

Rozprawa doktorska poświęcona jest opracowaniu i zastosowaniu trójwymiarowego (sferoidy) modelu hodowli komórkowych do przedklinicznych badań *in vitro* w terapii borowo-neutronowej (BNCT). W badaniu zaproponowano sferoidy, czyli trójwymiarowe (3D) struktury komórkowe uzyskiwane *in vitro*, ponieważ w porównaniu do standardowych hodowli komórkowych umożliwiają uzyskanie warunków przypominających warunki fizjologiczne panujące w guzie.

Głównym celem pracy było zbadanie wpływu promieniowania neutronowego na komórki czerniaka w obecności izotopu boru ^{10}B w modelach komórkowych 3D i 2D. Te badania przeprowadzono także na modelu 2D uzyskanym z hodowli normalnych komórek skóry – melanocytów (HEMA-LP), jako kontroli. W początkowej fazie badań opracowano model 3D wykorzystujący dwie linie komórkowe czerniaka ludzkiego, pierwotną (FM55p) i przerzutową (WM266-4). Otrzymane sferoidy oceniano wykorzystując parametry kształtu i rozmiaru, a także żywotność komórek w sferoidzie. Zastosowano techniki obrazowania fluorescencyjnego (mikroskopia konfokalna) i tomografii komputerowej (mikro-CT). Następnie wykonano badania wychwytu ^{10}B przez komórki dla różnych czasów inkubacji. Stężenie ^{10}B w komórkach mierzono za pomocą spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS). Sferoidy i hodowle 2D poddano ekspozycji na promieniowanie neutronowe w obecności (po 4h inkubacji z BPA) oraz braku boru. Eksperymenty te zostały wykonane w reaktorze TRIGA Mark II w laboratorium L.E.N.A. w Pawi, we Włoszech, gdzie komórki zostały napromieniowane dawką 2Gy oraz 6Gy (tylko sferoidy). Efekt biologiczny po napromienianiu oceniano poprzez analizę wielkości i kształtu sferoid oraz wykonanie badań żywotności (barwienie błękitem trypanu), ocenę uszkodzeń DNA (test kometowy) i ocenę zdolności komórek do podziału (ekspresja białka Ki67).

Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowaną reakcję linii czerniaka ludzkiego na promieniowanie neutronowe. Linia przerzutowa (WM266-4) w hodowli 2D nie wykazuje uszkodzeń DNA po BNCT, podczas gdy w hodowli 3D, podobnie jak w pozostałych liniach komórkowych (FM55p, HEMA-LP) poziom powstałych uszkodzeń DNA jest na znacząco wyższym poziomie niż dla komórek napromienionych tylko neutronami. Dodatkowo wyniki testu kometowego wskazują, że sferoidy są bardziej podatne na BNCT niż hodowle 2D. Co więcej, prawidłowa linia komórkowa (HEMA-LP) wykazuje niższą wrażliwość na BNCT niż pierwotna linia czerniaka FM55p. W przypadku sferoid z ^{10}BPA zaobserwowano efekt zależny od dawki: dawka 6 Gy promieniowania neutronowego powodowała większe uszkodzenia DNA i silniejsze hamowanie wzrostu komórek w obu liniach czerniaka.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają przydatność wykorzystania sferoid jako odpowiedniego modelu komórkowego czerniaka w doświadczeniach *in vitro* z zakresu BNCT. Przeprowadzone badania wskazują na konieczność dostosowania sposobu leczenia pacjenta poprzez dobór stężenia i rodzaju nośnika boru [^{10}B], jego metabolizmu oraz dawki promieniowania.