

Received: 12.11.2020
Accepted: 29.12.2020
Published: 26.02.2021

Nanocząstki o wysokiej zawartości boru jako potencjalne nośniki w terapii borowo-neutronowej*

Boron-rich nanoparticles as potential carriers in boron-neutron capture therapy

Anna Wróblewska, Bożena Szermer-Olearnik, Elżbieta Pajtasz-Piasecka

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

*Praca sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego nr 2019/33/B/NZ5/02212.

Streszczenie:

Podstawą terapii borowo-neutronowej (boron neutron capture therapy, BNCT) jest selektywne dostarczenie boru do komórek nowotworowych, a następnie napromienienie zmienionego chorobowo miejsca wiązką neutronów. W wyniku tego procesu dochodzi do rozszczepienia jądra izotopu ^{10}B , co powoduje uwolnienie energii niszczącej komórki nowotworowe. Mimo że badania związane z BNCT trwają od lat 50. XX wieku, pozostaje ona wciąż terapią eksperymentalną. Jest to związane m.in. z brakiem nośników umożliwiających szybkie i skuteczne wprowadzanie ^{10}B do środowiska nowotworu. Tak więc często podnoszonym zagadnieniem i jednym z głównych wyzwań dla rozwoju BNCT, jest poszukiwanie selektywnych związków dostarczających wymaganą ilość tego pierwiastka. Istotnym aspektem są badania nad nanometrycznymi strukturami, takimi jak liposomy zawierające związki bogate w bor lub nieorganiczne nanocząstki – węgiel boru czy azotek boru. Ze względu na dużą zawartość boru oraz możliwość modyfikacji powierzchni tych nanocząstek, mogą się one okazać wyjątkowo atrakcyjnym narzędziem w celowanej BNCT. Równie ważnym problemem tej terapii jest opracowanie precyzyjnych powiązań między źródłem neutronów, specyfiką wiązki a rodzajem zastosowanego nośnika. W artykule wskazujemy na wysoki potencjał związków bogatych w bor jako nośników w celowanej terapii borowo-neutronowej.

Słowa kluczowe:

terapia borowo-neutronowa, neutrony, związki boru, nanocząstki boru, nowotwór

Summary:

The basis of boron neutron capture therapy (BNCT) is the selective delivery of boron to tumor cells and then irradiation of the affected area with a neutron beam. As a result, there is a fission of the nucleus of the boron isotope, which causes the release of energy to destroy cancer cells. Although BNCT related research has been going on since the 1950s, it remains an experimental therapy. It is related, inter alia, with the lack of carriers enabling quick and effective introduction of ^{10}B into the tumor environment. Thus, a widely discussed issue and one of the main challenges for the development of BNCT is the search for selective compounds that provide the required amount of this element. An interesting aspect is research on nanometric structures such as liposomes containing boron-rich compounds or inorganic nanoparticles – boron carbide or boron nitride. Due to the high content of boron and the possibility of surface modification of these nanoparticles, they may prove to be an extremely attractive tool in targeted BNCT. An equally important problem of this therapy is the development of precise connections between the neutron source, the specificity of the beam and the type of carrier used. In this paper, we indicate the high potential of boron-rich compounds as carriers in targeted boron-neutron capture therapy.

Keywords:	boron neutron capture therapy, neutrons, boron compounds, boron nanoparticles, tumor
GICID	01.3001.0014.7760
DOI:	10.5604/01.3001.0014.7760
Word count:	5 471
Tables:	–
Figures:	3
References:	89

Adres autorki: dr inż. Bożena Szermer-Olearnik, Laboratorium Chemii Biomedycznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: bozena.szermer-olearnik@hirszfeld.pl

Wykaz skrótów: **BNCT** – terapia borowo-neutronowa (boron neutron capture therapy); **BPA** – ((L)-4-dihydroxy-borylphenylalanine); **BSH** – (di-sodium undecahydro-mercapto-closo-dodecacarborate); **CEA** – antygen rakowo-płodowy (carcinoembryonic antygen); **CPP** – peptyd penetrujący błonę komórkową (cell-penetrating peptide); **DSPE-PEG2000** – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanoloamina-N-[amino(polietylenoglikol)-2000] (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]); **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor); **EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor); **EPR** – efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (enhanced permeability and retention); **GB-10** – (decahydrodecaborate-10B); **L-DOPA** – L-3,4-dihydroksyfenyloalanina (L-3,4-dihydroxy-phenylalanine); **LET** – liniowy przekaz energii (linear energy transfer); **mPEG-DSPE** – metoksy-poli(etylenoglikol)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanoloamina (methoxy-poly(ethylene glycol)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N); **NRK** – komórki prawidłowe pochodzące z nerki szczura (normal rat kidney); **PEG** – glikol polietylenowy (polyethylene glycol); **SCC** – rak płaskonabłonkowy (squamous cell cancer).

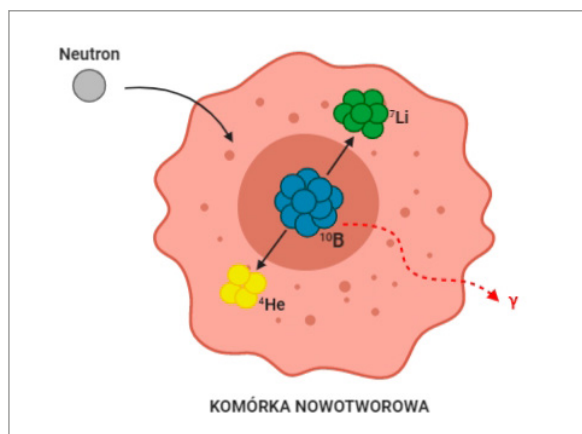
WPROWADZENIE

Terapia borowo-neutronowa (boron neutron capture therapy, BNCT) jest zaliczana do celowanej radioterapii przeciwnowotworowej. Jej początki sięgają 1932 r., w którym to Chadwick odkrył neutrony. Następnie w 1935 r. Taylor i Goldhaber opisali reakcję wychwytu neutronów przez jądro boru, a rok później Locher zaproponował wykorzystanie tej reakcji w terapii onkologicznej [63]. Natomiast badania kliniczne nad BNCT, jako główną strategią przeciwnowotworową oraz terapią wspomagającą, trwają od lat 50. XX w. Pierwsza opisana próba kliniczna dotyczyła leczenia pacjenta, u którego zdiagnozowano glejaka wielopostaciowego i została przeprowadzona w 1951 r. z wykorzystaniem reaktora jądrowego znajdującego się w Brookhaven National Laboratory w Stanach Zjednoczonych [72]. Następne badania również skupiały się na traktowaniu złośliwych guzów mózgu, które ze względu na głębokie umiejscowienie, dużą dyslokację w strukturze mózgu oraz słabe utlenowanie były trudne do usunięcia za pomocą resekcji chirurgicznej oraz radioterapii i chemioterapii.

Ważnym aspektem w BNCT jest odpowiednie źródło neutronów. Obecnie najpopularniejszym źródłem generującym wiązkę neutronów są reaktory jądrowe, takie jak: KUR w Japonii, RA-6 w Argentynie, THOR na Tajwanie oraz BCTC w Chinach [41]. Jednak ze względu na ograniczenia spowodowane wysokimi kosztami utrzymania, brakiem

możliwości wykorzystania w warunkach szpitalnych i ryzykiem skażenia radioaktywnego, prowadzone są prace nad zastosowaniem akceleratorów jako alternatywnego źródła neutronów [58]. Uważa się, że te urządzenia są tańsze, bezpieczniejsze, a dzięki niewielkim rozmiarom mogą być stosowane w warunkach szpitalnych [59]. Obecnie istnieją na świecie dwa akceleratory, które są wykorzystywane w badaniach klinicznych, mających na celu potwierdzenie ich bezpieczeństwa i skuteczności w dostarczaniu wiązki neutronów. Jeden znajduje się na Uniwersytecie Kyoto, drugi w szpitalu w Południowym Tohoku w Fukushima [37, 41]. Dalsze prace nad doskonaleniem konstrukcji akceleratorów oraz nad pomiarami fizycznymi związanymi z generowaniem wiązki neutronów prowadzone są nie tylko w Japonii [43, 62], lecz także w: Rosji, Finlandii, Izraelu, Argentynie, Włoszech, Korei oraz Chinach [41]. Polska również włącza się w światowy nurt badań nad BNCT. W Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Świerku, działającym przy reaktorze MARIA, powstaje stanowisko badawcze przeznaczone do tej terapii.

Badania nad skutecznością i bezpieczeństwem BNCT są rozwijane w takich krajach jak: Stany Zjednoczone, Japonia, Argentyna, Tajwan, Chiny, a także w kilku krajach europejskich – Finlandii, Szwecji, Czechach, Holandii i Włoszech [3, 63] – i skupiają się głównie na traktowaniu regionu głowy i szyi [36, 40], glejaka wielopostaciowego [56, 60], czerniaka [27], raka płuc [10] oraz wątroby [74].



Ryc. 1. Reakcja rozszczepienia jądra boru w obrębie pojedynczej komórki nowotworowej. Opracowanie własne na podstawie [35, 73]

Terapia borowo-neutronowa polega na selektywnym dostarczaniu związków zawierających nieradioaktywny izotop boru (^{10}B) do komórek nowotworowych, a następnie napromienieniu zmienionego chorobowo miejsca wiązką neutronów termicznych o energii około 0,025 eV. Bor ma wysoki przekrój czynny na wychwyt neutronów, w wyniku czego dochodzi do rozszczepienia jego jądra, a następnie uwolnienia jąder litu (^7Li) oraz cząstek alfa (^4He) charakteryzujących się wysokim współczynnikiem liniowego przekazu energii (linear energy transfer, LET), a także promieniowania gamma zawierającego energię rzędu 2,31 MeV (ryc. 1) [3, 47].

Zasięg wygenerowanych wysokoenergetycznych cząstek alfa jest ograniczony długością ich ścieżki w tkance, która wynosi 5–9 μm , i jest zbliżony do średnicy pojedynczej komórki. Umożliwia to zmniejszenie uszkodzeń tkanki do miejsc, w których nastąpiło nagromadzenie się odpowiedniej ilości izotopu ^{10}B , oszczędzając tym samym sąsiadujące niezmiennione chorobowo komórki. Ze względu na ograniczoną głębokość przenikania neutronów termicznych, w badaniach klinicznych również stosuje się neutrony epitermiczne (0,025 eV–10 keV) charakteryzujące się wyższą energią i większym zasięgiem, umożliwiającym lepszą penetrację w głąb ciała [47]. Neutrony epitermiczne ulegają spowolnieniu w chwili przechodzenia przez tkankę, co nazywane jest termalizacją. Proces ten ma na celu zmniejszenie ich energii do energii neutronów termicznych (0,025 eV) [19]. Neutrony są elektrycznie obojętne i przechodzą przez ludzkie ciało bez oddziaływań elektrycznych, dopiero w chwili interakcji jądrowych uwalniają duże ilości energii rzędu MeV. Również sam izotop ^{10}B nie jest radioaktywny, a jego usuwanie z organizmu zależy od tego w postaci jakiego związku występuje [68].

NOŚNIKI BORU W BADANIACH KLINICZNYCH

Terapia borowo-neutronowa, mimo wieloletnich wysiłków, nadal pozostaje w fazie badań klinicznych, nie tylko przez ograniczenia związane z dostępnością źródła neutronów, lecz także z powodu braku wydajnych związków zapewniających odpowiednią ilość boru w tkance docelowej. Bada-

nia prowadzone są dwoma nurtami, jeden to poszukiwanie nowych drobnocząsteczkowych związków boru, a drugi – z naszego punktu widzenia istotniejszy – to poszukiwanie nośników pozwalających na dostarczenie do guza bogatych w bor nanostruktur. Ponadto biodystrybucja otrzymanych związków, czy też nośników, powinna być zoptymalizowana w celu skutecznego dostarczania boru do tkanki guza, zwłaszcza do różnych subpopulacji komórek nowotworowych, jak i poprawy mikrodystribucji komórkowej [3, 18, 53].

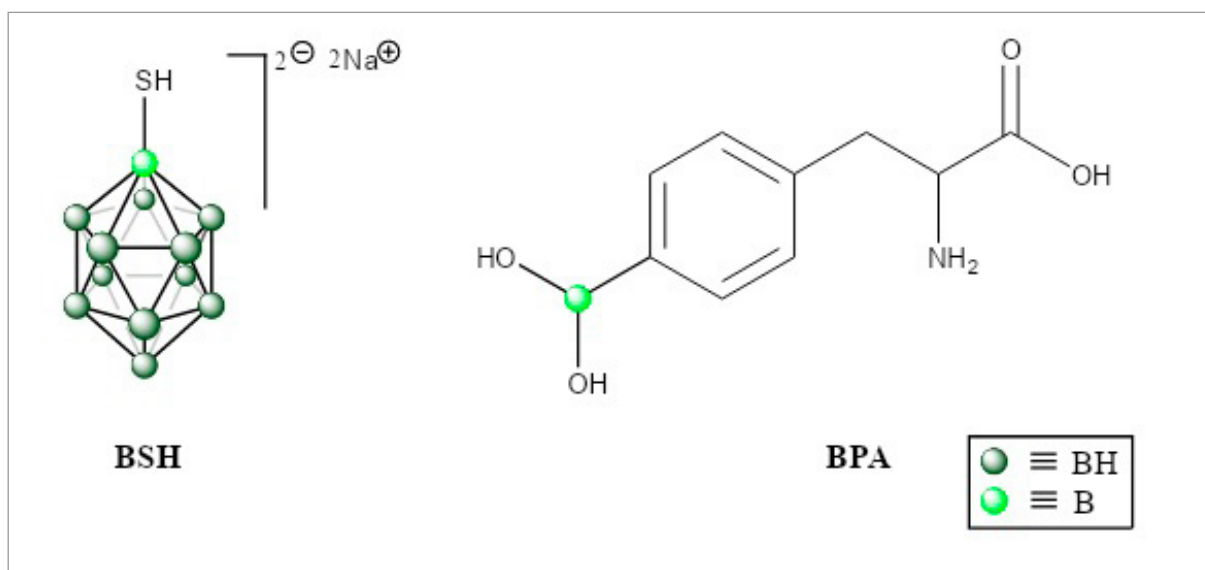
O przydatności związków/nośników boru w terapii borowo-neutronowej decydują następujące kryteria:

- niska toksyczność ogólnoustrojowa,
- większe pochłanianie przez nowotwór niż przez zdrowe tkanki; stosunek stężenia boru w komórkach nowotworowych i w zdrowych powinien wynosić $>3:1$,
- dostarczenie ^{10}B w stężeniu 20–35 μg na 1 gram guza lub około 10^9 atomów na komórkę,
- retencja w guzie przez co najmniej kilka godzin,
- szybkie usuwanie z krwi i zdrowych tkanek [47, 55].

Innym zagadnieniem jest tzw. efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (enhanced permeability and retention, EPR), który w nowotworze pojawia się w wyniku utraty ciągłości ścian naczyń krwionośnych. Umożliwia to swobodną dyfuzję nanocząstek do mikrośrodowiska nowotworu. Ponadto w strukturze guza nie występują funkcjonalne naczynia limfatyczne odpowiedzialne za odprowadzanie płynu śródmiąższowego z tkanek. Dzięki temu nanometryczne struktury mogą swobodnie kumulować się w tkance nowotworowej, z której nie będą usuwane [8]. Istotne są także takie właściwości związku jak jego lipofilowość oraz stosowana dawka i droga podania, co przekłada się na stężenie tego związku w osoczu. Szczególnym wyzwaniem jest również pokonanie bariery krew-mózg, która chroni mózg przed cząsteczkami z krążenia ogólnoustrojowego, bo wysokie stężenie nośnika boru we krwi maksymalnie zwiększa jego wchłanianie przez naczynia krwionośne mózgu, natomiast szybkie usuwanie z organizmu zmniejsza jego pobór, wyjątkiem jest tu dotętnicza droga podania związku [3, 75].

Pierwszym wykorzystywanym związkiem boru w BNCT był kwas borowy oraz jego pochodne, takie jak tetraboran sodu (boraks) i pentaboran sodu w roztworze glukozy. Jednak związki te okazały się nieselektywne, charakteryzowały się słabą retencją w komórkach nowotworowych i osiągały za niski stosunek stężenia boru guz/zdrowa tkanka. Ponadto uzyskane wyniki wskazywały na możliwość pojawienia się wielu działań niepożądanych, takich jak: radiodermatozy skóry głowy, owrzodzenia, a także obrzęk mózgu [2, 63, 72].

Obecnie w badaniach klinicznych nad BNCT wykorzystywane są dwa związki: BPA ((L)-4 dihydroxy-borylphenylalanine) i BSH (di-sodium undecahydro-mercapto-closo-dodecaborate) (ryc. 2), przede wszystkim ze względu na ich niską toksyczność, naturalne właściwości umożliwiające przenikanie do tkanki nowotworowej oraz retencję w guzie przez określony czas. Związki te jednak charakteryzują się za niską selektywnością, a ze względu na małą zawartość atomów boru muszą być podawane w dużych ilościach w celu zapewnienia odpowiedniego terapeutycznego stężenia [47].



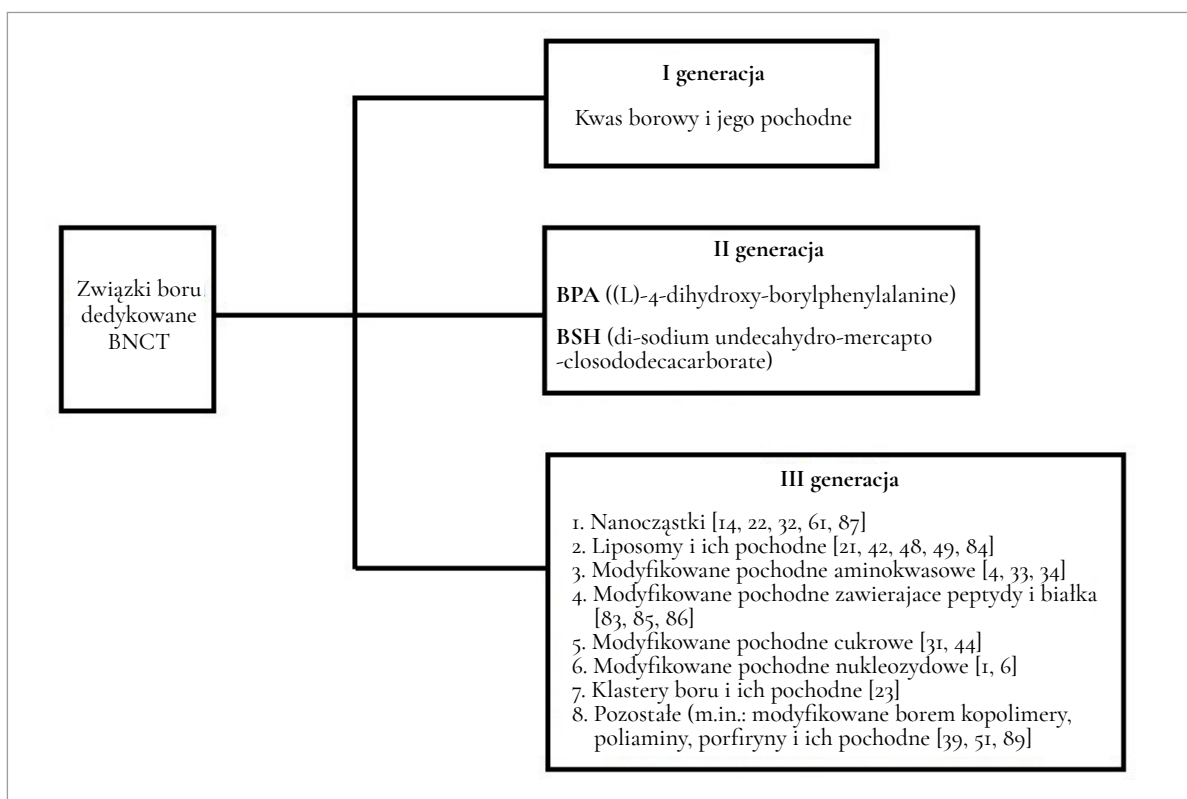
Ryc. 2. Wzory strukturalne BSH (di-sodium undecahydro-mercapto-closo-dodecacarborate) i BPA ((L)-4-dihydroxy-borylphenylalanine)

BPA to związek po raz pierwszy zsyntetyzowany przez Snydera i wsp. w 1958 r., ale dopiero w latach 1988–1989 został zastosowany w badaniach klinicznych przez Mishima i wsp. [54]. Ze względu na strukturalne podobieństwo do tyrozyny, będącej prekursorem syntezy melaniny, uznano, że BPA może być pochłaniana przez melanocyty i początkowo wykorzystywano ją w leczeniu pacjentów z czerniakiem. Leczenie tego schorzenia opiera się na zasadzie podwyższonego poziomu syntezy melaniny przez komórki nowotworowe [5, 27, 47]. Wykazano, że BPA może być również pochłaniana przez inne histologicznie typy nowotworów, w tym guzy mózgu [16]. Do badań klinicznych wykorzystywany jest enancjomer L-BPA, który charakteryzuje się większym nagromadzeniem w komórkach nowotworowych w porównaniu z enancjomerem D i mieszaniną racemiczną. BPA jest związkiem hydrofobowym, dlatego w celu zwiększenia jej rozpuszczalności w wodzie jest często łączona z fruktozą. Jednak wraz ze wzrostem rozpuszczalności w wodzie pochodnych BPA spada ich cytotoksyczność w komórkach czerniaka. Bardziej hydrofilowe cząsteczki BPA mogą być podawane dożylnie, ale niestety zmniejsza to ich zdolność do przenikania bariery krew-mózg [47, 64]. Ze względu na swoją budowę, BPA jest transportowana przez kanały białkowe dla aminokwasów typu L, które przenoszą neutralne analogi aminokwasów zawierających aromatyczne łańcuchy boczne. Transporter aminokwasów układu L ulega nadekspresji w różnych typach nowotworów, m.in. w guzach mózgu, a to pozwala na łatwiejsze gromadzenie się BPA w komórkach nowotworowych w porównaniu z otaczającymi, zdrowymi tkankami. Pochłanianie tego związku odbywa się aktywnie, dlatego subpopulacje komórek nowotworowych w stanie spoczynku, czyli takich, które przestają się dzielić, mogą mieć niższy pobór BPA, zmniejszając w ten sposób skuteczność terapii. Jak wykazują dotychczasowe badania, biodystrybucja BPA u pacjentów z glejakiem, czerniakiem oraz nowotworami głowy i szyi osiągnęła stosunek stężeń boru guz/krew w zakresie 1,1–3,6 oraz w przypadku guz/zdrowe tkanki 1,1–2,9 [47, 55].

Drugi związek stosowany w BNCT to BSH ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$). Po raz pierwszy był zsyntetyzowany przez Millera i wsp. w 1964 r., a już w 1968 r. został wykorzystany do leczenia pacjentów z glejakiem przez Hatanake i Nakagawę w Japonii [26, 60] oraz Sauerweina i wsp. w Europie [78]. BSH jest anionową pochodną dodekaboranu stosowaną w terapii w postaci soli sodowej. W porównaniu do BPA wykazuje większą hydrofilowość oraz jest transportowany w sposób pasywny do komórek nowotworowych. Ze względu na charakter anionowy, preferencyjnie gromadzi się w guzach mózgu w porównaniu ze zdrowymi tkankami dzięki zaburzonej barierze krew-mózg [47, 88]. Biodystrybucja tego związku osiąga stosunek stężeń boru guz/krew w zakresie od $0,9 \pm 0,4$ do $1,2 \pm 0,4$, natomiast w przypadku guz/zdrowe tkanki $0,7 \pm 0,1$ do $3,6 \pm 0,6$ [47, 82].

Jedną z podstawowych różnic między opisanymi związkami jest to, że BSH zawiera 12 atomów boru na cząsteczkę, natomiast BPA tylko jeden atom. Dlatego biorąc pod uwagę równomierną akumulację molową obu tych związków w guzie, BSH może łatwiej osiągnąć stężenie terapeutyczne $20\text{--}35 \mu\text{g } ^{10}\text{B}$ na 1 g guza [47].

Wykazano nie tylko osobnicze różnice w stopniu pobierania boru, lecz także zależne od typu nowotworu oraz jego strefy. Odmienność histologiczna poszczególnych nowotworów jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za różnice w pochłanianiu i retencji BPA, i BSH. Dlatego też prowadzone są badania nad polepszeniem biodystrybucji komórkowej tych związków z uwzględnieniem różnych subpopulacji komórek nowotworowych przez regulację szybkości wlewu czy sposobu podania, który może być dożylny lub dotętniczny. Należy podkreślić, że równoczesne zastosowanie BPA i BSH pozwala na osiągnięcie działania synergistycznego tych związków [25, 29, 58]. Poza wspomnianym już łąčeniem BPA z fruktozą w celu osiągnięcia lepszej rozpuszczalności w wodzie, do BSH i BPA można przyłączać związki umożliwiające przekroczenie bariery



Ryc. 3. Trzy generacje związków boru. Przykłady związków badanych pod względem użyteczności w BNCT. Na podstawie [5, 47]

kręgowo-mózg np. mannitol, czego skutkiem jest lepsza akumulacja boru w guzie. Zostało to potwierdzone *in vivo* na modelu szczurzego glejaka F98. Zwierzętom, przed podaniem BPA lub BSH, wstrzyknięto hiperosmotyczny roztwór mannitolu. Wyniki wykazały znaczny wzrost stężenia boru w guzie w porównaniu do grup, którym nie podano mannitolu [7].

Inną strategią, mającą na celu zwiększenie ilości BPA dostarczonej do guza, jest zastosowanie aminokwasowych analogów, takich jak L-DOPA, czyli L-3,4-dihydroksyfenyloalanina. Związek ten dzięki strukturalnemu podobieństwu do BPA jest transportowany do komórek za pomocą transportera aminokwasów układu L. Transport opiera się na mechanizmie antyportowym sprzężonym z substratem, dzięki czemu wstępne dostarczenie L-DOPA zwiększa akumulację BPA w guzie. Strategia ta została potwierdzona *in vitro* na komórkach glejaka C6 oraz *in vivo* na szczurach obciążonych tym nowotworem, u których stwierdzono 2,7-krotnie wyższe pochłanianie BPA w guzie niż w grupie traktowanej samym BPA [11]. Zamiast L-DOPA, można wykorzystać L-tyrozinę, która także wpływa na podwyższoną akumulację BPA w nowotworze, co potwierdzono na komórkach glejaka 9L [81].

Jednym z rozwiązań prowadzących do zwiększenia pochłaniania BSH przez komórki nowotworowe jest zastosowanie peptydu penetrującego błonę komórkową (cell-penetrating peptide, CPP) przyłączonego do dendrymeru peptydowego zawierającego cząsteczki BSH. Tak przygotowany BSH badano *in vitro* na komórkach glejaka U87,

wykazując znaczny wzrost stężenia BSH w guzie, w porównaniu z komórkami traktowanymi samym BSH, a w badaniach na myszach udowodniono, że BSH-dendrymer-CPP nie gromadzi się w zdrowej tkance, a tylko w guzie. Jest to prawdopodobnie osiągane dzięki dodatnio naładowanej części bogatej w argininę CPP (11 reszt argininy), która sprzyja wewnątrzkomórkowej akumulacji anionowego BSH [52]. Inną strategią, mającą na celu zwiększenie pobierania BSH przez komórki nowotworowe, jest sprzężenie tego związku z glikolem polietylenowym oraz kwasem poliglutaminowym. Badania koniugatu na komórkach raka jelita grubego C26 wykazały znacznie większe pobieranie i akumulację w tych komórkach w porównaniu do preparatów niepegylowanych i samego BSH [51].

W ostatnim 20-leciu rozpoczął się szybki rozwój badań nad nowymi związkami zawierającymi bor zarówno organicznymi, jak i nieorganicznymi. Ważnym aspektem jest wzbogacanie nośników w izotop ^{10}B , ponieważ jego zawartość w naturalnie występującym borze wynosi 19,9% [47]. Kierunek badań nad związkami III generacji przedstawiono na ryc. 3. Uwagę skupiono na: modyfikowanych pochodnych aminokwasów [4, 33, 34], peptydów i białek [83, 85, 86], ale też nukleozydów [1, 6] i pochodnych cukrowych [31, 44]. Ważną rolę wydają się odgrywać klastery boru i ich pochodne [23] oraz wiele różnych cząsteczek biologicznie czynnych. Jednym z dokładniej badanych nośników boru są liposomy i ich pochodne [21, 42, 48, 49, 84]. Dużą zaletą liposomów jest możliwość ich ukierunkowania w celu selektywnego dostarczenia zamkniętych w nich związków do tkanki nowotworowej.

Jedną z możliwości jest sprzężenie liposomów z przeciwciałami monoklonalnymi swoistymi dla antygenu rakowo-płodowego (carcino-embryonic antigen, CEA). W badaniach Yanagie i wsp. takie liposomy selektywnie wiązały się z komórkami ludzkiego raka trzustki AsPC-1 eksprymującymi na swojej powierzchni CEA oraz dostarczały zamknięty w nich związek boru o wzorze $\text{Cs}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$. Dzięki temu po napromienieniu wiązką neutronów hodowli komórek ich zdolność do przeżycia obniżyła się [84]. Inną strategią jest dołączenie do liposomów naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor, EGF), co umożliwia ukierunkowanie na receptor EGF (epidermal growth factor receptor, EGFR) obecny na powierzchni wielu typów komórek nowotworowych. Badania Kullberga i wsp. wykazały zwiększone pochłanianie tak zmodyfikowanych liposomów przez komórki glejaka U-343MGaCl₂:6, a dzięki zamkniętej w środku akrydynie związanej z borem, osiągnięto 10-krotne zmniejszenie przeżycia tych komórek po napromienieniu neutronami [42]. Aby skierować nośniki na receptor EGF, można także wykorzystać liposomy związane z przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko EGFR. Taką strategię zastosowali Feng i wsp., którzy w immunoliposomach zamknęli BSH. Ich badania wykazały, że BSH był transportowany wyłącznie do komórek eksprymujących receptor. Wybiórczość pochłaniania immunoliposomów stwierdzono również w doświadczeniu *in vivo* na myszach obarczonych glejakiem U87 [21]. Natomiast Masunagi i wsp. wykorzystali inną modyfikację liposomów za pomocą transferryny i glikolu polietylenowego do zamknięcia w ich wnętrzu GB-10 (decahydrodecaborate-10B) lub BSH. Doświadczenie *in vivo* na myszach z rakiem płaskonabłonkowym języka SCC VII (squamous cell cancer) wykazało większy wychwyt nośnika przez komórki nowotworowe zawierające receptor i korzystny stosunek stężenia boru guz/krew. Dzięki temu po napromienieniu neutronami miejsca podania, PEGylowane liposomy z transferryną i zamkniętymi związkami boru wykazały większy efekt terapeutyczny niż inne formy tych związków [49].

WYKORZYSTANIE NIEORGANICZNYCH NANOCZĄSTEK BORU JAKO POTENCJALNYCH ZWIĄZKÓW W TERAPII BOROWO-NEUTRONOWEJ

W przypadku nieorganicznych nanocząstek, badania skupiają się na węglu boru oraz azotku boru ze względu na dużą zawartość boru w ich strukturze oraz możliwość ukierunkowanych modyfikacji powierzchni.

Węgiel boru (B_4C) jest lekkim związkiem nieorganicznym, który charakteryzuje się bogatą zawartością boru, obojętnym charakterem oraz stosunkowo wolną degradacją w organizmie, co czyni go potencjalnym kandydatem do wykorzystania w terapii borowo-neutronowej. Można go otrzymać różnymi metodami, m.in.: spiekania proszków, redukcji karbotermicznej, reakcji w fazie gazowej lub pirolizie polimerów. Dzięki procesom chemicznego i fizycznego osadzania z fazy gazowej ma szeroki zakres stechiometrii oraz struktur polikrystalicznych i amorficznych [77].

Mortensen i wsp., w celu sprawdzenia użyteczności węgla

boru w BNCT, przetestowali jego działanie *in vitro* na mysiej linii komórkowej czerniaka B16F10. Po napromienieniu komórek wiązką neutronów zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia B_4C hamowana była proliferacja komórek nowotworowych, podczas gdy sam niepoddany naświetlaniu węgiel boru nie wpływał znacząco na ich żywotność [57].

W celu zastosowania w BNCT zbadano różne metody otrzymywania węgla boru, jego strukturę krystalograficzną, wielkość, jednorodność oraz funkcjonalizację za pomocą wielu cząsteczek. Została określona jego cytotoksyczność i działanie na liniach komórkowych oraz na modelach mysich. Przykładem są przygotowane przez Ishikawę i wsp. cząsteczki B_4C o wielkości około 200 nm, otrzymane metodą pulsacyjnego laserowego naświetlania rozproszonego związku boru w octanie etylu pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej. Każda uzyskana cząstka została zamknięta w warstwie grafitowej, która była korzystną modyfikacją powierzchni ułatwiającą połączenie z wybranym lekiem przeciwnowotworowym lub umożliwiającą uzyskanie cząsteczki o specyficznej zdolności do rozpoznawania tkanek [30]. Otrzymany węgiel boru z otoczką grafitową przetestowano w warunkach *in vitro* pod kątem użyteczności w BNCT na linii komórkowej SAS ludzkiego płaskonabłonkowego raka języka (SCC) oraz na nagich myszach z heteroprzeszczepem SAS. Ponadto cząstki B_4C zostały bezpośrednio podane do guza w badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vivo*. Na podstawie doświadczeń zaobserwowano:

- zmniejszoną żywotność komórek w hodowlach, mimo że sam B_4C nie wpływał na wzrost komórek;
- zahamowanie tworzenia kolonii przez komórki SAS;
- podanie B_4C do guza umożliwiło osiągnięcie wystarczającego stężenia boru wymaganego w BNCT;
- po wstrzyknięciu do guza cząstki B_4C nie gromadziły się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej prawidłowego nabłonka;
- związek kumulował się w nerkach, wątrobie i śledzionie w śladowych ilościach;
- masa ciała u myszy podczas eksperymentu nie uległa zmianie.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń obserwowano nieliczne działania niepożądane po podaniu B_4C [30, 32].

Natomiast w badaniach Tsui i wsp. przygotowano cząstki węgla boru powleczone dodatnio naładowaną poli-L-lizyną i ujemnie naładowanym kwasem poliglutaminowym, a następnie sprzężono z transferryną. Koniugat został przetestowany *in vitro* na linii raka szyjki macicy HeLa oraz prawidłowych komórkach pochodzących z nerki szczura NRK (normal rat kidney). Wykazano, że modyfikowany węgiel boru był internalizowany przez komórki nowotworowe za pomocą receptora transferryny, ale nie był pochłaniany przez komórki NRK. Ponadto w badaniach *in vivo* koniugat został wstrzyknięty dożylnie myszom, po czym był transportowany do guza, a następnie internalizowany przez komórki nowotworowe w procesie endocytozy w pobliżu jądra [76].

Pochłanianie zmodyfikowanych cząstek węgla boru przez komórki potwierdziły także badania Yinghua i wsp. Zsyntetyzowali oni jednościenne nanorurki węglowe funkcjonalizowane peptydami, a po podaniu ich myszom z rakiem sutka EMT6 zaobserwowali większą akumulację tych struktur w guzie w porównaniu z wątrobą, płucami, śledzioną oraz krwią [87].

Innym przykładem jest opracowanie przez Petersena i wsp. funkcjonalizacji węgla boru z lizaminą i sekwencją peptydu TAT, która promuje adhezję komórkową oraz pobieranie cząstek. Komórki czerniaka B16-OVA inkubowano z tak zmodyfikowanym związkiem przez 12 godzin, po czym wstrzyknięto je myszom, a miejsce podania napromieniono wiązką neutronów termicznych po 1, 4 lub 8 dniach po podaniu preparatu. W porównaniu do kontroli nietraktowanej, największe opóźnienie wzrostu guza i wydłużenie przeżycia myszy zaobserwowano, gdy miejsce iniekcji było napromienione po jednym dniu od podania komórek. Potwierdzając, że zmodyfikowany w ten sposób węgiel boru może być wykorzystany w terapii borowo-neutronowej, jako skuteczne narzędzie do opóźniania wzrostu agresywnego guza łitego, jakim jest czerniak B16-OVA [65].

Azotek boru (BN) to nieorganiczny związek boru i azotu o strukturze krystalicznej lub amorficznej. W postaci krystalicznej BN może występować m.in.: w układzie regularnym, heksagonalnym o budowie zbliżonej do grafenu lub układzie podobnym do struktury wurtzytu [67]. Do BNCT często wykorzystuje się heksagonalny azotek boru ze względu na jego chemiczną stabilność, a także tworzone z niego nanorurki, które mają dużą zawartość boru. Wykorzystując różne metody syntezy, można uzyskać wiele odmian polimorficznych tego związku. Istnieje bardzo wiele sposobów mających na celu wytworzenie wysokoenergetycznego wiązania między borem, a azotem, lecz do najważniejszych należy zaliczyć:

- azotowanie amoniakiem lub azotem produktów powstałych w wyniku reakcji tlenowych związków boru ze związkami organicznymi zawierającymi w swojej strukturze azot;
- synteza z nieorganicznych związków azotujących oraz tlenowych związków boru;
- azotowanie amoniakiem tlenku boru w stopionych solach lub na nośniku;
- azotowanie amoniakiem lub azotem tlenowych związków boru w obecności reduktorów, takich jak węgiel lub magnez;
- piroliza produktów reakcji estrów lub halogenków boru z amoniakiem lub piroliza lotnych związków boroorganicznych [66, 69].

Do uzyskania odpowiednich struktur BN przydatne są również techniki, takie jak: wyładowanie łukowe, mielenie kulowe, chemiczne osadzanie z fazy gazowej, pulsacyjne osadzanie laserowe, metody solwotermiczne, kriogeniczna eksfoliacja, sucha eksfoliacja z wykorzystaniem wodorotlenków, eksfoliacja wspomagana sonikacją, eksfoliacja

chemiczna np. z wykorzystaniem kwasu o dużej zawartości protonów, czy też wykorzystanie wirowego urządzenia płynowego [9, 20, 24, 71].

Zaletą BN jest jego częściowo polarny charakter, dzięki temu ma większą stabilność, również w układach biologicznych, w porównaniu do nanocząstek węglowych [61]. W celu poprawienia dyspersji w wodzie i płynach fizjologicznych, poddaje się go różnym wariantom funkcjonalizacji powierzchni. Przykładowo zastosowano powlekanie polietylenoiminą i poli-L-lizyną [15], przyłączanie glikodendrymerów [12], niekowalencyjne owijanie glikol-chitozan [13] oraz modyfikowanie Tweenem 80 (monooleinian polioksyetyleno-80-sorbitanu) [28]. Do funkcjonalizacji powierzchni nanorurek azotku boru wykorzystano także rozpuszczalne w wodzie i biokompatybilne PEGylowane fosfolipidy – metoksy-poli(etylenoglikol)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolaminę (mPEG-DSPE o średniej masie cząsteczkowej 5000) [46]. Wykorzystując odpowiednie metody i warunki syntezy, np. metodę solwotermiczną, można uzyskać BN o dużej dyspersji w wodzie [38]. Innym rozwiązaniem jest synteza porowatego hydroksylowanego azotku boru z wykorzystaniem termicznego podstawienia atomów węgla strukturami kwasu borowego w azotkach węgla. Powstały BN wykazuje zwiększoną dyspersję w wodzie, biokompatybilność oraz może służyć jako wydajny nośnik leków przeciwnowotworowych [80]. Wszystkie wymienione modyfikacje powierzchni nanorurek doprowadziły do otrzymania związków dyspergowalnych w wodzie oraz rozpuszczalnikach organicznych. W terapii nowotworów mózgu, azotek boru można także połączyć z transferryną, która umożliwia przejście bariery krew-mózg, dzięki obecności wielu receptorów transferyny na komórkach śródbłonna [14].

Ważnym czynnikiem powodzenia BNCT jest niewielka toksyczność nośników boru w stosunku do zdrowych komórek. Testy cytotoksyczności, przeprowadzone przez Singha i wsp., wykazały, że nanorurki z azotku boru są bardziej cytotoksyczne w stosunku do linii raka szyjki macicy HeLa oraz linii ludzkiego gruczolakoraka piersi MCF-7 w porównaniu do prawidłowej linii ludzkich embrionalnych komórek nerek HEK-293 [71]. Natomiast Kaur i wsp. zsyntetyzowali azotek boru na potrzeby BNCT metodą solwotermiczną z użyciem kwasu borowego i roztworu amoniaku. Następnie przeprowadzili analizę cytotoksyczności tak przygotowanego związku na linii komórkowej HeLa. Badanie wykazało zależność od stężenia pobieranie boru przez komórki. Zaobserwowano, że w stężeniu do 1 mg/ml nie jest on cytotoksyczny, co może sugerować, że w takim maksymalnym stężeniu może być bezpiecznie używany w procedurach biomedycznych. Natomiast przy stężeniu 1,2 mg/ml wskaźnik cytotoksyczności wynosił już 40%. Związek ten nie powoduje wzrostu reaktywnych form tlenu, nie narusza błony jądrowej i nie zmienia gęstości chromatyny jądrowej, co sugeruje, że azotek boru nie powoduje znacznych uszkodzeń komórek [38]. W badaniach Ferreiry i wsp. komórki linii HeLa po inkubacji z nanorurkami azotku boru zostały dodatkowo napromienione wiązką neutronów. Wyniki wykazały, że śmiertelność tych komórek, które pochło-

nęły nanostruktury, była znacznie większa, niż komórek traktowanych samymi nanostrukturami lub samą wiązką neutronów [22]. W innych badaniach porównywano nanorurki z azotku boru sfunkcjonalizowane DSPE-PEG2000 z BSH i BPA. Koniugat wykazał trzykrotnie większą akumulację w komórkach czerniaka B16 niż BSH, ale słabszą niż BPA. Dzięki temu po napromienieniu komórek wiązką neutronów wywołał śmierć większej liczby komórek nowotworowych w porównaniu do BSH [61]. Wstępny test *in vivo* na zwierzętach przeprowadzili Ciofani i wsp. Ocenili początkowe bezpieczeństwo biologiczne nanorurek azotku boru przez podanie dożylnie tego związku (1mg/kg masy ciała) królikom i przeprowadzenie analizy krwi, w wyniku której nie wykazano zmian podstawowych parametrów oraz upośledzenia funkcji wątroby i nerek. Nie zaobserwowano również toksyczności po jednorazowym podaniu dożylnym w ciągu 72 godzin [14].

Porównując oba związki, nanorurki azotku boru mają przewagę nad nanorurkami węglowymi, ponieważ wykazują obojętność chemiczną, stabilność termiczną oraz właściwości izolacyjne. Ponadto są lekkie, mają doskonałe właściwości mechaniczne, większą odporność na utlenianie oraz są strukturalnie stabilne i biokompatybilne [61]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że struktury z azotku boru charakteryzują się mniejszą cytotoxycznością niż ich węglowe odpowiedniki [71]. Nanorurki azotku boru nie hamują wzrostu komórek HEK-293 ani nie indukują szlaków

apoptotycznych, podczas gdy nanorurki węglowe mogą hamować proliferację tej linii komórkowej przez indukcję apoptozy i zmniejszenie zdolności adhezji [12, 17]. Ponadto udowodniono, że te węglowe struktury wykazują cytotoxyczność wobec ludzkich keratynocytów [70], mogą hamować wzrost embrionalnych komórek neuronu mózgu szczura [50], a także indukują tworzenie ziarniaków płuc u myszy [45, 79].

PODSUMOWANIE

Nowotwory są istotnym problemem społecznym, szacuje się, że z powodu chorób onkologicznych na świecie umiera prawie 10 milionów osób rocznie, a w Polsce ta liczba przekracza 100 tysięcy. Mimo że złośliwe nowotwory regionu głowy i szyi, mózgu, czerniaka czy rak płuca lub wątroby stają się celem BNCT w coraz szerszym zakresie, zwiększenie skuteczności terapii wymaga opracowania nowych sposobów dostarczania boru w celu uzyskania stężenia terapeutycznego. Nanocząstki, takie jak węglík boru, azotek boru oraz liposomy zawierające związki bogate w bor stwarzają nowe perspektywy. Oczekuje się, że te nanostruktury, ze względu na obfitość pierwiastka, nie będą wymagały dodatkowego wzbogacania izotopem ^{10}B . Ponadto, poddane modyfikacjom będą selektywnie ukierunkowane na środowisko nowotworu. Aby mogły zostać wykorzystane w przyszłości w celowanej terapii borowo-neutronowej, związki te wymagają dalszych badań nad bezpieczeństwem i skutecznością ich stosowania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Al-Madhoun A.S., Johnsamuel J., Barth R.F., Tjarks W., Eriksson S.: Evaluation of human thymidine kinase 1 substrates as new candidates for boron neutron capture therapy. *Cancer Res.*, 2004; 64: 6280–6286
- [2] Archambeau J.O.: The effect of increasing exposures of the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ reaction on the skin of man. *Radiology*, 1970; 94: 178–187
- [3] Barth R.F., Coderre J.A., Vicente M.G., Blue T.E.: Boron neutron capture therapy of cancer: Current status and future prospects. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 3987–4002
- [4] Barth R.F., Kabalka G.W., Yang W., Huo T., Nakkula R.J., Shaikh A.L., Haider S.A., Chandra S.: Evaluation of unnatural cyclic amino acids as boron delivery agents for treatment of melanomas and gliomas. *Appl. Radiat. Isot.*, 2014; 88: 38–42
- [5] Barth R.F., Mi P., Yang W.: Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer. *Cancer Commun.*, 2018; 38: 35
- [6] Barth R.F., Yang W., Nakkula R.J., Byun Y., Tjarks W., Wu L.C., Binns P.J., Riley K.J.: Evaluation of TK1 targeting carboranyl thymidine analogs as potential delivery agents for neutron capture therapy of brain tumors. *Appl. Radiat. Isot.*, 2015; 106: 251–255
- [7] Barth R.F., Yang W., Rotaru J.H., Moeschberger M.L., Joel D.D., Nawrocky M.M., Goodman J.H., Soloway A.H.: Boron neutron capture therapy of brain tumors: Enhanced survival following intracarotid injection of either sodium borocaptate or boronophenylalanine with or without blood-brain barrier disruption. *Cancer Res.*, 1997; 57: 1129–1136
- [8] Bertrand N., Wu J., Xu X., Kamaly N., Farokhzad O.C.: Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014; 66: 2–25
- [9] Bhimanapati G.R., Glavin N.R., Robinson J.A.: 2D boron nitride: Synthesis and applications. *Semicond. Semimet.*, 2016; 95: 101–147
- [10] Bortolussi S., Bakeine J.G., Ballarini F., Bruschi P., Gadan M. A., Protti N., Stella S., Clerici A., Ferrari C., Cansolino L., Zonta C., Zonta A., Nano R., Altieri S.: Boron uptake measurements in a rat model for Boron Neutron Capture Therapy of lung tumours. *Appl. Radiat. Isot.*, 2011; 69: 394–398
- [11] Capuani S., Gili T., Bozzali M., Russo S., Porcari P., Cametti C., Muolo M., D'Amore E., Maraviglia B., Lazzarino G., Pastore F.S.: Boronophenylalanine uptake in C6 glioma model is dramatically increased by L-DOPA preloading. *Appl. Radiat. Isot.*, 2009; 67: S34–S36
- [12] Chen X., Wu P., Rouseas M., Okawa D., Gartner Z., Zettl A., Bertozzi C.R.: Boron nitride nanotubes are noncytotoxic and can be functionalized for interaction with proteins and cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009; 131: 890–891
- [13] Ciofani G., Danti S., D'Alessandro D., Moscato S., Menciassi A.: Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: Interference with the MTT assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 394: 405–411
- [14] Ciofani G., Danti S., Genchi G.G., Mazzolai B., Mattoli V.: Boron nitride nanotubes: Biocompatibility and potential spill-over in nanomedicine. *Small*, 2013; 9: 1672–1685
- [15] Ciofani G., Raffa V., Menciassi, Cuschieri A.: Cytocompatibility, interactions, and uptake of polyethyleneimine-coated boron nitride nanotubes by living cells: Confirmation of their potential for biomedical applications. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008; 101: 850–858
- [16] Coderre J.A., Glass J.D., Fairchild R.G., Micca P.L., Fand I., Joel D.D.: Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue

p-boronophenylalanine to tumors other than melanoma. *Cancer Res.*, 1990; 50: 138–141

[17] Cui D., Tian F., Ozkan C.S., Wang M., Gao H.: Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.*, 2005; 155: 73–85

[18] Dahlström M., Capala J., Lindström P., Wasteson Å., Lindström A.: Accumulation of boron in human malignant glioma cells in vitro is cell type dependent. *J. Neuro-Oncol.*, 2004; 68: 199–205

[19] Dobrzyński L.: Spowalnianie neutronów w moderatorze. W: Podstawy Fizyki Reaktorów Jądrowych, red.: L. Dobrzyński. Świerk 2013, 60–61

[20] Duong N.M., Glushkov E., Chernev A., Navikas V., Comtet J., Nguyen M.A., Toth M., Radenovic A., Tran T.T., Aharonovich I.: Facile production of hexagonal boron nitride nanoparticles by cryogenic exfoliation. *Nano. Lett.*, 2019; 19: 5417–5422

[21] Feng B., Tomizawa K., Michiue H., Miyatake S., Han X.J., Fujimura A., Seno M., Kirihata M., Matsui H.: Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials*, 2009; 30: 1746–1755

[22] Ferreira T.H., Miranda M.C., Rocha Z., Leal A.S., Gomes D.A., Sousa E.M.: An assessment of the potential use of BNNTs for Boron Neutron Capture Therapy. *Nanomaterials*, 2017; 7: 82

[23] Gao Z., Horiguchi Y., Nakai K., Matsumura A., Suzuki M., Ono K., Nagasaki Y.: Use of boron cluster-containing redox nanoparticles with ROS scavenging ability in boron neutron capture therapy to achieve high therapeutic efficiency and low adverse effects. *Biomaterials*, 2016; 104: 201–212

[24] Gonzalez-Ortiz D., Salameh C., Bechelany M., Miele P.: Nanostructured boron nitride – based materials: Synthesis and applications. *Mater. Today Adv.*, 2020; 8: 100107

[25] Goodman J.H., Yang W., Barth R.F., Gao Z., Boesel C.P., Staubus A.E., Gupta N., Gahbauer R.A., Adams D.M., Gibson C.R., Ferketich A.K., Moeschberger M.L., Soloway A.H., Carpenter D.E., Albertson B.J. i wsp.: Boron neutron capture therapy of brain tumors: Biodistribution, pharmacokinetics, and radiation dosimetry sodium borocaptate in patients with gliomas. *Neurosurgery*, 2000; 47: 608–621

[26] Hatanaka H., Nakagawa Y.: Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1994; 28: 1061–1066

[27] Hiratsuka J., Kamitani N., Tanaka R., Tokiya R., Yoden E., Sakurai Y., Suzuki M.: Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT). *J. Radiat. Res.*, 2020; 61: 945–951

[28] Horváth L., Magrez A., Golberg D., Zhi C., Bando Y., Smajda R., Horváth E., Forró L., Schwaller B.: In vitro investigation of the cellular toxicity of boron nitride nanotubes. *ACS Nano*, 2011; 5: 3800–3810

[29] Ichikawa H., Taniguchi E., Fujimoto T., Fukumori Y.: Biodistribution of BPA and BSH after single, repeated and simultaneous administrations for neutron-capture therapy of cancer. *Appl. Radiat. Isot.*, 2009; 67: S111–S114

[30] Ishikawa Y., Shimizu Y., Sasaki T., Koshizaki N.: Boron carbide spherical particles encapsulated in graphite prepared by pulsed laser irradiation of boron in liquid medium. *Appl. Phys. Lett.*, 2007; 91: 161110

[31] Itoh T., Tamura K., Ueda H., Tanaka T., Sato K., Kuroda R., Aoki S.: Design and synthesis of boron containing monosaccharides by the hydroboration of D-glucal for use in boron neutron capture therapy (BNCT). *Bioorg. Med. Chem.*, 2018; 26: 5922–5933

[32] Iwagami T., Ishikawa Y., Koshizaki N., Yamamoto N., Tanaka H., Masunaga S., Sakurai Y., Kato I., Iwai S., Suzuki M., Yura Y.: Boron carbide particle as a boron compound for Boron Neutron Capture Therapy. *J. Nucl. Med. Radiat. Ther.*, 2014; 5: 2

[33] Kabalka G.W., Shaikh A.L., Barth R.F., Huo T., Yang W., Gordnier P.M., Chandra S.: Boronated unnatural cyclic amino acids as potential delivery agents for neutron capture therapy. *Appl. Radiat. Isot.*, 2011; 69: 1778–1781

[34] Kabalka G.W., Yao M.L., Marepally S.R., Chandra S.: Biological evaluation of boronated unnatural amino acids as new boron carriers. *Appl. Radiat. Isot.*, 2009; 67: S374–S379

[35] 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.*, 2014; 61: 254–263

[36] Kato I., Fujita Y., Maruhashi A., Kumada H., Ohmae M., Kirihata M., Imahori Y., Suzuki M., Sakurai Y., Sumi T., Iwai S., Nakazawa M., Murata I., Miyamaru H., Ono K.: Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies. *Appl. Radiat. Isot.*, 2009; 67: S37–S42

[37] Kato T., Hirose K., Tanaka H., Mitsumoto T., Motoyanagi T., Arai K., Harada T., Takeuchi A., Kato R., Yajima S., Takai Y.: Design and construction of an accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) facility with multiple treatment rooms at the Southern Tohoku BNCT Research Center. *Appl. Radiat. Isot.*, 2020; 156: 108961

[38] Kaur M., Singh P., Singh K., Gaharwar U.S., Meena R., Kumar M., Nakagawa F., Wu S., Suzuki M., Nakamura H., Kumar A.: Boron nitride (10BN) a prospective material for treatment of cancer by boron neutron capture therapy (BNCT). *Mater. Lett.*, 2020; 259: 126832

[39] Kawabata S., Yang W., Barth R.F., Wu G., Huo T., Binns P.J., Riley K.J., Ongayi O., Gottumukkala V., Vicente M.G.: Convection enhanced delivery of carboranylporphyrins for neutron capture therapy of brain tumors. *J. Neuro-Oncol.*, 2011; 103: 175–185

[40] Kimura Y., Ariyoshi Y., Shimahara M., Miyatake S., Kawabata S., Ono K., Suzuki M., Maruhashi A.: Boron neutron capture therapy for recurrent oral cancer and metastasis of cervical lymph node. *Appl. Radiat. Isot.*, 2009; 67: S47–S49

[41] Kiyonagi Y., Sakurai Y., Kumada H., Tanaka H.: Status of accelerator-based BNCT projects worldwide. *AIP Conf. Proc.*, 2019; 2160: 050012

[42] Kullberg E.B., Wei Q., Capala J., Giusti V., Malmström P.U., Gedda L.: EGF-receptor targeted liposomes with boronated acridine: Growth inhibition of cultured glioma cells after neutron irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2005; 81: 621–629

[43] Kumada H., Naito F., Hasegawa K., Kobayashi H., Kurihara T., Takada K., Onishi T., Sakurai H., Matsumura A., Sakae T.: Development of LINAC-based neutron source for Boron Neutron Capture Therapy in University of Tsukuba. *Plasma Fusion Res.*, 2018; 13: 2406006

[44] Lai C.H., Lin Y.C., Chou F.I., Liang C.F., Lin E.W., Chuang Y.J., Lin C.C.: Design of multivalent galactosyl carborane as a targeting specific agent for potential application to boron neutron capture therapy. *Chem. Commun.*, 2012; 48: 612–614

[45] Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L.: Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.*, 2004; 77: 126–134

[46] Lee C.H., Zhang D., Yap Y.K.: Functionalization, dispersion, and cutting of boron nitride nanotubes in water. *J. Phys. Chem. C*, 2012; 116: 1798–1804

- [47] Luderer M.J., de la Puente P., Azab A.K.: Advancements in tumor targeting strategies for Boron Neutron Capture Therapy. *Pharm. Res.*, 2015; 32: 2824–2836
- [48] Luderer M.J., Muz B., Alhallak K., Sun J., Wasden K., Guenther N., de la Puente P., Federico C., Azab A.K.: Thermal sensitive liposomes improve delivery of boronated agents for Boron Neutron Capture Therapy. *Pharm. Res.*, 2019; 36: 144
- [49] Masunaga S., Kasaoka S., Maruyama K., Nigg D., Sakurai Y., Nagata K., Suzuki M., Kinashi Y., Maruhashi A., Ono K.: The potential of transferrin-pendant-type polyethyleneglycol liposomes encapsulating decahydrodecaborate-10B (GB-10) as 10B-carriers for boron neutron capture therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2006; 66: 1515–1522
- [50] Mattson M.P., Haddon R.C., Rao A.M.: Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J. Mol. Neurosci.*, 2000; 14: 175–182
- [51] Mi P., Yanagie H., Dewi N., Yen H.C., Liu X., Suzuki M., Sakurai Y., Ono K., Takahashi H., Cabral H., Kataoka K., Nishiyama N.: Block copolymer boron cluster conjugate for effective boron neutron capture therapy of solid tumors. *J. Control. Release*, 2017; 254: 1–9
- [52] Michiue H., Sakurai Y., Kondo N., Kitamatsu M., Bin F., Nakajima K., Hirota Y., Kawabata S., Nishiki T., Ohmori I., Tomizawa K., Miyatake S., Ono K., Matsui H.: The acceleration of boron neutron capture therapy using multi-linked mercaptoundecahydrodecaborate (BSH) fused cell-penetrating peptide. *Biomaterials*, 2014; 35: 3396–3405
- [53] Mirzaei H.R., Sahebkar A., Salehi R., Nahand J.S., Karimi E., Jaafari M.R., Mirzaei H.: Boron neutron capture therapy: Moving toward targeted cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.*, 2016; 12: 520–525
- [54] Mishima Y., Honda C., Ichihashi M., Obara H., Hiratsuka J., Fukuda H., Karashima H., Kobayashi T., Kanda K., Yoshino K.: Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanoma-seeking 10B-compound. *Lancet*, 1989; 2: 388–389
- [55] Miyatake S.I., Kawabata S., Hiramatsu R., Kuroiwa T., Suzuki M., Ono K.: Boron Neutron Capture Therapy of malignant gliomas. *Prog. Neurol. Surg.*, 2018; 32: 48–56
- [56] Miyatake S.I., Kawabata S., Kajimoto Y., Aoki A., Yokoyama K., Yamada M., Kuroiwa T., Tsuji M., Imahori Y., Kirihata M., Sakurai Y., Masunaga S.I., Nagata K., Maruhashi A., Ono K.: Modified boron neutron capture therapy for malignant gliomas performed using epithelial neutron and two boron compounds with different accumulation mechanisms: An efficacy study based on findings on neuroimages. *J. Neurosurg.*, 2005; 103: 1000–1009
- [57] Mortensen M.W., Sørensen P.G., Björkdahl O., Jensen M.R., Gundersen H.J., Bjørnholm T.: Preparation and characterization of boron carbide nanoparticles for use as a novel agent in T cell-guided boron neutron capture therapy. *Appl. Radiat. Isot.*, 2006; 64: 315–324
- [58] Moss R.L.: Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Appl. Radiat. Isot.*, 2014; 88: 2–11
- [59] Naito F.: Introduction to accelerators for boron neutron capture therapy. *Ther. Radiol. Oncol.*, 2018; 2: 54
- [60] Nakagawa Y., Pooh K., Kobayashi T., Kageji T., Uyama S., Matsumura A., Kumada H.: Clinical review of the Japanese experience with boron neutron capture therapy and a proposed strategy using epithermal neutron beams. *J. Neuro-Oncol.*, 2003; 62: 87–99
- [61] Nakamura H., Koganei H., Miyoshi T., Sakurai Y., Ono K., Suzuki M.: Antitumor effect of boron nitride nanotubes in combination with thermal neutron irradiation on BNCT. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015; 25: 172–174
- [62] Nakamura S., Imamichi S., Masumoto K., Ito M., Wakita A., Okamoto H., Nishioka S., Iijima K., Kobayashi K., Abe Y., Igaki H., Kurita K., Nishio T., Masutani M., Itami J.: Evaluation of radioactivity in the bodies of mice induced by neutron exposure from an epi-thermal neutron source of an accelerator-based boron neutron capture therapy system. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 2017; 93: 821–831
- [63] Nedunchezian K., Aswath N., Thiruppathy M., Thirugnanamurthy S.: Boron Neutron Capture Therapy – A literature review. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2016; 10: ZE01–ZE04
- [64] Nemoto H., Cai J., Asao N., Iwamoto S., Yamamoto Y.: Synthesis and biological properties of water-soluble p-boronophenylalanine derivatives. Relationship between water solubility, cytotoxicity, and cellular uptake. *J. Med. Chem.*, 1995; 38: 1673–1678
- [65] Petersen M.S., Petersen C.C., Agger R., Suttmüller M., Jensen M.R., Sørensen P.G., Mortensen M.W., Hansen T., Bjørnholm T., Gundersen H.J., Huiskamp R., Hokland M.: Boron nanoparticles inhibit tumour growth by boron neutron capture therapy in the murine B16-OVA model. *Anticancer Res.*, 2008; 28: 571–576
- [66] Radomski J., Rečko W.M., Ketling-Szemley M.: Własności azotku boru i metody jego otrzymywania. Wydawnictwa Przemysłu Maszynowego “WEMA”. Warszawa 1980
- [67] Ryashentsev D.S., Belenkov E.A.: New BN polymorphs with two-dimensional structure. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 2019; 537: 022060
- [68] Seki R., Wakisaka Y., Morimoto N., Takashina M., Koizumi M., Toki H., Fukuda M.: Physics of epi-thermal boron neutron capture therapy (epi-thermal BNCT). *Radiol. Phys. Technol.*, 2017; 10: 387–408
- [69] Şen Ö., Emanet M., Çulha M.: One-step synthesis of hexagonal boron nitrides, their crystallinity and biodegradation. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2018; 6: 83
- [70] Shvedova A.A., Castranova V., Kisin E.R., Schwegler-Berry D., Murray A.R., Gandelsman V.Z., Maynard A., Baron P.: Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 2003; 66: 1909–1926
- [71] Singh B., Kaur G., Singh P., Singh K. Kumar B., Vij A., Kumar M., Bala R., Meena R., Singh A., Thakur A., Kumar A.: Nanostructured boron nitride with high water dispersibility for Boron Neutron Capture Therapy. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 35535
- [72] Slatkin D.N.: A history of boron neutron capture therapy of brain tumours. Postulation of a brain radiation dose tolerance limit. *Brain*, 1991; 114: 1609–1629
- [73] Suzuki M.: Boron neutron capture therapy (BNCT): A unique role in radiotherapy with a view to entering the accelerator-based BNCT era. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2020; 25: 43–50
- [74] Suzuki M., Masunaga S.I., Kinashi Y., Takagaki M., Sakurai Y., Kobayashi T., Ono K.: The effects of boron neutron capture therapy on liver tumors and normal hepatocytes in mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2000; 91: 1058–1064
- [75] Tajés M., Ramos-Fernández E., Weng-Jiang X., Bosch-Morató M., Guivernau B., Eraso-Pichot A., Salvador B., Fernández-Busquets X., Roquer J., Muñoz F.J.: The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol. Membr. Biol.*, 2014; 31: 152–167
- [76] Tsuji T., Yoshitomi H., Ishikawa Y., Koshizaki N., Suzuki M., Usukura J.: A method to selectively internalize submicrometer boron carbide particles into cancer cells using surface transferrin conjugation for developing a new boron neutron capture therapy agent. *J. Exp. Nanosci.*, 2020; 15: 1–11
- [77] Türkez H., Arslan M.E., Sönmez E., Geyikoğlu F., Açıkyıldız M., Tatar A.: Microarray assisted toxicological investigations of boron carbide nanoparticles on human primary alveolar epithelial cells. *Chem. Biol. Interact.*, 2019; 300: 131–137

- [78] Vos M.J., Turowski B., Zanella F.E., Paquis P., Siefert A., Hideghéty K., Haselsberger K., Grochulla F., Postma T.J., Wittig A., Heimans J.J., Slotman B.J., Vandertop W.P., Sauerwein W.: Radiologic findings in patients treated with boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme within EORTC trial 11961. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2005; 61: 392–399
- [79] Warheit D.B., Laurence B.R., Reed K.L., Roach D.H., Reynolds G.A., Webb T.R.: Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.*, 2004; 77: 117–125
- [80] Weng Q., Wang B., Wang X., Hanagata N., Li X., Liu D., Wang X., Jiang X., Bando Y., Golberg D.: Highly water-soluble, porous, and biocompatible boron nitrides for anticancer drug delivery. *ACS Nano*, 2014; 8: 6123–6130
- [81] Wittig A., Sauerwein W.A., Coderre J.A.: Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat. Res.*, 2000; 153: 173–180
- [82] Wittig A., Stecher-Rasmussen F., Hilger R.A., Rassow J., Mauri P., Sauerwein W.: Sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH), a boron carrier that merits more attention. *Appl. Radiat. Isot.*, 2011; 69: 1760–1764
- [83] Wu G., Yang W., Barth R.F., Kawabata S., Swindall M., Bandyopadhyaya A.K., Tjarks W., Khorsandi B., Blue T.E., Ferketich A.K., Yang M., Christofores G.A., Sferra T.J., Binns P.J., Riley K.J. i wsp.: Molecular targeting and treatment of an epidermal growth factor receptor-positive glioma using boronated cetuximab. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 1260–1268
- [84] Yanagië H., Tomita T., Kobayashi H., Fujii Y., Takahashi T., Hasumi K., Nariuchi H., Sekiguchi M.: Application of boronated anti-CEA immunoliposome to tumour cell growth inhibition in in vitro boron neutron capture therapy model. *Br. J. Cancer*, 1991; 63: 522–526
- [85] Yang W., Barth R.F., Wu G., Tjarks W., Binns P., Riley K.: Boron neutron capture therapy of EGFR or EGFRvIII positive gliomas using either boronated monoclonal antibodies or epidermal growth factor as molecular targeting agents. *Appl. Radiat. Isot.*, 2009; 67: S328–S331
- [86] Yang W., Wu G., Barth R.F., Swindall M.R., Bandyopadhyaya A.K., Tjarks W., Tordoff K., Moeschberger M., Sferra T.J., Binns P.J., Riley K.J., Ciesielski M.J., Fenstermaker R.A., Wikstrand C.J.: Molecular targeting and treatment of composite EGFR and EGFRvIII-positive gliomas using boronated monoclonal antibodies. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 883–891
- [87] Yinghuai Z., Peng A.T., Carpenter K., Maguire J.A., Hosmane N.S., Takagaki M.: Substituted carborane-appended water-soluble single-wall carbon nanotubes: New approach to Boron Neutron Capture Therapy drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005; 127: 9875–9880
- [88] Yokoyama K., Miyatake S., Kajimoto Y., Kawabata S., Doi A., Yoshida T., Asano T., Kiriata M., Ono K., Kuroiwa T.: Pharmacokinetic study of BSH and BPA in simultaneous use for BNCT. *J. Neuro-Oncol.*, 2006; 78: 227–232
- [89] Zhuo J.C., Cai J., Soloway A.H., Barth R.F., Adams D.M., Ji W., Tjarks W.: Synthesis and biological evaluation of boron-containing polyamines as potential agents for neutron capture therapy of brain tumors. *J. Med. Chem.*, 1999; 42: 1282–1292

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.