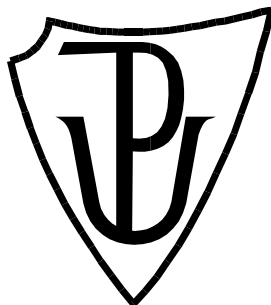


Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Cílená funkcionalizace transportních nosičů na bázi grafen oxidu cytokininovými deriváty a jejich biologická aktivita**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Pavlína Balatková</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Ludmila Žárská, Ph.D.
Rok:	2023

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení	Bc. Pavlína Balatková
Název práce	Cílená funkcionalizace transportních nosičů na bázi grafen oxidu cytokininovými deriváty a jejich biologická aktivita
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra chemické biologie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Diplomová práce se zabývala syntézou cytokininového derivátu (benzylaminopurin mesylátu), přípravou grafen oxidových nanočástic a funkcionalizací. První polovina teoretické části byla zaměřena na cytokininy, jejich špatnou rozpustnost ve vodních roztocích a na účinky v živočišných buňkách. Druhá část byla věnována grafen oxidu a jeho povrchové úpravě polyethylen glykolem. V praktické části byla popsána syntéza cytokininového derivátu, úprava velikosti a povrchu grafen oxidu s následnou cílenou funkcionalizací a charakterizací několika metodami. V neposlední řadě byl zhodnocen vliv na migraci fibroblastů u funkcionalizovaného PEGylovaného grafen oxidu s cytokininovými deriváty.
Klíčová slova	Cytokininy, biologická aktivita, kožní buňky, nanotechnologie, grafen oxid, polymery
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

First name and surname	Bc. Pavlína Balatková
Title of thesis	Targeted functionalization of graphene oxide-based transport carriers with cytokinin derivatives and their biological activity
Type of thesis	Master
Department	Department of Chemical Biology
Supervisor	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>The master thesis dealt with the synthesis of a cytokinin derivative (benzylaminopurine mesylate), the preparation of graphene oxide nanoparticles and their functionalization. The first half of the theoretical part was focused on cytokinins, their poor solubility in water solutions and their effects in animal cells. The second part was focused on graphene oxide and its surface treatment with polyethylene glycol. In the practical part were described the synthesis of a cytokinin derivative, modification of the size and surface of graphene oxide, followed by targeted functionalization and characterization by several methods. Lastly was evaluated the effect on fibroblast migration of functionalized PEGylated graphene oxide with cytokinin derivatives.</p>
Keywords	Cytokinins, biological activity, skin cells, nanotechnology, graphene oxide, polymers
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

.....

Podpis

V první řadě bych chtěla moc poděkovat mé vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Lucii Plíhalové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Ludmile Žárské, Ph.D., dále doc. RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, motivaci, a také za čas a cenné připomínky při vypracování práce. Mgr. Dardanu Klosovi za pomoc při syntéze, měření a zpracování výsledných dat. V neposlední řadě Mgr. Haně Omámikové, Mgr. Radimu Simerskému, Ph.D. a Eirini Ioannou, Ph.D. za analýzy, a rovněž Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. a jejím kolegům za biologické testování. Ráda bych také poděkovala za finanční podporu kvalifikační práce za pomocí grantu IGA\_PrF\_2023\_016.

## Obsah

<b>Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>2 Teoretická část .....</b>	<b>12</b>
2.1 Cytokininy.....	12
2.1.1 Problematická rozpustnost cytokininů.....	14
2.1.2 Pozitivní účinky cytokininů na živočišné buňky .....	15
2.2 Využití nanotechnologií v cíleném podávání léčiv .....	19
2.2.1 Povrch nanočástic .....	20
2.2.1.1 Funkční skupiny .....	20
2.2.1.2 Polymerace .....	21
2.2.1.3 Povrchový náboj.....	21
2.2.2 Použití nanočástic pro dermatologická ošetření .....	22
2.2.3 Grafen oxid .....	23
<b>3 Experimentální část .....</b>	<b>27</b>
3.1 Použité chemikálie .....	27
3.2 Metody a přístrojová technika.....	27
3.3 Protonizace cytokininových derivátů.....	29
3.3.1 Příprava 6-benzylaminopurinia methansulfonátu (BAP mesylát).....	29
3.4 Optimalizace velikosti nanočástic GO a určení počtu nanočástic .....	30
3.5 PEGylace grafen oxidu .....	30
3.6 Funkcionalizace nanočástic cytokininovými deriváty .....	31
3.7 Zjištění navázané koncentrace cytokininovými deriváty .....	31
3.8 Test stability funkcionalizovaného GO-PEG cytokininovými deriváty .....	31
3.9 Biologické testování.....	31
<b>4 Výsledky.....</b>	<b>33</b>
4.1 Charakterizace připraveného cytokininu.....	33
4.1.1 Prášková rentgenová difrakce .....	33
4.2 Charakterizace grafen oxidu a funkcionalizovaného materiálu .....	34
4.2.1 Mikroskopie atomárních sil .....	34
4.2.2 Skenovací elektronový mikroskop.....	38
4.2.3 Infračervená spektroskopie .....	39
4.2.4 Ramanova mikroskopie .....	44

4.2.5	Zeta potenciál.....	47
4.3	Funkcionalizovaná koncentrace CK na GO-PEG a jejich dlouhodobá stabilita...48	48
4.4	Biologické testování.....	52
<b>5</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>60</b>

## **Cíle práce**

- 1) Zpracování literární rešerše na téma cytokininy a jejich vliv na živočišné buňky, nanotechnologie v cíleném podávání léčiv, grafen oxid a jeho vlastnosti, a modifikace povrchu polymerizací.
- 2) Syntéza protonizovaného cytokininového derivátu a jeho charakterizace.
- 3) Úprava velikosti a povrchu nanomateriálu PEGylací pro jeho následnou funkcionalizaci a jeho charakterizace.
- 4) Porovnání vlivu PEGylace na koncentraci navázaných cytokininů na grafen oxid.
- 5) Biologická aktivita funkcionalizovaného materiálu a jeho zhodnocení.



## Seznam použitých zkratek

AFM	Mikroskop atomárních sil
AQP	Aquaporin
BAP	6-benzylaminopurin
BAPm	Benzylaminopurin mesylát, 6-benzylaminopurinium methansulfonát
BAPm GO-PEG	Benzylaminopurin mesylát navázaný na PEGylovaný grafen oxid
CK	Cytokininy
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration)
GO	Grafen oxid
GO-PEG	PEGylovaný grafen oxid
HPLC/UV-VIS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography) s detektorem v UV-VIS oblasti
K	Kinetin, 6-furfurylaminopurin
Km	Kinetin mesylát, 6-furfurylaminopurinium methansulfonát
Km GO-PEG	Kinetin mesylát navázaný na PEGylovaný grafen oxid
MeO	Methoxyestradiol
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NPs	Nanočástice (nanoparticles)
PBS	Fosfátový pufr
PEG	Polyethylenglykol
pT	<i>para</i> -topolin, 6-(4-hydroxybenzylamino)-9H-purin
pTm	<i>para</i> -topolin mesylát, 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium methansulfonát
pTm GO-PEG	<i>para</i> -topolin mesylát navázaný na PEGylovaný grafen oxid

ROS	Reaktivní formy kyslíku
RPM	Počet otáček za minutu
RVO	Rotační vakuová odparka
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
tZ	<i>Trans</i> -zeatin, (E)-2-methyl-4-(1H-purin-6-ylamino)-2-buten-1-ol
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor
XPRD	Rentgenová prášková difrakce (X-ray powder diffraction)
Z	Zeatin, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin

# 1 Úvod

Využití fytohormonů, jako jsou cytokininy (CK), je v posledních letech předmětem zájmu v péči o lidskou kůži. Cytokininy jsou sice rostlinné hormony, ale bylo u nich prokázáno, že mají velmi dobré účinky i na buňky lidské pokožky – na fibroblasty a keratinocyty, a to hlavně v oddalování stárnutí pokožky způsobené zejména UV zářením. Nicméně má se za to, že by mohly být také přínosné v procesu hojení ran (Rattan a Clark, 1994; Berge, Kristensen a Rattan, 2006; Ji *et al.*, 2010). V souvislosti s větším plánovaným použitím CK na ošetření kůže by mohla, i při jejich nízké aktivní koncentraci, způsobovat problém jejich špatná rozpustnost ve vodě. V současnosti se musí nejprve rozpustit v rozpouštědlech, například dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo alkoholu, a pak teprve ředit do vody na potřebnou koncentraci. Zároveň DMSO může ve vyšších koncentracích buňky poškozovat, a proto se jeví jako žádoucí tento mezikrok potlačit zvýšením rozpustnosti nebo dostupnosti vnesených CK. Ke zlepšení rozpustnosti ve vodě slouží jejich cílená protonizace, která mnohonásobně zvyšuje jejich rozpustnost (Singh, Mckenzie a Ma, 2017; Klos *et al.*, 2022). Aby se zvýšila CK účinnost, stabilita a biodostupnost, byly navrženy nanonosiče na bázi grafen oxidu (GO), které díky svým vlastnostem, jako je malá velikost a zároveň velký povrch, umožňují dopravit vyšší množství konkrétní látky do svého cíle bez nežádoucích účinků a degradace (Ventola, 2017). Ke zvýšení biokompatibility GO nanočástic lze jejich povrch dále upravovat biopolymery (Jokerst *et al.*, 2011). V této diplomové práci byly resyntetizovány dosud připravené vhodné protonizované CK, některé již připravené také v bakalářské práci. Tyto tři protonizované CK byly navázány na modifikovaný nanomateriál GO a v poslední řadě otestovány na buňkách a zhodnocen jejich vliv na migraci fibroblastů.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Cytokininy

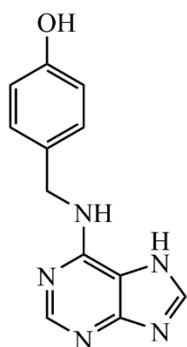
Výzkum CK začal již v polovině 20. století, kdy byl z autoklávované DNA izolován 6-furfurylaminopurin (kinetin; K), který byl popsán jako faktor ovlivňující dělení rostlinných buněk (Miller *et al.*, 1955). Při dalším hledání přirozeně se vyskytujících CK v rostlinách byl objeven například 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin (zeatin; Z) z nezralých kukuřičných zrn (Letham, 1963). Tyto objevy daly podnět k tomu, aby CK byly definovány jako skupina malých molekul se signální funkcí, které jsou nepostradatelnou součástí rostlinného vývoje a růstu. Od té doby jsou struktury, metabolismus, funkce a biosyntéza skupiny intenzivně studovány (Fathy *et al.*, 2022).

Jejich základní funkcí je řízení diferenciací a buněčného dělení, organogeneze, ovlivňování biotických a abiotických stresů, řízení a regulace senescence a mnoha dalších vývojových a fyziologických dějů v rostlině. Hrají také roli při regulaci rovnováhy mezi vegetativním růstem a reprodukčním vývojem a při navození systémově získané rezistence, přirozeného obranného mechanismu rostliny proti patogenům (Kieber a Schaller, 2014; Akhtar *et al.*, 2020). Zkoumá se přínos CK pro udržitelně řízené zemědělství, ale rovněž jsou v současnosti používány v celé řadě aplikačních rostlinných biotechnologií, například v rostlinných tkáňových kulturách (Plíhalová *et al.*, 2015). Mohou být využity ke zlepšení růstu rostlin, zvýšení výnosů plodin a odolnosti vůči stresu a chorobám (Fathy *et al.*, 2022). Jejich deriváty byly zkoumány jako zdroje bioaktivních sloučenin pro aplikaci v lékařství a farmacii. Konkrétně se pozoruje použití jako látek proti stárnutí a pro podporu hojení ran, protože aktivují proliferaci buněk (Ji *et al.*, 2010).

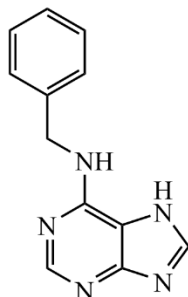
Strukturně se jedná o deriváty adeninu mající buď isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec připojený k atomu N6. Existují hlavní dva strukturní typy CK: purinového typu, jako je 6-furfurylaminopurin (kinetin, K), 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin (zeatin, Z) a 6-benzylaminopurin (BAP), a fenylmočovinného typu, například difenylurea (DPU) a thidiazuron (TDZ), pyridylmočovina (CPPU) (Obr. 1). Mohou existovat jako volné báze, ribosidy, ribotidy nebo konjugované s cukry. Rostlinné CK jsou syntetizovány v celé rostlině, kde interagují s jinými rostlinnými hormony, kupříkladu auxiny, za účelem koordinace růstu a vývoje (Mok a Mok, 2001; Kieber a Schaller, 2014).

## Purinový typ

### Aromatické

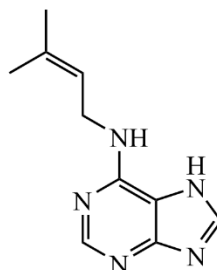


*para*-topolin (pT)

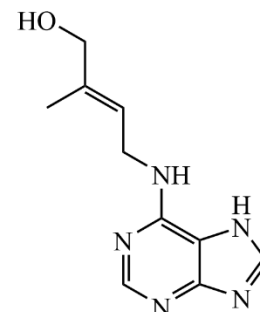


6-benzylaminopurin (BAP)

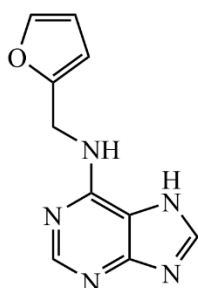
### Isoprenoidní



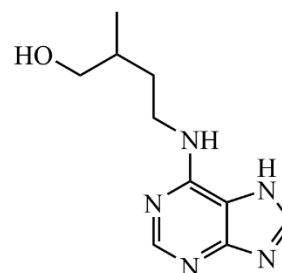
isopentenyladenin (iP)



*trans*-zeatin (tZ)

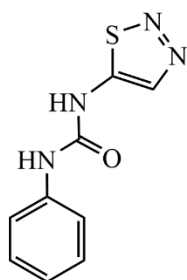


kinetin (K)

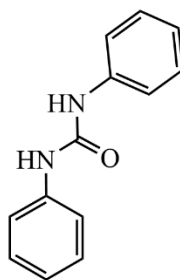


dihydrozeatin (DHZ)

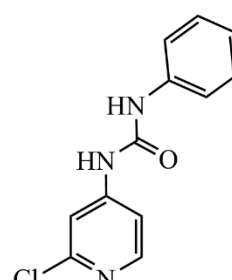
## Fenylmočoviny typ



thidiazuron (TDZ)



difenylmočovina (DPU)



pyridylmočovina (CPPU)

Obr. 1: Rozdělení CK a jejich strukturní vzorce

### 2.1.1 Problematická rozpustnost cytokininů

Účinnost aromatických CK je omezena jejich poměrně špatnou rozpustností ve vodě, a to především ve směsi s anorganickými solemi. Ačkoliv rostliny využívají tyto látky jako signální molekuly a malá rozpustnost jim nečiní velké potíže, problémy nastávají při přenosu těchto látek do biotechnologií nebo pro aplikaci v dermatologii. V současné době se tento problém řeší tak, že se CK nejprve rozpouštějí v jiných rozpouštědlech, nejčastěji v DMSO, dále ethanolu, methanolu, hydroxidu sodném, a poté se ředí vodou na požadovanou koncentraci (Klos *et al.*, 2022). Postup ale není moc vhodný pro pozdější *in vivo* a *in vitro* testování. Dimethylsulfoxid je univerzální rozpouštědlo široce používané při přípravě vzorků díky své schopnosti rozpouštět mnoho sloučenin. Bylo však zjištěno, že koncentrace DMSO vyšší než 1 % jsou toxické pro většinu typů savčích buněk, které se používají pro kultivační testy *in vitro*. Toxická koncentrace závisí na typu buňky, například lymfocyty tolerují až 10% koncentraci DMSO, zatímco některé typy buněk jsou ovlivněny již 0,5% koncentracemi. Bylo prokázáno, že koncentrace DMSO vyšší než 0,1 % snižují buněčnou proliferaci kožních fibroblastů a mohou být spojeny se zastavením buněčného cyklu, buněčnou diferenciací a buněčnou smrtí (Singh, Mckenzie a Ma, 2017). Vzhledem k tomu, že se CK nejprve rozpouští a poté ředí ve vodě, jejich účinná koncentrace se snižuje. Na atomech dusíku v CK jsou přítomny volné elektronové páry, které poskytují vhodné místo pro vznik vazeb, což by vyřešilo problém s rozpustností. Díky těmto volným elektronovým párům bylo možné stávající elektroneutrální volné báze protonizovat a byly vytvořeny mesylátové soli pomocí kyseliny methansulfonové, které vykazovaly mnohonásobně vyšší rozpustnost ve vodě než jejich výchozí látky. Látka 6-furfurylaminopurinium methansulfonát (kinetin mesylát; Km) byla téměř 700x rozpustnější, 6-benzylaminopurinium methansulfonát (BAP mesylát; BAPm) 1000x rozpustnější a 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium methansulfonát (p-topolin mesylát; pTm) až 60 000x rozpustnější než jejich původní látky (Klos *et al.*, 2022).

### 2.1.2 Pozitivní účinky cytokininů na živočišné buňky

Vzhledem k jejich významné úloze při regulaci růstu a diferenciaci rostlinných buněk by tyto sloučeniny mohly mít účinky na biochemické procesy živočišných i lidských buněk. V posledních letech byly prozkoumány jejich protinádorové (Voller *et al.*, 2010), antivirové (Tararov *et al.*, 2014) a neurodegenerativní účinky (Gonzalez *et al.*, 2021). Cytokininy mají kromě toho příznivý vliv na lidské kožní buňky kultivované *in vitro*, zejména na keratinocyty (Berge, Kristensen a Rattan, 2006) a fibroblasty (Rattan a Clark, 1994).

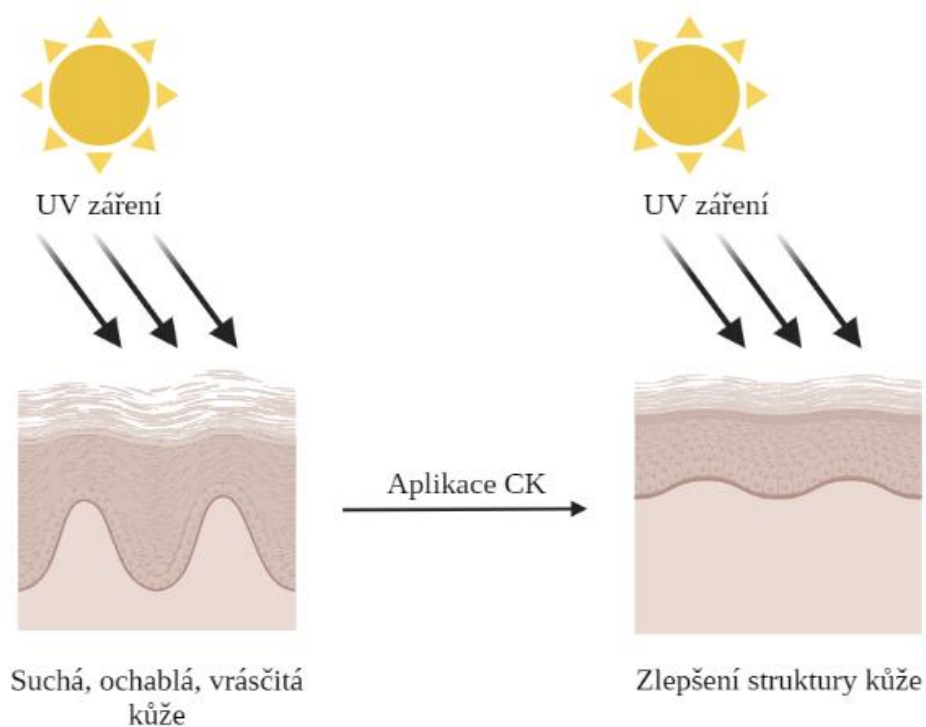
Bylo objeveno, že CK a jejich ribosidy mají cytotoxický efekt vůči lidským rakovinovým buňkám způsobujícím leukémii (Doležal *et al.*, 2007). Zatímco látka 6-(2-hydroxybenzyl)aminopurin ribosid (*ortho*-topolinový ribosid; oTR) měla vysokou aktivitu proti některým lidským nádorovým buněčným liniím, její odpovídající volné báze byly neaktivní. To se liší od působení CK v rostlinných buňkách, kde toxicita CK bází a jejich odpovídajících ribosidů je srovnatelná. Jelikož na rozdíl od lidských buněk, rostlinné buňky dokážou obě formy CK účinně přeměnit na ribosid-50-monofosfáty. To naznačuje, že mohou existovat různé mechanismy působení sloučenin podobných CK na rostlinné a živočišné (lidské) buňky (Voller *et al.*, 2010).

Neuroprotektivní účinky CK a jejich ribosidů byly sice testovány zatím jen na potkanech, ale v budoucnu by potenciálně mohly být využity při léčbě onemocnění centrálního nervového systému, včetně Alzheimerovy choroby. Bylo zjištěno, že *trans*-zeatin inhibuje acetylcholinesterázu potkanů a pomáhá udržovat životaschopnost buněk snížením produkce reaktivních druhů kyslíku (ROS). Na druhé straně kinetin chrání astrocyty a mozek potkanů před glykoxidačním poškozením a podporuje antioxidační mechanismus obranného systému. Má také terapeutickou aktivitu proti Parkinsonově chorobě spolu s nukleotidem aktivujícím kinázy v mozkových buňkách (Voller *et al.*, 2017; Gonzalez *et al.*, 2021).

Bylo zjištěno, že CK poskytují výhody, jako například ochranu před poškozením způsobeným UV zářením (Obr. 2), podporu hojení ran (Obr. 3) a indukci aquaporinů (AQP) (Ji *et al.*, 2010; Hönig *et al.*, 2018). Některé CK mají antioxidační vlastnosti a díky tomu stimulují aktivitu antioxidačních mechanismů. Oxidační poškození je totiž hlavním aktérem přispívajícím ke stárnutí pokožky (Voller *et al.*, 2017). Kůže, která je vystavena vlivům prostředí, hlavně UV záření, má vysoce účinný antioxidační systém, který působí proti oxidativnímu stresu. Ultrafialové paprsky způsobují stárnutí pokožky tím, že ji dehydratují, a to má za následek ztrátu AQP, který funguje jako membránový

transportér vody. Předpokládá se, že snížení působnosti tohoto systému přispívá ke stárnutí pokožky (Bolund, Jensen a Bjerring, 1991; Jabłońska-Trypuć, Matejczyk a Czerpak, 2016). Studie *in vitro* ukázaly, že jak *trans*-zeatin, tak kinetin mají podobný efekt na stárnutí fibroblastů (Rattan a Clark, 1994; Rattan a Sodagam, 2005), čímž oddalují nástup několika buněčných a biochemických znaků spojených s buněčným stárnutím, například buněčná expanze, akumulace lipofuscinu a hyperpolymerizace aktinových filament (Oshchepkov *et al.*, 2020). Kinetin funguje jako antioxidant prostřednictvím různých mechanismů. Může vychytávat ROS přímo tvorbou komplexů s ionty mědi, které vykazují aktivitu podobnou aktivitě superoxiddismutázy. Alternativně mohou radikály abstrahovat vodík z  $\alpha$ -uhlíku aminové vazby nebo z furanového kruhu, který je známý svými vlastnostmi vychytávání ROS. Kromě své přímé schopnosti vychytávání ROS může kinetin rovněž chránit buňky indukcí produkce antioxidantních enzymů, jako je superoxiddismutáza, kataláza a glutathionperoxidáza (Jabłońska-Trypuć, Matejczyk a Czerpak, 2016; Kadlecová *et al.*, 2019). Studie využívající lidské keratinocyty v kultuře potvrdila ochranný účinek kinetinu proti oxidativnímu stresu, ale pouze při nízkých koncentracích hormonů. Vysoké koncentrace hormonů mohou vést k opačnému účinku, tedy ke zvýšení oxidačního stresu a způsobit buněčnou apoptózu (Obr. 4). Různé buněčné linie tak vykazují různou citlivost na CK, jak dokazují rozdíly v aktivních koncentracích uváděných různými výzkumnými skupinami (Vostálová *et al.*, 2023).

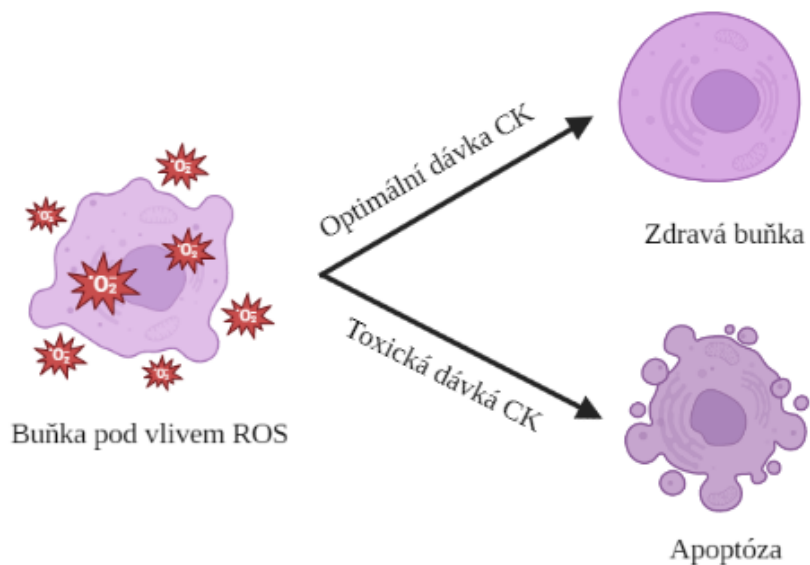




Obr. 2: Vliv dlouhodobého účinků UV záření – působením UV paprsků se inhibují AQP v keratinocytech a vyvolávají změny na kůži (suchá, ochablá a vrásčitá kůže); po aplikaci CK je působnost paprsků UV záření eliminována, zvýší se exprese AQP, čímž selepší struktura a hydratace pokožky (Ji et al., 2010)



Obr. 3: Vliv CK na hojení kůže – po aplikaci CK na poškozenou kůži nedochází ke ztrátě AQP a vzniklá rána je rychleji zahojena (Ji et al., 2010)



*Obr. 4: Buňka pod vlivem oxidativního stresu a následně ošetřena CK – optimální netoxickou dávkou, která redukovala negativní vliv ROS a tím podporovala produkci antioxidantních mechanismů; toxickou dávkou podporující oxidativní stres až buněčnou apoptózu (Vostálová et al., 2023)*

## 2.2 Využití nanotechnologií v cíleném podávání léčiv

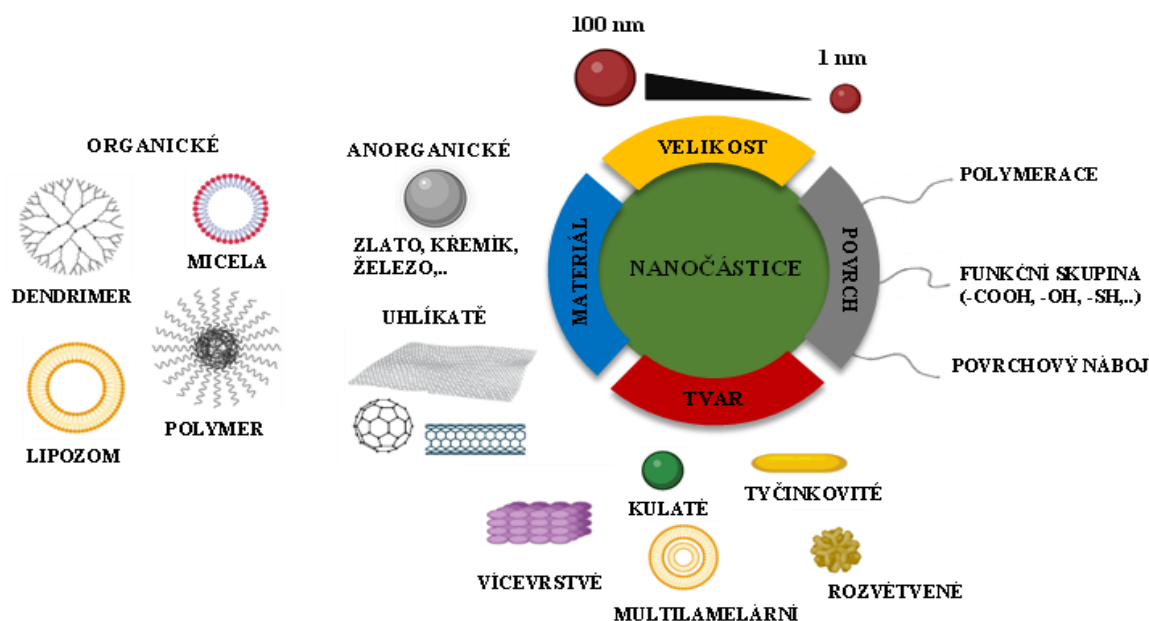
Konvenční systémy podávání léčivých přípravků představují řadu kritických problémů spojených s citlivostí, toxicitou, špatnou specificitou a lékovou rezistencí, které snižují terapeutický efekt. Nanomateriálové částice umožňují lepší transport léčivých látek do cílové tkáně s minimálními vedlejšími účinky (Ventola, 2017).

Nanotechnologie je obor využívající materiály v měřítku řádově nanometrů (nejčastěji 1 – 100 nm). Nanomateriály mají výborné optické, elektrické i magnetické vlastnosti, a právě tím způsobily revoluci v nových materiálech, které by se daly použít v medicíně. Konkrétně nanomedicína vykazuje významný potenciál v oblasti diagnostiky, zobrazovacích technik, tkáňových konstruktů a farmaceutické léčbě několika onemocnění, včetně rakoviny či neurologických onemocnění (Boulaiz *et al.*, 2011). Látky navázané na nanočástice mohou zvýšit akumulaci medikamentu v nemocné tkáni a umožnit snížení dávek léčiva, což může vést k eliminaci vedlejších účinků. První nanoléčivo schválené Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration; FDA) s nižší toxicitou ve srovnání s konvenčními formulacemi, byl přípravek Doxil (doxorubicin hydrochlorid navázaný na liposom), který byl schválen již v roce 1995 pro léčbu Kaposiho sarkomu a dodnes se používá pro různé indikace (Ventola, 2017).

Velikost je jednou z předností nanočástic, jelikož ovlivňuje jejich toxicitu, distribuci a schopnost cílení. Tím, že mají malé rozměry a díky tomu i zvýšenou mobilitu, jsou přístupnější buňkám. Kromě malé velikosti ovlivňuje příjem a toxicitu pro buňky jejich povrchový náboj, výskyt funkčních skupin a navázání polymeru. Nanočástice jsou schopny překročit hematoencefalickou bariéru, čímž zajišťují dodávání léků pro obtížně léčitelná onemocnění. Malé částice mají větší povrchovou plochu, která umožňuje rychlejší uvolňování léčiva. Alternativně větší částice umožňují, aby přidané léčivo bylo zapouzdřeno do částice díky velkým jádrům, což vede k pomalému uvolňování léčiva. Menší částice se snadno agregují během přípravy, skladování a přepravy, ale větší částice vedou k rychlejší degradaci. Nejen velikost, ale také tvar, pozitivně nebo negativně ovlivňuje toxicitu, biodistribuci, rychlost a penetraci do buňky, a tím může způsobit porušení buněčné membrány (McNeil, 2005; Singh a Lillard, 2009; Kladko *et al.*, 2021).

Moderní nanočástice rozdělujeme na organické (micely, lipozomy, dendrimery, polymery) a anorganické (zlaté, křemičité, uhlíkaté), přičemž je můžeme dále dělit na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností dle rozměrů (malé nebo velké velikosti), tvarů (koule, tyčinkové, rozvětvené, multilamelární nebo vícevrstvé struktury) či

povrchových vlastností (funkční skupiny, povrchový náboj, polymerace) (Obr. 5) (Sanità, Carrese a Lamberti, 2020).



Obr. 5: Rozdělení nanočástic dle jejich fyzikálně chemických vlastností

## 2.2.1 Povrch nanočástic

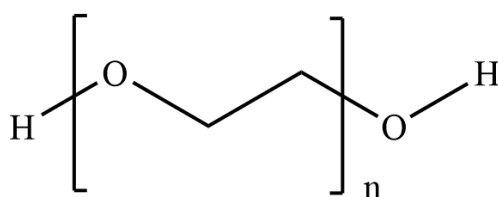
### 2.2.1.1 Funkční skupiny

Povrchová úprava nanočástic zahrnuje proces, jehož cílem je zlepšit a/nebo přidat vlastnosti užitečné pro použití těchto částic v lékařství. Různé typy nanomateriálů mají charakteristické funkční skupiny vystavené na svém povrchu. Modifikace povrchové chemie je zásadním krokem, který napomáhá snižovat toxicitu, zvyšovat stabilitu a kontrolovat buněčnou internalizaci, a v konečném důsledku ovlivňuje jejich biologické chování. Funkcionalizace povrchu často zahrnuje zavedení funkčních skupin, jako jsou  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  a  $-\text{NH}_2$ . Zvýšení počtu  $-\text{NH}_2$  skupin vede k vyššímu kladnému povrchovému náboji, čímž se zvyšuje příjem nanočástic do buněk. Podobně je tomu tak v případě  $-\text{COOH}$  skupiny, která zvyšuje negativní náboj a také navyšuje absorpci. Obecně je první fáze povrchové modifikace založena na využití tzv. crosslinkerů, s cílem přidat organickou funkční skupinu ( $\text{R}-\text{NH}_2$ ,  $\text{R}-\text{COOH}$  atd.) užitečnou pro vazbu biologických molekul. Druhou fází je poté samotné připojení léčivé látky (Foroozandeh a Aziz, 2018; Sanità, Carrese a Lamberti, 2020).

Prostřednictvím oxidace je možné generovat  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  a  $-\text{C}=\text{O}$  na jejich povrchu, a popřípadě pomocí cykloadice generovat/vytvářet různé typy funkčních skupin. Pro křemičité nanočástice jsou nejpoužívanějšími crosslinkery aminosilany, které zavádějí aminoskupinu na povrch nanočástic. Ušlechtilé kovy, jako je zlato, mohou být upravovány použitím síťovacích činidel se skupinami  $-\text{SH}$  nebo  $-\text{NH}_2$  schopnými reagovat s kovem a vytvořit kovalentní vazbu. Tyto bifunkční linkery, například thiokarboxylové kyseliny, mají na druhém konci funkční skupiny k použití pro vazbu ligandů (Sanità, Carrese a Lamberti, 2020).

### 2.2.1.2 Polymerace

Látky se špatnou rozpustností ve vodě jsou ve většině případů vyloučeny z krve dříve, než se dostanou do cílové tkáně. Monocyty a makrofágy snadněji vyhodnotí, že se jedná o cizí materiály. Fagocytující buňky rozpoznávají hydrofobní materiály jako cizorodé a vylučují je z krve, přičemž jsou vychytávány v játrech nebo slezině. Ukázalo se, že potažením nanočástic hydrofilním polyethylenglykolem (PEG) se zvyšuje rozpustnost a stabilita nanočástic (Obr. 6). S ohledem na to, že je PEG nenabitý, nenarušuje funkci nabitých molekul. Oponizace hydrofobních molekul může snížit jejich schopnost dostat se do cílové tkáně a spustit zánětlivou reakci po sekreci cytokinů z fagocytárních buněk. PEGylované nanočástice maskují svou hydrofobnost, a proto mohou prodloužit cirkulaci nanočástic v krvi (Jokerst *et al.*, 2011; Albanese, Tang a Chan, 2012).



Obr. 6: Struktura polyethylen glykolu

### 2.2.1.3 Povrchový náboj

Kromě velikosti, tvaru a hustoty ligandu je osud nanočástice řízen také povrchovým nábojem. Mírou povrchového náboje nanočástic v iontovém roztoku je zeta potenciál. Jedná se o potenciální rozdíl mezi mobilním médiem a stacionární vrstvou média připojenou k částici. Zeta potenciál je ovlivněn různými faktory, včetně pH média, iontové síly a teploty. Nanočástice se zeta potenciálem mezi  $-10$  a  $+10$  mV jsou považovány za neutrální, zatímco

ty s vyšším než +30 mV nebo menším než -30 mV jsou brány za silně kationické nebo aniontové. Povrchový náboj nanočástic ovlivňuje jejich schopnost být přijímán buňkami a rovněž ovlivňuje cestu, kterou do buněk vstupují. Povrchy s kladným nábojem na částicích jsou často více cytotoxické než aniontové a neutrální. Proto jsou snadněji a rychleji přijímány buněčnou membránou a nefagocytujícími buňkami. Rozdílné preference fagocytujících a nefagocytujících buněk pro kationtové a aniontové nanočástice jsou důležité pro účinnost a selektivitu nanočástic. Tím, že je buněčná membrána mírně záporná, kladný povrchový náboj sice napomáhá k lepší adhezii k povrchu buňky, ale také může způsobit narušení integrity plazmatické membrány, poškození mitochondrií a lysosomů. Tento efekt kladně nabitých povrchů může být prospěšný pro přenos léčiv. Pro neutrální nanočástice obecně platí, že mají nižší interakci s buněčnou membránou než záporně či kladně nabitě nanočástice stejné velikosti v důsledku nižších elektrostatických interakcí. Polymery, například PEG, ovlivňují povrchový náboj a tím snižují úlohu fagocytů odstranit cizorodé nanočástice. Účinnost PEGylovaných nanočástic je spojena s hustotou PEGu na jejich povrchu (Clogston a Patri, 2011; Fröhlich, 2012; Oh a Park, 2014).

### 2.2.2 Použití nanočástic pro dermatologická ošetření

Kůže, která je primárním rozhraním mezi lidským tělem a vnějším prostředím, je největším orgánem chránícím lidské tělo před různými vlivy. Vrchní vrstva kůže známá jako *stratum corneum* představuje konečný produkt diferenciačního procesu, který byl původně zahájen v bazální vrstvě *epidermis* tvorbou keratinocytů mitotickým dělením. Skládá se z mrtvých buněk rozptýlených v matrici bohaté na lipidy. Před systémovým ošetřením se upřednostňuje topická a transdermální aplikace, jelikož účinné látky jsou v přímém kontaktu s kožními buňkami. Po aplikaci látka difunduje do hlubších vrstev kůže, jako je *epidermis* a *dermis*, a jakmile dosáhne dermální vrstvy, je absorbována do systémové cirkulace prostřednictvím dermální mikrocirkulace (Brown *et al.*, 2008; Alkilani, McCrudden a Donnelly, 2015). Ve srovnání s jinými způsoby podávání léků má transdermální aplikace několik výhod. Například může být podáván na velkou plochu pokožky a je snadno přístupný. Navíc to vede k jednodušším farmakokinetickým profilům léčiv, což snižuje riziko toxických vedlejších účinků. Byly vyvinuty nanočásticové nosiče, například polymerní, anorganické, lipidové a uhlíkové, které nabízejí cílené dodávání léčiv, prodloužené uvolňování a nízkou toxicitu v závislosti na jejich velikosti, náboji a povrchové chemii (Gupta *et al.*, 2013; Zeb *et al.*, 2019). Některé materiály, například nanomateriály na bázi uhlíku, silně absorbují světlo při

zachování své stability, které z nich činí vhodnou skupinou pro fototerapii (Silva *et al.*, 2021). Příkladem může být GO (s průměrnou velikostí  $197,6 \pm 11,8$  nm), který pronikal kůží bez cytotoxických účinků a zároveň absorboval infračervené záření. Proto je možné jej použít k aplikaci lokální fototermální terapie nebo k cílenému podávání medikamentu k léčbě kožních onemocnění (Oliveira *et al.*, 2022).

### 2.2.3 Grafen oxid

Grafen, dvojrozměrný materiál, byl objeven roku 2004 (Novoselov *et al.*, 2004). V posledních letech byl využíván hlavně v lékařské oblasti (ale také například v elektronice, chemii či optice). Použití bylo limitováno jeho hydrofobními vlastnostmi, které může překonat oxidace a následné zavedení funkčních skupin obsahujících kyslík (karboxylové, hydroxylové a epoxidové skupiny) za vzniku jednovrstevného GO (Dideikin a Vul', 2019). Na rozdíl od oxidu grafitu existuje GO v monovrstvách (1 – 1,4 nm) nebo několika vrstvách s náhodně rozprostřenými defekty. Přítomnost polárních a reaktivních kyslíkatých skupin značně modifikuje vlastnosti a umožňuje na jeho povrch navázat jiné molekuly a využít jej jako nosič. Látky se tak mohou připojovat hydrofobními nebo elektrostatickými interakcemi, van der Waalsovými silami a vodíkovými vazbami na okraje nebo na bazální části GO. Grafen oxid má vysokou kapacitu pro navázání léčiv, uvádí se až 235 % hmotnostního procenta. To je mnohem vyšší, než například polymerní micely a lipozomy, které mají obvykle kapacitu naplnění kolem 10 %. Tyto nanočástice mají velký povrch ve srovnání s většími částicemi, díky čemuž je možné modifikovat základní vlastnosti, jako rozpustnost, toxicitu, poločas rozpadu a uvolňování léčiva (Pan *et al.*, 2012; Kiew *et al.*, 2016).

Plazmatická membrána je obal buňky chránící ji před vnějším prostředím a podílejí se na endocytóze. Endocytóza je typ aktivního transportu používaného buňkami k internalizaci biomolekul, které nemohou projít hydrofobní plazmatickou membránou. Během tohoto procesu buňka obklopuje materiál uvnitř extracelulární tekutiny a tvoří endozom, což je membránou vázaná vezikula. Endocytózu můžeme rozdělit do dvou kategorií: fagocytóza a pinocytóza. Fagocytóza, která je známá jako „požírání buněk“, je proces, při kterém specializované buňky fagocyty přijímají velké částice. Oponizace je integrální proces fagocytózy, ve kterém opsoniny pokrývají cílový materiál, aby spustily fagocyty a zahájily fagocytotickou aktivitu. Fagocyt současně spouští tvorbu fagozomu, kde jsou požitá materiály rozděleny do oddílů. Pinocytóza je proces, který se vyskytuje u všech

typů buněk a zahrnuje internalizaci malých částic v rozsahu nanometrů plazmatickou membránou. Pohlcené materiály jsou uzavřeny v malých vezikulách zvaných pinozomy, které se spojují s lysozomy za účelem rozkladu. Fagocytózu a pinocytózu lze rozlišit podle velikosti jejich endocytotických váčků (Foroozandeh a Aziz, 2018). Je známo, že velikost částic může určovat biologický mechanismus internalizace do buněk. Fagocytární buňky (makrofágy) obvykle internalizují větší částice a kdežto nefagocytární buňky (fibroblasty) podporují internalizaci menší (Oh a Park, 2014). V jedné studii byla porovnávána velikost nanočástic (350 nm) a mikročástic GO (2  $\mu\text{m}$ ) v buněčné odpovědi. Bylo objeveno, že makrofágy mají vyšší absorpční schopnost a obě velikosti GO vedly k podobnému buněčnému vychytávání, avšak větší velikost aktivovala silnější zánětlivou reakci. Pro snížení zánětlivé reakce by měla být velikost částic udržována kolem 150 nm a povrch by měl být hydrofilní, aby se oslabila interakce s opsoninovými proteiny. Grafen oxid v mikro i nano velikosti se po intravenózním podání hromadí v plicích, játrech a slezině, nicméně vyjmenované orgány jsou kompatibilnější pro nano velikosti. Také vylučování a rychlost clearance jsou určeny velikostí, nikoli povrchovými vlastnostmi. Nanočástice GO jsou rychleji eliminovány ledvinovým systémem, zatímco mikročástice GO jsou vyloučeny jaterní sekrecí do žlučových cest (Yue *et al.*, 2012; Kiew *et al.*, 2016). Grafen oxid je proto vhodným kandidátem pro úpravu velikosti, kterou lze měnit ultrazvukem a vysokou teplotou v závislosti na čase. Čím déle je GO pod vlivem ultrazvukových vln a teplotě, tím více se nanočástice zmenšují (Pan a Aksay, 2011). Bylo vyzpozorováno, že GO nanočástice jsou podstatně méně toxické než mikročástice GO, a to z důvodu rychlejší sedimentace mikročástic a tvorbě agregátů (Kiew *et al.*, 2016).

Chemie povrchu nanočástic je dalším základním parametrem biologické interakce s tkáněmi, normálními i nádorovými buňkami. Okysličené funkční skupiny propůjčují GO vysokou hustotu záporného náboje, proto velmi snadno může interagovat s kladně nabitými skupinami. Jak je již známo, buněčné membrány jsou tvořeny záporně nabitými a neutrálními lipidy, proto je velmi nepravděpodobné, že by záporné lipidy membrány elektrostaticky přitahovaly GO. Záporný GO ale může interagovat s ostatními složkami a tím poškodit membránu, aniž by prostoupil do buňky. Povrchový náboj nanočástic má významný příspěvek k buněčnému příjmu (rychlost a množství) a distribuci, ale také nevýhodu při použití v biologických aplikacích, jelikož v kontaktu s elektrolyty vznikají nevratné agregáty (Oh a Park, 2014; Sack *et al.*, 2022). Funkční skupiny GO slouží nejen k funkcionalizaci, ale pomohou i při solubilizaci. Byly vyvinuty dvě strategie



ke zvýšení stability, které umožňují, aby GO zůstat rozptýlený v buněčných kultivačních médiích a v séru. Prvním přístupem je elektrostatická stabilizace, která využívá další oxidaci GO na nízký poměr C/O (Li *et al.*, 2008). Druhým typem ke zlepšení je použití amfifilních biopolymerů a molekul, je například PEG, poly(vinyl alkohol) (PVA), polyethylenimin (PEI), poly(N-isopropylacrylamid) (PNIPAM), polysebacic anhydrid (PSA), chitosan (CS), amfifilní kopolymery, skupiny sulfonové kyseliny a aminoskupiny, které se k povrchu GO připojí kovalentními vazbami, minimalizují agregaci a zvyšují stabilitu a rozpustnost ve fyziologických roztocích (Liu *et al.*, 2008; Pan, Sahoo a Li, 2012).

Když se GO dostane do kontaktu s tělesnými tekutinami a tkáněmi, dojde na jeho povrchu ke koagulaci proteinů, čímž se umožní rozpoznání imunitním systémem. Spuštění imunologických procesů vede ke zkrácení cirkulačního poločasu nanočástic v krevním řečišti, k nízké biodistribuci a nemožnosti dosažení konkrétního cíle. Nanočástice mohou být navrženy tak, aby se vyhnuly imunitnímu systému nebo specificky inhibovaly imunitní reakce (Jokerst *et al.*, 2011). Povrchová modifikace nanočástic pomocí PEGu je metoda vedoucí k zabránění kontaktu s nabitými molekulami, opsonizaci částic, zvýšení poločasu rozpadu a zlepšení jejich transportu. V roce 2008 tým vědců poprvé kovalentně funkcionalizoval GO pro podávání léků (Obr. 7) (Liu *et al.*, 2008). Skupina vytvořila PEGylovaný GO (GO-PEG) v nanoměřítku, který byl použit jako nanonosič pro různé protirakovinné léky. Laterální velikost GO-PEG byla během syntézy snížena na 5 – 50 nm. To ve srovnání s většími nemodifikovanými GO listy usnadnilo překonání buněčných bariér. Tato práce vedla k vytvoření řady polymerem obalených GO nanonosičů pro dodávání ve vodě nerozpustných léků se zlepšenou rozpustností a stabilitou ve fyziologických roztocích. Polyethylen glykol působí jako hydrofilní obal tvořený dlouhými pružnými řetězci a má tu výhodu, že je netoxický a neimunogenní. Jedná se dosud o nejrozšířenější polymer schválený FDA (Liu *et al.*, 2008; Pan, Sahoo a Li, 2012).



## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

Pro přípravu látek byly použity následující chemikálie: 6-benzylaminopurin zakoupen od firmy OlChemIm s.r.o., 99,5% kyselina methansulfonová od firmy HoneyWell Fluka, methanol a aceton od firmy Lach-ner s.r.o. Látky 6-furfurylaminopurinium methansulfonát (kinetin mesylát) a 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium methansulfonát (p-topolin mesylát) byly připraveny v bakalářské práci dle diplomové práce Mgr. Dardana Kloše a protokolů doposud nepublikovaných dat (Klos D., 2020; nepublikovaná data D. Klos *et al.*, 2023). K přípravě nanočástic byla použita disperze grafen oxidu (4 mg/ml), 8-ramenný polyethylenglykol-amin (8-PEG amin, 10 kDa), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC) od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. Fosfátový pufr (PBS) s pH 7,4 byl připraven v Regionálním centru pokročilých technologií (RCPTM).

### 3.2 Metody a přístrojová technika

Chemikálie pro syntézu byly navažovány analytickými vahami AS 220.R2 a k vytvoření zásobních roztoků pro funkcionalizaci vahami KERN ABT 220-5DM.

Chemické reakce probíhaly s využitím magnetického míchadla s ohřevem Heidolph MR Hei-Standard. Poté byla použita rotační vakuová odparka (RVO) Büchi Rotavapor R-200 pro odpaření zbytku rozpouštědla.

K úpravě velikosti GO a k modifikaci povrchu byla využita ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex Digitec DT 103 H, centrifuga Benchtop 4-16K a třepačka Heidolph Unimax 1010, která byla také použita k PEGylaci a funkcionalizaci.

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se systémem Waters Alliance 2695 Separations Module na koloně C18 Symmetry o průměru 2,1 mm a délky 150 mm s pórovitostí 5  $\mu\text{m}$  a UV-VIS detektorem Waters 2996 PDA v oblasti 210 – 400 nm byla použita ke stanovení čistoty, navázané koncentrace CK na GO-PEG a k vyhodnocení testu stability. Eluát byl využit v metodě LC-MS k identifikaci produktu a určení molekulové hmotnosti. Vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi (mravenčan amonný : methanol v poměru 9:1) a poté promýván gradientem (10 – 90 % 24 minut) při pH 4 a průtoku 0,3 ml/min. Iontový zdroj (ESI) byl zahříván na 120 °C a desolvatační teplota činila 300 °C. Měření bylo provedeno v pozitivním (ESI+) i negativním (ESI-) módu v rozsahu m/z 60-1000. Kromě zjišťování koncentrace u testu stability analýzy provedla Mgr. Hana

Omámiková z Katedry chemické biologie. Analýzu koncentrace u testu stability uskutečnil Mgr. Radim Simerský, Ph.D. z Katedry chemické biologie.

Spektra produktů k ověření chemické individuality byly měřeny metodou nukleární magnetické rezonance (NMR), kdy byl použit NMR spektrometr typu JEOL 500 ECA. Byla provedena kalibrace posunu na zbytkový pík rozpouštědla v  $^1\text{H}$  DMSO- $d_6$  2,50 ppm. Protonové interakce byly vždy uváděny jako singlet (s), multiplet (m), dublet (d) a triplet (t). Měření a vyhodnocení spekter bylo provedeno Mgr. Dardanem Klosem z Katedry chemické biologie.

Metodou rentgenové práškové difrakce (XPRD) byla ověřena odlišnost nasyntetizovaného derivátu od výchozí látky. Byl použit difraktometr typu Bruker D8 Advance ECO s rentgenovým zářením CuK $\alpha$  a detektorem SSD 160. Měření a vyhodnocení spekter bylo provedeno Mgr. Dardanem Klosem.

K zobrazování a zjišťování velikosti nanočástic GO, velikostně upraveného GO, PEGylovaného GO a funkcionalizovaného GO-PEG sloužil mikroskop atomárních sil (AFM) s modulem SPM mikroskopu Ntegra Spectra SOLAR firmy NT-MDT. Byl využit semikontaktní mód s křemičítým hrotem ACTA-SS-20 od společnosti APPNANO. Na příslušnou slídu bylo napipetováno 5  $\mu\text{l}$  vzorku, který byl volně ponechán zaschnout na vzduchu při pokojové teplotě a poté byl vzorek zobrazován. Byly skenovány plochy o rozměrech  $45 \times 45 \mu\text{m}$ ,  $10 \times 10 \mu\text{m}$  a  $5 \times 5 \mu\text{m}$  s rozlišením  $500 \times 500 \text{ dpi}$  a rychlostí 0,3 Hz. Pro zpracování dat byl použit program Gwyddion verze 2.62 a ImageJ verze 1.8.0\_172. Měření a vyhodnocování bylo prováděno v přítomnosti Mgr. Ludmily Žárské, Ph.D. v Regionálním centru pokročilých technologií.

Povrch GO a PEGylovaného GO byl zobrazován pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) typu Jeol-7900F na urychlovacím napětí 5 kV. Vzorek GO byl ředěn v ethanolu, sonikován po dobu 2 minut a nakapán na uhlíkovou pásku sunstrate. Zobrazování provedla Eirini Ioannou, Ph.D. z Regionálního centra pokročilých technologií.

Infračervená spektra GO, PEGu, GO-PEG, CK (pTm, Km, BAPm) a funkcionalizovaných nanočástic GO-PEG cytokininovými deriváty – kinetin mesylát navázaný na GO-PEG (Km GO-PEG), p-topolin mesylát navázaný na GO-PEG (pTm GO-PEG) a BAP mesylát navázaný na GO-PEG (BAPm GO-PEG) byla naměřena pomocí přístroje infračervené spektroskopie (FTIR) Nicolet iS5 FT-IR Spectrometer s krystalem ZnSe 1492 a detektorem DTGS KBr od firmy Thermo Fisher Scientific. Naměřené transmittance byly zjišťovány v infračervené oblasti  $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ .

Před každým měřením bylo jako referenční sken změřeno pozadí krystalu. U každého vzorku bylo výsledné spektrum zprůměrováno z 32 skenů se spektrálním rozlišením  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

Povrchový náboj byl měřen na přístroji Zetasizer NanoZS s technikou Malvern M3-PALS pracující na dynamickém rozptylu světla. Do příslušné kyvety typu DTS 1070 bylo napipetováno  $100 \mu\text{l}$  vzorku, doplněno  $900 \mu\text{l}$  PBS a změřeno v triplicátu při podmínkách  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $151 \text{ V}$ .

Pro charakterizaci a zobrazování nanočástic GO-PEG a funkcionalizovaných nanočástic CK deriváty byl použit Ramanův mikroskop Witec Alpha 300 R+ (WiTec) s excitačním laserem v zelené části spektra ( $532 \text{ nm}$ , s výkonem  $\sim 5 \text{ mW}$  dopadajícím na vzorek). Čas expozice laseru na vzorek činil  $2 \text{ s}$ . Výsledky byly zprůměrovány z osmi měření. Měření provedl doc. RNDr. Václav Ranc, Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

Pro zobrazení a vyhodnocení biologického testování byl použit mikroskop Olympus IX51 při zvětšení  $40\times$ , toto testování bylo provedeno Mgr. Lucií Rárovou, Ph.D. z Katedry experimentální biologie a je shrnuto v kapitole 3.9 – Biologické testování.

### 3.3 Protonizace cytokininových derivátů

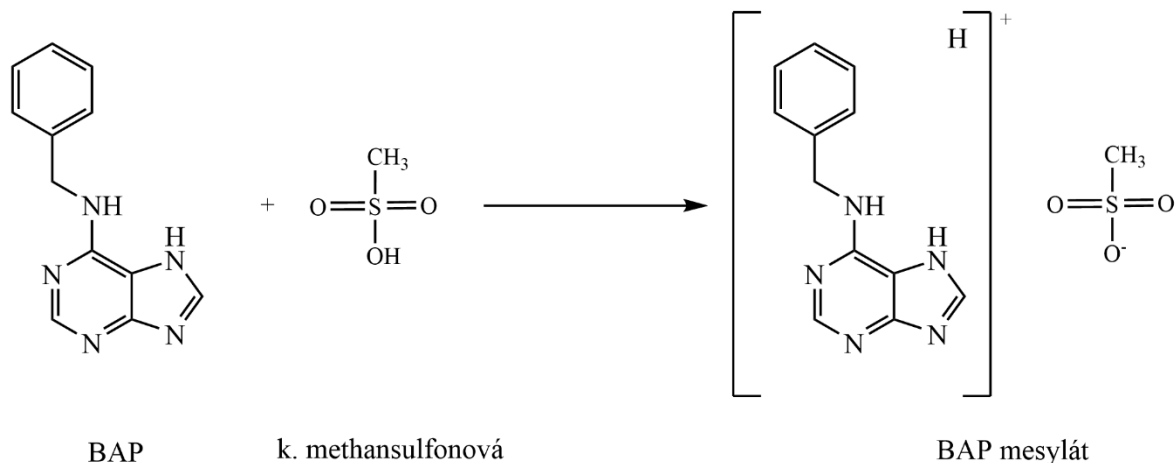
V diplomové práci byly využity tři látky, z nichž dvě – 6-furfurylaminopurinium methansulfonát (kinetin mesylát) a 6-(4-hydroxybenzylamino)purinium methansulfonát (p-topolin mesylát) byly připraveny již v rámci bakalářské práce a to na základě diplomové práce Mgr. Dardana Klose a protokolů doposud nepublikovaných dat (Klos D., 2020; nepublikovaná data D. Klos *et al.*, 2023). Proto zde jejich syntézy nejsou uvedeny.

#### 3.3.1 Příprava 6-benzylaminopurinia methansulfonátu (BAP mesylát)

Do  $50 \text{ ml}$  methanolu bylo přidáno  $370 \text{ mg}$  6-benzylaminopurinium a za stálého míchání při teplotě  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $250 \text{ RPM}$  byla reakce ponechána přibližně  $30 \text{ minut}$ . Poté bylo do reakce postupně přidáváno  $107 \mu\text{l}$  methansulfonové kyseliny. Po uplynutí  $1 \text{ hodiny}$  byla reakce zastavena a produkt byl dán na RVO na odparek. Odpařený produkt byl rozpuštěn v  $50 \text{ ml}$  acetonu a přefiltrován přes fritu. Výsledný produkt byl sušen při teplotě  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  v sušárně po dobu  $24 \text{ hodin}$ . Reakce proběhla dle schématu na Obr. 8. Jeho celková hmotnost byla  $457 \text{ mg}$ .

Výtěžek BAP mesylátu:  $74,39 \%$ , HPLC:  $>99 \%$ ,  $M_r = 321,11$ ; MS  $[\text{M}+\text{H}^+] = 226,16$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}D_6$ )  $\delta$  9.64 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.56 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.41 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.36 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.30 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 4.84 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 2.45 – 2.37 (m, 3H).



Obr. 8: Schéma reakce BAP mesylátu

### 3.4 Optimalizace velikosti nanočástic GO a určení počtu nanočástic

Grafen oxid s koncentrací 4 mg/ml byl ředěn 10x fosfátovým pufrem (PBS). Vytvořená disperze byla promíchána a přemístěna na 6 hodin do ultrazvukové lázně při 70 °C, po kterých následovalo přenesení na třepačku na dalších 18 hodin v podmínkách 65 °C a 500 RPM. Po uplynutí doby byla disperze umístěna opět do ultrazvukové lázně na 6 hodin při stejných podmínkách uvedených výše. Vytvořená disperze byla 5 minut centrifugována při 10 000 RPM z důvodu oddělení velkých částic. Supernatant GO byl odebrán a uskladněn. Ke stanovení počtu nanočástic bylo 5  $\mu\text{l}$  napipetováno na slídu určenou pro AFM. Byl stanoven počet nanočástic pomocí programu ImageJ, dopočítán na 1 ml, který činil  $1,5 \cdot 10^9$  NPs/ml.

### 3.5 PEGylace grafen oxidu

Do 988  $\mu\text{l}$  GO bylo napipetováno 8  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku PEGu o koncentraci 50 mg/ml. Na dobu 10 minut byl vzorek umístěn do ultrazvukové lázně. Dále bylo ke vzorku přidáno 4  $\mu\text{l}$  roztoku EDC s koncentrací 50 mg/ml (z důvodu aktivace karboxylových skupin přítomných v GO) a byl ponechán 24 hodin míchat na třepačce při 500 RPM a teplotě 65 °C. Vzorek byl následovně přemístěn na 6 hodin do ultrazvuku při teplotě 70 °C, poté

opět 18 hodin míchán a na závěr při stejných podmínkách ultrazvukován 6 hodin (Giusto *et al.*, 2022).

### **3.6 Funkcionalizace nanočástic cytokininovými deriváty**

Zásobní roztoky jednotlivých CK derivátů o koncentraci 30 mM byly použity k vytvoření koncentračních řad v rozmezí 3,0 – 0,5 mM. Tyto koncentrace vznikly smícháním CK mesylátů a GO-PEG. Vzorky byly ponechány 24 hodin na třepačce při pokojové teplotě (25 °C) a 500 RPM.

### **3.7 Zjištění navázané koncentrace cytokininovými deriváty**

Pro výběr vhodné koncentrace pro testování byly vzorky 5 minut centrifugovány při pokojové teplotě a 7000 RPM a následně zanalyzovány pomocí HPLC/UV-VIS. Pro HPLC/UV-VIS analýzu byl použit supernatant a měřen v triplicátu každé koncentrace při vlnové délce 210 – 400 nm. K zjištění navázaného množství byla sestavena kalibrační křivka a rovnice spojnice trendu. Výsledné pelety GO-PEG s CK byly resuspendovány v 1 ml PBS. Analýza HPLC/UV-VIS byla zprostředkována Mgr. Hanou Omámikovou z Katedry chemické biologie.

### **3.8 Test stability funkcionalizovaného GO-PEG cytokininovými deriváty**

Vzorky 1 ml GO-PEG s navázanými CK byly inkubovány v dialyzační membráně (100 kD od společnosti Spectrum laboratories, Inc.) v baňce s 300 ml PBS při pokojové teplotě a pH 7,4 po dobu 2, 4, 6, 8, 24, 48 hod a 7, 14, 21 a 28 dní. Koncentrace uvolněných CK z nanoplatfomy GO-PEG do PBS byla měřena pomocí HPLC/UV-VIS v triplicátu při vlnové délce 210 – 400 nm. Analýzu uskutečnil Mgr. Radim Simerský, Ph.D. z Katedry chemické biologie. Tento experiment byl prováděn dle publikace (Giusto *et al.*, 2022).

### **3.9 Biologické testování**

Primární buňky lidských fibroblastů (BJ) byly nasazeny do dvou kultivačních 24 jamkových desek a ponechány růst po dobu 48 hodin v médiu. Po uplynutí času byl špičkou pipety udělán vryp doprostřed každé jamky. Následovalo ošetření buněk látkami: PEG, Km, Km GO-PEG, pTm a pTm GO-PEG o koncentracích 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. U vzorků GO a GO-PEG byla nastavena koncentrace tak, aby odpovídala stejnému počtu nanočástic

ve vzorku Km GO-PEG a pTm GO-PEG. Dále byly jako kontroly využity látky: vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) (10 ng/ml) urychlující migraci, alaptid jako pozitivní kontrola urychlující migraci fibroblastů (10 a 100  $\mu$ M) a methoxyestradiol (MeO) jako inhibitor migrace (5 a 10  $\mu$ M). Jedna deska byla inkubována 8 hodin a druhá 16 hodin. Pro zobrazení a vyhodnocení experimentu byl použit mikroskop Olympus IX51 při zvětšení 40x. Ve snímcích byla poté změřena plocha rýhy a porovnána s neošetřenými fibroblasty. Toto testování bylo provedeno Mgr. Lucií Rárovou, Ph.D. z Katedry experimentální biologie.

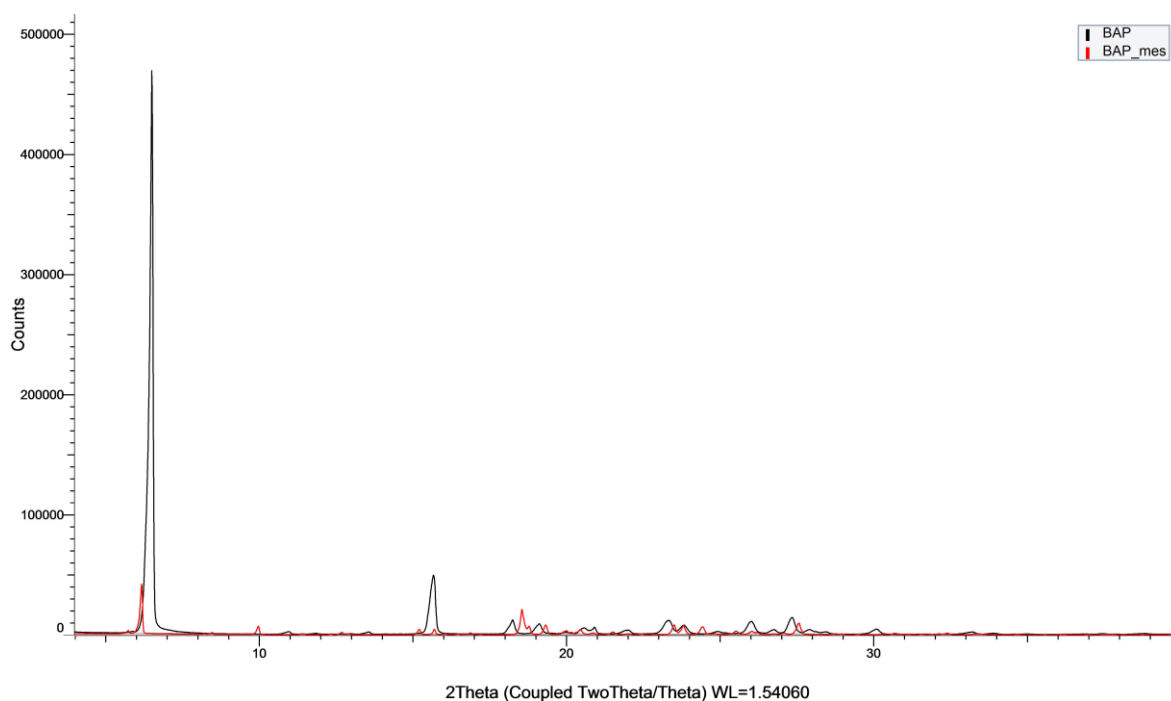


## 4 Výsledky

### 4.1 Charakterizace připraveného cytokininu

#### 4.1.1 Prášková rentgenová difrakce

Připravená látka BAP mesylát byla charakterizována metodami HPLC/UV-VIS, LC-MS a NMR, pro niž jsou výsledky uvedeny v experimentální části v kapitole 3.3.1 Příprava 6-benzylaminopurinia methansulfonátu (BAP mesylát). K odlišení protonizované látky od její výchozí byla použita metoda práškové rentgenové difrakce, jejíž výsledkem je odlišné spektrum výchozí látky (černě označena) od protonizované látky (červeně označena) (Obr. 9).



Obr. 9: Difraktogram BAP (černě označen) a BAP mesylátu (červeně označen)

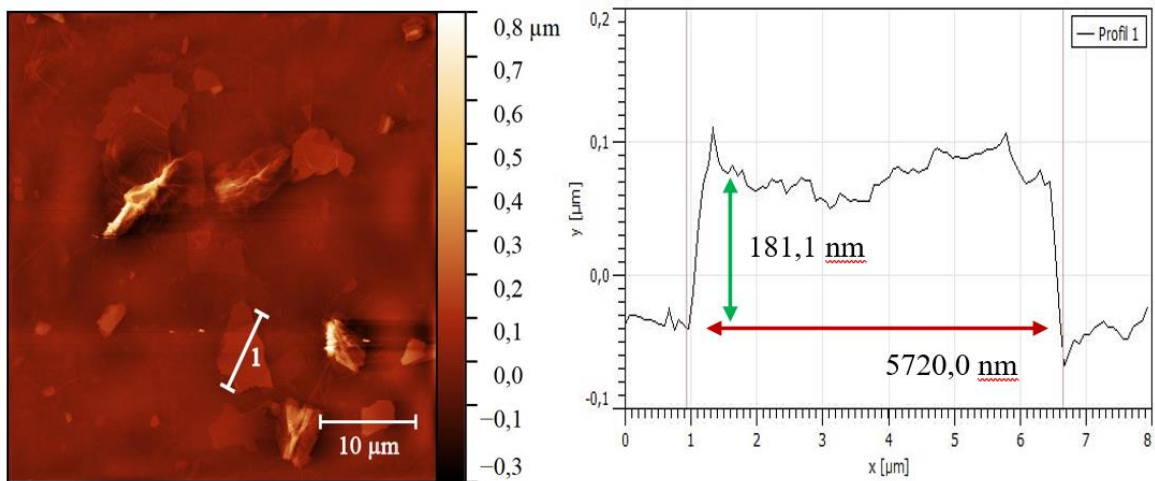
## 4.2 Charakterizace grafenu oxidu a funkcionalizovaného materiálu

### 4.2.1 Mikroskopie atomárních sil

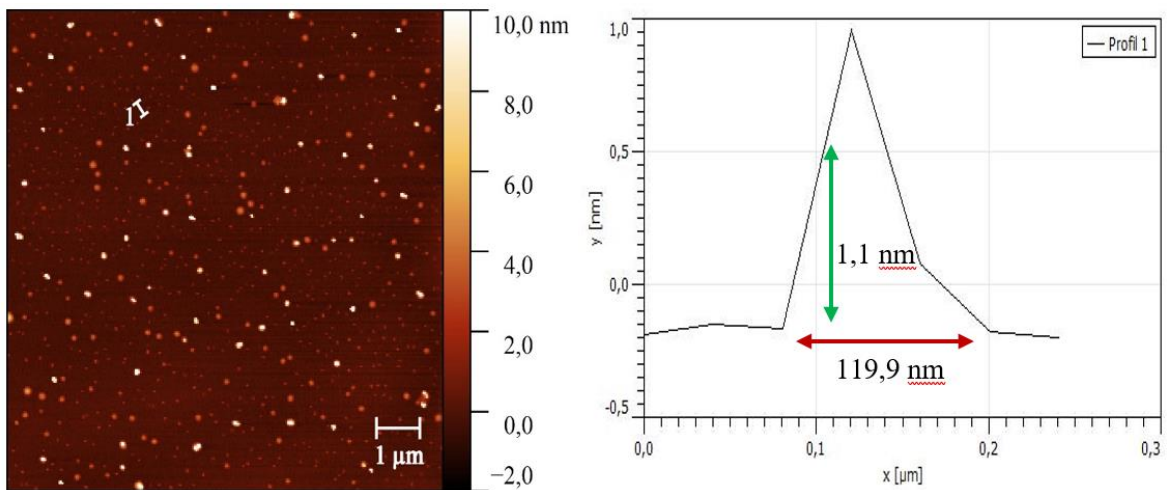
Mikroskopem atomárních sil byly charakterizovány nanočástice GO, GO po úpravě velikosti, PEGylovaného GO a funkcionalizovaného GO-PEG cytokininovými deriváty. Snímky nanočástic GO byly měřeny o velikosti  $45 \times 45 \mu\text{m}$ , nanočástice po změně velikosti a PEGylované nanočástice  $10 \times 10 \mu\text{m}$  a funkcionalizovaná platforma  $5 \times 5 \mu\text{m}$ . Z označených nanočástic na snímcích byly vždy vytvořeny grafy znázorňující laterální velikosti (osa x) a výškové profily (osa y).

V GO před úpravou byly přítomny nanočástice velké velikosti, laterální velikost označené nanočástice byla 5720 nm a její výška činila 181,1 nm, to odpovídá více než 120 vrstvám (jedna vrstva odpovídá 1 – 1,4 nm) (Kiew *et al.*, 2016) (Obr. 10). Nanočástice byly poté upraveny působením vysoké teploty a ultrazvukových vln. Laterální velikosti nanočástic byly mnohonásobně zmenšeny, označená nanočástice dosahovala velikostně 119,9 nm a výška byla zmenšena až na 1,1 nm (Obr. 11), což odpovídá zhruba jedné vrstvě. Modifikace povrchu GO nanočástic pomocí PEGu vedla jak ke změně velikosti a výšky (přibližně na 8,4 nm, odpovídá méně než 10 vrstvám), tak ke změně tvaru nanočástic z ostrého na zakulacený (Obr. 12). Po navázání CK derivátů na povrch PEGylovaného GO opět vzrostla výška (Obr. 13-15).

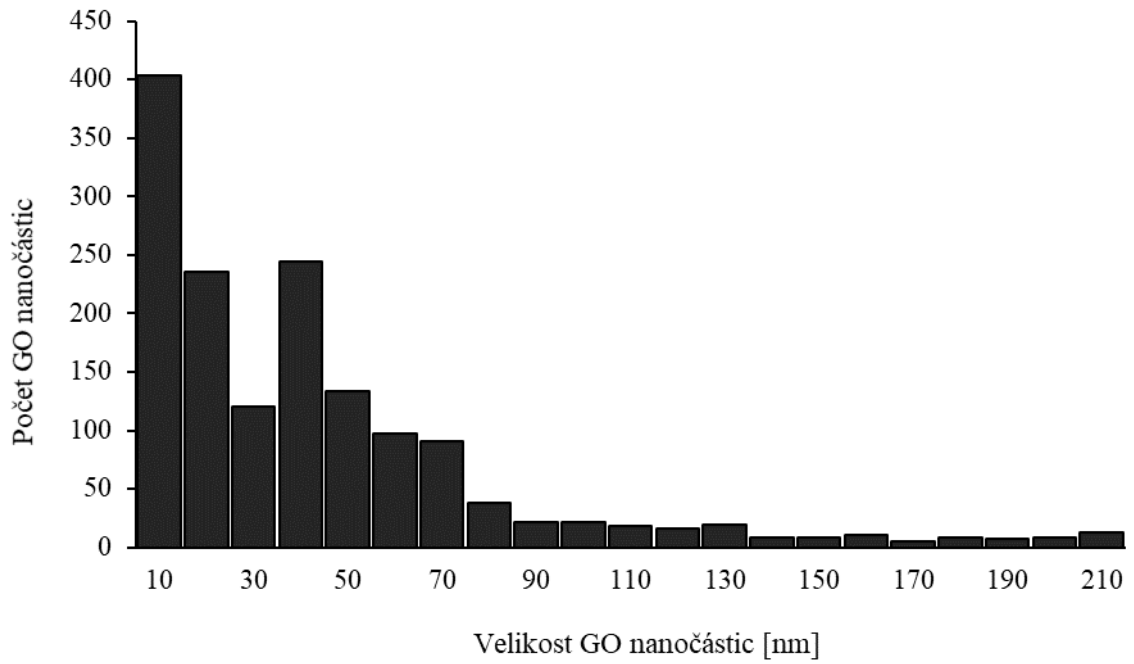
Rovněž byla provedena statistická analýza obrazových dat, která vyobrazuje laterální velikosti GO nanočástic ( $n = 1530$ ) upravené vlivem ultrazvukových vln a vysoké teploty (Graf 1). Histogram byl vytvořen z výsledků získaných z deseti náhodných snímků o rozměrech  $50 \times 50 \mu\text{m}$ . Snímky byly analyzovány v programu ImageJ. Statistická analýza získaných obrazových dat z AFM potvrdila úspěšnou změnu velikosti GO nanočástic se střední laterální velikostí do 130 nm pro více než 95 % identifikovaných nanočástic z celkového počtu 1530 analyzovaných nanočástic. Z tohoto počtu byl stanoven počet nanočástic na 1 ml, který činil  $1,5 \cdot 10^9$  NPs/ml.



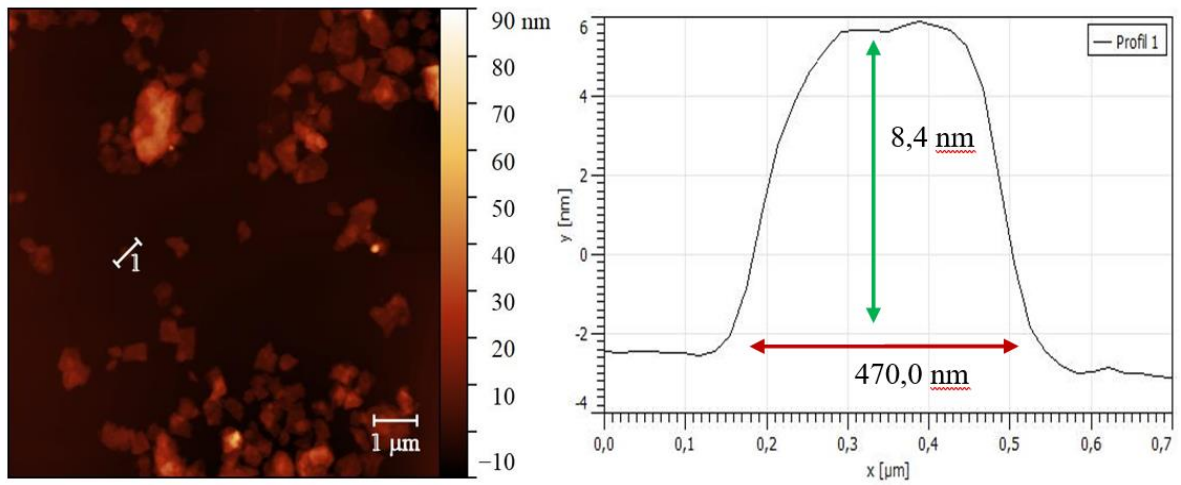
Obr. 10: Nanočástice GO zobrazeny AFM (vlevo); velikost a výška označené nanočástice (vpravo)



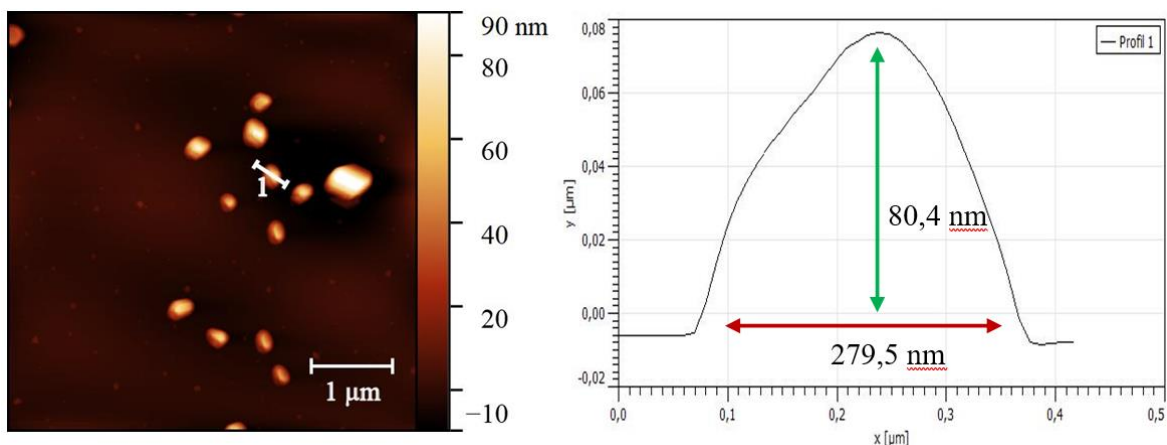
Obr. 11: Nanočástice upraveného GO zobrazeny AFM (vlevo); velikost a výška označené nanočástice (vpravo)



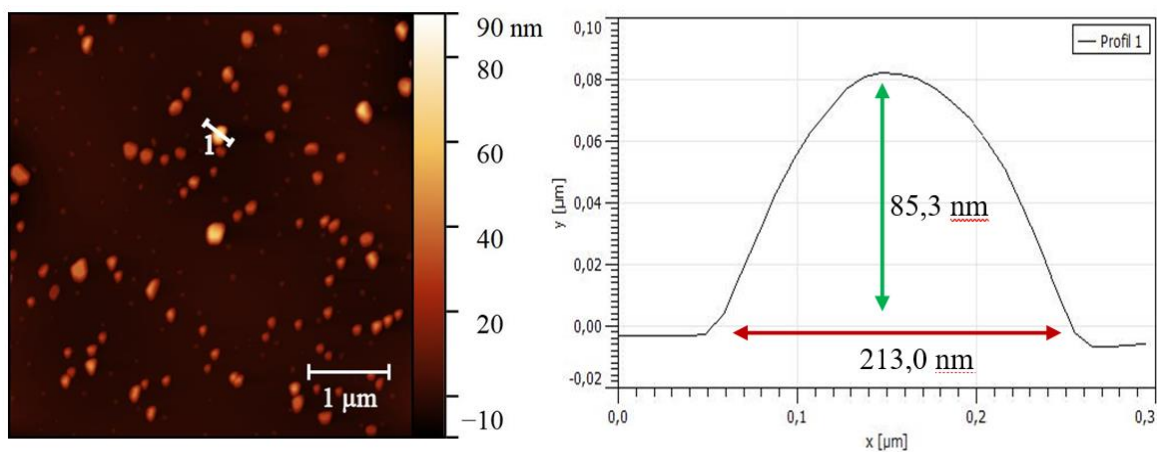
*Graf 1: Velikostní distribuce GO nanočástic po změně velikosti ultrazvukem a působením vysoké teploty*



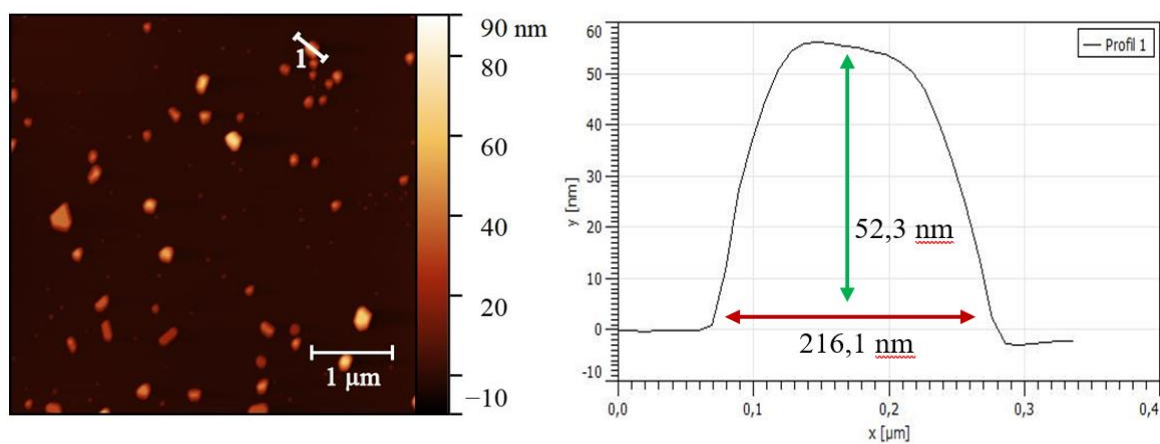
*Obr. 12: Nanočástice GO po PEGylaci zobrazeny AFM (vlevo); velikost a výška označené nanočástice (vpravo)*



Obr. 13: Funkcionalizované nanočástice K mesylátem zobrazeny AFM (vlevo); velikost a výška označené nanočástice (vpravo)



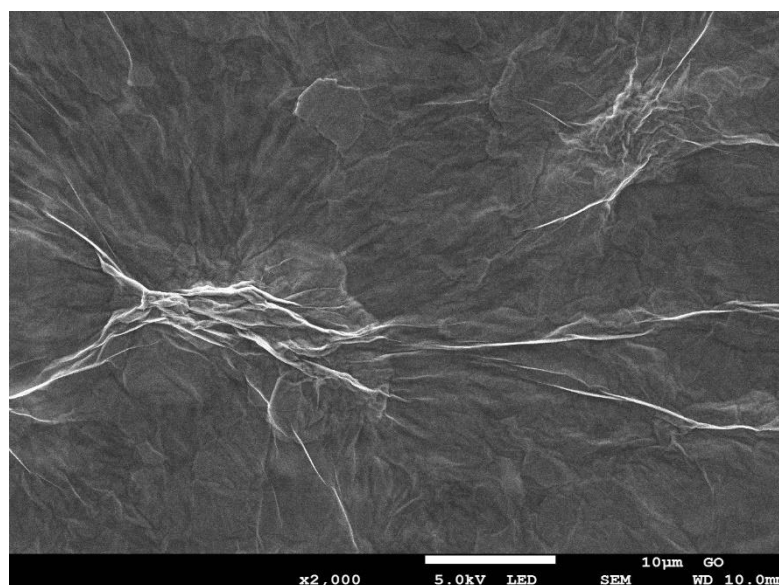
Obr. 14: Funkcionalizované nanočástice pT mesylátem zobrazeny AFM (vlevo); velikost a výška označené nanočástice (vpravo)



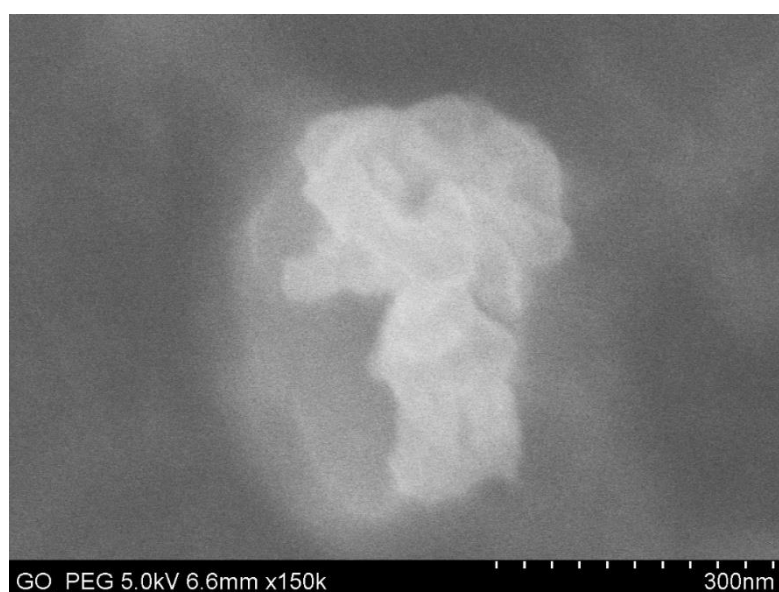
Obr. 15: Funkcionalizované nanočástice BAP mesylátem zobrazeny AFM (vlevo); velikost a výška označené nanočástice (vpravo)

#### 4.2.2 Skenovací elektronový mikroskop

Skenovací elektronová mikroskopie poskytuje informace o morfologii a struktuře nanomateriálů. Tímto mikroskopem byl zobrazován povrch GO před jeho samotnou úpravou teplotou a ultrazvukem a poté po PEGylaci. Z obrázku můžeme vypořadovat, že GO má ultratenkou strukturu a vytváří homogenní filmy, které jsou někdy složené nebo souvislé. Je také možné rozlišit okraje jednotlivých nanočástic, včetně zalomených a zvrásněných oblastí (Obr. 16). Po aplikaci 8-ramenného PEGu lze vidět, že byl navázán na povrch GO, což se jevílo jako obalení a zakulacení nanočástic (Obr. 17).



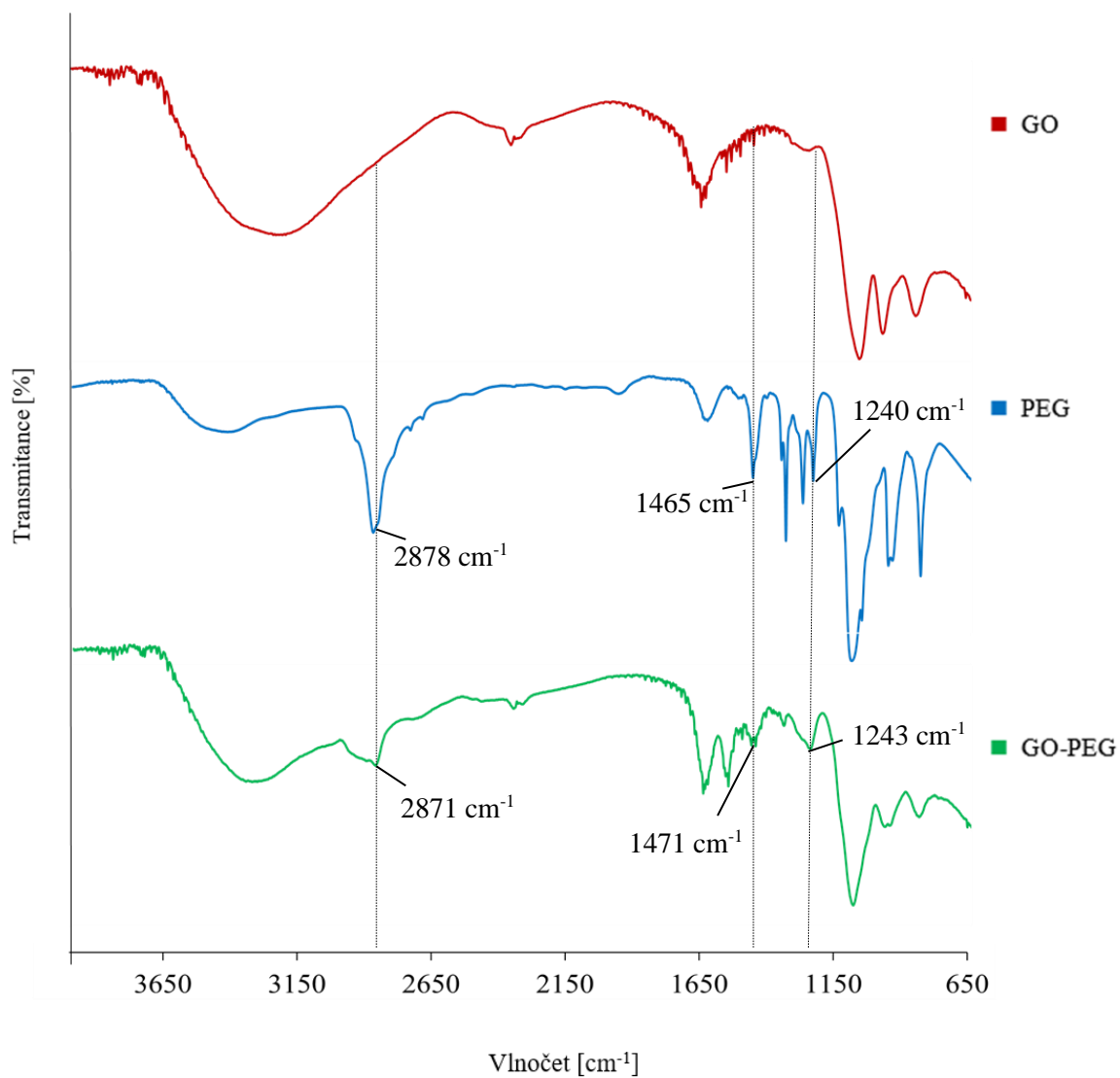
Obr. 16: Povrch GO zobrazený pomocí SEM (2000x zvětšeno)



Obr. 17: Povrch PEGylovaného GO zobrazený pomocí SEM (150000x zvětšeno)

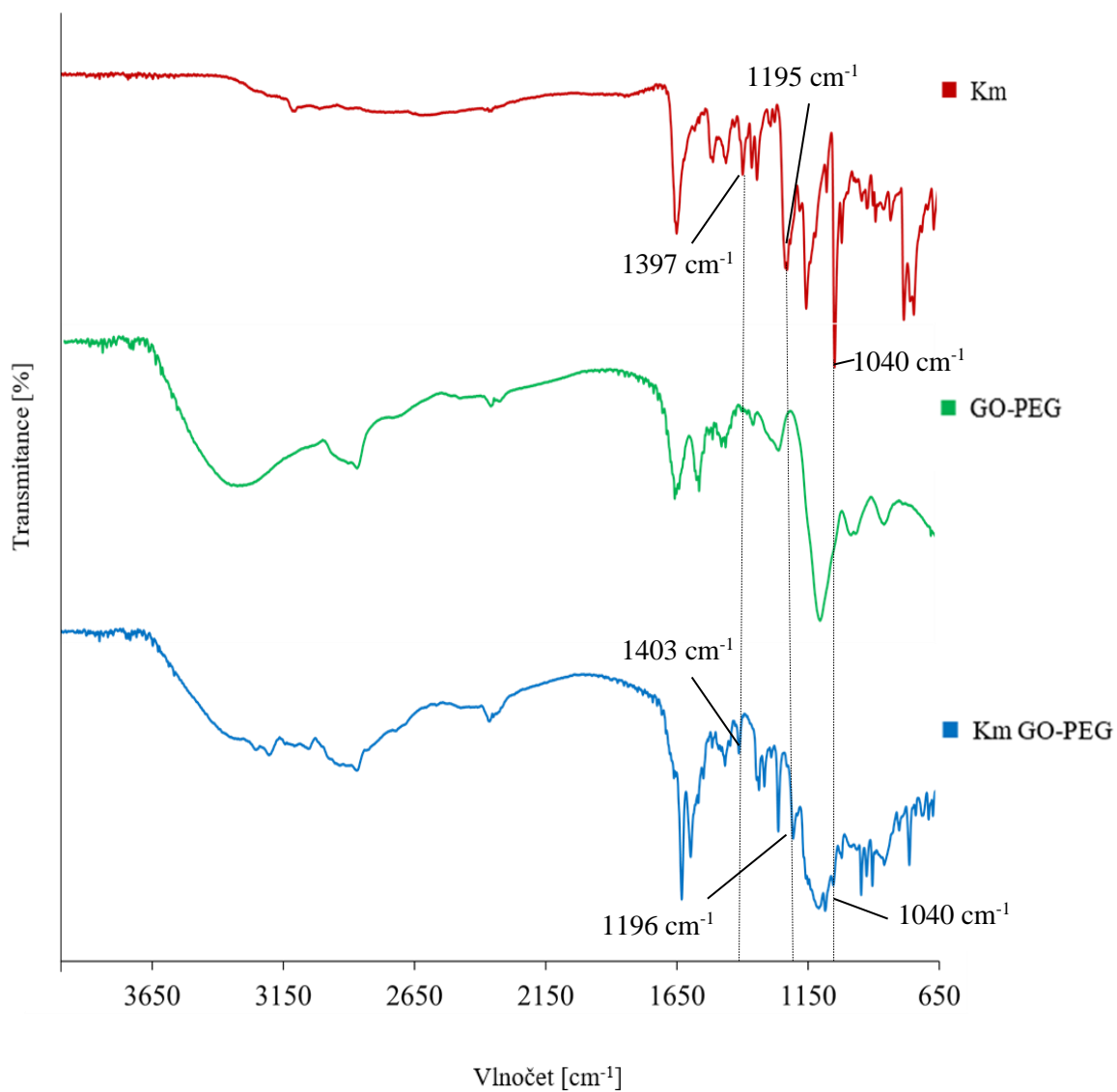
### 4.2.3 Infračervená spektroskopie

Infračervenou spektroskopií byl charakterizován GO, PEG, PEGylovaný GO, Km GO-PEG, pTm GO-PEG a BAPm GO-PEG (Obr. 18 – 21). Infračervená spektra je možné rozlišit na blízké ( $13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ), střední ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) a vzdálené ( $400 - 100 \text{ cm}^{-1}$ ). V této práci byly vzorky měřeny v rozmezí  $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ , které patří do střední infračervené části. Toto pole jde dále rozdělit do čtyř částí poskytujících informace o povaze molekul. Těmito pásmy je oblast vodíkových vazeb způsobena roztahováním O–H, C–H a N–H ( $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ ), oblast trojitě vazby ( $2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ ), oblast dvojité vazby ( $2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ) a oblast otisků prstů ( $1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ), která je pro každou sloučeninu jedinečná (Stuart, 2004). V prvním grafu jsou zobrazeny tři píky PEG ( $2878 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1465 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1240 \text{ cm}^{-1}$ ), které byly po navázání na GO přítomny ve spektru GO-PEG ( $2871 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1471 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1243 \text{ cm}^{-1}$ ) (Obr. 18). Druhý graf vyobrazuje tři píky Km ( $1397 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1195 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1040 \text{ cm}^{-1}$ ), které se rovněž vyskytovaly ve spektru Km GO-PEG ( $1403 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1196 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1040 \text{ cm}^{-1}$ ) (Obr. 19). Ve třetím spektru jsou tři píky Ptm ( $1211 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1038 \text{ cm}^{-1}$ ;  $778 \text{ cm}^{-1}$ ) a poté i ve spektru Ptm GO-PEG ( $1201 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1042 \text{ cm}^{-1}$ ;  $781 \text{ cm}^{-1}$ ) (Obr. 20). V posledním spektru byl zobrazen BAPm, pro který byly vybrány taktéž tři píky ( $1294 \text{ cm}^{-1}$ ;  $936 \text{ cm}^{-1}$ ;  $699 \text{ cm}^{-1}$ ), ve spektru BAPm GO-PEG byly tyto píky přítomny ( $1300 \text{ cm}^{-1}$ ;  $934 \text{ cm}^{-1}$ ;  $700 \text{ cm}^{-1}$ ) (Obr. 21). Toto zjištění naznačuje, že došlo k navázání CK derivátů na GO-PEG.

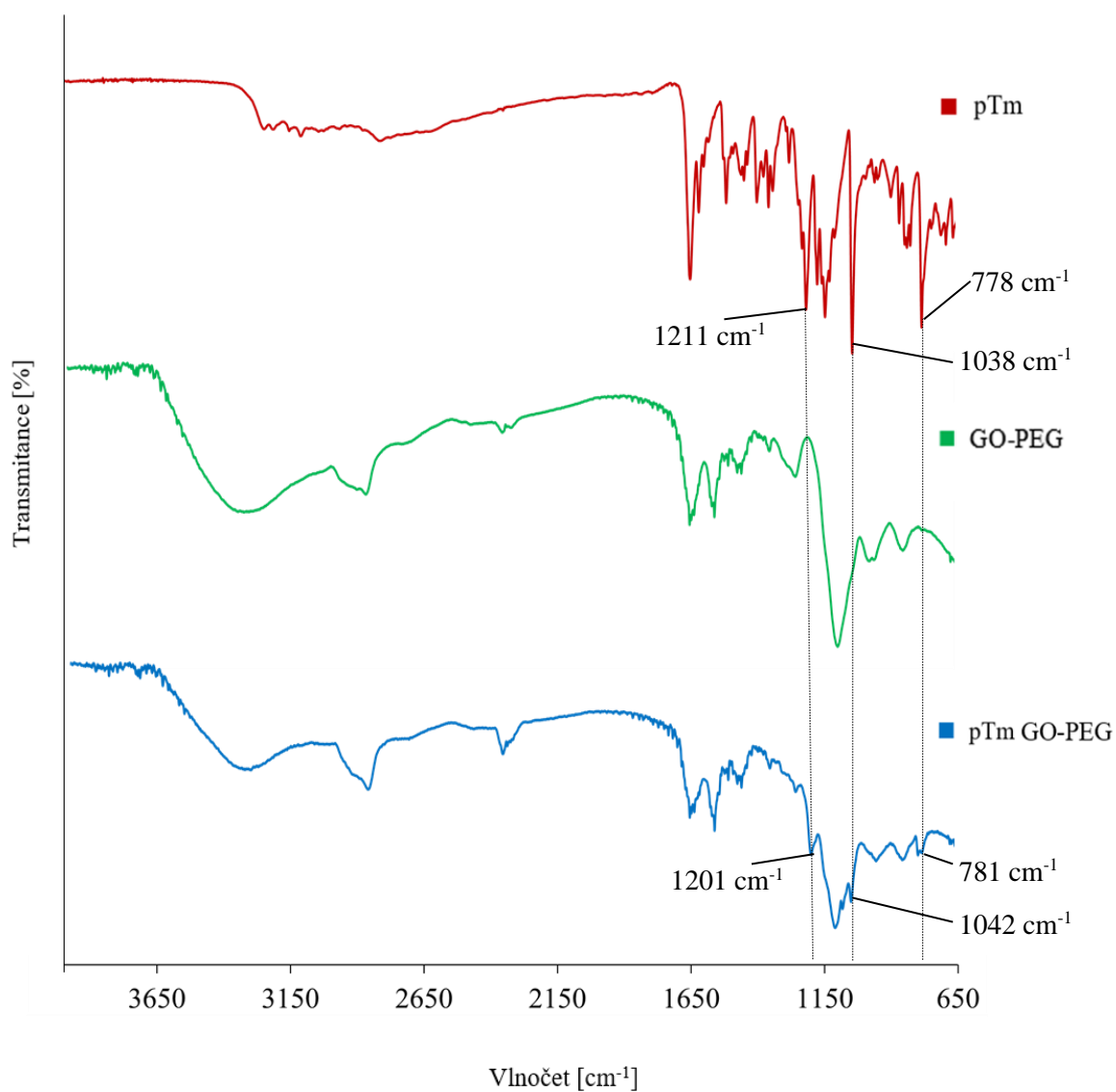


Obr. 18: Infračervená spektra GO, PEGu a PEGylovaného GO

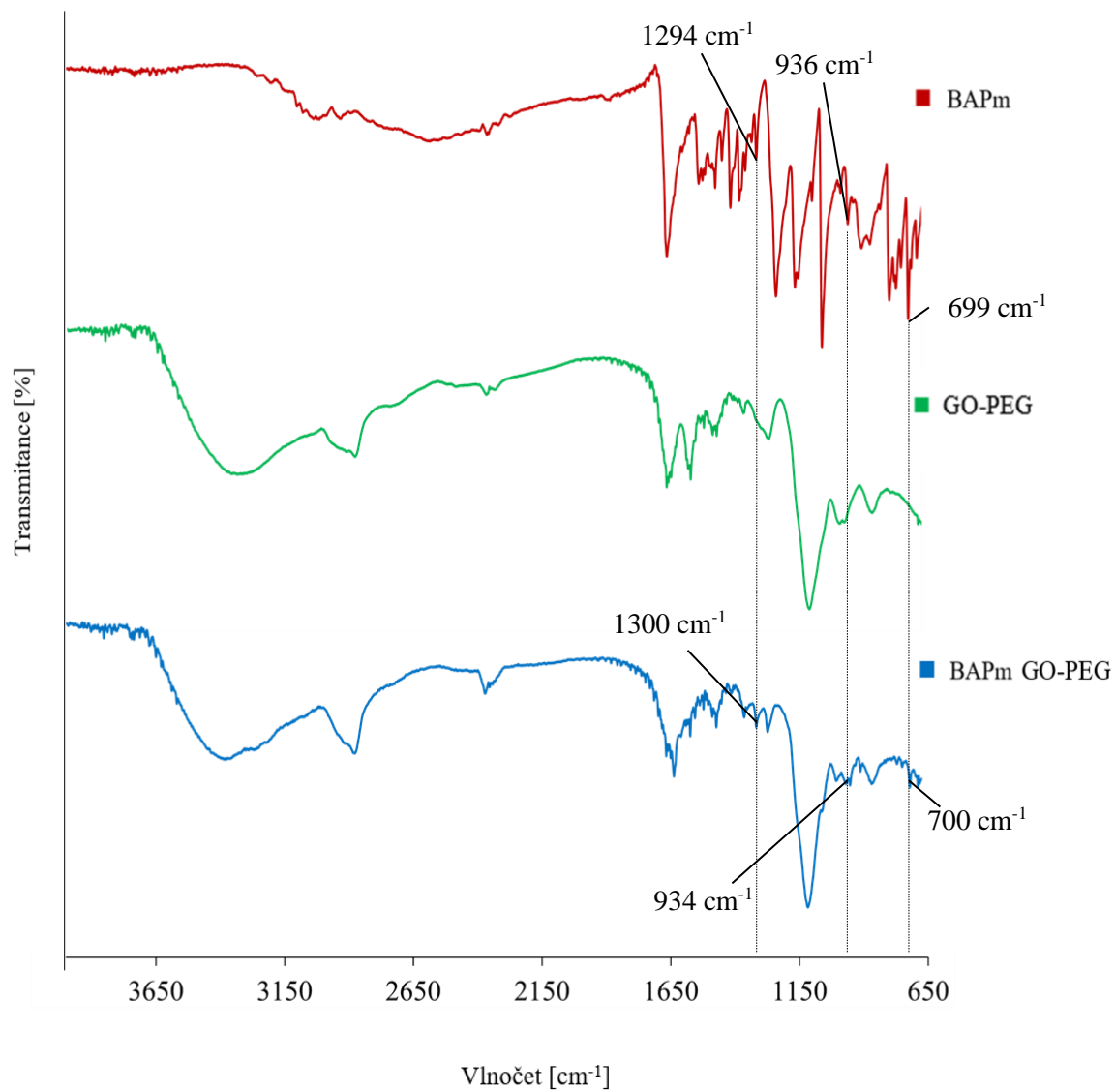




Obr. 19: Infračervená spektra Km, GO-PEG a Km GO-PEG



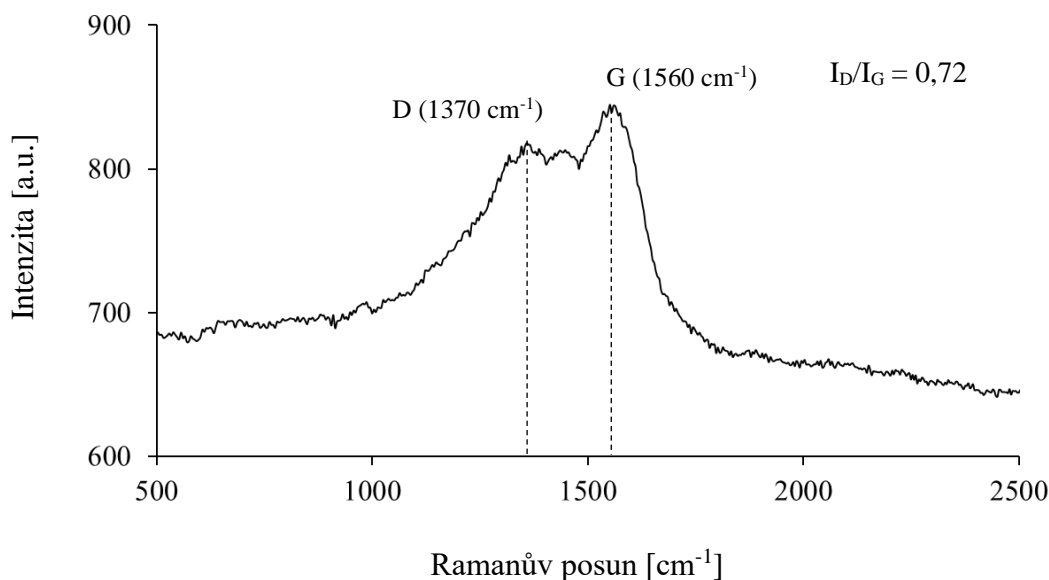
Obr. 20: Infračervená spektra pTm, GO-PEG a pTm GO-PEG



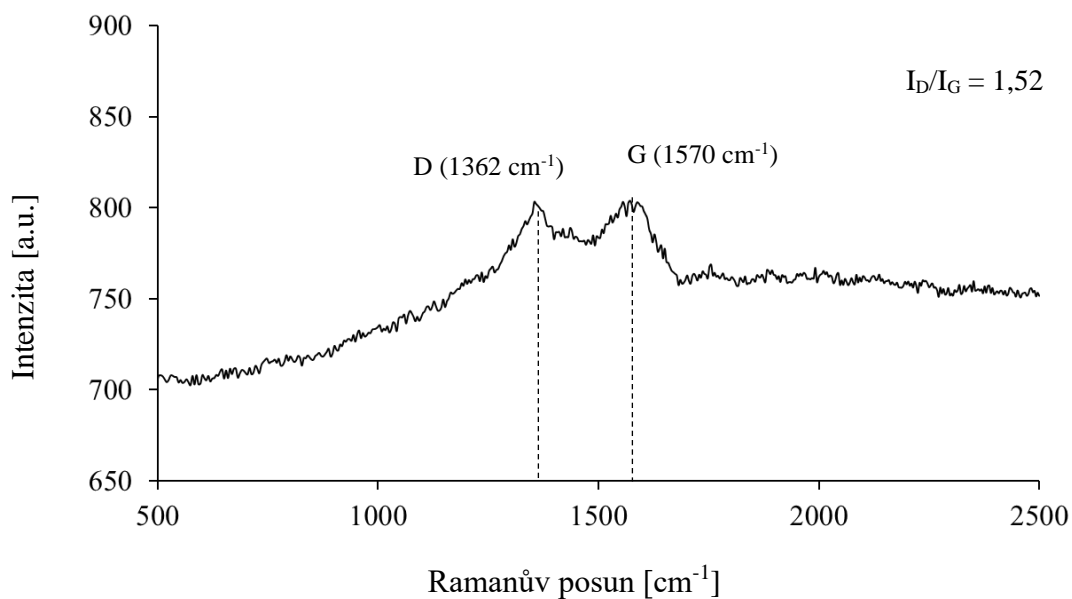
Obr. 21: Infračervená spektra BAPm, GO-PEG a BAPm GO-PEG

#### 4.2.4 Ramanova mikroskopie

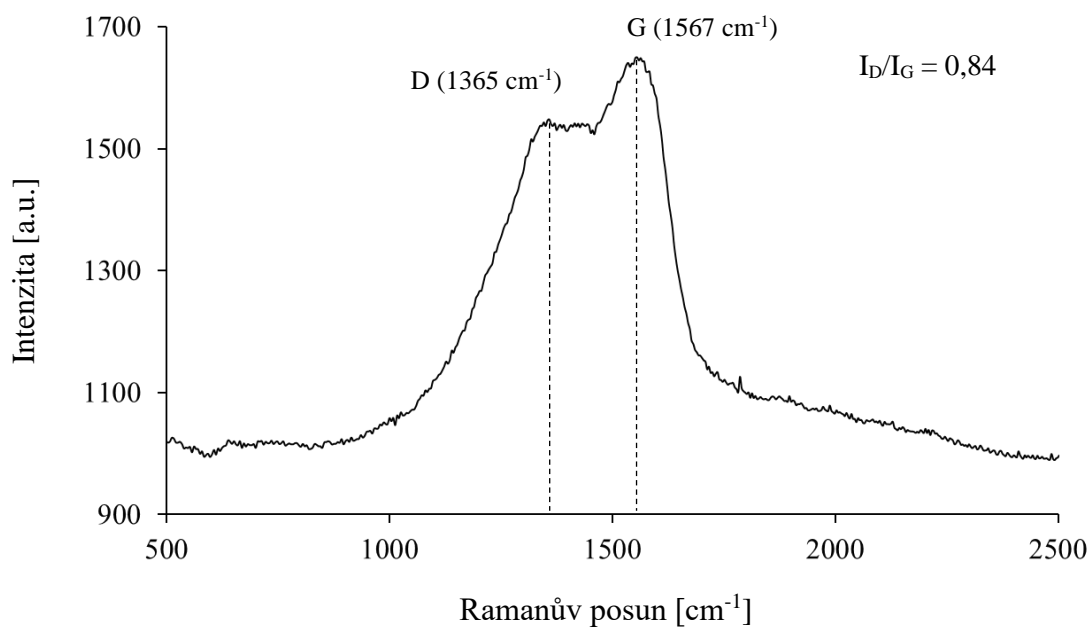
Ramanova mikroskopie je běžně používaná metoda pro analýzu uhlíkových materiálů díky své schopnosti detekovat dvojné a konjugované uhlíkové vazby. Ramanovým mikroskopem analyzované nanočástice mají charakteristické rysy ve svých spektrech, jako je přítomnost D a G pásů. Pás D představuje strukturální defekty v grafenovém listu mimo rovinu a vyskytuje se přibližně v  $1350\text{ cm}^{-1}$  (u GO-PEG v  $1370\text{ cm}^{-1}$ , Km GO-PEG v  $1362\text{ cm}^{-1}$ , pTm GO-PEG v  $1365\text{ cm}^{-1}$  a BAPm GO-PEG v  $1358\text{ cm}^{-1}$ ). Zatímco pás G odpovídá vibracím grafenu v rovině mezi vazbami uhlík-uhlík a nachází se přibližně v  $1580\text{ cm}^{-1}$  (u GO-PEG při  $1560\text{ cm}^{-1}$ , Km GO-PEG  $1570\text{ cm}^{-1}$ , pTm GO-PEG  $1567\text{ cm}^{-1}$  a BAPm GO-PEG  $1576\text{ cm}^{-1}$ ). Poměr mezi intenzitami D a G pásů ( $I_D/I_G$ ) se často používá k určení množství přítomných uhlíkových defektů. Když se poměr  $I_D/I_G$  zvýší, znamená to, že v materiálu je více defektů v důsledku narušení vazeb C=C způsobených strukturálními defekty nebo funkčními skupinami. Snížení poměru  $I_D/I_G$  může být zapříčiněno rozpadem více naskládaných vrstev grafenu, který vede k odhalení nedotčených vrstev pod nejvzdálenější vrstvou (Obr. 22-25) (Lalwani, Xing a Sitharaman, 2014; Talukdar *et al.*, 2014). Ramanovým mikroskopem byla zobrazena mapa pTm navázaného na GO-PEG, na kterém lze pozorovat nanočástice (Obr. 26).



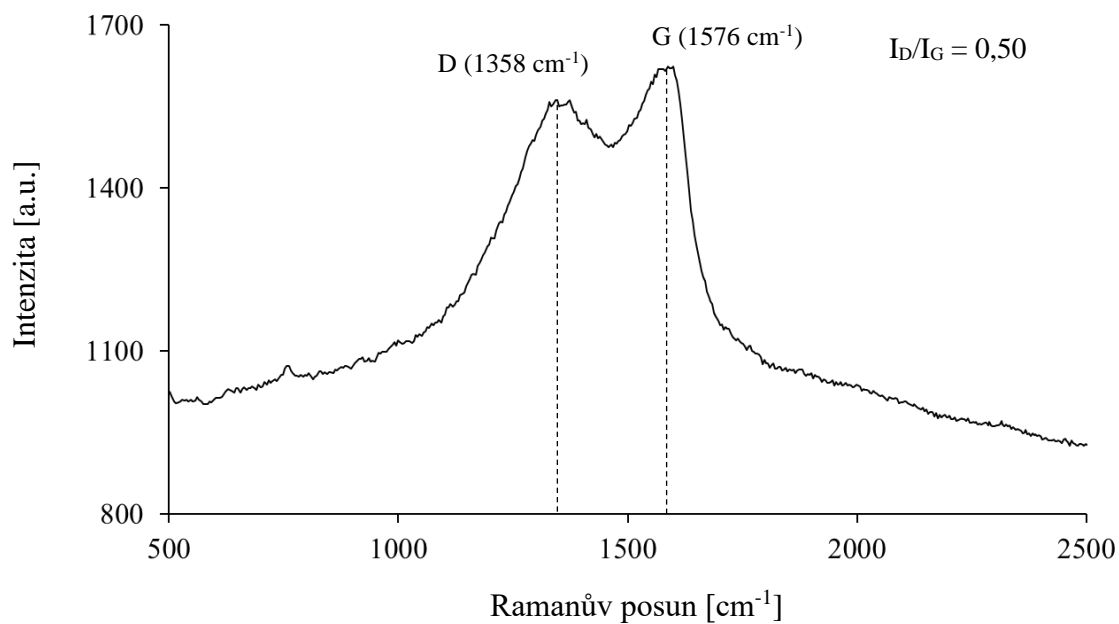
Obr. 22: Ramanovo spektrum GO-PEG



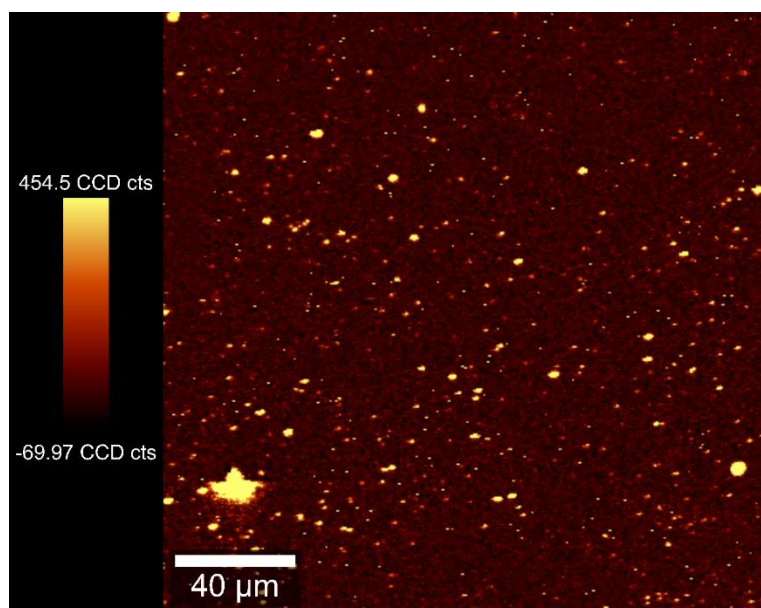
Obr. 23: Ramanovo spektrum funkcionalizovaného nanomateriálu Km GO-PEG



Obr. 24: Ramanovo spektrum funkcionalizovaného nanomateriálu pTm GO-PEG



Obr. 25: Ramanovo spektrum funkcionalizovaného nanomateriálu BAPm GO-PEG



Obr. 26: Ramanova mapa funkcionalizovaného materiálu pTm GO-PEG

#### 4.2.5 Zeta potenciál

U zásobního GO, PEGylovaného GO a funkcionalizovaného nanomateriálu CK byl v triplikátu měřen zeta potenciál (Tab. 1). Z uvedené tabulky je zjevné, že zeta potenciál zásobního roztoku GO byl negativní  $-33,13 \pm 0,47$  mV a po připojení osmi ramenného PEG-aminu byl změněn na  $-17,53 \pm 0,70$  mV. Tato změna zeta potenciálu je přisuzována napojení kladných aminových skupin PEGu na záporně nabitě kyslíkové skupiny GO. Po navázání Km na GO-PEG byl opět zeta potenciál zvýšen na  $-8,06 \pm 0,79$  mV, připojením pTm na  $-7,32 \pm 0,41$  mV a BAPm na  $6,29 \pm 0,27$  mV. Vytvořené komplexy mají zeta potenciál menší než -10 mV, a proto jsou brány jako neutrální (Clogston a Patri, 2011).

*Tab. 1: Analýza zeta potenciálu jednotlivých vzorků*

<b>Vzorek</b>	<b>Zeta potenciál <math>\pm</math> SD [mV]</b>
GO	$-33,13 \pm 0,47$
GO-PEG	$-17,53 \pm 0,70$
GO-PEG Km	$-8,06 \pm 0,79$
GO-PEG pTm	$-7,32 \pm 0,41$
GO-PEG BAPm	$-6,29 \pm 0,27$

### 4.3 Funkcionalizovaná koncentrace CK na GO-PEG a jejich dlouhodobá stabilita

Pomocí HPLC/UV-VIS analýzy byla určována funkcionalizovaná koncentrace CK na nanočásticích GO-PEG. Využitím kalibrační křivky byla stanovena nenavázaná koncentrace v supernatantu a následně navázaná. Tabulky představují úvodní koncentrace CK a navázané koncentrace, které byly poté přepočítány na procentuální zastoupení (LE % - loading efficiency) dle rovnice uvedené níže (Schéma 1) (Tab. 2-4).

$$\text{LE \%} = \frac{\text{navázaná koncentrace CK}}{\text{počáteční koncentrace CK}} \cdot 100$$

*Schéma 1: Rovnice výpočtu efektivnosti navázání cytokininů na grafen oxid*

Výsledky uvedené pro Km (Tab. 2), pTm (Tab. 3) a BAPm (Tab. 4) zobrazují, že na nanočástice GO-PEG bylo navázáno více než 90 % mnohonásobně ve vodě rozpustnějších CK derivátů. Jelikož vyšší koncentrace nad 1 mM vytvářely agregáty, pro následné testování na buňkách byly vybrány koncentrace 0,5 mM.

*Tab. 2: Funkcionalizovaná koncentrace Km GO-PEG*

Počáteční koncentrace [mM]	Navázaná koncentrace [mM]	LE %
<b>0,5</b>	<b>0,463</b>	<b>92,654 ± 0,857</b>
1	0,964	96,448 ± 0,295
1,5	1,450	96,673 ± 1,114
2	1,946	97,296 ± 0,033
2,5	2,466	98,635 ± 0,083
3	2,960	98,678 ± 0,243



Tab. 3: Funkcionalizovaná koncentrace pTm GO-PEG

Počáteční koncentrace [mM]	Navázaná koncentrace [mM]	LE %
<b>0,5</b>	<b>0,492</b>	<b>98,420 ± 0,589</b>
1	0,989	98,944 ± 0,299
1,5	1,492	99,491 ± 0,016
2	1,992	99,603 ± 0,133
2,5	2,492	99,689 ± 0,043
3	2,991	99,713 ± 0,068

Tab. 4: Funkcionalizovaná koncentrace BAPm GO-PEG

Počáteční koncentrace [mM]	Navázaná koncentrace [mM]	LE %
<b>0,5</b>	<b>0,471</b>	<b>92,917 ± 1,919</b>
1	0,941	94,115 ± 0,130
1,5	1,468	97,829 ± 0,214
2	1,980	99,023 ± 0,078
2,5	2,478	99,122 ± 0,051
3	2,960	98,505 ± 0,462

Tabulky 5 a 6 porovnávají navázané koncentrace na samotnou platformu GO připravené v rámci bakalářské práce a na PEGylovaný GO získané nyní. Pro nanoplatformu GO bylo stanoveno procentuální navázání (LE%) do 50 %, zatímco GO-PEG přes 90 %. Díky tomuto porovnání je zřejmé, že PEGylovaný GO má daleko vyšší kapacitu pro navázání látek a je tudíž i lepší pro budoucí experimenty.

Tab. 5: Porovnání funkcionalizované koncentrace  $K_m$  na GO a na GO-PEG

**Kinetin mesylát**

<b>GO</b>		<b>GO-PEG</b>	
7,714 $\mu\text{M}$	48,128 % ( $\pm 1,193$ )	<b>0,463 mM</b>	<b>92,654 % (<math>\pm 0,857</math>)</b>
13,179 $\mu\text{M}$	40,301 % ( $\pm 1,437$ )	0,964 mM	96,448 % ( $\pm 0,295$ )
21,214 $\mu\text{M}$	43,377 % ( $\pm 0,975$ )	1,450 mM	96,673 % ( $\pm 1,114$ )
<b>26,679 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>42,345 % (<math>\pm 0,874</math>)</b>	1,946 mM	97,296 % ( $\pm 0,033$ )
		2,466 mM	98,635 % ( $\pm 0,083$ )
		2,960 mM	98,678 % ( $\pm 0,243$ )

Tab. 6: Porovnání funkcionalizované koncentrace  $pT_m$  na GO a na GO-PEG

**p-topolin mesylát**

<b>GO</b>		<b>GO-PEG</b>	
0,296 $\mu\text{M}$	1,272 % ( $\pm 2,906$ )	<b>0,492 mM</b>	<b>98,420 % (<math>\pm 0,589</math>)</b>
2,074 $\mu\text{M}$	7,410 % ( $\pm 1,431$ )	0,989 mM	98,944 % ( $\pm 0,299$ )
9,481 $\mu\text{M}$	21,206 % ( $\pm 1,236$ )	1,492 mM	99,491 % ( $\pm 0,016$ )
<b>21,036 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>35,664 % (<math>\pm 1,664</math>)</b>	1,992 mM	99,603 % ( $\pm 0,133$ )
		2,492 mM	99,689 % ( $\pm 0,043$ )
		2,991 mM	99,713 % ( $\pm 0,068$ )

U funkcionalizovaných nanočástic GO-PEG cytokininovými deriváty byla zjišťována stabilita po dobu 2, 4, 6, 8, 24, 48 hod a 7, 14, 21 a 28 dní, při pokojové teplotě a pH 7,4. Byly sledovány koncentrace použité k testování na buňkách, tzn. Km 0,463 mM, pTm 0,492 mM a BAPm 0,471 mM. Zjištěné výsledky ukázaly, že v uvedených časech nebyla ani jedna látka uvolněna z nanoplatformy. To naznačuje, že všechny tři CK deriváty navázané na GO-PEG jsou krátkodobě i dlouhodobě stabilní a je možné je v uvedených podmínkách uchovávat.

#### 4.4 Biologické testování

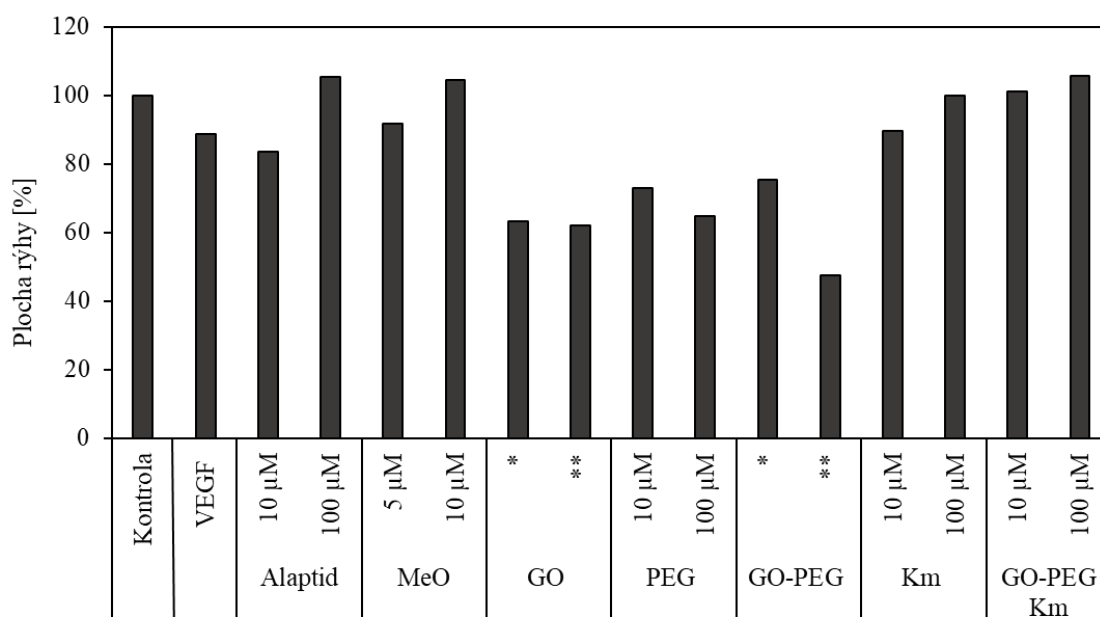
Test migrace je metoda, která zkoumá pohyb buněk do vytvořené rány a vyhodnocuje vliv jejího zacelení. I přes to, že tato *in vitro* metoda dokonale nereplikuje migraci buněk *in vivo*, částečně ale napodobuje pohyb buněk během hojení ran. Chování buněk během migrace může být, v závislosti na typu buněk, reprezentováno volně spojenými populacemi (např. fibroblasty) nebo buněčnými vrstvami (např. epitelální a endotelální buňky). Postup spočívá ve vytvoření rány a pořízení snímků. Po uplynutí příslušné doby byly pořízeny další snímky, ze kterých byla vyhodnocena účinnost buněčné migrace a změřena plocha zacelené rány (Rodriguez, Wu a Guan, 2005).

Tímto testem bylo zjišťováno, zda volné (nenavázané) CK deriváty a navázané na nanonosič GO-PEG měly efekt na migraci BJ linie fibroblastů a zacelily vytvořené rány. Test byl proveden Mgr. Lucií Rárovou, Ph.D. z Katedry experimentální biologie. V testování byly použity pouze Km a pTm, jelikož BAPm bude v budoucích experimentech otestován na rostlinných buňkách. Dále byly jako kontroly testovány látky: růstový faktor VEGF (pozitivní kontrola), alaptid (pozitivní kontrola) a methoxyestradiol (MeO) (negativní kontrola). Byly zvoleny dva časy ošetření fibroblastů – 8 hodin (Obr. 27 a 28) a 16 hodin (Obr. 29 a 30), po jejichž uplynutí byly pořízeny snímky rány a zhodnocen efekt migrace fibroblastů. U vzorků GO a GO-PEG není uvedena molární koncentrace (byl pouze určen počet nanočástic na ml), proto tyto dva vzorky byly ředěny stejně jako Km GO-PEG a pTm GO-PEG, aby byl zachován počet nanočástic (vzorek označen \* byl ředěn stejně, jako vzorky 10  $\mu\text{M}$  Km a pTm navázaných na GO-PEG; vzorek označen \*\* byl ředěn stejně jako vzorky 100  $\mu\text{M}$  Km a pTm navázaných na GO-PEG).

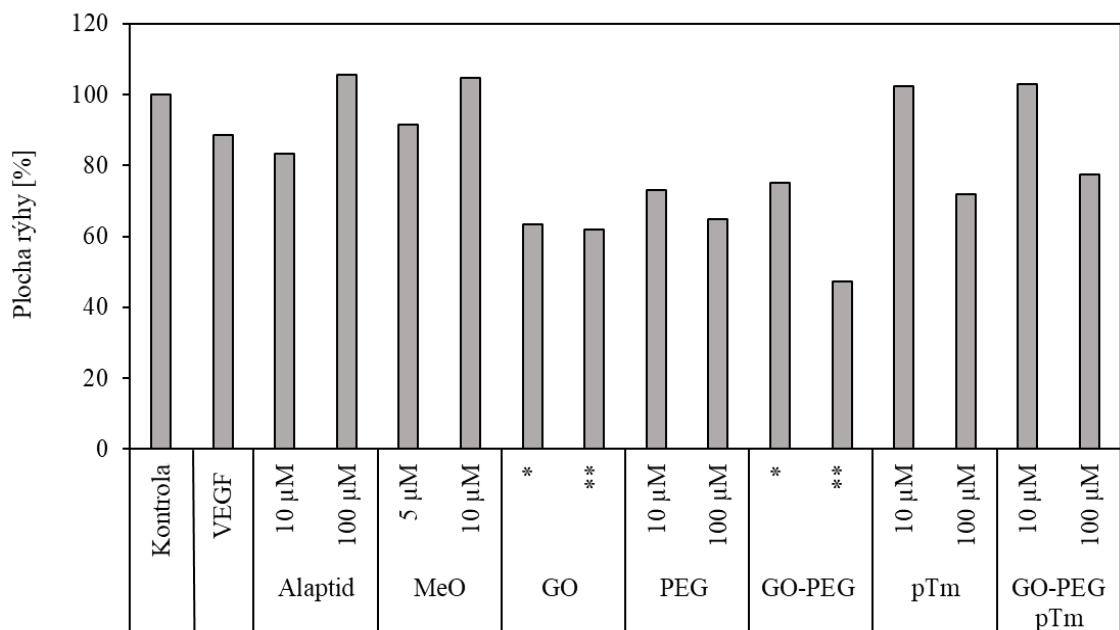
Vyhodnocení testu spočívá v tom, že čím je plocha rýhy menší, tím více buňky migrovaly do rány a docházelo k jejímu zmenšení. Získané výsledky byly vztaženy vůči neošetřené kontrole. Z níže uvedených výsledků měl po 8hodinové inkubaci vliv na fibroblastovou migraci GO (plocha rýhy činila 62 % a 63 %), PEG (73 % a 65 %) a GO-PEG (75 % a 47 %) (Obr. 27 nebo Obr. 28). Z testovaných CK derivátů měl největší účinek pTm v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  (72 %) a pTm GO-PEG 100  $\mu\text{M}$  (77 %) (Obr. 28). Po 16hodinové inkubaci měl opět vliv PEG v obou koncentracích (71 % a 60 %) (Obr. 29 nebo Obr. 30), dále z cytokininů Km 10  $\mu\text{M}$  (89 %) a Km GO-PEG v obou koncentracích (87 % a 78 %) (Obr. 29). Cytokinin pTm měl v tomto čase nejvyšší účinek nejen v koncentracích 10  $\mu\text{M}$  (45 %) a 100  $\mu\text{M}$  (49 %), ale také po navázání pTm na GO-PEG (v obou koncentracích) byla rýha oproti neošetřené kontrole 68 % a 72 %

(Obr. 30). Z těchto výsledků bylo vyvozeno, že po 8 i po 16hodinové inkubaci měl z CK největší vliv pTm a pTm GO-PEG. Odhad byl, že výraznější účinky budou mít CK navázané na GO-PEG, ovšem testování tento předpoklad potvrdilo pouze u Km po 16hodinové inkubaci.

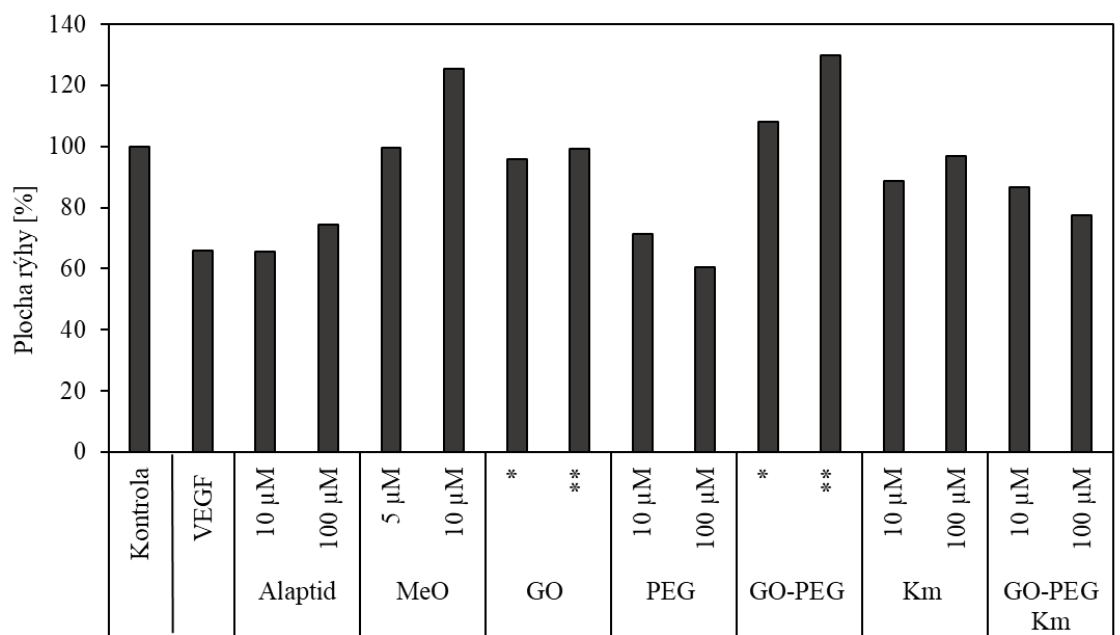
I přes to, že GO v této studii měl sloužit pouze jako přenašeč účinných látek, měl vliv na buněčnou migraci. Stejně tak PEG, který sloužil k modifikaci povrchu GO ke zvýšení stability ve fyziologických roztocích, měl rovněž pozitivní efekt. Největší vliv na zmenšení plochy rýhy měl GO-PEG (v koncentraci \*\*), kdy plocha dosahovala pouhých 47 %. Výsledek mohl být způsoben tím, že se PEG a jeho další deriváty standartně používají v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu v různých dermatologických přípravcích. V kosmetice slouží jako povrchově aktivní látky, emulgátory, pleťové kondicionéry a zvlhčovačla. Lze jej také nalézt ve veterinárních léčivech jako součást parenterálních, topických, oftalmických, orálních a rektálních přípravků (Jang, Shin a Kim, 2015).



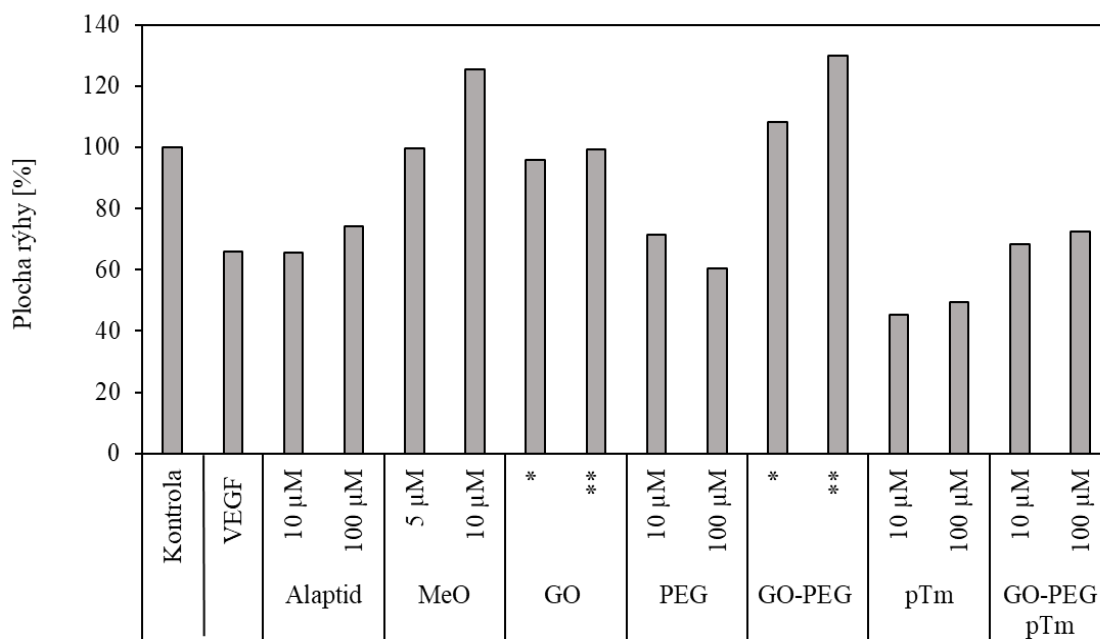
Obr. 27: Vliv volného Km a navázaného Km na nanonosič GO-PEG ovlivňující migraci fibroblastů po 8hodinovém ošetření



Obr. 28: Vliv volného pTm a navázaného pTm na nanonosič GO-PEG ovlivňující migraci fibroblastů po 8hodinovém ošetření



Obr. 29: Vliv volného Km a navázaného Km na nanonosič GO-PEG ovlivňující migraci fibroblastů po 16hodinovém ošetření



Obr. 30: Vliv volného pTm a navázaného pTm na nanosič GO-PEG ovlivňující migraci fibroblastů po 16hodinovém ošetření

## 5 Diskuse

Diplomová práce částečně navazovala na bakalářskou, během které byly nasyntetizovány dvě protonizované látky (kinetin mesylát a pT mesylát), které byly mnohonásobně rozpustné ve vodě. V diplomové práci byla připravena další látka, a to BAP mesylát, která byla charakterizována několika metodami. První metodou byla hmotnostní spektrometrie, která nepotvrdila protonizaci původní látky, naopak vyloučila změnu struktury nově protonizované. Čistota látky byla zjištěna metodou HPLC-UV/VIS, vykazující hodnotu vyšší než 99 %. Metoda XRPD byla použita k odlišení protonizované látky od původní. Ve výsledném difraktogramu měla původní látka BAP odlišné spektrum, než látka nově připravená – BAP mesylát. Analýza  $^1\text{H}$  NMR v poslední řadě doplnila potvrzení struktury této látky (Klos *et al.*, 2022).

Větší částice GO mají výraznější toxické účinky než nanočástice GO a zároveň rychleji agregují (Kiew *et al.*, 2016). Protože nanočástice byly využity v pozdějším testování na buňkách, musely být upraveny velikostně, a to delším působením vysoké teploty a ultrazvukových vln. K zobrazení nanočástic byl použit mikroskop AFM, kde částice GO byly velmi velké (označená částice odpovídala výškou více než 120 vrstvám), kdežto po úpravě měly nanočástice daleko menší laterální velikost, ale i výšku (označená nanočástice odpovídala monovrstvě). U zmenšených nanočástic byla provedena statistická analýza laterální velikosti. Ze získaných dat mělo až 95 % identifikovaných nanočástic z celkového počtu 1530 střední laterální velikost do 130 nm. Ze získaného počtu nanočástic byla stanovena koncentrace v 1 ml, která činila  $1,5 \cdot 10^9$  NPs/ml. Zvolenou metodou bylo potvrzeno, že došlo k razantní změně velikosti nanočástic.

Jelikož GO v přítomnosti solí v PBS agreguje, byl jeho povrch upraven PEGem. Nejen, že se touto úpravou zvyšuje stabilita a rozpustnost, ale zároveň se také snižuje toxicita a ovlivňuje povrchový náboj GO, který je bez této modifikace záporný (Oh a Park, 2014; Sack *et al.*, 2022). Úspěšnost PEGylace byla potvrzována AFM, kdy došlo ke změně laterální velikosti, výšky a tvaru z ostrého na kulatý. Další metodou SEM, kterou se běžně zobrazují nanomateriály a informují o struktuře a morfologii, byl zobrazen povrch nanočástic GO a po PEGylaci. Výsledné obrázky vykazovaly pozorovatelné změny ve struktuře, které potvrdily navázání PEGu na povrch GO. Poslední metoda, která potvrdila modifikaci povrchu GO, byla metoda FTIR. Ve spektru GO-PEG byly přítomny píky, které se ve spektrech samotného GO a PEG nevyskytovaly.



Funkcionalizovaný materiál GO-PEG cytokininovými deriváty byl charakterizován hned několika metodami. První metoda AFM zobrazovala změnu velikosti, která opět po navázání CK vzrostla. Metodou FTIR byly zjišťovány změny ve spektru po funkcionalizaci. Píky přítomné ve spektrech samotných CK v oblasti od  $1500\text{ cm}^{-1}$  do  $600\text{ cm}^{-1}$  byly poté viditelné i ve spektrech po jejich navázání na GO-PEG. Tyto metody potvrdily vznik vazeb mezi CK deriváty a GO-PEG. Pro doplnění charakterizace nanočástic byl použit Ramanův mikroskop, který se používá k analýze uhlíkových nanomateriálů. Ty ve svých spektrech mají přítomné charakteristické pásy D a G, které určují strukturální defekty a vazby mezi uhlíky. Poměr mezi intenzitami těchto pásů se využívá k určení množství uhlíkových defektů, které vznikají narušením vazeb po funkcionalizaci (Lalwani, Xing a Sitharaman, 2014; Talukdar *et al.*, 2014). Zmíněným mikroskopem byla taktéž vytvořena Ramanova mapa, kde byly zobrazeny nanočástice. U všech vzorků byl měřen zeta potenciál, který poskytoval informace o náboji nanočástic v roztoku, jelikož náboj ovlivňuje příjem nanočástic do buněk (Fröhlich, 2012). Zásobní GO měl negativní náboj způsobený přítomností kyslíkových skupin, po PEGylaci byl vlivem kladných aminových skupin náboj zvýšen, a po navázání mesylátů změněn na náboj neutrální.

Analýzou HPLC-UV/VIS byla stanovena navázaná koncentrace na GO-PEG. V bakalářské práci na GO bylo navázáno  $26,679\text{ }\mu\text{M}$  kinetin mesylátu (42 %) a  $21,036\text{ }\mu\text{M}$  p-topolin mesylátu (35 %). Oproti tomu byl v diplomové práci použit PEGylovaný GO, díky čemuž se podařilo navázat daleko vyšší koncentrace, a to  $0,463\text{ mM}$  kinetin mesylátu,  $0,492\text{ mM}$  p-topolin mesylátu a BAP mesylátu  $0,471\text{ mM}$ . U každé ze tří koncentrací to činilo přes 90 %. Vyšší kapacita je přisuzována 8-ramennému PEGu, který byl využit k modifikaci povrchu GO. Z toho plyne, že pro další experimenty je vhodnější použít PEGylovaný, jak z důvodu vyšší kapacity, tak i vzhledem k nižší toxicitě, zvýšené rozpustnosti i stabilitě. Touto metodou byla u funkcionalizovaných nanočástic zjišťována dlouhodobá stabilita. Výsledky naznačily, že vytvořené vzorky byly i po 28 dnech stabilní, proto je možné je ve zvolených podmínkách uchovávat.

Cílem biologického testování bylo zjistit, zda mají CK deriváty (Km a pTm) lepší vliv na migraci fibroblastů a na zacelení vytvořené rány samotné či navázané na přenašeč GO-PEG. V předložené diplomové práci byl otestován pouze Km a pTm. Látka BAPm bude předmětem dalších studií na rostlinných buňkách. Ze získaných výsledků měl po 8hodinové inkubaci nejlepší výsledky, v porovnání ze dvou testovaných cytokininů, pTm ( $100\text{ }\mu\text{M}$ ) a pTm GO-PEG ( $100\text{ }\mu\text{M}$ ). Z těchto dvou výsledků měl jen o 5 % lepší účinky

nenavázaný pTm. Po 16 hodinách vykazoval příznivé výsledky Km (10  $\mu$ M) a Km GO-PEG (v obou koncentracích), pTm (v obou koncentracích) a po navázání pTm na GO-PEG (v obou koncentracích). V porovnání mezi navázaným a nenavázaným Km měl lepší efekt Km GO-PEG v koncentraci 100  $\mu$ M, díky kterému měla plocha rýhy 78 %. U pTm a pTm GO-PEG měly účinky oba, ale v porovnání s nenavázaným pTm, fibroblasty migrovaly více. Kromě vlivu CK zajímavých výsledků dosahoval i GO, PEG a GO-PEG, a to i přes fakt, že v této studii měl GO sloužit pouze jen jako přenašeč látek a PEG k modifikaci povrchu GO. Výsledek mohl být způsoben tím, že PEG se běžně používá v kosmetice jako emulgátor, pleťový kondicionér a účinkuje jako zvlhčovač (Jang, Shin a Kim, 2015).

## 6 Závěr

V uvedené diplomové práci byl připraven další protonizovaný CK za použití methansulfonové kyseliny – BAP mesylát. Látka byla zcharakterizována pomocí fyzikálně-chemických metod k odlišení od výchozí látky. Spolu s dalšími dvěma CK deriváty, které byly již připraveny v bakalářské práci, byly navázány na GO nanomateriál, který sloužil jako přenašeč látek. Nanomateriál byl v první řadě upraven na vhodnou velikost a modifikován polymerem PEG, který snižuje toxicitu a degradaci a zároveň vylepšuje rozpustnost ve fyziologických podmínkách. Na rozdíl od bakalářské práce, díky použití polymeru, byla zvětšena kapacita nanočástic, na které bylo navázáno mnohonásobně více CK než na nemodifikovaný. Po úpravě a funkcionalizaci GO následovalo buněčné testování zaměřené na migraci fibroblastů a zacelení vytvořené rány. Předpokládaným výsledkem práce bylo, že funkcionalizovaný nanomateriál CK deriváty bude poskytovat daleko výraznější biodostupnost pro buňky a tím i lepší výsledky v testu migrace fibroblastů. Závěrem lze říci, že výraznější účinky byly viditelné po 16hodinové inkubaci, kde volný p-topolin mesylát měl lepší výsledky než při navázání na přenašeč, kdežto u kinetin mesylátu tomu bylo naopak.

## 7 Použitá literatura

Akhtar, S. S. *et al.* (2020) „Role of Cytokinins for Interactions of Plants With Microbial Pathogens and Pest Insects", *Frontiers in Plant Science*, 10, s. 1–12. doi: 10.3389/fpls.2019.01777.

Albanese, A., Tang, P. S. a Chan, W. C. W. (2012) „The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems", *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, s. 1–18. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.

Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T. C. a Donnelly, R. F. (2015) „Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum", *Pharmaceutics*, 7, s. 438–470. doi: 10.3390/pharmaceutics7040438.

Berge, U., Kristensen, P. a Rattan, S. I. S. (2006) „Kinetin-induced differentiation of normal human keratinocytes undergoing aging in vitro", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067, s. 332–336. doi: 10.1196/annals.1354.045.

Bolund, L., Jensen, P. K. A. a Bjerring, P. (1991) „Method and composition for treating hyperproliferative skin diseases using 6-aminopurine cytokinins", *US Patent 5,021,422*.

Boulaiz, H. *et al.* (2011) „Nanomedicine : Application Areas and Development Prospects", *International Journal of Molecular Sciences*, 12, s. 3303–3321. doi: 10.3390/ijms12053303.

Brown, M. B. *et al.* (2008) „Transdermal drug delivery systems: Skin perturbation devices", *Methods in Molecular Biology*, 437, s. 119–139. doi: 10.1007/978-1-59745-210-6\_5.

Clogston, J. D. a Patri, A. K. (2011) „Zeta Potential Measurement", *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, s. 63–70. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1.

Dideikin, A. T. a Vul', A. Y. (2019) „Graphene oxide and derivatives: The place in graphene family", *Frontiers in Physics*, 6. doi: 10.3389/fphy.2018.00149.

Doležal, K. *et al.* (2007) „Preparation , biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, s. 3737–3747. doi: 10.1016/j.bmc.2007.03.038.

Fathy, M. *et al.* (2022) „Cytokinins: Wide-Spread Signaling Hormones from Plants to Humans with High Medical Potential", *Nutrients*, 14, s. 1–15. doi: 10.3390/nu14071495.

Foroozandeh, P. a Aziz, A. A. (2018) „Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles", *Nanoscale Research Letters*, 13. doi: 10.1186/s11671-018-

2728-6.

Fröhlich, E. (2012) „The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles", *International Journal of Nanomedicine*, 7, s. 5577–5591. doi: 10.2147/IJN.S36111.

Giusto, E. *et al.* (2022) „Graphene Oxide Nanoplatfoms to Enhance Cisplatin-Based Drug Delivery in Anticancer Therapy", *Nanomaterials*, 12, s. 1–17. doi: 10.3390/nano12142372.

Gonzalez, G. *et al.* (2021) „Cytokinin Plant Hormones Have Neuroprotective Activity in In Vitro Models of Parkinson ' s Disease", *Molecules*, 26, s. 2–20. doi: 10.3390/molecules26020361.

Gupta, Sanjeev *et al.* (2013) „Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments", *Indian Dermatology Online Journal*, 4, s. 267. doi: 10.4103/2229-5178.120635.

Hönig, M. *et al.* (2018) „New cytokinin derivatives possess UVA and UVB photoprotective effect on human skin cells and prevent oxidative stress", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, s. 946–957. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.03.043.

Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M. a Czerpak, R. (2016) „N6-benzyladenine and kinetin influence antioxidative stress parameters in human skin fibroblasts", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 413, s. 97–107. doi: 10.1007/s11010-015-2642-5.

Jang, H.-J., Shin, C. Y. a Kim, K. (2015) „Safety Evaluation of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds for Cosmetic Use", *Toxicological Research*, 31, s. 105–136. doi: 10.5487/TR.2015.31.2.105

Ji, C. *et al.* (2010) „Trans-Zeatin attenuates ultraviolet induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes", *International Journal of Molecular Medicine*, 26, s. 257–263. doi: 10.3892/ijmm.

Jokerst, J. V *et al.* (2011) „Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy", *Nanomedicine*, 6, s. 715–728. doi: 10.2217/NNM.11.19.

Kadlecová, A. *et al.* (2019) „The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging", *Ageing Research Reviews*, 55. doi: 10.1016/j.arr.2019.100958.

Kieber, J. J. a Schaller, G. E. (2014) „Cytokinins", in *The Arabidopsis Book*, s. 1–35. doi: 10.1199/tab.0168.

Kiew, S. F. *et al.* (2016) „Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers:

A review", *Journal of Controlled Release*, 226, s. 217–228. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.015.

Kladko, D. *et al.* (2021) „Nanomaterial Shape Influence on Cell Behavior", *International Journal of Molecular Sciences*, 22, s. 1–27. doi: 10.3390/ijms22105266

Klos, D. (2020) „Příprava, zvýšení rozpustnosti a biologická aktivita purinových derivátů pro biotechnologické aplikace", Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.

Klos, D. *et al.* (2022) „New Water-Soluble Cytokinin Derivatives and Their Beneficial Impact on Barley Yield and Photosynthesis", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, s. 7288–7301. doi: 10.1021/acs.jafc.2c00981.

Lalwani, G., Xing, W. a Sitharaman, B. (2014) „Enzymatic degradation of oxidized and reduced graphene nanoribbons by lignin peroxidase", *Journal of Materials Chemistry*, s. 6354–6362. doi: 10.1039/c4tb00976b.

Letham, D. S. (1963) „Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*", *Life Sciences*, 2, s. 569–573. doi: 10.1016/0024-3205(63)90108-5.

Li, D. *et al.* (2008) „Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets", *Nature nanotechnology*, 3, s. 101–105. doi: 10.1038/nnano.2007.451.

Liu, Z. *et al.* (2008) „PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 130, s. 10876–10877. doi: 10.1021/am3019367

McNeil, S. E. (2005) „Nanotechnology for the biologist", *Journal of Leukocyte Biology*, 78, s. 585–594. doi: 10.1189/jlb.0205074.

Miller, C. O. *et al.* (1955) „Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid", *Journal of the American Chemical Society*, 77, s. 1392. doi: 10.1021/ja01610a105.

Miller, C. O. *et al.* (1956) „Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division", *Journal of the American Chemical Society*, 78, s. 1375–1380. doi: 10.1021/ja01588a032.

Mok, D. W. S. a Mok, M. C. (2001) „Cytokinin metabolism and action", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, s. 89–118. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.89.

Novoselov, K. S. *et al.* (2004) „Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films", *Science*, 306, s. 666–669. doi: 10.1126/science.1102896

- Oh, N. a Park, J.-H. (2014) „Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells", *International Journal of Nanomedicine*, 9, s. 51–63. doi: 10.2147/IJN.S26592.
- Oliveira, A. M. L. *et al.* (2022) „Graphene Oxide Thin Films with Drug Delivery Function", *Nanomaterials*, 12, s. 1–20. doi: 10.3390/nano12071149.
- Oshchepkov, M. S. *et al.* (2020) „Natural and synthetic cytokinins and their applications in biotechnology, agrochemistry and medicine", *Russian Chemical Reviews*, 89, s. 787–810. doi: 10.1070/rcr4921.
- Pan, S. a Aksay, I. A. (2011) „Factors Controlling the Size of Graphene Oxide Sheets Produced via the Graphite Oxide Route", *ACS Nano*, 5, s. 4073–4083. doi: 10.1021/nn200666r.
- Pan, Y., Sahoo, N. G. a Li, L. (2012) „The application of graphene oxide in drug delivery", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9, s. 1365–1376. doi: 10.1517/17425247.2012.729575.
- Plíhalová, L. *et al.* (2015) „Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology", *New Biotechnology*, 33, s. 614–624. doi: 10.1016/j.nbt.2015.11.009.
- Rattan, S. I. S. a Clark, B. F. C. (1994) „Kinetin Delays the Onset of Aging Characteristics in Human Fibroblasts", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201, s. 665–672. doi: 10.1006/bbrc.1994.1752.
- Rattan, S. I. S. a Sodagam, L. (2005) „Gerontomodulatory and Youth-Preserving Effects of Zeatin on Human Skin Fibroblasts Undergoing Aging In Vitro", *Rejuvenation Research*, 8, s. 46–57. doi: 10.1089/rej.2005.8.46.
- Rodriguez, L. G., Wu, X. a Guan, J. L. (2005) „Wound-healing assay", *Methods in molecular biology*, 294, s. 23–29. doi: 10.1385/1-59259-860-9:023.
- Sack, S. *et al.* (2022) „The role of size, charge, and cholesterol of cell membrane models in interactions with graphene oxide", *Journal of Hazardous Materials*, 432, s. 1–10. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128661.
- Sanità, G., Carrese, B. a Lamberti, A. (2020) „Nanoparticle Surface Functionalization : How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization", *Frontiers in Molecular Bioscience*, 7, s. 1–20. doi: 10.3389/fmolb.2020.587012.
- Silva, F. A. L. S. *et al.* (2021) „Graphene oxide topical administration: skin permeability studies", *Materials*, 14, s. 1–15. doi: 10.3390/ma14112810.

- Singh, M., McKenzie, K. a Ma, X. (2017) „Effect of dimethyl sulfoxide on in vitro proliferation of skin fibroblast cells", *Journal of Biotech Research*, 8, s. 78–82.
- Singh, R. a Lillard, J. W. (2009) „Nanoparticle-based targeted drug delivery", *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), s. 215–223. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
- Stuart, B. H. (2004) *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. s. 46–48. doi: 10.1002/0470011149
- Talukdar, Y. *et al.* (2014) „The effects of graphene nanostructures on mesenchymal stem cells", *Biomaterials*, 35(18), s. 4863–4877. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.054.
- Tararov, V. I. *et al.* (2014) „Chemical modification of the plant isoprenoid cytokinin N6-isopentenyladenosine yields a selective inhibitor of human enterovirus 71 replication", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90(1–62). doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.048.
- Ventola, C. L. (2017) „Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs", *Pharmacy and Therapeutics*, 42(12), s. 742–755. PMID: 29234213; PMCID: PMC5720487.
- Voller, J. *et al.* (2010) „Anticancer activity of natural cytokinins : A structure – activity relationship study", *Phytochemistry*, 71, s. 1350–1359. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.04.018.
- Voller, J. *et al.* (2017) „Plant Hormone Cytokinins for Modulating Human Aging and Age-Related Diseases", in *Hormones in Ageing and Longevity*, s. 311–335. doi: 10.1007/978-3-319-63001-4\_14
- Vostálová, J. *et al.* (2023) „Photoprotective properties of new derivatives of kinetin", *Photochemical & Photobiological Sciences*, 22, s. 357–369. doi: 10.1007/s43630-022-00320-1.
- Yue, H. *et al.* (2012) „The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses", *Biomaterials*, 33(16), s. 4013–4021. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.021.
- Zeb, A. *et al.* (2019) „Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin", *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49(5), s. 485–517. doi: 10.1007/s40005-018-00418-8.