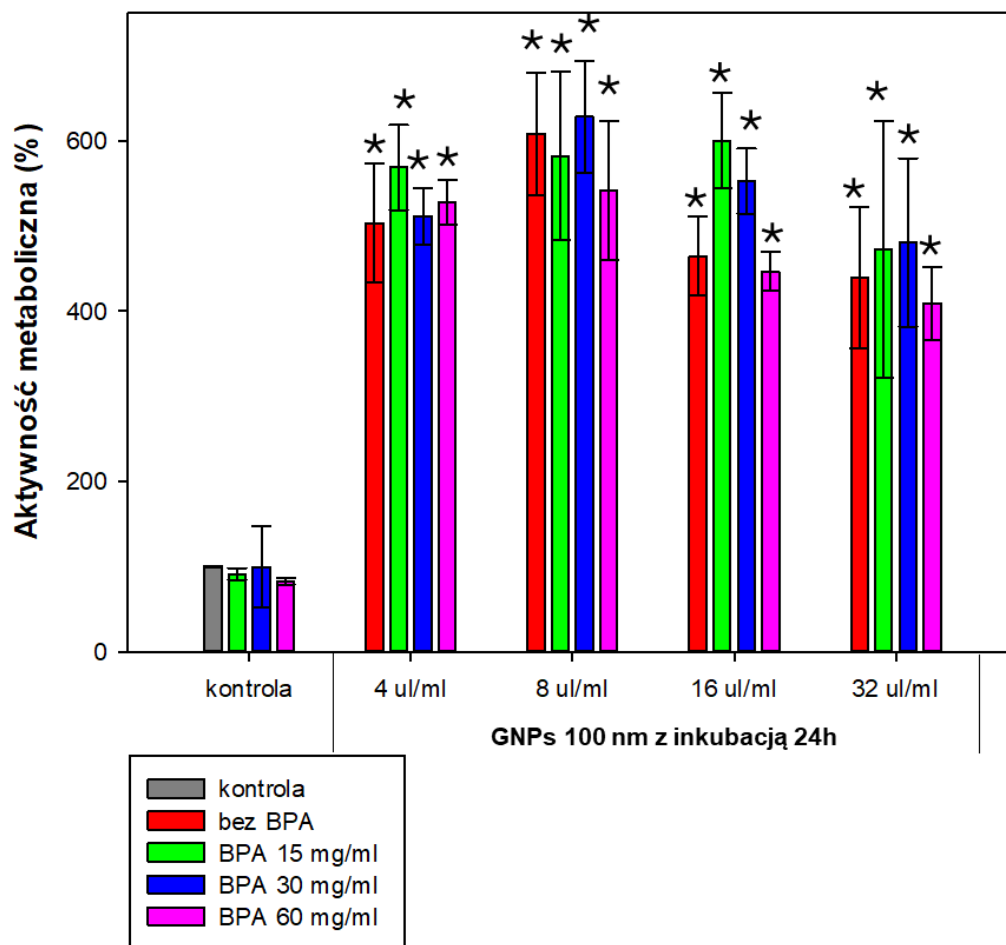
Test MTT dla linii komórkowej MDA-MB-231 wykonano w celu dobrania odpowiednich stężeń GNPs w dwóch czasach inkubacji – 4h i 24h oraz BPA. Wyniki na Rycinach 14 – 15 przedstawiono dla komórek MDA-MB-231 traktowanych GNPs z inkubacją 4-godziną. Test wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Aktywność metaboliczna komórek została przedstawiona w wartościach procentowych w odniesieniu do kontroli (100%). Wyniki aktywności metabolicznej w przypadku zastosowania nanocząstek złota o wielkości 100 nm przy inkubacji 4-godzinnej znajdowały się na podobnym poziomie bez względu na stężenie GNPs. Żaden z badanych czynników nie wpłynął w istotny statystycznie sposób na aktywność metaboliczną komórek. W eksperymentach z dodanymi GNPs 50 nm

z inkubacją 4-godzinną zauważono różnice w aktywności metabolicznej w poszczególnych badaniach, co zostało potwierdzone testami statystycznymi. Z analizy statystycznej testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wynika, że istotne statystycznie ($p < 0,05$) są wyniki z prób eksperymentalnych z dodanym BPA o stężeniu $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ i GNPs 50 nm o stężeniu $8 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $373,69\% \pm 45,81\%$; $p = 0,0249$) oraz z BPA o stężeniu $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ GNPs 50 nm o stężeniu $16 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $468,75\% \pm 127,94\%$; $p = 0,00285$), które porównywano względem kontroli (bez BPA i bez GNPs). Analizując aktywność metaboliczną w porównaniu do eksperymentów z samym BPA, istotne statystycznie wyniki są z prób badawczych z GNPs 50 nm z inkubacją 4h o stężeniu $8 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ i o stężeniu $16 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ z dodanym BPA o stężeniu $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} dla poszczególnych prób eksperymentalnych są przedstawione w tabeli poniżej:

Tabela 4. Wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} dla poszczególnych prób eksperymentalnych komórek MDA-MB-231 przy inkubacji 4h z GNPs.

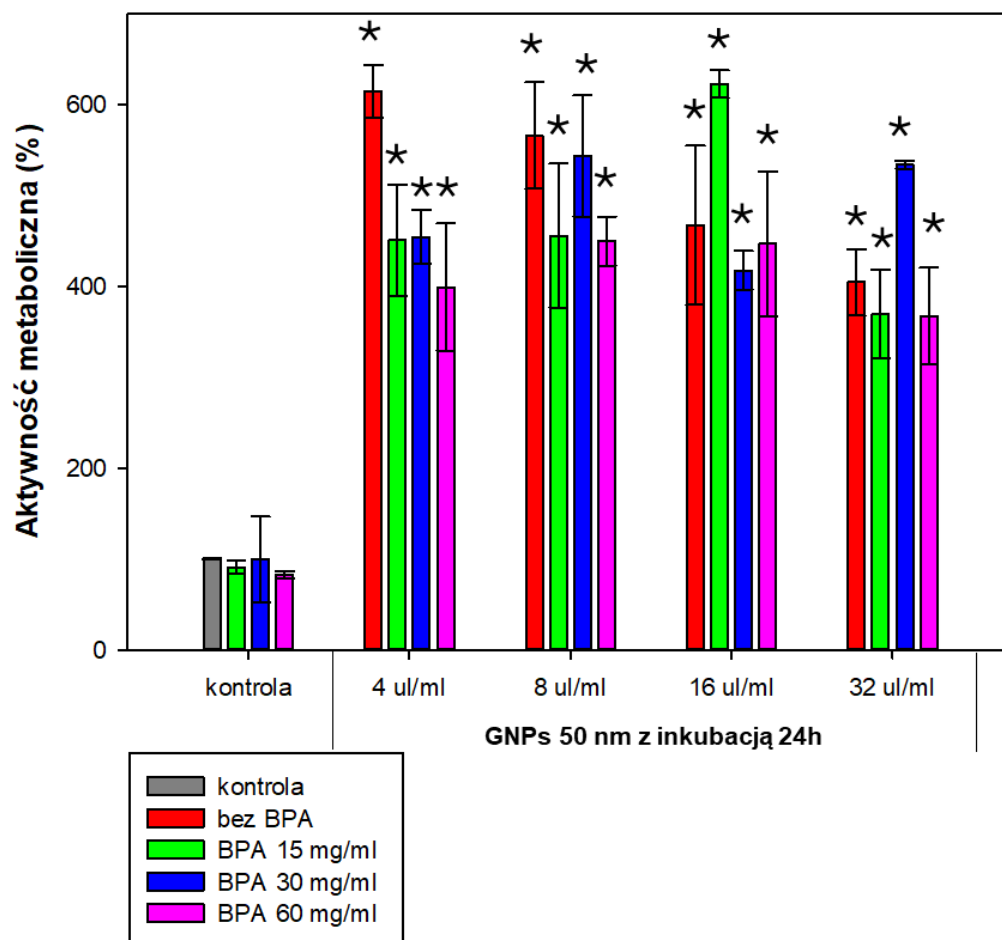
KOMÓRKI MDA-MB-231		
Próba eksperymentalna (inkubacja 4h)	IC_{50}	EC_{50}
GNPs 100 nm	--	$\sim 32 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$
GNPs 50 nm	--	$\sim 8 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$
BPA	$\sim 204 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	--
GNPs 100 nm (z BPA $30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$\sim 452 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$	--
GNPs 50 nm (z BPA $30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$\sim 1490 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$	--



Rycina 16. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 24-godziną oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*:p<0,05 (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej)



Rycina 17. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 24-godziną oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej)

Wyniki na Rycinach 16 - 17 przedstawiono dla komórek MDA-MB-231 traktowanych GNPs z inkubacją 24-godziną. Aktywność metaboliczna komórek MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami BPA w połączeniu z nanocząstkami złota zarówno o rozmiarze 50 nm, jak i 100 nm wzrosła wielokrotnie względem kontroli. Analiza statystyczna za pomocą testu ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że wyniki ze wszystkich prób eksperymentalnych z GNPs 50 nm i 100 nm w połączeniu z BPA były istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem kontroli. W przypadku inkubacji 24-godzinnej z GNPs 50 nm i 100 nm zauważono, że każde stężenie BPA, jak i nanocząstek złota byłoby odpowiednie do badań.

Najniższą wartość p, czyli najwyższą istotność statystyczną uzyskano po zastosowaniu samych GNPs 50 nm o stężeniu $4 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $614,66\% \pm 28,89\%$; $p=0,000197$) i z GNPs 100 nm o stężeniu $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $608,28\% \pm 71,66\%$; $p=0,000198$) oraz z GNPs 100 nm o stężeniu $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ wraz z BPA o stężeniu $30 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $627,97\% \pm 65,93\%$; $p=0,000209$) i z GNPs 100 nm o stężeniu $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ wraz z BPA o stężeniu $60 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $540,98\% \pm 81,58\%$; $p=0,000209$).

Poniżej w tabeli przedstawiono wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} .

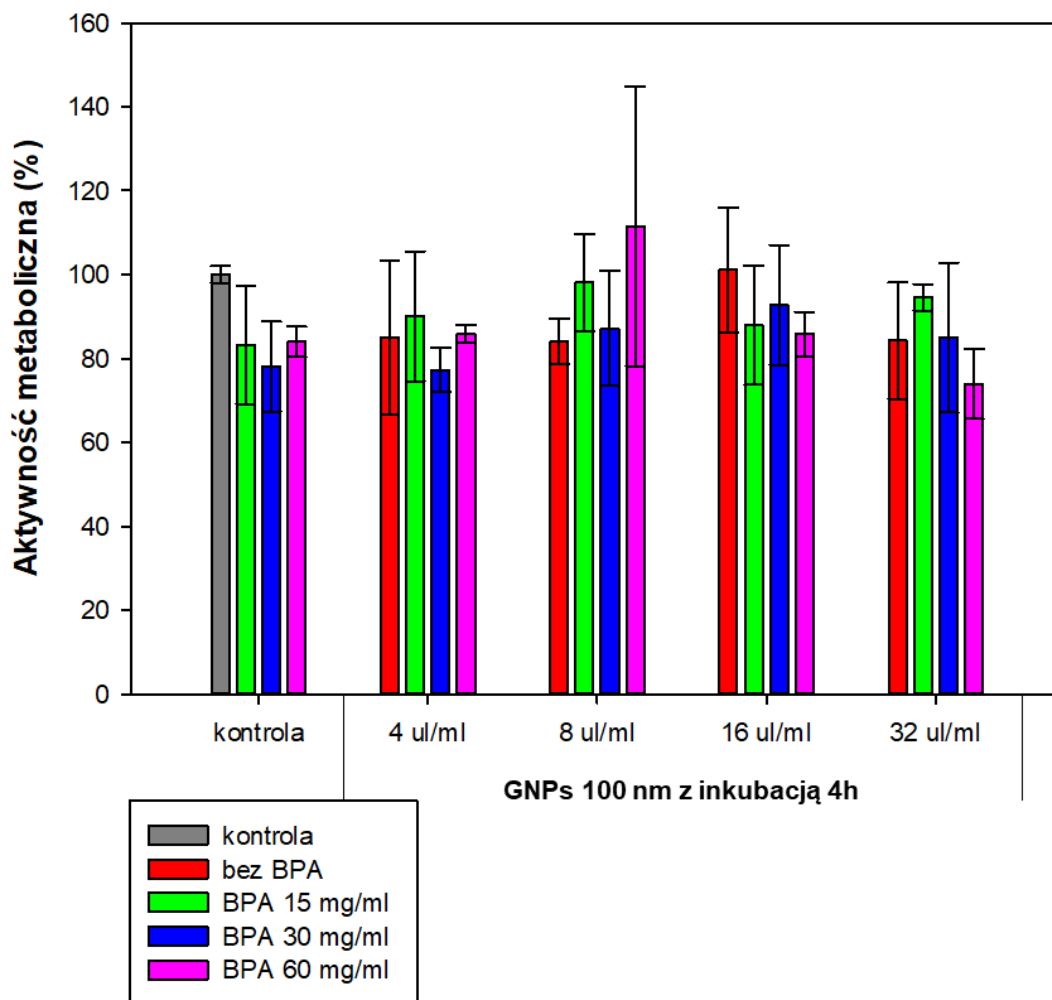
Tabela 5. Wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} dla poszczególnych prób eksperymentalnych komórek MDA-MB-231 przy inkubacji 24h z GNPs.

KOMÓRKI MDA-MB-231		
Próba eksperymentalna (inkubacja 24h)	IC_{50}	EC_{50}
GNPs 100 nm	$\sim 127 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$	--
GNPs 50 nm	--	$\sim 31 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$
BPA	$\sim 626 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	--
GNPs 100 nm (z BPA $30 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$\sim 189 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$	--
GNPs 50 nm (z BPA $30 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$\sim 78 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$	--

Wyniki z testu MTT przeanalizowano za pomocą testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Dodatkowo przeprowadzono szczegółową analizę post-hoc Tukey'a. Wyniki analizy zamieszczono w *Suplemencie*. Test MTT wykonano w celu dobrania odpowiednich stężeń GNPs i BPA dla komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231. W przypadku inkubacji 4h z nanocząstkami, zauważono brak istotności statystycznej wyników prób badawczych z GNPs 100 nm. Przy inkubacji 4-godzinnej istotność statystyczną wykazano natomiast po zastosowaniu GNPs 50 nm o o stężeniu $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ i o stężeniu $16 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ z dodanym BPA o stężeniu $15 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Analiza sugeruje, że w przypadku GNPs inkubowanych 24h, wyniki każdej z prób badawczych z nanocząstkami złota wraz z BPA były istotne statystycznie. Wyniki z eksperymentów traktowanych samym BPA o różnym stężeniu w porównaniu do kontroli nie są istotne statystycznie. Oznacza to, że każde z badanych stężeń jest odpowiednie do zastosowania w eksperymentach oraz dodanie GNPs wzmacnia aktywność metaboliczną komórek MDA-MB-231. Na podstawie otrzymanych wyników oraz danych literaturowych zastosowano stężenia GNPs $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz stężenie BPA $30 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dla linii komórkowej MDA-MB-231.

4.1.2. Analiza wyników testu MTT na linii komórkowej MCF-7

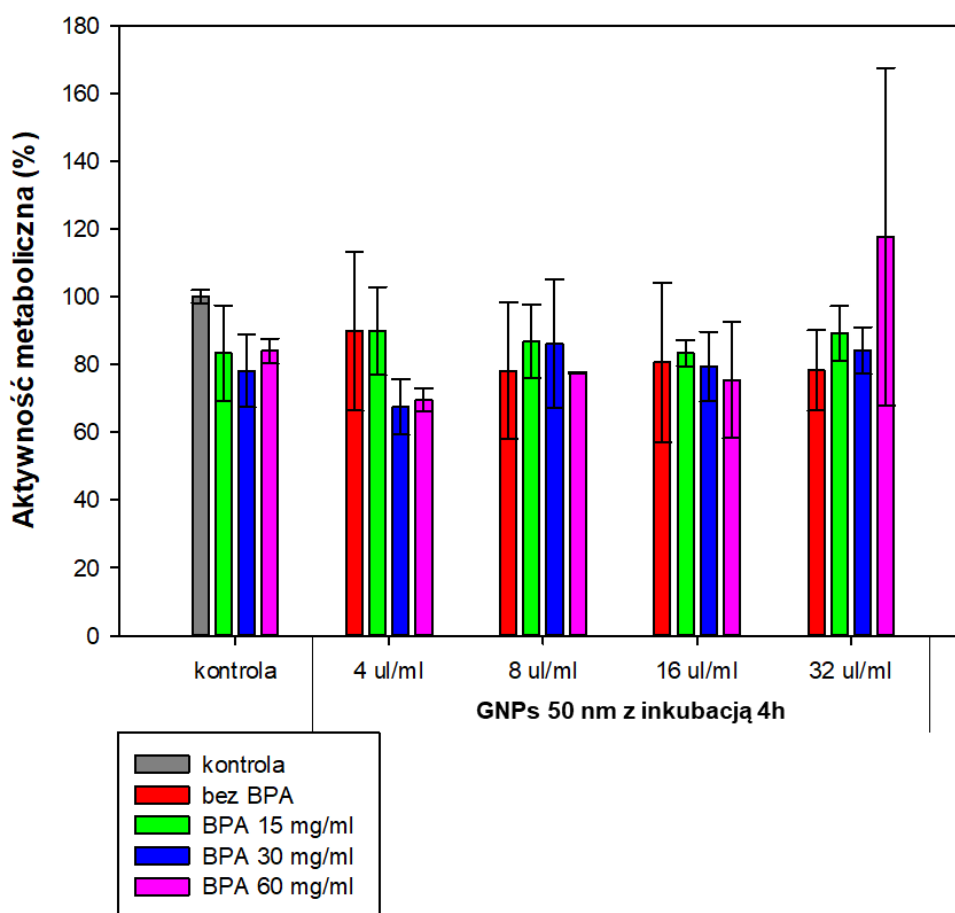
Wyniki uzyskane z testu MTT odnośnie aktywności metabolicznej komórek nowotworowych piersi MCF-7 przedstawiono na Rycinach 18 - 21. Test MTT wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Badano różne stężenia GNPs oraz BPA poprzez pomiary absorbancji dotyczących aktywności metabolicznej żywych komórek.



Rycina 18. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 4-godzinną oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej) – brak prób istotnych statystycznie



Rycina 19. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 4-godziną oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

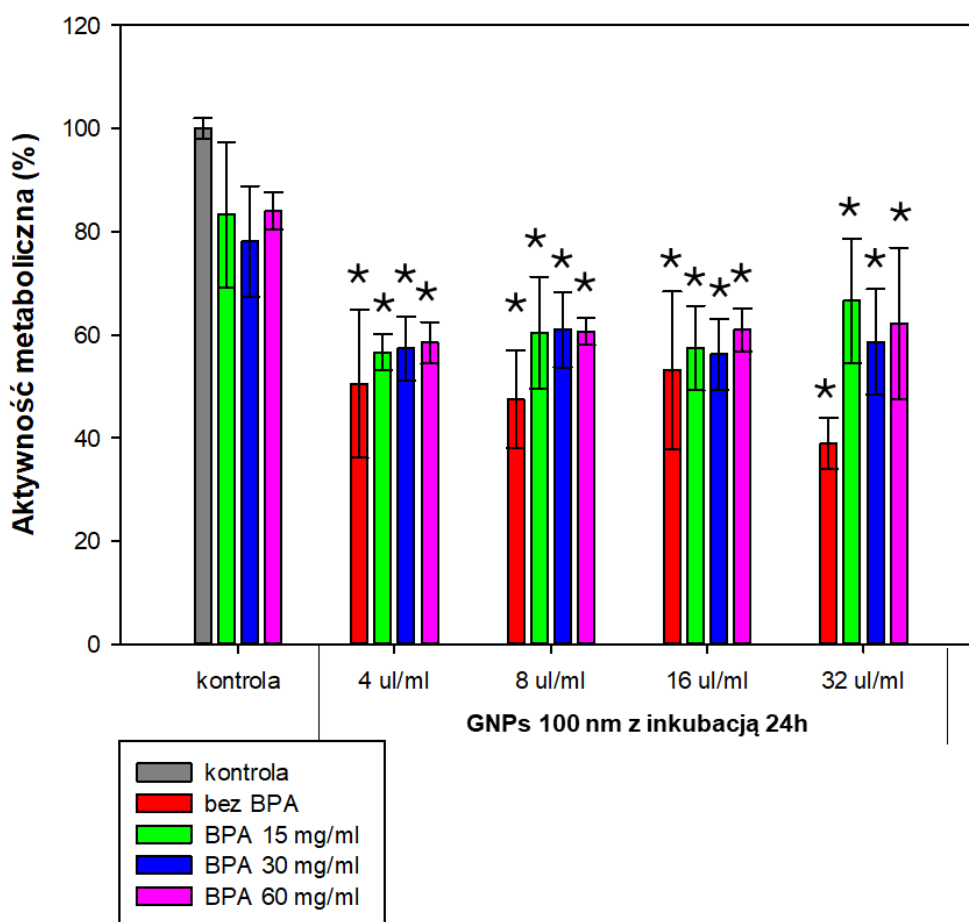
*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej) – brak prób istotnych statystycznie

W celu dobrania odpowiednich stężeń GNPs dla komórek MCF-7, wykonano test MTT z dwoma różnymi czasami inkubacji – 4h i 24h oraz odpowiedniego stężenia BPA. Test wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Na Rycinach 18 – 19 przedstawiono wyniki dla komórek MCF-7 traktowanych GNPs z inkubacją 4-godziną. Aktywność metaboliczna komórek została przedstawiona w wartościach procentowych w odniesieniu do kontroli (100%). Wyniki aktywności metabolicznych w przypadku zastosowania nanocząstek złota o wielkości 100 nm i 50 nm przy inkubacji 4-godzinnej znajdowały się na podobnym poziomie bez względu na stężenie GNPs. Żaden z badanych czynników nie wpłynął w istotny statystycznie sposób na aktywność metaboliczną komórek.

Wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} dla poszczególnych prób eksperymentalnych są przedstawione w tabeli poniżej:

Tabela 6. Wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} dla poszczególnych prób eksperymentalnych komórek MCF-7 przy inkubacji 4h z GNPs.

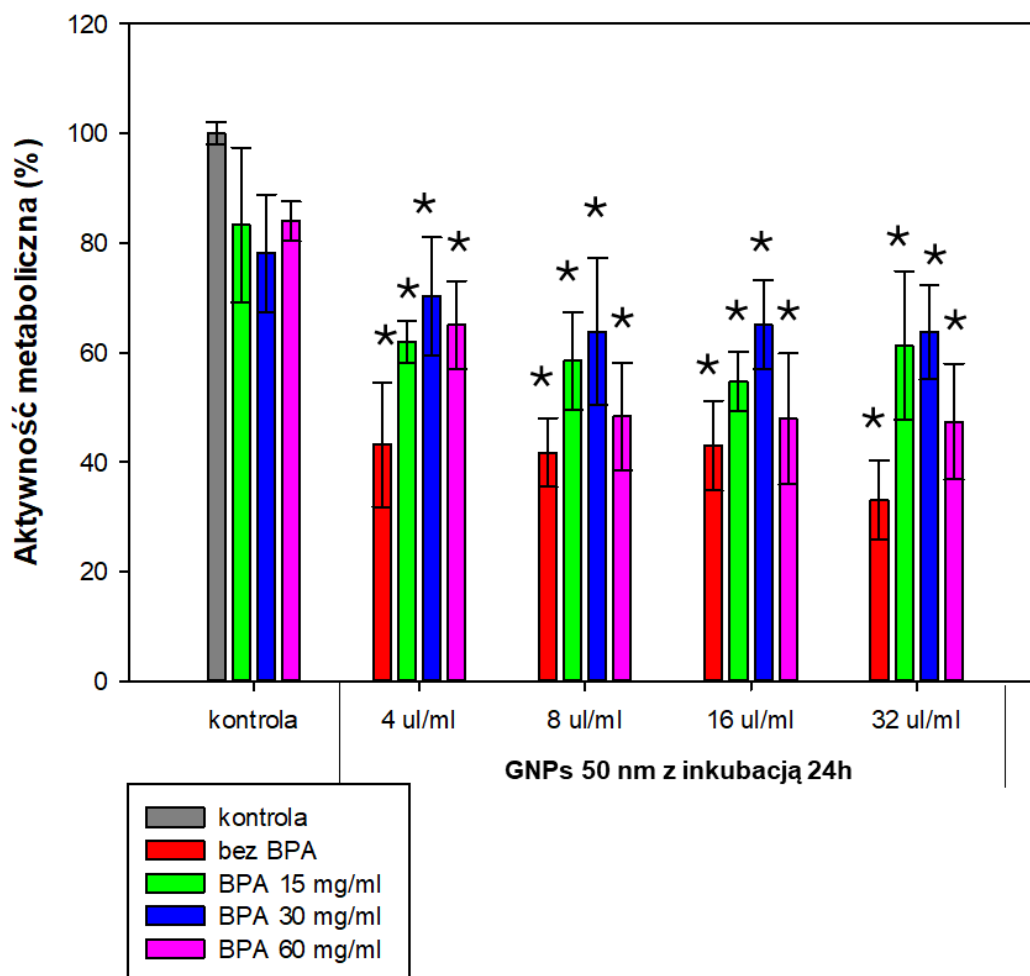
KOMÓRKI MCF-7		
Próba eksperymentalna (inkubacja 4h)	IC_{50}	EC_{50}
GNPs 100 nm	--	$\sim 32 \mu l \cdot ml^{-1}$
GNPs 50 nm	$\sim 133 \mu l \cdot ml^{-1}$	--
BPA	$\sim 190 mg \cdot ml^{-1}$	--
GNPs 100 nm (z BPA $30 mg \cdot ml^{-1}$)	--	$\sim 7 \mu l \cdot ml^{-1}$
GNPs 50 nm (z BPA $30 mg \cdot ml^{-1}$)	--	$\sim 4 \mu l \cdot ml^{-1}$



Rycina 20. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 24-godzinna oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej)



Rycina 21. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 24-godziną oraz różnymi stężeniami BPA. Na rycinie przedstawiono średnie otrzymane z trzech niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej)

Na Rycinach 20 – 21 przedstawiono wyniki dla komórek MCF-7 traktowanych GNPs z inkubacją 24-godziną. Aktywność metaboliczna komórek MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami BPA w połączeniu z nanocząstkami złota zarówno o rozmiarze 50 nm, jak i 100 nm zmalała względem komórek kontrolnych. Oznacza to, że komórki MCF-7 mają obniżoną aktywność metaboliczną po zastosowaniu GNPs z inkubacją 24h i z BPA. Analiza statystyczna za pomocą testu ANOVA i post-hoc Tukey’a wykazała, że wyniki ze wszystkich prób eksperymentalnych z GNPs 50 nm i 100 nm w połączeniu z BPA były istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem kontroli. W przypadku inkubacji 24-godzinnej z GNPs 50 nm i 100 nm zauważono, że każde stężenie BPA, jak i nanocząstek złota byłoby odpowiednie do badań.

Najniższą wartość p, czyli najwyższą istotność statystyczną uzyskano po traktowaniu komórek GNPs 50 nm o stężeniu 8, 16 i 32 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ wraz z BPA o stężeniu 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $\sim 48\% \pm \sim 10\%$; $p \sim 0,000188$), samymi GNPs 100 nm o stężeniu 8 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $47,52\% \pm 9,46\%$; $p=0,000254$) oraz w eksperymentach: z GNPs 100 nm o stężeniu 4 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ wraz z BPA o stężeniu 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $57,34\% \pm 6,18\%$; $p=0,000589$) i z GNPs 100 nm o stężeniu 8 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ wraz z BPA o stężeniu 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (średnia aktywność metaboliczna: $60,67\% \pm 2,66\%$; $p=0,000501$). Wszystkie wyniki z prób eksperymentalnych z dodanymi samymi nanocząstkami złota z inkubacją 24-godziną są istotne statystycznie względem kontroli i powodują spadek aktywności metabolicznej komórek MCF-7. Wyniki eksperymentów z komórkami traktowanymi samym BPA bez względu na stężenie, nie są istotne statystycznie w porównaniu do kontroli. Wartości p przedstawiono w tabelach w *Suplemencie*.

Poniżej w tabeli przedstawiono wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} .

Tabela 7. Wyliczone wartości IC_{50} oraz EC_{50} dla poszczególnych prób eksperymentalnych komórek MCF-7 przy inkubacji 24h z GNPs.

KOMÓRKI MCF-7		
Próba eksperymentalna (inkubacja 24h)	IC_{50}	EC_{50}
GNPs 100 nm	$\sim 8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$	--
GNPs 50 nm	--	$\sim 31 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$
BPA	$\sim 58 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	--
GNPs 100 nm (z BPA 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$\sim 789 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$	--
GNPs 50 nm (z BPA 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$\sim 116 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$	--

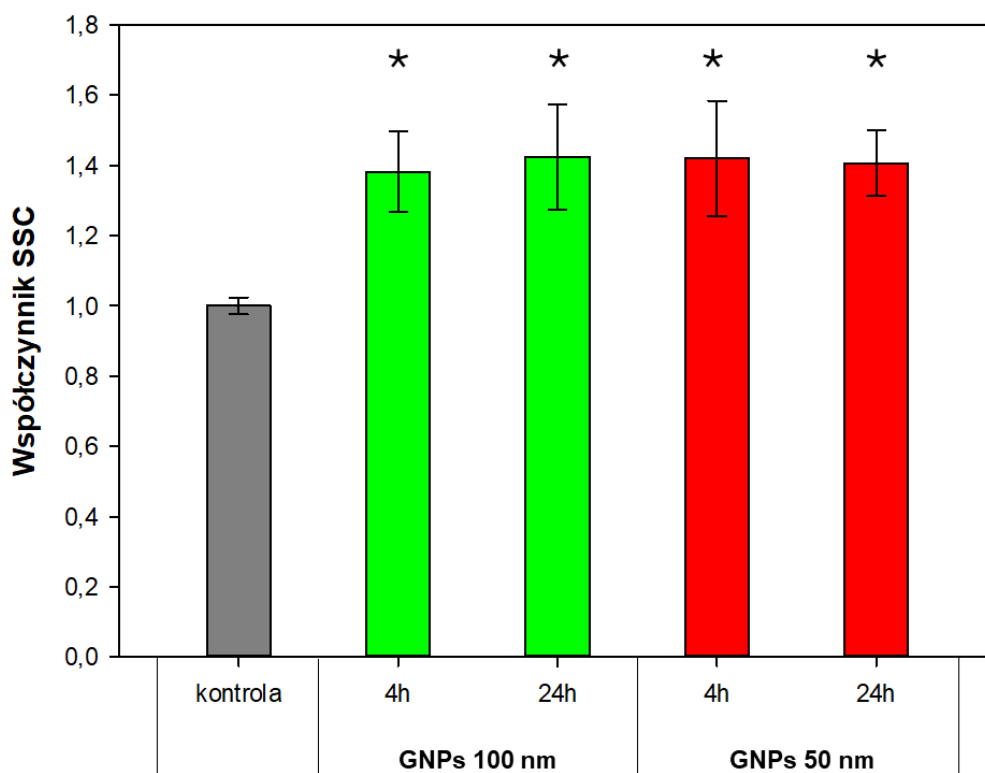
Wyniki z testu MTT z linii komórkowej MCF-7 przedstawione na Rycinach 18 – 21 przeanalizowano za pomocą testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Dodatkowo przeprowadzono analizę post-hoc Tukey’a. Wyniki analizy zamieszczono w *Suplemencie*. Test MTT wykonano w celu dobrania odpowiednich stężeń GNPs i BPA dla komórek nowotworowych piersi MCF-7. Analiza wykazała, że w przypadku GNPs inkubowanych 2h, wyniki z każdej z prób eksperymentalnych z nanocząstkami złota wraz z BPA były istotne statystycznie. Oznacza to, że każde z badanych stężeń jest odpowiednie do zastosowania w eksperymentach. W przypadku GNPs 100 nm i 50 nm z inkubacją 4-godziną, żadne z uzyskanych wyników z badań nie było istotne statystycznie. Na podstawie otrzymanych wyników oraz danych literaturowych wybrano dla komórek MCF-7 takie same stężenia jak dla komórek MDA-MB-231, czyli GNPs 8 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz stężenie BPA 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.2. Analiza wnikania nanocząstek złota do komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7 hodowanych *in vitro*

Wnikanie nanocząstek złota badano w komórkach nowotworowych piersi dwóch linii komórkowych – MDA-MB-231 i MCF-7. Do analizy wnikania GNPs (dawka: $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) zastosowano współczynnik SSC komórek traktowanych i nietraktowanych. Wartości SSC otrzymano za pomocą cytometru przepływowego.

4.2.1. Analiza wnikania nanocząstek złota w trójemnych komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231

Wyniki z analizy wnikania nanocząstek złota w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231 przedstawiono na Rycinie 22.



Rycina 22. Wnikanie nanocząstek złota o rozmiarze 100 nm i 50 nm do komórek MDA-MB-231 w dawce $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ przez 4h i 24h. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości współczynnika SSC $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

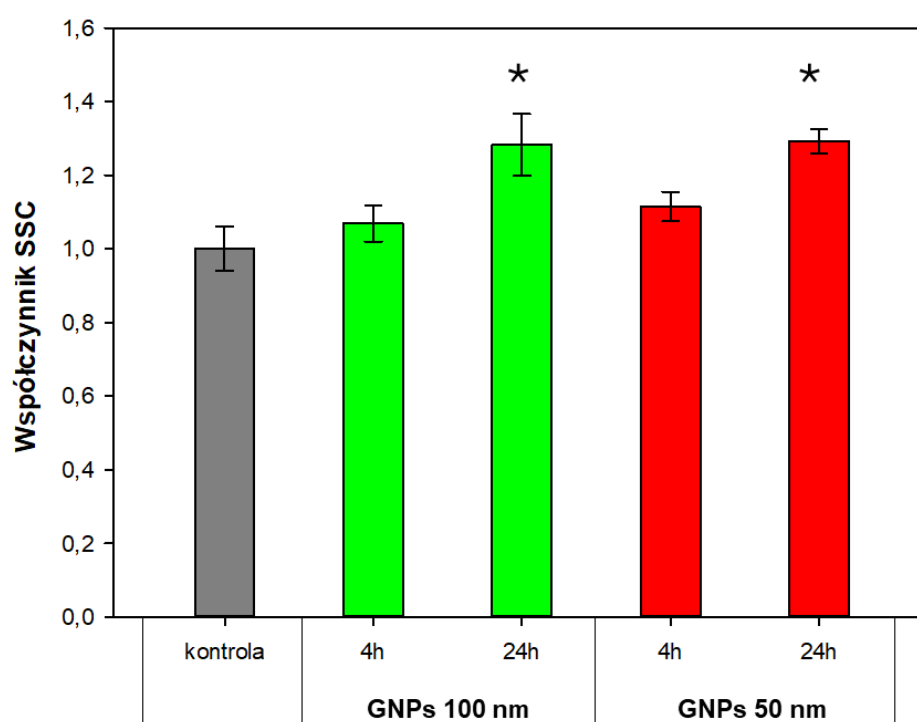
*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej)

Zauważono wzrost współczynnika SSC powyżej wartości kontroli w eksperymentach z dodanymi GNPs zarówno o rozmiarze 50 nm, jak i 100 nm. Otrzymane wyniki wskazują, że

nanocząstki złota wnikają do komórek. Otrzymane wyniki analizowano testem ANOVA jednoczynnikowym oraz testem post-hoc Tukey'a. Według analizy statystycznej, wyniki ze wszystkich prób badawczych z dodanymi GNPs są istotne statystycznie. Wyniki z poszczególnych prób eksperymentalnych były następujące: z GNPs 100 nm z inkubacją 4h (średnia wartość współczynnika SSC: $1,382 \pm 0,115$; $p=0,019$), z GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnia wartość współczynnika SSC: $1,425 \pm 0,150$; $p=0,00993$), z GNPs 50 nm z inkubacją 4h (średnia wartość współczynnika SSC: $1,420 \pm 0,164$; $p=0,0107$) oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia wartość współczynnika SSC: $1,406 \pm 0,0937$; $p=0,0132$).

4.2.2. Analiza wnikania nanocząstek złota w luminalnych komórkach nowotworowych piersi MCF-7

Wyniki z analizy wnikania nanocząstek złota w komórkach nowotworowych piersi MCF-7 przedstawiono Rycinie 23.



Rycina 23. Wnikanie nanocząstek złota o rozmiarze 100 nm i 50 nm do komórek MCF-7 w dawce $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ przez 4h i 24h. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości współczynnika SSC $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*: $p<0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej)

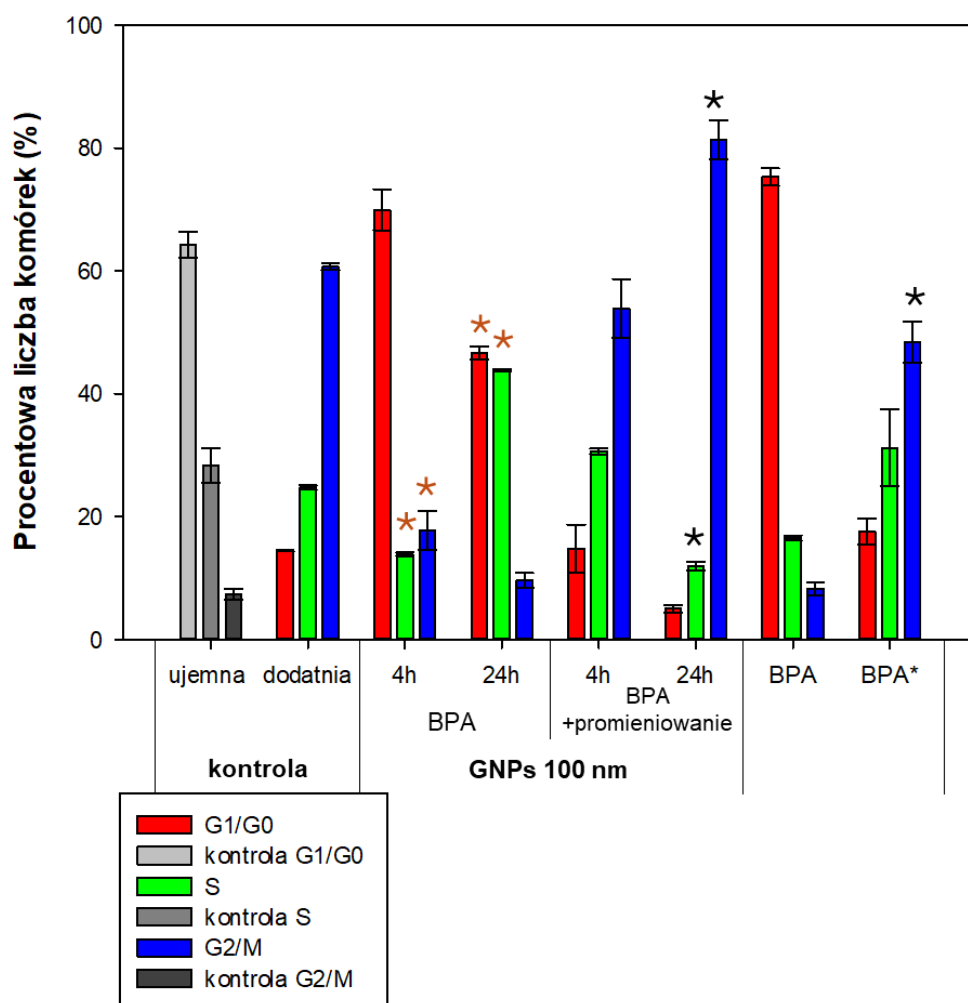
Uzyskane wyniki wskazują na znaczące różnice w wartościach SSC w porównaniu do kontroli. Współczynnik SSC w eksperymentach z dodanymi GNPs zarówno 100 nm, jak i 50 nm sugeruje, że nanocząstki złota wnikają do wnętrza komórek. Analiza statystyczna testem ANOVA jednoczynnikowym oraz testem post-hoc Tukey'a wykazała, że istotnie statystycznie ($p < 0,05$) są wyniki z prób eksperymentalnych z GNPs 50 nm z inkubacją 24-godziną (średnia wartość współczynnika SSC: $1,29 \pm 0,032$; $p = 0,000334$) oraz z GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnia wartość współczynnika SSC: $1,28 \pm 0,084$; $p = 0,000397$).

4.3. Przebieg cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych piersi hodowanych *in vitro* traktowanych nanocząstkami złota i *p*-borofenyloalaniną oraz poddanych działaniu wiązki neutronów

Jednym z zastosowanych testów badawczych była dystrybucja komórek nowotworowych w cyklu komórkowym wykonana za pomocą cytometrii przepływowej na dwóch liniach komórkowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7.

4.3.1. Wyniki rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w linii nowotworowej MDA-MB-231

Wyniki z analizy progresji cyklu komórkowego linii nowotworowej piersi MDA-MB-231 zaprezentowano na Rycinach 24-27.



Rycina 24. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

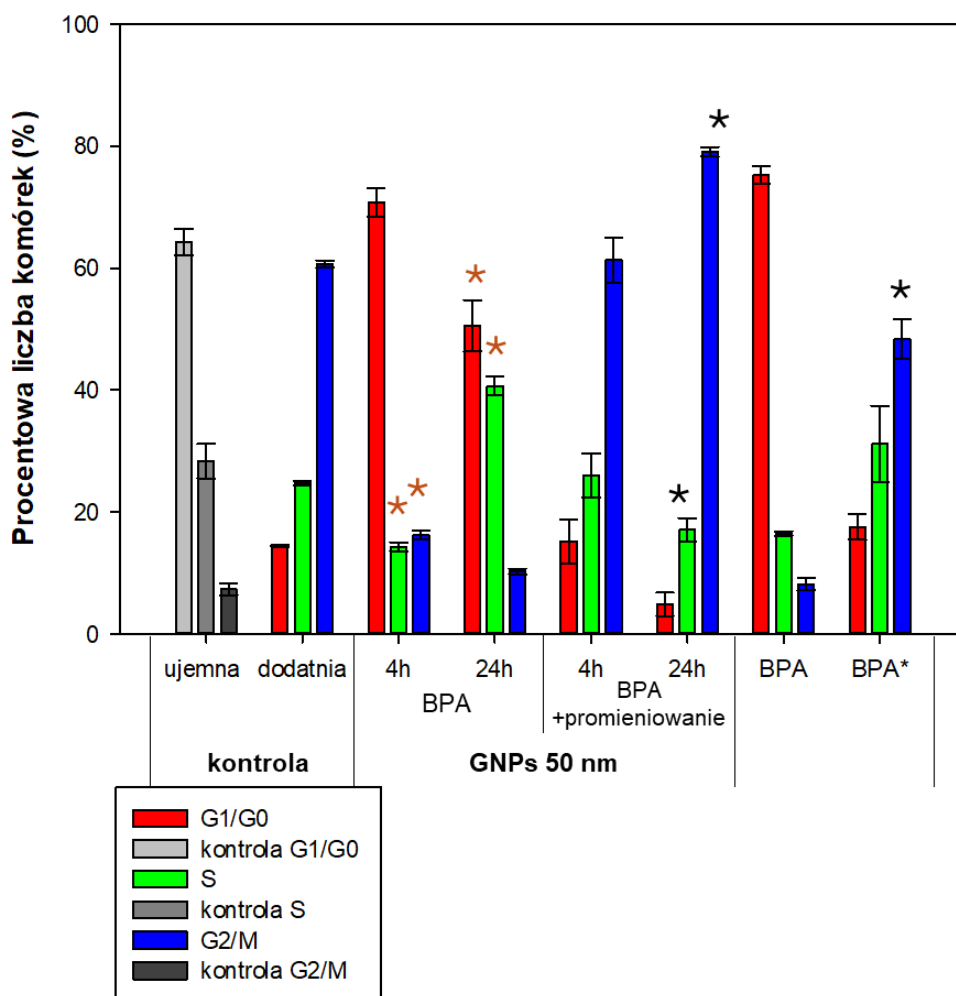
GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*BPA – BPA + promieniowanie

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 25. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

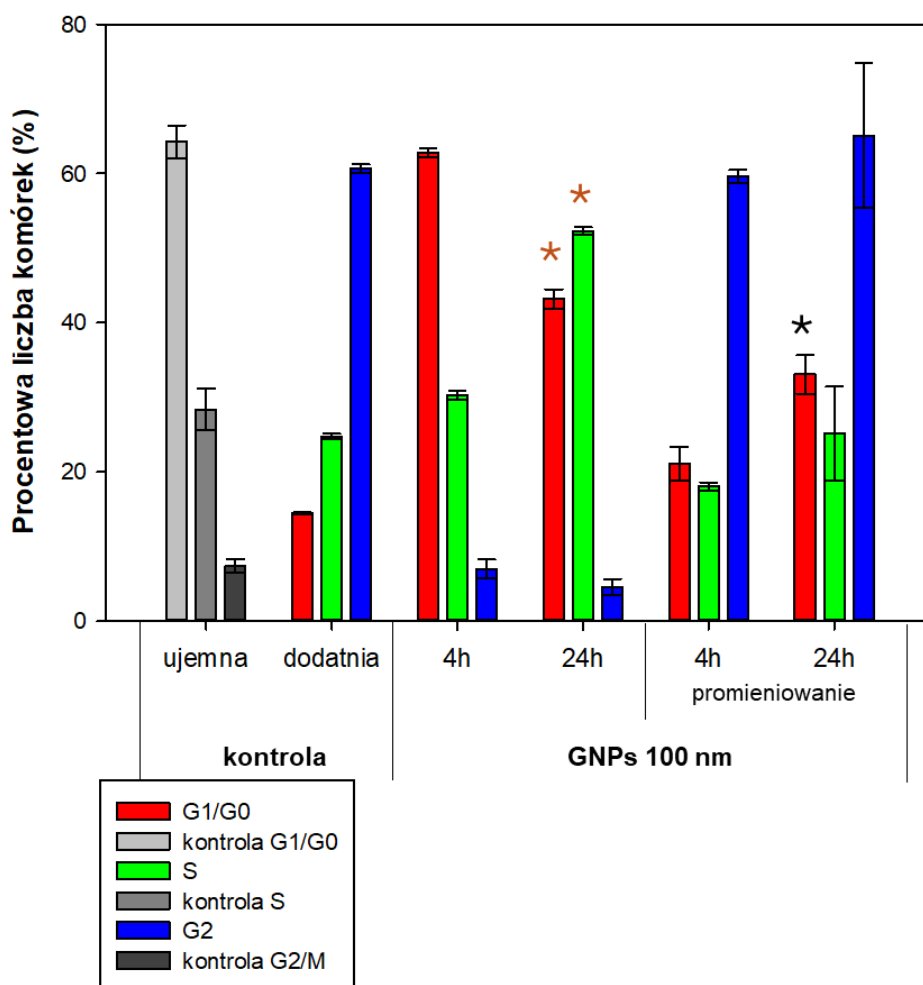
*BPA – BPA + promieniowanie

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej - napromienionej)

Analiza wyników cyklu komórkowego linii komórkowej MDA-MB-231 w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs) wykazała, że we wszystkich napromienionych eksperymentach nastąpił wyraźny blok cyklu komórkowego w fazie G₂ i względem kontroli nienapromienionej wszystkie próby napromienione są istotne statystycznie. W analizie statystycznej eksperymenty nienapromienione były porównywane głównie do kontroli nienapromienionej (ujemnej), natomiast eksperymenty napromienione do kontroli napromienionej (dodatniej). Analiza poszczególnych faz cyklu komórkowego testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że istotne statystycznie były wyniki z następujących faz cyklu w eksperymentach napromienionych: fazy S i G₂/M w próbach z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $11,98 \pm 0,67$ – $p=0,00638$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $81,30 \pm 3,13$ – $p=0,000386$) (*Rycina 24*), fazy S i G₂/M w próbach z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $17,09 \pm 1,95$ – $p=0,0356$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $79,06 \pm 0,77$ – $p=0,00233$) (*Rycina 25*) oraz faza G₂/M w próbach z samym BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $48,37 \pm 3,30$ – $p=0,0482$) (*Rycina 24-25*). W eksperymentach nienapromienionych istotne statystycznie były wyniki z faz cyklu w próbach: fazy S i G₂/M w komórkach traktowanych GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $13,87 \pm 0,28$ – $p=0,000250$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $17,75 \pm 3,11$ – $p=0,000216$), fazy G₁/G₀ i S w komórkach traktowanych GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $46,58 \pm 1,07$ – $p=0,000201$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $43,83 \pm 0,13$ – $p=0,000225$) (*Rycina 24*), fazy S i G₂/M w komórkach traktowanych GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $14,31 \pm 0,71$ – $p=0,000272$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $16,24 \pm 0,76$ – $p=0,000273$) oraz fazy G₁/G₀ i S w komórkach traktowanych GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $50,58 \pm 4,23$ – $p=0,000284$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $40,70 \pm 1,53$ – $p=0,000295$) (*Rycina 25*).



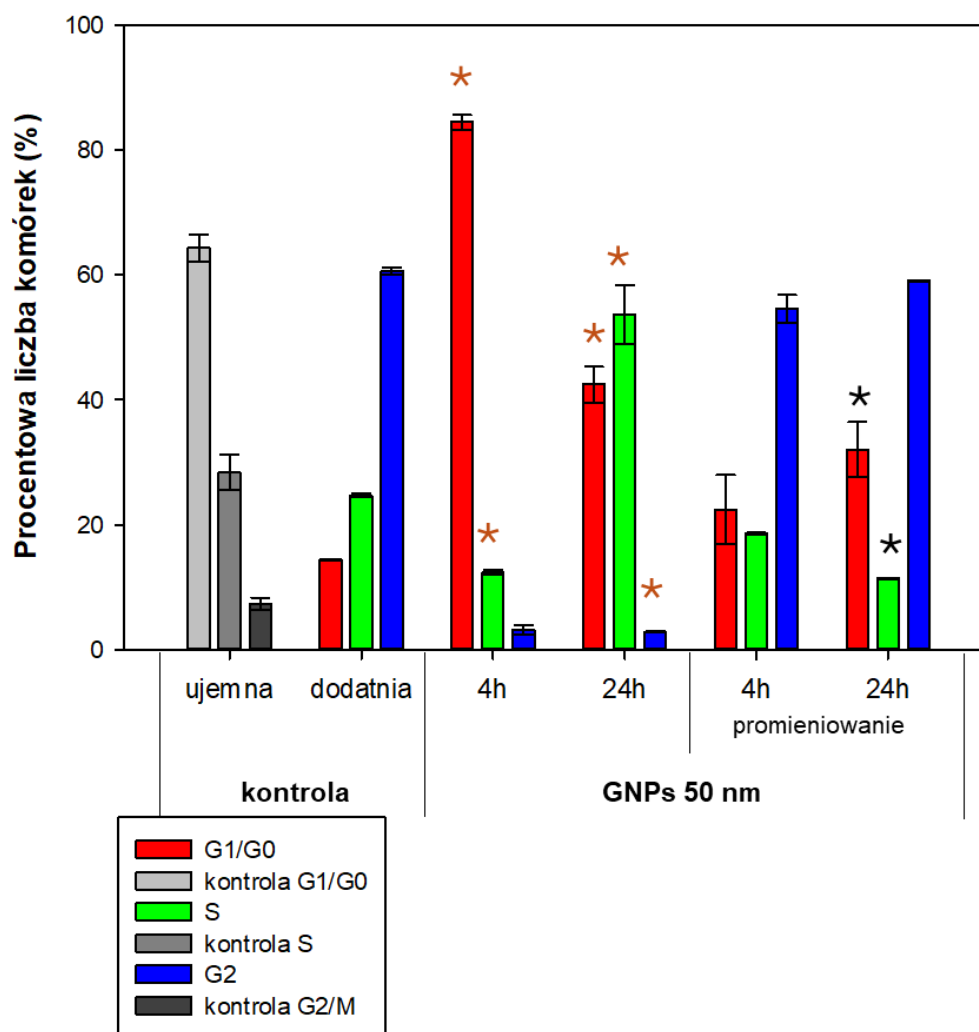
Rycina 26. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 27. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

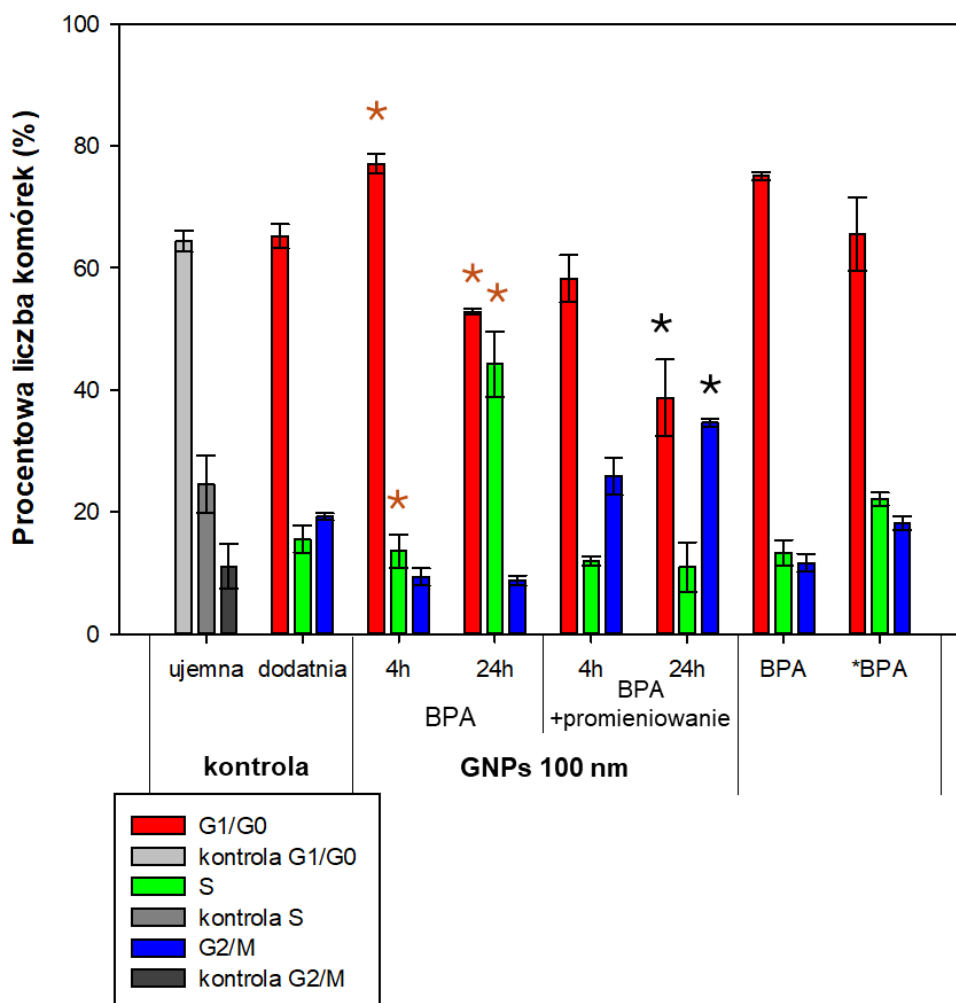
Powyżej przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego w próbach badawczych z dodanymi samymi nanocząstkami złota bez BPA. Zauważono, że w eksperymentach napromienionych występuje zwiększenie procentowej liczby komórek w fazie G₂ cyklu, jednakże nie jest on tak znaczący w porównaniu do eksperymentów napromienionych z dodanymi nanocząstkami złota i z BPA. Zaobserwowano również, że wyniki z prób kontrolnych bez napromieniania z dodanymi samymi nanocząstkami złota wykazują wzrost procentowej liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego. Analiza wyników z poszczególnych faz cyklu komórkowego testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że istotne statystycznie były następujące fazy cyklu w eksperymentach napromienionych: faza G₁/G₀ w komórkach traktowanych GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $33,06 \pm 2,59$ – $p=0,000518$) (*Rycina 26*) oraz fazy G₁/G₀ i S w komórkach traktowanych z GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $32,06 \pm 4,36$ – $p=0,000363$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $11,42 \pm 0,18$ – $p=0,00108$) (*Rycina 27*). W próbach eksperymentalnych nienapromienionych istotne statystycznie były fazy: fazy G₁/G₀ i S w komórkach traktowanych GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $43,17 \pm 1,31$ – $p=0,000193$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $52,27 \pm 0,54$ – $p=0,000209$) (*Rycina 26*), fazy G₁/G₀ i S w komórkach traktowanych GNPs 50 nm z inkubacją 4h (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $84,40 \pm 1,16$ – $p=0,000194$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $12,39 \pm 0,42$ – $p=0,000218$) oraz fazy G₁/G₀, S i G₂/M w komórkach traktowanych GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $42,46 \pm 2,88$ – $p=0,000193$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $53,60 \pm 4,75$ – $p=0,000209$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $2,85 \pm 0,11$ – $p=0,0376$) (*Rycina 27*).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA miała na celu sprawdzenie wpływu różnego traktowania nanocząstkami złota i BPA oraz wpływu promieniowania mieszanego na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G₁, S i G₂) w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231. Analizę przeprowadzono porównując wyniki z prób eksperymentalnych napromienionych do kontroli napromienionej, a wyniki z prób nienapromienionych do kontroli nienapromienionej. Wykonano także test post-hoc Tukey'a ze względu na zróżnicowaną liczbę eksperymentów. Szczegółowe wyniki z tego testu zawarte są w tabelach w *Suplemencie*. Powyżej w opisach wymieniono poszczególne fazy cyklu komórkowego w próbach eksperymentalnych, które wykazały istotność statystyczną. Samo

dodanie BPA do komórek MDA-MB-231 powoduje istotne statystycznie zmiany w fazach cyklu G_1/G_0 i S w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm z inkubacją 24h oraz GNPs 50 nm z inkubacją 4h i 24h) również istotnie statystycznie wpływa na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu w porównaniu do kontroli. W przypadku próby badawczej napromienionej z samym BPA wykazano istotność statystyczną jedynie w fazie G_2/M , czyli doszło do zatrzymania podziałów komórkowych w tej grupie komórek. Porównując do eksperymentu napromienionego z BPA istotne statystycznie wyniki we wszystkich fazach cyklu komórkowego wykazano w komórkach napromienionych z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA. Oznacza to, że dodanie GNPs 100 nm z inkubacją 24h zwiększa efektywność napromieniania komórek neutronami. Najwyższą istotność statystyczną, czyli najmniejszą wartość p interakcji traktowania komórek w odniesieniu do rozkładu procentowej ilości w poszczególnych fazach cyklu komórkowego wykazały próby badawcze napromienione z GNPs 100 nm z inkubacją 24h i z dodanym BPA oraz próby z samymi GNPs 100 nm z inkubacją 24h i z GNPs 50 nm z inkubacją 24h. Z komórek nienapromienionych najwyższą istotność wykazano w próbie z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA. Wynik ten sugeruje, że GNPs 100 nm inkubowane 24h wraz z BPA najefektywniej wpływają na zmianę rozkładu komórek w fazach cyklu komórkowego po napromienieniu i ich zwiększoną ilość w fazie G_2 , w której komórki zatrzymują się w celu naprawy uszkodzeń. Z analizy wynika również, że w przypadku komórek MDA-MB-231 czas inkubacji z GNPs jest istotny w przypadku nanocząstek złota o rozmiarze 100 nm, gdzie wykazano, że 24h jest bardziej odpowiednim wyborem. W przypadku GNPs 50 nm czas inkubacji nie jest istotny. Wyniki pokazały również, że same GNPs bez napromieniania mają istotny wpływ na rozkład komórek w cyklu.

4.3.2. Wyniki rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w linii nowotworowej MCF-7

Wyniki z analizy progresji cyklu komórkowego linii nowotworowej piersi typu luminalnego MCF-7 zaprezentowano na Rycinach 28 - 31.



Rycina 28. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

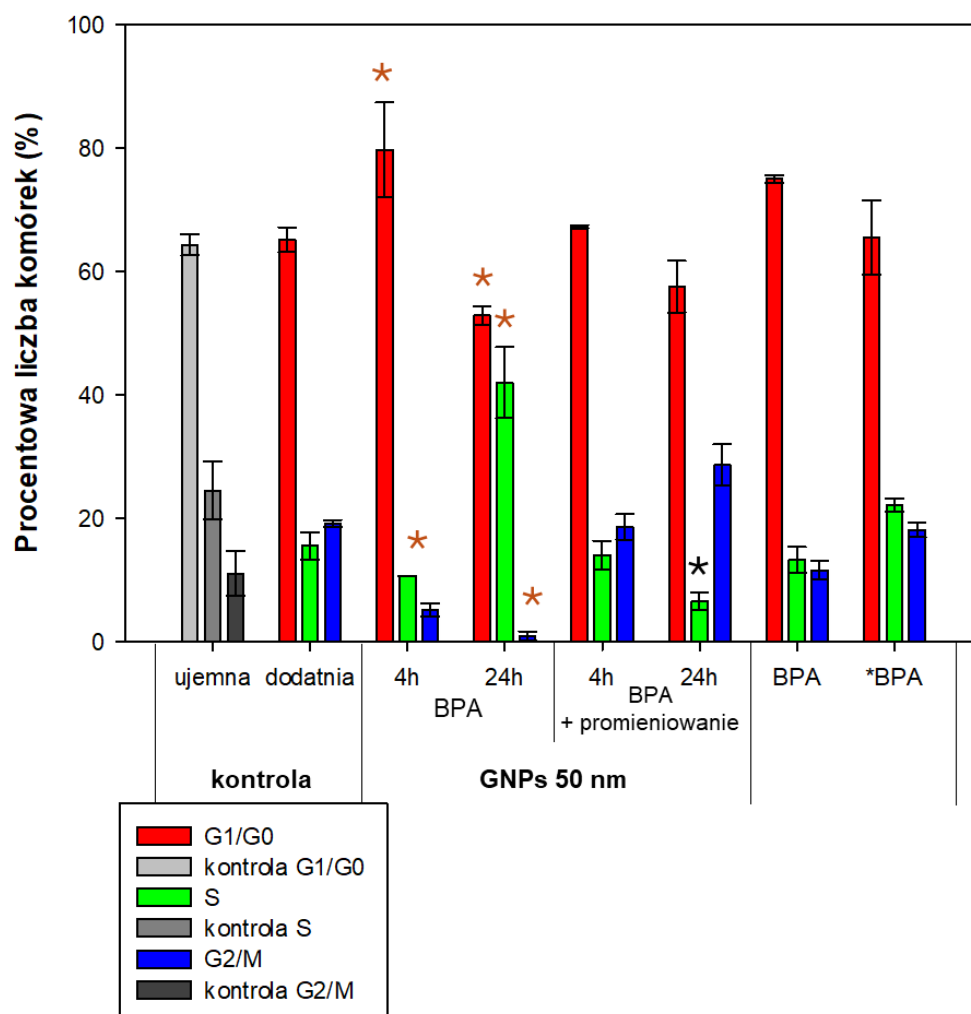
GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*BPA – BPA + promieniowanie

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 29. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles*

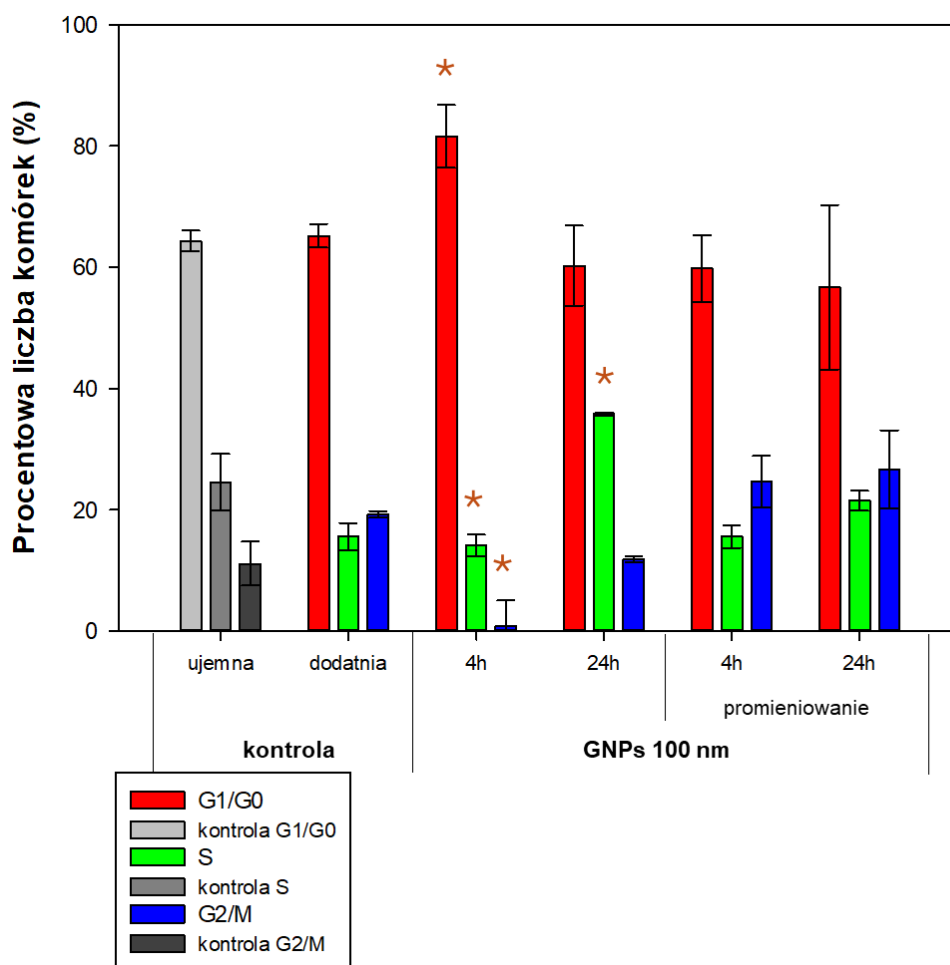
*BPA – BPA + promieniowanie

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Analiza cyklu komórkowego linii komórkowej MCF-7 w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs) nie wykazała, aby wystąpił jednoznaczny blok cyklu komórkowego w fazie G₂. Zauważamy, że następuje wzrost procentowej ilości komórek w fazie G₂ cyklu, ale dalej większa część komórek pozostaje w fazie G₁. Zauważono, że w kontroli bez promieniowania z dodanymi samymi nanocząstkami wzrasta procentowa ilość komórek w fazie S, tak samo jak było w komórkach MDA-MB-231. W analizie statystycznej próby eksperymentalne nienapromienione były porównywane głównie do kontroli nienapromienionej (ujemnej), natomiast próby badawcze napromienione do kontroli napromienionej (dodatniej). Analiza poszczególnych faz cyklu komórkowego testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że istotne statystycznie były następujące fazy cyklu w eksperymentach napromienionych: faza G₁/G₀ i G₂/M w komórkach z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $38,74 \pm 6,26$ – $p=0,0114$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $34,62 \pm 0,65$ – $p=0,00343$) (*Rycina 28*) oraz faza S w komórkach z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $6,59 \pm 1,45$ – $p=0,0171$) (*Rycina 29*). W eksperymentach nienapromienionych istotne statystycznie były: fazy G₁/G₀ i S w komórkach z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $77,07 \pm 1,61$ – $p=0,0221$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $13,55 \pm 2,78$ – $p=0,0283$), fazy G₁/G₀ i S w komórkach z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $52,80 \pm 0,46$ – $p=0,0466$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $44,27 \pm 5,35$ – $p=0,000222$) (*Rycina 28*), fazy G₁/G₀ i S w komórkach z GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $79,77 \pm 7,67$ – $p=0,00372$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $10,67 \pm 0,02$ – $p=0,0101$) oraz fazy G₁/G₀, S i G₂/M w komórkach z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $52,91 \pm 1,49$ – $p=0,0499$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $42,02 \pm 5,74$ – $p=0,000389$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $0,93 \pm 0,78$ – $p=0,00474$) (*Rycina 29*).



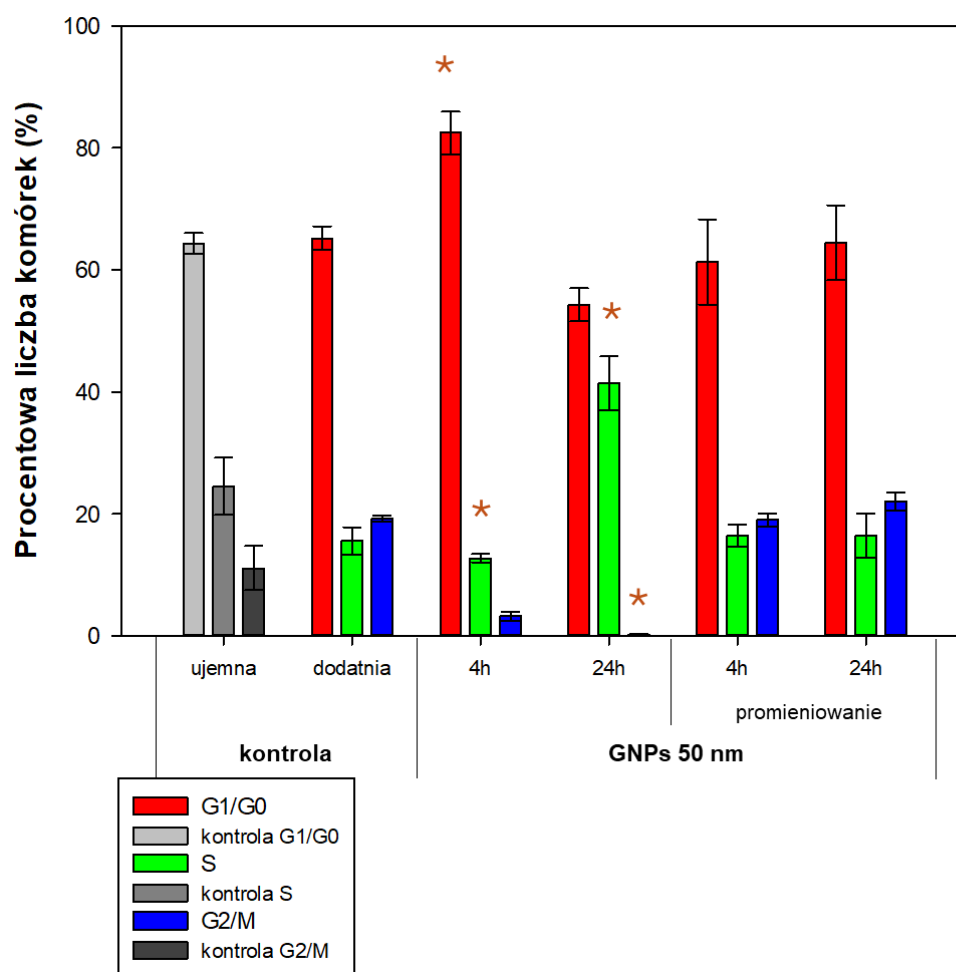
Rycina 30. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 31. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Powyżej przedstawiono wyniki dotyczące analizy cyklu komórkowego linii komórkowej MCF-7 z prób badawczych z samymi dodanymi nanocząstkami złota bez BPA. Zauważono niewielką zmianę w procentowej ilości komórek w fazie G₂ cyklu w eksperymentach napromienionych względem eksperymentów nienapromienionych. Analiza cyklu komórkowego testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że żadna z faz cyklu w próbach badawczych napromienionych z samymi nanocząstkami złota nie jest istotna statystycznie. Oznacza to, że żaden z badanych czynników w komórkach napromienionych nie wpłynął w sposób istotny na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Natomiast, w eksperymentach nienapromienionych istotne statystycznie były fazy w próbach: fazy G₁/G₀, S i G₂/M w komórkach traktowanych GNP_s 100 nm z inkubacją 4h (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $81,63 \pm 5,17$ – $p=0,00114$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $14,11 \pm 0,90$ – $p=0,0422$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $1,79 \pm 0,78$ – $p=0,00949$), faza S w komórkach traktowanych GNP_s 100 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $35,79 \pm 0,27$ – $p=0,0235$) (*Rycina 30*), fazy G₁/G₀ i S w komórkach traktowanych GNP_s 50 nm z inkubacją 4h (średnia procentowa liczba komórek w fazie G₁/G₀: $82,46 \pm 3,46$ – $p=0,000716$; średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $12,73 \pm 0,67$ – $p=0,0157$) oraz fazy S i G₂/M w komórkach traktowanych GNP_s 50 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek w fazie S: $41,40 \pm 4,41$ – $p=0,000515$; średnia procentowa liczba komórek w fazie G₂/M: $0,24 \pm 0,10$ – $p=0,00279$) (*Rycina 31*).

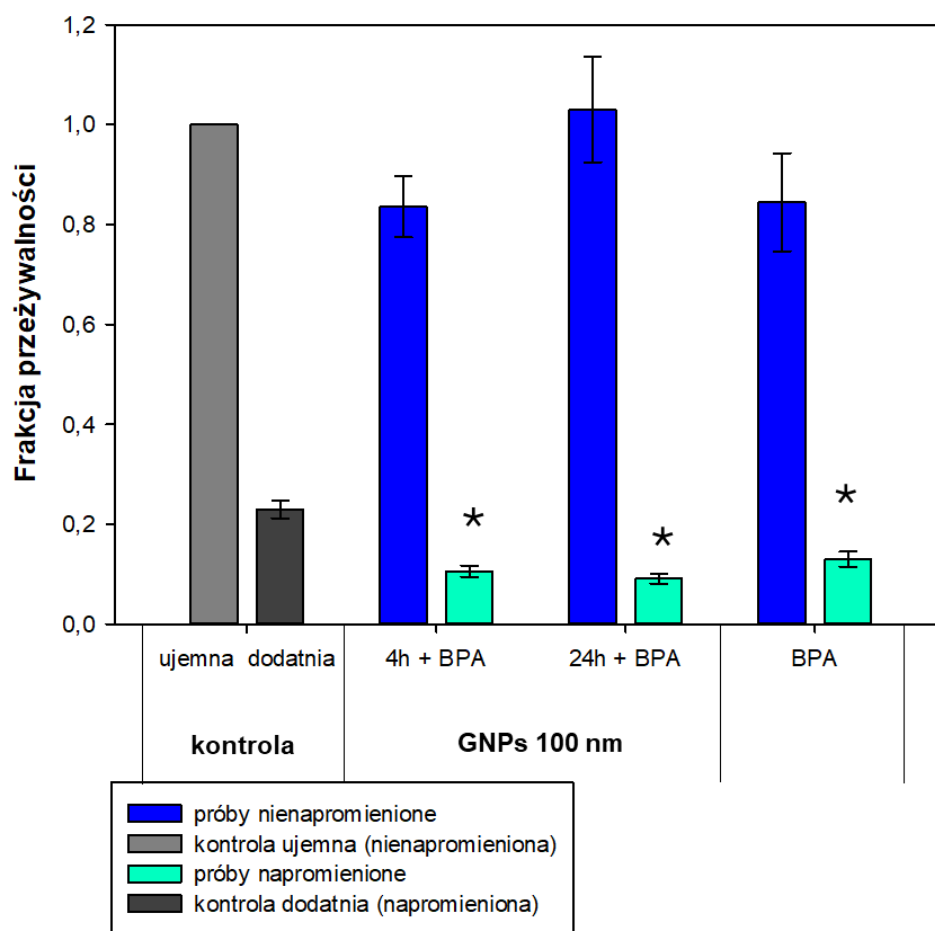
Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA miała na celu sprawdzenie wpływu różnego traktowania nanocząstkami złota i BPA oraz wpływu promieniowania neutronowego na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (G₁/G₀, S i G₂/M) w komórkach nowotworowych piersi MCF-7. Analizowano próby eksperymentalne porównując wyniki badań napromienionych do kontroli napromienionej i eksperymentów nienapromienionych do kontroli nienapromienionej. Wykonano także test post-hoc Tukey'a ze względu na zróżnicowanie prób eksperymentalnych. Wyniki z tego testu zawarte są w tabelach w *Suplemencie*. Powyżej w opisach wymieniono poszczególne fazy cyklu komórkowego w badaniach, które wykazały istotność statystyczną ($p<0,05$). Samo dodanie BPA do komórek MCF-7 powoduje istotne statystycznie zmiany w fazie cyklu S w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (GNP_s 100 nm z inkubacją 4h oraz GNP_s 50 nm z inkubacją 4h i 24h) również istotnie statystycznie wpływają na rozkład komórek poszczególnych faz cyklu w porównaniu do kontroli. W przypadku komórek traktowanych promieniowaniem z samym BPA nie wykazano istotności

statystycznej w porównaniu do kontroli dodatniej (napromienionej). Porównując próby z GNPs i BPA do próby badawczej napromienionej z BPA, istotne statystycznie wyniki we wszystkich fazach cyklu komórkowego wykazano w komórkach napromienionych z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA. Najwyższą istotność statystyczną, czyli najmniejszą wartość p , interakcji traktowania komórek w odniesieniu do rozkładu procentowej ilości w poszczególnych fazach cyklu komórkowego wykazano w próbach traktowanych promieniowaniem z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z dodanym BPA. Oprócz tego, analiza wykazała, że same GNPs bez napromieniania wpływały istotnie na rozkład komórek MCF-7 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$). Wyniki cyklu komórkowego MCF-7 wykazują podobny wniosek, jak w przypadku linii komórkowej MDA-MB-231. Oznacza to, że obecność GNPs 100 nm inkubowanych 24h z BPA z komórkami w połączeniu z promieniowaniem najbardziej wpływa na efektywność terapii borowo-neutronowej, zmieniając w istotny sposób rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu. Oprócz tego, istotny wpływ mają również GNPs 50 nm inkubowane 4h i 24h z BPA w interakcji z promieniowaniem. Co więcej, sam wpływ GNPs wpływa istotnie na rozkład komórek w cyklu komórkowym MCF-7.

4.4. Analiza wpływu nanocząstek złota i BPA w terapii borowo-neutronowej na przeżywalność komórek nowotworowych piersi hodowanych *in vitro*

4.4.1. Wyniki przeżywalności komórkowej na trójjemnej linii nowotworowej piersi MDA-MB-231

Wyniki z przeżywalności komórkowej dla linii komórkowej MDA-MB-231 przedstawiono na Rycinach 32 - 35.



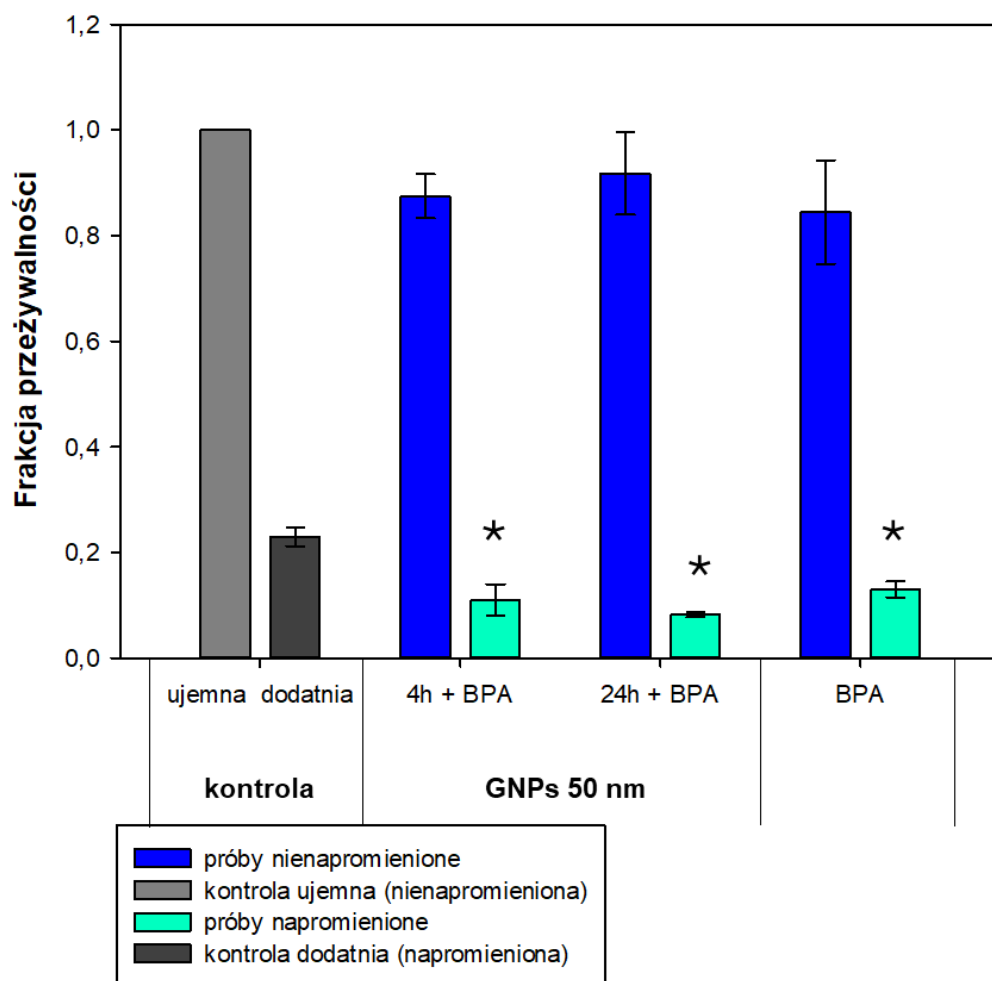
Rycina 32. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 33. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

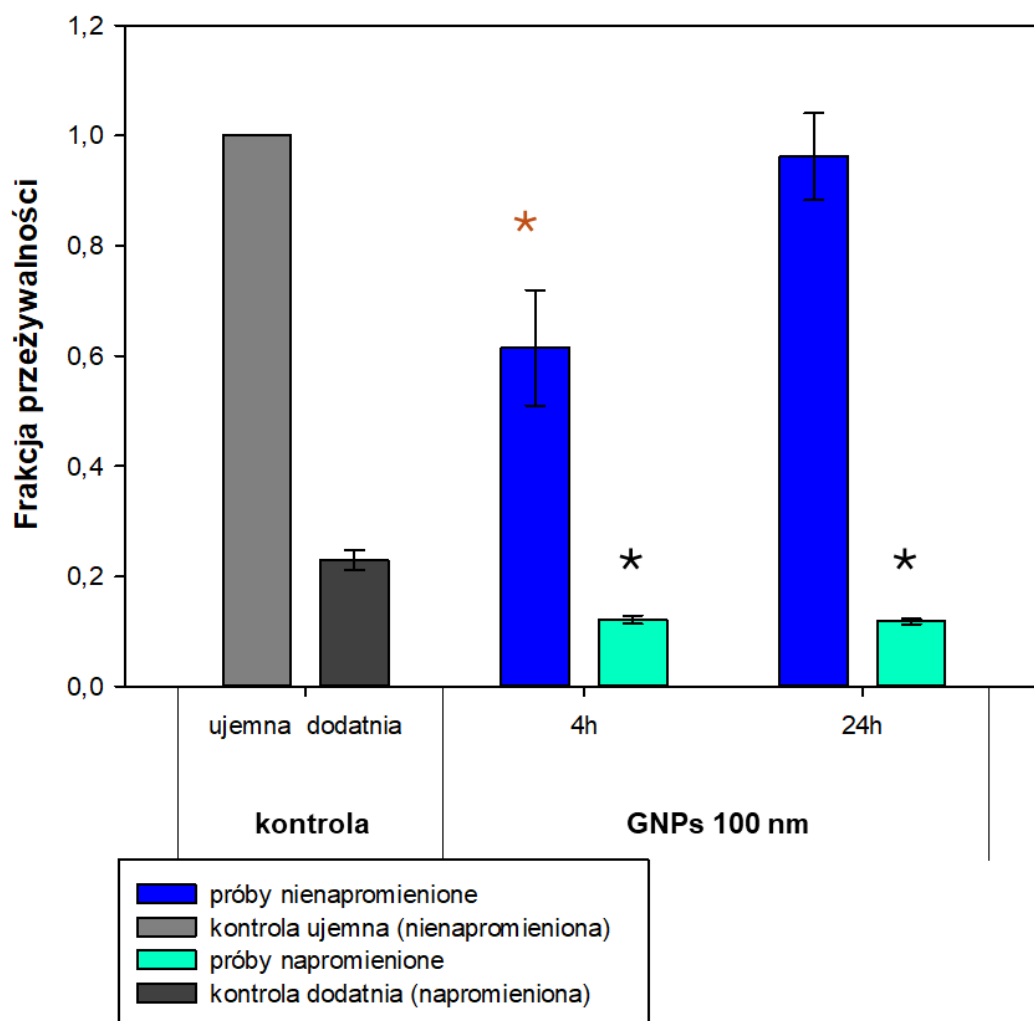
GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Zaobserwowano spadek przeżywalności komórkowej w próbach badawczych potraktowanych promieniowaniem mieszanym. Analiza frakcji przeżywalności komórek MDA-MB-231 testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że wszystkie eksperymenty napromienione z GNPs i z dodanym BPA są istotne statystycznie: komórki z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z dodanym BPA (średnie SF: $0,11 \pm 0,01$; $p=0,000179$), komórki z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnie SF: $0,091 \pm 0,01$; $p=0,000179$) (*Rycina 32*), komórki z GNPs 50 nm z inkubacją 4h (średnie SF: $0,11 \pm 0,03$; $p=0,000179$), komórki z GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnie SF: $0,082 \pm 0,005$; $p=0,000179$) (*Rycina 34*) oraz komórki z samym BPA (średnie SF: $0,13 \pm 0,01$; $p=0,000187$) (*Rycina 32-33*).



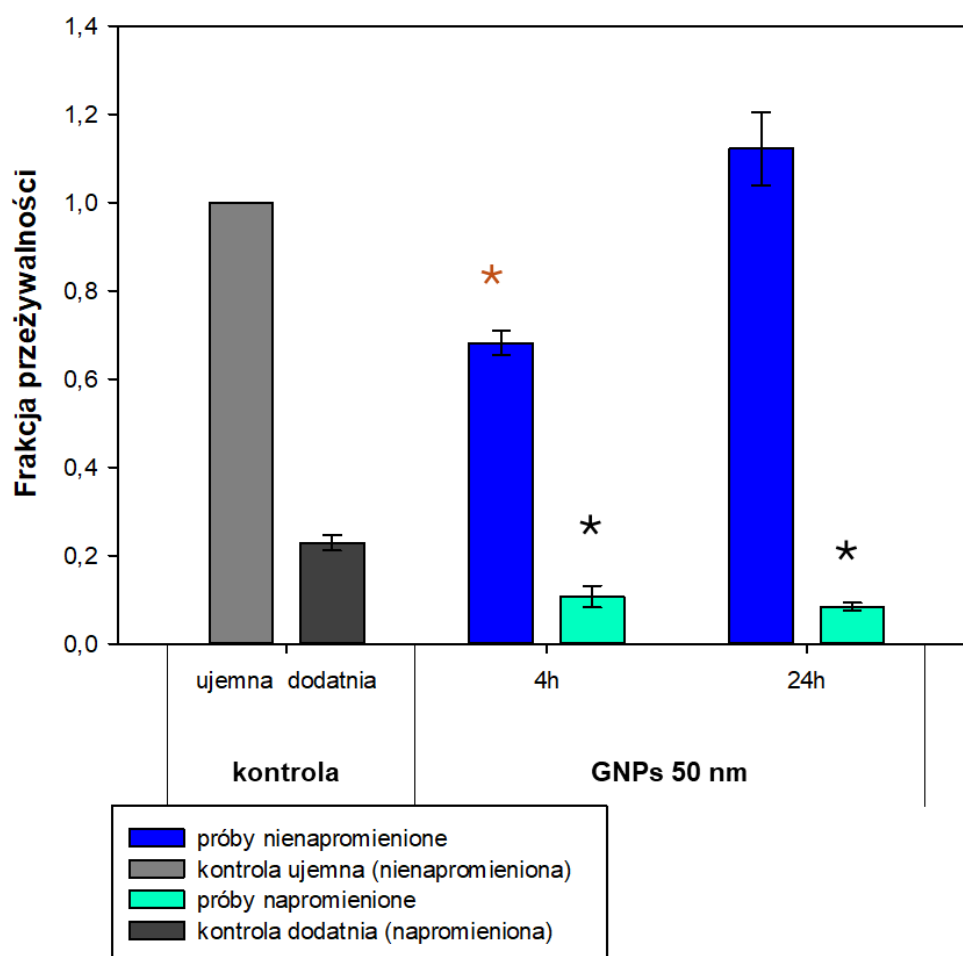
Rycina 34. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 35. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

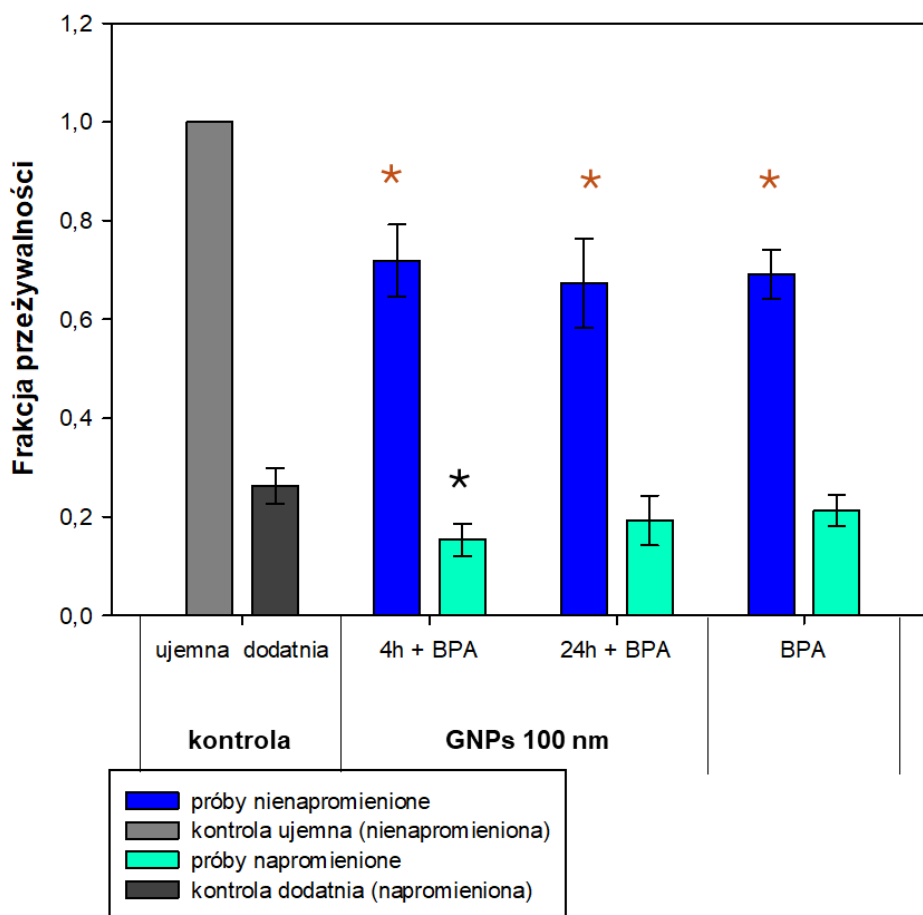
W eksperymentach z dodanymi samymi nanocząstkami złota traktowanymi promieniowaniem neutronowym również zauważono znaczny spadek przeżywalności

komórkowej w odniesieniu do komórek kontrolnych. Najmniejszą frakcję przeżywalności zanotowano w badaniach napromienionych z GNPs 50 nm z inkubacją 24h, gdzie wyniosła ona $0,084 \pm 0,01$ ($p=0,000179$) (*Rycina 36*). Próby z GNPs 100 nm z inkubacją 4h i 24h potraktowane promieniowaniem neutronowym miały tę samą średnią wartość przeżywalności, która wynosiła odpowiednio $\sim 0,12 \pm 0,01$ ($p=0,000179$) i $\sim 0,12 \pm 0,00$ ($p=0,000179$) (*Rycina 34*). W kolejnych próbach badawczych napromienionych z GNPs 50 nm z inkubacją 4h przeżywalność komórkowa wyniosła $0,11 \pm 0,02$ ($p=0,000179$) (*Rycina 35*). Z eksperymentów nienapromienionych istotność statystyczną wykazano w próbach traktowanych GNPs 100 nm z inkubacją 4h (średnie SF: $0,62 \pm 0,10$; $p=0,000697$) (*Rycina 34*) oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 4h (średnie SF: $0,68 \pm 0,03$; $p=0,000697$) (*Rycina 35*).

Do analizy przeżywalności komórkowej wykorzystano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Celem tej analizy było zbadanie wpływu różnego traktowania komórek MDA-MB-231 na frakcję przeżywalności. Dodatkowo wykonano analizę post-hoc Tukey'a, której wyniki zawarto w *Suplemencie*. Analiza statystyczna wykazała, że wartość $p < 0,05$ mają następujące próby eksperymentalne: nienapromienione – z GNPs 50 nm z inkubacją 4h i z GNPs 100 nm z inkubacją 4h oraz wszystkie próby napromienione. Próby badawcze napromienione miały podobną wartość p także każda z nich wykazała wysoką istotność statystyczną. Najmniejszą wartość średniej przeżywalności komórkowej (SF) zaobserwowano w eksperymentach napromienionych z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA, z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA oraz z samym GNPs 50 nm z inkubacją 24h. W analizie zauważono, że największy wpływ na przeżywalność komórkową ma traktowanie komórek promieniowaniem, co w bardzo dużym stopniu obniża ich przeżywalność. Oprócz tego, GNPs bez względu na rozmiar po inkubacji 4- czy 24-godzinnej z komórkami również wpływają na ich przeżywalność, która jest na poziomie kontroli lub wyższa, jak w przypadku GNPs 50 nm z inkubacją 24h. Dodanie samego BPA do komórek MDA-MB-231 nie powoduje istotnej statystycznie zmiany w przeżywalności komórkowej w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm z inkubacją 4h oraz GNPs 50 nm z inkubacją 4h) również istotnie statystycznie wpływa na przeżywalność komórkową w porównaniu do kontroli ujemnej. W przypadku próby badawczej napromienionej z samym BPA wykazano istotność statystyczną w porównaniu do przeżywalności komórek w kontroli dodatniej. Porównując do komórek napromienionych z BPA wyniki ze wszystkich prób eksperymentalnych z GNPs i BPA zaobserwowano, że istotny statystycznie jest eksperyment napromieniony z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA.

4.4.2. Wyniki przeżywalności komórkowej na luminalnej linii nowotworowej piersi MCF-7

Wyniki z przeżywalności komórkowej dla linii komórkowej MCF-7 przedstawiono na Rycinach 36 - 39.



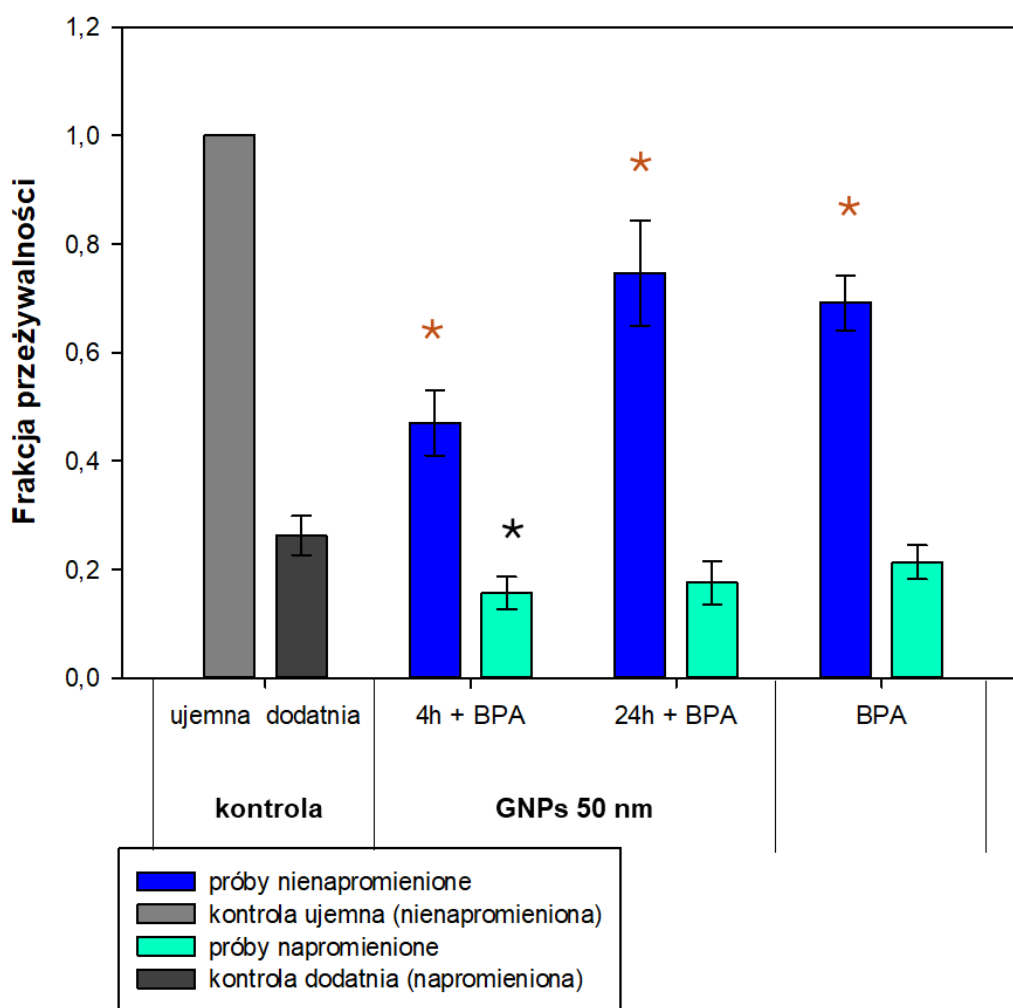
Rycina 36. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNP – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 37. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNP – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

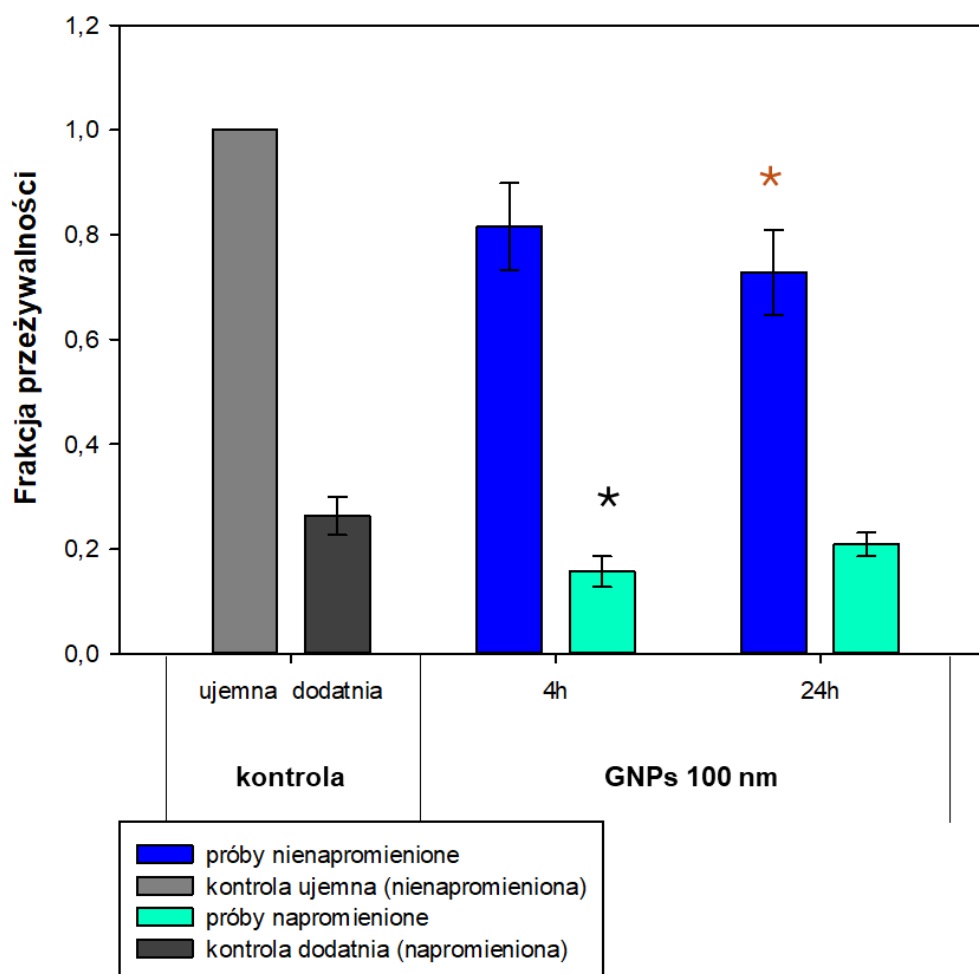
kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Zaobserwowano spadek przeżywalności komórkowej linii komórkowej MCF-7 w próbach badawczych potraktowanych promieniowaniem mieszanym. Analiza frakcji

przeżywalności komórek MCF-7 testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że z prób eksperymentalnych napromienionych istotnie statystycznie są: komórki z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z dodanym BPA (średnie SF: $0,15 \pm 0,03$; $p=0,0166$) (*Rycina 36*) oraz komórki z GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA (średnie SF: $0,15 \pm 0,03$; $p=0,0218$) (*Rycina 37*). Wszystkie eksperymenty nienapromienione z GNPs i z BPA także wykazały istotność statystyczną względem kontroli ujemnej (nienapromienionej): z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnie SF: $0,72 \pm 0,07$; $p=0,00448$), z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnie SF: $0,67 \pm 0,09$; $p=0,001008$) (*Rycina 36*), z GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA (średnie SF: $0,47 \pm 0,06$; $p=0,000186$), z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnie SF: $0,75 \pm 0,10$; $p=0,0116$) (*Rycina 37*) oraz z samym BPA (średnie SF: $0,69 \pm 0,05$; $p=0,00178$) (*Rycina 36-37*).



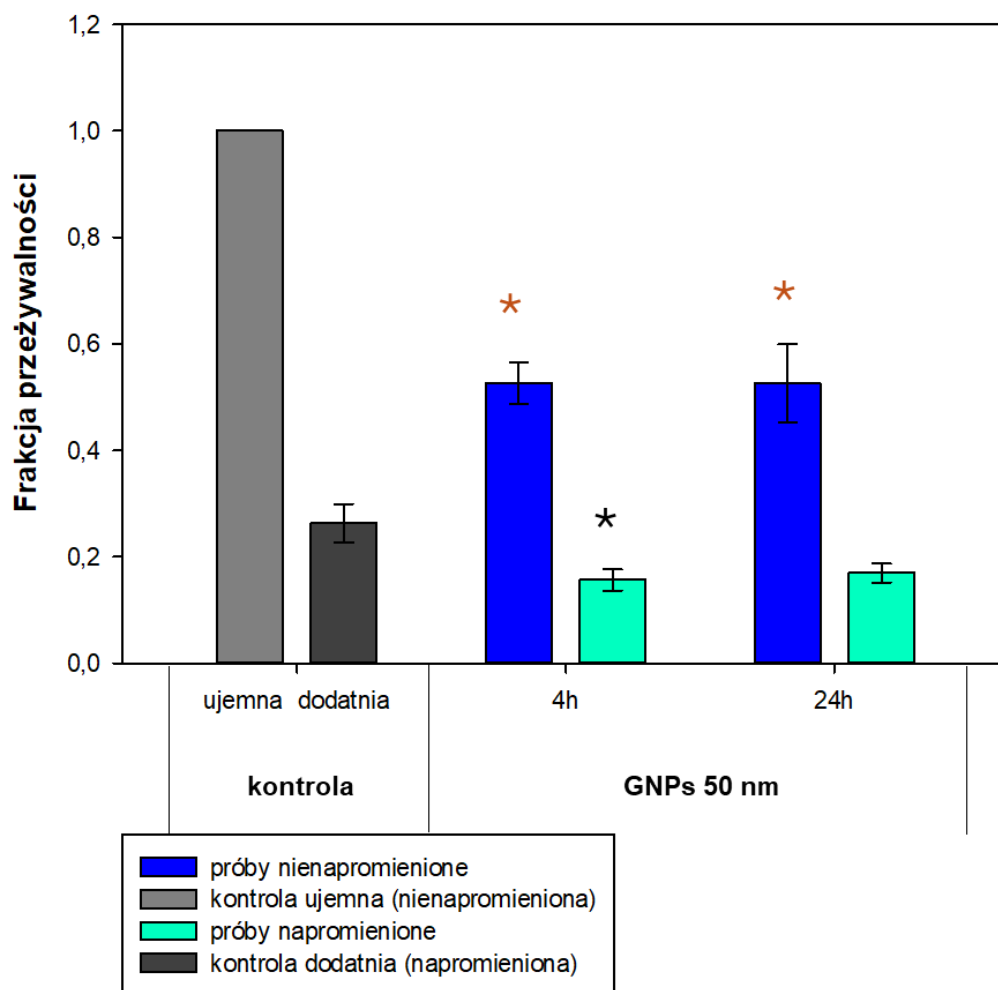
Rycina 38. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 39. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

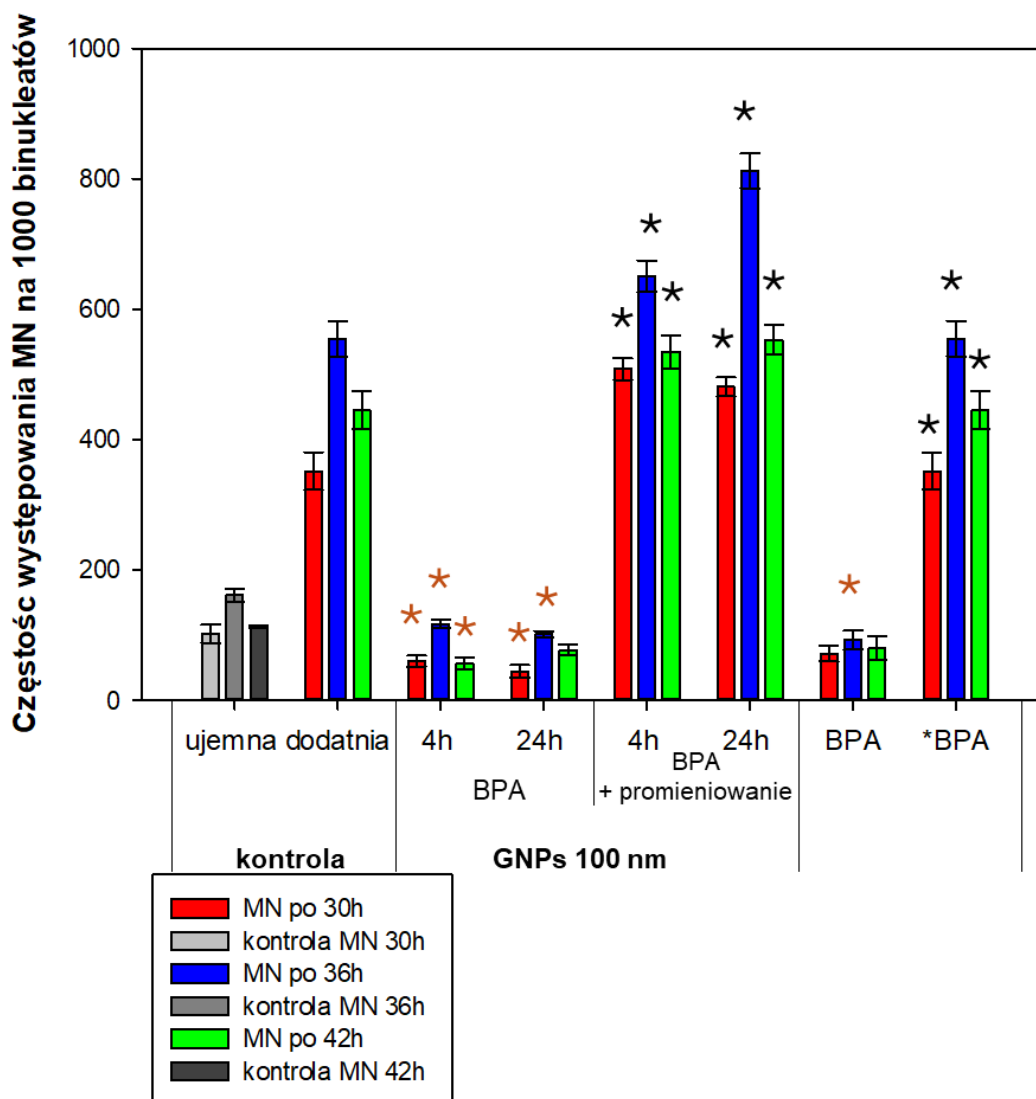
W przypadku linii komórkowej MCF-7 w próbach badawczych z dodanymi samymi nanocząstkami złota potraktowanymi promieniowaniem mieszanym zauważono znaczny spadek przeżywalności komórkowej w odniesieniu do kontroli. Analiza statystyczna wykazała, że z eksperymentów napromienionych wartość $p < 0,05$ mają komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h (średnie SF: $0,16 \pm 0,03$; $p = 0,0218$) (*Rycina 38*) oraz GNPs 50 nm z inkubacją 4h (średnie SF: $0,16 \pm 0,02$; $p = 0,0218$) (*Rycina 39*). Z badań nienapromienionych istotność statystyczną zaobserwowano w komórkach z GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnie SF: $0,73 \pm 0,08$; $p = 0,00614$) (*Rycina 38*), z GNPs 50 nm z inkubacją 4h (średnie SF: $0,53 \pm 0,04$; $p = 0,000211$) oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnie SF: $0,53 \pm 0,07$; $p = 0,000186$) (*Rycina 39*).

Do analizy przeżywalności komórkowej wykorzystano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Celem tej analizy było zbadanie wpływu różnego traktowania komórek MCF-7 na frakcję przeżywalności. Dodatkowo wykonano analizę post-hoc Tukey'a. Szczegółowe wyniki z tego testu zawarte są w tabelach w *Suplemencie*. Analiza statystyczna wykazała, że wartość $p < 0,05$ mają wszystkie eksperymenty nienapromienione, co oznacza, że traktowanie komórek MCF-7 nanocząstkami złota i BPA znacząco obniża ich przeżywalność. Najmniejszą wartość p z badań napromienionych, a co za tym idzie najwyższą istotność statystyczną, wykazały komórki napromienione z GNPs 50 nm z inkubacją 4h oraz z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA. Z eksperymentów nienapromienionych, największą istotnością statystyczną zaobserwowano w próbach z BPA oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 24h. Dodanie samego BPA do komórek MCF-7 powoduje istotne statystycznie zmiany w przeżywalności komórkowej w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm z inkubacją 24h oraz GNPs 50 nm z inkubacją 4h i 24h) również istotnie statystycznie wpływa na przeżywalność komórkową w porównaniu do kontroli ujemnej, zmniejszając ją. W przypadku eksperymentu napromienionego z samym BPA wykazano brak istotności statystycznej w porównaniu do przeżywalności komórek w kontroli dodatniej (napromienionej). Porównując wyniki ze wszystkich prób eksperymentalnych z GNPs i BPA do próby traktowanej samym BPA, nie wykazano w żadnej z nich istotności statystycznej.

4.5. Analiza częstości mikrojąder w komórkach nowotworowych piersi hodowanych *in vitro*

4.5.1. Wyniki częstości występowania mikrojąder w trójujemnej linii nowotworowej piersi MDA-MB-231

Wyniki z częstości występowania mikrojąder dla linii komórkowej MDA-MB-231 przedstawiono na Rycinach 40 - 43.



Rycina 40. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

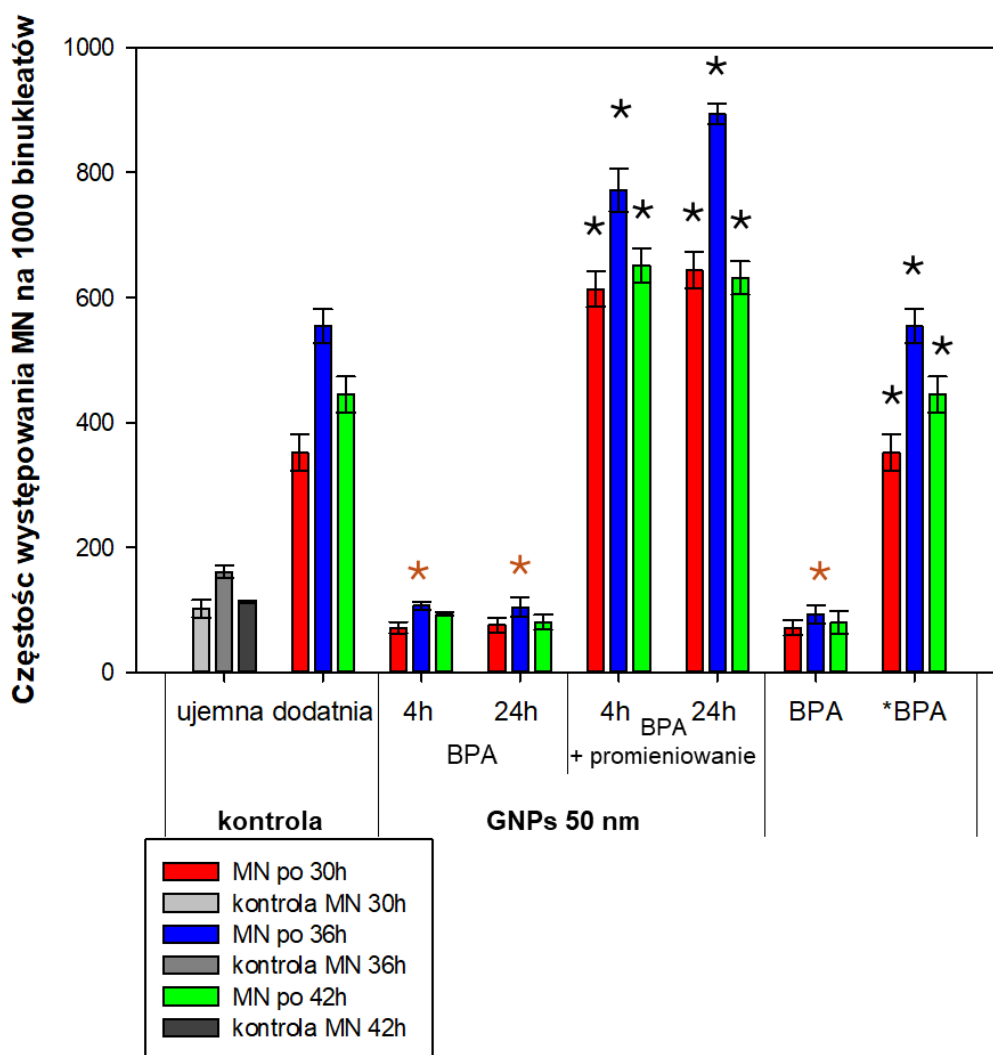
GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*BPA – BPA + promieniowanie

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*:p<0,05 (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*:p<0,05 (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 41. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. gold nanoparticles – nanocząstki złota

*BPA – BPA + promieniowanie

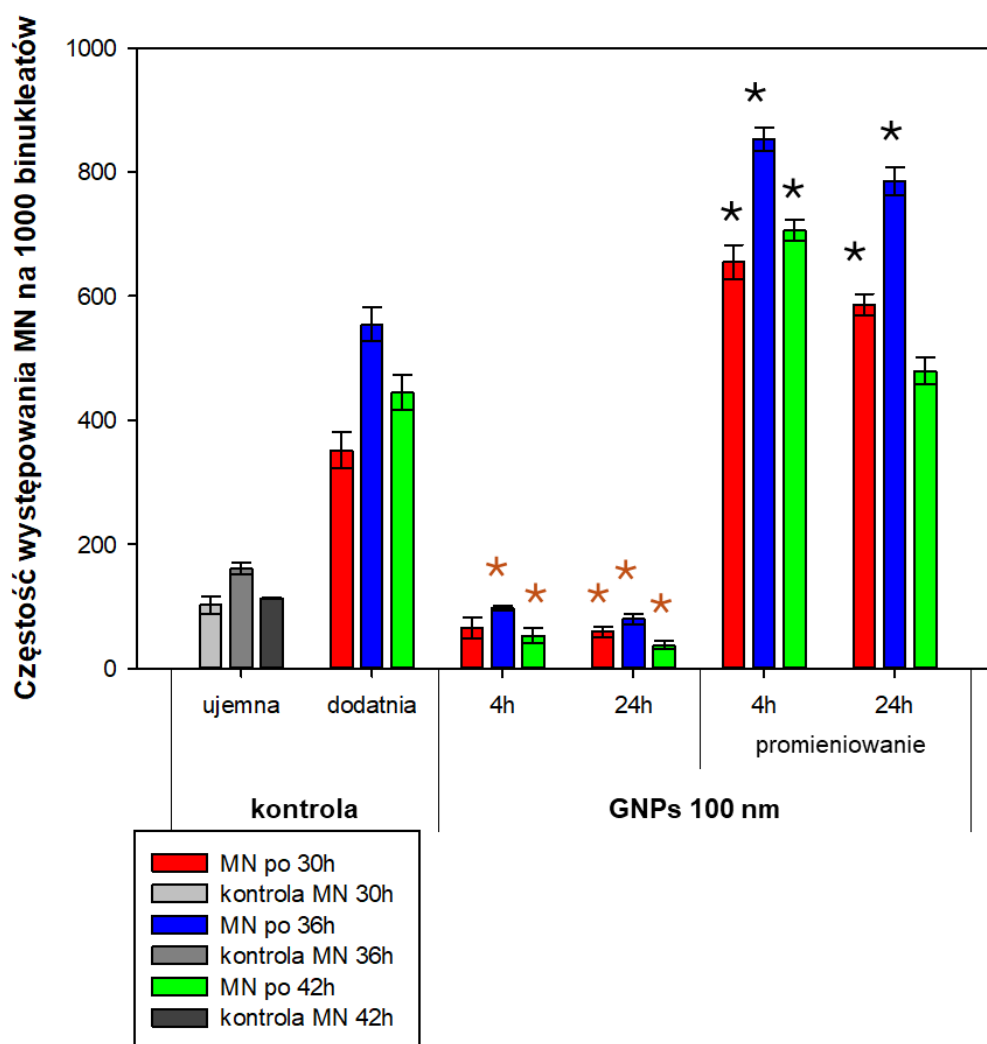
kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*:p<0,05 (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*:p<0,05 (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Zauważono znaczące różnice w częstości występowania mikrojąder w zależności od tego czy komórki były traktowane promieniowaniem czy też nie oraz od czasu utrwalania komórek od napromieniania, co przedstawiono na Rycinach 40 - 41. W tym eksperymencie badano kinetykę częstości występowania mikrojąder w zależności od traktowania komórek nowotworowych. Analiza kinetyki w komórkach MDA-MB-231 testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że wszystkie eksperymenty napromienione z nanocząstkami złota i z BPA są istotne statystycznie w porównaniu do kontroli dodatniej (napromienionej). Średnie częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 w poszczególnych czasach utrwalania komórek napromienionych są następujące: z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $508,00 \pm 16,82$, $p=0,000186$; po 36h: $650,33 \pm 24,01$, $p=0,0179$; po 42h: $535,00 \pm 25,36$, $p=0,00208$), z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $480,67 \pm 14,57$, $p=0,000204$; po 36h: $812,33 \pm 27,02$, $p=0,000179$; po 42h: $552,67 \pm 22,74$, $p=0,000378$) (*Rycina 40*), z GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $613,67 \pm 28,54$, $p=0,000179$; po 36h: $772,33 \pm 34,53$, $p=0,000179$; po 42h: $651,67 \pm 27,57$, $p=0,000179$), z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $644,00 \pm 28,62$, $p=0,000179$; po 36h: $893,67 \pm 15,95$, $p=0,000179$; po 42h: $631,67 \pm 26,58$, $p=0,000179$) (*Rycina 41*) oraz z samym BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $598,00 \pm 17,78$, $p=0,000179$; po 36h: $739,67 \pm 23,03$, $p=0,000188$; po 42h: $655,67 \pm 16,50$, $p=0,000179$) (*Rycina 40-41*). W badaniach nienapromienionych istotne statystycznie są komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $60,00 \pm 8,49$, $p=0,0326$; po 36h: $116,67 \pm 6,51$, $p=0,00418$; po 42h: $56,67 \pm 8,50$, $p=0,00691$), GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA po 30h i 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $44,33 \pm 9,61$, $p=0,00104$; po 36h: $101,33 \pm 4,93$, $p=0,000381$) (*Rycina 40*), GNPs 50 nm z inkubacją 4h po 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 36h: $106,50 \pm 6,36$, $p=0,00152$), GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA po 36h

(średnia częstość występowania mikrojąder po 36h: $104,00 \pm 15,56$, $p=0,00103$) (*Rycina 41*) oraz samym BPA po 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 36h: $92,33 \pm 14,47$, $p=0,000237$) (*Rycina 40-41*). Zauważono, że częstość występowania MN wzrasta do 36h po napromienieniu czy traktowaniu komórek GNPs i BPA, a następnie zaczyna spadać, co świadczy o naprawie komórek.



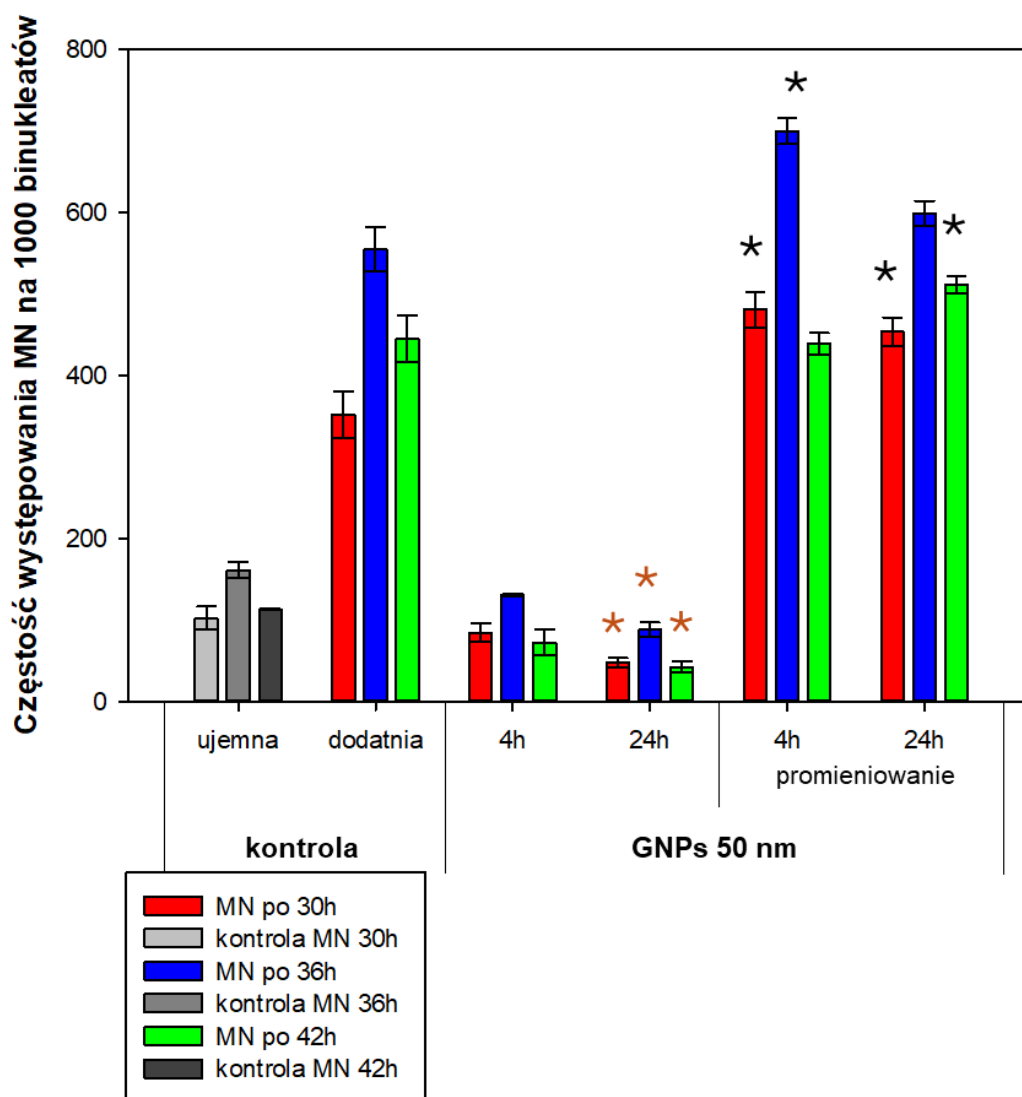
Rycina 42. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszane (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 43. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszane (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

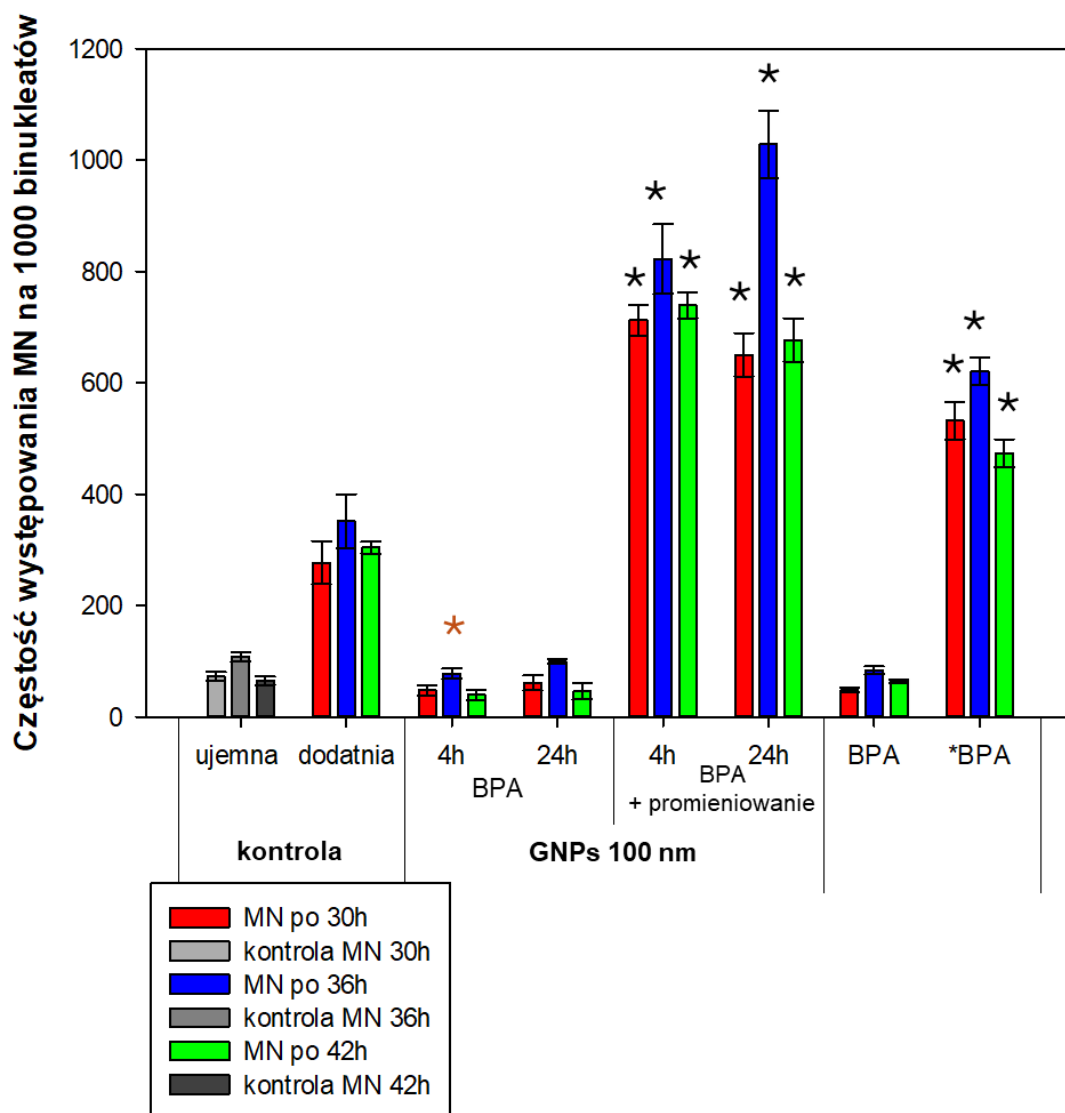
W eksperymentach z samymi dodanymi nanocząstkami największą częstość występowania mikrojąder tak samo zauważono w próbach badawczych napromienionych. Analiza kinetyki częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że z komórek napromienionych z samymi nanocząstkami złota istotnie statystycznie są próby: z GNPs 100 nm z inkubacją 4h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $654,67 \pm 27,59$, $p=0,000179$; po 36h: $853,33 \pm 18,77$, $p=0,000179$; po 42h: $706,00 \pm 17,44$, $p=0,000179$), z GNPs 100 nm z inkubacją 24h po 30h i 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $585,67 \pm 17,24$, $p=0,000179$; po 36h: $785,00 \pm 22,91$, $p=0,000179$) (*Rycina 42*), z GNPs 50 nm z inkubacją 4h po 30h i 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $480,00 \pm 21,52$, $p=0,000205$; po 36h: $699,00 \pm 16,09$, $p=0,000357$) oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 24h po 30h i 42h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $453,00 \pm 17,78$, $p=0,000874$; po 42h: $511,00 \pm 10,15$, $p=0,0357$) (*Rycina 43*). W próbach badawczych nienapromienionych istotnie statystycznie są komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h po 36h i 42h (średnia częstość występowania mikrojąder po 36h: $97,50 \pm 3,54$, $p=0,00335$; po 42h: $53,00 \pm 12,73$, $p=0,0346$), GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $59,33 \pm 8,62$, $p=0,0145$; po 36h: $79,33 \pm 8,62$, $p=0,000213$; po 42h: $37,33 \pm 6,66$, $p=0,000463$) (*Rycina 42*) oraz GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $47,33 \pm 5,86$, $p=0,00167$; po 36h: $87,67 \pm 9,07$, $p=0,000221$; po 42h: $42,33 \pm 7,02$, $p=0,000811$) (*Rycina 43*). Zauważono, że częstość występowania MN wzrasta po 36h od napromienienia czy traktowania komórek GNPs i BPA, a następnie zaczyna spadać, co świadczy o naprawie komórek.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA miała na celu sprawdzenie wpływu różnego traktowania nanocząstkami złota i BPA oraz wpływu promieniowania mieszanego na kinetykę częstości występowania mikrojąder w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231. Analizowano próby eksperymentalne porównując wyniki komórek napromienionych do kontroli napromienionej, natomiast komórki nienapromienione do kontroli nienapromienionej. Wykonano także test post-hoc Tukey'a dla każdego czasu utrwalania z osobna ze względu na dużą ilość różnych prób eksperymentalnych. Wyniki z tego testu zawarte są w tabelach w *Suplemencie*. W opisach wykresów wypisano wszystkie próby eksperymentalne, które są istotnie statystycznie w porównaniu do kontroli ujemnej i dodatniej. Dodanie samego BPA do komórek MDA-MB-231 powoduje istotnie statystyczną zmianę w częstości występowania mikrojąder po 36h od napromienienia w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (po wszystkich czasach kinetyki głównie

z GNPs 100 nm z inkubacją 24h oraz GNPs 50 nm z inkubacją 24h) również istotnie statystycznie wpływają na częstość występowania mikrojąder po 30h, 36h i 42h w porównaniu do kontroli ujemnej. W przypadku eksperymentu napromienionego z samym BPA wykazano istotność statystyczną w częstości występowania mikrojąder po 30h, 36h i 42h od napromieniania w porównaniu do kontroli dodatniej (napromienionej). Porównując do badania napromienionego z BPA wyniki ze wszystkich prób eksperymentalnych z GNPs i BPA wykazano, że istotne statystycznie są eksperymenty napromienione z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (po 30h, 36h i 42h) oraz z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (po 30h i 42h). Najwyższą istotność statystyczną, czyli najmniejsze wartości p wykazały próby badawcze napromienione z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z dodanym BPA oraz z GNPs 50 nm zarówno z inkubacją 4h, jak i 24h z BPA, w których każdy czas utrwalania komórek jest istotny statystycznie. Taki wynik sugeruje, że GNPs 50 nm i GNPs 100 nm z inkubacją 24h wraz z BPA najefektywniej wpływają na wzrost częstości występowania mikrojąder. Z analizy wynika również, że w przypadku komórek MDA-MB-231 czas inkubacji z GNPs jest istotny i większą efektywność otrzymuje się przy inkubacji 24-godzinnej przed napromienianiem. Wyniki pokazały także, że samo traktowanie komórek GNPs bez napromieniania ma istotny wpływ na częstość mikrojąder zmniejszając ich ilość w porównaniu do kontroli ujemnej.

4.5.2. Wyniki częstości występowania mikrojąder w luminalnej linii nowotworowej piersi MCF-7

Wyniki z częstości występowania mikrojąder dla linii komórkowej MCF-7 przedstawiono na Rycinach 44 - 47.



Rycina 44. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

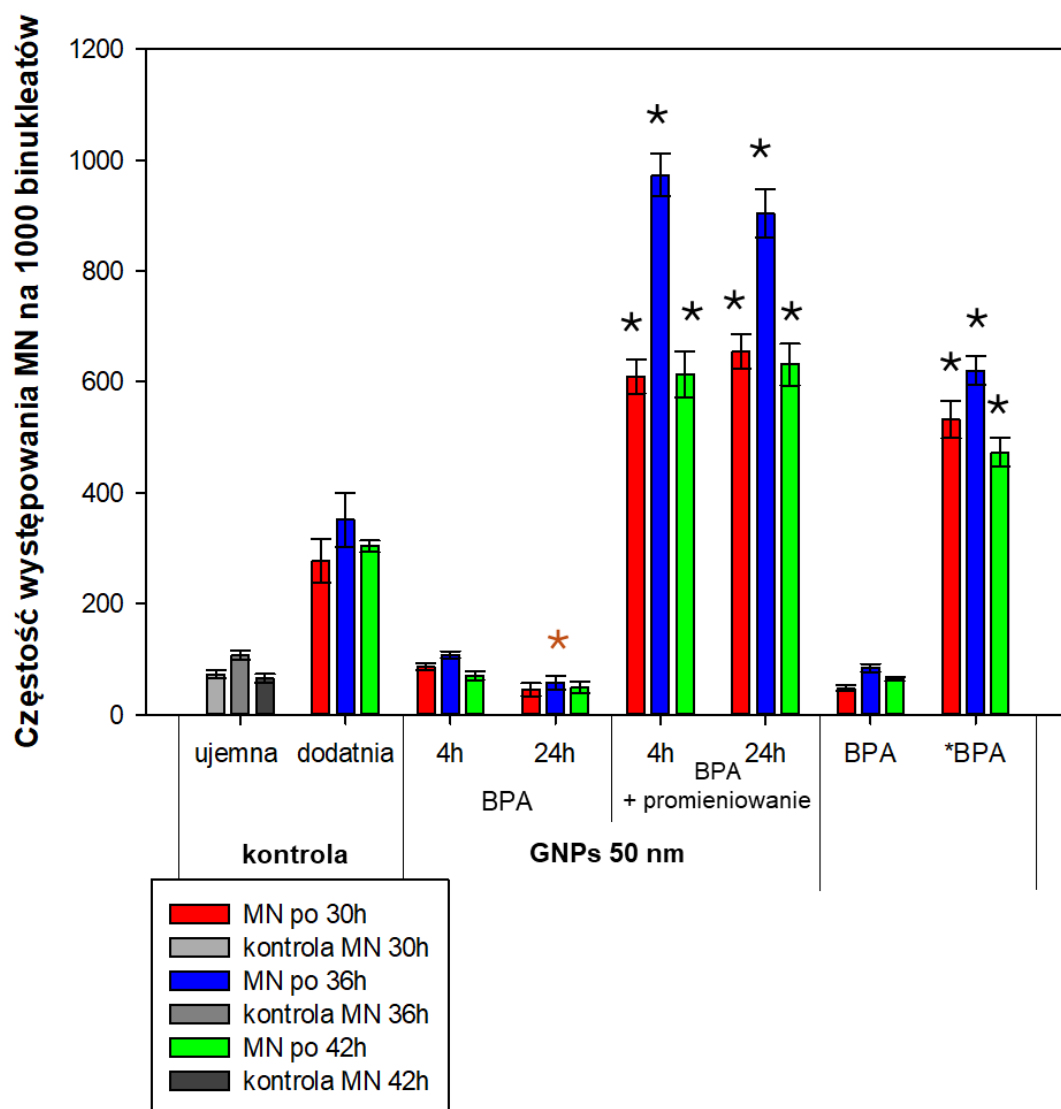
GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

*BPA – BPA + promieniowanie

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 45. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

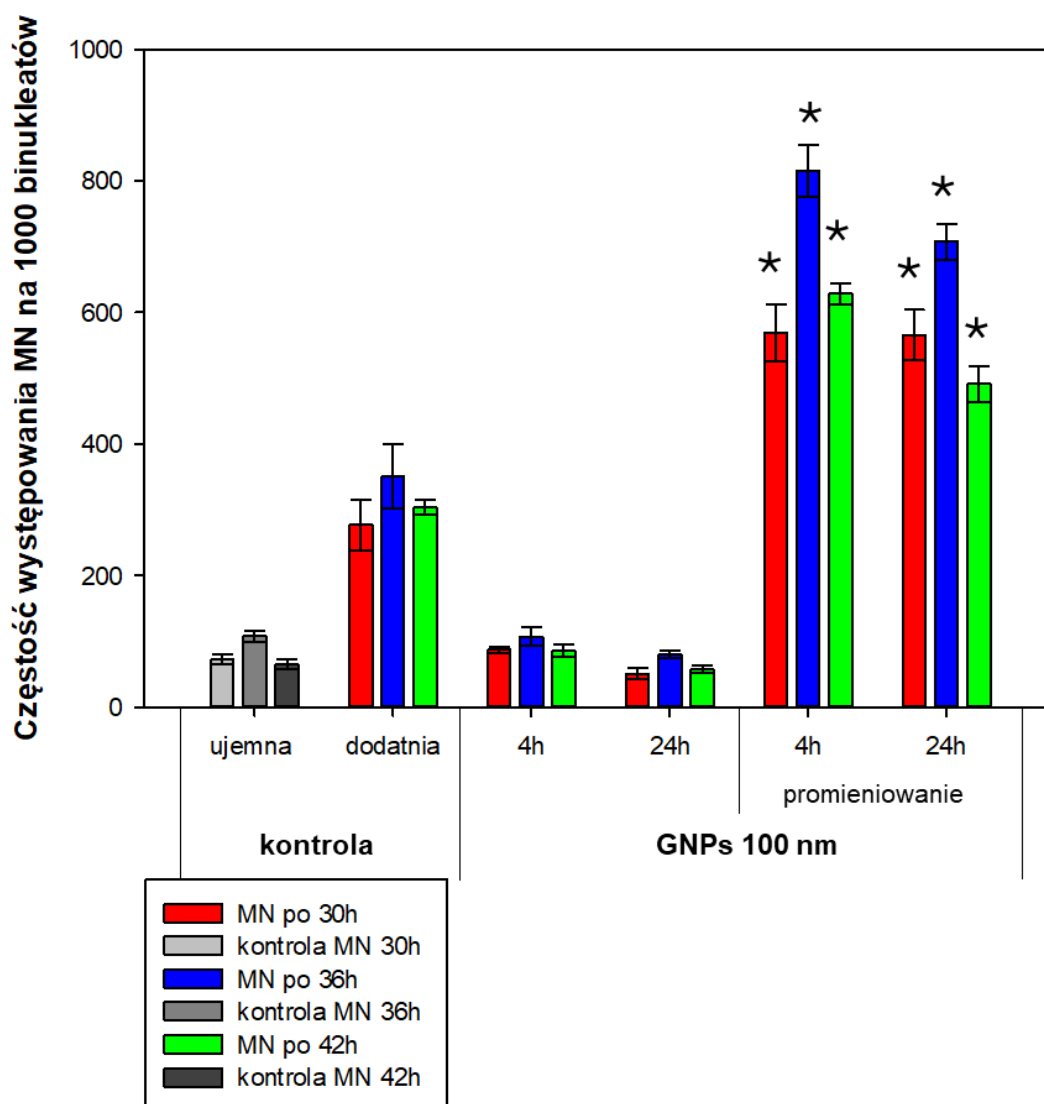
*BPA – BPA + promieniowanie

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

W badaniach zaobserwowano zwiększoną średnią częstość występowania mikrojąder w próbach eksperymentalnych napromienionych oraz zależność wartości częstości MN od czasu utrwalania komórek po napromienieniu. W tym eksperymencie badano również kinetykę częstości występowania mikrojąder w zależności od traktowania komórek nowotworowych. Analiza kinetyki częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że wszystkie badania napromienione z nanocząstkami złota i z BPA są istotne statystycznie w porównaniu do kontroli dodatniej (napromienionej). Średnie częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 w poszczególnych czasach utrwalania komórek napromienionych są następujące: z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $712,00 \pm 27,18$, $p=0,000184$; po 36h: $822,67 \pm 62,45$, $p=0,000179$; po 42h: $739,50 \pm 23,33$, $p=0,000184$), z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $650,50 \pm 38,89$, $p=0,000184$; po 36h: $1028,00 \pm 61,44$, $p=0,000179$; po 42h: $676,50 \pm 38,89$, $p=0,000184$) (*Rycina 44*), z GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $609,67 \pm 30,55$, $p=0,000184$; po 36h: $973,00 \pm 38,74$, $p=0,000179$; po 42h: $613,67 \pm 41,55$, $p=0,000185$), z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $655,33 \pm 31,56$, $p=0,000184$; po 36h: $903,67 \pm 43,55$, $p=0,000179$; po 42h: $631,33 \pm 37,69$, $p=0,000184$) (*Rycina 45*) oraz z samym BPA (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $532,00 \pm 33,60$, $p=0,000184$; po 36h: $620,67 \pm 25,58$, $p=0,000191$; po 42h: $473,33 \pm 25,01$, $p=0,00674$) (*Rycina 44-45*). W komórkach nienapromienionych istotne statystycznie są eksperymenty: z GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA po 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 36h: $77,50 \pm 9,19$, $p=0,0219$) (*Rycina 44*) oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA po 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 36h: $58,00 \pm 12,73$, $p=0,00909$) (*Rycina 45*). Zauważono, że częstość występowania MN wzrasta do 36h po napromienieniu czy traktowaniu komórek GNPs i BPA, a następnie zaczyna spadać, co świadczy o naprawie komórek.



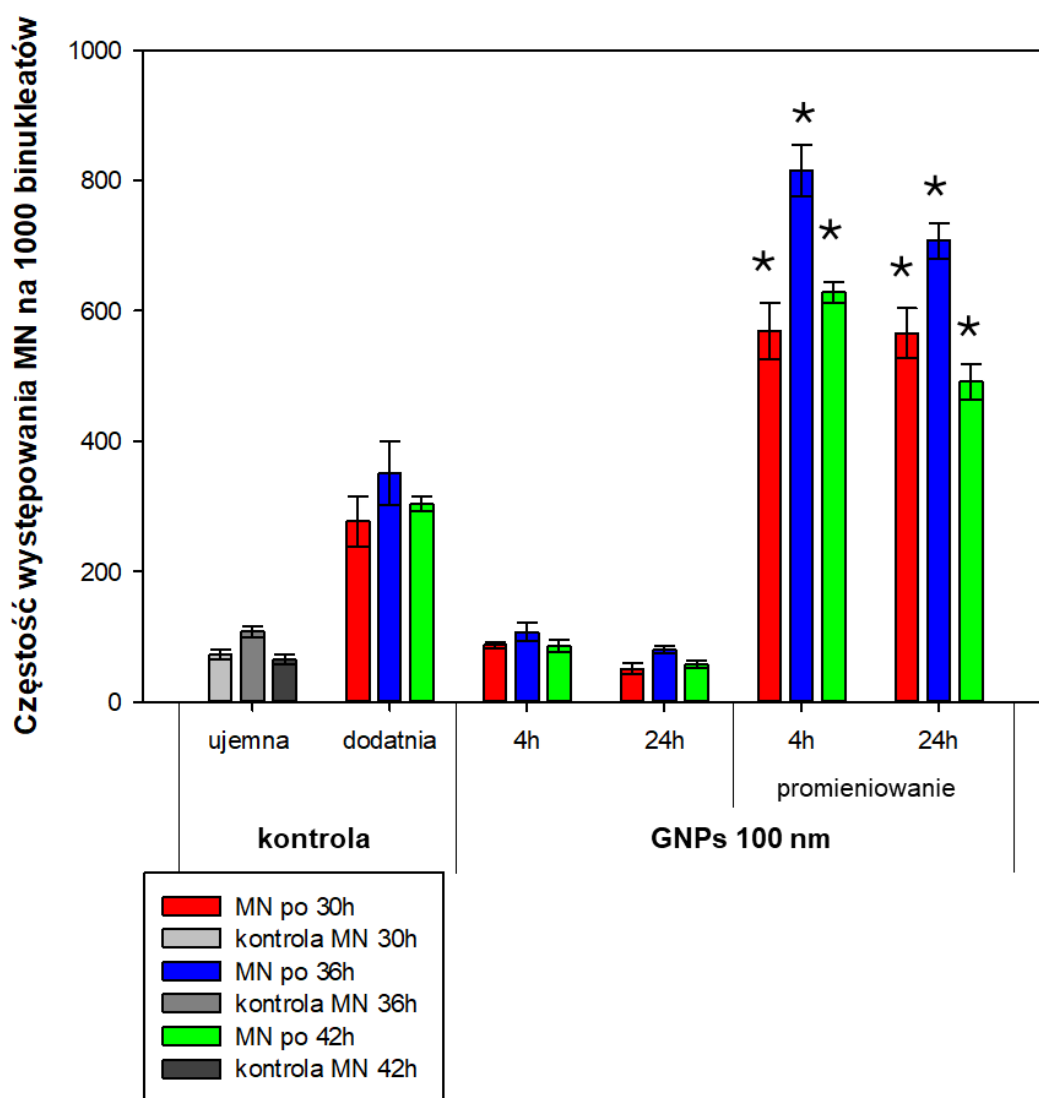
Rycina 46. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 47. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

W próbach eksperymentalnych z samymi dodanymi nanocząstkami największą częstość występowania mikrojąder tak samo zauważono w komórkach napromienionych. Analiza kinetyki częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 testem ANOVA i post-hoc Tukey'a wykazała, że z badań napromienionych z samymi nanocząstkami złota istotnie statystycznie są komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $569,00 \pm 43,31$, $p=0,000184$; po 36h: $815,33 \pm 38,89$, $p=0,000179$; po 42h: $628,33 \pm 16,26$, $p=0,000184$), GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $565,67 \pm 38,55$, $p=0,000184$; po 36h: $707,67 \pm 27,02$, $p=0,000179$; po 42h: $491,33 \pm 27,32$, $p=0,00249$) (*Rycina 46*), GNPs 50 nm z inkubacją 4h po 30h i 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $474,00 \pm 24,52$, $p=0,000241$; po 36h: $881,33 \pm 27,93$, $p=0,000179$) oraz GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia częstość występowania mikrojąder po 30h: $564,00 \pm 48,14$, $p=0,000184$; po 36h: $835,67 \pm 50,34$, $p=0,000179$; po 42h: $611,00 \pm 38,63$, $p=0,000185$) (*Rycina 47*). W komórkach nienapromienionych istotna statystycznie jest jedynie próba z GNPs 50 nm z inkubacją 4h z utrwaleniem po 36h (średnia częstość występowania mikrojąder po 36h: $64,67 \pm 9,50$, $p=0,0141$) (*Rycina 47*). W eksperymentach nienapromienionych z GNPs 100 nm żadna z prób nie jest istotna statystycznie.

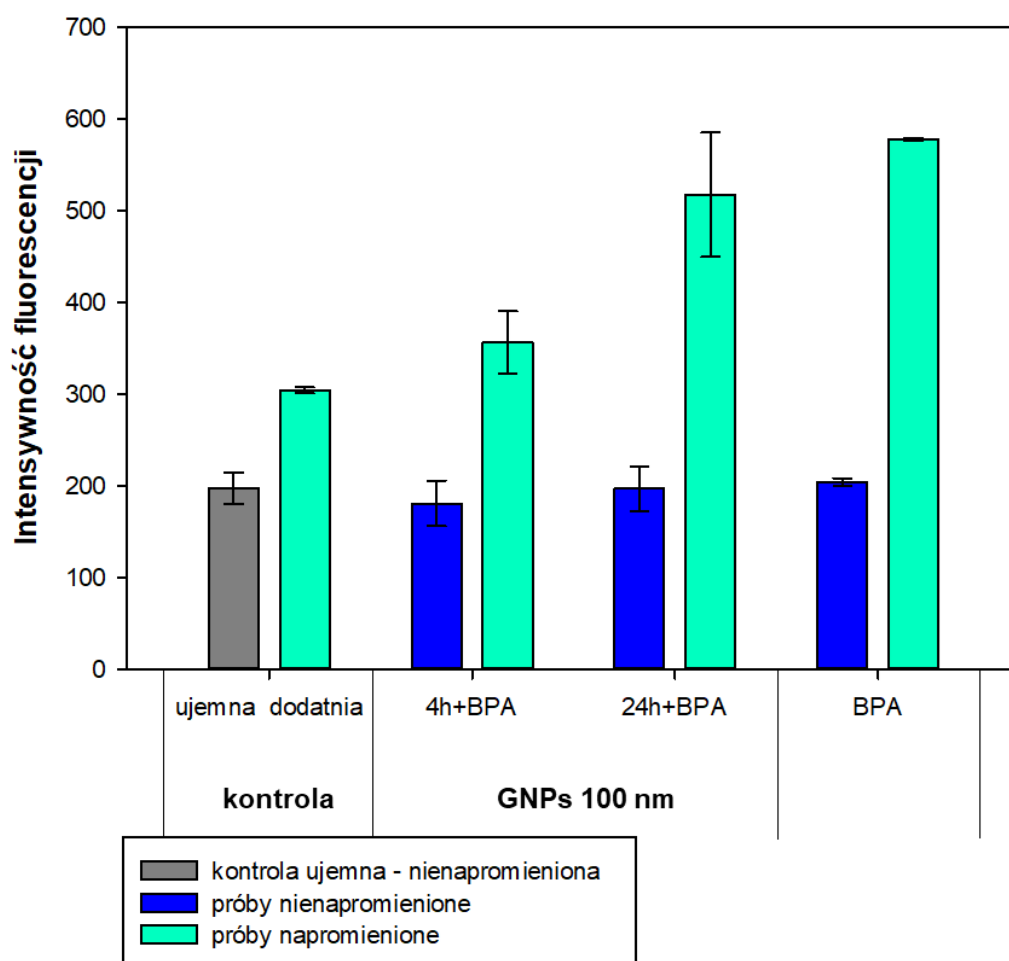
Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA miała na celu sprawdzenie wpływu różnego traktowania nanocząstkami złota i BPA oraz wpływu promieniowania mieszanego na kinetykę częstości występowania mikrojąder w komórkach nowotworowych piersi MCF-7. Analizowano próby eksperymentalne porównując wyniki komórek napromienionych do kontroli napromienionej oraz komórek nienapromienionych do kontroli nienapromienionej. Wykonano także test post-hoc Tukey'a dla każdego czasu utrwalania z osobna ze względu na dużą ilość różnych prób eksperymentalnych. Dokładne wyniki z testu post-hoc zawarte są w tabelach w *Suplemencie*. Wartości p poszczególnych prób badawczych są na podobnym poziomie, co oznacza, że komórki MCF-7 wykazywały podobny efekt w częstości występowania mikrojąder. Z analizy wynika również, że w przypadku komórek MCF-7 czas inkubacji z GNPs jest istotny i większą częstość mikrojąder obserwuje się w próbach z inkubacją 4-godzinną przed napromienianiem. Dodanie samego BPA do komórek MCF-7 nie powoduje istotnie statystycznie zmiany w kinetyce częstości występowania mikrojąder w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm z inkubacją 4h po 36h) również istotnie statystycznie wpływają na kinetykę częstości występowania mikrojąder w porównaniu do kontroli ujemnej.

W przypadku eksperymentu napromienionego z samym BPA wykazano istotność statystyczną w porównaniu do kinetyki częstości występowania mikrojąder w kontroli dodatniej (napromienionej). Porównując do komórek napromienionych z BPA wyniki ze wszystkich prób eksperymentalnych z GNPs i BPA wykazano, że istotna statystycznie są wszystkie komórki napromienione z dodanymi GNPs zarówno 100 nm, jak i 50 nm bez względu na czas inkubacji.

4.6. Analiza intensywności fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach nowotworowych piersi hodowanych *in vitro*

4.6.1. Wyniki intensywności fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach linii nowotworowej MDA-MB-231

Wyniki z intensywności fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach linii komórkowej MDA-MB-231 przedstawiono na Rycinach 48 - 51.



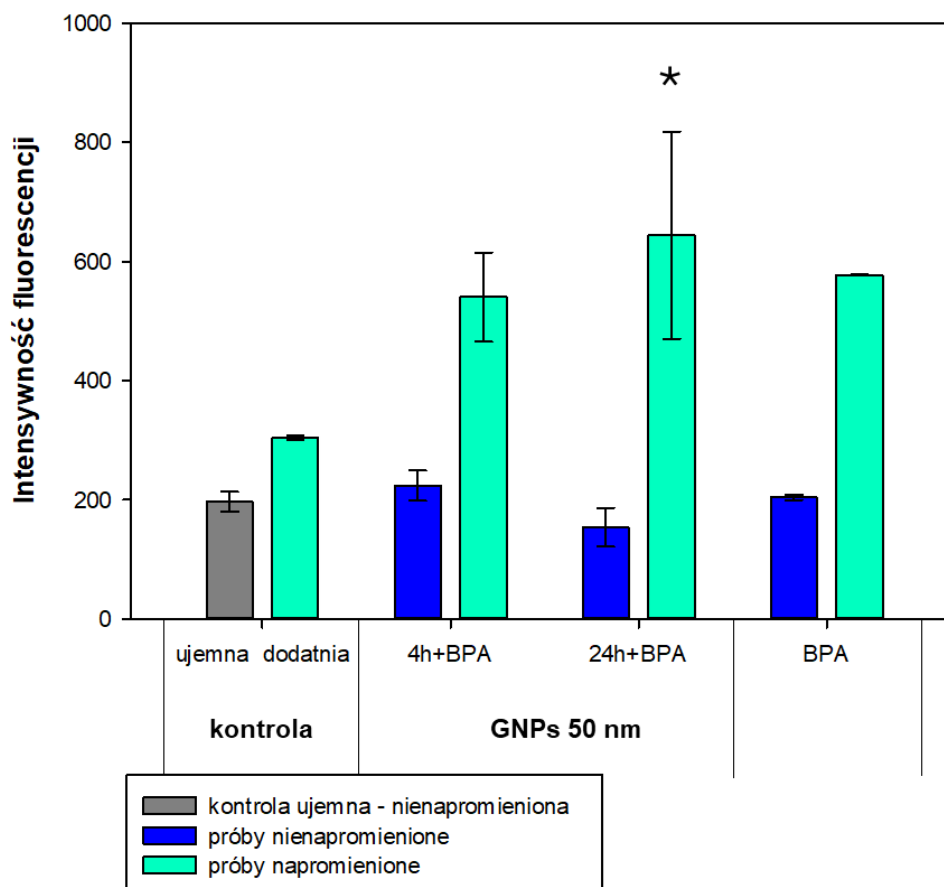
Rycina 48. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 49. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

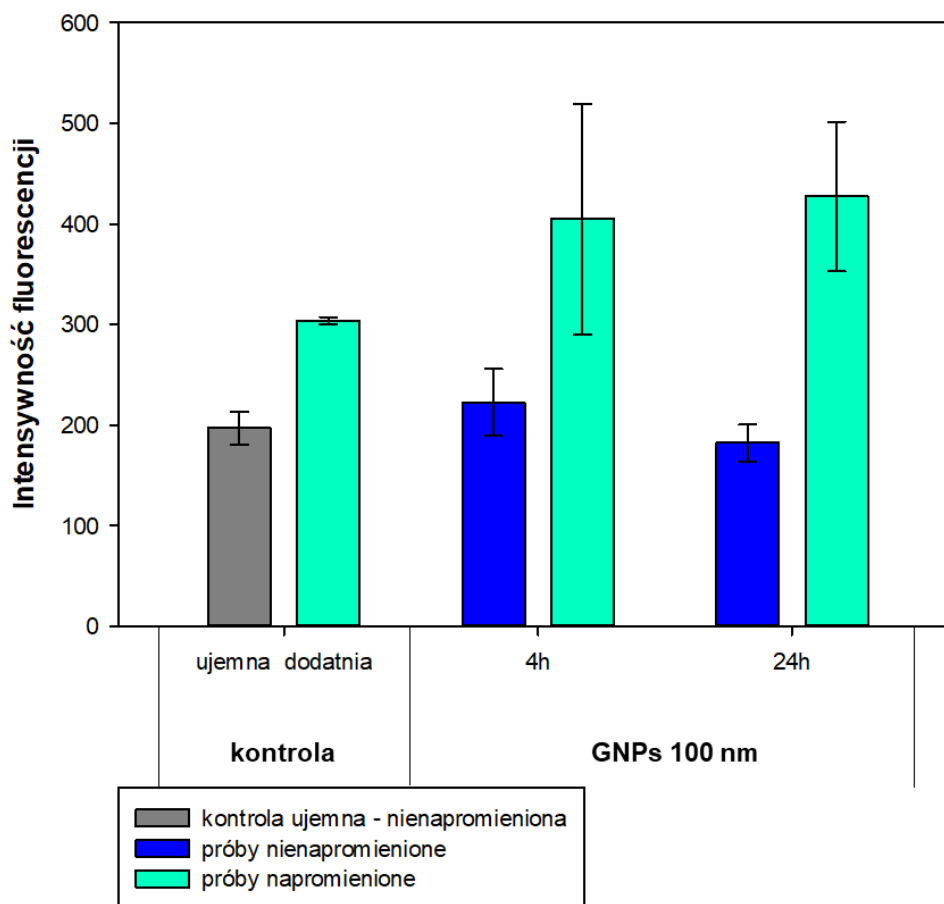
kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

W linii komórkowej MDA-MB-231 w teście γ -H2AX, intensywność fluorescencji wzrasta po poddaniu komórek działaniu promieniowania mieszanego. Oznacza to, że wzrasta poziom histonu H2AX, co świadczy o wzroście poziomu uszkodzeń DNA w danych komórkach. Pomimo widocznego trendu na wykresie, istotność statystyczną wykazano tylko

w eksperymencie napromienionym z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia intensywność fluorescencji: $644,00 \pm 173,95$; $p=0,012$) (Rycina 49). Z badań z dodanymi GNPs 100 nm z BPA nie wykazano istotności statystycznej w żadnej z prób badanych (Rycina 48).



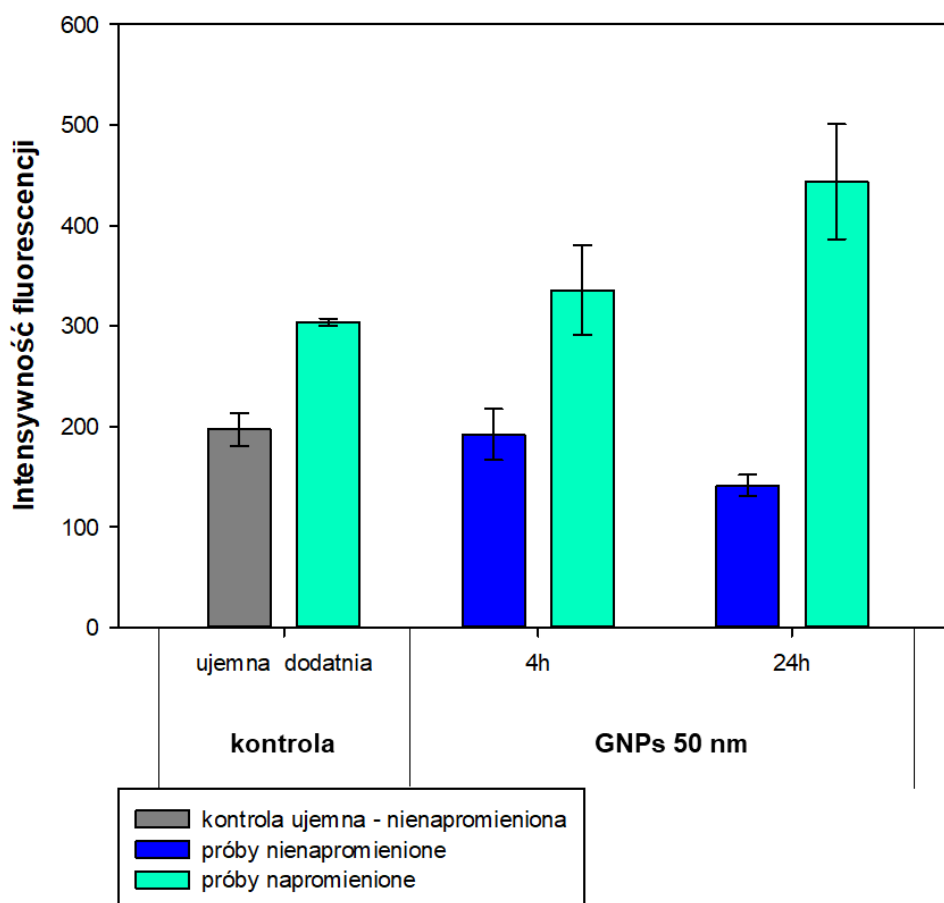
Rycina 50. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p<0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p<0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 51. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

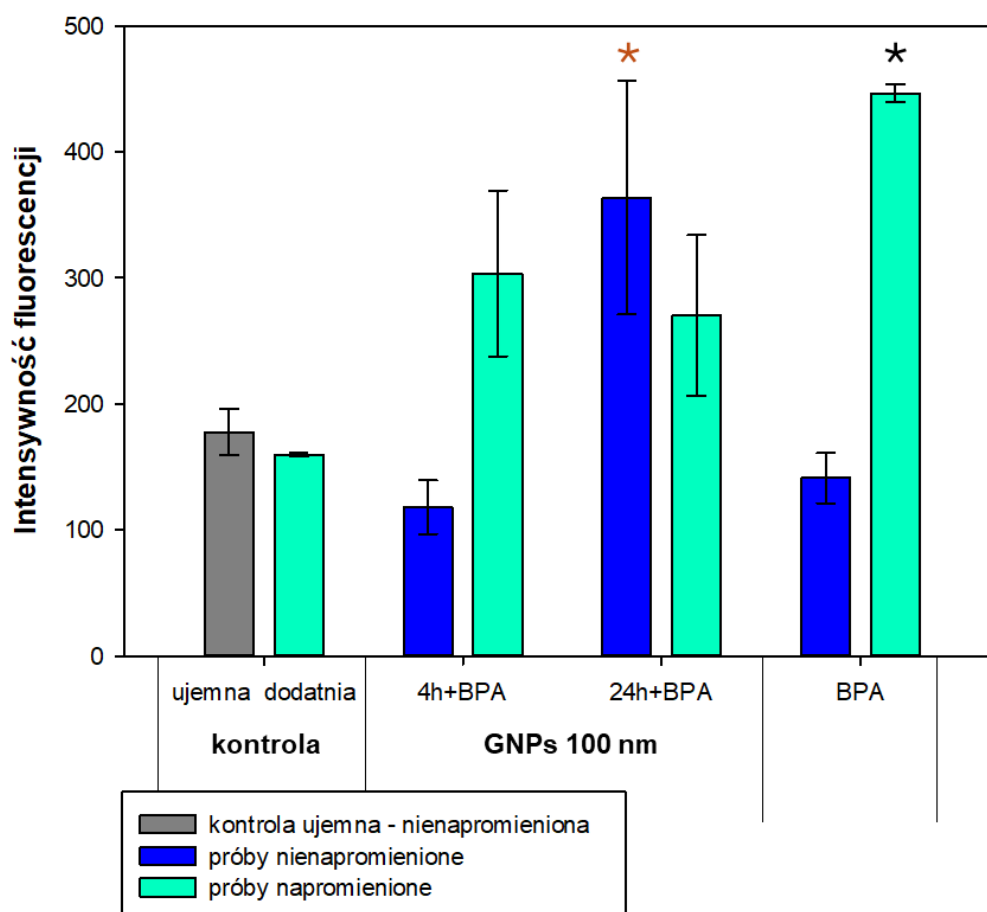
Powyżej przedstawione są wyniki z linii komórkowej MDA-MB-231 z testu ognisk naprawczych γ -H2AX z prób badawczych z samymi nanocząstkami złota. Po napromienieniu intensywność fluorescencji wzrasta odnośnie poziomu ognisk naprawczych i obecności histonu

w poszczególnych próbach. Pomimo widocznego trendu na Rycinach 50-51, nie wykazano istotności statystycznej w żadnej z badanych prób eksperymentalnych.

W celu analizy wyników, wykonano jednoczynnikowy test analizy wariancji ANOVA oraz test post-hoc Tukey'a. Celem tej analizy było zbadanie wpływu różnego traktowania komórek MDA-MB-231 na intensywność fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX. Porównywano eksperymenty napromienione do kontroli napromienionej (dodatniej) oraz eksperymenty nienapromienione do kontroli nienapromienionej (ujemnej). Szczegółowe wyniki analizy statystycznej zawarte są w tabelach w *Suplemencie*. Wykazano, że wartość $p < 0,05$ ma tylko jedna próba eksperymentalna z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA potraktowana promieniowaniem, co oznacza, że jest istotna statystycznie. Takie traktowanie komórek MDA-MB-231 najbardziej zwiększa intensywność fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX, co świadczy o największym stopniu uszkodzenia DNA. Wyniki z reszty prób badawczych nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Dodanie samego BPA do komórek MDA-MB-231 nie powoduje istotnej statystycznie zmiany w indukcji ognisk naprawczych w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota również nie wpływa w sposób istotny statystycznie na intensywność fluorescencji białka γ -H2AX w porównaniu do kontroli ujemnej. W przypadku próby eksperymentalnej napromienionej z samym BPA nie wykazano istotności statystycznej w porównaniu do kontroli dodatniej (napromienionej). Co więcej, żadne badania napromienione z GNPs i BPA nie są istotne statystycznie w porównaniu do próby napromienionej z samym BPA.

4.6.2. Wyniki intensywności fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach linii nowotworowej MCF-7

Wyniki z intensywności fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach linii komórkowej MCF-7 przedstawiono na Rycinach 52 - 55.



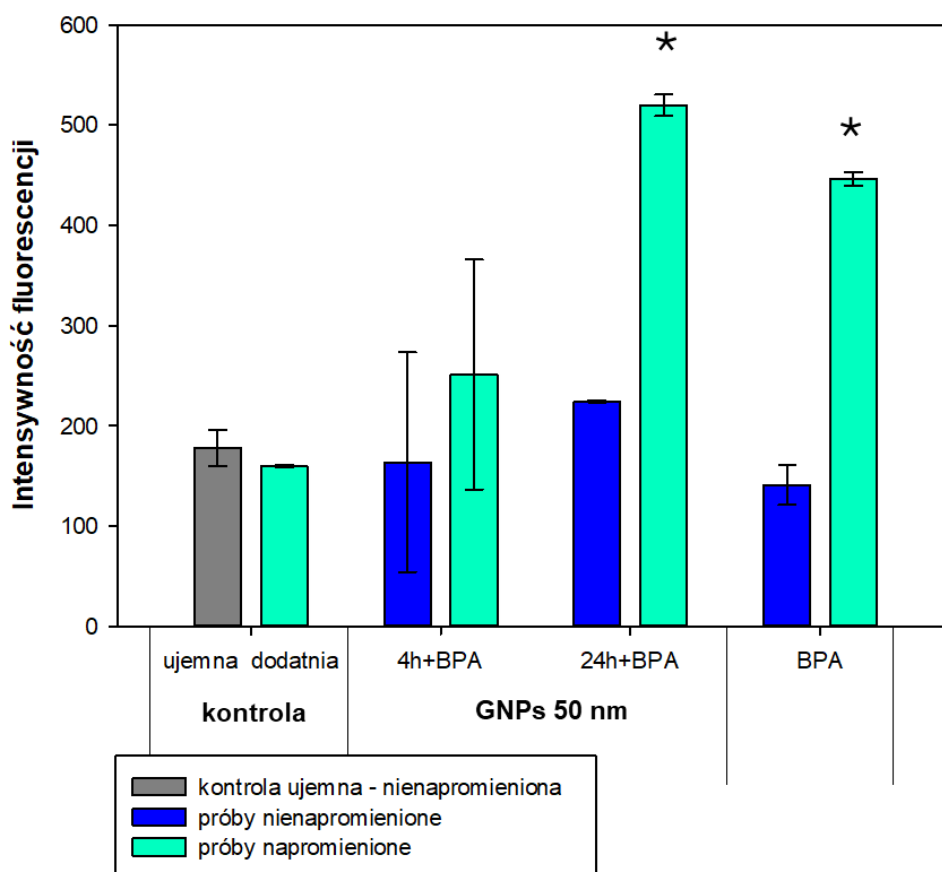
Rycina 52. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 53. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

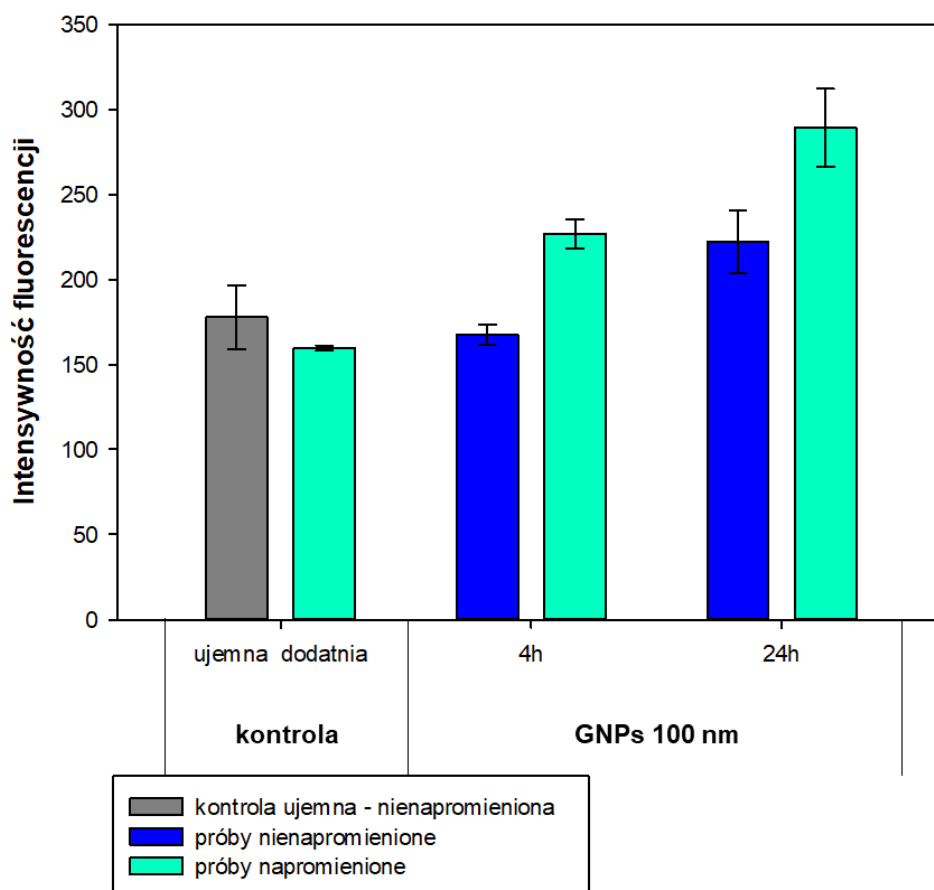
kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

W linii komórkowej MCF-7 w teście γ -H2AX, intensywność fluorescencji wzrasta po poddaniu komórek działaniu promieniowania neutronowego w porównaniu do kontroli. Wykazano w analizie statystycznej, że istotnie statystycznie są eksperymenty napromienione: z samym BPA (średnia intensywność fluorescencji: $446,00 \pm 7,07$; $p = 0,000230$) (Rycina 52-

53) oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia intensywność fluorescencji: $519,50 \pm 10,61$; $p=0,000658$) (Rycina 53). Z prób badawczych nienapromienionych istotna statystycznie jest traktowana GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia intensywność fluorescencji: $363,50 \pm 92,63$; $p=0,0175$) (Rycina 52).



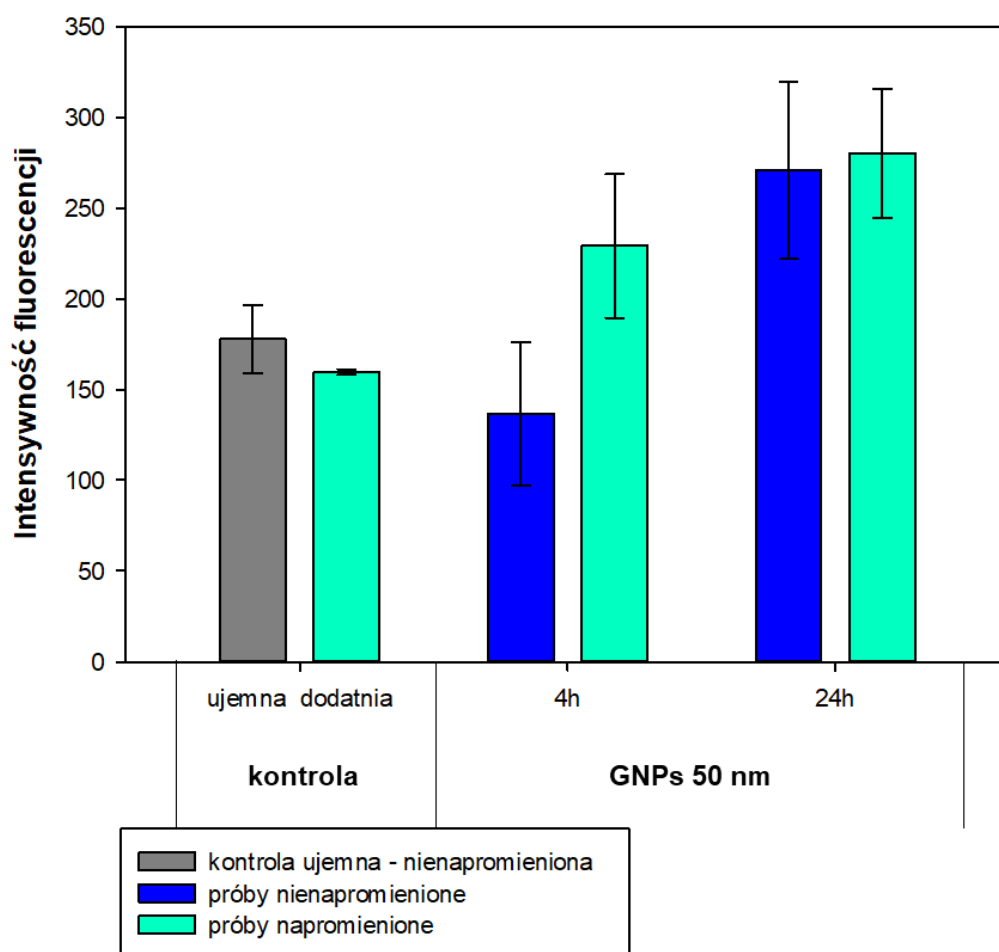
Rycina 54. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p<0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p<0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 55. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Powyżej przedstawione są wyniki z linii komórkowej MCF-7 z testu ognisk naprawczych γ -H2AX z prób badawczych z dodanymi samymi nanocząstkami złota. Po napromienieniu intensywność fluorescencji bardzo nieznacznie wzrasta w poszczególnych

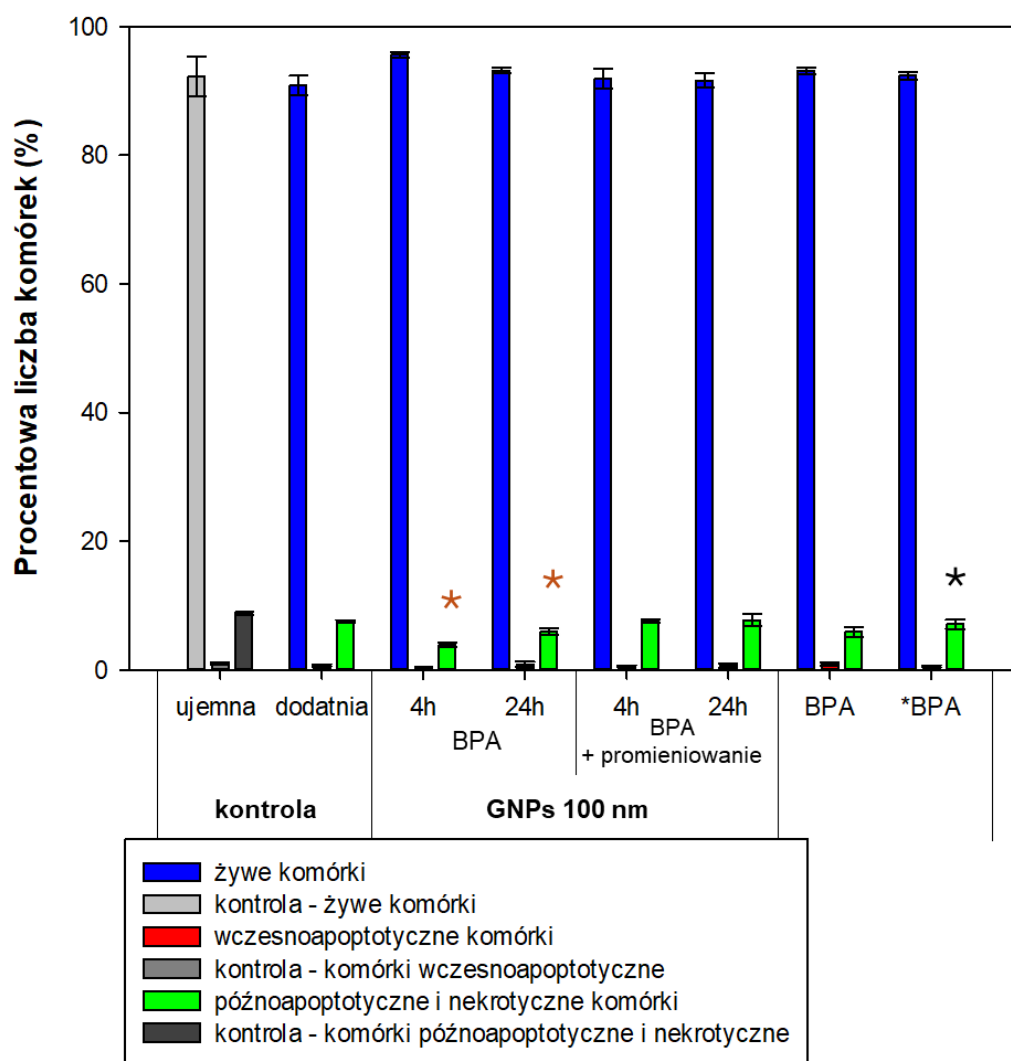
próbach eksperymentalnych. Pomimo widocznego trendu na Rycinach 54-55, nie wykazano istotności statystycznej w żadnej z badanych prób.

W celu analizy wyników, wykonano jednoczynnikowy test analizy wariancji ANOVA. Celem tej analizy było zbadanie wpływu różnego traktowania komórek MCF-7 na intensywność fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX. Porównywano eksperymenty napromienione do kontroli napromienionej (dodatniej) oraz badania nienapromienione do kontroli nienapromienionej (ujemnej). Dodatkowo wykonano analizę post-hoc Tukey'a ze względu na dużą ilość różnych prób eksperymentalnych. Szczegółowe wyniki analizy zawarto w tabelach w *Suplemencie*. W analizie statystycznej wykazano, że wartość $p < 0,05$ mają komórki nienapromieniona z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z dodanym BPA oraz komórki napromienione – GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA oraz z samym BPA. Otrzymane wyniki sugerują, że GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA wraz z promieniowaniem istotnie wpływają na intensywność fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX, a co za tym idzie na poziom uszkodzeń DNA. Zaobserwowano także, że same GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA bez napromienienia w istotny sposób zwiększyły poziom intensywności fluorescencji względem kontroli ujemnej. Wyniki z reszty prób eksperymentalnych nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Jak w przypadku komórek MDA-MB-231, dodanie samego BPA do komórek MCF-7 nie powoduje istotnej statystycznie zmiany w indukcji ognisk naprawczych w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota również nie wpływa w sposób istotny statystycznie na intensywność fluorescencji białka γ -H2AX w porównaniu do kontroli ujemnej. W przypadku próby badawczej napromienionej z samym BPA wykazano istotność statystyczną w porównaniu do kontroli dodatniej (napromienionej) w kwestii poziomu intensywności fluorescencji γ -H2AX. Z eksperymentów napromienionych z GNPs i BPA, jedna tylko próba z GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA jest istotna statystycznie w porównaniu do próby napromienionej z samym BPA.

4.7. Analiza poziomu apoptozy w komórkach nowotworowych piersi hodowanych *in vitro*

4.7.1. Wyniki analizy częstości apoptozy w komórkach linii nowotworowej MDA-MB-231

Wyniki analizy poziomu apoptozy komórek MDA-MB-231 zaprezentowano na Rycinach 56 – 63.



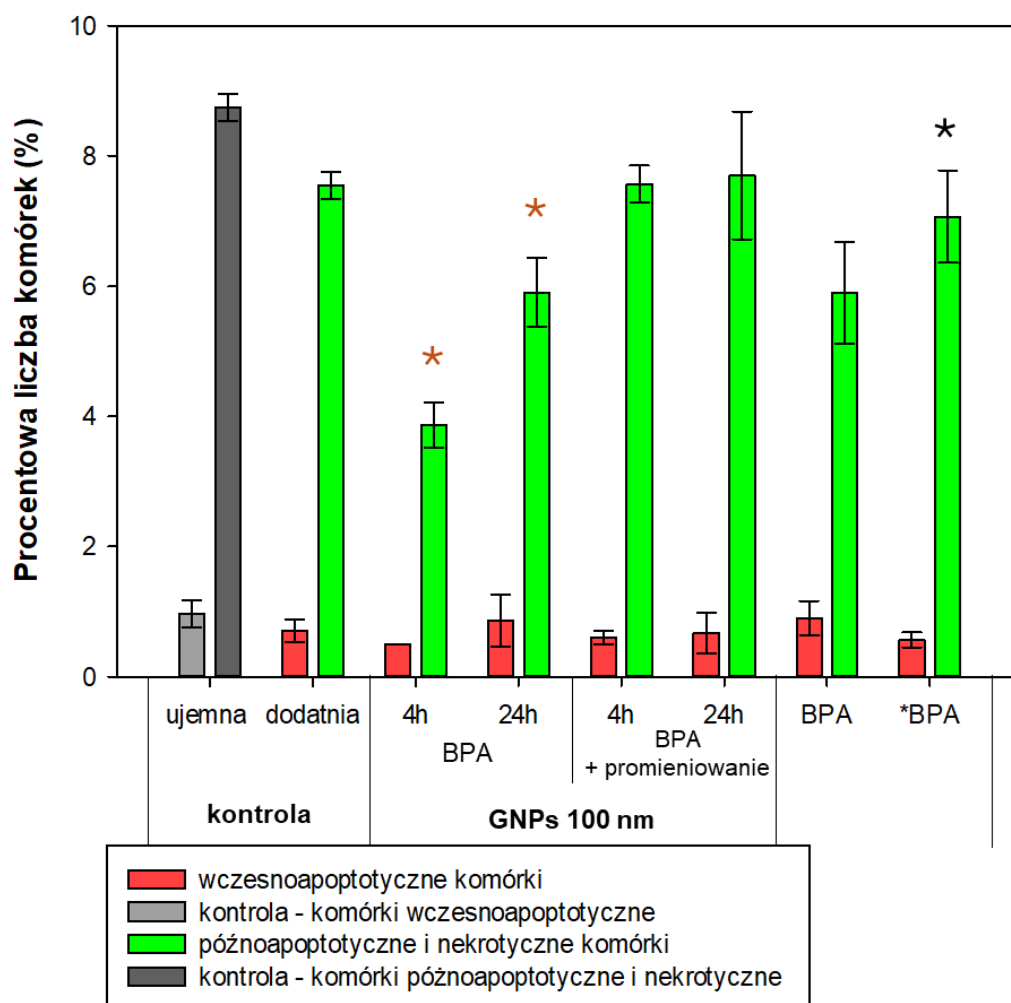
Rycina 56. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



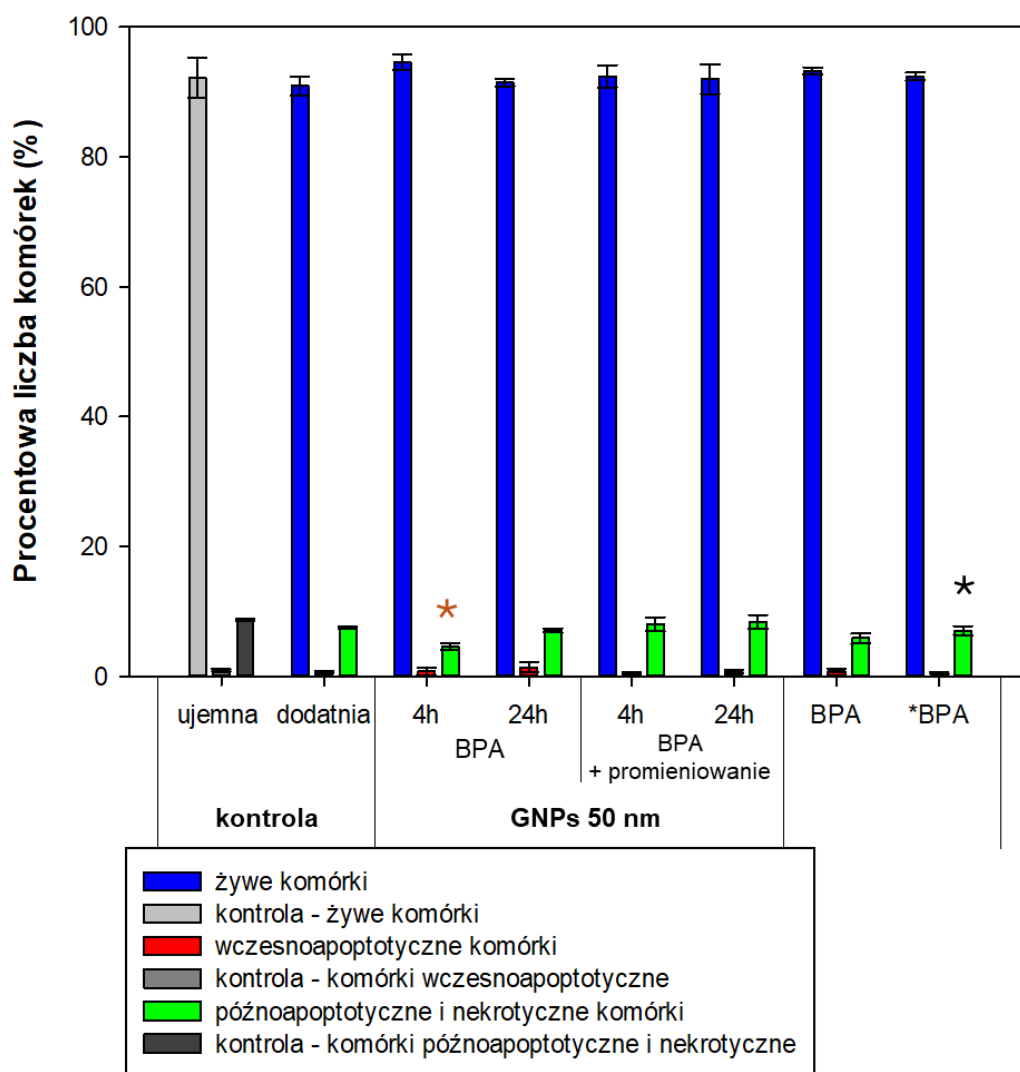
Rycina 57. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej - napromienionej)



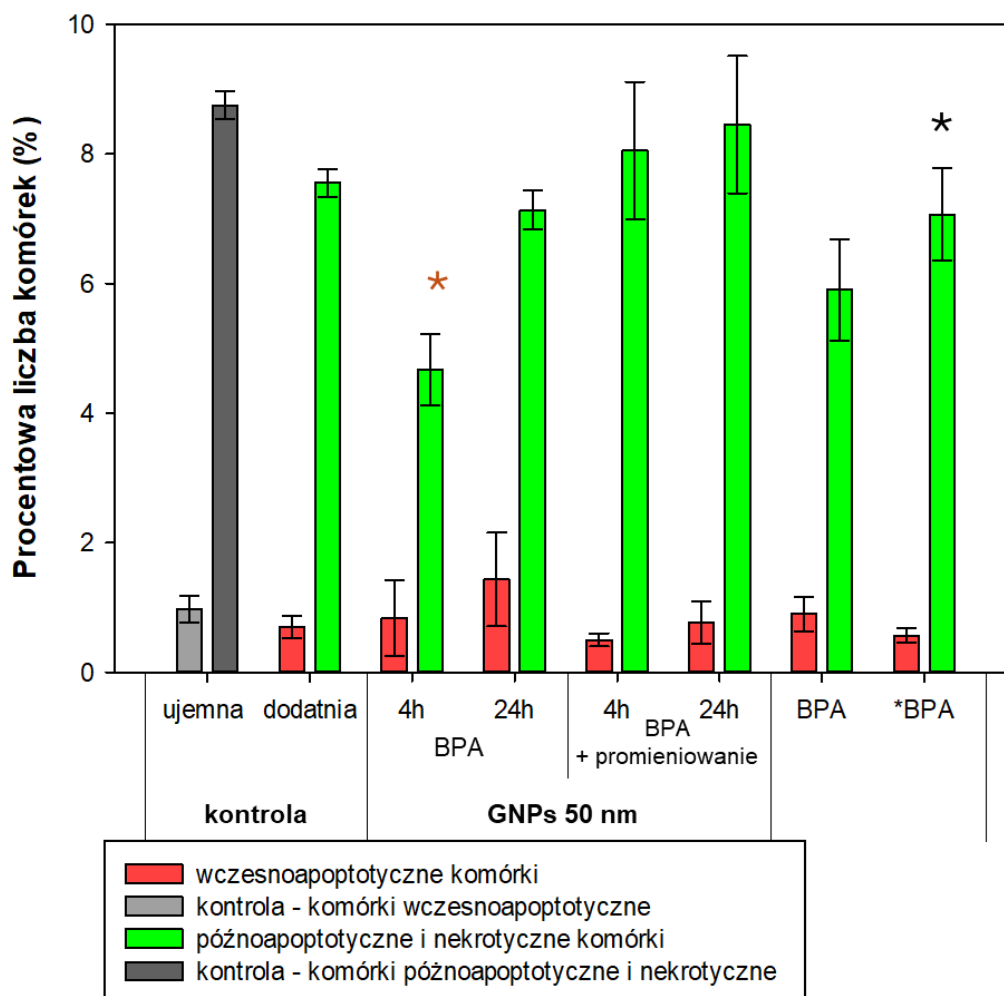
Rycina 58. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 59. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

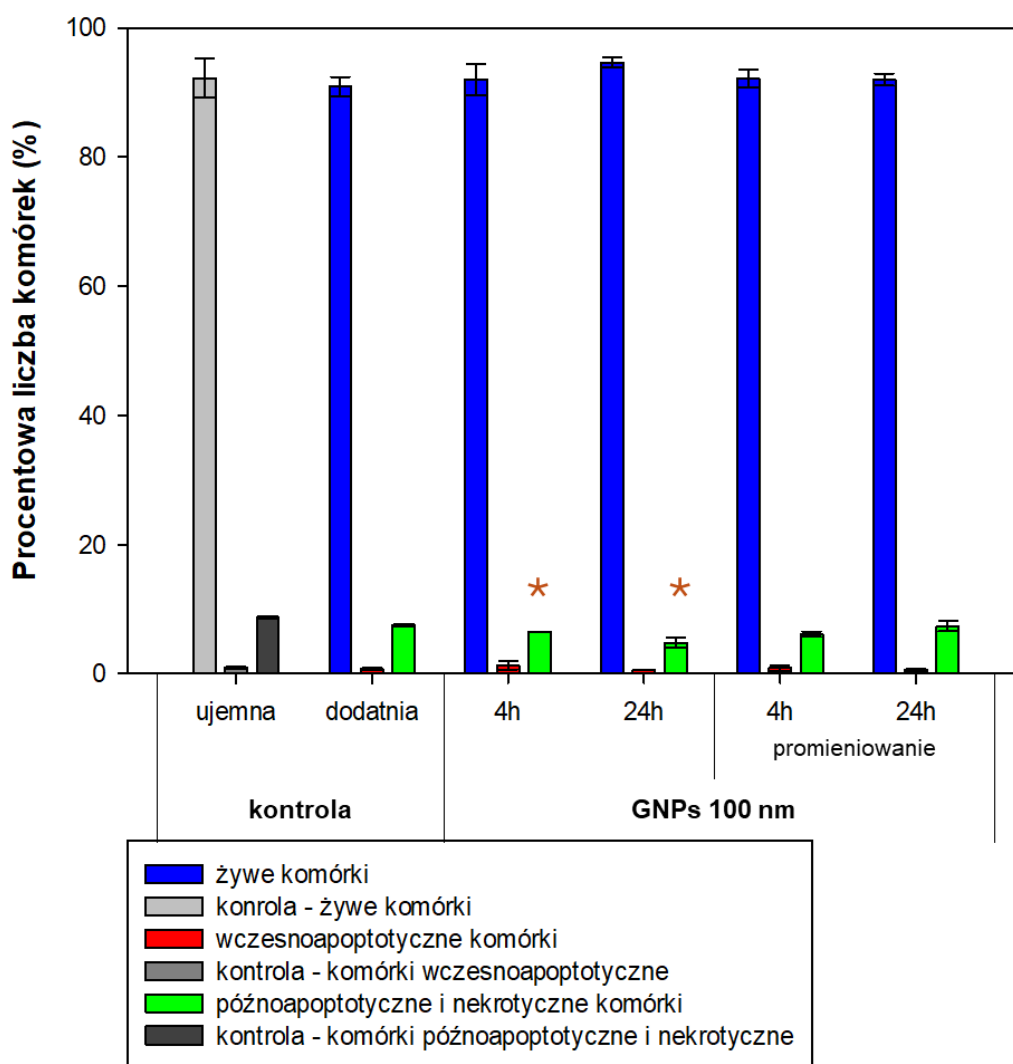
GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Powyżej na Rycinach 56 – 59 przedstawiono wyniki częstość spontanicznej oraz popromiennej apoptozy komórek dla linii komórkowej MDA-MB-231. Są to wyniki z prób badawczych z dodanymi nanocząstkami złota i z BPA. Na wykresach zaobserwowano nieznaczne fluktuacje w procentowej liczbie poszczególnych rodzajów komórek (kolejno: żywych komórek, wczesnoapoptotycznych komórek oraz późnoapoptotycznych i nekrotycznych komórek) w niektórych eksperymentach w badanej populacji 20 000 komórek. Analiza kinetyki częstości apoptozy w komórkach MDA-MB-231 testem ANOVA i post-hoc Tukey’a wykazała, że z komórek napromienionych żadna nie jest istotna statystycznie. Natomiast, z badań nienapromienionych istotne statystycznie są komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $3,87 \pm 0,35$; $p=0,000193$), GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $5,90 \pm 0,53$; $p=0,00102$) (*Rycina 56-57*), GNPs 50 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $4,67 \pm 0,55$; $p=0,000197$) (*Rycina 58-59*) oraz samym BPA (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $5,90 \pm 0,78$; $p=0,00102$) (*Rycina 56-59*). We wszystkich tych eksperymentach istotna statystycznie różnica występuje w procentowej liczbie komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych. Otrzymane wyniki w komórkach napromienianych z nanocząstkami złota z BPA są porównywalne między sobą i nie zauważono większej różnicy w przypadku zastosowania innych wielkości nanocząstek czy też czasów inkubacji.



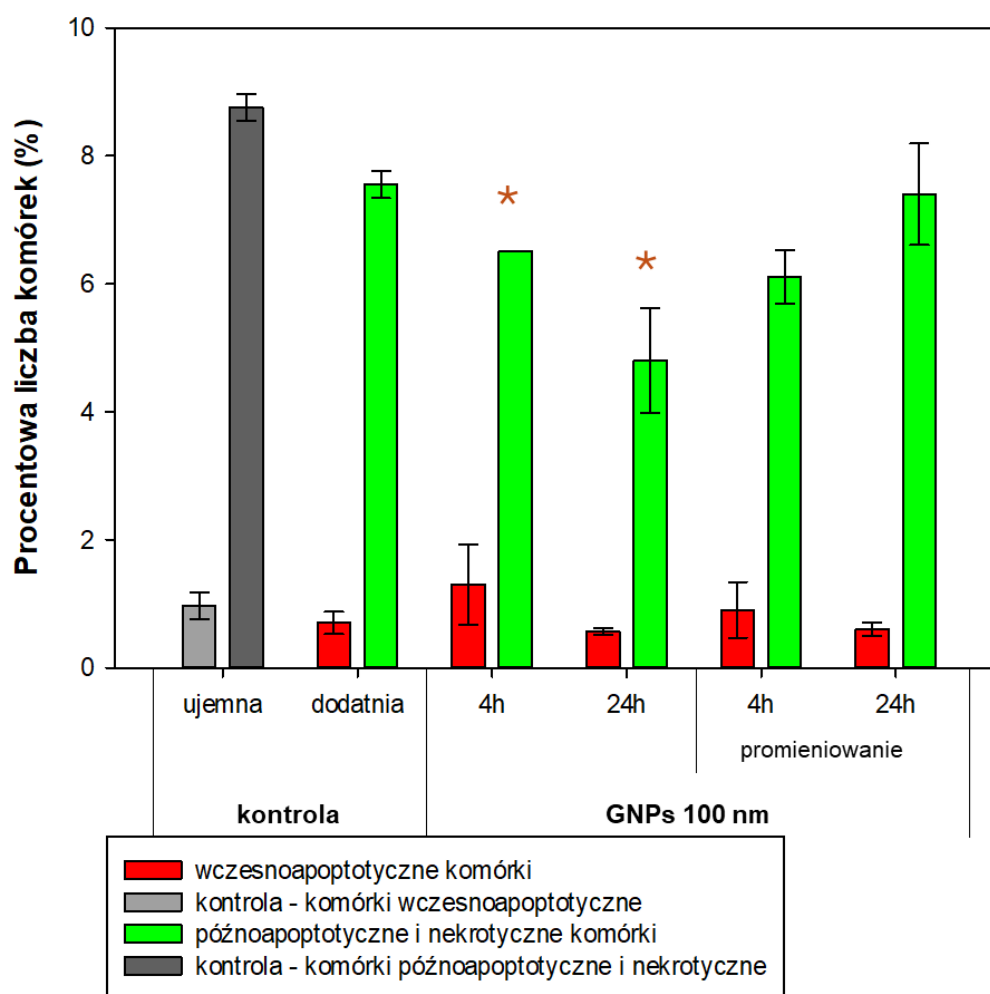
Rycina 60. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



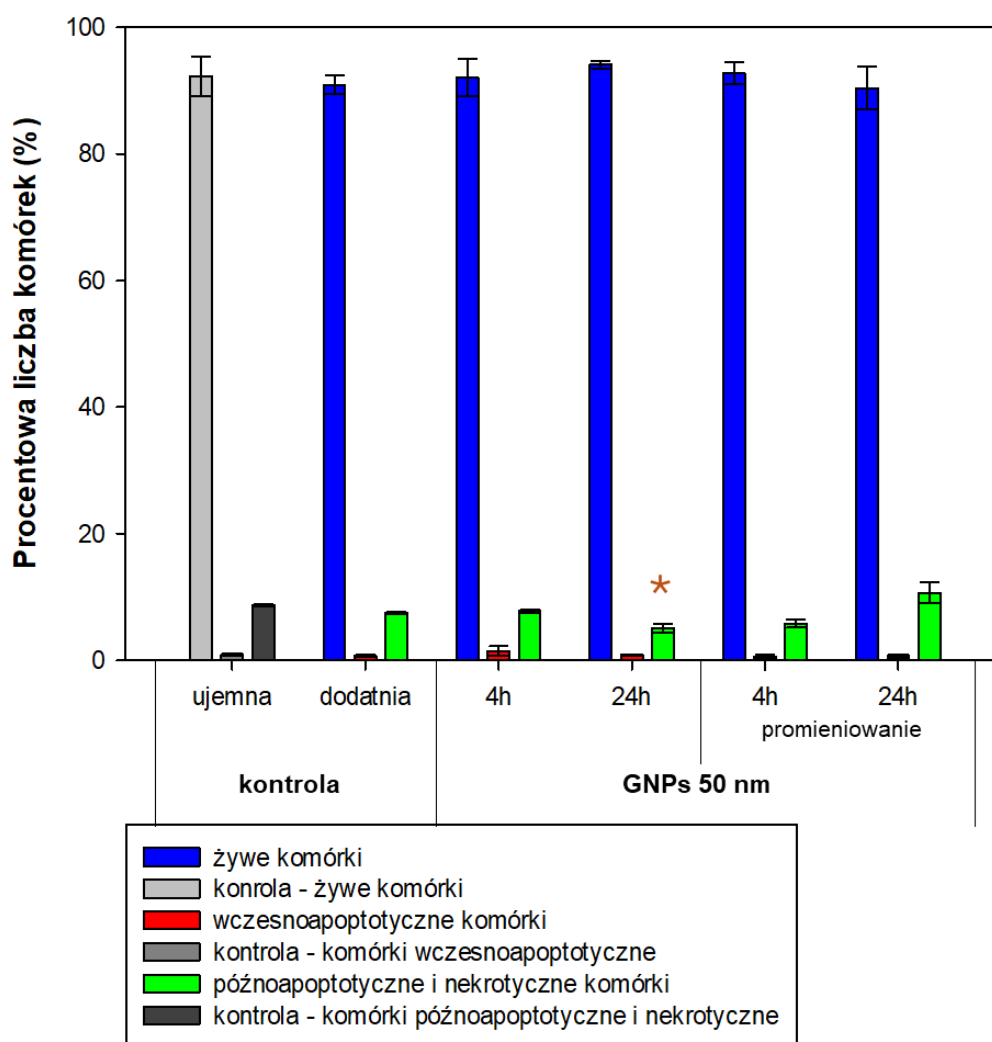
Rycina 61. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* -nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*:p<0,05 (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*:p<0,05 (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



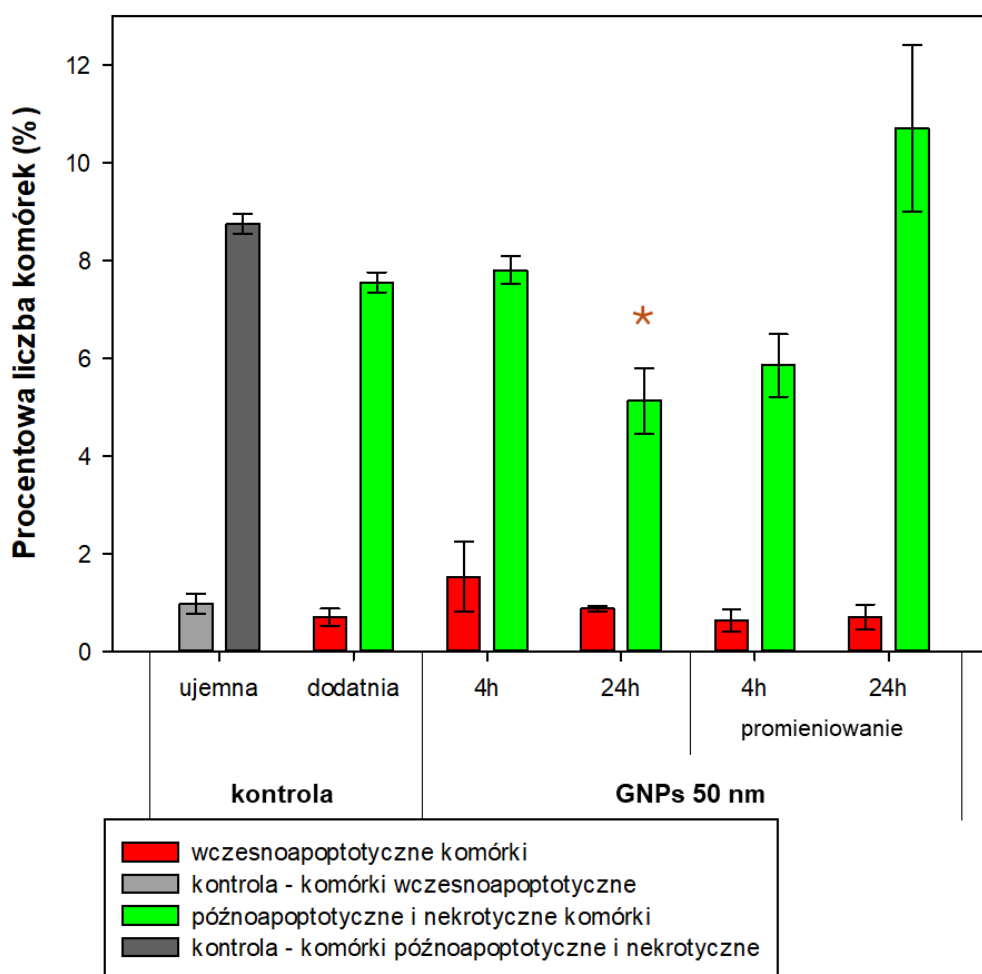
Rycina 62. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 63. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

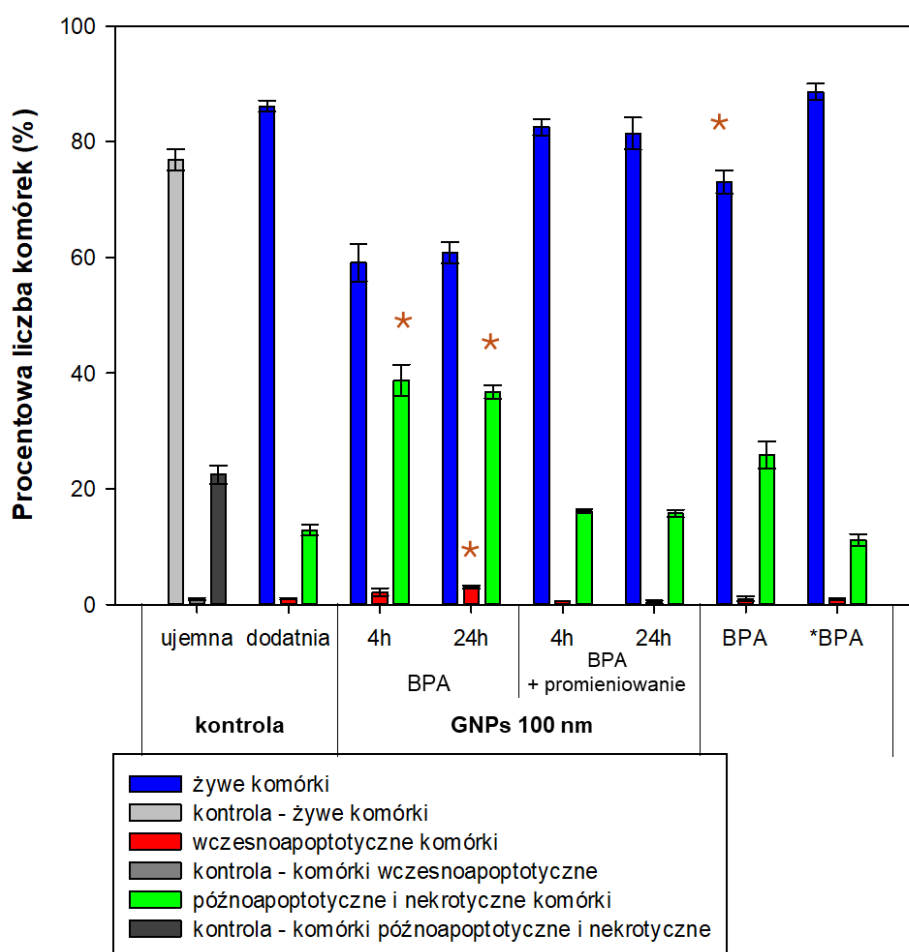
*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Na Rycinach 60 - 63 zaprezentowano wyniki z prób badawczych napromienionych lub nienapromienionych z samymi GNPs. Badana populacja wynosiła 20 000 komórek. W analizie statystycznej wykazano, że żadna z prób badawczych traktowanych promieniowaniem nie jest istotna statystycznie, co oznacza, że GNPs wraz z promieniowaniem nie wpływają w znaczący sposób na poziom apoptozy. W eksperymentach nienapromienionych istotne statystycznie są komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $6,50 \pm 0,00$; $p=0,0203$), GNPs 100 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $4,8 \pm 0,82$; $p=0,000201$) (*Rycina 60-61*) oraz GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $7,13 \pm 0,31$; $p=0,000227$) (*Rycina 62-63*).

Wyniki przeanalizowano za pomocą dwuczynnikowego testu analizy wariancji ANOVA oraz testu post-hoc Tukey'a. Analiza ta miała na celu sprawdzenie wpływu różnego traktowania nanocząstkami złota i BPA oraz wpływu promieniowania mieszanego na częstość występowania apoptozy w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231. Analizowano próby eksperymentalne porównując wyniki próbek napromienionych do kontroli napromienionej, natomiast próby nienapromienione do kontroli nienapromienionej. Szczegółowe wyniki analizy statystycznej zawarto w tabelach w *Suplemencie*. Wykazano, że wartości $p < 0,05$ nie miała żadna z napromienionych prób eksperymentalnych porównując je do kontroli dodatniej (napromienionej), co oznacza, że różnice pomiędzy procentową liczbą żywych, wczesnoapoptotycznych i późnoapoptotycznych komórek nie były istotne statystycznie. Przeciwnie było natomiast z komórkami nienapromienionymi, gdzie zaobserwowano w większości eksperymentach istotność statystyczną w poziomie komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych. Dodanie samego BPA do komórek MDA-MB-231 powoduje istotną statystycznie zmianę w częstości apoptozy jedynie w grupie komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej), gdzie zauważamy ich spadek. Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm z inkubacją 4h i 24h oraz GNPs 50 nm z inkubacją 24h) również wpływa w sposób istotny statystycznie na poziom apoptozy w porównaniu do kontroli ujemnej w podobny sposób jak samo BPA, czyli zmniejsza się procentowy udział komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych. W przypadku komórek napromienionych z samym BPA nie wykazano istotności statystycznej w porównaniu do kontroli dodatniej w kwestii częstości występowania apoptozy. Żadna z prób napromienionych z GNPs i BPA nie jest istotna statystycznie w porównaniu do próby napromienionej z samym BPA.

4.7.2. Wyniki analizy częstości apoptozy w komórkach linii nowotworowej MCF-7

Wyniki częstości apoptozy komórek linii komórkowej MCF-7 zaprezentowano na Rycinach 64 - 71.



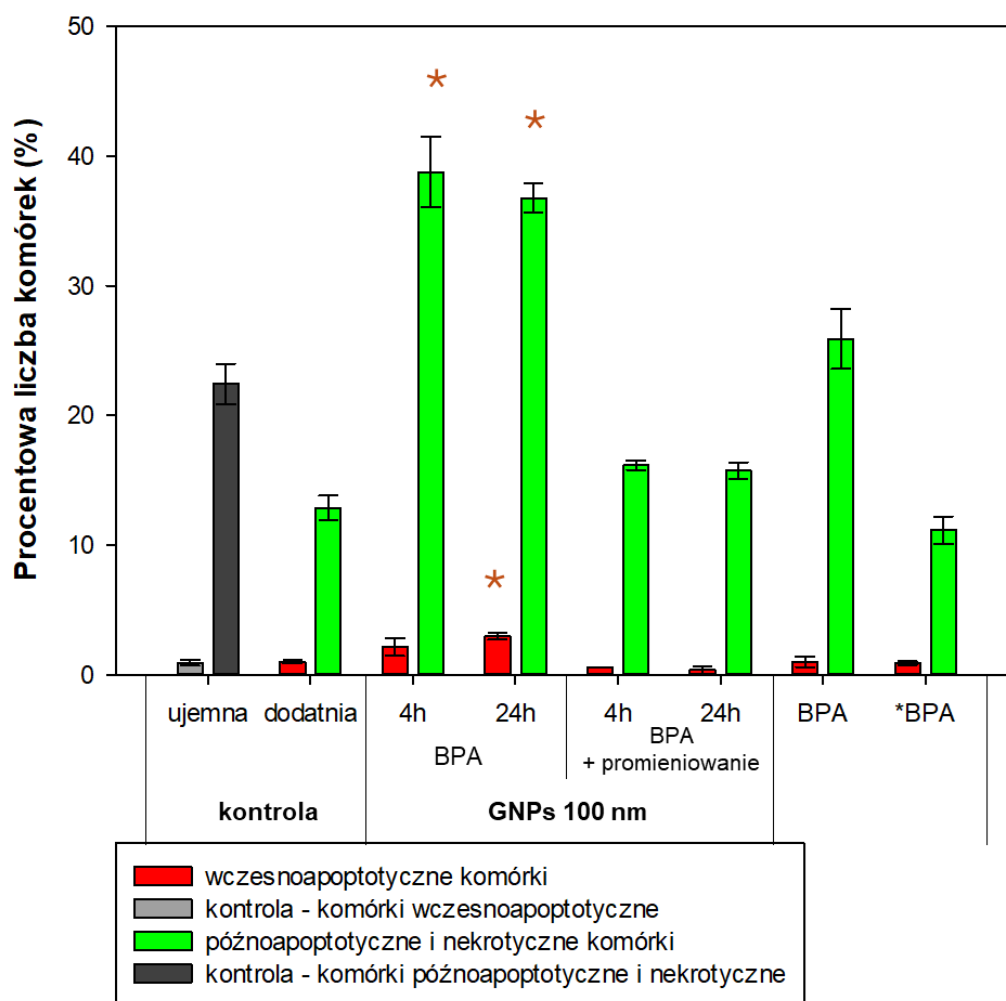
Rycina 64. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



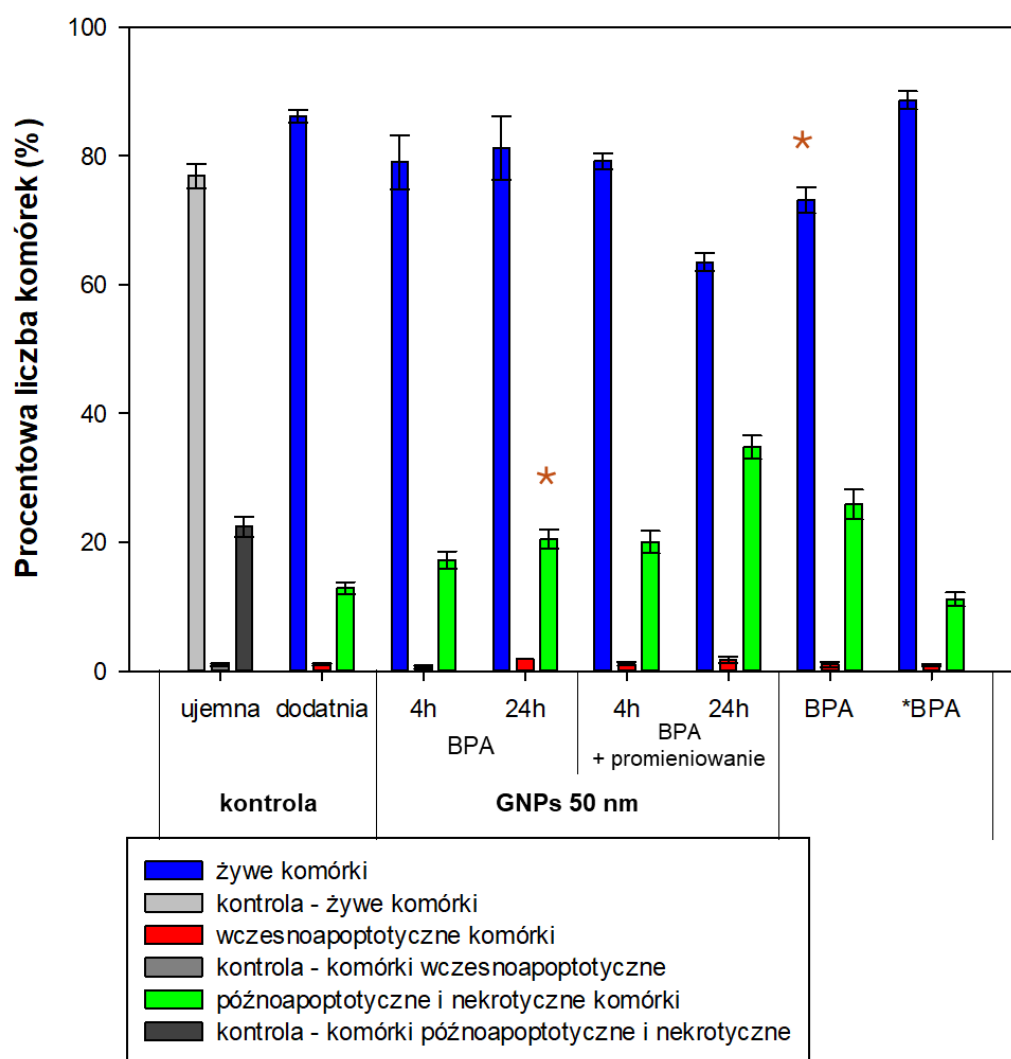
Rycina 65. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



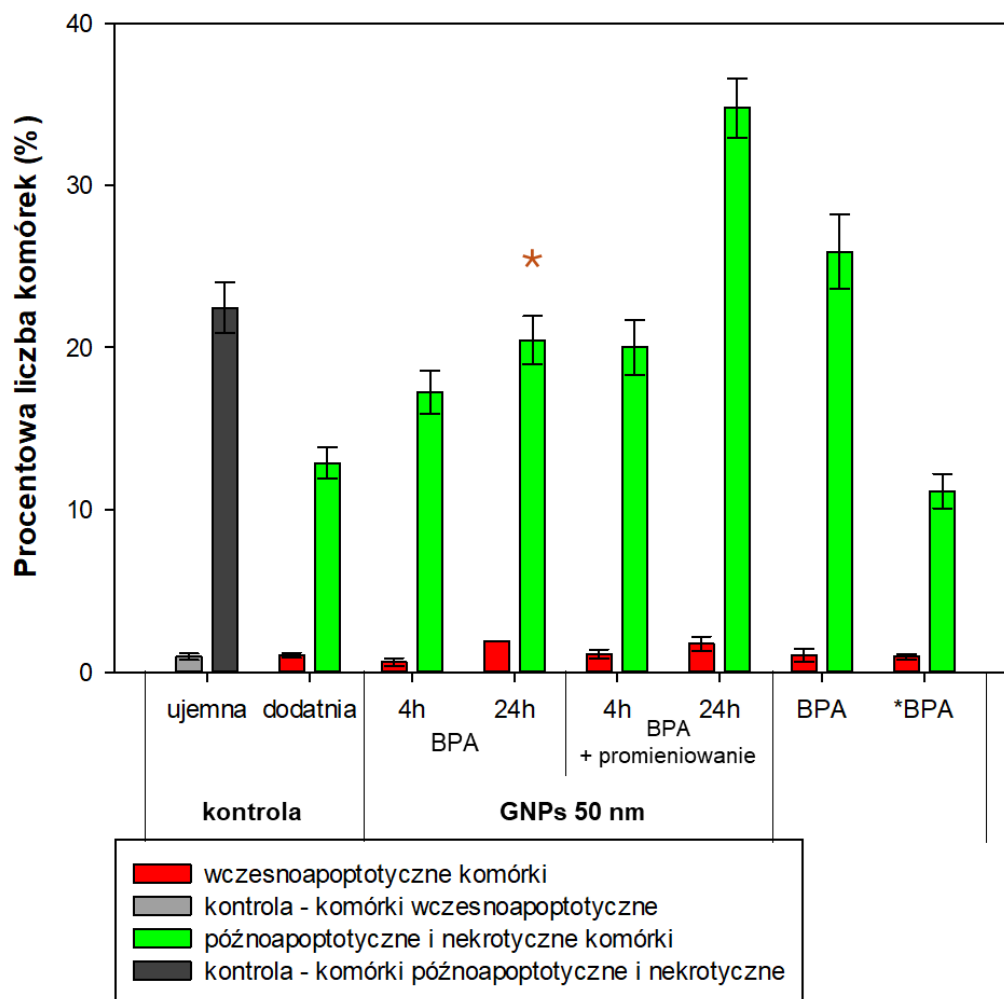
Rycina 66. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 67. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

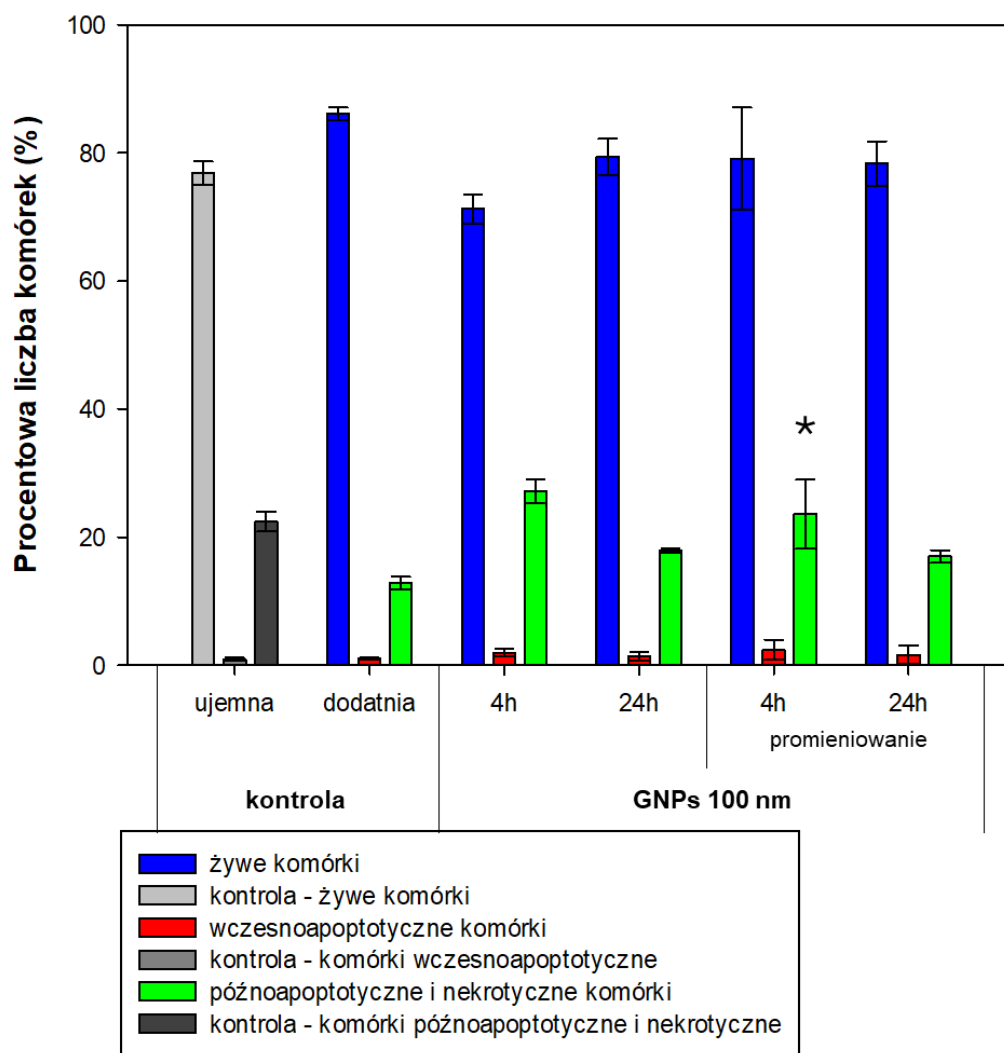
GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Powyżej na Rycinach 64 – 67 przedstawiono wyniki częstości apoptozy komórek dla linii komórkowej MCF-7. Są to wyniki z prób badawczych z dodanymi nanocząstkami złota i z BPA. Na wykresach zauważono znaczące różnice w średniej procentowej liczbie komórek w poszczególnych grupach kolejno żywych komórek, wczesnoapoptotycznych komórek oraz późnoapoptotycznych i nekrotycznych komórek. Badano populację 20 000 komórek. Analiza kinetyki częstości występowania apoptozy w komórkach MCF-7 testem ANOVA i post-hoc Tukey’a wykazała, że z eksperymentów napromienionych żadna nie jest istotna statystycznie, tak jak w przypadku komórek MDA-MB-231. Natomiast, z badań nienapromienionych istotne statystycznie są komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $38,77 \pm 2,72$; $p=0,000184$), GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek wczesnoapoptotycznych: $3,00 \pm 0,28$, $p=0,0199$; średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $36,77 \pm 1,12$, $p=0,000191$) (*Rycina 64-65*), GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $34,77 \pm 1,81$; $p=0,000276$) (*Rycina 66-67*) oraz samym BPA (średnia procentowa liczba komórek żywych: $25,90 \pm 2,31$; $p=0,00808$) (*Rycina 64 i 66*).



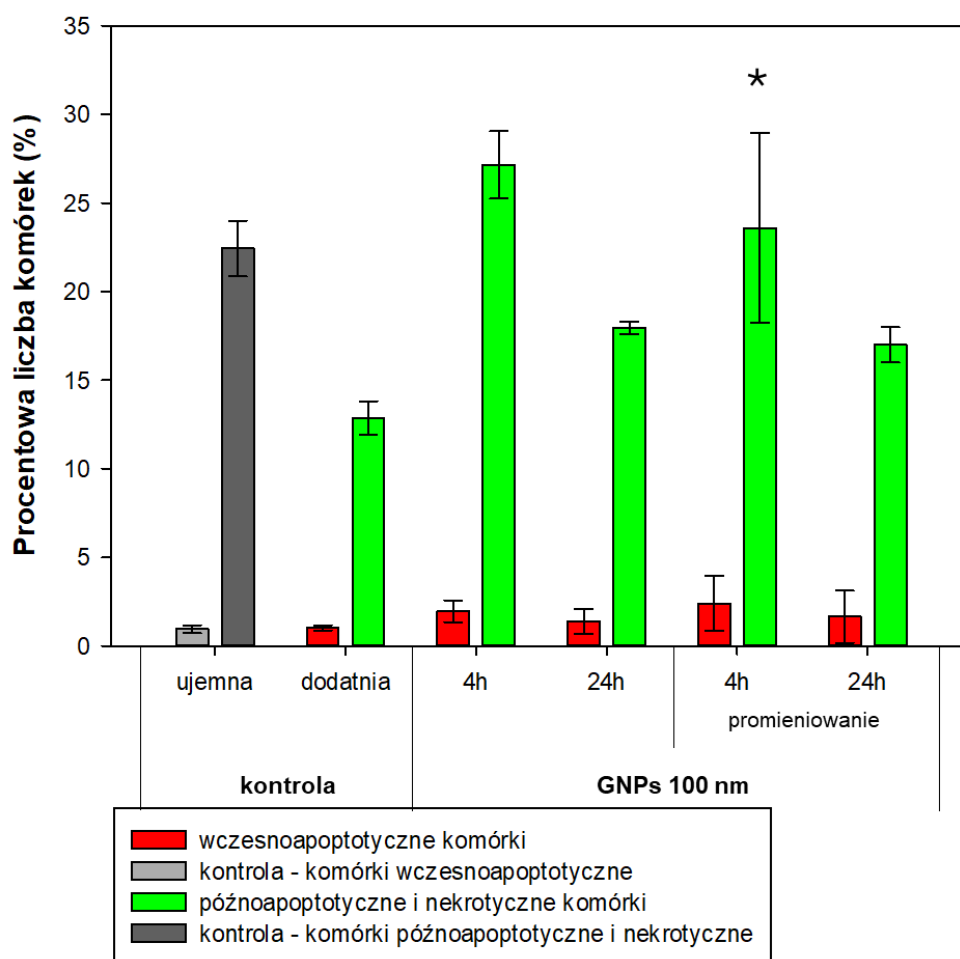
Rycina 68. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej - napromienionej)



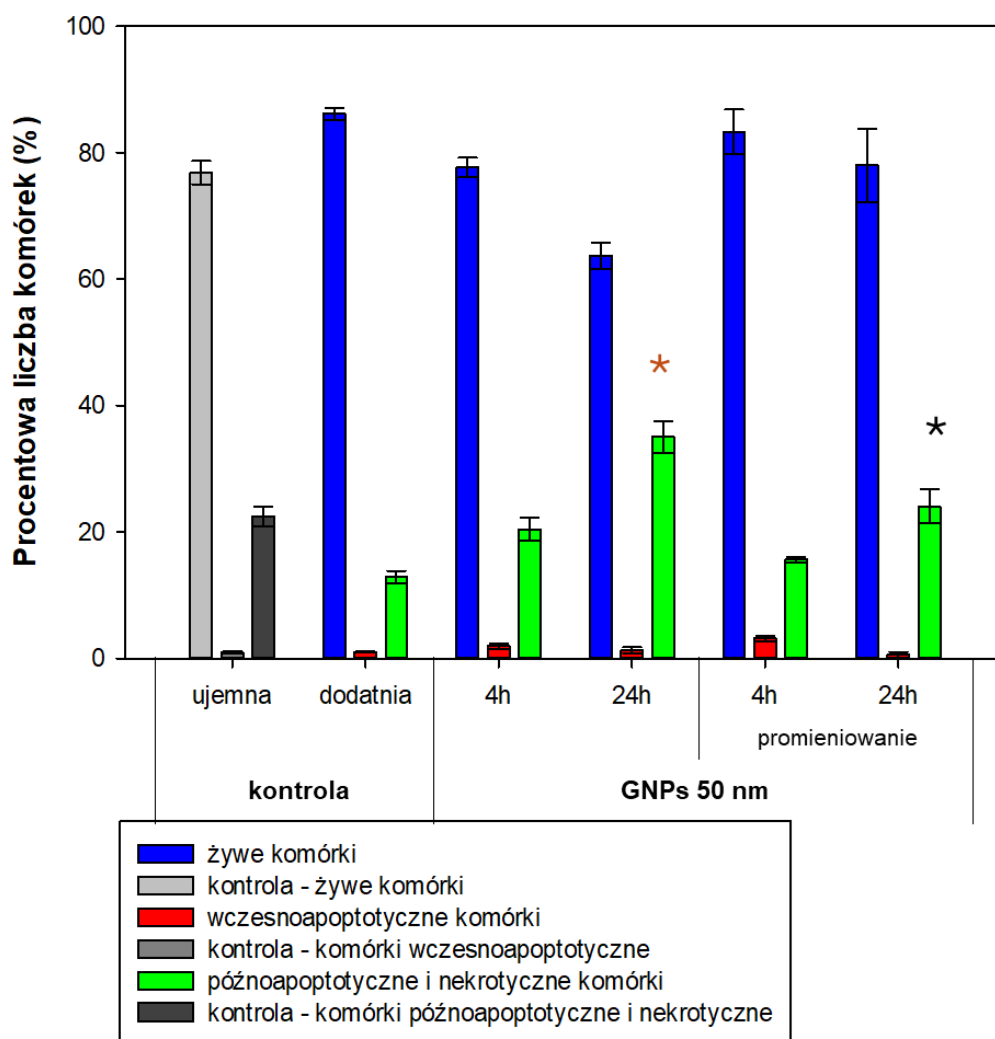
Rycina 69. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



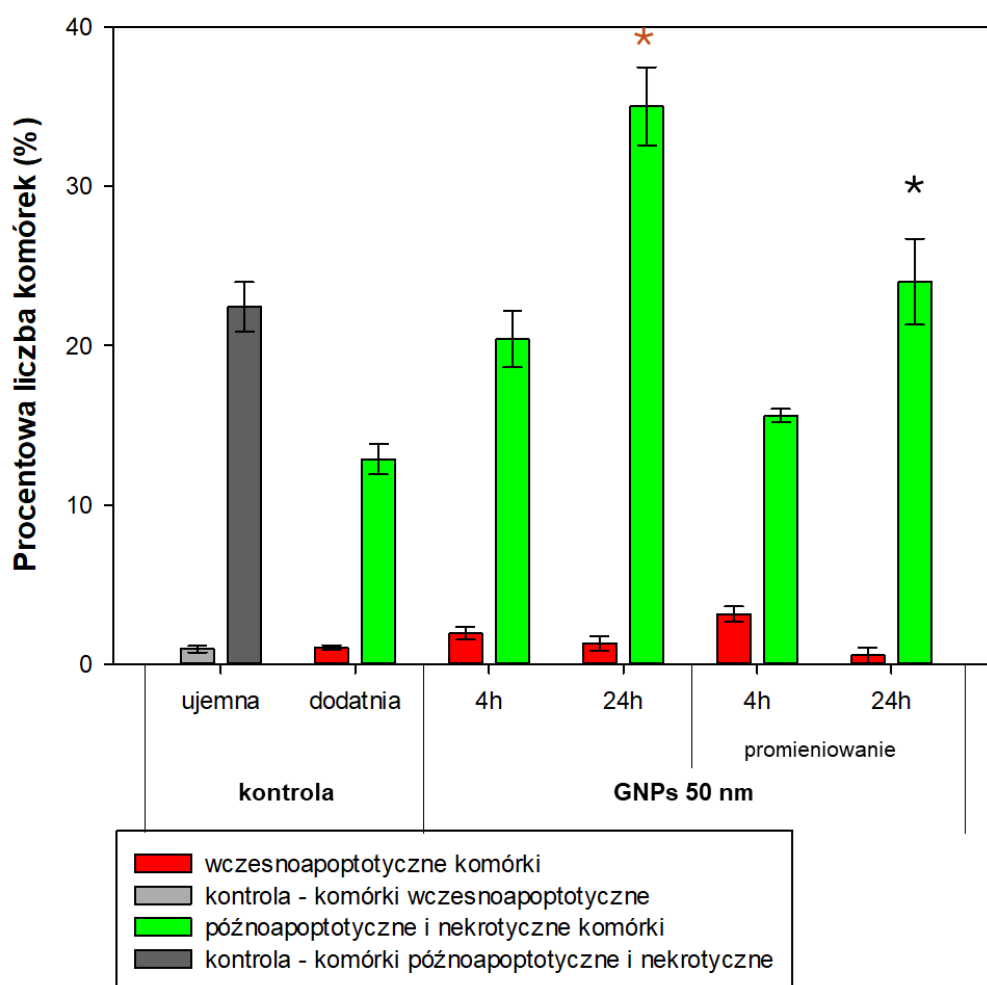
Rycina 70. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; *kontrola dodatnia* – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)



Rycina 71. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm). Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe wyliczone z 3 niezależnych powtórzeń.

GNPs – ang. *gold nanoparticles* – nanocząstki złota

kontrola ujemna – kontrola nienapromieniona; kontrola dodatnia – kontrola napromieniona

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej ujemnej – nienapromienionej)

*: $p < 0,05$ (próby eksperymentalne porównywane względem próby kontrolnej dodatniej – napromienionej)

Na Rycinach 68 - 71 zaprezentowano wyniki z prób badawczych napromienionych lub nienapromienionych z samymi nanocząstkami złota. Badana populacja wynosiła 20 000 komórek. W analizie statystycznej wykazano, że z eksperymentów napromienionych istotnie statystycznie są komórki traktowane: GNPs 100 nm z inkubacją 4h (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $23,60 \pm 5,37$; $p=0,00681$) (*Rycina 68-69*) oraz GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $24,00 \pm 2,69$; $p=0,00510$) (*Rycina 70-71*). W eksperymentach nienapromienionych istotna statystycznie jest jedynie próba z GNPs 50 nm z inkubacją 24h (średnia procentowa liczba komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych: $35,00 \pm 2,46$; $p=0,000255$) (*Rycina 70-71*).

Wyniki przeanalizowano za pomocą dwuczynnikowego testu analizy wariancji ANOVA oraz testu post-hoc Tukey'a. Analiza ta miała na celu sprawdzenie wpływu różnego traktowania nanocząstkami złota i BPA oraz wpływu promieniowania mieszanego na poziom apoptozy w komórkach nowotworowych piersi MCF-7. Analizowano próby eksperymentalne porównując wyniki z komórek napromienionych do kontroli napromienionej oraz komórki nienapromienione do kontroli nienapromienionej. Szczegółowe wyniki analizy zawarto w tabelach w *Suplemencie*. W analizie statystycznej wykazano, że wartości $p<0,05$ miały napromienione próby z GNPs 100 nm inkubowanych 4h oraz z GNPs 50 nm z inkubacją 24h w przypadku procentowej liczby komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych. Oznacza to, że same nanocząstki złota w istotny sposób wpływają na poziom częstości apoptozy. W eksperymentach nienapromienionych zaobserwowano różnice w wielu różnych próbach eksperymentalnych w poziomie częstości apoptozy wśród komórek. Dodanie samego BPA do komórek MCF-7 powoduje istotną statystycznie zmianę w częstości apoptozy jedynie w grupie komórek żywych w porównaniu do kontroli ujemnej (nienapromienionej). Inkubacja komórek z samymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm z inkubacją 24h) również wpływa w sposób istotny statystycznie na poziom apoptozy w porównaniu do kontroli ujemnej w grupie komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych zwiększając ich procentowy udział w populacji. W przypadku komórek napromienionych z samym BPA nie wykazano istotności statystycznej w porównaniu do kontroli dodatniej (napromienionej) w kwestii częstości występowania apoptozy. Z badań napromienionych z GNPs i BPA istotność statystyczną wykazano w komórkach traktowanych GNPs 100 nm z inkubacją 4h z BPA w porównaniu do eksperymentu napromienionego z samym BPA, gdzie zauważono spadek procentowego udziału komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych.

5. Dyskusja wyników

Nowotwory piersi są należą do najczęściej diagnozowanych nowotworów u kobiet na świecie (74). Metody ich leczenia są dobrze rozwinięte, jednak wciąż istnieje potrzeba opracowania bardziej efektywnych terapii oraz optymalizacji terapii już stosowanych. Wprowadzenie nowatorskich metod leczenia stwarza możliwość obniżenia wskaźników śmiertelności wśród pacjentów (75, 76). Niewielkie zmiany w tych wskaźnikach świadczą o skuteczności profilaktyki i działań terapeutycznych, które są umożliwiające dzięki ciągłemu rozwojowi badań interdyscyplinarnych.

Radioterapia obok chirurgii pozostaje jedną z podstawowych metod leczenia chorób nowotworowych w szczególności ich odmian złośliwych (97). Współcześnie coraz częściej wykorzystuje się metody hadronoterapii, w której stosuje się jony ciężkie (98). Terapie te są obiecujące pod kątem leczenia nowotworów opornych na tradycyjną radioterapię z użyciem promieniowania jonizującego. Jedną z dobrze zapowiadających się metod hadronoterapii jest terapia borowo-neutronowa (BNCT) (6). Jest to terapia bimodalna, w której pacjentowi podaje się farmaceutyk z izotopem ^{10}B , a następnie poddaje się go działaniu promieniowania neutronowego. Uważa się, że BNCT jest obiecującą metodą leczenia w szczególności w przypadku złośliwych odmian nowotworów, takich jak glejak wielopostaciowy (7, 14). Naukowcy poszukują sposobów zwiększenia skuteczności oraz udoskonalenia BNCT (6). Do tej pory efektywność BNCT jest badana w trakcie prowadzonych prób klinicznych na całym świecie, podczas których poszukuje się zmodernizowanych nośników izotopu ^{10}B oraz źródeł promieniowania neutronowego. BNCT może stanowić skuteczną opcję terapeutyczną dla nowotworów piersi, co potwierdzają nieliczne dotychczas przeprowadzone badania (25, 86, 92). Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że w celu zwiększenia efektywności terapii i zmniejszenia dawki promieniowania w radioterapiach można zastosować nanocząstki złota (GNPs) jako promieniowrażliwiacze (88, 100). Prowadzono również eksperymenty nad zastosowaniem GNPs w terapii borowo-neutronowej w celu zmaksymalizowania jej efektywności. Otrzymane wyniki stanowią obiecujący materiał do kontynuacji badań w tym zakresie (91, 101, 102). W świetle powyższego, głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza możliwości zwiększenia efektywności terapii borowo-neutronowej za pomocą nanocząstek złota w komórkach nowotworowych piersi typu trójujemnego i luminalnego. Cel główny został osiągnięty poprzez opracowanie protokołu napromieniania komórek w poczcie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA, a następnie zbadanie właściwości promieniowrażliwiających zastosowanych nanocząstek złota na komórki

nowotworowe piersi. Dobrano odpowiednie stężenia GNPs i nośnika boru ^{10}B (BPA) za pomocą testu cytotoksyczności oraz przebadano wnikanie nanocząstek złota do komórek nowotworowych przy użyciu wartości SSC. Zanalizowano wpływ GNPs na komórki nowotworowe piersi w przypadku leczenia BNCT za pomocą przeprowadzonych testów radiobiologicznych progresji cyklu komórkowego, powstawania i zanikania ognisk naprawczych, kinetyki częstości występowania mikrojąder, przeżywalności komórkowej oraz częstości występowania apoptozy komórkowej. Z analizy statystycznej wynika, że GNPs w połączeniu z BPA wykazały efekt uwrażliwiający komórki na BNCT w niektórych próbach eksperymentalnych w porównaniu do zastosowanego samego BPA.

5.1. Zbadanie właściwości cytotoksycznych nanocząstek złota na komórki nowotworowe piersi MDA-MB-231 i MCF-7 oraz ich wnikania do komórek za pomocą współczynnika SSC

Zarówno nanocząstki złota, jak i BPA mają specyficzne właściwości fizykochemiczne, które determinują ich wpływ biologiczny na komórki nowotworowe i zdrowe. W związku z tym, w niniejszej pracy podjęto się analizy cytotoksyczności różnych stężeń GNPs o rozmiarze 50 nm i 100 nm oraz BPA. Głównym celem tego eksperymentu był dobór odpowiednich stężeń odczynników do przeprowadzenia badań nad BNCT na komórkach nowotworowych piersi oraz analizy ich synergistycznego działania i łatwiejszego ich obrazowania. Duża zachorowalność wśród młodych kobiet na nowotwory piersi i znikoma liczba badań przeprowadzonych pod kątem BNCT na komórkach nowotworowych piersi zadecydowała o wyborze linii komórkowych do prowadzenia eksperymentu. Pierwszym etapem pracy był dobór odpowiednich stężeń GNPs oraz BPA. Wykonano test cytotoksyczności MTT, w którym zbadano wpływ różnych stężeń zarówno nanocząstek złota, jak i BPA. Wyniki uzyskane na linii komórkowej MDA-MB-231 wykazały wzrost aktywności metabolicznej komórek, co sugeruje wzrost proliferacji komórkowej po traktowaniu ich nanocząstkami złota 50 nm czy 100 nm z inkubacją 24-godziną. Przy inkubacji 4-godzinnej, zauważono zróżnicowanie wyników aktywności metabolicznej przy GNPs 50 nm, które zależne jest od użytego stężenia BPA działającego minimalnie toksycznie na komórki nowotworowe piersi. Użycie GNPs 100 nm inkubowanych 4h z komórkami w połączeniu z BPA nie zwiększa aktywności metabolicznej komórek MDA-MB-231 względem wyników z prób traktowanych samymi nanocząstkami. W komórkach MDA-MB-231 nie zaobserwowano inhibicji proliferacji komórkowej bez względu na stężenie GNPs i ich czas inkubacji czy też obecność BPA. Według dotychczas przeprowadzonych badań, do

zahamowania wzrostu komórek MDA-MB-231 jest potrzeba zastosowania stężenia GNPs powyżej 20 nM w celu zmniejszenia aktywności metabolicznej o 20% (102). Co więcej, wykazano, że MDA-MB-231 ma wysoką tolerancję na BPA o czym świadczy przeżywalność komórkowa na poziomie około 90% (103). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy na komórkach MCF-7 charakteryzowały się innym trendem niż w linii komórkowej MDA-MB-231. Aktywność metaboliczna komórek odmiany luminalnej spadała wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek złota oraz czasu inkubacji. Przy zastosowaniu samego BPA bez nanocząstek zauważono, że proliferacja komórek utrzymuje się na poziomie kontroli z nieznacznym spadkiem przy wyższych stężeniach, co świadczy o małej toksyczności samego BPA dla komórek MCF-7 (104). Stężenia dobrano analizując również prowadzone dotychczas badania na komórkach nowotworowych piersi pod kątem BNCT, jak i uwrażliwiania nanocząstkami złota (86, 106). Z przeprowadzonych badań przez Kodiha i wsp. na komórkach MCF-7 wynika, że GNPs zmniejszają ich aktywność mitochondrialną, co doprowadza do zaburzonej produkcji ATP (106). Co więcej, z badań Dahabiyeh i wsp. wynika, że nanocząstki złota w postaci nanorurek (GNRs) oraz GNRs zmodyfikowane fosfolipidami powodują istotny wpływ na profil metaboliczny MCF-7. Fosfolipidowe GNRs obniżyły poziom pośrednich i końcowych produktów metabolicznych, co doprowadziło do dysfunkcji cyklu TCA, czyli cyklu Krebsa, zmniejszenia aktywności glikolitycznej i zaburzenia równowagi redoks. W konsekwencji komórki mają uszkodzone szlaki metaboliczne niezbędne do proliferacji komórek nowotworowych (107). Badania te potwierdzają, że nanocząstki złota obniżają aktywność metaboliczną komórek MCF-7, co wykazano także w przeprowadzonym eksperymencie w powyższej pracy.

Kolejnym etapem pracy była analiza wnikanania nanocząstek złota o rozmiarach 50 nm i 100 nm do komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7. Analiza cytometryczna wykazała, że wnikananie GNPs jest zależne od rodzaju linii komórkowej oraz od czasu inkubacji. Efektywniej wnikały nanocząstki do komórek MDA-MB-231, gdzie zaobserwowano, że wydajniej przenikały GNPs o rozmiarze 100 nm z inkubacją 24-godziną i GNPs 50 nm z inkubacją 4-godziną. W luminalnej odmianie nowotworu piersi zauważono także wzrost wartości współczynnika SSC w wynikach z prób z GNPs 100 nm i 50 nm z inkubacją 24-godziną. W przypadku GNPs 100 nm stwierdzono, że wraz z wydłużeniem czasu inkubacji, ich wnikananie do wnętrza komórki wzrasta. Pomimo tego, że wyniki ze współczynnika SSC wskazują na wnikananie nanocząstek złota do komórek MDA-MB-231, wartości te mogą być jeszcze zaniżone, ze względu na użyte lasery w cytometrze. Przeprowadzone badania przez

Wu i wsp., sugerują, że wykorzystanie większej liczby laserów wzbudzających mających długość fali przesuniętą w stronę czerwieni znacznie wzmocni sygnał optyczny potrzebny do wykrycia całkowitego wnikania GNPs (108). Komórki MDA-MB-231 zazwyczaj gromadzą 25-40 pg Au na komórkę po 24 godzinach inkubacji, czyli dwukrotnie więcej niż MCF-7, co wyjaśnia wzmocnienie działania dawki w przypadku nowotworu trójemnego typu basal. Wyniki te pokrywają się z uzyskanymi w niniejszej pracy. Akumulacja nanocząstek złota mogłaby być również zwiększona poprzez połączenie z glukozą, które powoduje ich internalizację i zwiększone wnikanie na drodze makropinocytozy, co wykazano w badaniach Wang i wsp. (102). Analizując wyniki uzyskane w teście apoptozy zauważono, że po zastosowaniu samych GNPs procentowy udział komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych maleje w porównaniu do kontroli, co może świadczyć o zmianie aktywności komórek po traktowaniu ich GNPs. Współczynnik SSC nie wykaże nam natomiast poziomu wnikania BPA do komórek, ponieważ związek ten nie ma właściwości plazmonicznych i uzyskane wyniki nie są wystarczająco informacyjne. Obie wykorzystane linie komórkowe w przeprowadzonym eksperymencie charakteryzują się ekspresją transportera LAT-1, odpowiedzialnego za transport BPA do komórki, przy czym w MDA-MB-231 występuje jego nadekspresja. Różnica w ekspresji tych transporterów wpływa najprawdopodobniej na biodystrybucję boru w komórkach, co jest kluczowe dla efektywności BNCT. Według wcześniejszych doniesień, wychwyt BPA po 4h w komórkach MDA-MB-231 osiąga $\sim 18 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peletu komórkowego, a w MCF-7 $\sim 14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (105, 107). W komórkach MCF-7 występuje również ekspresja transportera LAT-2, który wspiera transport neutralnych aminokwasów. W komórkach MDA-MB-231 nie ma dowodów na ekspresję tego białka transbłonowego, co świadczy o innych mechanizmach transportu aminokwasów przez błonę komórkową w obu typach komórek. Co więcej, komórki MDA-MB-231 charakteryzują się większą aktywnością transportera alanina-seryna-cysteina 2 (ASCT2) niż komórki luminalne, co zauważono w badaniach Cha i wsp. (110). Nowotwory piersi trójemnego typu basal wykazywały wyższy wychwyt glutaminy niż komórki nowotworów luminalnych. Glutamina jest istotna dla aktywacji szlaku mTOR w MDA-MB-231, które wykazują wyższy jej wychwyt i szybszy metabolizm proliferujący, co koreluje z większym poziomem wnikania nanocząstek złota oraz potencjalnym zwiększeniem poziomu wrażliwości na strategie terapeutyczne oparte na BNCT. Sugeruje to zróżnicowany mechanizm transportu aminokwasów pomiędzy tymi liniami nowotworowymi. Transport BPA przez błonę komórkową może być również uzależniony od ekspresji ASCT2 oraz transporterów LAT-1 i LAT-2 (111, 112).

W celu lepszej analizy cytotoksyczności nanocząstek przeprowadzono test z Aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny. Ten test umożliwiał obserwowanie spadku poziomu procentowej częstości występowania śmierci nekrotycznej i apoptotycznej komórek, które polegało na badaniu wczesnej apoptozy na podstawie analizy translokacji fosfatydyloseryny z wewnętrznej na zewnętrzną błonę oraz późną apoptozę i nekrozę na podstawie analizy utraty integralności błony komórkowej (112). Otrzymane wyniki na komórkach linii MDA-MB-231 nie wykazały znaczącej różnicy w indukcji wczesnej apoptozy czy późnej apoptozy/nekrozy w populacji porównując do procentowej liczby żywych komórek. Jednakże, biorąc pod uwagę wyniki z uzyskane w grupie komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych/nekrotycznych zauważono wzrost procentowej liczby komórek w populacji, którą traktowano BPA w połączeniu z promieniowaniem. Indukcja śmierci komórkowej była zależna od rodzaju nanocząstek i ich czasu inkubacji oraz obecności BPA i traktowania promieniowaniem mieszanym. Zauważono także istotny statystycznie spadek procentowego udziału komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych w populacji komórek w wynikach z prób nienapromienionych z GNPs i BPA. Tę samą tendencję zaobserwowano w próbach z samymi GNPs. Taki rozkład wyników może wynikać nie tylko ze zmniejszenia śmierci komórkowej, ale też ze zmiany dynamiki podziałów komórkowych lub przyspieszonej fagocytozy apoptotycznych komórek. Otrzymane wyniki korelują z dotychczas przeprowadzonymi badaniami na innych komórkach (113). Te badania wskazują, że kombinacja GNPs, z BPA i promieniowaniem może doprowadzić do katastrofy mitotycznej komórek, a w przypadku zastosowania samego BPA w połączeniu z promieniowaniem neutronowym czy gamma, wysoki odsetek komórek w późnej apoptozie, wskazuje na działanie szlaku mitochondrialnego. Jednak warto również dodać, że różnice między liniami mogą wynikać także ze statusu genu p53, gdzie MDA-MB-231 są mutantem, a MCF-7 to komórki z genem dzikim, oraz ze zróżnicowania mechanizmów autofagii (110, 111). W celu zwiększenia działania promieniouwrażliwiającego nanocząstek złota, można je ukierunkować za pomocą przeciwciała na receptor chemokiny CXCR4, który jest w nadekspresji w TNBC. Wskazują na to badania przeprowadzone przez Bhattarai i wsp. (116). W komórkach typu luminalnego MCF-7 zauważono odwrotną tendencję, czyli zwiększoną indukcję wczesnej apoptozy i późnej apoptozy/nekrozy, co wykazały wyniki z prób nienapromienionych traktowanych w szczególności GNPs o rozmiarze 100 nm z BPA. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o indukcji apoptozy samymi nanocząstkami złota, które aktywują sygnały proapoptotyczne - p53, Bax i kaspazy 3/9, jednocześnie doprowadzając do obniżenia Bcl-2 (91, 114, 115). Oprócz tego, istotne różnice zaobserwowane w komórkach

późnoapoptotycznych i nekrotycznych świadczyły o zgodności z mechanizmem BNCT, gdzie cząstki o wysokim LET prowadzą do nieodwracalnych uszkodzeń DNA powodując tym samym rozpoczęcie procesów apoptotycznych i nekrotycznych (85). Interakcja między promieniowaniem neutronowym, a warunkami traktowania komórek nanocząstkami złota i BPA odegrały znaczący wpływ na indukcję procesów apoptotycznych w MCF-7. Znaczne zmniejszenie odsetek komórek żywych i zwiększona późna apoptoza/nekroza komórek w grupach traktowanych GNPs i BPA potwierdzają dotychczasowe ustalenia (100). Dodatkowe uszkodzenia DNA spowodowane obecnością GNPs w komórkach i stres oksydacyjny powstający w połączeniu nanocząstek z promieniowaniem i z BPA, działają stymulująco na rozpoczęcie procesu apoptozy (119). Samo BPA ma nieistotną wewnętrzną aktywność proapoptotyczną w komórkach, ale uszkodzenia spowodowane z pomocą cząstek o wysokim LET powstałych w trakcie BNCT doprowadzają do śmierci mitotycznej komórek niezależnej od kaspaz charakteryzującej się fragmentacją chromatyny (14, 105). Znaczna indukcja późnej fazy apoptozy i nekrozy podkreśla potencjał łączenia GNPs i BPA w celu zwiększenia dostarczania boru i skuteczności terapeutycznej. Otrzymane wyniki pokrywają się z dotychczasowymi badaniami przeprowadzonymi w celu optymalizacji mechanizmów dostarczania boru i protokołów leczenia. W badaniach Abedin i wsp. wykazano także, że MCF-7 mogą odpowiadać na uszkodzenia komórkowe autofagią. Zmniejszając ekspresję białek autofagii, Beclin 1 i Atg7 zauważono, że apoptoza zależna jest w tych komórkach od aktywności kaspaz reagujących na uszkodzenia DNA. Opóźnienie mitochondrialnej kaskady kaspaz spowodowane jest wczesnym usuwaniem uszkodzonych mitochondriów w autofagosomach (120). Może to być prawdopodobną przyczyną niskiego poziomu apoptozy w komórkach traktowanych GNPs z BPA i promieniowaniem.

5.2. Zbadanie genotoksyczności nanocząstek złota na komórki nowotworowe piersi MDA-MB-231 i MCF-7 w terapii borowo-neutronowej

Badania cytotoksyczności wykazały, że GNPs umiarkowanie indukują apoptozę w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7. Rozpoczęcie przez komórkę szlaku apoptotycznego lub nekrotycznego oznacza, że pojawiają się rozległe uszkodzenia w materiale genetycznym lub zahamowanie procesu replikacji. Wpływ na uszkodzenia DNA poprzez indukcję pojedynczo- i podwójnociowych pęknięć DNA oraz zwiększonej częstości występowania mikrojąder mogło mieć pojawienie się reaktywnych form tlenu (ROS) (121). Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że trójujemna odmiana komórek MDA-MB-231 charakteryzuje się wyższym podstawowym poziomem ROS po potraktowaniu

promieniowaniem neutronowym w porównaniu do komórek MCF-7. Różnica ta wynika prawdopodobnie z odmiennych profilów metabolicznych i antyoksydacyjnych pomiędzy liniami komórkowymi. Komórki MDA-MB-231, mając bardziej glikolityczny metabolizm i niższą aktywność procesów antyoksydacyjnych, są bardziej podatne na działanie reaktywnych form tlenu (122). Z tego też powodu zdecydowano się na wykonanie testu γ -H2AX za pomocą cytometrii przepływowej, w którym badano intensywność fluorescencji ognisk naprawczych podwójnoniciowych pęknięć DNA (DSBs - ang. *double strand breaks*). Jeśli pojedynczoniciowe uszkodzenia nie zostaną naprawione w komórkach nieproliferujących, w konsekwencji doprowadza to do śmierci komórki poprzez zablokowanie polimeraz RNA w trakcie transkrypcji. Natomiast, w przypadku komórek proliferujących doprowadza to do zatrzymania widełek replikacyjnych podczas fazy S cyklu komórkowego prowadząc do powstania podwójnoniciowych pęknięć DNA – DSBs (123). Ufosforylowana forma histonu γ -H2AX znajdująca się w miejscach DSBs zostaje wyznakowana fluorescencyjnym przeciwciałem anti- γ -H2AX, którego poziom bada się za pomocą pomiaru cytometrycznego uzyskując pomiar intensywności fluorescencji. W przeprowadzonych badaniach zauważono znaczny wzrost ognisk naprawczych γ -H2AX po napromienieniu komórek, co wskazuje na skuteczność BNCT w indukowaniu DSBs w docelowych komórkach. Wyniki odzwierciedlają badania dotyczące wpływu promieniowania neutronowego na powstawanie DSBs w BNCT, które doprowadza do znacznych uszkodzeń DNA. Spowodowane jest to przez cząstki wysokoenergetyczne powstające w trakcie reakcji pomiędzy ^{10}BPA a neutronami (124). Przeprowadzony w tych badaniach test γ -H2AX potwierdził zwiększenie częstości ognisk naprawczych po połączeniu BPA z promieniowaniem neutronowym w przypadku obu linii komórkowych, przy czym MDA-MB-231 miały większy poziom intensywności fluorescencji w porównaniu do prób nienapromienianych. Jak dotychczasowe badania wskazują, może być to spowodowane wyższym poziomem reaktywnych form tlenu, co w rezultacie prowadzi do bardziej rozległych uszkodzeń DSBs (122). Her i wsp. opublikowali wyniki badań na linii komórkowej MDA-MB-231, w których PEG-GNPs w połączeniu z promieniowaniem doprowadziły do znacznego zwiększenia poziomu podwójnoniciowych uszkodzeń DNA (125). Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają, że połączenie GNPs z promieniowaniem znacząco zwiększa liczbę podwójnoniciowych pęknięć DNA, czyli między innymi ognisk naprawczych γ -H2AX, w porównaniu do samego promieniowania, a co więcej uszkodzenia utrzymują się dłużej, ponieważ są zauważalne nawet po 24h od napromienienia (102, 122). W luminalnej odmianie komórek nowotworowych piersi MCF-7 zauważono zwiększoną intensywność fluorescencji w próbach nienapromienionych traktowanych GNPs 50 nm i

100 nm oraz BPA. Ten wynik potwierdza, że same nanocząstki złota uszkadzają materiał genetyczny komórek doprowadzając do powstawania DSBs i uruchomienia szlaków proapoptotycznych oraz szlaków naprawy DNA (114, 123). Traktowanie komórek promieniowaniem w niewielkim stopniu zwiększa intensywność fluorescencji γ -H2AX. Uzyskane wyniki badań sugerują, że zarówno GNPs 50 nm, jak i GNPs 100 nm indukują powstawanie podwójnoniciowych pęknięć DNA w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 w połączeniu z terapią borowo-neutronową, przy czym największy poziom uszkodzeń DNA uzyskano w próbach napromienionych z dodanymi nanocząstkami złota o rozmiarze 50 nm inkubowanych 24h z dodanym BPA. Intensywność fluorescencji mierzono po 24h od traktowania komórek promieniowaniem, co oznacza, że część podwójnoniciowych pęknięć mogła ulec naprawie. Z dotychczasowych badań wynika, że powstawanie ognisk naprawczych jest bezpośrednio związane z odpowiedzią komórkową na uszkodzenia DNA (DDR) oraz z działaniem szlaków naprawy. W komórkach MCF-7 szlaki naprawy działają sprawnie, mają aktywną naprawę HR (ang. *homologous recombination*) i NHEJ (ang. *non-homologous end-joining*). HR jest jednak mniej aktywna niż w komórkach zdrowych ze względu na słabą ekspresję genu BRCA1, który bierze udział w tym szlaku naprawy. Natomiast, MDA-MB-231 mają uszkodzoną efektywność działania DDR i szlaków naprawy DNA w przypadku NHEJ z powodu niskiego poziomu ekspresji genu DNA-PKcs, co powoduje, że częściej wykorzystują szlak alternatywny NHEJ doprowadzający do większej liczby błędów. Komórki MCF-7 wykazują się niższą zdolnością antyoksydacyjną w porównaniu do komórek MCF-10A, co pokazuje jak istotną rolę mają złożone uszkodzenia DNA w rozwoju nowotworów piersi (128). Kolejną różnicą pomiędzy tymi liniami komórkowymi jest aktywność białka p53, które w komórkach MCF-7 są aktywne, natomiast w MDA-MB-231 białko nie spełnia swoich funkcji doprowadzając do dysfunkcji punktów kontrolnych w cyklu komórkowym, co udowodniono w badaniach prowadzonych przez Lee i wsp. oraz Mao i wsp. (129, 130). Według eksperymentów prowadzonych przez zespół Montenegro, MDA-MB-231 są silnie zależne od regulatorów epigenetycznych, które doprowadzały do zahamowania aktywności białek BRCA1 i 53BP1 w miejscach podwójnoniciowych uszkodzeń DNA powodując tym samym brak reakcji na uszkodzenia DNA w komórkach (131). Interesującym byłoby wykonanie badań związanych z kinetyką powstawania i zanikania ognisk naprawczych powstałych po traktowaniu komórek nanocząstkami złota, a następnie terapią borowo-neutronową. Dałoby to możliwość dokładniejszej analizy zdolności naprawczych komórek odmiany trójujemnej MDA-MB-231 i luminalnej MCF-7.

W celu dalszego wyjaśnienia uszkodzeń w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7 powstających po zastosowaniu nanocząstek złota i terapii borowo-neutronowej wykonano test mikrojądrowy. Pozwala on na ocenę klastogennych i aneugennych uszkodzeń chromosomów (132). Uzyskane wyniki wskazywały na znaczną indukcję powstawania mikrojąder w próbach napromienionych z dodanymi nanocząstkami złota w obu liniach komórkowych. Jednocześnie w wynikach z niektórych prób badawczych nienapromienianych wykazano spadek częstości występowania mikrojąder po traktowaniu GNPs w porównaniu do kontroli ujemnej. Zauważono również, że częstość występowania MN wzrasta do 36h po napromienieniu, natomiast później zaczyna spadać we wszystkich próbach badawczych, co świadczy o zmniejszeniu poziomu nienaprawionych uszkodzeń DNA. W komórkach MDA-MB-231 i MCF-7 największy widoczny efekt wzrostu częstości MN zaobserwowano w próbach napromienionych z GNPs 100 nm inkubowanych 24h i z BPA. Zmniejszony poziom częstości MN w obu liniach komórkowych zauważono w próbach nienapromienionych z GNPs 100 nm inkubowanych przez 24h. Promieniowanie gamma i neutronowe powodują uszkodzenia DNA tworząc reaktywne formy tlenu, które mogą doprowadzić do fragmentacji chromosomów, a w konsekwencji do powstawania mikrojąder. Znaczny wzrost częstości występowania mikrojąder potwierdza dotychczasowe badania, że promieniowanie ma genotoksyczny wpływ na komórki nowotworowe, a dodatkowe połączenie z GNPs powoduje zwiększenie uszkodzeń chromosomalnych. Najprawdopodobniej jest to połączone z łączonym efektem wzrostu poziomu ROS w komórkach nowotworowych, co wynika również z prowadzonych badań przez Musielak i wsp. (126). Dodatkowo, częstość MN jest uzależniona od rozmiaru GNPs oraz ich stężenia. Wyższe stężenie GNPs, ich rozmiar oraz funkcjonalizacja doprowadzają do wzrostu poziomu ROS w komórkach powodując w konsekwencji do zwiększenia częstości MN (133). Dotychczasowe badania sugerują, że mniejsze rozmiary nanocząstek doprowadzają do zwiększenia ich genotoksycznego efektu na komórki. Jednakże, określenie genotoksyczności GNPs jest bardziej złożonym tematem badań, ponieważ wpływ na to również ma ich czas inkubacji oraz związek chemiczny, którym mogą być funkcjonalizowane (134). Oprócz tego, mniejsze stężenia nanocząstek złota mogą działać antyoksydacyjnie i doprowadzać do zmniejszenia częstości występowania MN. W komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7, badania potwierdzają, że użycie GNPs zwiększa ich promieniowrażliwość i powoduje wzrost efektywności stosowanej terapii (135). Według danych literaturowych, BNCT powoduje w komórkach nowotworowych piersi podwojenie częstości występowania MN w trakcie pojedynczego cyklu komórkowego i zaczyna

stopniowo zanikać w trakcie 4-5 cyklu, co jest zgodne ze złożoną naprawą pęknięć chromosomów (136).

Wykonano także ocenę progresji cyklu komórkowego obu linii komórkowych MDA-MB-231 i MCF-7. Analiza cyklu komórkowego umożliwia ocenę aktywności proliferacji komórek po traktowaniu GNPs w połączeniu z BNCT. W komórkach MDA-MB-231 najwięcej komórek w fazie G₂/M znajduje się w próbce napromienionej z GNPs 100 nm inkubowanych 24h z BPA. Oznacza to, że komórki po takim traktowaniu blokują się w fazie G₂/M w punkcie kontrolnym, który występuje w tej fazie cyklu komórkowego. Punkt kontrolny G₂ odpowiedzialny jest za sprawdzanie prawidłowości przebiegu replikacji DNA, poziomu uszkodzeń materiału genetycznego oraz rozmiaru komórki (137). W komórkach nowotworowych MDA-MB-231 uszkodzenia DNA były znaczące dlatego w próbach napromienionych zauważono, że większość komórek zatrzymało się w fazie G₂ w celu naprawy zaistniałych nieprawidłowości. W dotychczasowych prowadzonych badaniach nad użyciem nanocząstek złota zauważono ten sam trend, między innymi w badaniach Wang i wsp., w których użyto funkcjonalizowanych glukozą GNPs o rozmiarze 49 nm i również otrzymano zwiększoną liczbę komórek w fazie G₂/M cyklu (102). Dodatkowo uaktywnienie punktu kontrolnego doprowadza do zwiększenia promieniowrażliwości komórek. Zastosowanie BNCT w połączeniu z GNPs powoduje fenotypową katastrofę mitotyczną ze względu na duży poziom uszkodzeń materiału genetycznego, czyli wystąpienie rozległych DSBs oraz wysokiej częstości występowania mikrojąder w szczególności w komórkach z nadekspresją LAT-1 (104, 128). Według dotychczasowych badań, GNPs wykazują również znaczący wpływ na zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach MDA-MB-231, co wynika także z przeprowadzonych dotychczas badań, między innymi przez Lan i wsp., w których badano lek na bazie glikolu polietylenowego z izotopem ¹⁰B w formie nanocząstek na myszach z komórkami nowotworowymi typu MDA-MB-231 (106, 130). W komórkach MCF-7 zmiany w progresji cyklu komórkowego nie są tak znaczące jak w przypadku komórek trójemnych MDA-MB-231. W odmianie luminalnej zauważamy w niektórych próbach nienapromienionych nieznaczny wzrost liczby komórek w fazie G₁ (próby z GNPs 50 nm inkubowanych 4h z BPA) oraz w fazie S (próby z GNPs 50 nm i 100 nm z inkubacją 24h z dodanym BPA). Zatrzymanie komórek w fazie G₁/S może być spowodowane naprawą uszkodzonego DNA ze względu na naprawę HR, która jest bardziej efektywna właśnie w tych fazach cyklu. Dochodzi również do uruchomienia kaskady sygnałowej Chk1/Chk2, które doprowadzają do zatrzymania cyklu w punktach kontrolnych w fazie G₁/S i G₂/M (129, 140).

Największą liczbę komórek w fazie G₂/M zaobserwowano w próbie napromienionej z GNPs 50 nm i 100 nm z inkubacją 24-godziną z dodanym BPA. Pokrywa się to z dotychczasowymi badaniami Sun i wsp. nad BNCT prowadzonymi na komórkach macierzystych glejaka, że samo BNCT prowadzi do przedłużenia fazy G₂/M w komórkach z powodu rozległych uszkodzeń DNA (115). Natomiast, w połączeniu z nanocząstkami złota zauważono dodatkowe zwiększenie bloku komórek nowotworowych w fazie G₂/M zarówno w komórkach MDA-MB-231, jak i MCF-7. Otrzymane wyniki z przebiegu cyklu komórkowego sugerują, że uszkodzenia komórek traktowanych GNPs w połączeniu z promieniowaniem neutronowym są poważne i komórki nie mogą przejść do fazy mitozy (90). Zastosowanie nanocząstek złota wpłynęło na przebieg cyklu komórkowego w przypadku obu linii. Potwierdzają to dotychczas przeprowadzone badania, które sugerują, że GNPs oddziałują z błonami komórkowymi i strukturami wewnątrzkomórkowymi, potencjalnie zmieniając rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego lub powodowanie dodatkowych uszkodzeń DNA dzięki interakcji z promieniowaniem (140). Widoczny efekt interakcji pomiędzy promieniowaniem a obecnością GNPs i BPA świadczy o tym, że rodzaj traktowania miał istotny wpływ na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Z prowadzonych badań wynika także, że GNPs mogą niektóre komórki uwrażliwiać na działanie promieniowania, natomiast na inne mają wpływ ochronny. Na komórki nowotworowe piersi typu TNBC - MDA-MB-231 i typu luminalnego - MCF-7, nanocząstki złota wpływają w sposób uwrażliwiający na promieniowanie, zwiększając efekt BNCT, poprzez zmianę rozkładu dawki promieniowania i wzmacniając poziom powstałych uszkodzeń DNA (141). Dodatkowo, komórki nowotworowe piersi trójjemne typu basal wykazywały wyższy wychwyt glutaminy niż komórki nowotworów luminalnych. Glutamina jest istotna dla aktywacji szlaku mTOR w komórkach nowotworowych piersi oraz indukcji proliferacji komórek nowotworowych, co sugeruje, że MDA-MB-231 szybciej przechodzą podziały mitotyczne niż MCF-7 (111, 112).

5.3. Zbadanie przeżywalności komórkowej linii nowotworowych MDA-MB-231 i MCF-7 po zastosowaniu nanocząstek złota jako promieniouwrażliwacza w terapii borowo-neutronowej

W celu analizy przeżywalności komórkowej wykonano test klonogeny na obu liniach komórkowych MDA-MB-231 i MCF-7. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że promieniowanie mieszane znacząco zmniejszyło wskaźnik przeżywalności komórek niezależnie od typu komórek nowotworowych. Potwierdzają to dotychczasowe badania

dotyczące właściwości cytotoksycznych promieniowania mieszanego – gamma i neutronowego (142). W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano największy spadek przeżywalności w próbach napromienionych z GNPs 50 nm i 100 nm inkubowanych 24h z dodanym BPA w komórkach MDA-MB-231. Zauważono także zwiększoną, nieoczekiwaną przeżywalność w próbach nienapromienionych z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA oraz z samymi GNPs 50 nm inkubowanych 24h. Podobny efekt opisali Jain i wsp., w których zaobserwowano wzrost przeżywalności komórkowej po zastosowaniu nanocząstek złota 24h przed napromienianiem (87). W przypadku komórek MCF-7 zauważono spadek przeżywalności po zastosowaniu samych nanocząstek złota, co wykazały wykonane do tej pory badania przez między innymi Musielak i wsp. (114, 122, 123). Największy spadek wskaźnika przeżywalności zauważono w próbie napromienionej z GNPs 50 nm z inkubacją 4-godzinną z dodanym BPA. Komórki nowotworowe potraktowane GNPs przed napromienianiem, wykazywały zdecydowanie zmniejszoną przeżywalność w stosunku do komórek bez inkubacji z GNPs, przy czym dawka promieniowania wymagana do zabicia 90% komórek w obecności nanocząstek złota nieznacznie spadła (90). Wykazano ten trend również w przedstawionej pracy eksperymentalnej. Wyniki ilościowe wykazują, według badań przeprowadzonych przez Kim i wsp., że GNPs zwiększyły promieniowrażliwość komórek nowotworowych na działanie promieniowania gamma o $\sim 1,4$, natomiast dla promieniowania neutronowego o $\sim 1,8$ w warunkach *in vitro* (90). Nieznaczne różnice w przeżywalności komórkowej pomiędzy próbami z GNPs 50 nm i GNPs 100 nm można przypisać ich wychwytowi przez komórki nowotworowe, gdzie te pierwsze łatwiej wnikają do wnętrza komórek MCF-7 umożliwiając ich lepsze uwrażliwienie na działanie promieniowania (99). Czas inkubacji z nanocząstkami (4h lub 24h) też miał wpływ na efektywność klonogenną komórek MDA-MB-231 i MCF-7, gdzie krótsza inkubacja z GNPs w przypadku linii MCF-7, wykazuje większy wpływ na zmniejszenie przeżywalności komórkowej. Natomiast, w komórkach MDA-MB-231 większy wpływ mają nanocząstki inkubowane 24h z komórkami. Interakcja pomiędzy GNPs i BPA dodatkowo wzmacnia uszkodzenia spowodowane promieniowaniem neutronowym powodując zmniejszenie przeżywalności. Co więcej, GNPs wzmacniają efekt zdarzeń letalnych na dawkę promieniowania, co znacząco zmniejsza przeżywalność komórkową (90).

6. Wnioski

W niniejszej pracy przeanalizowano uwrażliwiający wpływ nanocząstek złota w dwóch różnych rozmiarach (50 nm i 100 nm) ze zróżnicowanymi czasami inkubacji (4h i 24h) na komórki nowotworowe piersi MDA-MB-231 i MCF-7 w BNCT.

Uzyskane wyniki dotyczące uwrażliwiającego wpływu GNPs na efektywność terapeutyczną BNCT w komórkach nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7 z wyżej wymienionych testów sugerują, że GNPs zwiększają efektywność terapii. Wskazuje na to uzyskana istotność statystyczna wielu prób eksperymentalnych, gdzie połączono GNPs z BPA i z promieniowaniem w porównaniu do prób z samym BPA. W linii komórkowej nowotworowej piersi podtypu trójąrnego - MDA-MB-231, zauważono, że promieniowrażliwość na BNCT bardziej zwiększają nanocząstki złota o rozmiarze 100 nm inkubowane z komórkami przez 24h. Natomiast, w przypadku MCF-7 są to GNPs o rozmiarze 50 nm i czas inkubacji miał mniejsze znaczenie.

Analiza cytotoksyczności GNPs w połączeniu z BPA nie wykazała istotnie statystycznie różnice pomiędzy zastosowanymi stężeniami przy inkubacji 4-godzinnej. Istotność statystyczną uzyskano natomiast we wszystkich próbach badawczych przy inkubacji 24-godzinnej, przy czym w MDA-MB-231 aktywność metaboliczna wzrosła, a w komórkach MCF-7 – spadała. Otrzymane wyniki sugerują, że każde z dobranych stężeń byłoby odpowiednie do przeprowadzenia badań. Współczynnik SSC, odnoszący się do wnikania nanocząstek do komórek, dostarczył dodatkowych informacji dotyczących optymalizacji czasu inkubacji i rozmiaru GNPs. Do komórek MCF-7 lepiej wnikały GNPs 50 nm z inkubacją 24h, a do komórek MDA-MB-231 - GNPs 100 nm inkubowane 24h.

Test klonogeny wykazał znaczący spadek przeżywalności po ekspozycji na promieniowanie, co potwierdza wysoką skuteczność samego promieniowania mieszanego w przypadku obu linii. Traktowanie komórek GNPs, dodatkowo obniża wskaźnik przeżywalności. Wynik sugeruje, że komórki nowotworowe piersi obu linii komórkowych są znacząco uszkodzane i eliminowane dzięki połączeniu nanocząstek złota z BPA wraz z ekspozycją na promieniowanie. Dla MDA-MB-231 najlepszą efektywność BNCT uzyskano w próbach z dodanymi GNPs 100 nm i 50 nm z inkubacją 24h z dodanym BPA. W przypadku MCF-7 była najwyższa skuteczność BNCT po 24-godzinnej inkubacji w obecności BPA. Analiza statystyczna wykazała także, że w porównaniu do wyników otrzymanych z napromienionych prób badawczych z dodanym samym BPA, największy efekt otrzymano po

dodaniu w komórkach MDA-MB-231 zarówno GNPs 100 nm, jak i 50 nm z inkubacją 24-godzinną w połączeniu z BPA i promieniowaniem. W przypadku MCF-7 najistotniejszy efekt otrzymano w przypadku połączenia BPA z GNPs 100 nm z inkubacją 24h.

Analizując wyniki otrzymane w teście mikrojądrowym z prób napromienionych, jednoznacznie był zauważalny efekt zwiększenia częstości MN w obecności GNPs. Dla MDA-MB-231 i MCF-7 w próbach eksperymentalnych napromienionych z GNPs 100 nm i 50 nm z inkubacją 24h z BPA była zauważalna największa genotoksyczność BNCT w porównaniu do kontroli. Natomiast, w porównaniu do traktowania komórek samym BPA, największy efekt zauważono po dodaniu GNPs 100 nm w połączeniu z BPA dla MDA-MB-231, a w MCF-7 – po zastosowaniu GNPs 100 nm oraz GNPs 50 nm z inkubacją 24h wraz z BPA. Niniejsze badanie dostarcza ważnych spostrzeżeń na temat roli promieniowania neutronowego i traktowania komórek substancjami, takimi jak GNPs i BPA w BNCT, zwłaszcza w odniesieniu do tworzenia mikrojąder jako markera genotoksyczności. Odkrycia sugerują, że podczas gdy promieniowanie neutronowe znacząco zwiększa tworzenie mikrojąder, wpływ różnych metod traktowania, może mieć kluczowe znaczenie w modulacji odpowiedzi genotoksycznej. Dalsze badania, szczególnie z większymi rozmiarami próbek i różnymi dawkami, są potrzebne, aby w pełni zrozumieć niuanse tych interakcji i zoptymalizować protokoły BNCT w celu zmaksymalizowania skuteczności terapii nowotworowej.

W teście γ -H2AX otrzymane wyniki w obu liniach komórkowych były istotne statystycznie pod kątem wpływu promieniowania na częstotliwość ognisk naprawczych γ -H2AX. Promieniowanie wyraźnie zwiększało poziom uszkodzeń DNA. Wyniki testu podkreślają istotną rolę promieniowania w indukowaniu uszkodzeń DNA w ramach BNCT. Synergistyczny efekt BPA w zwiększaniu tych uszkodzeń jest oczywisty, podczas gdy wkład GNPs wymaga dalszych badań. Te spostrzeżenia są kluczowe dla udoskonalenia strategii BNCT i optymalizacji protokołu w celu poprawy skuteczności terapeutycznej. Dla komórek MDA-MB-231 największą skuteczność terapii otrzymano w napromienionych próbach badawczych z dodanymi GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA, natomiast dla MCF-7 – w próbach z GNPs 50 nm z inkubacją 24h. Najistotniejszy statystycznie efekt w porównaniu do wyników z napromienionej próby badawczej z samym BPA, zaobserwowano w komórkach MCF-7 w połączeniu BPA z GNPs 50 nm z inkubacją 24h i z promieniowaniem.

Wyniki badania apoptozy podkreślają wpływ zróżnicowanego traktowania komórek, w tym rozmiaru nanocząstek, obecności związków boru i ekspozycji na promieniowanie, na

żywołność komórek i poziom apoptozy w kontekście BNCT. Widoczny spadek procentowej częstości komórek w późnej fazie apoptozy i nekrozy pokazuje złożoność mechanizmów, które mają miejsce w komórkach nowotworowych piersi po zastosowaniu nanocząstek złota w połączeniu z BPA i promieniowaniem. W przypadku linii MDA-MB-231, otrzymane wyniki wymagają przeprowadzenia dodatkowych badań, ponieważ otrzymany efekt apoptozy jest nieznaczny. Istotność statystyczną uzyskano w próbach eksperymentalnych, gdzie zauważono spadek częstości komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych i nekrotycznych w połączeniu GNPs 100 nm z BPA. Natomiast, w przypadku MCF-7 istotny statystycznie efekt synergistyczny pomiędzy promieniowaniem i BPA w połączeniu z nanocząstkami zauważono w nienapromienionych próbach eksperymentalnych z GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA. Otrzymane wyniki pokazują spadek procentowej częstości występowania komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych i nekrotycznych.

Podsumowując, można jednoznacznie stwierdzić, że uzyskane wyniki poszerzają wiedzę dotychczas uzyskaną odnośnie uwrażliwiania komórek nowotworowych piersi MDA-MB-231 i MCF-7 za pomocą GNPs w leczeniu terapią borowo-neutronową. Jednocześnie, wyniki badań pokazują złożoność procesów, które zachodzą w trakcie leczenia BNCT oraz potwierdzają dotychczas otrzymywane wyniki. Konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia i pogłębienia uzyskanych obserwacji z otrzymanych wyników oraz procesów, które wpływają na efektywność terapii w połączeniu z nanocząstkami złota. Dotychczasowe wyniki sugerują, że lepsze zwiększenie efektywności terapii występuje w obu liniach komórkowych przy zastosowaniu połączenia GNPs 100 nm z inkubacją 24h z BPA.

7. Bibliografia

1. Loap P., De Marzi L., Almeida C.E., Barcellini A., Bradley J., De Santis M.C., et al. Hadrontherapy techniques for breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.*;169:103574, 2022.
2. Taylor H.J., Goldhaber M. Detection of Nuclear Disintegration in a Photographic Emulsion. *Nature.* 135(3409):341–341, 1935.
3. Locher G.L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. *Am J Roentgenol Radium Ther.*, (36):1–13, 1936.
4. Barth R.F., Mi P., Yang W. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer. *Cancer Commun.*, 38(1):1–15, 2018.
5. Wang S., Zhang Z., Miao L., Li Y. Boron Neutron Capture Therapy: Current Status and Challenges. *Front Oncol.*, 12:788770, 2022.
6. Sauerwein W., Wittig A., Moss R., Nakagawa Y. *Neutron Capture Therapy: Principles and Applications.* Springer, DOI: 10.1007/978-3-642-31334-9, 2012.
7. Moss R.L. Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Appl Radiat Isot.*, 88:2–11, 2014.
8. Slatkin D.N. A History of Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors: Postulation of a Brain Radiation Dose Tolerance Limit. *Brain.*, 114(4):1609–29, 1991.
9. Asbury A.K., Ojemann R.G., Nielsen S.L., Sweet W.H. Neuropathologic Study of Fourteen Cases of Malignant Brain Tumor Treated by Boron-10 Slow Neutron Capture Radiation. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 31(2):278–303, 1972.
10. Soloway A.H., Hatanaka H., Davis M.A. Penetration of Brain and Brain Tumor. VII. Tumor-Binding Sulfhydryl Boron Compounds. *J Med Chem.*, 10(4):714–7, 1967.
11. Hatanaka H. Clinical Results of Boron Neutron Capture Therapy. *Neutron Beam Design, Development, and Performance for Neutron Capture Therapy.* Springer US; s. 15–21, 1990, DOI: 10.1007/978-1-4684-5802-2_2.
12. Hatanaka H., Sweet W.H., Sano K., Ellis F. The present status of boron-neutron capture therapy for tumors. *Pure Appl Chem.*, 63(3):373–4, 1991.

13. Mishima Y., Ichihashi M., Hatta S., Honda C., Yamamura K., Nakagawa T., i in. First human clinical trial of melanoma neutron capture. *Diagnosis and therapy. Strahlenther Onkol Organ Dtsch Rontgengesellschaft Al.*, 165(2–3):251–4,1989.
14. Dymova M.A., Taskaev S.Y., Richter V.A., Kuligina E.V. Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives. *Cancer Commun.*, 40(9):406–21, 2020.
15. Barth R.F., Zhang Z., Liu T. A realistic appraisal of boron neutron capture therapy as a cancer treatment modality. *Cancer Commun.*, 38(1):1–7, 2018.
16. Barth R.F., H. Vicente M., Harling O.K., Kiger W., Riley K.J., Binns P.J., i in. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. *Radiat Oncol.*, 7(1):146, 2012.
17. Kato I., Fujita Y., Maruhashi A., Kumada H., Ohmae M., Kirihata M., i in. Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies. *Appl Radiat Isot.*, 67(7–8):S37–42, 2009.
18. Fukuda H. Response of Normal Tissues to Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) with ¹⁰B-Borocaptate Sodium (BSH) and ¹⁰B-Paraboronophenylalanine (BPA). *Cells.*, 10(11):2883, 2021.
19. He T., Chittur S.V., Musah R.A. Impact on Glioblastoma U87 Cell Gene Expression of a Carborane Cluster-Bearing Amino Acid: Implications for Carborane Toxicity in Mammalian Cells. *ACS Chem Neurosci.*, 10(3):1524–34, 2019.
20. Kanemitsu T., Kawabata S., Fukumura M., Futamura G., Hiramatsu R., Nonoguchi N., i in. Folate receptor-targeted novel boron compound for boron neutron capture therapy on F98 glioma-bearing rats. *Radiat Environ Biophys.*, 58(1):59–67, 2019.
21. Miyabe J., Ohgaki R., Saito K., Wei L., Quan L., Jin C., i in. Boron delivery for boron neutron capture therapy targeting a cancer-upregulated oligopeptide transporter. *J Pharmacol Sci.*, 139(3):215–22, 2019.
22. Isono A., Tsuji M., Sanada Y., Matsushita A., Masunaga S., Hirayama T., i in. Design, Synthesis, and Evaluation of Lipopeptide Conjugates of

- Mercaptoundecahydrododecaborate for Boron Neutron Capture Therapy. *ChemMedChem.*, 14(8):823–32, 2019.
23. Fuentes I., García-Mendiola T., Sato S., Pita M., Nakamura H., Lorenzo E., i in. Metallacarboranes on the Road to Anticancer Therapies: Cellular Uptake, DNA Interaction, and Biological Evaluation of Cobaltabisdicarbollide [COSAN][−]. *Chem – Eur J.*, 24(65):17239–54, 2018.
 24. Yang W., Barth R.F., Wu G., Huo T., Tjarks W., Ciesielski M., i in. Convection enhanced delivery of boronated EGF as a molecular targeting agent for neutron capture therapy of brain tumors. *J Neurooncol.*, 95(3):355–65, 2009.
 25. Gadan M.A., González S.J., Batalla M., Olivera M.S., Policastro L., Szejnberg M.L. Application of BNCT to the treatment of HER2+ breast cancer recurrences: Research and developments in Argentina. *Appl Radiat Isot.*, 104:155–9, 2015.
 26. Luderer M.J., Muz B., Alhallak K., Sun J., Wasden K., Guenther N., i in. Thermal Sensitive Liposomes Improve Delivery of Boronated Agents for Boron Neutron Capture Therapy. *Pharm Res.*, 36(10):144, 2019.
 27. Sonali, Singh R.P., Singh N., Sharma G., Vijayakumar M.R., Koch B., i in. Transferrin liposomes of docetaxel for brain-targeted cancer applications: formulation and brain theranostics. *Drug Deliv.*, 23(4):1261–71, 2016.
 28. Barth R.F., Yang W., Nakkula R.J., Byun Y., Tjarks W., Chu Wu L., i in. Evaluation of TK1 targeting carboranyl thymidine analogs as potential delivery agents for neutron capture therapy of brain tumors. *Appl Radiat Isot.*, 106:251–5, 2015.
 29. Dukenbayev K., Korolkov I.V., Tishkevich D.I., Kozlovskiy A.L., Trukhanov S.V., Gorin Y.G., i in. Fe₃O₄ Nanoparticles for Complex Targeted Delivery and Boron Neutron Capture Therapy. *Nanomater Basel Switz.*, 9(4):494, 2019.
 30. Ferreira T., Miranda M., Rocha Z., Leal A., Gomes D., Sousa E. An Assessment of the Potential Use of BNNTs for Boron Neutron Capture Therapy. *Nanomaterials.*, 7(4):82, 2017.

31. Garabalino M.A., Olaiz N., Portu A., Saint Martin G., Thorp S.I., Pozzi E.C.C., i in. Electroporation optimizes the uptake of boron-10 by tumor for boron neutron capture therapy (BNCT) mediated by GB-10: a boron biodistribution study in the hamster cheek pouch oral cancer model. *Radiat Environ Biophys.*, 58(3):455–67, 2019.
32. Fan C.H., Wang T.W., Hsieh Y.K., Wang C.F., Gao Z., Kim A., i in. Enhancing Boron Uptake in Brain Glioma by a Boron-Polymer/Microbubble Complex with Focused Ultrasound. *ACS Appl Mater Interfaces.*, 11(12):11144–56, 2019.
33. Nomoto T., Inoue Y., Yao Y., Suzuki M., Kanamori K., Takemoto H., i in. Poly(vinyl alcohol) boosting therapeutic potential of *p* -boronophenylalanine in neutron capture therapy by modulating metabolism. *Sci Adv.*, 6(4):eaaz1722, 2020.
34. Nano R., Barni S., Chiari P., Pinelli T., Fossati F., Altieri S., i in. Efficacy of boron neutron capture therapy on liver metastases of colon adenocarcinoma: optical and ultrastructural study in the rat. *Oncol Rep.*, 11(1):149–53, 2004.
35. Catterall M., Rogers C., Thomlinson R.H., Field S.B. An investigation into the clinical effects of fast neutrons. *Br J Radiol.*, 44(524):603–11, 1971.
36. Wittig A., Moss R., Kaiser G.M., Malago M., Nievaart V., Sauerwein W.A. Boron neutron capture therapy for an explanted organ: The logistical challenges. *Appl Radiat Isot.*, 67(7–8):S302–5, 2009.
37. Particle Data Group, Workman RL, Burkert VD, Crede V, Klempt E, Thoma U, et al. Review of Particle Physics. *Prog Theor Exp Phys.* 8 sierpnia 2022;2022(8):083C01.
38. Abele H. The neutron. Its properties and basic interactions. *Prog Part Nucl Phys.*, 60(1):1–81, 2008.
39. Rauch H., Werner S.A. Neutron interferometry: lessons in experimental quantum mechanics. Oxford: Clarendon press; 2000.
40. Current Status of Neutron Capture Therapy. International Atomic Energy Agency, 2001 (TECDOC Series).
41. Schmitt H.W., Block R.C., Bailey R.L. Total neutron cross section of B10 in the thermal neutron energy range. *Nucl Phys.*, 17:109–15, 1960.

42. Naito F. Introduction to accelerators for boron neutron capture therapy. *Ther Radiol Oncol.*, 2:54–54, 2018.
43. Moss R.L., Aizawa O., Beynon D., Brugger R., Constantine G., Harling O., i in. The requirements and development of neutron beams for neutron capture therapy of brain cancer. *J Neurooncol.*, 33(1/2):27–40, 1997.
44. Tanaka H. Current Status of Accelerator-Based Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). 2021; DOI:10.11323/jjimp.41.3_117.
45. Kawabata S., Suzuki M., Hirose K., Tanaka H., Kato T., Goto H., i in. Accelerator-based BNCT for patients with recurrent glioblastoma: a multicenter phase II study. *Neuro-Oncol Adv.*, 3(1):vdab067, 2021.
46. Miyatake S.I., Kawabata S., Hiramatsu R., Kuroiwa T., Suzuki M., Ono K. Boron Neutron Capture Therapy of Malignant Gliomas. *Progress in Neurological Surgery.*, s. 48–56, 2018.
47. Koivunoro H., Kankaanranta L., Seppälä T., Haapaniemi A., Mäkitie A., Joensuu H. Boron neutron capture therapy for locally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: An analysis of dose response and survival. *Radiother Oncol.*, 137:153–8, 2019.
48. Wang L., Liu Y.H., Chou F., Jiang S. Clinical trials for treating recurrent head and neck cancer with boron neutron capture therapy using the Tsing-Hua Open Pool Reactor. *Cancer Commun.*, 38(1):1–7, 2018.
49. Suzuki M., Suzuki O., Sakurai Y., Tanaka H., Kondo N., Kinashi Y., i in. Reirradiation for locally recurrent lung cancer in the chest wall with boron neutron capture therapy (BNCT). *Int Cancer Conf J.*, 1(4):235–8, 2012.
50. Yanagie H., Higashi S., Seguchi K., Ikushima I., Fujihara M., Nonaka Y., i in. Pilot clinical study of boron neutron capture therapy for recurrent hepatic cancer involving the intra-arterial injection of a ¹⁰B¹⁰SH-containing WOW emulsion. *Appl Radiat Isot.*, 88:32–7, 2014.

51. Hiratsuka J., Kamitani N., Tanaka R., Yoden E., Tokiya R., Suzuki M., i in. Boron neutron capture therapy for vulvar melanoma and genital extramammary Paget's disease with curative responses. *Cancer Commun Lond Engl.*, 38(1):38, 2018.
52. Komori T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol Med Chir (Tokyo).*, 57(7):301–11, 2017.
53. Gupta P., Jalali R. Long-term Survivors of Childhood Brain Tumors: Impact on General Health and Quality of Life. *Curr Neurol Neurosci Rep.*, 17(12):99, 2017.
54. Cuperlovic-Culf M., Ferguson D., Culf A., Morin P., Touaibia M. ¹H NMR metabolomics analysis of glioblastoma subtypes: correlation between metabolomics and gene expression characteristics. *J Biol Chem.*, 287(24):20164–75, 2012.
55. Farhood B., Samadian H., Ghorbani M., Zakariaee S.S., Knaup C. Physical, dosimetric and clinical aspects and delivery systems in neutron capture therapy. *Rep Pract Oncol Radiother.*, 23(5):462–73, 2018.
56. Miyatake S.I., Kawabata S., Hiramatsu R., Kuroiwa T., Suzuki M., Kondo N., i in. Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo).*, 56(7):361–71, 2016.
57. Kawabata S., Miyatake S.I., Nonoguchi N., Hiramatsu R.Y., Iida K., Miyata S., i in. Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. *Appl Radiat Isot.*, 67(7–8):S15–8, 2009.
58. Kageji T., Nagahiro S., Mizobuchi Y., Matsuzaki K., Nakagawa Y., Kumada H. Boron neutron capture therapy (BNCT) for newly-diagnosed glioblastoma: Comparison of clinical results obtained with BNCT and conventional treatment. *J Med Invest.*, 61(3.4):254–63, 2014.
59. Kankaanranta L., Seppälä T., Koivunoro H., Saarilahti K., Atula T., Collan J., i in. Boron Neutron Capture Therapy in the Treatment of Locally Recurred Head-and-Neck Cancer: Final Analysis of a Phase I/II Trial. *Int J Radiat Oncol.*, 82(1):e67–75, 2012.
60. Shiba H., Takeuchi K., Hiramatsu R., Furuse M., Nonoguchi N., Kawabata S., i in. Boron Neutron Capture Therapy Combined with Early Successive Bevacizumab Treatments for

- Recurrent Malignant Gliomas - A Pilot Study. *Neurol Med Chir (Tokyo)*., 58(12):487–94, 2018.
61. Kankaanranta L., Seppälä T., Koivunoro H., Saarilahti K., Atula T., Collan J., i in. Boron Neutron Capture Therapy in the Treatment of Locally Recurred Head and Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol.*, 69(2):475–82, 2007.
 62. Wang L.W., Chen Y.W., Ho C.Y., Hsueh Liu Y.W., Chou F.I., Liu Y.H., i in. Fractionated Boron Neutron Capture Therapy in Locally Recurrent Head and Neck Cancer: A Prospective Phase I/II Trial. *Int J Radiat Oncol.*, 95(1):396–403, 2016.
 63. Fujita Y., Kato I., Iwai S., Ono K., Suzuki M., Sakurai Y., i in. Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol.*, 4(1):63, 2009.
 64. Zhou G., Liu Z., Myers J.N. *TP53* Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem.*, 117(12):2682–92, 2016.
 65. González S.J., Bonomi M.R., Santa Cruz G.A., Blaumann H.R., Larrieu O.A.C., Menéndez P., i in. First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome. *Appl Radiat Isot.*, 61(5):1101–5, 2004.
 66. Menéndez P.R., Roth B.M.C., Pereira M.D., Casal M.R., González S.J., Feld D.B., i in. BNCT for skin melanoma in extremities: Updated Argentine clinical results. *Appl Radiat Isot.*, 67(7–8):S50–3, 2009.
 67. Yong Z., Song Z., Zhou Y., Liu T., Zhang Z., Zhao Y., i in. Boron neutron capture therapy for malignant melanoma: first clinical case report in China. *Chin J Cancer Res.*, 28(6):634–40, 2016.
 68. Miyatake S.I., Tamura Y., Kawabata S., Iida K., Kuroiwa T., Ono K. Boron Neutron Capture Therapy for malignant tumors related to meningiomas. *Neurosurgery.*, 61(1):82–91, 2007.

69. Kawabata S., Hiramatsu R., Kuroiwa T., Ono K., Miyatake S.I. Boron neutron capture therapy for recurrent high-grade meningiomas: Clinical article. *J Neurosurg.*, 119(4):837–44, 2013.
70. Suzuki M., Endo K., Satoh H., Sakurai Y., Kumada H., Kimura H., i in. A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT). *Radiother Oncol.*, 88(2):192–5, 2008.
71. Suzuki M., Sakurai Y., Hagiwara S., Masunaga S., Kinashi Y., Nagata K., i in. First Attempt of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.*, 37(5):376–81, 2007.
72. Futamura G., Kawabata S., Siba H., Kuroiwa T., Suzuki M., Kondo N., i in. A case of radiation-induced osteosarcoma treated effectively by boron neutron capture therapy. *Radiat Oncol.*, 9(1):237, 2014.
73. Andoh T., Fujimoto T., Sudo T., Suzuki M., Sakurai Y., Sakuma T., i in. Boron neutron capture therapy as new treatment for clear cell sarcoma: Trial on different animal model. *Appl Radiat Isot.*, 88:59–63, 2014.
74. Kolak A., Kamińska M., Sygit K., Budny A., Surdyka D., Kukielka-Budny B., i in. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agric Environ Med.*, 24(4):549–53, 2017.
75. Anastasiadi Z., Lianos G.D., Ignatiadou E., Harissis H.V., Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updat Surg.*, 69(3):313–7, 2017.
76. DeSantis C.E., Ma J., Gaudet M.M., Newman L.A., Miller K.D., Goding Sauer A., i in. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.*, 69(6):438–51, 2019.
77. Kumar P., Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.*, 293(2):247–69, 2016.
78. Holliday D.L., Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.*, 13(4):215, 2011.
79. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B., Senn H.J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St

- Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.*, 22(8):1736–47, 2011.
80. Ahmad A. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress. Springer International Publishing; *Advances in Experimental Medicine and Biology*; t. 1152, 2019.
 81. Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J., Gnant M., Houssami N., Poortmans P., i in. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primer.*, 5(1):66, 2019.
 82. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/ *neu* Oncogene. *Science.*, 235(4785):177–82, 1987.
 83. Baselga J., Swain S.M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer.*, 9(7):463–75, 2009.
 84. Lehmann B.D., Pietenpol J.A., Tan A.R. Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Subtypes and New Targets for Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.*, (35):e31–9, 2015.
 85. Seneviratne D., Advani P., Trifiletti D.M., Chumsri S., Beltran C.J., Bush A.F., i in. Exploring the Biological and Physical Basis of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) as a Promising Treatment Frontier in Breast Cancer. *Cancers.*, 14(12):3009, 2022.
 86. Her S., Jaffray D.A., Allen C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv Drug Deliv Rev.*, 109:84–101, 2017.
 87. Jain S., Hirst D.G., O’Sullivan J.M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol.*, 85(1010):101–13, 2012.
 88. Butterworth K.T., Coulter J.A., Jain S., Forker J., McMahon S.J., Schettino G., i in. Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy. *Nanotechnology.*, 21(29):295101, 2010.
 89. Rancoule C., Magné N., Vallard A., Guy J.B., Rodriguez-Lafrasse C., Deutsch E., i in. Nanoparticles in radiation oncology: From bench-side to bedside. *Cancer Lett.*, 375(2):256–62, 2016.

90. Kim E.H., Kim M.S., Song H.S., Yoo S.H., Sai S., Chung K., i in. Gold nanoparticles as a potent radiosensitizer in neutron therapy. *Oncotarget.*, 8(68):112390–400, 2017.
91. Takahashi K., Suzuki K. Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Cancer.*, 55(3):453–8, 1993.
92. Cailleau R., Olivé M., Cruciger Q.V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.*, 14(11):911–5, 1978.
93. Zucker R.M., Massaro E.J., Sanders K.M., Degn L.L., Boyes W.K. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry A.*, 77A(7):677–85, 2010.
94. Lankoff A., Sandberg W.J., Wegierek-Ciuk A., Lisowska H., Refsnes M., Sartowska B., i in. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicol Lett.*, 208(3):197–213, 2012.
95. Krajewski P. Biologiczne skutki promieniowania jonizującego. Materiał dydaktyczny dla Wydziału Fizyki Politechniki Warszawskiej. 2009.
96. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.*, 21(4):1534, 2020.
97. Milecki P., Szyfter K. Efekt karcinogeny napromieniania w przedziale niskich dawek. *Rep Pract Oncol Radiother.*, 8:S246, 2003.
98. Arnaldi U. Hadrontherapy in the World and the Programmes of the Tera Foundation. *Tumori J.*, 84(2):188–99, 1998.
99. Chen Y., Yang J., Fu S., Wu J. Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int J Nanomedicine.*, 15:9407–30, 2020.
100. Feiner I.V.J., Pulagam K.R., Gómez-Vallejo V., Zamacola K., Baz Z., Caffarel M.M., i in. Therapeutic Pretargeting with Gold Nanoparticles as Drug Candidates for Boron Neutron Capture Therapy. *Part Part Syst Charact.*, 37(12):2000200, 2020.

101. Cunningham C., de Kock M., Engelbrecht M., Miles X., Slabbert J., Vandevoorde C. Radiosensitization Effect of Gold Nanoparticles in Proton Therapy. *Front Public Health.*, 9:699822, 2021.
102. Wang C., Jiang Y., Li X., Hu L. Thioglucose-bound gold nanoparticles increase the radiosensitivity of a triple-negative breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Breast Cancer.*, 22(4):413–20, 2015.
103. Wongthai P., Hagiwara K., Miyoshi Y., Wiriyasermkul P., Wei L., Ohgaki R., i in. Boronophenylalanine, a boron delivery agent for boron neutron capture therapy, is transported by $ATB^{0,+}$, LAT 1 and LAT 2. *Cancer Sci.*, 106(3):279–86, 2015.
104. Hermawan A., Susidarti R.A., Ramadani R.D., Qodria L., Utomo R.Y., Ishimura M., i in. Cellular uptake evaluation of pentagamaboronon-0 (PGB-0) for boron neutron capture therapy (BNCT) against breast cancer cells. *Invest New Drugs.*, 37(6):1292–9, 2019.
105. Akter Z., Khan F.Z., Khan M.A. Gold Nanoparticles in Triple-Negative Breast Cancer Therapeutics. *Curr Med Chem.*, 30(3):316–34, 2023.
106. Kodiha M, Mahboubi H, Maysinger D, Stochaj U. Gold Nanoparticles Impinge on Nucleoli and the Stress Response in MCF7 Breast Cancer Cells. *Nanobiomedicine.* 2016;3:3.
107. Dahabiyeh LA, Mahmoud NN, Al-Natour MA, Safo L, Kim DH, Khalil EA, et al. Phospholipid-Gold Nanorods Induce Energy Crisis in MCF-7 Cells: Cytotoxicity Evaluation Using LC-MS-Based Metabolomics Approach. *Biomolecules.* 27 lutego 2021;11(3):364.
108. Wu Y., Ali M.R.K., Dansby K., El-Sayed M.A. Improving the Flow Cytometry-based Detection of the Cellular Uptake of Gold Nanoparticles. *Anal Chem.*, 91(22):14261–7, 2019.
109. Tang F., Wei Y., Zhang S., Wang J., Gu W., Tang F., i in. Evaluation of Pharmacokinetics of Boronophenylalanine and Its Uptakes in Gastric Cancer. *Front Oncol.*, 12:925671, 2022.

110. Cha Y, Kim ES, Koo J. Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 19 marca 2018;19(3):907.
111. Puris E, Gynther M, Auriola S, Huttunen KM. L-Type amino acid transporter 1 as a target for drug delivery. *Pharm Res.* maja 2020;37(5):88.
112. Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z. *Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death.* Elsevier; s. 55–98, 2011.
113. Wang P., Zhen H., Jiang X., Zhang W., Cheng X., Guo G., i in. Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax. *BMC Cancer.*, 10(1):661, 2010.
114. McQuaid H.N., Muir M.F., Taggart L.E., McMahon S.J., Coulter J.A., Hyland W.B., i in. Imaging and radiation effects of gold nanoparticles in tumour cells. *Sci Rep.*, 6(1):19442, 2016.
115. Sun T., Zhang Z., Li B., Chen G., Xie X., Wei Y., i in. Boron neutron capture therapy induces cell cycle arrest and cell apoptosis of glioma stem/progenitor cells in vitro. *Radiat Oncol.*, 8(1):195, 2013.
116. Bhattarai S., Mackeyev Y., Venkatesulu B.P., Krishnan S., Singh P.K. CXCR4 chemokine receptor 4 (CXCR4) targeted gold nanoparticles potentially enhance radiotherapy outcomes in breast cancer. *Nanoscale.*, 13(45):19056–65, 2021.
117. Selim M.E., Hendi A.A. Gold Nanoparticles Induce Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 13(4):1617–20, 2012.
118. Mandal S., Bakeine G.J., Krol S., Ferrari C., Clerici A.M., Zonta C., i in. Design, development and characterization of multi-functionalized gold nanoparticles for biodetection and targeted boron delivery in BNCT applications. *Appl Radiat Isot.*, 69(12):1692–7, 2011.
119. Surapaneni S.K., Bashir S., Tikoo K. Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. *Sci Rep.*, 8(1):12295, 2018.

120. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* marca 2007;14(3):500–10.
121. Tudek B., Winczura A., Janik J., Siomek A., Foksinski M., Oliński R. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *Am J Transl Res.*, 2(3):254–84, 2010.
122. Singh S., Rajendran R., Kuroda K., Isogai E., Krstic-Demonacos M., Demonacos C. Oxidative stress and breast cancer biomarkers: the case of the cytochrome P450 2E1. *J Cancer Metastasis Treat.*, 2(7):268, 2016.
123. Woodbine L., Brunton H., Goodarzi A.A., Shibata A., Jeggo P.A. Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic Acids Res.*, 39(16):6986–97, 2011.
124. Masutani M., Baiseitov D., Itoh T., Hirai T., Berikhanova K., Murakami Y., i in. Histological and biochemical analysis of DNA damage after BNCT in rat model. *Appl Radiat Isot.*, 88:104–8, 2014.
125. Her S., Cui L., Bristow R.G., Allen C. Dual Action Enhancement of Gold Nanoparticle Radiosensitization by Pentamidine in Triple Negative Breast Cancer. *Radiat Res.*, 185(5):549, 2016.
126. Musielak M., Boś-Liedke A., Piwocka O., Kowalska K., Markiewicz R., Szymkowiak B., i in. The Role of Functionalization and Size of Gold Nanoparticles in the Response of MCF-7 Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation Comparing 2D and 3D In Vitro Models. *Pharmaceutics.*, 15(3):862, 2023.
127. Punshon L.D., Fabbri M.R., Phoenix B., Green S., Parsons J.L. Current Insights into the Radiobiology of Boron Neutron Capture Therapy and the Potential for Further Improving Biological Effectiveness. *Cells.*, 13(24):2065, 2024.
128. Francisco DC, Peddi P, Hair JM, Flood BA, Cecil AM, Kalogerinis PT, et al. Induction and processing of complex DNA damage in human breast cancer cells MCF-7 and nonmalignant MCF-10A cells. *Free Radic Biol Med.* lutego 2008;44(4):558–69.

129. Lee KJ, Mann E, Wright G, Piett CG, Nagel ZD, Gassman NR. Exploiting DNA repair defects in triple negative breast cancer to improve cell killing. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:1758835920958354.
130. Mao Z, Jiang Y, Liu X, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by homologous recombination, but not by nonhomologous end joining, is elevated in breast cancer cells. *Neoplasia N Y N. lipca* 2009;11(7):683–91.
131. Montenegro MF, González-Guerrero R, Sánchez-del-Campo L, Piñero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. Targeting the epigenetics of the DNA damage response in breast cancer. *Cell Death Dis.* 7 kwietnia 2016;7(4):e2180–e2180.
132. Kirsch-Volders M., Plas G., Elhajouji A., Lukamowicz M., Gonzalez L., Vande Loock K., i in. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol.*, 85(8):873–99, 2011.
133. Vales G., Suhonen S., Siivola K.M., Savolainen K.M., Catalán J., Norppa H. Genotoxicity and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles In Vitro: Role of Surface Functionalization and Particle Size. *Nanomaterials.*, 10(2):271, 2020.
134. Ramos-Pan L., Touzani A., Fernández-Bertólez N., Fraga S., Laffon B., Valdiglesias V. Impact of gold nanoparticle exposure on genetic material. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.*, 900:503827, 2024.
135. Lee J., Chatterjee D.K., Lee M.H., Krishnan S. Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Lett.*, 347(1):46–53, 2014.
136. Harada T., Hirose K., Wada Y., Sato M., Ichise K., Aoki M., i in. YC-1 sensitizes the antitumor effects of boron neutron capture therapy in hypoxic tumor cells. *J Radiat Res (Tokyo).*, 61(4):524–34, 2020.
137. Cuddihy A.R., O’Connell M.J. Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *International Review of Cytology*, Elsevier; s. 99–140, 2003.

138. Lan K.W., Huang W.Y., Chiu Y.L., Hsu F.T., Chien Y.C., Hsiao Y.Y., i in. In vivo investigation of boron-rich nanodrugs for treating triple-negative breast cancers via boron neutron capture therapy. *Biomater Adv.*, 155:213699, 2023.
139. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Recio MJ, Darband SG, Kaviani M, Safa A, Mihanfar A, et al. DNA damage response and breast cancer development: Possible therapeutic applications of ATR, ATM, PARP, BRCA1 inhibition. *DNA Repair*. lutego 2021;98:103032.
140. Pissuwan D., Valenzuela S.M., Cortie M.B. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends Biotechnol.*, 24(2):62–7, 2006.
141. Ahn J.M., Eom H.J., Yang X., Meyer J.N., Choi J. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere.*, 108:343–52, 2014.
142. Matsui T., Nuryadi E., Komatsu S., Hirota Y., Shibata A., Oike T., i in. Robustness of Clonogenic Assays as a Biomarker for Cancer Cell Radiosensitivity. *Int J Mol Sci.*, 20(17):4148, 2019.

Streszczenie

Terapia borowo-neutronowa (ang. *Boron Neutron Capture Therapy* – BNCT) to odmiana hadronoterapii, która jest oparta na zdolności wychwytu neutronów na jądrze izotopu ^{10}B oraz na reakcjach rozpadu. Pod wpływem tej reakcji, jądro boru rozpada się na wysokoenergetyczną cząsteczkę alfa i ^7Li , które przemieszczają się w obrębie komórki nowotworowej. BNCT jest metodą bimodalną, co oznacza, że najpierw musi być podany związek zawierający w swojej budowie strukturalnej izotop ^{10}B (BPA lub BSH), a następnie poddaje się działaniu promieniowania neutronowego. Skuteczność terapii zależy od równomierności rozkładu związku ^{10}B wewnątrz komórek nowotworowych. W powyższej pracy badano uwrażliwiający wpływ nanocząstek złota (GNPs) na komórki nowotworowe piersi typu trójujemnego MDA-MB-231 i luminalnego MCF-7 w terapii borowo-neutronowej. Głównym celem pracy badawczej było zbadanie możliwości zwiększenia efektywności terapii borowo-neutronowej za pomocą nanocząstek złota w komórkach nowotworowych piersi typu trójujemnego i luminalnego.

Badania wykonywano w Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Świerku, gdzie jako źródło promieniowania mieszanego był reaktor badawczy MARIA. Promieniowanie mieszane składało się w 50%-ach z promieniowania gamma i w 50%-ach z promieniowania neutronowego. Do eksperymentu wykorzystano dwie linie komórkowe nowotworów piersi MDA-MB-231 i MCF-7. GNPs wykorzystano w dwóch rozmiarach: 50 nm i 100 nm oraz zastosowano 4-godzinną i 24-godzinną inkubację z komórkami. Jako nośnik izotopu ^{10}B do badań wykorzystano borofenyloalaninę (BPA).

Wykonano test cytotoksyczności MTT w celu zoptymalizowania badań pod kątem doboru odpowiednich stężeń GNPs i BPA. Z eksperymentu wynikało, że badane stężenia zarówno GNPs, jak i BPA pod kątem 4-godzinnego czasu inkubacji komórek z nanocząstkami złota, nie wykazują istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi próbami. W przypadku inkubacji 24-godzinnej z GNPs istotne statystycznie były wszystkie próby badawcze, przy czym w MDA-MB-231 aktywność metaboliczna wzrosła, a w MCF-7 – spadła. Oznacza to, że każde z zaproponowanych stężeń byłoby odpowiednie do przeprowadzenia badań nad BNCT na komórkach nowotworowych piersi. GNPs dodawano w stężeniu $8\ \mu\text{l}$ na $1\ \text{ml}$ pożywki oraz $30\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BPA. W celu analizy wnikania nanocząstek do komórek zbadano współczynnik SSC. W teście wykazano, że GNPs 100 nm wnikają lepiej w połączeniu z BPA po inkubacji 24h z komórkami MDA-MB-231. Natomiast, w komórkach MCF-7 lepiej wnikają GNPs 50 nm po inkubacji 24-godzinnej.

W celu zbadania wpływu GNPs w połączeniu z BNCT na komórki nowotworowe piersi wykonano analizę progresji cyklu komórkowego, przeżywalności komórkowej, nieprawidłowej naprawy uszkodzeń DNA poprzez zbadanie częstości występowania mikrojąder, poziomu DSBs w komórkach na podstawie intensywności fluorescencji ognisk naprawczych γ -H2AX oraz poziomu apoptozy komórek. Uzyskane wyniki badań były zróżnicowane i wpływ na nie miał również typ traktowanych komórek nowotworowych piersi. W cyklu komórkowym zauważono zwiększony procent komórek w fazie G₂ cyklu w obu liniach komórkowych po zastosowaniu już nawet samego promieniowania, przy czym w komórkach MDA-MB-231 blok komórek w fazie G₂/M był na wyższym poziomie. Dodatkowe traktowanie komórek GNPs i BPA zwiększało poziom komórek w fazie G₂ cyklu. Taki wynik świadczy o tym, że DNA komórek zostało poważnie uszkodzone pod wpływem interakcji GNPs z BPA i z promieniowaniem mieszanym, co spowodowało dysfunkcję punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Komórki nowotworowe piersi typu trójęmnego MDA-MB-231 wykazały większe uszkodzenia po takim traktowaniu niż komórki typu luminalnego - MCF-7. W przypadku obu linii komórkowych, GNPs 100 nm z inkubacją 24h w połączeniu z BPA zwiększały efektywność terapii najlepiej. Sugeruje to, że większe nanocząstki efektywniej wpływają na poziom uszkodzeń DNA w interakcji z BPA i promieniowaniem.

Przeżywalność komórkowa w obu liniach komórkowych znacznie się zmniejszyła po napromienieniu komórek. Zauważono, że GNPs zwiększały ten efekt przyczyniając się do jeszcze niższej frakcji przeżywalności w próbach eksperymentalnych. Oznacza to, że nanocząstki maksymalizują poziom uszkodzeń doprowadzając do degradacji komórek ze zbyt rozległymi pęknięciami DNA. W komórkach MDA-MB-231 najlepszą efektywność uzyskano w próbach napromienionych z BPA z dodanymi GNPs 100 nm i GNPs 50 nm z inkubacją 24h, tak samo jak i w komórkach MCF-7. Analiza poziomu apoptozy wykazała spadek procentowej częstości komórek we wczesnej apoptozie oraz późnej apoptozie i nekrozie w próbach badawczych nienapromienionych z nanocząstkami złota i z BPA. Zauważono zmniejszenie populacji komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych w szczególności w próbie nienapromienionej z GNPs 50 nm z inkubacją 24h w połączeniu z BPA. W przypadku MDA-MB-231 zauważono podobną zależność po zastosowaniu GNPs 100 nm z inkubacją 24-godziną z BPA. Otrzymane wyniki pokazują dalszą potrzebę przeprowadzenia dodatkowych badań w celu bardziej szczegółowej analizy wpływu GNPs na komórki nowotworowe piersi typu trójęmnego i luminalnego pod kątem apoptozy.

Analiza częstości występowania mikrojąder wykazała znaczące różnice między próbami eksperymentalnymi. Synergistyczny efekt promieniowania z BPA i GNPs zwiększa częstość występowania mikrojąder, co świadczy o większym poziomie uszkodzeń genotoksycznych komórki. GNPs 100 nm z inkubacją 24h najbardziej wpływały na MN w komórkach MDA-MB-231, natomiast w MCF-7 były to GNPs 50 nm z inkubacją 4h i 24h. Test mikrojądrowy wykazał w obu liniach komórkowych zwiększony poziom błędnie naprawionych uszkodzeń DNA. Wyniki te potwierdza również analiza testu γ -H2AX, w którym po 24h był zauważalny wysoki poziom intensywności fluorescencji pochodzący z ognisk naprawczych. Promieniowanie odgrywa kluczową rolę w indukcji uszkodzeń DNA, a w połączeniu z BPA i z GNPs ten efekt ulega zwiększeniu. W komórkach MDA-MB-231 lepszy efekt uzyskano po inkubacji 24-godzinnej z GNPs 100nm, a w MCF-7 przy zastosowaniu zarówno GNPs 50 nm, jak i GNPs 100 nm z inkubacją 24h.

Terapia borowo-neutronowa jest obiecującą metodą hadronoterapii w celu leczenia nowotworów. Prowadzone badania na całym świecie umożliwiają dalszy jej rozwój, aby zwiększyć jej efektywność i dopracować każdy szczegół działania. Każde z prowadzonych badań nad źródłami promieniowania neutronowego, nowymi nośnikami ^{10}B czy też nad leczeniem różnych typów nowotworów, przybliża naukowców do uzyskania jak największej efektywności terapii. Uzyskane wyniki z przedstawionych w tej pracy badań dostarczają istotnych informacji odnośnie BNCT. Mogą one doprowadzić do rozwoju terapii borowo-neutronowej pod kątem leczenia nowotworów piersi przy dodatkowym zwiększeniu efektywności takiego leczenia. Co więcej, pokazują one złożoność procesu, który przebiega w trakcie stosowania BNCT oraz zróżnicowany jej wpływ w zależności od typu nowotworu.

Abstract

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is a type of hadrontherapy based on the ability to capture thermal neutrons on the ^{10}B isotope nucleus and on decay reactions. This reaction leads to the decay of ^{10}B nucleus into high-energy alpha particle and ^7Li which remain within the cancer cells. BNCT is a bimodal method what means that firstly, ^{10}B compound (BPA or BSH) have to be administered to the patient and later on, irradiation is performed with neutron radiation. The effectiveness of the therapy depends on the uniformity of ^{10}B compound distribution inside cancer cells. In presented research, the sensitizing effect of gold nanoparticles (GNPs) on breast cancer cell lines of triple-negative subtype MDA-MB-231 and luminal subtype MCF-7 was studied in the case of BNCT. The main aim of the research work was to investigate the possibility of increasing the effectiveness of boron-neutron therapy using gold nanoparticles in triple-negative and luminal breast cancer cells.

The research was carried out at the National Center for Nuclear Research in Świerk, where the MARIA research reactor was used as the source of mixed radiation beam. The mixed radiation consisted of 50% gamma radiation and 50% of neutron radiation. Two breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were used for the experiment. GNPs were added to cells in two sizes: 50 nm and 100 nm, and 4-hour and 24-hour incubation with cells was supplemented. Borophenylalanine (BPA) was used as a carrier of the ^{10}B isotope for the studies.

MTT cytotoxicity assay was performed to optimize the research in terms of selecting the appropriate concentrations of GNPs and BPA. The experiment showed that the tested concentrations of both GNPs and BPA for 4-hour incubation time of cells with gold nanoparticles, did not show statistically significant differences between individual trials. In the case of 24-hour incubation with GNPs, all test samples were statistically significant, with metabolic activity increasing in MDA-MB-231 and decreasing in MCF-7. This means that each of the proposed concentrations would be suitable for conducting research on BNCT on breast cancer cells. GNPs were added at a concentration of 8 μl per 1 ml of medium and the concentration of BPA was 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. In order to analyze the penetration of nanoparticles into cells, the SSC coefficient was examined. The test showed that GNPs 100 nm penetrate better in combination with BPA after 24 h incubation with MDA-MB-231 cells. On the other hand, GNPs 50 nm penetrate better in MCF-7 cells after 24 h incubation.

In order to examine the effect of GNPs in combination with BNCT on breast cancer cells, an analysis of cell cycle progression, cell survival, improper repair of DNA damage was

performed by examining the frequency of micronuclei, the level of DSBs in cells based on the fluorescence intensity of γ -H2AX repair foci and the level of cell apoptosis. The obtained research results were diverse and were also influenced by the type of treated breast cancer cells. In the cell cycle, an increased percentage of cells in the G₂ phase of the cycle was observed in both cell lines after the application of radiation alone, while in MDA-MB-231 cell line, the block of cells in the G₂/M phase was at a higher level. Additional treatment of cells with GNPs and BPA increased the level of cells in the G₂ phase of the cycle. This result indicates that the DNA of the cells was seriously damaged by the interaction of GNPs with BPA and with mixed radiation, which caused dysfunction of cell cycle checkpoints. MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells showed greater damage after such treatment than luminal type cells - MCF-7. In the case of both cell lines, GNPs 100 nm with 24h incubation in combination with BPA increased the effectiveness of the therapy the most. This suggests that larger nanoparticles more effectively affect the level of DNA damage in interaction with BPA and radiation.

In both cell lines, cell survivability significantly decreased after irradiation. It was observed that GNPs increased this effect contributing to an even lower survival fraction in the experimental trials. This means that nanoparticles maximize the level of damage leading to the degradation of cells with more extensive DNA strand breaks. In MDA-MB-231 cells, the best efficiency was obtained in the trials irradiated with BPA with added GNPs 100 nm and GNPs 50 nm with 24h incubation, and in MCF-7 with GNPs 50 nm with 24h incubation, the same as in MCF-7 cells. Analysis of the apoptosis level showed a decrease in the percentage of cells in early apoptosis and late apoptosis and necrosis in the non-irradiated test samples with gold nanoparticles and with BPA. A decrease in the population of late apoptotic and necrotic cells was observed, especially in the trial non-irradiated with GNPs 50 nm with 24h incubation in combination with BPA. In the case of MDA-MB-231 a similar correlation was observed after the use of 100 nm GNPs with 24-hour incubation with BPA. The obtained results show the need for additional studies to more thoroughly analyze the effect of GNPs on triple-negative and luminal breast cancer cells in terms of apoptosis. Analysis of the frequency of micronuclei showed significant differences between the experimental trials. The synergistic effect of radiation with BPA and GNPs increases the frequency of micronuclei, which indicates a higher level of genotoxic damages to the cells. GNPs 100 nm with 24h incubation had the greatest effect on MN in MDA-MB-231 cells, while in MCF-7 it was GNPs 50 nm with 4h and 24h incubation. The micronucleus assay showed an increased level of incorrectly repaired DNA damage in both cell lines. These results are also confirmed by the analysis of the γ H2AX test,

in which a high level of fluorescence intensity from repair foci was noticeable after 24h. Radiation plays a key role in the induction of DNA damage, and in combination with BPA and GNPs this effect is increased. In MDA-MB-231 cells, a better effect was obtained after 24-hour incubation with 100nm GNPs, and in MCF-7 both GNPs 50 nm and GNPs 100 nm with 24h incubation. Boron-neutron therapy is a promising method of hadrontherapy for the cancer treatment. Researches conducted around the world allows for its further development to increase its effectiveness and refine every detail of its action. Each of the performed studies on neutron radiation sources, new boron-10 carriers or on the treatment of various types of cancers brings scientists closer to achieving the highest possible effectiveness of the therapy. The results obtained from the research presented in this work provide important information on BNCT. They can lead to the development of boron-neutron therapy for the breast cancer treatment with an additional increase in the effectiveness. Moreover, they show the complexity of the process that takes place during BNCT and its varied impact depending on the type of cancer.

Suplement

Wyniki analizy post-hoc Tukey'a

Tabela 1. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MDA-MB-231 inkubowanych 4h z GNPs dla prób bez BPA.

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: bez BPA (test mtt 4h mda)								
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$								
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
	M=,83512	M=,85190	M=,82563	M=,91051	M=,74732	M=1,0000	M=,93045	M=,83560	M=,76970
GNP 100nm 4 ul/ml {1}		1,000000	1,000000	0,989717	0,973939	0,573111	0,958350	1,000000	0,995942
GNP 100nm 8 ul/ml {2}	1,000000		0,999995	0,998095	0,931665	0,693840	0,986696	1,000000	0,982412
GNP 100nm 16 ul/ml {3}	1,000000	0,999995		0,978660	0,986950	0,505196	0,930843	1,000000	0,998639
GNP 100nm 32 ul/ml {4}	0,989717	0,998095	0,978660		0,585450	0,970860	0,999999	0,990130	0,743940
GNP 50nm 4 ul/ml {5}	0,973939	0,931665	0,986950	0,585450		0,120712	0,444683	0,973086	0,999999
kontrola {6}	0,573111	0,693840	0,505196	0,970860	0,120712		0,993892	0,576633	0,192454
GNP 50nm 8 ul/ml {7}	0,958350	0,986696	0,930843	0,999999	0,444683	0,993892		0,959514	0,603099
GNP 50nm 16 ul/ml {8}	1,000000	1,000000	1,000000	0,990130	0,973086	0,576633	0,959514		0,995736
GNP 50nm 32 ul/ml {9}	0,995942	0,982412	0,998639	0,743940	0,999999	0,192454	0,603099	0,995736	

Tabela 2. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MDA-MB-231 inkubowanych 4h z GNPs z BPA 15 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test mtt 4h mda)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
	M=,94625	M=,93020	M=1,0984	M=,94808	M=3,3382	M=1,0000	M=,91196	M=3,7369	M=4,6875	M=2,2496
GNP 100nm 4 ul/ml {1}		1,000000	1,000000	1,000000	0,094216	1,000000	1,000000	0,039327	0,005142	0,678285
GNP 100nm 8 ul/ml {2}	1,000000		1,000000	1,000000	0,090998	1,000000	1,000000	0,037962	0,004978	0,665510
GNP 100nm 16 ul/ml {3}	1,000000	1,000000		1,000000	0,130570	1,000000	1,000000	0,054978	0,007028	0,793456
GNP 100nm 32 ul/ml {4}	1,000000	1,000000	1,000000		0,094588	1,000000	1,000000	0,039485	0,005161	0,679732
GNP 50nm 4 ul/ml {5}	0,094216	0,090998	0,130570	0,094588		0,065129	0,087467	0,999753	0,641571	0,835712
kontrola {6}	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,065129		1,000000	0,024928	0,002854	0,625867
BPA 15 mg/ml {7}	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,087467	1,000000		0,036468	0,004798	0,650929
GNP 50nm 8 ul/ml {8}	0,039327	0,037962	0,054978	0,039485	0,999753	0,024928	0,036468		0,912064	0,531727
GNP 50nm 16 ul/ml {9}	0,005142	0,004978	0,007028	0,005161	0,641571	0,002854	0,004798	0,912064		0,085278
GNP 50nm 32 ul/ml {10}	0,678285	0,665510	0,793456	0,679732	0,835712	0,625867	0,650929	0,531727	0,085278	

Tabela 3. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MDA-MB-231 inkubowanych 4h z GNPs z BPA 30 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test mtt 4h mda)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
	M=,98893	M=,98529	M=,94151	M=,96121	M=,87001	M=1,0000	M=1,0841	M=2,5524	M=,94990	M=,99732
GNP 100nm 4 ul/ml {1}		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,563011	1,000000	1,000000
GNP 100nm 8 ul/ml {2}	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,560335	1,000000	1,000000
GNP 100nm 16 ul/ml {3}	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,528483	1,000000	1,000000
GNP 100nm 32 ul/ml {4}	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,542748	1,000000	1,000000
GNP 50nm 4 ul/ml {5}	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,999999	0,477575	1,000000	1,000000
kontrola {6}	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,465033	1,000000	1,000000
GNP 50nm 8 ul/ml {7}	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,999999	1,000000		0,633546	1,000000	1,000000
GNP 50nm 16 ul/ml {8}	0,563011	0,560335	0,528483	0,542748	0,477575	0,465033	0,633546		0,534544	0,569179
GNP 50nm 32 ul/ml {9}	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,534544		1,000000
BPA 30 mg/ml {10}	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,569179	1,000000	

Tabela 4. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MDA-MB-231 inkubowanych 4h z GNPs z BPA 60 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test mtt 4h mda)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=,74562	M=,96231	M=1,0513	M=,94625	M=,76897	M=1,0000	M=1,0108	M=,82150	M=,87840	M=,82709
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,968369	0,815967	0,980301	1,000000	0,865924	0,904038	0,999989	0,998937	0,999948
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,999980	1,000000	0,991528	1,000000	1,000000	0,999172	0,999988	0,998780
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,999921	0,916924	1,000000	1,000000	0,973992	0,996134	0,961293
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					0,995373	0,999999	0,999999	0,999680	0,999988	0,999542
kontrola {6}						0,954020	0,964648	1,000000	0,999889	0,999999
GNP 50nm 8 ul/ml {7}							1,000000	0,990847	0,999463	0,984465
GNP 50nm 16 ul/ml {8}								0,992661	0,999487	0,988877
GNP 50nm 32 ul/ml {9}									1,000000	1,000000
BPA 60 mg/ml {10}										1,000000

Tabela 5. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MDA-MB-231 inkubowanych 24h z GNPs dla prób bez BPA

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: bez BPA (test MTT GNP24h)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=5,0331	M=6,0828	M=4,6408	M=4,3938	M=6,1466	M=1,0000	M=5,6593	M=4,6722	M=4,0445	
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,609411	0,997441	0,949049	0,542433	0,000214	0,954321	0,996902	0,551084	
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,349414	0,194629	1,000000	0,000198	0,997682	0,276332	0,044411	
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,999954	0,302769	0,000507	0,733824	1,000000	0,965021	
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					0,165354	0,000851	0,499766	0,999777	0,998858	
kontrola {6}						0,000197	0,994067	0,233769	0,036403	
GNP 50nm 8 ul/ml {7}							0,000207	0,675243	0,158591	
GNP 50nm 16 ul/ml {8}								0,675243	0,918177	
GNP 50nm 32 ul/ml {9}										

Tabela 6. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MDA-MB-231 inkubowanych 24h z GNPs z BPA 15 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test MTT GNP24h)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=5,6848	M=5,8213	M=5,9971	M=4,7269	M=4,5066	M=1,0000	M=,91196	M=4,5569	M=6,2240	M=3,6964
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		1,000000	0,999950	0,876001	0,708624	0,000229	0,000280	0,635075	0,996297	0,142935
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			1,000000	0,778910	0,586709	0,000223	0,000258	0,498836	0,999601	0,100982
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,724814	0,545538	0,000247	0,000310	0,475989	0,999998	0,107648
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					0,999999	0,001458	0,002652	1,000000	0,540214	0,886272
kontrola {6}						0,002494	0,004453	1,000000	0,373451	0,969355
BPA 15 mg/ml {7}							1,000000	0,000841	0,000230	0,021692
GNP 50nm 8 ul/ml {8}								0,001770	0,000266	0,033111
GNP 50nm 16 ul/ml {9}									0,303523	0,927590
GNP 50nm 32 ul/ml {10}										0,062438

Tabela 7. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MDA-MB-231 inkubowanych 24h z GNPs z BPA 30 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test MTT GNP24h)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=5,1147	M=6,2797	M=5,5243	M=4,8047	M=4,5435	M=1,0000	M=5,4331	M=4,1758	M=5,3368	M=,99732
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,355991	0,997653	0,999447	0,959533	0,000212	0,999667	0,618884	0,999983	0,000224
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,830093	0,069615	0,022797	0,000209	0,731173	0,004678	0,613899	0,000209
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,863419	0,566831	0,000210	1,000000	0,202097	0,999996	0,000212
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					0,999655	0,000211	0,930782	0,877523	0,973568	0,000222
kontrola {6}						0,000216	0,679644	0,995308	0,791079	0,000247
GNP 50nm 8 ul/ml {7}							0,000210	0,000246	0,000210	1,000000
GNP 50nm 16 ul/ml {8}								0,270628	1,000000	0,000213
GNP 50nm 32 ul/ml {9}									0,360051	0,000382
BPA 30 mg/ml {10}										0,000216

Tabela 12. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MCF-7 inkubowanych 4h z GNPs z BPA 60 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test MTT GNP4h)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < .05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=,85892	M=,11152	M=,85768	M=,73948	M=,69385	M=1,0000	M=,77409	M=,75423	M=,11759	M=,83939
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,810210	1,000000	0,999210	0,991434	0,993750	0,999950	0,999721	0,719422	1,000000
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,882385	0,526572	0,387010	0,998587	0,640741	0,574902	0,999997	0,746134
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,999645	0,995718	0,997014	0,999980	0,999879	0,799283	1,000000
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					1,000000	0,875842	1,000000	1,000000	0,454852	0,999809
kontrola {6}						0,753109	0,999986	0,999999	0,336521	0,996485
GNP 50nm 8 ul/ml {7}							0,940062	0,940062	0,906590	0,984954
GNP 50nm 16 ul/ml {8}								1,000000	0,555898	0,999995
GNP 50nm 32 ul/ml {9}									0,496983	0,999949
BPA 60 mg/ml {10}										0,656109

Tabela 13. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MCF-7 inkubowanych 24h z GNPs dla prób bez BPA.

próba	Test RIR Tukeya; zmienna: bez BPA (test MTT GNP24h)								
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < .05000$								
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=,50518	M=,47515	M=,53101	M=,38941	M=,43176	M=1,0000	M=,41760	M=,43005	M=,33119
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,999993	0,999995	0,927406	0,989805	0,000701	0,970536	0,988231	0,623904
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,999257	0,992477	0,999883	0,001105	0,999080	0,999844	0,867540
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,817996	0,941587	0,001114	0,887368	0,936198	0,461269
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					0,999902	0,000347	0,999996	0,999928	0,999480
kontrola {6}						0,000280	1,000000	1,000000	0,965739
GNP 50nm 8 ul/ml {7}							0,000254	0,000276	0,000233
GNP 50nm 16 ul/ml {8}								1,000000	0,985986
GNP 50nm 32 ul/ml {9}									0,968893

Tabela 14. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MCF-7 inkubowanych 24h z GNPs z BPA 15 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test MTT GNP24h)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < .05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=,56621	M=,60378	M=,57428	M=,66566	M=,61951	M=1,0000	M=,83257	M=,58437	M=,54766	M=,61282
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,999991	1,000000	0,968840	0,999660	0,002464	0,118961	1,000000	1,000000	0,999886
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,999998	0,998898	1,000000	0,005919	0,250405	1,000000	0,999487	1,000000
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,963294	0,999777	0,000987	0,073198	1,000000	0,999997	0,999940
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					0,999738	0,010093	0,496573	0,982374	0,855764	0,999232
kontrola {6}						0,002985	0,209881	0,999973	0,992348	1,000000
BPA 15 mg/ml {7}							0,492567	0,001244	0,000566	0,002516
GNP 50nm 8 ul/ml {8}								0,093779	0,037239	0,181439
GNP 50nm 16 ul/ml {9}									0,999960	0,999995
GNP 50nm 32 ul/ml {10}										0,996203

Tabela 15. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MCF-7 inkubowanych 24h z GNPs z BPA 30 mg/ml.

próba eksperymentalna'	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test MTT GNP24h)									
	Zaznaczone różnice są istotne z $p < .05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=,57336	M=,60994	M=,56189	M=,58621	M=,70211	M=1,0000	M=,63813	M=,65098	M=,63682	M=,78104
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,999949	1,000000	1,000000	0,754709	0,000589	0,995337	0,995367	0,995988	0,195778
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,999807	0,999999	0,952537	0,001402	0,999994	0,999868	0,999996	0,415479
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,999999	0,779240	0,001339	0,993257	0,980623	0,994041	0,253646
GNP 50nm 4 ul/ml {5}					0,843246	0,000780	0,999129	0,995337	0,999287	0,260169
kontrola {6}						0,018382	0,995731	0,999227	0,995059	0,981783
GNP 50nm 8 ul/ml {7}							0,003005	1,000000	1,000000	0,642345
GNP 50nm 16 ul/ml {8}								1,000000	1,000000	0,744799
GNP 50nm 32 ul/ml {9}									1,000000	0,631544
BPA 30 mg/ml {10}										

Tabela 16. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu MTT komórek MCF-7 inkubowanych 24h z GNPs z BPA 60 mg/ml.

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn7 (test MTT GNP24h) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
GNP 100nm 4 ul/ml {1}	M=,58476	M=,60666	M=,60994	M=,62187	M=,65019	M=1,0000	M=,48355	M=,47856	M=,47384	M=,83939
GNP 100nm 8 ul/ml {2}		0,999999	1,000000	1,000000	0,999888	0,991046	0,000331	0,877499	0,846028	0,812838
GNP 100nm 16 ul/ml {3}			0,999996	0,999888	0,999589	0,000501	0,714792	0,671134	0,628756	0,060561
GNP 100nm 32 ul/ml {4}				0,999781	0,000538	0,686224	0,641775	0,599042	0,066701	0,066701
GNP 50nm 4 ul/ml {5}				0,999988	0,000718	0,578812	0,533835	0,491969	0,094093	0,094093
kontrola {6}					0,001586	0,340677	0,305414	0,274174	0,201042	0,201042
GNP 50nm 8 ul/ml {7}						0,000189	1,000000	1,000000	0,001330	0,001330
GNP 50nm 16 ul/ml {8}							0,000188	1,000000	0,001150	0,001150
GNP 50nm 32 ul/ml {9}								1,000000	0,001008	0,001008
BPA 60 mg/ml {10}										

Tabela 17. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla współczynnika SSC dla komórek MDA-MB-231 traktowanych GNPs 100 nm i GNPs 50 nm.

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn2 (współczynnik ssc) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$				
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
kontrola {1}	M=1,0000	M=1,4202	M=1,4063	M=1,3824	M=1,4248
GNPs 50nm (4h) {2}		0,010654	0,013181	0,019112	0,009927
GNPs 50nm (24h) {3}			0,999896	0,994510	0,999999
GNPs 100 nm (4h) {4}				0,999106	0,999671
GNPs 100 nm (24h) {5}					0,991454

Tabela 18. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla współczynnika SSC dla komórek MCF-7 traktowanych GNPs 100 nm i GNPs 50 nm.

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: Zmn2 (współczynnik ssc) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$				
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
kontrola {1}	M=1,0000	M=1,1145	M=1,2919	M=1,0691	M=1,2820
GNPs 50nm (4h) {2}		0,098401	0,000334	0,464550	0,000397
GNPs 50nm (24h) {3}			0,009011	0,787082	0,012986
GNPs 100 nm (4h) {4}				0,001886	0,999093
GNPs 100 nm (24h) {5}					0,002587

Tabela 19. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla fazy G₁ komórek MDA-MB-231 dla prób napromienionych.

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: G1 (cykl komórkowy MDA-MB-231) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola napromieniana {1}	M=14,460	M=33,060	M=32,057	M=12,590	M=4,9900	M=15,233	M=4,8850	M=21,063	M=22,457	M=17,590
GNP 100nm (24h)+promieniowanie {2}		0,000518	0,000363	0,999513	0,102340	0,999999	0,096174	0,317884	0,139177	0,979627
GNP 50nm (24h)+promieniowanie {3}			0,999997	0,000502	0,000212	0,000712	0,000211	0,021474	0,051471	0,005631
GNP 100nm (4h)+BPA+promieniowanie {4}				0,000385	0,000210	0,000480	0,000210	0,017816	0,047492	0,004554
GNP 100nm (24h)+BPA+promieniowanie {5}					0,390801	0,993428	0,374335	0,180806	0,080748	0,840691
GNP 50nm (4h)+BPA+promieniowanie {6}						0,064234	1,000000	0,001754	0,000842	0,029342
GNP 50nm (24h)+BPA+promieniowanie {7}							0,060232	0,467410	0,224011	0,997125
GNP 100nm (4h)+promieniowanie {8}								0,001653	0,000801	0,027623
GNP 50nm (4h)+promieniowanie {9}									0,999888	0,961440
BPA+promieniowanie {10}										0,790652

Tabela 20. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla fazy S komórek MDA-MB-231 dla prób napromienionych.

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: S (cykl komórkowy MDA-MB-231) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola napromieniana {1}	M=24,753	M=25,135	M=11,420	M=30,630	M=11,977	M=26,010	M=17,087	M=18,030	M=18,570	M=27,840
GNP 100nm (24h)+promieniowanie {2}	1,000000		0,001083	0,259046	0,000638	0,999769	0,035581	0,144387	0,210980	0,897705
GNP 50nm (24h)+promieniowanie {3}	0,001083	0,001833		0,435926	0,001207	0,999995	0,053390	0,171017	0,239926	0,969883
GNP 100nm (4h)+BPA+promieniowanie {4}	0,259046	0,435926	0,000242		0,000222	0,641384	0,000955	0,003773	0,005430	0,963793
GNP 100nm (24h)+BPA+promieniowanie {5}	0,000638	0,001207	1,000000	0,000222		0,000726	0,287880	0,230453	0,158483	0,000338
GNP 50nm (4h)+BPA+promieniowanie {6}	0,999769	0,999995	0,001093	0,641384	0,000726		0,027053	0,095509	0,137423	0,997894
GNP 50nm (24h)+BPA+promieniowanie {7}	0,035581	0,053390	0,296495	0,000955	0,287880	0,027053		0,999978	0,999144	0,006584
GNP 100nm (4h)+promieniowanie {8}	0,144387	0,171017	0,233442	0,003773	0,230453	0,095509	0,999978		1,000000	0,026388
GNP 50nm (4h)+promieniowanie {9}	0,210980	0,239926	0,166125	0,005430	0,158483	0,137423	0,999144	1,000000		0,038744
BPA+promieniowanie {10}	0,897705	0,969883	0,000457	0,963793	0,000338	0,997894	0,006584	0,026388	0,038744	

Tabela 21. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla fazy G₂ komórek MDA-MB-231 dla prób napromienionych.

próba eksperymentalna	Test RIR Tukeya; zmienna: G2 (cykl komórkowy MDA-MB-231) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola napromieniana {1}	M=60,787	M=65,050	M=59,040	M=53,855	M=81,300	M=61,307	M=79,055	M=59,590	M=54,560	M=48,365
GNP 100nm (24h)+promieniowanie {2}	0,942382		0,999903	0,562861	0,000386	1,000000	0,002325	0,999996	0,557677	0,048214
GNP 50nm (24h)+promieniowanie {3}	0,999903	0,804499		0,146910	0,006409	0,973012	0,039856	0,871991	0,128847	0,010926
GNP 100nm (4h)+BPA+promieniowanie {4}	0,562861	0,146910	0,900261		0,000467	0,999220	0,002322	1,000000	0,924734	0,183968
GNP 100nm (24h)+BPA+promieniowanie {5}	0,000386	0,006409	0,000467	0,000226		0,000455	0,000380	0,839944	1,000000	0,868674
GNP 50nm (4h)+BPA+promieniowanie {6}	1,000000	0,973012	0,999220	0,474555	0,000455		0,002996	0,999916	0,459631	0,036698
GNP 50nm (24h)+BPA+promieniowanie {7}	0,002325	0,039856	0,002322	0,000380	0,999276	0,002996		0,002966	0,000286	0,000222
GNP 100nm (4h)+promieniowanie {8}	0,999996	0,871991	1,000000	0,839944	0,000556	0,999916	0,002966		0,866428	0,144985
GNP 50nm (4h)+promieniowanie {9}	0,557677	0,128847	0,924734	1,000000	0,000215	0,459631	0,000286	0,866428		0,690722
BPA+promieniowanie {10}	0,048214	0,010926	0,183968	0,868674	0,000213	0,036698	0,000222	0,144985	0,690722	

Tabela 22. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla fazy G₁ komórek MDA-MB-231 dla prób nienapromienionych.

próba	Test RIR Tukeya; zmienna: G1' (cykl komórkowy MDA-MB-231) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola {1}	M=64,250	M=43,170	M=42,463	M=69,933	M=46,575	M=70,807	M=50,580	M=62,727	M=84,400	M=75,260
GNP 100nm (24h) {2}	0,000193		0,000193	0,205943	0,000201	0,098046	0,000284	0,998469	0,000194	0,004219
GNP 50nm (24h) {3}	0,000193	0,999997		0,000193	0,871045	0,000193	0,044622	0,000193	0,000193	0,000193
GNP 100nm (4h)+BPA {4}	0,205943	0,000193	0,000193		0,000193	0,999983	0,000193	0,054035	0,000375	0,402481
GNP 100nm (24h)+BPA {5}	0,000201	0,871045	0,714548	0,000193		0,000193	0,741175	0,000229	0,000193	0,000193
GNP 50nm (4h)+BPA {6}	0,098046	0,000193	0,000193	0,999983	0,000193		0,000193	0,023472	0,000586	0,625600
GNP 50nm (24h)+BPA {7}	0,000284	0,044622	0,022653	0,000193	0,741175	0,000193		0,000591	0,000193	0,000193
GNP 100nm (4h) {8}	0,998469	0,000193	0,000193	0,054035	0,000229	0,023472	0,000591		0,000193	0,001216
GNP 50nm (4h) {9}	0,000194	0,000193	0,000193	0,000375	0,000193	0,000586	0,000193	0,000193		0,042447
BPA {10}	0,004219	0,000193	0,000193	0,402481	0,000193	0,625600	0,000193	0,001216	0,042447	

Tabela 23. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla fazy S komórek MDA-MB-231 dla prób nienapromienionych.

próba	Test RIR Tukeya; zmienna: S' (cykl komórkowy MDA-MB-231) Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola {1}	M=28,383	M=52,270	M=53,597	M=13,865	M=43,825	M=14,305	M=40,700	M=30,250	M=12,385	M=16,530
GNP 100nm (24h) {2}	0,000209		0,000209	0,000250	0,000225	0,000272	0,000295	0,980453	0,000218	0,000768
GNP 50nm (24h) {3}	0,000209	0,998231		0,000209	0,014801	0,000209	0,000412	0,000209	0,000209	0,000209
GNP 100nm (4h)+BPA {4}	0,000250	0,000209	0,000209		0,000209	1,000000	0,000209	0,000215	0,999133	0,950618
GNP 100nm (24h)+BPA {5}	0,000225	0,014801	0,004297	0,000209		0,000209	0,826102	0,000313	0,000209	0,000209
GNP 50nm (4h)+BPA {6}	0,000272	0,000209	0,000209	1,000000	0,000209		0,000209	0,000218	0,993960	0,983585
GNP 50nm (24h)+BPA {7}	0,000295	0,000412	0,000254	0,000209	0,826102	0,000209		0,000866	0,000209	0,000209
GNP 100nm (4h) {8}	0,980453	0,000209	0,000209	0,000215	0,000313	0,000218	0,000866		0,000210	0,000299
GNP 50nm (4h) {9}	0,000218	0,000209	0,000209	0,999133	0,000209	0,993960	0,000209	0,000210		0,642869
BPA {10}	0,000768	0,000209	0,000209	0,950618	0,000209	0,983585	0,000209	0,000299	0,642869	

Tabela 60. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu poziomu apoptozy w komórkach MCF-7 dla prób nienapromienionych – żywe komórki.

Test RIR Tukeya; zmienna: żywe komórki' (test apoptozy MCF-7)										
Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$										
próba	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola {1}	M=76,833	M=79,400	M=74,867	M=55,633	M=64,667	M=79,067	M=62,300	M=60,333	M=64,500	M=79,733
GNP 100nm (24h) {2}		0,999912	0,992630	0,002595	0,126678	1,000000	0,048708	0,020847	0,118826	1,000000
GNP 100nm (4h) {3}		0,999991	0,992630	0,019369	0,534999	0,995736	0,273854	0,136682	0,514119	0,987961
BPA {4}		0,008079	0,002595	0,019369	0,682631	0,002999	0,918015	0,990510	0,703145	0,002249
GNP 50nm (24h) {5}		0,311214	0,126678	0,534999	0,682631	0,143718	0,999955	0,994658	1,000000	0,111393
GNP 50nm (4h) {6}		0,999973	1,000000	0,995736	0,002999	0,143718	0,056019	0,024129	0,134970	1,000000
GNP 100nm (24h)+BPA {7}		0,136682	0,048708	0,273854	0,918015	0,999955	0,056019	0,999991	0,999976	0,042296
GNP 100nm (4h)+BPA {8}		0,062589	0,020847	0,136682	0,990510	0,994658	0,024129	0,999991	0,995988	0,017998
GNP 50 nm (24h)+BPA {9}		0,295192	0,118826	0,514119	0,703145	1,000000	0,134970	0,999976	0,995988	0,104370
GNP 50nm (4h)+BPA {10}		0,999760	1,000000	0,987961	0,002249	0,111393	1,000000	0,042296	0,017998	0,104370

Tabela 61. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu poziomu apoptozy w komórkach MCF-7 dla prób nienapromienionych – komórki wczesnoapoptotyczne.

Test RIR Tukeya; zmienna: wczesna apoptoza' (test apoptozy MCF-7)										
Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$										
próba	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola {1}	M=,95000	M=1,4000	M=1,9667	M=1,0000	M=1,3000	M=1,9333	M=3,0000	M=2,1333	M=1,7333	M=1,1000
GNP 100nm (24h) {2}		0,989505	0,479091	1,000000	0,998310	0,521405	0,019858	0,294089	0,775514	0,999999
GNP 100nm (4h) {3}		0,989505	0,916291	0,989939	1,000000	0,939685	0,062207	0,731959	0,997270	0,999488
BPA {4}		1,000000	0,989939	0,402066	0,998778	1,000000	0,458483	0,999990	0,999833	0,673092
GNP 50nm (24h) {5}		0,998310	1,000000	0,817586	0,998778	0,855000	0,041106	0,588414	0,982845	0,999982
GNP 50nm (4h) {6}		0,521405	0,939685	1,000000	0,446101	0,855000	0,041106	0,588414	0,982845	0,999982
GNP 100nm (24h)+BPA {7}		0,019858	0,062207	0,458483	0,011421	0,041106	0,418452	0,673092	0,222511	0,035567
GNP 100nm (4h)+BPA {8}		0,294089	0,731959	0,999990	0,222174	0,588414	0,999953	0,673092	0,989939	0,458483
GNP 50 nm (24h)+BPA {9}		0,775514	0,997270	0,999833	0,731959	0,982845	0,999953	0,222511	0,989939	0,916443
GNP 50nm (4h)+BPA {10}		0,999999	0,999488	0,673092	1,000000	0,999982	0,715339	0,035567	0,458483	0,916443

Tabela 62. Wyniki analizy post-hoc Tukey'a dla testu poziomu apoptozy w komórkach MCF-7 dla prób nienapromienionych – komórki późnoapoptotyczne i nekrotyczne.

Test RIR Tukeya; zmienna: późna apoptoza' (test apoptozy MCF-7)										
Zaznaczone różnice są istotne z $p < ,05000$										
próba	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
kontrola {1}	M=22,433	M=17,950	M=24,700	M=25,900	M=35,000	M=20,400	M=36,767	M=38,767	M=34,767	M=20,000
GNP 100nm (24h) {2}		0,545102	0,965301	0,716495	0,000255	0,982516	0,000191	0,000184	0,000276	0,947286
GNP 100nm (4h) {3}		0,545102	0,106589	0,035536	0,000186	0,971803	0,000184	0,000184	0,000187	0,991290
BPA {4}		0,965301	0,106589	0,035536	0,000186	0,455310	0,000309	0,000194	0,001471	0,343270
GNP 50nm (24h) {5}		0,716495	0,035536	0,000186	0,000186	0,176552	0,000691	0,000235	0,005249	0,121688
GNP 50nm (4h) {6}		0,000255	0,000186	0,001165	0,004073	0,000189	0,993289	0,622692	1,000000	0,000187
GNP 100nm (24h)+BPA {7}		0,982516	0,971803	0,455310	0,176552	0,000189	0,000184	0,000184	0,000191	1,000000
GNP 100nm (4h)+BPA {8}		0,000191	0,000184	0,000309	0,000691	0,993289	0,000184	0,984320	0,984320	0,000184
GNP 50 nm (24h)+BPA {9}		0,000184	0,000184	0,000194	0,000235	0,622692	0,000184	0,984320	0,548279	0,000184
GNP 50nm (4h)+BPA {10}		0,000276	0,000187	0,001471	0,005249	1,000000	0,000191	0,984320	0,548279	0,000188

Spis rycin

Rycina 1. a) Reakcja przebiegająca w trakcie terapii borowo-neutronowej. b) Model reakcji przebiegającej w trakcie terapii borowo-neutronowej wraz z podanymi energiami wytworzonych cząstek (rycina wykonana na podstawie artykułu Wang et. al. (5)).

Rycina 2. Wzór chemiczny (a) tetraboranu sodu (borax) oraz (b) kwasu borowego (źródło: wykonanie własne; Chems sketch).

Rycina 3. Wzór strukturalny (a) BSH oraz (b) L-borofenyloalaniny (źródło: wykonanie własne; Chems sketch).

Rycina 4. Liczba artykułów odnośnie badań klinicznych prowadzonych na poszczególnych typach nowotworów (źródło: Pubmed i Science Direct – rok 2023).

Rycina 5. Podział nowotworów piersi ze względu na podłoże molekularne i histologiczne (źródło: wykonanie własne).

Rycina 6. Schemat eksperymentu testu cytotoksyczności w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Rycina 7. Schemat eksperymentu do analizy wnikania nanocząstek złota (SSC) w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Rycina 8. Schemat przedstawiający wrażliwość komórek na promieniowanie jonizujące w zależności od fazy cyklu komórkowego (źródło: na podstawie artykułu (95)).

Rycina 9. Schemat eksperymentu progresji cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Rycina 10. Schemat eksperymentu przeżywalności komórkowej (test klonogeny) w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Rycina 11. Schemat eksperymentu kinetyki powstawania mikrojąder w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Rycina 12. Schemat eksperymentu ognisk naprawczych gamma-H2AX w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Rycina 13. Schemat eksperymentu mierzącego poziom apoptozy w komórkach nowotworowych piersi (źródło: wykonanie własne).

Rycina 14. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 4-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 15. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 4-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 16. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 24-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 17. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MDA-MB-231 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 24-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 18. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 4-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 19. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 4-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 20. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 100 nm z inkubacją 24-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 21. Aktywność metaboliczna zmierzona za pomocą spektrofotometru w komórkach MCF-7 traktowanych różnymi stężeniami GNPs 50 nm z inkubacją 24-godziną oraz różnymi stężeniami BPA.

Rycina 22. Wnikanie nanocząstek złota o rozmiarze 100 nm i 50 nm do komórek MDA-MB-231 w dawce $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ przez 4h i 24h. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości współczynnika SSC $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Rycina 23. Wnikanie nanocząstek złota o rozmiarze 100 nm i 50 nm do komórek MCF-7 w dawce $8 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ przez 4h i 24h. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości współczynnika SSC $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów.

Rycina 24. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 25. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 26. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 27. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 28. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 29. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 30. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 31. Rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zmierzonych za pomocą cytometrii przepływowej w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 32. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 33. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 34. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 35. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 36. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 37. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 38. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 39. Przeżywalność komórkowa komórek linii nowotworowej MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 40. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 41. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 42. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 43. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 44. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 45. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 46. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 47. Kinetyka częstości występowania mikrojąder w komórkach MCF-7 napromienionych neutronami w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 48. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 49. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 50. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 51. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 52. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 53. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe,

50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 54. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 55. Intensywność fluorescencji powstałych ognisk naprawczych γ -H2AX w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 56. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 57. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 58. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 59. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 60. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie

gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 61. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 62. Poziom apoptozy w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 63. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MDA-MB-231 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 64. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 65. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 66. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 67. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50%

promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podano w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi BPA i nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 68. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 69. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 100 nm).

Rycina 70. Poziom apoptozy w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Rycina 71. Poziom apoptozy (komórki wczesnoapoptotyczne oraz późnoapoptotyczne i nekrotyczne) w komórkach MCF-7 napromienionych promieniowaniem mieszanym (50% promieniowanie neutronowe, 50% promieniowanie gamma) w reaktorze badawczym MARIA (dawki podane w Tabeli 3.) w próbach badawczych z dodanymi nanocząstkami złota (GNPs 50 nm).

Dorobek publikacyjny

1. Płodowska M., Krakowiak W., Węgierek-Ciuk A., Gałczyńska K., Pasińska K., Sobota D., Wołowicz P., Braziewicz J., Lankoff A., Arabski M., Wójcik A., Lisowska H. *DNA damage response of U2OS cells to low doses of gamma radiation delivered at very low dose rate*. DNA Repair, Vol. 152, 103875; DOI: 10.1016/j.dnarep.2025.103875.
2. Krakowiak W., Lisowska H., Kaca W. *Porphyromonas gingivalis pathogenic features influencing rheumatoid arthritis disease progression*. Advancements of Microbiology, Vol. 63, Issue 1, 2024; DOI: 10.2478/am-2024-0002.
3. Płodowska M., Krakowiak W., Węgierek-Ciuk A., Lankoff A., Szary K., Lis K., Wójcik A., Lisowska H. *Hypothermia differentially modulates the formation and decay of NBS1, γ -H2AX and 53BP1 foci in U2OS cells exposed to gamma radiation.*, Sci Rep 12, 5878, 2022.
4. Krakowiak W., Wójcik K., Dorosz M., Płodowska M., Węgierek-Ciuk A., Lankoff A., Wójcik A., Lisowska H. *Boron Neutron Capture Therapy: review on the clinical applications*. Studia Medyczne. Medical Studies – przyjęte do druku.