

Terapia borowo-neutronowa BNCT przyszłością w leczeniu rozsia- nowotworów

Monika Szczepanek¹, Michał Silarski²

¹Zakład Fizyki Medycznej, Instytut Fizyki

im. M. Smoluchowskiego, Uniwersytet Jagielloński

²Zakład Doświadczalnej Fizyki Cząstek i jej Zastosowań,

Instytut Fizyki im. M. Smoluchowskiego, Uniwersytet Jagielloński

Terapia BNCT (*Boron Neutron Capture Therapy*) jest jednym z rodzajów radio-terapii, w której selektywna eliminacja komórek nowotworowych jest możliwa dzięki wprowadzeniu do nich atomów boru. Ideą tej terapii jest dostarczenie boru do komórek nowotworowych w ciele pacjenta za pomocą odpowiedniego nośnika oraz jego akumulacja w ich wnętrzu. W wyniku naświetlania neutronami, dzięki wysokiemu prawdopodobieństwu ich oddziaływania z borem, dochodzi do reakcji jądrowej, w której powstają cząstki α oraz jony litu (rys.1). Cząstki te charakteryzują się wysokim liniowym transferem energii (*ang. LET – Linear Energy Transfer*) i deponują całą swoją energię kinetyczną na odcinku porównywalnym z rozmiarem pojedynczej komórki (ok. 10 μm). Oznacza to, że niszczo- na jest tylko ta komórka nowotworowa, w której została zakumulowana odpo- wiednia ilość boru, natomiast sąsiednie, zdrowe komórki pozostają praktycznie nieuszkodzone.

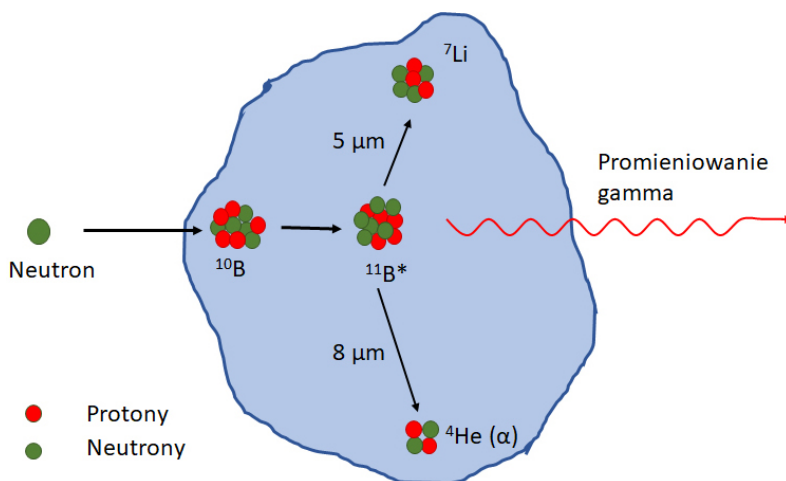
Krótką historia terapii borowo-neutronowej

W 1932 roku James Chadwick odkrył neutron, za co w 1935 roku otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki. Krótko po tym odkryciu Joseph H. Taylor i Maurice Goldhaber opisali reakcję wychwytu neutronów na jądrze boru oraz powstające produkty: atom helu oraz jądro litu [1]:



Już w 1936 roku Gordon L. Locher napisał artykuł, w którym zapropono- wał zastosowanie tej reakcji w leczeniu nowotworów [2]. Pierwsze próby wy- korzystania BNCT odbyły się w 1951 roku w Brookhaven National Laboratory, na pacjentach z glejakami złośliwymi, a później w Massachusetts Institute of Technology. Jednak rezultaty tych eksperymentów nie były zadowalające. Nie udało się dostarczyć odpowiedniej ilości atomów izotopu boru ^{10}B do komórek nowotworowych, przez co dawka promieniowania, jaką otrzymał pacjent, była za wysoka i spowodowała poważne skutki uboczne. Przede wszystkim zaobser- wowano choroby skóry i głowy, a także owrzodzenia i obrzęk mózgu. Kolejnym problemem było znalezienie związku, który nie byłby toksyczny dla pacjentów i dostarczałby odpowiednią ilość boru tylko do komórek nowotworowych. Mając na uwadze poważne skutki uboczne terapii oraz potencjalne zagrożenie w związ-

ku z wykorzystywaniem reaktorów jądrowych, w 1961 roku Stany Zjednoczone Ameryki Północnej wstrzymały badania nad BNCT [3].



Rys.1. Schemat reakcji jądrowej zachodzącej w trakcie naświetlania neutronami w komórce, w której zakumulowany został bor. W wyniku rozpadu wzbudzonego atomu boru powstaje jądro helu (cząsteczka α) oraz jądro litu, które charakteryzują się wysokim liniowym przekazem energii (dla cząstki α rzędu $150\ \text{keV}/\mu\text{m}$, dla jądra litu około $175\ \text{keV}/\mu\text{m}$) oraz krótkim zasięgiem – do $10\ \mu\text{m}$. W wyniku tej reakcji emitowane jest również promieniowanie gamma o energii ok. $0,48\ \text{MeV}$

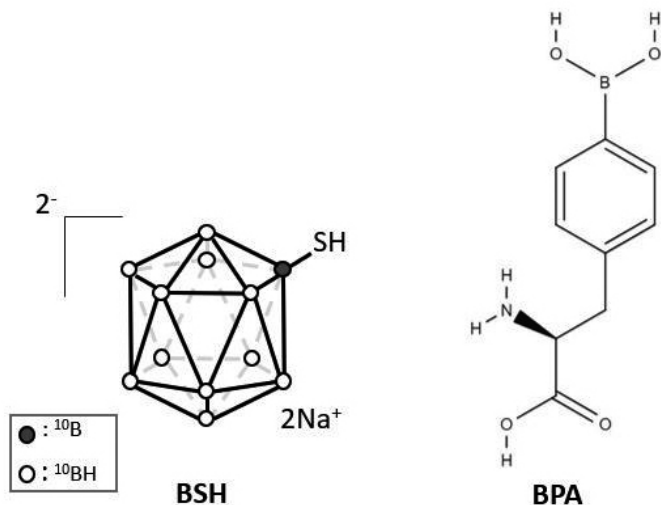
W Japonii w 1968 roku Hiroshi Hatanaka [4] przedstawił inny niż dotychczas stosowany związek boru jako propozycję dla BNCT, a mianowicie BSH (sól sodowa anionu tioboranowego, $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$). Leczenie polegało na zastosowaniu napromieniania wiązką neutronów potencjalnych pozostałości guza po jego operacyjnym usunięciu. Hatanaka przedstawił obiecujące wyniki testów przeprowadzonych na małej grupie pacjentów w zaawansowanym stadium glejaka złośliwego, dzięki czemu w Stanach Zjednoczonych, a nawet w Europie, zaczęto rozważać powrót do BNCT. W późniejszym okresie, również w Japonii, Yutaka Mishima [5] zastosował BPA (p-boranofenyloalanina, $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{BNO}_4$) jako nośnik boru dla terapii BNCT u pacjentów z powierzchniowym czerniakiem złośliwym skóry. Dzięki temu także w kolejnych ośrodkach zaczęto prowadzić intensywne badania nad tą terapią.

Kolejnym aspektem była również zmiana energii stosowanych cząstek, zamiast neutronów termicznych (o energiach $<0,05\ \text{eV}$) zaczęto stosować neutrony epitermiczne (o energii $0,1\ \text{eV} - 10\ \text{keV}$). Dzięki temu możliwa była głębsza penetracja tkanki przy zmniejszonych uszkodzeniach tkanek powierzchniowych oraz uzyskanie większej dawki w tkance nowotworowej.

Nośniki boru

Zgodnie z ideą terapii nośnik ma za zadanie dostarczyć atomy boru do komórek nowotworowych w ilości wystarczającej do wytworzenia produktów reakcji jądrowej.

wej niszczącej komórce. Jak już zostało wspomniane, odpowiedni nośnik oraz szybszy metabolizm komórek nowotworowych mogą zapewnić w nich wyższe stężenie boru niż w sąsiadujących, zdrowych komórkach. Dlatego dla skuteczności terapii ważne jest zastosowanie nośnika o odpowiednich cechach, takich jak: niska toksyczność czy większy pobór nośnika przez komórki nowotworowe niż zdrowe. Ponadto, stosunek stężenia boru w tkance nowotworowej do stężenia we krwi powinien przekraczać 3:1, a optymalne stężenie boru w guzie wynosi ok. 20-50 mg ^{10}B w jednym gramie guza. Nośnik powinien też być szybko usuwany z tkanek zdrowych i krwi przy jednoczesnym utrzymaniu wyższego stężenia w tkance chorej podczas naświetlania. Pierwszymi stosowanymi związkami boru w terapii BNCT były BSH i BPA (rys.2.), jednak nie spełniały one wszystkich wymogów opisanych powyżej. BSH jest związkiem wnikającym do komórek dzięki pasywnej dyfuzji (bez nakładu energii, zgodnie z gradientem stężeń) natomiast BPA jest aminokwasem, który ulega aktywnemu wychytowi przez komórki nowotworowe charakteryzujące się zwiększonym metabolizmem. Wadą obu związków jest ich nierównomierne wnikanie do komórek nowotworowych, przez co część z nich przeżywa napromienianie, co zmniejsza skuteczność terapii [6].



Rys. 2. Wzory strukturalne związków wykorzystywanych w terapii BNCT: BSH i BPA. Wzory uzyskane z wykorzystaniem aplikacji MolView

W ostatnich latach wiele ośrodków badawczych koncentruje się na poszukiwaniach nowego, skuteczniejszego nośnika boru. Jednym z ciekawszych pomysłów jest zastosowanie fragmentów kwasów nukleinowych jako nośników do terapii BNCT. Grupa naukowa z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod kierownictwem prof. Zbigniewa Leśnikowskiego opracowuje nośniki klasterów boru (związków o klatkowej strukturze przestrzennej, o innych właściwościach niż jego organiczny odpowiednik), które oparte są na oligonukleotydach (krótkich frag-

mentach kwasów nukleinowych) [7]. Wyniki badań potwierdziły, że taki nośnik odpowiednio zaprojektowany ma podwójną funkcję. Jest nie tylko transporterem boru do komórek nowotworowych, ale także posiada właściwości antyoksydacyjne i wyciszające aktywność konkretnego genu, na przykład EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu) [7]. EGFR jest białkiem błonowym regulującym wzrost, podziały i śmierć komórek. Zwiększona ilość tego białka występuje na powierzchni komórek nowotworowych w różnych typach nowotworów złośliwych jak np. nowotwory głowy i szyi, płuc, jelita grubego oraz piersi [8].

W jednej z opublikowanych prac przedstawione zostały siRNA¹ z dołączonymi klasterami boru [9]. W badaniach wykorzystano mRNA dla białka BACE1 jako docelowego. Białko to bierze udział w wytwarzaniu peptydu amyloidu beta, który występuje w płytkach amyloidowych u osób z chorobą Alzheimera. Zatem zahamowanie ekspresji genu odpowiedzialnego za produkcję białka beta może przynieść efekty w leczeniu oraz zapobieganiu tej chorobie. Wyniki potwierdziły zdolność zmodyfikowanego związkami boru RNA jako nośnika oraz zachowanie funkcji wyciszającej gen (zahamowanie ekspresji genu).

Wiele innych związków, nie tylko kwasy nukleinowe, jest sprawdzanych pod kątem dostarczania boru do komórek docelowych; są to między innymi: aminokwasy, przeciwciężła, czynniki wzrostu, karborany (grupa związków boroorganicznych o budowie przestrzennej), a także liposomy czy polimerowe nanocząstki [10].

Wykorzystując liposomy jako transporter związku boru, grupa Peacocka wykonała testy sprawdzające przydatność liposomów jako nośników [11]. Ponadto sprawdzone zostały czynniki wpływające na pobór liposomów do komórek, jak stężenie związku boru w medium, czas inkubacji czy zagęszczenie komórek. Nośnikiem boru był tutaj karboran naśladujący strukturą ester cholesterolu. Zawartość boru w komórkach nowotworowych wynosiła niemal 50 µg ¹⁰B/g komórki. Ponadto wykazano również zależność akumulacji boru w komórkach od stężenia nośnika w medium oraz konfluencji komórek.

Badania na modelach biologicznych

Podanie nowego leku, szczepionki czy środka kontrastującego człowiekowi nie byłoby możliwe bez przeprowadzenia wcześniejszych badań z zastosowaniem odpowiedniego modelu. Najpierw przeprowadzane są eksperymenty na liniach komórkowych lub/i hodowlach tkankowych, następnie nowe substancje badane są z wykorzystaniem zwierząt, a dopiero po przejściu szeregu testów możliwe do wykonania są badania z udziałem ludzi. Odpowiedni dobór rodzaju hodowli komórkowych w pierwszych etapach badań często wpływa na wyniki testów przeprowadzanych na organizmach żywych. Poniżej zostaną przedstawione wyni-

¹ siRNA (ang. *small interfering RNA*) – małe, interferujące RNA – krótka, dwuniciowa cząsteczka RNA, która powoduje wyciszenie ekspresji genów. siRNA związany z kompleksem białkowym RISC powoduje cięcie komplementarnej sekwencji mRNA na mniejsze fragmenty, uniemożliwiając powstawanie białka zapisanego w tej sekwencji.

ki eksperymentów kilku grup badawczych związane z pracą nad poprawą efektywności terapii BNCT.

Interesujące wyniki badań otrzymała grupa z Argentyny pod kierownictwem Marii Dagrosy [12]. Badała ona uszkodzenia oraz mechanizmy naprawcze w komórkach raka tarczycy wywołanych napromienianiem wiązką neutronów termicznych. Przedstawiona została analiza histonu² H2AX, który jest markerem uszkodzeń nici DNA, a także aktywacja dwóch różnych mechanizmów naprawy uszkodzeń kwasu nukleinowego, poprzez badanie ekspresji genów kluczowych białek biorących udział w danym mechanizmie naprawczym.

Badane grupy stanowiły komórki naświetlane promieniowaniem gamma, promieniowaniem neutronowym, promieniowaniem neutronowym z podaniem boru do komórek oraz grupa kontrolna – nienaświetlana. Wyniki wykazały, iż najwięcej uszkodzeń podwójnych nici DNA występuje po naświetlaniu promieniowaniem gamma, natomiast porównując dwie grupy naświetlane neutronami, większe uszkodzenia obserwowano w przypadku komórek, którym podawano bor. Natomiast biorąc pod uwagę mechanizmy naprawcze aktywowane promieniowaniem, największy wzrost mRNA kodującego enzymy naprawcze obserwowano w 4 i 6 h po napromienowaniu. Aktywowana została ścieżka HRR, tzw. mechanizm naprawy homologicznej rekombinacji [12].

W jeszcze innych badaniach oceniano efektywność terapii BNCT na dwóch liniach czerniaka płuc: pierwotnej (M8) oraz przerzutowej (Mej-J), stosując BPA jako nośnik boru. Komórki naświetlano dawką od 1 do 8 Gy. Oceniano względną skuteczność biologiczną RBE (*Relative Biological Effectiveness*)³ oraz wartości współczynników skuteczności biologicznej dla każdego składnika dawki – CBE (*Compound Biological Effectiveness*)⁴. Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowano różnicę we wrażliwości komórek na promieniowanie między obiema liniami komórkowymi – linia przerzutowa była bardziej oporna na promieniowanie oraz charakteryzowała się wyższym współczynnikiem RBE oraz CBE niż linia pierwotna. Różnice między liniami były widoczne również w poborze boru. Zaobserwowano większe stężenie boru w komórkach linii Mel-J [13].

Badania nad terapią nowotworową najlepiej prowadzić na modelu, który jak najbardziej odzwierciedla budowę i warunki panujące w leczonej tkance. Jednym z takich modeli dla guzów są sferoidy (rys.3). Są to agregaty komórek powstałe na skutek warunków hodowli uniemożliwiających przyłączenie do podłoża oraz dzięki właściwościom przylegania komórek do siebie. Ważną rolę odgrywają tu białka błonowe integryny i kadheryny, a także białka tworzące cytoskielet ko-

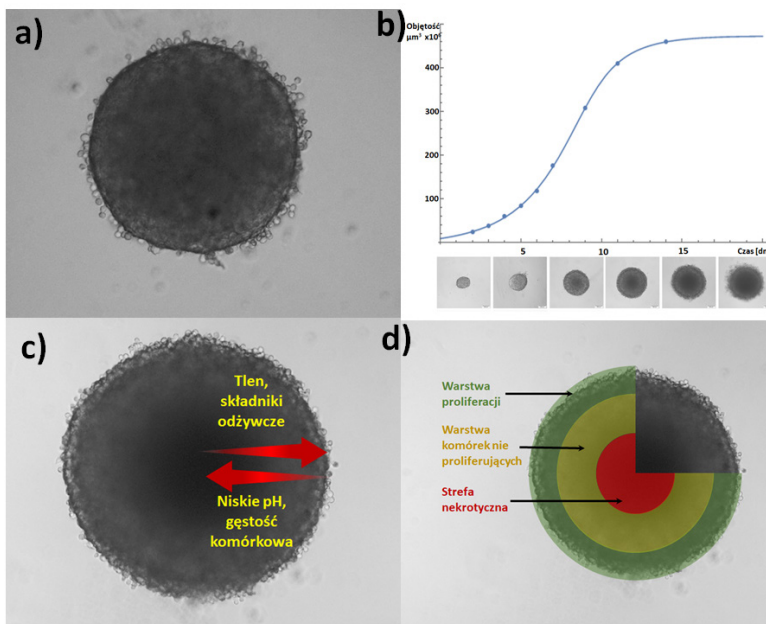
² Histony – zasadowe białka stabilizujące kwas DNA. Podczas pęknięć obu nici DNA do histonu H2A zostaje dodana grupa fosforanowa, której wyznakowanie umożliwia zlokalizowanie podwójnych pęknięć DNA.

³ Względną skuteczność biologiczną (RBE) definiujemy jako stosunek dawki referencyjnej (np. promieniowania X) do dawki promieniowania testowego, dającego ten sam efekt biologiczny.

⁴ CBE – wartości współczynników skuteczności biologicznej dla każdego ze składników dawki, które są zależne od zastosowanego nośnika boru.

mórek i połączenie komórkowe (np. złącza szczelinowe), umożliwiając komórkom nie tylko agregację, ale również komunikację międzykomórkową [14].

Sferoidy charakteryzują się warstwową strukturą, która została pokazana na rys. 3d. Ta organizacja w budowie sferoidu jest skutkiem dostępności składników odżywczych i tlenu dla rosnących i dzielących się komórek, których liczba zmniejsza się dla kolejnych warstw. Oprócz warstwowej struktury oraz wspomnianych zdolności do komunikacji komórkowej, sferoidy wytwarzają również macierz zewnątrzkomórkową⁵, a także wykazują charakterystyczną kinetykę wzrostu (rys.3b) [15].



Rys. 3. a) Zdjęcie sferoidu wykonane za pomocą mikroskopu optycznego, b) kinetyka wzrostu sferoidów podobna do wzrostu guza, c) rozkład składników odżywczych oraz d) związana z tym warstwową strukturą sferoidów – zewnętrzna warstwa komórek mająca nieograniczony dostęp do składników odżywczych i tlenu jest strefą komórek proliferacyjnych (dzielących się), komórki żywe lecz nie dzielące się stanowią warstwę środkową sferoidu, natomiast warstwa środkowa jest strefą komórek nekrotycznych (obumarłych)

Wszystkie wymienione cechy sferoidów są również obserwowane w guzach nowotworowych, dlatego wykorzystuje się je jako modele komórkowe w badaniach nad rozwojem terapii nowotworowych oraz mechanizmów dostarczania leków [16-18].

Warstwowa struktura wyróżniana w guzach litych (pozbawionych naczyń krwionośnych), sygnalizacja komórkowa, fizyczny kontakt komórek oraz macierz zewnątrzkomórkowa zapewniają barierę ochronną dla penetracji i dystry-

⁵ Macierz zewnątrzkomórkowa – sieciowa struktura budowana przez cząsteczki, głównie białka i polisacharydy, wydzielane przez komórki do przestrzeni międzykomórkowej.

bucji leków przeciwnowotworowych oraz wzrost odporności na radioterapię. Również fazy wzrostu sferoidów i guzów są do siebie zbliżone, a badania molekularne wykazują podobieństwo we wzorze ekspresji pewnych genów w obu strukturach, co oznacza przede wszystkim zwiększoną liczbę białek odpowiadających za rozwój, wzrost, przerzuty i inwazję komórek [15].

BNCT jest terapią o wysokiej selektywności poprzez zastosowanie izotopu ^{10}B zgromadzonego w guzach nowotworowych w dużo większym stężeniu niż we krwi czy tkankach zdrowych. Do niedawna jej zastosowanie było ograniczone poprzez dostępność neutronów o odpowiedniej energii oraz niedoskonałych nośników boru. Rozwój nowoczesnych źródeł neutronów epitermicznych opartych na wykorzystaniu akceleratorów spowodował gwałtowny wzrost zainteresowania tą terapią w wielu krajach. W naszym kraju powstało Polskie Konsorcjum na rzecz terapii Borowo-Neutronowej, zrzeszające trzynastce jednostek naukowych prowadzących badania nad tą terapią. Aktualnie trwają intensywne prace nad nowymi sposobami selektywnego dostarczania izotopu ^{10}B do komórek nowotworowych, których efektywność zależy od rodzaju guza. Testy nośników boru mogą być prowadzone z wykorzystaniem trójwymiarowych modeli komórkowych, wśród których na szczególną uwagę zasługują sferoidy posiadające wiele cech charakteryzujących nowotwory. Rozwój terapii BNCT daje szansę na efektywne leczenie nieoperacyjnych oraz rozsianych nowotworów, uzupełniając i udoskonalając stosowane dotychczas metody.

Autorzy dziękują prof. Ewie Stępień za pomoc w przygotowaniu artykułu.

Literatura:

- [1] H. Taylor, M. Goldhaber, *Detection of nuclear disintegration in a photographic emulsion*. Nature 135, 341 (1935).
- [2] Locher GL. *Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons*. Am J Roentgenol Radium Ther. 36, 1 (1936).
- [3] R.L. Moss, *Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)*. Applied Radiation and Isotopes 88, 2 (2014).
- [4] H. Hatanaka, *Clinical experience of boron-neutron capture therapy for gliomas – a comparison with conventional chemo-immuno-radiotherapy*, (1986), In: H. Hatanaka ed Boron Neutron Capture Therapy for Tumours. Nishimura Co., Niigata 349-379.
- [5] Y. Mishima et al. *First human clinical trial of melanoma neutron capture*. Diagnosis and therapy Strahlenther. Onkol., 165 (1989).
- [6] K. Nedunchezian et al., *Boron Neutron Capture Therapy – A Literature Review*. J. Clin. Diag. Res. 10, 01 (2016).
- [7] D. Kaniowski et al., *High Boron- loaded DNA-Oligomesr as Potential Boron Neutron Capture Therapy and Antisense Oligonucleotide Dual-Action Anticancer Agents*. Molecules 22, 1393 (2017).
- [8] M.Z. Wojtukiewicz et al., *Podstawy biologiczne terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR)*. NOWOTWORY Journal of Oncology 58, 3 (2008).
- [9] A. Kwiatkowska et al., *siRNA Modified with Boron Cluster and Their Physicochemical and Biological Characterization*. Bioconjugate Chemistry 24, 1017 (2013).

- [10] R.F.Barth et al., *Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer*. Cancer Commun 38 (2018).
- [11] G.F. Peacock et al., *Cell Culture Studies of a Carbonare Cholesteryl Ester with Conventional and PEG Liposomes*. Drug Delivery 10, 29 (2003).
- [12] C. Rodriguez et al., *In vitro studies of DNA damage and repair mechanisms induced by BNCT in a poorly differentiated thyroid carcinoma cell line*. Radiation and Environmental Biophysics 57, 143 (2018).
- [13] A.E. Rossini et al., *Assessment of biological effectiveness of boron neutron capture therapy in primary and metastatic melanoma cell lines*. Int J Radiat Biol 1 (2014).
- [14] R-Z. Lin, H-Y.Chang, *Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research*. Biotechnol.J. 3, 1172 (2008).
- [15] W.C. Costa et al., *3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis*. Biotechnol. Adv. 34, 1427 (2016).
- [16] E.Ł. Stępień et al., *Melanoma spheroids as a model for cancer imaging study*. Acta Phys. Pol.B 51, 159 (2020).
- [17] H. Karimi et al., *X-ray microtomography as a new approach for imaging and analysis of tumor spheroids*. Micron 137, 102917 (2020).
- [18] M. Szczepanek, *Application of 3D model of cancer cells in research on the effectiveness of BNCT in the treatment of melanoma*. Acta Phys. Pol.B 51, 159 (2020).