

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej

Emilia Teresa Majka

Pegylowane nanocząstki złota
pokryte radionuklidami $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ -
nowe podejście do terapii
elektronami Auger potrójnie
ujemnego nowotworu piersi
i glejaka wielopostaciowego

Rozprawa doktorska złożona

w

Szkole Doktorskiej

Narodowego Centrum Badań Jądrowych oraz Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej

Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej



NATIONAL
CENTRE
FOR NUCLEAR
RESEARCH
ŚWIERK

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. inż. Agnieszki Majkowskiej-Pilip, prof. IChTJ

Warszawa, czerwiec 2025

STRESZCZENIE

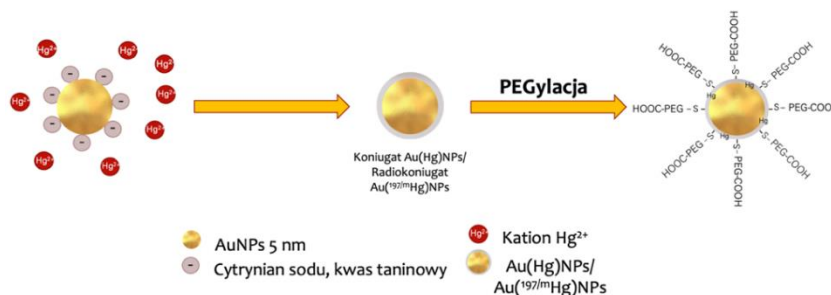
Nowotwory pozbawione specyficznej ekspresji receptora stanowią poważne wyzwanie dla projektowania nowych radiofarmaceutyków. Tego rodzaju raki charakteryzują się niską przeżywalnością i wysoką przerzutowością. Przerzutowy potrójnie ujemny rak piersi opiera się leczeniu konwencjonalnemu oraz ma wskaźnik śmiertelności na poziomie 88%,¹ podobnie jak glejak wielopostaciowy, którego wskaźnik śmiertelności wynosi 93%.² W przypadku obu tych nowotworów istnieje jednak możliwość zastosowania brachyterapii. Z tego względu, w niniejszej rozprawie zdecydowano się na przeprowadzenie badań na liniach komórkowych wywodzących się z tych nowotworów, a dzięki zastosowaniu nanocząstek złota (AuNPs) jako nośników radionuklidów, koncepcję tę poszerzono o możliwość zastosowania badanych związków do nanobrachyterapii.

Nanobrachyterapia jest metodą, która umożliwia bezpośrednie podanie leku do guza, bez konieczności ukierunkowania na specyficzne receptory. Wykorzystując radionuklidy emitujące elektrony Augera, które charakteryzują się wysokim wskaźnikiem liniowego transferu energii, umożliwiającym indukcję dwuniciowych pęknięć DNA, można skutecznie zwiększyć efektywność nanobrachyterapii, na przykład poprzez połączenie $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ z nanocząstkami złota.

W niniejszej pracy do pokrycia nanocząstek złota zastosowane zostały radionuklidy rtęci $^{197\text{m}}\text{Hg}$ ($T_{1/2}=23,8$ h, $E_{\gamma}=134$ keV, 34%) i ^{197}Hg ($T_{1/2}=64,14$ h, $E_{\gamma}=77$ keV, 19% i 279 keV, 6%). Radionuklidy te są emiterami elektronów Auger (AE) i konwersji (CE). Podczas rozpadu $^{197\text{m}}\text{Hg}$ emitowane jest 19,4 AE o średniej energii 0,7 keV/AE i 1,6 CE o średniej energii 127,0 keV/CE. Podczas rozpadu ^{197}Hg emitowane jest 23,2 AE o średniej energii 0,7 keV/AE i 0,8 IC o średniej energii 67,0 keV/CE.³

Opisany w rozdziale pierwszym cel pracy obejmuje syntezę, charakteryzację oraz badania biologiczne koniugatu Au(Hg)NPs-PEG, a także jego radioaktywnego odpowiednika - radiokoniugatu Au($^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$)NPs-PEG. W pracy przedstawiona została również synteza oraz analiza synergicznego działania terapeutycznego radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, który posiada w swojej strukturze zarówno izotop beta promieniotwórczy (^{198}Au) jak i emitery elektronów Auger ($^{197\text{m}}\text{Hg}$ i ^{197}Hg).

Wszystkie koniugaty zsyntezowano zgodnie ze schematem przedstawionym na poniższym rysunku (Rys. 1), a następnie oceniono ich potencjał terapeutyczny *in vitro* na liniach komórek nowotworowych potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231) i glejaka wielopostaciowego (T98G).



Rys. 1. Schematyczna prezentacja syntezy PEGylowanych koniugatów nanocząstek złota z rtęcią.

Otrzymane koniugaty poddano badaniom w zakresie ich internalizacji do wnętrza komórek oraz do jądra komórkowego z wykorzystaniem metody frakcjonowania. Przeprowadzono również ocenę ich cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych oraz test cytotoksyczności MTS. Ponadto, za pomocą cytometrii przepływowej dokonano analizy indukcji apoptozy oraz wpływu koniugatów na cykl komórkowy badanych komórek.

Dla radiokoniugatu Au($^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$)NPs-PEG przeprowadzono badanie indukcji dwuniciowych pęknięć DNA metodą detekcji fosforylacji γ -H2AX, wykazując istotny, zależny od zastosowanego stężenia promieniotwórczego, poziom uszkodzeń DNA.

Ponadto, dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG przeprowadzono ocenę jego działania na myszach z guzami indukowanymi z komórek 4T1.

Wykonano następujące badania *ex vivo*:

- analizę biodystrybucji po doustrowym podaniu radiokoniugatu oraz jego bezpośrednim wstrzyknięciu do guza,
- ocenę efektywności terapeutycznej radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o aktywności promieniotwórczej 10 MBq (podanie do guza) oraz
- ocenę efektywności terapeutycznej radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o aktywności promieniotwórczej 25 MBq (podanie do guza).

Rozdział drugi stanowi część literaturową pracy. Zawarto w nim przegląd literatury dotyczący potrójnie ujemnego raka piersi oraz glejaka wielopostaciowego, a także opis standardowych metod leczenia nowotworów. Opisano także zagadnienie terapii radionuklidowej ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania emiterów elektronów Augera. Przedstawiono również zalety i ograniczenia stosowania rtęci oraz radionuklidów rtęci w medycynie. Na zakończenie omówiono zastosowanie nanocząstek złota w terapii radionuklidowej oraz w nanobrachyterapii.

W rozdziale trzecim opisano metodologię oraz metodykę badań. Zawarto spis odczynników i aparatury wykorzystywanej we wszystkich eksperymentach, a także szczegółowe opisy procedur badawczych oraz zastosowanych metod analitycznych.

W rozdziale czwartym przedstawiono metodę syntezy oraz analizę właściwości fizykochemicznych nieradioaktywnego koniugatu $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$, a także wszystkie uzyskane wyniki eksperymentalne. Opisano również wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych dla koniugatu niezawierającego izotopów promieniotwórczych, tj. $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$.

Na podstawie zebranych danych dotyczących właściwości fizykochemicznych koniugatu, takich jak jego rozmiar, potencjał zeta, widma UV-Vis, FTIR oraz analiza TGA — potwierdzono prawidłowość zastosowanej metodyki syntezy. Dzięki wstępnym badaniom biologicznym określono także stężenie rtęci, które nie wywołuje efektu cytotoksycznego w komórkach docelowych. Dodatkowo, przeanalizowano mechanizm śmierci komórkowej indukowany przez koniugat przy wyższych stężeniach.

W rozdziale piątym opisano wyniki obliczeń teoretycznych oraz eksperymentów dotyczących produkcji radionuklidów rtęci. W celu otrzymania izotopów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ przeanalizowano trzy metody produkcji:

- produkcję cyklotronową na drodze reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(\text{p}, \text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$,
- produkcję cyklotronową na drodze reakcji $^{197}\text{Au}(\text{d}, 2\text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ oraz
- produkcję reaktorową na drodze reakcji $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

W rozdziale tym omówiono szczegółowo wszystkie powyższe metody, w tym procesy rozpuszczania tarcz oraz otrzymywania prekursora $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ do dalszych badań. Ze względu na wysoki przekrój czynny oraz łatwość pracy z tarczą, spośród analizowanych metod, wybrano jedną metodę produkcji - $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, będącą punktem wyjściowym do dalszych eksperymentów z zastosowaniem radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG.

W rozdziale szóstym przedstawiono wyniki badań dotyczących właściwości oraz potencjału przeciwnowotworowego radiokoniugatu nanocząstek złota zawierającego radionuklidy rtęci - $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG-COOH. Zamieszczono wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* oraz badań biodystrybucji i efektywności terapeutycznej *ex vivo*.

Rozdział siódmy dotyczy możliwości zastosowania łączonej nanobrachyterapii (promieniowanie β oraz elektrony Auger) z użyciem radioaktywnych nanocząstek złota pokrytych emiterami elektronów Augera ($^{197\text{m}/197}\text{Hg}$). W rozdziale tym przedstawiono wyniki badań stabilności radiokoniugatu

$^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ oraz jego działania *in vitro* na komórki nowotworowe linii MDA-MB-231 oraz T98G.

Podsumowując, w ramach niniejszej pracy opisano działanie oraz przeprowadzono analizę potencjału przeciwnowotworowego *in vitro* na liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G dla trzech koniugatów nanocząstek złota z rtęcią:

- nieradioaktywnego koniugatu $\text{Au(Hg)NPs-PEG-COOH}$,
- radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ zawierającego radionuklidy rtęci $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$,
- radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ zawierającego radionuklidy ^{198}Au oraz $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

ABSTRACT

Cancers that lack specific receptor overexpression present a significant challenge for the development of new radiopharmaceuticals. These cancers are characterized by low survival rates and high metastatic potential. Metastatic triple-negative breast cancer has a mortality rate of 88%¹, while glioblastoma multiforme has a mortality rate of 93.1%.² However, brachytherapy can be utilized for both of these tumors. Consequently, this dissertation focuses on studies using cell lines derived from these tumors. By employing gold nanoparticles (AuNPs) as radionuclide carriers, the concept is expanded to nanobrachytherapy. Nanobrachytherapy is a technique that enables intratumoral drug administration without the necessity of targeting specific receptors. Utilizing radionuclides that emit Auger electrons, which are characterized by a high linear energy transfer and the ability to induce DNA double-strand breaks, we can effectively enhance the effectiveness of nanobrachytherapy by combining $^{197\text{m}}\text{Hg}/^{197}\text{Hg}$ with gold nanoparticles.

In this work, mercury radionuclides $^{197\text{m}}\text{Hg}$ ($T_{1/2}=23.8$ h, $E_{\gamma}=134$ keV, 34%) and ^{197}Hg ($T_{1/2}=64.14$ h, $E_{\gamma}=77$ keV, 19% and 279 keV, 6%) were employed to coat gold nanoparticles. These radionuclides are efficient emitters of Auger electrons (AE) and conversion electrons (CE). During the decay of $^{197\text{m}}\text{Hg}$, 19.4 AE with an average energy of 0.7 keV/AE and 1.6 CE with an average energy of 127.0 keV/CE are emitted. During the decay of ^{197}Hg , 23.2 AE with an average energy of 0.7 keV/AE and 0.8 IC with an average energy of 67.0 keV/CE are emitted.³

The aim of the work described in the thesis's first chapter includes the synthesis, characterization, and biological studies of the Au(Hg)NPs-PEG conjugate, as well as its radioactive counterpart, the Au($^{197\text{m}}\text{Hg}/^{197}\text{Hg}$)NPs-PEG radioconjugate. This work also presents the synthesis and analysis of the synergistic therapeutic effect of the $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}\text{Hg}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ radioconjugate, which incorporates both a beta radioactive isotope (^{198}Au) and Auger electron emitters ($^{197\text{m}}\text{Hg}$ and ^{197}Hg) in its structure.

All conjugates were synthesized according to the scheme shown in the figure below (Fig. 1), and their *in vitro* therapeutic potential was then assessed on triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) and glioblastoma multiforme (T98G) cell lines.

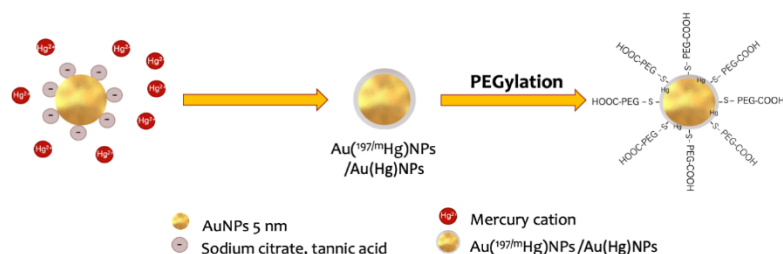


Fig. 1. Schematic representation of the synthesis of PEGylated gold nanoparticles' conjugates with mercury.

The obtained conjugates were evaluated for internalization into cells and the cell nucleus, and subjected to cytotoxicity studies on three-dimensional structures, as well as MTS cytotoxicity tests. Additionally, the analysis of apoptosis induction and the impact of conjugates on the cell cycle was studied using flow cytometry.

For the Au($^{197\text{m}}\text{Hg}/^{197}\text{Hg}$)NPs-PEG radioconjugate, a study of the induction of DNA double-strand breaks using the γ -H2AX phosphorylation detection method revealed a significant level of double-stranded DNA breaks that depended on the concentration of radioactive radioconjugate used.

Additionally, the effect of Au($^{197\text{m}}\text{Hg}/^{197}\text{Hg}$)NPs-PEG radioconjugates was evaluated on mice with tumors induced from 4T1 cells.

The following *ex vivo* studies were conducted:

- biodistribution study after intravenous and intratumoral administration of the radioconjugate,

- therapeutic efficacy study of 10 MBq Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG (intratumoral administration),
- therapeutic efficacy study of 25 MBq Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG (intratumoral administration).

Chapter two encompasses the literature section of the work. It includes a review of existing research on triple-negative breast cancer and glioblastoma multiforme, along with a description of standard cancer treatment. In addition, the issue of radionuclide therapy is described with particular emphasis on the use of Auger electron emitters. The advantages and limitations of using mercury and mercury radionuclides in medicine are also presented. Finally, the use of gold nanoparticles in radionuclide therapy and nanobrachytherapy is discussed.

Chapter three describes the methodology and research approach. It includes a list of reagents and equipment used in all experiments, along with detailed descriptions of the procedures and analytical methods employed.

Chapter four details the approach for synthesizing and analyzing the physicochemical properties of the non-radioactive Au(Hg)NPs-PEG-COOH conjugate, alongside all experimental results obtained. It also includes the results from *in vitro* studies performed on the conjugate, which does not contain radioactive isotopes, specifically Au(Hg)NPs-PEG-COOH.

Based on the collected data regarding the physicochemical properties of the conjugate, including its size, zeta potential, UV-Vis spectra, FTIR, and TGA analysis, the validity of the synthesis methodology was confirmed. Preliminary biological studies also established the mercury concentration that does not induce cytotoxic effects in target cells. Furthermore, the mechanism of cell death induced by the conjugate at higher concentrations was examined.

The fifth chapter presents the results of theoretical calculations and experimental findings related to the production of mercury radionuclides. To obtain the mercury radionuclides ^{197m/197}Hg, three methods were analyzed:

- cyclotron production through the nuclear reaction ¹⁹⁷Au(p, n)^{197m/197}Hg,
- cyclotron production through the nuclear reaction ¹⁹⁷Au(d, 2n)^{197m/197}Hg, and
- reactor production through the nuclear reaction ¹⁹⁶Hg(n, γ)^{197m/197}Hg.

This chapter discusses all the above methods, along with the processes of dissolving the targets and obtaining the ^{197m/197}Hg precursor for further studies. Due to the high reaction cross-section and the convenience of handling the target for routine synthesis, the ¹⁹⁶Hg(n, γ)^{197m/197}Hg production method was chosen as the starting point for further experiments using the Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG radioconjugate.

Chapter six presents the results obtained from the study on the properties and anticancer potential of the Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate, which combines gold nanoparticles with mercury radionuclides. It includes findings from *in vitro* studies as well as *ex vivo* biodistribution and therapeutic efficacy evaluation.

Chapter seven addresses the potential of using combined nanobrachytherapy (β-radiation and Auger electrons) using radioactive gold nanoparticles covered with Auger electron emitters (^{197m/197}Hg). This chapter presents the results of stability studies of the ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate and its *in vitro* effects on MDA-MB-231 and T98G cancer cell lines.

In summary, this work describes and analyzes the characteristics and *in vitro* anticancer potential of three gold nanoparticle conjugates with mercury on MDA-MB-231 and T98G cell lines:

- non-radioactive Au(Hg)NPs-PEG-COOH conjugate,
- Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate containing mercury radionuclides ^{197m/197}Hg, and
- ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH radioconjugate containing gold ¹⁹⁸Au and mercury ^{197m/197}Hg radionuclides.

Słowa kluczowe

nanocząstki złota, radionuklidy rtęci, elektrony Auger, potrójnie ujemny rak piersi, glejak wielopostaciowy

Słowa kluczowe w języku angielskim

gold nanoparticles, mercury radionuclides, Auger electrons, triple-negative breast cancer, glioblastoma multiforme

Dziedzina pracy

nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina

nauki chemiczne

Tytuł pracy w języku angielskim

Pegylated gold nanoparticles coated with $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ radionuclides - a new approach to Auger electron therapy of triple-negative breast cancer and glioblastoma multiforme

Badania prowadzone w ramach tej pracy doktorskiej były finansowane z grantu PRELUDIUM 20 2021/41/N/ST5/00322 uzyskanego od Narodowego Centrum Nauki



Część badań opisanych w tej pracy została wykonana dzięki Fulbright Junior Research Award, które realizowałam na Duke University, Durham, NC, USA



Pamięci mojej Babci – Marii Pieczyńskiej.

Dla tych, którzy byli przy mnie wtedy, gdy najbardziej tego potrzebowałam.

Z całego serca dziękuję mojej Promotorce, dr hab. inż. Agnieszce Majkowskiej-Pilip, prof. IChTJ za nieocenione i wieloletnie wsparcie oraz za życzliwość i zaufanie, jakim mnie obdarzyła. Jej zaangażowanie i ludzka wrażliwość miały dla mnie szczególne znaczenie nie tylko na ścieżce naukowej, ale także w momentach osobistych trudności. Dziękuję za zrozumienie, dzięki któremu łatwiej było mi odnaleźć się w nowych, zawodowych wyzwaniach. Nie mogłam sobie wymarzyć lepszego przewodnika po tym etapie mojej drogi.

Pragnę serdecznie podziękować prof. dr hab. Aleksandrowi Bilewiczowi za cenne wskazówki naukowe, inspirujące rozmowy oraz wsparcie na różnych etapach moich studiów doktoranckich. Wyrażam szczególną wdzięczność również za okazane zaufanie i motywujące słowa w kluczowych momentach tego procesu. Jego wiedza, przenikliwość i umiejętność stawiania trafnych pytań stanowiły dla mnie cenne źródło motywacji.

Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi pomocniczemu, dr inż. Rafałowi Walczakowi, za pomoc merytoryczną oraz organizacyjną związaną z przygotowaniem tej pracy dyplomowej. Dziękuję za cierpliwość, dyspozycyjność i zaangażowanie, które bardzo doceniam.

Bardzo dziękuję dr Monice Łyczko za wsparcie okazane przez całe studia, za cierpliwość do moich chemicznych pytań i za wszystkie trafne uwagi przy sprawdzaniu prac. Dziękuję za każdą odbytą rozmowę. Twoja obecność wiele dla mnie znaczyła.

Serdecznie dziękuję dr Krzysztofowi Łyczko za wykonanie analiz FTIR i TGA oraz za wszystkie cenne uwagi dotyczące tej części pracy. Dziękuję również za okazaną życzliwość i poświęcony czas.

Najszczerze podziękowania składam także dr n. med. Bartoszowi Itrychowi, którego wsparcie wykraczało daleko poza ramy merytorycznej konsultacji. Dziękuję za obecność, empatię i mądrość, które pomogły mi odnaleźć siebie.

Bardzo dziękuję mgr Agacie Malinowskiej za wspólne godziny spędzone w laboratorium, za Twoją pomoc przy badaniach komórkowych, bez względu na porę dnia. Dziękuję, że zawsze mogłam na Ciebie liczyć. Dzięki Tobie moje ostatnie lata studiów doktoranckich stały się lepsze.

Serdecznie dziękuję mojemu Mężowi, za cierpliwość, zrozumienie i spokój, które towarzyszyły mi przez cały czas pracy nad rozprawą – również wtedy, gdy przez długie miesiące byłam daleko od domu. Jego cierpliwość i niezmiennie wsparcie pozwoliły mi przejść przez ten czas z większym spokojem.

Spis treści

STRESZCZENIE	3
ABSTRACT	6
ROZDZIAŁ I	17
1. CEL PRACY.....	17
CZĘŚĆ TEORETYCZNA	18
ROZDZIAŁ II	18
2.1. Nowotwory złośliwe.....	18
2.1.1. Potrójnie ujemny receptorowo rak piersi	20
2.1.2. Glejak wielopostaciowy	24
2.2. Terapia przeciwnowotworowa	27
2.2.1. Chemioterapia	27
2.2.2. Radioterapia	29
2.2.3. Brachyterapia	30
2.2.5. Terapia celowana.....	31
2.3. Terapia radionuklidowa	32
2.3.1. Terapia radionuklidowa z zastosowaniem emiterów promieniowania β	33
2.3.2. Terapia radionuklidowa z zastosowaniem emiterów promieniowania α	35
2.3.3. Terapia z zastosowaniem emiterów elektronów Auger.....	38
2.4. Rtęć.....	41
2.4.1. Rtęć w medycynie	42
2.4.2. Radionuklidy rtęci	42
2.5. Nanocząstki złota w terapii radionuklidowej.....	47
2.5.1. Nanocząstki złota w celowanej terapii radionuklidowej	49
2.5.2. Nanocząstki złota w nanobrachyterapii	51
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	54
METODOLOGIA	54
ROZDZIAŁ III	54
3.1. Stosowane odczynniki do badań chemicznych.....	54
3.2. Stosowane odczynniki do badań komórkowych	54
3.3. Stosowana aparatura	55
3.4. Stosowane metody analityczne	56
3.4.1. Mikroskopia elektronowa (TEM) oraz wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HR-TEM).....	56
3.4.2. Pomiar metodą dynamicznego rozpraszania światła laserowego (DLS) oraz potencjału zeta.....	57
3.4.3. Spektrofotometria UV-Vis	59
3.4.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)	61
3.4.5. Analiza termogravimetryczna (TGA)	62
3.4.6. Półprzewodnikowy detektor z wysokiej czystości germanem (HPGe)	64
3.4.7. Test MTS.....	65
3.4.8. Mikroskopia konfokalna do obrazowania dwuniciowych pęknięć DNA	66
3.4.9. Cytometria przepływowa.....	67
3.4.10. Analiza statystyczna	69
3.5. Metodyka przeprowadzonych badań	69
3.5.1. Otrzymywanie radionuklidów rtęci $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$	69
3.5.2. Otrzymywanie radionuklidu złota ^{198}Au	71
3.5.3. Synteza nanocząstek złota oraz radioaktywnych nanocząstek złota.....	71
3.5.4. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota rtęcią.....	73
3.5.5. Stabilizacja nanocząstek glikolem polietylenowym (PEG).....	73
3.5.6. Badanie stabilności radiokoniugatów	74
3.5.7. Badania komórkowe <i>in vitro</i>	75
WYNIKI ORAZ ANALIZA BADAŃ	85
ROZDZIAŁ IV	85
4. KONIUGAT $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$	85
4.1. Synteza nanocząstek złota 5 nm.....	85
4.2. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota rtęcią	85
4.3. Stabilizacja koniugatu glikolem polietylenowym.....	86
4.4. Właściwości fizykochemiczne otrzymanych nanocząstek.....	86

4.4.1. Wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HR-TEM).....	87
4.4.2. Pomiar metodą dynamicznego rozpraszania światła laserowego (DLS) oraz potencjału zeta	89
4.4.3. Spektrofotometria UV-Vis	91
4.4.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)	92
4.4.5. Analiza termogravimetryczna (TGA)	93
4.5. <i>Badania komórkowe in vitro</i>	95
4.5.1. Badanie cytotoksyczności testem MTS	95
4.5.2. Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych.....	98
4.5.3. Badanie metodą cytometrii przepływowej.....	101
ROZDZIAŁ V	109
5. PRODUKCJA RADIONUKLIDÓW RTĘCI	109
5.1. <i>Produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(p, n)^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$</i>	109
5.2. <i>Produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$</i>	117
5.3. <i>Produkcja reaktorowa w wyniku reakcji jądrowej $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$</i>	121
ROZDZIAŁ VI	126
6. RADIOKONIUGAT $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$	126
6.1. <i>Synteza radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$</i>	127
6.2. <i>Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota radionuklidami rtęci $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$</i>	127
6.3. <i>Stabilizacja radiokoniugatu glikolem polietylenowym</i>	129
6.4. <i>Analiza stabilności radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$</i>	130
6.5. <i>Badania komórkowe in vitro</i>	131
6.5.1. <i>Badanie internalizacji do wnętrza komórki</i>	131
6.5.2. <i>Badanie internalizacji do jądra komórkowego metodą frakcjonowania (izolacji jądra komórkowego)</i>	133
6.5.3. <i>Badanie cytotoksyczności testem MTS</i>	134
6.5.4. <i>Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych</i>	139
6.5.5. <i>Badanie dwuniciowych pęknięć DNA</i>	143
6.5.6. <i>Badanie metodą cytometrii przepływowej</i>	146
6.6. <i>Badania ex vivo na myszach</i>	157
6.6.1. <i>Badanie biodystrybucji</i>	158
6.6.2. <i>Badanie efektywności terapeutycznej</i>	160
ROZDZIAŁ VII	163
7. RADIOKONIUGAT $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$	163
7.1. <i>Synteza radioaktywnych nanocząstek złota $^{198}\text{AuNPs}$</i>	163
7.2. <i>Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota $^{198}\text{AuNPs}$ radionuklidami rtęci $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$</i>	164
7.3. <i>Stabilizacja radiokoniugatu glikolem polietylenowym</i>	164
7.4. <i>Analiza stabilności radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$</i>	164
7.5. <i>Badania komórkowe in vitro</i>	165
7.5.1. <i>Badanie internalizacji do wnętrza komórki</i>	166
7.5.2. <i>Badanie internalizacji do jądra komórkowego metodą frakcjonowania (izolacji jądra komórkowego)</i>	168
7.5.3. <i>Badanie cytotoksyczności testem MTS</i>	170
7.5.4. <i>Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych</i>	174
7.5.5. <i>Badanie metodą cytometrii przepływowej</i>	179
ROZDZIAŁ VIII	192
8. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	192
BIBLIOGRAFIA	197
WYKAZ SKRÓTÓW	220
SPIS TABEL	222
SPIS FOTOGRAFII	223
SPIS RYSUNKÓW	223

ROZDZIAŁ I

1. CEL PRACY

Nowotwory nie wykazujące nadekspresji charakterystycznych receptorów molekularnych, takie jak potrójnie ujemny rak piersi oraz glejak wielopostaciowy stanowią jedno z większych wyzwań współczesnej onkologii. Agresywny przebieg choroby, wysoka przerzutowość oraz niska przeżywalność pacjentów ograniczają skuteczność standardowych metod leczenia, a brak odpowiednich receptorów uniemożliwia terapię celowaną. W związku z tym, istnieje pilna potrzeba opracowania nowych, skutecznych strategii terapeutycznych, które byłyby niezależne od molekularnych celów wewnątrzkomórkowych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena potencjału terapeutycznego innowacyjnej metody leczenia opornych nowotworów przy zastosowaniu nanobrachyterapii z wykorzystaniem nanocząstek złota jako nośników emiterów elektronów Augera — radionuklidów ^{197m}Hg i ^{197}Hg .

W ramach pracy przeprowadzono syntezę oraz charakteryzację fizykochemiczną koniugatów nanocząstek złota pokrytych rtęcią, ich radioaktywnych odpowiedników zawierających ^{197m}Hg i ^{197}Hg , a także radiokoniugatów zawierających dodatkowo β^- -promieniotwórczy izotop ^{198}Au . Oceniono również działanie przeciwnowotworowe tych preparatów na liniach komórkowych potrójnie ujemnego raka piersi (MDA-MB-231) oraz glejaka wielopostaciowego (T98G).

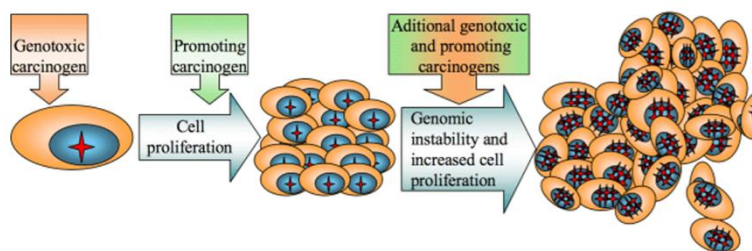
CZEŚĆ TEORETYCZNA

ROZDZIAŁ II

Rozdział II opisuje ramy teoretyczne dotyczące tematyki tej pracy doktorskiej oraz zawiera przegląd literaturowy.

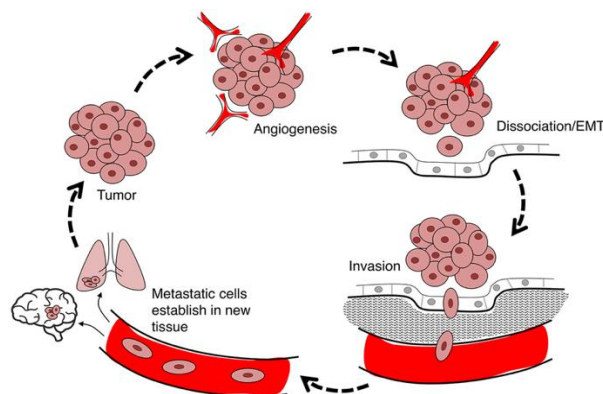
2.1. Nowotwory złośliwe

Nowotwory złośliwe powstają, gdy komórki nowotworowe namnażają się, tworząc guz mogący zastąpić zdrową tkankę.⁴ Karcynogeneza charakteryzuje się sześcioma kluczowymi cechami, które umożliwiają jej progresję w dowolnej komórce, tkance lub narządzie. Cechy te obejmują unikanie apoptozy, nieograniczoną zdolność do podziału komórek, zwiększoną angiogenezę, oporność na sygnały antywzrostowe, indukcję własnych sygnałów wzrostu oraz zdolność do przerzutowania. Opisane mechanizmy wspierają rozwój nowotworów, których występowanie jest uwarunkowane zarówno czynnikami genetycznymi, jak i środowiskowymi.⁵ Mechanizm chemicznej karcynogenezy obejmuje trzy etapy: inicjację, promocję oraz progresję. Na pierwszym etapie pojawia się pojedyncza mutacja DNA. Czynniki rakotwórcze wpływają na powstanie komórki o zmutowanym genotypie. Etap promocji natomiast polega na aktywacji onkogenów i zwiększeniu produkcji czynników wpływających na wzrost i namnażanie komórek. Ostatnim etapem jest faza progresji, prowadząca do powstania nowotworu, zwiększając szybkość proliferacji komórek i przekształcając zmianę przednowotworową w raka.⁶



Rys. 2. Mechanizm karcynogenezy chemicznej przedstawiający jej trzy etapy: inicjację, promocję i progresję.⁶

W odróżnieniu od guzów łagodnych, guzy złośliwe mogą naciekać sąsiadujące komórki, odrywać się od pierwotnego miejsca i poruszać się po organizmie, prowadząc do przerzutów (Rys. 3)



Rys. 3. Schemat przedstawiający etapy tworzenia się przerzutów nowotworowych.⁷

Nowotwory złośliwe mogą rozprzestrzeniać komórki nowotworowe po całym ciele za pośrednictwem krwi lub układu limfatycznego. Wczesne rozpoznanie i szybkie rozpoczęcie leczenia znacząco zwiększają szanse na skuteczną terapię.⁴ Nowotwory złośliwe można podzielić ze względu na pochodzenie tkanki z jakiej powstała zmiana na następujące grupy:^{8,9}

- Rak (*carcinoma*) – nowotwór wywodzący się z tkanki nabłonkowej m.in. wyściełającej lub pokrywającej narządy wewnętrzne, a także z gruczołów.
- Mięsak (*sarcoma*) – nowotwór pochodzący z tkanek takich jak kości, chrząstki, tłuszcz, mięśnie i naczynia krwionośne.
- Białaczka (*leukemia*) – nowotwór wywodzący się z układu krwiotwórczego, takiego jak szpik kostny.
- Chłoniak (*lymphoma*) – nowotwór powstający w limfocytach - komórkach układu odpornościowego.
- Czerniak (*melanoma*) – nowotwór rozwijający się z melanocytów, występuje na skórze, błonach śluzowych lub w znamionach, pojawiając się w dowolnym miejscu na ciele.
- Głojak (*glioma*) – nowotwór wewnątrzczaszkowy powstający z komórek glejowych.

Nowotwory są głównym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Wskaźnik umieralności stał się jednym z największych wyzwań dla starzejącej się populacji krajów rozwiniętych.^{10,11} Nowotwory złośliwe są drugą najczęstszą przyczyną zgonów z około 19 milionami nowych przypadków diagnozowanych każdego roku na świecie oraz blisko 10 milionami zgonów.^{10,12} Pomimo, że nie wszystkie nowotwory złośliwe są śmiertelne, ta choroba znacząco obniża jakość życia pacjentów oraz generuje wysokie koszty leczenia.⁶ Udoskonalone narzędzia diagnostyczne, nowe strategie terapeutyczne oraz postęp w badaniach nad mechanizmami nowotworów spowodował spadek wskaźników umieralności w ciągu ostatnich 10 lat, jednakże obciążenie nowotworami wciąż stanowi istotne wyzwanie dla lekarzy oraz naukowców na całym świecie.¹² Szczególnym wyzwaniem są nowotwory, którym brakuje nadekspresji specyficznych receptorów. Stanowią one obecnie poważny problem w kontekście nowych podejść radiofarmaceutycznych. Szczególną uwagę zwracają potrójnie ujemny rak piersi (TNBC) oraz głojak wielopostaciowy (GBM), które są wysoce agresywnymi nowotworami o niekorzystnym rokowaniu.^{1,13}

2.1.1. Potrójnie ujemny receptorowo rak piersi

Rak piersi pozostaje najczęściej diagnozowanym nowotworem u kobiet, stanowiąc 23% wszystkich przypadków nowotworów złośliwych.¹⁴ Zapadalność na TNBC oraz jego wskaźniki śmiertelności wzrosły w ciągu ostatnich trzech dekad, częściowo ze względu na zmianę profili czynników ryzyka oraz lepszą rejestrację i wykrywanie nowotworów. Istnieje wiele czynników ryzyka warunkujących wystąpienie tej choroby. Czynniki te, z uwzględnieniem podziału na modyfikowalne i niemodyfikowalne, przedstawiono w Tab. I Tab. I. Czynniki ryzyka raka piersi z podziałem na czynniki niemodyfikowalne oraz modyfikowalne.^{5,5}

Tab. I. Czynniki ryzyka raka piersi z podziałem na czynniki niemodyfikowalne oraz modyfikowalne.⁵

Czynniki niemodyfikowalne	Czynniki modyfikowalne
Płeć żeńska	Hormonalna terapia zastępcza
Wiek powyżej 50 roku życia	Przyjmowanie dietylostilbestrolu
Nowotwory piersi i jajnika w rodzinie	Nadwaga/otyłość
Przebyty rak piersi	Palenie tytoniu
Rasa biała	Niska aktywność fizyczna
Brak ciąży/karmienia piersią	Niewystraczająca suplementacja witamin
Okres menstruacyjny i menopauzalny	Nadmierna ekspozycja na sztuczne światło
Większa gęstość tkanki piersi	Spożywanie przetworzonej żywności
Nienowotworowe choroby piersi	Ekspozycja na substancje chemiczne takie jak m.in. dichlorodifenylotrichloroetan, polichlorowane bifenyle, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
Leczenie radioterapią	Przyjmowanie niektórych leków z grupy antybiotyków, leków przeciwdepresyjnych, statyn, leków przeciwnadciśnieniowych i niesteroidowych leków przeciwzapalnych

Leczenie tej choroby jest złożone i obejmuje skojarzenie różnych metod, w tym chirurgii, radioterapii, chemioterapii, terapii hormonalnej lub terapii biologicznych stosowanych w różnych sekwencjach. Prawdopodobieństwo wydłużenia czasu przeżycia lub wyleczenia zależy od wielu czynników, w tym np. od stadium zaawansowania klinicznego nowotworu, podtypu molekularnego nowotworu, rodzinnego obciążenia genetycznego.⁵ Na podstawie poziomów mRNA odnoszących się do ekspresji genów, wyróżniamy cztery typy raka piersi: luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni oraz potrójnie receptorowo ujemny.⁵ Typy luminalne stanowią około 70% wszystkich przypadków raka piersi w populacjach zachodnich i charakteryzują się one obecnością receptora estrogenowego (ER-dodatnie).^{5,15}

- **Typ luminalny A** wykazuje obecność receptora estrogenowego i receptora progesteronowego (PR-pozytywne) oraz brak ekspresji receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2). Klinicznie są to zazwyczaj wolno rosnące nowotwory z tendencją do najlepszego rokowania.¹⁶ Leczenie polega na interwencji chirurgicznej, hormonoterapii oraz radioterapii, brachyterapii,¹⁷ a w niektórych przypadkach także chemioterapii.¹⁸
- **Typ luminalny B** wykazuje obecność receptora estrogenowego i/lub receptora progesteronowego, a ponadto może być HER2-dodatni lub ujemny. Zazwyczaj wykazuje także wysoką ekspresję

genów związanych z proliferacją jak Ki67 oraz kinazy Aurory A (AURKA), a więc posiada gorsze rokowanie.¹⁹ Standardowe leczenie obejmuje interwencję chirurgiczną, hormonoterapię, radioterapię, brachyterapię oraz chemioterapię.^{19,20,21,22}

- **Typ HER-2 dodatni** charakteryzuje się wysoką ekspresją receptora HER2 przy jednoczesnym braku ekspresji receptorów ER i PR. Podtyp ten charakteryzuje się szybką proliferacją, cechuje się chemiowrażliwością²³ oraz reaguje na terapię ukierunkowaną na HER2.^{22,24}
- **Typ potrójnie receptorowo ujemny (TNBC)** jest heterogenicznym nowotworem charakteryzującym się brakiem ekspresji receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz receptorów HER2. Występuje w 10-15% wszystkich przypadków raka piersi, a wskaźnik przeżycia postaci TNBC z przerzutami wynosi 12%.²⁵ Zaobserwowano zwiększoną częstość występowania tego typu raka u kobiet pochodzenia afrykańskiego i afroamerykańskiego w okresie przedmenopauzalnym. Standardowe metody leczenia obejmują interwencję chirurgiczną, radioterapię, immunoterapię oraz chemioterapię (antracykliny, taksany). Jednakże leczenie to wiąże się z wysokim odsetkiem nawrotów miejscowych i ogólnoustrojowych.²⁶

Do badań prowadzonych w ramach tej pracy wybrany został potrójnie receptorowo ujemny rak piersi ze względu na ograniczone możliwości zastosowania terapii celowanej oraz niski wskaźnik przeżycia chorych. Pacjenci z TNBC mają zazwyczaj niekorzystne cechy histopatologiczne z wyższym stopniem złośliwości, większym rozmiarem guza i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Obserwowana jest także korelacja między występowaniem mutacji BRCA1, a wystąpieniem potrójnie ujemnego raka piersi, gdzie aż u 75% posiadających tę mutację rozwija się TNBC.²⁶ Nowotwory typu TNBC rozprzestrzeniają się preferencyjnie poprzez krew i częściej niż w przypadku innych typów raka piersi powodują przerzuty do mózgu oraz płuc.^{25,26}

Leczenie miejscowe jest podobne do leczenia innych inwazyjnych typów nowotworów piersi i obejmuje chirurgiczne wycięcie masy guza za pomocą mastektomii lub operacji oszczędzającej, a następnie radioterapię. Ten typ raka piersi jest wrażliwy na chemioterapię, co potwierdzają wysokie wskaźniki całkowitej odpowiedzi patologicznej uzyskane po zastosowaniu chemioterapii neoadjuwantowej.²⁶ Maksymalne ryzyko nawrotu TNBC występuje 3 lata po operacji, po czym systematycznie się obniża. Czas przeżycia chorych w przypadku nawrotu w postaci przerzutów odległych, jest krótszy niż w przypadku innych typów raka piersi, a dostępne terapie cechują się niską skutecznością i krótkotrwałymi odpowiedziami, co podkreśla potrzebę poszukiwania skuteczniejszych metod leczenia. Aby poprawić wyniki terapeutyczne TNBC, wymagane są niezawodne biomarkery predykcyjne i nowsze leki przeciwko znanym szlakom molekularnym.¹⁴ Obecnie nadal badane są inne niż chemioterapia opcje leczenia systemowego, takie jak terapie celowane na poziomie molekularnym, terapie ukierunkowane na cytoszkielecie, migrację komórek, układ naczyniowy i szlaki genów o wysokiej proliferacji, immunoterapia oraz szczepionki.²⁶ Niezbędna jest analiza wielu ukierunkowanych podejść terapeutycznych i kombinacji schematów leczenia w celu poprawy skuteczności leczenia TNBC, co wynika z jego wysokiej złośliwości, heterogeniczności oraz lekooporności.²⁷

Poniższa tabela przedstawia zebrane możliwe opcje terapeutyczne w zależności od podtypu molekularnego TNBC (Tab. II).²⁷

Tab. II. Stosowane strategie terapeutyczne w zależności od podtypu TNBC.²⁷

Podtyp	Strategie terapeutyczne
Immunomodulujący	Blokada punktów kontrolnych układu odpornościowego
	Aktywacja układu odpornościowego
	Immunoterapia (szczepionki, wirusy, związki chemiczne)
	Koniugaty przeciwciało-lek (ADC)
	Radioterapia
LAR	Terapia celowana w receptor androgenowy
M/MSL	Leki o działaniu antyangiogennym
	Inhibitory szlaków sygnałowych
Bazalno-podobny	Inhibitory PARP
	Terapia oparta na związkach platyny
	Środki opóźniające cykl komórkowy

Potrójnie ujemny rak piersi pozostaje trudnym do leczenia typem nowotworu, a obecnie dostępne metody nie są wystarczająco skuteczne. Dzięki pojawieniu się nowych leków, które poddawane są ciągłej analizie w badaniach klinicznych, wiedza na temat TNBC znacząco się rozwinęła.

Udowodniono, że analogi platyny i inhibitory PARP osiągają obiecujące wyniki w leczeniu przerzutowej postaci TNBC. W przypadku podtypu posiadającego receptory androgenowe, korzyści kliniczne zaobserwowano dzięki stosowaniu ich inhibitorów oraz inhibitorów kinaz. Ponadto, istotnym klinicznie trendem w leczeniu TNBC jest immunoterapia. Blokada punktów kontrolnych układu odpornościowego za pomocą atezolizumabu lub pembrolizumabu wykazuje korzyści kliniczne. W celu kompensacji niezadowolającego wskaźnika odpowiedzi immunologicznej dla przeciwciał monoklonalnych, opracowano również przeciwciała bispecyficzne oraz przeciwciała bispecyficzne angażujące limfocyty T.^{27,28} Pojawiły się ponadto nowe koniugaty przeciwciało-lek, z których sacituzumab govitecan został zatwierdzony przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA). Zaobserwowano, że sama immunoterapia może nie być wystarczająca do leczenia chorych z rozpoznaniem TNBC, a najlepszy efekt uzyskuje się poprzez terapię skojarzoną obejmującą immunoterapię. W niektórych badaniach klinicznych terapia skojarzona wykazała lepszą skuteczność niż monoterapia, jednak kolejność oraz czas podawania leków skojarzonych wymaga dalszych badań.^{14,27,28,29}

Ponadto, aby uniknąć niespecyficznego ukierunkowania i skutków ubocznych chemioterapii, obiecującym narzędziem są systemy dostarczania leków oparte na nanotechnologii. Ostatnie postępy w nanotechnologii i jej zastosowanie w teranostyce nie tylko pozwalają wyeliminować cytotoksyczność leków dla zdrowych tkanek i narządów, ale także umożliwiają obrazowanie postępu leczenia. Zastosowanie nanomedycyny jest jednak ograniczone w TNBC ze względu na brak znanego receptora o wysokiej ekspresji oraz odpowiednich ligandów.³⁰ Większość systemów dostarczania leków za pomocą nanocząstek opiera się więc na efekcie wzmocnionej przepuszczalności i retencji (EPR), który został opisany w rozdziale 2.5 tej pracy.

Wyróżniamy następujące grupy nanocząstek, które są poddawane ocenie w badaniach przedklinicznych oraz klinicznych jako potencjalne terapeutyki dla potrójnie ujemnego raka piersi.³⁰

Nanocząstki liposomalne zawierające dokсорubicynę (DOX) i rapamycynę przyłączone do cyklicznego oktapeptydu LXY zostały zastosowane do ukierunkowania nadmiernej ekspresji integryny- $\alpha 3$ w modelach TNBC. Podejście to zwiększyło skuteczność leczenia w porównaniu z podaniem wolnych leków.³¹ Podobny efekt osiągnięto podając liposomy z dokсорubicyną i sorafenibem.³² Opracowano także system liposomalnego dostarczania antagomiru-10b i PTX dla zmniejszenia przerzutów raka piersi do płuc oraz opóźnienia wzrostu guza.³³ W badaniach przedklinicznych nanokryształ PTX powlekane PEG-iem oraz

nanocząstki estrogenowe w połączeniu z cisplatyną spowodowały opóźnienie wzrostu guza oraz przerzutów.^{34,35} Ponadto, w fazie badań klinicznych znajdują się liposomy wypełnione paklitaksellem oraz irynotekaniem.³⁶

Układy micelarne zastosowano do transportu pochodnej kurkuminy - RL71, co zwiększyło wychwyt leku przez komórki nowotworowe, lecz posiadały one zbyt niską specyficzność.³⁷ Opracowano także sprzężone z cetuximabem micelle witaminy E do ukierunkowanego podawania docetakselu.³⁸ Kopolimerowe micelle PAA-g-PEG zawierające DOX sprawdzono na modelu mysim i zaobserwowano skuteczną redukcję przerzutów do płuc oraz wzrostu guza. W II fazie badań klinicznych znalazły się ponadto polimeryczne micelle przenoszące irynotekan.³⁹

Dendrymery stosowano jako ukierunkowany moduł diagnostyczny w mysim modelu guza TNBC. Dendrymer G4PAMAM sprzężony z GdDOTA (kontrast MRI) i DL680 (barwnik NIR) podano podskórnie myszom jako podwójny model do obrazowania i dostarczania leków. W obrazowaniu potwierdzono diagnostyczne ukierunkowanie tego środka dendrymerycznego.⁴⁰ Dostarczanie nieukierunkowanego leku mitaplatyny Pt (IV) z zastosowaniem nanocząstek polimerowych PLGA-PEG spowodowało hamowanie rozwoju guza na modelu mysim.⁴¹ Zidentyfikowano także nowy peptyd (Gle-Ile-Arg-Leu-Arg-Gly), który specyficznie rozpoznaje białko regulowane glukozą (GRP78). Peptyd ten sprzężono z poliestrowymi nanocząstkami oraz paklitaksellem w celu specyficznego dostarczenia do receptora.⁴² W badaniu klinicznym pacjentów z przerzutowym TNBC o wysokim poziomie białka Trop-2 zastosowano przeciwciało anti-Trop-2-SN-38 (lek IMMU-1322) i uzyskano wskaźnik odpowiedzi wynoszący 33%.²⁹ Kopolimer poloxamer (P188) w połączeniu z sukcynobukolem okazał się być najlepszym środkiem w doustnym leczeniu TNBC, hamując cząsteczki adhezyjne komórek naczyniowych-1 (VCAM-1) oraz migrację komórek nowotworowych.⁴³

Nanocząstki polimerowe mogą także dostarczać terapeutyk wraz z miRNA i siRNA. Zbadano nanocząstki PLGA-bPEG, które dostarczały siRNA (białko oporności wielolekowej) wraz z doksorubicyną, co spowodowało 8-krotną redukcję wzrostu guza i jego objętości.⁴⁴ Wykazano także, że funkcjonalizowane stałe lipidowe nanocząstki cyklicznego peptydu Arg-Gly-Asp (RGD-SLN) hamują adhezję i inwazję receptora $\alpha_v\beta_3$, który wykazuje nadmierną ekspresję w inwazyjnych guzach TNBC.⁴⁵ Ponadto, hybrydowe nanocząsteczki polimerolipidowe, sprzężone z ligandem peptydowym RGD i wypełnione doksorubicyną i mitomycyną C osiągnęły celowaną skuteczność i wykazały synergiczne działanie w przerzutowym modelu mysim.⁴⁶

Najdokładniej zbadanymi nanocząstkami metalicznymi są nanocząstki złota (AuNPs), które są obecnie wszechstronnie wykorzystywane w przedklinicznych badaniach nad nowymi terapiami przeciwnowotworowymi m.in. do dostarczania leku paklitaksel.⁴⁷ Złote nanopryty wypełnione cisplatyną w połączeniu z promieniowaniem podczerwonym spowodowały supresję guza TNBC i redukcję przerzutów w badaniach *in vivo*.³⁵ Utlenione wielościennie nanorurki węglowe (o-MWNT) stanowią nowe podejście w terapii nowotworowej poprzez redukcję makrofagów i gęstości naczyń w guzie.^{48,49} Zaproponowana została ablacja indukowana fototermicznie przy użyciu MWNT w terapii TNBC. Kompleks nanodiamentu oraz DOX hamował rozwój raka u myszy poprzez przeciwdziałanie wpływowi leku oraz zwiększenie apoptozy, a także redukcję przerzutów do płuc.^{50,51}

Nanostruktura czworościanu zbudowanego z DNA (TH) zawierająca cetuximab z interkalowaną doksorubicyną, tj. THDC₃ wykazała preferencyjne zabijanie komórek nowotworowych linii potrójnie ujemnego raka piersi celując na komórki o nadmiernej ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Wykazano wysoką i specyficzną skuteczność niszczenia komórek nowotworowych przez THDC₃.⁵²

Dostarczanie leków oparte na nanotechnologii z wystarczającą ilością pomocniczych systemów może poprawić zdolność diagnostyczną i wyniki terapeutyczne, przyczyniając się tym samym do zwiększenia przeżywalności pacjentów.³⁰ Mimo toczących się wielu badań klinicznych oraz przedklinicznych dostępne obecnie terapie są niewystarczające w leczeniu pacjentów z TNBC. Ponadto, większość badanych związków oraz nanonośników w terapii raka piersi przeznaczona jest jedynie do leczenia ukierunkowanego.^{14,30} Wobec powyższych argumentów, połączenie dwóch lub więcej leków może być konieczne w celu uzyskania optymalnego podejścia do leczenia TNBC.⁵³ Istnieje zatem potrzeba przeprowadzenia dalszych badań, w tym badań nanocząstek, w celu identyfikacji nowych skutecznych terapii przeciwnowotworowych dla potrójnie receptorowo ujemnego raka piersi.^{14,27,28,30}

2.1.2. Glejak wielopostaciowy

Glejak wielopostaciowy (GBM) jest najczęstszym rodzajem nowotworu mózgu, stanowiącym 50,1% wszystkich złośliwych guzów mózgu, a jego śmiertelność wynosi 93,1%.¹³ Mediana całkowitego przeżycia pacjentów jest niska i stanowi zaledwie 15 miesięcy.⁵⁴ GBM jest złośliwym glejakiem IV stopnia. Lokalizuje się on w większości przypadków w płatach czołowych, skroniowych i ciemieniowych i rzadziej wpływa na inne struktury. Wiele badań potwierdza, że wiek znacząco wpływa na częstość występowania GBM; zdecydowana większość przypadków występuje u osób powyżej 40 roku życia. Opierając się na stopniu złośliwości glejaka wielopostaciowego określanej na podstawie kryteriów histopatologicznych, wyróżniono cztery typy tego nowotworu.⁵⁴

- **Glejak wielopostaciowy, bez mutacji dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH)** – występuje w 90% przypadków, pierwotny, rozwijający się u osób w wieku około 60 lat.
- **Glejak wielopostaciowy, z mutacją IDH** – występuje w 10% przypadków, wtórny GBM, który zwykle rozwija się u młodszych pacjentów z glejakami o wyższym zróżnicowaniu. Charakteryzuje się znacznie lepszymi rokowaniami niż typ bez mutacji IDH.
- **Glejak wielopostaciowy nieokreślony inaczej (NOS)** - statusu mutacji IDH nie można było określić z powodu braku materiału histologicznego lub molekularnego do badania.
- **Glejak wielopostaciowy niesklasyfikowany w innym miejscu (NEC)** - to nowa kategoria wyróżniona w ostatnich latach. Występuje w przypadku, gdy dokonano niezbędnych ustaleń dotyczących klasyfikacji guza, ale wyniki nie pozwalają na jego dopasowanie do żadnej z wyżej wymienionych kategorii podziału. Istnieją rozbieżności między cechami klinicznymi, histologicznymi, immunohistologicznymi i genetycznymi guza.

Dziedziczenie odgrywa niedużą rolę jako czynnik ryzyka rozwoju GBM. Jedynie mała podgrupa (około 5%) pacjentów z glejakami jest związana z pewnymi zespołami dziedzicznymi. Transformacja złośliwa w przypadku tego nowotworu jest wynikiem sekwencyjnej akumulacji zmian genetycznych i nieprawidłowej regulacji szlaków sygnałowych czynników wzrostu.⁵⁵ GBM jest bardzo agresywną postacią nowotworu mózgu pochodzącą z astrocytarnych komórek glejowych i charakteryzującą się opornością na radioterapię i chemioterapię. Oporność ta wynika w dużej mierze z unikalnej biologii komórek GBM, które mogą unikać efektów konwencjonalnych metod leczenia dzięki mechanizmom takim jak zwiększona odporność na śmierć i szybka regeneracja komórek nowotworowych. Ponadto, bariera krew–mózg utrudnia chemioterapeutykom dotarcie do komórek nowotworowych, co prowadzi do zmniejszenia jej skuteczności.⁵⁶ Pomimo tych wyzwań, istnieje kilka konwencjonalnych metod leczenia tego nowotworu. Standard opieki nad pacjentami z GBM obejmuje resekcję chirurgiczną, a następnie jednoczasową chemioradioterapię i w dalszej kolejności chemioterapię adiuwantową.⁵⁶ Terapia obejmuje dodatkowo

leczenie napadów padaczkowych, obrzęku mózgu, infekcji, zaburzeń o charakterze depresji, zaburzeń funkcji poznawczych, objawów zmęczenia oraz żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej.⁵⁷

Standardowe leczenie GBM po operacji obejmuje 6 tygodni jednoczesnego stosowania temozolomidu (TMZ) i radioterapii, a następnie uzupełniającego stosowania TMZ przez sześć cykli. TMZ jest najczęściej stosowanym chemioterapeutykiem w leczeniu GBM po operacji. Bezpośrednio uszkadza on komórki nowotworowe poprzez metylację zasady purynowej.⁵⁶ Kilka leków będących pochodnymi nitrozomocznika zostało zbadanych w leczeniu guzów mózgu, m. in. karmustyna, która powoduje międzyrzędowe wiązanie poprzeczne między cytozyną a zasadą guaniny w DNA komórek nowotworowych. Dostępne są zatwierdzone przez FDA biodegradowalne dyski karmustyny, które umieszcza się w jamie resekcyjnej podczas operacji, gdzie lek uwalniany jest powoli przez dwa tygodnie. Karmustynę można stosować w połączeniu z inhibitorami alkiloguaninotransferazy w celu uzyskania lepszych efektów terapeutycznych.^{56,58,59} Kolejnymi istotnymi środkami alkilującymi są lomustyna i fotemustyna. Stosuje się je doustnie, a ze względu na niewielkie rozmiary i wysoką lipofilowość mogą one przekraczać barierę krew-mózg.^{60,61} Opcje chemioterapeutyczne w przypadku glejaków wysokiego stopnia to karboplatyna, irynotekan, karmustyna, etopozyd oraz połączenie prokarbazyny, lomustyny i winkrystyny. Stosowana jest także chemioterapia antyangiogenna, która obejmuje dożylne podanie przeciwciała monoklonalnego bevacizumabu. Przeciwciało to wiąże się z czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyńowego A (VEGF-A) i hamuje go, inicjując wzrost nowych naczyń krwionośnych. Bevacizumab poprawia przeżycie bez progresji, jednakże nie poprawia znacząco ogólnego przeżycia pacjentów i z tego powodu jest stosowany głównie w leczeniu nawracających glejaków wielopostaciowych.⁶² Badaniom poddano także skojarzenie bevacizumabu z irynotekaniem.^{63,64}

W leczeniu GBM zastosowano również pembrolizumab. Celem terapii było przywrócenie aktywności limfocytów T za pomocą własnego układu odpornościowego pacjenta. Pembrolizumab blokuje receptor zaprogramowanej śmierci komórek na powierzchni limfocytów, zapobiegając ich neutralizacji poprzez blokowanie połączenia między białkiem PD-L1 GBM a receptorem zaprogramowanej śmierci komórek. Lek ten podawano pacjentom ze zdiagnozowanym GBM nie tylko w okresie pooperacyjnym, ale również przed planowanym leczeniem chirurgicznym.⁶⁵

Radioterapia może być stosowana w celu zapewnienia lokalnej kontroli nad GBM leczonym lub nieleczonym poprzez resekcję chirurgiczną. Pacjenci otrzymują radioterapię, która wykorzystuje promieniowanie rentgenowskie skierowane na cel guza z kilku różnych kątów. Radioterapia jest zwykle rozłożona na 6 tygodni w 2 frakcjach po 400 Gy.⁶⁶ Inną, stosowaną rutynowo formą radioterapii jest radiochirurgia stereotaktyczna, w której stosowane jest źródło kobaltu-60. W tej metodzie stosuje się większe dawki, dostarczając wiele nierównoległych, zbieżnych wiązek promieniowania. Dawka jest podawana w mniejszej liczbie frakcji, ale w wyższych dawkach na pojedynczą frakcję.⁶⁷

Brachyterapia jest wciąż w fazie badań klinicznych w leczeniu GBM. Obejmuje ona miejscową implantację jednego lub więcej radioaktywnych źródeł do łoża guza w trakcie operacji. Najczęściej stosowanymi izotopami do brachyterapii guzów mózgu są ¹²⁵I i ¹⁹²Ir.⁶⁸ Niestety, w prowadzonych do tej pory głównych badaniach klinicznych nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zakresie czasu przeżycia całkowitego wśród pacjentów otrzymujących brachyterapię a tymi, którzy jej nie otrzymali.^{69,70} Natomiast wydłużenie czasu przeżycia całkowitego i czasu przeżycia bez progresji choroby zaobserwowano u pacjentów leczonych skojarzoną radioterapią protonową z leczeniem TMZ w porównaniu z pacjentami poddanymi terapii skojarzonej, tj. połączeniu TMZ ze standardową radioterapią.⁷¹

W ramach wielodyscyplinarnego leczenia glejaków wysokiego stopnia, opcje terapeutyczne są ograniczone i obejmują ponowną operację lub ponowne napromieniowanie, chemioterapię systemową oraz udział

w badaniu klinicznym.^{72,73} Ze względu na fakt, że większość pacjentów nie kwalifikuje się do ponownej operacji lub ponownego napromieniowania, udział w badaniu klinicznym pozostaje często jedyną opcją leczenia. Wśród nowych strategii terapeutycznych możemy wyróżnić terapie inhibitorami specyficznych procesów molekularnych, immunoterapię, terapie z zastosowaniem nanocząstek, laserową śródmiąższową terapię termiczną oraz terapie inhibitorami specyficznych procesów molekularnych.⁷³

Nanotechnologia zyskuje na znaczeniu także w leczeniu glejaka wielopostaciowego. Ze względu na występowanie efektu zwiększonej przepuszczalności i retencji, duży rozmiar nanomateriałów zapobiega ich dyfuzji poza naczynia krwionośne z powrotem do krwi, co ma miejsce w przypadku małych leków, które są szybko eliminowane z guza.⁷⁴ Efekt EPR jest w dużym stopniu zależny od przepuszczalności naczyń krwionośnych w obrębie guza. W celu poprawy ukierunkowania na guz nowotworowy, nanocząstki są często funkcjonalizowane przeciwciałami, peptydami lub aptamerami, które mogą być aktywnie ukierunkowane na specyficzne markery powierzchniowe komórek nowotworowych. Nanocząstki w leczeniu glejaka wielopostaciowego znajdują się głównie w fazie badań przedklinicznych. PEG-owane nanocząstki sprzężone z Pep-1 i zawierające paklitaksel poprawiły skuteczność leczenia i wydłużyły czas życia myszy w badaniach przedklinicznych.⁷⁵ Opracowano także nanocząstki złota zamknięte w liposomach i sprzężone z peptydami apolipoproteiną E i glikoproteiną wirusa wścieklizny, które przekraczały barierę krew-mózg i lokalizowały się specyficznie w miejscu nadekspresji miR-92b, wykazując tym samym dużą akumulację w tkankach guza mózgu.⁷⁶ Zbadano także wielofunkcyjny, ukierunkowany na glejaka, liposomalny system dostarczania leków modyfikowany cyklicznym RGD i kwasem p-hydroksybenzoesowym. W badaniu przedklinicznym na myszach połączenie to zwiększyło medianę przeżycia do 35 dni.⁷⁷ W badaniach przedklinicznych na myszach z podwójnym niedoborem odporności oceniono także potencjał terapeutyczny podawanych do guza nanocząstek [¹⁹⁷Hg]Hg-AuNP oraz celowanych na EGFR nanocząstek [¹⁹⁷Hg]Hg-AuNP-panitumumab. Badanie *ex vivo* wykazało bardziej rozproszoną dystrybucję nieukierunkowanych nanocząstek w mózgu. Biodystrybucja obu koniugatów była znacząco większa w prawej półkuli mózgu (zawierającej guz) w porównaniu z lewą półkulą mózgu oraz mózdzkiem. Wychwyt przez tkankę normalną był niski. Nie odnotowano istotnych różnic między celowanymi i niecelowanymi nanocząstkami. Zarówno ukierunkowane na receptor EGFR, jak i nieukierunkowane [¹⁹⁷Hg]Hg-AuNP były silnie zatrzymywane w guzach U251-Luc w mózgu myszy po podaniu za pomocą wspomaganego konwekcyjnie dostarczania.⁷⁸

W badaniach stosowano również nanostruktury reagujące na bodźce. Są one zaprojektowane do dostarczania i uwalniania leków poprzez reagowanie na określone czynniki, takie jak m. in. pH, aktywność enzymów, światło, ultradźwięki, temperatura i pole magnetyczne. Opracowano usieciovane nanocząstki tlenku żelaza sprzężone z azademetylokolchicyną (CLIO-ICT). Jest ona specyficznie aktywowana przez enzym, metaloproteinazę macierzy 14 (MMP-14), której nadekspresję zaobserwowano w GBM. Po poddaniu działaniu enzymu, nanostruktura CLIO-ICT uwalnia azademetylokolchicynę w tkance guza, co zakłóca jego unaczynienie guza i zabija komórki nowotworowe. Wykazano, że leczenie CLIO-ICT w połączeniu z TMZ oraz napromieniowaniem prowadzi do znacząco lepszego zahamowania wzrostu guza i wydłużenia ogólnego przeżycia myszy z GBM w porównaniu z grupą kontrolną.⁵⁶

Zbadano także nanocząstki PLGA modyfikowane polisorbatem-80 oraz paklitakselem, które wykazały znacznie silniejszą skuteczność przeciwnowotworową u myszy w połączeniu ze skoncentrowanymi ultradźwiękami. Ponadto, terapia nowotworowa oparta na hipertermii magnetycznej wykazała obiecujące wyniki w badaniach przedklinicznych.⁵⁶

Ze względu na trudności w przekraczaniu przez leki bariery krew mózg, opracowane zostały nowe drogi podawania, takie jak podanie donosowe oraz bezpośrednio do guza/łoży pooperacyjnej.

Zaobserwowano, że donosowa droga podawania leku może umożliwić dotarcie związków terapeutycznych do guzów GBM w znacznie wyższych dawkach niż w przypadku podawania dożylnego. Podobnie, podawanie leku do guza może mieć wysoką skuteczność w przypadkach pojedynczego guza, którego nie można usunąć chirurgicznie. Wstrzyknięcie można wykonać za pomocą strzykawki lub cewnika w miejscu guza lub za pomocą konwekcyjnego wspomagania dostarczania, która to technika pozwala na precyzyjną kontrolę szybkości infuzji związku poprzez utrzymanie gradientu ciśnienia hydrostatycznego.^{56,79}

GBM jest nowotworem mózgu z ograniczonymi możliwościami jego leczenia. Biorąc pod uwagę złożoność genomyczną i wiele szlaków sygnałowych, monoterapia tego nowotworu prawdopodobnie będzie nieskuteczna, a optymalne podejście do leczenia będzie wymagało terapii skojarzonych ukierunkowanych na różne szlaki metaboliczne. Badania nad leczeniem GBM są rozległe i szybko ewoluują. Dotychczas nie udało się znaleźć skutecznej metody leczenia tego nowotworu. Konwencjonalne terapie mogą jedynie nieznacznie wydłużyć czas przeżycia całkowitego pacjentów z GBM. Niestety, terapie celowane na GBM w dużej mierze zawiodły w badaniach klinicznych. Obecnie trwają badania kliniczne w celu oceny bezpieczeństwa i skuteczności innych innowacyjnych metod leczenia GBM.⁵⁶ Jak wykazano powyżej, nanoterapeutyki mają wiele zalet w leczeniu GBM mogących zwiększyć skuteczność tradycyjnej terapii. Udowodniono ponadto, iż podanie bezpośrednio do guza, jest korzystną drogą dostarczania leku w przypadku pojedynczych guzów mózgu.^{79,80}

2.2. Terapia przeciwnowotworowa

Terapia przeciwnowotworowa jest podstawowym sposobem zmniejszania śmiertelności nowotworów, a kluczem do jej skutecznego rozwoju jest lepsze zrozumienie wpływu schematów leczenia i mechanizmów oporności, które mogą się rozwijać. Badania naukowe prowadzone w dziedzinie terapii przeciwnowotworowych są obecnie jednym z głównych aspektów, na których skupiają się naukowcy na całym świecie.⁸¹ W roku 2022 na nowotwory zachorowało 18,74 mln ludzi na świecie, a śmierć w wyniku tej choroby poniosło 9,67 mln osób.⁸² Logiczną konsekwencją tego stanu rzeczy jest skupienie naukowców na całym świecie nad zagadnieniem leczenia nowotworów. W 2023 roku Amerykańskie Stowarzyszenie Badań nad Rakiem (AACR) poinformowało, że od lipca 2022 r. do sierpnia 2023 r. FDA zatwierdziło 14 nowych leków przeciwnowotworowych oraz rozszerzyło stosowanie 12 wcześniej zatwierdzonych terapii w celu leczenia dodatkowych typów nowotworów. W 2024 roku według *The Pharma* opublikowano ponad 81 tysięcy artykułów naukowych skupiających się na tej tematyce.⁸³

Wiele innowacyjnych rozwiązań zostało już zaaplikowanych klinicznie powodując znaczny wpływ na postęp choroby i rokowania, zwłaszcza u pacjentów we wczesnych fazach jej rozwoju.⁸⁴ Podejście do leczenia raka w dużym stopniu zależy od stopnia zaawansowania choroby. Miejscowa choroba jest często leczona poprzez resekcję chirurgiczną, a następnie radioterapię i chemioterapię. Zaawansowane, przerzutowe nowotwory są nieoperacyjne i często stosuje się agresywną chemioterapię.⁸⁵

2.2.1. Chemioterapia

Chemioterapia jest niewątpliwie jedną z najczęściej stosowanych metod w leczeniu nowotworów. Odnosi się ona do podawania leków cytotoksycznych, tj. substancji wchodzących w interakcje z kluczowymi cyklami życiowymi szybko dzielącej się komórki, w celu wyeliminowania lub zmniejszenia guza, a tym samym zmniejszenia objawów z nim związanych oraz wydłużenia życia. Leki cytotoksyczne

najczęściej podawane są dożylnie w określonych kombinacjach dwóch lub więcej leków. Zwiększa to ich zdolność przezwyciężenia oporności komórek nowotworowych, uzyskania aktywności leczenia przeciwko różnym populacjom komórek nowotworowych i uniknięcia wyraźnej toksyczności dla normalnych tkanek.^{86,87}

Tradycyjne chemioterapeutyki działają poprzez eliminowanie szybko dzielących się komórek, zazwyczaj poprzez ukierunkowanie działania na DNA lub procesy krytyczne dla podziału komórkowego. Natomiast niekonwencjonalne terapie ukierunkowane są na specyficzną podatność komórek nowotworowych, w tym zmiany w ich genach i białkach. Leki cytostatyczne są klasyfikowane w zależności od ich mechanizmu działania i obejmują:^{85,88,89}

- środki alkilujące,
- środki antymetaboliczne,
- środki ukierunkowane na mikrotubule - leki z grupy taksoidów,
- topoizomerazy - leki z grupy pochodnych kamptotecyny,
- leki z grupy antybiotyków przeciwnowotworowych.

Środki alkilujące działają poprzez dodawanie grup alkilowych do reaktywnych składników biocząsteczek, w tym białek i kwasów nukleinowych. Alkilacja guaniny w DNA powoduje nieprawidłowe parowanie zasad, rozszczepienie DNA lub usieciowanie nici, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki lub apoptozy wynikającej z niezdolności do naprawy uszkodzenia. Leki o działaniu alkilującym znajdują zastosowanie w leczeniu nowotworów hematologicznych oraz guzów litych. Do tej grupy leków należy także pierwszy zastosowany chemioterapeutyk – cyklofosfamid. Ponadto, przynależą do niej pochodne platyny oraz nowsze terapeutyki, takie jak temozolomid, chlorambucyl i mefalan.^{85,88}

Następną grupą chemioterapeutyków ukierunkowanych na DNA są środki antymetaboliczne. Działają one poprzez hamowanie syntezy kwasów nukleinowych. Antymetabolity promują śmierć komórek rakowych poprzez włączanie się do kwasów nukleinowych lub blokowanie enzymów niezbędnych do syntezy DNA lub RNA. Przykładem takiego leku cytostatycznego jest metotreksat, który działa jako antymetabolit poprzez hamowanie reduktazy dihydrofolianowej, enzymu kluczowego dla produkcji kwasu tetrahydrofoliowego, ważnego produktu pośredniego w syntezie prekursorów nukleotydów.⁸⁵

Inhibitory topoizomerazy (leki z grupy pochodnych kamptotecyny) działają na komórki nowotworowe hamując enzymy syntezy DNA. Jest to krytyczne dla replikacji, transkrypcji i podziału komórek. W leczeniu nowotworów stosowane są leki działające na dwie główne topoizomerazy, tj. topoizomerazę typu I (TOPI) i topoizomerazę typu II (TOPII). TOPI tworzy jednoniciowe cięcia w DNA, podczas gdy TOPII powoduje pęknięcia dwuniciowe. Jednym z najwcześniej zidentyfikowanych inhibitorów TOPI była kamptotecyna, która została wyekstrahowana z rośliny *Camptotheca acuminata*. Kamptotecyna i jej pochodne, takie jak topotekan i irynotekan, hamują aktywność topoizomerazy, wiążąc się z pośrednim produktem reakcji TOPI-DNA. Natomiast, mechanizmy działania inhibitorów TOPII, takich jak doksorubicyna, etopozyd i daunorubicyna, obejmują interkalację DNA i modyfikację enzymów.⁸⁵

Chemioterapia ukierunkowana na mikrotubule zatrzymuje podział komórkowy w fazie mitozy. Ten typ chemioterapii obejmuje leki z grupy alkaloidów roślinnych oraz z grupy taksoidów. Alkaloidy roślinne zapobiegają tworzeniu się mikrotubul lub indukują depolimeryzację, podczas gdy taksoidy stabilizują mikrotubule lub zwiększają polimeryzację. Alkaloidy roślinne takie jak winkrystyna, winorelbina i winedezyna są stosowane klinicznie w leczeniu różnych nowotworów. Leki z grupy taksoidów są natomiast wykorzystywane w leczeniu kilku nowotworów, tj. raka jajników, płuc, piersi i prostaty. Do grupy tej należy paklitaksel, a także jego półsyntetyczne pochodne docetaksel i kabazyteksel stosowane do leczenia zaawansowanego raka prostaty i piersi oraz raka głowy, szyi i jelita grubego.⁸⁵

Leki z grupy antybiotyków przeciwnowotworowych oddziałują na DNA poprzez zaburzenie jego syntezy oraz hamowanie naprawy. Głównym typem antybiotyków przeciwnowotworowych są antracykliny, tj. doksorubicyna, daunorubicyna, idarubicyna i epirubicyna. Antracykliny posiadają cztery główne mechanizmy, poprzez które indukują toksyczność w komórkach nowotworowych: hamowanie syntezy DNA/RNA poprzez interkalację między zasadami, hamowanie enzymu topoizomerazy II, generowanie reaktywnych form tlenu i zakłócanie interakcji histon-DNA. Doksorubicyna jest popularnym chemioterapeutykem i jest szeroko stosowana w leczeniu raka piersi, szyjki macicy, żołądka i endometrium, a także ostrej białaczki i chłoniaka nieziarniczego. Natomiast daunorubicyna wykazała skuteczność w ostrej białaczce limfocytowej u dorosłych. Wadą antracyklin jest wysokie ryzyko kardiotoxyczności. Do innych cytostatyków pochodzenia bakteryjnego należą aktynomycyna D, bleomycyna, mitomycyna C i mitoksantron.^{85,88,90,91}

Chemioterapia jest stosowana w wielu różnych typach nowotworów, a ilość chemioterapeutyków dopuszczonych klinicznie stale wzrasta.⁹²

Jednakże leczenie cytostatykami wiąże się z wystąpieniem działań niepożądanych. Wyniszczające efekty uboczne wpływają także na zdrowie psychiczne pacjentów powodując strach przed chemioterapią, który ogranicza jej potencjał terapeutyczny, ponieważ wydłużenie czasu przeżycia całkowitego, odbywa się często kosztem pogorszenia się jakości życia. Pacjenci narażeni są na wystąpienie krótko- i długoterminowych efektów ubocznych chemioterapii, takich jak mielotoksyczność, zapalenie błon śluzowych, hipotonia, łysienie, neuropatia obwodowa wywołana chemioterapią, nudności i wymioty, kardiotoxyczność, biegunka, gorączka, dreszcze, wysypka, zwłóknienia płuc, niepłodność, mgła mózgowa, neurotoksyczność, objawy podrażnienia naczyń, ból mięśni i stawów, duszność oraz brak łaknienia. Wiele z tych niepożądanych skutków chemioterapii jest leczonych za pomocą zatwierdzonej opieki wspomagającej, a ich część jest nieunikniona. W związku z tym leki cytostatyczne są podawane jedynie wtedy, gdy ich korzyści terapeutyczne przewyższają chemotoksyczność.^{89,93}

2.2.2. Radioterapia

Drugą rutynowo stosowaną klinicznie metodą leczenia nowotworów jest radioterapia. Jest ona najskuteczniejszym leczeniem cytotoxycznym dostępnym w przypadku zlokalizowanych nowotworów litych. Sukces tego podejścia podkreśla fakt, że około 60% wszystkich pacjentów onkologicznych w Polsce jest poddawanych radioterapii na różnych etapach leczenia.⁸⁹ Głównym celem radioterapii jest ograniczenie potencjału reprodukcyjnego komórek nowotworowych. Osiąga się to poprzez indukcję śmierci komórek nowotworowych oraz zahamowanie ich zdolności proliferacyjnej. Dzięki radioterapii można osiągnąć kontrolę nad wzrostem guza lub go wyeliminować. Promieniowanie wywołuje uszkodzenie DNA w komórkach, a bardziej widoczne konsekwencje obejmują apoptozę, martwicę, katastrofę mitotyczną, autofagię, zatrzymanie cyklu komórkowego oraz/lub starzenie się.⁹⁴

Działanie lecznicze radioterapii polega na wykorzystaniu promieniowania jonizującego, które uszkadza tkanki oddziałując z nimi. Większość tych uszkodzeń wynika z generowania wolnych rodników w wyniku interakcji promieniowania z wodą. Główne wolne rodniki generowane przez radiolizę wody to $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$, e_{aq}^- , $\text{HO}_2^\bullet$ i H_3O^+ . Oddziałują one z makrocząsteczkami komórkowymi, w tym DNA, RNA, białkami i błonami, co prowadzi do uszkodzenia i śmierci komórek. Niestety, po wystawieniu na działanie promieniowania jonizującego, oddziaływania te występują zarówno w komórkach nowotworowych, jak i zdrowych. Uszkodzenia radiacyjne komórki mogą być zwiększone lub zmniejszone w zależności od kilku czynników, takich jak np. obecność tlenu i związków sulfhydrylowych w środowisku komórkowym.

Zwiększona wrażliwość komórek na promieniowanie jonizujące w obecności tlenu w porównaniu do jego braku jest określana jako efekt tlenowy. Cząsteczki tlenu reagują z uwodnionymi elektronami i atomami wodoru produkując kolejne wolne rodniki: $\text{HO}_2^\bullet$ i $\text{O}_2^{\bullet-}$. Wysoce reaktywne rodniki tlenowe wytwarzane przez promieniowanie jonizujące powodują zmiany w DNA, prowadząc do śmierci komórek i mutacji.⁹⁵

Większość klinicznej radioterapii w leczeniu raka obejmuje radioterapię zewnętrzną wiązką (teleradioterapia). Teleradioterapia wykorzystuje fotony o wysokiej energii deponujące dawkę głęboko w tkance minimalizując narażenie skóry na promieniowanie. Promieniowanie podaje się w serii codziennych frakcji 1,8–2 Gy przez 6–8 tygodni. Radioterapia frakcjonowana wykorzystuje różne zdolności naprawcze tkanek nowotworowych i normalnych, aby zmaksymalizować współczynnik terapeutyczny.⁹⁶

Stosowane w radioterapii promieniowanie pochodzi z akceleratorów liniowych (promieniowanie X) lub z rozpadu pierwiastków promieniotwórczych takich jak ^{60}Co (promieniowanie γ). Możliwe jest także wykorzystanie ciężkich cząstek naładowanych. W teleradioterapii źródło promieniowania umieszczone jest w pewnej odległości od chorego, mianowicie 80 cm dla źródeł kobaltowych oraz 110 cm dla akceleratorów liniowych. Odpowiednie planowanie radioterapii jest kluczowe dla redukcji skutków ubocznych oraz uzyskania optymalnego prawdopodobieństwa zniszczenia nowotworu.⁸⁹

2.2.3. Brachyterapia

Podtypem radioterapii jest także brachyterapia, która zamiast zewnętrznej wiązki wykorzystuje źródła promieniowania w postaci milimetrowych uszczelnionych implantów zawierających radionuklidy. W porównaniu z zewnętrzną radioterapią, brachyterapia jest szerzej stosowana w przypadku nowotworów o zaawansowaniu lokoregionalnym (np. piersi i prostaty) i pozwala zmaksymalizować dawkę dostarczaną do tkanek guza nowotworowego. Brachyterapia polega na wykorzystaniu radionuklidów (m.in. ^{192}Ir , ^{125}I , ^{198}Au), które umieszczone w guzie lub jego bezpośrednim sąsiedztwie pozwalają na dostarczenie dawki promieniowania bezpośrednio do miejsca występowania nowotworu, oszczędzając przy tym zdrowe tkanki.⁹⁷ Technika ta jest stosowana w leczeniu różnych typów nowotworów i pozwala na optymalne dostarczanie bardzo wysokich dawek do guza nowotworowego, przy jednoczesnym zminimalizowaniu prawdopodobieństwa powikłań w zdrowych tkankach. Brachyterapia może być stosowana jako leczenie podstawowe lub w połączeniu z innymi metodami.⁹⁸ Większa skuteczność brachyterapii w porównaniu z radioterapią wynika z jej zdolności do precyzyjnego dostarczania wyższych dawek promieniowania w miejsce choroby. Technika ta jest natomiast inwazyjna i wymaga zastosowania znieczulenia.⁸⁹ Obecnie najczęściej stosowanym w brachyterapii radioizotopem jest ^{125}I , który może być dostarczany za pomocą elektronicznego źródła obejmującego zminiaturyzowaną lampę rentgenowską.²¹

Brachyterapia jest stosowana m.in. w leczeniu guzów prostaty, szyjki macicy, piersi, pochwy, endometrium, głowy i szyi, przełyku, płuc i kilku innych.²¹ Jest ona wskazana jako standard leczenia w połączeniu z chemioradioterapią u pacjentek z miejscowo zaawansowanym rakiem szyjki macicy, u pacjentek leczonych chirurgicznie z rakiem trzonu macicy, u pacjentów z rakiem prostaty wysokiego ryzyka w celu przeprowadzenia eskalacji dawki i poprawy przeżycia bez progresji.⁹⁸ Ponadto odgrywa znaczącą rolę w paliatywnym leczeniu choroby obturacyjnej płuc.¹⁷ Zaletami brachyterapii są przede wszystkim możliwość uniknięcia operacji, a więc skrócenie czasu pobytu w szpitalu oraz rekonwalescencji. Ponadto, korzyścią jest także precyzja metody, która pozwala na zminimalizowanie narażenia sąsiadujących zdrowych tkanek, a więc jest preferowana pod względem miejscowej kontroli guza i optymalnych efektów estetycznych.⁹⁹

Skutkami ubocznymi związanymi z napromieniowaniem małych objętości tkanek dużymi dawkami promieniowania są owrzodzenia, martwica popromienna, przetoka, krwawienie oraz zwłóknienia. Ponadto, specyficzne połączenia brachyterapii z zabiegiem chirurgicznym, chemioterapią, terapią hormonalną oraz lekami celowanymi również wpływają na efekty niepożądane związane z interakcją różnych metod leczenia. W celu optymalizacji technik brachyterapii do rozwiązania pozostaje kilka kwestii. Przede wszystkim istotne jest ustalenie optymalnych dawek i dawek frakcjonowanych dla poszczególnych pacjentów. Ponadto, istotna jest również obserwacja skuteczności długoterminowej, zwłaszcza w okresach przekraczających 10 lat oraz narażenie zdrowych tkanek pacjenta, a także jego rodziny oraz personelu medycznego na radioaktywność implantów brachyterapeutycznych.⁹⁹

2.2.5. Terapia celowana

Postępy w zrozumieniu zmian molekularnych leżących u podstaw rozwoju nowotworów umożliwiły ukierunkowanie leków na określone geny lub białka specyficzne dla komórek nowotworowych lub środowiska tkankowego, sprzyjającemu wzrostowi raka. Skuteczność tych terapii polega na uwolnieniu leku w miejscu choroby oraz na zminimalizowaniu skutków ubocznych. W związku z tym, terapia celowana z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, proleków, inhibitorów małych cząsteczek oraz koniugatów przeciwciało-nanocząstka zyskuje na znaczeniu.¹⁰⁰ Obejmuje ona leki, które blokują proliferację komórek nowotworowych, promują regulację cyklu komórkowego, indukują apoptozę lub autofagię oraz ukierunkowane dostarczanie substancji toksycznych specjalnie do komórek nowotworowych w celu ich zniszczenia. Leki ukierunkowane można zasadniczo podzielić na dwie kategorie, tj. małe cząsteczki oraz makrocząsteczki, takie jak przeciwciała monoklonalne, polipeptydy, koniugaty przeciwciało-lek i kwasy nukleinowe. Terapia celowana jest często stosowana w skojarzeniu z chemioterapią, radioterapią oraz innymi metodami leczenia nowotworów.¹⁰¹

Zastosowanie przeciwciał w terapii określamy mianem immunoterapii. W przypadku nowotworów obejmuje to np. stosowanie swoistego dla CD-33 przeciwciała monoklonalnego gemtuzumabu (Mylotarg®) sprzężonego z kalicheamycyną, który jest stosowany w leczeniu ostrej białaczki szpikowej.¹⁰² Podobnie, ibrytomomabtiuksetan znakowany radioizotopem ⁹⁰Y (Zevalin®) ukierunkowany na antygen CD20 jest stosowany do leczenia chłoniaka nieziarniczego.¹⁰³ Standardem leczenia raka piersi z receptorem naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2) jest trastuzumab – rekombinowane przeciwciało skierowane na HER2. Mimo że obecnie dostępnych jest wiele leków m. in. pertuzumab i lapatynib, trastuzumab pozostaje złotym standardem w leczeniu tego podtypu choroby. Trastuzumab można stosować we wczesnych oraz zaawansowanych stadiach, mając na uwadze, że skojarzenie z taksanami wydaje się korzystniejsze niż jego stosowanie w monoterapii. Ponadto, w przypadkach zaawansowanego raka piersi opornego na trastuzumab stosuje się koniugat trastuzumab-emtanzyna.¹⁰⁴ Przeciwciała są także stosowane jako transportery dostarczające aktywne środki terapeutyczne, enzymy i chemioterapeutyki do komórek nowotworowych.¹⁰¹

Terapia celowana z zastosowaniem proleków obejmuje selektywną aktywację proleków w tkankach nowotworowych przez enzymy egzogenne i polega na dostarczeniu enzymu aktywującego lek, genu lub funkcjonalnego białka do tkanek guza, a następnie na ogólnoustrojowym podaniu proleku. Systemy enzymów/proleków stosowane w terapii genowej obejmują układy wykazujące działanie wewnątrzkomórkowe, przekształcające proleki w ich aktywną formę w obrębie nowotworu. Przykładami takich układów są HSV-TK/GCV, Escherichia coli CD/5-FC i Escherichia coli NTR/CB1954. Terapia prolekowa kierowana wirusem wykorzystuje nietoksyczny prolek podawany ogólnoustrojowo, który

w komórkach nowotworowych ulega przekształceniu w środek cytotoksyczny. Przykładem tego połączenia jest NTR/CB1954, stosowane w leczeniu raka jelita grubego i raka trzustki.^{101,105,106}

Terapia celowana z zastosowaniem inhibitorów małych cząsteczek jest ukierunkowana na określone cele molekularne ważne dla proliferacji komórek nowotworowych, przerzutów lub angiogenezy. Podejście to umożliwiło skuteczne leczenie pacjentów onkologicznych posiadających specyficzne mutacje genowe.

W ostatnich latach zostały opracowane koniugaty przeciwciała-nanocząstka w celu ukierunkowanego dostarczania chemioterapeutyków, co pozwala na zmniejszenie skutków ubocznych poprzez brak uwalniania leku w niespecyficznych obszarach nieobjętych chorobą.¹⁰⁷

2.3. Terapia radionuklidowa

Terapia radionuklidowa (RT) jest szybko rozwijającą się dziedziną medycyny nuklearnej. Rozpad radioizotopu następuje w pobliżu komórek docelowych dostarczając tym samym stałą dawkę promieniowania. Pozwala to na leczenie zarówno zlokalizowanych guzów, jak i małych przerzutów w obszarze całego ciała.¹⁰⁸ W celu selektywnego dostarczania cytotoksyczności w miejsca chorobowe, aby skutecznie wyleczyć, złagodzić lub kontrolować chorobę, wykorzystuje się promieniowanie jonizujące o optymalnej skuteczności biologicznej, tj. emitery promieniowania α , β^- oraz elektronów Auger.¹⁰⁹

W przypadku łagodnych zaburzeń, terapia radionuklidowa stanowi alternatywę dla operacji lub leczenia farmakologicznego. Natomiast w leczeniu onkologicznym RT jest zazwyczaj stosowana jako część strategii terapeutycznej. Toksyczność jest na ogół ograniczona do tkanki krwiotwórczej, a długoterminowe skutki uboczne są mniejsze niż w przypadku chemioterapii systemowej oraz radioterapii.¹¹⁰ Jednym z najstarszych i najszerzej stosowanych zastosowań terapii radionuklidowej jest leczenie nadczynności tarczycy z zastosowaniem radiojodu ¹³¹I. Ponadto, obserwowana jest wysoka skuteczność leczenia chorób stawów metodą radiosynowektomii z zastosowaniem koloidów znakowanych izotopami ⁹⁰Y, ¹⁶⁹Er i ¹⁸⁶Re.¹¹⁰

W poniższej tabeli (Tab. III) przedstawiono najczęściej stosowane w terapii radionuklidowej izotopy wraz z rodzajem emitowanego przez nie promieniowania.¹¹¹

Tab. III. Podział radionuklidów najczęściej stosowanych w terapii radionuklidowej ze względu na rodzaj emitowanej cząstki.¹¹¹

Emitery β^-	Emitery α	Emitery elektronów Auger
⁹⁰ Y, ⁸⁹ Sr, ¹³¹ I, ¹⁵³ Sm, ¹⁷⁷ Lu, ¹⁸⁸ Re	²²³ Ra, ²²⁵ Ac, ²¹³ Bi, ²¹¹ At	¹¹¹ In, ¹²⁵ I, ¹⁶¹ Tb

Każdy z wymienionych rodzajów cząstek jest optymalny dla leczenia różnego typu nowotworów. Cząstki β^- , dzięki większemu zasięgowi w tkankach, są w stanie oddziaływać na duże objętości, co sprawia, że znajdują one zastosowanie w leczeniu dużych guzów. Jednakże, ze względu na duży zasięg sąsiednie zdrowe tkanki również narażone są na działanie promieniowania. Wady tej nie posiadają emitery cząstek α , lecz ich niewielki zasięg sprawia, że są optymalne jedynie w leczeniu małych guzów o wymiarach komórkowych lub mikroprzerzutów. W terapii celowanej z zastosowaniem elektronów Augera skupiamy się natomiast na strukturach o wymiarach subkomórkowych. Emitery te są szczególnie dopasowane do dostarczania wysokich dawek promieniowania bezpośrednio do jądra komórkowego.¹¹¹

W nowoczesnej medycynie nuklearnej coraz bardziej popularna staje się celowana terapia radionuklidowa. Lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych raka, pojawienie się cząstek

specyficznie celujących w jego komórki (przeciwciał, peptydów i małych cząsteczek) oraz dostępność nowych radioizotopów umożliwiły znaczny postęp w tej dziedzinie. Dzięki zwiększonej selektywności na poziomie guza, dawka przyjmowana przez zdrowe tkanki ulega zredukowaniu zmniejszając skutki uboczne. Opracowywane w tym podejściu radiofarmaceutyki składają się z radionuklidu sprzężonego z wektorem, który z wysoką specyficznością wiąże się z celem biologicznym. Skuteczność kliniczna kilku środków przeznaczonych do celowanej terapii radionuklidowej została już udowodniona i dopuszczono je do rutynowego stosowania.^{110,111} Należą do nich m. in. [¹³¹I]I-Tositumomab (Bexaar®), [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTATATE (Lutathera®) oraz [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617.

W kolejnych podrozdziałach przedstawiono wykorzystywane w onkologii radiofarmaceutyki z podziałem na rodzaj emitowanego promieniowania.

2.3.1. Terapia radionuklidowa z zastosowaniem emiterów promieniowania β^-

Bogate w neutrony jądra atomowe rozpadają się poprzez emisję elektronu i antyneutrino elektronowego w wyniku przekształcenia neutronu w proton. W rozpadzie beta minus z jądra atomowego emitowany jest szybki i energetyczny elektron, przekształcając tym samym pierwotny nuklid w jego izobar. Większość stosowanych klinicznie radionuklidów oparta jest na emiterach β^- . Średni zakres elektronów w tkance może wynosić od 0,1 do 5,0 mm w zależności od energii kinetycznej, średnio 50 - 2300 keV. W rezultacie, cząstki beta mogą przechodzić przez wiele komórek oraz poprzez *crossfire effect* wykazywać działanie cytotoksyczne na komórki niebędące bezpośrednio związane z receptorem, w dużej masie tkanki.^{112,113}

Radionuklid ⁹⁰Y o czasie połowicznego rozpadu 64,1 h jest emiterem cząstek β^- o energii maksymalnej 2,28 MeV, nie emitując przy tym kwantów gamma. ⁹⁰Y znajduje zastosowanie w tzw. selektywnej radioterapii wewnętrznej (*ang. selective internal radiation therapy, SIRT*) wątroby za pomocą mikrosfer. Ponadto, [⁹⁰Y]Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) stosowany jest w leczeniu chłoniaka nieziarniczego.¹¹⁴

⁸⁹Sr ($T_{1/2}$ = 50,53 dni) rozpada się poprzez emisję cząstek β^- o energii maksymalnej 1,495 MeV. Kation ⁸⁹Sr²⁺ jest analogiem Ca²⁺ i z tego względu jest internalizowany do nieorganicznej macierzy kostnej, dlatego [⁸⁹Sr]SrCl₂ (Metastron™) znajduje zastosowanie w łagodzeniu bólu nowotworowego kości. Ogólny wskaźnik odpowiedzi tego radiofarmaceutyku wynosi 70%. Działanie rozpoczyna się w ciągu 14-28 dni od podania i trwa do 15 miesięcy. Skuteczność chlorku ⁸⁹Sr w łagodzeniu bólu kości jest porównywalna z innymi radiofarmaceutykami tj. [¹⁵³Sm]Sm-EDTMP i [^{186/188}Re]Re-HEDP.^{114,115}

Kolejnym izotopem znajdującym szerokie zastosowanie w terapii radionuklidowej jest ¹³¹I, który charakteryzuje się czasem połowicznego rozpadu wynoszącym 8,02 dnia oraz emisją cząstek β^- o energii maksymalnej 606 keV i kwantów gamma o energii 364 keV. Roztwór jodku sodu Na¹³¹I jest stosowany w leczeniu zaburzeń tarczycy od kilkadziesiąt lat. Ponadto, [¹³¹I]I-MIBG (m-jodobenzylguanidyna) jest wykorzystywana w leczeniu guzów neuroendokrynnych, a [¹³¹I]I-Tositumomab (Bexaar®) w leczeniu chłoniaka nieziarniczego.¹¹⁴ Przeprowadzone zostały badania kliniczne I fazy, które miały na celu ustalenie dawki oraz ocenę skuteczności terapii zastępczej z zastosowaniem celującego w melaninę [¹³¹I]I-ICF01012 w leczeniu przerzutowego czerniaka złośliwego.¹¹⁶ Ponadto, zakończone zostały badania kliniczne I i II fazy, które określiły schematy dawkowania leku [¹³¹I]I-chTNT-1/B mAb (Cotara®). Cotara® wykorzystuje genetycznie zmodyfikowane chimeryczne przeciwciało monoklonalne, które wiąże się z kompleksem DNA–histon H1. Ponadto, badanie fazy II potwierdzające dawkę u pacjentów z glejakiem

wielopostaciowym wykazało obiecujące rezultaty. Czas całkowitego przeżycia pacjentów wyniósł 41 tygodni.¹¹⁷

¹⁵³Sm ma czas połowicznego zaniku wynoszący 1,93 dni i rozpada się poprzez emisję β^- o energii maksymalnej 810 keV oraz kwantu gamma o energii 103 keV. Związek ¹⁵³Sm z leksydronamem (EDTMP), ze względu na wysokie powinowactwo do kości, jest stosowany klinicznie w łagodzeniu przerzutowego bólu kości.¹¹⁴ Zastosowanie [¹⁵³Sm]Sm-EDTMP (Quadramet[®]) wiąże się ze zmniejszeniem bólu i ma niewiele skutków ubocznych. Leczenie jest na ogół dobrze tolerowane i może poprawić jakość życia pacjentów z przerzutowym rakiem kości.¹¹⁴ Ponadto, [¹⁵³Sm]Sm-EDTMP w połączeniu z bisfosfonianami, chemioterapią oraz radioterapią zapewnia lepsze efekty lecznicze zarówno w przypadku leczenia paliacyjnego, jak i leczenia nowotworów kościotwórczych (kostniakomięsak).¹¹⁸

Jednym z najważniejszych radioizotopów teranostycznych stosowanych w leczeniu chorób onkologicznych jest ¹⁷⁷Lu o czasie połowicznego rozpadu 6,73 dnia.¹¹⁹ Emituje on niskoenergetyczne cząstki β^- o energii maksymalnej 498 keV oraz kwanty gamma o energii odpowiedniej dla obrazowania metodą SPECT, 113 keV oraz 208 keV. [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTATATE (Lutathera[®]) jest środkiem zatwierdzonym przez FDA do celowanej terapii radionuklidowej guzów neuroendokrynnych.¹¹⁴ W 2022 roku zatwierdzona przez FDA została również terapia radionuklidowa z zastosowaniem [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 w leczeniu przerzutowego, opornego na kastrację raka prostaty.¹²⁰ Udowodniono także, że połączenie ¹⁷⁷Lu z chelatorem ukierunkowanym na kości – DOTMP tworzy bezpieczny radiofarmaceutyk, który skutecznie łagodzi ból związany z przerzutami do kości oraz znacząco poprawia jakość życia pacjentów z rakiem piersi, prostaty i nosogardła.¹²¹ W leczeniu przerzutowego bólu kości zastosowano także [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-ZOL, oparty na kwasie zoledronowym, który w badaniach klinicznych oceniających skuteczność osiągnął wskaźnik odpowiedzi na poziomie 90%.¹²² [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-E[c(RGDfK)]₂ wykazało korzyści kliniczne w postaci znacznej ulgi w bólu i zmniejszenia guza u pacjentów ze zróżnicowanym rakiem tarczycy, prezentujących podwyższony poziom tyreoglobuliny.¹²³ Ponadto, wykazano bezpieczeństwo leczenia chłoniaka z zastosowaniem przeciwciała znakowanego ¹⁷⁷Lu, [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-rituximab.¹²⁴ Zbadano również znakowane ¹⁷⁷Lu przeciwciała mające powinowactwo do receptora HER2. Wykazano specyficzną lokalizację koniugatu [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-trastuzumab zarówno w guzach pierwotnych jak i miejscach przerzutowych HER2-dodatniego raka piersi, co nie było obserwowane w przypadku pacjentów bez nadekspresji tego receptora.¹²⁵ Radionuklid ¹⁷⁷Lu został zastosowany również w radiosynowektomii. Jest to skuteczna metoda leczenia chorób zapalno-reumatoidalnych i zwyrodnieniowych stawów, która polega na dostawowym podaniu emiterów promieniowania β^- w postaci koloidalnej lub cząsteczkowej. Znakowany ¹⁷⁷Lu hydroksyapatyt (HA), [¹⁷⁷Lu]Lu-HA, podano pacjentom z reumatoidalnym zapaleniem stawów nadgarstka oraz stawów kolanowych i zaobserwowano znaczną poprawę stanu po 15 dniach od podania radiofarmaceutyku.^{119,126}

Radionuklid ¹⁸⁸Re ($T_{1/2}$ = 16,9 h) jest emiterem wysokoenergetycznych cząstek β^- o energii maksymalnej 2,12 MeV oraz kwantów gamma o energii 155 keV, które mogą być zastosowane w obrazowaniu metodą SPECT.¹¹⁴ Większość doświadczeń klinicznych z ¹⁸⁸Re dotyczy stosowania [¹⁸⁸Re]Re-1,1-hydroksyetylidenodifosfonianu ([¹⁸⁸Re]Re-HEDP) w celu łagodzenia bólu kości u pacjentów cierpiących na raka prostaty. Radiofarmaceutyk łagodzi ból u 60–92% pacjentów.¹²⁷ Znakowany ¹⁸⁸Re fragment peptydu analogu somatostatyny P2045 jest obecnie poddawany badaniom klinicznym w celu określenia maksymalnej tolerowanej dawki.¹²⁸ Ponadto, selektywne podanie radiofarmaceutyku [¹⁸⁸Re]Re-n-heksylodwuaminodithiol (HDD)-lipiodol do tętnic zaopatrujących guz wątroby wykazało dobry efekt przeciwnowotworowy przy minimalnych efektach ubocznych i uszkodzeniach otaczającej zdrowej tkanki

wątroby.^{127,129} Oprócz zastosowań w onkologii, ^{188}Re jest również wykorzystywany do radiosynowektomii opornego na leczenie zapalenia stawów.¹²⁷

Radionuklid ^{161}Tb o czasie półrozpadu 6,9 dni charakteryzuje się emisją niskoenergetycznych elektronów o energii maksymalnej 593 keV, a także emituje on znaczną ilość elektronów Auger i konwersji. Kation Tb^{3+} jest podobny chemicznie do Lu^{3+} , dzięki czemu zastosowane mogą być te same techniki znakowania.¹¹⁴ W obliczeniach dawki dostarczanej do komórek metodą Monte Carlo wykazano, że w przypadku pojedynczej komórki dawka dla jądra była znacznie wyższa w przypadku ^{161}Tb w porównaniu do ^{177}Lu .¹³⁰ Badania na myszach po zastosowaniu gromadzącego się w nerkach koniugatu DOTA-folian znakowanego ^{161}Tb nie wykazały zwiększonej toksyczności dla nerek w porównaniu z odpowiednikiem znakowanym ^{177}Lu . Dodatkową zaletą jest fakt, że koniugat ^{161}Tb -DOTA-folian nie wywoływał radionefropatii, co może być wynikiem emisji elektronów o krótkim zasięgu. Wykazano także, że ^{161}Tb -DOTA-LM3 był wielokrotnie skuteczniejszy w zmniejszaniu żywotności komórek nowotworowych AR42J niż jego odpowiednik znakowany ^{177}Lu . Tę samą obserwację poczyniono w przypadku ^{161}Tb -PSMA-617, który zmniejszał żywotność i przeżywalność komórek nowotworowych PC-3 PIP ponad dwukrotnie skuteczniej niż ^{177}Lu -PSMA-617. Osiągnięte rezultaty wynikają z faktu, że ^{161}Tb poza emisją niskoenergetycznego promieniowania β^- jest także wydajnym emitерem elektronów Auger i konwersji, co wiąże się z wyższym liniowym współczynnikiem przenoszenia energii.¹³¹

2.3.2. Terapia radionuklidowa z zastosowaniem emiterów promieniowania α

Rozpad alfa występuje głównie w jądrach cięższych nuklidów o liczbie atomowej większej lub równej 82. W wyniku tego rozpadu, jądro macierzyste przekształca się w lżejsze jądro potomne, emitując cząstkę α – jądro helu. Cząstki α są około 8000 razy większe od emitowanych w rozpadzie β^- elektronów, a w wyniku ich emisji uwalniana jest znaczna ilość energii (5 MeV - 9 MeV) na krótkim dystansie. Cząstki alfa charakteryzują się wysokim współczynnikiem liniowego transferu energii (*ang. Linear Energy Transfer, LET*) oraz niskim średnim zasięgiem w tkance, około dziesięciu komórek (50–100 μm). W porównaniu z emiterami β^- , emitery alfa zapewniają znacznie większą specyficzną zdolność do zabijania komórek nowotworowych bez uszkodzania otaczających zdrowych tkanek.^{113,132} Śmierć komórki spowodowana działaniem cząstki alfa nie zależy od fazy cyklu komórkowego oraz poziomu natlenienia, a uszkodzenie następuje najczęściej w wyniku dwuniciowego lub klastrowego pęknięcia DNA. Dzięki temu jest ono trudniejsze do naprawienia w porównaniu z uszkodzeniem wywołanym przez cząstki β^- , tym samym minimalizując ryzyko nawrotu choroby. Klinicznie skuteczne izotopy emitujące cząstki alfa do terapii nowotworowej powinny mieć krótki okres półtrwania, co ograniczy długotrwałą ekspozycję pacjentów na promieniowanie oraz umożliwi produkcję i przygotowanie radiofarmaceutyku. Dlatego emitery alfa, takie jak ^{225}Ac , ^{211}At , ^{213}Bi i ^{223}Ra mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu małych guzów oraz mikroprzerzutów.¹³²

^{223}Ra jest emitерem cząstek alfa o czasie połowicznego rozpadu 11,4 dni, który celuje w obszary zwiększonego obrotu kostnego w przerzutach kostnych. W wyniku rozpadu tego radionuklidu emitowane cztery cząstki alfa stanowią o całkowitej energii 27,8 MeV. Dichlorek radu [^{223}Ra] RaCl_2 (Xofigo[®]) był pierwszym tego typu radiofarmaceutykiem zatwierdzonym przez FDA oraz EMA do leczenia przerzutów kostnych w przerzutowym raku prostaty opornym na kastrację. Radiofarmaceutyk ten łagodzi ból i wydłuża życie średnio o 3,6 miesiąca. ^{223}Ra zdeponowany w macierzy kostnej śródmiąższowej emituje wysokoenergetyczne cząstki alfa, które indukują cytotoksyczne pęknięcia dwuniciowe DNA. ^{223}Ra działa poprzez mechanizm multimodalny, zabijając zarówno komórki nowotworowe, jak i komórki patologicznego metabolizmu kości, osteoblasty i osteoklasty.^{133,134} ^{223}Ra może również promować

miejscowe, immunologiczne odpowiedzi przeciwnowotworowe. Leczenie pacjentów z przerzutowym rakiem prostaty opornym na kastrację z zastosowaniem ^{223}Ra doprowadziło do opracowania ukierunkowanych terapii alfa innych nowotworów, które również przerzutują do kości.¹³⁵

Obiecującym emitery promieniowania α do zastosowań terapeutycznych jest ^{225}Ac o czasie półtrwania 10 dni. W wyniku jego rozpadu emitowane są cztery cząstki alfa i trzy cząstki β . Ponadto, krótko żyjące radionuklidy potomne, ^{221}Fr i ^{213}Bi są emiterymi kwantów γ o energii 218 i 440 keV. Ze względu na opisany schemat rozpadu istotne jest, aby zaprojektowany dla aktynu chelator tworzył stabilne kompleksy zarówno z aktynem, jak i produktami jego rozpadu, oraz aby energia odrzutu cząstek α nie rozrywała jego wiązań chemicznych wywołując tym samym dyfuzję produktów rozpadu do otaczających zdrowych tkanek.^{136,137} Niestety, obecne zasoby ^{225}Ac są niewystarczające dla jego powszechnego stosowania. Istnieje jedynie kilka ośrodków produkujących ten radionuklid. Głównymi dostawcami aktynu na potrzeby testów przedklinicznych i badań klinicznych są Joint Research Center (JRC) w Karlsruhe oraz Oak Ridge National Laboratory (ORNL) w Oak Ridge, Tennessee. JRC produkuje około 13 GBq ^{225}Ac , a maksymalna roczna produkcja ^{225}Ac w ORNL wynosi około 33 GBq.¹³⁸ Edotreotyd (DOTATOC) oraz oksdotreotyd (DOTATATE) są analogami somatostatyny, które selektywnie celują i wiążą się z receptorem SSTR2. Oceniono skuteczność leczenia guzów neuroendokrynnych z zastosowaniem [^{225}Ac]Ac-DOTATOC oraz [^{225}Ac]Ac-DOTATATE. Wykazano, że [^{225}Ac]Ac-DOTATOC skuteczniej hamował wzrost guzów neuroendokrynnych na modelu mysim w porównaniu z [^{177}Lu]Lu-DOTATOC. W badaniach klinicznych wyznaczona została maksymalna dawka dla pojedynczego cyklu [^{225}Ac]Ac-DOTATOC na 40 MBq radiofarmaceutyku.¹³⁹ Udowodniono również, że pojedyncza dawka 9,8 MBq [^{225}Ac]Ac-DOTATOC powoduje częściową remisję u pacjentów z guzami neuroendokrynnymi trzustki i przerzutami do wątroby, którzy byli oporni na leczenie [^{177}Lu]Lu-DOTATATE.¹⁴⁰ W testach przedklinicznych na myszach, pojedyncze podanie [^{225}Ac]Ac-DOTATATE spowodowało znaczne opóźnienie wzrostu guza u myszy z indukowanym SSTR2-pozytywnym rakiem płuca w porównaniu z grupą kontrolną.¹⁴¹ Badania kliniczne [^{225}Ac]Ac-DOTATATE na pacjentach z przerzutowymi guzami neuroendokrynnymi, których wcześniej poddano leczeniu [^{177}Lu]Lu-DOTATATE, wykazały po 8-miesięcznej obserwacji częściową remisję i stabilizację bez progresji lub zgonu. Ponadto, w innym badaniu klinicznym na pacjentach z guzami neuroendokrynnymi z nadekspresją receptorów SSTR wykazano poprawę długości przeżycia oraz niewielką toksyczność związaną z leczeniem. Ponadto, kilka raportów wykazało całkowitą remisję choroby u pacjentów leczonych [^{225}Ac]Ac-DOTATATE.¹⁴² Jednakże, zarówno [^{225}Ac]Ac-DOTATOC, jak i [^{225}Ac]Ac-DOTATATE wykazywały nefrotoksyczność przy dużych dawkach, co przypisano ich znacznej akumulacji w nerkach.¹⁴³

Radionuklid ^{225}Ac zastosowano również do znakowania PSMA (antygen błonowy specyficzny dla prostaty), specyficznego białka występującego na powierzchni komórek raka prostaty. W badaniach klinicznych oceniających skuteczność przeciwnowotworową [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 uzyskano bardzo dobry efekt terapeutyczny w postaci całkowitej remisji u 10% pacjentów, z przypadkami pacjentów osiągających przeżycie bez nawrotu choroby, z czasem odpowiedzi wynoszącym 10-15 miesięcy.^{144,145} [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 jest skuteczną i bezpieczną opcją leczenia dla pacjentów z przerzutowym rakiem prostaty opornym na kastrację. Konieczne są dalsze randomizowane badania kliniczne w celu oceny efektów terapeutycznych w porównaniu z istniejącymi metodami leczenia.¹⁴⁶

Substancja P (SP) jest fizjologicznym ligandem receptora neurokininy-1, który wykazuje silną nadekspresję w komórkach glejaka. Opracowano protokół syntezy radiofarmaceutyku [^{225}Ac]Ac-DOTA-SP oraz zbadano jego wpływ na linie komórek ludzkiego glejaka. Wykryto znaczącą, zależną od dawki redukcję żywotności komórek w teście klonogennym oraz indukcję szlaków późnej

apoptozy.¹⁴⁷ [²²⁵Ac]Ac-DOTAGA-SP została podana bezpośrednio do guza pacjentom w celu leczenia nawracającego GBM. W badaniach klinicznych fazy I i II, celowana terapia alfa złośliwych glejaków poprzez miejscowe podanie [²²⁵Ac]Ac-DOTAGA-SP okazała się korzystna w porównaniu z terapią standardową. Ponadto, zaobserwowano jedynie łagodne i tymczasowe działania niepożądane. Sposób podania koniugatów powinien być jednak zoptymalizowany poprzez opracowanie cewników ograniczających przepływ wsteczny oraz pozwalających na kontrolowanie oporu oraz ciśnienia wewnątrzguzowego.¹⁴⁸

Białko aktywacji fibroblastów (FAP) jest celem terapeutycznym, który wykazuje silną nadekspresję na fibroblastach związanych z niektórymi komórkami nowotworowymi. Wykazano, że [²²⁵Ac]Ac-FAPI-04 znacząco hamowało wzrost guza, nie powodując przy tym znacznej utraty masy ciała, u myszy z indukowanymi guzami trzustki. Zaobserwowano jednak zbyt szybki klirens związku z guza, dlatego w celu poprawy retencji opracowano FAPI-46.^{149,150} Zbadano skuteczność przeciwnowotworową [²²⁵Ac]Ac-FAPI-46 w monoterapii lub w połączeniu z blokadą punktów kontrolnych układu odpornościowego na mysim modelu mięsaków. Wykazano skuteczność terapeutyczną koniugatu, zależną od ekspresji FAP w guzie.¹⁵¹ Jednakże, w innym badaniu wykazano wysoką akumulację [²²⁵Ac]Ac-FAPI-46 w wątrobie przy ograniczonych efektach terapeutycznych w porównaniu z [¹⁷⁷Lu]Lu-FAPI-46 oraz z grupą kontrolną.¹⁵²

Radionuklid ²¹³Bi posiada okres półtrwania wynoszący 45,6 min i wykazuje rozgałęziony rozpad (rozpad β^- i α), gdzie większość emitowanych przez niego cząstek α pochodzi z gałęzi β^- . W celu dostarczenia ²¹³Bi do zastosowań klinicznych, wykorzystuje się radionuklid ²²⁵Ac do utworzenia generatora ²²⁵Ac/²¹³Bi. Układ ten został opracowany w JRC Karlsruhe. Generatory charakteryzują się wysoką wydajnością elucji ²¹³Bi, powyżej 80% oraz niskim wymywaniem radionuklidu macierzystego. Radiofarmaceutyki znakowane ²¹³Bi były podawane zarówno doguzowo, jak i ogólnoustrojowo. Znalazły one zastosowanie w leczeniu pacjentów cierpiących na białaczkę, chłoniaka, czerniaka, raka pęcherza moczowego, glejaka i guzy neuroendokrynne.¹⁵³ Przeprowadzono badanie oceniające skuteczność leczenia koniugatem ²¹³Bi-anty-EGFR zawierającym przeciwciało monoklonalne blokujące działanie receptora epidermalnego czynnika wzrostu u pacjentów z opornym nowotworem *in situ*. Podanie [²¹³Bi]Bi-anty-EGFR o aktywności 366 - 821 MBq było tolerowane bez działań niepożądanych. U czterech pacjentów zaobserwowano całkowitą odpowiedź, tj. brak widocznego guza, osiem tygodni po zakończeniu leczenia.¹⁵⁴ Radionuklid ²¹³Bi zastosowano również w celu leczenia glejaka znakowanym koniugatem DOTA-Substancja P. W badaniu klinicznym koniugat [²¹³Bi]Bi-DOTA-Substancja P podawano do guza mózgu lub jamy guza, za pomocą cewnika, w aktywnościach nie przekraczających 14,1 GBq. Badanie nie wykazało żadnych poważnych skutków ubocznych, a mediana czasu przeżycia wynosiła 7,5 miesiąca. Ponadto, u kilku pacjentów wystąpiła całkowita remisja.¹⁵⁵ Zbadano także skuteczność leczenia guzów neuroendokrynnych z zastosowaniem [²¹³Bi]Bi-DOTATOC poprzez wstrzyknięcie śródtętnicze do tętnicy wątrobowej. Terapia doprowadziła do znacznej liczby długotrwałych odpowiedzi, w tym jednej całkowitej remisji.¹⁵⁶ Przeprowadzono również leczenie pacjenta z postępującym, przerzutowym opornym na kastrację rakiem prostaty przy użyciu [²¹³Bi]Bi-PSMA-617. Pacjent był leczony dwoma cyklami [²¹³Bi]Bi-PSMA-617 o łącznej aktywności 592 MBq. Po 11 miesiącach wykazano bardzo dobrą odpowiedź zarówno w obrazowaniu molekularnym, jak i w badaniach biochemicznych poziomu antygenu swoistego dla prostaty.¹⁵⁷

Radionuklid ²¹¹At posiada czas półrozpadu 7,2 h i charakteryzuje się emisją jednej cząstki alfa na rozpad.¹⁵⁸ Jony [²¹¹At]astatkowe posiadają podobne właściwości chemiczne do jonów [¹³¹I]jodkowych, co wskazuje na możliwość ich zastosowania w radioterapii wewnętrznej. Przeprowadzono badania

przedkliniczne, w których dożylnie podawano myszom roztwory $\text{Na}^{[211]\text{At}]\text{At}}$. Nie wykazano żadnych poważnych skutków ubocznych. Dodatkowo, udowodniono, że $\text{Na}^{[211]\text{At}]\text{At}}$ indukuje więcej dwuniciowych pęknięć DNA i skuteczniej zmniejsza tworzenie kolonii niż $\text{Na}^{[131]\text{I}]\text{I}}$.¹⁵⁹ Ponadto, m- $^{[211]\text{At}]\text{astato}}\text{benzylguanidyna}$ wykazała bardzo dużą skuteczność terapeutyczną w badaniach przeklinicznych na myszach z wszczepiony guzem chromochłonnym. W efekcie terapii, po 3 tygodniach guzy zmniejszyły się 53-krotnie w porównaniu z grupą kontrolną.¹⁶⁰

Radionuklid ^{211}At zastosowano również do znakowania pochodnej bisfosfonianów 3- $^{[211]\text{At}]\text{astato}}\text{-benzamid-N-3-hydroksypropylideno-3,3-bisfosfonianu}$ ($^{[211]\text{At}]\text{ABPB}}$). Związek ten wykazał wysoką stabilność *in vivo*, dobre wchłanianie przez kości i szybkie usuwanie z krwi.¹⁶¹ Oceniono także efektywność terapeutyczną znakowanej ^{211}At cząsteczki PSMA. Udowodniono, że $^{[211]\text{At}]\text{At-PSMA5}}$ doskonale hamuje wzrost guza z komórek LNCaP u myszy, nie wywołując znaczącej utraty masy ciała.¹⁶² Radionuklid ^{211}At zastosowano także do znakowania pochodnych peptydów RGD w celu oceny skuteczności leczenia glejaka. $^{[211]\text{At}]\text{c[RGDf(4-At)K]}}$ podano myszom z guzem U87MG i udowodniono wysoki wychwyt związku przez guza oraz równoważną biodystrybucję radioaktywności. Ponadto, $^{[211]\text{At}]\text{At-FAPI-04}}$ wykazało szybkie i specyficzne wiązanie do komórek U87MG z nadekspresją FAP. Związek hamował wzrost guza U87MG u myszy w sposób zależny od dawki nie wykazując znacznej toksyczności.¹⁶³

2.3.3. Terapia z zastosowaniem emiterów elektronów Auger

Terapia radionuklidowa z zastosowaniem radionuklidów emitujących elektrony Augera może wykazywać podobną skuteczność terapeutyczną jak cząstki α w przypadku niewielkich nowotworów, przy mniejszym ryzyku toksyczności dla zdrowych tkanek. Elektrony Augera (AE) to elektrony o bardzo niskiej energii, w większości poniżej 25 keV, które są emitowane przez radionuklidy rozpadające się na drodze wychwytu elektronu m. in. ^{111}In , ^{125}I i ^{123}I , $^{195\text{m}}\text{Pt}$, $^{193\text{m}}\text{Pt}$, ^{191}Pt , ^{103}Pd , $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.¹⁶⁴

Te posiadające wysokie LET elektrony zostały po raz pierwszy niezależnie opisane przez Lise Meitner w 1922 r.¹⁶⁵ oraz Pierre'a Augera w 1923 r.¹⁶⁶ W wyniku indukcji padającym promieniowaniem rentgenowskim lub w wyniku rozpadu poprzez wychwyt elektronów oraz konwersję wewnętrzną radionuklidy o wysokiej liczbie atomowej emitują serię elektronów Augera w wyniku zjawiska nazywanego efektem Augera. Efekt Augera opisuje proces, w którym puste miejsce w wewnętrznym orbitalu elektronowym jest zapełniane przez elektron z wyższej powłoki, posiadający niższą energię wiązania. Różnica energii wynikająca z tego przejścia jest emitowana jako charakterystyczne promieniowanie X lub przenoszona na inny elektron, który jest następnie wyrzucany z atomu. Jeśli wyrzucony elektron pochodzi z tego samego głównego poziomu energetycznego jest on nazywany elektronem Augera, natomiast gdy pochodzi on z wyższej powłoki nazywa się go elektronem Costera-Kroniga. Elektrony Augera i Costera-Kroniga są zbiorczo nazywane elektronami Augera. Energia elektronów Augera emitowana jest na odległościach nanometrowych, co skutkuje wysokim liniowym transferem energii i umożliwia indukowanie śmiertelnych uszkodzeń komórek, dlatego radiofarmaceutyki oparte na AE mają duży potencjał w leczeniu nowotworów. Ze względu na krótki, nanometrowy zasięg AE emitowanych kaskadowo, większość z nich skutkuje wysokim LET między 1 a 23 keV/ μm , co jest potencjalnie bardzo skuteczne w powodowaniu śmiertelnych uszkodzeń w komórkach nowotworowych, szczególnie w ich DNA oraz błonie komórkowej. Ponadto większość radionuklidów emitujących AE emituje niewielką liczbę elektronów IC, o wyższych energiach i zasięgu do kilku milimetrów, zapewniając efekt o większym zasięgu. AE wykazują największą cytotoksyczność, gdy są emitowane w pobliżu jądra komórkowego, a zwłaszcza

po włączeniu się do DNA i powodują jego uszkodzenia bezpośrednio oraz pośrednio poprzez radiolizę wody.^{164,167} Bezpośrednie uszkodzenie DNA może być spowodowane poprzez przejście AE przez podwójną helisę DNA. Alternatywnie, pośrednie uszkodzenie DNA może być spowodowane przez reaktywne rodniki hydroksylowe, które są generowane w wyniku radiolizy wody. Kaskada elektronów i wynikająca z niej lokalna generacja wolnych rodników może skutkować utworzeniem skoncentrowanego regionu uszkodzeń makrocząsteczkowych, co może skutkować śmiercią komórki m. in. poprzez apoptozę lub katastrofę mitotyczną.³

¹¹¹In jest jednym z najważniejszych i najczęściej stosowanych radionuklidów w diagnostycznej medycynie nuklearnej. Rozpada się w procesie wychwytu elektronu z czasem połowicznego zaniku wynoszącym 2,8 dnia. Jest także emitерem wysokiej intensywności kwantów γ o energii 171,3 keV oraz 245,4 keV. Radionuklid ¹¹¹In emituje średnio 14,7 elektronów Augera na rozpad, o średniej energii wynoszącej 6,88 keV. Ponadto, emitowane są także średnio 0,2 elektrony konwersji o średniej energii 27,94 keV na rozpad.^{168,169} Reily i współ. zbadali [¹¹¹In]In-DTPA-hEGF celujący w EGFR-pozytywnego raka piersi i wykazali, że szybko wiąże się on do receptora i internalizuje do wnętrza komórek oraz ich jądra w ciągu 24 godzin. Po dożylnym podaniu [¹¹¹In]In-DTPA-hEGF myszom z guzami indukowanymi z komórek MDA-MB-468 zaobserwowano znaczące hamowanie wzrostu guza bez toksyczności dla wątroby oraz nerek.¹⁷⁰ W badaniu klinicznym na pacjentach z EGFR-dodatnim przerzutowym rakiem piersi, które oceniało wychwyt [¹¹¹In]In-DTPA-hEGF przez guz i tkanki prawidłowe wykazano gromadzenie się radiofarmaceutyku zarówno w pierwotnym guzie, jak i w ogniskach przerzutowych u około połowy pacjentów. Przy podanych dawkach nie stwierdzono toksyczności hematopoetycznej, nerkowej ani wątrobowej. Jednakże, stwierdzono działania niepożądane takie jak zaczerwienienie, dreszcze, nudności i wymioty, które były związane z podaniem fragmentu hEGF.¹⁷¹ Ważną właściwością, która zwiększa cytotoksyczność wywołowaną przez elektrony Augera jest lokalizacja radiofarmaceutyku w jądrze. Fasih i współ. zmodyfikowali koniugat [¹¹¹In]In-nimotuzumab poprzez przyłączenie peptydu zawierającego sekwencję lokalizacji jądrowej (CGYGPKKKRKVGG, NLS) i zbadali jego cytotoksyczność względem EGFR-pozytywnych komórek raka piersi. Modyfikacja z zastosowaniem NLS zwiększyła wychwyt jądrowy 2-krotnie w komórkach raka piersi MDA-MB-468 w porównaniu do [¹¹¹In]In-nimotuzumabu bez NLS. Ponadto, [¹¹¹In]In-NLS-nimotuzumab był 7-krotnie skuteczniejszy w zmniejszaniu przeżywalności komórek oraz powodował 2-krotnie więcej dwuniciowych pęknięć DNA.¹⁷² Constantini i współ. wykazali, że [¹¹¹In]In-DTPA-NLS-trastuzumab specyficznie wiąże się oraz internalizuje do jądra komórek HER2-dodatniego raka piersi.¹⁷³ Wykazano wysoki wychwyt [¹¹¹In]In-DTPA-NLS-trastuzumabu przez guza u myszy z wszczepionym ludzkim HER-2 pozytywnym rakiem piersi z komórek MDA-MB-361. Leczenie myszy z guzami MDA-MB-361 dwiema dawkami [¹¹¹In]In-DTPA-NLS-trastuzumabu znacząco wydłużyło ich przeżycie w porównaniu do grup kontrolnych.¹⁷⁴ Chen i współ. zastosowali ¹¹¹In do znakowania mysich (M195) i humanizowanych (HuM195) przeciwciał monoklonalnych anty-CD33 modyfikowanych NLS. [¹¹¹In]In-NLS-HuM195 wykazywało dwukrotnie większą skuteczność niż [¹¹¹In]In-HuM195 bez NLS w zabijaniu komórek ludzkiej białaczki szpikowej HL-60 *in vitro* oraz zmniejszało klonogeniczne przeżycie pierwotnych próbek białaczki szpikowej u pacjentów z ekspresją CD33.¹⁷⁵ Capello i współ. zbadali [¹¹¹In]In-DTPA-oktreotyd w leczeniu guzów neuroendokrynnych metodą terapii radionuklidowej receptora peptydowego (PRRT). Badania *in vitro* na szczurzych komórkach guza trzustki wykazały bardzo wysoką cytotoksyczność związku. Przeżywalność komórek spadła do 0% podczas gdy nieznakowany oktreotyd powodował zmniejszenie populacji komórek żywych do 40%. W badaniu *in vivo* na szczurach z guzami CA20948 wykazano całkowitą lub częściową odpowiedź na terapię w zależności od wielkości guza. Przeprowadzone zostało również kilka badań klinicznych z zastosowaniem [¹¹¹In]In-DTPA-oktreotyd.

Badano pacjentów z zaawansowanymi SSTR-2 dodatnimi nowotworami neuroendokrynnymi. W badaniach tych zaobserwowano stabilizację choroby lub zmniejszenie rozmiaru guza, a w przypadku jednego pacjenta częściową remisję.¹⁷⁶ Ponadto, w badaniach klinicznych oceniano również skuteczność leczenia pacjentów z nieoperacyjnymi SSTR-2 dodatnimi przerzutami do wątroby poprzez podanie [¹¹¹In]In-DTPA-oktreotyd przez tętnicę wątrobową. U większości pacjentów zaobserwowano częściową remisję lub stabilizację choroby, a u jednego pacjenta uzyskano całkowitą odpowiedź.¹⁷⁷

¹²⁵I jest jednym z najczęściej stosowanych radioizotopów do badania uszkodzeń DNA indukowanych elektronami Augera *in vivo* i *in vitro*. ¹²⁵I o czasie połowicznego rozpadu 59,4 dni rozpada się poprzez wychwyt elektronu. Emituje on 24,9 elektronów Augera na rozpad o średniej energii 12,24 keV oraz średnio 0,9 elektronów konwersji o średniej energii 7,3 keV na rozpad.^{168,169} Jododeoksyurydyna (IUdR) jest analogiem nukleozydu, który jest bezpośrednio włączany do DNA. Dzięki temu znakowany ¹²⁵I koniugat [¹²⁵I]IUdR, który emituje elektrony Augera w pobliżu jądra komórkowego i powoduje powstawanie dwuniciowych pęknięć DNA, prowadząc do aberracji chromosomowych i wywołując wysoką cytotoksyczność.¹⁷⁸ Sobolev i współ. zbadali natomiast modułowe nanotransportery (MNT) będące rekombinowanymi wielofunkcyjnymi polipeptydami przeznaczonymi do dostarczania radionuklidów, np. ¹²⁵I do jądra komórkowego.¹⁷⁹ Slastnikova i współ. wykazali w badaniach *in vitro*, że [¹²⁵I]SGMIB-MNT ukierunkowane na EGFR skutecznie transportowały ponad 60% zinternalizowanej radioaktywności do jądra komórek ludzkiego raka skóry A431 i glejaka wielopostaciowego D247 MG po 1 godzinie inkubacji. Cytotoksyczność koniugatu była większa dla komórek A431 wykazujących nadmierną ekspresję EGFR.¹⁸⁰ W badaniach prowadzonych przez Pouget i współ. wykazano, że lokalizacja koniugatu w jądrze może nie być bezwzględny wymogiem dla cytotoksycznych efektów emiterów elektronów Augera. Wykorzystując znakowane ¹²⁵I przeciwciała monoklonalne ukierunkowane na różne elementy komórki nowotworowej, tj. na błonę, cytoplazmę oraz jądro komórkowe, udowodniono, że zmniejszenie przeżywalności klonogenicznej komórek ludzkiego raka płaskonabłonkowego sromu A-431 i ludzkiego raka jajnika SKOV-3 było istotnie większe w przypadku lokalizacji błonowej niż cytoplazmatycznej.¹⁸¹ Santoro i współ. wykazali, że znakowane ¹²⁵I przeciwciała monoklonalne anty-CEA ([¹²⁵I]I-35A7) znacząco zwiększyły przeżywalność u myszy nagich z wewnątrznaczyniowymi EGFR-pozytywnymi ksenograftami płaskonabłonkowego raka sromu. Efekt ten był znacząco mniejszy w przypadku zastosowania znakowanych ¹²⁵I internalizujących przeciwciał monoklonalnych anty-EGFR i odpowiadających im nieoznakowanych przeciwciał monoklonalnych. Nie zaobserwowano jednak liniowej zależności dawka-efekt pomiędzy obserwowaną odpowiedzią biologiczną, a pochłoniętą dawką zdeponowaną przez znakowane przeciwciała, co wskazuje na możliwość indukowania przez ¹²⁵I lokalnych uszkodzeń błony komórkowej.^{182,183} Rebischung i współ. wykonali dokanałowe wstrzyknięcie [¹²⁵I]IUdR u pacjenta z zaawansowanym rakiem trzustki z opornym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. Pacjentowi przed i po wstrzyknięciu 1,85 GBq [¹²⁵I]IUdR podano metotreksat. Leczenie przyniosło poprawę kliniczną, bez toksyczności dla ośrodkowego układu nerwowego. Wystąpił jednak nawrót choroby.¹⁸⁴ Li i współ. przeprowadzili badanie kliniczne przeciwciała monoklonalnego anty-EGFR 425 znakowanego ¹²⁵I ([¹²⁵I]I-mAb 425) z maksymalną skumulowaną aktywnością 5,4 GBq w leczeniu glejaka wielopostaciowego. Mediana całkowitego przeżycia pacjentów, którzy otrzymywali wyłącznie [¹²⁵I]I-mAb 425, wyniosła 14,5 miesiąca, a dla pacjentów, którzy otrzymywali [¹²⁵I]I-mAb 425 i chemioterapię temozolomidem, całkowita mediana przeżycia wyniosła 20,4 miesiąca.¹⁸⁵

¹⁶¹Tb to radionuklid o okresie półtrwania wynoszącym 6,89 dnia, który emituje łącznie 0,9 elektronu Augera na rozpad ze średnią energią wynoszącą 5,7 keV oraz 1,4 elektrony konwersji na rozpad ze średnią energią 36,7 keV na rozpad. ¹⁶¹Tb emituje również cząstki β⁻ o średniej energii 155 keV oraz fotony γ

o energii 49 keV i 75 keV odpowiednie do obrazowania SPECT. Może być więc zastosowany w teranostyce.¹⁸⁶ Müller i współ. wykazali, że [¹⁶¹Tb]Tb-PSMA-617 był skuteczniejszy w niszczeniu PSMA-pozytywnych komórek nowotworowych PC-3 PIP niż PSMA-617 znakowany β-emiterem, [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. W badaniach przedklinicznych, leczenie [¹⁶¹Tb]Tb-PSMA-617 myszy z guzem z komórek PC-3 PIP spowodowało opóźnienie wzrostu guza i wydłużenie czasu przeżycia. Efekty hamujące wzrost nowotworu były bardziej widoczne u myszy leczonych [¹⁶¹Tb]Tb-PSMA-617 w porównaniu z [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617.¹⁸⁷ Ponadto, rozpoczęto analizę [¹⁶¹Tb]Tb-DOTATOC jako potencjalnego środka teranostycznego. W tym celu przeprowadzono obrazowanie scyntygraficzne oraz SPECT/CT u pacjentów z przerzutowymi nowotworami neuroendokrynnymi. Badanie wykazało możliwość obrazowania małych przerzutów przy niskiej aktywności promieniotwórczej z zastosowaniem scyntyigrafii SPECT/CT.¹⁸⁸ Wharton i współ. opracowali wydajną metodę znakowania ¹⁶¹Tb nowego układu peptyd-koniugatu crown-TATE. Wykazano doskonały kontrast obrazowania guza *in vivo* przy minimalnym wychwycie narządów. Obecnie prowadzone także są badania efektywności terapeutycznej koniugatu [¹⁶¹Tb]Tb-crown-TATE.¹⁸⁹

2.4. Rtęć

Rtęć jest metalem grupy głównej o konfiguracji elektronowej [Xe]4f¹⁴5d¹⁰6s². Charakteryzuje się liczbą atomową 80 oraz średnią masą atomową 200,59 g/mol. Rtęć znajduje się w dwunastej grupie układu okresowego i należy do grupy cynkowców. Jest gęstą, srebrzystobiałą cieczą o bardzo niskiej temperaturze topnienia (-38,83°C), której przyczyną są składowe konfiguracji elektronowej, efekty relatywistyczne i kontrakcja lantanowców.¹⁹⁰ Rtęć jest naturalnie występującym pierwiastkiem o stężeniu w skorupie ziemskiej około 80 µg/kg i 0,3 ng/l w wodzie morskiej.¹⁹¹ Naturalnie występująca rtęć składa się z siedmiu stabilnych izotopów, z których najbardziej powszechnym jest ²⁰²Hg. Skład izotopowy naturalnej rtęci przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. IV).¹⁹²

Tab. IV. Skład izotopowy naturalnie występującej rtęci.¹⁹²

Izotop	Abudancja
¹⁹⁶ Hg	0,155 ± 0,004
¹⁹⁸ Hg	10,038 ± 0,010
¹⁹⁹ Hg	16,938 ± 0,009
²⁰⁰ Hg	23,138 ± 0,006
²⁰¹ Hg	13,170 ± 0,012
²⁰² Hg	29,743 ± 0,009
²⁰⁴ Hg	6,818 ± 0,006

Rtęć pierwiastkowa ma zdolność tworzenia amalgamatu z wieloma metalami, takimi jak złoto, srebro, miedź i cyna, co spowodowało, że była ona szeroko stosowana w przemyśle. Amalgamacja złota została po raz pierwszy opisana przez Witruwiusza już w I wieku p.n.e. Starożytny proces złocenia obejmował stosowanie amalgamatu rtęci i złota. Płynna rtęć była używana do ekstrakcji i oczyszczania złota oraz przeprowadzania procesu złocenia. Proces amalgamacji rtęci z cyną pozwolił również na produkcję wysokiej jakości luster.^{193,194} Dentystyczne wypełnienia amalgamatowe zawierające około 50% rtęci były stosowane w stomatologii przez prawie 200 lat.¹⁹⁵ Właściwości i zachowanie rtęci zależą od jej stopni

utlenienia, występuje ona w formie pierwiastkowej Hg^0 (0), kationów Hg^{2+} (+II) i Hg^+ (+I) oraz w postaci związków rtęcioorganicznych.¹⁹⁰ Jon Hg^{2+} tworzy silniejsze wiązania z atomami S, P i N w porównaniu z jakimkolwiek innym metalem dwuwartościowym. Jest on klasyfikowany jako miękki jon, preferujący koordynację przez ligandy charakteryzujące się miękkimi grupami funkcyjnymi, takimi jak grupy tiolowe oraz sulfidowe. Powinowactwo to wykorzystywane jest np. w leczeniu zatrucia rtęcią.¹⁹⁶

Dzięki konfiguracji elektronowej kationu Hg^{2+} geometrie tworzonych kompleksów mogą się znacznie różnić.^{197,198} Ponadto, ze względu na brak preferencyjnego wiązania, dużą średnicę koordynacyjną i szybką wymianę ligandów, Hg^{2+} wykazuje kilka różnych liczb koordynacyjnych i geometrii, gdy jest związany z tymi samymi ligandami. Rtęć może przyjmować trzy struktury koordynacyjne: liniową, diagonalną, trygonalną płaską oraz tetraedryczną.^{199, 169}

Istnieje niewiele środków, które można stosować do związania rtęci, a większość z nich opiera się na związkach tiolowych. Wyróżniają się wśród nich kwas dimerkaptobursztynowy (DMSA) i kwas dimerkaptopropanosulfonowy (DMPS). Jednakże, DMSA ani DMPS nie tworzą prawdziwych kompleksów chelatowych z jonami rtęci, zamiast tego powstają struktury pierścieniowe, w których między dowolnym konkretnym jonom Hg^{2+} a tiolanem tworzy się tylko jedno wiązanie Hg-S .¹⁹⁹

2.4.1. Rtęć w medycynie

Unikalne właściwości chemiczne i fizyczne tego pierwiastka fascynują ludzi od ponad 3500 lat i doprowadziły do jego powszechnego wykorzystania w sztuce, nauce, religii, przemyśle, rolnictwie oraz medycynie.¹⁹⁴ Pierwsza datowana wzmianka o zastosowaniu rtęci w leczeniu pochodzi od Hipokratesa, gdzie została ona zastosowana jako składnik maści. W późniejszym okresie, rtęć stosowano w leczeniu kiły. Na liście leków stosowanych w XII wieku podano rtęć jako maść leczącą świerzb, której opary mogą powodować skutki uboczne. Rtęć stosowano również w medycynie Islamu oraz w Indiach, co miało swoje korzenie w alchemii.²⁰⁰ Przez kilkaset lat była ona również lekiem z wyboru w leczeniu kiły. Pomimo wprowadzenia penicyliny w 1943 roku, stosowania rtęci zaprzestano dopiero w połowie XX wieku.¹⁹⁴ Ponadto, w XX wieku związki rtęciowe były wciąż stosowane jako leki moczopędne, maści, środki antyseptyczne i środki antykoncepcyjne. Dopiero od 1998 roku FDA zakazała stosowania rtęci w środkach antyseptycznych.^{201,202}

Jednakże, rtęć od dawna była popularnym wyborem w przypadku amalgamatów dentystycznych.²⁰³ Związki rtęci mają właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, dlatego są stosowane jako środki konserwujące lub antyseptyczne w farbách, kosmetykach, lekach i szczepionkach. Na przykład tiomersal jest związkiem zawierającym rtęć, stosowanym jako środek konserwujący w szczepionkach przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, błonicy, krztuścowi, bezkomórkowemu krztuścowi i tężcowi.^{201,202}

2.4.2. Radionuklidy rtęci

W oparciu o potencjalne dawki terapeutyczne, do wywołania efektu radioterapeutycznego potrzebne są jedynie śladowe ilości (od nano- do mikrogramów) radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$. Wartości te znajdują się znacznie poniżej bezpiecznego limitu stężenia rtęci we krwi, które w Europie wynosi 1,6 $\mu\text{g/kg}$ masy ciała. Toksyczność rtęci jest widoczna dopiero dla stężeń przekraczających 25 $\mu\text{g/kg}$ masy ciała. W związku z tym, nie istnieje ryzyko zatrucia rtęcią spowodowane stosowaniem proponowanej w pracy metody leczenia.¹⁶⁹

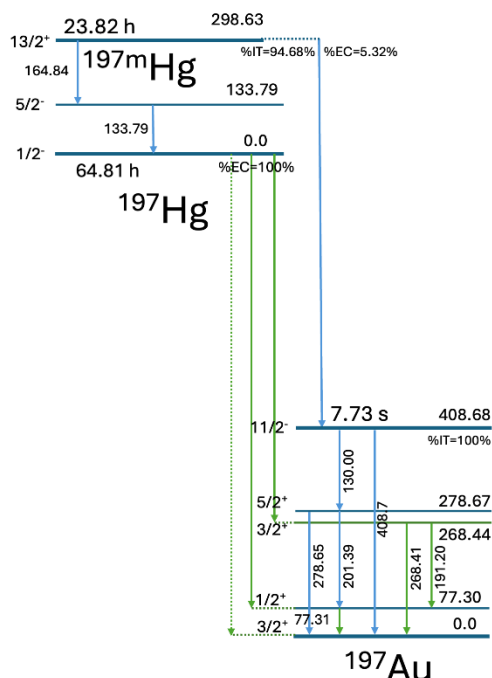
Rtęć posiada liczne zaobserwowane radioaktywne izotopy o liczbach masowych 170-211, z których najważniejsze z punktu widzenia zastosowań w medycynie i przemyśle przedstawiono w Tab. V.²⁰⁴

Tab. V. Najczęściej badane radioaktywne izotopy rtęci.²⁰⁴

Radionuklid	Sposób rozpadu	Czas połowicznego rozpadu
¹⁹⁵ Hg	wychwyt elektronu, β^+	10,68 h
^{195m} Hg	konwersja wewnętrzna, wychwyt elektronu, β^+	41,60 h
¹⁹⁷ Hg	wychwyt elektronu, β^+	64,96 h
^{197m} Hg	konwersja wewnętrzna, wychwyt elektronu, β^+	23,82 h
^{199m} Hg	konwersja wewnętrzna	42,66 min
²⁰³ Hg	β^-	46,61 dni

Radionuklidy ^{195m/195}Hg zostały zastosowane przez Elliott i współ. do utworzenia generatora ^{195m/195}Hg/¹⁹⁵Au do zastosowania w angiokardiografii. Generator zapewnił wysoką aktywność właściwą eluowanego radionuklidu, a wyciek ^{195m/195}Hg oceniono na minimalny.²⁰⁵ Ponadto, radionuklid ^{199m}Hg był badany pod kątem zastosowania jako potencjalny radiofarmaceutyk w obrazowaniu guzów płuc.²⁰⁶ Natomiast najczęściej stosowanym w badaniu układów środowiskowych radioznacznikiem rtęci jest ²⁰³Hg. Matilainen i współ. analizowali zachowanie rtęci w profilach glebowych, wpływ zwiększonych opadów oraz kwasowości i nawożenia na metylację rtęci poprzez zastosowanie [²⁰³Hg]HgCl₂.^{207,208} Związek [²⁰³Hg]HgCl₂ znalazł zastosowanie w monitorowaniu dystrybucji i akumulacji rtęci w ciele, jak na przykład skutki długotrwałego codziennego przyjmowania rtęci, wpływ na jej wydalanie oraz zatrzymanie w całym ciele, stężenie rtęci we krwi oraz jej uwalnianie i dystrybucję z wypełnień amalgamatowych w organizmie matki i płodu.^{206,209,210} W przeszłości stosowano chlormerodrynę znakowaną ²⁰³Hg do oceny struktury i funkcji nerek w celu scyntygraficznej diagnostyki zmian nowotworowych.²¹¹

Najwięcej zastosowań zarówno w przemyśle, jak i medycynie znajdują radionuklidy ^{197m/197}Hg. Rtęć-197 występuje w dwóch stanach energetycznych: ¹⁹⁷Hg oraz ^{197m}Hg, które prowadzą do dwóch odrębnych ścieżek rozpadu (Rys. 4). Stan podstawowy ¹⁹⁷Hg rozpada się do stabilnego izotopu ¹⁹⁷Au, natomiast stan metastabilny ^{197m}Hg rozpada się poprzez przejście izomeryczne (94,68%) do stanu podstawowego ¹⁹⁷Hg lub poprzez wychwyt elektronu (5,32%) do stanu wzbudzonego ¹⁹⁷Au*.²¹²



Rys. 4. Schemat rozpadu radionuklidów $^{197m/197}\text{Hg}$. Na podstawie.²¹³

^{197}Hg w stanie podstawowym rozpada się w wyniku wychwytu elektronu (EC) do stanu wzbudzonego $^{197}\text{Au}^*$ z emisją kwantu gamma o energii 523 keV. Następnie, $^{197}\text{Au}^*$ rozpada się w wyniku przejścia izomerycznego do stanu podstawowego ^{197}Au z emisją kwantów gamma o energii 77,31 keV; 268,78 keV; 191,44 keV, elektronu konwersji o energii 63 keV oraz elektronów Auger o średniej energii 7,4 keV i promieniowania rentgenowskiego. Przejście izomeryczne skutkuje emisją kwantów gamma o energii 133,79 keV oraz 164,84 keV, elektronu konwersji o energii 150 keV, niskoenergetycznych elektronów Augera o energii 7,1 keV oraz promieniowania X. Rozpad ^{197m}Hg poprzez EC skutkuje emisją promieniowania gamma o energii 130,00 keV; 201,39 keV oraz 278,65 keV, elektronu konwersji o energii 116 keV, niskoenergetycznych elektronów Augera o energii 7,6 keV oraz promieniowania X.^{212,214,215}

Radionuklidy $^{197m/197}\text{Hg}$ zaczęto badać pod kątem ich potencjału radiofarmaceutycznego już w drugiej połowie XX wieku. Chloromerodryna, znakowana radionuklidami rtęci $^{197m/197}\text{Hg}$, była stosowana do celów diagnostycznych mózgu i nerek w latach 1960 i 1970, została ona jednak później wycofana ze względu na wprowadzenie obrazowania technetowego.^{216,217,218}

Istnieje kilka metod produkcji rtęci $^{197m/197}\text{Hg}$, jednak w większości opublikowanych badań stosowano metody produkcji cyklotronowej. Filozofov i współ. oraz Randchawa i współ. wspominają o technicznej możliwości pozyskania radionuklidów $^{197m/197}\text{Hg}$ na drodze reakcji (n, γ), skupiają się oni jednak głównie na produkcji cyklotronowej w wyniku bombardowania protonami i deuteronami.^{167,169} Neves i współ. również zaproponowali zastosowanie $^{197m/197}\text{Hg}$ w terapii radionuklidowej. Zaznaczyli oni możliwość produkcji tych radionuklidów metodą cyklotronową poprzez reakcje jądrowe $^{197}\text{Au}(p,n)^{197m/197}\text{Hg}$, $^{197}\text{Au}(\alpha,3np)^{197m/197}\text{Hg}$ oraz reaktorową $^{196}\text{Hg}(n,\gamma)^{197m/197}\text{Hg}$ zwracając jednak uwagę na niewielki procent udziału ^{196}Hg w naturalnie występującej rtęci.²¹⁹

Guevara i współ. zastosowali $^{197m/197}\text{Hg}$ produkowaną w reakcji (n, γ) jako radioznacznik do badania metod ekstrakcji rozpuszczalnikowej przy użyciu $\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4$ lub HCl w osadach słodkowodnych.²²⁰ Gaćnik i współ. opracowali jednostkę kalibracyjną opartą na chlorku rtęci, która wykorzystywała ^{197}Hg jako radioznacznik.²²¹ Koron i współ. wprowadzili wysoce czułą metodę jednoczesnego pomiaru metylacji

i redukcji wzbogaconej rtęci nieorganicznej (Hg^{2+}) w wodzie morskiej przy użyciu radioizotopu ^{197}Hg .²²² ^{197}Hg zastosowano również do oceny poziomów rtęci w próbkach biologicznych przy użyciu instrumentalnej aktywacyjnej analizy neutronowej.^{223,224}

W 1997 roku Shibata i współ. przedstawili przekroje czynne dla reakcji wychwytu neutronów w zakresie energii od kilku eV do 20 MeV dla różnych stabilnych izotopów rtęci, w tym dla ^{196}Hg .²²⁵ Przekroje czynne dla metod produkcji cyklotronowej zostały przedstawione w 2020 roku przez Červenáka i Lebedę. Wyznaczyli oni eksperymentalne wartości przekrojów czynnych dla produkcji $^{197\text{m}}\text{Hg}$ i ^{197}Hg w wyniku reakcji (p,n) w zakresie energii protonów od 6,4 do 35,3 MeV.²²⁶ Najnowsze dane dotyczące przekroju czynnego dla reakcji $^{197}\text{Au}(\text{p},\text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ w zakresie energii protonów poniżej 18 MeV przedstawili Kotanjyana i współ. w 2024 roku.²²⁷ Produkcja radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ za pomocą cyklotronu może być zatem osiągnięta poprzez napromieniowanie naturalnego złota protonami lub deuteronami. Metody cyklotronowe wymagają więc przeprowadzenia procesu separacji radionuklidów rtęci ze złotej tarczy.

Zbadanych zostało wiele metod separacji $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ z tarczy. W 1955 roku Macnevin i Lee zbadali radiochemiczne rozdzielanie $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ od złotej tarczy za pomocą żywicy Dowex 50. W swoich eksperymentach mieszaninę złota i rtęci przepuszczali przez kolumnę zawierającą 800 gramów żywicy Dowex 50 i eluowali za pomocą 2 M HCl (frakcja zawierająca rtęć) oraz wody (frakcja zawierająca złoto).²²⁸ Samczyński badał proces wymiany jonowej kilku pierwiastków obejmujących rtęć i złoto, i wykazał, że rtęć pobrana przez żywicę Chelex 100 może być eluowana 10 M HCl, podczas gdy złoto jest silnie utrzymywane na żywicy w całym zakresie stężeń kwasu solnego. Złoto usunięto z żywicy za pomocą roztworu amoniaku zawierającego chlorek amonu.²²⁹ Moyers i Fritz dokonali separacji $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ przy użyciu żywicy heksyloetioglikolanowej zawierającej siarkę. Rtęć i złoto były łatwo zatrzymywane przez żywicę w 0,1 M HCl. Następnie rtęć wymywano 6 M HCl, podczas gdy złoto pozostawało zaadsorbowane. Ostatecznie złoto eluowano 0,001 M roztworem tiomocznika (pH = 3) w kwasie solnym.²³⁰ Walther i współ. opracowali metodę wykorzystującą ekstrakcję w fazie stałej opartą na żywicy LN składającej się z kwasu di(2-etyloheksylo)ortofosforowego impregnowanego na obojętnym nośniku, uzyskując dobre rozdzielanie $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.²³¹ Schemat rozdzielania oparty na chromatografii ekstrakcyjnej z wykorzystaniem żywicy LN był również stosowany przez Randhawa i współ. oraz Chen i współ. Napromieniowane złote tarcze były rozpuszczane w wodzie królewskiej w temperaturze 90°C. Następnie roztwór przenoszono do umieszczonej na kolumnie, wstępnie kondycjonowanej w 6 M HCl żywicy LN. W warunkach rozdzielania, złoto zatrzymywało się na kolumnie, podczas gdy rtęć była eluowana. Następnie frakcję zawierającą rtęć odparowano nie dopuszczając do wyparowania całości rozpuszczalnika. Proces ten miał na celu osiągnięcie jak najwyższej aktywności właściwej nie powodując jednocześnie związanej z lotnością związków rtęci, utraty aktywności.^{169,232}

Alternatywną metodą umożliwiającą otrzymanie radionuklidów rtęci $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ jest bombardowanie neutronami termicznymi rtęciowej tarczy wzbogaconej w ^{196}Hg . Przekrój czynny na reakcję (n,γ) wynosi 3078 b dla ^{197}Hg oraz 105 b dla $^{197\text{m}}\text{Hg}$. Dzięki bardzo wysokiemu przekrojowi czynnemu możemy uzyskać znaczne aktywności, jednakże koszt wzbogaconego materiału tarczowego jest wysoki.²³³

Ponadto, ^{197}Hg można otrzymać poprzez fragmentację cięższych pierwiastków, takich jak ołów z protonami o energii powyżej 100 MeV.²³⁴

Niestety, rtęć jest pierwiastkiem trudnym do skompleksowania. Tylko niewielka liczba chelatorów nadaje się do stosowania dla rtęci. Do nielicznych związków, które udało się otrzymać w celu związania $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ należą: bifunkcyjny ligand makrocycliczny S3 i kilka ligandów typu NS4, takich jak: 1,4,7,10-tetratia-13-azacyklopentadekan (NS4), kwas 2-(1,4,7,10-tetratia-13-azacyklopentadekan-13-

ylo)octowy (NS4-CA) i N-benzylo-2-(1,4,7,10-tetratria-13-azacyklopentadekan-13-ylo)acetamid (NS4-BA). Komercyjnie dostępne są chelatory, takie jak 1,4,7,10-tetrakis-(karbamoilometylo)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (DOTAM), wraz z jego bifunkcyjnym odpowiednikiem (pSCN-Bn-DOTAM) również.^{235, 236} Weber i współ. opracowali 4-etapową metodę syntezy Hg^{2+} z funkcjonalizowanymi związkami diazabicyklononanu z 1,5-difenylo-3,7-diazabicyklo[3.3.1]nonan-9-olu. Obejmowała ona przyłączenie modyfikowanych grup benzytowych w celu wytworzenia funkcjonalizowanych diazabicyklonononów. Ponadto, opracowali oni metodę koniugacji biocząsteczek za pomocą *click chemistry*.²³⁷ Gilpin i współ. przedstawili stabilny *in vivo* cykliczny związek bisarylortęciowy wytworzony poprzez transmetalację organocyny z $^{197m/197}HgCl_2$. Wykazywał on wysoką stabilność chemiczną w stosunku do konkurentów siarkowych, brak interakcji z białkami surowicy ludzkiej i skuteczne wydalanie z organizmu szczurów, bez retencji w nerkach.²³⁸ Tosato i współ. zbadali szereg bogatych w siarkę makrocyclicznych ligandów, w tym 1,4,7,10-tetrakis[2-(metylosulfanylo)etylo]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (DO4S), 1,4,7-tris[2-(metylosulfanylo)etylo]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (DO3S) i 1,7-bis[2-(metylosulfanylo)etylo]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,10-kwas dioctowy (DO2A2S), obok powszechnie stosowanych chelatorów, takich jak DOTA i cyklen. Wykazano, że ramiona boczne zawierające siarkę znacząco zwiększają powinowactwo wiązania do Hg^{2+} , umożliwiając tworzenie wysoce stabilnych kompleksów metal-ligand w łagodnych warunkach w stosunku 1:1. Kompleksy te wykazały 6-8 – krotnie większą stabilność w porównaniu z DOTA i niefunkcjonalizowanym cyklem.²³⁹ Chu i współ. zaproponowali związki panitumumabu znakowane ^{197}Hg . Przeciwciała znakowano ^{197}Hg poprzez kompleksowanie z chelatorem DOTAM oraz bezpośrednio wiązanie bez użycia chelatora. Skuteczność znakowania wynosiła odpowiednio 58,3% i 56,6%. W przeprowadzonych badaniach udowodniono również, że związki ^{197}Hg z panitumumabem są cytotoksyczne dla linii komórkowej potrójnie ujemnego raka piersi.²⁴⁰

Walther i współ. wykazali, że uzyskane przez nich beznośnikowe radionuklidy $^{197m/197}Hg$ w reakcji jądrowej $^{197}Au(p,n)^{197m/197}Hg$ mogą znaleźć zastosowanie w terapii. Napromieniowanie przeprowadzono stosując wiązkę protonów o energii 10 MeV przy maksymalnym natężeniu 25-27 μA przez 1 do 2 godzin, uzyskując około 100 MBq zarówno ^{197m}Hg , jak i ^{197}Hg po rozdzieleniu metodą ekstrakcji ciecz-ciecz. Osiągnięta aktywność właściwa wyniosła ponad 500 GBq/ μmol . Porównanie otrzymanych radionuklidów $^{197m/197}Hg$ z ^{177}Lu , potwierdziło, że radionuklidy $^{197m/197}Hg$ są odpowiednie do zastosowania w terapii. Ponadto autorzy określili, że dawka deponowana w promieniu 1 mm przez radionuklidy rtęci jest dziesięć razy większa niż ta obliczona dla stosowanego rutynowo izotopu ^{177}Lu .²¹⁴ Przeprowadzono również obliczenia dozymetryczne porównując $^{197m/197}Hg$ z ^{111}In , ujawniając, że w przypadku kierowania na pojedynczą komórkę radionuklidy rtęci były 2 do 3 razy skuteczniejsze niż ^{111}In z uwagi na emisję elektronów konwersji.²⁴¹

Ze względu na emisję kwantu gamma o energii 133,79 keV przez radionuklid ^{197m}Hg , para izomerów $^{197m/197}Hg$ była również badana pod kątem zastosowań teranostycznych. Przeprowadzono symulacje Monte Carlo oraz pomiary fantomowe i w rezultacie potwierdzono zdolność obrazowania SPECT z zastosowaniem ^{197m}Hg .^{212,214} Ze względu na trudność w chelatowaniu rtęci opracowane zostało podejście polegające na związaniu radionuklidów rtęci z nanocząstkami złota. Lisha i współ. zastosowali nanocząstki złota (10-20 nm) stabilizowane cytrynianami do oczyszczania wód pitnych z rtęci. W procesie tym, stosowano dodatkowy czynnik redukujący w postaci $NaBH_4$, a nanocząstki po przyłączeniu rtęci ulegały aglomeracji, zmieniały swój rozmiar oraz wytrącały się z roztworu. Dodatek rtęci do nanocząstek powodował zaburzenie otoczki jonowej z cytrynianów i prowadził do agregacji. Niemniej jednak, zastosowany układ sprawdził się w przypadku usuwania jonów rtęci z wody.²⁴² Ponadto, Rex i współ.

opracowali metodę oznaczania stężenia rtęci w wodzie stosując złote nanoprety oraz borowodorek sodu i obserwując przesunięcie w powierzchniowym rezonansie plazmonowym (LSPR) w stronę mniejszej długości fali.²⁴³ Ojea-Jimenez i współ. zastosowali AuNPs (9 nm) do usuwania rtęci z rzek, gdzie proces pochłaniania rtęci przez nanocząstki polegał na chemisorpcji Hg(II), a także na redukcji Hg(II) oraz jej wytrącaniu się na ich powierzchni powodując wzajemną dyfuzję metali i tworząc amalgamat.²⁴⁴ Brown i współ. przyłączyli ^{197m/197}Hg do AuNP zsyntezowanych metodą Turkevicha i zmodyfikowali panitumumabem poprzez wiązanie złoto-tiolowe z disiarczkiem. Przeprowadzili badania *in vitro* wiązalności, internalizacji do komórki oraz do jądra komórkowego oraz cytotoksyczności z zastosowaniem testu klonogenego. Badania wykazały, że celowane w EGFR ^{197m/197}Hg-AuNP wiązały się specyficznie, były internalizowane i transportowane do jądra komórek nowotworowych oraz były cytotoksyczne.⁷⁸

2.5. Nanocząstki złota w terapii radionuklidowej

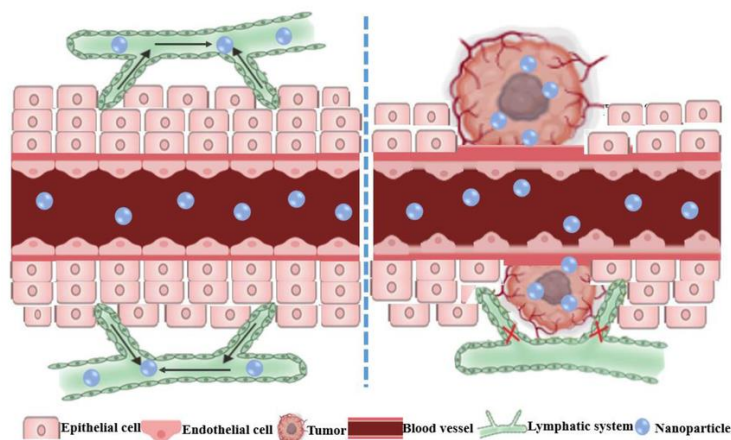
Współczesne zastosowanie AuNPs obejmuje diagnostykę, obrazowanie *in vivo* i terapię (terapia fototermiczną, katalityczną, transportowanie leków oraz terapię radionuklidową).^{245,246,247} AuNPs charakteryzują się łatwością syntezy oraz funkcjonalizacji powierzchni. AuNPs są stosowane m. in. jako nośniki leków dla chemioterapeutyków, środków immunomodulujących, kwasów nukleinowych oraz radionuklidów. Dużą zaletą stosowania nanocząstek w terapii radionuklidowej jest możliwość uzyskania znacznie większych radioaktywności, w porównaniu z konwencjonalnymi radiofarmaceutykami, w których przeciwciała sprzężone są tylko z jednym radionuklidem.²⁴⁷

Stosowane w terapii radionuklidowej koniugaty nanocząstek mogą być podawane doustrojowo w formie celowanej terapii radionuklidowej oraz w formie nanobrachyterapii. Ponadto, koniugaty te mogą celować w guz korzystając z dwóch mechanizmów wnikania nanocząstek do komórek, transportu czynnego za pomocą biomolekuł naprowadzających oraz biernego, poprzez efekt wzmocnionej przepuszczalności i retencji (EPR).

Zastosowanie aktywnego transportu nanocząstek poprzez systemy ukierunkowanego dostarczania leków ma kilka zalet. Są nimi ochrona zdrowych komórek przed związkami cytotoksycznymi, redukcja dawki i ograniczona ilość działań niepożądanych oraz zwalczanie opornych na leczenie komórek nowotworowych. Ze względu na specyficzne mechanizmy wychwytu i transportu komórkowego, nanocząstki dają możliwość dostarczenia leku do docelowych zmian w formie aktywnej. Wraz z postępem badań nad lekami opartymi na nanocząstkach zaobserwowano jednak, że cytozolowa internalizacja cząsteczki leku nie zawsze powoduje jej interakcję z celem subkomórkowym. W związku z tym konieczne jest projektowanie i optymalizacja nanocząstek tak, aby umożliwić ich ukierunkowanie na wnętrze komórki lub jądro komórkowe.²⁴⁸ Oprócz dostarczania leku do powierzchni komórek nowotworowych, niektóre terapie wymagają bardziej precyzyjnego celowania, jakim jest dostarczanie leku na poziomie organelli, na przykład jądra, lizosomów, mitochondriów lub siateczki śródplazmatycznej. Mechanizm działania większości leków przeciwnowotworowych, w tym np. doksorubicyny, obejmuje oksydacyjne uszkodzenie DNA i hamowanie topoizomerazy II w jądrze. Jednak działanie takich leków przeciwnowotworowych może być drastycznie zmniejszone, jeśli nie są one ukierunkowane na wnikanie do komórki oraz do jądra komórkowego.²⁴⁹ Celowanie farmaceutyku w jądro komórkowe jest również kluczowe dla terapeutycznego działania emiterów elektronów Augera.³ Dobrym przykładem nanocząstek stosowanych do celowania w jądro komórki są nanocząstki złota. Oprócz łatwej syntezy, ich kontrolowany i bardzo mały rozmiar pozwala osiągnąć wymiar poniżej wymiaru porów jądrowych i umożliwia ich przenikanie do jądra.

Wykazano, że im mniejszy jest rozmiar nanocząstek, tym wyższy jest ich poziom wnikania do jądra komórki.²⁵⁰ Dodatkowo, badania nad ligandami zwiększającymi penetrację jądra wykazały, że funkcjonalizacja nanocząstek peptydem sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS) znacząco promuje ich ukierunkowanie na jądro.²⁵¹

Normalna, zdrowa tkanka ma ścisły śródbłonek naczyń, aby zapobiec migracji makrocząsteczek. Transport bierny nanocząstek poprzez efekt EPR jest wynikiem nieszczelnego układu naczyń i nieskutecznego drenażu limfatycznego naczyń krwionośnych guza, co powoduje zatrzymanie w nim nanocząstek. Mechanizm bierny ukierunkowania na guz opiera się na cechach nośnika oraz biologii guza, bez udziału wektora przeznaczonego do wiązania się ze specyficzną tkanką.^{252,253} Ogólny schemat ilustrujący to zjawisko przedstawiono na Rys. 5.²⁵⁴



Rys. 5. Schematyczny diagram reprezentujący efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji nanocząstek w guzach.²⁵⁴

W warunkach zapalenia lub niedotlenienia, które są typowe dla guzów, śródbłonek naczyń krwionośnych staje się bardziej przepuszczalny niż w tkankach zdrowych.²⁵⁵ Szybko powstałe w guzie naczynia nie są szczelne, co zwiększa przepuszczalność nanosystemów do guza, a brak prawidłowego drenażu limfatycznego w jego obszarze przyczynia się do zatrzymania nanocząstek wewnątrz.²⁴⁸ Efekt EPR jest w dużym stopniu zależny od wewnętrznej biologii guza, a w szczególności od stopnia jego angiogenezy i limfangiogenezy, stopnia okołonaczyniowego wzrostu guza i jego gęstości oraz ciśnienia wewnątrzguzowego. Czynniki te, wraz z fizykochemicznymi właściwościami nanonośników, determinują wydajność dostarczania leku.²⁵⁶ Ponadto, z powodu niejednorodnego ukrwienia komórki nowotworowe rosną w obszarze guza w sposób nieregularny. Komórki znajdujące się w pobliżu naczyń krwionośnych, proliferują szybciej niż te, które znajdują się w rdzeniu guza. Wyjaśnia to obszary niedotlenienia występujące w rdzeniach dużych guzów oraz niemożność dotarcia nanoleków do tych obszarów.^{253,255} Możliwe jest modulowanie efektu EPR chemicznie lub mechanicznie w celu normalizacji naczyń, co prowadzi do większej akumulacji nanonośników. Wśród chemicznych wzmacniaczy efektu EPR wyróżniamy bradykininę, tlenek azotu, nadtlenoazotyn, prostaglandyny, czynnik przepuszczalności naczyń (VPF) i czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) oraz inne cytokiny.^{252,253} Częsteczkami te wywołują naciśnienie lub normalizację naczyń, co może tymczasowo zwiększyć perfuzję guza. Inne podejścia wykorzystują ultradźwięki, promieniowanie, hipertermię lub fotoimmunoterapię w celu modulacji naczyń krwionośnych guzów i zwiększenia przenikania nanosystemów.^{253,256}

Uniwersalność AuNPs umożliwiła opracowanie licznych znakowanych radionuklidami koniugatów, które mogą być dostosowane do konkretnych typów nowotworów. AuNPs zastosowano do przenoszenia izotopów emitujących promieniowanie o wysokim LET, w tym radionuklidów emitujących cząstki α , takich jak ^{211}At , ^{225}Ac oraz elektrony Augera, takich jak ^{111}In , $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, ^{125}I . Ponadto, AuNPs wykorzystano również do przenoszenia emiterów promieniowania β^- , takich jak ^{177}Lu , ^{131}I oraz ^{198}Au korzystając z możliwości zastosowania radionuklidów złota jako prekursora do syntezy radioaktywnych nanocząstek $^{198}\text{AuNPs}$.^{257,258}

2.5.1. Nanocząstki złota w celowanej terapii radionuklidowej

Nanocząstki złota stały się wielofunkcyjnymi platformami w ukierunkowanej terapii radionuklidowej ze względu na ich unikalne właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne. AuNPs są doskonałymi nośnikami radionuklidów z powodu ich dużego stosunku powierzchni do objętości oraz możliwości funkcjonalizacji za pomocą ligandów, biomolekuł naprowadzających oraz chemioterapeutyków. Dodatkowo, sprzężanie AuNPs z cząsteczkami, takimi jak peptydy, przeciwciała i chemioterapeutyki zwiększyło selektywność i potencjał terapeutyczny ich koniugatów. Stosując transport aktywny poprzez biomolekułę naprowadzającą nanocząstki mogą być podawane ogólnoustrojowo poprzez dożylną wstrzyknięcie i specyficznie znajdować komórki nowotworowe poprzez wiązanie wektora do receptorów.²⁵⁹ W badaniach *in vitro* oceniono zastosowanie znakowanych ^{177}Lu nanocząstek złota sprzężonych z biomolekułą naprowadzającą do celowanej terapii. Jimenez-Mancilla i współ. przyłączyli do AuNPs znakowanych $^{177}\text{Lu}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ bombęzyne - ligand receptora peptydu uwalniającego gastrynę, i peptyd Tat w celu lokalizacji jądrowej. W badaniach *in vitro*, na komórkach raka prostaty linii PC-3 wykazano, że koniugat osiągnął bardzo wysoką akumulację w jądrze komórek PC-3 i po 3 dniach inkubacji zahamował ich proliferację. Po podziałaniu impulsem laserowym (532 nm) na komórki inkubowane z koniugatem zaobserwowano wzrost temperatury pożywki do $46,4^\circ\text{C}$ i znaczne zmniejszenie ich żywotności, do 1,3%. Badany związek wykazał obiecujące efekty zarówno w terapii fototermicznej, jak i w celowanej radioterapii.²⁶⁰

Zhang i współ. zaprojektowali natomiast znakowane ^{131}I złote nanoprety sprzężone z cyklicznymi peptydami RGD (cRGD), aby aktywnie celować w integrynę $\alpha_v\beta_3$, której nadekspresja występuje w naczyniach krwionośnych guza. Po podaniu dożylnym myszom z guzami czerniaka koniugat celowany wykazywał znacząco zwiększoną akumulację w guzie w porównaniu do grup kontrolnych. Badania potwierdziły możliwość zastosowania $^{131}\text{I}[\text{AuNR-PEG-cRGD}]$ w obrazowaniu SPECT/CT ukierunkowanym na angiogenezę. Ponadto, wykazano zdolność koniugatu do wysoce wydajnej konwersji fototermicznej w obszarze bliskiej podczerwieni, co sugeruje jego potencjał jako wielofunkcyjnego środka teranostycznego.²⁶¹

Dziawer i współ. zbadali koniugaty AuNPs znakowanych ^{211}At w celowanej terapii glejaka. AuNPs zostały sprzężone z PEG-iem oraz z Substancją P w celu ukierunkowania na receptory neurokininy-1 (NK1), których nadmierna ekspresja występuje w komórkach glejaka. Radionuklid ^{211}At był trwale chemisorbowany na powierzchni AuNPs, a powstałe koniugaty wykazały wysoką stabilność radiochemiczną w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym przez co najmniej 24 godziny. Badania *in vitro* potwierdziły silne działanie cytotoksyczne na komórki glejaka, podkreślając potencjał koniugatu w celowanej terapii alfa.²⁶² Zhang i współ. opracowali $^{211}\text{At}[\text{At-AuNP-ABDMPL16}]$, znakowany ^{211}At koniugat AuNPs sprzężonych z przeciwciałem skierowanym na PD-L1 w terapii czerniaka. Po dożylnym podaniu myszom z guzem B16 F10 koniugat wykazał silną akumulację w obszarze guza oraz znaczące

zahamowanie jego wzrostu i poprawę przeżycia u myszy. Wzmocnił również odporność przeciwnowotworową, nie powodując toksyczności ogólnoustrojowej, co potwierdziło jego potencjał jako celowanego środka terapeutycznego.²⁶³

Song i współ. opracowali koniugat nanocząstek złota znakowany radionuklidem ^{111}In oraz sprzężony z naskórkowym czynnikiem wzrostu (EGF) w celu aktywnego celowania w komórki nowotworowe o nadmiernej ekspresji EGFR. Po dożylnym podaniu myszom z ksenograftami ludzkiego raka piersi MDA-MB-468, koniugat [^{111}In]In-EGF-Au-PEG6000 wykazał znaczną akumulację w tkankach nowotworowych. Ponadto, jednoczesne podanie nieznakowanego EGF spowodowało zwiększone wchłanianie nanocząstek przez guz i zmniejszenie akumulacji w wątrobie, co sugeruje poprawę efektywności oraz zminimalizowanie niespecyficznego działania koniugatu.²⁶⁴

Su i współ. opracowali AuNPs znakowane ^{125}I i funkcjonalizowane cyklicznymi peptydami RGD (^{125}I -cRGD-GNPs) w celu zwiększenia radiowrażliwości swoistej dla guza. Koniugat podano dożylnie myszom z guzem NCI-H446 i połączono z zewnętrzną radioterapią gamma. Obrazowanie SPECT/CT wykazało silny wychwyt związku przez guz. W ocenie efektywności terapeutycznej, zaobserwowano zwiększoną apoptozę i znaczną redukcję objętości guza w ciągu 21 dni w porównaniu z grupami kontrolnymi.²⁶⁵ Ponadto, Kim i współ. opisali znakowane ^{125}I , cykliczne RGD-PEG-owane nanocząstki złota celowane na guzy o nadmiernej ekspresji integryny $\alpha_v\beta_3$. Nanocząstki wykazały doskonałą stabilność i wysoką swoistość dzięki wiązaniu do receptora. Obrazowanie SPECT/CT małych zwierząt potwierdziło szybkość i selektywną akumulację guza w ciągu 10 minut po wstrzyknięciu, z obserwowanym wydalaniem nerkowym.²⁶⁶

Pomimo obiecującej skuteczności terapeutycznej w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, kliniczne zastosowanie radiofarmaceutyków na bazie nanocząstek złota przeznaczonych do podawania dożylnego napotyka na duże wyzwania. Ukierunkowane systemy AuNPs zaprojektowane do podawania ogólnoustrojowego są szczególnie atrakcyjne ze względu na ich potencjał leczenia rozsianych lub niedostępnych chirurgicznie nowotworów. Jednakże, po podaniu dożylnym nanocząstki są szybko wiązane przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (RES), zwłaszcza przez makrofagi w wątrobie i śledzionie, co znacznie ogranicza ich użyteczność kliniczną. Modyfikacje powierzchni AuNPs, które zastosowane są w celu zminimalizowania tych ograniczeń, mogą zwiększyć specyficzny wychwyt przez guz, jednak mogą one niekorzystnie wpływać na farmakokinetykę nanocząstek.^{267,268} Biorąc pod uwagę te ograniczenia, wielu badaczy oceniających skuteczność terapii radionuklidowej z zastosowaniem znakowanych radionuklidami AuNPs, wybierało doguzową drogę podania radiokoniugatów. Badania porównujące biodystrybucję AuNPs po podaniu dożylnym oraz śródguzowym wskazały na znaczące korzyści terapeutyczne płynące z podania bezpośredniego do guza, w tym zwiększenie stężenia nanocząstek w miejscu docelowym oraz zminimalizowanie ich akumulacji poza celem, w wątrobie oraz śledzionie. Strategia doguzowego podania znakowanych AuNPs jest sugerowana jako potencjalna alternatywa dla konwencjonalnej brachyterapii i nazywana nanobrachyterapią. Metoda ta umożliwia miejscowe dostarczanie promieniowania bez konieczności interwencji chirurgicznej.^{269,270}

2.5.2. Nanocząstki złota w nanobrachyterapii

W ostatnich latach popularnością wśród badaczy cieszyła się również nowa forma brachyterapii, a mianowicie oparta na nanocząstkach (złota, palladu, tlenku żelaza) nanobrachyterapia.²⁷¹ Nanobrachyterapia obejmuje stosowanie nanocząstek zamiast implantów lub cewników. Zaletą nanobrachyterapii jest fakt, że jest to technika nieinwazyjna wymagająca prostego wstrzyknięcia, a nie zabiegu chirurgicznego, w przeciwieństwie do tradycyjnej brachyterapii.²⁷² Nanocząstki znajdują zastosowanie w brachyterapii dzięki swojemu małemu rozmiarowi, który pozwala na precyzyjne ukierunkowanie na określone komórki oraz umożliwia lokalną dyfuzję z miejsca wstrzyknięcia, co ujednolica depozycję dawki promieniowania w guzie.^{273,274} W ciągu ostatniej dekady nanocząstki radioznakowane izotopami diagnostycznymi lub terapeutycznymi wykazały duży potencjał w przewidywaniu wad, których nie można było pokonać za pomocą konwencjonalnych metod, umożliwiając bardziej spersonalizowane podejście do leczenia raka.²⁷⁴ Nanobrachyterapia oparta na nanocząstkach złota stanowi nowatorskie podejście w leczeniu chorób nowotworowych, łącząc precyzję brachyterapii z unikalnymi właściwościami AuNPs. W przeciwieństwie do tradycyjnej brachyterapii, która obejmuje implantację radioaktywnych ziaren, nanobrachyterapia wykorzystuje znakowane radionuklidami AuNPs wstrzykiwane bezpośrednio do guzów, poprawiając dystrybucję oraz zmniejszając skutki uboczne.³⁰ Uzyskano skuteczność terapeutyczną wykorzystując do nanobrachyterapii znakowane nanocząstki złota w postaci śródguzowych iniekcji o stosunkowo niskiej aktywności promieniotwórczej zawierających m.in. radionuklidy ¹⁷⁷Lu, ¹⁹⁸Au, ²¹¹At, ²²⁵Ac oraz ¹¹¹In.²⁷¹

Vilchis-Juarez i współ. opracowali AuNPs funkcjonalizowane cyklicznymi peptydami RGD i znakowane ¹⁷⁷Lu do celowania w integryny $\alpha_v\beta_3$, których nadmierna ekspresja występuje w niektórych glejakach. Po doguzowym podaniu ¹⁷⁷Lu-cRGD-AuNP myszom, zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza oraz zmniejszenie jego unaczynienia i ekspresji VEGF.²⁷⁵ Reilly i współ. opisali wychwyt nanocząstek złota przez guz nowotworowy po podaniu dożylnym oraz doguzowym. Stwierdzono, że ukierunkowanie na HER-2 poprzez przyłączenie trastuzumabu zmniejszyło wychwyt guza w wyniku szybszej eliminacji celowanych nanocząstek z krwi. Mimo tego, podanie doguzowe celowanych na HER-2 nanocząstek złota skutkowało wysoką retencją koniugatu w guzie przy niskim narażeniu systemowym, co stanowi skuteczniejszą alternatywę dla podania dożylnego.²⁷⁶ Ponadto, ta sama grupa wykazała, że podane doguzowo znakowane ¹⁷⁷Lu nanocząstki złota, celowane z przyłączonym panitumumabem (¹⁷⁷Lu-T-AuNP) oraz niecelowane (¹⁷⁷Lu-NT-AuNP) zahamowały wzrost ludzkich guzów raka piersi MDA-MB-468 u atymicznych myszy CD-1 nie powodując toksyczności dla zdrowych tkanek. Dodatkowo wykazano, że zarówno ¹⁷⁷Lu-T-AuNP, jak i ¹⁷⁷Lu-NT-AuNP były równie skuteczne w zatrzymywaniu wzrostu guza, a dodatkową zaletą nanocząstek bez wektora jest możliwość ich stosowania w neoadjuwatywnej terapii guzów o wielu fenotypach.²⁷⁷ Podobne badanie przeprowadzono również dla podania dożylnego oraz doguzowego koniugatu nanocząstek złota z ¹⁷⁷Lu zawierającego celowany na HER2 wektor – trastuzumab, oraz analogicznego koniugatu bez biomolekuły naprowadzającej. W tym przypadku, wykazano jednak, że radiokoniugat celowany był 1,8 razy bardziej skuteczny w zatrzymaniu wzrostu guza u myszy z indukowanymi HER-2 pozytywnymi nowotworami piersi z linii MDA-MB-361.²⁷⁸

Zhu i współ. zsyntezowali AuNPs znakowane ¹³¹I do zastosowania w nanobrachyterapii. ¹³¹I-AuNP wykazały wysoką czystość radiochemiczną oraz stabilność. W badaniach *in vitro* na komórkach glejaka linii C6 indukowały one zależną od dawki cytotoksyczność, podczas gdy nieznakowane AuNPs nie wykazywały znaczącego efektu. Po śródguzowym podaniu myszom nanocząstki charakteryzowały się niskim wychwytem przez tarczycę i znaczącym zahamowaniem wzrostu guza. Jednocześnie nie

zaobserwowano toksyczności ogólnoustrojowej, co potwierdziło ich potencjał w bezpiecznej miejscowej terapii radionuklidowej.²⁷⁹ Żelechowska-Matysiak i współ. zbadali radioaktywne nanocząstki złota ¹⁹⁸AuNPs modyfikowane doksorubicyną i trastuzumabem w terapii nowotworów wykazujących nadekspresję receptorów HER2. Udowodniono, że radiokoniugat DOX-¹⁹⁸AuNPs-trastuzumab ma wysokie powinowactwo do receptora HER2. Ponadto, badania efektywności terapeutycznej na myszach po doguzowym podaniu pojedynczej dawki 10 MBq wykazały silny efekt synergistyczny dzięki jednoczesnej obecności trastuzumabu, doksorubicyny oraz emitera β^- ¹⁹⁸Au oraz 82% redukcję wzrostu guza.²⁸⁰ Shukla i współ. zsyntezowali specyficzne dla guza prostaty funkcjonalizowane radioaktywne nanocząsteczki złota połączone z epigallokatechiną (EGCg). Po ich podaniu do guza z komórek linii raka prostaty (PC-3) na modelu mysim wykazano występowanie 72% retencji ¹⁹⁸AuNP-EGCg w guzach po 24 godzinach od nastrzyknięcia, a badania efektywności terapeutycznej wykazały 80% redukcję objętości guza po 28 dniach leczenia.²⁸¹ Chanda i współ. opisali nanocząstki złota funkcjonalizowane gumą arabską (GA). Badania skuteczności terapeutycznej *in vivo* wykazały wysokie powinowactwo GA-¹⁹⁸AuNP po doguzowym podaniu myszom z silnie upośledzoną odpornością (SCID) z ksenograftami ludzkiego guza prostaty (PC-3). Objętość guza u leczonych zwierząt po 21 dniach była o 82% mniejsza w porównaniu z objętością guza w grupie kontrolnej.²⁸²

Dziawer et al. zsyntezowali radiokoniugat AuNPs zawierający trastuzumab oraz α emiter ²¹¹At dla celowanej terapii HER2-dodatnich mikroprzerzutowych komórek nowotworowych oraz małych guzów. Udowodniono, że ²¹¹At-AuNP-trastuzumab został specyficznie związany z receptorami HER2, zinternalizowany i zlokalizowany w pobliżu jądra komórek raka jajnika SKOV-3.²⁸³ Szczególnie zainteresowanie wśród badaczy budzi zastosowanie nanobrachyterapii w leczeniu glejaka wielopostaciowego, gdzie tradycyjna radioterapia często okazuje się niewystarczająca ze względu na inwazyjny charakter i heterogeniczność guza oraz ograniczoną przepuszczalność bariery krew-mózg.²⁸⁴ Liu i współ. wprowadzili złote nanogwiazdki (GNS) znakowane ²¹¹At. W modelu mysim ksenoprzeszczepu glejaka, pojedyncze śródguzowe podanie [²¹¹At]At-GNS znacząco zmniejszyło wzrost guza bez toksyczności ogólnoustrojowej. Ponadto, w badaniu biodystrybucji *in vivo* potwierdzono niski wychwyt koniugatu przez tarczycę i żołądek, co udowodniło minimalną dehalogenację i wysoką stabilność radiochemiczną.²⁸⁵ Kato i współ. opracowali AuNPs zmodyfikowane glikolem metoksypolietylenowym i znakowane ²¹¹At do śródguzowej terapii glejaka oraz raka trzustki. Koniugat został jednokrotnie podany szczurom z guzami indukowanymi z komórek C-6 oraz myszom z guzami indukowanymi z komórek PANC-1. Wykazano, że nanocząstki pozostały w obszarze guza, bez wykrywalnego rozprzestrzeniania się, przez okres 6 czasów połowicznego rozpadu, tj. do 42 godzin. Przy czym, najmniejsze badane nanocząstki (5 nm AuNP) osiągnęły najbardziej równomierny rozkład i wykazały najsilniejsze zahamowanie wzrostu guza.²⁸⁶

Salvanou i współ. zbadali nanocząstki złota z przyłączonym chelatorem TADOTAGA znakowane emiteryem α , ²²⁵Ac. Mimo braku biomolekuły naprowadzającej zaobserwowano wysoką retencję w guzie po bezpośrednim podaniu radiokoniugatu do guza. Efektywność terapeutyczną [²²⁵Ac]Ac-AuNP@TADOTAGA oceniano przez 22 dni od podania. Udowodniono, że radiokoniugat spowodował opóźnienie wzrostu guza U87MG u myszy.²⁷³ Ta sama grupa zbadła również możliwość przenoszenia emitery elektronów Auger – ¹⁶¹Tb poprzez nanokwiaty tlenku żelaza połączone z nanocząstkami złota, modyfikowanymi dopaminą. Wykazano, że retencja radiokoniugatu po doguzowym podaniu u myszy z nowotworem z komórek linii 4T1 była wysoka. Ponadto, przeprowadzone zostały wstępne badania skuteczności terapeutycznej radiokoniugatu [¹⁶¹Tb]Tb-NFAu@TADOTAGA.²⁸⁷

Cai i współ. opracowali nanocząstki złota połączone z trastuzumabem oraz wyznakowane emitерem elektronów Auger - ^{111}In , do ukierunkowanej nanobrachyterapii HER2-dodatniego raka piersi. W badaniach *in vitro* koniugat wiązał się specyficznie z komórkami wykazującymi nadekspresję HER2 i lokalizował się okołojądrowo, indukując dwuniciowe pęknięcia DNA i zmniejszając przeżywalność komórek. Ponadto, udowodniono, że jednokrotne, miejscowe wstrzyknięcie trastuzumabu-AuNP- ^{111}In zatrzymało wzrost guza u myszy z ksenograftami HER2-dodatniego raka piersi (MDA-MB-361) nie powodując toksyczności dla zdrowych tkanek.²⁸⁸ Fach i współ. opracowali metodę wiązania radionuklidu ^{103}Pd w nanocząstkach złota w formie stopu AuPdNP i pokryli je polimerem poli(N-izopropylakrylamidem) tworząc implanty nanożelowe wiążące [^{103}Pd]AuPdNP. Zsyntezowane nanoimplanty wykazały skuteczność terapeutyczną na modelu guza raka jelita grubego CT26.²⁸⁹

Brown i współ. zbadali *in vitro* potencjał terapeutyczny nanocząstek złota znakowanych izotopami emitującymi elektrony Augera, $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, na linii komórkowej ludzkiego glejaka wielopostaciowego U251-Luc. Nanocząstki zostały sprzężone z panitumumabem, monoklonalnym przeciwciałem anty-EGFR. Badania wykazały skuteczną internalizację komórkową i znaczący transport do jądra. Ponadto, koniugat wywołał wyraźną redukcję przeżywalności, co potwierdziło jego cytotoksyczność wobec komórek ludzkiego glejaka wielopostaciowego.²⁹⁰

Na podstawie badań przedklinicznych można stwierdzić, że nanobrachyterapia ma wiele zalet, takich jak depozycja dawki promieniowania bezpośrednio do wnętrza ciała w zlokalizowanym obszarze, co skutkuje mniejszą liczbą skutków ubocznych dla otaczających zdrowych tkanek.²⁹¹

Podsumowując, nanobrachyterapia oparta na nanocząstkach złota jest bardzo obiecującą metodą w leczeniu zlokalizowanych guzów nowotworowych. Dzięki unikalnym właściwościom AuNPs i precyzji miejscowego dostarczania promieniowania, oferuje potencjalną ścieżkę do skuteczniejszych i mniej toksycznych terapii nowotworowych. Jednakże, dalsze badania i próby kliniczne będą miały kluczowe znaczenie dla przezwyciężenia obecnych ograniczeń i pełnego wykorzystania potencjału tego innowacyjnego podejścia.³⁰

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

METODOLOGIA

ROZDZIAŁ III

W rozdziale III opisano metodologię oraz metodykę badań. Zamieszczony jest tutaj spis odczynników oraz aparatury stosowanej we wszystkich eksperymentach, a także szczegółowe opisy sposobu ich przeprowadzenia oraz zastosowane metody analityczne.

3.1. Stosowane odczynniki do badań chemicznych

Chlorek złota (III), trihydrat ($\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich
Złota folia, grubość 0,1 mm, 99,99%, Sigma-Aldrich
Kwas poli(glikol etylenowy)-2-merkaptoetyloetero etanowy, Sigma-Aldrich
Kwas chlorowodorowy 36,5%, Sigma-Aldrich
Kwas taninowy ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$), $> 99\%$, Thermo Fisher Scientific
Kwas azotowy V, 65 %, Chempur
Bromek potasu, czda, $>99,5\%$, Chempur
Cytrynian trisodowy, dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), $> 99\%$, POCH
Roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl), Polatom
LN resin, rozmiar cząstek 50-100 μm , TRISKEM
Gold Reference Standard for ICP/AAS 1000 mg/l Au Certipur® w 2 M HCl, Supelco
Mercury (Hg) ICP Single-Component Standard 1000 $\mu\text{g/mL}$ w 2% HNO_3 , High-Purity Standards
Złoto, próba 999,9, Mennica Polska S.A.
Wzbogacona izotopowo w ^{196}Hg metaliczna rtęć, 3 mg, ISOFLEX USA
Woda dejonizowana
Kolba okrągłodenna dwuszyjna 250 ml, ChemLand
Kolba okrągłodenna dwuszyjna 50 ml, ChemLand
Mikroprobówki typu Eppendorf Safe-Lock Tubes, Eppendorf
Kartridże do chromatografii SepaFlash®iLOK®, HAAS
Filtr strzykawkowy 0,22 μm , Millipore™, Merck
Koncentratory wirówkowe Amicon® Ultra 4 mL, Millipore™, Merck
Fiolki szklane typu penicylinówki z korkiem
Fiolki kwarcowe, Polatom

3.2. Stosowane odczynniki do badań komórkowych

Komórki linii MDA-MB-231, ATCC
Komórki linii T98G, ATCC
Komórki linii T41, bank komórek ośrodka INRASTES

Sól fizjologiczna buforowana TRIS, Thermo Fisher Scientific
 Triton X-100, Thermo Fisher Scientific
 Tween 20, Thermo Fisher Scientific
 TRIS, Thermo Fisher Scientific
 Hoechst 33258, Thermo Fisher Scientific
 Pożywka DMEM z wysokim poziomem glukozy, Capricorn Scientific
 Pożywka MEM na solach Earle'a (MEM-Eagle) bez L-glutaminy, Biological Industries
 Płodowe serum cielęce, Biological Industries
 L-Glutamina, 200mM, Biological Industries
 Antybiotyki (Penicilina, Streptomycyna), Biological Industries
 Trypsyna EDTA, Biological Industries
 Buforowana fosforanem sól fizjologiczna bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , Biological Industries
 Trypan blue, Biological Industries
 Przeciwciało I-rzędowe (ANTI-PHOS-HIST H2A.X (S139), Merck
 Przeciwciało II-rzędowe (Anti-Mouse IgG (H+L), CF™ 633 antibody produced in goat, Merck
 Alkohol etylowy, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich
 Glicyna HCl, $>99\%$, Sigma-Aldrich
 Nuclei Isolation Kit, Sigma-Aldrich
 SDS (laurylosiarczan sodu), $>99\%$, Sigma-Aldrich
 Jodek propidyny, $\geq 94,0\%$, Sigma-Aldrich
 BSA (albuminy surowicy wołowej), Sigma-Aldrich
 RNAza, BD Pharmigen™
 Zestaw do oznaczania apoptozy FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD Pharmigen™
 Barwnik MTS, The CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (MTS + PES), Promega
 Line-Antybakteria 70, Lineal Chemicals
 Fluorescent Mounting Medium, DAKO
 Butelki do hodowli adherentnych i zawiesinowych 150 cm² z wentylacją, Techno Plastic Products
 Probówki do mrożenia komórek, Thermo Fisher Scientific
 Płytki 6-dołkowe, 24-dołkowe, 96-dołkowe, Techno Plastic Products
 Płytki U-kształtne Nunclon tm sfera tm 96-dołkowe, Thermo Fisher Scientific
 Szalki Petriego, SPL Life Sciences
 Skrobak do komórek sterylny, Techno Plastic Products
 Probówki cytometryczne, BD Pharmigen™
 Sterylne falkony o objętości 15 ml i 50 ml, ABDOS
 Szkiełka okrągłe do hodowli adherentnych, VWR
 Szkiełka prostokątne, VWR

3.3. Stosowana aparatura

Dejonizator wody, Hydrolab
 Łaźnia wodna, Memmert
 Komora laminarna s@felow 1.2, BIOAIR®

Incubator Euroclone Safegrow Pro
 Wirówka MPW-260R
 Mikroskop Zeiss Primavert
 Kamera AxioCam 105 color
 Mikroskop TALOS F200X
 Mikroskop konfokalny Olympus FV100
 BioTek Synergy H1 Multimode Reader
 komora Bürkera, Brand GmbH
 Detektor automatyczny γ Wizard2® 2480
 Detektor automatyczny γ Cobra II, Canberra Packard
 Detektor HPGe, Canberra Packard
 Detektor HPGe: Ortec Gamma-X N-type detector
 Kalibrator dawek Atomlab 500, BIODEx
 Kalibrator dawek, Capintec CRC-7
 mieszadło magnetyczne z grzaniem RCT basic, IKA® GmbH
 Suszarka z wymuszoną konwekcją, VWR
 Wyrząsarka laboratoryjna Vortex, IKA® GmbH
 Wirówka Centrifuge 5430, Eppendorf
 Termoblok ThermoMixer® F1.5, Eppendorf
 Rotor, mieszadło kołowe SB3, Stuart
 Zetasizer Nano ZS, Malvern oraz kuwety pomiarowe DTS1070, Malvern
 Spektrofotometr UV-Vis JASCO V-750 oraz kuwety pomiarowe UV Mikro K-6221, Bionovo
 Cytometr FACSCelesta, BD

3.4. Stosowane metody analityczne

3.4.1. Mikroskopia elektronowa (TEM) oraz wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HR-TEM)

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (*ang. Transmission electron microscopy, TEM*) jest zaawansowaną techniką pozwalającą na analizę wewnętrznej struktury materiałów stałych z bardzo wysoką rozdzielczością przestrzenną przy użyciu wiązki wysokoenergetycznych elektronów przechodzących przez próbkę. Jest ona wszechstronnym narzędziem dostarczającym informacji morfologicznych, rozmiarowych i dystrybucyjnych oraz chemicznych na temat pojedynczych nanocząstek.^{292,293} Strumień elektronów, po przejściu przez próbkę, tworzy na ekranie obraz, który jest rejestrowany i analizowany. Teoretyczna rozdzielczość TEM jest determinowana przez długość strumienia fali elektronów (λ), kąt zbieżności (α) oraz aberrację sferyczną i może być opisana w sposób uproszczony poniższym wzorem (Równanie 1).²⁹⁴

$$r = \frac{0,61\lambda}{\alpha}$$

Równanie 1. Teoretyczna rozdzielczość techniki TEM.²⁹⁴

Rozdzielczość TEM osiąga 0,07 nm, dlatego jest to optymalna technika do pomiaru wielkości nanocząstek.²⁹⁵ Transmisyjny mikroskop elektronowy składa się z katody generującej elektrony, które są

przyspieszane w kierunku anody. Następnie, elektrony te formowane są w wiązkę za pomocą soczewki elektrostatycznej. Utworzona wiązka elektronowa przemieszcza się wzdłuż osi optycznej mikroskopu i trafia do kondensora, gdzie zostaje skupiona i skierowana na badany preparat. Po przejściu przez próbkę, wiązka trafia do układu powiększającego, który odpowiednio zwiększa obraz obszaru, przez który przeniknęły elektrony. Ostatecznie, wiązka elektronowa pada na ekran, co umożliwia pośrednią obserwację badanego materiału. Wewnątrz kolumny mikroskopu utrzymywana jest wysoka próżnia w celu zapewnienia jego prawidłowego funkcjonowania.

Obraz rejestrowany jest więc po przejściu przez cienką próbkę badanego materiału. Przygotowanie próbki do analizy metodą TEM jest wymagające, ponieważ musi ona mieć formę cienkiej folii, której grubość jest uzależniona od napięcia przyspieszającego oraz średniej liczby atomowej materiału.^{294,296}

Wysokorozdzielcza Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa (HR-TEM) stanowi rozwinięcie metody TEM i umożliwia uzyskanie obrazu z rozdzielczością atomową. Technika ta wykorzystuje zarówno wiązki elektronów transmitowanych, jak i rozproszonych, które interferują ze sobą, tworząc szczegółowy obraz interferencyjny. Interferencja fal elektronowych występuje podczas propagacji przez soczewkę obiektywu, a modulowane fale elektronowe zbierane są w punkcie obrazu. HR-TEM jest szeroko stosowany w analizie struktur krystalicznych oraz defektów sieciowych. Technika ta umożliwia szczegółową charakteryzację defektów punktowych, dyslokacji oraz struktur powierzchniowych. Dzięki zdolności do obrazowania w skali atomowej, HR-TEM jest niezastąpionym narzędziem w badaniach nanomateriałów oraz zaawansowanych technologii materiałowych.²⁹⁷

Metoda TEM została zastosowana do oceny kształtu, wielkości oraz sferyczności nieradioaktywnych nanocząstek AuNPs, Au(Hg)NPs oraz Au(Hg)NPs-PEG. Ponadto, analiza HR-TEM miała na celu potwierdzenie lokalizowania się rtęci na powierzchni nanocząstek, a tym samym potwierdzenie prawidłowej syntezy koniugatu Au(Hg)NPs.

Badanie metodą TEM/HR-TEM zostało przeprowadzone w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego z zastosowaniem mikroskopu TALOS F200X umożliwiającym badanie składu pierwiastkowego próbki.

3.4.2. Pomiar metodą dynamicznego rozpraszania światła laserowego (DLS) oraz potencjału zeta

Metoda dynamicznego rozpraszania światła laserowego (*Dynamic Light Scattering*, DLS) jest powszechną techniką służącą do określania wielkości cząstek w zawiesinach koloidalnych w zakresie wielkości od nanometrów do mikrometrów. Jest ona odpowiednia do badania nanocząstek rozproszonych w rozpuszczalnikach. Pozwala na ocenę wielkości cząstek oraz informuje o obecności aglomeratów i agregatów w próbce. Ponadto, jest to technika nieinwazyjna, nieniszcząca i niedroga.²⁹⁵

Działanie DLS polega przede wszystkim na pomiarze ruchów Browna cząsteczek w roztworze. Cząsteczki zawieszone w ciekłym rozpuszczalniku podlegają losowym ruchom Browna. Światło jest rozpraszane na cząstkach w zawiesinie, ponieważ powodują one lokalne zmiany współczynnika refrakcji. Rozmiary cząstek w roztworze są określone na podstawie równania Stokesa-Einsteina (Równanie 2), które opisuje relacje między szybkością cząstek, a ich rozmiarem.²⁹⁸

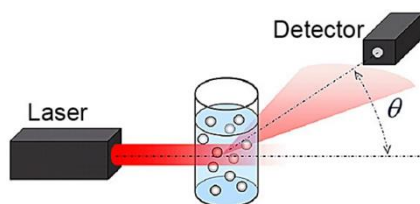
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

Równanie 2. Równanie Stokesa-Einsteina.

Gdzie: D - współczynnik dyfuzji,

k - stała Boltzmanna,
 T - temperatura,
 η - lepkość rozpuszczalnika,
 R_h - promieniem hydrodynamiczny cząstek w roztworze.²⁹⁸

Z tego względu znajomość dokładnej temperatury jest niezbędna do pomiarów DLS, ponieważ zależy od niej lepkość rozpuszczalnika. Monitorując ruch cząstek w pewnym zakresie czasu, można uzyskać informacje o rozmiarze makrocząstek, ponieważ duże cząsteczki dyfundują powoli przyjmując relatywnie stałą pozycję, w porównaniu z małymi cząsteczkami (jak cząsteczki rozpuszczalnika), które poruszają się szybciej i dlatego nie przyjmują określonej pozycji. W przypadku urządzenia do DLS, gdy światło lasera napotyka makrocząsteczki, rozprasza się ono we wszystkich kierunkach, a intensywność rozpraszania jest rejestrowana przez detektor. Monochromatyczne padające światło będzie podlegać zjawisku zwanemu poszerzeniem Dopplera, ponieważ makrocząsteczki w roztworze znajdują się w ciągłym ruchu.^{295,299}



Rys. 6. Podstawowa konfiguracja urządzenia DLS.³⁰⁰

Podstawowa konfiguracja instrumentu DLS została zaprezentowana na Rys. 6. Laser o jednej częstotliwości jest skierowany na próbkę zawartą w kuwecie. Światło lasera, padając na cząstki ulega rozproszeniu we wszystkich kierunkach i jest wykrywane pod pewnym kątem w czasie. Następnie, sygnał ten jest stosowany do określenia współczynnika dyfuzji i rozmiaru cząstek za pomocą równania Stokesa-Einsteina (Równanie 2).³⁰¹

W 1903 roku Smoluchowski opracował model umożliwiający obliczenie potencjału elektrokinetycznego, czyli potencjału zeta (ZP) cząstki stałej na granicy między ruchomym a stojącym ośrodkiem ciekłym otaczającym cząstkę.^{302,303} Metoda badania potencjału zeta (ZP) polega na pomiarze potencjału elektrostatycznego na podwójnej warstwie elektrycznej (warstwa Sterna oraz zewnętrzna warstwa rozproszona) otaczającej nanocząstkę w roztworze. W pomiarach tych, pole elektryczne jest przykładane do próbki, a ruchliwość elektroforetyczna nanocząstek jest mierzona za pomocą laserowego prędkościomierza Dopplera (LDV). Następnie, do obliczenia potencjału zeta stosuje się równanie Henry'ego (Równanie 3).^{303,304}

$$U_e = \frac{2\epsilon z \cdot f(\kappa a)}{3\eta}$$

Równanie 3. Równanie Henry'ego umożliwiające wyznaczenie ruchliwości elektroforetycznej.

Gdzie:

U_e - ruchliwością elektroforetyczną,

ϵ - stała dielektryczna,

η - lepkość bezwzględną przy zerowym ścinaniu ośrodka,

$f(\kappa a)$ - funkcja Henry'ego, gdzie κa jest miarą stosunku promienia cząstki do długości Debye'a.

Nanocząstki o potencjale zeta pomiędzy -10 i $+10$ mV są uważane w przybliżeniu za neutralne, podczas gdy nanocząstki o potencjale zeta większym niż $+30$ mV uważane są za silnie kationowe, a te z potencjałem mniejszym niż -30 mV za silnie anionowe. Ze względu na fakt, że większość błon komórkowych ma ładunek ujemny, potencjał zeta może wpływać na tendencję nanocząstek do przenikania przez te błony. W zastosowaniach biologicznych, powszechnie stosuje się pomiar potencjału zeta złota koloidalnego i w znacznej części przypadków jest to potencjał silnie anionowy.³⁰⁴

W celu przeprowadzenia analizy średnicy hydrodynamicznej nanocząstek metodą DLS oraz potencjału zeta roztwory wszystkich mierzonych nanocząstek zostały przygotowane w jednakowy sposób. Nanocząstki złota przefiltrowano z zastosowaniem filtrów strzykawkowych o wielkości porów $0,22\ \mu\text{m}$, następnie próbki rozcieńczono 5-krotnie, uzyskując tym samym roztwory nanocząstek o stężeniu $2,28\ \text{nM}$, zawierające $1,37 \cdot 10^{13}$ NPs/ml. Pomiar wykonywany był w specjalnie przeznaczony do tego kuwecie (DTS1070), a objętość roztworu AuNPs wynosiła $1\ \text{ml}$.



Fot. 1. Urządzenie Zeta Sizer Nano ZS stosowane do pomiarów DLA oraz potencjału zeta.

Na Fot. 1 przedstawiono urządzenie pomiarowe Zetasizer Nano ZS firmy Malvern, które w tej pracy stosowane było do pomiaru zarówno rozmiaru nanocząstek jak i potencjału zeta. Urządzenie to posiada $4,0\ \text{mW}$ laser He-Ne o długości fali $632,8\ \text{nm}$ oraz detektory w postaci fotodiody lawinowej.³⁰⁵ Zastosowane parametry pomiarowe były stałe i wynosiły: lepkość ośrodka $0,8872$, temperatura 25°C , współczynnik załamania światła materiału $1,332$. Każda z próbek była mierzona 3-krotnie.

Metody DLS oraz pomiar ZP zostały zastosowane do analizy następujących próbek: AuNPs $5\ \text{nm}$, AuNPs-PEG $1:50$, Au(Hg)NPs, Au(Hg)NPs-PEG-COOH ($1:50$), Au(Hg)NPs-PEG-COOH ($1:100$), Au(Hg)NPs-PEG-COOH ($1:500$) oraz Au(Hg)NPs-PEG-COOH ($1:1000$).

3.4.3. Spektrofotometria UV-Vis

Spektroskopia UV-Vis to technika spektrofotometryczna, która polega na pomiarze intensywności światła w obszarach ultrafioletowym ($10\text{--}400\ \text{nm}$) oraz światła widzialnego ($400\text{--}800\ \text{nm}$) jako funkcji długości fali. Technika ta działa w oparciu o zjawisko absorpcji światła, a ilość pochłoniętego światła jest wprost proporcjonalna do ilości analitu obecnego w roztworze próbki. Wraz ze wzrostem stężenia analitu absorpcja światła również wzrasta liniowo.³⁰⁶

Ilość absorpcji promieniowania pochłoniętego przez analit jest mierzona i przedstawiana na wykresie względem długości fali, w celu uzyskania widma. Widmo utworzone po absorpcji światła UV-Vis jest wynikiem interakcji promieniowania elektromagnetycznego w obszarze UV-Vis z analitem i stanowi podstawę do analizy różnych substancji, takich jak związki organiczne, nieorganiczne, biochemiczne i farmaceutyczne.^{306,307}

Prawo Lamberta-Beera (Równanie 4) opisuje liniową zależność między absorbancją światła, a stężeniem substancji i po wyznaczeniu odpowiedniej krzywej kalibracyjnej, dzięki molowemu współczynnikowi absorpcji (ϵ), umożliwia uzyskanie informacji o stężeniu badanej próbki.^{306,308}

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Równanie 4. Prawo Lamberta-Beera.

Gdzie:

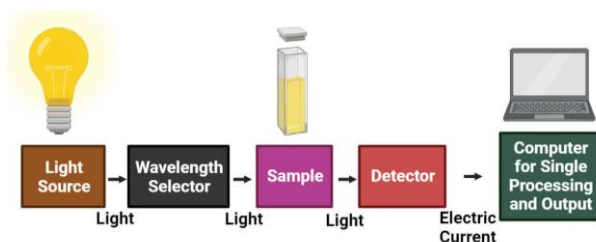
A – absorbancja,

ϵ – molowy współczynnik absorpcji [$\frac{1}{M \cdot cm}$],

l – długość drogi optycznej [cm],

c – stężenie próbki [M].

Urządzeniem pomiarowym w metodzie analitycznej UV-Vis jest spektrofotometr (Rys. 7). Składa się on ze źródła światła: zazwyczaj lampy deuterowej dla światła UV oraz lampy halogenowo-wolframowej dla światła widzialnego. Kolejnym, istotnym elementem budowy jest monochromator, który izoluje określone długości fal ze źródła światła i kieruje je przez umieszczoną w kuwecie próbkę. Po przejściu przez próbkę, światło dociera do detektora mierzącego jego intensywność. Następnie, dane te są przetwarzane w celu obliczenia wartości absorbancji, generując widmo, które odzwierciedla interakcję próbki ze światłem.^{306,309}



*Rys. 7. Schematyczna budowa spektrofotometru UV-Vis.*³⁰⁹

Spektroskopia UV-Vis jest bardzo funkcjonalną techniką umożliwiającą oszacowanie wielkości, stężenia i poziomu agregacji nanocząstek złota. Spektrometry UV-Vis są obecne w większości laboratoriów, analiza jest nieniszcząca, a rejestracja widma wymaga krótkiego czasu.³¹⁰

W celu przygotowania próbek do pomiaru, każda z nich została odwirowana na koncentratorach wirówkowych Amicon o objętości 4 ml i odcięciu membrany 100 kDa, a następnie zdyspergowana w 1 ml wody dejonizowanej. Badane próbki były 10-krotnie rozcieńczone i zawierały $6,84 \cdot 10^{12}$ AuNPs/ml. Przygotowane anality umieszczano w kuwecie przeznaczonej do pomiarów UV-Vis (UV Mikro K-6221, Bionovo) i przeprowadzano analizę.



Fot. 2. Spektrofotometr JASCO V-750.

W tej pracy, spektrofotometria UV-Vis została zastosowana do zbadania różnic w maksimach absorpcji oraz kształtach widm dla AuNPs, AuNPs-PEG 1:50, Au(Hg)NPs, Au(Hg)NPs-PEG. Pomiary wszystkich próbek wykonano na spektrofotometrze JASCO V-750 (Fot. 2.).

3.4.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (*ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) ma szeroki zakres zastosowań, od badania małych cząsteczek i kompleksów molekularnych po analizę komórek i tkanek. Technika ta umożliwia zarówno analizy jakościowe, jak i ilościowe, obejmując różnorodne materiały i warunki.

Widoczne na widmie FTIR piki reprezentują wzbudzenie drgań oscylacyjnych cząsteczek, co wiąże się z obecnością w badanym związku specyficznych wiązań chemicznych i grup funkcyjnych. Widmo IR związku jest jedną z jego najbardziej charakterystycznych właściwości fizycznych. Badania nad związkami modelowymi i coraz powszechniejsze wykorzystanie chemii teoretycznej pozwalają na interpretację widm IR w kategoriach specyficznych cech strukturalnych badanej grupy chemicznej lub cząsteczki.^{311,312,313}

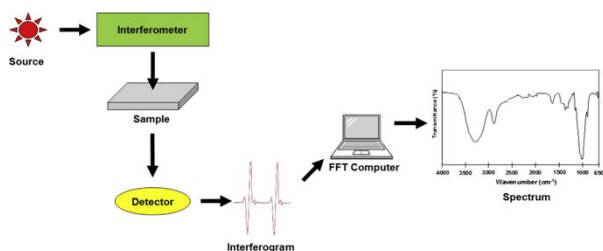
Spektroskopia w podczerwieni bada zatem drgania molekularne. Drgania rozciągające w cząsteczce opisywane są za pomocą modelu oscylatora harmonicznego, w którym wiązanie chemiczne jest reprezentowane przez dwie masy punktowe połączone sprężyną. Siła wiązania to napięcie sprężyny (k), a masy punktowe (m_1 i m_2) reprezentują masy atomów lub grup chemicznych zaangażowanych w wiązanie. Częstotliwość oscylacji (ν) opisuje Równanie 5.^{312,313}

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 \cdot m_2}}$$

Równanie 5. Równanie oscylatora harmonicznego.³¹²

Częstotliwość drgań jest więc zależna od siły wiązania. Wiazania pojedyncze wykazują niższe częstotliwości w porównaniu z wiązaniami potrójnymi oraz podwójnymi.³¹²

Spektrofotometr stosowany do pomiaru widma FTIR został schematycznie zilustrowany na Rys. 8.



Rys. 8. Schemat obrazujący podstawową zasadę działania spektroskopii FTIR.³¹²

Urządzenie to wytwarza wiązkę promieniowania podczerwonego, która następnie przechodzi do interferometru, gdzie następuje kodowanie spektralne. Rekombinacja wiązek o różnych długościach ścieżki w interferometrze tworzy interferogram. Wiązka przechodzi następnie przez próbkę, która pochłania określone częstotliwości energii, charakterystyczne dla swojej struktury. Następnie, detektor mierzy sygnał interferogramu w jednostkach energii względem czasu dla wszystkich częstotliwości jednocześnie. Ostatecznie dzięki oprogramowaniu wykorzystującemu transformację Fouriera uzyskiwane jest widmo.^{311,312}

Metodę spektroskopii FTIR zastosowano w celu uwidocznienia modyfikacji nanocząstek złota PEG-iem, a tym samym jakościowego potwierdzenia jego obecności na powierzchni nanostruktur.

Zbadano następujące nanocząstki oraz ich koniugaty: AuNPs oraz AuNPs-PEG, a także Au(Hg)NPs oraz Au(Hg)NPs-PEG. Próbkę przed pomiarem zatężono 10-krotnie na koncentratorach wirówkowych Amicon, a następnie zliofilizowano. Liczba nanocząstek w próbkach pomiarowych wynosiła $6,84 \cdot 10^{14}$ AuNPs/próbkę. Otrzymany proszek wykorzystano do utworzenia pastylek z matrycą KBr.



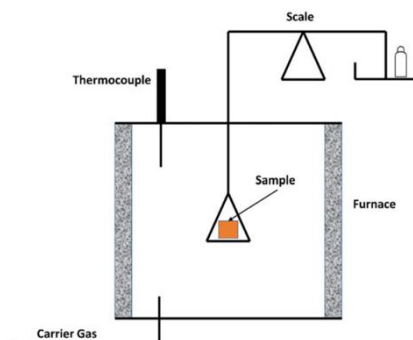
Fot. 3. Spektrometr FTIR Nicolet is10 (Thermo Scientific).

Widma próbek w zakresie średniej podczerwieni ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) zostały zarejestrowane w postaci pastylek z matrycą KBr za pomocą spektrometru FTIR Nicolet is10 firmy Thermo Scientific (Fot. 3).

3.4.5. Analiza termograwimetryczna (TGA)

Analiza termograwimetryczna (ang. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) jest prawdopodobnie najczęściej stosowaną techniką analizy termicznej będącą jedną z najbardziej użytecznych metod badań fizykochemicznych. TGA dostarcza informacji o wiązaniu składników w próbce poprzez pomiar bezwzględnej ilości i szybkości zmiany masy próbki jako funkcji czasu lub temperatury w kontrolowanym środowisku. Technika ta pozwala zmierzyć szeroki zakres właściwości, takich jak stabilność termiczna, stabilność oksydacyjna, wilgotność i zawartość substancji lotnych, oraz w zależności od warunków również skład układów wieloskładnikowych.³¹⁴

Schematyczny układ systemu do pomiaru TGA przedstawia Rys. 9. Podstawą pomiarów jest zmiana masy próbki w wyniku obróbki cieplnej. W wyniku tego procesu część masy jest tracona w postaci substancji lotnych lub rozkładu, a utratę masy mierzy się zwykle za pomocą mikrowagi. Próbka jest umieszczana na szalce lub w pojemniku specjalnie zaprojektowanym do tego rodzaju pomiarów. Temperatura mierzona jest za pomocą termopar, które mają kontakt z pojemnikiem na próbkę. Tygielek z próbką jest umieszczany na szalce, która jest połączona z mikrowagą. W analizatorze TGA wysoka temperatura jest osiągana za pomocą pieca elektrycznego, który może osiągnąć temperaturę do 2000°C, w zależności od zastosowanych materiałów i konstrukcji pieca oraz innych komponentów.³¹⁵



Rys. 9. Schematyczne przedstawienie działania pomiaru metodą TGA.³¹⁵

Metodą analizy termograwimetrycznej zbadano następujące nanocząstki oraz ich koniugaty: AuNPs, AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs oraz Au(Hg)NPs-PEG. Próbki przygotowane zostały w taki sam sposób jak dla pomiarów FTIR. Celem analizy było potwierdzenie obecności PEG-u oraz rtęci na powierzchni nanocząstek.



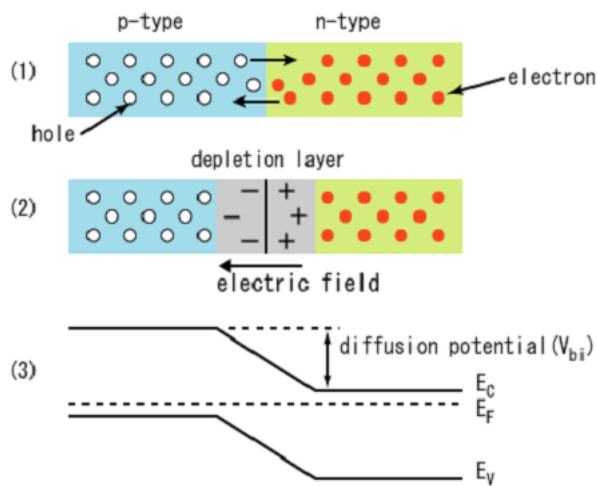
Fot. 4. Analizator termograwimetryczny SDT Q600 (TA Instruments).

Krzywe rozkładu termicznego próbek zarejestrowano za pomocą analizatora termogravimetrycznego SDT Q600 firmy TA Instruments (Fot. 4) w atmosferze powietrza (100 ml/min) przy szybkości nagrzewania 10°C/min.

3.4.6. Półprzewodnikowy detektor z wysokiej czystości germanem (HPGe)

Wysokorozdzielcza spektrometria gamma z detektorem germanowym o wysokiej czystości (HPGe) jest nieniszczącą techniką, która jest szeroko stosowana do określania aktywności promieniotwórczej radionuklidów w laboratoriach.

Detektor z wysokiej czystości germanem posiada kryształ germanu składający się ze spolaryzowanego w kierunku zaporowym złącza p-n (Rys. 10). Kryształ ten pełni kluczową rolę jako aktywna część detektora i jest wrażliwy na promieniowanie jonizujące, w szczególności promienie rentgenowskie i promienie gamma.



Rys. 10. Schemat obrazujący sposób działania diody p-n.³¹⁶

Pod wpływem polaryzacji zaporowej pole elektryczne rozciąga się przez obszar wewnętrzny lub zubożony detektora. Gdy fotony oddziałują z materiałem w zubożonej objętości detektora, wytwarzane są nośniki ładunku, które kierowane są przez pole elektryczne do elektrod p i n. Ładunek ten, który jest proporcjonalny do energii zdeponowanej w detektorze przez przychodzący foton, jest przekształcany w impuls napięcia przez integralny przedwzmacniacz wrażliwy na ładunek. Ze względu na stosunkowo małą przerwę pasmową w germanie, detektory te muszą być chłodzone zmniejszając wytwarzanie ciepła przez nośniki ładunku. W tym celu zazwyczaj stosuje się ciekły azot umieszczony w dewarze.³¹⁷

Kwant promieniowania może zdeponować w detektorze część lub całość swojej energii. Z punktu widzenia analizy jakościowej, najistotniejsza jest sytuacja, w której cała energia kwantu pozostaje w detektorze (efekt fotoelektryczny). Energia ta jest energią charakterystyczną dla każdego izotopu, co pozwala na jego jednoznaczną identyfikację.^{317,318}

Dużą zaletą stosowania detektora germanowego jest fakt, że posiada on doskonałą rozdzielczość energetyczną dla spektroskopii gamma. Wysoka rozdzielczość energetyczna pozwala na rozróżnienie przez detektor kwantów gamma o podobnych energiach, a im jest ona wyższa, tym bardziej zdefiniowane staje się widmo. Rozdzielczość detektora jest determinowana przez jego rozmiar oraz jakość. Istnieją trzy czynniki, z których każdy może być w różnym stopniu istotny. Są to statystyczny rozrzut liczby nośników ładunku, zmiany w wydajności zbierania ładunku oraz wkład szumu elektronicznego.^{317,319}



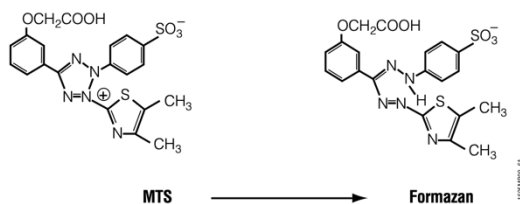
Fot. 5. Detektor germanowy wysokiej czystości zastosowany do pomiaru aktywności promieniotwórczej próbek w analizie stabilności oraz frakcjonowania jądra komórkowego.

W tej pracy zastosowano kilka detektorów HPGe, a jeden z nich został przedstawiony na Fot. 5. Metodę spektrometrii gamma zastosowano do wyznaczania aktywności promieniotwórczej próbek w pomiarach dla analizy stabilności i frakcjonowania jądra komórkowego, a także do szczegółowej analizy składu tarcz po produkcji radionuklidów $^{197m/197}\text{Hg}$.

3.4.7. Test MTS

Badanie testem MTS jest metodą kolorymetryczną stosowaną do określania ilości żywych komórek w testach cytotoksyczności oraz proliferacji. Główną zaletą tego badania, w porównaniu z innymi podobnymi testami (np. testem MTT), jest to że barwny produkt formazanowy MTS/PMS jest rozpuszczalny w standardowej pożywce do hodowli komórkowych i można go mierzyć bezpośrednio na płytce, bez konieczności dodatkowego rozpuszczania, co czyni test MTS doskonałą metodą do szybkiej oceny cytotoksyczności dużej liczby związków w różnych stężeniach.³²⁰

W niniejszym badaniu, aktywność mitochondrialnego białka dehydrogenazy bursztynianowej występującego w komórkach aktywnych metabolicznie, w obecności metosiarczanu fenazyny (PMS), przekształca pomarańczową sól tetrazolową w rozpuszczalny w wodzie formazan. Związek tetrazolowy MTS (3-(4,5-dimetylotioazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol) ulega więc bioredukcji przez komórki do barwnego produktu formazanu według schematu reakcji przedstawionego na Rys. 11.



Rys. 11. Schemat reakcji redukcji związku MTS do formazanu.³²¹

Oznaczenia przeprowadza się poprzez dodanie niewielkiej ilości odczynnika MTS/PMS bezpośrednio do dołków zawierających komórki na płytce 96-dołkowej, a następnie inkubuje przez 2 godziny.³²¹

Ilość produktu formazanowego określana jest poprzez pomiar absorbancji dla długości fali 490 nm i jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek w hodowli, co pozwala na wyznaczenie cytotoksyczności badanych związków. W tej pracy określenie właściwości cytotoksycznych otrzymanych koniugatów zostało

przeprowadzone z zastosowaniem testu proliferacji komórek CellTiter 96® AQueous One Solution, a pomiar absorbancji został wykonany na czytniku BioTek Synergy H1 Multimode Reader (Fot. 6).



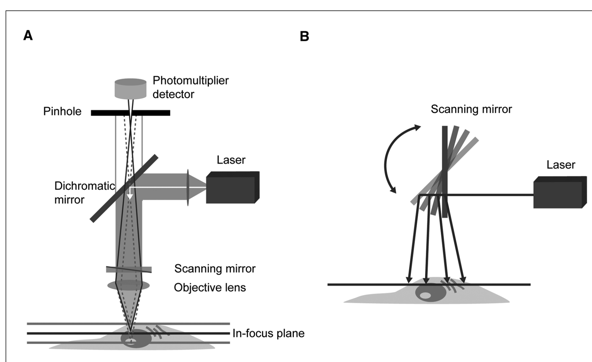
Fot. 6. Czytnik BioTek Synergy H1 Multimode Reader.

Testem MTS oceniono działanie cytotoksyczne nieradioaktywnych nanocząstek złota, ich koniugatów z rtęcią oraz radiokoniugatów zawierających $^{197m}/^{197}\text{Hg}$, a także radiokoniugatów zawierających ^{198}Au na liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G. Szczegółowy opis przeprowadzonej procedury oraz parametry badanych związków przedstawiono w rozdziale 3.5.7.4. Badanie cytotoksyczności testem MTS.

3.4.8. Mikroskopia konfokalna do obrazowania dwuniciowych pęknięć DNA

Technika mikroskopii konfokalnej pozwala na uzyskanie obrazów komórek o bardzo wysokiej jakości. Nowoczesny mikroskop konfokalny jest w stanie zbierać obrazy multispektralne w całym zakresie światła widzialnego. Technika ta jest szeroko stosowana zarówno w biologii komórki, jak i medycynie. Dzięki mikroskopii konfokalnej możliwe jest m.in. badanie bioplastów, lokalizacji cząsteczek białek i przeciwciał oraz innych związków w odniesieniu do struktur komórkowych lub tkankowych, a ponadto monitorowanie dynamicznych procesów komórkowych.³²²

Schemat budowy mikroskopu konfokalnego oraz uproszczona zasada jego działania zostały przedstawione na Rys. 12. Światło ze źródła laserowego przechodzi przez optykę kolimującą do zmiennego lustra dichromatycznego i jest odbijane do obiektywu, który skupia wiązkę na punkcie próbki. Lustra skanujące przesuwają wiązkę wzbudzenia nad próbką i tworzą obraz. Następnie emitowana fluorescencja przechodzi z powrotem przez obiektyw i lustro dichromatyczne i jest wykrywana przez fotopowielacze o wysokiej czułości. Obrazowanie widmowe można uzyskać za pomocą układu fotopowielaczy i kratki dyfrakcyjnej lub pryzmatu, umieszczonych na ścieżce światła emisyjnego.³²³



Rys. 12. Schematyczne przedstawienie budowy oraz zasady działania mikroskopu konfokalnego.³²³

Mikroskopia konfokalna posiada szereg istotnych zalet w porównaniu z konwencjonalną mikroskopią fluorescencyjną. Należą do nich przede wszystkim zwiększona efektywna rozdzielczość, zmniejszone rozmycie obrazu z powodu rozpraszania światła, poprawiony stosunek sygnału do szumu, możliwość skanowania w osi z oraz regulacja powiększenia elektronicznego.³²⁴

W niniejszej pracy mikroskopia konfokalna została zastosowana do wizualizacji podwójnych pęknięć nici DNA. W celu zobrazowania jąder komórkowych w próbce wybarwiono je barwnikiem Hoechst 33258, a dzięki zastosowaniu przeciwciała anti- γ H2AX (Ser139) na obrazach uwidocznione zostały również pęknięcia dwuniciowe DNA.³²⁵

Obrazowanie dwuniciowych pęknięć DNA przy użyciu techniki mikroskopii konfokalnej zostało wykonane przez dra hab. Mateusza Wierzbickiego, prof. SGGW, z zastosowaniem mikroskopu Olympus FV100, w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Badano radiokoniugat $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml na dwóch liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G.

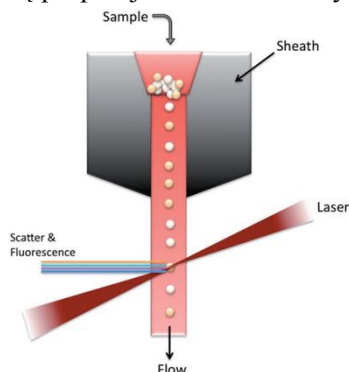
Otrzymane zdjęcia analizowano z zastosowaniem programu Fiji ImageJ2 2.14.0. Analizę ilościową przeprowadzono także w programie Fiji ImageJ2 2.14.0. z zastosowaniem języka programowania Macro.

3.4.9. Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest techniką laserową umożliwiającą szybką analizę wielkości i ziarnistości cząstki, a tym samym pozwala na wykorzystanie wielu czynników fluorescencyjnych pozwalających wykryć zmiany zachodzące w pojedynczych komórkach oraz ich populacjach. Każda cząsteczka jest analizowana pod kątem rozproszenia światła widzialnego oraz jednego lub wielu parametrów fluorescencji. Rozproszenie światła widzialnego jest mierzone w dwóch różnych kierunkach: w kierunku do przodu (FSC, ang. *forward scatter*), który może wskazywać względny rozmiar komórki, oraz pod kątem 90° (rozproszenie boczne – SSC, ang. *side scatter*), który wskazuje na wewnętrzną złożoność lub ziarnistość komórki. Rozproszenie światła jest niezależne od fluorescencji. Próbkę są przygotowywane do pomiaru fluorescencji poprzez transfekcję i ekspresję białek fluorescencyjnych, barwienie barwnikami fluorescencyjnymi (np. jodkiem propidyny, który znakuje kwasy nukleinowe np. DNA) lub immunobarwienie przeciwciałami sprzężonymi fluorescencyjnie (np. FITC).³²⁶

Podstawowa zasada cytometrii przepływowej jest związana z rozpraszaniem światła i emisją fluorescencji, której źródłem jest wiązka laserowa uderzająca w poruszające się cząstki (Rys. 13). Głównymi elementami budowy cytometrów przepływowych są układy przepływowe, optyka oraz detektory i komputer. Układ przepływowy odpowiada za kierowanie cząstek do skupionego źródła światła. Układ

optyczny wzbudzający skupia źródło światła na komórkach lub cząstkach, a układ optyczny zbierający przesyła rozproszone/fluorescencyjne światło do detektora, a ten do komputera. Ostatecznie, sygnał jest przekształcany na dane cyfrowe, które są proporcjonalne do intensywności światła.³²⁷



Rys. 13. Podstawowa zasada działania cytometru przepływowego.³²⁷

Metoda cytometrii przepływowej została w tej pracy zastosowana do selektywnego odróżnienia komórek apoptotycznych od komórek żywych i martwiczych w badanych populacjach, a tym samym określenia ich odsetka znajdującego się we frakcjach komórek żywych, w późnej lub wczesnej apoptozie oraz nekrozie.

Ponadto, technikę cytometrii przepływowej zastosowano do analizy cyklu komórkowego w celu oszacowania części populacji komórek znajdujących się w różnych fazach cyklu G0/G1, S, G2/M.

Do analizy apoptozy wykorzystano dwa fluorochromy: aneksynę V skoniugowaną z FITC do identyfikacji fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej oraz jodek propidyny (PI) do znakowania DNA w martwych komórkach o uszkodzonej błonie. Dzięki takiej kombinacji fluorochromów można wyróżnić cztery populacje komórek: żywe (niewybarwione), martwe na skutek nekrozy (barwiące się PI), we wczesnej fazie apoptozy (barwiące się aneksyną V) oraz w późnej fazie apoptozy (barwiące się PI oraz aneksyną V).^{328,329}

W celu zbadania cyklu komórkowego, oznaczano ilość DNA w komórkach za pomocą enzymu RNA-se oraz jodku propidyny. Komórki znajdujące się w fazie G0/G1 mają ilość DNA równą 1 jednostce, natomiast komórki w fazie S zwiększają jego zawartość stopniowo, aż ostatecznie duplikują swoje DNA, zwiększając jego zawartość do 2 jednostek w fazie G2/M. Metoda analizy zawartości DNA jest najczęściej stosowaną i najszybszą metodą analizy cyklu komórkowego.³²⁹

Analizy apoptozy oraz cyklu komórkowego przeprowadzono dla następujących koniugatów:

- AuNPs-PEG oraz Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci 10 oraz 8 $\mu\text{g/ml}$,
- $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}$ NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml,
- ^{198}Au NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml i 50 MBq/ml,
- $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}$ NPs-PEG o stężeniach ^{198}Au wynoszących 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml i o stężeniach $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml.

Wszystkie analizy wykonane zostały dla 10 000 zdarzeń.



Fot. 7. Cytometr BD FACSCelesta.

Badania cytometrią przepływową prowadzono na dwóch liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G z zastosowaniem urządzenia BD FACSCelesta (Fot. 7) z oprogramowaniem FACSDiva™ (wersja 8.0).

3.4.10. Analiza statystyczna

Statystyczną analizę danych wykonano w języku programowania Python z zastosowaniem biblioteki Matplotlib.

Przeprowadzono niezależny test t-Studenta oraz wielogrupową jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Poziomy istotności statystycznej oznaczono na wykresach zgodnie z notacją gwiazdkową, gdzie * dla $p < 0,05$, ** dla $p < 0,01$ oraz ***p dla 0,001.

Niepewności pomiarowe funkcji złożonych zostały obliczone metodą różniczki zupełnej według wzoru (Równanie 6).

$$\Delta y = \left| \frac{\partial f}{\partial x_1} \right| \cdot \Delta x_1 + \left| \frac{\partial f}{\partial x_2} \right| \cdot \Delta x_2 + \dots + \left| \frac{\partial f}{\partial x_n} \right| \cdot \Delta x_n$$

Równanie 6. Wzór na niepewność pomiarową funkcji złożonej – metoda różniczki zupełnej.

Gdzie:

Δy – niepewność pomiarowa funkcji złożonej,

$\frac{\partial f}{\partial x_n}$ – pochodna funkcji po parametrze n,

Δx_n – niepewność pomiarowa parametru.

3.5. Metodyka przeprowadzonych badań

3.5.1. Otrzymywanie radionuklidów rtęci $^{197m/197}\text{Hg}$

Izotop ^{196}Hg charakteryzuje się bardzo dużym przekrojem czynnym na produkcję radionuklidu ^{197}Hg poprzez reakcję jądrową $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 3078 barnów, oraz przekrojem czynnym na produkcję radionuklidu ^{197m}Hg wynoszącym 105 barnów. Własność ta pozwala na osiągnięcie bardzo wysokich aktywności właściwych radionuklidu ^{197}Hg , które mogą być porównywane z tymi uzyskiwanymi

dla produkcji radiofarmaceutyków.²³³ Jest to wyjątkowo istotne ze względu na potencjalne zastosowanie kliniczne radionuklidów rtęci $^{197m/197}\text{Hg}$ w przyszłości.

Rutynową produkcję radionuklidów rtęci $^{197m/197}\text{Hg}$, przeprowadzono w reaktorze jądrowym. Radionuklidy otrzymywano poprzez napromienienie stabilnej tarczy ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) w strumieniu neutronów termicznych, w wyniku reakcji jądrowej $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197m/197}\text{Hg}$. Do reakcji wykorzystywano tarczę wzbogaconą izotopowo do $55,36 \pm 0,15\%$ w ^{196}Hg .

Wzbogaconą rtęć w postaci metalicznej (3 mg) zakupiono w firmie ISOFLEX USA i rozpuszczono w 30% HNO_3 otrzymując roztwór o stężeniu 6 mg/ml. Następnie, roztwór ten przeniesiono do szklanej fiolki i przechowywano zamknięty w temperaturze 4°C do czasu zaplanowanego napromieniania.

Tydzień przed planowanym napromienieniem, 8,33 lub 16,67 μl (odpowiednio 50 lub 100 μg Hg) roztworu tarczy przeniesiono do fiolki kwarcowej i odparowano do sucha. Fiolkę kwarcową zamknięto termicznie i napromieniano w reaktorze jądrowym Maria (Świerk, NCBJ, Polska) w strumieniu neutronów $10^{14} \text{ n/cm}^2\text{s}$ przez 7 godzin. Czas schładzania próbki wynosił 1 godzinę.

Teoretyczną, oczekiwaną aktywność tarczy po napromienieniu opisuje wzór (Równanie 7).

$$A = N_A \cdot \Phi \cdot m \cdot Ab \cdot \frac{\sigma}{M_{\text{tarczy}}} \cdot (1 - e^{-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} t_i}) \cdot e^{-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} t_c}$$

Równanie 7. Aktywność promieniotwórcza radionuklidu powstającego w wyniku aktywacji tarczy w strumieniu neutronów termicznych.

Gdzie:

A - aktywność tarczy po aktywacji [Bq]

N_A - liczba Avogadro

Φ - gęstość strumienia neutronów [$\frac{\text{n}}{\text{cm}^2\cdot\text{s}}$]

m - masa materiału tarczowego [g]

Ab - abundancja izotopu tarczy w próbce [%]

σ - przekrój czynny na reakcję [b]

M_{tarczy} - masa molowa izotopu tarczy [g/mol]

$T_{1/2}$ - czas połowicznego rozpadu izotopu produkowanego [h]

t_i - czas napromieniowania [h]

t_c - czas schładzania [h]

Obliczona ze wzoru spodziewana aktywność promieniotwórcza radionuklidów rtęci produkowanych tą metodą wynosiła 3,79 GBq ^{197}Hg oraz 321 MBq ^{197m}Hg . Aktywność zmierzona na detektorze HPGe była nieznacznie niższa od spodziewanej i znajdowała się na poziomie $3,568 \pm 0,535$ GBq dla ^{197}Hg oraz $219,3 \pm 32,9$ MBq dla ^{197m}Hg .

Otrzymywana aktywność właściwa radionuklidu ^{197}Hg była bardzo wysoka i wynosiła $35,680 \pm 5,352$ GBq/mg.

Po aktywacji tarczy próbka była rozpuszczana w 100 μl 2% r-r HNO_3 , a otrzymany roztwór o stężeniu 1 mg/ml, bez dalszych modyfikacji, stosowano do syntezy radiokoniugatu z nanocząstkami złota.

3.5.2. Otrzymywanie radionuklidu złota ^{198}Au

Prekursorem do syntezy radioaktywnych nanocząstek złota był radionuklid ^{198}Au . Radionuklid ten otrzymywano w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(n, \gamma)^{198}\text{Au}$. Wysoki przekrój czynny na tę reakcję wynoszący 98,7 barnów pozwolił na wydajne pozyskiwanie ^{198}Au koniecznego do syntezy radioaktywnych nanocząstek $^{198}\text{AuNPs}$.

W celu minimalizacji ryzyka związanego z obróbką chemiczną metalicznej tarczy złotej, jako prekursora w tej reakcji użyto roztworu wzorcowego chlorku złota (500 μl , 1000 mg/l). Aby przygotować tarczę do naświetlania, roztwór wzorcowy chlorku złota odparowywano do sucha w kwarcowej fiolce w temperaturze 120°C. Fiolkę kwarcową zamykano termicznie, a następnie, powstały proszek poddawany był aktywacji w strumieniu neutronów 10^{14} n/s·cm² przez 7 godzin w reaktorze jądrowym Maria (NCBJ, Świerk). Czas schładzania próbki wynosił 1 godzinę.

Spodziewana aktywność promieniotwórcza obliczona według wzoru przedstawionego w poprzednim podrozdziale (Równanie 7.) wynosiła 1,1 GBq. Jednakże, próbka dostarczana z reaktora charakteryzowała się aktywnością nieznacznie wyższą, wynoszącą 1,5 GBq. Tym samym, aktywność właściwa radionuklidu ^{198}Au wynosiła 3,0 GBq/mg.

Po napromienieniu próbki, osad $\text{H}^{198}\text{AuCl}_4$ rozpuszczano w wodzie i stosowano do syntezy radioaktywnych nanocząstek złota według opisu zamieszczonego w rozdziale 3.5.3. Synteza nanocząstek złota oraz radioaktywnych nanocząstek złota”.

3.5.3. Synteza nanocząstek złota oraz radioaktywnych nanocząstek złota

Synteza nanocząstek złota (AuNPs 5 nm) oraz radioaktywnych nanocząstek złota ($^{198}\text{AuNPs}$ 5 nm) została przeprowadzona według metody opisanej przez Turkevicha.³³⁰

Do syntezy nieradioaktywnych nanocząstek (AuNPs) jako prekursor użyto chlorek złota zakupiony z firmy Sigma-Aldrich, natomiast dla radioaktywnych nanocząstek ($^{198}\text{AuNPs}$) zastosowano roztwór wzorcowy chlorku złota (500 μl , 1000 mg/l) odparowany do sucha w kwarcowej fiolce, w temperaturze 120°C, a po napromienieniu rozpuszczony w wodzie.

W przypadku syntezy AuNPs roztwór 17,26 mg chlorku złota w 94,33 ml wody doprowadzono do wrzenia w okrągłodennej kolbie dwuszyjnej o objętości 250 ml. Następnie do roztworu dodano podgrzane do 95°C roztwory cytrynianu sodu (39,3 mg) rozpuszczonego w 3,91 ml wody oraz 17,26 mg kwasu taninowego rozpuszczonego w 1,71 ml wody. Mieszanie reakcyjną ogrzewano do temperatury wrzenia w łaźni olejowej i mieszano pod chłodnicą zwrotną przez 15 minut. Układ zastosowany do syntezy przedstawiono na Fot. 8.



Fot. 8. Układ stosowany do syntezy AuNPs.

W wyniku przeprowadzonej syntezy otrzymano roztwór koloidalny nanocząstek złota o ciemnoczerwonym zabarwieniu (Fot. 9).



Fot. 9. Produkt syntezy - roztwór AuNPs o średnicy 5 nm.

W przypadku radioaktywnych $^{198}\text{AuNPs}$, do roztworu radioaktywnego chlorku złota powstałego po rozpuszczeniu osadu w kwarcowej fiole dodano 0,867 mg nieradioaktywnego chlorku złota i rozpuszczono w 8,93 ml wody. Roztwór doprowadzono do wrzenia. Następnie do roztworu dodano podgrzane do 95°C roztwory cytrynianu sodu (3,93 mg) rozpuszczonego w 0,391 ml oraz 1,73 mg kwasu taninowego rozpuszczonego w 0,171 ml wody. Mieszaninę reakcyjną poddano mieszaniu w temperaturze wrzenia w łaźni olejowej, przez czas 15 minut. Otrzymano roztwory koloidalne nanocząstek złota o ciemnoczerwonym zabarwieniu. Obliczone stężenie molowe zsintezowanych roztworów nanocząstek wynosiło 11,4 nM, natomiast liczba nanocząstek to $6,84 \cdot 10^{13}$.

Przed kolejnymi etapami syntezy koniugatów, nanocząstki odfiltrowano przez filtr strzykawkowy Milipore o wielkości porów $0,22 \mu\text{m}$.

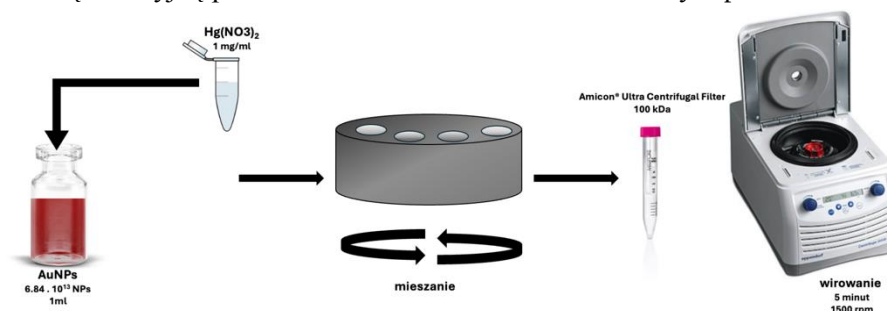
Roztwór nanocząstek złota po syntezie osłonięto przed światłem i przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C .

3.5.4. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota rtęcią

W celu otrzymania trwałego połączenia nanocząstek złota z rtęcią wykorzystano naturalne powinowactwo złota do rtęci.³³¹ Złoto w formie nanocząstek może zarówno adsorbować jak i amalgamować rtęć na swojej powierzchni. Hg(II) jest eliminowana z roztworu poprzez redukcję do Hg(0) jeszcze przed interakcją z AuNPs.²⁴⁴ Biorąc pod uwagę potencjał standardowy Au(III)/Au(0), $E^0 = 1,51$ V nie jest możliwe, aby w warunkach normalnych zachodziła reakcja redoks między Hg(II) oraz Au(0).²⁴⁴ Ponadto, występujący na powierzchni nanocząstek cytrynian sodu sam nie wykazuje działania redukującego na Hg(II).³³² Jednakże ustalono, iż bardzo reaktywne powierzchniowe atomy złota w AuNPs są katalizatorem reakcji redukcji Hg(II) przez cytrynian sodu w procesie adsorpcji/amalgamacji Hg(0) i stąd układ AuNPs stabilizowany cytrynianami sprawdza się w procesie adsorpcji/amalgamacji Hg(II) z roztworu.²⁴⁴

W niniejszej pracy zastosowano dwa czynniki redukujące znajdujące się na powierzchni oraz stabilizujące AuNPs, tj. kwas taninowy oraz cytrynian sodu.

Reakcję przeprowadzono w temperaturze pokojowej według schematu przedstawionego na Rys. 14. Do 1 ml AuNPs/¹⁹⁸AuNPs ($6,84 \cdot 10^{13}$ NPs; 11,4 nM) dodano 10 μ l roztworu wzorcowego rtęci (10 μ g, 1 mg/ml) w 2% HNO₃ lub 10 μ l (10 μ g, 1 mg/ml) radioaktywnego roztworu rtęci (^{197m}/¹⁹⁷Hg) w 2% HNO₃. Następnie mieszaninę reakcyjną poddano mieszaniu na mieszadło kołowym przez 1 h.



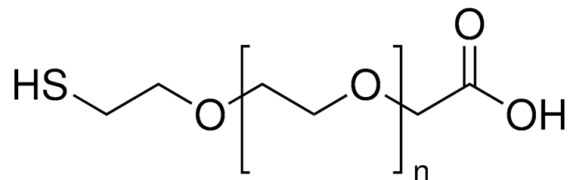
Rys. 14. Schemat obrazujący reakcję przyłączania rtęci do nanocząstek złota.

W celu oczyszczenia otrzymanego produktu zastosowano koncentratory wirówkowe Amicon o objętości 4 ml i wielkości membrany 100 kDa. Tak dobrane koncentratory pozwoliły na skuteczne i szybkie oczyszczenie produktu reakcji bez dużych strat (<20%). Po oczyszczeniu, nanocząstki zebrano z membrany poprzez ich dyspersję w 1 ml wody dejonizowanej.

Otrzymany produkt stosowano do dalszej syntezy radiokoniugatu z glikolem polietylenowym.

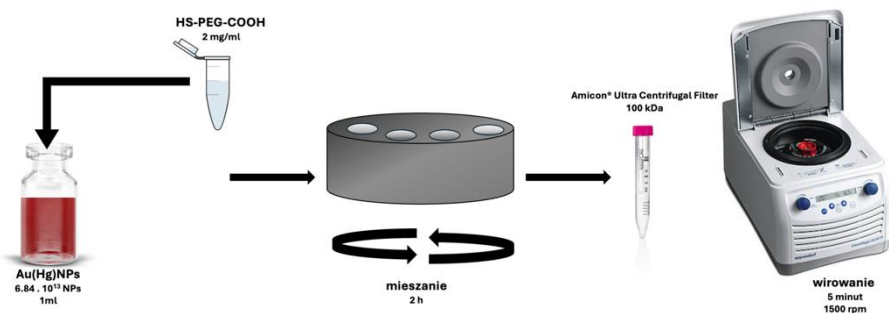
3.5.5. Stabilizacja nanocząstek glikolem polietylenowym (PEG)

W celu stabilizacji otrzymanego koniugatu nanocząstek złota z rtęcią Au/¹⁹⁸Au(Hg/^{197m}/¹⁹⁷Hg)NPs zastosowano glikol polietylenowy. Polimer ten jest szeroko stosowany do zmniejszenia tendencji nanocząstek do aglomeracji poprzez utworzenie na ich powierzchni glikolowej otoczki.^{333,334} Ze względu na powinowactwo grupy tiolowej do nanocząstek złota oraz szerokie zastosowanie tego połączenia w katalizie i elektronice molekularnej,³³⁵ do reakcji wybrano glikol polietylenowy modyfikowany właśnie grupą tiolową. Glikol polietylenowy stosowany w tej pracy miał średnią masę molową wynoszącą 5000 g/mol i był modyfikowany grupą tiolową z jednej strony oraz grupą karboksylową z drugiej strony. Odczynnik przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. 15), gdzie liczba $n \approx 110$.



Rys. 15. Struktura chemiczna stosowanego glikolu polietylenowego (kwas poli(glikol etylenowy)-2-merkptoetyloetero etanowy), $n \approx 110$.

Rutynową syntezę stabilizacji nanocząstek przeprowadzano dla 50-krotnego nadmiaru molowego PEG-u do AuNPs, według schematu przedstawionego na Rys. 16.



Rys. 16. Schemat obrazujący reakcję stabilizacji koniugatu Au(Hg)NPs glikolem polietylenowym.

Do 1 ml koniugatu/radiokoniugatu ($6,84 \cdot 10^{13}$ NPs; 11,4 nM) dodawano wodny roztwór glikolu polietylenowego (HS-PEG-COOH) o masie molowej 5000 g/mol (27,08 μg ; 13,54 μl ; 2 mg/ml) i mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadzie kołowym przez 2 h. W celu oczyszczenia otrzymanego produktu stosowano koncentratory wirówkowe Amicon o objętości 4 ml i odcięciu membrany 100 kDa. Powstały produkt końcowy poddawano badaniom fizykochemicznym oraz komórkowym.

3.5.6. Badanie stabilności radiokoniugatów

Badanie stabilności połączenia rtęci z nanocząstkami złota zostało przeprowadzone w 0,9% roztworze soli fizjologicznej oraz w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) o pH = 7,4. Test wykonano dodając 100 μl nanocząstek złota do 400 μl odpowiedniego medium, a następnie inkubowano przez 7 dni w termobloku, w temperaturze 37°C.

Po upływie każdych 24 h, jedna próbka z serii była przeznaczana na pomiar stabilności. Roztwory wirowano na koncentratorach wirówkowych Amicon o objętości 500 μl i odcięciu membrany 100 kDa, a następnie przeprowadzono pomiar aktywności promieniotwórczej nanocząstek znajdujących się nad membraną oraz supernatantu. Pomiar aktywności promieniotwórczej wykonywano dla bardzo rozcieńczonych próbek (stosunek rozcieńczenia 1:10⁵). Każdy pomiar prowadzono 3-krotnie przez 1 minutę na detektorze HPGe (Canberra Packard). Analiza została przeprowadzona zarówno dla radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG na izotopie ¹⁹⁷Hg jak i dla ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG na izotopach ¹⁹⁸Au oraz ¹⁹⁷Hg.

W opisywanym badaniu, na podstawie danych uzyskanych dla ¹⁹⁷Hg można określić, czy nie następuje oddysocjowanie radionuklidów rtęci z nanocząstek, a więc czy zsyntezowany radiokoniugat jest stabilny w badanych mediach. Natomiast dane dotyczące aktywności promieniotwórczej izotopu ¹⁹⁸Au

pozostałej w nanocząstkach, określają czy w trakcie eksperymentu nie nastąpiło uszkodzenie membrany koncentratora wirówkowego.

Wyniki pomiarów zostały przedstawione na wykresach zależności procentu aktywności promieniotwórczej pozostałej w nanocząstkach od czasu oraz rodzaju medium (PBS, NaCl).

3.5.7. Badania komórkowe *in vitro*

Badania *in vitro* przeprowadzono na liniach komórkowych dwóch opornych na leczenie nowotworów złośliwych: potrójnie negatywnego raka piersi (MDA-MB-231) oraz glejaka wielopostaciowego (T98G), które zostały zakupione od firmy American Type Culture Collection (ATCC, USA).

3.5.7.1. Hodowle komórkowe

Badania z hodowlami komórkowymi prowadzono w sterylnych warunkach, pod komorą laminarną, stosując do dezynfekcji 70% roztwór etanolu (Line-Antybakteria 70, Linegal Chemicals).

Linie komórkowe hodowano według instrukcji zapewnionej przez producenta. Dla linii MDA-MB-231 stosowano pożywkę DMEM (Capricorn Scientific) z wysokim poziomem glukozy wzbogaconą 10% FBS oraz 1% roztworem antybiotyków (penicylina 10000 jedn./ml, streptomycyna 10 mg/ml). Dla linii T98G stosowano podłoże MEM na solach Earle'a (MEM-Eagle) (Biological Industries) modyfikowane dodatkiem 10% FBS, 1% antybiotyków (penicyliny, streptomycyny) oraz 1% L-glutaminy (200 mM).

W pierwszym kroku komórki zostały rozmrożone w odpowiednim medium i odwirowane na wirówce MPW-260R z prędkością 1100 rpm przez 10 minut, a następnie zdyspergowane w odpowiedniej pożywce i przeniesione do butelek przeznaczonych do hodowli adherentnych o powierzchni 150 cm² z wentylacją (TPP, Szwajcaria). Komórki po osiągnięciu konfluencji na poziomie 80% pasażowano w stosunku 1:4. W tym celu, pożywka była usuwana, a komórki przemywano roztworem PBS (bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺). Następnie traktowano je roztworem trypsyny-EDTA i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie, dodawano dwukrotny nadmiar objętościowy pożywki i cały roztwór przenoszono do falkonów o objętości 15 ml. Falkony wirowano przez 10 minut z prędkością 1100 rpm. Następnie, supernatant usuwano, a komórki dyspergowano w pożywce i przenoszono do nowej butli do hodowli komórkowych.

W każdym prowadzonym *in vitro* teście stosowano komórki z pasażu od trzeciego do szóstego. Przed każdym z eksperymentów komórki liczono z zastosowaniem komory Brükera. W tym celu, 50 µl roztworu komórek zawieszonych w pożywce dodawano do 450 µl barwnika Trypan Blue i umieszczano w komorze. Liczbę wybarwionych komórek zliczano z zastosowaniem mikroskopu Zeiss Primavert.

3.5.7.2. Badanie internalizacji do wnętrza komórki

Badanie internalizacji do wnętrza komórki pozwala odróżnić frakcję związaną z komórką od frakcji internalizującej do jej wnętrza. Eksperyment ten przeprowadzono dla komórek linii MDA-MB-231 oraz T98G.

Komórki posiano do płytek 6 dołkowych (Techno Plastic Products, Szwajcaria) w liczbie po 600 tysięcy komórek na dołek i inkubowano w inkubatorze (Euroclone Safegrow Pro) przez 24 godziny.

Po tym czasie, usunięto pożywkę, dołki przemyto 1 ml PBS i dodano 1 ml roztworów badanych związków w pożywkę. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 2, 6, 18 oraz 24 godziny. Następnie z dołków usunięto pożywkę ze związkami i umieszczono ją w odpowiednich probówkach (frakcja niezwiązana) oraz przepłukano 1 ml roztworu PBS (frakcja niezwiązana). po czym 3-krotnie do komórek dodano 500 μ l zimnego roztworu 0,05 M glicynyHCl o pH = 2,8 i inkubowano je w temperaturze 4°C przez 5 minut, a roztwór z dołków za każdym razem przenoszono do odpowiednich probówek (frakcja związana z błoną). W ostatnim kroku, komórki 3-krotnie traktowano roztworem 500 μ l 1% SDS, odczekano 30 sekund i przepłukano 500 μ l roztworu PBS. Za każdym razem frakcje zebrano do odpowiednich probówek (frakcja zinternalizowana do wnętrza komórki).

Następnie zmierzono aktywność promieniotwórczą poszczególnych probówek z zastosowaniem automatycznego detektora γ Wizard2® 2480.

Wyniki eksperymentu przedstawiono w postaci tabeli oraz wykresów zależności procentu populacji znajdującego się we frakcji internalizującej do wnętrza oraz związanej z błoną komórkową od czasu inkubacji dla każdej linii komórkowej.

Badanie prowadzono w czterech punktach czasowych: 2 h, 6 h, 18 h oraz 24 h dla następujących radiokoniugatów:

- $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 2 MBq/ml zawierającym $2,69 \cdot 10^{11}$ AuNPs/ml na dołek oraz
- $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 0,5 MBq/ml o stężeniu $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszących 2 MBq/ml zawierającym $2,69 \cdot 10^{11}$ AuNPs/ml na dołek.

3.5.7.3. Badanie internalizacji do jądra komórkowego metodą frakcjonowania

Komórki linii MDA-MB-231 oraz T98G posiano na sterylne szalki Petriego (SPL Life Sciences) po 10 mln komórek na szalkę w odpowiedniej pożywkę, w objętości 8 ml i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C, w inkubatorze w atmosferze 5% CO_2 . Po tym czasie wymieniono pożywkę i dodano radiokoniugaty w objętości 1 ml. Metoda ta została zastosowana dla dwóch radiokoniugatów:

- $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 2 MBq/ml zawierającym $2,69 \cdot 10^{11}$ AuNPs/ml na dołek oraz
- $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 0,5 MBq/ml o stężeniu $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszących 2 MBq/ml zawierającym $2,69 \cdot 10^{11}$ AuNPs/ml na dołek.

Całkowita objętość dołka nie uległa zmianie i nadal wynosiła 8 ml. Tak przygotowane szalki ponownie inkubowano przez okres 24, 48 oraz 72 h w inkubatorze, w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO_2 .

Po zakończonej inkubacji, szalkę z komórkami ułożono na podkładzie chłodzącym i rozpoczęto eksperyment. W pierwszym kroku, pożywka wraz z radiokoniugatem została przeniesiona do odpowiednich falkonów (frakcja niezwiązana). Następnie, dołki przemyto dwukrotnie zimnym roztworem PBS i dodano do falkonów (frakcja niezwiązana). W kolejnym kroku, do komórek dodano 2 ml Nuclei EZ lysis buffer (Nuclei Isolation Kit, Sigma-Aldrich) i inkubowano przez kilkanaście sekund i zebrano je za pomocą skrobaka. Krok ten powtórzono trzykrotnie. Następnie, falkon wytrząsano i pozostawiono na podkładzie chłodzącym przez 5 minut. Falkon z komórkami odwirowano (1750 rpm) przez 5 minut w temperaturze 4°C. Zebrano supernatant (frakcja koniugatu pozostała w cytoplazmie) oraz osad (frakcja koniugatu w jądrze komórkowym) do odpowiednich fiolek.

Na zakończenie zmierzono aktywność promieniotwórczą poszczególnych frakcji na detektorze germanowym HPGe (Canberra Packard).

Wyniki przedstawiono w postaci wykresów zależności wielkości populacji komórkowej od czasu inkubacji oraz stężenia promieniotwórczego radionuklidów dla obu badanych linii komórkowych.

3.5.7.4. Badanie cytotoksyczności testem MTS

Badanie cytotoksyczności testem MTS zostało przeprowadzone w celu oceny wpływu koniugatów na aktywność metaboliczną komórek.

W celu przeprowadzenia eksperymentu komórki linii MDA-MB-231 oraz T98G posiano do 96-dółkowych płytek (Techno Plastic Products, Szwajcaria) odpowiednio po 3 tysiące oraz 2 tysiące komórek na dółek i inkubowano w 37°C przez okres 24 godzin. Po tym czasie z dołków usunięto pożywkę, dołki przemyto 100 µl roztworu PBS i dodano 100 µl roztworów badanych związków w pożywce. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 24, 48 oraz 72 godziny. Następnie, usunięto związki wraz z pożywką, dołki przemyto roztworem PBS, dodano świeżej, niemodyfikowanej pożywki oraz 20 µl odczynnika CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (MTS + PES) i inkubowano ponownie przez 2 godziny w 37°C.

Na koniec wykonano pomiar absorbancji dla długości fali 492 nm z zastosowaniem czytnika BioTek Synergy H1 Multimode Reader.

Zestawienie związków poddanych testowi MTS oraz ich stężenia przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. VI).

Tab. VI. Związki poddane badaniu testem cytotoksyczności MTS oraz stężenia ich komponentów na dółek.

Badany związek	Liczba nanocząstek [AuNPs/ml]	Stężenie rtęci [µg/ml]	Stężenie promieniotwórcze ^{197m/197} Hg [MBq/ml]	Stężenie promieniotwórcze ¹⁹⁸ Au [MBq/ml]
AuNPs-PEG	3,65·10 ¹⁴ AuNPs/ml	-	-	-
Au(Hg)NPs-PEG	3,65·10 ¹⁴ AuNPs/ml	10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5	-	-
Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG	1,23·10 ¹⁴ – 6,84·10 ¹³	6; 5,25; 4,5; 3,75; 3; 1,5; 0,75; 0,38; 0,2	200; 175; 150; 125; 100; 50; 25; 12,5 i 6,25	-
^{197m/197} Hg(NO ₃) ₂	-	6; 3; 1,5	200; 100; 50	-
¹⁹⁸ AuNPs	1,71·10 ¹⁴ – 8,60·10 ¹³	-	-	50; 25
¹⁹⁸ Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG	1,71·10 ¹⁴ – 8,60·10 ¹²	3; 1,5; 0,75	100; 50; 25	50; 25; 10; 5; 2,5
H ¹⁹⁸ AuCl ₄	-	-	-	50; 25; 12,5; 6,25; 3,13

Wyniki badania cytotoksyczności testem MTS zostały przedstawione w postaci wykresów zależności aktywności metabolicznej komórek od czasu oraz stężenia związków dla linii komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G.

3.5.7.5. Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych

Badanie na sferoidach pozwala na dokładniejsze określenie efektu cytotoksycznego powodowanego przez badane związki w porównaniu do testu MTS.³³⁷ Struktury te, imitując guzy nowotworowe, dostarczają bardziej wiarygodnego obrazu wpływu badanych koniugatów na niszczenie nowotworów.

Komórkowe struktury trójwymiarowe zostały wyhodowane na płytkach U-kształtnych 96-dołkowych Nunclon™ Sphera™ (Thermo Fisher Scientific™, USA) uniemożliwiających przyczepienie się komórek do ścian dołka, a tym samym pozwalających na tworzenie się sferoidów. Obie badane linie zostały posiane na płytkę w ilości po 2 tysiące komórek na dołek. Płytki z komórkami inkubowano w inkubatorze Euroclone Safegrow Pro przez 7 dni przed rozpoczęciem eksperymentu, zmieniając pożywkę co drugi dzień.

Sferoidy rosły do osiągnięcia przez linię MDA-MB-231 powierzchni około 100 000 μm^2 , a dla T98G ze względu na bardziej upakowaną strukturę sferoidów 70 000 μm^2 . Dokładne wartości średnie powierzchni w dniu rozpoczęcia eksperymentów z każdym z badanych koniugatów zostały przedstawione w Tab. VII.

Tab. VII. Powierzchnia sferoidów w dniu dodania (dzień 0) koniugatów.

Linia komórkowa	Au(Hg)NPs-PEG-COOH	Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG-COOH	¹⁹⁸ Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG-COOH
MDA-MB-231	102621 μm^2	89961 μm^2	123757 μm^2
T98G	79138 μm^2	63431 μm^2	73502 μm^2

Po 7 dniach do płytek dodano nanocząstki w następujących badanych stężeniach rtęci oraz stężeniach promieniotwórczych:

- AuNPs-PEG oraz Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci 10 oraz 8 $\mu\text{g/ml}$,
- Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml,
- ¹⁹⁸AuNPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml i 50 MBq/ml,
- ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach ¹⁹⁸Au wynoszących 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml i o stężeniach ^{197m/197}Hg wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml.

Ponadto, w każdym z eksperymentów analizowano również grupę kontrolną nietraktowaną nanocząstkami.

Po dodaniu związków kontynuowano zmianę pożywki co drugi dzień przez cały czas trwania eksperymentu. Sferoidy były fotografowane przez 14 dni z zastosowaniem mikroskopu Zeiss Primovert wyposażonego w kamerę Axiocam 105 color. Następnie, za pomocą programu Fiji ImageJ2 2.14.0, dokonywano pomiaru ich powierzchni wyrażonej w μm^2 . Otrzymane dane dotyczące powierzchni sferoidów zostały zebrane w programie Microsoft Excel i zilustrowane na wykresach zależności powierzchni od czasu oraz stężeń dla każdego badanego koniugatu oraz linii komórkowej. Ponadto, analizie programem Fiji ImageJ2 2.14.0 poddano zdjęcia sferoidów uzyskane w eksperymencie. Obrazy te zostały przedstawione na rysunkach w celu wizualnego porównania badanych struktur trójwymiarowych.

3.5.7.6. Badanie dwuniciowych pęknięć DNA

W wyniku uszkodzenia DNA tworzącego pęknięcie dwuniciowe (DSB) zawsze występuje fosforylacja histonu, H2AX. H2AX jest odmianą histonu posiadającą kluczowy wpływ na tworzenie ognisk naprawczych DNA. Ogniska te reprezentują DSB w stosunku 1:1 i mogą być użyte jako biomarkery

uszkodzeń. Dzięki zastosowaniu przeciwciała przeciwko γ -H2AX można uwidocznć metodą immunofluorescencji występowanie podwójnych pęknięć DNA w próbce.^{338,339}

W celu przygotowania do eksperymentu badającego występowanie pęknięć dwuniciowych, komórki linii MDA-MB-231 oraz T98G posiano na szkiełkach (VWR, USA) ułożonych na płytce 6-dołkowej (TPP, Szwajcaria) po 200 tysięcy komórek na dołek w 2 ml pożywki i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Następnego dnia wymieniono medium w dołkach na roztwory badanych związków w pożywce i komórki inkubowano przez okres 6, 24 oraz 48 godzin.

Po wyznaczonym czasie inkubacji, szkiełka przeniesiono na płytkę 24-dołkową (TPP, Szwajcaria), utrwalono w 4% roztworze p-formaldehydu w PBS i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dołki przemyto roztworem PBS i przechowywano do momentu barwienia. Szczegółowy opis używanych roztworów wraz z ich stężeniami znajduje się w tabeli poniżej (Tab. VIII).

Tab. VIII. Odczynniki stosowane do przeprowadzenia eksperymentu badającego występowanie dwuniciowych pęknięć DNA.

Nazwa	Odczynnik	Rozpuszczalnik	Stężenie
p-formaldehyd	paraformaldehyd	PBS	4%
Triton-X	Triton X-100	PBS	0,2%
TBS	TRIS, HCl 35%, NaCl	H ₂ O	0,2 M
TBST	Tween 20 (polisorbat 20) o pH~8	TBS	0,1%
Bufor Blokujący	albumina surowicy wołowej (BSA)	TBS	2%
Przeciwciało I-rzędowe	Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301	Bufor Blokujący	5 µg/ml
Przeciwciało II-rzędowe	Anti-Mouse IgG (H+L), CF TM 633 antibody produced in goat	Bufor Blokujący	10 µg/ml
Hoechst 33258	Hoechst 33258	H ₂ O	1 µg/ml

W celu rozpoczęcia barwienia gamma γ H2AX, z dołków usunięto roztwór PBS i potraktowano je związkiem Triton X-100, a następnie przepłukano roztworem PBS i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Komórki inkubowano w obecności Buforu Blokującego przez 1,5 h w temperaturze pokojowej. Potem, dodano przeciwciało I-rzędowe i ponownie inkubowano w ciemności, przez całą noc, tym razem w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia przystąpiono do 3-krotnego, dokładnego płukania dołków roztworem TBST. Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym w Buforze Blokującym, przez 2 h w ciemności, w temperaturze 37°C. Po tym czasie roztwór zdjęto z komórek, przepłukano 3-krotnie TBST oraz wodą dejonizowaną.

Na tym etapie rozpoczęto barwienie DNA. Do każdego z dołków dodano roztwór barwnika Hoechst 33258 i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, dołki przepłukano wodą dejonizowaną i szkiełka przyklejono do szkiełka podstawowego (VWR, USA) przy użyciu DAKO Fluorescent Mounting Medium. Tak przygotowane preparaty pozostawiono do wyschnięcia i przechowywano w lodówce do momentu analizy przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FV100.

Obrazowanie dwuniciowych pęknięć DNA za pomocą techniki mikroskopii konfokalnej zostało wykonane przez dra hab. Mateusza Wierzbieckiego, prof. SGGW w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Otrzymane zdjęcia mikroskopowe analizowano z zastosowaniem programu Fiji ImageJ2 2.14.0. Analizę ilościową przeprowadzono także w programie Fiji ImageJ2 2.14.0. z zastosowaniem języka programowania Macro.

Intensywność sygnału pochodzącą od podwójnych pęknięć w odniesieniu do grupy kontrolnej obliczono według następującego wzoru (Równanie 8).

$$I_{final} = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=0}^n \frac{I_{DSB,i}}{n_{nuclei,i}}}{\frac{1}{n} \sum_{i=0}^n \frac{I_{kontrola,i}}{n_{nuclei,i}}}$$

Równanie 8. Intensywność sygnału pochodząca od dwuniciowych pęknięć DNA w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Wartości sygnałów dla grupy kontrolnej przyjęto jako wartości odniesienia. Intensywność sygnału od dwuniciowych pęknięć komórek traktowanych radiokoniugatem została podzielona przez liczbę komórek w preparacie, a następnie przez wartość intensywności sygnału dla grup kontrolnych podzieloną przez liczbę komórek w preparacie.

Wyniki przedstawiono w postaci porównania obrazów uzyskanych z mikroskopu oraz wykresów zależności intensywności sygnału pochodzącego od podwójnych pęknięć względem grupy kontrolnej od czasu oraz rodzaju badanego związku.

Metoda ta została zastosowana do zbadania radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 200 MBq/ml, a także grupy komórek kontrolnych nietraktowanych nanocząstkami.

3.5.7.7. Badanie apoptozy metodą cytometrii przepływowej

W celu określenia rodzaju śmierci komórek po potraktowaniu ich zsyntezowanymi nanocząstkami oraz koniugatami wykonano test apoptozy z zastosowaniem zestawu do oznaczania apoptozy FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™).

Komórki zostały posiane na płytkach 6-dółkowych (TPP, Szwajcaria) w liczbie 600 tysięcy komórek na dółkę, a następnie inkubowane przez 24 h w celu osiągnięcia odpowiedniego stopnia adhezji oraz konfluencji. Dółki po inkubacji przemyto roztworem PBS i dodano do nich badane koniugaty w różnych stężeniach w objętości 1 ml. Komórki inkubowano ze związkami przez 24, 48 oraz 72 h, a następnie przygotowano do badania metodą cytometrii przepływowej.

W tym celu, z komórek zdjęto roztwór pożywki wraz ze związkiem, przemyto roztworem PBS, a następnie poddano działaniu trypsyny przez 5 minut inkubując w temperaturze 37°C. Komórki przeniesiono do falkonów i wirowano przez 5 minut z prędkością 1200 rpm na wirówce (MPW-260R), po czym, znad komórek usunięto supernatant, zdyspergowano je w roztworze PBS i ponownie wirowano. Następnie, powtórnie usunięto supernatant znad komórek i dodano 400 µl buforu Binding Buffer przygotowanego poprzez 10-krotne rozcieńczenie PBS-em buforu 10xAnnexin Binding Buffer z zestawu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™).

Komórki zawieszone w Binding Buffer przeniesiono do probówek cytometrycznych (po 100 µl komórek) i dodano barwniki: 5 µl jodku propidyny oraz 5 µl FITC Annexin V, a następnie inkubowano w ciemności przez 15 minut. Po tym czasie, do każdej z probówek dodano 400 µl zimnego Binding Buffer i przystąpiono do analizy cytometrycznej.

Badanie apoptozy zostało przeprowadzone dla następujących koniugatów:

- AuNPs-PEG niemodyfikowanych rtęcią,
- Au(Hg)NPs wykazujących toksyczność w teście MTS tj. dla stężeń rtęci 8 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$,
- Au($^{197\text{m}/197}\text{Hg}$)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml,
- ^{198}Au NPs-PEG dla stężeń 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml,
- $^{198}\text{Au}(\text{}^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml,
- $^{198}\text{Au}(\text{}^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 100 MBq/ml,
- $^{198}\text{Au}(\text{}^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml.

Wyniki analiz przedstawione zostały na wykresach reprezentatywnych apoptozy oraz na wykresach obrazujących dystrybucję komórek pomiędzy frakcją komórek żywych, wczesną apoptozą, późną apoptozą oraz nekrozą. Wykresy przedstawiają zależności wielkości populacji w danej frakcji od rodzaju związku i jego stężenia w trzech punktach czasowych: 24, 48 i 72 godziny.

3.5.7.8. Badanie cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej

Wpływ koniugatów nanocząstek na fazy cyklu komórkowego został zbadany metodą cytometrii przepływowej.

W celu przeprowadzenia eksperymentu komórki linii MDA-MB-231 oraz T98G posiano po 500 tysięcy komórek na dołek na płytkach 6-dołkowych (TPP, Szwajcaria) i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂, w celu osiągnięcia odpowiedniego stopnia adhezji oraz konfluencji.

Po 24-godzinnej inkubacji, do komórek dodano badane koniugaty w 1 ml pożywki i inkubowano przez wybrane punkty czasowe tj. 24, 48 i 72 godziny. Po każdym czasie, pożywkę wraz z koniugatami przeniesiono do falkonów, a komórki przemyto 1 ml PBS, który następnie dodano również do falkonów. Do komórek dodano 400 μl trypsyny i inkubowano je przez 5 minut w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki następnie przepłukano trzykrotnie roztworem PBS, aż do całkowitego oczyszczenia dołków i dodano do falkonów.

Tak przygotowane fiolki wirowano przez 5 minut (1500 rpm), w temperaturze pokojowej, na wirówce MPW-260R. Po wirowaniu usunięto supernatant, a komórki zdyspergowano w 100 μl roztworu PBS.

Następnie, w celu utrwalenia komórki powoli dodawano do 2 ml 70% roztworu etanolu na wytrząsarce laboratoryjnej. Falkony przechowywano w zamrażalce, w temperaturze -20°C do czasu przeprowadzenia analizy cytometrycznej tj. przez 7 dni.

W dniu wykonywania analizy cytometrycznej, komórki zawieszone w etanolu odwirowano przez 5 minut (1500 rpm), w temperaturze pokojowej. Następnie supernatant usunięto, a komórki zawieszono w 400 μl PBS-u i przeniesiono do fiolek do analiz cytometrycznych. Do komórek dodano 20 μl jodku propidyny (1 mg/ml) oraz 2 μl RNA-se (10 mg/ml) i inkubowano przez 45 minut w ciemności, w temperaturze 37°C. Po tym czasie przystąpiono do analizy cytometrycznej.

Badanie cyklu komórkowego zostało przeprowadzone dla następujących koniugatów:

- AuNPs-PEG niemodyfikowanych rtęcią,
- Au(Hg)NPs wykazujących toksyczność w teście MTS tj. dla stężeń rtęci 8 µg/ml i 10 µg/ml,
- Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml,
- ¹⁹⁸AuNPs-PEG o stężeniach 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml,
- ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH o stężeniu promieniotwórczym ¹⁹⁸Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym ^{197m/197}Hg wynoszącym 50 MBq/ml,
- ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH o stężeniu promieniotwórczym ¹⁹⁸Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym ^{197m/197}Hg wynoszącym 100 MBq/ml,
- ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH o stężeniu promieniotwórczym ¹⁹⁸Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym ^{197m/197}Hg wynoszącym 50 MBq/ml.

Wyniki zostały przedstawione w formie wykresów reprezentatywnych cyklu komórkowego oraz wykresów zależności części populacji komórek znajdujących się w danej fazie cyklu komórkowego: G0/G1, S oraz G2/M w zależności od stężeń promieniotwórczych i czasu inkubacji dla obu badanych linii komórkowych.

3.5.7.9. Badanie biodystrybucji *ex vivo* na myszach

Badania *ex vivo* przeprowadzono w ośrodku badawczym Institute of Nuclear & Radiological Sciences and Technology, Energy & Safety (INRASTES) w Atenach we współpracy z dr Penelope Bouziotis. Wyjazd ten był możliwy dzięki finansowaniu w ramach projektu „International Doctoral Program at NCBJ & ICHTJ” z programu STER – Umiejędzynarodowienie Szkół Doktorskich.

Linia komórkowa mysiego raka piersi 4T1 została pobrana z banku komórek INRASTES. Do eksperymentów na zwierzętach wykorzystano samice myszy Carworth Farms White (CFW). Myszy trzymane w indywidualnie wentylowanych klatkach, w stałej temperaturze (22 ± 2°C) i wilgotności (45 - 50%) oraz 12-godzinnym cyklu światło/ciemność, z wolnym dostępem do pożywienia i wody. Zwierzęta uzyskano z ośrodków hodowlanych INRASTES. Ośrodek ten jest zarejestrowany zgodnie z greckim dekretem prezydenckim 56/2013 (numer rejestracyjny: EL 25 BIO 022), zgodnie z europejską dyrektywą 2010/63, która jest zgodna z krajowymi przepisami dotyczącymi ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Przestrzegano wszystkich obowiązujących krajowych wytycznych dotyczących opieki nad zwierzętami i ich wykorzystywaniem. Protokół badania został zatwierdzony przez Departament Rolnictwa i Służby Weterynaryjnej Prefektury Aten oraz przez instytucjonalną komisję etyczną, a stosowane procedury były zgodne z wytycznymi.

Radioaktywność próbek i strzykawkę mierzono za pomocą kalibratora dawki (Capintec, Ramsey, New Jersey). Do pomiaru radioaktywności każdego organu i próbki krwi zastosowano automatyczny licznik gamma Cobra II (Canberra, Packard, Schwadorf, Austria).

Badanie biodystrybucji przeprowadzono na myszach w wieku 6-8 tygodni o masie ciała 15-25 gramów. W ramach przygotowania do eksperymentu myszom tym wszczepiono podskórnie, w obszarze pod lewą kończyną przednią, zawiesinę 10 mln komórek 4T1 w pożywce RPMI 1640 (100 µl). Myszy podzielono na dwie grupy, z których każda odnosiła się do trzech punktów czasowych i liczyła po trzy osobniki, tj. 9 osobników na grupę. Eksperyment rozpoczęto po upływie 7 dni, gdy guzy osiągnęły objętość około 150 mm³.

Pierwsza grupa otrzymała 100 µl radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG, podawanego dożylnie. Natomiast, drugiej grupie zwierząt podano 50 µl Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG tego samego związku podanego

bezpośrednio do guza. Aktywności promieniotwórcze radiokoniugatów zaaplikowane każdej z myszy przedstawiono w tabeli (Tab. IX).

Tab. IX. Aktywność promieniotwórcza radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ podana zwierzętom w badaniu biodystrybucji.

Lp.	Podanie dożylne [MBq]	Podanie do guza [MBq]
1	3,846	4,039
2	3,729	3,944
3	3,814	4,047
4	3,933	4,011
5	3,826	3,906
6	3,984	4,067
7	3,935	4,197
8	4,096	4,085
9	3,825	3,959

Zwierzęta uśmiercono 2, 24 i 48 godzin po podaniu radiokoniugatu w komorze nasyconej parami izofluoranu. Następnie pobierano ich tkanki i narządy: serce, wątrobę, śledzionę, płuca, nerki, żołądek, jelita, trzustkę, kości, a także objętość guza, próbki mięśni, moczu i krwi. Tkanki zważono i zmierzono, a następnie określono ich aktywność promieniotwórczą stosując automatyczny licznik γ Cobra II.

Wyniki badania biodystrybucji zostały podane w postaci procentu wstrzykniętej aktywności na gram tkanki (%IA/g $\pm$ SD), stosując odpowiednią próbkę jako standard. W pomiarach uwzględniona została aktywność promieniotwórcza tła, aktywność pozostająca w strzykawce, na igle oraz w miejscu nastrzyku.

3.5.7.10. Badanie efektywności terapeutycznej *ex vivo* na myszach

Zwierzęta do badania efektywności terapeutycznej przygotowano w ten sam sposób jaki opisano dla eksperymentu biodystrybucji. Badania skuteczności terapeutycznej przeprowadzono u myszy CFW z podskórnymi guzami raka piersi, gdy guz osiągnął objętość około 150 mm³ tj. 6 dni po wszczepieniu komórek 4T1.

Myszy podzielone zostały losowo na następujące grupy (po 4 osobniki w każdej grupie):

- grupa kontrolna traktowana roztworem 0,9% NaCl,
- grupa terapeutyczna traktowana radiokoniugatem o aktywności promieniotwórczej ~10 MBq,
- grupa terapeutyczna traktowana radiokoniugatem o aktywności promieniotwórczej ~25 MBq.

Wszystkie związki w tym eksperymencie były wstrzykiwane do guza w objętości 50 μ l roztworu. Dokładne aktywności, jakie zostały podane każdej z myszy przedstawiono w tabeli (Tab. X).

Tab. X. Aktywności promieniotwórcze radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ podane zwierzętom w badaniu efektywności terapeutycznej.

Lp.	Grupa terapeutyczna 10 MBq	Grupa terapeutyczna 25 MBq
1	9,460 MBq	24,909 MBq
2	9,911 MBq	23,140 MBq
3	9,845 MBq	24,397 MBq
4	9,675 MBq	22,760 MBq

Objętość guza monitorowano dwa razy w tygodniu za pomocą suwmiarki i obliczono ją przy użyciu wzoru podanego poniżej (Równanie 9).

$$\text{objętość guza} = \frac{\text{długość guza} \cdot (\text{szerokość guza})^2}{2}$$

Równanie 9. Równanie zastosowane do obliczenia objętości guza w badaniu efektywności terapeutycznej na myszach.

Na podstawie danych dotyczących wielkości guzów w czasie trwania eksperymentu obliczony został wskaźnik wzrostu guza TGI (ang. *Tumor Growth Index*) (Równanie 10), który następnie zastosowano do sporządzenia wykresu obrazującego zmianę powierzchni guza, a tym samym efektywność terapeutyczną radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$.

$$TGI[\%] = \frac{\text{objętość guza w grupie leczonej (dzień pomiaru)}}{\text{objętość guza w grupie kontrolnej (dzień 1)}}$$

Równanie 10. Równanie opisujące sposób wyznaczenia wskaźnika wzrostu guza (TGI).

Wyniki przedstawiono w postaci wykresów zależności wskaźnika wzrostu guza od czasu i aktywności promieniotwórczej radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$.

WYNIKI ORAZ ANALIZA BADAŃ

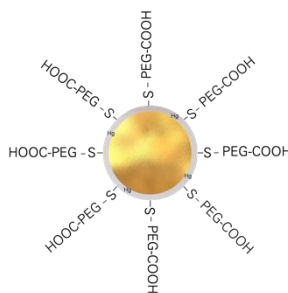
ROZDZIAŁ IV

W rozdziale IV opisana została metoda syntezy, analiza właściwości fizykochemicznych oraz wszystkie otrzymane eksperymentalnie rezultaty dotyczące nieradioaktywnego koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH (Au(Hg)NPs-PEG).

Ponadto, zamieszczono i opisano tutaj wyniki badań *in vitro* dla koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH tj. wyniki badań metodą testu cytotoksyczności MTS, badania cytotoksyczności na strukturach trójwymiarowych oraz metodą cytometrii przepływowej.

4. Koniugat Au(Hg)NPs-PEG-COOH

Koniugat Au(Hg)NPs-PEG-COOH (Rys. 17) zawierający w swojej strukturze nieradioaktywną rtęć został zsyntezowany w celu zbadania właściwości fizykochemicznych połączenia nanocząstek złota z rtęcią oraz oceny potencjalnego działania toksycznego na komórki nowotworowe w zależności od zastosowanego stężenia rtęci.



Rys. 17. Koniugat AuNPs pokryty rtęcią oraz stabilizowany glikolem polietylenowym.

4.1. Synteza nanocząstek złota 5 nm

Synteza nanocząstek złota (AuNPs) 5 nm została przeprowadzona według sposobu opisanego w rozdziale 3.5.3. Synteza nanocząstek złota oraz radioaktywnych nanocząstek złota.

Stężenie molowe oraz liczba nanocząstek zsyntezowanego roztworu obliczone na podstawie masy chorku złota zastosowanej do reakcji wynosiły odpowiednio 11,4 nM oraz $6,84 \cdot 10^{13}$ AuNPs. Dane eksperymentalne dotyczące stężenia molowego oraz liczby nanocząstek uzyskano metodą analizy termogravimetrycznej i przedstawiono w rozdziale 4.4.5. Analiza termogravimetryczna (TGA).

4.2. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota rtęcią

Szczegółowy opis metodyczny modyfikacji powierzchni nanocząstek złota rtęcią zamieszczono w rozdziale 3.5.4. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota rtęcią.

Reakcję syntezy Au(Hg)NPs przeprowadzono w temperaturze pokojowej według schematu przedstawionego na Rys. 14. Wygląd roztworu po reakcji przyłączenia rtęci nie uległ zmianie. Otrzymany

roztwór był homogeniczny i posiadał ciemnoczerwone zabarwienie. Porównanie wyglądu nanocząstek po kolejnych etapach syntezy zostało przedstawione na Fot. 10.

Zgodnie z danymi literaturowymi, w wyniku procesu amalgamacji na AuNPs następować powinna zmiana ich rozmiaru, koloru roztworu, a tym samym znaczne przesunięcie maksimum absorpcji na widmie UV-Vis oraz poszerzenie piku, a także wytrącenie nanocząstek z roztworu.²⁴⁴ Po syntezie wyżej wymienionego koniugatu nie zaobserwowano wytrącenia nanocząstek, ani znaczących zmian w kolorze roztworu oraz jego widmie UV-Vis, co zostało opisane w rozdziale 4.4. Właściwości fizykochemiczne otrzymanych nanocząstek. Na tej podstawie możemy wnioskować, że rtęć jest przyłączona do AuNPs, głównie na zasadzie chemisorpcji na powierzchni nanocząstki.

4.3. Stabilizacja koniugatu glikolem polietylenowym

Proces stabilizacji glikolem polietylenowym oraz jego parametry zamieszczono w rozdziale 3.5.5. Stabilizacja nanocząstek glikolem polietylenowym. Stosowany do stabilizacji glikol polietylenowy posiadał średnią masę molową wynoszącą 5000 g/mol i był modyfikowany grupą tiolową z jednej strony oraz grupą karboksylową na końcu. Struktura chemiczna odczynnika przedstawiona została na Rys. 15., a schematyczna ilustracja procesu przeprowadzenia stabilizacji na Rys. 16.

Ze względu na konieczność oszacowania optymalnego stosunku molowego nanocząstek do PEG-u przeprowadzone zostało kilka syntez różniących się jedynie masą tego odczynnika.

Do 1 ml koniugatu Au(Hg)NPs ($6,84 \cdot 10^{13}$ NPs; 11,4 nM) dodano różne objętości (13,54; 27,08; 135,4 oraz 270,8 μ l) roztworu glikolu polietylenowego (HS-PEG-COOH) o masie molowej 5000 g/mol (27,08; 54,16; 270,8; 541,6 μ g; 2 mg/ml). Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle kołowym przez 2 h. Po tym czasie, w celu oczyszczenia otrzymanego produktu z nieprzereagowanych substratów ponownie zastosowano koncentratory wirówkowe Amicon o objętości 4 ml i odcięciu membrany 100 kDa. Po oczyszczeniu, nanocząstki zebrano z membrany poprzez ich dyspersję w 1 ml wody dejonizowanej. Roztwór nanocząstek nie zmienił swojego zabarwienia w wyniku dodatku glikolu polietylenowego. Pozostał on także homogeniczny.

Optymalny stosunek molowy nanocząstek do PEG-u wyznaczono metodą DLS oraz pomiarem potencjału zeta. Wyniki przedstawiono w rozdziale 4.4.2. Pomiar metodą dynamicznego rozpraszania światła laserowego (DLS) oraz potencjału zeta.

4.4. Właściwości fizykochemiczne otrzymanych nanocząstek

W celu określenia właściwości fizykochemicznych nanocząstek na każdym etapie syntezy zastosowano następujące metody analityczne:

- transmisyjna mikroskopia elektronowej (TEM) oraz wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HR-TEM) – określenie wielkości nanocząstek oraz ich kształtu,
- Dynamiczne Rozproszenie Światła Laserowego (DLS) oraz pomiar potencjału zeta – określenie wielkości oraz tendencji do aglomeracji,
- spektrofotometria UV-Vis – badanie przesunięcia maksimów absorpcji roztworów na każdym etapie syntezy,
- spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) - potwierdzenie obecności PEG-u i azotanu(V) rtęci(II) w próbce nanocząstek oraz

- analiza termograwimetryczna (TGA) – potwierdzenie obecności PEG-u w próbce nanocząstek oraz wyznaczenie liczby nanocząstek i stężenia molowego.

Ponadto, dokonano wizualnego porównania nanocząstek po poszczególnych etapach syntezy. Poniżej przedstawiono zdjęcie obrazujące niemodyfikowane nanocząstki wraz z ich wszystkimi zsyntezowanymi koniugatami, od lewej AuNPs 5 nm, AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs oraz Au(Hg)NPs-PEG (Fot. 10).



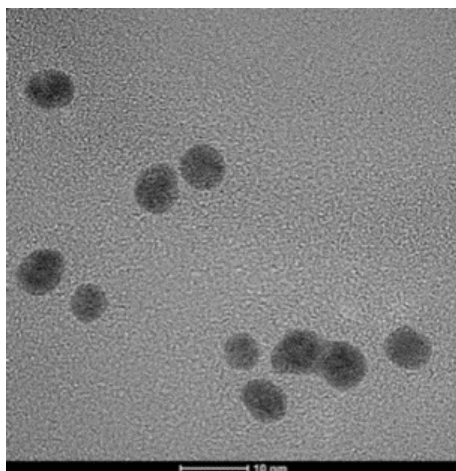
Fot. 10. Zdjęcie porównujące niemodyfikowane AuNPs wraz z ich koniugatami.

Na podstawie powyższej fotografii można wnioskować, iż dodatek rtęci oraz PEG-u nie wpłynął na wygląd nanocząstek. Nanocząstki złota nie różnią się kolorem względem ich koniugatów, a wszystkie roztwory są homogeniczne. Jediną obserwowalną różnicą jest niewielka rozbieżność w intensywności koloru spowodowana oczyszczaniem na koncentratorach wirówkowych, co powoduje nieznaczną zmianę stężenia produktu względem próbki wyjściowej.

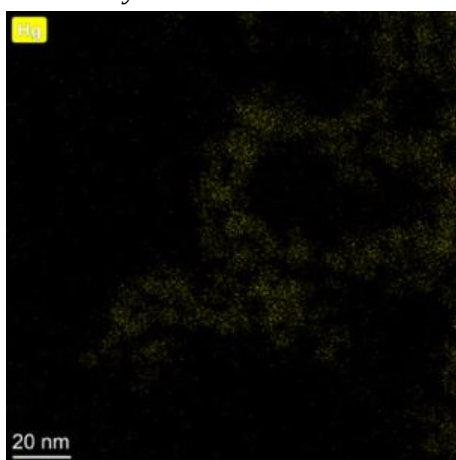
4.4.1. Wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (HR-TEM)

Analizę TEM przeprowadzono w celu potwierdzenia rozmiaru zsyntezowanych nanocząstek, ich sferyczności oraz homogeniczności próbki. Analiza HR-TEM miała na celu zobrazowanie lokalizowania się rtęci na powierzchni nanocząstek, a tym samym potwierdzenie syntezy koniugatu Au(Hg)NPs.

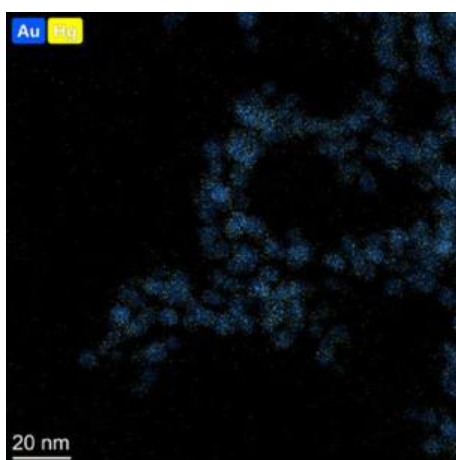
Obrazy uzyskane w wyniku analiz TEM oraz HR-TEM przedstawiono na poniższych zdjęciach (Rys. 18, Rys. 19, Rys. 20).



Rys. 18. AuNPs 5 nm.



Rys. 19. Au(Hg)NPs z obrazowaniem Hg.

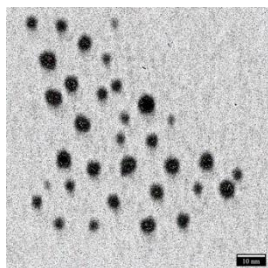


Rys. 20. Au(Hg)NPs z obrazowaniem Au i Hg.

Z danych uzyskanych na podstawie zdjęć TEM wyznaczony został rozmiar niemodyfikowanych nanocząstek AuNPs, który wyniósł $5,545 \pm 0,445$ nm. Wartość ta jest zgodna z założeniami syntezy określającymi docelową średnicę nanocząstek 5 nm oraz z dostępnymi danymi literaturowymi.³⁴⁰

Ponadto, w obrazach TEM (Rys. 18) nie uwidoczniono tworzenia się dużych aglomeratów, a badane nanocząstki okazały się jednorodne i sferyczne.

W przypadku nanocząstek złota modyfikowanych rtęcią Au(Hg)NPs, wyznaczony średni rozmiar nanocząstek okazał się być nieznacznie większy tj. $5,861 \pm 0,651$ nm. Ponadto, dzięki analizie HR-TEM z mapowaniem powierzchni potwierdzono pokrycie nanocząstek rtęcią, a także brak jej niespecyficznego występowania w innych miejscach. Na podstawie powyższych wyników, można było potwierdzić prawidłową syntezę koniugatu Au(Hg)NPs.



Rys. 21. Au(Hg)NPs-PEG-COOH.

Wyznaczona na podstawie zdjęcia TEM (Rys. 21) średnica koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH wyniosła $6,142 \pm 0,467$ nm. Ze względu na odparowanie PEG-u obraz TEM związku Au(Hg)NPs-PEG-COOH charakteryzował się gorszą jakością niż obrazy uzyskane z poprzednich próbek.

Na podstawie badania techniką TEM nie można było potwierdzić obecności polimeru HS-PEG-COOH na powierzchni nanocząstek, dlatego też do tego celu, zastosowano w późniejszych etapach badań inne metody analityczne, takie jak pomiar średnicy oraz potencjału zeta z użyciem DLS, FTIR oraz TGA.

4.4.2. Pomiar metodą dynamicznego rozpraszania światła laserowego (DLS) oraz potencjału zeta

Nanocząstki złota oraz ich koniugaty zostały poddane pomiarowi średnicy hydrodynamicznej oraz wartości potencjału zeta metodą Dynamicznego Rozpraszania Światła Laserowego.

Roztwory wszystkich nanocząstek zostały przygotowane do analizy w identyczny sposób. Nanocząstki złota przepuszczono przez filtry strzykawkowe o wielkości membrany $0,22 \mu\text{m}$, następnie rozcieńczono 5-krotnie, uzyskując tym samym roztwory nanocząstek o stężeniu $2,28 \text{ nM}$, zawierające $1,37 \cdot 10^{13}$ NPs/ml. Pomiar wykonywany był w specjalnie przeznaczony do tego kuwecie, a objętość roztworu AuNPs wynosiła 1 ml.

Wyniki pomiaru dla niemodyfikowanych AuNPs, nanocząstek z rtęcią Au(Hg)NPs, koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH zawierającego PEG, w stosunkach molowych 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 zostały przedstawione w poniższej tabeli (Tab. XI).

Tab. XI. Rozmiar AuNPs oraz ich koniugatów zawierających rtęć.

Próbka	Średnica hydrodynamiczna [nm]	Potencjał Zeta [mV]
AuNPs 5 nm	$7,96 \pm 0,22$	$-12,70 \pm 3,29$
AuNPs-PEG 1:50	$12,13 \pm 3,41$	$-20,30 \pm 3,27$
Au(Hg)NPs	$7,87 \pm 0,33$	$-23,10 \pm 0,71$
Au(Hg)NPs-PEG-COOH (1:50)	$13,94 \pm 0,86$	$-24,63 \pm 2,31$
Au(Hg)NPs-PEG-COOH (1:100)	$16,03 \pm 0,43$	$-25,10 \pm 2,46$
Au(Hg)NPs-PEG-COOH (1:500)	$17,78 \pm 0,76$	$-29,13 \pm 1,63$
Au(Hg)NPs-PEG-COOH (1:1000)	$19,25 \pm 0,77$	$-33,30 \pm 2,17$

Średnica hydrodynamiczna niemodyfikowanych nanocząstek złota wyniosła $7,96 \pm 0,22$ nm. Po modyfikacji AuNPs rtęcią, zaobserwowano jej niewielką zmianę do $7,87 \pm 0,33$ nm. Z danych przedstawionych w Tab. XI wynika, iż średnica hydrodynamiczna PEG-owanych nanocząstek po przyłączeniu do nich rtęci jedynie nieznacznie zwiększyła się, o $1,81 \pm 4,27$ nm. Obserwowana tendencja jest zgodna z wynikami analiz obrazów TEM tych nanocząstek.

Wzrost rozmiaru nanocząstek po PEG-ylacji, dotyczy więc zarówno nanocząstek modyfikowanych rtęcią, jak i tych niemodyfikowanych. Dla AuNPs zawierających rtęć, obserwowany wzrost rozmiaru dla stosunku molowego 1:50 wynosi $6,07 \pm 1,19$ nm, natomiast dla nanocząstek niemodyfikowanych jest to $4,17 \pm 3,63$ nm. Na tej podstawie można stwierdzić, że obecność rtęci na powierzchni nanocząstki nie ma wpływu na jej średnicę hydrodynamiczną mierzoną metodą DLS. Różnica wielkości między koniugatami zawierającymi różne stosunki molowe PEG-u jest natomiast nieznacznie większa i wynosi $5,31 \pm 1,63$ nm. Różnice te są uzasadnione i wynikają ze spodziewanego powiększania się otoczki z glikolu polietylenowego wokół nanocząstek wraz ze wzrostem nadmiaru odczynnika.

Analizując zmiany potencjału zeta, obserwujemy spadek jego wartości wraz z modyfikacją powierzchni nanocząstek, co świadczy o ich większej anionowości, stabilności i niższej podatności do tworzenia aglomeratów. Różnica potencjału zeta dla niemodyfikowanych nanocząstek oraz dla koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH wynosi $11,93 \pm 5,6$ mV, podczas gdy niemodyfikowane nanocząstki charakteryzowały się potencjałem zeta wynoszącym $-12,7 \pm 3,29$ mV, a koniugat $-24,63 \pm 2,31$ mV.

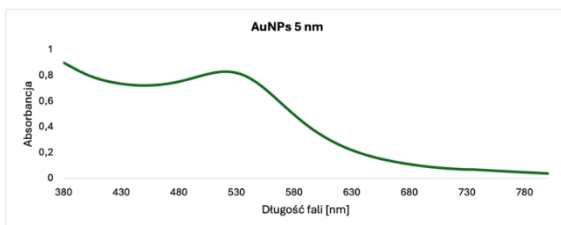
Dodatek rtęci do niemodyfikowanych AuNPs powodował znaczny spadek potencjału zeta, o $10,40 \pm 4,00$ mV, z $-12,7 \pm 3,29$ mV do $-23,10 \pm 0,71$ mV, natomiast w przypadku PEG-owanych nanocząstek różnica ta wynosiła jedynie $4,33 \pm 0,96$ mV. Ponadto, zaobserwowano, że ilość stosowanego PEG-u wpływała na zmianę potencjału zeta powodując jego obniżenie. Różnica pomiędzy najmniejszym a największym badanym stosunkiem molowym wynosiła $8,67 \pm 4,48$ mV.

W związku z wysoką stabilnością koniugatu oraz niewielkim wzrostem średnicy hydrodynamicznej, do kolejnych badań wybrano stosunek molowy AuNPs:PEG-u wynoszący 1:50. Stosowany w dalszej części pracy koniugat Au(Hg)NPs-PEG-COOH charakteryzował się średnicą hydrodynamiczną wynoszącą $13,94 \pm 0,86$ nm oraz ujemnym potencjałem zeta o wartości $-24,63 \pm 2,31$ Vm.

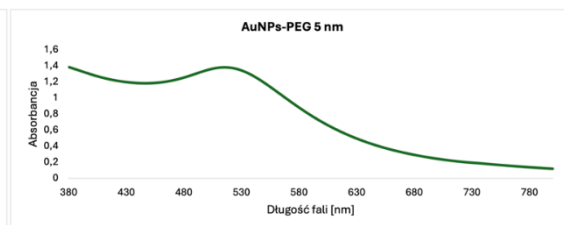
4.4.3. Spektrofotometria UV-Vis

Otrzymane nanocząstki oraz ich koniugaty poddano również analizie metodą spektrofotometrii UV-Vis w celu wyznaczenia przesunięcia w maksimach ich absorpcji oraz określenia kształtu widm absorpcyjnych.

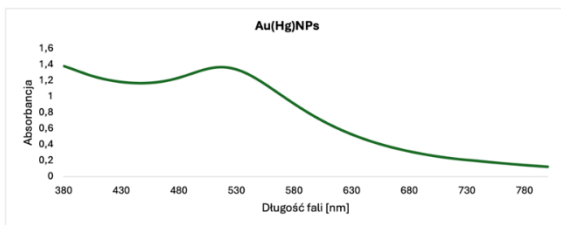
Przed pomiarem każdą z próbek odwirowano na koncentratorach wirówkowych Amicon o objętości 4 ml i odcięciu membrany 100 kDa, a następnie zdyspergowano w 1 ml wody dejonizowanej. Tak przygotowaną próbkę umieszczano w kuwecie przeznaczanej do pomiarów UV-Vis i wykonywano analizę. Widma spektrofotometryczne UV-Vis zostały wyznaczone dla AuNPs (Rys. 22), AuNPs-PEG 1:50 (Rys. 23), Au(Hg)NPs (Rys. 24), Au(Hg)NPs-PEG (Rys. 25), a także wszystkich powstałych w procesie oczyszczania supernatantów.



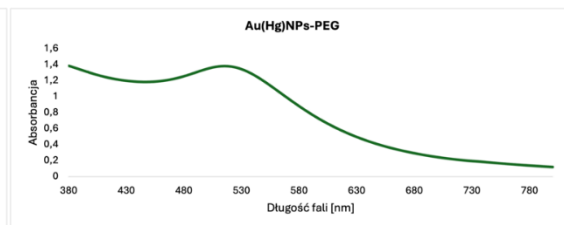
Rys. 22. Widmo UV-Vis dla AuNPs 5 nm.
Maksimum absorpcji przy 520 nm.



Rys. 23. Widmo UV-Vis dla AuNPs-PEG-COOH.
Maksimum absorpcji przy 514,5 nm.



Rys. 24. Widmo UV-Vis dla Au(Hg)NPs.
Maksimum absorpcji przy 516,5 nm.



Rys. 25. Widmo UV-Vis dla Au(Hg)NPs-PEG.
Maksimum absorpcji przy 514,5 nm.

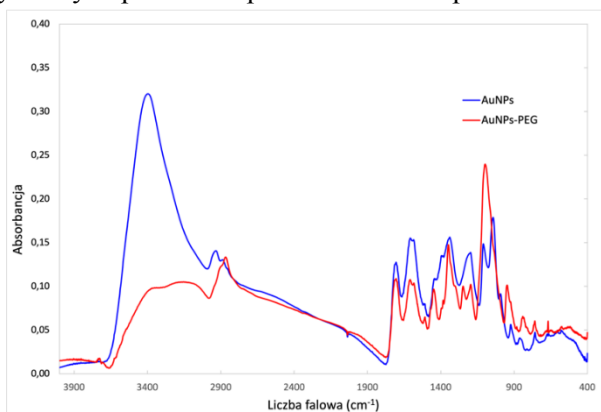
Nie odnotowano maksimów absorpcji dla żadnej z badanych próbek supernatantów. W widmach otrzymanych koniugatów zaobserwowano jedynie nieistotne statystycznie różnice w maksimach absorpcji przy identycznym kształcie widma. Dla niemodyfikowanych nanocząstek złota maksimum absorpcji znajduje się przy długości fali 520 nm. Po modyfikacji nanocząstek glikolem polietylenowym, przesuwa się ono nieznacznie w stronę fali krótszej do 514,5 nm. Modyfikacja rtęcią zmienia natomiast maksimum absorpcji do 516,5 nm, co daje różnicę 3,5 nm w porównaniu z niemodyfikowanymi AuNPs oraz 5,5 nm w porównaniu z pełnym koniugatem. Dodanie PEG-u do AuNPs nie powoduje zmian w widmie (Rys. 24, Rys.25) w obu przypadkach maksimum absorpcji występuje przy 514,5 nm.

Na podstawie tak nieznacznych różnic w widmach badanych związków nie można z wystarczającą pewnością określić stopnia modyfikacji nanocząstek.

4.4.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Analizę badanych nanocząstek przeprowadzono z wykorzystaniem pomiarów spektroskopowych w zakresie podczerwieni. Celem tej analizy było potwierdzenie obecności rtęci na powierzchni nanocząstek złota oraz potwierdzenie przyłączenia do AuNPs molekuł HS-PEG-COOH. Próbkę została przygotowane według opisu zamieszczonego w rozdziale 3.4.4. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).

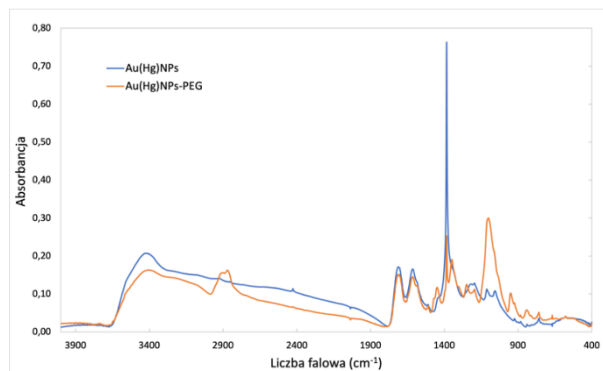
Zarejestrowano widma w zakresie średniej podczerwieni dla próbek zawierających niemodyfikowane (AuNPs) oraz odpowiednio zmodyfikowane (AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs i Au(Hg)NPs-PEG) nanocząstki złota. Wyniki tych pomiarów przedstawiono w postaci widm IR na Rys. 26 oraz Rys. 27.



Rys. 26. Widma IR dla próbek AuNPs (kolor niebieski) oraz AuNPs-PEG (kolor czerwony).

Wyraźne różnice w widmach zaprezentowanych na Rys. 26 potwierdzają modyfikację nanocząstek złota poprzez przyłączenie do ich powierzchni grup polietylenoglikolowych (PEG). Istotną różnicą jest znaczne zmniejszenie się szerokiego pasma przy około 3400 cm^{-1} , jakie występowało dla AuNPs. Pik ten można przypisać drganiom rozciągającym fenolowych grup hydroksylowych (wiązanie O–H) w kwasie taninowym, a jego szeroki zakres wynika z tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami tanin.³⁴¹ Znaczące zmniejszenie się tego sygnału świadczy o ubytku grup OH poprzez wymianę cząsteczek kwasu taninowego na grupy polietylenoglikolowe w wyniku przeprowadzonego procesu PEG-ylacji. Ponadto, po modyfikacji PEG-iem obserwujemy również mniejszą intensywność pasm w zakresie $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$, które odpowiadają drganiom rozciągającym C=O pochodzącym od cytrynianów oraz drganiom rozciągającym C=C, świadczącym o obecności pierścieni aromatycznych tanin.^{341,342}

Na widmie pochodzącym od AuNPs-PEG możemy zaobserwować najintensywniejsze pasmo przy 1097 cm^{-1} , pochodzące od drgań rozciągających C–O–C, świadczące o obecności grup eterowych z glikolu polietylenowego.³⁴³ Obserwowane zmiany potwierdzają modyfikację powierzchni badanych nanocząstek. Zarejestrowane widma są zgodne z opublikowanymi wcześniej danymi dotyczącymi widm IR dla nanocząstek pokrytych taninami oraz cytrynianami.^{342,344} Znajdujące się na Rys. 26 sygnały potwierdzają obecność grup taninowych i cytrynianowych w próbce AuNPs oraz sugerują ich zmniejszenie w próbce AuNPs-PEG, wskazując jednocześnie na przyłączenie się do nanocząstek złota cząsteczek PEG-u.



Rys. 27. Widmo IR dla próbek Au(Hg)NPs (kolor niebieski) oraz Au(Hg)NPs-PEG (kolor czerwony).

W przypadku widm w podczerwieni zarejestrowanych dla nanocząstek modyfikowanych dodatkowo rtęcią, a przedstawionych na Rys. 27, obserwujemy, że zarówno w przypadku dodatku rtęci jak i PEG-u nastąpiła zmiana kształtu widma w porównaniu do AuNPs, co świadczy o wyraźnej modyfikacji ich powierzchni. W obszarze liczby falowej 2900 cm^{-1} dla Au(Hg)NPs nie obserwujemy wyraźnych pików. Z kolei dla koniugatu Au(Hg)NPs-PEG w tym obszarze pojawiają się dwa piki przy 2870 i 2903 cm^{-1} od drgań rozciągających C–H pochodzących od grup CH_2 PEG-u. Widoczne jest także intensywne pasmo przy 1100 cm^{-1} odpowiadające drganiom rozciągającym C–O–C należącym do wiązań eterowych w cząsteczkach PEG-u.^{342,343} Na tej podstawie można wnioskować o udanym przyłączeniu PEG-u do koniugatu.

Porównując widma przedstawione na Rys. 26 i Rys. 27, możemy zaobserwować dla nanocząstek złota pokrytych rtęcią intensywny i wąski pik przy 1384 cm^{-1} związany z drganiami N–O pochodzącymi od anionów azotanowych. Ich obecność jest spowodowana wykorzystaniem azotanu(V) rtęci(II) w trakcie modyfikowania powierzchni AuNPs. Intensywność tego sygnału ulega zmniejszeniu po dodaniu PEG-u w wyniku częściowej wymiany grup azotanowych na grupy polietylenoglikolowe.

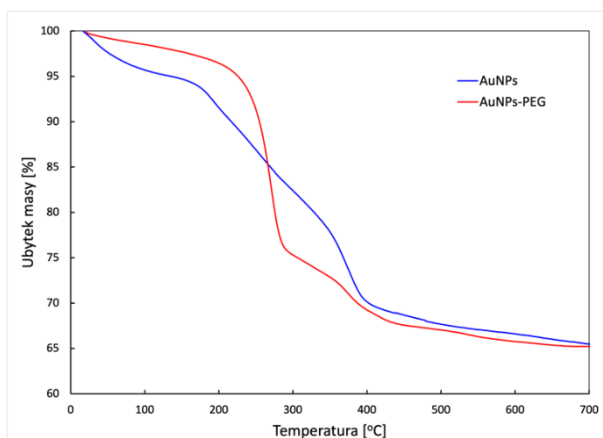
Pomiary przeprowadzone metodą spektroskopii w podczerwieni potwierdziły modyfikację nanocząstek złota rtęcią oraz PEG-iem i otrzymanie odpowiednich koniugatów Au(Hg)NPs i Au(Hg)NPs-PEG.

4.4.5. Analiza termograwimetryczna (TGA)

Pokrycie nanocząstek złota rtęcią oraz przyłączenie do nich polietylenoglikolu można potwierdzić również analizą termograwimetryczną.

Próbki nanocząstek przygotowano według opisu znajdującego się w części eksperymentalnej w rozdziale 3.4.5. Analiza termograwimetryczna (TGA). Analizie poddano niemodyfikowane nanocząstki złota AuNPs, nanocząstki złota z przyłączonym PEG-iem (AuNPs-PEG), nanocząstki złota pokryte rtęcią (Au(Hg)NPs) oraz cały koniugat zawierający nanocząstki złota z rtęcią i PEG-iem (Au(Hg)NPs-PEG).

Wyniki zostały przedstawione na poniższych wykresach prezentujących krzywe rozkładu termicznego badanych związków (Rys. 28, Rys. 29).



Rys. 28. Krzywe rozkładu termicznego dla AuNPs oraz AuNPs-PEG.

Krzywe przedstawione na Rys. 28 reprezentują ubytek masy w zależności od wzrostu temperatury dla AuNPs oraz AuNPs-PEG. Dla temperatury wynoszącej 400°C (ubytek masy rzędu 70,0%), obserwujemy rozpoczęcie tworzenia się plateau, które trwa aż do końca zakresu pomiarowego tj. do osiągnięcia 700°C (ubytek masy 64,9%). Obserwowany ubytek masy próbki jest spowodowany rozkładem grup cytrynianowych i taninowych i jest charakterystyczny dla wykresów TGA przedstawiających AuNPs pokryte grupami cytrynianowymi.³⁴⁵ Dzięki ubytkowi masy wyznaczonemu metodą TGA dla AuNPs można było oszacować stężenie oraz liczbę nanocząstek złota znajdujących się w próbce po syntezie. Analizy tej dokonano na podstawie metody opisanej przez Bajaj i współ.³⁴⁵ zakładając iż taniny oraz cytryniany obecne na powierzchni nanocząstek złota uległy całkowitemu rozkładowi w temperaturze końcowej 700°C,³⁴⁶ co doprowadziło do powstania czystego złota w postaci nanocząstek, jako produktu końcowego o masie resztkowej 0,707 mg. Masa ta, wraz ze średnicą nanocząstek (wyznaczoną poprzez pomiary TEM, $d = 5,545 \pm 0,445$ nm) pozwala na obliczenie liczby nanocząstek w próbce. W obliczeniach tych zastosowano poniższe wzory (Równanie 11, Równanie 12).³⁴⁵

$$V_{Au(left)} = \frac{w}{\rho_{Au}}$$

Równanie 11. Równanie opisujące objętość złota pozostałą w próbce.³⁴⁵

$$N_{AuNPs} = \frac{V_{Au(left)}}{V_{Au}}$$

Równanie 12. Wzór pozwalający obliczyć liczbę nanocząstek w próbce.³⁴⁵

Gdzie:

$V_{Au(left)}$ – pozostała objętość złota,

ρ_{Au} – gęstość złota (19,32 g/cm³),

w – masa resztkowa złota,

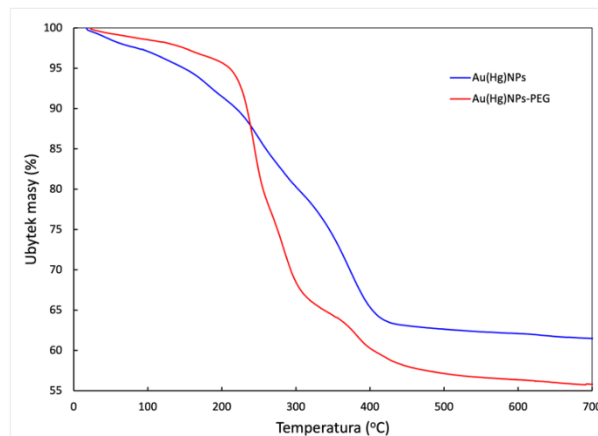
N_{AuNPs} – liczba nanocząstek w próbce,

V_{Au} – objętość nanocząstki ($\frac{4}{3}\pi r^3$).

Korzystając z równań 10 i 11 wyznaczono liczbę nanocząstek w badanej próbce, która wyniosła $4,1 \cdot 10^{14}$ AuNPs. Biorąc pod uwagę, że próbka była dziesięciokrotnie zatężona, stężenie nanocząstek w

roztworze po syntezie wynosiło około $4,10 \cdot 10^{13}$ AuNPs/ml, a odpowiadające tej wartości stężenie molowe 6,8 nM.

Na wykresie przedstawiającym dane dla AuNPs-PEG (Rys 27) obserwujemy zmianę kształtu krzywej rozkładu termicznego, co świadczy o modyfikacji składu próbki.³⁴⁷ Analiza TGA potwierdziła obecność PEG-u w próbce AuNPs-PEG.



Rys. 29. Krzywe rozkładu termicznego dla Au(Hg)NPs oraz Au(Hg)NPs-PEG.

Krzywe rozkładu termicznego koniugatów Au(Hg)NPs oraz Au(Hg)NPs-PEG przedstawiono na Rys. 29. Obserwowane są różnice dla krzywych rozkładu termicznego koniugatu Au(Hg)NPs-PEG (Rys. 29) w porównaniu do AuNPs-PEG (Rys. 28), gdzie ubytek masy Au(Hg)NPs-PEG jest większy o około 10% w porównaniu z innymi próbkami badanymi w tym eksperymencie. Może to świadczyć o występowaniu oddziaływań między rtęcią, a PEG-iem wynikających z jej powinowactwa do grupy tiolowej.³⁴⁸

Dzięki analizie danych uzyskanych metodą TGA można potwierdzić, iż próbki AuNPs-PEG oraz Au(Hg)NPs-PEG zawierają glikol polietylenowy. Ponadto, ustalono że stężenie nanocząstek w próbkach jest równe $4,10 \cdot 10^{13}$ AuNPs/ml, a odpowiadające tej wartości stężenie molowe wynosi 6,8 nM. Różnice między wartościami obliczonymi teoretycznie, a stężeniami wyznaczonymi z zastosowaniem TGA wynoszą zatem 40%, co prawdopodobnie wynika z błędów związanych z zastosowaną metodą oczyszczania produktu na filtrach 0,22 μm oraz jego kilkukrotnego zatężenia (10x) na koncentratorach wirówkowych.

4.5. Badania komórkowe *in vitro*

Znając własności fizykochemiczne koniugatu Au(Hg)NPs-PEG, a także wszystkich koniugatów pośrednich powstających w trakcie syntezy, przystąpiono do analizy jego potencjału przeciwnowotworowego w warunkach *in vitro* na liniach komórkowych.

Komórki nowotworowe hodowano według opisu zawartego w części metodologicznej tej pracy (3.5.7. Badania komórkowe *in vitro*).

4.5.1. Badanie cytotoksyczności testem MTS

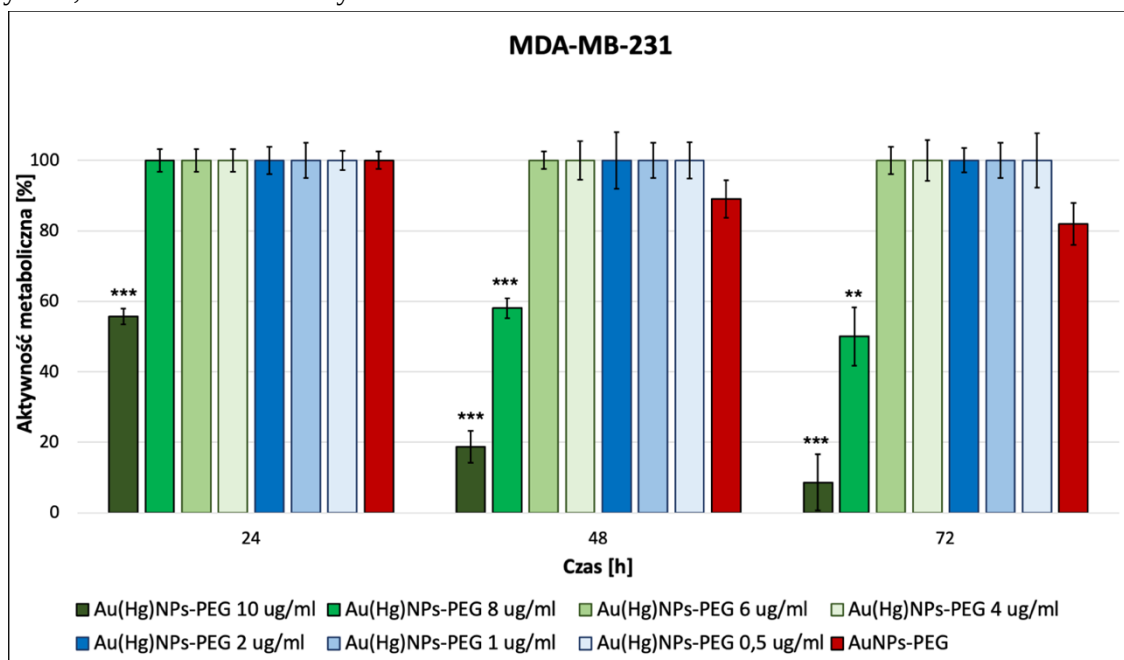
Pierwszym eksperymentem dla Au(Hg)NPs-PEG przeprowadzonym na liniach komórkowych było badanie cytotoksyczności testem MTS. Metodologię oraz metodykę tego badania opisano w poprzednich rozdziałach tej pracy (3.4.7. Test MTS, 3.5.7.4. Badanie cytotoksyczności testem MTS).

Wyniki testu MTS opracowano na podstawie otrzymanych danych o absorbancji i przedstawiono w postaci wykresów zależności aktywności metabolicznej komórek od czasu oraz stężenia związków (Rys. 30, Rys. 31).

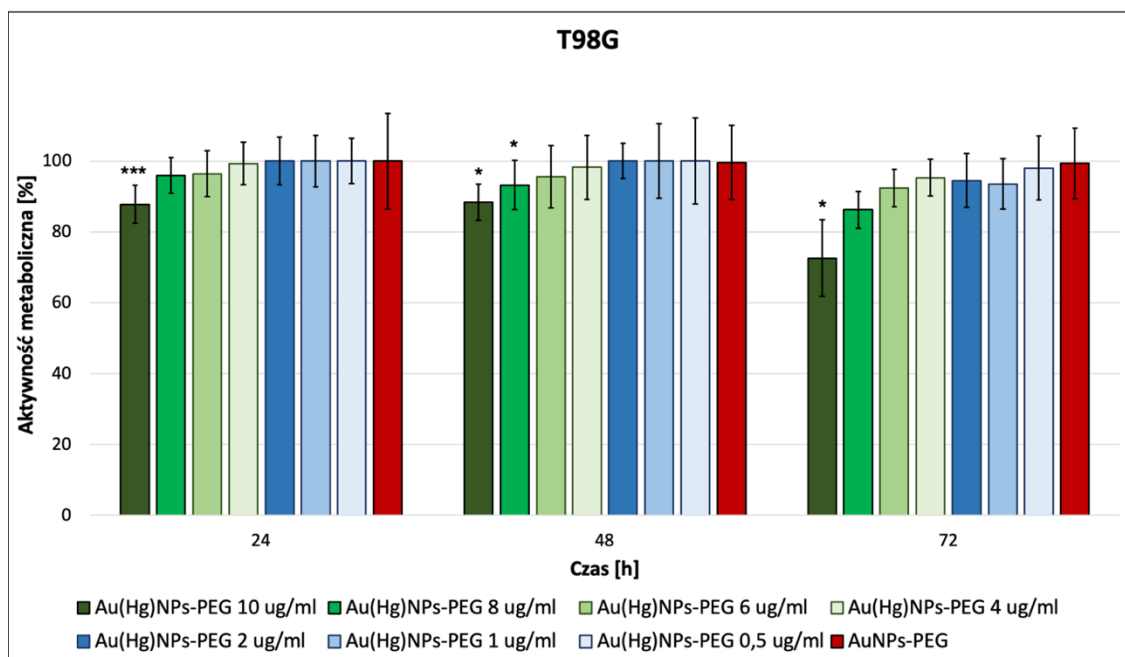
Zbadano następujące nieradioaktywne koniugaty: AuNPs-PEG; Au(Hg)NPs-PEG. Dla pełnego koniugatu badano stężenia nieradioaktywnej rtęci wynoszące 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla nanocząstek niezawierających rtęci do badań wybrano stężenie wynoszące $3,65 \cdot 10^{14}$ AuNPs/ml, które odpowiada najwyższemu stężeniu NPs zastosowanemu dla koniugatu Au(Hg)NPs-PEG.

Test dla AuNPs niezawierających rtęci przeprowadzono w celu potwierdzenia braku ich toksycznego działania na badane linie komórkowe.

Wyniki badania cytotoksyczności testem MTS dla linii komórkowej MDA-MB-231 przedstawiono na Rys. 30, a dla linii T98G na Rys. 31.



Rys. 30. Zależność aktywności metabolicznej od czasu dla linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanej AuNPs, AuNPs-PEG oraz Au(Hg)NPs-PEG o różnych stężeniach rtęci.



Rys. 31. Zależność aktywności metabolicznej od czasu dla linii komórkowej T98G traktowanej AuNPs, AuNPs-PEG oraz koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o różnych stężeniach rtęci.

Z otrzymanych danych wynika, że badany koniugat wykazuje znacznie silniejsze działanie cytotoksyczne względem komórek potrójnie ujemnego raka piersi. Komórki glejaka wielopostaciowego są znacznie bardziej odporne na działanie nieradioaktywnego koniugatu Au(Hg)NPs-PEG (Rys. 31). W przypadku tego nowotworu istotnie statystycznie działanie toksyczne koniugatu obserwujemy jedynie dla najwyższych stosowanych stężeń rtęci tj. 10 oraz 8 $\mu\text{g/ml}$. Po 72 godzinach inkubacji, najwyższe badane stężenie powoduje spadek aktywności metabolicznej komórek linii T98G do $72,6 \pm 10,8\%$, a stężenie 8 $\mu\text{g/ml}$ powoduje po tym samym czasie spadek aktywności metabolicznej do $86,2 \pm 5,2\%$. Można więc stwierdzić, iż badany koniugat nie wykazuje znacznej toksyczności dla linii komórkowej T98G we wszystkich badanych stężeniach, oraz że koniugat jest nietoksyczny dla badanej linii komórkowej o stężeniach mniejszych bądź równych 6 $\mu\text{g/ml}$.

Wyniki uzyskane dla komórek linii MDA-MB-231 wskazują na znaczną cytotoksyczność badanego koniugatu o stężeniach większych niż 6 $\mu\text{g/ml}$. Związek o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ powoduje obniżenie aktywności metabolicznej komórek już po 24 godzinach do wartości $55,7 \pm 2,3\%$, po 48 godzinach wartość ta spada do $18,8 \pm 4,5\%$, a po 72 godzinach osiąga $8,6 \pm 8,0\%$. Ponadto, Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu 8 $\mu\text{g/ml}$ po 72 h powoduje spadek aktywności metabolicznej komórek do $50,0 \pm 8,3\%$. Koniugat jest więc bardzo cytotoksyczny dla wysokich stężeń. Analiza statystyczna także potwierdziła ten wniosek wykazując wysoką istotność statystyczną dla stężeń 8 $\mu\text{g/ml}$ oraz 10 $\mu\text{g/ml}$. Przy zmniejszeniu stężenia rtęci, cytotoksyczność Au(Hg)NPs-PEG dla linii MDA-MB-231 gwałtownie maleje, a koniugat staje się nietoksyczny dla stężeń mniejszych bądź równych 6 $\mu\text{g/ml}$.

W opublikowanej przez Kim *i współl.* pracy analizującej wpływ HgCl_2 o stężeniach 10–50 μM (około 2–10 $\mu\text{g/ml}$) wykazano, że występuje zależne od dawki zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc linii H1299. Wykazano zmniejszenie żywotności do 60% po 24 h dla najwyższego stężenia.³⁴⁹ Wynik ten jest zgodny z uzyskanymi danymi dla linii MDA-MB-231, gdzie zastosowano nanocząstki złota pokryte rtęcią. Jednakże, nie można dokonać

jednoznacznego porównania tych wyników ze względu na odmienną formulację związku oraz zastosowanie innej linii komórkowej.

Informacje dotyczące cytotoksyczności zimnego koniugatu uzyskane podczas testu MTS pozwoliły na wyznaczenie optymalnego stężenia rtęci, które zostanie zastosowane do badań jej radioaktywnego odpowiednika w radiokoniugacie $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$. Ze względu na założenie, iż toksyczność radiokoniugatu ma pochodzić jedynie od radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, w badaniach radiokoniugatu stosowano stężenie rtęci na poziomie poniżej 6 $\mu\text{g/ml}$.

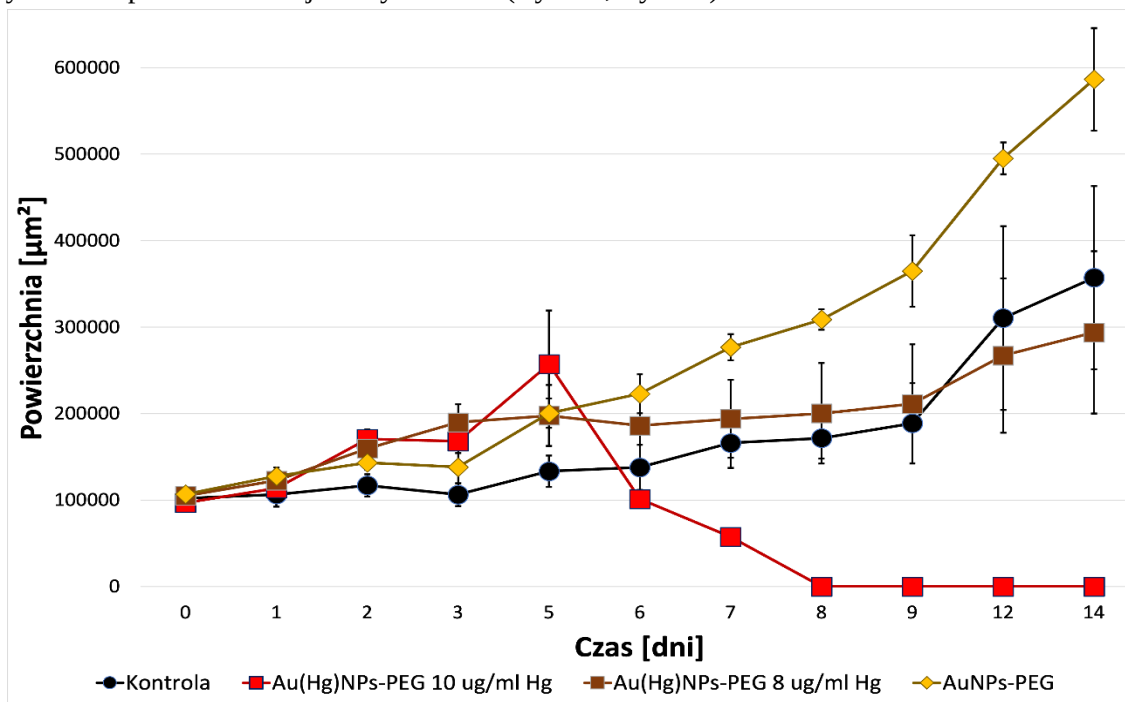
Wyniki uzyskane dla nanocząstek AuNPs-PEG oraz koniugatu Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 4 $\mu\text{g/ml}$ zostały wykorzystane w dalszej części pracy do przeprowadzenia porównawczej analizy statystycznej danych otrzymanych dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$.

4.5.2. Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych

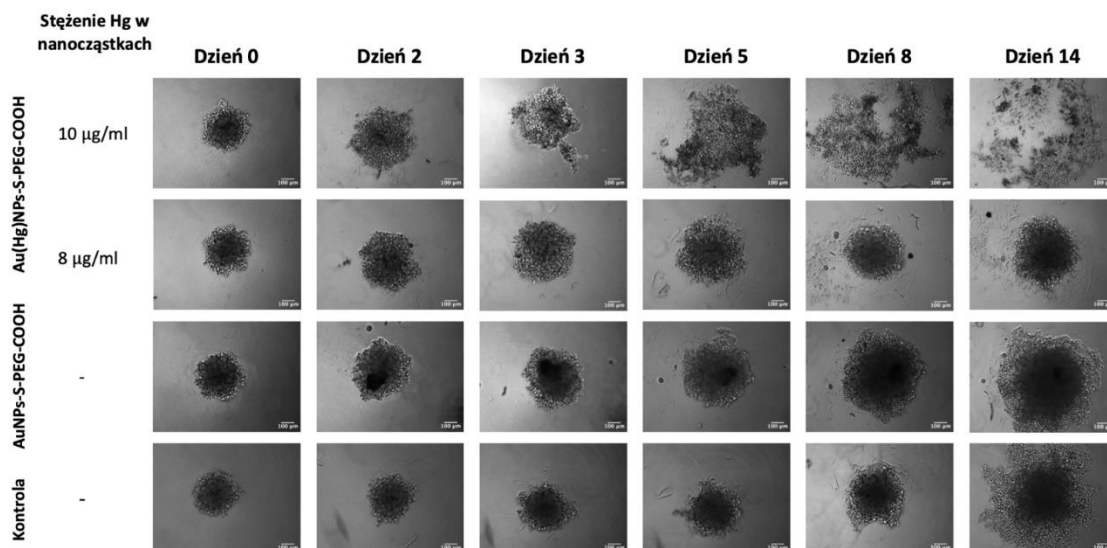
Trójwymiarowe struktury komórkowe (sferoidy) przygotowano według opisu zamieszczonego w rozdziale 3.5.7.5. Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych.

Badanie cytotoksyczności dla związków nieradioaktywnych na sferoidach przeprowadzono dla AuNPs-PEG niemodyfikowanych rtęcią oraz dla Au(Hg)NPs wykazujących toksyczność w teście MTS tj. dla stężeń rtęci 8 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$.

Otrzymane dane dotyczące powierzchni sferoidów zostały przedstawione na wykresach poniżej (Rys. 32, Rys. 34). Ponadto, analizie programem Fiji ImageJ2 2.14.0 poddano zdjęcia sferoidów uzyskane w eksperymencie i przedstawiono je na rysunkach. (Rys. 33, Rys. 35).



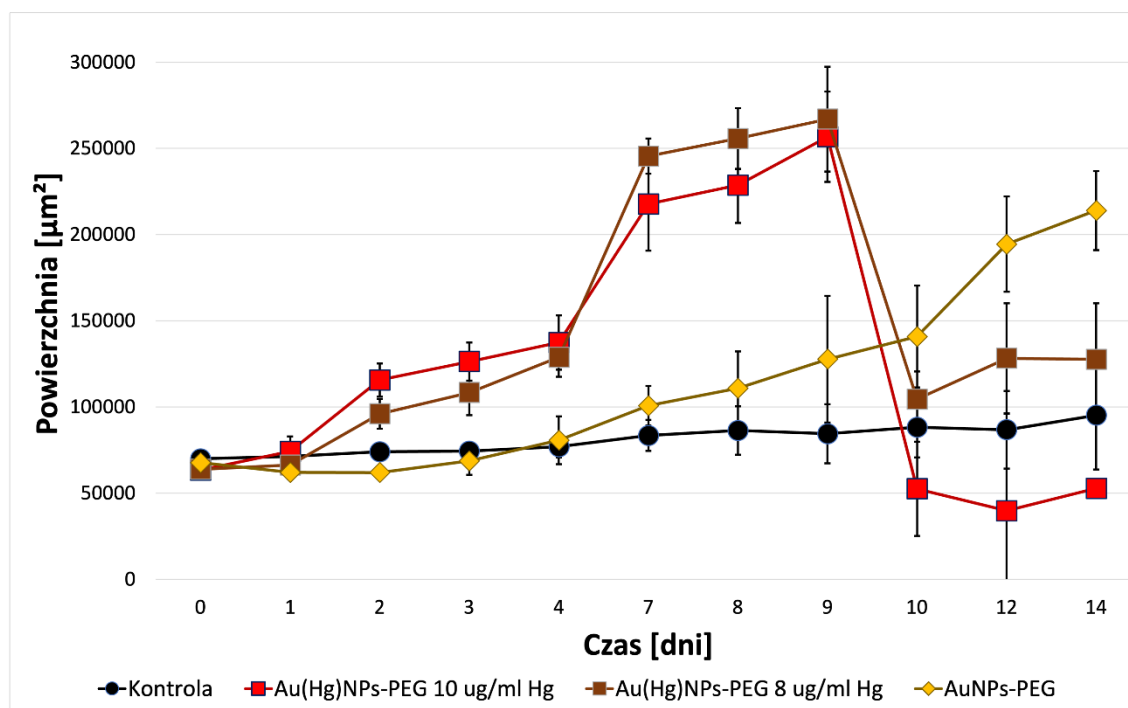
Rys. 32. Zmiana powierzchni sferoidów z linii MDA-MB-231, traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 $\mu\text{g/ml}$ i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.



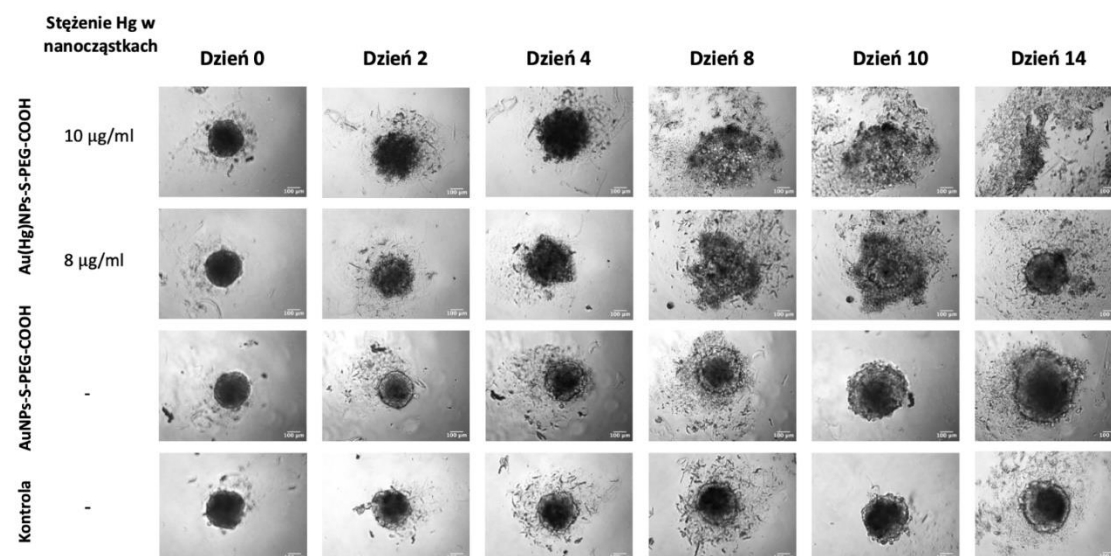
Rys. 33. Obrazy sferoidów linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 µg/ml i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.

Dla sferoidów z linii komórkowej MDA-MB-231 (Rys. 32, Rys. 33) zaobserwowano znaczną toksyczność powodującą rozpad struktury komórkowej po 8 dniach od dodania do komórek koniugatu Au(Hg)NPs-PEG zawierającego rtęć o stężeniu 10 µg/ml. Dla tej badanej grupy, obserwujemy także wzrost powierzchni sferoidów względem grupy kontrolnej rozpoczynający się po 2 dniach od dodania koniugatu, co może wynikać z rozpoczęcia się procesu rozpadu sferoidów, który początkowo powoduje pozorne powiększenie się struktury ze względu na zwiększanie się odległości pomiędzy poszczególnymi komórkami. Struktura komórkowa traktowana Au(Hg)NPs-PEG rozpada się całkowicie po 8 dniach inkubacji z badanym związkiem. Dla komórek traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu 8 µg/ml na początku trwania eksperymentu obserwujemy stopniowy wzrost sferoidów względem grupy kontrolnej. W dniu trzecim różnica między wielkościami w tych grupach wynosi 78,8%. Następnie, struktury stopniowo rosną, a różnice wielkości w porównaniu do grupy kontrolnej zmniejszają się. Po 12 dniach inkubacji struktura traktowana koniugatem o stężeniu rtęci 8 µg/ml staje się mniejsza od grupy kontrolnej o 14,0% i nie ulega zmianie do końca trwania eksperymentu, kiedy to różnica wielkości w porównaniu do grupy kontrolnej wynosi 17,7%.

Warto zaznaczyć, że obserwowany jest również wzrost wielkości powierzchni struktur traktowanych nanocząstkami niezawierającymi rtęci. Po siedmiu dniach inkubacji wynosi on 66,6% w stosunku do grupy kontrolnej komórek nietraktowanych nanocząstkami i utrzymuje się do końca eksperymentu, kiedy to po 14 dniach inkubacji wynosi 65,3%.



Rys. 34. Zmiana powierzchni sferoidów z linii T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 µg/ml i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.



Rys. 35. Obrazy sferoidów linii komórkowej T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 µg/ml i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.

Dla linii T98G również obserwujemy efekt toksyczny pochodzący od koniugatów zawierających rtęć w obu stężeniach (Rys. 34, Rys. 35). Dla najwyższego badanego stężenia - 10 µg/ml widoczny jest rozpad sferoidów, który rozpoczyna się w ósmym dniu eksperymentu, gdy powierzchnia sferoidów rośnie o 165% w porównaniu do grupy kontrolnej, w wyniku zwiększania się odległości między komórkami. Rozpad sferoidów dla tego stężenia jest widoczny przez cały czas trwania eksperymentu. W dziesiątym dniu

eksperymentu powierzchnia sferoidów dla tej grupy spada o 40,5%, natomiast na końcu eksperymentu, w dniu czternastym, zmniejszenie powierzchni w porównaniu do grupy kontrolnej wynosi 44,6%. Dla tych komórek obserwujemy duże odchylenia w wielkości powierzchni, zwłaszcza przy końcu trwania eksperymentu, co wynika z faktu, że nie wszystkie sferoidy z tej grupy rozpadły się. Część z nich zaczęła ponownie rosnąć po etapie chwilowego spadku powierzchni. Obserwowana jest więc częściowa wznowa nowotworu. Dla grupy sferoidów traktowanych koniugatem o stężeniu rtęci 8 $\mu\text{g/ml}$ widoczny jest nieznaczny efekt cytotoksyczny na początku trwania eksperymentu. Do dziewiątego dnia eksperymentu obserwujemy zwiększanie się powierzchni sferoidów (do 216% ich początkowej wielkości), które spowodowane jest ich rozpadem. Następnie, od dnia dziesiątego następuje ponowne uformowanie się regularnej struktury sferoidów oraz ich wzrost. W ostatnim dniu trwania eksperymentu sferoidy z tej grupy są o 34% większe w porównaniu z grupą kontrolną. Zauważalny jest także znaczny wzrost wielkości powierzchni struktur traktowanych nanocząstkami niezawierającymi rtęci, który postępuje stopniowo w czasie. Po dziesięciu dniach inkubacji wynosi on 60% w stosunku do grupy kontrolnej komórek nietraktowanych nanocząstkami i utrzymuje się do końca eksperymentu, kiedy różnica wielkości powierzchni osiąga aż 125%.

Na podstawie powyższych informacji można wywnioskować, iż koniugat nanocząstek złota działa cytotoksycznie na komórki linii MDA-MB-231 w najwyższym badanym stężeniu tj. 10 $\mu\text{g/ml}$. Koniugat wykazuje słabe działanie cytotoksyczne na komórki linii MDA-MB-231 o stężeniu rtęci 8 $\mu\text{g/ml}$, gdzie redukuje on wielkość sferoidów w porównaniu do grupy kontrolnej o 17,7%. Działanie koniugatów zawierających rtęć jest słabsze dla komórek linii T98G, gdzie najwyższe badane stężenie powoduje zmniejszenie powierzchni o 44,6%, natomiast w niektórych dołkach przy tym stężeniu obserwujemy ponowny wzrost po 10 dniach. Koniugat o stężeniu 8 $\mu\text{g/ml}$ powoduje wzrost powierzchni o 34,0%. W tym przypadku obserwujemy odbudowanie się sferoidów we wszystkich badanych dołkach po 10 dniach trwania eksperymentu.

Dla grupy nanocząstek złota niezawierających rtęci AuNPs-PEG stwierdzamy znaczny wzrost sferoidów obu badanych linii komórkowych w czasie, w porównaniu do sferoidów z grupy kontrolnej. Wzrost ten dla linii MDA-MB-231 wynosi 65,3% na koniec trwania eksperymentu, a dla linii T98G osiąga on aż 125%.

4.5.3. Badanie metodą cytometrii przepływowej

Następną metodą badawczą, która została zastosowana do dokładnej oceny mechanizmu toksycznego działania nieradioaktywnych nanocząstek złota oraz ich koniugatów z rtęcią, była cytometria przepływowa. Technika ta umożliwia szybką ocenę wielkości i ziarnistości cząstki pozwalając na analizę zmian w populacjach komórek. Metoda cytometrii przepływowej została opisana w rozdziale 3.4.9. Cytometria przepływowa.

Badania cytometrią przepływową również prowadzono na dwóch liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G.

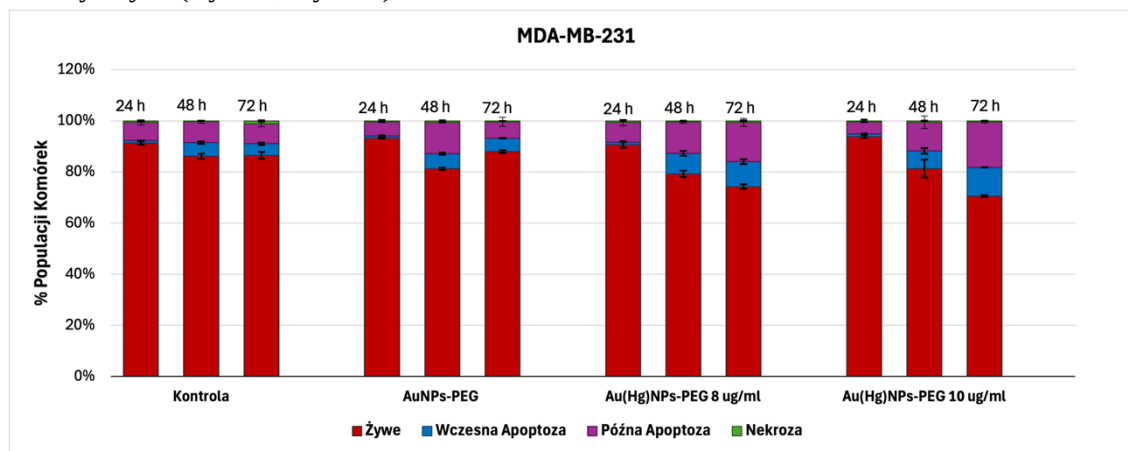
4.5.3.1. Badanie apoptozy

W celu określenia mechanizmu śmierci komórkowej wykonano test apoptozy z zastosowaniem zestawu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™).

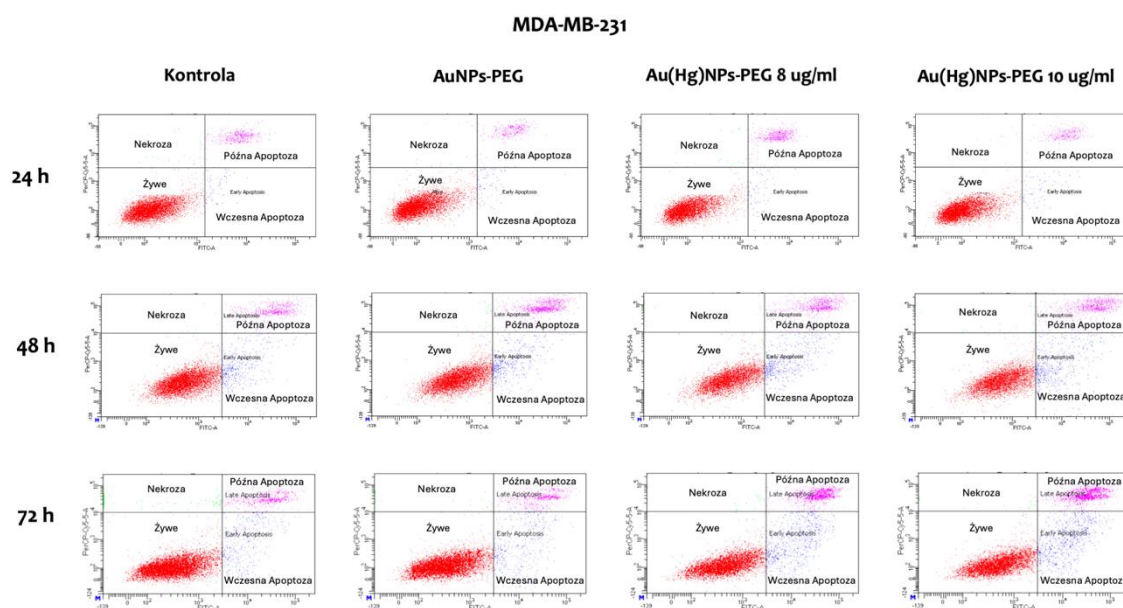
Badanie przeprowadzono dla koniugatów Au(Hg)NPs wykazujących toksyczność w teście MTS tj. dla stężeń rtęci 8 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$, a także dla grupy kontrolnej niezawierającej nanocząstek oraz zawierającej nanocząstki AuNPs-PEG niemodyfikowane rtęcią.

Dokładny opis zastosowanego protokołu badania apoptozy zamieszczono w rozdziale 3.5.7.7. Badanie apoptozy metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki analizy przedstawione zostały na poniższych wykresach (Rys. 36, Rys. 38) oraz rysunkach reprezentatywnych (Rys. 37, Rys. 39).

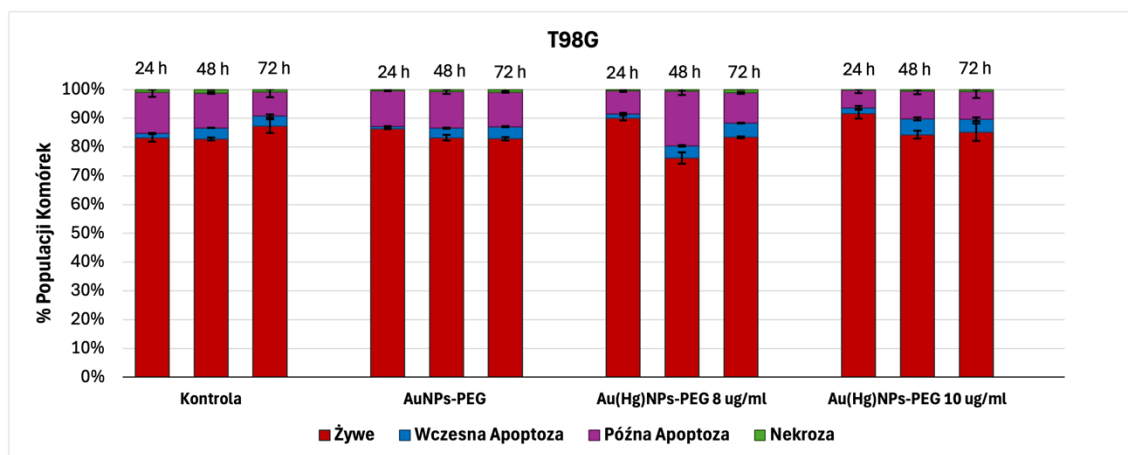


Rys. 36. Procent populacji komórek MDA-MB-231 traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 oraz 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.



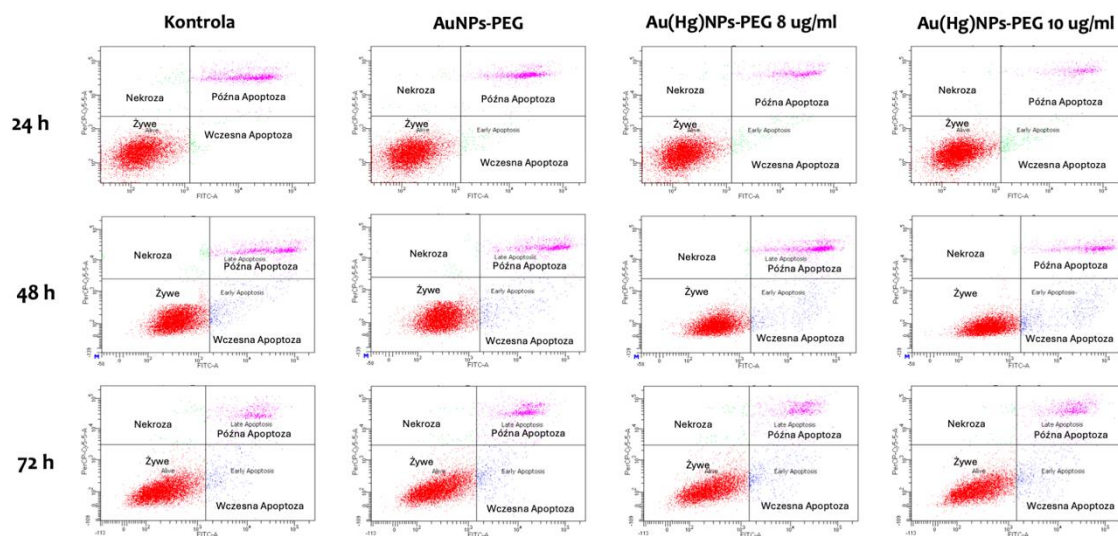
Rys. 37. Wykresy reprezentatywne apoptozy dla linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.

Obserwując dane zebrane dla linii komórkowej potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231 (Rys. 36, Rys. 37) możemy wnioskować, że procent komórek żywych zmniejsza się w czasie oraz wraz ze wzrostem stężenia rtęci w nanocząstkach. Dla stężenia rtęci w koniugacie nanocząstek wynoszącego 8 $\mu\text{g/ml}$ obserwujemy po 72 h spadek poziomu frakcji komórek żywych do $74,3 \pm 0,85\%$ i wzrost poziomu komórek znajdujących się we wczesnej oraz późnej apoptozie do odpowiednio $9,75 \pm 0,92\%$ oraz $15,40 \pm 1,56\%$. Dla najwyższego badanego stężenia, 10 $\mu\text{g/ml}$, procent komórek żywych spada do $70,60 \pm 0,4\%$ po 72 h, podczas gdy utrzymuje się on na poziomie $87,15 \pm 0,49\%$ dla nanocząstek kontrolnych AuNPs-PEG, które nie zawierają rtęci oraz na poziomie $86,45 \pm 1,34\%$ dla komórek z grupy kontrolnej nietraktowanej nanocząstkami. W przypadku koniugatu Au(Hg)NPs o stężeniu rtęci 10 $\mu\text{g/ml}$ znacznie zwiększa się poziom komórek we wczesnej i późnej apoptozie. Po 72 h, dla stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$, we wczesnej apoptozie znajduje się $11,15 \pm 0,07\%$ komórek, a w późnej apoptozie $17,80 \pm 0,40\%$ komórek. Jest to różnica 6,35-11,45 punktów procentowych (p.p.) względem grupy nanocząstek kontrolnych AuNPs-PEG, gdzie tylko $5,15 \pm 0,07\%$ komórek znajduje się we wczesnej, a $6,35 \pm 1,77\%$ komórek w późnej apoptozie. Jest to także różnica o 6,90-9,95 p.p. względem grupy komórek kontrolnych nietraktowanych nanocząstkami, gdzie $4,60 \pm 0,42\%$ komórek znajduje się we wczesnej apoptozie, a $7,85 \pm 1,20\%$ komórek znajduje się w późnej apoptozie. Nekroza będąca „niechcianym” typem śmierci komórkowej w przypadku projektowania leków,³⁵⁰ występuje w przypadku wszystkich badanych nieradioaktywnych koniugatów na poziomie między 0,35% a 1,10%. Jest to bardzo mała część populacji, co świadczy o tym, że nie jest to preferowany rodzaj śmierci komórki.



Rys. 38. Procent populacji komórek T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.

T98G



Rys. 39. Wykresy reprezentatywne apoptozy dla linii komórkowej T98G traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 oraz 10 µg/ml, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.

Z badania apoptozy na linii komórkowej glejaka wielopostaciowego T98G podobnie jak dla komórek MDA-MB-231 wynika, że procent komórek żywych maleje w czasie oraz wraz ze wzrostem stężenia rtęci w koniugacie Au(Hg)NPs-PEG (Rys. 38, Rys. 39). Dla stężenia wynoszącego 8 µg/ml po 72 h inkubacji poziom żywotności komórek wynosi $83,35 \pm 0,35\%$. Wartość ta utrzymuje się na podobnym poziomie $85,05 \pm 3,04\%$ dla koniugatu o stężeniu rtęci 10 µg/ml po 72 h. Dla wszystkich badanych stężeń nie obserwujemy znaczących różnic w procencie komórek żywych względem grupy kontrolnej nanocząstek niezawierających rtęci oraz względem komórek z grupy kontrolnej nietraktowanej nanocząstkami. Różnice te nie przekraczają 5 p.p.

Nieznacznie zmienia się również procent komórek znajdujących się we wczesnej oraz później apoptozie, gdzie dla 72 h inkubacji wynosi on odpowiednio $4,55 \pm 0,64\%$ i $9,60 \pm 2,26\%$ dla stężenia rtęci 10 µg/ml oraz $4,90 \pm 0,14\%$ i $10,55 \pm 0,35\%$ dla stężenia rtęci 8 µg/ml. Podczas gdy, poziomy te wynoszą dla komórek nietraktowanych koniugatami $3,55 \pm 0,49\%$ oraz $8,35 \pm 1,91\%$, a dla komórek traktowanych AuNPs-PEG $4,15 \pm 0,21\%$ oraz $11,95 \pm 0,07\%$.

Poziom nekrozy w komórkach linii T98G w przypadku wszystkich badanych koniugatów oraz grup kontrolnych nie przekracza 1,2%, co świadczy o tym, że nie jest to preferowany szlak śmierci komórkowej indukowanej przez badane koniugaty.

Obserwujemy występowanie różnic w poziomie żywotności komórek pomiędzy liniami MDA-MB-231 oraz T98G. Linia komórkowa potrójnie ujemnego raka piersi jest mniej oporna na działanie koniugatu Au(Hg)NPs-PEG i po 72 h dla najwyższego badanego stężenia poziom komórek żywych spada do $70,6 \pm 0,40\%$, podczas gdy utrzymuje się on na poziomie $85,05 \pm 3,04\%$ dla komórek glejaka wielopostaciowego. Powyższe wyniki mogą wskazywać na bardzo dużą oporność glejaka na leczenie i jego wysoką złośliwość.⁵⁶

Dla obu linii koniugaty nanocząstek z rtęcią najczęściej indukują późną apoptozę, w mniejszym stopniu obserwujemy frakcje komórek we wczesnej apoptozie. Różnice między liniami komórkowymi,

jakie zaobserwowano dla Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 10 µg/ml wynoszą 6,6 p.p. dla wczesnej apoptozy oraz 8,2 p.p. dla późnej apoptozy, przy czym dla linii MDA-MB-231 wartości te są wyższe w porównaniu z linią T98G. Nie stwierdzono, aby badane koniugaty indukowały nekrozę ($\leq 1,2\%$).

Kim i współ. również wykazali indukowanie wczesnej oraz późnej apoptozy po potraktowaniu komórek linii H1299 nieorganiczną rtęcią HgCl_2 . Zaobserwowany efekt był jednak znacznie silniejszy, niż w przypadku badań przedstawionych w pracy.³⁴⁹

Wyniki analizy typu śmierci komórkowej dla nieradioaktywnych nanocząstek zostały w dalszej części pracy wykorzystane do przeprowadzenia analizy statystycznej danych otrzymanych dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG.

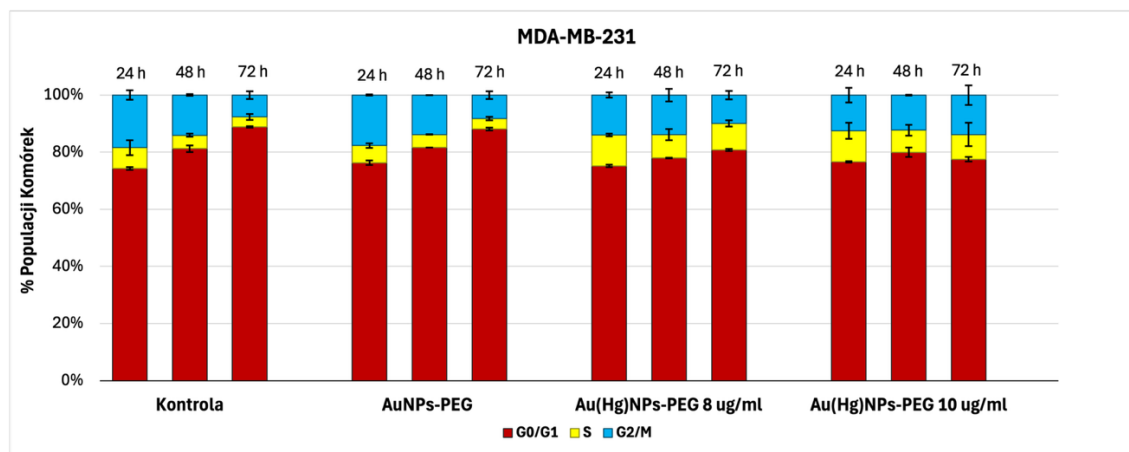
Podsumowując, ze względu na duży potencjał koniugatów nanocząstek w indukcji apoptozy bez jednoczesnego powodowania śmierci nekrotycznej, korzystnym będzie zbadanie radioaktywnego odpowiednika koniugatów nanocząstek z rtęcią $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG.

4.5.3.2. Badanie cyklu komórkowego

Metoda cytometrii przepływowej została również zastosowana do zbadania wpływu koniugatów na fazę cyklu komórkowego komórek linii MDA-MB-231 oraz T98G.

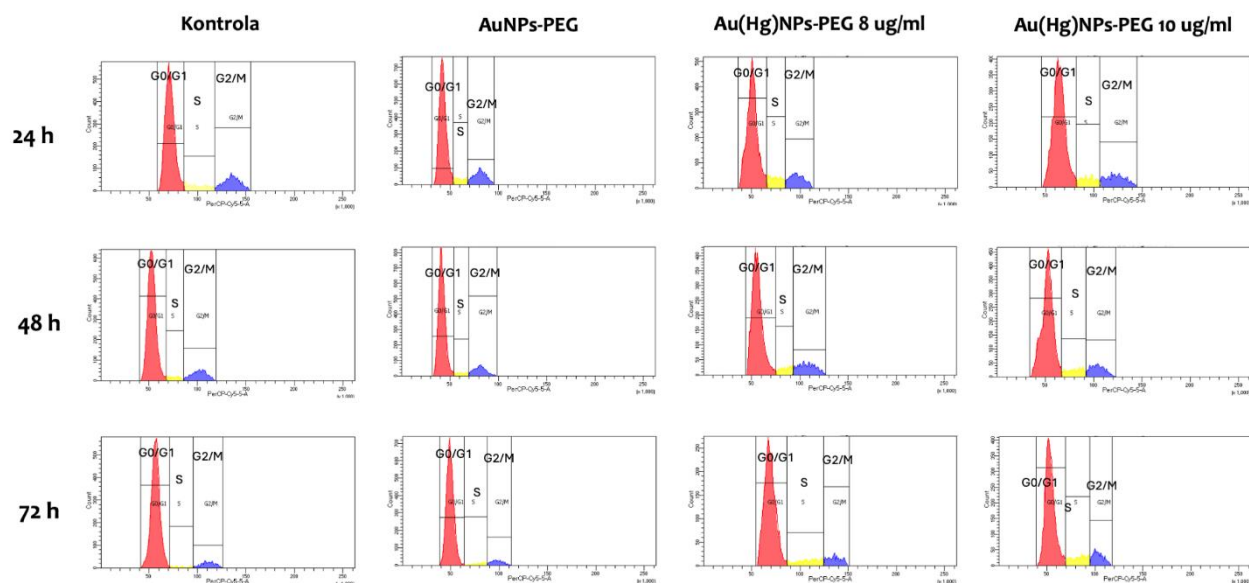
Szczegółowy opis przygotowania komórek do eksperymentu oraz jego przeprowadzenia zamieszczono w rozdziale 3.5.7.8. Badanie cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej.

Badano nanocząstki złota o stężeniu $3,65 \cdot 10^{14}$ AuNPs/ml oraz ich koniugaty zawierające rtęć o stężeniu 8 µg/ml oraz 10 µg/ml. Wyniki badania cyklu komórkowego przedstawiono na wykresach (Rys. 40, Rys. 42) oraz rysunkach reprezentatywnych (Rys. 41, Rys. 43) poniżej.



Rys. 40. Procent populacji komórek MDA-MB-231 traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 µg/ml AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy cyklu komórkowego.

MDA-MB-231

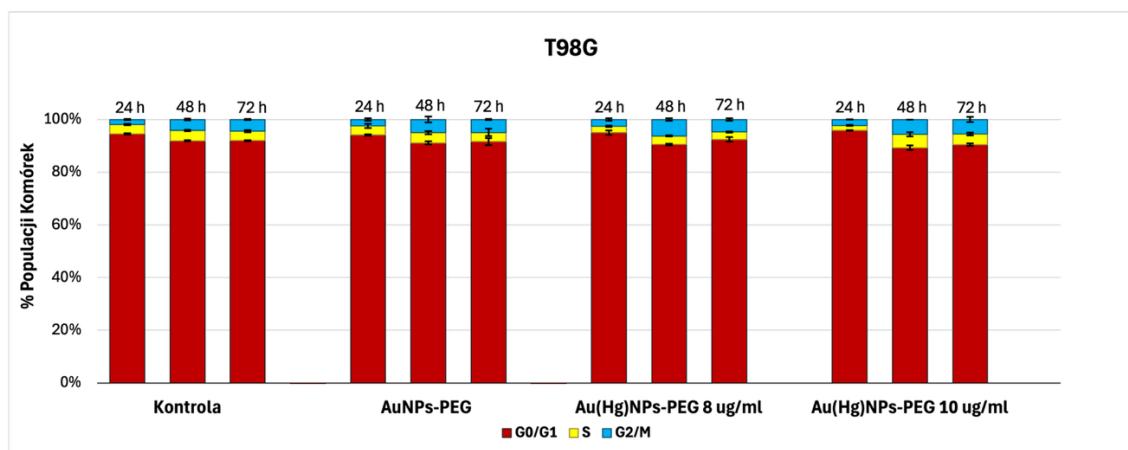


Rys. 41. Wykresy reprezentatywne cyklu komórkowego dla linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 µg/ml, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.

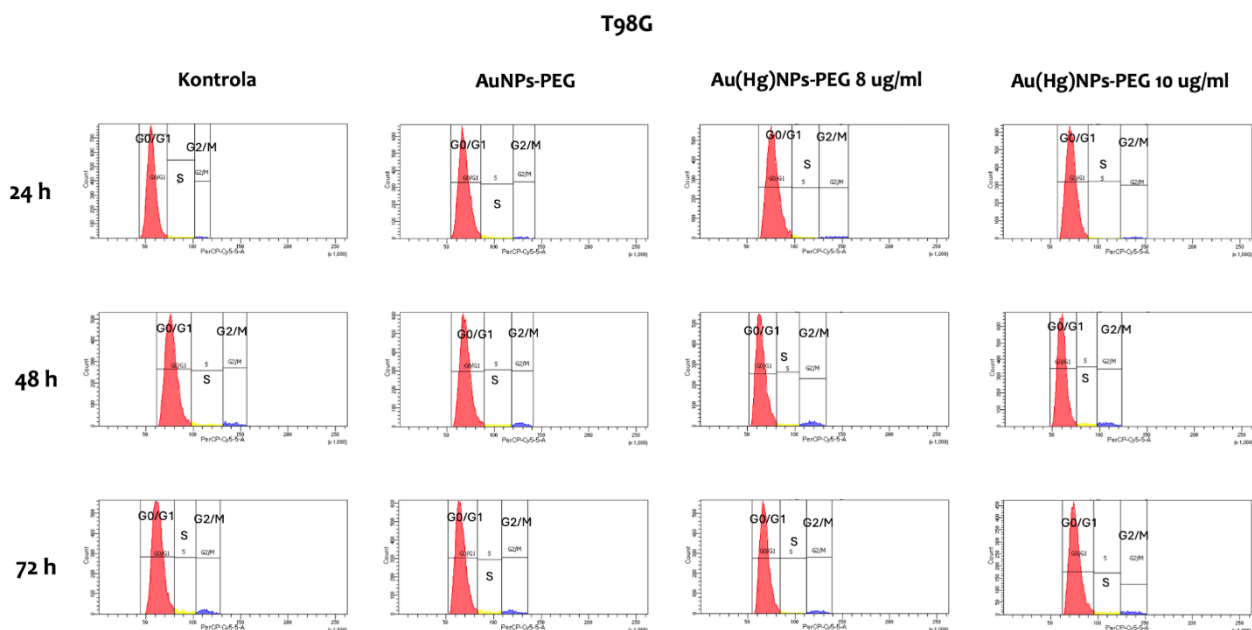
Dla linii komórkowej MDA-MB-231 obserwujemy nieznaczne zmiany w fazie cyklu komórkowego po inkubacji komórek z koniugatami nanocząstek złota zawierającymi i niezawierającymi rtęć. Po 72 godzinach dla koniugatu z rtęcią w najwyższym badanym stężeniu tj. 10 µg/ml obserwujemy spadek frakcji komórkowej w fazie G0/G1 do $77,45 \pm 0,78\%$ względem grupy kontrolnej, dla której wartość ta wynosiła $88,65 \pm 0,21\%$. Jednocześnie widoczny jest wzrost frakcji komórek w fazie S do $9,70 \pm 4,10\%$ względem grupy kontrolnej $3,50 \pm 0,99\%$, a także wzrost populacji w fazie G2/M do $13,8 \pm 3,39\%$ względem grupy kontrolnej, gdzie wynosił on $7,65 \pm 1,34\%$.

Obserwujemy także, iż dla grup kontrolnych procent frakcji komórek znajdujących się w fazie G0/G1 rośnie w czasie od $74,05 \pm 0,49\%$ do $88,65 \pm 0,21\%$, podczas gdy pozostaje on na stałym i niższym poziomie dla komórek traktowanych koniugatami z rtęcią, gdzie średnia wartość wynosi $77,97 \pm 2,08\%$ dla wszystkich badanych czasów oraz dla obu stężeń rtęci.

Podsumowując badane koniugaty nie wpływają znacząco na fazę cyklu komórkowego linii MDA-MB-231. Dodatek rtęci w koniugatach powoduje nieznaczne obniżenie frakcji komórek w fazie G0/G1 na rzecz fazy S oraz G2/M. Ponadto, można zauważyć, że wartości procentowe frakcji znajdujących się w różnych fazach cyklu wyróżniają się większą stałością w czasie w porównaniu do grup kontrolnych.



Rys. 42. Procent populacji komórek T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy cyklu komórkowego.



Rys. 43. Wykresy reprezentatywne cyklu komórkowego dla linii komórkowej T98G traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.

W przypadku danych uzyskanych dla linii T98G nie obserwujemy znaczących różnic między badanymi koniugatami. Dla wszystkich związków oraz grup kontrolnych zdecydowana większość komórek znajduje się w fazie G0/G1. Na koniec eksperymentu tj. po 72 h procent komórek w fazie G0/G1 znajduje się w przedziale (90,45 - 92,30)% dla wszystkich badanych nanocząstek oraz grup kontrolnych. Wobec powyższego, nie występują różnice między grupami kontrolnymi, a komórkami traktowanymi koniugatami zawierającymi rtęć w ciągu trwania eksperymentu tj. przez okres 72 h.

Obserwuje się jednak nieznaczny wzrost frakcji komórek w fazach S oraz G2/M pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi dla wszystkich badanych komórek. Różnice te znajdują się w przedziale od 0,4 do 3,2

p.p. dla fazy S oraz od 2,50 do 3,65 p.p. dla fazy G2/M i są niezależne od badanej grupy komórek traktowanych bądź nietraktowanych nanocząstkami.

W badaniach z zastosowaniem HgCl_2 , prowadzonych przez Kim i współ., na linii komórkowej H1299, wykazano blokadę cyklu komórkowego w fazach G0/G1 i S.³⁴⁹ Jak wspomniano wcześniej, różnice w strukturze badanych związków oraz linii komórkowej uniemożliwiają jednoznaczne porównanie.

Na podstawie przeprowadzonej analizy można wywnioskować, że badane nanocząstki złota zawierające na swojej powierzchni nieradioaktywną rtęć w niewielkim stopniu wpływają na fazy cyklu komórek linii MDA-MB-231, natomiast praktycznie nie oddziałują na cykl komórkowy komórek linii T98G.

ROZDZIAŁ V

Na podstawie zebranych danych dotyczących nieradioaktywnego koniugatu Au(Hg)NPs-PEG uwzględniających jego właściwości fizykochemiczne (w tym rozmiar, potencjał zeta, widma UV-Vis, FTIR oraz TGA) potwierdzono poprawność zastosowanej metodyki syntezy tego koniugatu. Dodatkowo, w wyniku wstępnych badań biologicznych określono stężenie rtęci w koniugacie, które nie wywołuje efektu cytotoksycznego na docelowych komórkach. Zbadano również mechanizm śmierci komórkowej, indukowanej przez ten koniugat w wyższych stężeniach.

Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było rozpoczęcie kolejnego etapu badań polegającego na przyłączeniu do koniugatu radioaktywnej rtęci – izotopów $^{197m/197}\text{Hg}$.

Ze względu na krótki zasięg i wysoki liniowy transfer energii (LET), elektrony Augera są obiecującymi kandydatami do terapii radionuklidowej. Po przedostaniu się do jądra komórkowego mogą one dostarczać wysokie dawki promieniowania do niewielkich objętości tkanki.³⁵¹ Jak omówiono w części teoretycznej niniejszej pracy, izotopy $^{197m/197}\text{Hg}$ wyróżniają się wyjątkowo efektywną emisją elektronów Augera.

W poniższym rozdziale przedstawiono wyniki obliczeń teoretycznych oraz eksperymentalnych dotyczących produkcji tych radionuklidów.

5. Produkcja radionuklidów rtęci

W celu pozyskania radionuklidów rtęci $^{197m/197}\text{Hg}$, przeanalizowano możliwe metody ich wydajnej produkcji. Pod uwagę wzięto trzy różne podejścia:

- produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(p, n)^{197m/197}\text{Hg}$,
- produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197m/197}\text{Hg}$ oraz
- produkcja reaktorowa w wyniku reakcji jądrowej $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197m/197}\text{Hg}$.

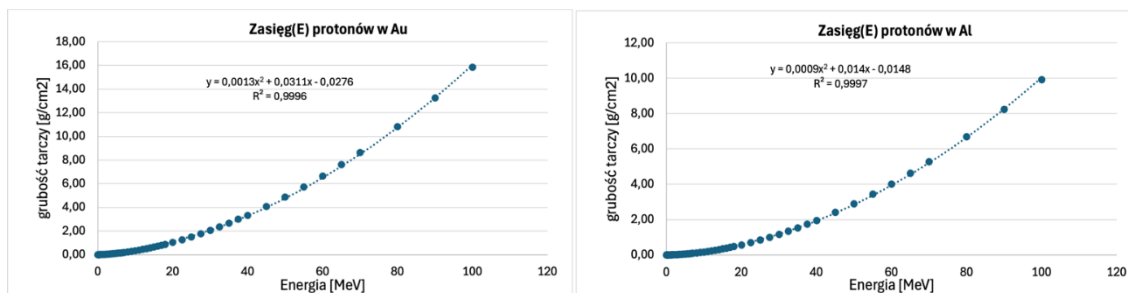
W niniejszym rozdziale omówione zostały wszystkie powyższe metody uwzględniając procesy rozpuszczania tarcz oraz otrzymywania prekursora $^{197m/197}\text{Hg}$ do dalszych badań. Na podstawie przeprowadzonej analizy wybrano jedną metodę produkcji, która została uznana za punkt wyjściowy do dalszych eksperymentów z zastosowaniem radiokoniugatu Au($^{197m/197}\text{Hg}$)NPs-PEG.

5.1. Produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(p, n)^{197m/197}\text{Hg}$

Do produkcji cyklotronowej rtęci w wyniku reakcji jądrowych $^{197}\text{Au}(p, n)^{197}\text{Hg}$ i $^{197}\text{Au}(p, n)^{197m}\text{Hg}$ zastosowano tarczę z metalicznego złota o czystości 99,99% zakupionego w Mennicy Polskiej. Tarcza została przygotowana do napromienienia poprzez sprasowanie jej na cienką folię o grubości 173 μm , średnicy 1 cm oraz grubości tarczy 334 mg/cm^2 .

Bombardowanie tarczy przeprowadzono w cyklotronie GE-PETtrace Środowiskowego Laboratorium Ciężkich Jonów Uniwersytetu Warszawskiego. Reakcję prowadzono przez 20 minut, wykorzystując protony o energii 10 MeV ($\sigma = 81$ mb dla ^{197}Hg , $\sigma = 32$ mb dla ^{197m}Hg) oraz przy strumieniu wiązki o natężeniu 1,67 μA . Energia protonów została tak dobrana, aby zminimalizować produkcję stabilnego izotopu ^{196}Hg , którego przekrój czynny na powstawanie rośnie wraz ze wzrostem energii protonów.³⁵²

Przed przeprowadzeniem eksperymentu z napromienianiem tarczy wyznaczone zostały teoretyczne wartości TTY dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$. W tym celu określono postaci funkcji opisujące przekroje czynne na reakcję (p, n) dla tych radionuklidów, a także za pomocą programu SRIM uzyskano postać funkcji opisującą zasięg deuteronów dla złotej tarczy oraz aluminiowego degradera. Funkcje reprezentujące zasięg protonów zostały przedstawione na poniższych wykresach (Rys. 44).



Rys. 44. Funkcje zależności grubości tarczy od energii strumienia protonów dla złota oraz aluminium.

Wyznaczone postaci funkcji zastosowano do obliczenia wydajności napromienienia próbki (TTY) w zależności od energii stosując wzór (Równanie 13).

$$TTY(E) = \frac{N_A \lambda}{M z e^-} \int_{E_{min}}^{E_{max}} \frac{\sigma(E)}{S(E)} dE$$

Równanie 13. Wydajność napromienienia próbki (TTY) w zależności od energii.

Gdzie:

TTY - wydajność napromienienia tarczy,

N_A – liczba Avogadro,

λ – stała rozpadu produkowanego radionuklidu,

M – masa atomowa tarczy,

z – liczba atomowa deuteronu,

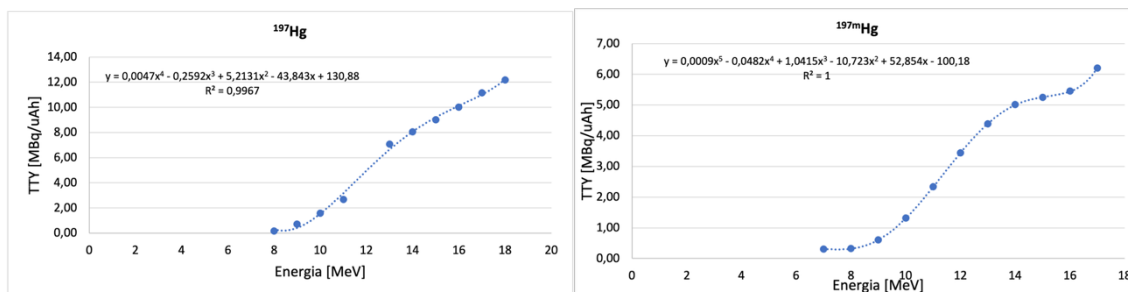
e^- - ładunek elektronu ($1,602\ 176\ 634 \cdot 10^{-19}\ \text{C}$),

E_{max} , E_{min} – maksymalna i minimalna energia deuteronów,

$S(E)$ – siła hamowania pocisku w materiale tarczowym w zależności od energii wyznaczona w programie SRIM,

$\sigma(E)$ – przekrój czynny reakcji w zależności od energii.

Wyznaczone dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$ TTY w zależności od energii deuteronów przedstawiają poniższe wykresy (Rys. 45) oraz umieszczone na nich dopasowania funkcji zależności TTY(E).



Rys. 45. Wyznaczone teoretyczne wykresy zależności wydajności napromienienia próbki (TTY) od energii dla produkcji radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$ w wyniku reakcji jądrowych $^{197}\text{Au}(p, n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Dzięki sporządzonym wykresom oraz dopasowaniu odpowiednich postaci funkcji wyznaczono teoretyczne wartości TTY dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$ dla stosowanej w eksperymencie energii protonów – 10 MeV. Wartości TTY przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. XII).

Tab. XII. Wyznaczone teoretycznie oraz eksperymentalnie wartości TTY dla energii protonów równej 10 MeV dla ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$.

Radionuklid	TTY _{teoretyczne} [MBq/μA*h]	TTY _{eksperymentalne} [MBq/μA*h]
^{197}Hg	1,49	5,63
$^{197\text{m}}\text{Hg}$	4,38	2,55

Obliczone powyżej wartości teoretyczne pozwoliłyby po 1 godzinie napromienienia, przy natężeniu wiązki wynoszącym 20 μA, na otrzymanie radionuklidów rtęci ^{197}Hg i $^{197\text{m}}\text{Hg}$ o aktywnościach promieniotwórczych odpowiednio 29,8 MBq oraz 87,6 MBq.

Dla przeprowadzonej produkcji obliczono również eksperymentalną wartość Thick Target Yield (TTY). Pomiary niezbędne do wyznaczenia TTY wykonano w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów UW. Próbki mierzono przez 13 dni w odległości 96 cm od detektora HPGe.

Przed rozpoczęciem eksperymentu przeprowadzono kalibrację energetyczną oraz wydajnościową detektora. Kalibrację energetyczną wykonano w standardowy sposób wykorzystując wzorcowe źródła promieniotwórcze. W celu kalibracji wydajnościowej, po pomiarze aktywności źródeł wzorcowych, dopasowano do wykresu zależności wydajności od energii funkcję w odpowiedniej postaci:

$$\varepsilon(E_\gamma) = 10^{a+b \cdot \log(E_\gamma) + c \cdot \log^2(E_\gamma) + \frac{d}{E_\gamma^3}}$$

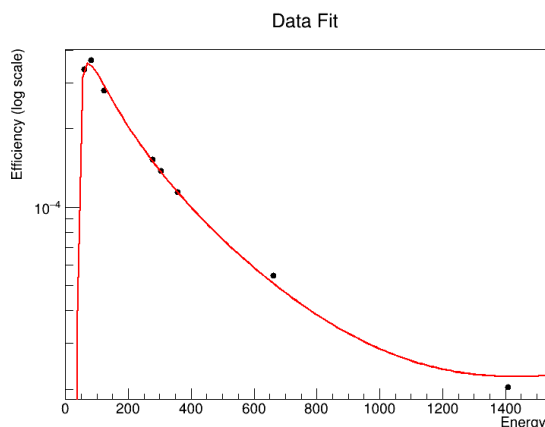
Gdzie:

$\varepsilon(E_\gamma)$ – wydajność detektora w zależności od energii,

E_γ – energia kwantu gamma,

a,b,c – parametry dopasowania funkcji.

Dopasowaną w programie CERN ROOT (wersja 6.32.08) funkcję przedstawiono poniżej (Rys. 46).



Rys. 46. Dopasowanie funkcji do wykresu zależności wydajności od energii dla detektora HPGe.

Parametry dopasowania dla geometrii 96 cm wyniosły: $a = (0,002548 \pm 0,0002524)$, $b = (-0,0006949 \pm 8,396 \cdot 10^{-5})$, $c = (4,780 \cdot 10^{-5} \pm 6,908 \cdot 10^{-6})$, $d = (-34,87 \pm 6,569)$.

Na podstawie uzyskanych danych o wydajności obliczono aktywność poszczególnych izotopów obecnych w próbce na podstawie wzoru (Równanie 14).

$$A = \frac{N[cps]}{\eta \cdot w\%}$$

Równanie 14. Aktywność promieniotwórcza radionuklidów na podstawie widma HPGe.

Gdzie:

A – Aktywność promieniotwórcza

N – liczba zliczeń

η – wydajność detektora dla danej energii

w – intensywność emisji danego kwantu gamma przez badany radionuklid

Następnie, w celu wyznaczenia TTY zastosowano poniższy wzór (Równanie 15).

$$TTY = \frac{A_{EOB}}{I(1 - e^{-\lambda t})}$$

Równanie 15. Eksperymentalna wydajność napromienienia tarczy.

Gdzie:

TTY – wydajność napromienienia tarczy

A_{EOB} – aktywność produktu pod koniec napromienienia tarczy

I – natężenie prądu wiązki padającej na tarczę

t – czas aktywacji tarczy

λ – stała rozpadu produktu

Wyznaczone eksperymentalnie wydajności produkcji radionuklidów rtęci ^{197m}Hg oraz ^{197}Hg wyniosły odpowiednio $2,55 \text{ MBq}(\mu\text{A}\cdot\text{h})^{-1}$ i $5,63 \text{ MBq}(\mu\text{A}\cdot\text{h})^{-1}$, co dla wiązki protonów o natężeniu $20 \mu\text{A}$ z czasem napromienienia 1 h umożliwiłoby uzyskanie aktywności promieniotwórczej wynoszącej dla ^{197m}Hg 51,0 MBq oraz 112,6 MBq dla ^{197}Hg . Porównanie otrzymanych danych z wartościami wyznaczonymi teoretycznie przedstawia Tab. XII. Obserwujemy, że dla radionuklidu ^{197}Hg wartość ta jest znacząco wyższa niż przewidywana. Różnica ta może wynikać z faktu, iż stan podstawowy ^{197}Hg poza

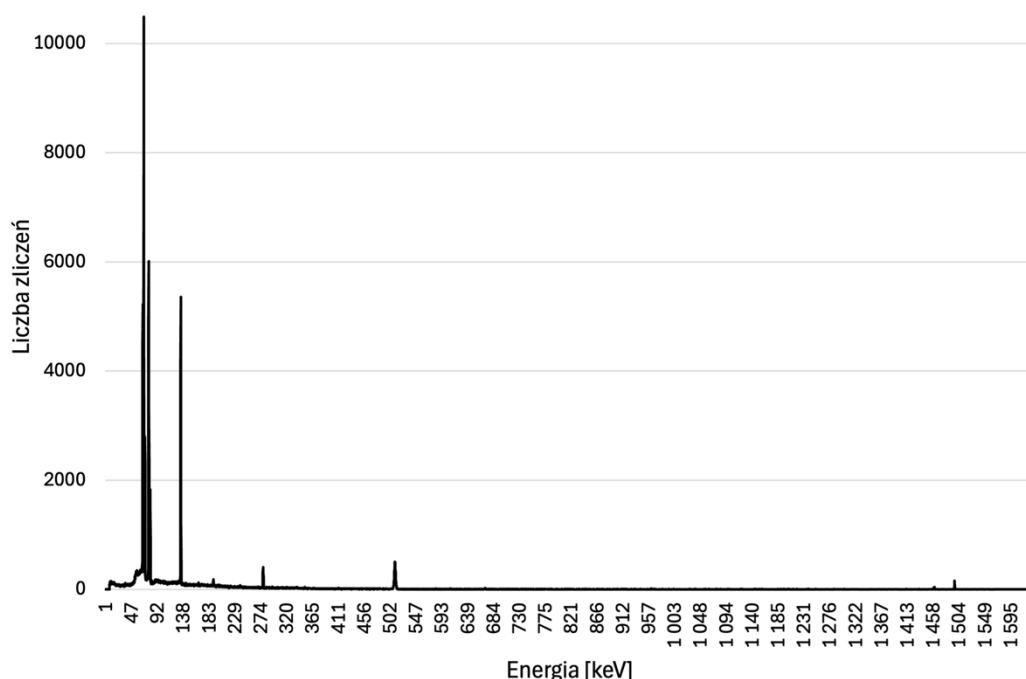
produkcją w reakcji $^{197}\text{Au}(p,n)^{197}\text{Hg}$ powstaje również w wyniku rozpadu ze stanu metastabilnego $^{197\text{m}}\text{Hg}$. Ponadto, zastosowana do analizy tego radionuklidu linia gamma jest niska i leży w zakresie charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego dla ołowiu, którym osłonięty był stosowany detektor. Powyższe argumenty wskazują więc na możliwość uzyskania wyższego odczytu liczby zliczeń dla radionuklidu ^{197}Hg nie wynikającego z wydajności jego produkcji cyklotronowej. Dodatkowo, należy również uwzględnić, że średnia energia zastosowanej wiązki protonów nie była mierzona eksperymentalnie, wobec czego przyjęte w obliczeniach parametry wiązki są jedynie przybliżeniem. Eksperymentalna wartość TTY uzyskana dla radionuklidu $^{197\text{m}}\text{Hg}$ wskazuje natomiast na wydajność produkcji wynoszącą około 60% względem obliczeń teoretycznych.

Porównując otrzymane eksperymentalnie wyniki z danymi opisanymi przez Lebeda i współ. obserwujemy, że wartość TTY dla radionuklidu $^{197\text{m}}\text{Hg}$ jest w zgodzie z tą opisaną w publikacji.²¹⁵

Ponadto, dzięki uzyskanym widmom spektrometrycznym tarczy mierzonym przez 13 dni oraz odpowiedniej kalibracji określono rodzaj i aktywność izotopów obecnych w tarczy. Ustalono, że bezpośrednio po zakończeniu napromienienia w próbce znajdowały się następujące izotopy wraz z ich aktywnościami (*Activity at End of Bombardment, AEOB*):

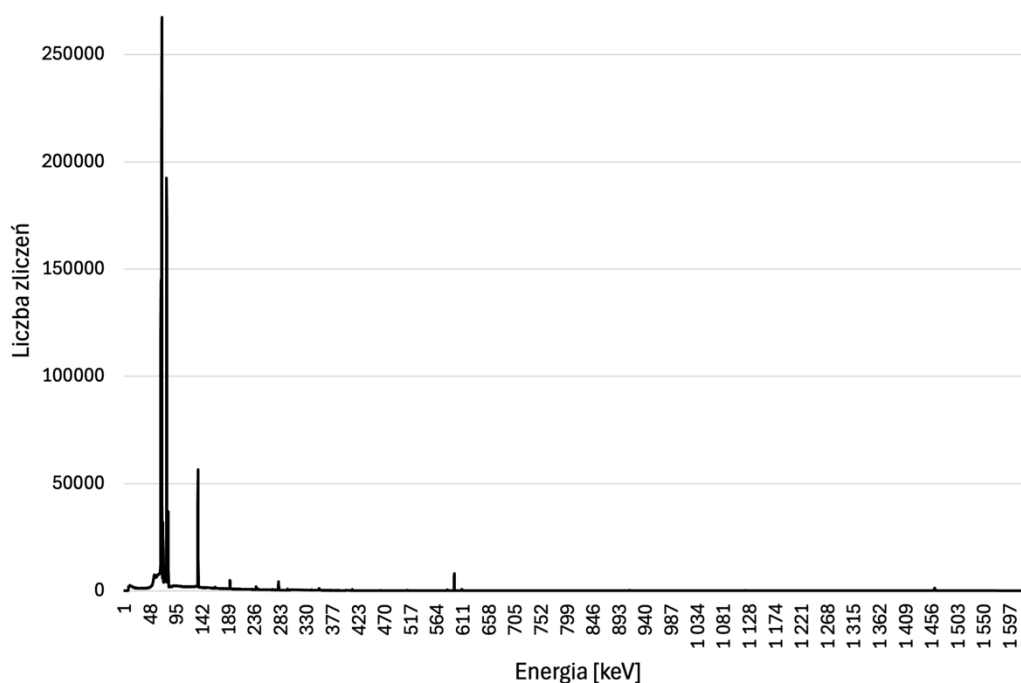
- ^{197}Hg (77,45 keV) o aktywności (A_{EOB}) 3,13 MBq,
- $^{197\text{m}}\text{Hg}$ (191,43 keV) o aktywności (A_{EOB}) 1,42 MBq,
- ^{203}Hg (238,68 keV) o aktywności (A_{EOB}) 32 kBq,
- ^{198}Au (412,01 keV) o aktywności (A_{EOB}) 144 kBq.

Widmo HPGe dla tarczy po 27 minutach od zakończenia napromienienia przedstawia Rys. 47.



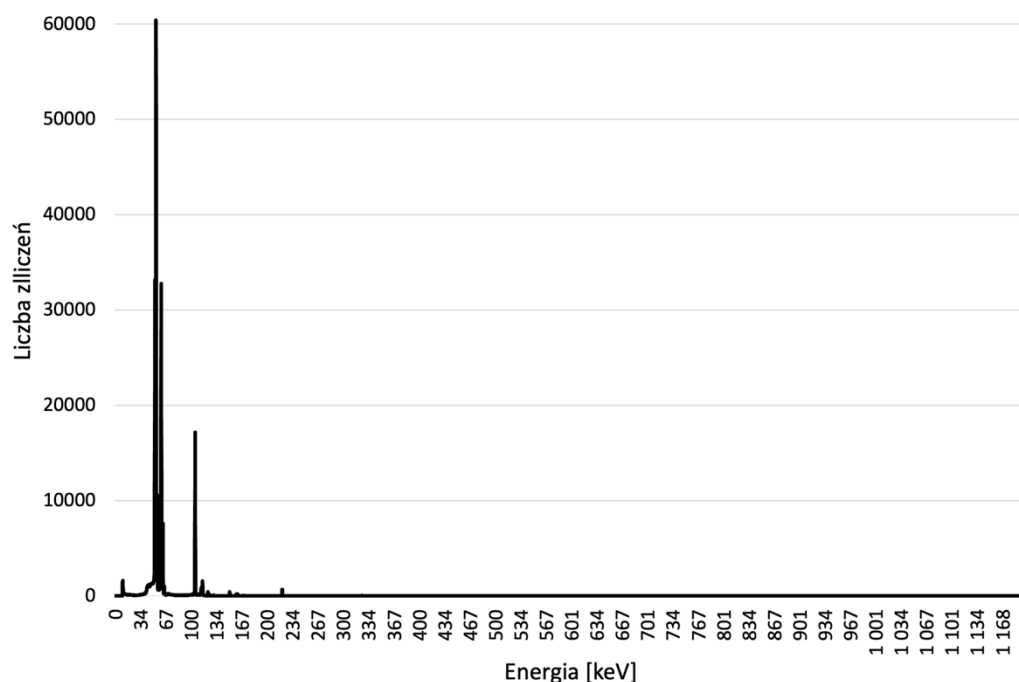
Rys. 47. Widmo HPGe tarczy po 27 minutach od zakończenia bombardowania strumieniem protonów.

Do końca trwania eksperymentu tj. przez 13 dni nie zidentyfikowano w próbce innych izotopów, a widmo HPGe zmierzone ostatniego dnia przedstawione zostało na poniższym Rys. 48.



Rys. 48. Widmo HPGe tarczy 13 dni po produkcji cyklotronowej w wyniku bombardowania strumieniem protonów.

Bezpośrednio po napromienieniu tarcze z kolejnych eksperymentów były transportowane do Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej, gdzie przeprowadzano ich obróbkę. W pierwszym etapie tarczę rozpuszczano w trzech porcjach po 500 μl wody królewskiej (mieszaniny stężonego HNO_3 oraz HCl w stosunku objętościowym 1:3) i podgrzewano do 55°C na termobloku. Następnie do próbki dodano 1,5 ml 6 M HCl i przeprowadzono pomiar rozpuszczonej tarczy przy użyciu detektora HPGe (Rys. 49). Roztwór do pomiaru przygotowano poprzez 50-krotne rozcieńczenie w wodzie.



Rys. 49. Widmo HPGe dla tarczy po produkcji cyklotronowej w wyniku bombardowania strumieniem protonów oraz rozpuszczeniu w wodzie królewskiej.

Na Rys. 49 zidentyfikowano linie gamma pochodzące od następujących izotopów:

- ^{197}Hg (68,81 keV, 77,34 keV, 80,43 keV, 191,36 keV) – o aktywności 3,64 MBq,
- $^{197\text{m}}\text{Hg}$ (133,54 keV) - o aktywności 1,31 MBq,
- ^{203}Hg (279,19 keV) - o aktywności 64,91 kBq,
- ^{198}Au (412,14 keV) - o aktywności 0,26 kBq.

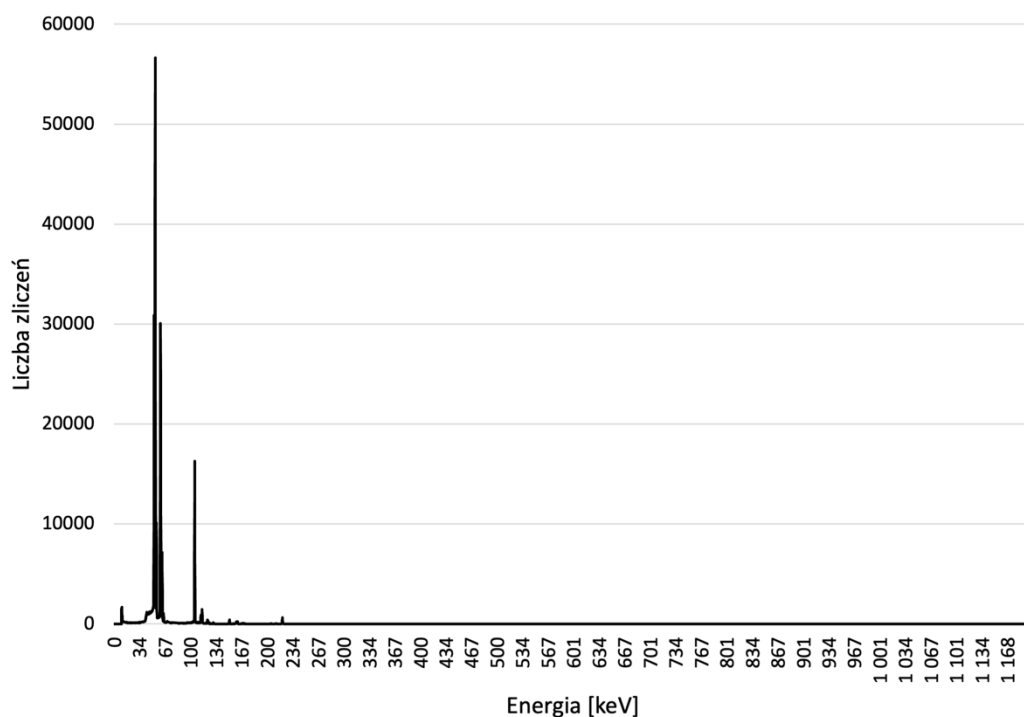
Po skontrolowaniu aktywności izotopów obecnych w próbce przystąpiono do wydzielania radionuklidów rtęci ze złotej tarczy. W tym celu zastosowano metodę opisaną przez Wang³⁵³ oraz Chen i współ.²³²

Złoże LN-resin (rozmiar cząstek 50-100 μm , 5 g) kondycjonowano przez 12 godzin w 10 ml 6 M HCl, a następnie ułożono w dwóch połączonych plastikowych kartridżach do chromatografii. Kolumny przepłukano 5 ml 6 M HCl i pozostawiono pod wyciągiem do momentu rozpoczęcia procesu separacji. Rozpuszczony materiał tarczowy dodano na uprzednio przygotowaną kolumnę przy użyciu strzykawki, a następnie eluowano go roztworem 6 M HCl zbierając frakcje o objętości 0,5 - 1 ml. Aktywność promieniotwórczą każdej z frakcji zmierzono za pomocą kalibratora dawek Atomlab 500, a uzyskane wyniki przedstawiono w formie tabeli (Tab. XIII).

Tab. XIII. Aktywność promieniotwórcza poszczególnych frakcji w procesie separacji $^{197m/197}\text{Hg}$ z tarczy po przejściu przez kolumnę.

Numer frakcji	Aktywność promieniotwórcza [MBq]
1-4	0
5	0,11
6	0,18
7	0,27
8	0,38
9	0,50
10	0,70
11	0,49
12	0,54
13	0,49
14	0,40
15	0,22
16	0,12
17-25	0

Frakcje 7-15 połączono uzyskując roztwór o objętości około 4 ml. Następnie, ponownie zmierzono ich aktywność promieniotwórczą za pomocą kalibratora dawek Atomlab 500, uzyskując wartość 4,1 MBq. Na podstawie stosunku tej wartości do całkowitej aktywności wszystkich frakcji obliczono wydajność procesu wydzielenia radionuklidów rtęci, która wyniosła 93%. Widmo próbki zawierającej $^{197m/197}\text{Hg}$, uzyskane po jej separacji ze złotej tarczy przedstawiono na Rys. 50.



Rys. 50. Widmo HPGe dla eluatu rtęci po wydzieleniu z tarczy.

Na widmie zaobserwowano jedynie linie gamma pochodzące z radionuklidów rtęci ^{197}Hg , $^{197\text{m}}\text{Hg}$ oraz ^{203}Hg . Aktywność promieniotwórcza próbki końcowej wynosiła 3,35 MBq dla ^{197}Hg , 1,33 MBq dla $^{197\text{m}}\text{Hg}$ oraz 60,92 kBq dla ^{203}Hg .

Ostatnim etapem procesu było odparowanie roztworu HCl i rozpuszczenie rtęci w 2% roztworze HNO_3 . Rtęć odparowywano na termobloku, jednakże zarejestrowany bardzo duży ubytek aktywności promieniotwórczej (75%), co uniemożliwiło jej dalszą obróbkę termiczną.

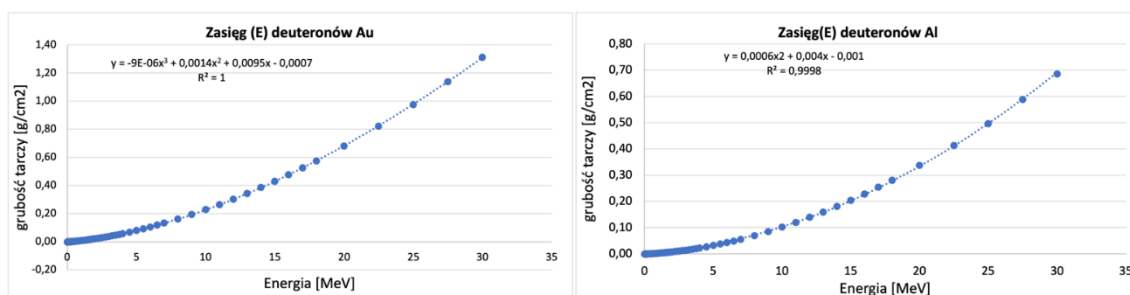
Ze względu na skomplikowany proces rozpuszczania próbki oraz trudności związane z jej odparowywaniem, podjęto decyzję o rezygnacji z metody produkcji radionuklidów rtęci poprzez reakcję jądrową $^{197}\text{Au}(p, n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

5.2. Produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$

W ramach otrzymanego stypendium Fulbrighta Junior Research Award zrealizowałam na Duke University projekt dotyczący produkcji radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ poprzez reakcje jądrowe $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197}\text{Hg}$ oraz $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197\text{m}}\text{Hg}$.

Przed przeprowadzeniem eksperymentu z napromienieniem tarczy wyznaczone zostały teoretyczne wartości TTY dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$ jak to opisano w poprzednim podrozdziale „5.1. Produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(p, n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ ”.

W tym celu, określono funkcje opisujące przekroje czynne reakcji (d, 2n) dla tych radionuklidów. Dodatkowo przy użyciu programu SRIM wyznaczono funkcje opisujące zasięg deuteronów w tarczy wykonanej ze złota oraz w aluminiowym degraderze. Funkcje przedstawiające zasięg deuteronów zostały zilustrowane na poniższych wykresach (Rys. 51).



Rys. 51. Funkcje zależności grubości tarczy od energii strumienia deuteronów dla złota oraz aluminium.

Wyznaczone funkcje zastosowano do obliczenia wydajności napromienienia próbki (TTY) w zależności od energii. Obliczenia przeprowadzono zgodnie ze wzorem przedstawionym poniżej (Równanie 16).

$$TTY(E) = \frac{N_A \lambda}{Mze^-} \int_{E_{min}}^{E_{max}} \frac{\sigma(E)}{S(E)} dE$$

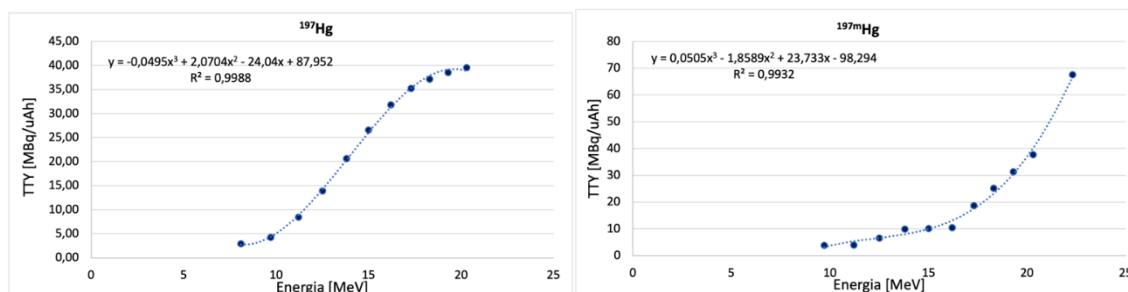
Równanie 16. Wydajność napromienienia próbki (TTY) w zależności od energii.

Gdzie:

TTY - wydajność napromienienia tarczy,

NA – liczba Avogadro,
 λ – stała rozpadu produkowanego radionuklidu,
 M – masa atomowa tarczy,
 z – liczba atomowa deuteronu,
 e^- – ładunek elektronu ($1,602\,176\,634 \times 10^{-19}$ C),
 $E_{\max}$, $E_{\min}$ – maksymalna i minimalna energia deuteronów,
 $S(E)$ – siła hamowania pocisku w materiale tarczowym, w zależności od energii, wyznaczona w programie SRIM,
 $\sigma(E)$ – przekrój czynny reakcji w zależności od energii.

Wyznaczone dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$ TTY w zależności od energii deuteronów przedstawiają poniższe wykresy (Rys. 52) oraz umieszczone na nich dopasowania funkcji zależności TTY(E).



Rys. 52. Wyznaczone teoretyczne wykresy zależności wydajności napromienienia próbki (TTY) od energii dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$.

Dzięki sporządzonym wykresom oraz dopasowaniu odpowiednich postaci funkcji wyznaczono teoretyczne wartości TTY dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$ dla stosowanej w eksperymencie energii deuteronów – 15 MeV. Teoretyczne wartości TTY przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. XIV).

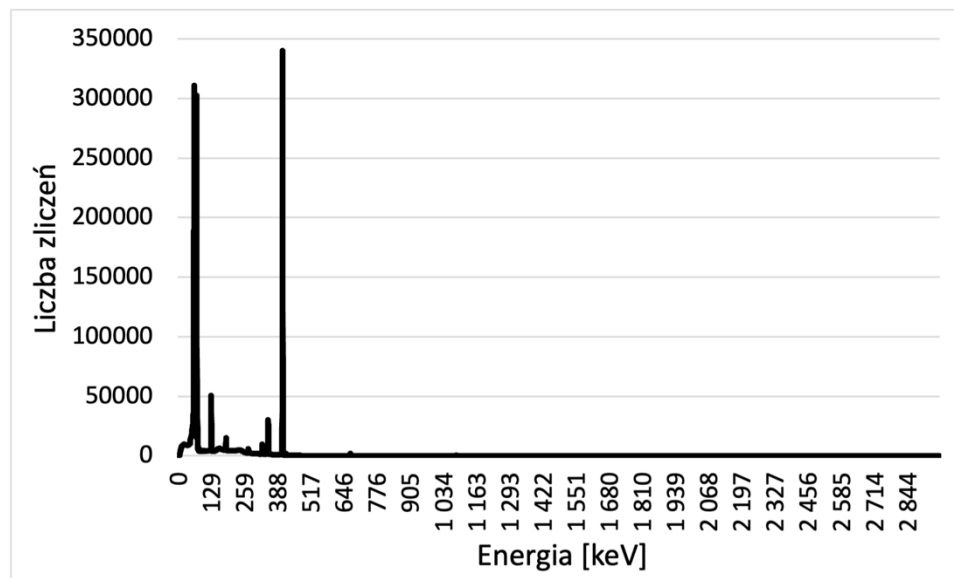
Tab. XIV. Wyznaczone teoretycznie wartości TTY dla energii deuteronów równej 15 MeV dla ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$.

Radionuklid	TTY _{teoretyczne} [MBq/μA*h]
^{197}Hg	20,11
$^{197\text{m}}\text{Hg}$	5,92

Obliczone powyżej wartości teoretyczne pozwoliłyby, przy stosowanym natężeniu wiązki wynoszącym 1,63 μA, na otrzymanie radionuklidów rtęci ^{197}Hg i $^{197\text{m}}\text{Hg}$ o aktywnościach promieniotwórczych odpowiednio 32,78 MBq oraz 9,65 MBq.

Do eksperymentalnej produkcji cyklotronowej metodą napromienienia strumieniem deuteronów wykorzystano folię z czystego 99,99% metalicznego złota zakupioną od Sigma Aldrich. Napromienienie przeprowadzono z użyciem cyklotronu CS-30 dostępnego na Duke University. Tarcza w postaci cienkiej folii o grubości 100 μm i masie 311 mg została umocowana na aluminiowej podkładce i napromieniona strumieniem deuteronów o energii 15 MeV i natężeniu 1,63 μA przez 1 godzinę. Moc dawki na powierzchni tarczy po napromienieniu wyniosła 45,5 mSv/h.

Po napromienieniu tarczę rozpuszczono w trzech porcjach wody królewskiej po 500 μ l w temperaturze 55°C i dodano 1,5 ml 6 M HCl. Następnie, zarejestrowano widma HPGe roztworu. Próbkę pomiarowa była 100-krotnie rozcieńczona. Wykonano dwanaście 6-godzinnych pomiarów. Pierwsze zarejestrowane widmo z serii przedstawiono poniżej (Rys. 53).



Rys. 53. Widmo HPGe rozpuszczonej tarczy po produkcji w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Na podstawie serii pomiarów widm HPGe stwierdzono, iż w rozpuszczonej tarczy obecne były radionuklidy ^{197}Hg , $^{197\text{m}}\text{Hg}$ oraz ^{196}Au i ^{198}Au .

Aktywności promieniotwórcze wyznaczone ze zmierzonych widm i przeliczone na aktywność produktu na koniec napromienienia tarczy (A_{EOB}) przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. XV).

Tab. XV. Aktywność promieniotwórcza produktów na koniec napromienienia tarczy (A_{EOB}) dla radionuklidów zidentyfikowanych w produkcji metodą $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Radionuklid	A_{EOB} [MBq]
^{197}Hg	$27,80 \pm 0,90$
$^{197\text{m}}\text{Hg}$	$6,83 \pm 0,21$
^{196}Au	$0,53 \pm 0,02$
^{198}Au	$10,43 \pm 0,31$
$^{198\text{m}}\text{Au}$	$0,01340 \pm 0,00056$

Porównując dane o wyprodukowanych aktywnościach promieniotwórczych radionuklidów rtęci, zawarte w tabeli (Tab. XV) z wartościami obliczonymi teoretycznie na podstawie TTY tj. 32,78 MBq (^{197}Hg) oraz 9,65 MBq ($^{197\text{m}}\text{Hg}$) zauważamy, że uzyskane wyniki dobrze odzwierciedlają obliczenia teoretyczne, zwłaszcza dla ^{197}Hg . Wartość eksperymentalna dla radionuklidu ^{197}Hg odbiega od wartości teoretycznej jedynie o 15,2%, natomiast dla radionuklidu $^{197\text{m}}\text{Hg}$ różnica ta wynosi 29,2%.

W kolejnym kroku przeprowadzono wydzielanie radionuklidów rtęci z tarczy według metody opisanej w poprzednim podrozdziale „5.1. Produkcja cyklotronowa w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(\text{p}, \text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ ”.

Aktywności poszczególnych frakcji zmierzone na kalibratorze dawek Capintec CRC-7 zostały przedstawione w tabeli (Tab. XVI).

Tab. XVI. Aktywność promieniotwórcza poszczególnych frakcji w procesie separacji $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ z tarczy po przejściu przez kolumnę.

Numer frakcji	Aktywność promieniotwórcza [MBq]
1-9	0
10	0,11
11	0,19
12	0,77
13	0,98
14	14,54
15	9,10
16	2,29
17	0,30
18	0,15
19-25	0

Roztwory znajdujące się we frakcjach 14 – 16 połączono i ponownie zmierzono ich aktywność, która wyniosła 25,9 MBq w objętości 4 ml. Wydajność procesu separacji wyznaczona ze stosunku aktywności połączonych frakcji do aktywności całkowitej wszystkich frakcji wyniosła 91,1%.

Roztwór połączonych frakcji przeniesiono do kolby okrągłodennej o objętości 50 ml i odparowano do sucha na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze 33°C. Następnie, w celu rozpuszczenia pozostałych radionuklidów w kolbie, dodano do niej 150 μl 2% roztworu HNO_3 i zmierzono odzyskaną aktywność promieniotwórczą, która wyniosła 17,0 MBq. Pozostała aktywność (8,5 MBq) została zatrzymana w zimnej pułapce na związki lotne, co stanowi stratę wynoszącą ponad 30%. Jest to znacząca poprawa w porównaniu do poprzedniej metody odparowywania na termobloku, gdzie starta ta wynosiła 75%. Niemniej jednak, ze względu na utrzymujący się wysoki poziom straty radionuklidów podczas odparowywania, oraz na brak możliwości dalszej optymalizacji tej metody,³⁵³ a także skomplikowany proces oczyszczania, podjęto decyzję o ewaluacji alternatywnej metody produkcji radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, mianowicie, produkcji reaktorowej, poprzez reakcję jądrową $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

5.3. Produkcja reaktorowa w wyniku reakcji jądrowej $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$

Do produkcji reaktorowej wykorzystano tarczę rtęciową wzbogaconą izotopowo do $55,36 \pm 0,15\%$ w ^{196}Hg . Dokładny skład izotopowy tarczy przedstawiono w Tab. XVII.

Tab. XVII. Skład izotopowy tarczy rtęciowej wzbogaconej w ^{196}Hg (ISO FLEX, USA).

Izotop	Hg-196	Hg-198	Hg-199	Hg-200	Hg-201	Hg-202	Hg-204
Zawartość[%]	55,36± 0,15	0,60± 0,05	41,56± 0,15	0,32± 0,03	1,13± 0,07	0,42±0,03	0,6± 0,05

Radionuklid ^{196}Hg charakteryzuje się bardzo wysokim przekrojem czynnym na reakcję jądrową $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 3080 b oraz przekrojem czynnym na reakcję $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197\text{m}}\text{Hg}$ wynoszącym 105 b. Jest to wartość znacznie przekraczająca inne przekroje czynne dla izotopów obecnie stosowanych w medycynie nuklearnej,^{354,355} co wskazuje na bardzo duży potencjał tego radionuklidu do rutynowych zastosowań terapeutycznych.

Odpowiednią ilość uprzednio sporządzonego roztworu azotanu(V) rtęci wzbogaconego w ^{196}Hg przeniesiono do fiolki kwarcowej i odparowano do sucha. Stosowana objętość była zależna od ilości prowadzonych eksperymentów (50 µg, 8,33 µl lub 100 µg 16,67 µl). Fiolkę kwarcową zamknięto termicznie szkłem i napromieniono w reaktorze jądrowym Maria (Świerk, NCBJ, Polska) w strumieniu neutronów 10^{14} n/cm²·s przez 7 godzin. Parametry napromienienia oraz otrzymane aktywności radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ dla wybranych eksperymentów przedstawiono w tabeli (Tab. XVIII).

Tab. XVIII. Parametry napromieniania oraz otrzymane aktywności promieniotwórcze radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ mierzone na kalibratorze dawek Atomlab.

Masa tarczy	Czas [h]	Gęstość strumienia neutronów [n/cm ² ·s]	Czas schładzania próbki [h]	Aktywność promieniotwórcza $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ [GBq]
100	7	10^{14}	12	5,11
100	7	10^{14}	12	5,22
50	7	10^{14}	12	2,61
50	7	10^{14}	12	2,77
50	7	10^{14}	12	2,55
100	7	10^{14}	12	5,62
100	7	10^{14}	12	5,75
100	7	10^{14}	12	5,49
50	7	10^{14}	12	2,82
100	7	10^{14}	12	5,58

Po aktywacji próbkę rozpuszczono w odpowiednich ilościach 50 µl lub 100 µl 2% roztworu HNO₃ dla masy tarczy 50 µg oraz 100 µg uzyskując tym samym roztwór o stężeniu około 1 µg/µl. Otrzymany roztwór, bez dalszych modyfikacji był następnie stosowany do syntezy radiokoniugatu z nanocząstkami.

Dodatkowo, przeprowadzono analizę rozpuszczonej tarczy metodą spektrometrii gamma z zastosowaniem detektora HPGe. Parametry napromieniania mierzonej tarczy przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. XIX).

Tab. XIX. Parametry napromieniania tarczy rtęciowej do produkcji metodą $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wykorzystanej do pomiarów HPGe.

Parametr	Wartość
Masa tarczy	100 μg
Wzbogacenie w ^{196}Hg	55,36%
Czas napromieniowania	7 h
Czas schładzania	1 h
Strumień neutronów	10^{14} n/cm ² ·s
Przewidywana aktywność promieniotwórcza ^{197}Hg	3,79 GBq
Przewidywana aktywność promieniotwórcza $^{197\text{m}}\text{Hg}$	321 MBq

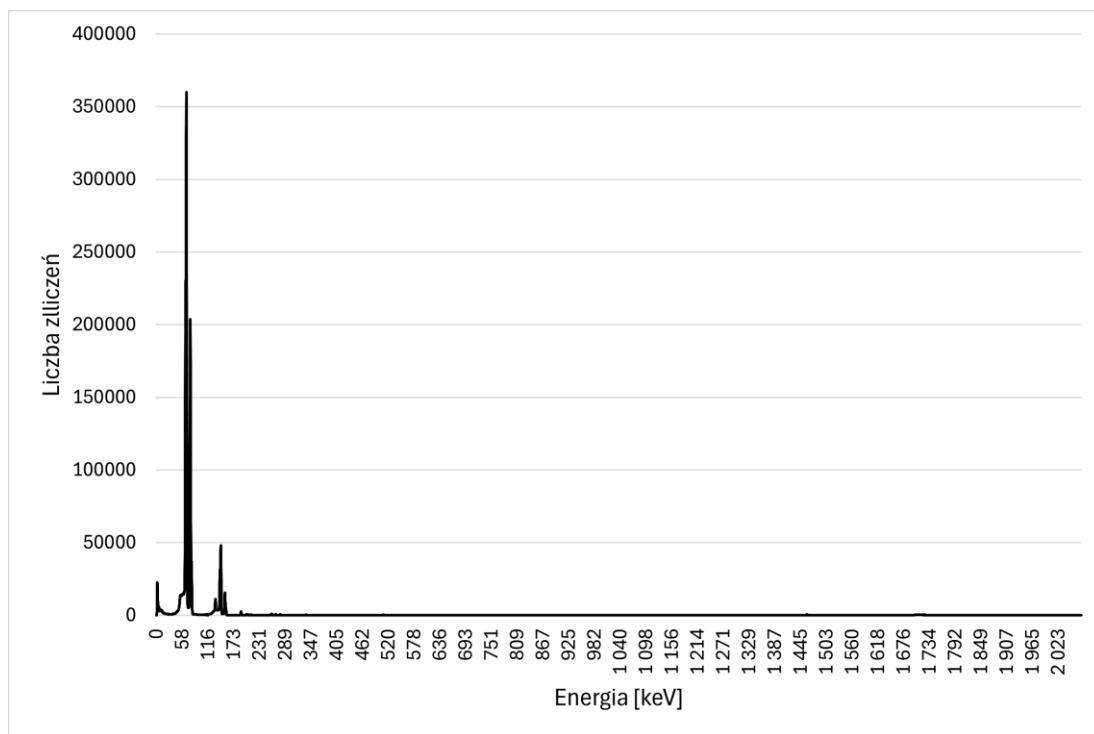
Wykonano osiem pomiarów rozcieńczonego materiału tarczowego, których parametry przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. XX).

Na podstawie składu izotopowego tarczy oraz wielkości przekrojów czynnych na reakcję wychwytu neutronów termicznych dla poszczególnych izotopów rtęci, założono iż w tarczy po napromienieniu znajdowały się będą głównie izotopy ^{196}Hg , $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ oraz ^{200}Hg . Stabilny izotop ^{200}Hg pochodzi z reakcji wychwytu neutronów przez wchodzący w skład tarczy w ponad 41% izotop ^{199}Hg . Przekrój czynny na reakcję $^{199}\text{Hg}(n, \gamma)^{200}\text{Hg}$ wynosi 2150 b.

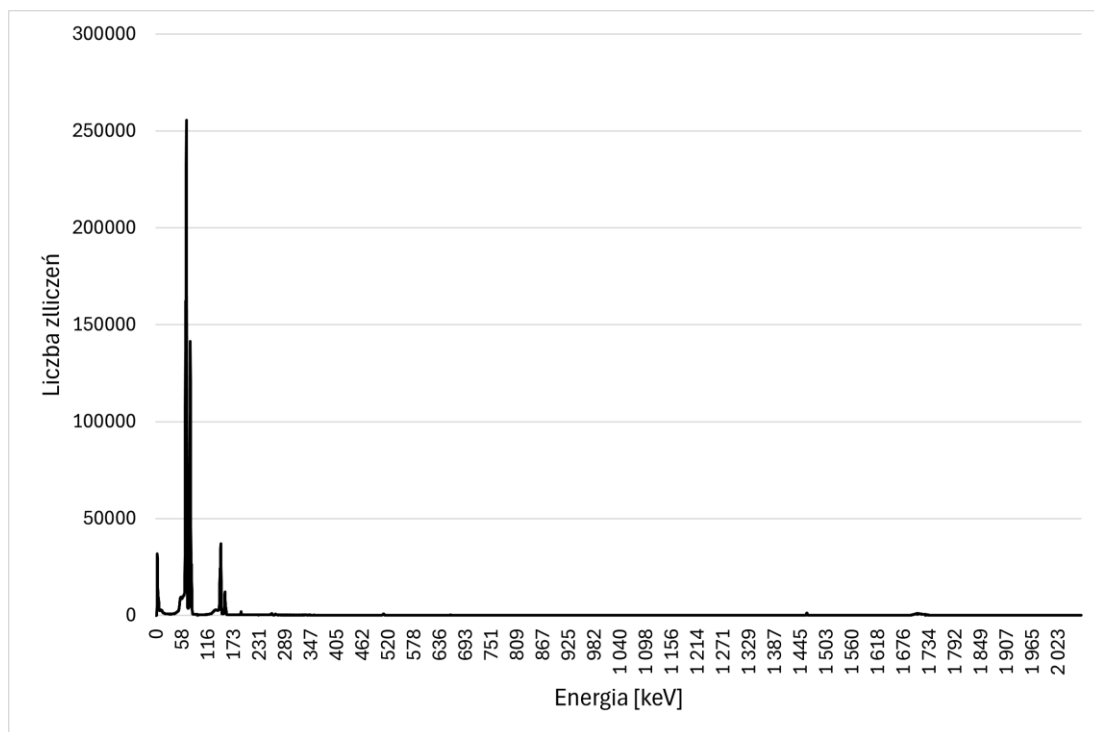
Tab. XX. Czas trwania oraz czas od EOB dla wykonanych pomiarów gamma spektrometrycznych.

Pomiar	Czas trwania	Czas od zakończenia napromieniowania
1	200 sekund	7 h 17 min.
2	200 sekund	7 h 21 min.
3	24 h	7 h 25 min.
4	24 h	56 h 36 min
5	24 h	80 h
6	24 h	150 h
7	24 h	174 h
8	48 h	246 h

Sporządzono także wykresy obrazujące wybrane widma: Rys. 54 - po 7 h od zakończenia napromieniania oraz Rys. 55 - po 246 h od zakończenia napromieniania (EOB) ($\sim 10T_{1/2}$ radionuklidu $^{197\text{m}}\text{Hg}$).



Rys. 54. Widmo HPGe rozpuszczonej tarczy po 7 h od zakończenia napromienienia strumieniem neutronów.



Rys. 55. Widmo HPGe rozpuszczonej tarczy po 246 h od zakończenia napromienienia strumieniem neutronów.

Zgodnie z przewidywaniami, na powyższych wykresach udało się zaobserwować kwanty gamma pochodzące głównie od radionuklidów ^{197}Hg , $^{197\text{m}}\text{Hg}$.

Wyznaczone aktywności promieniotwórcze izotopów przedstawione zostały w tabeli poniżej (Tab. XXI).

Tab. XXI. Radionuklidy zidentyfikowane w widmie HPGe po produkcji metodą $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197\text{m}}\text{Hg}$ oraz ich wyznaczone aktywności promieniotwórcze.

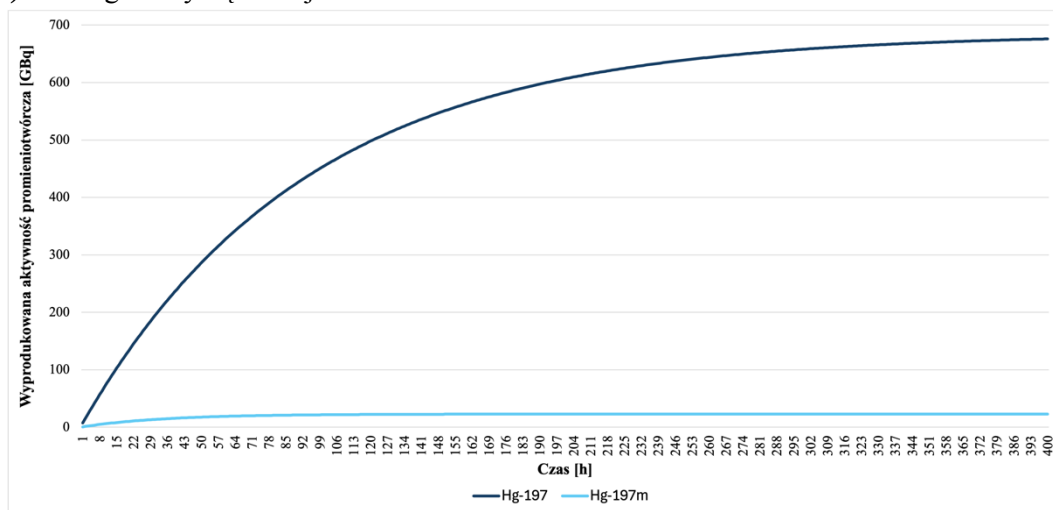
Radionuklid	Aktywność promieniotwórcza [MBq]
^{197}Hg	$3568,0 \pm 535,2$
$^{197\text{m}}\text{Hg}$	$219,3 \pm 32,90$
^{198}Au	$19,96 \pm 2,99$

Podsumowując wyniki pomiarów spektrometrycznych, stwierdzono, że tarcza po napromienieniu w reaktorze jądrowym zawiera nieznaczną ilość zanieczyszczeń innymi izotopami promieniotwórczymi tj. ^{198}Au . Otrzymana dla ^{197}Hg aktywność promieniotwórcza jest niższa od przewidywanej teoretycznie o 6,1%, natomiast w przypadku $^{197\text{m}}\text{Hg}$ różnica ta wynosi 31,7%.

Produkcja radionuklidów w reakcji (n, γ) nie jest metodą bežnośnikową, jednakże mimo tego aktywność właściwa otrzymanego produktu wyniosła imponujące $35,680 \pm 5,352 \text{ GBq/mg}$.

Wiadome jest, iż ze względu na dążenie do uzyskania jak największej czystości radiochemicznej oraz wysokiej aktywności właściwej w zastosowaniach terapeutycznych, naukowcy dążą do opracowywania metod pozwalających uzyskać radionuklidy bežnośnikowe.^{356,357} Jednakże, radionuklidy $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wyróżniają się na tle innych, ponieważ posiadają duży przekrój czynny na reakcję jądrową $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197}\text{Hg}$. Dzięki temu, stosując niewielką masę tarczy można tą metodą uzyskać bardzo wysokie aktywności promieniotwórcze dla radionuklidu ^{197}Hg .

Biorąc pod uwagę dostępne ośrodki do przeprowadzenia napromienienia tarcz wysokim strumieniem neutronów, takie jak Institut Laue-Langevin (ILL) można przyjąć, że najwyższy możliwy strumień neutronów do zastosowania w rutynowej produkcji wynosi $10^{15} \text{ n/cm}^2\text{s}$.³⁵⁸ Dla parametrów napromieniania próbek, jakimi charakteryzuje się reaktor wysokostrumieniowy ILL możliwe jest wyznaczenie krzywej wzrostu aktywności promieniotwórczej w czasie (Rys. 56) dla wysoko wzbogaconej (73,16%) w ^{196}Hg tarczy rtęciowej.



Rys. 56. Krzywe reprezentujące zmianę aktywności promieniotwórczej radionuklidów $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ w czasie produkcji metodą $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197\text{m}}\text{Hg}$ w reaktorze wysokostrumieniowym.

Dla opisanych warunków otrzymujemy, dla wzbogaconej tarczy rtęciowej o masie 100 µg, po naświetlaniu przez 8 dni, aktywność promieniotwórcza radionuklidu ^{197}Hg wyniesie 599,05 GBq, a dla radionuklidu $^{197\text{m}}\text{Hg}$ 22,84 GBq. Na podstawie masy tarczy oraz danych aktywności można obliczyć aktywność właściwą, która wynosi 5,99 TBq/mg dla ^{197}Hg . Wartość ta jest porównywalna z aktywnościami właściwymi wyznaczanymi dla radionuklidów beźnośnikowych,^{356,357} Wynik ten jest imponujący, zwłaszcza dla izotopu produkowanego metodą reaktorową poprzez reakcję jądrową (n, γ).

Ponadto, istotną zaletą tej metody produkcji jest łatwość rozpuszczenia tarczy oraz możliwość jej szybkiego zastosowywania do syntezy radiokoniugatu, co znacząco usprawnia cały proces i pozwala na uzyskanie wyższej aktywności właściwej docelowego produktu (minimalizacja strat aktywności przy obróbce tarczy).

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej argumenty, do dalszych etapów syntezy radiokoniugatu wykorzystywana była rtęć otrzymywana wyłącznie metodą reaktorową w następującej reakcji jądrowej $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

ROZDZIAŁ VI

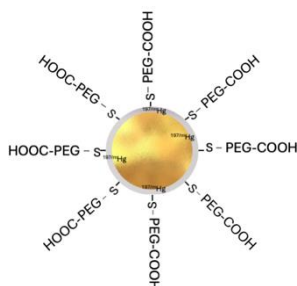
Opracowana i opisana w poprzednim rozdziale bardzo efektywna metoda produkcji radionuklidów $^{197m/197}\text{Hg}$ poprzez reakcję $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197m/197}\text{Hg}$ oraz emisja średnio 43 elektronów Auger na rozpad czyni z nich potencjalnie przełomową parę izomerów do zastosowań w terapii przeciwnowotworowej. Dodatkowo, emisja przez ^{197m}Hg kwantu gamma o energii 133,79 keV umożliwia obrazowanie diagnostyczne metodą SPECT.

Kluczowym problemem w zastosowaniach radionuklidów rtęci w terapii jest brak ligandów zdolnych do stabilnej koordynacji $^{197m/197}\text{Hg}$. Dotychczas opisano kilka ligandów, umożliwiających skuteczne chelatowanie rtęci, w tym związki bogate w siarkę takie jak NS4, NS4-CA, NS4-CA³⁵⁹ oraz komercyjne chelatory p-SCN-Bn-DOTAM.²³⁶ Problem ten można ominąć wykorzystując wysokie powinowactwo rtęci do złota, a w przypadku niniejszej pracy, nanocząstek złota, które z wysoką wydajnością wiążą rtęć z jej roztworów.

W rozdziale VI opisano wyniki badań dotyczących właściwości oraz potencjału przeciwnowotworowego radiokoniugatu nanocząstek złota z radionuklidami rtęci - $\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ do zastosowania w nanobrachyterapii potrójnie ujemnego raka piersi oraz glejaka wielopostaciowego.

6. Radiokoniugat $\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$

Po opracowaniu metod produkcji radionuklidów rtęci rozpoczęto syntezę oraz badania nad związkiem $\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ (Rys. 57).



Rys. 57. Radiokoniugat $\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$.

Radiokoniugat zawierający radionuklidy rtęci $^{197m/197}\text{Hg}$ stanowi radioaktywny odpowiednik $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$, którego właściwości fizykochemiczne oraz działanie na komórki linii MDA-MB-221 i T98G szczegółowo opisano w rozdziale czwartym niniejszej pracy (4. Koniugat $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$).

Otrzymany radiokoniugat charakteryzował się wysoką stabilnością oraz stężeniem promieniotwórczym ^{197}Hg wynoszącym 546 MBq/ml.

6.1. Synteza radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH

W celu otrzymania radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH stosowano procedurę analogiczną jak w przypadku jego nieradioaktywnego odpowiednika.

Nanocząstki złota zsyntezowano metodą Turkevicha według opisu zawartego w rozdziale „4.1. Synteza nanocząstek złota 5 nm” i przed dalszą częścią syntezy odfiltrowano na filtrach strzykawkowych Milipore o rozmiarze porów 0,22 µm.

6.2. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota radionuklidami rtęci ^{197m/197}Hg

Modyfikację powierzchni nanocząstek złota radionuklidami rtęci przeprowadzono w następujący sposób: do 1 ml AuNPs (6,84·10¹³ NPs; 11,4 nM) dodano różne objętości (10, 25, 50 oraz 100 µl) roztworu rozpuszczonego materiału tarczowego – azotanu(V) rtęci(II) ^{197m/197}Hg(NO₃)₂ (10, 25, 50, 100 µg; 1 mg/ml). Następnie mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle kołowym przez 1, 2 oraz 3 godziny. Reakcję prowadzono według schematu przedstawionego na Rys. 14.

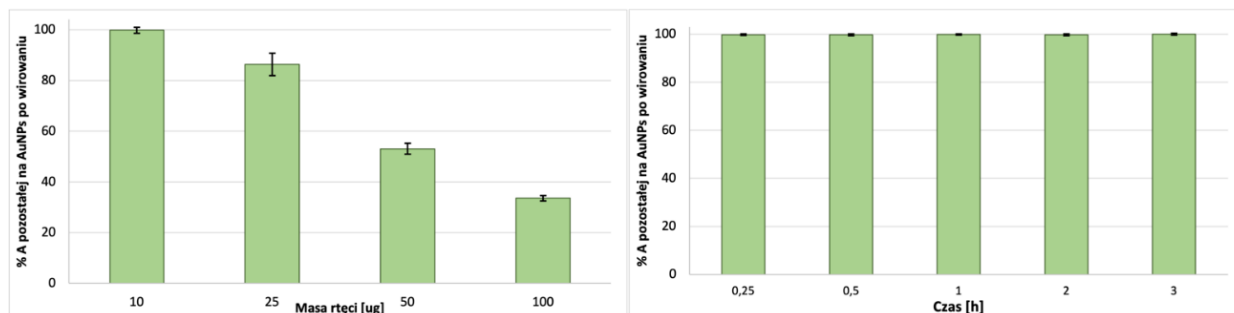
Do oczyszczenia otrzymanego produktu zastosowano ponownie koncentratory wirówkowe Amicon o objętości 4 ml i odcięciu membrany 100 kDa. Proces wirowania przeprowadzono przy prędkości 1500 rpm, przez 5 minut. Po oczyszczeniu nanocząstki zostały zebrane z membrany poprzez ich dyspersję w 1 ml wody dejonizowanej. Następnie zmierzono aktywność promieniotwórczą nanocząstek oraz supernatantu za pomocą kalibratora dawek Atomlab 500.

W celu optymalizacji parametrów reakcji pokrywania AuNPs rtęcią zbadano wpływ czasu trwania reakcji oraz masy użytej rtęci na procent aktywności promieniotwórczej pozostającej w nanocząstkach po wirowaniu.

Aby określić maksymalną masę rtęci, jaką można przyłączyć do 1ml AuNPs (6,84·10¹³ NPs; 11,4 nM) przeprowadzono eksperymenty, w których nanocząstki pokrywano różnymi ilościami rtęci: 10, 25, 50, 100 µg. Rezultatem były różne teoretyczne stopnie pokrycia powierzchni AuNPs tym metalem: wynoszące odpowiednio 40%, 100%, 200%, 400%. Dodatkowo, w celu określenia optymalnego czasu reakcji nanocząstki mieszano przez kilka punktów czasowych: 15 minut, 30 minut, 1 h, 2 h oraz 3 h.

Procent aktywności związanej z AuNPs po wirowaniu obliczono na podstawie porównania aktywności promieniotwórczej supernatantu (frakcja niezwiązana) oraz nanocząstek zdyspergowanych w wodzie (frakcja związana). Proces oczyszczania prowadzono z wykorzystaniem koncentratorów wirówkowych Amicon.

Wyniki optymalizacji przedstawiono w tabelach (Tab. XXII, Tab. XXIII) oraz na wykresach ilustrujących zależność aktywności promieniotwórczej (A) związanej z frakcją AuNPs od zastosowanej masy rtęci oraz czasu reakcji (Rys. 58).



Rys. 58. Aktywność promieniotwórcza związana z AuNPs w zależności od stosowanej masy rtęci oraz czasu reakcji.

Tab. XXII. Aktywność promieniotwórcza związana z AuNPs w zależności od stosowanej masy rtęci.

Masa rtęci	% Aktywności pozostaje po wirowaniu
10	99,81±0,18
25	86,33±4,41
50	53,03±2,15
100	33,59±1,03

Tab. XXIII. Aktywność promieniotwórcza związana z AuNPs w zależności od czasu reakcji.

Czas reakcji [h]	% Aktywności pozostaje po wirowaniu
0,25	99,80 ± 0,30
0,50	99,74 ± 0,35
1	99,87±0,22
2	99,78±0,39
3	99,98±0,04

Analizując otrzymane dane, określono optymalny czas reakcji oraz masę rtęci, które umożliwiają wydajne otrzymywanie radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH.

Zwiększając masę rtęci dodawaną do nanocząstek obserwowano wzrost aktywności w supernatancie, a tym samym spadek procentowy aktywności pozostaje w nanocząstkach. Obserwowana zależność spadku aktywności we frakcji nanocząstek była zbliżona do liniowej, z R^2 wynoszącym 0,9762, według dopasowania równania funkcji liniowej przeprowadzonego w programie Excel. Do przeprowadzenia eksperymentu zastosowano stały czas reakcji wynoszący 1 godzinę. Maksymalną masą rtęci, którą udało się przyłączyć do nanocząstek z wydajnością $99,81 \pm 0,18\%$ było 10 µg. Dla wszystkich wyższych mas wartość ta była niższa niż 90%, a dla największej badanej masy rtęci tj. 100 µg osiągnęła zaledwie $33,59 \pm 1,03\%$. Na podstawie tych wyników, do dalszych eksperymentów przyjęto masę rtęci wynoszącą maksymalnie 10 µg (40% powierzchni pokrytej Hg) na 1 ml AuNPs.

Przeprowadzono również badanie zależności aktywności promieniotwórczej pozostaje we frakcji nanocząstek po wirowaniu od czasu trwania reakcji, przy stałej masie rtęci wynoszącej 10 µg. Wyniki pokazały brak istotnego wpływu czasu reakcji na wydajność przyłączenia rtęci - dla każdego z badanych punktów czasowych wartość ta pozostawała bliska 100%. Na tej podstawie stwierdzono, że reakcja pokrycia nanocząstek rtęcią zachodzi bardzo szybko i już po 15 minutach osiąga maksymalną wydajność - 100%. Do dalszych etapów badań koniugatu przyjęto czas reakcji wynoszący 1 godzinę, który uznano za

optymalny ze względów praktycznych, tj. wykonywania wielu syntez jednocześnie i konieczności oczyszczania próbek przez wirowanie na koncentratorach wirówkowych, co wymagało czasu od eksperymentatora.

6.3. Stabilizacja radiokoniugatu glikolem polietylenowym

Proces stabilizacji otrzymanego radiokoniugatu przeprowadzono według schematu oraz opisu przedstawionego w rozdziale „3.5.5. Stabilizacja nanocząstek glikolem polietylenowym”.

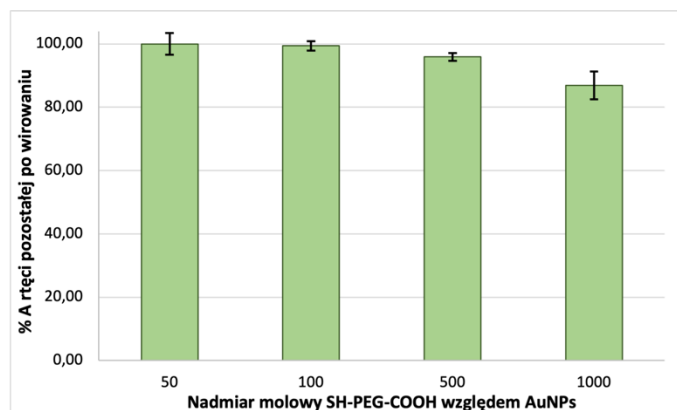
Zarówno złoto jak i rtęć wykazują powinowactwo do grupy tiolowej.^{335,348} Z tego względu, przeprowadzono badanie mające na celu określenie stabilności połączenia rtęci z nanocząstkami złota w obecności glikolu polietylenowego zawierającego w swojej strukturze grupę HS-.

W celu określenia wpływu dodatku glikolu polietylenowego na stopień przyłączenia rtęci do nanocząstek przeprowadzono eksperyment, w którym do 1 ml Au(^{197m/197}Hg)NPs (6,84·10¹³ NPs; 11,4 nM) dodano różne objętości (13,54; 27,08; 135,4 oraz 270,8 µl) roztworu glikolu polietylenowego (HS-PEG-COOH) o masie molowej 5000 g/mol (27,08; 54,16; 270,8; 541,6 µg; 2 mg/ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle kołowym przez 2 h. Następnie otrzymane produkty oczyszczono na koncentratorach wirówkowych Amicon o objętości 4 ml i odcięciu membrany 100 kDa z parametrami wirowania 1500 rpm, 5 minut. Supernatant zebrano, a nanocząstki pozostałe na membranie zdyspergowano w 1 ml wody dejonizowanej. Następnie, zmierzono aktywność promieniotwórczą obu próbek na kalibratorze dawek Atomlab 500.

Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli (Tab. XXIV) oraz przedstawiono w formie wykresu ilustrującego zależność procentowej aktywności rtęci pozostałej po wirowaniu od nadmiaru molowego PEG-u względem nanocząstek (Rys. 59).

Tab. XXIV. Wpływ dodatku PEG na stabilność połączenia AuNPs z radionuklidami ^{197m/197}Hg.

Nadmiar molowy PEG:NPs	% Aktywności pozostałej po wirowaniu
50:1	100,0 ± 3,4
100:1	99,4 ± 0,5
500:1	95,9 ± 1,2
1000:1	86,9 ± 4,4



Rys. 59. Wpływ dodatku PEG na stabilność połączenia AuNPs z radionuklidami $^{197m/197}\text{Hg}$.

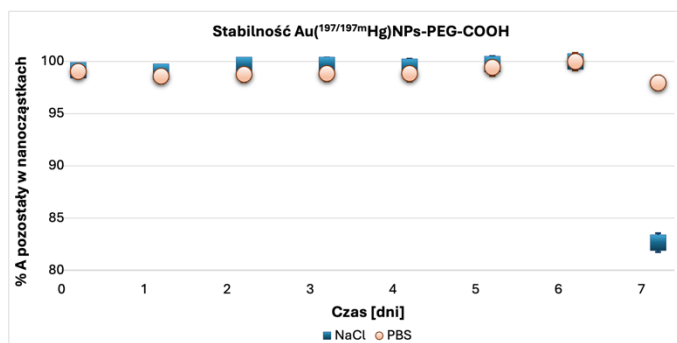
Dane przedstawione na wykresie (Rys. 59) oraz w tabeli (Tab. XXIV) wskazują na niewielki wpływ przyłączenia PEG-u na stabilność połączenia rtęci z nanocząstkami. Dla wszystkich badanych stosunków molowych mniejszych niż 1000:1 trwałość tego połączenia przekracza 95%. Dla nadmiaru molowego wynoszącego 50:1 jest to $100,0 \pm 3,4\%$. Jedynie dla najwyższego badanego stosunku molowego (1000:1) stabilność nieznacznie spada, wciąż utrzymując się na wysokim poziomie $86,9 \pm 4,4\%$.

Uwzględniając zarówno właściwości fizykochemiczne takie jak wysoka stabilność oraz mały rozmiar koniugatu z 50-krotnym nadmiarem molowym PEG-u, opisany w rozdziale 4.3. Stabilizacja koniugatu glikolem polietylenowym, do dalszych badań wybrano stosunek molowy PEG:AuNP wynoszący 50:1.

6.4. Analiza stabilności radiokoniugatu $\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$

Badanie stabilności radiokoniugatu $\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ zostało przeprowadzone w 0,9% roztworze soli fizjologicznej oraz w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) o pH = 7,4.

Szczegółowy opis procesu określenia stabilności zamieszczony został w rozdziale 3.5.6. Badanie stabilności radiokoniugatów. Analizę przeprowadzono z użyciem izotopu ^{197}Hg , a jej wyniki przedstawiono na Rys. 60.



Rys. 60. Aktywność promieniotwórcza izotopu $^{197m/197}\text{Hg}$ [%] pozostała we frakcji nanocząstek po inkubacji w roztworach PBS i NaCl.

Na podstawie przedstawionych danych (Rys. 60), można stwierdzić, że radiokoniugat wykazuje wysoką stabilność w roztworze soli fizjologicznej przez 6 dni, co odpowiada 2,25 czasom połowicznego rozpadu rtęci-197. W roztworze PBS stabilność ta utrzymuje się przez cały okres trwania eksperymentu, czyli 7 dni, co odpowiada 2,63 czasom połowicznego rozpadu rtęci-197. W ciągu pierwszych 6 dni, procent aktywności promieniotwórczej uwalniającej się z koniugatu nie przekroczył 1,4% w obu badanych mediach. W dniu siódmym, odnotowano wzrost aktywności promieniotwórczej uchodzącej z nanocząstek w roztworze soli fizjologicznej, który osiągnął wartość 17,35%. Natomiast w przypadku roztworu PBS aktywność ta pozostała bardzo niska, wynosząc zaledwie 2,05%.

Zebrane dane potwierdzają wysoką stabilność koniugatu w roztworze PBS oraz soli fizjologicznej przez 6 dni. Stabilność radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ uznano za bardzo dobrą z perspektywy potencjalnego radiofarmaceutyku³⁶⁰ oraz wystarczającą do dalszych badań *in vitro* oraz *ex vivo*.

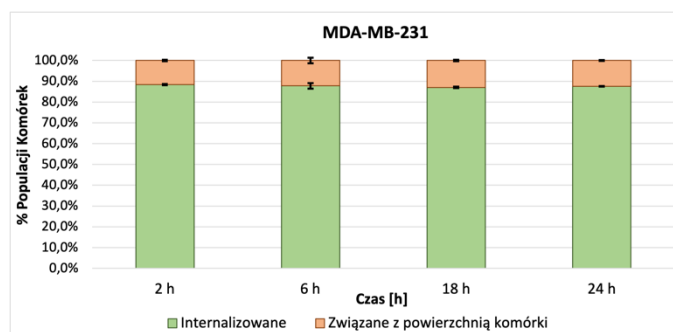
6.5. Badania komórkowe *in vitro*

Po przeprowadzeniu ewaluacji optymalnych parametrów syntezy oraz badaniu stabilności radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ przystąpiono do oceny jego potencjału przeciwnowotworowego na komórkach linii MDA-MB-231 oraz T98G.

6.5.1. Badanie internalizacji do wnętrza komórki

Pierwszym testem *in vitro* jaki został przeprowadzony było badanie internalizacji radiokoniugatu do wnętrza komórki. Badanie prowadzono dla radiokoniugatu o stężeniu promieniotwórczym 2 MBq/ml zawierającym $2,69 \cdot 10^{11} \text{AuNPs/ml}$ na dołek, dla czterech punktów czasowych tj. 2, 6, 18 oraz 24 h.

Wyniki zostały przedstawione w formie wykresów (Rys. 61, Rys. 62) oraz tabel (Tab. XXV, Tab. XXVI). Obrazują one procent populacji komórkowej danej linii internalizowany do wnętrza komórki oraz związany z jej powierzchnią. Badanie przeprowadzone zostało zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale „3.5.7.2. Badanie internalizacji do wnętrza komórki”.

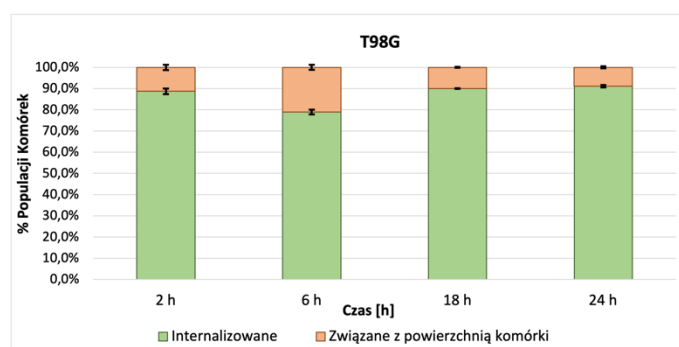


Rys. 61. Rozmieszczenie zaabsorbowanego koniugatu w komórkach linii MDA-MB-231 określone według aktywności promieniotwórczej izotopów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Tab. XXV. Procent aktywności promieniotwórczej radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ związanej z błoną oraz internalizowanej do wnętrza komórki dla linii komórkowej MDA-MB-231.

Czas	2 h	6 h	18 h	24 h
Wychwyt koniugatu [%]	18,37 ± 0,99	15,51 ± 0,80	8,36 ± 0,80	16,89 ± 0,10
% aktywności związany z błoną	11,64 ± 0,29	12,20 ± 1,30	12,95 ± 0,33	12,49 ± 0,16
% aktywności internalizowany	88,36 ± 0,29	87,80 ± 1,30	87,05 ± 0,33	87,51 ± 0,16

Dla linii komórkowej MDA-MB-231 zarówno wartość wychwytu koniugatu, procent aktywności związanej z błoną komórkową, jak i procent zinternalizowany do komórki okazały się stałe w czasie. Wartości procentowe aktywności związanej z błoną komórkową mieszczą się dla wszystkich badanych punktów czasowych w przedziale od 11,64% do 12,95%. Poziom internalizacji do wnętrza komórki również utrzymywał się na stałym i wysokim poziomie podczas trwania eksperymentu, wynosząc już po 2 godzinach $88,36 \pm 0,29\%$, a na koniec trwania eksperymentu, po 24 godzinach, $87,51 \pm 0,16\%$. Badany radiokoniugat osiągał wysoki poziom internalizacji do wnętrza komórek linii MDA-MB-231.



Rys. 62. Rozmieszczenie zaabsorbowanego koniugatu w komórkach linii T98G określone według aktywności promieniotwórczej izotopów $^{197m/197}\text{Hg}$.

Tab. XXVI. Procent aktywności promieniotwórczej radiokoniugatu $\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ związanej z błoną oraz internalizowanej do wnętrza komórki dla linii komórkowej T98G.

Czas	2 h	6 h	18 h	24 h
Wychwyt koniugatu [%]	9,13 ± 0,15	9,99 ± 0,24	9,02 ± 0,10	18,41 ± 0,22
% aktywności związany z błoną	11,32 ± 1,25	21,07 ± 1,14	9,98 ± 0,18	8,90 ± 0,50
% aktywności internalizowany	88,68 ± 1,25	78,93 ± 1,14	90,02 ± 0,18	91,10 ± 0,50

Dla linii komórkowej T98G obserwuje się niemal 2-krotny wzrost wartości wychwytu koniugatu w ostatnim punkcie pomiarowym – po 24 h. Podobnie jak w przypadku linii MDA-MB-231 nie zaobserwowano, wyraźnej zależności między procentem aktywności związanej z błoną oraz zinternalizowanej a czasem. Dopiero w dwóch ostatnich punktach czasowych widoczny jest wzrost poziomu internalizacji do odpowiednio $90,02 \pm 0,18\%$ oraz $91,10 \pm 0,50\%$. Wartości te stanowią znaczną poprawę względem punktu czasowego 6 h, w którym poziom internalizacji wynosił jedynie $78,03 \pm 1,14\%$. Jednakże, poziom internalizacji dla punktu czasowego 6 h był znacznie niższy niż dla punktu 2 h $88,68 \pm 1,25\%$.

W związku z powyższym, nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków dotyczących wpływu czasu na poziom internalizacji dla linii komórkowej T98G. Niemniej jednak, procent aktywności, jaka zinternalizowała do wnętrza komórki jest bardzo wysoki. Znajduje się on dla wszystkich badanych punktów czasowych w przedziale od $78,93 \pm 1,14\%$ do $91,10 \pm 0,50\%$.

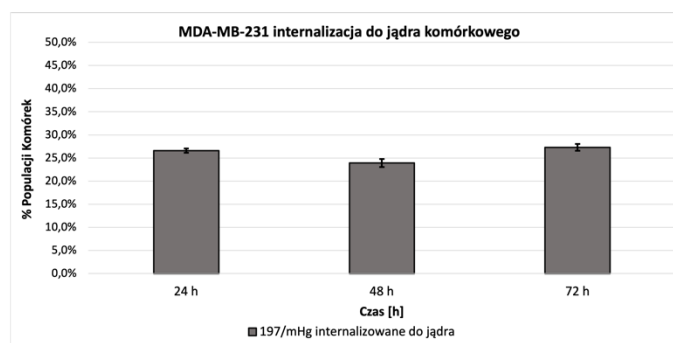
Osiągnięty dla obu badanych linii komórkowych wysoki poziom internalizacji do wnętrza komórki (po 24 h dla linii MDA-MB-231 oraz T98G odpowiednio 87,51% oraz 91,10%) wskazuje na wysoki potencjał terapeutyczny radiokoniugatu. Wyniki te są w zgodzie z istniejącą literaturą. Liu i współ. udowodnili, że 5 nm AuNPs są łatwo internalizowane przez komórki raka płuc A549.³⁶¹ Wu i współ. wykazali również, że 5 nm AuNP gromadzą się we wnętrzu komórki, w pobliżu jądra komórek raka żołądka SGC-7901.³⁶²

Kluczowe jest, aby potencjalny radiofarmaceutyk oparty na elektronach Auger skutecznie wniknął do wnętrza komórki i lokalizował się jak najbliżej jądra. Poznanie charakterystyki koniugatu *in vitro* oraz potwierdzenie jego zdolności do wnikania do wnętrza komórki umożliwiło przejście do kolejnego etapu eksperymentalnego, w którym oceniono jego zdolność do wnikania do jądra komórkowego.

6.5.2. Badanie internalizacji do jądra komórkowego metodą frakcjonowania (izolacji jądra komórkowego)

Analiza zdolności radiokoniugatu do wnikania do jądra komórkowego została przeprowadzona dla dwóch linii komórkowych. Szczegółowy opis procesu przeprowadzenia testu został zamieszczony w rozdziale metodycznym „3.5.7.3. Badanie internalizacji do jądra komórkowego metodą frakcjonowania”. Eksperyment wykonano dla czterech punktów czasowych tj. 2, 6, 18 oraz 24 h na szalkach w objętości 8 ml. Stężenie nanocząstek radiokoniugatu w szalce wynosiło $2,69 \cdot 10^{11}$ AuNPs/ml, a stężenie promieniotwórcze 2 MBq/ml.

Wyniki analizy przedstawiono w formie wykresów dla linii komórkowej MDA-MB-231 (Rys. 63) oraz linii komórkowej T98G (Rys. 63).

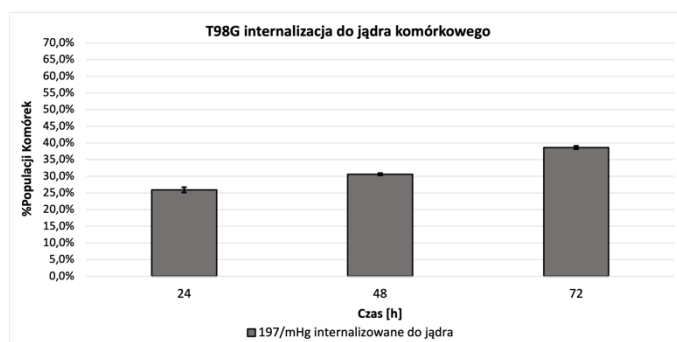


Rys. 63. Internalizacja radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ do jądra komórkowego komórek MDA-MB-231 w czasie, analizowana dla radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Dla najkrótszego czasu inkubacji – 24 godziny – wynosi on $26,6 \pm 0,48\%$. Następnie obserwuje się nieznaczny spadek do $23,90 \pm 0,88\%$ po 48 godzinach, a po 72 godzinach wartość ta wzrasta do $27,30 \pm 0,73\%$, co stanowi wzrost o 0,7 p.p. względem początkowej wartości.

Wyniki dla linii komórkowej potrójnie ujemnego raka piersi przedstawione na Rys. 63 pokazują, że poziom internalizacji do jądra komórkowego pozostaje na zbliżonym poziomie we

wszystkich badanych punktach czasowych. Dla najkrótszego czasu inkubacji – 24 h wynosi on $26,6 \pm 0,48\%$. Następnie, obserwuje się nieznaczny spadek do $23,90 \pm 0,88\%$ dla 48 h, a po 72 h wartość ta wzrasta do $27,30 \pm 0,73\%$ co stanowi wzrost o 0,7 p.p. względem początkowej wartości.



Rys. 64. Internalizacja radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$ do jądra komórkowego komórek MDA-MB-231 w czasie, analizowana dla radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Wyniki dla linii komórkowej glejaka wielopostaciowego wskazują na zależności stopnia internalizacji do jądra komórkowego od czasu. Procent internalizacji do jądra komórkowego rośnie od $25,90 \pm 0,77\%$ dla 24 h, przez $30,59 \pm 0,25\%$ dla 48 h, do $38,61 \pm 0,48\%$ osiągniętych dla 72 h. Różnica wartości internalizacji między pierwszym, a ostatnim punktem czasowym wynosi 12,71 p.p.

W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano różnice pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. W przypadku linii T98G poziom internalizacji zwiększał się wraz z upływem czasu, podczas gdy dla linii MDA-MB-231 pozostawał on stały. Ponadto, poziom internalizacji był wyższy dla linii T98G o 0,70 p.p. dla czasu 24 h oraz o 11,31 p.p. dla 72 h.

Porównując uzyskane dane z wynikami innych badań nad nanocząstkami złota obserwujemy znaczną przewagę badanego koniugatu, co najprawdopodobniej wynika z jego niewielkiego rozmiaru.³⁶³ Uzyskane poziomy internalizacji do jądra komórkowego są satysfakcjonujące i stanowią podstawę do prowadzenia dalszych badań z zastosowaniem radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$.

Badanie potwierdziło, kluczową cechą badanego radiokoniugatu, jaką jest zdolność przenikania do jądra komórkowego, co uzasadnia jego potencjalne zastosowanie w terapii z wykorzystaniem emiterów elektronów Auger. Z uwagi na obiecujące właściwości terapeutyczne radiokoniugatu, podjęto dalsze badania w celu oceny jego toksyczności oraz zdolności do indukowania dwuniciowych pęknięć DNA. Wyniki tych eksperymentów zostały omówione w kolejnych rozdziałach niniejszej pracy.

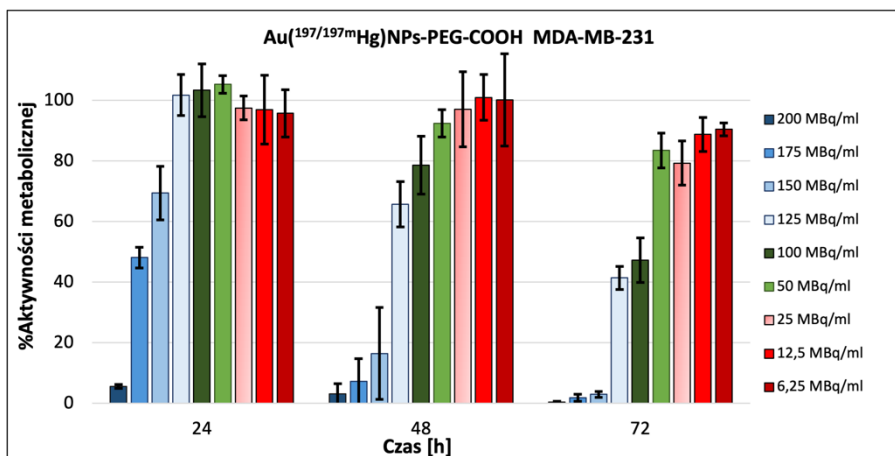
6.5.3. Badanie cytotoksyczności testem MTS

Badanie cytotoksyczności testem MTS miało na celu ocenę skuteczności radiokoniugatu w zmniejszaniu aktywności metabolicznej komórek linii MDA-MB-231 oraz T98G. Szczegółowy opis metodyki przeprowadzenia testu został zamieszczony w rozdziale 3.5.7.4. Badanie cytotoksyczności testem MTS.

W eksperymencie analizowano działanie radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$ w dziewięciu różnych stężeniach promieniotwórczych: 200; 175; 150; 125; 100; 50; 25; 12,5 i 6,25 MBq/ml.

Wyniki badania cytotoksyczności przedstawiono w formie wykresów obrazujących zależność aktywności metabolicznej komórek od czasu i stężenia testowanych związków dla linii komórkowej MDA-MB-231 (Rys. 65) oraz T98G (Rys. 67).

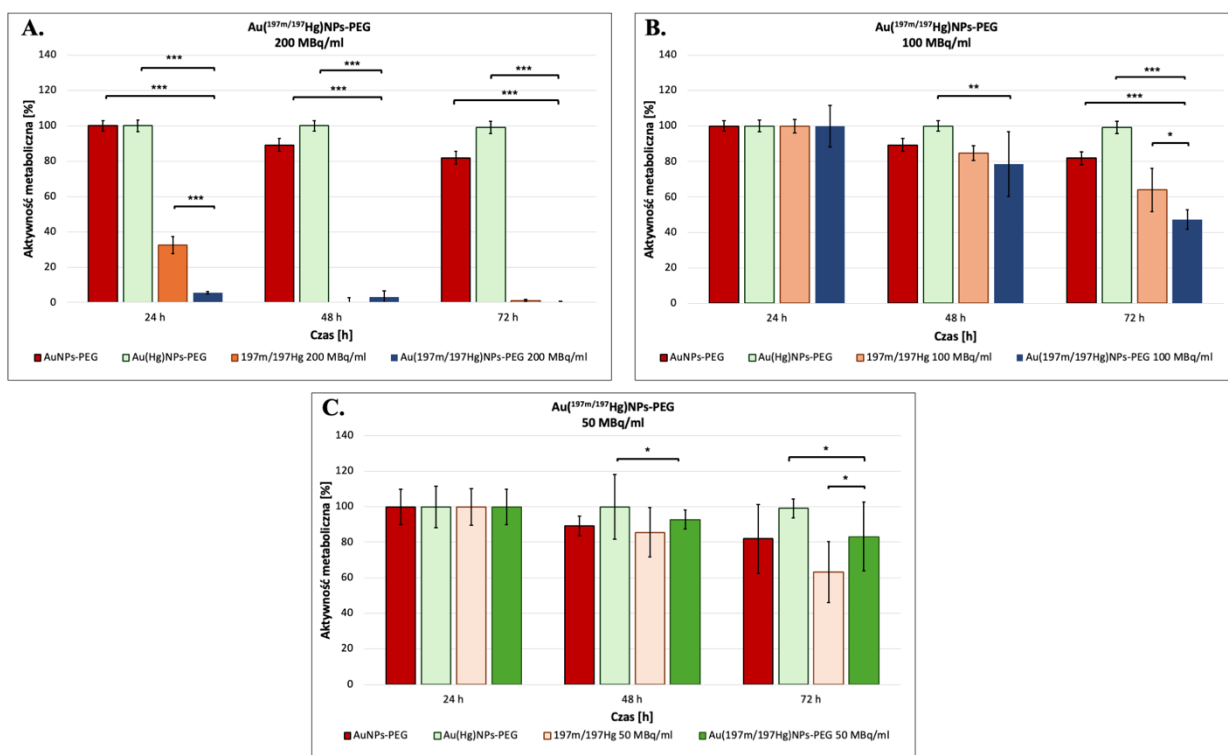
Ponadto, przeprowadzono analizę statystyczną porównującą działanie radiokoniugatu do nanocząstek złota AuNPs-PEG, nieradioaktywnego odpowiednika koniugatu Au(Hg)NPs-PEG oraz wolnych radionuklidów rtęci w postaci $^{197\text{m}/197}\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ o stężeniach promieniotwórczych wynoszących 200, 100 oraz 50 MBq/ml. Wyniki analizy statystycznej dla poszczególnych linii komórkowych przedstawiono na wykresach (Rys. 66, Rys. 68).



Rys. 65. Aktywność metaboliczna komórek linii MDA-MB-231 po traktowaniu roztworem radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 175 MBq/ml, 150 MBq/ml, 125 MBq/ml, 100 MBq/ml, 50 MBq/ml, 25 MBq/ml; 12,5 MBq/ml i 6,25 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w zależności od czasu.

Komórki linii MDA-MB-231 pod wpływem działania radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ znacznie zmniejszają swoją aktywność metaboliczną dla stężeń promieniotwórczych powyżej 125 MBq/ml. Dla najwyższego stężenia, 200 MBq/ml, radiokoniugat wykazuje bardzo silne działanie cytotoksyczne. Aktywność metaboliczna komórek już po 24 h spada do $5,51 \pm 0,67\%$, a następnie po 72 h osiąga $0,33 \pm 0,31\%$. Radiokoniugat wykazuje więc wyższą toksyczność w porównaniu do badanej wolnej rtęci, gdzie spadek przeżywalności rozpoczyna się od $72,93 \pm 3,55\%$ dla 24 h i dopiero po 72 h osiąga podobną dla radiokoniugatu wartość $1,03 \pm 0,63\%$. Wysoką cytotoksyczność obserwujemy również w przypadku radiokoniugatu o stężeniach promieniotwórczych wynoszących 175 oraz 150 MBq/ml, gdzie aktywność metaboliczna po 24 h spada odpowiednio do $48,10 \pm 3,39\%$ i $69,43 \pm 8,84\%$, a następnie po 72 h do $1,78 \pm 1,18\%$ i $2,88 \pm 1,02\%$. Stężenia promieniotwórcze koniugatu wynoszące 125 MBq/ml oraz 100 MBq/ml obniżają aktywność metaboliczną komórek do odpowiednio $41,34 \pm 3,77\%$ oraz $47,26 \pm 7,40\%$ po 72 h. Stężenia poniżej 25 MBq/ml powodują niewielki efekt cytotoksyczny obniżając przeżywalność komórek jedynie o 10-12% po 72 h.

MDA-MB-231

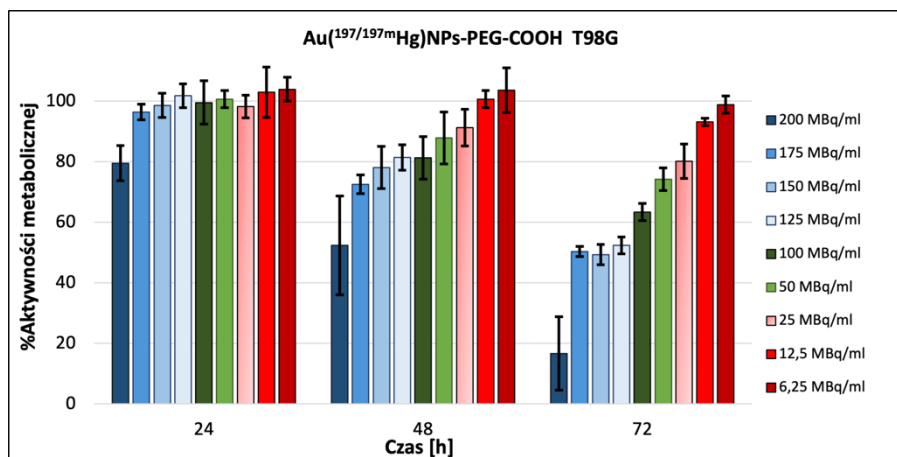


Rys. 66. Analiza statystyczna aktywności metabolicznej komórek linii MDA-MB-231 po traktowaniu AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs-PEG oraz Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml (A), 100 MBq/ml (B) i 50 MBq/ml (C) w zależności od czasu.

Najbardziej wyraźny efekt cytotoksyczny zaobserwowano dla najwyższego badanego stężenia promieniotwórczego – 200 MBq/ml. Odnotowano istotny statystycznie spadek aktywności metabolicznej komórek, który nasilał się wraz z wydłużeniem czasu inkubacji.

Po 72 h stężenie promieniotwórcze koniugatu wynoszące 100 MBq/ml obniżyło aktywność metaboliczną komórek o 16,8 p.p. w porównaniu do wolnej rtęci, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie.

Dla najniższego badanego stężenia promieniotwórczego - 50 MBq/ml, nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian, które potwierdzałyby zależność efektu cytotoksycznego od stężenia promieniotwórczego.

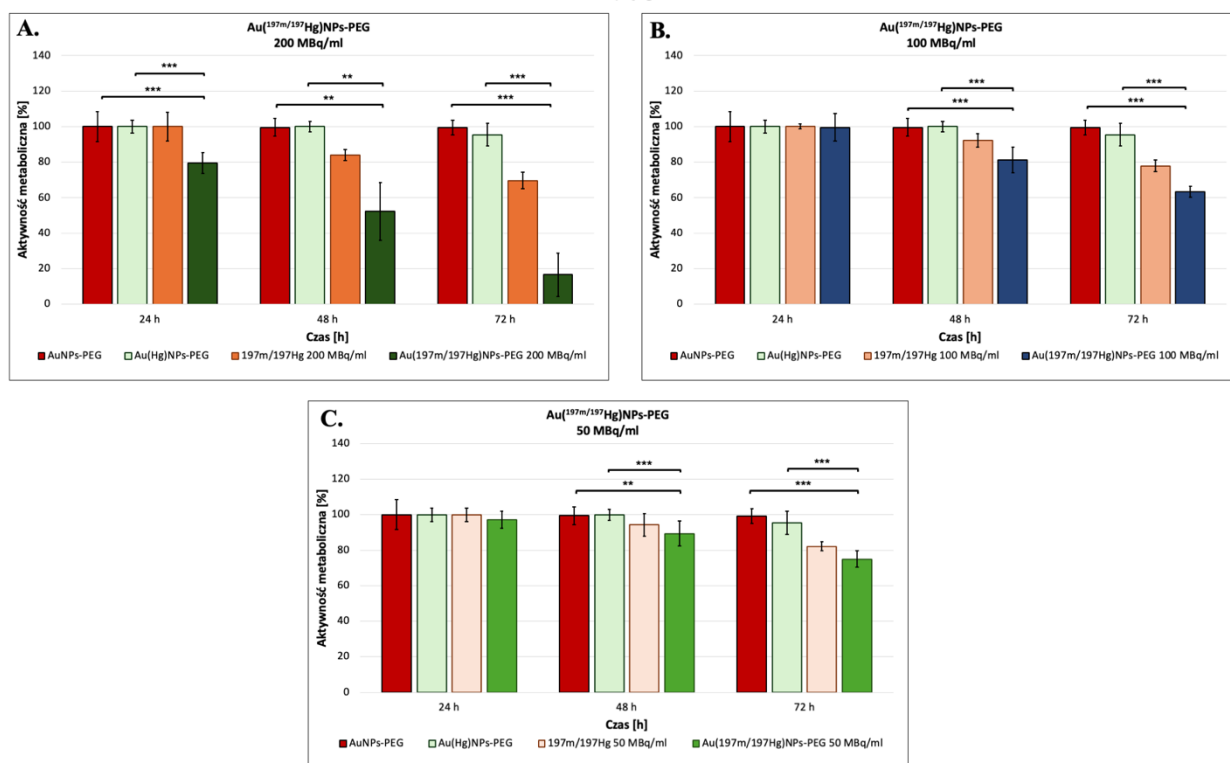


Rys. 67. Aktywność metaboliczna komórek linii T98G po traktowaniu roztworem radiokoniugatu $Au(^{197m}/^{197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 175 MBq/ml, 150 MBq/ml, 125 MBq/ml, 100 MBq/ml, 50 MBq/ml, 25 MBq/ml; 12,5 MBq/ml i 6,25 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w zależności od czasu.

Dla linii komórkowej T98G obserwujemy spadek aktywności metabolicznej komórek wraz ze wzrostem stężenia radiokoniugatu $Au(^{197m}/^{197}Hg)NPs-PEG$ oraz czasu inkubacji. Badany radiokoniugat w najwyższym stężeniu wykazuje działanie cytotoksyczne już po 24 h inkubacji, a aktywność metaboliczna komórek spada do $79,47 \pm 5,78\%$. Po 48 h stężenia radiokoniugatu większe od 50 MBq/ml wywołują zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek, a stężenie 200 MBq/ml powoduje spadek tej wartości do $52,33 \pm 16,32\%$. Po 72 h inkubacji zaobserwowano znaczne zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek począwszy od stężenia 25 MBq/ml, przy którym wartość ta wynosiła $80,17 \pm 5,66\%$, aż do 200 MBq/ml, gdzie widoczny jest znaczny efekt cytotoksyczny w postaci obniżenia aktywności metabolicznej do $16,64 \pm 12,13\%$.

Stężenia poniżej 25 MBq/ml powodowały po 72 h inkubacji niewielki efekt cytotoksyczny, skutkujący spadkiem przeżywalności komórek w zakresie 1,2 – 6,9%.

T98G



Rys. 68. Analiza statystyczna aktywności metabolicznej komórek linii T98G po traktowaniu AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs-PEG oraz Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml (A), 100 MBq/ml (B) i 50 MBq/ml (C) w zależności od czasu.

Aktywność metaboliczna komórek jest znacznie mniejsza dla grupy komórek traktowanej radiokoniugatem w porównaniu z grupą traktowaną Hg(NO₃)₂, co świadczy o większej cytotoksyczności radiokoniugatu względem niezwiązanych form rtęci. Niezwiązane formy rtęci nie powodują zmniejszenia aktywności metabolicznej w żadnym z badanych stężeń po 24 h. Po 48 h stężenie 200 MBq/ml radiokoniugatu obniża aktywność metaboliczną komórek o 31,5 p.p. efektywniej w porównaniu do wolnej rtęci, a po 72 h aż o 53,0 p.p. Analiza statystyczna dla 200 MBq/ml wykazała wysoką istotność różnic pomiędzy radiokoniugatem a AuNPs-PEG i Au(Hg)NPs-PEG we wszystkich punktach czasowych. Dla 100 MBq/ml również zaobserwowano istotne statystycznie różnice. W przypadku 50 MBq/ml efekt obniżenia aktywności metabolicznej był najmniej wyraźny, jednak również odnotowano istotność statystyczną.

Wyniki te wskazują, że nawet niższe stężenie związku wpływa negatywnie na żywotność komórek T98G. Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskujemy, iż radiokoniugat Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG powoduje efekt cytotoksyczny w postaci obniżenia aktywności metabolicznej komórek zarówno linii MDA-MB-231 jak i T98G.

Uzyskane rezultaty są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi innych związków zawierających radionuklidy emitujące elektrony Augera, w których również wykazano ich cytotoksyczność wobec różnych linii komórkowych. Ho zastosował panitumumab znakowany izotopami ¹⁹⁷Hg/^{197m}Hg, który istotnie zmniejszał przeżywalność komórek MDA-MB-468, zarówno w przypadku koniugatu zawierającego chelator DOTAM, jak i dla bezpośrednio znakowanego przeciwciała. ³⁶⁴ Brown i współ. wykazali wysoką cytotoksyczność AuNPs z przyłączonym panitumumabem znakowanych ¹⁹⁷Hg/^{197m}Hg

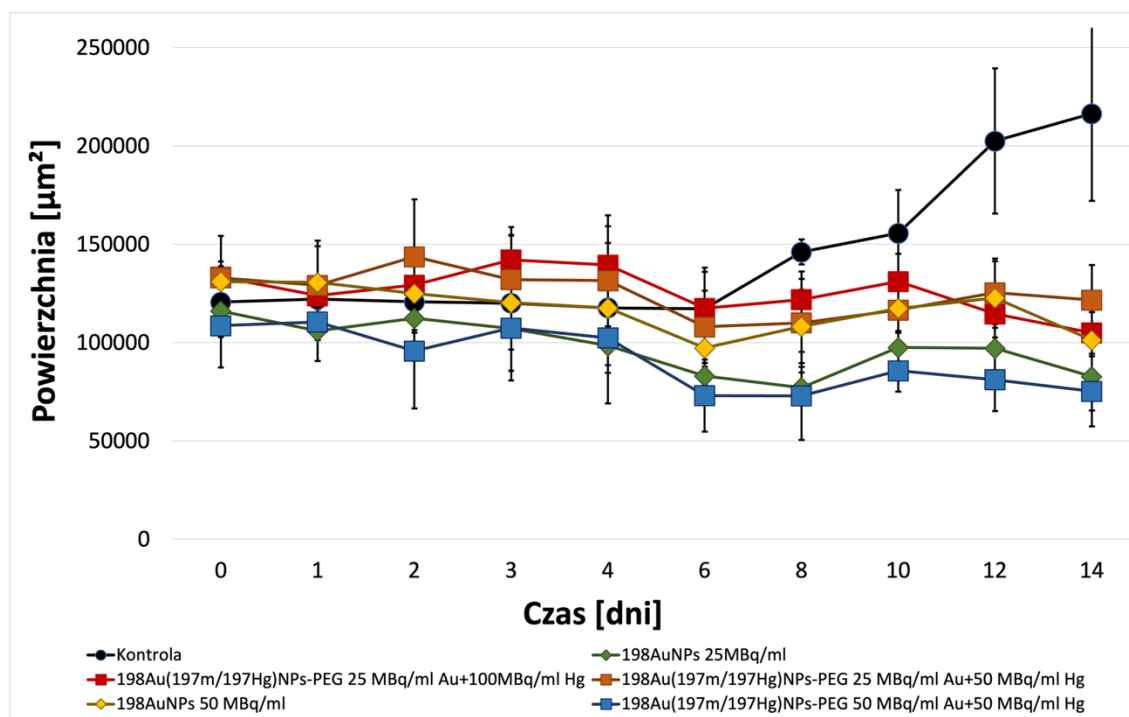
wobec komórek glejaka U251-Luc.²⁹⁰ Z kolei Rosenkranz i współ. potwierdzili efektywny transport emitera elektronów Auger - ¹¹¹In do jądra komórkowego przy użyciu układów nanotransporterowych (MNT) w kilku linii komórkowych raka pęcherza moczowego. W porównaniu do wolnego izotopu uzyskali oni aż 57-krotnie silniejsze działanie cytotoksyczne.³⁶⁵

W celu pogłębionej i bardziej precyzyjnej oceny różnic w odpowiedzi obu linii komórkowych oraz oceny potencjalnej skuteczności terapeutycznej radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG zdecydowano o przeprowadzeniu dalszych eksperymentów z wykorzystaniem struktur trójwymiarowych imitujących guzy nowotworowe – sferoidów.

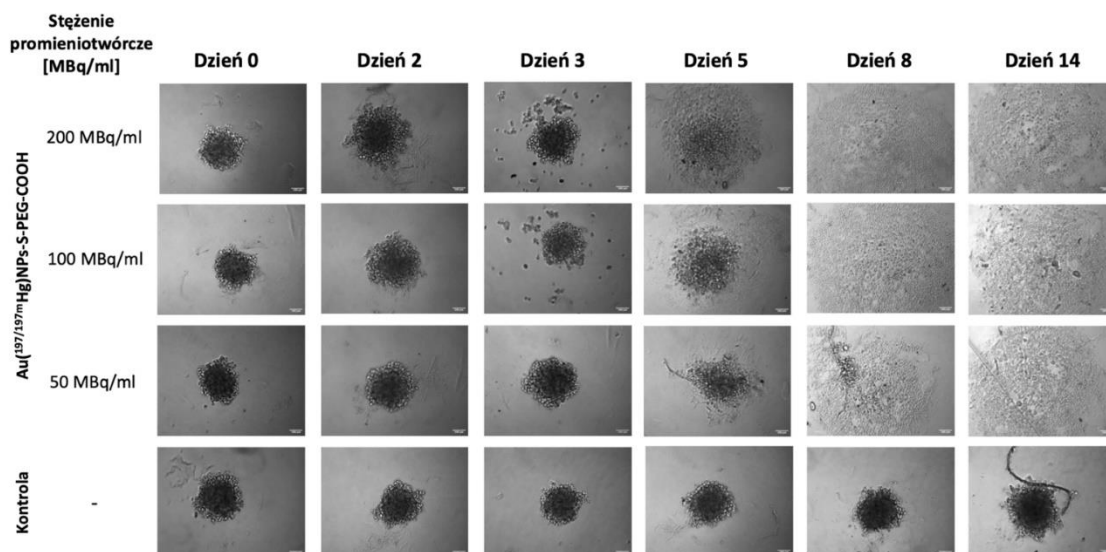
6.5.4. Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych

Badania przeprowadzone na trójwymiarowych strukturach komórkowych umożliwiają uzyskanie bardziej realistycznego obrazu działania badanych związków na proces zmniejszania się guzów nowotworowych. Eksperyment przeprowadzono dla obu linii komórkowych z zastosowaniem radiokoniugatu w trzech stężeniach promieniotwórczych: 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml. Uzyskane wyniki porównano z grupą kontrolną komórek nietraktowanych radiokoniugatem.

Dane zostały przedstawione w formie wykresów ilustrujących zależność powierzchni sferoidów od czasu oraz stężeń (Rys. 69, Rys. 71), a także w postaci obrazów porównujących morfologię sferoidów poddanych działaniu różnych stężeń radiokoniugatu oraz grupy kontrolnej w kolejnych punktach czasowych (Rys. 70, Rys. 72).



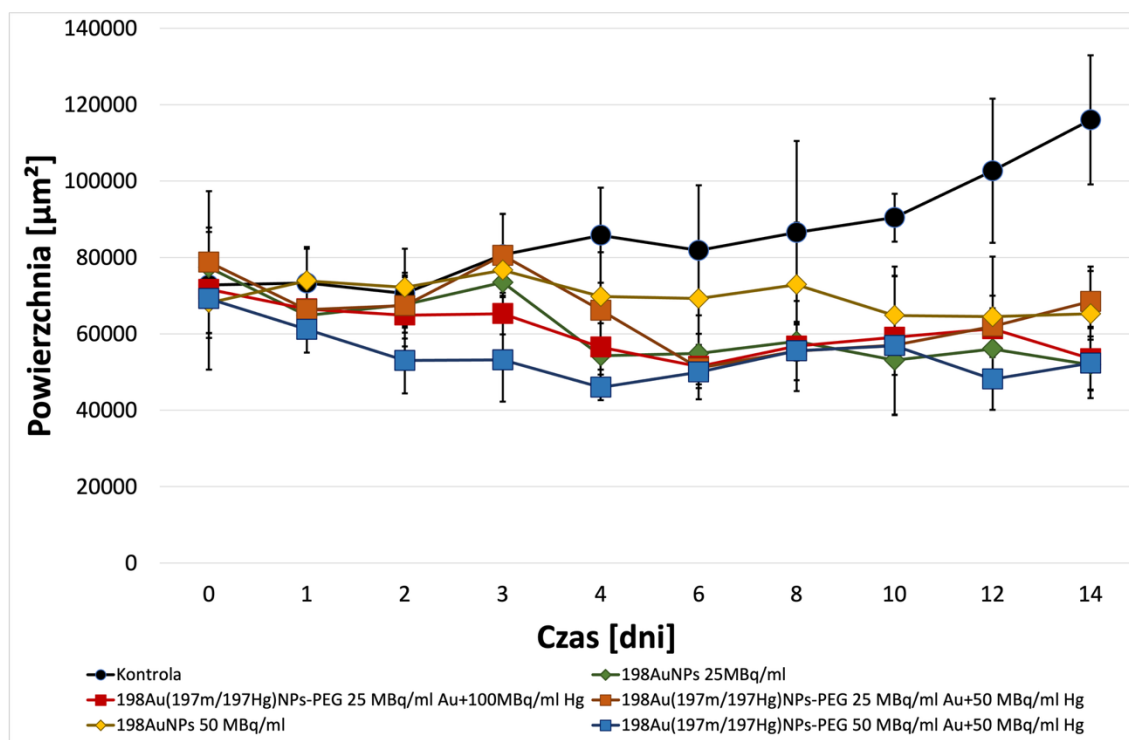
Rys. 69. Zmiana powierzchni sferoidów z linii MDA-MB-231 traktowanych radiokoniugatem Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w czasie.



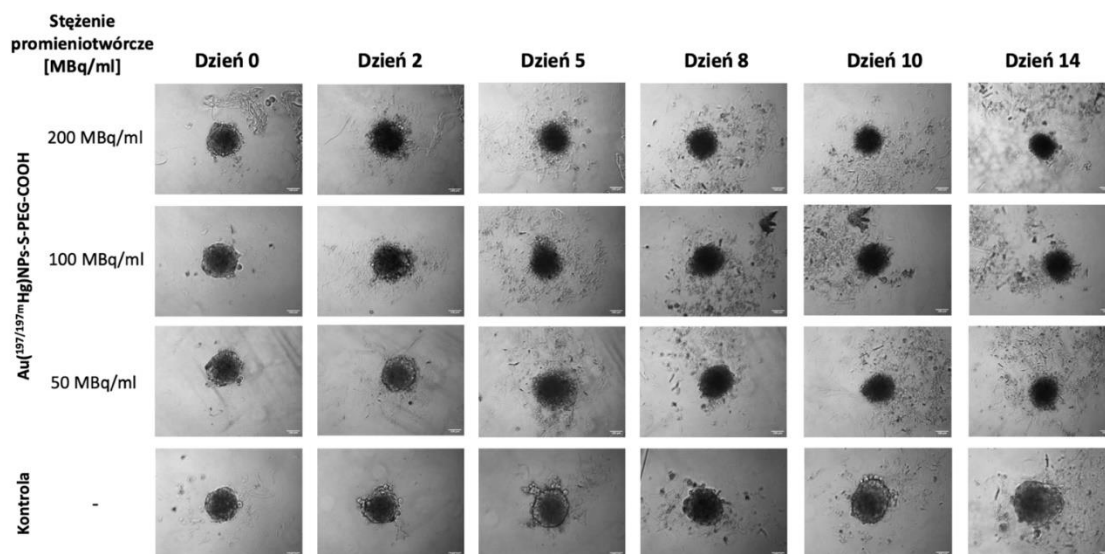
Rys. 70. Obrazy sferoidów linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanych radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w wybranych punktach czasowych.

Na podstawie wizualnego porównania sferoidów linii MDA-MB-231 przedstawionego na Rys. 70 oraz wyników zaprezentowanych na Rys. 69 obserwujemy, iż sferoidy całkowicie rozpadają się pod wpływem każdego z badanych stężeń promieniotwórczych, podczas gdy sferoidy z grupy kontrolnej stopniowo zwiększają swoją powierzchnię przez cały czas trwania eksperymentu tj. 14 dni. Widoczna jest znaczna toksyczność powodowana przez radiokoniugat $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 200 MBq/ml, która powoduje rozpad trójwymiarowej struktury komórkowej po 5 dniach inkubacji. Ponadto, radiokoniugat o stężeniu 100 MBq/ml indukuje rozpad sferoidów po 8 dniach inkubacji, a o stężeniu 50 MBq/ml po 10 dniach inkubacji. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na zależność efektu cytotoksycznego od zarówno stężenia radiokoniugatu, jak i czasu jego działania.

W początkowej fazie eksperymentu obserwujemy wzrost powierzchni sferoidów traktowanych radiokoniugatem względem wartości początkowej (tj. pomiaru z dnia 0 – przed dodaniem związku). Wzrost ten jest największy dla najwyższego stężenia i maleje wraz z jego spadkiem. Dla 200 MBq/ml po 2 dniach wzrost ten wynosi 52,0%, dla 100 MBq/ml wynosi on 52,6%, a dla 50 MBq 22,2%. Zjawisko to można tłumaczyć rozluźnianiem się struktury sferoidów i zwiększaniem przestrzeni międzykomórkowej podczas ich rozpadu. W następnym etapie eksperymentu zaobserwowano wyraźny spadek powierzchni sferoidów. Proces ten rozpoczął się dla stężenia 200 MBq/ml już od trzeciego dnia inkubacji, natomiast dla stężeń 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml od szóstego dnia. W ostatnim dniu eksperymentu (dzień 14) powierzchnia sferoidów z grupy kontrolnej zwiększyła się o 117,6% w porównaniu do dnia początkowego, podczas gdy wszystkie sferoidy traktowane radiokoniugatem uległy całkowitej redukcji. W badaniach przeprowadzonych na linii komórkowej MDA-MB-231 nie zaobserwowano wznowy wzrostu modelu guza dla żadnego z badanych stężeń promieniotwórczych.



Rys. 71. Zmiana powierzchni sferoidów z linii T98G traktowanych radiokoniugatem $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w czasie.



Rys. 72. Obrazy sferoidów linii komórkowej T98G traktowanych radiokoniugatem $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupa kontrolna w wybranych punktach czasowych.

Wyniki eksperymentu przeprowadzonego na sferoidach linii T98G odzwierciedlają wysoką oporność glejaka wielopostaciowego na terapię przeciwnowotworową. Trójwymiarowe struktury

komórkowe utworzone przez tę linię charakteryzowały się zwartą budową oraz dużym zagęszczeniem komórek na ograniczonej powierzchni. Utworzone sferoidy wyróżniały się regularnym i kulistym kształtem. Zarówno analiza danych przedstawionych na Rys. 71, jak i porównanie wizualne zawarte na Rys. 72 wskazują, że działanie radiokoniugatu na sferoidy linii T98G nie spowodowało znaczących zmian ich wielkości ani morfologii. W początkowej fazie eksperymentu – do dnia 3 – zaobserwowano niewielki wzrost powierzchni sferoidów traktowanych radiokoniugatem o stężeniach 200 MBq/ml i 100 MBq/ml, odpowiednio o 29,2% i 17,6% względem dnia 0. Może to sugerować rozluźnienie struktury sferoidów, będące wstępnym efektem cytotoksycznego działania związku. Następnie, od dnia ósmego nastąpił powolny spadek wielkości powierzchni sferoidów: o 28,4%, dla 200 MBq/ml o 6,2% dla 100 MBq/ml, oraz o 3,7% dla 50 MBq/ml. Jednakże, w dniu 12 odnotowano ponowny wzrost powierzchni sferoidów traktowanych radiokoniugatem o stężeniu 50 MBq/ml, o 14,1% względem dnia 10, co może wskazywać na wznowę wzrostu guza. Podobne zjawisko zaobserwowano także dla stężenia 200 MBq/ml, w dniu 14, w porównaniu do dnia 12, powierzchnia sferoidów zwiększyła się o 14,8%.

Pomimo tego, w 14 dniu eksperymentu powierzchnia sferoidów dla wszystkich badanych stężeń radiokoniugatu była mniejsza o 37,3-50,0% od powierzchni sferoidów z grupy kontrolnej. Sferoidy z grupy kontrolnej zwiększyły swoją powierzchnię względem dnia 0 o 25,7%, podczas gdy dla sferoidów traktowanych radiokoniugatem odnotowano jej zmniejszenie: o 26,2% dla 200 MBq/ml, 19,1% dla 100 MBq/ml oraz 23,4% dla 50 MBq/ml.

Warto podkreślić, że w przypadku linii T98G nie zaobserwowano wyraźnej zależności pomiędzy zastosowanym stężeniem radiokoniugatu a zmianą powierzchni sferoidów.

Wyniki porównano z danymi opublikowanymi przez Wawrowicza i współ., gdzie pełny rozpad sferoidów HepG2 wystąpił po 12 dniach od potraktowania ich nanocząstkami platyny znakowanymi emitującym elektrony Augera ^{125}I o stężeniu promieniotwórczym 100 MBq/ml.³⁶⁶ Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty wskazują na silniejszy i szybszy efekt cytotoksyczny radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$)NPs-PEG w stosunku do komórek nowotworowych linii MDA-MB-231 niż miało to miejsce w cytowanej publikacji. W przypadku komórek T98G skuteczność radiokoniugatu była wyraźnie niższa, co może wynikać z oporności tej linii komórkowej oraz ograniczonej możliwości wnikania związku do wnętrza struktury. Należy również wyraźnie podkreślić, że dokładne porównywanie badań opisanych w niniejszej pracy z opublikowanymi materiałami nie jest możliwe ze względu na zastosowanie różnych typów nanocząstek, odmiennych mechanizmów działania i różnic biologicznych pomiędzy analizowanymi liniami komórkowymi. Opisane wyniki podkreślają znaczenie zarówno typu komórek nowotworowych, jak i zastosowanego radionuklidu w skuteczności terapeutycznej emiterów elektronów Auger.

Podsumowując, struktury trójwymiarowe z linii MDA-MB-231 charakteryzowały się niższą gęstością oraz mniejszym skupieniem komórek w porównaniu ze sferoidami pochodzącymi z linii T98G. Ponadto, sferoidy MDA-MB-231 miały bardziej nieregularny kształt, a ich krawędź była rozmyta i otoczona przez pojedynczo, luźno rozmieszczone komórki. Radiokoniugat powodował całkowity rozpad sferoidów MDA-MB-231 dla wszystkich badanych stężeń, przy czym szybkość tego zjawiska była zależna od stężenia. Destrukcję struktur obserwowano dla stężenia 200 MBq/ml już po 5 dniach inkubacji. W przypadku linii T98G obserwowano wyraźnie wyższą oporność na działanie radiokoniugatu – nawet w ostatnim dniu eksperymentu nie doszło do całkowitego rozpadu trójwymiarowej struktury. Niemniej jednak, zanotowano zmniejszenie powierzchni sferoidów względem wartości początkowej (dzień 0) – o 19,1–26,2%, co w porównaniu do grupy kontrolnej w dniu 14 przekładało się na redukcję o 37,3–50,0%. W ostatnim dniu eksperymentu nie zaobserwowano również wyraźnej zależności zmniejszenia powierzchni od stężenia promieniotwórczego koniugatu.

Warto nadmienić, iż widoczne na wykresach duże błędy pomiarowe są wynikiem nierównoczesnego rozpadu oraz wzrostu wszystkich sferoidów traktowanych danym stężeniem radiokoniugatu oraz niejednorodnym profilem rozpadu, a w związku z tym, z trudnością dokładnego wyznaczenia granic struktury i prawidłowego pomiaru powierzchni.

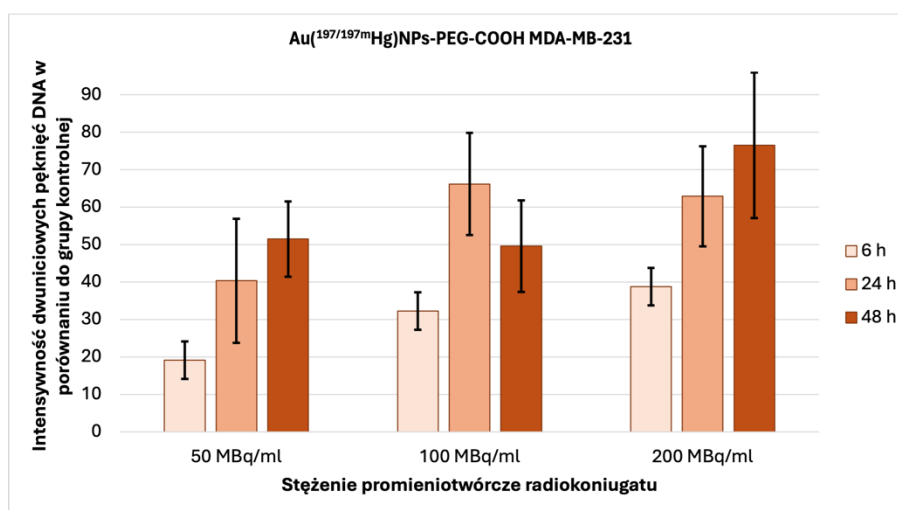
Na podstawie wyników uzyskanych z badania cytotoksyczności na trójwymiarowych modelach nowotworów potwierdzono wysoki potencjał terapeutyczny radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$. W związku z tym, w celu weryfikacji mechanizmu jego działania, przystąpiono do oceny, czy związek ten – oparty na radionuklidach emitujących elektrony Augera – indukuje dwuniciowe pęknięcia DNA.

6.5.5. Badanie dwuniciowych pęknięć DNA

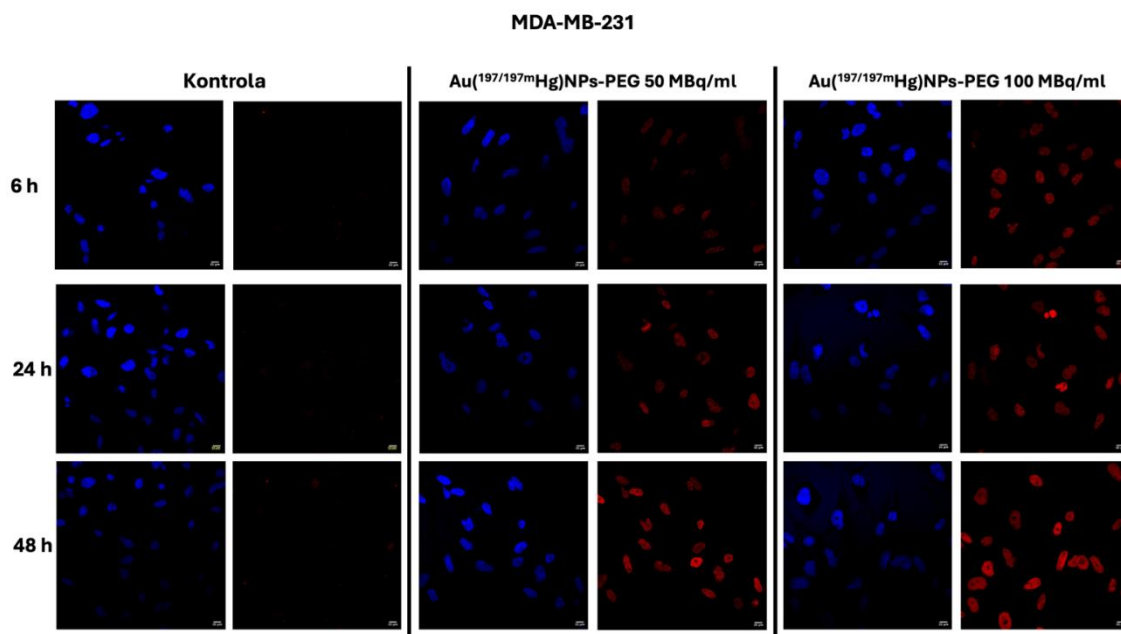
Badanie zdolności radiokoniugatu do indukowania dwuniciowych pęknięć DNA zostało przeprowadzone zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „3.5.7.6. Badanie dwuniciowych pęknięć DNA”.

W eksperymencie analizowano wpływ radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ na indukcję uszkodzeń DNA w postaci pęknięć dwuniciowych. Komórki dwóch badanych linii: MDA-MB-231 oraz T98G inkubowano z radiokoniugatem o aktywnościach promieniotwórczych 50 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 200 MBq/ml. Oceny dokonano w trzech punktach czasowych: po 6, 24 oraz 48 godzinach inkubacji.

Wyniki eksperymentu przedstawiono w formie wykresów ilustrujących zależność intensywności sygnału świadczącego o obecności dwuniciowych pęknięć DNA w porównaniu do grupy kontrolnej, w funkcji stężenia promieniotwórczego oraz czasu inkubacji (Rys. 73, Rys. 75). Ponadto, przedstawiono także wizualizację obrazów uzyskanych metodą mikroskopii konfokalnej. Na przedstawionych obrazach jądra komórkowe oznaczono kolorem niebieskim, natomiast dwuniciowe pęknięcia DNA – kolorem czerwonym (Rys. 74, Rys. 76).



Rys. 73. Intensywność dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii MDA-MB-231 w stosunku do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h.



Rys. 74. Obrazy dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii MDA-MB-231 w porównaniu do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197\text{Hg})}\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml i 100 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h. Jądra komórkowe oznaczono kolorem niebieskim, natomiast dwuniciowe pęknięcia DNA — kolorem czerwonym.

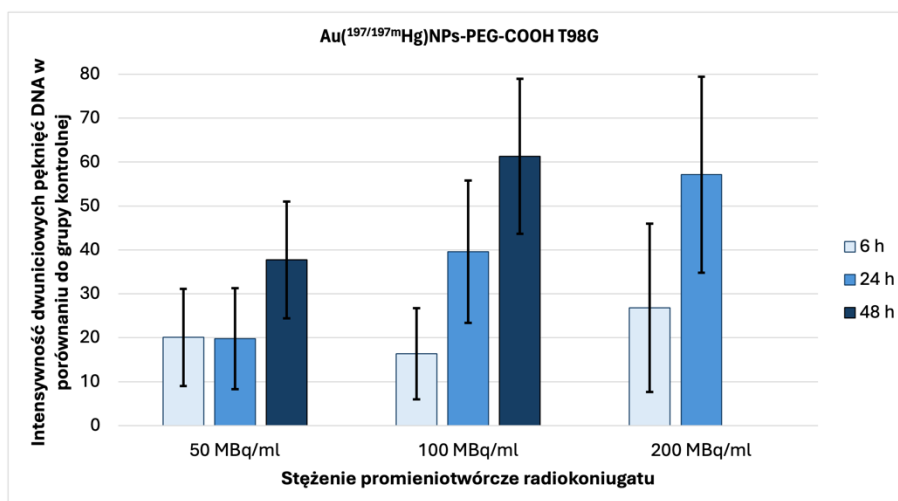
Radiokoniugat $\text{Au}^{(197\text{m}/197\text{Hg})}\text{NPs-PEG}$ działając na komórki linii MDA-MB-231 spowodował wystąpienie dwuniciowych pęknięć DNA. Zarówno wykres na Rys. 73, jak i ilustracja przedstawiona na Rys. 74 jednoznacznie wskazują, że badany radiokoniugat powoduje znaczące uszkodzenia materiału genetycznego w komórkach tej linii. Już po 6 godzinach inkubacji z najniższym badanym stężeniem (50 MBq/ml), obserwuje się ponad 19-krotny wzrost intensywności sygnału pęknięć DNA w porównaniu do grupy kontrolnej.

Intensywność pęknięć dwuniciowych wzrasta z czasem inkubacji, osiągając odpowiednio: 40-krotność dla 24 h oraz 51-krotność dla 48 h względem grupy kontrolnej. Można ponadto zaobserwować wyraźną zależność intensywności pęknięć od stężenia radiokoniugatu. Dla stężenia 200 MBq/ml intensywność uszkodzeń DNA po 6 godzinach inkubacji jest dwukrotnie większa niż przy 50 MBq/ml; po 24 godzinach – 1,6-krotnie większa, a po 48 godzinach – 1,5-krotnie wyższa.

Widoczne odstępstwa od tej zależności odnotowano dla stężenia 100 MBq/ml, przy którym po 72 godzinach inkubacji niespodziewanie zaobserwowano spadek intensywności pęknięć DNA. Warto jednak podkreślić, że dla tego samego stężenia, po 24 godzinach, intensywność pęknięć była wysoka i niemal równa wartości uzyskanej przy 200 MBq/ml.

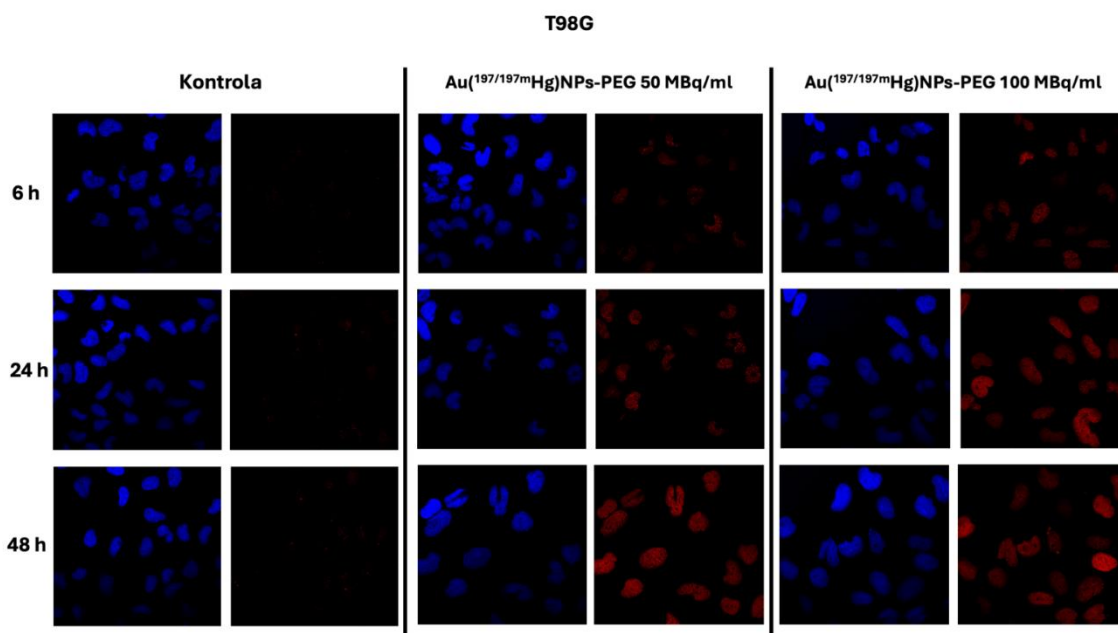
Efekt działania radiokoniugatu jest zauważalny już po 6 h dla wszystkich badanych stężeń i stopniowo zwiększa się wraz z czasem inkubacji.

Dla najwyższego badanego stężenia (200 MBq/ml) intensywność sygnału pęknięć DNA osiąga: po 6 godzinach – 39-krotność, po 24 godzinach – 63-krotność, a po 48 godzinach – aż 76-krotność wartości uzyskanej w grupie kontrolnej.



Rys. 75. Intensywność dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii T98G w stosunku do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h.

Preparat zawierający szkiełka z komórkami linii T98G traktowanymi radiokoniugatem Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 200 MBq/ml i czasie inkubacji 48 h uległ uszkodzeniu podczas przechowywania. Ze względu na wysokie koszty przeprowadzenia eksperymentu nie było możliwe jego powtórzenie, w związku z czym wyniki dla tej konkretnej próbki nie zostały uwzględnione w niniejszej pracy.



Rys. 76. Obrazy dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii T98G w porównaniu do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h. Jądra komórkowe oznaczono kolorem niebieskim, natomiast dwuniciowe pęknięcia DNA — kolorem czerwonym.

Dla linii komórkowej T98G również zaobserwowano wysoki poziom dwuniciowych pęknięć DNA w próbkach traktowanych radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG. Efekt ten nasilał się wraz ze wzrostem zarówno stężenia preparatu jak i czasu inkubacji. Dla najkrótszego czasu inkubacji (6 godzin) i najniższego badanego stężenia (50 MBq/ml) intensywność sygnału pochodzącego od dwuniciowych pęknięć DNA była 20-krotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Pozostawała ona na tym samym poziomie po 24 h, natomiast po 48 h wzrosła do 38-krotności względem grupy kontrolnej. Dla stężenia promieniotwórczego 100 MBq/ml intensywność sygnału po 6 h była 16-krotnie wyższa od wartości grupy kontrolnej i wykazywała dalszy wzrost osiągając 40-krotność po 24 h oraz 61-krotność po 48 h inkubacji. Najsilniejsze oddziaływanie radiobiokoniugatu odnotowano przy najwyższym badanym stężeniu (200 MBq/ml), dla którego już po 6 h intensywność sygnału wynosiła 27-krotność wartości kontrolnej, a po 24 h wzrastała do 57-krotności.

Dla obu badanych linii komórkowych zaobserwowano znacznie zwiększoną intensywność sygnałów pochodzących od dwuniciowych pęknięć DNA w porównaniu do grup kontrolnych. Siła działania radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG była zbliżona dla linii MDA-MB-231 i T98G. Dla punktów czasowych 6 h oraz 24 h silniejsze działanie zaobserwowano w przypadku komórek linii MDA-MB-231. Natomiast po 48 godzinach inkubacji intensywność efektu była porównywalna dla obu linii przy stężeniu 50 MBq/ml, a przy stężeniu 100 MBq/ml nieznacznie wyższa dla linii T98G. Ze względu na uszkodzenie próbki, nie uzyskano wyników dla stężenia 200 MBq/ml dla linii T98G po 48 godzinach inkubacji.

Uzyskane dane są zgodne z wynikami uzyskanymi metodą symulacji przez Moradiego i Bidabadiego, gdzie zastosowano model Monte Carlo Geant4-DNA w celu oszacowania ilości dwuniciowych pęknięć DNA na rozpad dla różnych radionuklidów emitujących elektrony Auger. W badaniu analizowano izotopy ^{123}I , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{111}In . Najwyższą wartość uzyskano dla ^{125}I (0,4–0,9 DSB/rozpad). Dane te stanowią podstawę teoretyczną dla skuteczności emiterów elektronów Augera w indukowaniu podwójnych pęknięć DNA, która została zaobserwowana w niniejszej pracy.³⁶⁷ Ponadto, uzyskane rezultaty są zgodne z danymi eksperymentalnymi wyznaczonymi przez Gharibkandi i współ., gdzie na linii komórkowej MDA-MB-231 badano AuNPs pokryte ^{109}Pd z przyłączonym panitumumabem. Potwierdzono indukcję DSB za pomocą barwienia γH2AX . Pomimo, że w opublikowanej pracy zastosowano panitumumab – przeciwciało specyficzne dla receptora EGF, użyty w niniejszej w pracy radiokoniugat wykazał porównywalną skuteczność, co wskazuje na możliwość efektywnego uszkodzenia DNA, nawet bez konieczności celowania za pośrednictwem receptora.³⁶⁸

Przeprowadzony eksperyment jednoznacznie potwierdził zdolność radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG do indukowania dwuniciowych pęknięć DNA zarówno w komórkach linii MDA-MB-231 jak i T98G. W związku z tym zdecydowano się na dalsze badania mające na celu dokładne poznanie mechanizmu jego działania z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej.

6.5.6. Badanie metodą cytometrii przepływowej

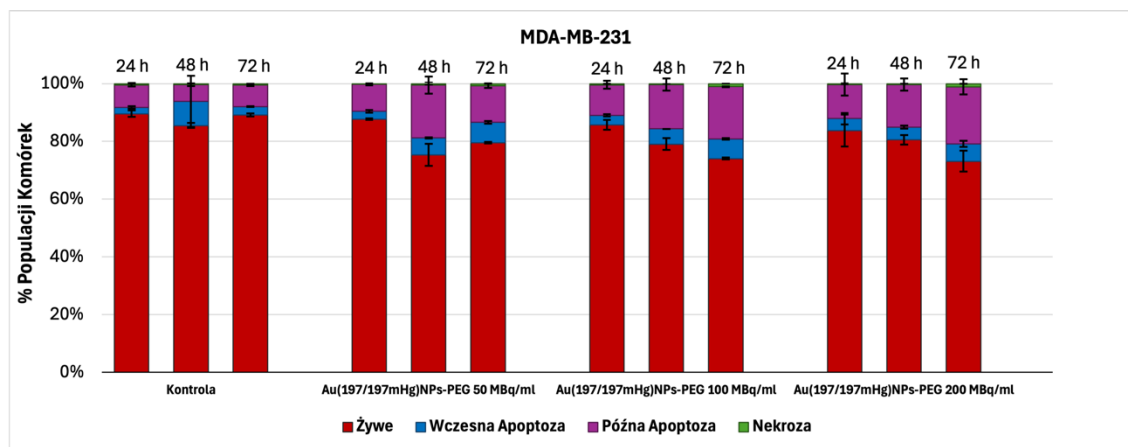
W celu pogłębienia wiedzy na temat mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej przez radiokoniugat $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG zastosowano metodę cytometrii przepływowej. Technika ta umożliwiła rozróżnienie poszczególnych frakcji populacji komórkowych – komórek żywych, apoptotycznych oraz nekrotycznych – a także pozwoliła na szczegółową analizę rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Badania przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G.

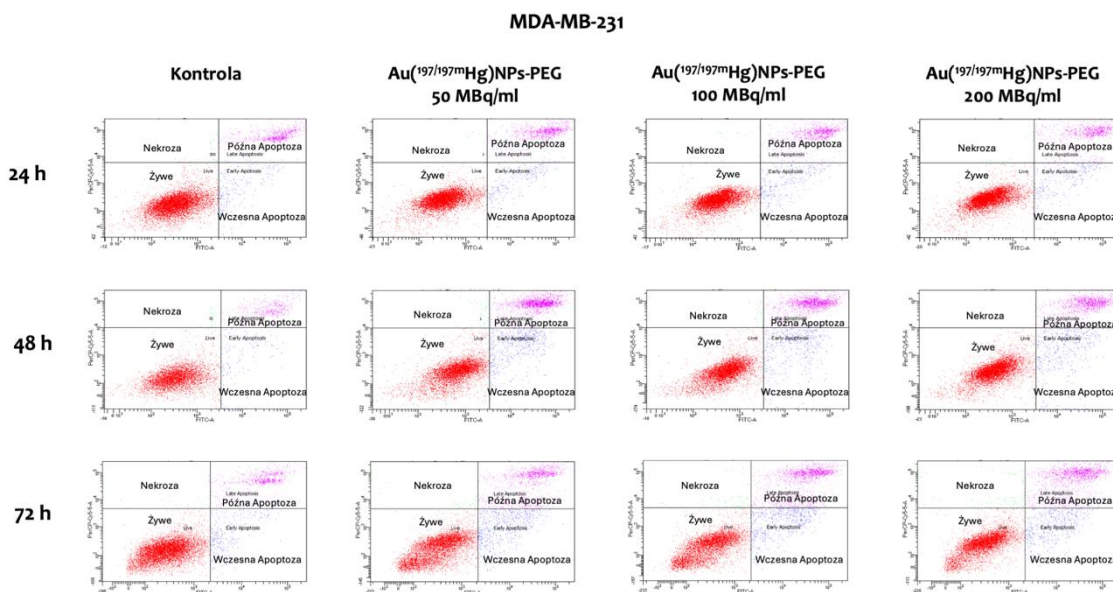
6.5.6.1. Badanie apoptozy

Badanie apoptozy przeprowadzono w celu identyfikacji mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej przez radiokoniugat $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG, w porównaniu do grupy kontrolnej obejmującej komórki nietraktowane nanocząstkami. Analizie poddano radiokoniugaty o stężeniach promieniotwórczych wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml. Przeprowadzono również analizę statystyczną porównującą wyniki uzyskane dla radiokoniugatów $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG z nieradioaktywnymi nanocząstkami opisanymi w rozdziale „4. Koniugat $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ ”. Rezultaty analizy przedstawiono na wykresach (Rys. 79, Rys. 82).

Szczegółowa procedura przygotowania próbek oraz przebieg analizy zostały przedstawione w rozdziale „3.5.7.7. Badanie apoptozy metodą cytometrii przepływowej”.



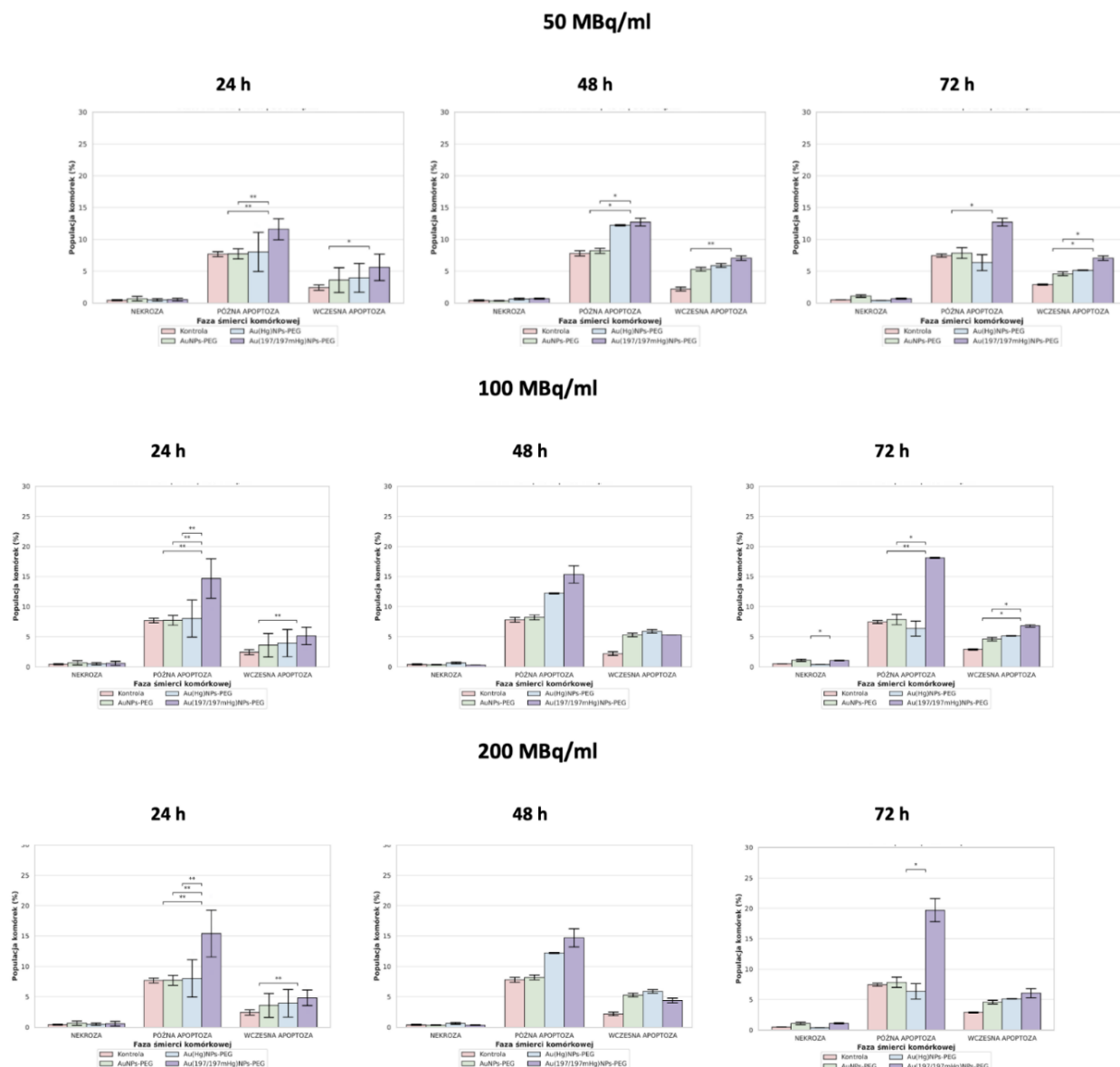
Rys. 77. Procentowy udział populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.



Rys. 78. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii MDA-MB-231 poddanej działaniu radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.

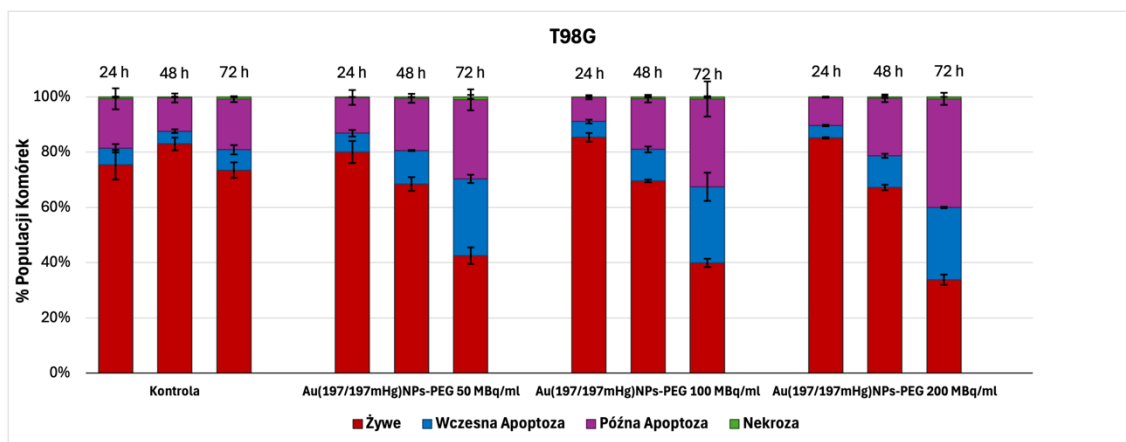
W wyniku działania radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$)NPs-PEG na komórki linii MDA-MB-231 zaobserwowano stopniowy spadek odsetka komórek żywych i ich przechodzenie do frakcji apoptotycznej (Rys. 77, Rys. 78). Efekt ten był wyraźnie zależny od czasu inkubacji oraz w mniejszym stopniu od stężenia promieniotwórczego. Dla najniższego stężenia (50 MBq/ml) badanego radiokoniugatu, po 24 h inkubacji stwierdzono, że $9,4 \pm 0,4\%$ komórek znajdowało się we frakcji późnej apoptozy, a $2,70 \pm 0,4\%$ we frakcji wczesnej apoptozy. W przypadku stężenia 100 MBq/ml wartości te wynosiły odpowiednio $10,6 \pm 1,3\%$ i $3,3 \pm 0,4\%$. Natomiast, dla najwyższego stężenia – 200 MBq/ml odsetek komórek w późnej apoptozie wzrósł do $11,8 \pm 3,8\%$, a we wczesnej apoptozie $4,4 \pm 0,6\%$.

Po 48 h inkubacji, frakcja późnej apoptozy wzrosła we wszystkich przypadkach o kilka punktów procentowych, osiągając maksimum po 72 h. Wówczas dla stężenia promieniotwórczego 50 MBq/ml udział komórek w późnej apoptozie wynosił $12,7 \pm 0,9\%$, dla 100 MBq/ml - ($15,4 \pm 2,1\%$), a dla 200 MBq/ml - $14,7 \pm 2,1\%$. Różnice względem grupy kontrolnej wyniosły odpowiednio 5,3; 8,0 oraz 7,3 p.p. Frakcja komórek we wczesnej apoptozie po 72 h utrzymywała się na zbliżonym poziomie dla wszystkich badanych stężeń promieniotwórczych i wynosiła od 6,1 do 7,1%, co stanowiło wzrost o 3,2 – 4,2 p.p. względem grupy kontrolnej. Frakcja komórek nekrotycznych we wszystkich analizowanych warunkach była niska i nie przekraczała 0,5%, z wyjątkiem najwyższego stężenia po 72 h inkubacji, gdzie osiągnęła wartość 1,1%. Wyniki te wskazują, że badany radiokoniugat nie indukuje procesu nekrozy w komórkach linii MDA-MB-MDA, lecz aktywuje programowaną śmierć komórkową (apoptozę), której stopień zależny jest od czasu inkubacji i nieznacznie zmienia się wraz ze stężeniem promieniotwórczym radiokoniugatu.

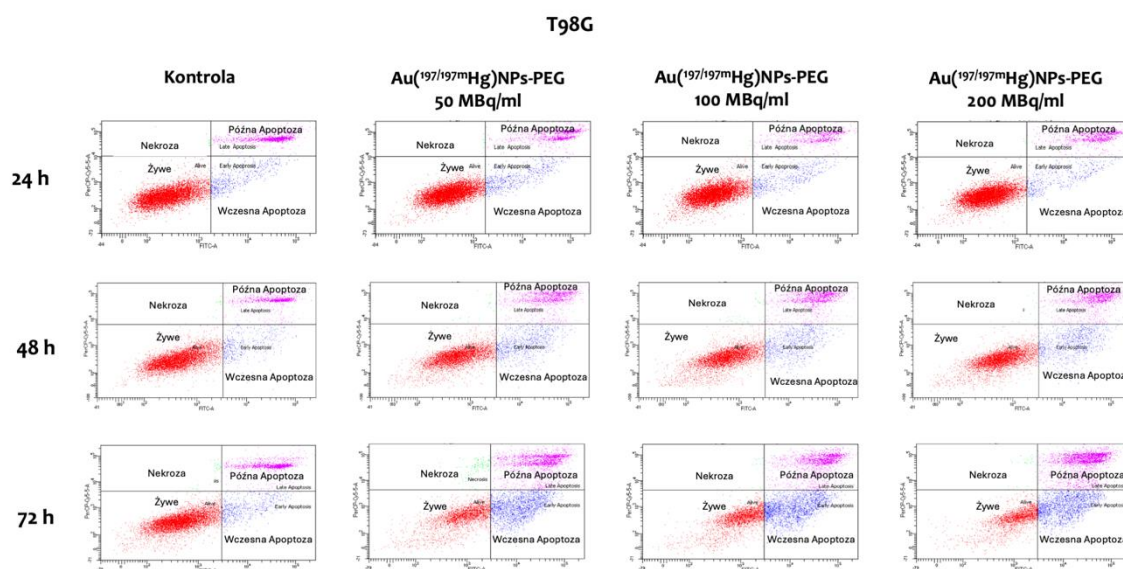


Rys. 79. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych nanocząstkami AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs-PEG oraz radiokoniugatem Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml a także komórek z grupy kontrolnej, w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.

Analiza statystyczna wykazała, że po 24 h inkubacji wystąpił istotny statystycznie wzrost udziału komórek we wczesnej apoptozie, szczególnie przy stężeniu 50 MBq/ml, w porównaniu do wszystkich grup kontrolnych. W przypadku nekrozy oraz późnej apoptozy również zaobserwowano zmiany, jednak ich istotność statystyczna była mniejsza. Po 48 h inkubacji, efekt proapoptotyczny utrzymywał się dla stężenia 50 MBq/ml ponownie odnotowano wyraźnie istotne statystycznie różnice względem wszystkich grup porównawczych. Po 72 godzinach inkubacji, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost odsetka komórek zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie apoptozy w grupach traktowanych stężeniami 50 MBq/ml oraz 100 MBq/ml.



Rys. 80. Procentowy udział populacji komórek linii T98G traktowanych radiokoniugatem $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.

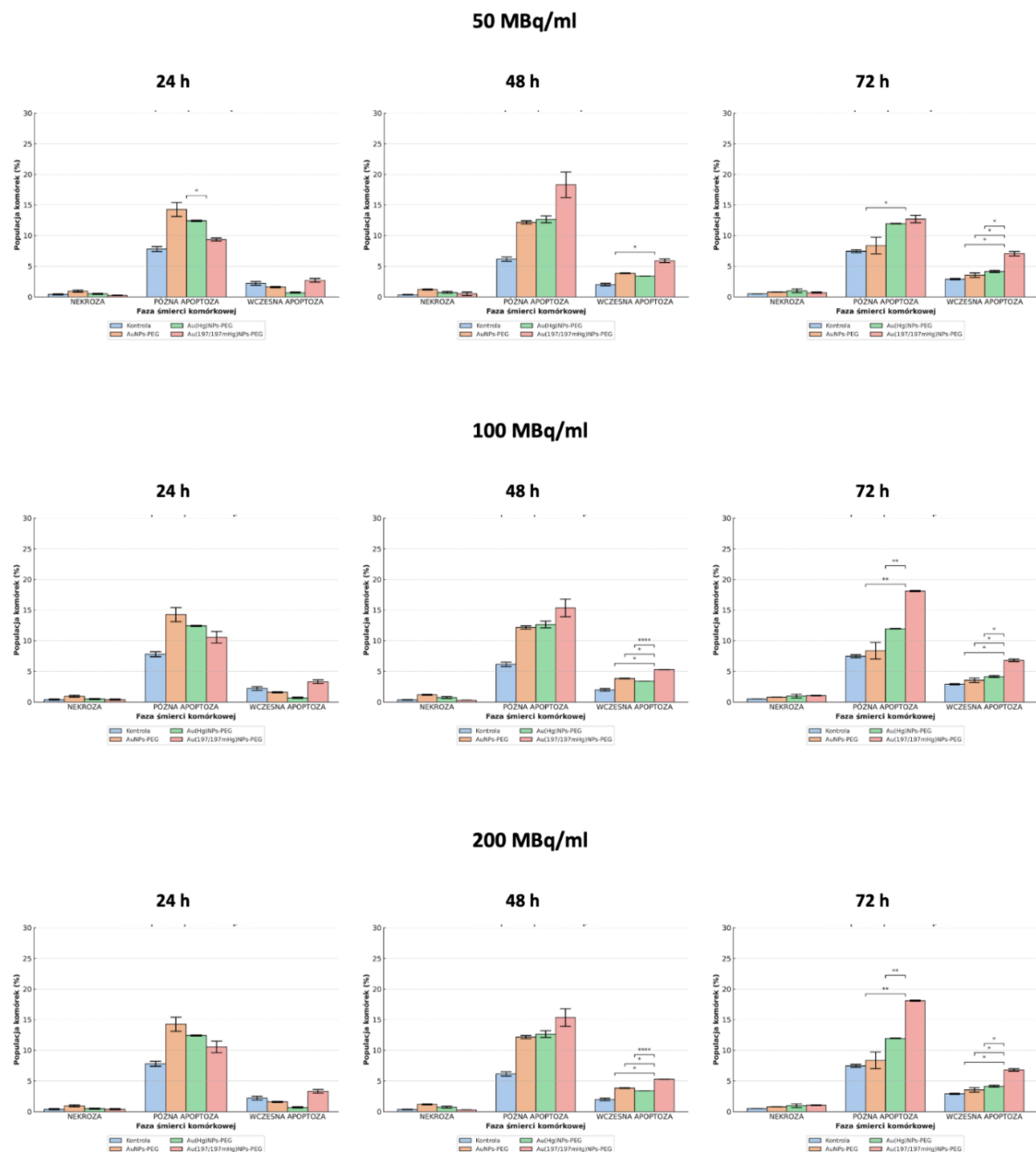


Rys. 81. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii T98G poddanej działaniu radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.

Znacznie większe różnice między komórkami traktowanymi radiokoniugatem a grupą kontrolną zaobserwowano w przypadku linii komórkowej T98G w porównaniu do linii MDA-MB-231. Dla komórek T98G (Rys. 80, Rys. 81) widoczna jest zależność wielkości populacji komórek żywych od czasu inkubacji przy jednoczesnej słabszej zależności od stężenia promieniotwórczego radiokoniugatu.

Po 24 h inkubacji nie zaobserwowano spadku odsetka komórek żywych w żadnej z badanych grup w porównaniu do grupy kontrolnej. Efekt ten pojawił się dopiero po 48 h i ulegał nasileniu wraz z wydłużeniem czasu inkubacji. Dla stężenia promieniotwórczego 50 MBq/ml po 48 h $18,7 \pm 1,6\%$ komórek znajdowało się we frakcji późnej apoptozy, natomiast po 72 h wartość ta wzrosła do $28,6 \pm 1,1\%$.

Podobny trend zaobserwowano dla wyższych stężeń. Dla stężenia 100 MBq/ml frakcja późnej apoptozy wzrosła z $18,4 \pm 1,4\%$ po 48 h do $31,8 \pm 6,4\%$ po 72 h. Najsilniejszy efekt stwierdzono dla najwyższego badanego stężenia promieniotwórczego 200 MBq/ml, gdzie frakcja późnej apoptozy po 48 h wynosiła $20,8 \pm 1,4\%$, a po 72 h osiągnęła $39,4 \pm 1,5\%$. Rozkład populacji komórek po 72 h inkubacji z radiokoniugatem o stężeniu 200 MBq/ml przedstawiał się następująco: $33,8 \pm 1,8\%$ komórek pozostało żywych, $26,2 \pm 0,3\%$ komórek znajdowało się we frakcji wczesnej apoptozy, a $39,4 \pm 2,2\%$ we frakcji późnej apoptozy. Dla porównania, w grupie kontrolnej po tym samym czasie $73,5 \pm 2,8\%$ komórek pozostało żywych, $7,4 \pm 1,7\%$ znajdowało się we frakcji wczesnej apoptozy, a $18,4 \pm 1,1\%$ – we frakcji późnej apoptozy. Frakcja komórek nekrotycznych we wszystkich analizowanych warunkach, zarówno w grupach eksperymentalnych, jak i kontrolnej, utrzymywała się na niskim poziomie ($\leq 1,1\%$). Wyniki te wskazują, że badany radiokoniugat indukuje śmierć komórek linii T98G głównie na drodze apoptozy, bez istotnej aktywacji ścieżki nekrotycznej.



Rys. 82. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii T98G traktowanych nanocząstkami AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs-PEG oraz radiokoniugatem Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml a także komórek z grupy kontrolnej, w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.

Analiza statystyczna dla linii T98G wykazała, że po 24 h zmiany w zakresie apoptozy i nekrozy były niewielkie i w większości przypadków nie osiągały poziomu istotności statystycznej. Wyjątek stanowiła późna apoptoza przy stężeniu 50 MBq/ml, gdzie odnotowano umiarkowany wzrost w porównaniu

do grupy kontrolnej. Po 48 h inkubacji zauważono zwiększenie efektu, jednakże nie był on jednolicie istotny statystycznie. Natomiast po 72 h inkubacji zaobserwowano istotne statystycznie różnice dla wczesnej apoptozy we wszystkich badanych stężeniach.

Podsumowując, po 72 godzinach inkubacji wyższy odsetek komórek żywych zaobserwowano w linii MDA-MB-231 w porównaniu do linii T98G. Różnica pomiędzy badanymi liniami komórkowymi, nawet po uwzględnieniu różnic w żywotności grup kontrolnych (różnica wynosząca 16,8 p.p. na korzyść MDA-MB-231), wynosiła 22,5 p.p. Dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 200 MBq/ml wzrost udziału komórek w frakcji późnej apoptozy względem grupy kontrolnej wynosił po 72 godzinach inkubacji 20,0 p.p. w linii T98G, podczas gdy w przypadku linii MDA-MB-231 było to jedynie 13,5 p.p. Ponadto, różnice między liniami dla frakcji wczesnej apoptozy wynosiły aż 21,5 p.p. Linia T98G charakteryzowała się więc znacznie większym udziałem komórek we wczesnej apoptozie po traktowaniu radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$. W obu liniach komórkowych udział komórek w stanie nekrozy pozostał znikomy i nie przekraczał 1,1%, co sugeruje, że radiokoniugat nie indukuje śmierci nekrotycznej.

Obserwowany efekt indukcji apoptozy jest zgodny z danymi opublikowanymi dla innych radionuklidów emitujących elektrony Auger. Schmitz i współ. wykazali znaczącą indukcję apoptozy w ludzkich limfocytach krwi obwodowej po włączeniu $^{125}\text{I}]\text{UdR}$, po 70 godzinach inkubacji poziom późnej apoptozy wyniósł 27%.³⁶⁹ Ponadto, Sankaranarayanan i współ. opisali wyraźnie nasilony proces apoptozy w liniach komórek potrójnie ujemnego raka piersi po zastosowaniu znakowanego ^{125}I inhibitora PARP, $^{125}\text{I}]\text{I-PARPi-01}$.³⁶⁹

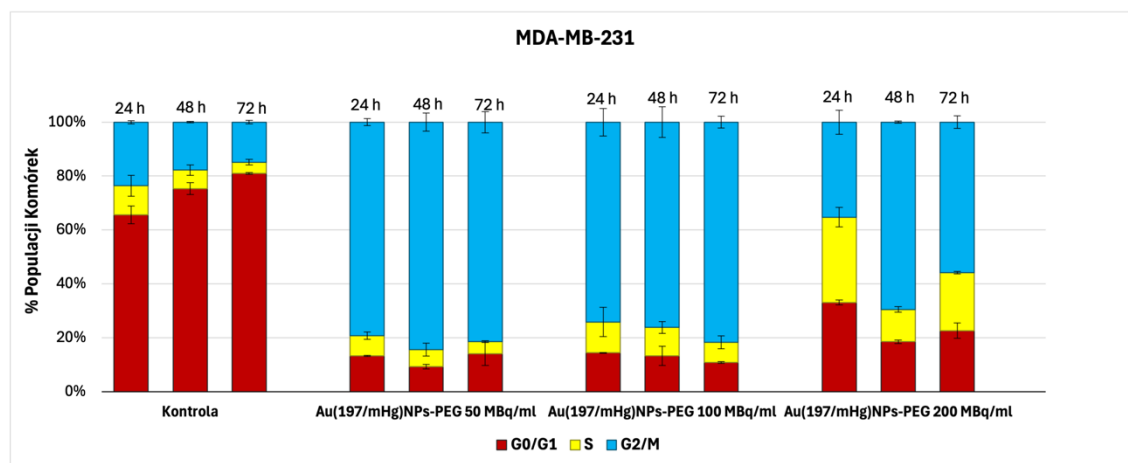
Zarówno w przypadku linii T98G, jak i MDA-MB-231, obserwowano wyraźny efekt zależności odpowiedzi komórek od czasu inkubacji oraz — w nieco mniejszym stopniu — od stężenia promieniotwórczego radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$.

6.5.6.2. Badanie cyklu komórkowego

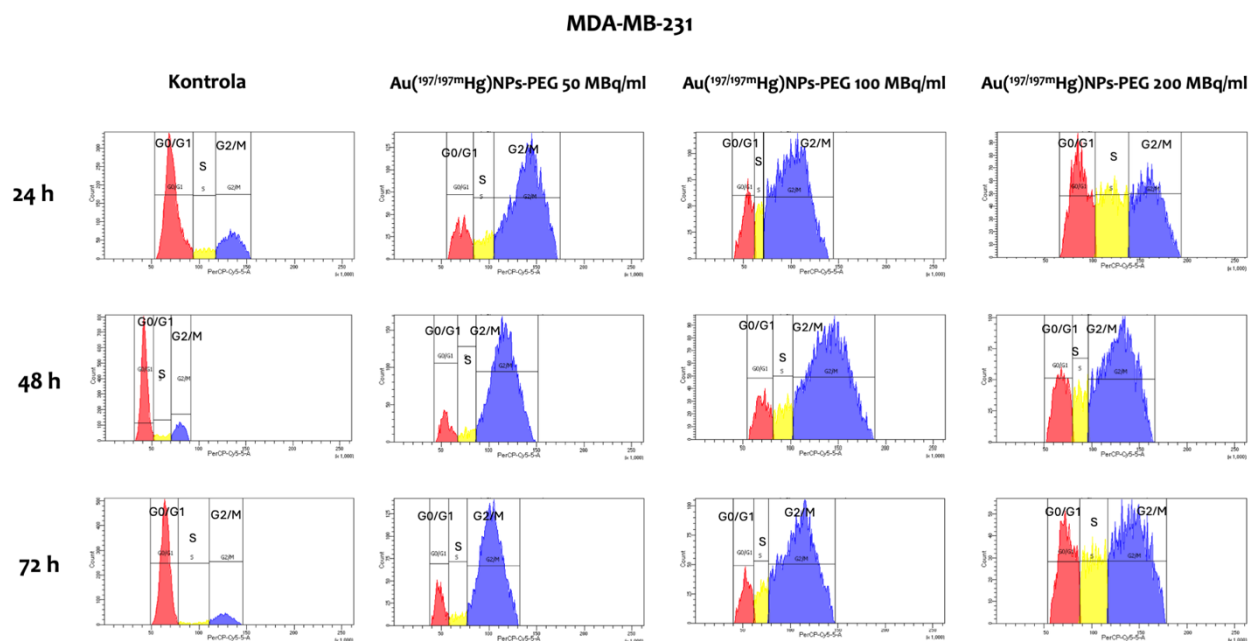
Metoda cytometrii przepływowej została również zastosowana do analizy wpływu radiokoniugatów na rozkład faz cyklu komórkowego w liniach MDA-MB-231 oraz T98G. Badaniu poddano trzy stężenia promieniotwórcze radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$, 200 MBq/ml, 100 MBq/ml oraz 50 MBq/ml.

Szczegółowy opis przygotowania próbek oraz ich analizy przedstawiono w rozdziale 3.5.7.8. Badanie cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w formie wykresów obrazujących zależność procentowego udziału komórek w poszczególnych fazach cyklu od zastosowanego stężenia promieniotwórczego radiokoniugatu i czasu (Rys. 83, Rys. 84), a także w postaci wykresów reprezentatywnych (Rys. 85, Rys. 86) dla obu linii komórkowych.

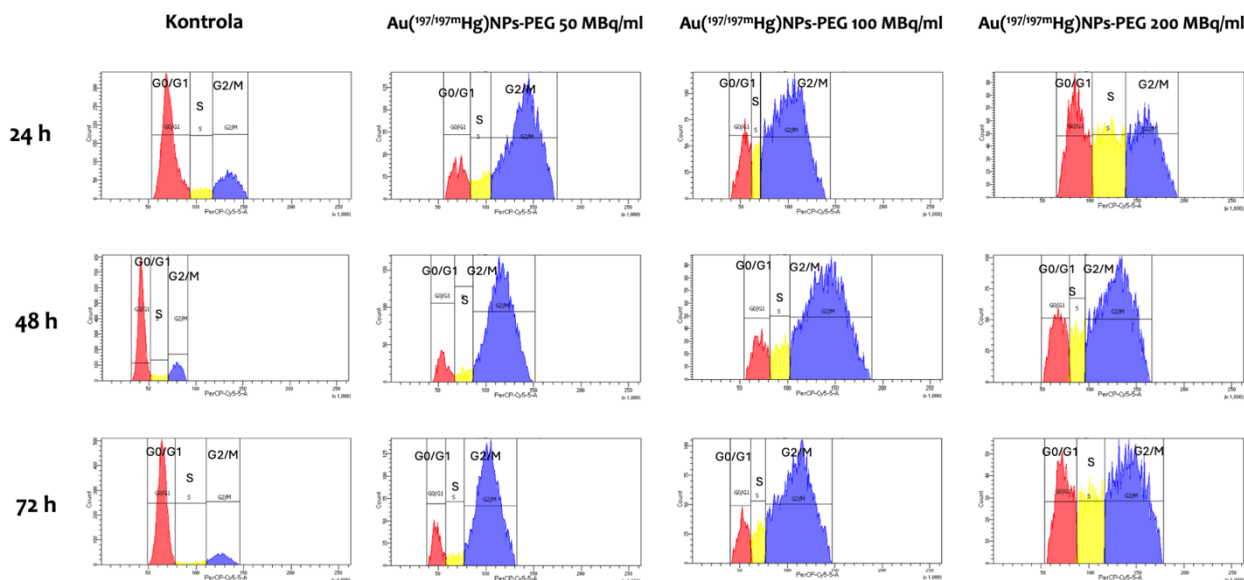


Rys. 83. Procentowy rozkład populacji komórek linii MDA-MB-231 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rys. 84. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii MDA-MB-231 po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.

MDA-MB-231

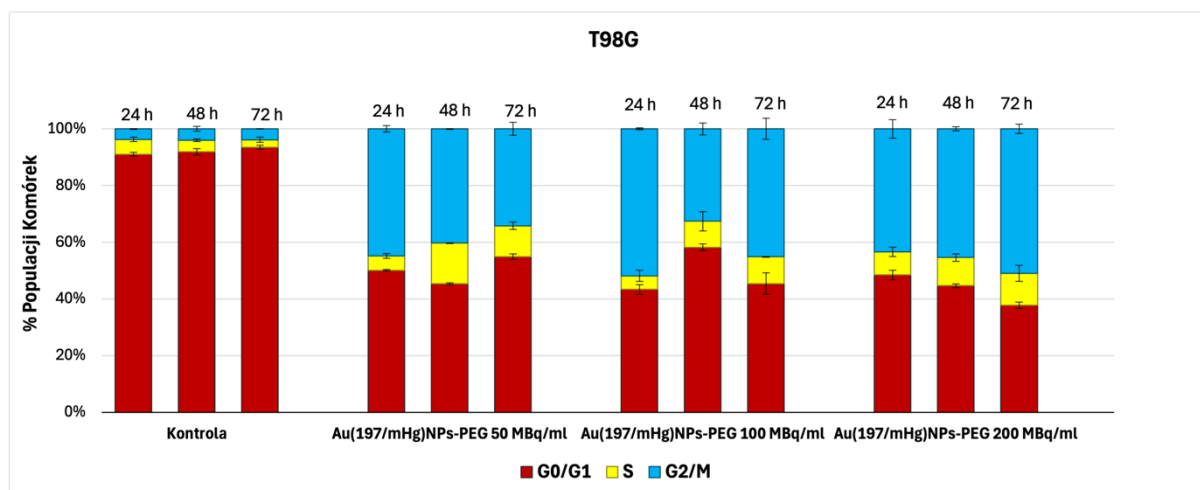


Rys. 84 przedstawiających wyniki eksperymentu dla linii komórkowej MDA-MB-231, widoczna jest wyraźna zmiana rozkładu faz cyklu komórkowego już po 24 h inkubacji z radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197\text{Hg})}\text{NPs-PEG}$. Efekty działania badanego związku istotnie różnią się w porównaniu do grupy kontrolnej. W komórkach grupy kontrolnej większość populacji znajduje się w fazie G0/G1, z udziałem wynoszącym od $65,5 \pm 3,2\%$ do $81,0 \pm 0,3\%$ - wartości te rosną wraz z czasem inkubacji. Jednocześnie obserwuje się stopniowy spadek udziału komórek w fazach S oraz G2/M, który mieści się odpowiednio w przedziale $4,2 \pm 1,0\%$ – $10,8 \pm 3,8\%$ dla fazy S oraz $14,9 \pm 0,6\%$ – $23,6 \pm 0,6\%$ dla fazy G2/M.

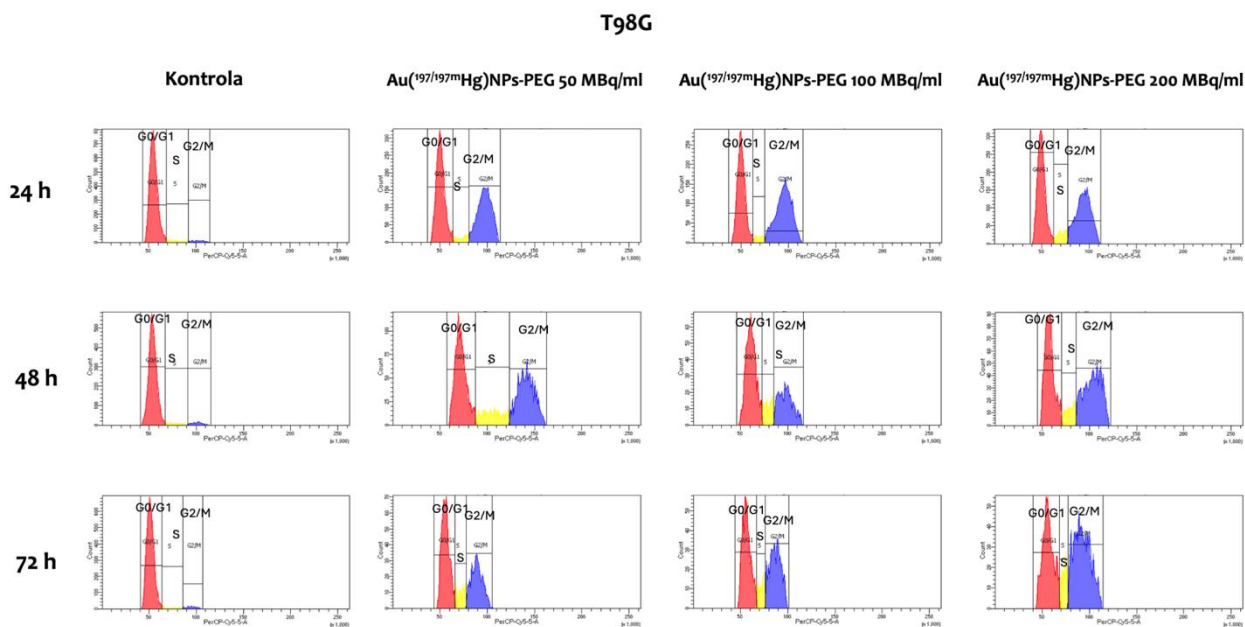
Już przy najniższym stężeniu promieniotwórczym (50 MBq/ml) po 24 h inkubacji dochodzi do zaburzeń cyklu komórkowego – udział komórek w fazie G0/G1 spada do $13,3 \pm 0,2\%$, a w fazie S do $7,5 \pm 1,4\%$. Jednocześnie obserwowany jest znaczny wzrost populacji w fazie G2/M do $79,2 \pm 1,3\%$. Po 72 h wartości te zmieniają się jedynie nieznacznie i wynoszą odpowiednio: $14,0 \pm 4,2\%$ dla fazy G0/G1, $4,6 \pm 0,4\%$ dla fazy S oraz $81,5 \pm 4,0\%$ dla fazy G2/M.

Podobny rozkład faz cyklu obserwowany jest także dla stężenia promieniotwórczego 100 MBq/ml. Po 72 h inkubacji: $10,8 \pm 0,3\%$ komórek znajduje się w fazie G0/G1, $7,5 \pm 2,4\%$ w fazie S, a $81,8 \pm 2,2\%$ w fazie G2/M.

Wraz ze wzrostem stężenia radiokoniugatu do 200 MBq/ml zwiększa się udział komórek w fazie S. Dla tego stężenia faza S osiąga największe wartości, wynoszące od $12,0 \pm 1,1\%$ do $31,7 \pm 3,6\%$ w zależności od czasu inkubacji, przy czym udział ten maleje wraz z jego wydłużeniem. Jednocześnie, udział komórek w fazie G2/M wzrasta z $35,3 \pm 4,5\%$ po 24 h do $55,9 \pm 2,3\%$ po 72 h inkubacji. Największe różnice względem grupy kontrolnej w zakresie faz G0/G1 oraz G2/M zaobserwowano przy stężeniach promieniotwórczych 50 MBq/ml oraz 100 MBq/ml. Natomiast najbardziej wyraźną zmianę w fazie S odnotowano dla stężenia promieniotwórczego 200 MBq/ml, gdzie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej wyniosły od 5,1 do 20,9 p.p.



Rys. 85. Procentowy rozkład populacji komórek linii T98G w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$)NPs-PEG o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rys. 86. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii T98G po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$)NPs-PEG o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.

Dla linii komórkowej T98G (Rys. 85, Rys. 86) charakterystyczne są wyraźnie węższe piki na wykresach reprezentatywnych (Rys. 86) w porównaniu do linii MDA-MB-231, co sugeruje większą jednorodność populacji komórkowej. Ponadto, na wykresach obserwuje się istotnie niższy udział komórek w fazach S oraz G2/M. W grupie kontrolnej zdecydowana większość komórek znajduje się w fazie G0/G1, w zakresie od $90,9 \pm 0,6\%$ do $93,4 \pm 0,8\%$. Udział frakcji w fazie S wynosi od $2,7 \pm 0,9\%$ do $5,3 \pm 0,8\%$ i jest o 1,5 - 5,5 p.p. niższy niż w przypadku linii MDA-MB-231. Również frakcja komórek w fazie G2/M pozostaje niska - od $3,7 \pm 0,1\%$ do $4,0 \pm 0,9\%$ - co stanowi różnicę 11,0 - 19,9 p.p. w porównaniu z linią

MDA-MB-231. Warto podkreślić, że w przeciwieństwie do linii MDA-MB-231, rozkład faz cyklu komórkowego w grupie kontrolnej dla linii T98G pozostaje stosunkowo stabilny w czasie.

Ponadto, po dodaniu badanego radiokoniugatu do komórek linii T98G obserwuje się mniej dynamiczne zmiany w rozkładzie faz cyklu komórkowego niż w przypadku linii MDA-MB-231. Udział komórek w fazie S nieznacznie wzrasta, osiągając $5,0 \pm 0,9\%$ po 24 h, $14,3 \pm 0,1\%$ po 48 h oraz $10,9 \pm 1,3\%$ po 72 h dla stężenia 50 MBq/ml, a podobne wartości odnotowano także dla pozostałych stężeń. Znaczące zmiany dotyczą przede wszystkim spadku udziału komórek w fazie G0/G1. Dla wszystkich badanych stężeń i czasów udział ten znajduje się w przedziale $37,7 \pm 1,1\% - 58,3 \pm 1,2\%$ i osiąga najniższą wartość przy najwyższym stężeniu 200 MBq/ml. Podobna wielkość populacji została zaobserwowana dla fazy G2/M – $32,6 \pm 2,1\% - 51,9 \pm 0,4\%$, jednak nie wykazuje wyraźnych zależności od stężenia ani czasu inkubacji. Dla najwyższego badanego stężenia - 200 MBq/ml po 72 h inkubacji rozkład populacji komórek między fazami cyklu wynosi: $37,7 \pm 1,1\%$ w fazie G0/G1, $11,3 \pm 2,8\%$ w fazie S oraz $51,0 \pm 1,6\%$ G2/M. W porównaniu z grupą kontrolną oznacza to odpowiednio różnice wynoszące: 39,4 p.p., 8,6 p.p. oraz 47,1 p.p. Działanie radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG powoduje głównie zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, przy jednoczesnym spadku liczby komórek w fazie G0/G1 oraz umiarkowanym zwiększeniu udziału fazy S.

Zastosowanie radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG wywołuje wyraźne zmiany w rozkładzie faz cyklu komórkowego w obu badanych liniach komórkowych. Głównym obserwowanym efektem jest przejście komórek z fazy G0/G1 do fazy G2/M, co świadczy o zatrzymaniu cyklu komórkowego w tej fazie. Zmiany te są częściowo zależne od czasu inkubacji oraz stężenia radiokoniugatu, choć efekt ten jest bardziej wyraźny dla linii MDA-MB-231. W przypadku linii T98G odpowiedź komórek jest mniej dynamiczna — zmiany w rozkładzie faz cyklu są bardziej stabilne i wykazują słabsze zależności od czasu i stężenia. Mimo to, również dla tej linii obserwuje się istotne różnice pomiędzy komórkami traktowanymi radiokoniugatem a grupą kontrolną.

Obserwacje są zgodne z wcześniej opublikowanymi badaniami nad radiofarmaceutykami emitującymi elektrony Augera. Sankaranarayanan i współ. również zaobserwowali zatrzymanie komórek potrójnie ujemnego raka piersi w fazie G2/M po dodaniu ^{125}I I-PARPi-01.³⁷⁰ Schmitz i współ. również zaobserwowali zakłócenie cyklu komórkowego i akumulację w fazach S i G2/M po potraktowaniu komórek limfocytów ludzkich związkiem ^{125}I UdR.³⁶⁹

Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że radiokoniugat $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG wpływa na mechanizmy regulujące cykl komórkowy, prowadząc do jego zaburzeń, co może być istotnym elementem jego potencjalnego działania terapeutycznego.

6.6. *Badania ex vivo na myszach*

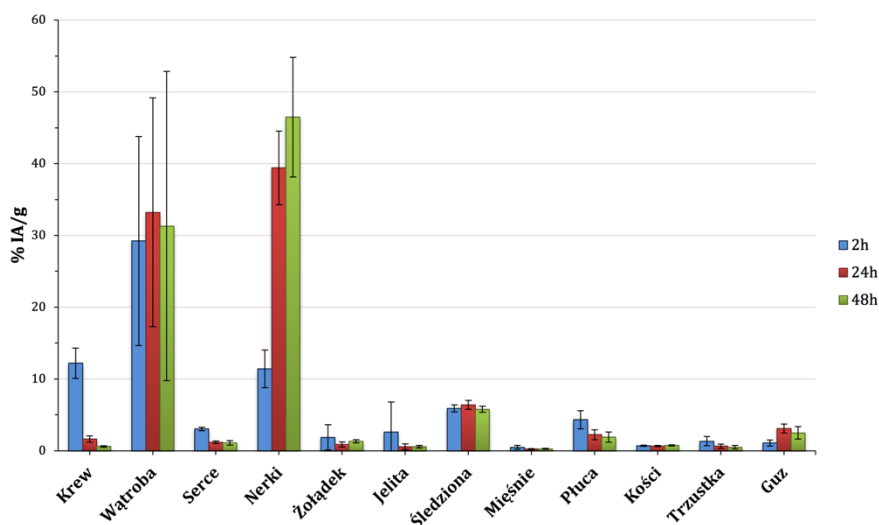
Ze względu na bardzo duży potencjał terapeutyczny radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG zaprezentowany w poprzednich rozdziałach, podjęto decyzję o przeprowadzeniu dalszych badań *ex vivo* na modelu zwierzęcym.

Do eksperymentów na zwierzętach wybrano linię komórkową potrójnie ujemnego mysiego raka piersi - 4T1. Badania przeprowadzono w ośrodku badawczym Institute of Nuclear & Radiological Sciences and Technology, Energy & Safety (INRASTES) w Atenach, we współpracy z dr Penelope Bouziotis.

6.6.1. Badanie biodystrybucji

Badanie biodystrybucji przeprowadzono dla dwóch sposobów podania radiokoniugatu: podania dożylnego oraz bezpośredniego wstrzyknięcia do guza, zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 3.5.7.9. Badanie biodystrybucji *ex vivo* na myszach. Każda z myszy otrzymała radiokoniugat o aktywności około 4 MBq, w objętości 50/100 μ l, w zależności od zastosowanej metody podania.

Wyniki badania biodystrybucji przedstawiono jako procent wstrzykniętej aktywności na gram tkanki (%IA/g $\pm$ SD), przy zastosowaniu odpowiednio przygotowanej próbki odniesienia jako standardu. Zależność wartości %IA/g od czasu oraz rodzaju analizowanej tkanki/narządu zaprezentowano w formie wykresów zarówno dla podania dożylnego (Rys. 87), jak i dla aplikacji bezpośrednio do guza (Rys. 88).



Rys. 87. Biodystrybucja radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ (%IA/g) w zależności od czasu w wybranych narządach/tkankach po podaniu dożylnym.

Po dożylnym podaniu radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$, już po dwóch godzinach zaobserwowano wyraźną akumulację aktywności w wątrobie i nerkach, odpowiednio na poziomie $29,23 \pm 14,55\%$ oraz $11,4 \pm 2,63$ %IA/g. Dominujące nagromadzenie w wątrobie jest typowym zjawiskiem obserwowanym w badaniach biodystrybucji nanocząstek, jak wykazano m. in. przez Kozics i współ.³⁷¹ dla nanocząstek pokrytych PEG-iem (5 kDa). Wysoka akumulacja w tym narządzie odzwierciedla jego kluczową rolę w usuwaniu nanocząstek z organizmu, co przypisuje się aktywności komórek siateczkowo-śródbłonkowych wątroby, które są wyspecjalizowane w fagocytozie cząstek obcego pochodzenia. Wysoki poziom gromadzenia się radiokoniugatu w wątrobie utrzymywał się we wszystkich analizowanych punktach czasowych.

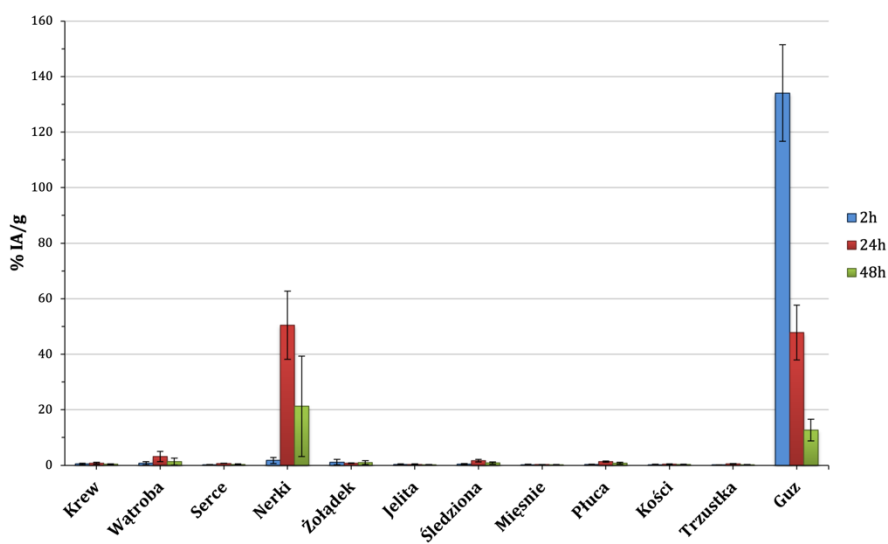
W nerkach natomiast zaobserwowano stopniowy wzrost akumulacji radiokoniugatu, który po 48 h osiągnął wartość $46,49 \pm 8,35$ %IA/g, co wskazuje na istotną rolę tego narządu w eliminacji nanocząstek o niewielkich rozmiarach z organizmu.^{371,372}

Zauważono również gromadzenie się radiokoniugatu w śledzionie, co jest zgodne z jej rolą w filtrowaniu krwi i wychwytywaniu nanocząstek.^{371,372} Poziom akumulacji w tym narządzie pozostawał stabilny przez cały czas trwania eksperymentu i wynosił średnio $6,03 \pm 0,51$ %IA/g.

W płucach natomiast odnotowano początkową akumulację radiokoniugatu, po 2 h na poziomie $4,33 \pm 1,26\%$, co jest najprawdopodobniej spowodowane zatrzymywaniem cząstek w naczyniach krwionośnych płuc.³⁷¹ Poziom ten uległ obniżeniu w czasie i po 48 h osiągnął wartość $1,91 \pm 0,72\%$ IA/g.

Akumulacja nanocząstek w guzie była niska i po 24 h wynosiła $3,11 \pm 0,62\%$ IA/g, co było spodziewanym efektem wynikającym z braku biomolekuły naprowadzającej w strukturze radiokoniugatu.

Podsumowując, radiokoniugat $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG po dożylnym podaniu wykazywał dominującą akumulację w wątrobie, nerkach oraz śledzionie, co jest zgodne z mechanizmami biodystrybucji PEG-yłowanych nanocząstek.^{371,372} Wzrost gromadzenia w nerkach w czasie eksperymentu sugeruje kluczową rolę tego narządu w eliminacji radiokoniugatu z organizmu.



Rys. 88. Biodystrybucja radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG (%IA/g) w zależności od czasu w wybranych narządach/tkankach po bezpośrednim wstrzyknięciu do guza.

Po bezpośrednim wstrzyknięciu radiokoniugatu do guza, co jest docelową metodą podania, zaobserwowano jego główną akumulację w guzie oraz wzrastające w czasie gromadzenie się w nerkach wynikające z dominującej drogi eliminacji związku z organizmu.^{371,372}

Już 2 h po podaniu akumulacja $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG w guzie wynosiła $134,04 \pm 17,38\%$ IA/g. Z czasem jednak obserwowano istotny spadek tej wartości - po 24 h wynosiła ona $47,82 \pm 9,91\%$ IA/g, a po 48 h $12,72 \pm 3,90\%$ IA/g.

Jednocześnie odnotowano wzrost akumulacji radiokoniugatu w nerkach, gdzie procent wstrzykniętej aktywności na gram tkanki zwiększył się z $1,72 \pm 1,09\%$ IA/g po 2 h do $50,41 \pm 12,29\%$ IA/g po 24 h. Następnie, ze względu na eliminację z organizmu, wartość ta spadła do $21,28 \pm 18,09\%$ IA/g. Uzyskane wyniki wskazują, że badany radiokoniugat jest szybko wydalany z organizmu za pośrednictwem nerek.

Retencję nanocząstek w guzie można potencjalnie zwiększyć poprzez zwiększenie ich rozmiaru, jednak modyfikacja ta może ograniczać ich zdolność do penetracji jądra komórkowego, co w konsekwencji mogłoby obniżyć ich skuteczność terapeutyczną. Alternatywnie, wiele zespołów badawczych stosowało biomolekuły naprowadzające w celu zwiększenia akumulacji w guzie.^{288,373,374} Warto jednak zaznaczyć, że w badaniu przeprowadzonym przez grupę R. Reilly na myszach z modelem potrójnie ujemnego raka piersi

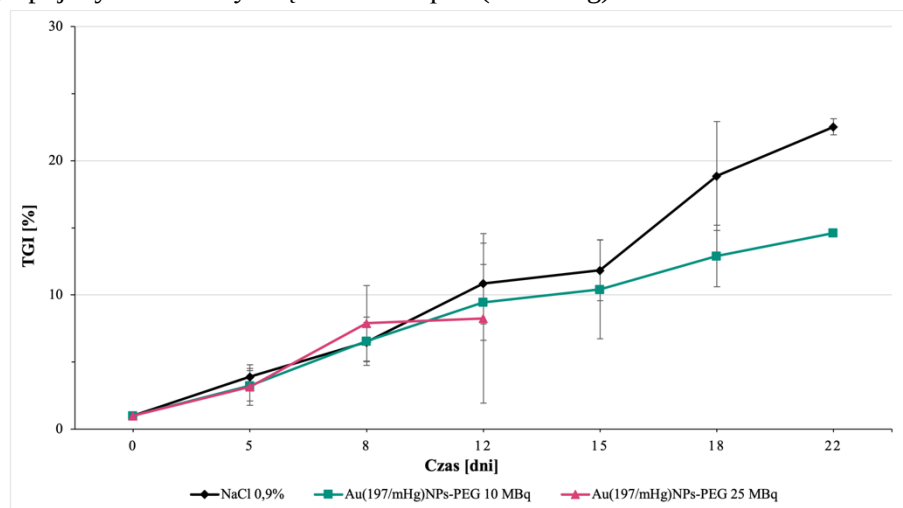
(linia MDA-MB-468) po bezpośrednim podaniu do guza nanocząstek z panitumumabem nie uzyskano większej retencji w porównaniu do nanocząstek bez wektora.²⁷⁷

Tym samym, nanocząstki pozbawione wektora wykazują istotną zaletę - możliwość zastosowania w nanobrachyterapii nowotworów o zróżnicowanym profilu molekularnym i fenotypowym.^{8 4}

6.6.2. Badanie efektywności terapeutycznej

Skuteczność terapeutyczną radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG określono poprzez obliczenie wskaźnika wzrostu guza (*ang. Tumor Growth Index*; TGI) dla trzech grup myszy CFW (*ang. Carworth Farms White*) z wszczepionym guzem nowotworowym linii 4T1, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.5.7.10. Badanie efektywności terapeutycznej *ex vivo* na myszach.

Eksperyment był prowadzony przez 22 dni od momentu podania radiokoniugatu bezpośrednio do guza. Myszy z grupy kontrolnej (grupa pierwsza) otrzymały pojedyncze wstrzyknięcie 50 μl soli fizjologicznej (Rys. 89, wykres czarny). Druga grupa otrzymała wstrzyknięcie 50 μl radiokoniugatu o aktywności 10 MBq $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG (Rys. 89, wykres zielony), natomiast grupa trzecia (Rys. 89, czerwony wykres) - pojedyncze wstrzyknięcie 25 MBq $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG.



Rys. 89. Wykresy zależności wskaźnika wzrostu guza od czasu oraz rodzaju preparatu podanego myszom w badaniu efektywności terapeutycznej.

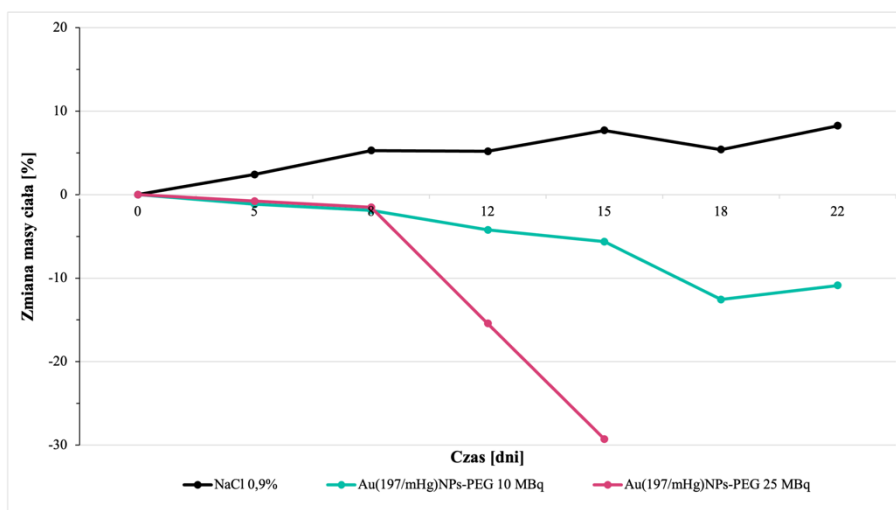
W ciągu pierwszych ośmiu dni eksperymentu zaobserwowano wzrost wskaźnika wzrostu guza (TGI) we wszystkich badanych grupach. W 12. dniu nastąpiło nieznaczne obniżenie wartości TGI w grupach leczonych radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG, przy czym efekt ten był zależny od zastosowanej aktywności promieniotwórczej. Dla grupy otrzymującej dawkę 10 MBq zaobserwowano spadek wskaźnika o 13 p.p. względem grupy kontrolnej, natomiast w przypadku dawki 25 MBq – o 24 p.p.

W kolejnych dniach, gdy w badaniu pozostały tylko dwie grupy myszy, (kontrola oraz leczona 10 MBq) wartości wskaźnika TGI dla grupy kontrolnej rosły, podczas gdy w grupie leczonej obserwowano ich spadek.

W 18. dniu różnica TGI pomiędzy grupami wyniosła 32 p.p., a po 22 dniach osiągnęła 35 p.p. Wyniki te wskazują, że terapeutyczny efekt działania radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o aktywności 10 MBq zaczynał być wyraźnie widoczny od 18. dnia eksperymentu.

W 22. dniu eksperymentu, ze względu na śmierć niemal wszystkich myszy z grup leczonych radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ oraz znaczne powiększenie objętości guza u myszy z grupy kontrolnej, podjęto decyzję o zakończeniu badania.

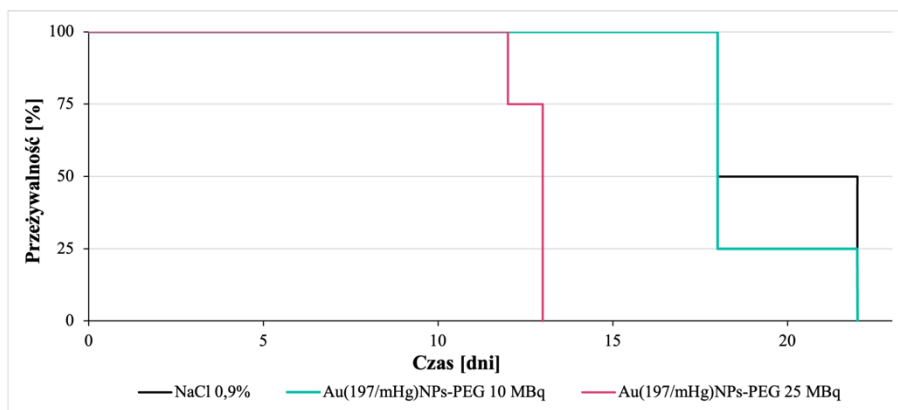
Utrata masy ciała jest istotnym wskaźnikiem toksyczności, z tego powodu masa ciała zwierząt uczestniczących w badaniu skuteczności terapeutycznej była monitorowana dwukrotnie w ciągu każdego tygodnia trwania eksperymentu. Wyniki pomiarów przedstawiono na wykresie poniżej (Rys. 89).



Rys. 90. Zależność masy ciała od czasu oraz rodzaju preparatu podanego myszom w badaniu efektywności terapeutycznej.

Zaobserwowano nieznaczny wzrost masy ciała u myszy z grupy kontrolnej – o $8,24 \pm 3,15\%$ po 22 dniach trwania eksperymentu. Natomiast u zwierząt leczonych radiokoniugatami w obu badanych aktywnościach promieniotwórczych stwierdzono spadek masy ciała. Już po 12 dniach od podania radiokoniugatu zaobserwowano istotne zmniejszenie masy ciała myszy z obu grup leczonych - średnio o $9,83 \pm 3,91\%$ względem ich masy początkowej. W przypadku aktywności 25 MBq efekt ten szybko się pogłębiał osiągając $29,27 \pm 3,38\%$ spadku w 15. dniu badania. Dla niższej aktywności 10 MBq utrata masy ciała była wolniejsza - w 15. dniu wynosiła $5,63 \pm 2,09\%$ – jednakże nasilała się z czasem, przekraczając 10,8% w ostatnim dniu eksperymentu.

Równolegle monitorowano także przeżywalność myszy we wszystkich grupach (Rys. 91).



Rys. 91. Przeżywalność myszy objętych badaniem skuteczności terapeutycznej w zależności od czasu oraz rodzaju podanego preparatu.

W grupie kontrolnej 2 myszy zostały humanitarnie uśmiercone w dniu 18, a kolejne dwie w dniu 22 z powodu przekroczenia dopuszczalnej objętości guza ($>2 \text{ cm}^3$).

W grupie terapeutycznej z zastosowaną aktywnością 10 MBq jedna mysz została uśmiercona w dniu 18, również z powodu nadmiernego wzrostu guza, natomiast dwie kolejne znaleziono martwe w dniu 22. Czwartą mysz z tej grupy uśmiercono, zgodnie z harmonogramem zakończenia eksperymentu w 22. dniu badania. W przypadku grupy otrzymującej wyższą aktywność (25 MBq) jedną mysz znaleziono martwą w dniu 12, podczas gdy pozostałe trzy myszy zmarły do dnia 15, co świadczy o silnej toksyczności zastosowanej aktywności.

Pomimo zaobserwowanego zahamowania wzrostu guza w grupie otrzymującej 10 MBq oraz zarysowującego się efektu terapeutycznego w grupie 25 MBq, wyniki jednoznacznie wskazują, że obie dawki były zbyt wysokie i wykazywały znaczną toksyczność wobec zwierząt. Wskazuje na to również istotna utrata masy ciała, zaprezentowana na Rys. 91.

W opublikowanej dotychczas literaturze badano inne radionuklidy emitujące elektrony Augera. Chan i współ. zbadali związek $[^{123}\text{I}]\text{CC1}$ w ksenograftach glejaka U251 MG. Pojedyncza, podana dootrzewnowo aktywność 9,25 MBq znacznie zmniejszyła objętość guza bez obserwowalnej toksyczności ogólnoustrojowej i utraty wagi.³⁷⁵ Ponadto, Chan i współ. potwierdzili, że $[^{111}\text{In}]\text{In-Bn-DTPA-nimotuzumab}$ w dawce do 28,6 MBq podawany zdrowym myszom nie powodował utraty wagi ani toksyczności.³⁷⁶ Rosenkranz i współ. zaobserwowali wyraźny efekt terapeutyczny po pojedynczym doguzowym podaniu 9,2 MBq znakowanych ^{111}In modularnych nanotransporterów, $[^{111}\text{In}]\text{In-NOTA-DTox-HMP-NLS-EGF}$. W 26. dniu eksperymentu średnia objętość guza w grupie leczonej była prawie 9-krotnie mniejsza. Ponadto, nie zaobserwowano znaczącej toksyczności związku.³⁶⁵

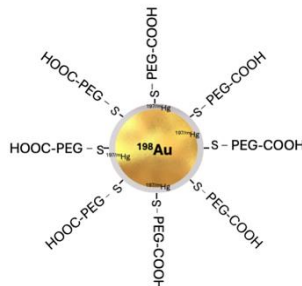
Jednakże, ze względu na brak danych literaturowych dotyczących zastosowania radionuklidów rtęci $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ w modelach zwierzęcych, oszacowanie optymalnych aktywności promieniotwórczych badanego radiokoniugatu było utrudnione. W związku z tym, dalsze badania *ex vivo* z użyciem niższych aktywności są zalecane, w celu pełnej oceny potencjału terapeutycznego $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$.

ROZDZIAŁ VII

Rozdział VII przedstawia potencjał zastosowania łączonej nanobrachyterapii wykorzystującej jednocześnie promieniowanie β^- oraz elektrony Auger z użyciem radioaktywnych nanocząstek złota pokrytych radionuklidami rtęci ($^{197m/197}\text{Hg}$).

W niniejszym rozdziale przedstawione zostały wyniki badań stabilności radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ oraz jego działanie *in vitro* na komórki nowotworowe linii MDA-MB-231 oraz T98G.

7. Radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$



Rys. 92. Radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$.

W celu zbadania potencjalnego działania synergicznego połączenia emitery β^- (^{198}Au) z emitery elektronów Auger ($^{197m/197}\text{Hg}$) zsyntezowano radiokoniugat składający się z radioaktywnych nanocząstek złota $^{198}\text{AuNPs}$ pokrytych radionuklidami rtęci (Rys. 92). Scharakteryzowana została jego stabilność $^{198}\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ oraz skuteczność działania *in vitro* na komórkach linii MDA-MB-231 oraz T98G.

7.1. Synteza radioaktywnych nanocząstek złota $^{198}\text{AuNPs}$

Syntezę radioaktywnych nanocząstek złota ($^{198}\text{AuNPs}$) o średnicy 5 nm przeprowadzono analogicznie do syntezy ich nieradioaktywnego odpowiednika tj. według metody opisanej przez Turkevicha³³⁰ i szczegółowo przedstawionej w rozdziale „3.5.3. Synteza nanocząstek złota oraz radioaktywnych nanocząstek złota”.

Roztwór wzorcowy chlorku złota (500 μl , 1000 mg/l) został odparowany do sucha w kwarcowej fiolce w temperaturze 120°C . Powstały proszek poddano aktywacji w strumieniu neutronów 10^{14} n/s/cm² przez 7 godzin w reaktorze jądrowym Maria (NCBJ, Świerk). Aktywność próbki po napromieniowaniu wynosiła 1,50 GBq. Następnie do radioaktywnego osadu dodano 0,867 mg nieradioaktywnego chlorku złota i rozpuszczono w 8,93 ml wody. Roztwór doprowadzono do wrzenia. Następnie dodano podgrzane do 95°C roztwory cytrynianu sodu (3,93 mg) rozpuszczonego w 0,391 ml oraz 1,73 mg kwasu taninowego rozpuszczonego w 0,171 ml wody.

Mieszaninę reakcyjną utrzymywano w stanie wrzenia przez 15 minut stosując łaźnię olejową oraz chłodnicę zwrotną.

W wyniku reakcji otrzymano koloidalny roztwór radioaktywnych nanocząstek złota o ciemnoczerwonym zabarwieniu i stężeniu molowym 11,4 nM. Liczba nanocząstek złota w 1 ml roztworu wynosiła $6,84 \cdot 10^{13}$ AuNPs.

7.2. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota $^{198}\text{AuNPs}$ radionuklidami rtęci $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$

Modyfikację powierzchni nanocząstek złota radionuklidami rtęci przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.5.4. Modyfikacja powierzchni nanocząstek złota rtęcią.

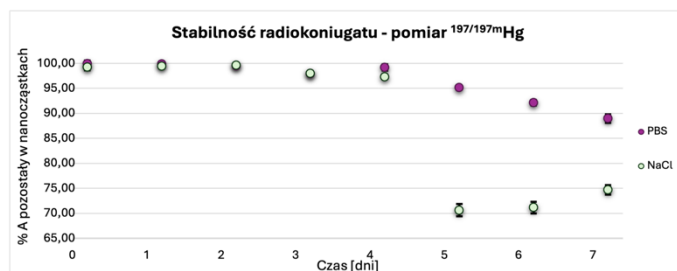
7.3. Stabilizacja radiokoniugatu glikolem polietylenowym

W celu stabilizacji otrzymanego radiokoniugatu nanocząstek złota ($^{198}\text{AuNPs}$) z radionuklidami rtęci ($^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$) zastosowano glikol polietylenowy zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.5.5. Stabilizacja nanocząstek glikolem polietylenowym.

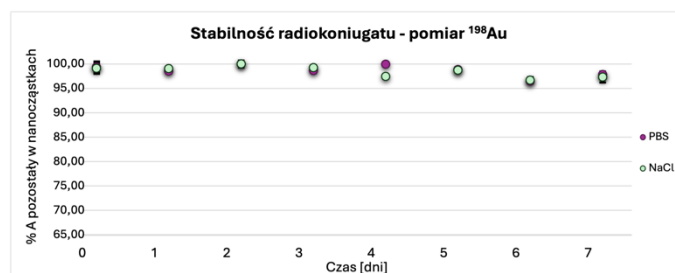
7.4. Analiza stabilności radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$

Badanie stabilności połączenia radionuklidów rtęci z nanocząstkami złota przeprowadzono w 0,9% roztworze soli fizjologicznej oraz w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) $\text{pH} = 7,4$. Test przeprowadzono według opisu zamieszczonego w rozdziale 3.5.6. Badanie stabilności radiokoniugatów.

Pomiar aktywności promieniotwórczej wykonywano trzykrotnie, każdorazowo przez 1 minutę z użyciem detektora półprzewodnikowego HPGe. Analiza została przeprowadzona zarówno na izotopie ^{198}Au jak i ^{197}Hg . Wyniki pomiarów przedstawiono na poniższych wykresach (Rys. 93, Rys. 94).



Rys. 93. Aktywność promieniotwórcza izotopu $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ [%] pozostała we frakcji nanocząstek po inkubacji w roztworach PBS i NaCl.



Rys. 94. Aktywność promieniotwórcza izotopu ^{198}Au [%] pozostała we frakcji nanocząstek po inkubacji w roztworach PBS i NaCl.

W przeprowadzonym badaniu procentowa aktywność promieniotwórcza izotopu ^{198}Au pozostałego w nanocząstkach służyła jako wskaźnik ewentualnego uszkodzenia membrany koncentratora wirówkowego podczas eksperymentu. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że potencjalny wyciek izotopu ^{198}Au przez membranę w ciągu pierwszych trzech dni eksperymentu nie przekroczył 2,1%, natomiast w całym okresie badania nie przekroczył 3,6% — zarówno w roztworze soli fizjologicznej, jak i w buforze fosforanowym (PBS).

Na podstawie danych uzyskanych z pomiarów dla $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ można określić czy nie następuje wyciek radionuklidów rtęci z powierzchni nanocząstek, a więc czy zszyntezowany radiokoniugat jest stabilny w badanych mediach.

Na podstawie powyższych wykresów można wyciągnąć wniosek, iż radiokoniugat charakteryzuje się wysoką stabilnością w roztworze soli fizjologicznej przez okres 4 dni, co odpowiada 1,5 okresu połowicznego rozpadu ^{197}Hg . W tym czasie, procent aktywności promieniotwórczej uwolnionej z koniugatu nie przekroczył 2,7%.

Radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ wykazywał także stabilność w roztworze PBS przez 6 dni, co odpowiada 2,25 czasów połowicznego rozpadu ^{197}Hg , przy czym procent aktywności uchodzącej z koniugatu nie przekroczył 7,9%, zwłaszcza w krótszych przedziałach czasowych typowych dla takich eksperymentów.

W ostatnim dniu eksperymentu zaobserwowano wyciek radionuklidu ^{197}Hg : do 11,0% w roztworze PBS oraz do 25,3% w roztworze NaCl.

Porównując te dane do koniugatu zawierającego stabilny izotop złota otrzymujemy, iż trwałość radiokoniugatu mieszanego jest nieznacznie gorsza w porównaniu z radiokoniugatem $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$, gdzie w czasie 6 dni, procent uwalniającej się aktywności promieniotwórczej nie przekroczył 1,4% dla obu badanych mediów, a w dniu 7 pogorszył się on jedynie w soli fizjologicznej osiągając 17,35%, przy czym dla roztworu PBS pozostał wciąż bardzo mały i wynosił zaledwie 2,05%.

Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że stabilność radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ jest wystarczająca do przeprowadzenia dalszych badań *in vitro*.

7.5. Badania komórkowe *in vitro*

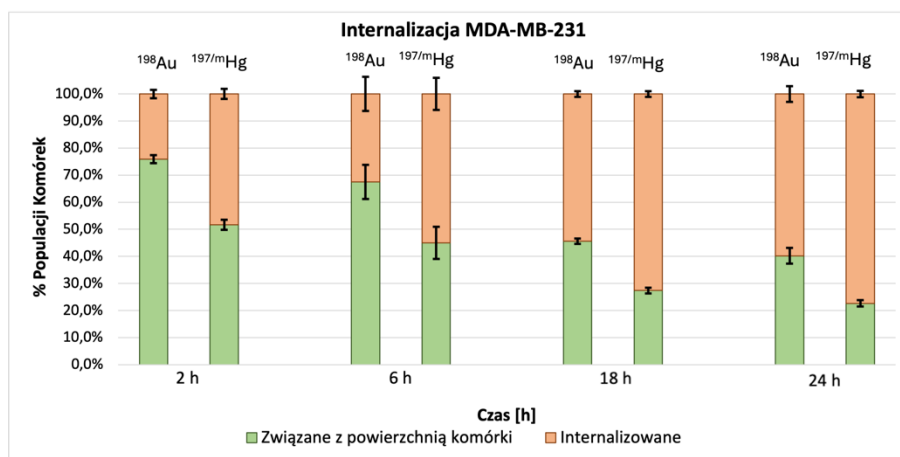
Badania *in vitro* dla radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G. Hodowle komórkowe prowadzono zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale 3.5.7.1. Hodowle komórkowe.

7.5.1. Badanie internalizacji do wnętrza komórki

W pierwszym etapie badań przeprowadzono test internalizacji radiokoniugatu, mający na celu określenie procentowego udziału koniugatu związanego z błoną komórkową oraz zinternalizowanego do wnętrza komórki. Szczegółowy protokół badania został opisany w rozdziale 3.5.7.2 „Badanie internalizacji do wnętrza komórki”.

W eksperymencie zastosowano radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 0,5 MBq/ml zawierającym $2,69 \cdot 10^{11}$ AuNPs/ml na dołek oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 2 MBq/ml.

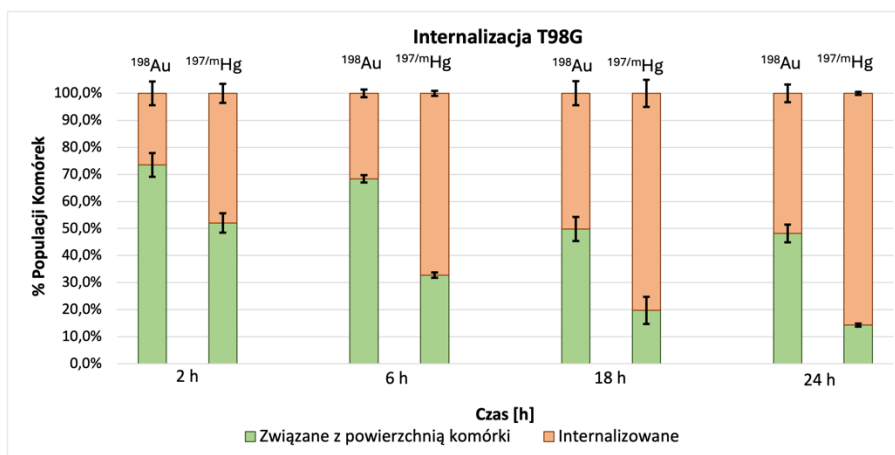
Wyniki przedstawiono w formie tabeli (Tab. XXVII, Tab. XXVIII) oraz wykresów (Rys. 95, Rys. 96).



Rys. 95. Rozmieszczenie zaabsorbowanego radiokoniugatu w komórkach linii MDA-MB-231 określone według aktywności promieniotwórczej izotopów ^{198}Au oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$.

Tab. XXVII. Procent aktywności promieniotwórczej radiokoniugatu związanego z błoną oraz internalizowanego do wnętrza komórki dla linii komórkowej MDA-MB-231.

Czas	2 h		6 h		18 h		24 h	
Izotop	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$
Wychwyt koniugatu [%]	$2,83 \pm 0,23$	$5,57 \pm 0,01$	$2,67 \pm 0,45$	$6,16 \pm 0,49$	$8,86 \pm 0,51$	$12,23 \pm 0,68$	$8,10 \pm 0,06$	$12,08 \pm 0,38$
% aktywności związany z błoną	$75,90 \pm 1,53$	$51,69 \pm 1,85$	$67,54 \pm 6,31$	$44,96 \pm 5,94$	$45,62 \pm 1,04$	$27,36 \pm 1,04$	$40,19 \pm 2,93$	$22,64 \pm 1,18$
% aktywności internalizowany	$24,10 \pm 1,53$	$48,31 \pm 1,85$	$32,46 \pm 6,31$	$55,04 \pm 5,94$	$54,38 \pm 1,04$	$72,64 \pm 1,04$	$59,81 \pm 2,93$	$77,36 \pm 1,18$



Rys. 96. Rozmieszczenie zaabsorbowanego radiokoniugatu w komórkach linii T98G określone według aktywności promieniotwórczej izotopu ^{198}Au oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$.

Tab. XXVIII. Procent aktywności promieniotwórczej koniugatu związanego z błoną oraz internalizowanego do wnętrza komórki dla linii komórkowej T98G.

Czas	2 h		6 h		18 h		24 h	
Izotop	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$	dla ^{198}Au	dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$
Wychwyt koniugatu [%]	2,66 ± 0,24	6,34 ± 0,45	1,66 ± 0,06	5,79 ± 0,18	3,10 ± 0,06	12,58 ± 0,19	2,96 ± 0,21	13,66 ± 0,21
% aktywności związany z błoną	73,55 ± 4,39	52,06 ± 3,57	68,41 ± 1,38	32,80 ± 0,97	49,81 ± 4,44	19,73 ± 5,04	48,19 ± 3,28	14,26 ± 0,60
% aktywności internalizowany	26,45 ± 4,39	47,94 ± 3,57	31,59 ± 1,38	67,20 ± 0,97	50,19 ± 4,44	80,27 ± 5,04	51,81 ± 3,28	85,74 ± 0,60

Zaobserwowano, że dane uzyskane dla izotopów ^{198}Au i $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ różnią się od siebie, co może wynikać z faktu, że statystycznie nie wszystkie nanocząstki w populacji są pokryte rtęcią. Ponadto, niska energia i wydajności kwantów gamma emitowanych przez radionuklidy rtęci jak również obecność rtęci w postaci mieszaniny dwóch izotopów ^{197}Hg , $^{197\text{m}}\text{Hg}$, mogą generować niedokładności pomiarowe przy użyciu czytnika Wizzard.

Z przedstawionych powyżej danych wynika, iż większość radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ związanego z komórką ulega internalizacji po 24 h inkubacji w przypadku linii komórkowej MDA-MB-231, jak i T98G. Procent internalizacji rośnie wraz z czasem i jest wyższy w pomiarach prowadzonych z wykorzystaniem izotopów rtęci. Po 24 h do komórek linii MDA-MB-231 zinternalizowało odpowiednio 59,81 ± 2,93% - koniugatu ^{198}Au oraz 77,36 ± 1,18% koniugatu oznaczonego $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$. Dla linii T98G wartości te wyniosły odpowiednio 51,81 ± 3,28% - ^{198}Au oraz 85,74 ± 0,60% - $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$.

Linia T98G wykazywała nieco wyższy stopień internalizacji badanego koniugatu w porównaniu do MDA-MB-231 – różnice wynosiły maksymalnie 12 p.p. w punkcie czasowym 6 h, gdzie obserwowano największe rozbieżności w pomiarach dla izotopów rtęci. Dane obliczane dla radionuklidów rtęci wykazują wyższy poziom wychwytu koniugatu, a także większy stopień jego internalizacji. Różnice te mieszczą się w zakresie 18–36 p.p. i wynoszą odpowiednio 24 p.p. dla linii MDA-MB-231 oraz 36 p.p. dla linii T98G,

w punktach czasowych wykazujących największą rozbieżność. Ponadto, linia T98G wykazuje nieznacznie większe różnice w poziomie internalizacji mierzonej między izotopami – o około 3-12 p.p.

Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi przez Gharibkandi i współ. oraz Żelechowską-Matysiak i współ., w których zastosowano celowane nanocząstki złota, uzyskując efektywną internalizację do wnętrza komórek.^{368,377} Wyniki przeprowadzonego badania potwierdzają zasadność dalszych prac nad łączeniem pasywnych i aktywnych mechanizmów dostarczania nanocząstek w celu optymalizacji wychwytu koniugatów przez komórki.

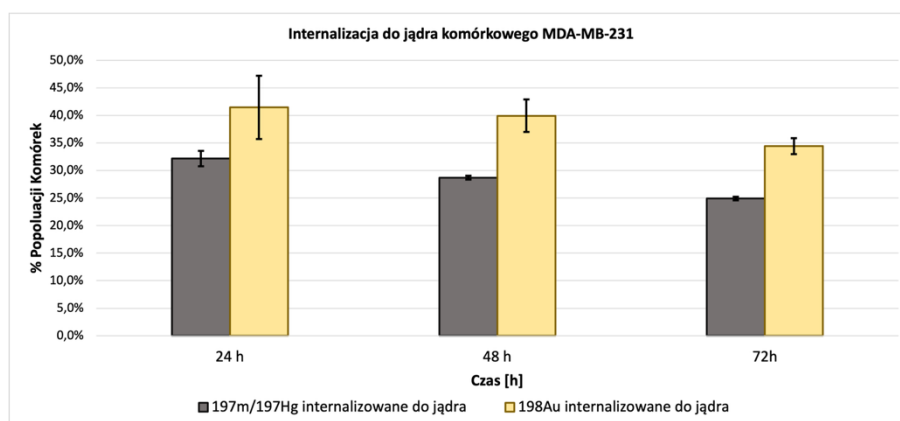
7.5.2. Badanie internalizacji do jądra komórkowego metodą frakcjonowania (izolacji jądra komórkowego)

Celem badania przeprowadzonego metodą frakcjonowania jądra komórkowego była ocena zdolności radiokoniugatu do lokalizacji wewnątrz jądra komórkowego, co pozwalało na określenie jego potencjału do wywoływania uszkodzeń materiału genetycznego poprzez emisję elektronów Augera.

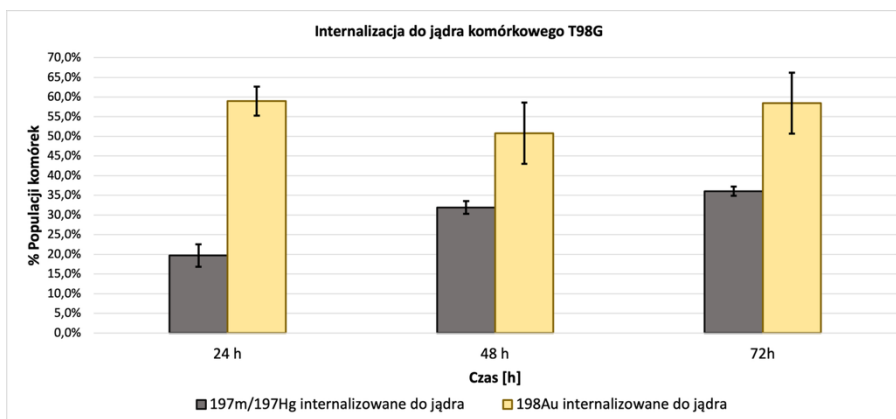
Szczegółowy opis zastosowanej metodyki znajduje się w rozdziale 3.5.7.3 „Badanie internalizacji do jądra komórkowego metodą frakcjonowania”.

Analizie poddano radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym wynoszącym 0,5 MBq/ml dla izotopu ^{198}Au oraz 2 MBq/ml dla izotopów $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$, zawierający $2,69 \times 10^{11}$ AuNPs/ml na każdy dołek hodowlany.

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie wykresów ilustrujących zależność poziomu lokalizacji radiokoniugatu w jądrze komórkowym od czasu inkubacji oraz aktywności promieniotwórczej radionuklidów $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ i ^{198}Au . Dla linii komórkowej MDA-MB-231 wyniki zaprezentowano na Rys. 97, natomiast dla linii T98G – na Rys. 98.



Rys. 97. Internalizacja radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ do jądra komórkowego komórek linii MDA-MB-231 w zależności od czasu inkubacji, analizowana dla radionuklidów $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ oraz ^{198}Au .



Rys. 98. Internalizacja radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ do jądra komórkowego komórek linii T98G w zależności od czasu inkubacji, analizowana dla radionuklidów $^{197m/197}\text{Hg}$ oraz ^{198}Au .

Z analizy danych przedstawionych na wykresach (Rys. 97, Rys. 98) wynika, że radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197m/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ internalizuje do jądra komórkowego zarówno komórek linii MDA-MB-231, jak i T98G.

Dla linii MDA-MB-231 procent internalizacji do jądra maleje w czasie, zarówno dla izotopu złota od 41,4% do 34,4%, jak i dla izotopów rtęci od 27,7% do 22,2%.

Dla linii T98G procent internalizacji do jądra komórkowego w badanych punktach czasowych dla izotopu ^{198}Au pozostaje na stałym poziomie, w zakresie 50,8 – 59,0%, podczas gdy dla izotopów rtęci obserwuje się stopniowy wzrost wartości od 19,7% do 36,1%.

Poziom internalizacji do jądra w komórkach linii T98G jest wyższy niż w przypadku linii MDA-MB-231 o 2,5 – 8,4 p.p. dla izotopów $^{197m/197}\text{Hg}$ oraz o 16,4 – 17,6 p.p. dla radionuklidu ^{198}Au .

Dla obu linii komórkowych zaobserwowano wyższy poziom internalizacji do jądra w przypadku zastosowania izotopu złota w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla izotopów rtęci. Różnice te wynoszą średnio 12,3 – 13,7 p.p. dla linii komórkowej potrójnie ujemnego raka piersi, gdzie po 24 h inkubacji dla izotopu ^{198}Au internalizacja do jądra osiąga poziom 41,4%, natomiast w przypadku $^{197m/197}\text{Hg}$ jest to 27,7%. Dla glejaka wielopostaciowego mierzona między izotopami różnica wynosi 22,9 – 31,1 p.p., gdzie po 72 h inkubacji internalizacja do jądra komórkowego osiąga 58,4% dla izotopu złota oraz 36,1% dla izotopów rtęci.

Zaobserwowane różnice mogą wynikać z faktu, że nie każda nanocząstka pokryta jest radionuklidami rtęci. Statystycznie, aby utworzyć jednoatomową warstwę rtęci na powierzchni 1 ml nanocząstek złota potrzebne jest 25,31 μg rtęci. Na podstawie tej informacji możemy stwierdzić, że po reakcji jedynie 39,5% powierzchni nanocząstki pokryte jest rtęcią. Biorąc pod uwagę bardzo dużą liczbę nanocząstek w 1 ml roztworu tj. $6,84 \cdot 10^{13}$ można stwierdzić, że znaczna część z nich nie posiada radionuklidów rtęci na swojej powierzchni.

Na podstawie otrzymanych danych można również wysnuć wniosek, że nanocząstki pokryte rtęcią wykazują mniejszą zdolność do internalizacji do jądra komórkowego, niezależnie od linii komórkowej. Dodatkowo, dla obu badanych linii komórkowych zaobserwowano różnice w poziomie internalizacji radiokoniugatu do całej komórki pomiędzy zastosowanymi izotopami. Różnice te były bardziej widoczne w przypadku linii MDA-MB-231.

Dodatkowo, dla obu badanych linii zaobserwowano różnice w poziomie wnikania radiokoniugatu do komórki, a mierzone odchylenia pomiędzy izotopami były bardziej widoczne w przypadku linii MDA-MB-231. Dla tej linii, wnikanie do wnętrza komórki dla izotopu ^{198}Au wynosiło od 2,2% do 6,4%

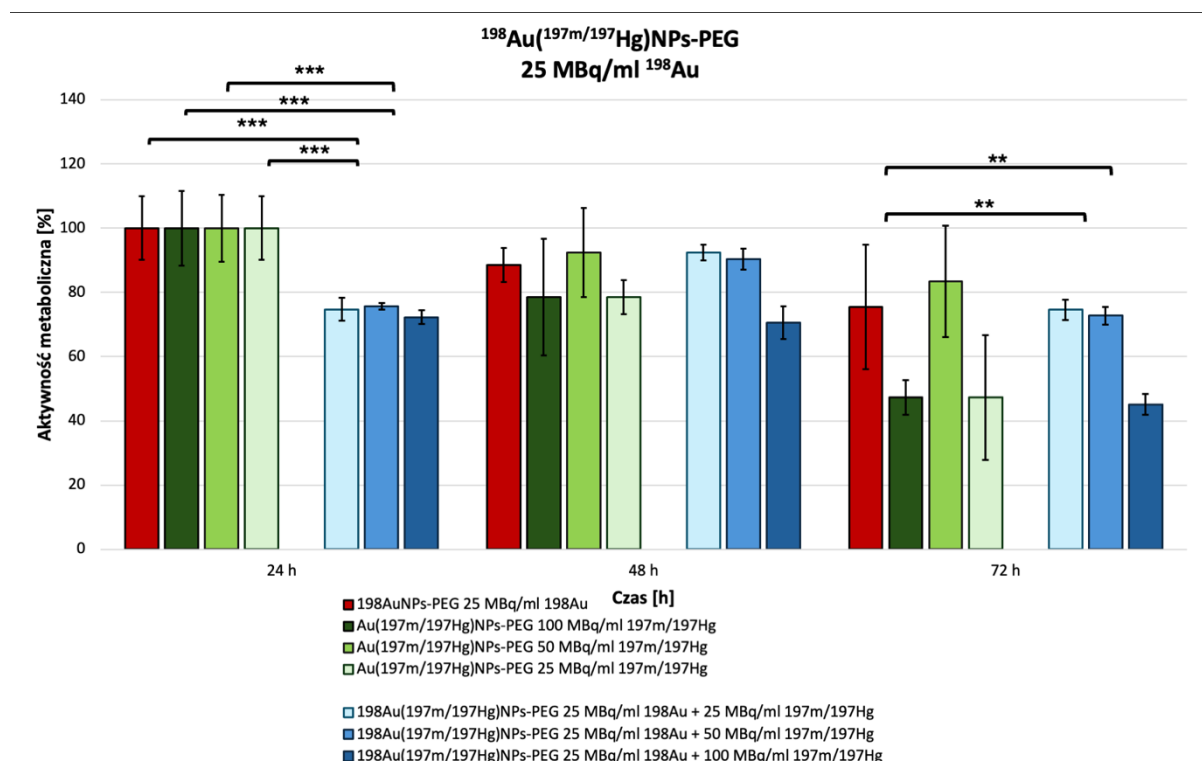
i było niższe o 9,4–19,5 p.p. w porównaniu z poziomem uzyskanym dla izotopów rtęci, który wynosił od 11,6% (po 24 godzinach inkubacji) do 25,8% (po 72 godzinach inkubacji). W przypadku linii T98G, internalizacja do wnętrza komórki dla ^{198}Au kształtowała się w zakresie 4,8–9,6%, natomiast dla $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wartości te były wyższe i wynosiły od 7,7% do 17,1%, co oznacza różnicę na poziomie 2,9 – 7,5 p.p.

7.5.3. Badanie cytotoksyczności testem MTS

Ewaluację potencjału cytotoksycznego $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ rozpoczęto od badania cytotoksyczności z wykorzystaniem testu MTS, przeprowadzonego zgodnie z protokołem zamieszczonym w rozdziale 3.5.7.4. Badanie cytotoksyczności testem MTS”.

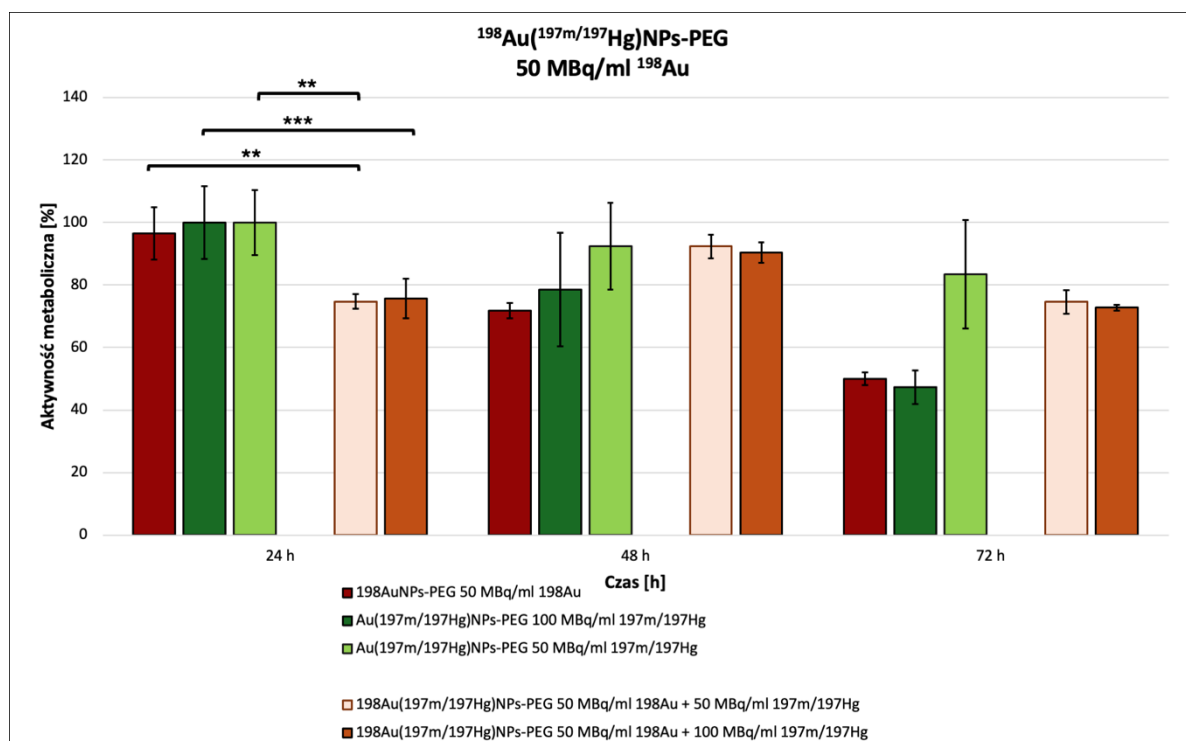
W eksperymencie analizowano działanie koniugatu zawierającego radioaktywne nanocząstki złota $^{198}\text{AuNPs}$ o różnych stężeniach promieniotwórczych (25 oraz 50 MBq/ml) pokryte radionuklidami rtęci $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ o stężeniach promieniotwórczych (100, 50 oraz 25 MBq/ml). Równolegle badano wolne radioaktywne nanocząstki złota $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 50, 25, 10, 5, 2,50 MBq/ml.

Wyniki badania cytotoksyczności testem MTS dla linii komórkowej MDA-MB-231 oraz T98G przedstawiono w postaci wykresów ilustrujących zależność aktywności metabolicznej komórek od czasu inkubacji oraz stężenia badanych związków (Rys. 99, Rys. 100, Rys. 101, Rys. 102). Na wykresach przedstawiono również wyniki analizy statystycznej.



Rys. 99. Aktywność metaboliczna komórek linii MDA-MB-231 wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ 5 nm o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$

wynoszących 25, 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszącymi 25, 50 i 100 MBq/ml.

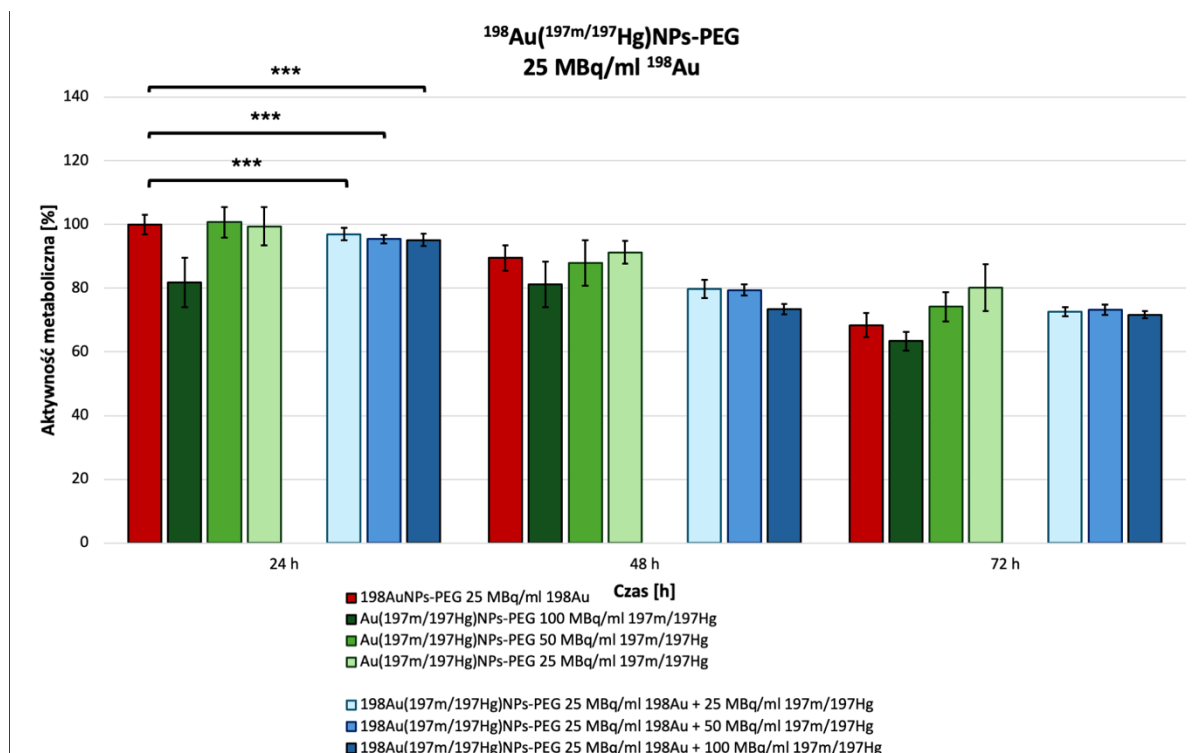


Rys. 100. Aktywność metaboliczna komórek linii MDA-MB-231 wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszących 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszącymi 50 i 100 MBq/ml.

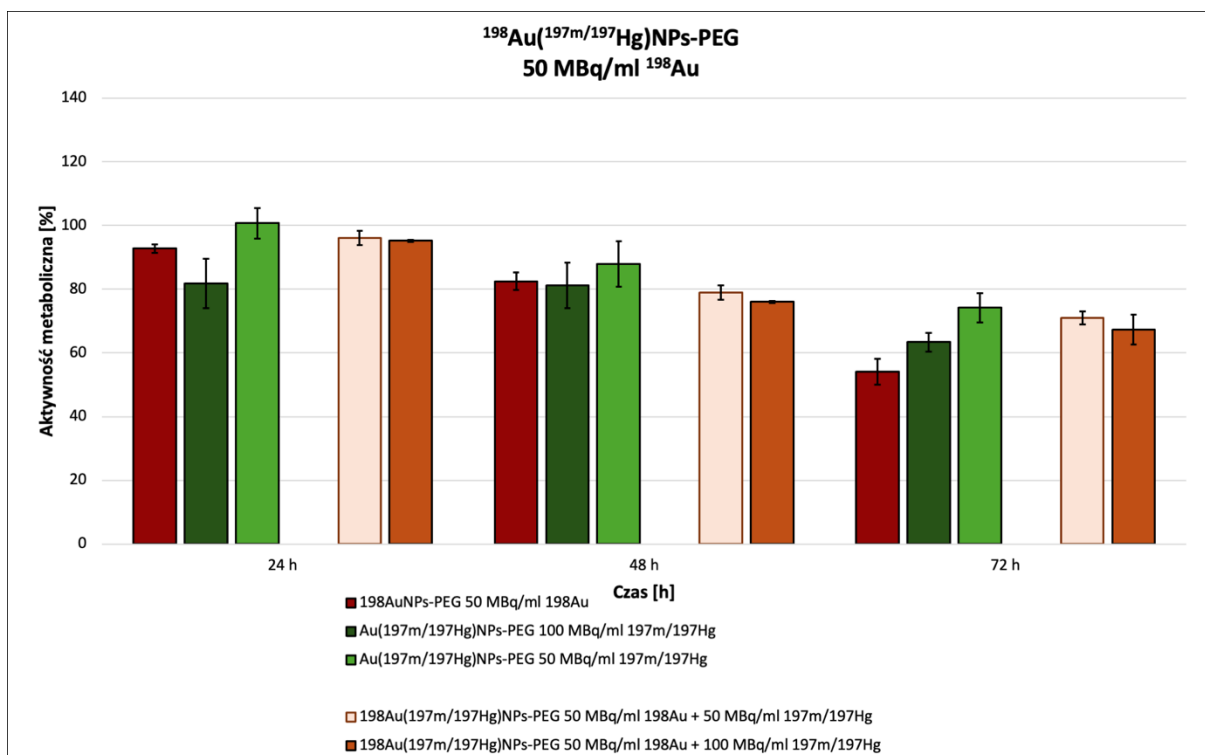
Radioaktywne nanocząstki złota o średnicy 5 nm wykazywały toksyczność dla komórek linii MDA-MB-231. Dla najwyższych badanych stężeń promieniotwórczych tj. 50 MBq/ml oraz 25 MBq/ml przeżywalność komórek tej linii po 72 h spadała odpowiednio do $28,30 \pm 2,00\%$ oraz $57,07 \pm 4,11\%$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Dodatek radionuklidów rtęci zwiększył toksyczność radiokoniugatu w przypadku linii komórkowej MDA-MB-231. Dla nanocząstek o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml dodatek radionuklidów rtęci o stężeniu 100 MBq/ml spowodował wzrost cytotoksyczności o 14 p.p. po 72 h inkubacji. Przeżywalność komórek traktowanych koniugatem $^{198}\text{AuNPs}$ 50 MBq/ml + $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ 100 MBq/ml wynosiła po 72 h $4,30 \pm 0,85\%$, podczas gdy przeżywalność ta wynosiła $28,30 \pm 2,00\%$ dla samych nanocząstek $^{198}\text{AuNPs}$ oraz $47,26 \pm 7,40\%$ dla radiokoniugatu zawierającego jedynie izotopy rtęci $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs}$. Efekt ten jest również widoczny dla niższych stężeń tj. połączenia $^{198}\text{AuNPs}$ 25 MBq/ml z $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ 100 MBq/ml, gdzie różnica wartości przeżywalności między nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs}$, a pełnym radiokoniugatem „mieszanym” wynosi 11,94 p.p. W tej konfiguracji przeżywalność komórek spadała do $45,13 \pm 3,18\%$, w porównaniu do $57,07 \pm 4,11\%$ dla $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ oraz $47,26 \pm 7,40\%$ dla koniugatu zawierającego wyłącznie izotopy rtęci.

Obserwowane wyniki wskazują na statystycznie istotne zmniejszenie przeżywalności komórek w przypadku radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ w porównaniu z samymi $^{198}\text{AuNPs}$. Jednakże nie zaobserwowano statystycznie istotnego spadku aktywności metabolicznej komórek w porównaniu z $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$. W związku z tym nie można potwierdzić występowania efektu synergistycznego wynikającego z jednoczesnego zastosowania dwóch rodzajów promieniowania – emitera β^- (^{198}Au) oraz emiterów elektronów Augera ($^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$) – w przypadku komórek linii MDA-MB-231.



Rys. 101. Aktywność metaboliczna komórek linii T98G wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ 5 nm o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 25, 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącymi 25, 50 i 100 MBq/ml.



Rys. 102. Aktywność metaboliczna komórek linii T98G wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek ^{198}Au NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącymi 50 i 100 MBq/ml.

Dla linii T98G obserwowana cytotoksyczność była znacznie mniejsza, co może wynikać ze szczególnej oporności tej linii na leczenie.^{56,378} Zaobserwowano jedynie niedużą toksyczność zależną od stężenia promieniotwórczego zastosowanych nanocząstek. Po 72 h inkubacji, dla najwyższych badanych stężeń promieniotwórczych tj. 50 MBq/ml oraz 25 MBq/ml przeżywalność komórek wyniosła odpowiednio $54,11 \pm 4,02\%$ i $68,45 \pm 3,70\%$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Nie zaobserwowano także zwiększonej cytotoksyczności radiokoniugatu mieszanego w porównaniu z radiokoniugatami zawierającymi pojedyncze izotopy. Ponadto, odnotowano nieznaczny wzrost przeżywalności komórek po zastosowaniu radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ w porównaniu z wolnymi nanocząstkami ^{198}Au NPs-PEG. Po 72 godzinach inkubacji przeżywalność komórek traktowanych wolnymi nanocząstkami ^{198}Au NPs-PEG wyniosła $54,11 \pm 4,02\%$ dla stężenia 50 MBq/ml oraz $68,45 \pm 3,70\%$ dla stężenia 25 MBq/ml. Natomiast dla radiokoniugatu mieszanego $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, przy najwyższym zastosowanym stężeniu promieniotwórczym izotopów rtęci (100 MBq/ml), przeżywalność wyniosła odpowiednio $67,33 \pm 4,77\%$ i $71,66 \pm 1,15\%$ — wartości wyższe nie tylko względem wolnych nanocząstek ^{198}Au , ale również względem koniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, dla którego przeżywalność wyniosła $63,36 \pm 2,88\%$ przy tym samym stężeniu. Brak widocznego efektu synergicznego oraz nieznacznie obniżona cytotoksyczność (różnice w przeżywalności na poziomie 0,95 – 16,91 p.p.) mogą wynikać z większej heterogeniczności komórek linii T98G oraz ich wysokiej oporności na leczenie.

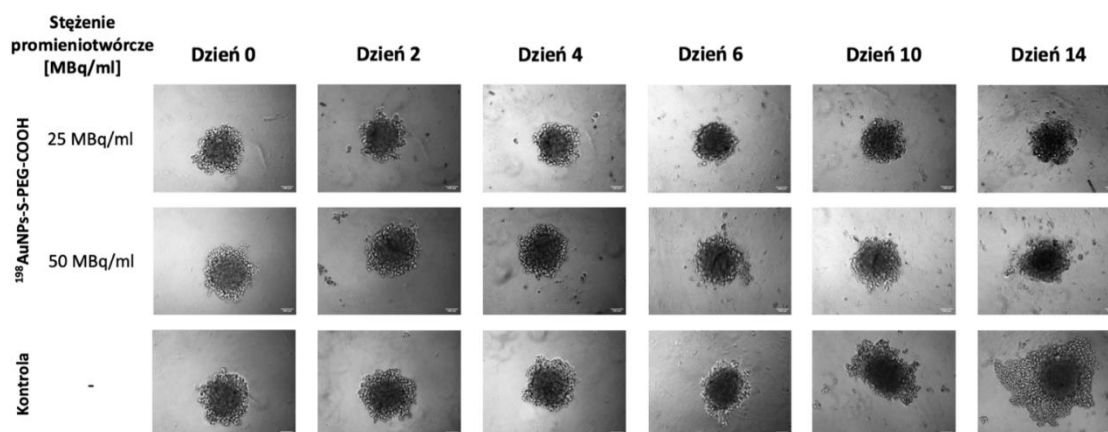
Otrzymane wyniki można odnieść do danych opublikowanych przez Gharibkandi i współ., gdzie również zastosowano nanocząstki zawierające zarówno emiter promieniowania β^- , jak i elektronów Augera w terapii raka wątrobowokomórkowego na linii komórkowej HepG2. Autorzy wykorzystali podejście oparte na generatorze *in vivo* $^{109}\text{Pd}/^{109\text{m}}\text{Ag}$, przy czym w cytowanej pracy uzyskano efekt synergiczny.³⁶⁸

7.5.4. Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych

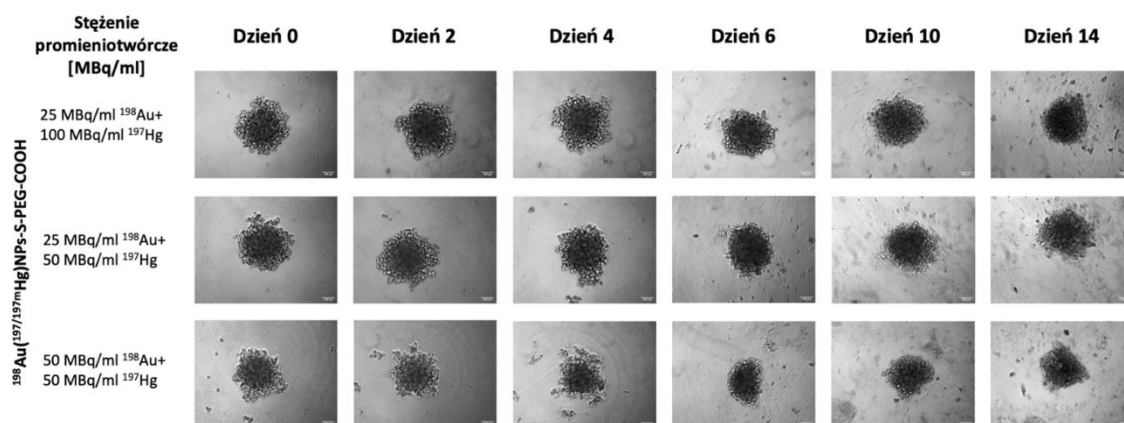
Kolejnym etapem oceny cytotoksyczności radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ było przeprowadzenie badania na trójwymiarowych strukturach komórkowych (sferoidach). Eksperyment został wykonany z wykorzystaniem linii komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G, obejmując grupę kontrolną (nieotraktowaną nanocząstkami), radioaktywne nanocząstki złota $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz mieszany radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach ^{198}Au - 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ - 50 MBq/ml i 100 MBq/ml.

Szczegółowy opis sposobu przeprowadzenia badania znajduje się w rozdziale 3.5.7.5. Badanie cytotoksyczności na trójwymiarowych strukturach komórkowych”.

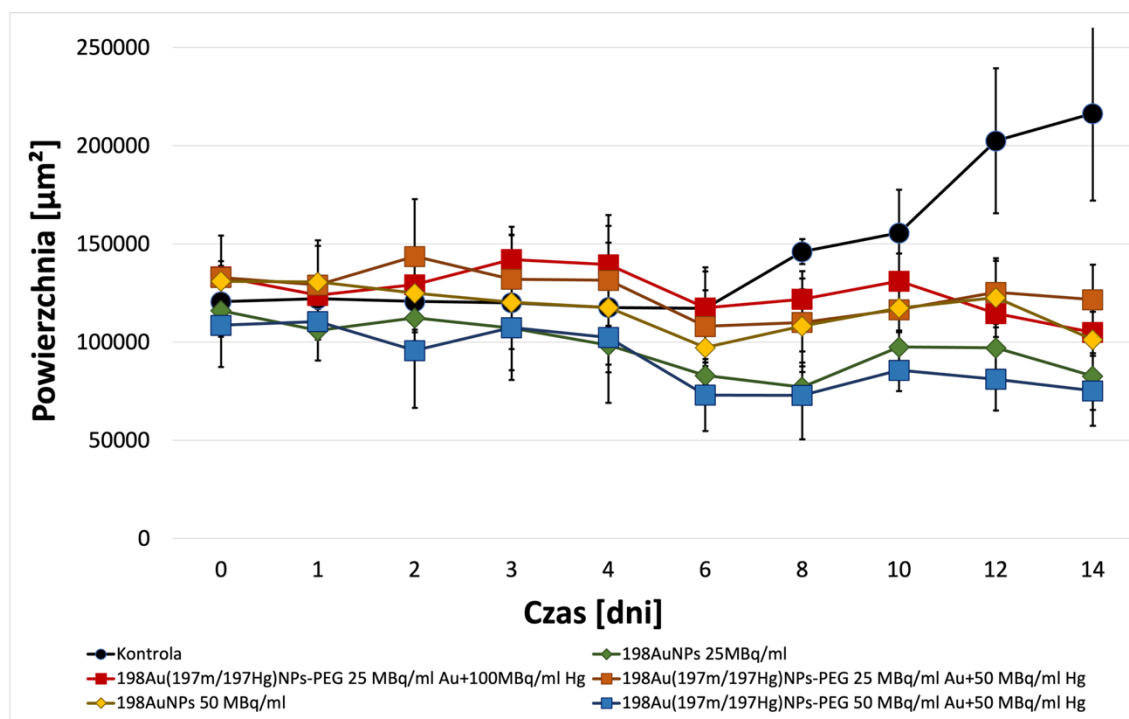
Wyniki przedstawiono w postaci wykresów ilustrujących zależność powierzchni sferoidów od czasu oraz zastosowanych stężeń (Rys. 105, Rys. 108) oraz w postaci obrazów porównujących wygląd sferoidów traktowanych nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ z grupą kontrolną (Rys. 103, Rys. 106) oraz radiokoniugatem mieszanym $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ w różnych stężeniach i czasach inkubacji (Rys. 104, Rys. 107).



Rys. 103. Obrazy sferoidów komórek linii MDA-MB-231 po 14-dniach inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml, w porównaniu z grupą kontrolną.



Rys. 104. Obrazy sferoidów komórek linii MDA-MB-231 po 14-dniach inkubacji z radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml.



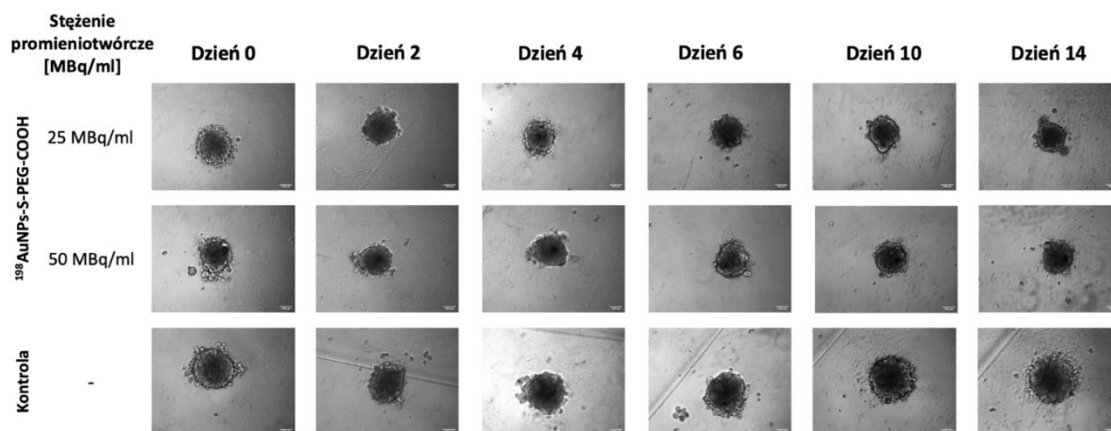
Rys. 105. Zmiana powierzchni sferoidów komórek linii MDA-MB-231 w czasie po traktowaniu radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml a także w grupie kontrolnej.

Sferoidy uzyskane z linii komórkowej MDA-MB-231 traktowane nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ stopniowo zmniejszały swoją powierzchnię w czasie inkubacji osiągając wyraźnie mniejsze rozmiary w porównaniu z grupą kontrolną. Efekt cytotoksyczny obserwowany dla stężenia 25 MBq/ml był nieznacznie silniejszy niż dla stężenia 50 MBq/ml. Różnice w wielkości sferoidów pomiędzy tymi dwoma stężeniami wynosiły odpowiednio 17,3% po 6 dniach, oraz 22,4% po 14 dniach inkubacji.

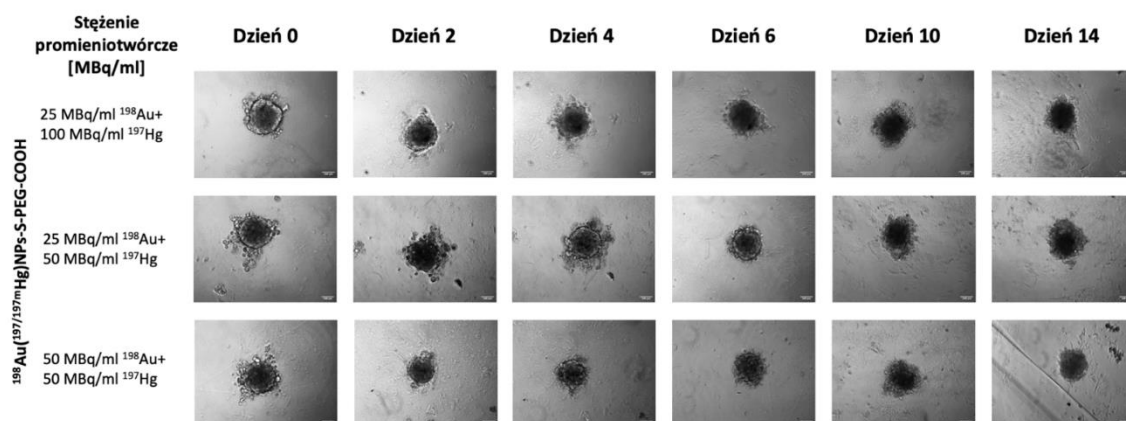
Dodatek radionuklidów rtęci o stężeniu 50 MBq/ml do nanocząstek ^{198}Au NPs o stężeniu 50 MBq/ml spowodował niewielki spadek powierzchni sferoidów w czasie. Różnice te wyniosły 32,6% po 8 dniach, oraz 25,8% po 14 dniach w porównaniu do grupy kontrolnej, co sugeruje zwiększony efekt terapeutyczny wynikający z połączenia dwóch izotopów. Nie zaobserwowano natomiast takiego efektu w przypadku połączenia nanocząstek z radionuklidami rtęci o stężeniu $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ 25 MBq/ml, co może wynikać z wysokiej skuteczności samego ^{198}Au NPs-PEG oraz mniejszego rozmiaru początkowego sferoidów w tej grupie badawczej.

Radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ zawierający ^{198}Au o stężeniu 25 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ o stężeniu 50 MBq/ml wykazał po 14 dniach słabszy efekt terapeutyczny niż same ^{198}Au NPs-PEG – różnica ta wyniosła 47,0%. Podwojenie stężenia $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ do 100 MBq/ml nieznacznie zwiększyło efekt terapeutyczny – różnica w powierzchni sferoidów między tymi dwiema grupami wyniosła 13,7% po 14 dniach. Mimo to, powierzchnia sferoidów traktowanych radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ (^{198}Au 25 MBq/ml + $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ 100 MBq/ml) pozostawała wciąż o 26,8% większa niż w przypadku zastosowania samych nanocząstek ^{198}Au NPs-PEG w tym samym stężeniu. W ostatnim dniu eksperymentu, wszystkie sferoidy traktowane radiokoniugatami wykazywały wyraźnie mniejszą powierzchnię względem z dnia odniesienia, podczas gdy w grupie kontrolnej nastąpił znaczny wzrost rozmiarów sferoidów – o 79,5%. Największy spadek powierzchni zanotowano dla sferoidów traktowanych radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ (^{198}Au 25 MBq/ml + 50 MBq/ml $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$), który osiągnął wartość 22,7% względem dnia odniesienia oraz 113,7% w porównaniu do grupy kontrolnej po 14 dniach.

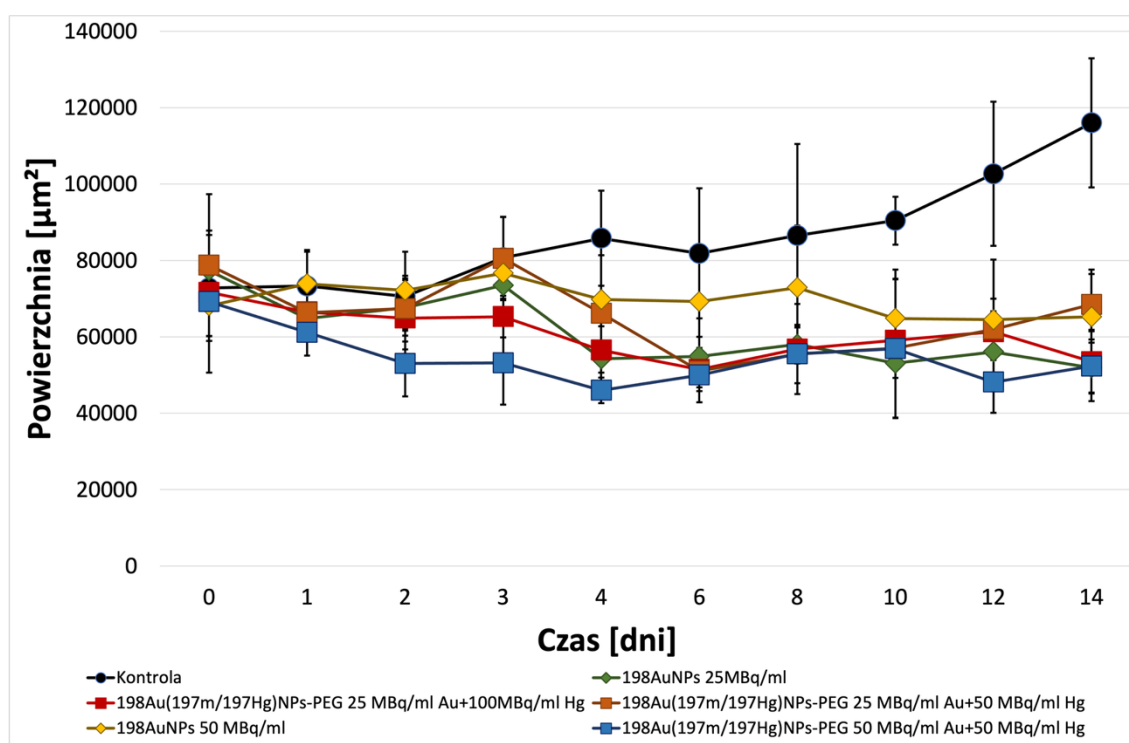
Podsumowując, nie zaobserwowano jednoznacznych zależności pomiędzy zastosowanymi stężeniami radionuklidów ^{198}Au i $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, a skutecznością terapeutyczną w modelu sferoidów linii MDA-MB-231. Ponadto, wszystkie badane związki spowodowały jedynie redukcję powierzchni sferoidów bez całkowitego rozpadu ich struktur, jak to miało miejsce w przypadku radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ zawierającego wyłącznie izotopy $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.



Rys. 106. Obrazy sferoidów komórek linii T98G po 14-dniach inkubacji z nanocząstkami ^{198}Au NPs o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml, w porównaniu z grupą kontrolną.



Rys. 107. Obrazy sferoidów komórek linii T98G po 14-dniach inkubacji z radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml.



Rys. 108. Zmiana powierzchni sferoidów komórek linii T98G w czasie po traktowaniu radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{198}\text{AuNPs}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml a także w grupie kontrolnej.

Sferoidy uzyskane z komórek linii T98G również wykazywały zmniejszenie powierzchni po traktowaniu każdym z badanych związków. Ich końcowa powierzchnia była mniejsza zarówno względem dnia odniesienia jak i grupy kontrolnej, w której komórki nie były eksponowane na nanocząstki. Podobnie

jak w przypadku linii komórkowej MDA-MB-231 największą toksyczność wykazały nanocząstki $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o najniższym stężeniu promieniotwórczym (25 MBq/ml). Po 14 dniach powierzchnia sferoidów traktowanych tym stężeniem była o 25,6% mniejsza niż w przypadku wyższego stężenia $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ (50 MBq/ml), co nie odpowiada spodziewanemu trendowi wzrostu cytotoksyczności wraz ze stężeniem.

W przypadku zastosowania koniugatu mieszanego zawierającego ^{198}Au (25 MBq/ml) oraz radionuklidy rtęci (50 MBq/ml), zaobserwowano niespodziewany wzrost powierzchni sferoidów, pomimo występowania dodatkowego źródła toksyczności. Cytotoksyczność tego radiokoniugatu była niższa o 31,8% względem samych nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o identycznym stężeniu. Po zwiększeniu stężenia $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ do 100 MBq/ml efekt uległ poprawie o 21,8%, jednak nadal pozostawał słabszy niż w przypadku zastosowania samych nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$.

Sferoidy z grupy kontrolnej systematycznie zwiększały swoją powierzchnię w czasie trwania eksperymentu, osiągając po 14 dniach wartość o 59,3% wyższą niż w dniu odniesienia. Wyniki te wskazują, że wszystkie badane związki wykazują efekt cytotoksyczny wobec komórek T98G, jednak nie zaobserwowano jednoznacznych zależności między skutecznością działania a stężeniem związków oraz rodzajem zastosowanych radionuklidów.

Dla obu badanych linii komórkowych efekt cytotoksyczny radiokoniugatów zawierających ^{198}Au był niższy niż w przypadku radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, zawierającego wyłącznie radionuklidy rtęci. Żaden z analizowanych związków nie doprowadził do rozpadu struktur sferoidalnych, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych we wcześniejszym badaniu. Rozbieżność ta może wynikać z drobnych różnic w procedurze syntezy, związanych z wykorzystaniem radioaktywnego prekursora w przypadku koniugatów zawierających ^{198}Au .

Należy również uwzględnić wpływ początkowej powierzchni sferoidów na wyniki eksperymentu – w badaniu z radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ powierzchnia początkowa była większa niż w eksperymencie z $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$. Różnice te wyniosły średnio 33 797 μm^2 dla linii MDA-MB-231 oraz 10 070 μm^2 dla linii T98G.

Z kolei w przypadku radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ zawierającego wyższe stężenie ^{198}Au (50 MBq/ml) oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ (50 MBq/ml), dodatek radionuklidów rtęci skutkował poprawą efektu cytotoksycznego odpowiednich nanocząstek niezawierających Hg. Już po 2 dniach inkubacji różnica wynosiła 26,5%, a po 14 dniach 19,8%. W ostatnim dniu eksperymentu, powierzchnia sferoidów w tej grupie była mniejsza o 24,4% względem dnia odniesienia oraz o 54,9% względem grupy kontrolnej. Podobne wartości końcowe uzyskano dla sferoidów traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ (25 MBq/ml) oraz $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ (^{198}Au 25 MBq/ml + $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ 100 MBq/ml), które po 14 dniach, zmniejszyły się odpowiednio o 32,9% oraz 25,3% względem dnia odniesienia.

Mniejszy efekt cytotoksyczny zaobserwowano natomiast dla $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ (50 MBq/ml) oraz dla radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ zawierającego ^{198}Au 25 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ 50 MBq/ml, gdzie po 14 dniach sferoidy zmniejszyły swoją powierzchnię odpowiednio o zaledwie 4,0% oraz 13,1%. Sferoidy z grupy kontrolnej stopniowo zwiększały swoją powierzchnię w czasie trwania eksperymentu, osiągając po 14 dniach wartość o 59,3% wyższą niż w dniu odniesienia. Wyniki te wskazują, że wszystkie badane związki wykazują efekt cytotoksyczny wobec komórek T98G, jednak nie zaobserwowano jednoznacznej zależności między skutecznością działania a stężeniem związków oraz rodzajem zastosowanych radionuklidów.

Dla obu badanych linii komórkowych efekt cytotoksyczny radiokoniugatów zawierających ^{198}Au był niższy niż w przypadku radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, zawierającego wyłącznie radionuklidy

rtęci. Żaden z analizowanych związków nie doprowadził do rozpadu struktur sferoidalnych, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych we wcześniejszym badaniu. Rozbieżność ta może wynikać z nieznacznych modyfikacji sposobu syntezy w przypadku radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ spowodowanych syntezą nanocząstek z radioaktywnego prekursora.

Ponadto, możliwy jest także wpływ powierzchni początkowej sferoidów na wynik eksperymentu, która w tym przypadku była większa od powierzchni sferoidów w dniu odniesienia dla badania z radiokoniugatem $\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$. Różnice w powierzchni w dniu 0 między eksperymentami wyniosły dla linii MDA-MB-231 średnio $33\,797\,\mu\text{m}^2$ a dla linii T98G $10\,070\,\mu\text{m}^2$.

Uzyskane w analizie cytotoksyczności na strukturach trójwymiarowych dane można odnieść do pracy Gharibkandi i współ., gdzie stężenie promieniotwórcze ^{109}Pd wynoszące $25\,\text{MBq/ml}$ po 15 dniach prowadziło do znacznego zahamowania wzrostu modelu guza. Wyniki różnią się od tych uzyskanych w niniejszej pracy, gdzie żadna z testowanych kombinacji stężeń promieniotwórczych nie doprowadziła do znacznego zmniejszenia sferoidów. Oba badania wykazały cytotoksyczne efekty przy stosunkowo niskich aktywnościach, jednakże opisane w pracy wyniki nie wykazały korelacji między stężeniem promieniotwórczym izotopu a zmniejszeniem się sferoidu.³⁶⁸

7.5.5. Badanie metodą cytometrii przepływowej

W celu oceny wpływu radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ na mechanizm indukowanej śmierci komórkowej oraz rozkład komórek w fazach cyklu komórkowego, przeprowadzono analizę z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Przygotowanie hodowli komórkowych do badania odbyło się zgodnie z procedurą opisaną w poprzednich rozdziałach niniejszej pracy dla innych koniugatów. Szczegółowy opis zastosowanej metody analitycznej został przedstawiony w rozdziale 3.4.9. Cytometria przepływowa.

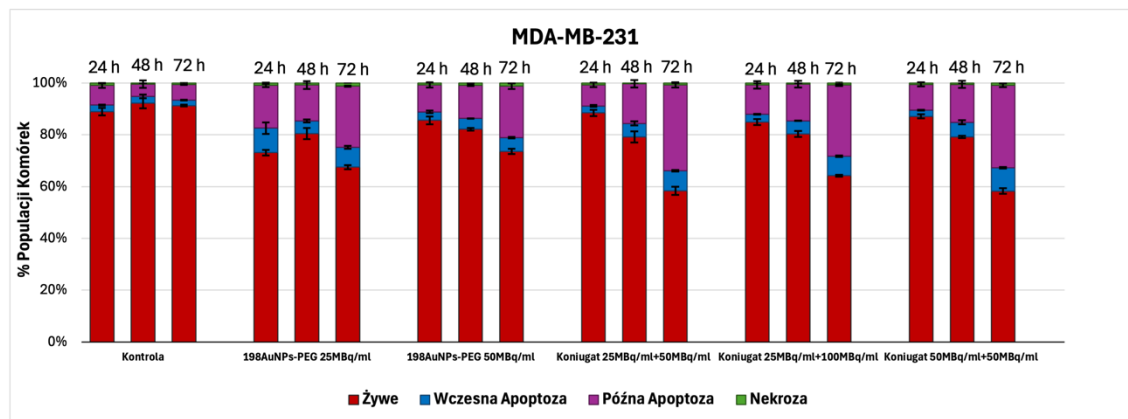
Badaniu poddano radioaktywne nanocząstki złota $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach $25\,\text{MBq/ml}$ oraz $50\,\text{MBq/ml}$, a także ich radiokoniugaty $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ w trzech konfiguracjach:

- $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym $25\,\text{MBq/ml}$ oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym $50\,\text{MBq/ml}$,
- $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym $25\,\text{MBq/ml}$ oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym $100\,\text{MBq/ml}$,
- $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym $50\,\text{MBq/ml}$ oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym $50\,\text{MBq/ml}$.

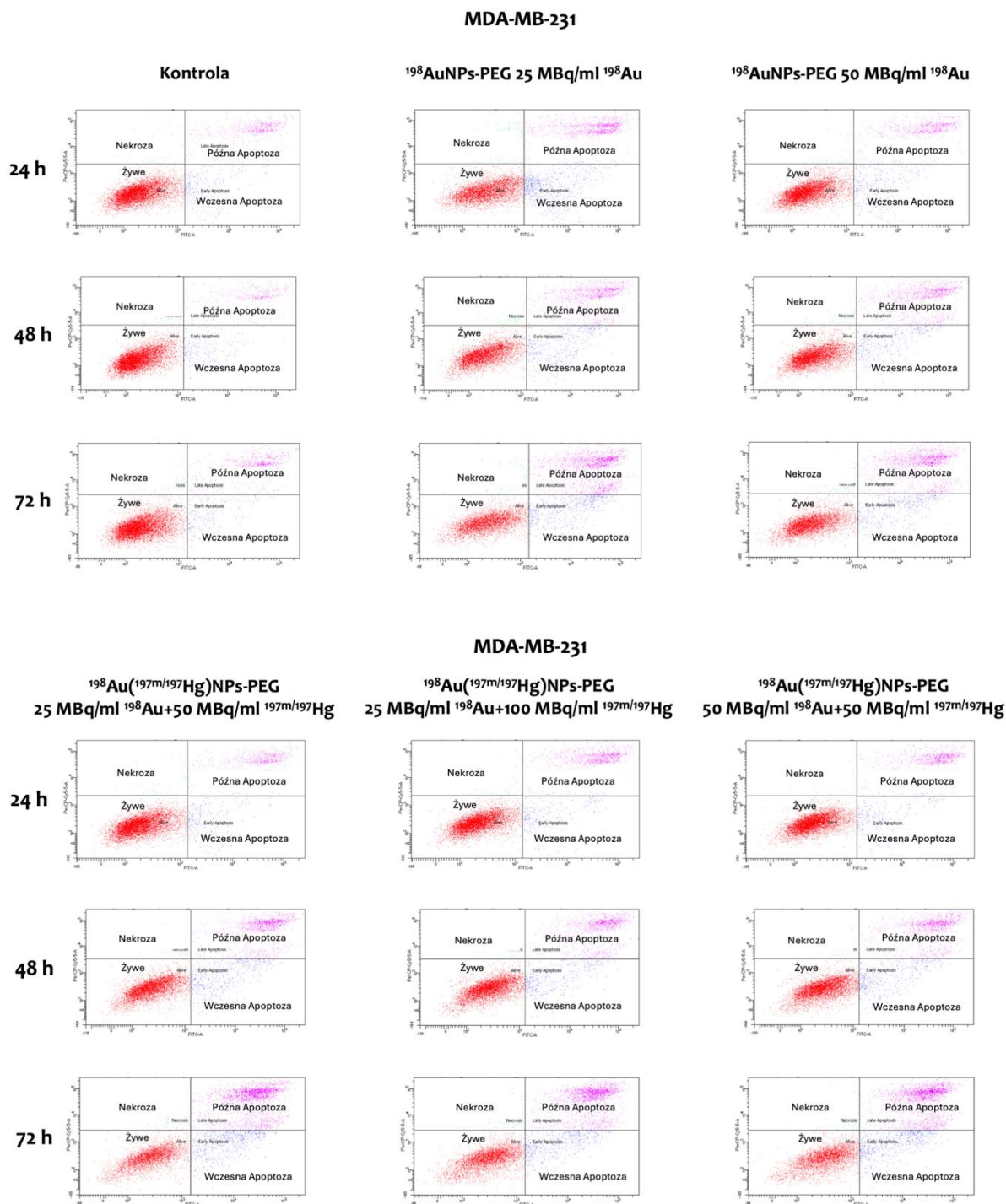
7.5.5.1. Badanie apoptozy

Badanie apoptozy zostało przeprowadzone według opisu zamieszczonego w rozdziale 3.5.7.7. Badanie apoptozy metodą cytometrii przepływowej tej pracy. Celem eksperymentu było określenie mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej przez radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ zawierający w swojej strukturze zarówno izotopy ^{198}Au jak i $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$.

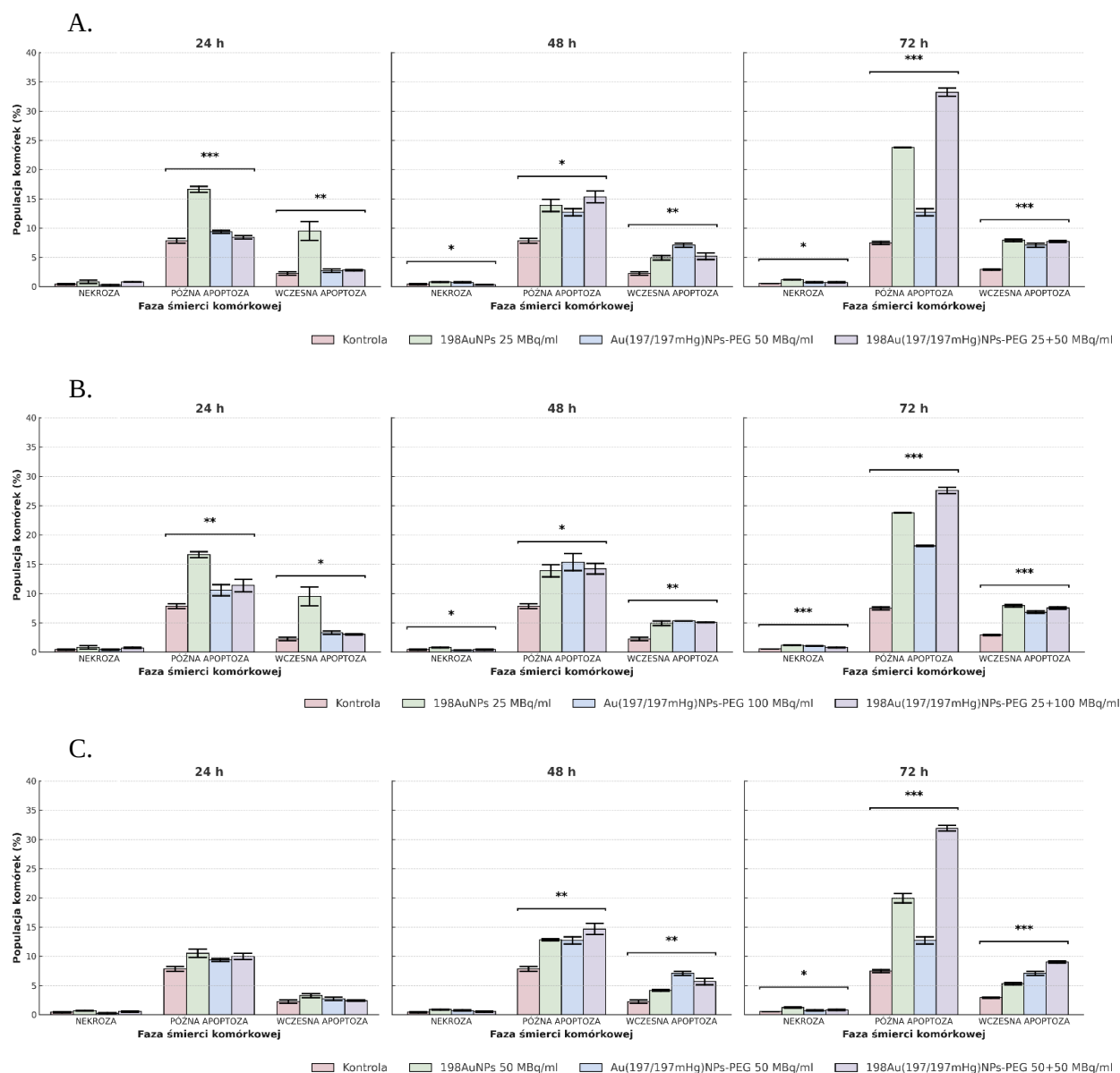
Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wykresów (Rys. 109, Rys. 112), reprezentatywnych diagramów cytometrycznych (Rys. 110, Rys. 113) oraz wykresów zawierających wyniki analizy statystycznej (Rys. 111, Rys. 114).



Rys. 109. Procentowy udział populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.



Rys. 110. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii MDA-MB-231 poddanej działaniu nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatów $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/^{197}\text{Hg}}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.



Rys. 111. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych nanocząstkami oraz ich koniugatami w różnych stężeniach promieniotwórczych oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.

(A) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml.

(B) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 100 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 100 MBq/ml.

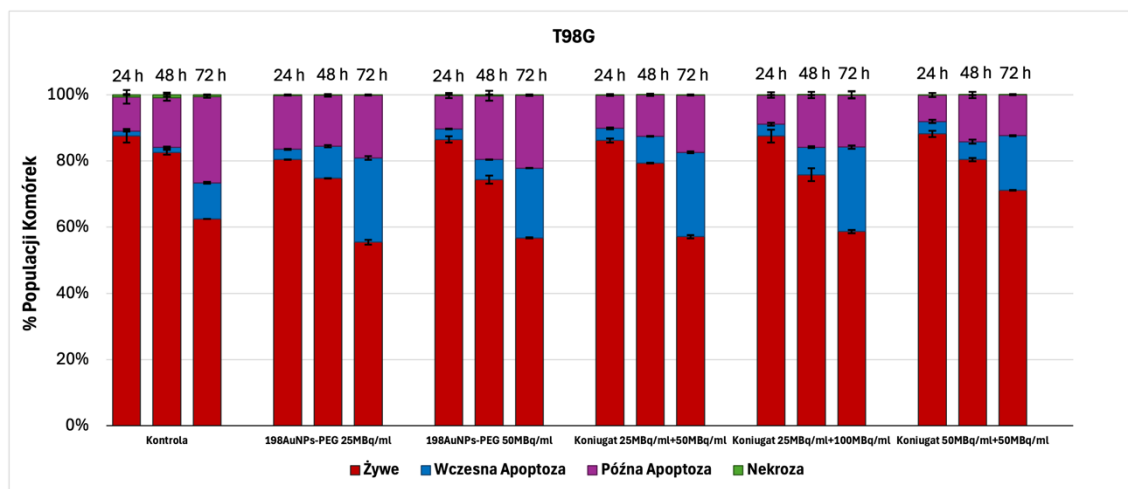
(C) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym

50 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym stężeniu ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml.

Na podstawie danych uzyskanych dla linii komórkowej MDA-MB-231 przedstawionych na wykresach oraz diagramach reprezentatywnych (Rys. 109, Rys. 110) można stwierdzić, że wszystkie badane w tym eksperymencie radiokoniugaty indukują śmierć komórkową głównie na drodze apoptozy. Udział komórek nekrotycznych był bardzo niski - we wszystkich analizowanych przypadkach oraz grupie kontrolnej nie przekraczał 1,3% w żadnym punkcie czasowym. Poziom wczesnej apoptozy w grupie kontrolnej utrzymywał się na stałym poziomie w zakresie $2,1 \pm 0,1\%$ - $2,6 \pm 0,7\%$, natomiast w pozostałych grupach wzrastał wraz z czasem inkubacji. Dla najbardziej cytotoksycznego radiokoniugatu poziom wczesnej apoptozy wzrósł z $2,4 \pm 0,1\%$ po 24 h inkubacji do $9,0 \pm 0,3\%$ po 72 h.

Frakcja komórek znajdujących się w późnej apoptozie była stała w grupie kontrolnej, natomiast rosła w czasie dla radiokoniugatów mieszanych i w mniejszym stopniu dla radioaktywnych nanocząstek. Dla radiokoniugatu zawierającego 25 MBq/ml ^{198}Au oraz 50 MBq/ml $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ frakcja późnej apoptozy wzrosła z $8,1 \pm 0,9\%$ po 24 h, do $33,2 \pm 1,0\%$ po 72 h. W przypadku konfiguracji z 50 MBq/ml ^{198}Au i 50 MBq/ml $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wartości te wynosiły odpowiednio $11,4 \pm 1,5\%$ i $27,6 \pm 0,4\%$. Dla radiokoniugatu zawierającego 50 MBq/ml zarówno ^{198}Au , jak i $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$, frakcja późnej apoptozy wzrosła z $9,95 \pm 0,8\%$ po 24 h do $31,9 \pm 0,7\%$ po 72 h. Efekt wywołany przez radiokoniugat mieszany $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ był dla niektórych punktów czasowych silniejszy niż ten obserwowany dla $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, gdzie najbardziej toksyczne stężenie (200 MBq/ml $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$) powodowało wystąpienie późnej apoptozy jedynie u $19,7 \pm 2,7\%$ populacji komórek. Jednakże, obserwowane zmiany nie okazały się statystycznie istotne dla większości punktów czasowych, co wskazuje, że w testowanych warunkach połączenie nanocząstek ^{198}Au i $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ nie zapewnia statystycznie istotnej przewagi w indukowaniu śmierci komórek w porównaniu z każdym ze składników stosowanych oddzielnie.

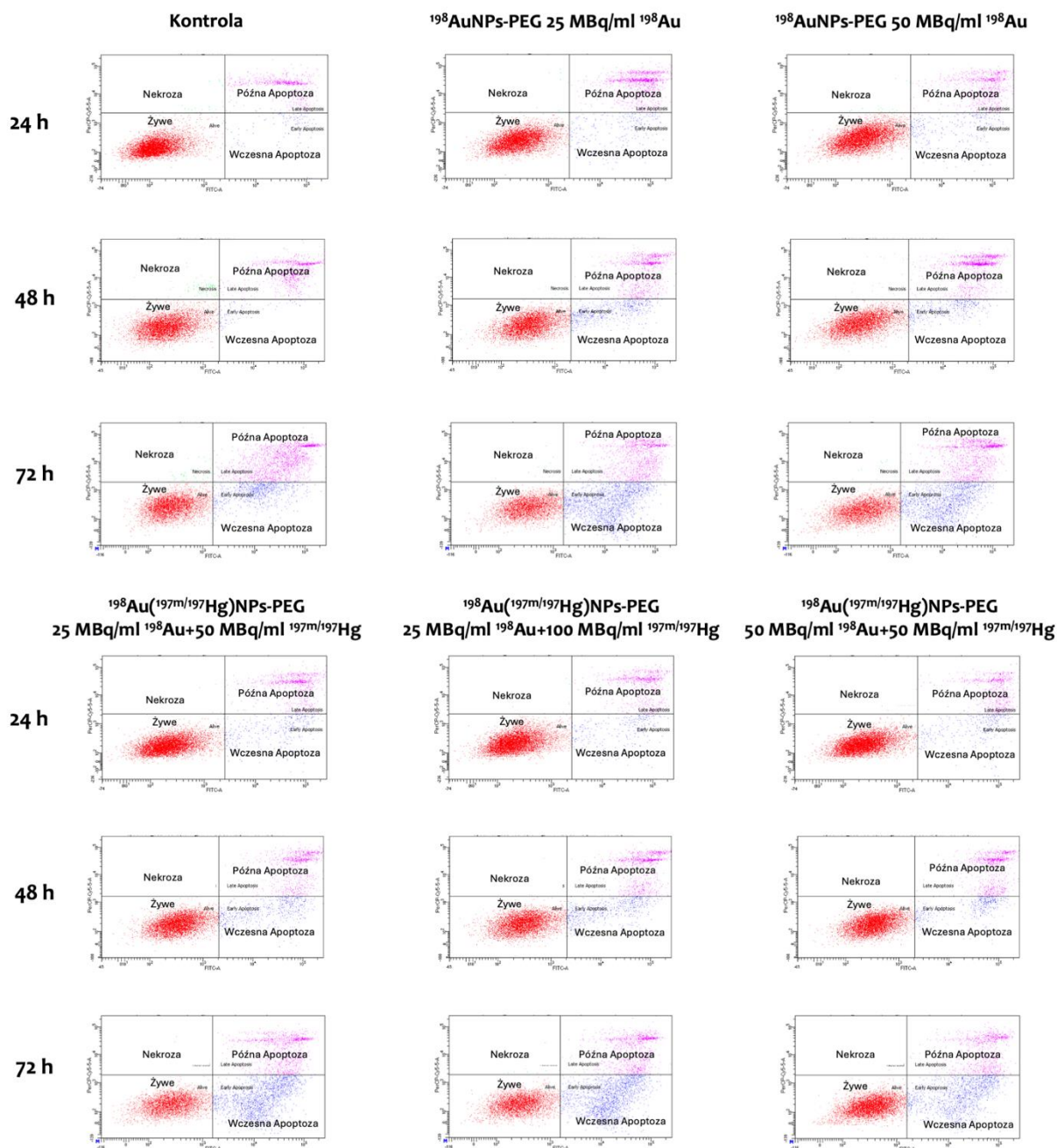
Podsumowując, radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ wykazał silniejszy potencjał do indukcji apoptozy w komórkach MDA-MB-231 niż nanocząstki $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ oraz radiokoniugat $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$.



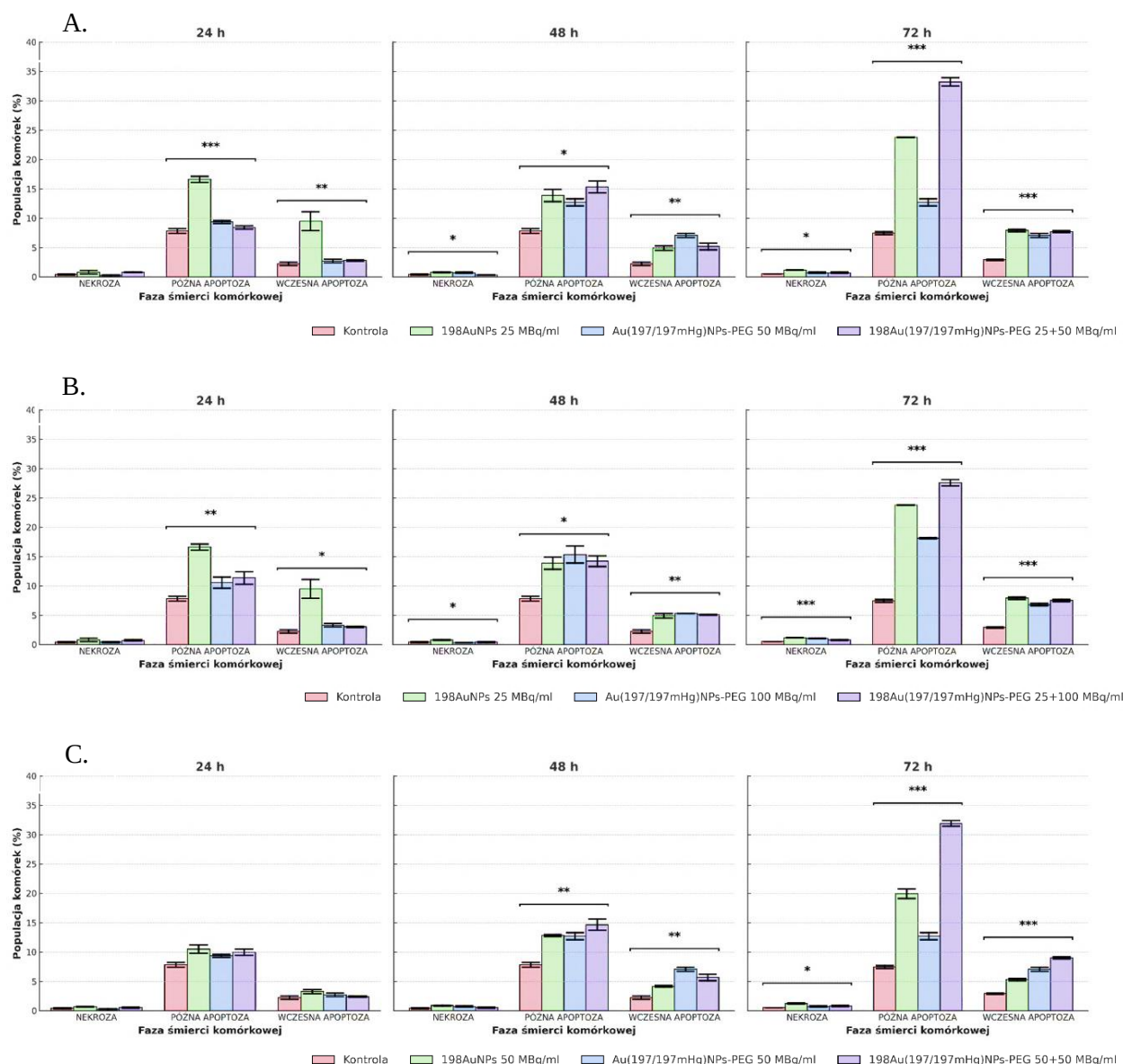
Rys. 112. Procentowy udział populacji komórek linii T98G traktowanych nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au

wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.

T98G



Rys. 113. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii T98G poddanej działaniu nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatów $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.



Rys. 114. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii T98G traktowanych nanocząstkami oraz ich koniugatami w różnych stężeniach promieniotwórczych oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.

(A) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml.

(B) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 100 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 100 MBq/ml.

(C) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, radiokoniugatem $\text{Au}^{(197\text{m}/197)\text{Hg}}\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym

50 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml.

Dla linii komórkowej T98G również zaobserwowano zmiany w indukowaniu apoptozy po wprowadzeniu do struktury koniugatu izotopu ^{198}Au . W przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla linii MDA-MB-231, w przypadku T98G same nanocząstki $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ wykazywały mniejszy efekt proapoptotyczny niż wcześniej opisywany radiokoniugat $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ (rozdział 6.5.6.1). Podobnie jak w przypadku poprzednich radiokoniugatów, zarówno $^{198}\text{AuNPs-PEG}$, jak i $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ nie indukowały nekrotycznej śmierci komórkowej – odsetek komórek nekrotycznych nie przekraczał 0,9% w żadnej z badanych grup. Po 72 godzinach inkubacji, w przypadku nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu 25 MBq/ml, $25,4 \pm 0,6\%$ komórek znajdowało się we wczesnej apoptozie, a $19,0 \pm 0,1\%$ w późnej. Dla wyższego stężenia (50 MBq/ml) wartości te były porównywalne – odpowiednio $21,1 \pm 0,1\%$ oraz $22,1 \pm 0,2\%$.

W przypadku radiokoniugatów mieszanych $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ dodatek radioaktywnej rtęci nie wpłynął na zwiększenie udziału komórek apoptycznych. Dla stężenia ^{198}Au równego 25 MBq/ml i dodatku rtęci o aktywności 100 MBq/ml odsetki komórek w apoptozie po 72 h wynosiły $25,6 \pm 0,5\%$ dla fazy wczesnej oraz $15,7 \pm 1,1\%$ dla późnej. Podobnie dla radiokoniugatu zawierającego 50 MBq/ml ^{198}Au i 50 MBq/ml $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ nie zaobserwowano wzrostu frakcji apoptycznej w porównaniu do koniugatów zawierających jedynie ^{198}Au .

Ponadto, radiokoniugaty mieszane $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ wykazywały mniejszą skuteczność indukcji apoptozy niż radiokoniugat $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ zawierający jedynie radionuklidy rtęci. Dla stężenia $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszącego 50 MBq/ml różnice te wynosiły odpowiednio 11,2 p.p. dla nanocząstek zawierających 25 MBq/ml ^{198}Au oraz 16,2 p.p. dla stężenia 50 MBq/ml ^{198}Au . Dla $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ 100 MBq/ml różnica ta wynosiła 16,1 p.p. po 72 h inkubacji.

Analiza statystyczna wyników nie wykazała spójnego, statystycznie istotnego zwiększenia aktywności apoptotycznej wywołanej przez radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ w porównaniu z poszczególnymi jego składowymi. Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że w przypadku linii T98G nie uzyskano oczekiwanego efektu synergii wynikającego z połączenia β -emitery (^{198}Au) z emitarami elektronów Augera ($^{197\text{m}/197}\text{Hg}$). Potwierdzono jednak, że radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ skutecznie indukuje apoptozę, nie wywołując jednocześnie nekrozy.

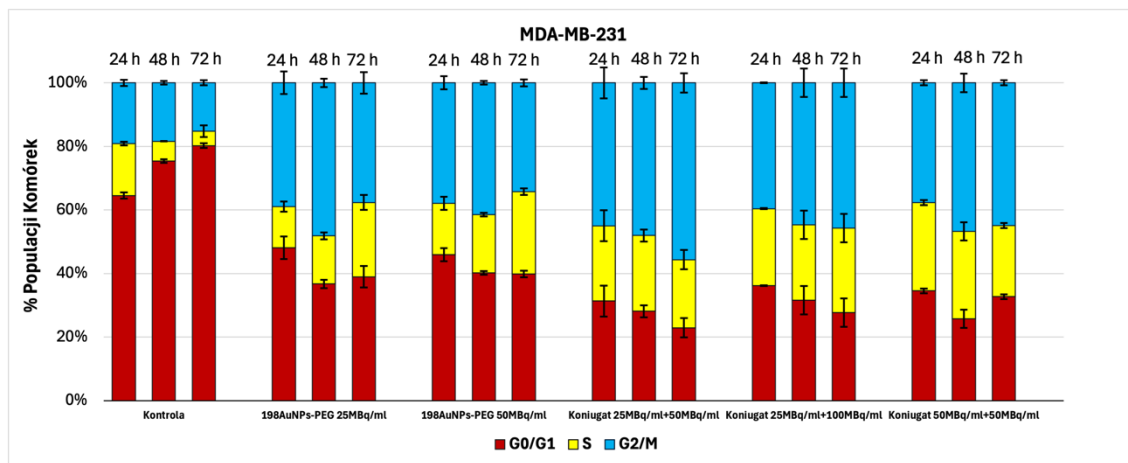
W porównaniu z wynikami opublikowanymi przez Żelechowską-Matysiak i współ., radiokoniugat opisany w niniejszej pracy wywołał słabszy efekt proapoptotyczny, bez statystycznie istotnej synergii. W cytowanych badaniach Żelechowska-Matysiak i współ. wykazali synergistyczne działanie promieniowania β^- oraz chemioterapeutyku, a także wyższy poziom populacji komórek znajdujących się w apoptozie po zastosowaniu radiokoniugatu zawierającego $^{198}\text{AuNPs}$ w połączeniu z trastuzumabem i doksorubicyną wobec komórek raka jajnika linii SKOV-3. Prace te nie są jednak w pełni porównywalne ze względu na zastosowanie odmiennej strategii terapeutycznej.³⁷⁷

Porównując obie linie komórkowe, można zauważyć, że MDA-MB-231 wykazuje większą wrażliwość na działanie radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ – obserwowane poziomy apoptozy były w tym przypadku wyższe niż w grupach traktowanych samym $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ lub $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$. W przypadku komórek T98G, radiokoniugat zawierający oba izotopy nie wykazał większej skuteczności niż koniugaty zawierające pojedyncze radionuklidy, co świadczy o braku efektu synergii w tej linii komórkowej.

7.5.5.2. Badanie cyklu komórkowego

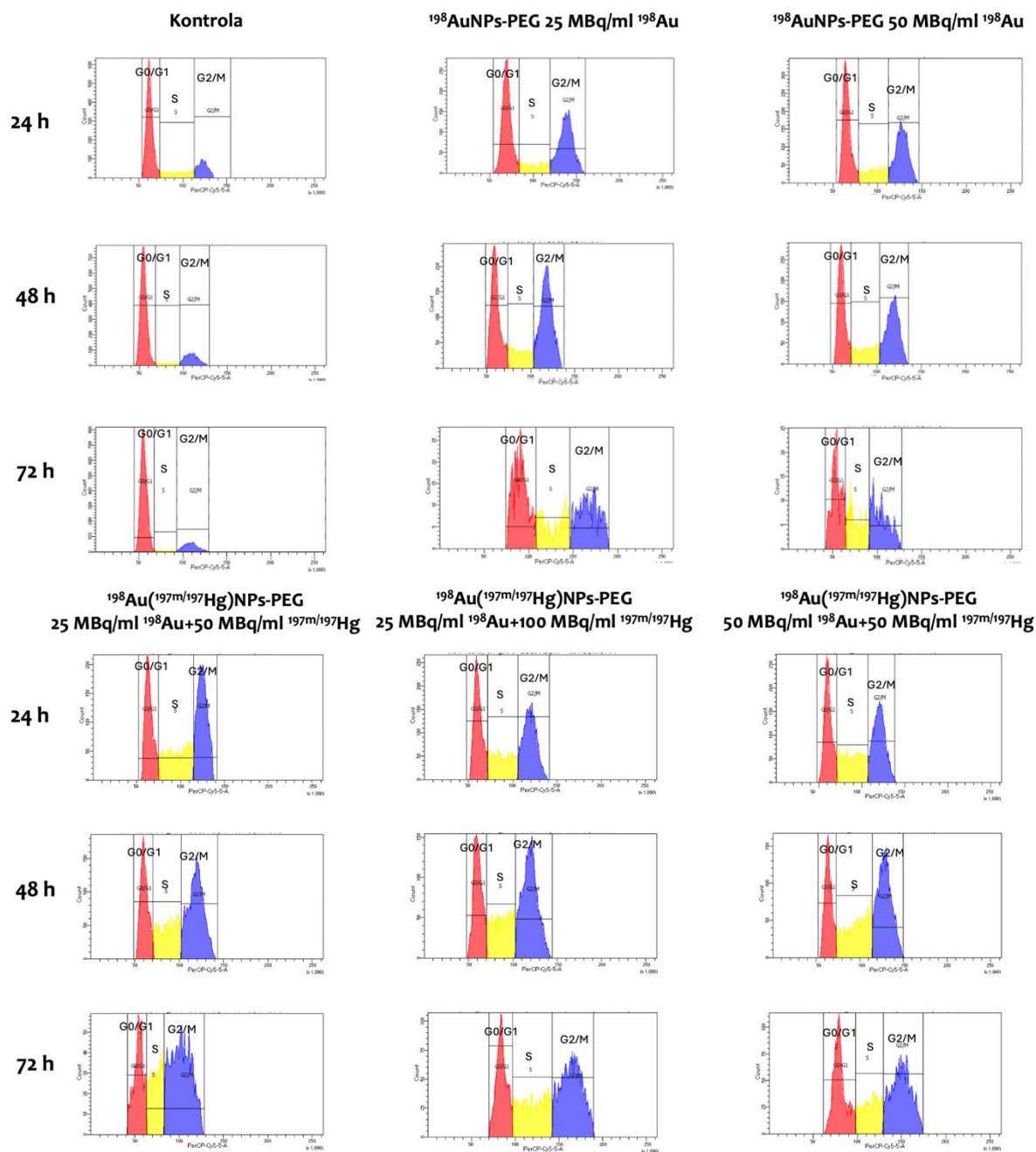
Radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ został także poddany analizie wpływu na cykl komórkowy komórek nowotworowych. Eksperyment przeprowadzono według procedury opisanej w rozdziale 3.5.7.8. Badanie cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej. Celem eksperymentu było określenie w jaki sposób radiokoniugat wpływa na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w dwóch badanych liniach: MDA-MB-231 oraz T98G.

Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane w postaci wykresów (Rys. 115, Rys. 117), a także na rysunkach przedstawiających reprezentatywne profile rozkładu cyklu komórkowego (Rys. 116, Rys. 118).



Rys. 115. Procent rozkładu populacji komórek linii MDA-MB-231 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml w porównaniu do grupy kontrolnej.

MDA-MB-231



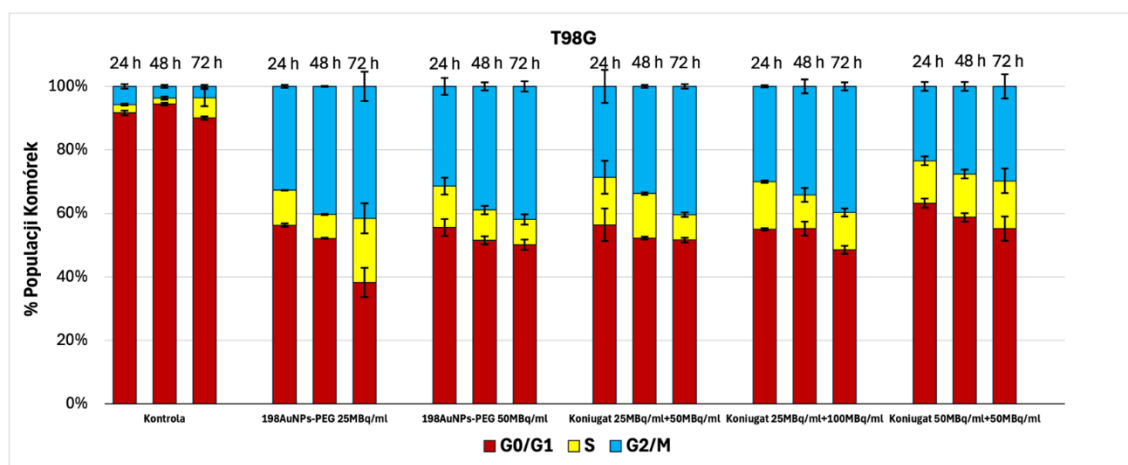
Rys. 116. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii MDA-MB-231 po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami ^{198}Au NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.

Po potraktowaniu komórek linii MDA-MB-231 radioaktywnymi nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ zaobserwowano, że część populacji komórek przeszła z fazy G0/G1 do fazy G2/M. Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji udział populacji w fazie G2/M maleje, przy jednoczesnym wzroście udziału fazy S. Nie stwierdzono istotnych różnic między dwoma badanymi stężeniami promieniotwórczymi izotopu ^{198}Au - 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml. Dla stężenia 25 MBq/ml rozkład komórek w poszczególnych fazach wynosił: G0/G1 - $38,9 \pm 5,5\%$, S - $23,4 \pm 2,3\%$, G2/M - $37,6 \pm 3,4\%$. Dla wyższego stężenia 50 MBq/ml wartości te były zbliżone: G0/G1 - $39,9 \pm 2,6\%$, S - $25,9 \pm 1,6\%$, G2/M - $34,3 \pm 1,1\%$.

Dodanie do radiokoniugatu izotopów rtęci $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ powodowało dalszy spadek liczby komórek w fazie G0/G1 na korzyść fazy G2/M. Po 72 godzinach inkubacji, przy stężeniu promieniotwórczym $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ 50 MBq/ml, udział komórek w fazie G2/M wzrósł do $54,9 \pm 3,0\%$, co stanowiło wzrost o 17,3 p.p. w porównaniu do nanocząstek zawierających wyłącznie ^{198}Au (25 MBq/ml).

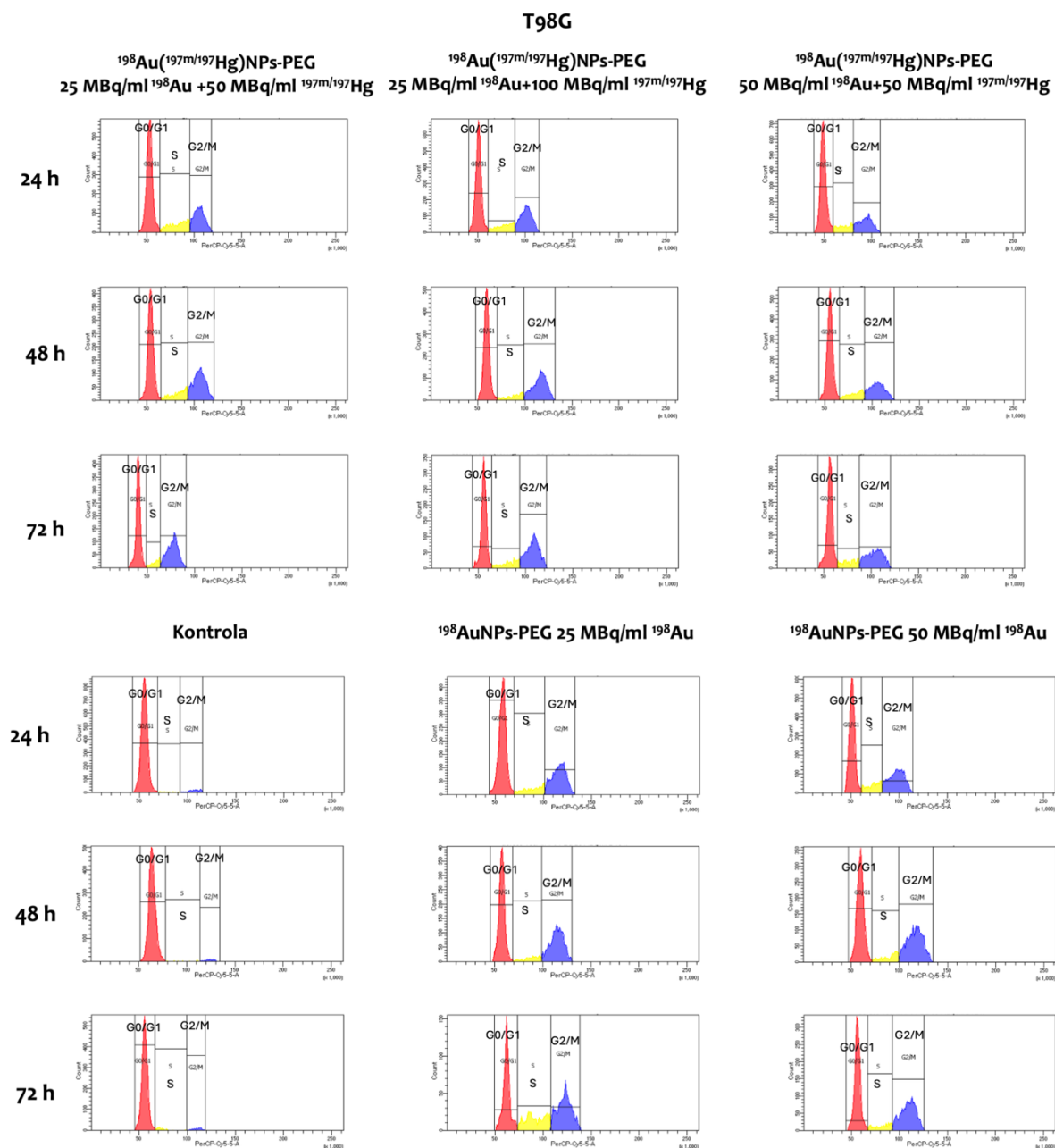
Zwiększenie stężenia rtęci do 100 MBq/ml skutkowało nieznacznym spadkiem tej wartości, która jednak nadal była wyższa o 8,0 p.p. względem samych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$. Dla radiokoniugatu mieszanego zawierającego ^{198}Au - 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ - 50 MBq/ml również odnotowano wzrost udziału komórek w fazie G2/M w stosunku do samych nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$, przy czym różnica wynosiła 10,3 p.p. W przypadku komórek traktowanych radiokoniugatami mieszanymi $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ udział populacji w fazie S pozostawał względnie stabilny, mieszcząc się w przedziale $21,2 \pm 0,5 - 27,8 \pm 0,4\%$. Dla porównania, w przypadku samych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ obserwowano wyraźny wzrost tej frakcji w czasie, od $13,0 \pm 1,6\%$ do $25,9 \pm 1,6\%$.

W porównaniu do radiokoniugatu $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, preparaty mieszane zawierające dodatkowo ^{198}Au powodowały istotny wzrost udziału komórek w fazie S - o 16,5 p.p. (dla 50 MBq/mL $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$) i 19,1 p.p. (dla 100 MBq/ml $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$) po 72 h inkubacji. Zaobserwowano także wzrost udziału populacji w fazie G0/G1 o 8,6 – 18,4 p.p., oraz istotny spadek populacji komórek w fazie G2/M o 26,6 – 36,9 p.p., w zależności od zastosowanego stężenia promieniotwórczego. Nie stwierdzono wyraźnej zależności zmian rozkładu cyklu komórkowego od czasu inkubacji - obserwowane zmiany pojawiały się już po 24 godzinach i utrzymywały się na podobnym poziomie do końca eksperymentu.



Rys. 117. Procent rozkładu populacji komórek linii T98G w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$

wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rys. 118. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii T98G po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.

Dla komórek linii T98G zaobserwowano wyraźną zależność zmian w rozkładzie faz cyklu komórkowego od czasu inkubacji. W porównaniu do linii MDA-MB-231 zmiany te przebiegają w sposób bardziej łagodny i stopniowy. Podobne tendencje zauważono również dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG.

W przypadku komórek inkubowanych z radioaktywnymi nanocząstkami ^{198}Au NPs-PEG stwierdzono, że z czasem zmniejsza się udział komórek w fazie G0/G1, a zwiększa się populacja komórek w fazie G2/M. Po 72 h inkubacji, dla stężenia ^{198}Au NPs-PEG 50 MBq/ml procent populacji komórek znajdujący się w fazie G2/M wynosił $41,7 \pm 1,6\%$, co stanowiło znaczący wzrost względem grupy kontrolnej, gdzie wartość ta wynosiła jedynie $3,6 \pm 0,5\%$.

Dla komórek traktowanych radiokoniugatem $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniach $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml odnotowano wyższy udział frakcji G0/G1 oraz S względem wyników uzyskanych dla samych radioaktywnych nanocząstek. Po 72 godzinach inkubacji wielkość populacji znajdująca się w fazie G0/G1 wynosiła odpowiednio $48,4 \pm 0,8\%$ i $51,1 \pm 0,9\%$, co oznacza wzrost o 10,3 – 13,0 p.p. w porównaniu z wartością $38,1 \pm 0,1\%$ odnoszącą się do samych radioaktywnych nanocząstek.

W przypadku radiokoniugatu mieszanego $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG zawierającego 50 MBq/ml ^{198}Au i 50 MBq/ml $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ stwierdzono wzrost udziału fazy S przy jednoczesnym spadku udziału fazy G2/M. Po 72 h udział komórek w fazie G2/M spadł do $29,7 \pm 3,8\%$, czyli o 12,0 p.p. mniej niż dla ^{198}Au NPs-PEG (50 MBq/ml). Równocześnie, nastąpił wzrost populacji komórek w fazie S o 7,0 p.p.

Ponadto, wartości uzyskane dla badanego radiokoniugatu mieszanego $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG były porównywalne do tych jakie otrzymano dla radiokoniugatu $\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG – bez dodatku radionuklidu złota ^{198}Au . Różnice te były niewielkie, co uniemożliwia jednoznaczne określenie zależności pomiędzy rodzajem zastosowanych radionuklidów, ich stężeniem a rozkładem faz cyklu komórkowego.

W porównaniu z linią MDA-MB-231, linia T98G charakteryzowała się znacznie większym udziałem komórek w fazie G0/G1, a mniejszym udziałem faz S i G2/M we wszystkich próbach z radiokoniugatem $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG. Różnice te znajdowały się w przedziałach: G0/G1: 18,3 – 32,9 p.p., S: 7,2 – 24,9 p.p. oraz G2/M: 6,1 – 19,2 p.p.

W pracy opublikowanej przez Żelechowską-Matysiak i współ. zastosowano połączenie promieniowania β^- (^{198}Au NPs) i chemioterapii (doksorubicyna), ukierunkowany za pomocą trastuzumabu na komórki wykazujące nadmierną ekspresję HER2. Strategia ta doprowadziła do silnego i trwałego zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M. W porównaniu z wynikami opisanymi w niniejszej pracy, zaobserwowano mniejsze wahania liczebności populacji komórek w fazach S i G0/G1.³⁷⁷

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że radiokoniugat $^{198}\text{Au}^{(197\text{m}/197)}\text{Hg}$ NPs-PEG wpływa na cykl komórkowy zarówno linii MDA-MB-231 jak i T98G, powodując przesunięcie populacji komórek z fazy G0/G1 do faz S i G2/M. W przypadku linii MDA-MB-231, zmiany te są szybkie i stabilizują się już po 24 godzinach, natomiast dla linii T98G mają one charakter progresywny i zależny od czasu inkubacji.

ROZDZIAŁ VIII

8. Podsumowanie i wnioski

W ramach niniejszej pracy zbadano fizykochemiczne właściwości i przeciwnowotworowe działanie trzech koniugatów nanocząstek złota z rtęcią:

- nieradioaktywnego koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH,
- radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH zawierającego radionuklidy rtęci ^{197m/197}Hg oraz
- radiokoniugatu ¹⁹⁸Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH zawierającego radionuklidy ¹⁹⁸Au oraz ^{197m/197}Hg.

Nanocząstki będące nośnikami wszystkich powyższych koniugatów zsyntezowano metodą Turkevicha stosując jako prekursor chlorek złota (dla AuNPs) oraz napromieniony roztwór wzorcowy chlorku złota (dla ¹⁹⁸AuNPs).

Przeprowadzono szczegółową analizę właściwości fizykochemicznych otrzymanych nanocząstek oraz ich koniugatów. Badania TEM, HR-TEM, DLS, ZP, FTIR oraz TGA, w celu uniknięcia skażenia aparatury pomiarowej, wykonano dla nieradioaktywnego koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH i można je odnosić bezpośrednio do analogicznych radioaktywnych odpowiedników.

Rozmiar koniugatu oraz jego produktów pośrednich określono za pomocą dwóch technik analitycznych: TEM oraz DLS. Średnica koniugatu Au(Hg)NPs-PEG-COOH wyznaczona metodą TEM wynosiła $6,142 \pm 0,467$ nm, natomiast jego średnica hydrodynamiczna, określona metodą DLS, była około 2-krotnie większa i wynosiła $13,94 \pm 0,86$ nm. Pomiar potencjału zeta wykazał, że Au(Hg)NPs-PEG-COOH charakteryzuje się ujemnym potencjałem zeta o wartości $(-24,63 \pm 2,31)$ mV.

Dodatkowo, pomiary wykonane metodami DLS i ZP umożliwiły wyznaczenie optymalnego stosunku molowego PEG:AuNPs podczas syntezy, który wyniósł 50:1 i został zastosowany do dalszych badań nanocząstek.

Metoda UV-Vis okazała się niewystarczająca do analizy różnic pomiędzy Au(Hg)NPs-PEG-COOH, a koniugatami pośrednimi, ze względu na bardzo niewielkie przesunięcia maksimów absorpcji oraz ich identyczny kształt widma.

Prawidłowość syntezy koniugatu została jednak potwierdzona za pomocą innych technik analitycznych. Wyniki analiz metodą FTIR oraz TGA jednoznacznie potwierdziły modyfikację powierzchni nanocząstek złota zarówno jonami rtęci, jak i PEG-iem, co świadczy o skutecznym otrzymaniu koniugatu Au(Hg)NPs-PEG. Dodatkowo, analiza TGA pozwoliła na określenie stężenia nanocząstek w próbce, które wynosiło $4,10 \cdot 10^{13}$ AuNPs/ml.

Podczas analizy radiokoniugatu Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH ustalono, że maksymalna masa rtęci, jaka może zostać przyłączona do 1 ml nanocząstek, wynosi 10 µg. Ponadto wykazano, że reakcja osiąga wydajność bliską 100% w czasie krótszym niż 15 minut. Przeanalizowano również wpływ dodatku PEG-u na stabilność wiązania rtęci z nanocząstkami złota. Stwierdzono, że stabilność ta pozostaje bliska 100% dla nadmiarów molowych PEG-u $\leq 500:1$.

Wszystkie dalsze syntezowane koniugaty zawierały maksymalną masę rtęci 10 µg/ml, a stosunek molowy PEG:AuNPs wyniósł 50:1.

W pracy zastosowano i przeanalizowano także trzy metody produkcji radionuklidów rtęci:

- produkcję cyklotronową w reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(\text{p}, \text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$,
- produkcję cyklotronową w reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(\text{d}, 2\text{n})^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ oraz
- produkcję reaktorową w reakcji jądrowej $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$.

Na podstawie przeprowadzonych obliczeń teoretycznych oraz badań eksperymentalnych, do rutynowej pracy wybrano metodę produkcji reaktorowej opartą na reakcji jądrowej $^{196}\text{Hg}(\text{n}, \gamma)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$. Metoda ta wyróżniała się wysokim przekrojem czynnym wynoszącym 3078 b dla powstawania ^{197}Hg oraz 105 b dla jego izomeru $^{197\text{m}}\text{Hg}$. Dodatkowymi atutami tej techniki są łatwość rozpuszczenia tarczy oraz możliwość szybkiej syntezy radiokoniugatu, co znacząco usprawnia pracę i pozwala na uzyskanie znacznie wyższej aktywności właściwej produktu końcowego. Zastosowanie reaktora wysokostrumieniowego umożliwia, po 8 dniach napromienienia, uzyskanie aktywności właściwej radionuklidu ^{197}Hg na poziomie 5,99 TBq/mg. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na wyższość metody reaktorowej zarówno pod względem wydajności, jak i praktyczności, co czyni ją bardziej efektywnym rozwiązaniem dla rutynowej produkcji radionuklidów przeznaczonych do zastosowań w terapii przeciwnowotworowej.

Dla wszystkich zsyntezowanych koniugatów przeprowadzono również ocenę ich potencjału przeciwnowotworowego *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych MDA-MB-231 (potrójnie ujemny rak piersi) oraz T98G (glejak wielopostaciowy). W ramach badań wykonano następujące analizy:

- ocenę stabilności koniugatów,
- analizę cytotoksyczności metodą testu MTS oraz na trójwymiarowych strukturach komórkowych,
- badanie apoptozy i cyklu komórkowego przy użyciu cytometrii przepływowej,
- ocenę procesu internalizacji do wnętrza komórki,
- badanie internalizacji do wnętrza jądra komórkowego oraz
- analizę indukcji podwójnych pęknięć nici DNA metodą immunofluorescencji z wykorzystaniem $\gamma\text{-H2AX}$ jako markera uszkodzeń DNA.

Ze względu na założenie, iż toksyczność radiokoniugatu wynika wyłącznie z obecności radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$, przeprowadzono badania nieradioaktywnego koniugatu $\text{Au}(\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ w celu wyznaczenia nietoksycznego stężenia nieradioaktywnej rtęci w strukturze AuNPs. W tym celu koniugat poddano analizie cytotoksyczności z wykorzystaniem testu MTS oraz trójwymiarowych modeli komórkowych, a także badaniom apoptozy i cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki badań cytotoksyczności umożliwiły wyznaczenie nietoksycznego stężenia rtęci, które określono na poziomie poniżej 6 $\mu\text{g/ml}$.

W analizie apoptozy wykazano, że nieradioaktywny koniugat indukuje głównie późną apoptozę, nie wpływając istotnie na poziom nekrozy ($\leq 1,2\%$). Ponadto, nieradioaktywny koniugat wywierał jedynie niewielki wpływ na rozkład faz cyklu komórkowego w linii MDA-MB-231 oraz nie wykazywał istotnego wpływu na cykl komórkowy komórek linii T98G.

Radiokoniugaty $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ oraz $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ zostały poddane analizie stabilności, badaniom internalizacji do wnętrza komórki oraz jądra komórkowego, testom cytotoksyczności (test MTS oraz badania na trójwymiarowych strukturach komórkowych), a także analizie indukowanej śmierci komórkowej i cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej.

W badaniach stabilności wykazano, że oba radiokoniugaty charakteryzują się wysoką stabilnością w roztworze PBS do 6 dni oraz w roztworze soli fizjologicznej do 4 dni. Zaobserwowano również, że stabilność radiokoniugatu mieszanego $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ jest nieznacznie niższa w porównaniu z koniugatem zawierającym wyłącznie radioaktywną rtęć - $\text{Au}(^{197\text{m}/197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$.

Dla związku $\text{Au}^{(19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$ zaobserwowano wysoki poziom internalizacji do wnętrza komórek, wynoszący po 24 godzinach 87,51% dla linii MDA-MB-231 oraz 91,10% dla linii T98G. Wyniki te wskazują na istotny potencjał terapeutyczny radiokoniugatu, zwłaszcza w kontekście terapii z wykorzystaniem elektronów Augera, których zasięg w tkankach jest bardzo krótki, co sprzyja precyzyjnemu uszkodzaniu struktur komórkowych.

W przypadku radiokoniugatu mieszanego $^{19\ 8}\text{Au}^{(19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$ poziom internalizacji był nieco niższy i wynosił odpowiednio 77,36% dla komórek MDA-MB-231 oraz 85,74% dla komórek T98G. Zaobserwowano ponadto, że dane dotyczące internalizacji do wnętrza komórki oraz jądra komórkowego różniły się w zależności od radionuklidu ($^{19\ 8}\text{Au}$ vs. $^{19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg}}$), co może być związane z niejednorodnym rozmieszczeniem radionuklidów na powierzchni nanocząstek — z punktu widzenia statystyki nie każda nanocząstka była pokryta atomami rtęci

Ponadto, co szczególnie istotne z perspektywy terapii z wykorzystaniem emiterów elektronów Augera, badanie frakcjonowania jądra komórkowego pokazało potencjał analizowanych radiokoniugatów do przenikania do wnętrza jądra komórkowego. Dodatkowo, radiokoniugat $\text{Au}^{(19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg})\text{NPs-PEG}}$ poddano analizie indukowania podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs) z wykorzystaniem metody immunofluorescencji $\gamma\text{-H2AX}$.

Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność radiokoniugatu do skutecznej indukcji uszkodzeń DNA w liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz T98G. W obu przypadkach intensywność sygnału $\gamma\text{-H2AX}$, świadczącego o obecności dwuniciowych pęknięć DNA, była istotnie wyższa w porównaniu do grup kontrolnych. Obserwacje te jednoznacznie wskazują na wysoką skuteczność terapeutyczną badanego radiokoniugatu oraz jego znaczny potencjał w zastosowaniach przeciwnowotworowych.

Badania cytotoksyczności przeprowadzone za pomocą testu MTS wykazały, że radiokoniugaty wywołują efekt cytotoksyczny w postaci obniżenia aktywności metabolicznej komórek linii MDA-MB-231 oraz T98G. Zaobserwowano istotne różnice w odpowiedzi obu badanych linii komórkowych. Komórki MDA-MB-231 wykazywały nieliniową odpowiedź na działanie radiokoniugatów, co skutkowało gwałtownym spadkiem ich aktywności metabolicznej przy wyższych stężeniach.

W przypadku radiokoniugatu $^{19\ 8}\text{Au}^{(19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$ nie stwierdzono statystycznie istotnego efektu synergistycznego działania radionuklidów $^{19\ 8}\text{Au}$ oraz $^{19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg}}$ w komórkach

MDA-MB-231. Niemniej jednak, odnotowano znacząco większe obniżenie aktywności metabolicznej tych komórek w porównaniu z działaniem koniugatu zawierającego wyłącznie $^{19\ 8}\text{AuNPs-PEG}$.

Dla komórek linii T98G efekt synergistyczny nie został zaobserwowany, co może wskazywać na różnice w wrażliwości metabolicznej między badanymi liniami komórkowymi.

Radiokoniugat $\text{Au}^{(19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$ wykazywał wysoką skuteczność wobec sferoidów MDA-MB-231, powodując ich całkowity rozpad przy wszystkich badanych stężeniach, a szybkość tego procesu była zależna od zastosowanego stężenia. W przypadku sferoidów utworzonych z komórek linii T98G zaobserwowano natomiast wyraźną oporność na działanie radiokoniugatu – nawet w ostatnim dniu eksperymentu nie odnotowano rozpadu ich struktury.

Dla radiokoniugatu $^{19\ 8}\text{Au}^{(19\ 7\ m/19\ 7\ \text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}}$, efekt cytotoksyczny był słabszy w porównaniu do jego odpowiednika niezawierającego izotopu $^{19\ 8}\text{Au}$, zarówno w przypadku komórek MDA-MB-231, jak i T98G. Żaden z analizowanych związków w tym eksperymencie nie doprowadził do całkowitego rozpadu sferoidów obu linii komórkowych, co pozostaje niezgodne z wcześniejszymi obserwacjami i może być wynikiem drobnych modyfikacji procedury syntezy radiokoniugatu

$^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, związanych z wykorzystaniem radioaktywnego prekursora do wytwarzania nanocząstek.

W badaniu apoptozy przeprowadzonym metodą cytometrii przepływowej dla obu radiokoniugatów oraz linii komórkowych nie stwierdzono istotnego udziału frakcji nekrotycznej ($\leq 1,3\%$). Zarówno radiokoniugat $\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$, jak i $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ indukowały śmierć komórkową głównie na drodze późnej apoptozy. Dla radiokoniugatu $\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$, ostatniego dnia inkubacji zaobserwowano wyższy odsetek żywych komórek w populacji MDA-MB-231, natomiast dla linii T98G odnotowano wyraźny wzrost udziału komórek w fazie późnej apoptozy. Komórki linii MDA-MB-231 wykazywały większą wrażliwość na działanie radiokoniugatu

$^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$, co potwierdzono wyższym odsetkiem komórek apoptotycznych w porównaniu do grup traktowanych nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ oraz radiokoniugatem $\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$.

W przypadku linii T98G nie zaobserwowano istotnej przewagi terapeutycznej radiokoniugatu zawierającego oba izotopy (^{198}Au oraz $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$) względem koniugatów zawierających pojedyncze radionuklidy.

Oba badane związki wykazywały istotny wpływ na przebieg cyklu komórkowego w analizowanych liniach komórkowych, indukując przesunięcie komórek z fazy G0/G1 do fazy G2/M. Zaobserwowany efekt był częściowo zależny od czasu inkubacji oraz stężenia radiokoniugatu, przy czym zależności te były mniej wyraźne w przypadku linii T98G, gdzie rozkład faz cyklu komórkowego pozostawał bardziej stabilny w czasie. Analiza wykazała istotne różnice w rozkładzie faz cyklu między komórkami traktowanymi radiokoniugatami a grupą kontrolną, co potwierdza wpływ tych związków na mechanizmy regulujące podział komórkowy.

Dodatkowo, dla radiokoniugatu $\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ przeprowadzono ocenę działania terapeutycznego *in vivo* na modelu myszy z guzami indukowanymi komórkami nowotworowymi linii 4T1. Przeprowadzono następujące badania *ex vivo*:

- analizę biodystrybucji po dożylnym podaniu radiokoniugatu oraz po jego bezpośrednim wstrzyknięciu do guza,
- ocenę efektywności terapeutycznej dla radiokoniugatu $\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o aktywności 10 MBq (podanie do guza),
- ocenę efektywności terapeutycznej dla radiokoniugatu $\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o aktywności 25 MBq (podanie do guza).

W badaniu biodystrybucji po dożylnym podaniu radiokoniugatu $\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ myszom zaobserwowano, że po 2 godzinach część nanocząstek nadal krążyła w krwiobiegu, a głównymi miejscami ich akumulacji były wątroba, nerki oraz płuca. Po 24 godzinach poziom nagromadzenia nanocząstek w wątrobie i śledzionie utrzymywał się na względnie stałym poziomie, podczas gdy znacząco wzrósł w nerkach. W przypadku guza odnotowano niewielką akumulację, wynoszącą jedynie $3,11 \pm 0,62\% \text{IA/g}$.

Niska retencja w guzie była zgodna z oczekiwaniami, wynikającymi z braku biomolekuły naprowadzającej w strukturze radiokoniugatu. Po 72 godzinach poziomy akumulacji w wątrobie i śledzionie pozostały stabilne, natomiast zawartość nanocząstek w nerkach ponownie wzrosła, co wskazuje na udział tego narządu w procesie eliminacji nanocząstek z organizmu.

Po bezpośrednim wstrzyknięciu radiokoniugatu do guza zaobserwowano początkowo bardzo wysoką lokalną akumulację - $134,04 \pm 17,38\% \text{IA/g}$, która stopniowo malała w czasie:

do $47,82 \pm 9,91$ %IA/g po 24 godzinach i $12,72 \pm 3,90$ %IA/g po 72 godzinach. Równocześnie obserwowano wzrost gromadzenia się nanocząstek w nerkach, co potwierdza ich rolę w wydalaniu radiokoniugatu.

Choć retencja w guzie może być zwiększona poprzez odpowiednie modyfikacje powierzchni nanocząstek (np. wprowadzenie biomolekuł celujących), może to jednocześnie wpłynąć negatywnie na ich właściwości farmakokinetyczne i skuteczność terapeutyczną. Wyniki sugerują, że niecelowane nanocząstki mogą stanowić wartościowe narzędzie terapeutyczne w leczeniu nowotworów o zróżnicowanym profilu fenotypowym, co czyni je obiecującą opcją w kontekście nanobrachyterapii.

W ocenie efektywności terapeutycznej wykazano zahamowanie wzrostu guzów w grupach leczonych radiokoniugatem Au($^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$)NPs-PEG. Dla dawki promieniotwórczej 10 MBq wskaźnik zahamowania wzrostu guza (TGI) wyniósł 32% po 18 dniach oraz 35% po 22 dniach, co wskazuje na istotny potencjał terapeutyczny tej dawki. Efekt terapeutyczny był również obserwowany w grupie otrzymującej 25 MBq, jednak wyższa toksyczność znacząco ograniczała jej zastosowanie. W grupie 25 MBq zaobserwowano wyraźną utratę masy ciała - $29,27 \pm 3,38\%$ po 15 dniach oraz podwyższoną śmiertelność, które przypisano nadmiernej aktywności radiokoniugatu.

Pomimo pewnych ograniczeń badania zaprezentowane w niniejszej pracy dostarczyły cennych informacji na temat możliwości zastosowania Au($^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$)NPs-PEG do terapii przeciwnowotworowej w kontekście nanobrachyterapii. Komórki glejaka oraz potrójnie ujemnego nowotworu piersi charakteryzują się niską ekspresją receptorów, co znacznie utrudnia dobór odpowiednich biomolekuł do celowanego dostarczania leków. Z tego względu istnieje potrzeba opracowania alternatywnych podejść terapeutycznych, które nie wymagają precyzyjnego naprowadzania na konkretne cele molekularne. Zastosowanie radioaktywnych nanocząstek opartych na emiterach elektronów Auger, podanych bezpośrednio do guza bądź też łoża pooperacyjnej, znacznie zwiększa możliwości leczenia. Prezentowana praca po raz pierwszy opisuje potencjał terapeutyczny radionuklidów rtęci $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ w badaniach toksyczności *in vivo*. Uzyskane wyniki sugerują możliwą skuteczność zastosowanego radiokoniugatu przy niższych dawkach, co stanowi istotny krok w kierunku optymalizacji aktywności promieniotwórczej oraz minimalizacji efektów ubocznych. Warto również podkreślić, że w pracy opublikowanej przez Brown i współ.⁷⁸ wykazano, że nanocząstki [^{197}Hg]Hg-AuNPs zarówno z dołączonym wektorem jak i bez niego, charakteryzowały się podobną retencją w guzie mózgu u myszy (U251-Luc). Potwierdza to możliwość skutecznego zastosowania otrzymanych w niniejszej pracy radioaktywnych koniugatów rtęci do miejscowej terapii glejaka oraz potrójnie ujemnego raka piersi, nowotworów szczególnie trudnych w leczeniu.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Triple-negative Breast Cancer. www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/triple-negative.html (accessed 2024-02-05).
- (2) Grade 4 – Glioblastoma (GBM). www.brainumor.org (accessed 2025-02-17).
- (3) Ku, A.; Facca, V. J.; Cai, Z.; Reilly, R. M. Auger Electrons for Cancer Therapy – a Review. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* **2019**, 4 (1), 27. <https://doi.org/10.1186/s41181-019-0075-2>.
- (4) Benign & Malignant Tumors. <https://health.uconn.edu/orthopedics-sports-medicine/conditions-and-treatments/a-z-index/benign-malignant-tumors/> (accessed 2025-01-03).
- (5) Łukasiewicz, S.; Czeczelewski, M.; Forma, A.; Baj, J.; Sitarz, R.; Stanisławek, A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers* **2021**, 13 (17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>.
- (6) Pérez-Carreón, J.; Meléndez-Zajgla, J. In Vitro and in Vivo Models for Cancer Research. *Molecular Oncology Principles and Recent Advances* **2012**, 148–162. <https://doi.org/10.2174/978160805016111201010148>.
- (7) De Ieso, M.; Yool, A. Mechanisms of Aquaporin-Facilitated Cancer Invasion and Metastasis. *Frontiers in Chemistry* **2018**, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00135>.
- (8) Typy nowotworów. <https://maintrac.com.pl/typy-nowotworow/> (accessed 2025-01-03).
- (9) Types of cancer. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer> (accessed 2024-01-03).
- (10) Siegel, R. L.; Giaquinto, A. N.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2024**, 74 (1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>.
- (11) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, 71 (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (12) Wang, B.; Hu, S.; Teng, Y.; Chen, J.; Wang, H.; Xu, Y.; Wang, K.; Xu, J.; Cheng, Y.; Gao, X. Current Advance of Nanotechnology in Diagnosis and Treatment for Malignant Tumors. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2024**, 9 (1), 200. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01889-y>.
- (13) Grade 4 – Glioblastoma (GBM). www.brainumor.org (accessed 2024-02-05).
- (14) Kumar, P.; Aggarwal, R. An Overview of Triple-Negative Breast Cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **2016**, 293 (2), 247–269. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>.
- (15) Howlader, N.; Altekruse, S. F.; Li, C. I.; Chen, V. W.; Clarke, C. A.; Ries, L. A. G.; Cronin, K. A. US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2014**, 106 (5), dju055. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju055>.
- (16) Höller, A.; Nguyen-Sträuli, B. D.; Frauchiger-Heuer, H.; Ring, A. “Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Luminal Breast Cancer: Where Are We Now?” *Breast Cancer: Targets and Therapy* **2023**, 15 (null), 525–540. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S340741>.
- (17) Skowronek, J. Current Status of Brachytherapy in Cancer Treatment – Short Overview. *Journal of Contemporary Brachytherapy* **2017**, 9 (6), 581–589. <https://doi.org/10.5114/jcb.2017.72607>.
- (18) Ignatiadis, M.; Sotiriou, C. Luminal Breast Cancer: From Biology to Treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2013**, 10 (9), 494–506. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.124>.

- (19) Ades, F.; Zardavas, D.; Bozovic-Spasojevic, I.; Pugliano, L.; Fumagalli, D.; de Azambuja, E.; Viale, G.; Sotiriou, C.; Piccart, M. Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *JCO* **2014**, 32 (25), 2794–2803. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1870>.
- (20) Li, Z.-H.; Hu, P.-H.; Tu, J.-H.; Yu, N.-S. Luminal B Breast Cancer: Patterns of Recurrence and Clinical Outcome. *Oncotarget* **2016**, 7 (40), 65024–65033. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11344>.
- (21) Kauer-Dorner, D.; Berger, D. The Role of Brachytherapy in the Treatment of Breast Cancer. *Breast Care* **2018**, 13 (3), 157–161. <https://doi.org/10.1159/000489638>.
- (22) Oh, D.-Y.; Bang, Y.-J. HER2-Targeted Therapies — a Role beyond Breast Cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2020**, 17 (1), 33–48. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>.
- (23) Figueroa-Magalhães, M. C.; Jelovac, D.; Connolly, R. M.; Wolff, A. C. Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *The Breast* **2014**, 23 (2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.11.011>.
- (24) Loibl, S.; Gianni, L. HER2-Positive Breast Cancer. *The Lancet* **2017**, 389 (10087), 2415–2429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5).
- (25) Foulkes William D.; Smith Ian E.; Reis-Filho Jorge S. Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2010**, 363 (20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>.
- (26) Cleator, S.; Heller, W.; Coombes, R. C. Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Options. *The Lancet Oncology* **2007**, 8 (3), 235–244. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70074-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70074-8).
- (27) Li, Y.; Zhang, H.; Merkhher, Y.; Chen, L.; Liu, N.; Leonov, S.; Chen, Y. Recent Advances in Therapeutic Strategies for Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Hematology & Oncology* **2022**, 15 (1), 121. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01341-0>.
- (28) Medina, M. A.; Oza, G.; Sharma, A.; Arriaga, L. G.; Hernández Hernández, J. M.; Rotello, V. M.; Ramirez, J. T. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2020**, 17 (6). <https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>.
- (29) Syed, Y. Y. Sacituzumab Govitecan: First Approval. *Drugs* **2020**, 80 (10), 1019–1025. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01337-5>.
- (30) Thakur, V.; Kutty, R. V. Recent Advances in Nanotheranostics for Triple Negative Breast Cancer Treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2019**, 38 (1), 430. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1443-1>.
- (31) Dai, W.; Yang, F.; Ma, L.; Fan, Y.; He, B.; He, Q.; Wang, X.; Zhang, H.; Zhang, Q. Combined mTOR Inhibitor Rapamycin and Doxorubicin-Loaded Cyclic Octapeptide Modified Liposomes for Targeting Integrin A3 in Triple-Negative Breast Cancer. *Biomaterials* **2014**, 35 (20), 5347–5358. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.036>.
- (32) Lee, S.-M.; Ahn, R. W.; Chen, F.; Fought, A. J.; O'Halloran, T. V.; Cryns, V. L.; Nguyen, S. T. Biological Evaluation of pH-Responsive Polymer-Caged Nanobins for Breast Cancer Therapy. *ACS Nano* **2010**, 4 (9), 4971–4978. <https://doi.org/10.1021/nn100560p>.
- (33) Sun, Y.; Zou, W.; Bian, S.; Huang, Y.; Tan, Y.; Liang, J.; Fan, Y.; Zhang, X. Bioreducible PAA-g-PEG Graft Micelles with High Doxorubicin Loading for Targeted Antitumor Effect against Mouse Breast Carcinoma. *Biomaterials* **2013**, 34 (28), 6818–6828. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.032>.
- (34) Zhang, H.; Hu, H.; Zhang, H.; Dai, W.; Wang, X.; Wang, X.; Zhang, Q. Effects of PEGylated Paclitaxel Nanocrystals on Breast Cancer and Its Lung Metastasis. *Nanoscale* **2015**, 7 (24), 10790–10800. <https://doi.org/10.1039/C4NR07450E>.
- (35) Andey, T.; Sudhakar, G.; Marepally, S.; Patel, A.; Banerjee, R.; Singh, M. Lipid Nanocarriers of a Lipid-Conjugated Estrogenic Derivative Inhibit Tumor Growth and Enhance Cisplatin Activity against Triple-Negative Breast Cancer: Pharmacokinetic and Efficacy Evaluation. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, 12 (4), 1105–1120. <https://doi.org/10.1021/mp5008629>.
- (36) Awada, A.; Bondarenko, I. N.; Bonnetterre, J.; Nowara, E.; Ferrero, J. M.; Bakshi, A. V.; Wilke, C.; Piccart, M. A Randomized Controlled Phase II Trial of a Novel Composition of Paclitaxel Embedded into Neutral and Cationic Lipids Targeting Tumor Endothelial Cells in Advanced Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). *Annals of Oncology* **2014**, 25 (4), 824–831. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu025>.

- (37) Taurin, S.; Nehoff, H.; Diong, J.; Larsen, L.; Rosengren, R. J.; Greish, K. Curcumin-Derivative Nanomicelles for the Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Drug Targeting* **2013**, *21* (7), 675–683. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.796955>.
- (38) Kutty, R. V.; Feng, S.-S. Cetuximab Conjugated Vitamin E TPGS Micelles for Targeted Delivery of Docetaxel for Treatment of Triple Negative Breast Cancers. *Biomaterials* **2013**, *34* (38), 10160–10171. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.043>.
- (39) Matsumura, Y. Preclinical and Clinical Studies of NK012, an SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, Which Is Designed Based on EPR Effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63* (3), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.008>.
- (40) Huang, Q.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Timashev, P.; Ma, X.; Liang, X.-J. Adaptive Changes Induced by Noble-Metal Nanostructures in Vitro and in Vivo. *Theranostics* **2020**, *10* (13), 5649–5670. <https://doi.org/10.7150/thno.42569>.
- (41) Johnstone, T. C.; Kulak, N.; Pridgen, E. M.; Farokhzad, O. C.; Langer, R.; Lippard, S. J. Nanoparticle Encapsulation of Mitaplatin and the Effect Thereof on in Vivo Properties. *ACS Nano* **2013**, *7* (7), 5675–5683. <https://doi.org/10.1021/nn401905g>.
- (42) Passarella, R. J.; Spratt, D. E.; van der Ende, A. E.; Phillips, J. G.; Wu, H.; Sathiyakumar, V.; Zhou, L.; Hallahan, D. E.; Harth, E.; Diaz, R. Targeted Nanoparticles That Deliver a Sustained, Specific Release of Paclitaxel to Irradiated Tumors. *Cancer Research* **2010**, *70* (11), 4550–4559. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0339>.
- (43) Cao, H.; Zhang, Z.; Zhao, S.; He, X.; Yu, H.; Yin, Q.; Zhang, Z.; Gu, W.; Chen, L.; Li, Y. Hydrophobic Interaction Mediating Self-Assembled Nanoparticles of Succinobucol Suppress Lung Metastasis of Breast Cancer by Inhibition of VCAM-1 Expression. *J Control Release* **2015**, *205*, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.015>.
- (44) Deng, Z. J.; Morton, S. W.; Ben-Akiva, E.; Dreaden, E. C.; Shopsowitz, K. E.; Hammond, P. T. Layer-by-Layer Nanoparticles for Systemic Codelivery of an Anticancer Drug and siRNA for Potential Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *ACS Nano* **2013**, *7* (11), 9571–9584. <https://doi.org/10.1021/nn4047925>.
- (45) Shan, D.; Li, J.; Cai, P.; Prasad, P.; Liu, F.; Rauth, A. M.; Wu, X. Y. RGD-Conjugated Solid Lipid Nanoparticles Inhibit Adhesion and Invasion of $\text{Av}\beta 3$ Integrin-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Drug Delivery and Translational Research* **2015**, *5* (1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s13346-014-0210-2>.
- (46) Zhang, T.; Prasad, P.; Cai, P.; He, C.; Shan, D.; Rauth, A. M.; Wu, X. Y. Dual-Targeted Hybrid Nanoparticles of Synergistic Drugs for Treating Lung Metastases of Triple Negative Breast Cancer in Mice. *Acta Pharmacologica Sinica* **2017**, *38* (6), 835–847. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.166>.
- (47) Kong, T.; Zeng, J.; Wang, X.; Yang, X.; Yang, J.; McQuarrie, S.; McEwan, A.; Roa, W.; Chen, J.; Xing, J. Z. Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized Attachment of Gold Nanoparticles. *Small* **2008**, *4* (9), 1537–1543. <https://doi.org/10.1002/smll.200700794>.
- (48) Sharma, A.; Jain, N.; Sareen, R. Nanocarriers for Diagnosis and Targeting of Breast Cancer. *BioMed Research International* **2013**, *2013* (1), 960821. <https://doi.org/10.1155/2013/960821>.
- (49) Yang, M.; Meng, J.; Cheng, X.; Lei, J.; Guo, H.; Zhang, W.; Kong, H.; Xu, H. Multiwalled Carbon Nanotubes Interact with Macrophages and Influence Tumor Progression and Metastasis. *Theranostics* **2012**, *2* (3), 258–270. <https://doi.org/10.7150/thno.3629>.
- (50) Burke, A. R.; Singh, R. N.; Carroll, D. L.; Wood, J. C. S.; D'Agostino, R. B.; Ajayan, P. M.; Torti, F. M.; Torti, S. V. The Resistance of Breast Cancer Stem Cells to Conventional Hyperthermia and Their Sensitivity to Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy. *Biomaterials* **2012**, *33* (10), 2961–2970. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.052>.
- (51) Chow, E. K.; Zhang, X.-Q.; Chen, M.; Lam, R.; Robinson, E.; Huang, H.; Schaffer, D.; Osawa, E.; Goga, A.; Ho, D. Nanodiamond Therapeutic Delivery Agents Mediate Enhanced Chemoresistant Tumor Treatment. *Science Translational Medicine* **2011**, *3* (73), 73ra21–73ra21. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001713>.
- (52) Setyawati, M. I.; Kutty, R. V.; Leong, D. T. DNA Nanostructures Carrying Stoichiometrically Definable Antibodies. *Small* **2016**, *12* (40), 5601–5611. <https://doi.org/10.1002/smll.201601669>.

- (53) Tomao, F.; Papa, A.; Zaccarelli, E.; Rossi, L.; Caruso, D.; Minozzi, M.; Vici, P.; Frati, L.; Tomao, S. Triple-Negative Breast Cancer: New Perspectives for Targeted Therapies. *OncoTargets and Therapy* **2015**, *8* (null), 177–193. <https://doi.org/10.2147/OTT.S67673>.
- (54) Grochans, S.; Cybulska, A. M.; Simińska, D.; Korbecki, J.; Kojder, K.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers* **2022**, *14* (10). <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>.
- (55) Alifieris, C.; Trafalis, D. T. Glioblastoma Multiforme: Pathogenesis and Treatment. *Pharmacology & Therapeutics* **2015**, *152*, 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>.
- (56) Wu, W.; Klockow, J. L.; Zhang, M.; Lafortune, F.; Chang, E.; Jin, L.; Wu, Y.; Daldrop-Link, H. E. Glioblastoma Multiforme (GBM): An Overview of Current Therapies and Mechanisms of Resistance. *Pharmacological Research* **2021**, *171*, 105780. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>.
- (57) Wen, P. Y.; Schiff, D.; Kesari, S.; Drappatz, J.; Gigas, D. C.; Doherty, L. Medical Management of Patients with Brain Tumors. *J Neurooncol* **2006**, *80* (3), 313–332. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9193-2>.
- (58) Bock, H. C.; Puchner, M. J. A.; Lohmann, F.; Schütze, M.; Koll, S.; Ketter, R.; Buchalla, R.; Rainov, N.; Kantelhardt, S. R.; Rohde, V.; Giese, A. First-Line Treatment of Malignant Glioma with Carmustine Implants Followed by Concomitant Radiochemotherapy: A Multicenter Experience. *Neurosurgical Review* **2010**, *33* (4), 441–449. <https://doi.org/10.1007/s10143-010-0280-7>.
- (59) Kaina, B.; Christmann, M. DNA Repair in Personalized Brain Cancer Therapy with Temozolomide and Nitrosoureas. *DNA Repair* **2019**, *78*, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.04.007>.
- (60) Lombardi, G.; De Salvo, G. L.; Brandes, A. A.; Eoli, M.; Rudà, R.; Faedi, M.; Lolli, I.; Pace, A.; Daniele, B.; Pasqualetti, F. Regorafenib Compared with Lomustine in Patients with Relapsed Glioblastoma (REGOMA): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Controlled, Phase 2 Trial. *The Lancet Oncology* **2019**, *20* (1), 110–119.
- (61) Brandes, A. A.; Finocchiaro, G.; Zagonel, V.; Reni, M.; Caserta, C.; Fabi, A.; Clavarezza, M.; Maiello, E.; Eoli, M.; Lombardi, G. AVAREG: A Phase II, Randomized, Noncomparative Study of Fotemustine or Bevacizumab for Patients with Recurrent Glioblastoma. *Neuro-oncology* **2016**, *18* (9), 1304–1312.
- (62) Ameratunga, M.; Pavlakis, N.; Wheeler, H.; Grant, R.; Simes, J.; Khasraw, M. Anti- angiogenic Therapy for High- grade Glioma. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2018**, No. 11.
- (63) Ozel, O.; Kurt, M.; Ozdemir, O.; Bayram, J.; Akdeniz, H.; Koca, D. Complete Response to Bevacizumab plus Irinotecan in Patients with Rapidly Progressive GBM: Cases Report and Literature Review. *Journal of Oncological Sciences* **2016**, *2* (2–3), 87–94.
- (64) Friedman, H. S.; Prados, M. D.; Wen, P. Y.; Mikkelsen, T.; Schiff, D.; Abrey, L. E.; Yung, W. A.; Paleologos, N.; Nicholas, M. K.; Jensen, R. Bevacizumab Alone and in Combination with Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *Journal of clinical oncology* **2009**, *27* (28), 4733–4740.
- (65) Moughon, D.; Everson, R.; Odesa, S.; Soto, H.; Billingslea-Yoon, E.; Sedighim, S.; Orpilla, J.; Lin, J.; Prins, R.; Liau, L. ATIM-32. PHASE IIA CLINICAL TRIAL EVALUATING DENDRITIC CELL VACCINE FOR THE TREATMENT OF LOW-GRADE GLIOMAS. *Neuro-Oncology* **2016**, *18* (suppl_6), vi25–vi25. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now212.097>.
- (66) Cabrera, A. R.; Kirkpatrick, J. P.; Fiveash, J. B.; Shih, H. A.; Koay, E. J.; Lutz, S.; Petit, J.; Chao, S. T.; Brown, P. D.; Vogelbaum, M. Radiation Therapy for Glioblastoma: Executive Summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Practical radiation oncology* **2016**, *6* (4), 217–225.
- (67) Ganz, J. C. The Journey from Proton to Gamma Knife. *Progress in Brain Research* **2014**, *215*, 67–75.
- (68) Barbarite, E.; Sick, J. T.; Berchmans, E.; Bregy, A.; Shah, A. H.; Elsayyad, N.; Komotar, R. J. The Role of Brachytherapy in the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Neurosurgical review* **2017**, *40*, 195–211.

- (69) Laperriere, N. J.; Leung, P. M.; McKenzie, S.; Milosevic, M.; Wong, S.; Glen, J.; Pintilie, M.; Bernstein, M. Randomized Study of Brachytherapy in the Initial Management of Patients with Malignant Astrocytoma. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* **1998**, *41* (5), 1005–1011.
- (70) Selker, R. G.; Shapiro, W. R.; Burger, P.; Blackwood, M. S.; Deutsch, M.; Arena, V. C.; Van Gilder, J. C.; Wu, J.; Malkin, M. G.; Mealey Jr, J. The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: A Randomized Comparison of Surgery, External Radiotherapy, and Carmustine versus Surgery, Interstitial Radiotherapy Boost, External Radiation Therapy, and Carmustine. *Neurosurgery* **2002**, *51* (2), 343–357.
- (71) Kong, L.; Wu, J.; Gao, J.; Qiu, X.; Yang, J.; Hu, J.; Hu, W.; Mao, Y.; Lu, J. J. Particle Radiation Therapy in the Management of Malignant Glioma: Early Experience at the Shanghai Proton and Heavy Ion Center. *Cancer* **2020**, *126* (12), 2802–2810.
- (72) Wen, P. Y.; Kesari, S. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* **2008**, *359* (5), 492–507. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126>.
- (73) Butowski, N. A.; Sneed, P. K.; Chang, S. M. Diagnosis and Treatment of Recurrent High-Grade Astrocytoma. *JCO* **2006**, *24* (8), 1273–1280. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.7522>.
- (74) Shi, Y.; van der Meel, R.; Chen, X.; Lammers, T. The EPR Effect and beyond: Strategies to Improve Tumor Targeting and Cancer Nanomedicine Treatment Efficacy. *Theranostics* **2020**, *10* (17), 7921–7924. <https://doi.org/10.7150/thno.49577>.
- (75) Wang, B.; Lv, L.; Wang, Z.; Jiang, Y.; Lv, W.; Liu, X.; Wang, Z.; Zhao, Y.; Xin, H.; Xu, Q. Improved Anti-Glioblastoma Efficacy by IL-13R α 2 Mediated Copolymer Nanoparticles Loaded with Paclitaxel. *Scientific reports* **2015**, *5* (1), 16589.
- (76) Grafals-Ruiz, N.; Rios-Vicil, C. I.; Lozada-Delgado, E. L.; Quiñones-Díaz, B. I.; Noriega-Rivera, R. A.; Martínez-Zayas, G.; Santana-Rivera, Y.; Santiago-Sánchez, G. S.; Valiyeva, F.; Vivas-Mejía, P. E. Brain Targeted Gold Liposomes Improve RNAi Delivery for Glioblastoma. *International Journal of Nanomedicine* **2020**, 2809–2828.
- (77) Belhadji, Z.; Zhan, C.; Ying, M.; Wei, X.; Xie, C.; Yan, Z.; Lu, W. Multifunctional Targeted Liposomal Drug Delivery for Efficient Glioblastoma Treatment. *Oncotarget* **2017**, *8* (40), 66889.
- (78) Brown, M.; Cai, Z.; Kondo, M.; Chen, S.; Weatherall, N.; Radchenko, V.; Reilly, R. Convection-Enhanced Delivery (CED) of ¹⁹⁷Hg-Labeled Gold Nanoparticles to Orthotopic Human GBM Tumors in Mice as a Potential Auger Electron-Emitting Radiation Nanomedicine for GBM. *J Nucl Med* **2024**, *65* (supplement 2), 241831.
- (79) Arshad, A.; Yang, B.; Bienemann, A. S.; Barua, N. U.; Wyatt, M. J.; Woolley, M.; Johnson, D. E.; Edler, K. J.; Gill, S. S. Convection-Enhanced Delivery of Carboplatin PLGA Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma. *PloS one* **2015**, *10* (7), e0132266.
- (80) van Solinge, T. S.; Nieland, L.; Chiocca, E. A.; Broekman, M. L. D. Advances in Local Therapy for Glioblastoma — Taking the Fight to the Tumour. *Nature Reviews Neurology* **2022**, *18* (4), 221–236. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00621-0>.
- (81) DeVita, V. T. Jr.; Lawrence, T. S.; Rosenberg, S. A. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer : Principles & Practice of Oncology*, 11th ed.; Wolters Kluwer, 2019.
- (82) International Agency for Research on Cancer, World Health Organization Statistics. <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz> (accessed 2025-03-12).
- (83) Williams, P. A.; Zaidi, S. K.; Sengupta, R. AACR Cancer Progress Report 2023: Advancing the Frontiers of Cancer Science and Medicine. *Clinical Cancer Research* **2023**, *29* (19), 3850–3851. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-2591>.
- (84) Yearly Publication Trends - cancer. <https://thepharma.net/publication-trends/index/cancer> (accessed 2025-03-12).
- (85) Shields, M. Chapter 14 - Chemotherapeutics. In *Pharmacognosy*; Badal, S., Delgoda, R., Eds.; Academic Press: Boston, 2017; pp 295–313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00014-7>.
- (86) National Comprehensive Cancer Network. <https://www.nccn.org/> (accessed 2025-03-12).
- (87) Nygren, P. What Is Cancer Chemotherapy? *Acta Oncologica* **2001**, *40* (2–3), 166–174. <https://doi.org/10.1080/02841860151116204>.

- (88) Hurley, L. H. DNA and Its Associated Processes as Targets for Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer* **2002**, 2 (3), 188–200. <https://doi.org/10.1038/nrc749>.
- (89) *Onkologia Kliniczna*; Krzakowski, M., Potemski, P., Warzocha, K., Wysocki, P., Eds.; 2014; Vol. I.
- (90) Gottlieb, A. J.; Weinberg, V.; Ellison, R. R.; Henderson, E. S.; Terebelo, H.; Rafla, S.; Cuttner, J.; Silver, R. T.; Carey, R. W.; Levy, R. N.; Hutchinson, J. L.; Raich, P.; Cooper, M. R.; Wiernik, P.; Anderson, J. R.; Holland, J. F. Efficacy of Daunorubicin in the Therapy of Adult Acute Lymphocytic Leukemia: A Prospective Randomized Trial by Cancer and Leukemia Group B. *Blood* **1984**, 64 (1), 267–274. <https://doi.org/10.1182/blood.V64.1.267.267>.
- (91) Demain, A. L.; Vaishnav, P. Natural Products for Cancer Chemotherapy. *Microbial Biotechnology* **2011**, 4 (6), 687–699. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>.
- (92) Miljkovic, M. D.; Tuia, J.; Olivier, T.; Haslam, A.; Prasad, V. Cancer Drug Price and Novelty in Mechanism of Action. *JAMA Netw Open* **2023**, 6 (12), e2347006. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.47006>.
- (93) Brianna; Lee, S. H. Chemotherapy: How to Reduce Its Adverse Effects While Maintaining the Potency? *Medical Oncology* **2023**, 40 (3), 88. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-01954-6>.
- (94) Deloch, L.; Derer, A.; Hartmann, J.; Frey, B.; Fietkau, R.; Gaipl, U. S. Modern Radiotherapy Concepts and the Impact of Radiation on Immune Activation. *Front Oncol* **2016**, 6, 141. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00141>.
- (95) NAIR, C. K. K.; PARIDA, D. K.; NOMURA, T. Radioprotectors in Radiotherapy. *Journal of Radiation Research* **2001**, 42 (1), 21–37. <https://doi.org/10.1269/jrr.42.21>.
- (96) Allen, C.; Her, S.; Jaffray, D. A. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Adv Drug Deliv Rev* **2017**, 109, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004>.
- (97) Martins, P. N. A Brief History about Radiotherapy.
- (98) Chargari, C.; Deutsch, E.; Blanchard, P.; Gouy, S.; Martelli, H.; Guérin, F.; Dumas, I.; Bossi, A.; Morice, P.; Viswanathan, A. N.; Haie-Meder, C. Brachytherapy: An Overview for Clinicians. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2019**, 69 (5), 386–401. <https://doi.org/10.3322/caac.21578>.
- (99) Tanderup, K.; Ménard, C.; Polgar, C.; Lindegaard, J. C.; Kirisits, C.; Pötter, R. Advancements in Brachytherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, 109, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.09.002>.
- (100) Sawyers, C. Targeted Cancer Therapy. *Nature* **2004**, 432 (7015), 294–297. <https://doi.org/10.1038/nature03095>.
- (101) Padma, V. V. An Overview of Targeted Cancer Therapy. *BioMedicine* **2015**, 5 (4), 19. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0019-4>.
- (102) Sorokin, P. MylotargTM Approved for Patients With CD33+ Acute Myeloid Leukemia. *Clinical journal of oncology nursing* **2000**, 4 (6).
- (103) Jacobs, S. A. 90Yttrium Ibritumomab Tiuxetan in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma: Current Status and Future Prospects. *Biologics: Targets and Therapy* **2007**, 1 (3), 215–227.
- (104) Maximiano, S.; Magalhães, P.; Guerreiro, M. P.; Morgado, M. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs* **2016**, 30 (2), 75–86. <https://doi.org/10.1007/s40259-016-0162-9>.
- (105) McNeish, I. A.; Green, N. K.; Gilligan, M. G.; Ford, M. J.; Mautner, V.; Young, L. S.; Kerr, D. J.; Searle, P. F. Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy for Ovarian and Pancreatic Cancer Using Retrovirally Delivered E. Coli Nitroreductase and CB1954. *Gene Therapy* **1998**, 5 (8), 1061–1069.
- (106) Grove, J. I.; Searle, P. F.; Weedon, S. J.; Green, N. K.; McNeish, I. A.; Kerr, D. J. Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy Using CB1954. *Anticancer Drug Des* **1999**, 14 (6), 461–472.
- (107) Fay, F.; Scott, C. J. Antibody-Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy. *Immunotherapy* **2011**, 3 (3), 381–394.
- (108) St. James, S.; Bednarz, B.; Benedict, S.; Buchsbaum, J. C.; Dewaraja, Y.; Frey, E.; Hobbs, R.; Grudzinski, J.; Roncali, E.; Sgouros, G.; Capala, J.; Xiao, Y. Current Status of Radiopharmaceutical Therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* **2021**, 109 (4), 891–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.08.035>.

- (109) Dash, A.; F. (Russ) Knapp, F.; R.A. Pillai, M. Targeted Radionuclide Therapy - An Overview. *Current Radiopharmaceuticals*, 2013, 6, 152–180. <https://doi.org/10.2174/18744710113066660023>.
- (110) Chatal, J.-F.; Hoefnagel, C. A. Radionuclide Therapy. *The Lancet* **1999**, 354 (9182), 931–935. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)06002-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)06002-X).
- (111) Lepareur, N.; Ramée, B.; Mougin-Degraef, M.; Bourgeois, M. Clinical Advances and Perspectives in Targeted Radionuclide Therapy. *Pharmaceutics* **2023**, 15 (6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061733>.
- (112) O'Donoghue, J. A.; Bardiès, M.; Wheldon, T. E. Relationships between Tumor Size and Curability for Uniformly Targeted Therapy with Beta-Emitting Radionuclides. *J Nucl Med* **1995**, 36 (10), 1902–1909.
- (113) Ree, S. M.; Greenwood, H.; Young, J. D.; Roberts, R.; Livens, F. R.; Heath, S. L.; Sosabowski, J. K. Selection of Radionuclide(s) for Targeted Alpha Therapy Based on Their Nuclear Decay Properties. *Nuclear Medicine Communications* **2024**, 45 (6).
- (114) Vallabhajosula, S. *Molecular Imaging and Targeted Therapy: Radiopharmaceuticals and Clinical Applications*; Springer International Publishing, 2023.
- (115) Manafi-Farid, R.; Masoumi, F.; Divband, G.; Saidi, B.; Ataeinia, B.; Hertel, F.; Schweighofer-Zwink, G.; Morgenroth, A.; Beheshti, M. Targeted Palliative Radionuclide Therapy for Metastatic Bone Pain. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, 9 (8). <https://doi.org/10.3390/jcm9082622>.
- (116) Thivat, E.; Rouanet, J.; Auzeloux, P.; Sas, N.; Jouberton, E.; Levesque, S.; Billoux, T.; Mansard, S.; Molnar, I.; Chanchou, M.; Fois, G.; Maigne, L.; Chezal, J.-M.; Miot-Noirault, E.; D'Incan, M.; Durando, X.; Cachin, F. Phase I Study of [¹³¹I] ICF01012, a Targeted Radionuclide Therapy, in Metastatic Melanoma: MELRIV-1 Protocol. *BMC Cancer* **2022**, 22 (1), 417. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09495-3>.
- (117) Hdeib, A.; and Sloan, A. Targeted Radioimmunotherapy: The Role of ¹³¹I-chTNT-1/B mAb (Cotara®) for Treatment of High-Grade Gliomas. *Future Oncology* **2012**, 8 (6), 659–669. <https://doi.org/10.2217/fon.12.58>.
- (118) Anderson, P.; and Nuñez, R. Samarium Lexidronam (¹⁵³Sm-EDTMP): Skeletal Radiation for Osteoblastic Bone Metastases and Osteosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2007**, 7 (11), 1517–1527. <https://doi.org/10.1586/14737140.7.11.1517>.
- (119) Chakravarty, R.; Chakraborty, S. A Review of Advances in the Last Decade on Targeted Cancer Therapy Using (¹⁷⁷)Lu: Focusing on (¹⁷⁷)Lu Produced by the Direct Neutron Activation Route. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **2021**, 11 (6), 443–475.
- (120) Parent, E. E.; Savir-Baruch, B.; Gayed, I. W.; Almaguel, F.; Chin, B. B.; Pantel, A. R.; Armstrong, E.; Morley, A.; Ippisch, R. C.; Flavell, R. R. ¹⁷⁷Lu-PSMA Therapy. *Journal of nuclear medicine technology* **2022**, 50 (3), 205–212.
- (121) Bollampally, N.; Shukla, J.; Mittal, B.; Kapoor, R.; Mohanty, M. Evaluation of the Efficacy and Safety of ¹⁷⁷Lu-DOTMP in Metastatic Bone Pain Palliation. *J Nucl Med* **2019**, 60 (supplement 1), 75.
- (122) Fernández, R.; Eppard, E.; Lehnert, W.; Jiménez-Franco, L. D.; Soza-Ried, C.; Ceballos, M.; Ribbeck, J.; Kluge, A.; Rösch, F.; Meckel, M.; Zhernosekov, K.; Kramer, V.; Amaral, H. Evaluation of Safety and Dosimetry of ¹⁷⁷Lu-DOTA-ZOL for Therapy of Bone Metastases. *J Nucl Med* **2021**, 62 (8), 1126. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.255851>.
- (123) Parihar, A. S.; Sood, A.; Kumar, R.; Bhusari, P.; Shukla, J.; Mittal, B. R. Novel Use of (¹⁷⁷)Lu-DOTA-RGD(2) in Treatment of (⁶⁸)Ga-DOTA-RGD(2)-Avid Lesions in Papillary Thyroid Cancer with TENIS. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2018**, 45 (10), 1836–1837. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4036-x>.
- (124) Forrer, F.; Oechsli-Oberholzer, C.; Campana, B.; Herrmann, R.; Maecke, H. R.; Mueller-Brand, J.; Lohri, A. Radioimmunotherapy with ¹⁷⁷Lu-DOTA-Rituximab: Final Results of a Phase I/II Study in 31 Patients with Relapsing Follicular, Mantle Cell, and Other Indolent B-Cell Lymphomas. *J Nucl Med* **2013**, 54 (7), 1045–1052. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.115170>.
- (125) Bhusari, P.; Vatsa, R.; Singh, G.; Parmar, M.; Bal, A.; Dhawan, D. K.; Mittal, B. R.; Shukla, J. Development of Lu-177-Trastuzumab for Radioimmunotherapy of HER2 Expressing Breast Cancer and Its

- Feasibility Assessment in Breast Cancer Patients. *Int J Cancer* **2017**, *140* (4), 938–947. <https://doi.org/10.1002/ijc.30500>.
- (126) Shinto, A. S.; Kamaleshwaran, K. K.; Chakraborty, S.; Vyshakh, K.; Thirumalaisamy, S. G.; Karthik, S.; Nagaprabhu, V. N.; Vimalnath, K. V.; Das, T.; Banerjee, S. Radiosynovectomy of Painful Synovitis of Knee Joints Due to Rheumatoid Arthritis by Intra-Articular Administration of (177)Lu-Labeled Hydroxyapatite Particulates: First Human Study and Initial Indian Experience. *World J Nucl Med* **2015**, *14* (2), 81–88. <https://doi.org/10.4103/1450-1147.153908>.
- (127) Lambert, B.; de Klerk, J. M. H. Clinical Applications of 188Re-Labelled Radiopharmaceuticals for Radionuclide Therapy. *Nuclear Medicine Communications* **2006**, *27* (3).
- (128) Open Label Study of Single Dose Rhenium Re 188 P2045 in Patients With Lung Cancer Who Have Received or Refused to Receive Prior Chemotherapy, 2004. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00100256> (accessed 2004-01-01).
- (129) Jeong, J. M.; Chung, J.-K. Therapy with 188Re-Labeled Radiopharmaceuticals: An Overview of Promising Results from Initial Clinical Trials. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* **2003**, *18* (5), 707–717. <https://doi.org/10.1089/108497803770418256>.
- (130) Alcocer-Ávila, M. E.; Ferreira, A.; Quinto, M. A.; Morgat, C.; Hindié, E.; Champion, C. Radiation Doses from 161Tb and 177Lu in Single Tumour Cells and Micrometastases. *EJNMMI Physics* **2020**, *7* (1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40658-020-00301-2>.
- (131) Müller, C.; van der Meulen, N. P.; Schibli, R. Opportunities and Potential Challenges of Using Terbium-161 for Targeted Radionuclide Therapy in Clinics. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2023**, *50* (11), 3181–3184. <https://doi.org/10.1007/s00259-023-06316-y>.
- (132) Kim, Y.-S.; Brechbiel, M. W. An Overview of Targeted Alpha Therapy. *Tumor Biology* **2012**, *33* (3), 573–590. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0286-y>.
- (133) Marques, I. A.; Neves, A. R.; Abrantes, A. M.; Pires, A. S.; Tavares-da-Silva, E.; Figueiredo, A.; Botelho, M. F. Targeted Alpha Therapy Using Radium-223: From Physics to Biological Effects. *Cancer Treatment Reviews* **2018**, *68*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.05.011>.
- (134) Morris, M. J.; Corey, E.; Guise, T. A.; Gulley, J. L.; Kevin Kelly, W.; Quinn, D. I.; Scholz, A.; Sgouros, G. Radium-223 Mechanism of Action: Implications for Use in Treatment Combinations. *Nature Reviews Urology* **2019**, *16* (12), 745–756. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0251-x>.
- (135) Shih, C.; Blok, L.; Niederkohr, R.; Avins, A. RETROSPECTIVE ANALYSIS OF XOFIGO TREATMENTS. *J Nucl Med* **2019**, *60* (supplement 1), 2041.
- (136) Nelson, B. J. B.; Andersson, J. D.; Wuest, F. Targeted Alpha Therapy: Progress in Radionuclide Production, Radiochemistry, and Applications. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010049>.
- (137) Vallabhajosula, S. Radiopharmaceuticals for Therapy. In *Molecular Imaging and Targeted Therapy: Radiopharmaceuticals and Clinical Applications*; Vallabhajosula, S., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp 461–499. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23205-3_17.
- (138) Morgenstern, A.; Apostolidis, C.; Kratochwil, C.; Sathekge, M.; Krolicki, L.; Bruchertseifer, F. An Overview of Targeted Alpha Therapy with (225)Actinium and (213)Bismuth. *Curr Radiopharm* **2018**, *11* (3), 200–208. <https://doi.org/10.2174/1874471011666180502104524>.
- (139) Kunikowska, J.; Królicki, L. Targeted α -Emitter Therapy of Neuroendocrine Tumors. *Seminars in Nuclear Medicine* **2020**, *50* (2), 171–176. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.11.003>.
- (140) Zhang, J.; Kulkarni, H. R.; Baum, R. P. Peptide Receptor Radionuclide Therapy Using 225Ac-DOTATOC Achieves Partial Remission in a Patient with Progressive Neuroendocrine Liver Metastases after Repeated β -Emitter Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Clinical Nuclear Medicine* **2020**, *45* (3), 241–243.
- (141) Ianniello, A.; Sansovini, M.; Severi, S.; Nicolini, S.; Grana, C. M.; Massri, K.; Bongiovanni, A.; Antonuzzo, L.; Di Iorio, V.; Sarnelli, A. Peptide Receptor Radionuclide Therapy with 177 Lu-DOTATATE in Advanced Bronchial Carcinoids: Prognostic Role of Thyroid Transcription Factor 1 and 18 F-FDG PET. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2016**, *43*, 1040–1046.

- (142) Satapathy, S.; Sood, A.; Das, C. K.; Kavanal, A. J.; Mittal, B. R. Alpha before Beta: Exceptional Response to First-Line 225Ac-DOTATATE in a Patient of Metastatic Neuroendocrine Tumor with Extensive Skeletal Involvement. *Clinical Nuclear Medicine* **2022**, 47 (2), e156–e157.
- (143) King, A. P.; Gutsche, N. T.; Raju, N.; Fayn, S.; Baidoo, K. E.; Bell, M. M.; Olkowski, C. S.; Swenson, R. E.; Lin, F. I.; Sadowski, S. M. 225Ac-MACROPATATE: A Novel α -Particle Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Neuroendocrine Tumors. *Journal of Nuclear Medicine* **2023**, 64 (4), 549–554.
- (144) Kratochwil, C.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L. 225Ac-PSMA-617 for Therapy of Prostate Cancer. *Seminars in Nuclear Medicine* **2020**, 50 (2), 133–140. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2020.02.004>.
- (145) Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Giesel, F. L.; Weis, M.; Verburg, F. A.; Mottaghy, F.; Kopka, K.; Apostolidis, C.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med* **2016**, 57 (12), 1941–1944. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178673>.
- (146) Satapathy, S.; Mittal, B. R.; Sood, A.; Das, C. K.; Singh, S. K.; Mavuduru, R. S.; Bora, G. S. Health-Related Quality-of-Life Outcomes with Actinium-225-Prostate-Specific Membrane Antigen-617 Therapy in Patients with Heavily Pretreated Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Indian Journal of Nuclear Medicine* **2020**, 35 (4), 299–304.
- (147) Majkowska-Pilip, A.; Rius, M.; Bruchertseifer, F.; Apostolidis, C.; Weis, M.; Bonelli, M.; Laurenza, M.; Królicki, L.; Morgenstern, A. In Vitro Evaluation of 225Ac-DOTA-Substance P for Targeted Alpha Therapy of Glioblastoma Multiforme. *Chemical Biology & Drug Design* **2018**, 92 (1), 1344–1356. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13199>.
- (148) Królicki, L.; Kunikowska, J.; Bruchertseifer, F.; Koziara, H.; Królicki, B.; Jakuciński, M.; Pawlak, D.; Rola, R.; Morgenstern, A.; Rosiak, E.; Merlo, A. 225Ac- and 213Bi-Substance P Analogues for Glioma Therapy. *Seminars in Nuclear Medicine* **2020**, 50 (2), 141–151. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.11.004>.
- (149) Muneke, M.; Fuchigami, T.; Ogawa, K. Recent Advances in the Development of 225Ac- and 211At-Labeled Radioligands for Radiotheranostics. *Analytical Sciences* **2024**, 40 (5), 803–826. <https://doi.org/10.1007/s44211-024-00514-w>.
- (150) Loktev, A.; Lindner, T.; Burger, E.-M.; Altmann, A.; Giesel, F.; Kratochwil, C.; Debus, J.; Marmé, F.; Jäger, D.; Mier, W.; Haberkorn, U. Development of Fibroblast Activation Protein-Targeted Radiotracers with Improved Tumor Retention. *J Nucl Med* **2019**, 60 (10), 1421–1429. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.224469>.
- (151) Taddio, M. F.; Doshi, S.; Masri, M.; Jeanjean, P.; Hikmat, F.; Gerlach, A.; Nyiranshuti, L.; Rosser, E. W.; Schaeue, D.; Besserer-Offroy, E.; Carlucci, G.; Radu, C. G.; Czernin, J.; Lückert, K.; Monn, C. E. Evaluating [225Ac]Ac-FAPI-46 for the Treatment of Soft-Tissue Sarcoma in Mice. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2024**, 51 (13), 4026–4037. <https://doi.org/10.1007/s00259-024-06809-4>.
- (152) Liu, Y.; Watabe, T.; Kaneda-Nakashima, K.; Shirakami, Y.; Naka, S.; Ooe, K.; Toyoshima, A.; Nagata, K.; Haberkorn, U.; Kratochwil, C.; Shinohara, A.; Hatazawa, J.; Giesel, F. Fibroblast Activation Protein Targeted Therapy Using [177Lu]FAPI-46 Compared with [225Ac]FAPI-46 in a Pancreatic Cancer Model. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2022**, 49 (3), 871–880. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05554-2>.
- (153) Ahenkorah, S.; Cassells, I.; Deroose, C. M.; Cardinaels, T.; Burgoyne, A. R.; Bormans, G.; Ooms, M.; Cleeren, F. Bismuth-213 for Targeted Radionuclide Therapy: From Atom to Bedside. *Pharmaceutics* **2021**, 13 (5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050599>.
- (154) Autenrieth, M. E.; Seidl, C.; Bruchertseifer, F.; Horn, T.; Kurtz, F.; Feurecker, B.; D'Alessandria, C.; Pfob, C.; Nekolla, S.; Apostolidis, C. Treatment of Carcinoma in Situ of the Urinary Bladder with an Alpha-Emitter Immunoconjugate Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor: A Pilot Study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2018**, 45, 1364–1371.
- (155) Królicki, L.; Bruchertseifer, F.; Kunikowska, J.; Koziara, H.; Królicki, B.; Jakuciński, M.; Pawlak, D.; Apostolidis, C.; Mirzadeh, S.; Rola, R. Safety and Efficacy of Targeted Alpha Therapy with 213 Bi-

DOTA-Substance P in Recurrent Glioblastoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2019**, *46*, 614–622.

(156) Kratochwil, C.; Giesel, F. L.; Bruchertseifer, F.; Mier, W.; Apostolidis, C.; Boll, R.; Murphy, K.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. ²¹³Bi-DOTATOC Receptor-Targeted Alpha-Radionuclide Therapy Induces Remission in Neuroendocrine Tumours Refractory to Beta Radiation: A First-in-Human Experience. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2014**, *41* (11), 2106–2119. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2857-9>.

(157) Sathekge, M.; Knoesen, O.; Meckel, M.; Modiselle, M.; Vorster, M.; Marx, S. ²¹³Bi-PSMA-617 Targeted Alpha-Radionuclide Therapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2017**, *44* (6), 1099–1100. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3657-9>.

(158) Feng, Y.; Zalutsky, M. R. Production, Purification and Availability of ²¹¹At: Near Term Steps towards Global Access. *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, *100–101*, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2021.05.007>.

(159) Watabe, T.; Kaneda-Nakashima, K.; Ooe, K.; Liu, Y.; Kurimoto, K.; Murai, T.; Shidahara, Y.; Okuma, K.; Takeuchi, M.; Nishide, M.; Toyoshima, A.; Shinohara, A.; Shirakami, Y. Extended Single-Dose Toxicity Study of [²¹¹At]NaAt in Mice for the First-in-Human Clinical Trial of Targeted Alpha Therapy for Differentiated Thyroid Cancer. *Annals of Nuclear Medicine* **2021**, *35* (6), 702–718. <https://doi.org/10.1007/s12149-021-01612-9>.

(160) Ohshima, Y.; Sudo, H.; Watanabe, S.; Nagatsu, K.; Tsuji, A. B.; Sakashita, T.; Ito, Y. M.; Yoshinaga, K.; Higashi, T.; Ishioka, N. S. Antitumor Effects of Radionuclide Treatment Using α -Emitting Meta-(²¹¹At)-Astato-Benzylguanidine in a PC12 Pheochromocytoma Model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2018**, *45* (6), 999–1010. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3919-6>.

(161) Larsen, R. H.; Murud, K. M.; Akabani, G.; Hoff, P.; Bruland, O. S.; Zalutsky, M. R. ²¹¹At- and ¹³¹I-Labeled Bisphosphonates with High in Vivo Stability and Bone Accumulation. *J Nucl Med* **1999**, *40* (7), 1197–1203.

(162) Watabe, T.; Kaneda-Nakashima, K.; Shirakami, Y.; Kadonaga, Y.; Ooe, K.; Wang, Y.; Haba, H.; Toyoshima, A.; Cardinale, J.; Giesel, F. L.; Tomiyama, N.; Fukase, K. Targeted α -Therapy Using Astatine ((²¹¹At)-Labeled PSMA1, 5, and 6: A Preclinical Evaluation as a Novel Compound. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2023**, *50* (3), 849–858. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-06016-z>.

(163) Ma, H.; Li, F.; Shen, G.; Pan, L.; Liu, W.; Liang, R.; Lan, T.; Yang, Y.; Yang, J.; Liao, J.; Liu, N. In Vitro and in Vivo Evaluation of (²¹¹At)-Labeled Fibroblast Activation Protein Inhibitor for Glioma Treatment. *Bioorg Med Chem* **2022**, *55*, 116600. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116600>.

(164) Bolcaen, J.; Gizawy, M. A.; Terry, S. Y. A.; Paulo, A.; Cornelissen, B.; Korde, A.; Engle, J.; Radchenko, V.; Howell, R. W. Marshalling the Potential of Auger Electron Radiopharmaceutical Therapy. *J Nucl Med* **2023**, jnumed.122.265039. <https://doi.org/10.2967/jnumed.122.265039>.

(165) Meitner, L. Über Die Entstehung Der β -Strahl-Spektren Radioaktiver Substanzen. *Zeitschrift für Physik* **1922**, *9* (1), 131–144. <https://doi.org/10.1007/BF01326962>.

(166) Auger, P. The Auger Effect. *Surface Science* **1975**, *48* (1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(75\)90306-4](https://doi.org/10.1016/0039-6028(75)90306-4).

(167) Filosofov, D.; Kurakina, E.; Radchenko, V. Potent Candidates for Targeted Auger Therapy: Production and Radiochemical Considerations. *Nucl. Med. Biol.* **2021**, *94–95*, 1–19.

(168) Hindíé, E.; Zanotti-Fregonara, P.; Quinto, M. A.; Morgat, C.; Champion, C. Dose Deposits from ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹¹¹In, and ¹⁶¹Tb in Micrometastases of Various Sizes: Implications for Radiopharmaceutical Therapy. *J Nucl Med* **2016**, *57* (5), 759. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.170423>.

(169) Randhawa, P.; Olson, A. P.; Chen, S.; Gower-Fry, K. L.; Hoehr, C.; Engle, J. W.; Ramogida, C. F.; Radchenko, V. Meitner-Auger Electron Emitters for Targeted Radionuclide Therapy: Mercury-197m/g and Antimony-119. *Curr Radiopharm.* **2021**, *14* (4), 394–419.

(170) Chen, P.; Cameron, R.; Wang, J.; Vallis, K. A.; Reilly, R. M. Antitumor Effects and Normal Tissue Toxicity of ¹¹¹In-Labeled Epidermal Growth Factor Administered to Athymic Mice Bearing Epidermal Growth Factor Receptor-Positive Human Breast Cancer Xenografts. *J Nucl Med* **2003**, *44* (9), 1469.

- (171) Vallis, K. A.; Reilly, R. M.; Scollard, D.; Merante, P.; Brade, A.; Velauthapillai, S.; Caldwell, C.; Chan, I.; Freeman, M.; Lockwood, G.; Miller, N. A.; Cornelissen, B.; Petronis, J.; Sabate, K. Phase I Trial to Evaluate the Tumor and Normal Tissue Uptake, Radiation Dosimetry and Safety of (111)In-DTPA-Human Epidermal Growth Factor in Patients with Metastatic EGFR-Positive Breast Cancer. *Am J Nucl Med Mol Imaging* **2014**, *4* (2), 181–192.
- (172) Fasih, A.; Fonge, H.; Cai, Z.; Leyton, J. V.; Tikhomirov, I.; Done, S. J.; Reilly, R. M. ¹¹¹In-Bn-DTPA-Nimotuzumab with/without Modification with Nuclear Translocation Sequence (NLS) Peptides: An Auger Electron-Emitting Radioimmunotherapeutic Agent for EGFR-Positive and Trastuzumab (Herceptin)-Resistant Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2012**, *135* (1), 189–200. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2137-y>.
- (173) Costantini, D. L.; Chan, C.; Cai, Z.; Vallis, K. A.; Reilly, R. M. (111)In-Labeled Trastuzumab (Herceptin) Modified with Nuclear Localization Sequences (NLS): An Auger Electron-Emitting Radiotherapeutic Agent for HER2/Neu-Amplified Breast Cancer. *J Nucl Med* **2007**, *48* (8), 1357–1368. <https://doi.org/10.2967/jnumed.106.037937>.
- (174) Costantini, D. L.; McLarty, K.; Lee, H.; Done, S. J.; Vallis, K. A.; Reilly, R. M. Antitumor Effects and Normal-Tissue Toxicity of ¹¹¹In-Nuclear Localization Sequence-Trastuzumab in Athymic Mice Bearing HER-Positive Human Breast Cancer Xenografts. *J Nucl Med* **2010**, *51* (7), 1084–1091. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.072389>.
- (175) Chen, P.; Wang, J.; Hope, K.; Jin, L.; Dick, J.; Cameron, R.; Brandwein, J.; Minden, M.; Reilly, R. M. Nuclear Localizing Sequences Promote Nuclear Translocation and Enhance the Radiotoxicity of the Anti-CD33 Monoclonal Antibody HuM195 Labeled with ¹¹¹In in Human Myeloid Leukemia Cells. *J Nucl Med* **2006**, *47* (5), 827–836.
- (176) Valkema, R.; De Jong, M.; Bakker, W. H.; Breeman, W. A. p; Kooij, P. P. m; Lugtenburg, P. J.; De Jong, F. H.; Christiansen, A.; Kam, B. L. r; De Herder, W. W.; Stridsberg, M.; Lindemans, J.; Ensing, G.; Krenning, E. P. Phase I Study of Peptide Receptor Radionuclide Therapy with [In-DTPA]Octreotide: The Rotterdam Experience. *Semin Nucl Med* **2002**, *32* (2), 110–122. <https://doi.org/10.1053/snuc/2002.31025>.
- (177) Limouris, G. S.; Chatziioannou, A.; Kontogeorgakos, D.; Mourikis, D.; Lyra, M.; Dimitriou, P.; Stavraka, A.; Gouliamos, A.; Vlahos, L. Selective Hepatic Arterial Infusion of In-¹¹¹-DTPA-Phe1-Octreotide in Neuroendocrine Liver Metastases. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2008**, *35* (10), 1827–1837. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-0779-0>.
- (178) Olive, P. L.; Banáth, J. P. Detection of DNA Double-Strand Breaks through the Cell Cycle after Exposure to X-Rays, Bleomycin, Etoposide and ¹²⁵I dUrd. *Int J Radiat Biol* **1993**, *64* (4), 349–358. <https://doi.org/10.1080/09553009314551531>.
- (179) Sobolev, A. S. Modular Nanotransporters for Nuclear-Targeted Delivery of Auger Electron Emitters. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, Volume 9-2018.
- (180) Slastnikova, T. A.; Koumarianou, E.; Rosenkranz, A. A.; Vaidyanathan, G.; Lupanova, T. N.; Sobolev, A. S.; Zalutsky, M. R. Modular Nanotransporters: A Versatile Approach for Enhancing Nuclear Delivery and Cytotoxicity of Auger Electron-Emitting ¹²⁵I. *EJNMMI Research* **2012**, *2* (1), 59. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-59>.
- (181) Pouget, J.-P.; Santoro, L.; Raymond, L.; Chouin, N.; Bardiès, M.; Bascoul-Mollevi, C.; Huguet, H.; Azria, D.; Kotzki, P.-O.; Pèlegri, M.; Vivès, E.; Pèlegri, A. Cell Membrane Is a More Sensitive Target than Cytoplasm to Dense Ionization Produced by Auger Electrons. *Radiat Res* **2008**, *170* (2), 192–200. <https://doi.org/10.1667/RR1359.1>.
- (182) Santoro, L.; Boutaleb, S.; Garambois, V.; Bascoul-Mollevi, C.; Boudousq, V.; Kotzki, P.-O.; Pèlegri, M.; Navarro-Teulon, I.; Pèlegri, A.; Pouget, J.-P. Noninternalizing Monoclonal Antibodies Are Suitable Candidates for ¹²⁵I Radioimmunotherapy of Small-Volume Peritoneal Carcinomatosis. *J Nucl Med* **2009**, *50* (12), 2033. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.066993>.
- (183) Piron, B.; Paillas, S.; Boudousq, V.; Pèlegri, A.; Bascoul-Mollevi, C.; Chouin, N.; Navarro-Teulon, I.; Pouget, J.-P. DNA Damage-Centered Signaling Pathways Are Effectively Activated during Low Dose-Rate Auger Radioimmunotherapy. *Nuclear Medicine and Biology* **2014**, *41*, e75–e83. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.01.012>.

- (184) Rebischung, C.; Hoffmann, D.; Stefani, L.; Desruet, M. D.; Wang, K.; Adelstein, S. J.; Artignan, X.; Vincent, F.; Gauchez, A. S.; Zhang, H.; Fagret, D.; Vuillez, J.; Kassis, A. I.; Balosso, J. First Human Treatment of Resistant Neoplastic Meningitis by Intrathecal Administration of MTX plus (125)IUDR. *Int J Radiat Biol* **2008**, *84* (12), 1123–1129. <https://doi.org/10.1080/09553000802395535>.
- (185) Li, L.; Quang, T. S.; Gracely, E. J.; Kim, J. H.; Emrich, J. G.; Yaeger, T. E.; Jenrette, J. M.; Cohen, S. C.; Black, P.; Brady, L. W. A Phase II Study of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Radioimmunotherapy in the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *J Neurosurg* **2010**, *113* (2), 192–198. <https://doi.org/10.3171/2010.2.JNS091211>.
- (186) Uusijärvi, H.; Bernhardt, P.; Rösch, F.; Maecke, H. R.; Forssell-Aronsson, E. Electron- and Positron-Emitting Radiolanthanides for Therapy: Aspects of Dosimetry and Production. *J Nucl Med* **2006**, *47* (5), 807–814.
- (187) Müller, C.; Umbricht, C. A.; Gracheva, N.; Tschan, V. J.; Pellegrini, G.; Bernhardt, P.; Zeevaart, J. R.; Köster, U.; Schibli, R.; van der Meulen, N. P. Terbium-161 for PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Prostate Cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2019**, *46* (9), 1919–1930. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04345-0>.
- (188) Baum, R. P.; Singh, A.; Kulkarni, H. R.; Bernhardt, P.; Rydén, T.; Schuchardt, C.; Gracheva, N.; Grundler, P. V.; Köster, U.; Müller, D.; Pröhl, M.; Zeevaart, J. R.; Schibli, R.; van der Meulen, N. P.; Müller, C. First-in-Humans Application of ¹⁶¹Tb: A Feasibility Study Using ¹⁶¹Tb-DOTATOC. *J Nucl Med* **2021**, *62* (10), 1391. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.258376>.
- (189) Wharton, L.; McNeil, S. W.; Merckens, H.; Yuan, Z.; Van de Voorde, M.; Engudar, G.; Ingham, A.; Koniar, H.; Rodríguez-Rodríguez, C.; Radchenko, V.; Ooms, M.; Kunz, P.; Bénard, F.; Schaffer, P.; Yang, H. Preclinical Evaluation of [155/161Tb]Tb-Crown-TATE—A Novel SPECT Imaging Theranostic Agent Targeting Neuroendocrine Tumours. *Molecules* **2023**, *28* (7). <https://doi.org/10.3390/molecules28073155>.
- (190) Kozin, L. F.; Hansen, S. Physicochemical Properties of Metallic Mercury. *Mercury handbook: Chemistry, applications and environmental impact (1st ed.)*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom **2013**, 1–35.
- (191) Gonzalez-Raymat, H.; Liu, G.; Liriano, C.; Li, Y.; Yin, Y.; Shi, J.; Jiang, G.; Cai, Y. Elemental Mercury: Its Unique Properties Affect Its Behavior and Fate in the Environment. *Environmental Pollution* **2017**, *229*, 69–86. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.101>.
- (192) Meija, J.; Yang, L.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z. Certification of Natural Isotopic Abundance Inorganic Mercury Reference Material NIMS-1 for Absolute Isotopic Composition and Atomic Weight. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2010**, *25* (3), 384–389.
- (193) Clarkson, T. W. The Toxicology of Mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **1997**, *34* (4), 369–403. <https://doi.org/10.3109/10408369708998098>.
- (194) Parsons, M. B.; Percival, J. B. A Brief History of Mercury and Its Environmental Impact. *Mercury: sources, measurements, cycles, and effects* **2005**, *34*, 1–20.
- (195) Bates, M. N. Mercury Amalgam Dental Fillings: An Epidemiologic Assessment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **2006**, *209* (4), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.11.006>.
- (196) Bjørklund, G.; Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Cappai, R.; Buha Djordjevic, A.; Aaseth, J. A Review on Coordination Properties of Thiol-Containing Chelating Agents Towards Mercury, Cadmium, and Lead. *Molecules* **2019**, *24* (18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183247>.
- (197) Atwood, D. A. Recent Developments in Mercury Science. **2006**.
- (198) Morsali, A.; Masoomi, M. Y. Structures and Properties of Mercury (II) Coordination Polymers. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253* (13–14), 1882–1905.
- (199) Fu, J.; Hoffmeyer, R. E.; Pushie, M. J.; Singh, S. P.; Pickering, I. J.; George, G. N. Towards a Custom Chelator for Mercury: Evaluation of Coordination Environments by Molecular Modeling. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, *16* (1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0695-1>.
- (200) Goldwater, L. J. Human Toxicology of Mercury. *Environmental Toxicology of Pesticides, edited by Matsumura, F., Boush, GM and Misato* **1972**, 165–175.

- (201) Westphal, G.; Hallier, E. Mercury in Infants given Vaccines Containing Thiomersal. *The Lancet* **2003**, 361 (9358), 699.
- (202) Osinka, A.; Pasternak, K. Mercury in Medicine and Health Service. *Journal of Elementology* **2014**, 19 (1).
- (203) Berlin, M. Mercury in Dental Amalgam: A Risk Analysis. *NeuroToxicology* **2020**, 81, 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.09.034>.
- (204) *NuDat 3.0*. <https://www.nndc.bnl.gov/nudat3>.
- (205) A T Elliott; D S Dymond; D L Stone; W Flatman; R Bett; J G Cuninghame; H E Sims; H H Willis. A 195Hg-195Au Generator for Use in First-Pass Nuclear Angiocardigraphy. *Physics in Medicine & Biology* **1983**, 28 (2), 139. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/28/2/003>.
- (206) Sadeghi, M.; Bakhtiari, M.; Bakht, M. K.; Anjomrouz, M.; Mokhtari, L. Overview of Mercury Radionuclides and Nuclear Model Calculations of ${}^{195}\text{Hg}^{\text{m,g}}$ and ${}^{197}\text{Hg}^{\text{m,g}}$ to Evaluate Experimental Cross Section Data. *Phys. Rev. C* **2012**, 85 (3), 034605. <https://doi.org/10.1103/PhysRevC.85.034605>.
- (207) Minet, A.; Metian, M.; Taylor, A.; Gentès, S.; Azemard, S.; Oberhänsli, F.; Swarzenski, P.; Bustamante, P.; Lacoue-Labarthe, T. Bioaccumulation of Inorganic and Organic Mercury in the Cuttlefish *Sepia Officinalis*: Influence of Ocean Acidification and Food Type. *Environmental Research* **2022**, 215, 114201. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114201>.
- (208) Matilainen, T.; Verta, M.; Korhonen, H.; Uusi-Rauva, A.; Niemi, M. Behavior of Mercury in Soil Profiles: Impact of Increased Precipitation, Acidity, and Fertilization on Mercury Methylation. *Water, Air, and Soil Pollution* **2001**, 125 (1), 105–120. <https://doi.org/10.1023/A:1005220016761>.
- (209) Vimy, M. J.; Takahashi, Y.; Lorscheider, F. L. Maternal-Fetal Distribution of Mercury (^{203}Hg) Released from Dental Amalgam Fillings. *Am J Physiol* **1990**, 258 (4 Pt 2), R939-945. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.4.R939>.
- (210) Morcillo, M. A.; Santamaria, J. Whole-Body Retention, and Urinary and Fecal Excretion of Mercury after Subchronic Oral Exposure to Mercuric Chloride in Rats. *Biometals* **1995**, 8 (4), 301–308. <https://doi.org/10.1007/BF00141603>.
- (211) POWELL, M. R. Evaluation of Kidney Structure and Function by Radioisotope Imaging; US Atomic Energy Commission, Office of Information Services; [available from ..., 1972; p 447.
- (212) Freudenberg, R.; Apolle, R.; Walther, M.; Hartmann, H.; Kotzerke, J. Molecular Imaging Using the Theranostic Agent ^{197}mHg : Phantom Measurements and Monte Carlo Simulations. *EJNMMI Physics* **2018**, 5 (1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40658-018-0216-9>.
- (213) Lebeda, O.; Kondev, F. G.; Červenák, J. Branching Ratio and γ -Ray Emission Probabilities in the Decay of the $J\pi = 13/2^+$ Isomer in ^{197}Hg . *Nucl Instrum Methods Phys Res A* **2020**, 959, 163481.
- (214) Walther, M.; Preusche, S.; Bartel, S.; Wunderlich, G.; Freudenberg, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, H.-J. Theranostic Mercury: ^{197}mHg with High Specific Activity for Imaging and Therapy. *Appl Radiat Isot* **2015**, 97, 177–181.
- (215) Lebeda, O.; Červenák, J. Revised Cross-Sections for Formation of Theranostic $^{197\text{m,g}}\text{Hg}$ in Proton- and Deuteron-Induced Reactions on ^{197}Au . *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **2020**, 478, 85–91.
- (216) YAMAMOTO, Y. L.; FEINDEL, W.; ZANELLI, J. COMPARATIVE STUDY OF RADIOACTIVE CHLORMERODRIN (NEOHYDRIN) TAGGED WITH MERCURY ^{197} AND MERCURY ^{203} FOR BRAIN SCANNING. *Neurology* **1964**, 14, 815–820. <https://doi.org/10.1212/wnl.14.9.815>.
- (217) SODEE, D. B.; DISTEFANO, B. THE CLINICAL VALUE OF TODAY'S RADIOISOTOPE SCANNING. *Ohio State Med J* **1965**, 61, 819–822.
- (218) Sodee, D. B. Comparison of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetate and ^{197}Hg -Chlormerodrin for Brain Scanning. *J Nucl Med* **1968**, 9 (12), 645.
- (219) Neves, M.; Kling, A.; Oliveira, A. Radionuclides Used for Therapy and Suggestion for New Candidates. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2005**, 266 (3), 377–384. <https://doi.org/10.1007/s10967-005-0920-5>.

- (220) Ribeiro Guevara, S.; Žižek, S.; Repinc, U.; Pérez Catán, S.; Jaćimović, R.; Horvat, M. Novel Methodology for the Study of Mercury Methylation and Reduction in Sediments and Water Using ^{197}Hg Radiotracer. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *387*, 2185–2197.
- (221) Gačnik, J.; Živković, I.; Ribeiro Guevara, S.; Jaćimović, R.; Kotnik, J.; Horvat, M. Validating an Evaporative Calibrator for Gaseous Oxidized Mercury. *Sensors* **2021**, *21* (7). <https://doi.org/10.3390/s21072501>.
- (222) Koron, N.; Bratkič, A.; Ribeiro Guevara, S.; Vahčić, M.; Horvat, M. Mercury Methylation and Reduction Potentials in Marine Water: An Improved Methodology Using ^{197}Hg Radiotracer. *Applied Radiation and Isotopes* **2012**, *70* (1), 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.07.015>.
- (223) Horne, S.; Landsberger, S. Selenium and Mercury Determination in Biological Samples Using Gamma–Gamma Coincidence and Compton Suppression. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2012**, *291* (1), 49–53. <https://doi.org/10.1007/s10967-011-1268-7>.
- (224) Abrefah, R.; Adotey, D.; Mensimah, E.; Ampomah-Amoako, E.; Sogbadji, R.; Opata, N. Biomonitoring of Occupational Exposure to Total Arsenic and Total Mercury in Urine of Goldmine Workers in Southwestern Ghana. *Environmental Research, Engineering and Management* **2011**, *56*. <https://doi.org/10.5755/j01.erem.56.2.273>.
- (225) SHIBATA, K.; FUKAHORI, T.; CHIBA, S.; YAMAMURO, N. Evaluation of Neutron Nuclear Data for Mercury. *Journal of Nuclear Science and Technology* **1997**, *34* (12), 1171–1177. <https://doi.org/10.1080/18811248.1997.9733807>.
- (226) Červenák, J.; Lebeda, O. Measurement of Cross-Sections of Proton-Induced Nuclear Reactions on ^{197}Au Focused on the Production of the Theranostic Pair $^{197\text{m}}\text{gHg}$. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **2019**, *458*, 118–125.
- (227) Kotanjyan, T. V.; Aleksanyan, A. Y.; Amirkhanyan, S. M.; Gevorgyan, A. A.; Ghavalyan, V. B.; Gulkanyan, H. R.; Poghosyan, L. A. Cross Sections of $^{197}\text{Au}(p,n) ^{197\text{g}}\text{Hg}$ and $^{197}\text{Au}(p,n) ^{197\text{m}}\text{Hg}$ Reactions at Energies below 18 MeV. *The European Physical Journal Plus* **2024**, *139* (11), 990. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-024-05780-1>.
- (228) MacNevin, W.; Lee, I. The Separation of Mercury from Gold by Ion Exchange. *Analytica Chimica Acta* **1955**, *12*, 544–546.
- (229) Samczyński, Z. Ion Exchange Behavior of Selected Elements on Chelex 100 Resin. *Solvent Extraction and Ion Exchange* **2006**, *24* (5), 781–794.
- (230) Moyers, E. M.; Fritz, J. S. Separation of Metal Ions Using a Hexylthioglycolate Resin. *Analytical Chemistry* **1976**, *48* (8), 1117–1120.
- (231) Walther, M.; Lebeda, O.; Preusche, S.; Pietzsch, H.-J.; Steinbach, J. Theranostic Mercury Part 1: A New Hg/Au Separation by a Resin Based Method. *AIP Conference Proceedings* **2017**, *1845* (020023).
- (232) Chen, S.; Bas, M.; Happel, S.; Randhawa, P.; McNeil, S.; Kurakina, E.; Zeisler, S.; Maskell, K.; Hoehr, C.; Ramogida, C. F.; Radchenko, V. Determination of Distribution Coefficients of Mercury and Gold on Selected Extraction Chromatographic Resins - towards an Improved Separation Method of Mercury-197 from Proton-Irradiated Gold Targets. *Journal of Chromatography A* **2023**, *1688*, 463717. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463717>.
- (233) Chakraborty, S.; Chakravarty, R.; Shetty, P.; Vimalnath, K. V.; Sen, I. B.; Dash, A. Prospects of Medium Specific Activity ^{177}Lu in Targeted Therapy of Prostate Cancer Using ^{177}Lu -Labeled PSMA Inhibitor. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2016**, *59* (9), 364–371. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3414>.
- (234) Gloris, M.; Michel, R.; Sudbrock, F.; Herpers, U.; Malmborg, P.; Holmqvist, B. Proton-Induced Production of Residual Radionuclides in Lead at Intermediate Energies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **2001**, *463* (3), 593–633.
- (235) Randhawa, P.; Gower-Fry, K. L.; Stienstra, C. M. K.; Tosato, M.; Chen, S.; Gao, Y.; McDonagh, A. W.; Di Marco, V.; Radchenko, V.; Schreckenbach, G.; Ramogida, C. F. Selective Chelation of the Exotic Meitner-Auger Emitter Mercury- $^{197\text{m}}\text{g}$ with Sulfur-Rich Macrocyclic Ligands: Towards the Future of Theranostic Radiopharmaceuticals. *Chem. Eur. J.* **2023**, *29* (21).

- (236) Randhawa, P.; Davey, P. R.; Chen, S.; Merkens, H.; Uribe, C. F.; Zhang, C.; Tosato, M.; Bénard, F.; Radchenko, V.; Ramogida, C. F. Exploration of Commercial Cyclen-Based Chelators for Mercury-197 m/g Incorporation into Theranostic Radiopharmaceuticals. *Frontiers in Chemistry* **2024**, *12*, 1292566.
- (237) Weber, T.; Krönke, T.; Köckerling, M.; Walther, M.; Pietzsch, H.-J.; Kopka, K.; Mamat, C. Towards the Stable Binding of Mercury: Synthesis and Functionalization of Dibenzylidiazabicyclononane Scaffolds. *European Journal of Organic Chemistry* **2024**, *27* (25), e202400258. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202400258>.
- (238) Gilpin, I. M. F.; Ullrich, M.; Wünsche, T.; Zarschler, K.; Lebeda, O.; Pietzsch, J.; Pietzsch, H.-J.; Walther, M. Radiolabelled Cyclic Bisarylmercury: High Chemical and in Vivo Stability for Theranostics. *ChemMedChem* **2021**, *16* (17), 2645–2649. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100131>.
- (239) Tosato, M.; Randhawa, P.; Asti, M.; Hemmingsen, L. B. S.; O'Shea, C. A.; Thaveenrasingam, P.; Sauer, S. P. A.; Chen, S.; Graiff, C.; Menegazzo, I.; Baron, M.; Radchenko, V.; Ramogida, C. F.; Di Marco, V. Capturing Mercury-197m/g for Auger Electron Therapy and Cancer Theranostic with Sulfur-Containing Cyclen-Based Macrocycles. *Inorg. Chem.* **2024**, *63* (30), 14241–14255. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.4c02418>.
- (240) Chu, A.; Ho, F.; Chan, C.; Chen, S.; Radchenko, V.; Reilly, R.; Davey, P. Cytotoxicity of Auger Electron-Emitting [197Hg]Hg-Panitumumab Radioimmunoconjugates on EGFR-Positive Human Breast Cancer Cells. *J Nucl Med* **2024**, *65* (supplement 2), 241617.
- (241) Cai, Z.; Al-saden, N.; Georgiou, C. J.; Reilly, R. M. Cellular Dosimetry of 197Hg, 197mHg and 111In: Comparison of Dose Deposition and Identification of the Cell and Nuclear Membrane as Important Targets. *International Journal of Radiation Biology* **2023**, *99* (1), 53–63. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1849850>.
- (242) Lisha, K. P.; Anshup; Pradeep, T. Towards a Practical Solution for Removing Inorganic Mercury from Drinking Water Using Gold Nanoparticles. *Gold Bull.* **2009**, *42* (2), 144–152.
- (243) Rex, M.; Hernandez, F. E.; Campiglia, A. D. Pushing the Limits of Mercury Sensors with Gold Nanorods. *Anal Chem* **2006**, *78* (2), 445–451. <https://doi.org/10.1021/ac051166r>.
- (244) Ojea-Jimenez, I.; López, X.; Arbiol, J.; Puentes, V. Citrate-Coated Gold Nanoparticles As Smart Scavengers for Mercury(II) Removal from Polluted Waters. *ACS Nano* **2012**, *6* (2), 2253–2260.
- (245) Cole, L. E.; Ross, R. D.; Tilley, J. M.; Vargo-Gogola, T.; Roeder, R. K. Gold Nanoparticles as Contrast Agents in X-Ray Imaging and Computed Tomography. *Nanomedicine* **2015**, *10* (2), 321–341.
- (246) Li, W.; Chen, X. Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging. *Nanomedicine* **2015**, *10* (2), 299–320.
- (247) Zhang, R.; Kiessling, F.; Lammers, T.; Pallares, R. M. Clinical Translation of Gold Nanoparticles. *Drug Delivery and Translational Research* **2023**, *13* (2), 378–385. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01232-4>.
- (248) Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T. F. An Overview of Active and Passive Targeting Strategies to Improve the Nanocarriers Efficiency to Tumour Sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2019**, *71* (8), 1185–1198.
- (249) Mizutani, H.; Tada-Oikawa, S.; Hiraku, Y.; Kojima, M.; Kawanishi, S. Mechanism of Apoptosis Induced by Doxorubicin through the Generation of Hydrogen Peroxide. *Life Sciences* **2005**, *76* (13), 1439–1453. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.05.040>.
- (250) Kang, B.; Mackey, M. A.; El-Sayed, M. A. Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (5), 1517–1519.
- (251) Derfus, A. M.; Chan, W. C.; Bhatia, S. N. Intracellular Delivery of Quantum Dots for Live Cell Labeling and Organelle Tracking. *Advanced materials* **2004**, *16* (12), 961–966.
- (252) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Advances in enzyme regulation* **2001**, *41* (1), 189–207.

- (253) Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved, and Limitations and Augmentation of the Effect. *Advanced drug delivery reviews* **2011**, 63 (3), 136–151.
- (254) Li, J.; Xie, Q.; Ma, R.; Yong, L.; Yuan, J.; Ren, M.; Li, H.; Wang, J.; Lu, D.; Xu, Z.; Wang, J. Recent Progress on the Synergistic Antitumor Effect of a Borneol-Modified Nanocarrier Drug Delivery System. *Frontiers in Medicine* **2021**, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.750170>.
- (255) Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* **2013**, 4 (1), 81.
- (256) Huynh, E.; Zheng, G. Cancer Nanomedicine: Addressing the Dark Side of the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Nanomedicine* **2015**, 10 (13), 1993–1995.
- (257) Silva, F.; Cabral Campello, M. P.; Paulo, A. Radiolabeled Gold Nanoparticles for Imaging and Therapy of Cancer. *Materials* **2021**, 14 (1). <https://doi.org/10.3390/ma14010004>.
- (258) Seniwal, B.; Thipe, V. C.; Singh, S.; Fonseca, T. C.; Freitas de Freitas, L. Recent Advances in Brachytherapy Using Radioactive Nanoparticles: An Alternative to Seed-Based Brachytherapy. *Frontiers in Oncology* **2021**, 11, 766407.
- (259) Daems, N.; Michiels, C.; Lucas, S.; Baatout, S.; Aerts, A. Gold Nanoparticles Meet Medical Radionuclides. *Nuclear Medicine and Biology* **2021**, 100–101, 61–90. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2021.06.001>.
- (260) Jiménez-Mancilla, N.; Ferro-Flores, G.; Santos-Cuevas, C.; Ocampo-García, B.; Luna-Gutiérrez, M.; Azorín-Vega, E.; Isaac-Olivé, K.; Camacho-López, M.; Torres-García, E. Multifunctional Targeted Therapy System Based on ^{99m}Tc/¹⁷⁷Lu-Labeled Gold Nanoparticles-Tat(49–57)-Lys3-Bombesin Internalized in Nuclei of Prostate Cancer Cells. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2013**, 56 (13), 663–671. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3087>.
- (261) Zhang, Y.; Zhang, Y.; Yin, L.; Xia, X.; Hu, F.; Liu, Q.; Qin, C.; Lan, X. Synthesis and Bioevaluation of Iodine-131 Directly Labeled Cyclic RGD-PEGylated Gold Nanorods for Tumor-Targeted Imaging. *Contrast Media Mol Imaging* **2017**, 2017, 6081724. <https://doi.org/10.1155/2017/6081724>.
- (262) Dziawer, Ł.; Męczkowski, M.; Majkowska-Pilip, A.; et al. Gold Nanoparticle Bioconjugates Labelled with ²¹¹At for Targeted Alpha Therapy. *Nuclear Medicine and Biology* **2017**, 49, 63–72.
- (263) Zhang, J.; Qin, S.; Huang, X.; Hilmayanti, E.; Hu, F.; Luan, X.; Ye, T.; Li, F.; Yang, Y.; Liu, N.; Kabayama, K.; Fukase, K.; Yu, F. Preclinical Evaluation of [²¹¹At]At-AuNP-ABDMPL16 for Targeted Alpha Therapy in Melanoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2025**. <https://doi.org/10.1007/s00259-025-07238-7>.
- (264) Song, L.; Able, S.; Johnson, E.; Vallis, K. A. Accumulation of (111)In-Labelled EGF-Au-PEG Nanoparticles in EGFR-Positive Tumours Is Enhanced by Coadministration of Targeting Ligand. *Nanotheranostics* **2017**, 1 (3), 232–243. <https://doi.org/10.7150/ntno.19952>.
- (265) Su, N.; Dang, Y.; Liang, G.; Liu, G. Iodine-125-Labeled cRGD-Gold Nanoparticles as Tumor-Targeted Radiosensitizer and Imaging Agent. *Nanoscale Research Letters* **2015**, 10 (1), 160. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0864-9>.
- (266) Kim, Y.-H.; Jeon, J.; Hong, S. H.; Rhim, W.-K.; Lee, Y.-S.; Youn, H.; Chung, J.-K.; Lee, M. C.; Lee, D. S.; Kang, K. W.; Nam, J.-M. Tumor Targeting and Imaging Using Cyclic RGD-PEGylated Gold Nanoparticle Probes with Directly Conjugated Iodine-125. *Small* **2011**, 7 (14), 2052–2060. <https://doi.org/10.1002/sml.201100927>.
- (267) Mittal, S.; Kumar, C.; Mallia, M. B.; Sarma, H. D. Re-Engineered Theranostic Gold Nanoparticles for Targeting Tumor Hypoxia. *Materials Advances* **2024**, 5 (2), 513–520.
- (268) Ngwa, W.; Kumar, R.; Sridhar, S.; Korideck, H.; Zygmanski, P.; Cormack, R. A.; Berbeco, R.; Makrigiorgos, G. M. Targeted Radiotherapy with Gold Nanoparticles: Current Status and Future Perspectives. *Nanomedicine* **2014**, 9 (7), 1063–1082.
- (269) Xie, H.; Goins, B.; Bao, A.; Wang, Z. J.; Phillips, W. T. Effect of Intratumoral Administration on Biodistribution of ⁶⁴Cu-Labeled Nanoshells. *Int J Nanomedicine* **2012**, 7, 2227–2238. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30699>.

- (270) Yook, S.; Cai, Z. .; Lu, Y. .; et al. Intratumorally Injected ^{177}Lu -Labeled Gold Nanoparticles: Gold Nanoseed Brachytherapy with Application for Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, *12*, 711–719.
- (271) Daruich de Souza, C.; Nogueira, B. R.; Zeituni, C. A.; Rostelato, M. E. C. M. Chapter 15 - Radioactive Nanoparticles and Their Biomedical Application in Nanobrachytherapy. In *Nanoparticle Therapeutics*; Kesharwani, P., Singh, K. K., Eds.; Academic Press, 2022; pp 529–560. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820757-4.00012-0>.
- (272) Salvanou, E.-A.; Kolokithas-Ntoukas, A.; Prokopiou, D.; Theodosiou, M.; Efthimiadou, E.; Koźmiński, P.; Xanthopoulos, S.; Avgoustakis, K.; Bouziotis, P. ^{177}Lu -Labeled Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Doxorubicin and Bevacizumab as Nanobrachytherapy Agents against Breast Cancer. *Molecules* **2024**, *29* (5). <https://doi.org/10.3390/molecules29051030>.
- (273) Salvanou, E.-A.; Stellas, D.; Tsoukalas, C.; Mavroidi, B.; Paravatou-Petsotas, M.; Kalogeropoulos, N.; Xanthopoulos, S.; Denat, F.; Laurent, G.; Bazzi, R.; Roux, S.; Bouziotis, P. A Proof-of-Concept Study on the Therapeutic Potential of Au Nanoparticles Radiolabeled with the Alpha-Emitter Actinium-225. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020188>.
- (274) Majkowska-Pilip, A.; Gawęda, W.; Żelechowska-Matysiak, K.; Wawrowicz, K.; Bilewicz, A. Nanoparticles in Targeted Alpha Therapy. *Nanomaterials* **2020**, *10* (7). <https://doi.org/10.3390/nano10071366>.
- (275) Vilchis-Juárez, A.; Ferro-Flores, G.; Santos-Cuevas, C.; Morales, E.; Ocampo-García, B.; Díaz, L.; Luna-Gutiérrez, M.; Jimenez, N.; Pedraza-López, M.; Gómez-Oliván, L. Molecular Targeting Radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) Peptides Conjugated to Lu-177-Labeled Gold Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice. *Journal of biomedical nanotechnology* **2014**, *10*, 393–404. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1721>.
- (276) Chattopadhyay, N.; Fonge, H.; Cai, Z.; Scollard, D.; Lechtman, E.; Done, S. J.; Pignol, J.-P.; Reilly, R. M. Role of Antibody-Mediated Tumor Targeting and Route of Administration in Nanoparticle Tumor Accumulation in Vivo. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9* (8), 2168–2179. <https://doi.org/10.1021/mp300016p>.
- (277) Yook, S.; Cai, Z.; Lu, Y.; Winnik, M. A.; Pignol, J.-P.; Reilly, R. M. Intratumorally Injected ^{177}Lu -Labeled Gold Nanoparticles: Gold Nanoseed Brachytherapy with Application for Neoadjuvant Treatment of Locally Advanced Breast Cancer. *J Nucl Med* **2016**, *57* (6), 936. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.168906>.
- (278) Cai, Z.; Yook, S.; Lu, Y.; Bergstrom, D.; Winnik, M. A.; Pignol, J.-P.; Reilly, R. M. Local Radiation Treatment of HER2-Positive Breast Cancer Using Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ^{177}Lu . *Pharmaceutical Research* **2017**, *34* (3), 579–590. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2082-2>.
- (279) Zhu, M.; Zhao, L.; Lu, X. Direct Labeling of Gold Nanoparticles with Iodine-131 for Tumor Radionuclide Therapy. *Int J Nanomedicine* **2024**, *19*, 11805–11818. <https://doi.org/10.2147/IJN.S484976>.
- (280) Żelechowska-Matysiak, K.; Salvanou, E.-A.; Bouziotis, P.; Budlewski, T.; Bilewicz, A.; Majkowska-Pilip, A. Improvement of the Effectiveness of HER2+ Cancer Therapy by Use of Doxorubicin and Trastuzumab Modified Radioactive Gold Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* **2023**, *20* (9), 4676–4686. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00414>.
- (281) Shukla, R.; Chanda, N.; Zambre, A.; Upendran, A.; Katti, K.; Kulkarni, R. R.; Nune, S. K.; Casteel, S. W.; Smith, C. J.; Vimal, J.; Boote, E.; Robertson, J. D.; Kan, P.; Engelbrecht, H.; Watkinson, L. D.; Carmack, T. L.; Lever, J. R.; Cutler, C. S.; Caldwell, C.; Kannan, R.; Katti, K. V. Laminin Receptor Specific Therapeutic Gold Nanoparticles ($^{198}\text{AuNP}$ -EGCg) Show Efficacy in Treating Prostate Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (31), 12426–12431. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121174109>.
- (282) Chanda, N.; Kan, P.; Watkinson, L. D.; Shukla, R.; Zambre, A.; Carmack, T. L.; Engelbrecht, H.; Lever, J. R.; Katti, K.; Fent, G. M.; Casteel, S. W.; Smith, C. J.; Miller, W. H.; Jurisson, S.; Boote, E.; Robertson, J. D.; Cutler, C.; Dobrovolskaia, M.; Kannan, R.; Katti, K. V. Radioactive Gold Nanoparticles in Cancer Therapy: Therapeutic Efficacy Studies of GA- $^{198}\text{AuNP}$ Nanoconstruct in Prostate Tumor-Bearing Mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6* (2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.11.001>.

- (283) Dziawer, Ł.; Majkowska-Pilip, A.; Gawęł, D.; Godlewska, M.; Pruszyński, M.; Jastrzębski, J.; Wąs, B.; Bilewicz, A. Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ^{211}At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Nanomaterials* **2019**, *9* (4). <https://doi.org/10.3390/nano9040632>.
- (284) Grzegorzewski, J.; Michalak, M.; Wołoszczuk, M.; Bulicz, M.; Majchrzak-Celińska, A. Nanotherapy of Glioblastoma—Where Hope Grows. *International Journal of Molecular Sciences* **2025**, *26* (5). <https://doi.org/10.3390/ijms26051814>.
- (285) Liu, Y.; Zhou, Z.; Feng, Y.; Zhao, X.-G.; Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R.; Vo-Dinh, T. Gold Nanostars: A Novel Platform for Developing ^{211}At -Labeled Agents for Targeted Alpha-Particle Therapy. *International Journal of Nanomedicine* **2021**, 7297–7305.
- (286) Kato, H.; Huang, X.; Kadonaga, Y.; Katayama, D.; Ooe, K.; Shimoyama, A.; Kabayama, K.; Toyoshima, A.; Shinohara, A.; Hatazawa, J.; Fukase, K. Intratumoral Administration of Astatine-211-Labeled Gold Nanoparticle for Alpha Therapy. *Journal of Nanobiotechnology* **2021**, *19* (1), 223. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00963-9>.
- (287) Salvanou, E.-A.; Apostolopoulou, A.; Xanthopoulos, S.; Koelewijn, S.; van Overeem, P.; Laurent, G.; Bazzi, R.; Denat, F.; Roux, S.; Bouziotis, P. ^{161}Tb -Labeled Gold Nanoparticles as Nanoscale Brachytherapy Agents Against Breast Cancer. *Materials* **2025**, *18* (2). <https://doi.org/10.3390/ma18020248>.
- (288) Cai, Z.; Chattopadhyay, N.; Yang, K.; Kwon, Y. L.; Yook, S.; Pignol, J.-P.; Reilly, R. M. ^{111}In -Labeled Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Are Cytotoxic in Vitro to HER2-Positive Breast Cancer Cells and Arrest Tumor Growth in Vivo in Athymic Mice after Intratumoral Injection. *Nuclear Medicine and Biology* **2016**, *43* (12), 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.08.009>.
- (289) Fach, M.; Fliedner, F. P.; Kempen, P. J.; Melander, F.; Hansen, A. E.; Bruun, L. M.; Köster, U.; Sporer, E.; Kjær, A.; Andresen, T. L.; Jensen, A. I.; Henriksen, J. R. Effective Intratumoral Retention of ^{103}Pd /AuPd Alloy Nanoparticles Embedded in Gel-Forming Liquids Paves the Way for New Nanobrachytherapy. *Advanced Healthcare Materials* **2021**, *10* (10), 2002009. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002009>.
- (290) Brown, M. K.; Cai, Z.; Chen, S.; Davey, P.; Radchenko, V.; Reilly, R. M. EGFR-Targeted $^{197}\text{Hg}/^{197}\text{mHg}$ -Labeled Gold Nanoparticles Are Internalized and Imported into the Nucleus of Human Glioblastoma Multiforme (GBM) Cells and Are Cytotoxic by Emission of Auger Electrons.
- (291) Ponchelle, M.; Pruszyński, M.; Gravel, E.; Doris, E. ^{177}Lu -Gold Nanohybrids in Radiotherapeutic Approaches Against Cancer. *Small Science* **2024**, *n/a* (n/a), 2400550. <https://doi.org/10.1002/smss.202400550>.
- (292) House, S. D.; Bonifacio, C. S.; Grieshaber, R. V.; Li, L.; Zhang, Z.; Ciston, J.; Stach, E. A.; Yang, J. C. Statistical Analysis of Support Thickness and Particle Size Effects in HRTEM Imaging of Metal Nanoparticles. *Ultramicroscopy* **2016**, *169*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2016.06.007>.
- (293) Jurkiewicz, K.; Pawlyta, M.; Burian, A. Structure of Carbon Materials Explored by Local Transmission Electron Microscopy and Global Powder Diffraction Probes. *C* **2018**, *4*, 68. <https://doi.org/10.3390/c4040068>.
- (294) Stachowiak, G. W.; Batchelor, A. W.; Stachowiak, G. B. 8 - Surface Micrography and Analysis. In *Tribology Series*; Stachowiak, G. W., Batchelor, A. W., Stachowiak, G. B., Eds.; Elsevier, 2004; Vol. 44, pp 165–220. [https://doi.org/10.1016/S0167-8922\(04\)80024-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8922(04)80024-5).
- (295) Souza, T. G. F.; Ciminelli, V. S. T.; Mohallem, N. D. S. A Comparison of TEM and DLS Methods to Characterize Size Distribution of Ceramic Nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series* **2016**, *733* (1), 012039. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/733/1/012039>.
- (296) TRANSMISYJNY MIKROSKOP ELEKTRONOWY. <https://mikroskopelektronowy.pl/transmisyjny-mikroskop-elektronowy/>.
- (297) Thust, A. High-Resolution Transmission Electron Microscopy on an Absolute Contrast Scale. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102* (22), 220801. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.102.220801>.
- (298) Hoo, C. M.; Starostin, N.; West, P.; Mecartney, M. L. A Comparison of Atomic Force Microscopy (AFM) and Dynamic Light Scattering (DLS) Methods to Characterize Nanoparticle Size Distributions. *Journal of Nanoparticle Research* **2008**, *10* (1), 89–96. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9435-7>.

- (299) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys Rev* **2016**, *8* (4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (300) Babick, F. Chapter 3.2.1 - Dynamic Light Scattering (DLS). In *Characterization of Nanoparticles*; Hodoroba, V.-D., Unger, W. E. S., Shard, A. G., Eds.; Elsevier, 2020; pp 137–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9>.
- (301) *The principles of dynamic light scattering*. <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>.
- (302) Matematyczno-Przyrodniczy, A. U. w K. W. Bulletin International de l'Académie Des Sciences de Cracovie Classe Des Sciences Mathématiques et Naturelles; Cracovie, Impr. de l'Université, 1901-1909, 1903; Vol. 1903, p 0.
- (303) Lunardi, C. N.; Gomes, A. J.; Rocha, F. S.; De Tommaso, J.; Patience, G. S. Experimental Methods in Chemical Engineering: Zeta Potential. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **2021**, *99* (3), 627–639. <https://doi.org/10.1002/cjce.23914>.
- (304) Clogston, J. D.; Patri, A. K. Zeta Potential Measurement. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; McNeil, S. E., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- (305) Zetasizer Nano User Manual (English), 2017.
- (306) Akash, M. S. H.; Rehman, K. Ultraviolet-Visible (UV-VIS) Spectroscopy. In *Essentials of Pharmaceutical Analysis*; Akash, M. S. H., Rehman, K., Eds.; Springer Nature Singapore: Singapore, 2020; pp 29–56. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_3.
- (307) Aldabib, J.; Edbeib, M. The Effects of Concentration Based on the Absorbance Form the Ultraviolet–Visible (UV-VIS) Spectroscopy Analysis. *IJSL* **2020**, *2* (1), 1–11. <https://doi.org/10.38058/ijsl.633876>.
- (308) Mosorov, V. The Lambert-Beer Law in Time Domain Form and Its Application. *Applied Radiation and Isotopes* **2017**, *128*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.06.039>.
- (309) Aryal, S. *UV-Vis Spectroscopy: Principle, Parts, Uses, Limitations*. <https://microbenotes.com/uv-vis-spectroscopy/>.
- (310) Amendola, V.; Meneghetti, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV–vis Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (11), 4277–4285. <https://doi.org/10.1021/jp8082425>.
- (311) Mohamed, M. A.; Jaafar, J.; Ismail, A. F.; Othman, M. H. D.; Rahman, M. A. Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In *Membrane Characterization*; Hilal, N., Ismail, A. F., Matsuura, T., Oatley-Radcliffe, D., Eds.; Elsevier, 2017; pp 3–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>.
- (312) Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Photosynth Res* **2009**, *101* (2–3), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>.
- (313) Ismail, A. A.; van de Voort, F. R.; Sedman, J. Chapter 4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Principles and Applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; Paré, J. R. J., Bélanger, J. M. R., Eds.; Elsevier, 1997; Vol. 18, pp 93–139. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80013-3](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80013-3).
- (314) Pan, W.; Xu, W.; Li, S. Fundamentals of TGA and SDT; 2005.
- (315) De Blasio, C. Thermogravimetric Analysis (TGA). In *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology*; De Blasio, C., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 91–102. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11599-9_7.
- (316) Nirula, U. P-N Junction Diode | Definition, Application & Function, 2023. <https://study.com/academy/lesson/p-n-junction-diode-definition-properties.html>.
- (317) D Demir; M Eroğlu; A Turşucu. Studying of Characteristics of the HPGe Detector for Radioactivity Measurements. *Journal of Instrumentation* **2013**, *8* (10), P10027. <https://doi.org/10.1088/1748-0221/8/10/P10027>.
- (318) WYKORZYSTANIE DETEKTORA PÓŁPRZEWODNIKOWEGO W POMIARACH PROMIENIOWANIA. <http://atom.chem.uw.edu.pl/files/C2.pdf>.

- (319) Vargas, M. J.; Timón, A. F.; Díaz, N. C.; Sánchez, D. P. Influence of the Geometrical Characteristics of an HpGe Detector on Its Efficiency. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2002**, 253 (3), 439–443. <https://doi.org/10.1023/A:1020425704745>.
- (320) Kabakov, A. E.; Gabai, V. L. Cell Death and Survival Assays. In *Chaperones: Methods and Protocols*; Calderwood, S. K., Prince, T. L., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2018; pp 107–127. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9.
- (321) CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, 2023. www.promega.com/protocols/.
- (322) St. Croix, C. M.; Shand, S. H.; Watkins, S. C. Confocal Microscopy: Comparisons, Applications, and Problems. *BioTechniques* **2005**, 39 (sup6), S2–S5. <https://doi.org/10.2144/000112089>.
- (323) Elliott, A. D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry* **2020**, 92 (1), e68. <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>.
- (324) Robinson, J. P. Chapter 4 Principles of Confocal Microscopy. In *Methods in Cell Biology*; Academic Press, 2001; Vol. 63, pp 89–106. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)63008-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)63008-5).
- (325) Ruprecht, N.; Hungerbühler, M. N.; Böhm, I. B.; Heverhagen, J. T. Improved Identification of DNA Double Strand Breaks: γ -H2AX-Epitope Visualization by Confocal Microscopy and 3D Reconstructed Images. *Radiation and Environmental Biophysics* **2019**, 58 (2), 295–302. <https://doi.org/10.1007/s00411-019-00778-1>.
- (326) McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* **2018**, 120 (1), 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- (327) Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. Flow Cytometry: Basic Principles and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **2017**, 37 (2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
- (328) Wlodkowic, D.; Skommer, J.; Darzynkiewicz, Z. Cytometry of Apoptosis. Historical Perspective and New Advances. *Exp Oncol* **2012**, 34 (3), 255–262.
- (329) Darzynkiewicz, Z.; Bedner, E.; Smolewski, P. Flow Cytometry in Analysis of Cell Cycle and Apoptosis. *Seminars in Hematology* **2001**, 38 (2), 179–193. [https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(01\)90051-4](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(01)90051-4).
- (330) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. The Formation of Colloidal Gold. *J Phys Chem* **1953**, 57 (7), 670–673.
- (331) Readwin, T. A. On the Occurrence of Gold in Merionetshire. *The Geologist* **1861**, 4 (11), 511–516.
- (332) Mukherji, A. K.; Sinha, A. K.; Dey, A. K. Complex Citrates of Metals in Inorganic Analysis: Some Preliminary Observations and the Application of Citrate Complex Formation in the Qualitative Analysis of the Metallic Ions of the Silver Group. *Analytica Chimica Acta* **1955**, 12, 501–503. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)87872-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)87872-1).
- (333) Wang, W.; Wei, Q. Q.; Wang, J.; Wang, B. C.; Zhang, S.; Yuan, Z. Role of Thiol-Containing Polyethylene Glycol (Thiol-PEG) in the Modification Process of Gold Nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or Coagulant? *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, 404, 223–229.
- (334) Cruje, C.; Chithrani, D. B. Polyethylene Glycol Functionalized Nanoparticles for Improved Cancer Treatment. *Rev. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, 3, 20–30.
- (335) Häkkinen, H. The Gold–Sulfur Interface at the Nanoscale. *Nature Chemistry* **2012**, 4 (6), 443–455. <https://doi.org/10.1038/nchem.1352>.
- (336) Sigma-Aldrich. *Poly(ethylene glycol) 2-mercaptoethyl ether acetic acid*. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/structures/352/825/0cf11dd3-a961-4117-869f-ad67403d5c8a/800/0cf11dd3-a961-4117-869f-ad67403d5c8a.png>.
- (337) Juarez-Moreno, K.; Chávez-García, D.; Hirata, G.; Vazquez-Duhalt, R. Monolayer (2D) or Spheroids (3D) Cell Cultures for Nanotoxicological Studies? Comparison of Cytotoxicity and Cell Internalization of Nanoparticles. *Toxicology in Vitro* **2022**, 85, 105461. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105461>.
- (338) Pinto, D. M. S.; Flaus, A. Structure and Function of Histone H2AX. *Subcell Biochem* **2010**, 50, 55–78. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3471-7_4.

- (339) KUO, L. J.; YANG, L.-X. γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-Strand Breaks. *In Vivo* **2008**, 22 (3), 305.
- (340) Nie, H.-Y.; Romanovskaia, E.; Romanovski, V.; Hedberg, J.; Hedberg, Y. S. Detection of Gold Cysteine Thiolate Complexes on Gold Nanoparticles with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Biointerphases* **2021**, 16 (2), 021005. <https://doi.org/10.1116/6.0000910>.
- (341) Aswathy Aromal, S.; Philip, D. Facile One-Pot Synthesis of Gold Nanoparticles Using Tannic Acid and Its Application in Catalysis. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2012**, 44 (7), 1692–1696. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2012.04.022>.
- (342) Wulandari, P.; Nagahiro, T.; Fukada, N.; Kimura, Y.; Niwano, M.; Tamada, K. Characterization of Citrates on Gold and Silver Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, 438, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.09.078>.
- (343) Park, G.; Seo, D.; Chung, I. S.; Song, H. Poly(Ethylene Glycol)- and Carboxylate-Functionalized Gold Nanoparticles Using Polymer Linkages: Single-Step Synthesis, High Stability, and Plasmonic Detection of Proteins. *Langmuir* **2013**, 29 (44), 13518–13526. <https://doi.org/10.1021/la402315a>.
- (344) Kurrey, R.; Deb, M. K.; Shrivastava, K.; Khalkho, B. R.; Nirmalkar, J.; Sinha, D.; Jha, S. Citrate-Capped Gold Nanoparticles as a Sensing Probe for Determination of Cetyltrimethylammonium Surfactant Using FTIR Spectroscopy and Colorimetry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2019**, 411 (26), 6943–6957. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02067-8>.
- (345) Bajaj, M.; Wangoo, N.; Jain, D. V. S.; Sharma, R. K. Quantification of Adsorbed and Dangling Citrate Ions on Gold Nanoparticle Surface Using Thermogravimetric Analysis. *Scientific Reports* **2020**, 10 (1), 8213. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65013-0>.
- (346) Jayeoye, T. J.; Supachettapun, C.; Muangsin, N. Toxic Ag⁺ Detection Based on Au@Ag Core Shell Nanostructure Formation Using Tannic Acid Assisted Synthesis of Pullulan Stabilized Gold Nanoparticles. *Scientific Reports* **2023**, 13 (1), 1844. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27406-9>.
- (347) Sebbby, K. B.; Mansfield, E. Determination of the Surface Density of Polyethylene Glycol on Gold Nanoparticles by Use of Microscale Thermogravimetric Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, 407 (10), 2913–2922. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8520-x>.
- (348) Wiederhold, J. G.; Cramer, C. J.; Daniel, K.; Infante, I.; Bourdon, B.; Kretzschmar, R. Equilibrium Mercury Isotope Fractionation between Dissolved Hg(II) Species and Thiol-Bound Hg. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44 (11), 4191–4197. <https://doi.org/10.1021/es100205t>.
- (349) Kim, M. J.; Park, J.; Kim, J.; Kim, J.-Y.; An, M.-J.; Shin, G.-S.; Lee, H.-M.; Kim, C.-H.; Kim, J.-W. Transcriptome Analysis Reveals HgCl₂ Induces Apoptotic Cell Death in Human Lung Carcinoma H1299 Cells through Caspase-3-Independent Pathway. *Int J Mol Sci* **2021**, 22 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms22042006>.
- (350) Carneiro, B. A.; El-Deiry, W. S. Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2020**, 17 (7), 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
- (351) Dropp, P.; Chen, S.; Radford, M. J.; Paulssen, E.; Gates, B. D.; Reilly, R. M.; Radchenko, V.; Hoehr, C. Synthesis of ¹⁹⁷m/gHg Labelled Gold Nanoparticles for Targeted Radionuclide Therapy. *Radiochim. Acta* **2023**, 111 (10), 773–779.
- (352) Mandal, S.; Nayak, D. Production, Separation and Speciation of No-Carrier-Added Hg Radionuclides Using Greener Methodologies. **2010**, 98 (1), 45–51. <https://doi.org/10.1524/ract.2010.1679>.
- (353) Wang, C. Theranostic Mercury: ¹⁹⁷(m)Hg with High Specific Activity for Imaging and Therapy. praca doktorska, Technischen Universität Dresden, Dresden-Rossendorf, 2018.
- (354) Şekerci, M.; Özdoğan, H.; Kaplan, A. An Investigation of Effects of Level Density Models and Gamma Ray Strength Functions on Cross-Section Calculations for the Production of ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁹Er, ¹⁷⁷Lu and ¹⁸⁶Re Therapeutic Radioisotopes via (n,γ) Reactions. **2020**, 108 (1), 11–17. <https://doi.org/10.1515/ract-2019-3123>.
- (355) Nir-El, Y. Production of ¹⁷⁷Lu by Neutron Activation of ¹⁷⁶Lu. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2005**, 262 (3), 563–567. <https://doi.org/10.1007/s10967-005-0476-4>.
- (356) Bonardi, M.; Gallorini, M.; Birattari, C.; Groppi, F.; Magon, L.; Marchi, A.; Saponaro, S.; Ulrici, L. Irradiation Methods for Production of High Specific Activity Radionuclides in No Carrier Added Form.

- Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **1995**, 195 (2), 227–236. <https://doi.org/10.1007/BF02035961>.
- (357) Qaim, S. M. The Present and Future of Medical Radionuclide Production. **2012**, 100 (8–9), 635–651. <https://doi.org/10.1524/ract.2012.1966>.
- (358) *Technical characteristics, Description of the ILL high-flux reactor*. <https://www.ill.eu/reactor-and-safety/high-flux-reactor/technical-characteristics>.
- (359) Randhawa, P.; Gower-Fry, K. L.; Stienstra, C. M. K.; Tosato, M.; Chen, S.; Gao, Y.; McDonagh, A. W.; Di Marco, V.; Radchenko, V.; Schreckenbach, G.; Ramogida, C. F. Selective Chelation of the Exotic Meitner-Auger Emitter Mercury-197 m/g with Sulfur-Rich Macrocyclic Ligands: Towards the Future of Theranostic Radiopharmaceuticals. *Chemistry – A European Journal* **2023**, 29 (21), e202203815. <https://doi.org/10.1002/chem.202203815>.
- (360) Damasceno, A.; Pijera, M. S. O.; Ricci-Junior, E.; Alencar, L. M. R.; İlem-Özdemir, D.; Santos-Oliveira, R. Exploiting the Extemporaneousness of Radiopharmaceuticals: Radiolabeling Stability under Diverse Conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2022**, 221, 115024. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115024>.
- (361) Liu, Z.; Wu, Y.; Guo, Z.; Liu, Y.; Shen, Y.; Zhou, P.; Lu, X. Effects of Internalized Gold Nanoparticles with Respect to Cytotoxicity and Invasion Activity in Lung Cancer Cells. *PLoS One* **2014**, 9 (6), e99175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099175>.
- (362) Wu, Y.; Zhang, Q.; Ruan, Z.; Yin, Y. Intrinsic Effects of Gold Nanoparticles on Proliferation and Invasion Activity in SGC-7901 Cells. *Oncology Reports* **2016**, 35 (3), 1457–1462.
- (363) Wawrowicz, K.; Majkowska-Pilip, A.; Gawel, D.; Chajduk, E.; Pieńkowski, T.; Bilewicz, A. Au@Pt Core-Shell Nanoparticle Bioconjugates for the Therapy of HER2+ Breast Cancer and Hepatocellular Carcinoma. Model Studies on the Applicability of ^{193m}Pt and ^{195m}Pt Radionuclides in Auger Electron Therapy. *Molecules* **2021**, 26 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules26072051>.
- (364) Ho, F. K. S. Development of ¹⁹⁷Hg-Labelled Panitumumab for Auger Electron Radioimmunotherapy of Triple-Negative Breast Cancer. **2023**.
- (365) Rosenkranz, A. A.; Slastnikova, T. A.; Karmakova, T. A.; Vorontsova, M. S.; Morozova, N. B.; Petriev, V. M.; Abrosimov, A. S.; Khramtsov, Y. V.; Lupanova, T. N.; Ulasov, A. V.; Yakubovskaya, R. I.; Georgiev, G. P.; Sobolev, A. S. Antitumor Activity of Auger Electron Emitter ¹¹¹In Delivered by Modular Nanotransporter for Treatment of Bladder Cancer With EGFR Overexpression. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, Volume 9-2018.
- (366) Wawrowicz, K.; Żelechowska-Matysiak, K.; Majkowska-Pilip, A.; Wierzbicki, M.; Bilewicz, A. Platinum Nanoparticles Labelled with Iodine-125 for Combined “Chemo-Auger Electron” Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Nanoscale Advances* **2023**, 5 (12), 3293–3303.
- (367) Moradi, M. S.; Bidabadi, B. S. Assessment of Single-and Double-Strand Breaks in DNA Induced by Auger Electrons of Radioisotopes Used in Diagnostic and Therapeutic Applications. *J Med Phys* **2020**, 45 (4), 240–248. https://doi.org/10.4103/jmp.JMP_79_19.
- (368) Gharibkandi, N. A.; Majkowska-Pilip, A.; Walczak, R.; Wierzbicki, M.; Bilewicz, A. Au@(¹⁰⁹)Pd Core-Shell Nanoparticles Conjugated to Panitumumab for the Combined β (-)-Auger Electron Therapy of Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci* **2024**, 25 (24). <https://doi.org/10.3390/ijms252413555>.
- (369) Sankaranarayanan, R. A.; Peil, J.; Vogg, A. T. J.; Bolm, C.; Terhorst, S.; Classen, A.; Bauwens, M.; Maurer, J.; Mottaghy, F.; Morgenroth, A. Auger Emitter Conjugated PARP Inhibitor for Therapy in Triple Negative Breast Cancers: A Comparative In-Vitro Study. *Cancers* **2022**, 14 (1). <https://doi.org/10.3390/cancers14010230>.
- (370) Schmitz, S.; Oskamp, D.; Pomplun, E.; Kriehuber, R. Chromosome Aberrations Induced by the Auger Electron Emitter ¹²⁵I. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2015**, 793, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.08.007>.
- (371) Kozics, K.; Sramkova, M.; Kopecka, K.; Begerova, P.; Manova, A.; Krivosikova, Z.; Sevcikova, Z.; Liskova, A.; Rollerova, E.; Dubaj, T.; Puentes, V.; Wsolova, L.; Simon, P.; Tulinska, J.; Gabelova, A. Pharmacokinetics, Biodistribution, and Biosafety of PEGylated Gold Nanoparticles In Vivo. *Nanomaterials* **2021**, 11 (7). <https://doi.org/10.3390/nano11071702>.

- (372) Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Sperling, R. A.; Wenk, A.; Takenaka, S.; Schleh, C.; Kissel, T.; Parak, W. J.; Kreyling, W. G. Biodistribution of PEG-Modified Gold Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Intravenous Injection. *Biomaterials* **2010**, *31* (25), 6574–6581. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.009>.
- (373) Janic, B.; Brown, S. L.; Neff, R.; Liu, F.; Mao, G.; Chen, Y.; Jackson, L.; Chetty, I. J.; Movsas, B.; Wen, N. Therapeutic Enhancement of Radiation and Immunomodulation by Gold Nanoparticles in Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Biology & Therapy* **2021**, *22* (2), 124–135. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1861923>.
- (374) Morshed, R. A.; Muroski, M. E.; Dai, Q.; Wegscheid, M. L.; Auffinger, B.; Yu, D.; Han, Y.; Zhang, L.; Wu, M.; Cheng, Y.; Lesniak, M. S. Cell-Penetrating Peptide-Modified Gold Nanoparticles for the Delivery of Doxorubicin to Brain Metastatic Breast Cancer. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13* (6), 1843–1854. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00004>.
- (375) Chan, C. Y.; Chen, Z.; Guibbal, F.; Dias, G.; Destro, G.; O'Neill, E.; Veal, M.; Lau, D.; Mosley, M.; Wilson, T. C.; Gouverneur, V.; Cornelissen, B. [¹²³I]CC1: A PARP-Targeting, Auger Electron–Emitting Radiopharmaceutical for Radionuclide Therapy of Cancer. *J Nucl Med* **2023**, *64* (12), 1965. <https://doi.org/10.2967/jnumed.123.265429>.
- (376) Chan, C.; Fonge, H.; Lam, K.; Reilly, R. M. Effectiveness and Normal Tissue Toxicity of Auger Electron (AE) Radioimmunotherapy (RIT) with [¹¹¹In]In-Bn-DTPA-Nimotuzumab in Mice with Triple-Negative or Trastuzumab-Resistant Human Breast Cancer Xenografts That Overexpress EGFR. *Nuclear Medicine and Biology* **2020**, *80–81*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.10.001>.
- (377) Żelechowska-Matysiak, K.; Salvanou, E.-A.; Bouziotis, P.; Budlewski, T.; Bilewicz, A.; Majkowska-Pilip, A. Improvement of the Effectiveness of HER2+ Cancer Therapy by Use of Doxorubicin and Trastuzumab Modified Radioactive Gold Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* **2023**, *20* (9), 4676–4686. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00414>.
- (378) Taggart, L. E.; McMahon, S. J.; Currell, F. J.; Prise, K. M.; Butterworth, K. T. The Role of Mitochondrial Function in Gold Nanoparticle Mediated Radiosensitisation. *Cancer Nanotechnology* **2014**, *5* (1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12645-014-0005-7>.

Wykaz skrótów

ADC – koniugaty przeciwciało-lek

A_{EOB} – Aktywność produktu na koniec napromieniowania tarczy

AR – receptor androgenowy

^{197m}Hg – radionuklidy ¹⁹⁷Hg oraz ^{197m}Hg

Au(^{197m/197}Hg)NPs – koniugat nanocząstek złota oraz radionuklidów rtęci ¹⁹⁷Hg oraz ^{197m}Hg

Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG – koniugat nanocząstek złota oraz PEG-u i radionuklidów rtęci ¹⁹⁷Hg oraz ^{197m}Hg

Au(Hg)NPs – koniugat nanocząstek złota oraz rtęci

Au(Hg)NPs-PEG – koniugat nanocząstek złota oraz PEG-u i rtęci

AuNP – nanocząstka złota

AuNPs – nanocząstki złota

AuNPs-PEG – koniugat nanocząstek złota oraz PEG-u

AURKA – kinazy Aurory A

AXL – receptorowa kinaza tyrozynowa

BSA – albumina surowicy wołowej

CAR-T – chimeryczne receptory antygenowe

CFW – myszy Carworth Farms White

Detektor HPGe – półprzewodnikowy detektor z wysokiej czystości germanem

DLS – technika dynamicznego rozpraszania światła laserowego

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DOX – dokсорubicyna

EC – wychwyt elektronu

EGF – naskórkowy czynnik wzrostu

EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

EOB - koniec napromieniania próbki (ang. *end of bombardment*)

EPR – efekt wzmocnionej przepuszczalności i retencji

ER – receptora estrogenowy

FDA – Agencja ds. Żywności i Leków

FBS – płodowe serum cielęce

FTIR – Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

GBM – glejak wielopostaciowy (GBM)

HDAC – deacetylaza histonowa

HER2 – receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2

HR-TEM – wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa

IDH – dehydrogenaza izocytrynianowa

IR – Spektroskopia w podczerwieni

Ki67 – wskaźnik proliferacji

LAR – receptor androgenowy luminalny

MDT – terapia wielolekowa (*ang. Multi-Drug Therapy*)

MMP-14 – metaloproteinaza macierzy 14

MTS – 3-(4,5- dimetylotioazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol

o-MWNT – utlenione wielościennie nanorurki węglowe

PARP – polimeraza poli-ADP-rybozy

PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PEG, PEG-COOH – glikol polietylenowy, kwas poli(glikol etylenowy)-2-merkaptetoetyloetero etanowy

Pen-Strep – połączone antybiotyki Penicylina i Streptomycyna

Podtyp M – podtyp TNBC mezenchymalny (*ang. mesenchymal*)

Podtyp MSL – podtyp TNBC przypominający mezenchymalny-macierzysty (*ang. mesenchymal stem-like*)

PR – receptor progesteronowego

PSMA – antygen błonowy specyficzny dla prostaty

RES – układ siateczkowo-śródbłonkowy

SSTR2 – receptor somatostatyny typu 2

TBST – 0,1% Tween 20 (mieszanina TRIS i polisorbatu 20 o pH~8)

TGA – Analiza termograwimetryczna

TMZ – temozolomid

TNBC – potrójnie receptorowo ujemny rak piersi

TRIS – 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol

TTY – Wydajność napromieniowania tarczy, *Thick Target Yield*

VCAM-1 – cząsteczki adhezji komórek naczyniowych-1

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF/

VEGFR – receptor naczyniowo-śródbłonkowy czynnika wzrostu

ZP – potencjał zeta

$\alpha_v\beta_3$ – receptora integryny $\alpha_v\beta_3$

%IA/g – procent aktywności wstrzykniętej na gram tkanki

Spis tabel

Tab. I. Czynniki ryzyka raka piersi z podziałem na czynniki niemodyfikowalne oraz modyfikowalne. ⁵ ..	20
Tab. II. Stosowane strategie terapeutyczne w zależności od podtypu TNBC. ²⁷	22
Tab. III. Podział radionuklidów najczęściej stosowanych w terapii radionuklidowej ze względu na rodzaj emitowanej cząstki. ¹¹¹	32
Tab. IV. Skład izotopowy naturalnie występującej rtęci. ¹⁹²	41
Tab. V. Najczęściej badane radioaktywne izotopy rtęci. ²⁰⁴	43
Tab. VI. Związki poddane badaniu testem cytotoksyczności MTS oraz stężenia ich komponentów na dołek.	77
Tab. VII. Powierzchnia sferoidów w dniu dodania (dzień 0) koniugatów.	78
Tab. VIII. Odczynniki stosowane do przeprowadzenia eksperymentu badającego występowanie dwuniciowych pęknięć DNA.	79
Tab. IX. Aktywność promieniotwórcza radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG podana zwierzętom w badaniu biodystrybucji.	83
Tab. X. Aktywności promieniotwórcze radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG podane zwierzętom w badaniu efektywności terapeutycznej.	84
Tab. XI. Rozmiar AuNPs oraz ich koniugatów zawierających rtęć.	90
Tab. XII. Wyznaczone teoretycznie oraz eksperymentalnie wartości TTY dla energii protonów równej 10 MeV dla ¹⁹⁷ Hg oraz ^{197m} Hg.	111
Tab. XIII. Aktywność promieniotwórcza poszczególnych frakcji w procesie separacji ^{197m/197} Hg z tarczy po przejściu przez kolumnę.	116
Tab. XIV. Wyznaczone teoretycznie wartości TTY dla energii deuteronów równej 15 MeV dla ¹⁹⁷ Hg oraz ^{197m} Hg.	118
Tab. XV. Aktywność promieniotwórcza produktów na koniec napromienienia tarczy (A _{EOB}) dla radionuklidów zidentyfikowanych w produkcji metodą ¹⁹⁷ Au(d, 2n) ^{197m/197} Hg.	119
Tab. XVI. Aktywność promieniotwórcza poszczególnych frakcji w procesie separacji ^{197m/197} Hg z tarczy po przejściu przez kolumnę.	120
Tab. XVII. Skład izotopowy tarczy rtęciowej wzbogaconej w ¹⁹⁶ Hg (ISOFLEX, USA).	121
Tab. XVIII. Parametry napromieniania oraz otrzymane aktywności promieniotwórcze radionuklidów ^{19m/197} Hg mierzone na kalibratorze dawek Atomlab.	121
Tab. XIX. Parametry napromieniania tarczy rtęciowej do produkcji metodą ¹⁹⁶ Hg(n, γ) ^{197m/197} Hg wykorzystanej do pomiarów HPGe.	122
Tab. XX. Czas trwania oraz czas od EOB dla wykonanych pomiarów gamma spektrometrycznych.	122
Tab. XXI. Radionuklidy zidentyfikowane w widmie HPGe po produkcji metodą ¹⁹⁶ Hg(n, γ) ^{197m/197} Hg oraz ich wyznaczone aktywności promieniotwórcze.	124
Tab. XXII. Aktywność promieniotwórcza związana z AuNPs w zależności od stosowanej masy rtęci.	128
Tab. XXIII. Aktywność promieniotwórcza związana z AuNPs w zależności od czasu reakcji.	128
Tab. XXIV. Wpływ dodatku PEG na stabilność połączenia AuNPs z radionuklidami ^{197m/197} Hg.	129
Tab. XXV. Procent aktywności promieniotwórczej radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG-COOH związanej z błoną oraz internalizowanej do wnętrza komórki dla linii komórkowej MDA-MB-231.	131
Tab. XXVI. Procent aktywności promieniotwórczej radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG-COOH związanej z błoną oraz internalizowanej do wnętrza komórki dla linii komórkowej T98G.	132
Tab. XXVII. Procent aktywności promieniotwórczej radiokoniugatu związanego z błoną oraz internalizowanego do wnętrza komórki dla linii komórkowej MDA-MB-231.	166
Tab. XXVIII. Procent aktywności promieniotwórczej koniugatu związanego z błoną oraz internalizowanego do wnętrza komórki dla linii komórkowej T98G.	167

Spis fotografii

Fot. 1. Urządzenie Zeta Sizer Nano ZS stosowane do pomiarów DLA oraz potencjału zeta.	59
Fot. 2. Spektrofotometr JASCO V-750.	61
Fot. 3. Spektrometr FTIR Nicolet is10 (Thermo Scientific).	62
Fot. 4. Analizator termograwimetryczny SDT Q600 (TA Instruments).	63
Fot. 5. Detektor germanowy wysokiej czystości zastosowany do pomiaru aktywności promieniotwórczej próbek w analizie stabilności oraz frakcjonowania jądra komórkowego.	65
Fot. 6. Czytnik BioTek Synergy H1 Multimode Reader.	66
Fot. 7. Cytometr BD FACSCelesta.	69
Fot. 8. Układ stosowany do syntezy AuNPs.	72
Fot. 9. Produkt syntezy - roztwór AuNPs o średnicy 5 nm.	72
Fot. 10. Zdjęcie porównujące niemodyfikowane AuNPs wraz z ich koniugatami.	87

Spis rysunków

Rys. 1. Schematyczna prezentacja syntezy PEGyloowanych koniugatów nanocząstek złota z rtęcią.	3
Rys. 2. Mechanizm karcynogenezy chemicznej przedstawiający jej trzy etapy: inicjację, promocję i progresję. ⁶	18
Rys. 3. Schemat przedstawiający etapy tworzenia się przerzutów nowotworowych. ⁷	19
Rys. 4. Schemat rozpadu radionuklidów ^{197m/197} Hg. Na podstawie. ²¹³	44
Rys. 5. Schematyczny diagram reprezentujący efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji nanocząstek w guzach. ²⁵⁴	48
Rys. 6. Podstawowa konfiguracja urządzenia DLS. ³⁰⁰	58
Rys. 7. Schematyczna budowa spektrofotometru UV-Vis. ³⁰⁹	60
Rys. 8. Schemat obrazujący podstawową zasadę działania spektroskopii FTIR. ³¹²	62
Rys. 9. Schematyczne przedstawienie działania pomiaru metodą TGA. ³¹⁵	63
Rys. 10. Schemat obrazujący sposób działania diody p-n. ³¹⁶	64
Rys. 11. Schemat reakcji redukcji związku MTS do formazanu. ³²¹	65
Rys. 12. Schematyczne przedstawienie budowy oraz zasady działania mikroskopu konfokalnego. ³²³	67
Rys. 13. Podstawowa zasada działania cytometru przepływowego. ³²⁷	68
Rys. 14. Schemat obrazujący reakcję przyłączania rtęci do nanocząstek złota.	73
Rys. 15. Struktura chemiczna stosowanego glikolu polietylenowego (kwas poli(glikol etylenowy)-2-merkaptioetyloetero etanowy), $n \approx 110$	74
Rys. 16. Schemat obrazujący reakcję stabilizacji koniugatu Au(Hg)NPs glikolem polietylenowym.	74
Rys. 17. Koniugat AuNPs pokryty rtęcią oraz stabilizowany glikolem polietylenowym.	85
Rys. 18. AuNPs 5 nm.	88
Rys. 19. Au(Hg)NPs z obrazowaniem Hg.	88
Rys. 20. Au(Hg)NPs z obrazowaniem Au i Hg.	88
Rys. 21. Au(Hg)NPs-PEG-COOH.	89
Rys. 22. Widmo UV-Vis dla AuNPs 5 nm.	91
Rys. 23. Widmo UV-Vis dla AuNPs-PEG-COOH.	91
Rys. 24. Widmo UV-Vis dla Au(Hg)NPs.	91
Rys. 25. Widmo UV-Vis dla Au(Hg)NPs-PEG.	91
Rys. 26. Widma IR dla próbek AuNPs (kolor niebieski) oraz AuNPs-PEG (kolor czerwony).	92
Rys. 27. Widmo IR dla próbek Au(Hg)NPs (kolor niebieski) oraz Au(Hg)NPs-PEG (kolor czerwony).	93
Rys. 28. Krzywe rozkładu termicznego dla AuNPs oraz AuNPs-PEG.	94
Rys. 29. Krzywe rozkładu termicznego dla Au(Hg)NPs oraz Au(Hg)NPs-PEG.	95

Rys. 30. Zależność aktywności metabolicznej od czasu dla linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanej AuNPs, AuNPs-PEG oraz Au(Hg)NPs-PEG o różnych stężeniach rtęci.	96
Rys. 31. Zależność aktywności metabolicznej od czasu dla linii komórkowej T98G traktowanej AuNPs, AuNPs-PEG oraz koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o różnych stężeniach rtęci.	97
Rys. 32. Zmiana powierzchni sferoidów z linii MDA-MB-231, traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 $\mu\text{g/ml}$ i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.	98
Rys. 33. Obrazy sferoidów linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 $\mu\text{g/ml}$ i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.	99
Rys. 34. Zmiana powierzchni sferoidów z linii T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 $\mu\text{g/ml}$ i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.	100
Rys. 35. Obrazy sferoidów linii komórkowej T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniach rtęci wynoszących 10 i 8 $\mu\text{g/ml}$ i nanocząstkami AuNPs-PEG w porównaniu do kontroli.	100
Rys. 36. Procent populacji komórek MDA-MB-231 traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 oraz 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.	102
Rys. 37. Wykresy reprezentatywne apoptozy dla linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.	102
Rys. 38. Procent populacji komórek T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.	103
Rys. 39. Wykresy reprezentatywne apoptozy dla linii komórkowej T98G traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 oraz 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.	104
Rys. 40. Procent populacji komórek MDA-MB-231 traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy cyklu komórkowego.	105
Rys. 41. Wykresy reprezentatywne cyklu komórkowego dla linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.	106
Rys. 42. Procent populacji komórek T98G traktowanych koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy cyklu komórkowego.	107
Rys. 43. Wykresy reprezentatywne cyklu komórkowego dla linii komórkowej T98G traktowanej koniugatem Au(Hg)NPs-PEG o stężeniu rtęci 8 i 10 $\mu\text{g/ml}$, AuNPs-PEG oraz grupy kontrolnej.	107
Rys. 44. Funkcje zależności grubości tarczy od energii strumienia protonów dla złota oraz aluminium.	110
Rys. 45. Wyznaczone teoretyczne wykresy zależności wydajności napromienienia próbki (TTY) od energii dla produkcji radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$ w wyniku reakcji jądrowych $^{197}\text{Au}(p, n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$	111
Rys. 46. Dopasowanie funkcji do wykresu zależności wydajności od energii dla detektora HPGe.	112
Rys. 47. Widmo HPGe tarczy po 27 minutach od zakończenia bombardowania strumieniem protonów.	113
Rys. 48. Widmo HPGe tarczy 13 dni po produkcji cyklotronowej w wyniku bombardowania strumieniem protonów.	114
Rys. 49. Widmo HPGe dla tarczy po produkcji cyklotronowej w wyniku bombardowania strumieniem protonów oraz rozpuszczeniu w wodzie królewskiej.	115
Rys. 50. Widmo HPGe dla eluatu rtęci po wydzieleniu z tarczy.	116
Rys. 51. Funkcje zależności grubości tarczy od energii strumienia deuterionów dla złota oraz aluminium.	117
Rys. 52. Wyznaczone teoretyczne wykresy zależności wydajności napromienienia próbki (TTY) od energii dla radionuklidów ^{197}Hg oraz $^{197\text{m}}\text{Hg}$	118
Rys. 53. Widmo HPGe rozpuszczonej tarczy po produkcji w wyniku reakcji jądrowej $^{197}\text{Au}(d, 2n)^{197\text{m}/197}\text{Hg}$	119
Rys. 54. Widmo HPGe rozpuszczonej tarczy po 7 h od zakończenia napromienienia strumieniem neutronów.	123
Rys. 55. Widmo HPGe rozpuszczonej tarczy po 246 h od zakończenia napromienienia strumieniem neutronów.	123
Rys. 56. Krzywe reprezentujące zmianę aktywności promieniotwórczej radionuklidów $^{197\text{m}/197}\text{Hg}$ w czasie produkcji metodą $^{196}\text{Hg}(n, \gamma)^{197\text{m}}\text{Hg}$ w reaktorze wysokostrumieniowym.	124

Rys. 57. Radiokoniugat $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$	126
Rys. 58. Aktywność promieniotwórcza związana z AuNPs w zależności od stosowanej masy rtęci oraz czasu reakcji.....	128
Rys. 59. Wpływ dodatku PEG na stabilność połączenia AuNPs z radionuklidami $^{197m/197}Hg$	130
Rys. 60. Aktywność promieniotwórcza izotopu $^{197m/197}Hg$ [%] pozostała we frakcji nanocząstek po inkubacji w roztworach PBS i NaCl.	130
Rys. 61. Rozmieszczenie zaabsorbowanego koniugatu w komórkach linii MDA-MB-231 określone według aktywności promieniotwórczej izotopów $^{197m/197}Hg$	131
Rys. 62. Rozmieszczenie zaabsorbowanego koniugatu w komórkach linii T98G określone według aktywności promieniotwórczej izotopów $^{197m/197}Hg$	132
Rys. 63. Internalizacja radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH$ do jądra komórkowego komórek MDA-MB-231 w czasie, analizowana dla radionuklidów $^{197m/197}Hg$	133
Rys. 64. Internalizacja radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH$ do jądra komórkowego komórek MDA-MB-231 w czasie, analizowana dla radionuklidów $^{197m/197}Hg$	134
Rys. 65. Aktywność metaboliczna komórek linii MDA-MB-231 po traktowaniu roztworem radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 175 MBq/ml, 150 MBq/ml, 125 MBq/ml, 100 MBq/ml, 50 MBq/ml, 25 MBq/ml; 12,5 MBq/ml i 6,25 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w zależności od czasu.	135
Rys. 66. Analiza statystyczna aktywności metabolicznej komórek linii MDA-MB-231 po traktowaniu AuNPs-PEG, $Au(Hg)NPs-PEG$ oraz $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml (A), 100 MBq/ml (B) i 50 MBq/ml (C) w zależności od czasu.....	136
Rys. 67. Aktywność metaboliczna komórek linii T98G po traktowaniu roztworem radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 175 MBq/ml, 150 MBq/ml, 125 MBq/ml, 100 MBq/ml, 50 MBq/ml, 25 MBq/ml; 12,5 MBq/ml i 6,25 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w zależności od czasu.	137
Rys. 68. Analiza statystyczna aktywności metabolicznej komórek linii T98G po traktowaniu AuNPs-PEG, $Au(Hg)NPs-PEG$ oraz $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml (A), 100 MBq/ml (B) i 50 MBq/ml (C) w zależności od czasu.....	138
Rys. 69. Zmiana powierzchni sferoidów z linii MDA-MB-231 traktowanych radiokoniugatem $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w czasie.	139
Rys. 70. Obrazy sferoidów linii komórkowej MDA-MB-231 traktowanych radiokoniugatem $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w wybranych punktach czasowych.	140
Rys. 71. Zmiana powierzchni sferoidów z linii T98G traktowanych radiokoniugatem $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupy kontrolnej w czasie.....	141
Rys. 72. Obrazy sferoidów linii komórkowej T98G traktowanych radiokoniugatem $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG$ o stężeniach promieniotwórczych 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz grupa kontrolna w wybranych punktach czasowych.....	141
Rys. 73. Intensywność dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii MDA-MB-231 w stosunku do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH$ o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h.....	143
Rys. 74. Obrazy dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii MDA-MB-231 w porównaniu do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu $Au(^{197m/197}Hg)NPs-PEG-COOH$ o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml i 100 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h. Jądra komórkowe oznaczono kolorem niebieskim, natomiast dwuniciowe pęknięcia DNA — kolorem czerwonym.	144

Rys. 75. Intensywność dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii T98G w stosunku do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG-COOH o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h.	145
Rys. 76. Obrazy dwuniciowych pęknięć DNA komórek linii T98G w porównaniu do grupy kontrolnej dla radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG-COOH o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml i czasie inkubacji 6, 24 oraz 48 h. Jądra komórkowe oznaczono kolorem niebieskim, natomiast dwuniciowe pęknięcia DNA — kolorem czerwonym.....	145
Rys. 77. Procentowy udział populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.	147
Rys. 78. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii MDA-MB-231 poddanej działaniu radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.....	148
Rys. 79. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych nanocząstkami AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs-PEG oraz radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml a także komórek z grupy kontrolnej, w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.	149
Rys. 80. Procentowy udział populacji komórek linii T98G traktowanych radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.	150
Rys. 81. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii T98G poddanej działaniu radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.....	150
Rys. 82. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii T98G traktowanych nanocząstkami AuNPs-PEG, Au(Hg)NPs-PEG oraz radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach promieniotwórczych radionuklidów rtęci wynoszących odpowiednio 200 MBq/ml, 100 MBq/ml i 50 MBq/ml a także komórek z grupy kontrolnej, w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.....	152
Rys. 83. Procentowy rozkład populacji komórek linii MDA-MB-231 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, w porównaniu do grupy kontrolnej.	154
Rys. 84. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii MDA-MB-231 po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.	154
Rys. 85. Procentowy rozkład populacji komórek linii T98G w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml, w porównaniu do grupy kontrolnej.	156
Rys. 86. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii T98G po 24, 48 i 72 h inkubacji z radiokoniugatem Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG o stężeniach 50 MBq/ml, 100 MBq/ml i 200 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.....	156
Rys. 87. Biodystrybucja radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG (%IA/g) w zależności od czasu w wybranych narządach/tkankach po podaniu dożylnym.	158
Rys. 88. Biodystrybucja radiokoniugatu Au(^{197m/197} Hg)NPs-PEG (%IA/g) w zależności od czasu w wybranych narządach/tkankach po bezpośrednim wstrzyknięciu do guza.....	159
Rys. 89. Wykresy zależności wskaźnika wzrostu guza od czasu oraz rodzaju preparatu podanego myszom w badaniu efektywności terapeutycznej.	160
Rys. 90. Zależność masy ciała od czasu oraz rodzaju preparatu podanego myszom w badaniu efektywności terapeutycznej.	161
Rys. 91. Przeżywalność myszy objętych badaniem skuteczności terapeutycznej w zależności od czasu oraz rodzaju podanego preparatu.....	162

Rys. 92. Radiokoniugat $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$.	163
Rys. 93. Aktywność promieniotwórcza izotopu $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ [%] pozostała we frakcji nanocząstek po inkubacji w roztworach PBS i NaCl.	164
Rys. 94. Aktywność promieniotwórcza izotopu ^{198}Au [%] pozostała we frakcji nanocząstek po inkubacji w roztworach PBS i NaCl.	165
Rys. 95. Rozmieszczenie zaabsorbowanego radiokoniugatu w komórkach linii MDA-MB-231 określone według aktywności promieniotwórczej izotopów ^{198}Au oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$.	166
Rys. 96. Rozmieszczenie zaabsorbowanego radiokoniugatu w komórkach linii T98G określone według aktywności promieniotwórczej izotopu ^{198}Au oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$.	167
Rys. 97. Internalizacja radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ do jądra komórkowego komórek linii MDA-MB-231 w zależności od czasu inkubacji, analizowana dla radionuklidów $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ oraz ^{198}Au .	168
Rys. 98. Internalizacja radiokoniugatu $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG-COOH}$ do jądra komórkowego komórek linii T98G w zależności od czasu inkubacji, analizowana dla radionuklidów $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ oraz ^{198}Au .	169
Rys. 99. Aktywność metaboliczna komórek linii MDA-MB-231 wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ 5 nm o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszących 25, 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszącymi 25, 50 i 100 MBq/ml.	170
Rys. 100. Aktywność metaboliczna komórek linii MDA-MB-231 wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszących 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszącymi 50 i 100 MBq/ml.	171
Rys. 101. Aktywność metaboliczna komórek linii T98G wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ 5 nm o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszących 25, 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszącymi 25, 50 i 100 MBq/ml.	172
Rys. 102. Aktywność metaboliczna komórek linii T98G wraz z analizą statystyczną po 24, 48, 72-godzinnej inkubacji z roztworem nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, radiokoniugatami $\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszących 50 i 100 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ wynoszącymi 50 i 100 MBq/ml.	173
Rys. 103. Obrazy sferoidów komórek linii MDA-MB-231 po 14-dniach inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml, w porównaniu z grupą kontrolną.	174
Rys. 104. Obrazy sferoidów komórek linii MDA-MB-231 po 14-dniach inkubacji z radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml.	175
Rys. 105. Zmiana powierzchni sferoidów komórek linii MDA-MB-231 w czasie po traktowaniu radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml a także w grupie kontrolnej.	175
Rys. 106. Obrazy sferoidów komórek linii T98G po 14-dniach inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml, w porównaniu z grupą kontrolną.	176
Rys. 107. Obrazy sferoidów komórek linii T98G po 14-dniach inkubacji z radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197\text{m}/^{197}}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml.	177

Rys. 108. Zmiana powierzchni sferoidów komórek linii T98G w czasie po traktowaniu radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych ^{198}Au 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ 100 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz $^{198}\text{AuNPs}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml oraz 50 MBq/ml a także w grupie kontrolnej.	177
Rys. 109. Procentowy udział populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.	180
Rys. 110. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii MDA-MB-231 poddanej działaniu nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatów $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.	181
Rys. 111. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii MDA-MB-231 traktowanych nanocząstkami oraz ich koniugatami w różnych stężeniach promieniotwórczych oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu.	182
Rys. 112. Procentowy udział populacji komórek linii T98G traktowanych nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także komórek z grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej.	183
Rys. 113. Reprezentatywne wykresy apoptozy dla komórek linii T98G poddanej działaniu nanocząstek $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatów $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml, a także dla grupy kontrolnej.	184
Rys. 114. Analiza statystyczna procentowego udziału populacji komórek linii T98G traktowanych nanocząstkami oraz ich koniugatami w różnych stężeniach promieniotwórczych oraz grupy kontrolnej w zależności od fazy śmierci komórkowej oraz czasu. (A) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml. (B) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml, radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 100 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 100 MBq/ml. (C) Analiza dla komórek traktowanych $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 50 MBq/ml, radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml oraz radiokoniugatem $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym ^{198}Au wynoszącym 50 MBq/ml oraz stężeniu promieniotwórczym $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszącym 50 MBq/ml.	185
Rys. 115. Procent rozkładu populacji komórek linii MDA-MB-231 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml w porównaniu do grupy kontrolnej.	187
Rys. 116. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii MDA-MB-231 po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami $^{198}\text{AuNPs-PEG}$ o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197}\text{m}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.	188

Rys. 117. Procent rozkładu populacji komórek linii T98G w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami ^{198}Au NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml w porównaniu do grupy kontrolnej.	189
Rys. 118. Reprezentatywne wykresy rozkładu cyklu komórkowego komórek linii T98G po 24, 48 i 72 h inkubacji z nanocząstkami ^{198}Au NPs-PEG o stężeniu promieniotwórczym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz radiokoniugatami $^{198}\text{Au}(^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg})\text{NPs-PEG}$ o stężeniach promieniotwórczych $^{197\text{m}}/^{197}\text{Hg}$ wynoszących 50 MBq/ml i 100 MBq/ml oraz stężeniu ^{198}Au wynoszącym 25 MBq/ml i 50 MBq/ml oraz dla grupy kontrolnej.	190