

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Příprava a charakterizace PEGylované nanoplatfomy
na bázi grafen oxidu s navázanými deriváty cisplatiny,
a jejich protinádorová aktivita**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Michaela Gapčová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ludmila Žárská, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Michaela Gapčová
Název práce:	Příprava a charakterizace PEGylované nanoplatformy na bázi grafen oxidu s navázanými deriváty cisplatiny, a jejich protinádorová aktivita
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Ludmila Žárská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Nádorová onemocnění patří mezi hlavní příčiny úmrtí po celém světě, a proto se stále vyvíjí nové strategie léčby zaměřené na snížení recidivy, inhibici invaze a metastáz. Jednou z moderních technik léčby rakoviny jsou hybridní nanoplatformy sloužící k aktivnímu podávání léků. Mezi hlavní výhody těchto nanoplatform se řadí snížení nežádoucích účinků nebo vyšší efektivita dodávání léčiv.

Teoretická část diplomové práce je věnována charakteristice nanonosičů léčiv a jejich využití při léčbě nádorů. Cílem experimentální části je připravit a charakterizovat funkcionalizované nanoplatformy na bázi grafen oxidu mikroskopickými a také spektroskopickými metodami. Dále je vyhodnocena koncentrace úspěšně navázaného protinádorového léčiva na funkcionalizovanou nanoplatformu, a následně studován protinádorový efekt *in vitro*.

Klíčová slova	Nanotechnologie, nanonosiče léčiv, grafen oxid, cisplatina, protinádorová aktivita
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Michaela Gapčová
Title of thesis	Preparation and characterization of PEGylated graphene oxide-based nanoplateforms loaded with cisplatin derivatives and their anticancer activity
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Ludmila Žárská, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, therefore new treatment strategies are constantly being developed to reduce cancer relapse, inhibit invasion and metastasis. One of the modern techniques for cancer treatment is hybrid nanoplateforms used for active drug delivery. The main advantages of these nanoplateforms include reduction of side effects or higher efficiency of drug delivery.

The theoretical part of the thesis is devoted to the characterization of drug nanocarriers and their use in cancer treatment. The aim of the experimental part is to prepare and characterize functionalized graphene oxide based nanoplateforms by microscopic as well as spectroscopic methods. Furthermore, the concentration of successfully bound anticancer drug on the functionalized nanoplateform is evaluated and subsequently the *in vitro* anticancer effect is studied.

Keywords	Nanotechnology, drug nanocarriers, graphene oxide, cisplatin, anticancer activity
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením Mgr. Ludmily Žárské, Ph.D., za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 10. 5. 2024

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Ludmile Žárské, Ph.D. za odborné vedení práce, motivaci a věcné připomínky. Dále bych také ráda poděkovala doc. RNDr. Václavu Rancovi za cenné rady při vypracování práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. a Mgr. Tomášovi Malinovi, Ph.D. za pomoc při měření a zpracování výsledných dat. V neposlední řadě Eirini Ioannou, Ph.D. a Mgr. Janovi Kolaříkovi, Ph.D. za analýzy. Ráda bych také poděkovala za finanční podporu projektu Nano4Tarmed, díky kterému jsem měla možnost zúčastnit se krátkodobých zahraničních stáží a školení.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 Nanotechnologie	10
2.2 Nanonosiče léčiv	10
2.2.1 Aplikace nanonosičů v medicíně	11
2.2.2 Biodistribuce léčiv	12
2.2.3 Mechanismy cílení nanonosičů	13
2.2.4 Klasifikace systémů využívaných jako nosiče léčiv	14
2.2.4.1 Polymerní nanočástice	15
2.2.4.2 Dendrimery	15
2.2.4.3 Lipozomy	16
2.2.4.4 Polymerní micely	16
2.2.4.5 Anorganické nanonosiče	16
2.3 Grafen	17
2.3.1 Grafen oxid	18
2.3.2 Funkcionalizace grafenu a grafen oxidu	20
2.4 Cisplatina	23
2.4.1 Mechanismus účinku cisplatin	24
2.4.2 Modifikace cisplatin monosacharidy	24
3 Experimentální část	25
3.1 Materiál	25
3.1.1 Použité chemikálie a roztoky	25
3.1.2 Testované sloučeniny	26
3.1.3 Kultivační média	26

3.1.4	Buněčné kultury	26
3.1.5	Přístrojové vybavení	26
3.1.6	Programy.....	27
3.2	Metody	28
3.2.1	Syntéza léčiv na bázi cisplatiny	28
3.2.2	Optimalizace velikosti nanočástic grafen oxidu	29
3.2.3	Funkcionalizace grafen oxidu PEGem	29
3.2.4	Charakterizace nanoplateform na bázi grafen oxidu	29
3.2.5	Navázání derivátů cisplatiny na nanoplateformu GO-PEG.....	30
3.2.6	Zobrazení buněk konfokálním mikroskopem	31
3.2.7	MTT test	31
3.2.8	Značení buněk pro fluorescenční mikroskopii.....	32
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	Charakterizace nanoplateformy na bázi GO.....	34
4.1.1	Mikroskopie atomárních sil	34
4.1.2	Skenovací elektronový mikroskop.....	37
4.1.3	Infračervená spektroskopie	38
4.1.4	Ramanova mikroskopie	40
4.2	Efektivita navázání derivátů cisplatiny na nanoplateformu GO-PEG.....	42
4.3	Zobrazení buněk konfokálním mikroskopem	43
4.4	Analýza viability buněk – MTT test.....	45
4.5	Analýza viability buněk fluorescenčním mikroskopem	49
5	Závěr	54
6	Použitá literatura	56

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	atomic absorption spectroscopy
AFM	atomic force microscopy
CTR1	copper transporter 1
CVD	chemical vapor deposition
EPR	enhanced permeability and retention
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GAF	graphene acid
GLUT1	glucose transporter type 1
GLUT3	glucose transporter type 3
GLUT5	glucose transporter type 5
GO	graphene oxide
GO-PEG	PEGylated graphene oxide
NPs	nanoparticles
PAMAM	poly(amido amine)
PEG	polyethylene glycol
PEI	poly(ethylene imine)
PPI	poly(propylene imine)
PVA	polyvinyl alcohol
RCPTM	Regional Centre of Advanced Technologies and Materials
RES	reticuloendothelial system
rGO	reduced graphene oxide
SEM	scanning electron microscope
SPR	surface plasmon resonance

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Zhoubná nádorová onemocnění jsou skupinou onemocnění, které se řadí mezi nejzávažnější problémy současné medicíny. Často jsou způsobeny mnoha faktory, včetně genetických, fyzikálních a chemických vlivů, či vlivů životního stylu. Mezi metody léčby nádorových onemocnění patří chirurgické zákroky, chemoterapie a radioterapie, přičemž po chirurgickém odstranění je nejčastějším způsobem léčby chemoterapie. Chemoterapie zahrnuje použití chemických cytostatik, která potlačují maligní buněčný růst a zastavují jejich dělení. Nejúspěšnějšími chemoterapeutiky jsou sloučeniny na bázi platiny, konkrétně cisplatina, karboplatina a oxaliplatina, jejichž hlavním cílem účinku je jaderná DNA.

Prvním, a stále nejpoužívanějším cytostatikem na bázi platiny, je cisplatina, která má však řadu vedlejších účinků. Velkou překážku v léčbě nádorových onemocnění představuje nefrotoxicita, ototoxicita či rezistence maligních buněk k cisplatině. Strategií k překonání těchto nežádoucích účinků je modifikace cisplatiny či využití nanonosičů pro cílené doručování léčiv. Nanonosiče na bázi grafen oxidu jsou díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem potencionálně atraktivní pro lékařské aplikace. Pro zlepšení biokompatibility nanočástic grafen oxidu lze jejich povrch modifikovat pomocí biopolymerů.

V rámci teoretické části diplomové práce byly charakterizovány nanonosiče léčiv a jejich využití při léčbě nádorových onemocnění. Dále bylo cílem zpracovat literární rešerši se zaměřením na popis funkcionalizace grafen oxidu a mechanismu účinku cisplatiny.

Cílem experimentální části bylo připravit a charakterizovat funkcionalizované nanoplatformy grafen oxidu mikroskopickými a také spektroskopickými metodami. Po navázání léčiv na bázi cisplatiny byla stanovena koncentrace navázaného léčiva, byl proveden *in vitro* test životaschopnosti buněk, který byl dále potvrzen fluorescenční mikroskopií.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Nanotechnologie

Nanotechnologie je oblast vědy a průmyslu, která se zabývá návrhem, syntézou, popisem a aplikací materiálů, jejichž nejmenší funkční jednotka se pohybuje alespoň v jednom rozměru v řádu 1 až 100 nanometrů (nm). Nanotechnologie přispívá k rozvoji téměř všech vědních oborů, zahrnujících biologii, chemii, fyziku, informatiku, materiálové vědy a inženýrství. Nabízí tak nejen zdokonalení současných technik, ale dokonce zavedení zcela nových nástrojů (Saini et al., 2010).

Nanotechnologie nachází své uplatnění v širokém spektru oblastí, jako je elektronika, energetika, kosmický průmysl, potravinářský průmysl a především medicína. Nanomedicína je specifické odvětví medicíny využívající nanotechnologie k diagnostice a léčbě onemocnění. Pravděpodobně nejdůležitější oblastí nanomedicíny je nanoonkologie, jež využívá nanomateriály při léčbě rakoviny (Ranganathan et al., 2012).

2.2 Nanonosiče léčiv

Nanonosiče jsou definovány jako koloidní struktury, jejichž velikost je měřena v nanometrech. V závislosti na jejich použití se velikost těchto částic obvykle liší a pohybuje se od několika jednotek až po stovky nanometrů. Obecně však platí, že je velikost částic navržena tak, aby mohly procházet endotelem nádoru a následně se v nádoru také hromadit. Velikost částic dále určuje, zda cirkulující částice projde opsonizací a rychlým odstraněním retikuloendotelovým systémem (RES), který je distribuován převážně v játrech, slezině, plicích a kostní dřeni. Pokud není požadováno doručení léčiva do těchto tkání, je nutné povrch nanočástic upravit tak, aby unikl účinkům RES. Jednou z metod je modifikace polymerního složení částice pomocí PEGylace, tedy adice polyethylenglykolu (PEG) na její povrch. Další možností je výroba částic s hydrofilním povrchem (Haley et al., 2008).

Nanočástice jsou v poslední době vyhledávaným nástrojem jakožto nanonosiče s cíleným podáváním léčiv. Důvodem je zejména jejich schopnost transportovat velké množství léků, prodlužovat dobu cirkulace a podporovat selektivní akumulaci v nádoru prostřednictvím zvýšené permeability a retenčního efektu (EPR) (Yu et al., 2010). Díky vysokému poměru plochy k objemu mají navíc nanonosiče schopnost modifikovat základní vlastnosti a terapeutickou účinnost léčiv. Zlepšují například dispergovatelnost hydrofobních sloučenin, stabilitu terapeutických látek, jejich řízené uvolňování nebo farmakokinetiku a biodistribuci léčivých látek, čímž minimalizují toxicitu (Mishra et al., 2010).

Celá řada těchto výhod je spojena s vyšší účinností oproti konvenčním lékovým terapiím. Rovněž je snazší modifikovat fyzikálně-chemické vlastnosti nanonosičů, jako je složení, velikost, tvar, náboj či povrchové vlastnosti. Stanovení těchto vlastností může do značné míry přispět k predikci fyzikální stability, účinnosti zachycení léčiva a dalších aspektů. Nejdůležitějšími charakteristikami nanonosičů jsou však velikost, tvar a disperzita, které významně ovlivňují eliminaci nanonosičů, jejich adhezi nebo polčas cirkulace (Alshawwa et al., 2022).

Úspěšné dodání léčiva do cílové oblasti vyžaduje nejen ideální nanonosič, ale také účinný způsob podání. Nanonosiče mohou být podávány mnoha různými cestami, včetně parentální, nazální, transdermální nebo perorální. Představují tak inovativní způsob podávání léčiv, a dokonce umožňují průnik léčivé látky hematoencefalickou bariérou, kterou většina léků nepronikne (Chenthamara et al., 2019).

2.2.1 Aplikace nanonosičů v medicíně

Nanomedicína je specializovaný obor, který se zaměřuje na využití nanotechnologií k urychlení diagnostiky, zlepšení terapeutických přístupů a prevenci široké škály klinických stavů. Tento inovativní obor se uplatňuje zejména v oblasti podávání léčiv, diagnostických metod či zobrazovacích technik. Vzhledem ke změnám četnosti onemocnění, úmrtnosti a odpovědi na léčbu chronických onemocnění, jako je rakovina, neurodegenerativní poruchy a metabolický syndrom, je třeba vyvinout novější technologie pro včasnou a rychlou diagnostiku. Právě materiály založené na nanotechnologiích se staly zdrojem mnoha slibných příležitostí v těchto oblastech medicíny (Ranganathan et al., 2012).

Nanonosiče hrají klíčovou roli v terapeutických aplikačních systémech, jelikož umožňují cílené podávání léčiv do konkrétních buněk nebo tkání v těle. Navíc jsou schopny řízeného uvolňování léčiv, což může vést k prodlouženému nebo zpožděnému uvolnění léku. V diagnostických aplikacích nabízejí detekci v molekulárním měřítku. Mají schopnost identifikovat drobné abnormality jako jsou virové fragmenty, prekancerózní buňky a markery onemocnění, které často zůstávají běžnými diagnostickými metodami neodhaleny. Nanočástice také přispívají ke zvýšení účinnosti lékařských zobrazovacích technik. Slouží jako kontrastní látky, které výrazně zlepšují citlivost a specifickou zobrazovacích metod, jako je magnetická rezonance (Zhang et al., 2008).

V posledních letech zaznamenala oblast nanomedicíny obrovský rozvoj, což vedlo ke zlepšení léčby závažných onemocnění. Na trh bylo dosud uvedeno více než 90 nanočásticových systémů pro podávání léčiv, které přitahují celosvětovou pozornost díky svým výjimečným terapeutickým účinkům. První léčivo na bázi nanočástic, Doxil neboli Caelyx, bylo schváleno roku 1995 Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Jedná se o PEGylovaný lipozomální doxorubicin, který je určený především k léčbě rakoviny vaječníků a Kaposiho sarkomu souvisejícího s AIDS. Mezi další schválená nanoléčiva se řadí například Rapamune, Abraxane a Mylotarg. Mnoho dalších je v různých fázích vývoje, a celá řada z nich vykazuje potenciál pro lékařské aplikace (Park et al., 2022; Jia et al., 2023).

2.2.2 Biodistribuce léčiv

Biodistribuce nanočástic s navázaným léčivem je ovlivněna nesčítelným počtem faktorů, včetně vlastností samotných nanočástic, způsobu podání a fyziologického prostředí, do kterého jsou nanonosiče vnášeny. Existuje mnoho způsobů podání nanonosičů pro biomedicínské aplikace, avšak v současnosti je intravenózní injekce nejvíce studovanou metodou (Almeida et al., 2011).

Po intravenózním podání jsou nanonosiče distribuovány krevním řečištěm po celém těle s následným rozptýlením ve tkáních, ve kterých se mohou při dlouhodobém podávání hromadit. Nanonosiče mají v krevním řečišti tendenci adsorbovat na svůj povrch složky plazmy – opsoniny, čímž dojde ke změně jejich fyzikálně-chemických vlastností, konkrétně náboje a velikosti. Opsoniny zprostředkovávají rozpoznání nanonosičů monocyty a podskupinami tkáňových makrofágů. Tyto opsonizované nanonosiče jsou poté z krevního oběhu odstraněny buňkami RES (Su et al., 2019).

Ačkoli se zdá, že opsonizace má při eliminaci prostřednictvím RES zásadní význam, je zřejmé, že velikost a tvar nanočástic také značně ovlivňují RES vychytávání. Velikost je jedním z klíčových parametrů biologické distribuce a doby cirkulace. Endotel plicních a svalových kapilár se obecně vyznačuje spojitou morfologií, což umožňuje transport pouze malých molekul o velikosti menší než 3 nm. Naopak ledviny mají krevní cévy tvořené endotelem s póry, a játra se slezinou mají cévy s přerušovaným endotelem. Tyto endotelie tak umožňují průnik větších nanonosičů do tkání zásobovaných takovými cévami (Almeida et al., 2011; Chrastina et al., 2011).

Důležitým aspektem při navrhování nanonosiče je tedy výroba nanosystému s optimálními vlastnostmi. V ideálním případě by měla být velikost větší než krevní kapiláry, ale zároveň dostatečně malá, aby se skryly před pohlcením makrofágy. Pro překonání četných bariér se pro cílené podávání léčiv stále častěji využívají povrchové modifikace nanonosičů. Povrchově modifikované nanonosiče zajistí prodlouženou dobu cirkulace a minimalizují riziko opsonizace (Chenthamara et al., 2019).

Dalším metodou, jak zlepšit biodistribuci, je optimalizace způsobu podání nanonosičů. Alternativní cesty podání, jako je intranodální nebo subkutánní injekce, umožňují nanonosičům vstoupit do lymfatického systému před systémovou cirkulací. Jinou metodou pro překonání extravazace je plicní podání, konkrétně inhalace (Mitchell et al., 2021).

2.2.3 Mechanismy cílení nanonosičů

Hlavní výhodou nanotechnologií při léčbě rakoviny je cílené dodávání léčiva. Klíčovou schopností je odlišit zhoubné buňky od nezhoubných, a selektivně zlikvidovat buňky zhoubné. Na odlišení těchto typů buněk se podílejí dva základní mechanismy, pasivní a aktivní cílení. Pasivní cílení využívá efektu zvýšené permeability a retence, čímž stupňuje koncentraci nanočástic v nádoru. Zatímco aktivní cílení zahrnuje specifické molekulární rozpoznávání antigenů exprimovaných na povrchu nádorových buněk, s cílem navést nanočástice k maligním buňkám. Tyto dvě strategie cílení lze použít nezávisle na sobě, anebo v kombinaci. Mezi důležité faktory, které je třeba při výběru zvážit, patří složení nosiče a výběr cílového ligandu. Oba mechanismy však těží z povrchových modifikací nanočástic, které snižují vychytávání makrofágovým fagocytárním systémem, a prodlužují tak dobu cirkulace (Gmeiner et al., 2015).

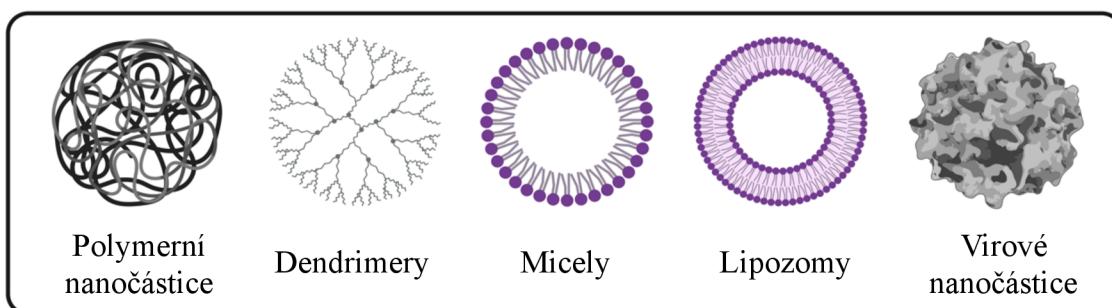
Pasivní cílení závisí na hyperpropustné povaze nádorových cév. Přítomnost mezer mezi endotelovými buňkami a nesprávné uspořádání cévního endotelu vedou k netěsnosti cév, což umožňuje průnik nanonosičů do nádorového intersticia. Nefunkční lymfatická drenáž navíc přispívá k nedostatečnému zpětnému vychytávání extravazovaných molekul oběhem, které má za následek zadržování nanonosičů v nádorové tkáni. Kombinací těchto patofyziologických znaků vzniká efekt zvýšené permeability a retence, jenž je hojně používán v oblasti nanomedicíny. Mnoho léčiv využívajících EPR efekt je v současné době v klinických studiích, a některá jsou dokonce schválena v klinické praxi, například Doxil, Myocet a DaunoXome (Kunjachan et al., 2014).

Aktivní cílení je založeno na povrchové modifikaci nanonosičů ligandy, které jsou specifické pro receptory nadměrně exprimované na nádorových buňkách. Interakce mezi ligandem a receptorem jsou možné pouze tehdy, pokud jsou obě složky v těsné blízkosti, tedy ve vzdálenosti menší než 0,5 nm. Mezi ligandy, které se běžně uplatňují ke zvýšení specifčnosti nanonosičů, se řadí růstové faktory, transferin či folátový ligand. Léčiva jsou při aktivním cílení dopravena do místa určení v důsledku krevního oběhu a extravazace, po níž následuje intratumorální retence a distribuce (Bae et al., 2011; Gmeiner et al., 2015).

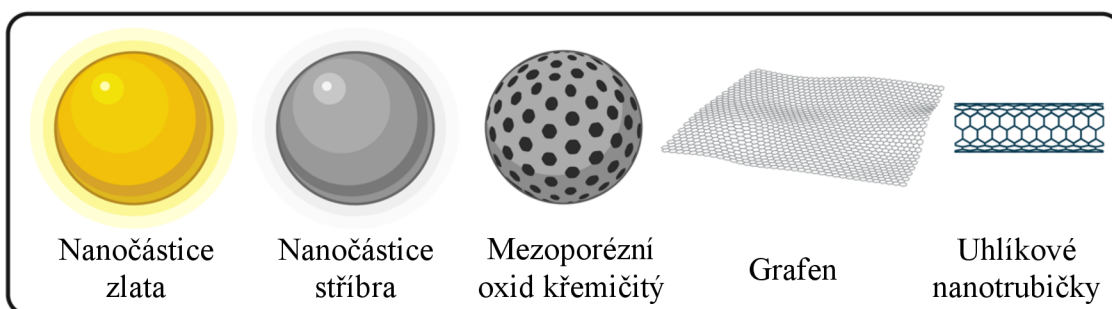
2.2.4 Klasifikace systémů využívaných jako nosiče léčiv

Jako systémy pro podávání léčiv byly vyzkoušeny různé nanomateriály, zahrnující jak biologické látky jako je albumin, želatina a fosfolipidy používané v lipozomech, tak chemické látky, které obsahují různé polymery. Existuje tedy mnoho různých typů nanosystémů, přičemž v některých případech se skládají pouze z léčiva pokrytého pomocnými látkami, označovanými jako nanokrystaly. Ve většině aplikací jsou však léčiva rozpuštěna v matrici částic nebo zapouzdřena do specifických nanonosičů. Tyto nosiče mohou mít různou podobu, a dělí se na organické a anorganické. Mezi organické nanonosiče se řadí nanosystémy tvořené polymery (polymerní nanočástice, micely, dendrimery), lipidy (lipozomy) či viry. Anorganické nanonosiče jsou tvořeny materiály jako je zlato, stříbro, křemík či uhlík (Yu et al., 2010; Bamrungsap et al., 2012).

Organické nanonosiče



Anorganické nanonosiče



Obr. 1: Schématické znázornění jednotlivých typů nanonosičů a jejich rozdělení (převzato a upraveno z Mitchell et al., 2011).

2.2.4.1 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou koloidní částice o rozměrech od 1 do 1000 nm, které mohou být tvořeny přírodními nebo syntetickými, biodegradovatelnými i nebiodegradovatelnými materiály. Účinné látky mohou nést zapouzdřené uvnitř polymerního jádra nebo adsorbované na svém povrchu. Tyto nanočástice se dělí na nanokapsle a nanosféry, lišící se svou morfologií. Nanokapsle se vyznačují olejovým jádrem, v němž je obvykle rozpuštěno léčivo obklopené polymerním obalem, který řídí způsob uvolňování léčiva z jádra. Naproti tomu nanosféry jsou tvořeny kontinuální polymerní maticí, v níž může být léčivo buď zapouzdřeno nebo adsorbováno na povrchu. (Zielińska et al., 2020).

Doposud bylo na trh uvedeno jen jedno léčivo zahrnující polymerní nanočástice, s názvem Abraxane. Jedná se o paklitaxel ve formě částic o velikosti 130 nm navázanými na albumin. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv schválil Abraxane v roce 2005 pro léčbu karcinomu pankreatu a metastazujícího karcinomu prsu. V roce 2012 byl pak schválen k léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (Jia et al., 2023).

2.2.4.2 Dendrimery

Dendrimery jsou polymerní makromolekuly, které se vyznačují symetrickou, vysoce rozvětvenou trojrozměrnou strukturou. Molekuly mají často kulovitý tvar s jádrem ve středu, z něhož vybíhají dendrony. Na konce těchto dendronů mohou být kovalentně nebo nekovalentně navázány biologicky aktivní molekuly, geny, léčiva a další skupiny. Dendrimery s terminálními aminovými ($-NH_2$) nebo hydroxylovými ($-OH$) skupinami jsou klasifikovány jako úplné dendrimery, zatímco ty, které jsou zakončeny karboxylovými ($-COOH$) skupinami se označují jako polodendrimery (Bober et al., 2022).

Léčiva jsou dendrimery transportována dvěma způsoby, prostřednictvím nekovalentních nebo kovalentních interakcí. V případě nekovalentní interakce jsou molekuly léčiva zapouzdřeny uvnitř dendrimerů, čímž zvyšují dispergovatelnost lipofilních léčiv ve vodě. Ke kovalentní interakci může dojít pomocí stabilních vazeb, zejména u dendrimerů s vlastní terapeutickou aktivitou, nebo prostřednictvím štěpitelných vazeb, které by se měly rozštěpit až po dosažení cíle (Caminade et al., 2014).

Nejvíce studovanými dendrimery pro biomedicínské aplikace jsou polyamidoaminy (PAMAM) a polypropyleniminy (PPI), pravděpodobně z důvodu jejich rozsáhlé komerční dostupnosti. Avšak kvůli přítomnosti aminoskupin mají dendrimery omezené možnosti klinického použití (Janaszewska et al., 2019).

2.2.4.3 Lipozomy

Lipozomy jsou sférické vezikuly složené z jedné nebo více fosfolipidových dvojvrstev, které ohraničují vodní prostor. Velikost těchto vezikul se pohybuje od několika nanometrů po několik mikrometrů, nicméně lipozomy využívané pro lékařské účely mají velikost mezi 50 a 450 nm. Díky své morfologii, která se velmi podobá morfologii buněčných membrán, a schopnosti inkorporovat širokou škálu látek, jsou lipozomy považovány za téměř ideální systém pro transport léčiv (Bozzuto et al., 2015).

Lipozomy se řadí mezi nejstarší, a zároveň nejúspěšnější nanomedicínské systémy, což dokládá velké množství schválených léčiv a léčiv procházejících klinickými studiemi. Nejznámějším příkladem schváleného léčiva je Doxil/Caelyx, což je obchodní název pro lipozomální doxorubicin. Dalším typem protinádorového lipozomálního přípravku je Vyxeos, který byl schválen pro léčbu akutní myeloidní leukémie, nebo DaunoXome, schválený k léčbě Kaposiho sarkomu souvisejícího s AIDS (Luiz et al., 2023).

2.2.4.4 Polymerní micely

Polymerní micely se skládají ze sféricky tvarovaných, amfifilních bloků kopolymerů o průměru 10 až 100 nm. Ve vodném prostředí se samovolně sdružují, přičemž vzniká struktura tvořená kulovým hydrofobním jádrem a vnějším hydrofilním obalem. Celý systém je dispergovatelný ve vodě a je vhodný především pro podávání hydrofobních léčiv, která se akumulují v jádře (Majumder et al., 2020).

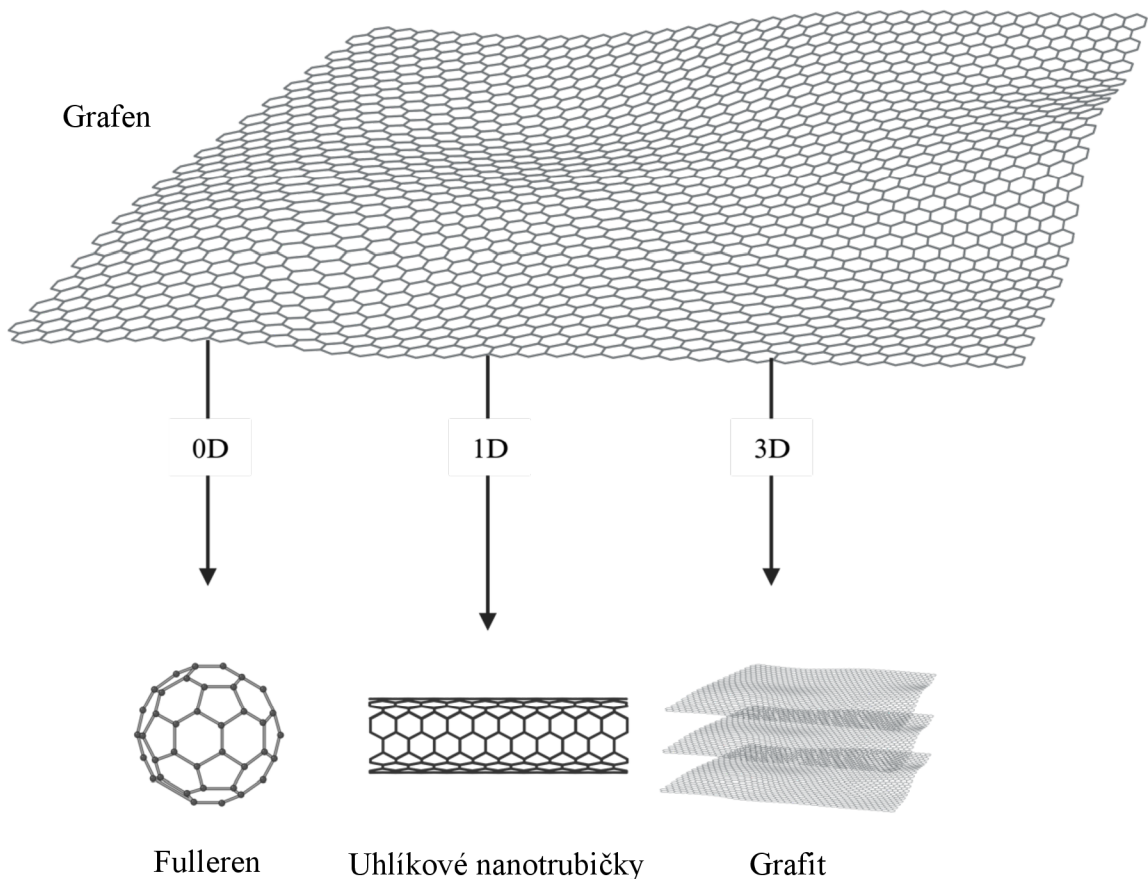
Do polymerních micel může být inkorporována celá řada molekul léčiv, a to buď fyzikální enkapsulací nebo kovalentním připojením. Jedním z nich je i Genexol-PM, tedy polymerní micelární preparát paklitaxelu, který byl schválen v Jižní Koreji pro léčbu rakoviny prsu a nemalobuněčného karcinomu plic (Werner et al., 2013).

2.2.4.5 Anorganické nanonosiče

Anorganické nanonosiče mohou být složeny z různých materiálů, od zlata, stříbra, křemíku až po kvantové tečky či nanonosiče na bázi uhlíku. Zlaté nanočástice jsou nejlépe prozkoumané, a spolu se stříbrnými mají specifické využití při analýze povrchové plazmonové rezonance (SPR). Dalším významným materiálem je oxid železitý, který tvoří většinu schválených anorganických nanoléčiv, kupříkladu InFed, Ferrlecit či Venofer. Rovněž materiály na bázi uhlíku přitahují v poslední době velkou pozornost, zejména pak uhlíkové nanotrubičky, grafen a jeho deriváty (Lin et al., 2016; Mitchell et al., 2021).

2.3 Grafen

Grafen představuje jednoatomovou vrstvu uhlíku, uspořádanou do dvourozměrné (2D) hexagonální mřížky spojené vazbami sp^2 . Uhlíkové atomy obsahují tři elektrony tvořící silné σ -vazby, kdežto čtvrtý elektron je dostupný pro π -vazby. Grafen je základním stavebním kamenem pro grafitové materiály všech ostatních rozměrů. Může být zabalen do fullerenů s nulovým rozměrem (0D), svinut do nanotrubiček s jedním rozměrem (1D) nebo poskládán do trojrozměrného (3D) grafitu. Další variantou jsou grafenové kvantové tečky, které představují fragmenty grafenu s nulovým rozměrem (0D). Díky svým jedinečným fyzikálně-chemickým, elektrickým, optickým a mechanickým vlastnostem, se grafen a jeho deriváty stávají ideálním materiálem pro širokou škálu aplikací. Zejména pro skladování energie, biosenzory, podávání léčiv či fototermální terapii (Geim et al., 2007; Sattari et al., 2021).



Obr. 2: Vybrané modifikace uhlíku (převzato a upraveno z Geim et al., 2007).

Průmyslový grafen se připravuje mnoha výrobními metodami, které lze obecně rozdělit do dvou skupin. Jednou z nich je syntéza shora dolů (top-down), a druhou je technika zdola nahoru (bottom-up). Při syntéze shora dolů dochází k redukci rozměrů prekurzorů, tedy z 3D grafitu na 2D grafen, zatímco syntéza zdola nahoru představuje rozměrové zvětšení prekurzorů. Syntéza shora dolů obsahuje metody jako je exfoliace v kapalně fázi nebo chemická exfoliace, a tyto metody poskytují velké množství grafenových listů relativně nízké kvality. V případě syntézy zdola nahoru jsou využívány metody chemické depozice z plynné fáze (CVD) a epitaxní růst na karbidu křemíku (SiC), a současně vznikají kvalitnější grafenové listy nanosené na substrát (Wang et al., 2017).

Kromě elektronické a chemické aplikace grafenu se neustále rozšiřuje jeho využití v oblasti biomedicíny. Mimořádné mechanické vlastnosti grafenu nabízejí jeho uplatnění v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. Vzhledem ke kombinaci naprosté tenkosti, vodivosti a pevnosti se také stává ideálním nosičem pro zobrazování biomolekul v transmisní elektronové mikroskopii. Grafen je zároveň lipofilní, což umožňuje průnik membránou buněk při podávání léčiv. V neposlední řadě mohou deriváty grafenu rozpouštět a vázat molekuly léčiva na základě velkého povrchu a delokalizovaných π elektronů, tudíž mají možnost stát se samotnými nosiči léčiv (Novoselov et al., 2012).

Grafen má však i přes výše zmíněné mimořádné vlastnosti několik nevýhod, a zásadní z nich je nízká dispergovatelnost ve vodných roztocích. Hlavními strategiemi k překonání tohoto problému jsou oxidace na grafen oxid (GO), výroba redukovaného grafen oxidu (rGO) nebo funkcionalizace hydrofilními funkčními skupinami (Sattari et al., 2021).

2.3.1 Grafen oxid

Grafen oxid (GO) je vrstevnatá uhlíková struktura s funkčními skupinami obsahujícími kyslík, jako například epoxidové, karboxylové, karbonylové nebo hydroxylové. Tyto funkční skupiny jsou navázány na obou stranách vrstvy, i na okrajích roviny, což vede ke směsi sp^2 a sp^3 hybridizovaných atomů uhlíku. Podobně, jako jakýkoli jiný 2D uhlíkový materiál, může mít i GO jednovrstevnou nebo vícevrstevnou strukturu. Grafen oxid lze syntetizovat oxidací grafitu na oxid grafitu s následnou exfoliací na GO. Vlastnosti materiálu jsou významně ovlivněny metodou syntézy, která má vliv na typ a množství skupin obsahujících kyslík ve vzniklém GO (Jiříčková et al., 2022).

Grafen oxid disponuje několika významnými vlastnostmi, které jsou klíčové pro biologické aplikace, zejména pro použití jako nanonosiče protinádorových léčiv. První z nich je obrovská plocha povrchu, která dosahuje přibližně 2600 m²/g, což GO poskytuje vysokou kapacitu pro navázání léčiv. Další důležitou vlastností GO je dobrá dispergovatelnost ve vodě. Grafen oxid dispergovaný ve vodě má záporný povrchový náboj v důsledku ionizace skupin kyseliny karboxylové a hydroxylové. Tento záporný náboj je dostatečně vysoký na to, aby vytvořil elektrostatické odpuzování, které zajišťuje stabilní rozptýlení GO ve vodě. Navíc je zeta potenciál suspenze GO citlivý na pH, a tato unikátní vlastnost GO umožňuje řízené uvolňování léčiv v závislosti na specifickém pH prostředí. Uvádí se, že zabezpečuje vyšší míru uvolňování léčiva při kyselém pH oproti neutrálnímu pH. V neposlední řadě má GO jedinečné optické vlastnosti včetně fotoluminiscence v blízké infračervené oblasti (570 nm) a optické absorpce. Fotoluminiscence by mohla zajistit přímé sledování vnitrobuněčného umístění nanočástic na bázi GO, a to bez nutnosti konjugace s externími fluorescenčními látkami (Kiew et al., 2016).

Všeobecně je známo, že je GO syntetizován převážně chemickou oxidací přírodního grafitu. Poprvé byl GO syntetizován v roce 1859 sirem Benjaminem Collinsem Brodiem, při oxidaci grafitu chlorečnanem draselným a kyselinou dusičnou. Bylo zjištěno, že je materiál rozpustný v čisté nebo zásadité vodě, ale ne v kyselém prostředí, a proto tento produkt označil jako grafenovou kyselinu. O necelých 40 let později Staudenmaier upravil Brodieho metodu tím, že změnil způsob přidávání chlorečnanu, a navíc do směsi přidal kyselinu sírovou. Téměř 60 let poté vyvinul Hummers a Offeman nejznámější a nejpoužívanější metodu syntézy, takzvanou Hummersovu metodu (Dreyer et al., 2010).

Hummersova metoda vznikla roku 1958, přičemž se jedná o relativně rychlou konvenční metodu syntézy GO. Tato metoda využívá dusičnan sodný a manganistan draselný rozpuštěný v koncentrované kyselině sírové k oxidaci grafitu na oxid grafitu. Přestože se Hummersova metoda těšila značné oblibě díky své jednoduchosti a rychlému provedení, narazila na několik nedostatků, včetně tvorby toxických plynů, zbytkových dusičnanů či nízkého výtěžku. V posledních dvou desetiletích bylo proto vyvinuto úsilí o zmírnění těchto problémů modifikací Hummersovy metody (Yu et al., 2016).

Grafen oxid našel své uplatnění i pro biologické aplikace, jako je doručování genů při léčbě genetických poruch včetně rakoviny. Tato terapeutická metoda využívá genové vektory k ochraně DNA před degradací nukleázami. Dalším možným využitím v oblasti medicíny je podávání léčiv či jejich cílené uvolňování. V neposlední řadě je GO v oblasti diagnostiky součástí biosenzorů (Jiříčková et al., 2022).

2.3.2 Funkcionalizace grafenu a grafen oxidu

Funkcionalizaci lze obecně definovat jako připojení chemické funkční skupiny na povrch nanočástic, s následnou možností měnit jejich fyzikální či chemické vlastnosti. Funkcionalizace, ať už kovalentními nebo nekovalentními metodami, představuje nejvýznamnější způsob, jak zlepšit funkčnost, dispergovatelnost ve vodě a zpracovatelnost do nových materiálů a zařízení. Kovalentní funkcionalizace je běžnější a je zprostředkována kovalentními vazbami, kdežto při nekovalentní funkcionalizaci jsou funkční skupiny vázány nejčastěji prostřednictvím slabých van der Waalsových sil. Z hlediska vlastností mohou kovalentní metody poskytnout lepší stabilitu a mechanickou odolnost, zatímco nekovalentní metody mohou zachovat elektrickou vodivost (Boukhvalov et al., 2009). Kovalentní funkcionalizace je doprovázena strukturálními změnami, které mohou probíhat na konci grafenových listů anebo na jejich povrchu. Na rozdíl od kovalentní funkcionalizace, jsou změny ve strukturální geometrii nekovalentně funkcionalizovaného grafenu zanedbatelné (Kuila et al., 2012; Spinato et al., 2014).

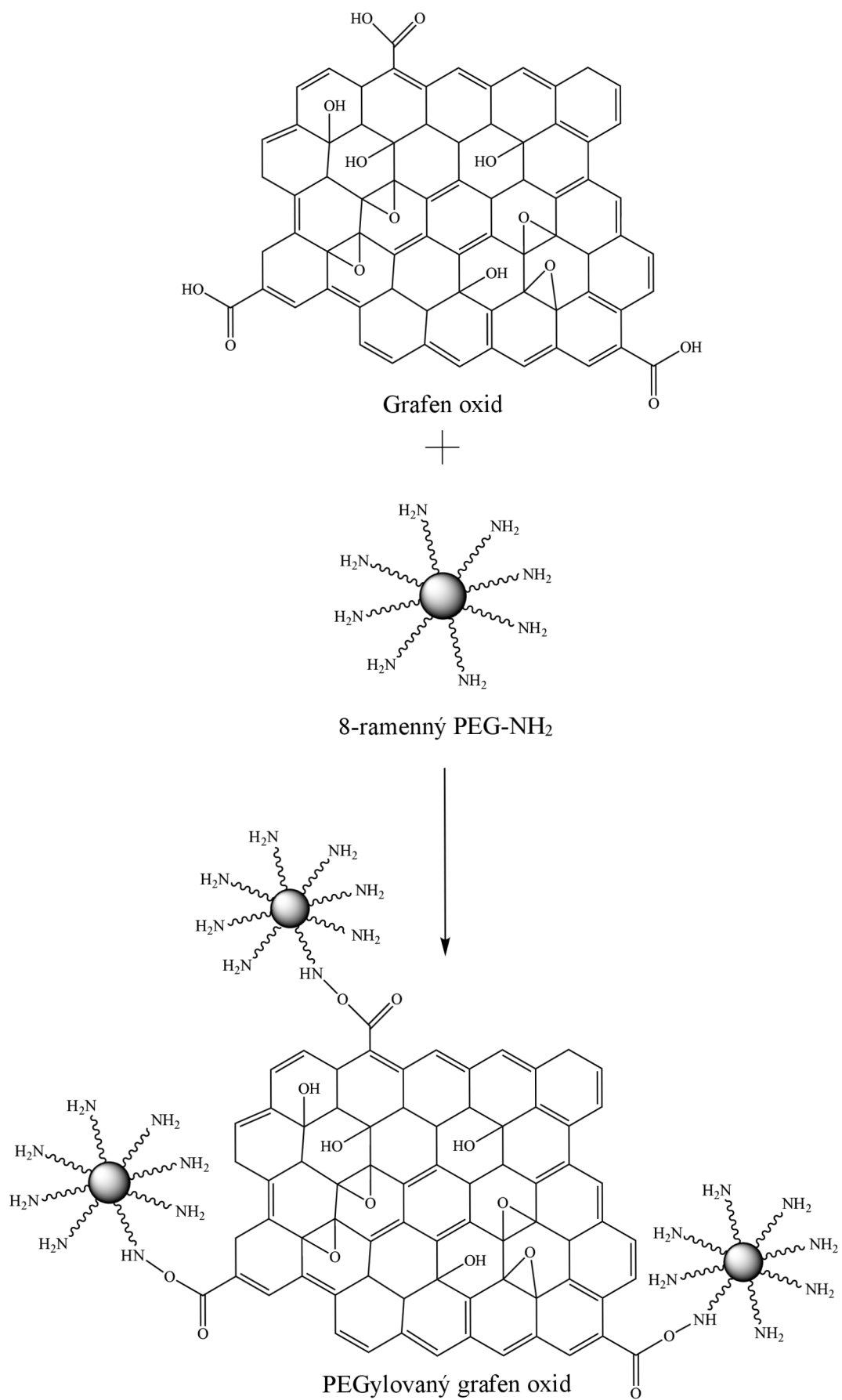
Díky velkému množství funkčních skupin obsahujících kyslík na povrchu GO, je jeho kovalentní funkcionalizace snazší než u samotného grafenu. Kovalentní funkcionalizace povrchu GO zahrnuje chemickou vazbu ve vodě rozpustných polymerů a jiných sloučenin, například aminoskupin, polyethylenglykolu (PEG), polyvinylalkoholu (PVA) nebo polyethyleniminu (PEI). Zároveň však GO podléhá nekovalentní vazbě s některými molekulami prostřednictvím hydrofobních interakcí, π - π interakcí nebo van der Waalsových sil. Mezi tyto molekuly patří amfifilní polymery, aromatické sloučeniny či konjugované polymery. Především amfifilní polymery jsou hojně využívány ke zvýšení dispergovatelnosti a schopnosti ukládat léčiva (Pan et al., 2012).

Existuje několik metod, jak modifikovat nebo funkcionalizovat GO, které vedou k tvorbě různých derivátů. Většinou se však GO využívá k výrobě redukovaného GO (rGO), což je forma GO s nižším obsahem kyslíku, která vzniká chemickou nebo termickou redukcí GO (Guo et al., 2021).

Nejrozšířenější cílenou modifikací GO pro zlepšení biokompatibility je PEGylace čili funkcionalizace PEGem. Polyethylenglykol je hydrofilní neiontový polyether, který je netoxický a biokompatibilní, FDA byl schválen jako farmaceutická pomocná látka. Tento polymer je tvořen hydroxylovými skupinami na konci řetězce, jež jsou spojeny etherovými vazbami. Obecně je rozpustný ve vodě, alkoholu, acetonu a chloroformu, mísitelný s glykoly, ale prakticky nerozpustný v etheru (Jain et al., 2010).

Polyethylenglykol může být lineární nebo rozvětvený a jeho fyzikálně chemické vlastnosti závisí na délce řetězce. Rozvětvený PEG obsahuje minimálně 3 lineární ramena spojená s centrálním jádrem, přičemž všechna ramena mají stejnou délku i strukturu. V oblasti dodávání a řízeného uvolňování léčiv se nejčastěji využívá 4, 6 a 8-ramenný PEG. Ve srovnání s lineárním má rozvětvený PEG řadu mimořádných vlastností. Rozvětvený PEG má více modifikovatelných funkčních skupin na konci řetězce, a také může tvořit nanočástice s relativně malou velikostí na rozdíl od lineárního PEGu se stejnou molekulovou hmotností (Zhao et al., 2020).

Termínem PEGylace se označuje proces navázání polyethylenglykolu na povrch proteinů, nanonosičů či farmaceutických léčiv, a to buď kovalentní nebo nekovalentní vazbou. K navázání může dojít několika způsoby, fyzikální nebo chemickou adsorpcí. PEGylace se provádí za účelem prodloužení doby cirkulace látky v krevním řečišti a zvýšení její dispergovatelnosti v kapalném prostředí. Kromě toho snižuje toxicitu, imunogenicitu, a zvyšuje stabilitu látky (Jain et al., 2010).



Obr. 3: Povrchová funkcionizace grafen oxidu 8-ramenným PEG-NH₂.

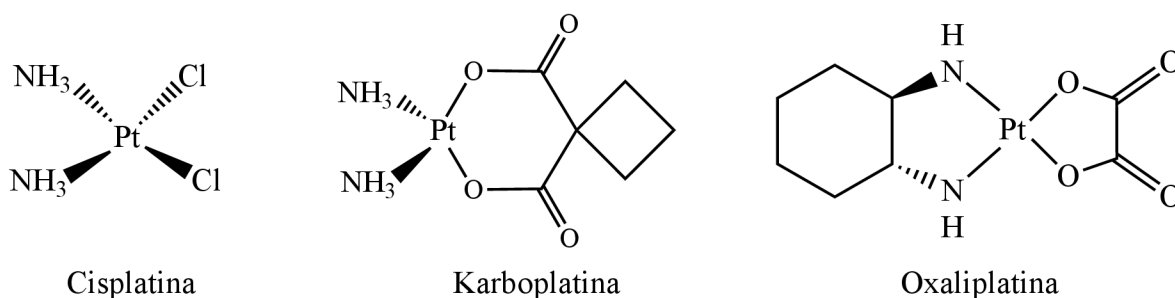
2.4 Cisplatina

Cis-diammindichloroplatnatý komplex neboli cisplatina je poměrně jednoduchá anorganická sloučenina s čtvercově planární geometrií, mající významný vliv při léčbě rakoviny. Tato sloučenina se skládá z centrálního atomu platiny, který je obklopen dvěma chloridovými ligandy a dvěma aminovými skupinami v konfiguraci cis. Při pokojové teplotě se jeví jako bílý nebo žlutý až tmavě žlutý krystalický prášek málo rozpustný ve vodě. Za normální teploty a tlaku je cisplatina stabilní, ačkoli v průběhu času může docházet k postupné přeměně na trans-izomer (Dasari et al., 2014).

Cisplatina byla objevena roku 1845 Michele Peyronem, a její chemickou strukturu odhalil v roce 1893 Alfred Werner. Avšak biologické vlastnosti cisplatiny byly objasněny až roku 1965, kdy Barnett Rosenberg odhalil její schopnost inhibovat buněčné dělení. Jednalo se o první sloučeninu na bázi platiny, která byla schválena FDA pro léčbu rakoviny varlat a vaječníků v roce 1978 (Ghosh 2019).

Cisplatina je účinná proti celému spektru solidních nádorů, zejména při léčbě nádorů vaječníků, varlat, močového měchýře, tlustého střeva, konečníku či plic. Terapie cisplatinou však často vyžaduje kombinaci s jinými protinádorovými léky, kvůli rezistenci nádorových buněk k cisplatině a nežádoucím vedlejším účinkům. Mezi závažné nežádoucí účinky patří nefrotoxicita omezující dávku, ototoxicita v důsledku nevratného poškození vláskových buněk Cortiho orgánu, periferní sensorická neuropatie či nevolnost (Dilruba et al., 2016).

Klinická omezení a nežádoucí účinky cisplatiny vedly k vývoji velkého množství nových analogů. Celosvětově byla zatím schválena pouze karboplatina a oxaliplatina (Obrázek 4), ale řada analogů cisplatiny se dostala do klinických studií. Karboplatina (cis-diammin(1,1-cyklobutandikarboxylato)platnatý komplex) je analog druhé generace platinových chemoterapeutik. Využívá se především při léčbě zhoubného nádoru vaječníků a je méně toxická než cisplatina. Analogem třetí generace je oxaliplatina (1,2-diammnicyklohexan-(oxaláto)platnatý komplex), která je účinná proti rakovině tlustého střeva. Účinkuje pouze na určité typy nádorů, a navíc je neurotoxická (Ghosh 2019).



Obr. 4: Strukturní vzorce cisplatiny, karboplatiny a oxaliplatiny.

2.4.1 Mechanismus účinku cisplatiny

Hlavní biochemický mechanismus účinku cisplatiny spočívá ve vazbě léčiva na DNA v buněčném jádře, s následným narušením transkripce anebo replikace DNA. Tato narušení mohou poté vyvolat cytotoxické reakce vedoucí ke smrti nádorové buňky. Ve skutečnosti je přibližně 90 % cisplatiny v krvi vázáno na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin, což způsobí inaktivaci významného množství cisplatiny. I přesto, že hlavním cílem cisplatiny je jaderná DNA, k navázání dochází v omezeném množství. Dříve než cisplatin vstoupí do buňky, může dojít k interakci s fosfolipidy a fosfatidylserinem v buněčné membráně. Kromě toho se v cytoplazmě nachází mnoho potenciálních vazebných míst pro cisplatinu, včetně RNA a molekul obsahujících síru (Fuertes et al., 2003).

Pacientům je cisplatin podávána intravenózně a aktivuje se, jakmile vstoupí do buňky. Vstup do buňky je zprostředkován převážně pasivní difúzí, ale byl popsán i aktivní transport pomocí membránového přenašeče mědi Ctr1. V cytoplazmě buněk, ve které je koncentrace chloridových iontů velmi nízká, jsou atomy chloridu v molekule cisplatin vytěsněny molekulami vody. Takto hydrolyzovaný produkt je silným elektrolytem, který může interagovat s jakýmkoli nukleofilem, včetně dusíkových atomů nukleových kyselin. Cisplatin se váže na N7 purinové báze guaninu, čímž způsobuje poškození DNA nádorových buněk, což následně vede k buněčné smrti. Reakcí cisplatin s DNA vznikají různě strukturně odlišné adukty, přičemž nejprve se vytváří monofunkční adukty, z nichž se většinou dále vyvíjí vnitřetězcové či mezietězcové můstky (Dasari et al., 2014).

2.4.2 Modifikace cisplatiny monosacharidy

V oblasti výzkumu léčiv na bázi cisplatiny je velká pozornost věnována jejich modifikaci pomocí malých molekul, a to za účelem zvýšení účinnosti léčiv. Jednou z metod modifikace je konjugace s glykosidy neboli glykokonjugace, která využívá zvýšeného příjmu sacharidů nádorovými buňkami. Pro zhoubné nádorové buňky je typický zvýšený příjem glukózy, která je zpracována procesem aerobní glykolýzy na laktát. Tento jev je známý jako Warburgův efekt. Vzniká v důsledku mitochondriálních metabolických změn a je jedním z charakteristických znaků rakoviny. Bylo prokázáno, že nádorové buňky a nádorové tkáně nadměrně exprimují glukózový transportér 1 (GLUT1), v některých případech i GLUT3 a GLUT5. Na základě těchto poznatků je cílení na glukózové transportéry součástí návrhu nových protinádorových léčiv (Wu et al., 2016).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie a roztoky

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitroimidazolium bromidu: MTT (Sigma-Aldrich, USA)
- 8-ramenný polyethylenglykol-amin: 8-ramenný PEG-NH₂ (Sigma-Aldrich, USA)
- deionizovaná voda
- dimethylformamid: DMF (Sigma-Aldrich, USA)
- dimethylsulfoxid: DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
- disperze grafen oxidu: GO (Sigma-Aldrich, USA)
- ethanol 96% (Lach-Ner, ČR)
- fetální bovinní sérum: FBS (Biowest, Francie)
- fosfátový pufr s pH 7,4 a pH 5,3: PBS (připraven v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů)
- Hoechst 33342, trihydrochlorid trihydrát (Invitrogen, USA)
- kalcein (Invitrogen, USA)
- kultivační médium DMEM (Gibco, USA)
- kultivační médium EMEM (Gibco, USA)
- kultivační médium MEM (Gibco, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová: EDTA (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)
- Lysosensor™ Green DND-189 (Invitrogen, USA)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid: EDC (Sigma-Aldrich, USA)
- penicilin (Sigma-Aldrich, USA)
- propidium jodid: PI (zásobní koncentrace 1 mg·ml⁻¹; Sigma-Aldrich, USA)
- streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- trypsin (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Testované sloučeniny

- **JB14, JB19:** látky byly syntetizovány Mgr. Janem Belzou na Univerzitě v Maynooth pod vedením Dr. Diega Montagnera. Látky byly připraveny jako zásobní roztok v PBS o koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Zásobní roztoky testovaných látek byly uskladněny v mrazáku při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.3 Kultivační média

- **DMEM s 10% FBS:** DMEM, 10% fetální bovinní sérum, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ penicilin, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ streptomycin, $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ L-glutamin, $3,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO_3 , součástí kultivačního média byl acidobazický indikátor fenolová červeň.
- **EMEM s 10% FBS:** EMEM, 10% fetální bovinní sérum, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ penicilin, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ streptomycin, $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ L-glutamin, $3,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO_3 , součástí kultivačního média byl acidobazický indikátor fenolová červeň.
- **MEM s 10% FBS:** MEM, 10% fetální bovinní sérum, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ penicilin, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ streptomycin, $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ L-glutamin, $3,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO_3 , součástí kultivačního média byl acidobazický indikátor fenolová červeň.

3.1.4 Buněčné kultury

- **HT-1080** (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) nenádorová linie odvozená z tkáně lidského fibrosarkomu. Linie byla kultivována v médiu MEM s 10% FBS.
- **L929** (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) nenádorová linie izolována z pojivové tkáně myši. Linie byla kultivována v médiu EMEM s 10% FBS.
- **SK-BR3** (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) nádorová linie odvozená z pleurální efúze lidského adenokarcinomu prsu. Linie byla kultivována v médiu DMEM s 10% FBS.

3.1.5 Přístrojové vybavení

- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- automatické počítadlo buněk T10TM (Bio-Rad, USA)

- centrifuga 5430 R (Eppendorf, Německo)
- centrifuga Sigma 6-16K sartorius (Sigma, Německo)
- CO₂ inkubátor NB-203XL (N-Biotek, Korea)
- FTIR spektrometr Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- inverzní mikroskop Olympus CKX31 (Olympus, Japonsko)
- konfokální mikroskop Zeiss LSM 980 (Zeiss, Německo)
- laboratorní váhy KERN ABJ-NM/ABS-N (KERN, Německo)
- mikroskop atomárních sil (AFM) Ntegra Spectra SOLAR (NT-MDT, Rusko)
- mikroskop Olympus IX51 (Olympus, Japonsko)
- multidetekční reader Tecan infinite M200 pro (Schoeller Instruments, Rakousko)
- Ramanův mikroskop Witec Alpha 300 R+ (WiTec, Německo)
- skenovací elektronový mikroskop (SEM) JSM-7900F (JEOL, Japonsko)
- světelný mikroskop s fluorescenčním módem Olympus IX 70 (Olympus, Japonsko)
- třepačka Heidolph Unimax 1010 (Heidolph, Německo)
- ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex Digitec DT 255 H (Bandelin, Německo)
- vodní lázeň Julabo Pura 2 (Julabo, Německo)

Dále bylo použito spotřební laboratorní zboží:

- mikrozkušavky 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf, Německo)
- sterilní 96-jamková mikrotitrační destička s kulatým dnem (TPP, Švýcarsko)
- sterilní kultivační láhve (TPP, Švýcarsko)

Běžné laboratorní vybavení: kádinky, lžičky, odměrné válce, stojany na zkumavky a mikrozkušavky, stříčky, špičky, váženky, zkumavky

3.1.6 Programy

- Gwyddion 2.62 (Czech Metrology Institute, ČR)
- I-control 1.12 (Tecan, Rakousko)
- ImageJ 1.8.0_172 (National Institutes of Health, USA)
- Quick Photo Camera 3.0 (Promicra, ČR)
- Zen 2.3 (Zeiss, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Syntéza léčiv na bázi cisplatiny

Deriváty cisplatiny s navázanou galaktózou JB14 (Gal(OH)-Pt[IV]-Succ) a glukózou JB19 (GlcEt(OH)-Pt[IV]-Succ) byly připraveny Mgr. Janem Belzou na Univerzitě v Maynooth pod vedením Dr. Diega Montagnera. Nově syntetizované sloučeniny byly charakterizovány Ramanovou spektroskopií a nukleární magnetickou rezonancí (NMR).

Sloučenina JB14 byla připravena rozpuštěním 0,286 g Gal(OH)-Pt[IV] a 0,217 g anhydridu kyseliny jantarové v 7 ml dimethylformamidu (DMF). Za stálého míchání byla reakce ponechána při pokojové teplotě (23 °C) 18 hodin. Následně byl produkt z roztoku vysrážen pomocí diethyletheru a oddělen centrifugací při 4 000 RPM po dobu 5 minut. Výsledný produkt byl vysušen pomocí vakuové odparky. Výtěžek činil 58 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12,08 (br, 1H, COOH), 8,01 (s, 1H, triaz-CH), 6,53 (br, 6H, NH₃), 5,40 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, H-1), 5,15 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H, OH of C2), 5,00 (br, 1H, OH of C-6), 4,68 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, OH of C3), 4,62 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, OH of C4), 4,02 (td, *J* = 9,3, 5,7 Hz, 1H, H-2), 3,77 – 3,74 (m, 1H, H-4), 3,69 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H, H-5), 3,6 – 3,4 (m, 3H, H-3, H-6, H-6'), 2,85 – 2,81 (m, 2H, triaz-CH₂), 2,58 (dd, *J* = 8,8, 6,3 Hz, 2H, CH₂COO-succ), 2,49 (m, 2H, CH₂CO-triaz), 2,38 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂COOH-succ).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 179,69 (s, CO-triaz), 179,59 (s, CO-succ), 173,78 (s, COOH), 145,96 (s, C_q-triaz), 120,98 (s, CHN), 88,02 (s, C-1), 78,34 (s, C-5), 73,71 (s, C-3), 69,20 (s, C-2), 68,43 (s, C-4), 60,45 (s, C-6), 35,10 (s, CH₂COO-succ), 30,50 (s, CH₂CO-triaz), 29,82 (s, CH₂COOH-succ), 21,65 (s, triaz-CH₂).

¹⁹⁵Pt NMR (108 MHz, DMSO) δ 1226,71 (s).

Sloučenina JB19 byla připravena rozpuštěním 0,240 g GlcEt(OH)-Pt[IV] a 0,181 g anhydridu kyseliny jantarové v 7 ml dimethylformamidu (DMF). Následující kroky byly stejné jako u předchozí sloučeniny. Výtěžek byl v tomto případě 62 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12,14 (br, 1H, COOH), 7,93 (s, 1H, triaz-CH), 5,98 (t, *J* = 48,2 Hz, 6H, 2x NH₃), 5,10 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, OH of C-2), 4,98 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H, OH of C-3), 4,93 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, OH of C-4), 4,57 – 4,46 (m, 3H, CH₂-triaz, OH of C-6), 4,21 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-1), 4,10 – 4,03 (m, 1H, OCH), 3,89 – 3,83 (m, 1H, OCH'), 3,67 (dd, *J* = 10,7, 4,4 Hz, 1H, H-6), 3,43 (dd, *J* = 11,4, 5,6 Hz, 1H, H-6'), 3,16 – 3,09 (m, 2H, H-3, H-5), 3,03 (dd, *J* = 9,0, 4,0 Hz, 1H, H-4), 2,98 – 2,93 (m, 1H, H-2), 2,80 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, triaz-CH₂), 2,46 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, CH₂CO), 2,58 (dd, *J* = 8,8, 6,3 Hz, 2H, CH₂COO-succ), 2,49 (m, 2H, CH₂CO-triaz), 2,38 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂COOH-succ).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 179,9 (CO), 179,59 (s, CO-succ), 173,78 (s, COOH), 146,2 (triaz-C), 122,9 (triaz-CH), 102,8 (C-1), 77,0 (C-3), 76,5 (C-5), 73,3 (C-2), 70,0 (C-4), 67,3 (OCH₂), 61,1 (C-6), 49,4 (CH₂-triaz), 36,1 (CH₂CO), 35,10 (s, CH₂COO-succ), 29,82 (s, CH₂COOH-succ), 22,0 (triaz-CH₂).

$^{195}\text{Pt}\{^1\text{H}\}$ NMR (108 MHz, DMSO) δ 1045 ppm.

3.2.2 Optimalizace velikosti nanočástic grafen oxidu

Zásobní disperze grafen oxidu o koncentraci 4 mg/ml byla naředěna fosfátovým pufrům (PBS) na výslednou koncentraci 400 $\mu\text{g/ml}$. Takto zředěná disperze grafen oxidu byla promíchána a následně sonikována v ultrazvukové lázni při teplotě 70 °C po dobu 6 hodin. Disperze byla poté homogenizována na třepačce 18 hodin, při 500 RPM a 65 °C. Po ukončení této doby byla opět umístěna do ultrazvukové lázně na 6 h při teplotě 70 °C. Vzniklá disperze byla centrifugována 10 minut při 10 000 RPM s cílem oddělit větší částice. Supernatant grafen oxidu byl odebrán a opět centrifugován za stejných podmínek. Tento postup byl zopakován celkem čtyřikrát a poslední centrifugace probíhala po dobu 15 minut při 10 000 RPM. Následovala opět sonikace 4 hodiny při 70 °C. Připravený GO byl odebrán a uskladněn při pokojové teplotě.

3.2.3 Funkcionalizace grafen oxidu PEGem

Za účelem PEGylace grafen oxidu bylo k 988 μl GO připraveného v předchozím kroku napipetováno 8 μl zásobního roztoku 8-ramenného polyethylenglykol-aminu o koncentraci 50 mg/ml. Tato disperze byla sonikována v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Následně byly k disperzi přidány 4 μl roztoku N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC) o koncentraci 50 mg/ml. Vzniklý GO-PEG byl míchán na třepačce 24 hodin, při 500 RPM a 65 °C. Poté byl umístěn do ultrazvukové lázně na 6 h při teplotě 70 °C, dále opět míchán 18 hodin na třepačce při 500 RPM a 65 °C, a nakonec byl ponechán v ultrazvukové lázni 6 hodin při stejných podmínkách. Připravená nanoplatforma GO-PEG byla uskladněn při pokojové teplotě.

3.2.4 Charakterizace nanoplatforem na bázi grafen oxidu

Mikroskop atomárních sil (AFM) byl využit pro vizualizaci i analýzu výškového a velikostního profilu nanočástic GO zásobní disperze, velikostně upraveného GO a GO-PEG. Tato metoda byla rovněž použita ke stanovení množství nanočástic GO v 1 ml roztoku.

Pro tyto účely byl použit semikontaktní režim se zlatým hrotem ACTA-SS-20 od firmy APPNANO. Na slídu o poloměru 0,5 cm bylo nanášeno 5 μl vzorku a byly provedeny skeny ploch o rozměrech 45 \times 45 μm , 10 \times 10 μm a 5 \times 5 μm s rozlišením 500 \times 500 dpi a rychlostí 0,3 Hz. Získaná data byla dále analyzována a zpracována pomocí programu Gwyddion a ImageJ.

Skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) byl zobrazen povrch GO a nanoplatformy GO-PEG. Vzorek GO byl naředěn v ethanolu, sonikován po dobu 2 minut, nakápnut na uhlíkovou pásku a ponechán na vzduchu při pokojové teplotě, aby zaschnul. Následně byl vzorek analyzován při urychlovacím napětím 7 kV. Disperze GO-PEG ve vodě byla nakápnuta na měděnou mřížku s uhlíkovou folií a vzorek byl skenován při urychlovacím napětí 5 kV. Skenování bylo provedeno Eirini Ioannou, Ph.D. z Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM).

Ramanova spektra GO-PEG a funkcionalizovaných nanoplatform GO-PEG derivátů cisplatiny byla získána pomocí Ramanova mikroskopu s excitačním laserem v zelené části spektra (532 nm) a výkonem \sim 5 mW. Doba expozice laseru na vzorek činila 2 s, přičemž výsledky byly získány zprůměrováním osmi měření. Měření provedl doc. RNDr. Václav Ranc, Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

Infračervená spektra GO, PEGu, GO-PEG byla naměřena pomocí FTIR spektrometru s krystalem ZnSe 1492 a detektorem DTGS KBr. Naměřené transmittance byly zaznamenány v oblasti 4000 – 650 cm^{-1} , a před každým měřením bylo provedeno měření pozadí krystalu jako referenčního skenu. Výsledné spektrum každého vzorku bylo zprůměrováno z 32 skenů se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} .

3.2.5 Navázání derivátů cisplatiny na nanoplatformu GO-PEG

Bylo smícháno 25 μl zásobních roztoků jednotlivých derivátů cisplatiny o koncentraci 20 mg/ml s 975 μl GO-PEG. Takto vzniklý roztok byl míchán na třepačce 24 hodin při 500 RPM a pokojové teplotě (23 $^{\circ}\text{C}$). Nenačnané deriváty cisplatiny byly odstraněny centrifugací při 13 500 RPM po dobu 10 minut. Vzniklý pelet byl jemně rozsuspendován v 1 ml PBS a následně skladován při pokojové teplotě. Celkové množství navázané sloučeniny bylo stanoveno atomovou absorpční spektroskopií (AAS), která byla provedena ve třech opakováních.

3.2.6 Zobrazení buněk konfokálním mikroskopem

Konfokální mikroskopie je neinvazivní a nedestruktivní metoda s vyšší rozlišovací schopností a kontrastem než u ostatních metod světelné mikroskopie. Lysozomy buněk byly obarveny fluorescenčním barvivem LysoSensor Green DND-189 a jádra buněk byla obarvena barvivem Hoechst. Pro zobrazení buněk bylo do 8-jamkové destičky pro konfokální mikroskopii vysazeno 30 000 buněk na jamku jednotlivých buněčných linií do 300 μ l média. Před obarvením byly buňky ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin.

Následující den byly buňky v destičce pro konfokální mikroskopii obarveny 0,3 μ l LysoSensorem Green (koncentrace 1 mM) a inkubovány v inkubátoru po dobu 1 hodiny. Poté bylo přidáno 30 μ l barviva Hoechst (koncentrace 1 mg/ml) a opět inkubováno v inkubátoru 5 minut. Po inkubaci bylo médium z jamek odsáto a buňky byly promyty 300 μ l PBS. Na závěr bylo k buňkám přidáno 300 μ l nového média a destička byla vložena do konfokálního mikroskopu. Snímky byly pořízeny pomocí programu Zen 2.3.

3.2.7 MTT test

Kolorimetrický MTT test je používán ke kvantitativnímu hodnocení životaschopnosti buněk. Je založen na redukci žlutého 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) metabolicky aktivními buňkami na nerozpustné fialové krystaly formazanu. K určení životaschopnosti buněk bylo do 96-jamkové mikrotitrační destičky vysazeno 10 000 buněk na jamku jednotlivých buněčných linií do 100 μ l média. Před ovlivněním byly buňky ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin.

Další den byly buňky v mikrotitračních destičkách ovlivněny samotnými deriváty cisplatin, nanoplatformou GO-PEG a GO-PEG s navázanými deriváty cisplatin o koncentracích 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6 μ M a 3 μ M v triplicátu po dobu 24 hodin. MTT bylo rozsuspendováno v PBS s finální koncentrací 5 mg/ml. Staré médium z jednotlivých jamek mikrotitračních destiček bylo odstraněno a nahrazeno 50 μ l roztoku MTT. Po 4hodinové inkubaci bylo MTT z jamek odsáto a případné krystaly formazanu byly rozpuštěny přidáním 100 μ l DMSO. Po 10minutové inkubaci na třepačce byla měřena absorbance při 570 nm pomocí multifunkčního readeru Tecan infinite M200 pro. Z těchto hodnot byla následně vypočtena životaschopnost buněk v programu Excel, a to jako podíl průměrné absorbance vzorku buněk obsahujících testované sloučeniny a průměrné absorbance kontrolních buněk. Výsledek MTT testu byl uveden jako procentuální vyjádření buněčné viability doplněný směrodatnou odchylkou ze tří různých měření.

3.2.8 Značení buněk pro fluorescenční mikroskopii

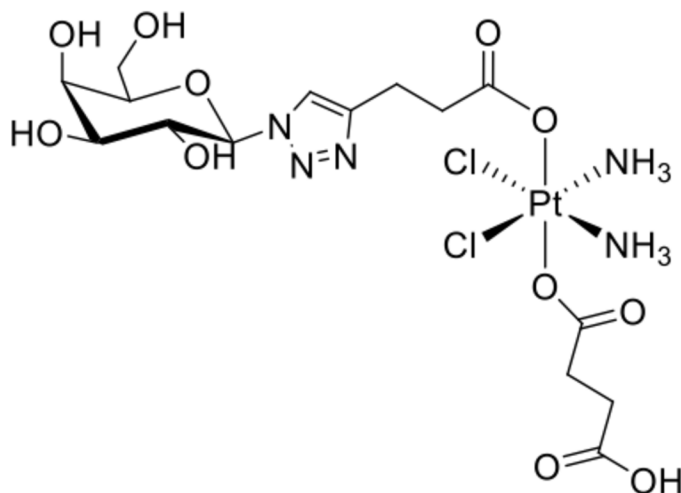
K vyhodnocení životaschopnosti buněk se velmi často používá fluorescenční barvení kalceinem a propidium jodidem (PI). Kalcein AM (acetoxymethylester kalcein) je silně hydrofobní barvivo, které proniká buněčnou membránou. Metoda je založena na konverzi kalceinu AM na zelený fluorescenční kalcein prostřednictvím intracelulární esterázové aktivity životaschopných buněk. Mrtvé či poškozené buňky toto barvivo nezachycují, a proto neprodukují fluorescenci. Naopak propidium jodid (PI) barví výhradně buňky mrtvé, jelikož je membrána živých buněk pro PI nepropustná. Propidium jodid má schopnost interkalace do DNA v jádře buněk, což se projeví emitací červeného fluorescenčního záření.

Buněčné linie pro značení kalceinem a propidium jodidem byly připraveny stejným způsobem jako při MTT testu. Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo vysazeno 10 000 buněk na jamku jednotlivých buněčných linií do 100 μ l média. Před ovlivněním byly buňky ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin. Následující den byly buňky v mikrotitračních destičkách ovlivněny samotnými deriváty cisplatiny a GO-PEG s navázanými deriváty cisplatiny o koncentraci 100 μ M v triplicátu po dobu 24 hodin.

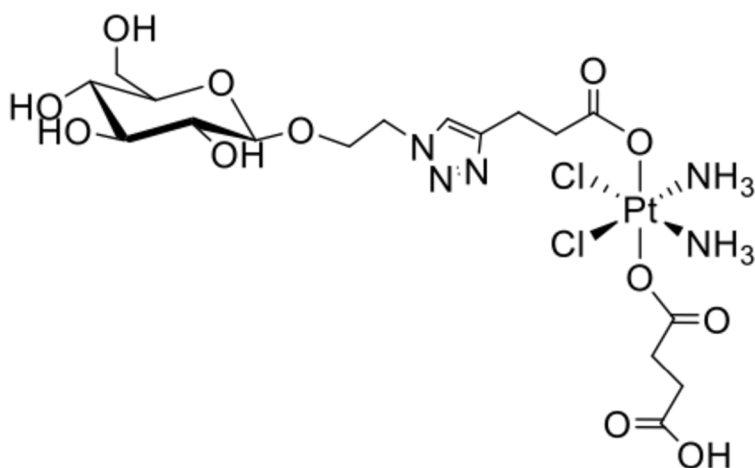
Roztok kalceinu o finální koncentraci 50 μ M byl připraven smícháním 39,5 μ l DMSO a 0,5 μ l zásobního roztoku kalceinu o koncentraci 4 mM. Poté byl do každé jamky s buňkami a testovanou sloučeninou přidán 1 μ l připraveného roztoku kalceinu a 1 μ l roztoku propidium jodidu (koncentrace 1 mg/ml). Po inkubaci buněk s kalceinem a propidium jodidem po dobu 5 minut v inkubátoru bylo z jamek mikrotitračních destiček odstraněno médium a nahrazeno 50 μ l PBS. Indukovaná fluorescence byla pozorována světelným mikroskopem Olympus IX 70 s fluorescenčním módem, a snímky buněk byly pořízeny programem Quick Photo Camera 3.0.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro vlastní experimentální práci byly k testování vybrány dva deriváty cisplatiny **JB14** a **JB19**. Nově syntetizované deriváty cisplatiny byly připravovány s cílem zvýšení účinnosti léčiva, a to pomocí modifikace cisplatiny galaktózou (**JB14**) a glukózou (**JB19**) (Obrázek 5 a 6). V rámci diplomové práce byla optimalizována a charakterizována nanoplatforma na bázi GO, která slouží jako nanonosič léčiv. Za účelem zlepšení stability a biodistribuce testovaných látek byly deriváty cisplatiny navázány na PEGylovaný GO.



Obr. 5: Strukturální vzorec JB14 (Gal(OH)-Pt[IV]-Succ).



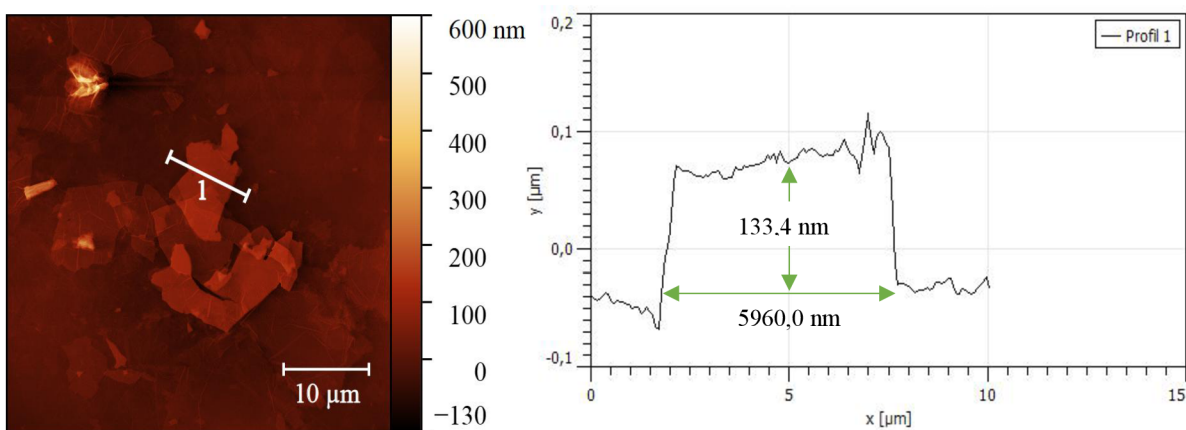
Obr. 6: Strukturální vzorec JB19 (GlcEt(OH)-Pt[IV]-Succ).

4.1 Charakterizace nanoplatformy na bázi GO

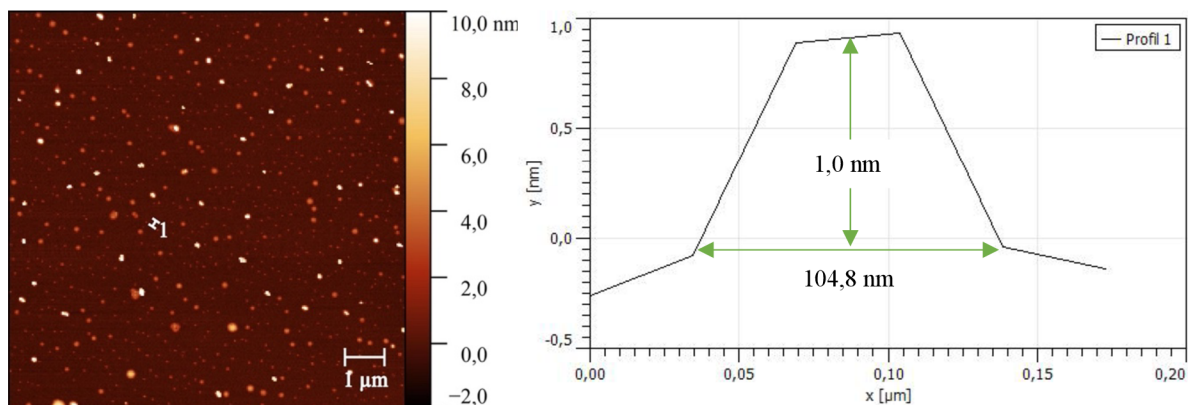
4.1.1 Mikroskopie atomárních sil

Nanočástice GO, velikostně upraveného GO a GO-PEG byly analyzovány pomocí AFM, která mapuje rozložení atomárních sil na povrchu vzorku a slouží ke 3D zobrazování povrchu. Jednotlivé nanočástice byly na obrázcích vyznačeny a byly z nich vytvořeny grafy se stanovenou laterální velikostí (osa x) a výškovým profilem (osa y).

Je prokázáno, že velikost částic GO významně ovlivňuje jejich vlastnosti a případné možnosti aplikace. Větší částice GO vykazují závažnější toxické účinky a daleko více se hromadí v orgánech než menší nanočástice GO (Guo et al., 2021). Velikost a výška nanočástic GO byla optimalizována působením kombinace ultrazvukových vln a vysoké teploty popsané v kapitole 3.2.2. Laterální velikost vybrané částice GO před úpravou byla 5960 nm a výška 133,4 nm (Obrázek 7). Na základě předchozích AFM studií byla experimentálně stanovena výška jedné vrstvy GO přibližně 1,0 – 1,4 nm, z čehož vyplývá, že výška námi zobrazené nanočástice GO odpovídá asi 100 vrstvám (Paredes et al., 2008). Velikostně upravené nanočástice GO byly podstatně menší, a vyznačená nanočástice měla laterální velikost 104,8 nm a výšku 1,0 nm, což odpovídá jedné vrstvě GO (Obrázek 8).

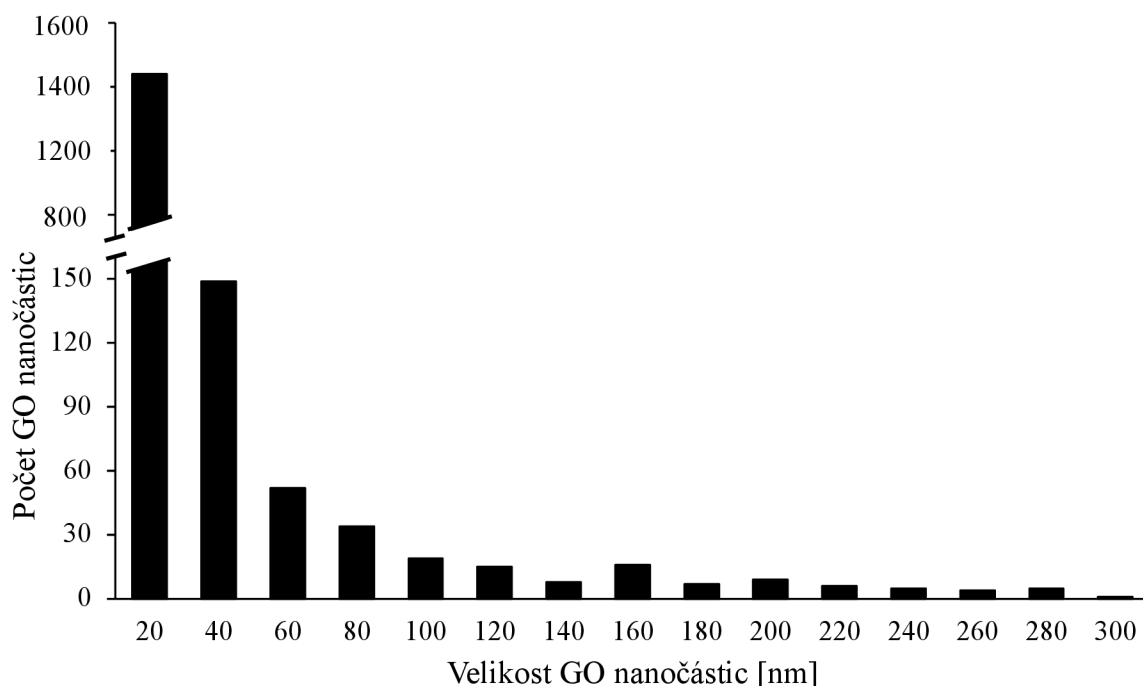


Obr. 7: Částice GO zobrazeny pomocí AFM (vlevo), výškový a velikostní profil označené nanočástice (vpravo).



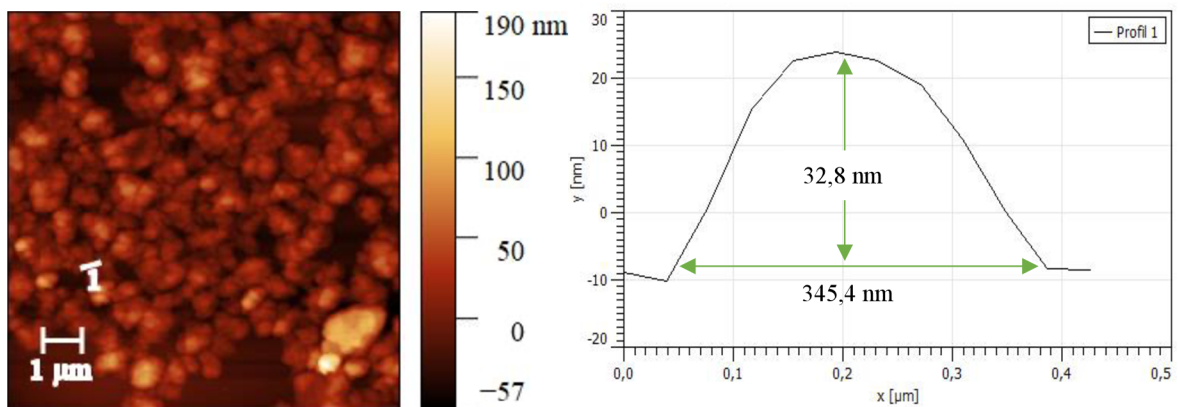
Obr. 8: Nanočástice upraveného GO zobrazeny pomocí AFM (vlevo), výškový a velikostní profil označené nanočástice (vpravo).

Statistická analýza naměřených dat, která prezentuje laterální velikosti GO nanočástic ($n = 1800$) modifikovaných kombinací ultrazvukových vln a vysoké teploty, je zobrazena v Obrázku 9. Histogram byl sestaven na základě výsledků získaných z dvanácti snímků o rozměrech $20 \times 20 \mu\text{m}$, které byly vyhodnoceny v programu ImageJ. Z celkového počtu 1800 analyzovaných nanočástic bylo 95 % se střední laterální velikostí do 100 nm, a byla tak potvrzena úspěšná změna velikosti GO nanočástic. Na základě těchto výsledků byl určen počet nanočástic na 1 ml, který činil $6,5 \cdot 10^9$ nanočástic/ml.



Obr. 9: Velikostní distribuce GO nanočástic po modifikaci velikosti pomocí kombinace ultrazvuku a vysoké teploty.

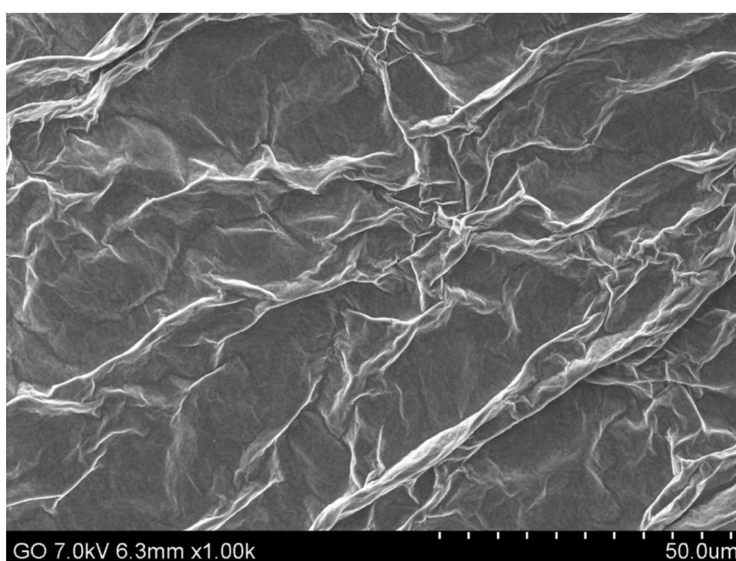
Navzdory své hydrofilní povaze GO v přítomnosti solí a složek séra rychle agreguje, a proto byl jeho povrch modifikován pomocí 8-ramenného PEG-NH₂ (Loutfy et al., 2017). Po PEGylaci nanočástic GO došlo ke změně nejen laterální velikosti a výšky, ale také ke změně tvaru. Modifikovaná nanočástice se zaobleným tvarem zaujímal laterální velikost 345,4 nm a výšku 32,8 nm (Obrázek 10). Bylo tak potvrzeno, že PEGylované nanočástice GO jsou vhodné pro biomedicínské aplikace, neboť jejich rozměr nepřesahuje maximální limit proniknutí buněčnou membránou, stanovený na 500 nm (Bae et al., 2011).



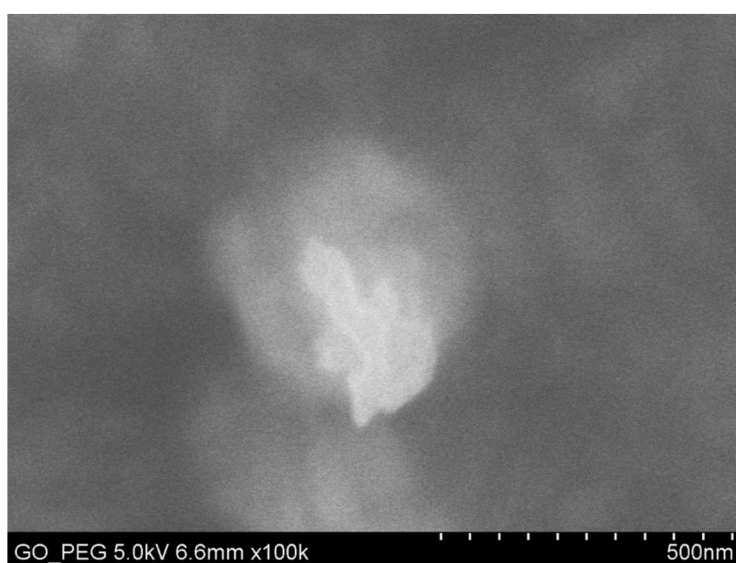
Obr. 10: Nanočástice GO po PEGylaci zobrazeny pomocí AFM (vlevo), výškový a velikostní profil označené nanočástice (vpravo).

4.1.2 Skenovací elektronový mikroskop

Skenovací elektronová mikroskopie je metoda využívaná při studiu struktury a morfologie nanomateriálů. Skenovacím elektronovým mikroskopem byl analyzován povrch nanočástic GO před velikostní úpravou, a také povrch nanočástic po PEGylaci. Je zřejmé, že GO má vrstevnatou extrémně tenkou strukturu, která tvoří homogenní film. Vrstvy GO jsou naskládány jedna na druhou a je možné rozlišit hrany jednotlivých nanočástic, včetně lomených a zvrásněných oblastí (Obrázek 11). Po PEGylaci nanočástic GO byl jejich povrch pokryt 8-ramenným PEG-NH₂, což je patrné z hladkého povrchu a zaobleného tvaru nanočástice (Obrázek 12).



Obr. 11: Povrch GO zobrazený pomocí SEM (1000x zvětšeno).



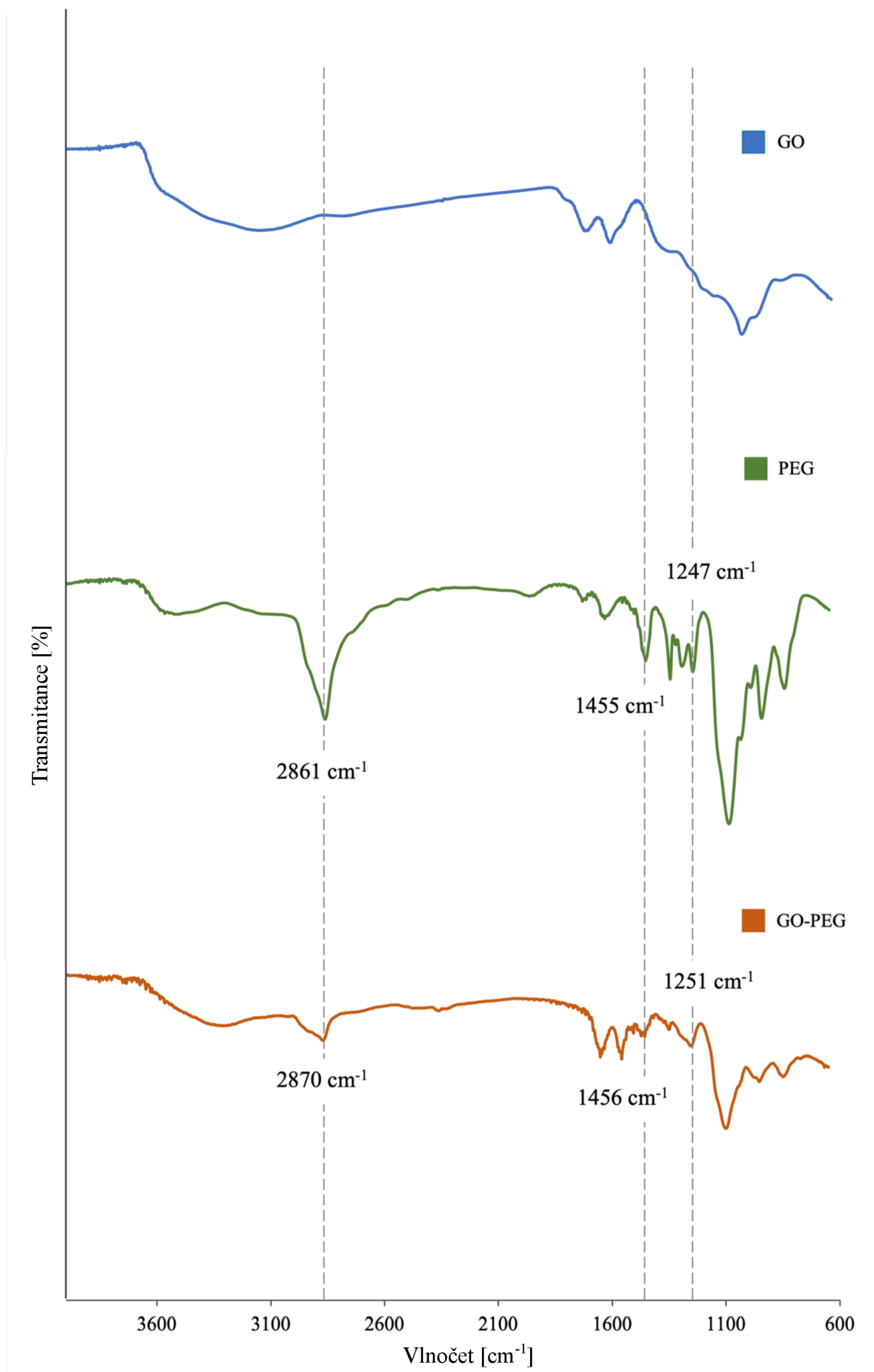
Obr. 12: Povrch GO po PEGylaci zobrazený pomocí SEM (100000x zvětšeno).

4.1.3 Infračervená spektroskopie

Pomocí infračervené spektroskopie byl charakterizován GO, PEG-NH₂ a nanoplatforma GO-PEG. Infračervené spektrum se dělí na blízké (13000 – 4000 cm⁻¹), střední (4000 – 400 cm⁻¹) a vzdálené (400 – 100 cm⁻¹). V této diplomové práci byly vzorky analyzovány v rozmezí 4000 – 600 cm⁻¹, které spadá do střední infračervené části. Spektrum lze dále rozdělit na oblast charakteristických vibrací (4000 – 1500 cm⁻¹) a oblast otisků prstů (1500 – 600 cm⁻¹). V oblasti charakteristických vibrací se nachází pásy vibrací funkčních skupin a v oblasti otisků prstů pásy deformačních vibrací.

V grafu jsou označeny tři píky PEG (2861 cm⁻¹; 1455 cm⁻¹; 1247 cm⁻¹), které byly po navázání na GO pozorovatelné také u GO-PEG (2870 cm⁻¹; 1456 cm⁻¹; 1251 cm⁻¹). První pík (2861 cm⁻¹) odpovídá vibracím skupiny C–H, druhý pík (1455 cm⁻¹) odpovídá vibracím skupiny =CH₂ a třetí pík (1247 cm⁻¹) vibracím skupiny O–H (Obrázek 13). Infračervené spektrum PEGylovaného GO tedy obsahovalo většinu píků hlavních funkčních skupin 8-ramenného PEG-NH₂. Zároveň se tyto píky nevyskytovaly v infračerveném spektru samotného GO. Mírný posun polohy píků a změnu jejich relativní intenzity lze připisovat vzniku vodíkových vazeb.

Srovnatelné výsledky byly popsány v publikaci Esmaeili et al. (2020), ve které byl GO, PEG a PEGylovaný grafen oxid charakterizován mimo jiné pomocí FTIR. Infračervené spektrum PEGu obsahovalo taktéž valenční C–H vibrace (2847 cm⁻¹), deformační =CH₂ vibraci (1468 cm⁻¹) a O–H vibrace (1242 cm⁻¹). Tyto píky byly identifikovány rovněž v infračerveném spektru GO-PEG, spolu s dalšími charakteristickými píky.



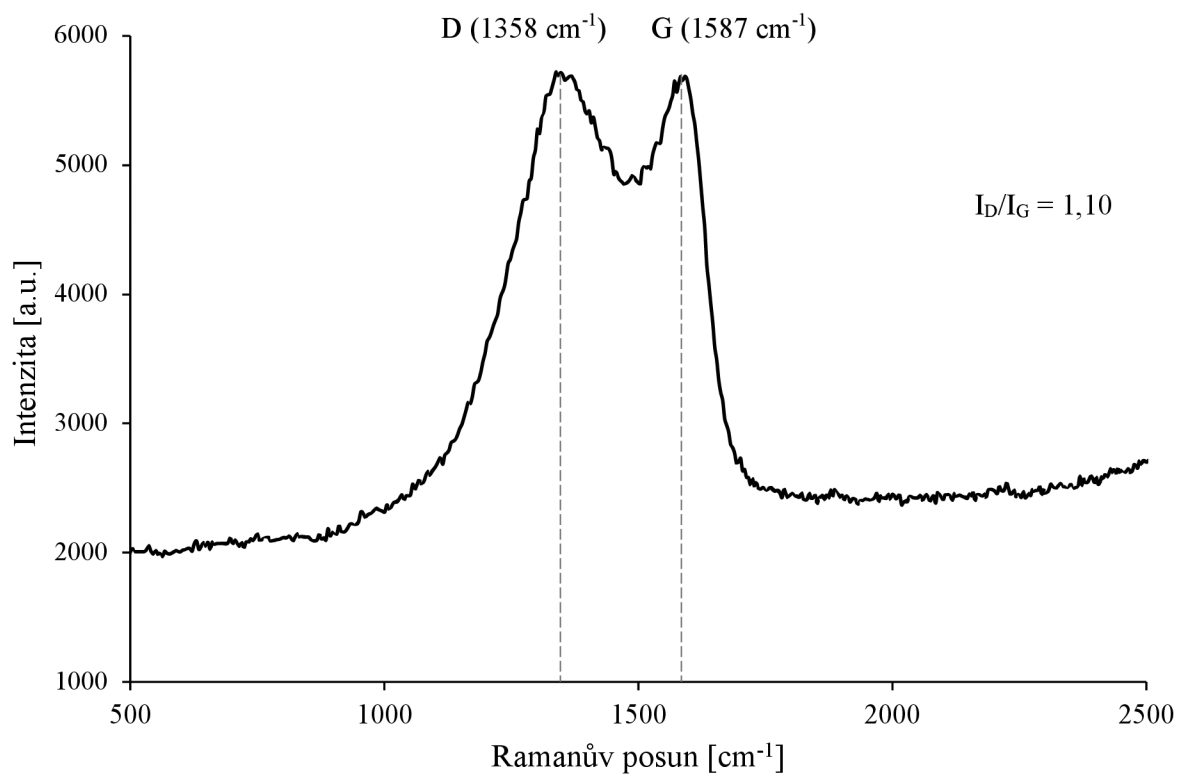
Obr. 13: Infračervené spektrum GO, PEGu a GO-PEG.

4.1.4 Ramanova mikroskopie

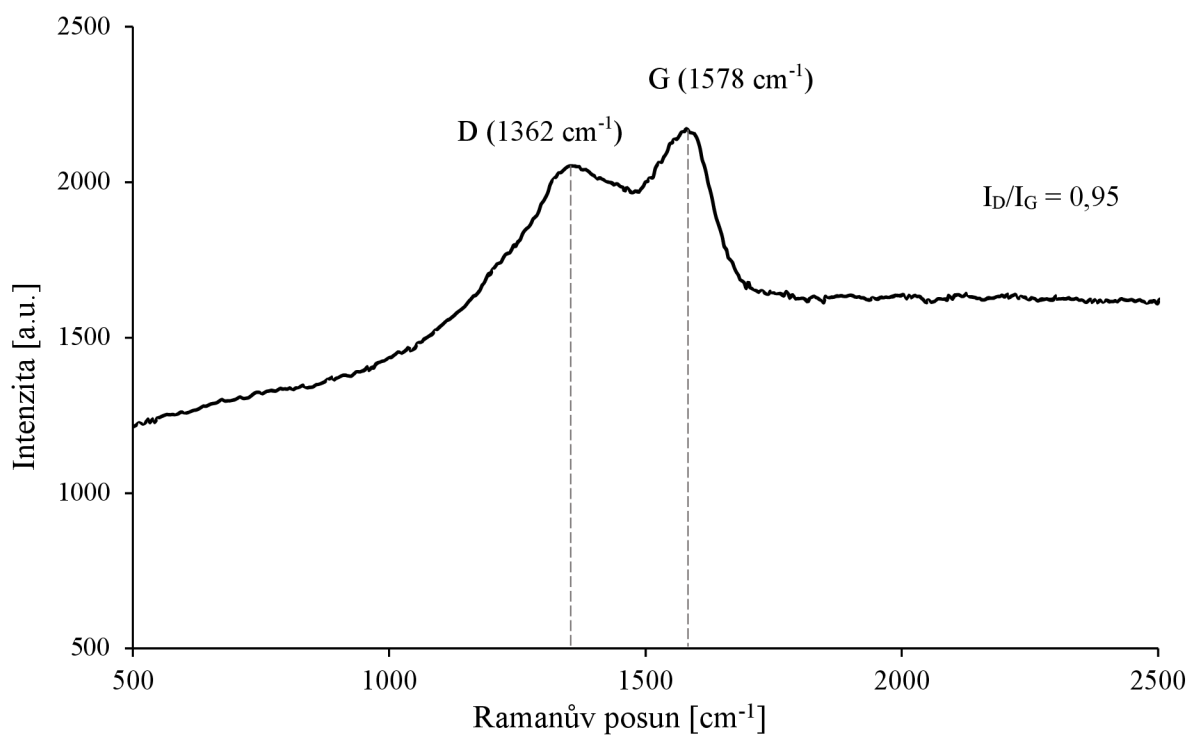
Ramanova mikroskopie je metoda nedestruktivní analýzy vzorku, která se často používá k chemické analýze uhlíkových materiálů, jelikož umožňuje detekci dvojných a konjugovaných uhlíkových vazeb. Ramanovo spektrum analyzovaných nanočástic obsahuje charakteristické pásy D a G. Pás D je spojen s sp^3 hybridizací atomů uhlíku, odpovídá defektům ve struktuře grafenu mimo rovinu a nachází se kolem 1350 cm^{-1} . V případě GO-PEG se vyskytoval v 1358 cm^{-1} , u derivátu **JB14** navázaného na **GO-PEG** v 1362 cm^{-1} , a u **JB19** navázaného na **GO-PEG** v 1354 cm^{-1} . Kdežto pás G souvisí s valenčními vibracemi grafenu v rovině mezi vazbami uhlíků sp^2 a vyskytuje se zhruba v 1580 cm^{-1} . U GO-PEG se nacházel v 1587 cm^{-1} , u **JB14** navázaného na **GO-PEG** v 1578 cm^{-1} a v poslední řadě u **JB19** na **GO-PEG** v 1575 cm^{-1} (Obrázek 14–16).

Ve studii Negi et al. (2021) bylo navíc srovnáno Ramanovo spektrum GO a GO-PEG, přičemž nebyl pozorován významný posun v poloze charakteristických pásů D a G. Tento výsledek nasvědčuje, že navázáním PEGu na grafen oxid nedošlo ke změně ani narušení aromatické struktury GO. Pás D byl zaznamenán v oblasti 1360 cm^{-1} a pás G v 1588 cm^{-1} .

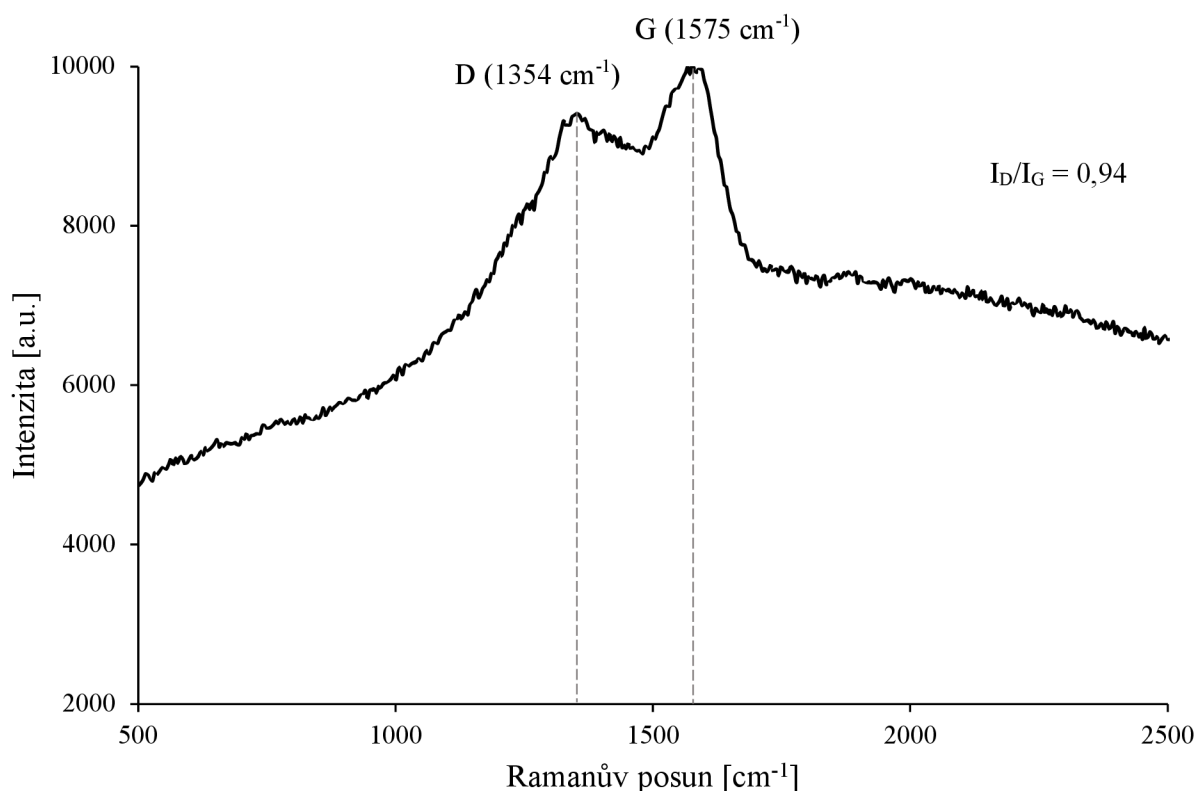
Kvantifikace uhlíkových defektů se obvykle provádí analýzou poměru intenzit I_D/I_G , tedy mezi D a G pásy. Vyšší poměr I_D/I_G naznačuje větší množství defektů, které mohou být způsobeny narušením vazeb C=C strukturálními defekty nebo funkčními skupinami. Naopak nižší poměr I_D/I_G může být způsobeno rozpadem vrstev grafenu a menším počtem defektů (Dresselhaus et al., 2010). Poměr intenzit I_D/I_G pro GO-PEG byl 1,10, pro **JB14** navázaný na **GO-PEG** byl poměr 0,95 a pro **JB19** navázaný na **GO-PEG** 0,94. V porovnání s nanoplatformou GO-PEG měl poměr intenzit I_D/I_G u derivátů cisplatin navázaných na **GO-PEG** nižší hodnotu, což naznačuje, že navázání **JB14** a **JB19** může inhibovat vznik defektů.



Obr. 14: Ramanovo spektrum GO-PEG.



Obr. 15: Ramanovo spektrum funkcionalizovaného nanomateriálu JB14 GO-PEG.



Obr. 16: Ramanovo spektrum funkcionalizovaného nanomateriálu JB19 GO-PEG.

4.2 Efektivita navázání derivátů cisplatinu na nanoplatformu GO-PEG

Navázaná koncentrace derivátů cisplatinu **JB14** a **JB19** na GO-PEG byla určena pomocí AAS. S využitím kalibrační křivky byla nejprve stanovena nenavázaná koncentrace v supernatantu, a poté byla určena navázaná koncentrace na nanoplatformě. Následně byla stanovena procentuální úspěšnost navázání léčiv na nanoplatformu (LE % - loading efficiency) dle rovnice:

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

Obr. 17: Rovnice výpočtu efektivitu navázání derivátů cisplatinu na GO-PEG.

Tato rovnice je definována jako poměr koncentrace navázaného derivátu na GO-PEG a počáteční koncentrace, vynásobený 100.

Na nanoplatformu GO-PEG bylo navázáno $72,544 \pm 0,171$ % látky **JB14** a $70,593 \pm 0,058$ % látky **JB19** (Tabulka 1). Vysoká efektivita navázání léčiv na GO je hlavní výhodou oproti klasickým nanonosičům, jako jsou lipozomy či pevné lipidové nanočástice. Navíc využití 8-ramenného PEG-NH₂ vedlo k vyšší efektivitě navázání ve srovnání s předchozími studiemi, které používaly lineární PEG (LE = 4,5 %) a 6-ramenný PEG (LE = 11 %) (Charmi et al., 2019; Muñoz et al., 2019).

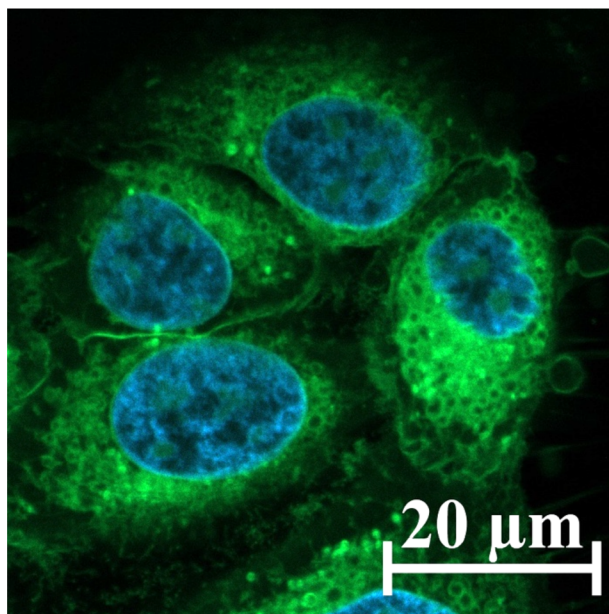
Tab. 1: Koncentrace a efektivita navázání derivátů cisplatinu na GO-PEG.

Testovaná látka	Počáteční koncentrace [mg/ml]	Navázaná koncentrace [mg/ml]	LE %
JB14	0,5	0,363	$72,544 \pm 0,171$
JB19	0,5	0,353	$70,593 \pm 0,058$

4.3 Zobrazení buněk konfokálním mikroskopem

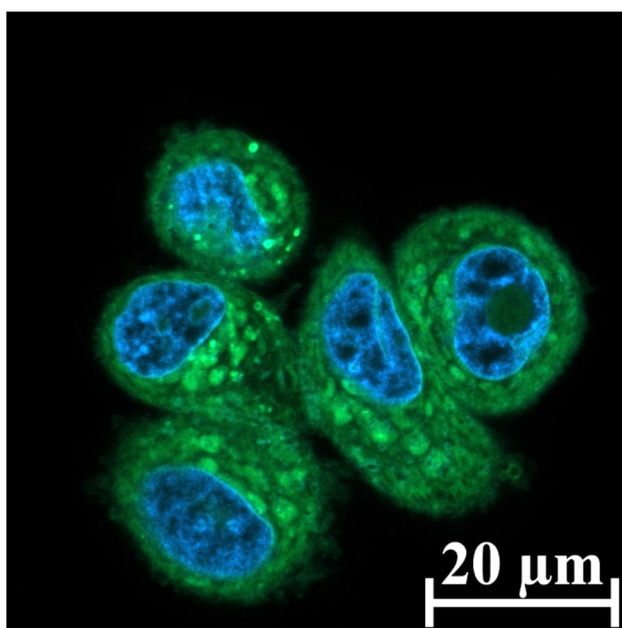
Buněčné kultury HT-1080, SK-BR3 a L929 byly před ovlivněním studovanými látkami zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 980. Lysozomy buněk byly obarveny zeleně fluorescenčním barvivem LysoSensor Green DND-189 s excitačním maximem 443 nm a emisním maximem 505 nm. Zatímco jádra buněk byla obarvena modře fluorescenčním barvivem Hoechst 33342, které se specificky váže do DNA. Excitační maximum Hoechst je 350 nm a emisní maximum 461 nm.

Buněčná nádorová linie HT-1080 je odvozena z tkáně lidského fibrosarkomu, což je maligní nádor vycházející z fibrózní pojivové tkáně. Tento typ sarkomu se typicky vyvíjí ve vazivových tkáních kosti a nejčastěji postihuje dlouhé a ploché kosti. Buňky HT-1080 vykazují adherentní růst a mají protáhlý, vřetenovitý tvar. Protáhlý charakter buněk je zobrazen na Obrázku 18. Stejný tvar buněk byl pozorován ve studii Keller et al. (2000), kdy více než 90 % neošetřených buněk mělo tvar protáhlého fibroblastu.



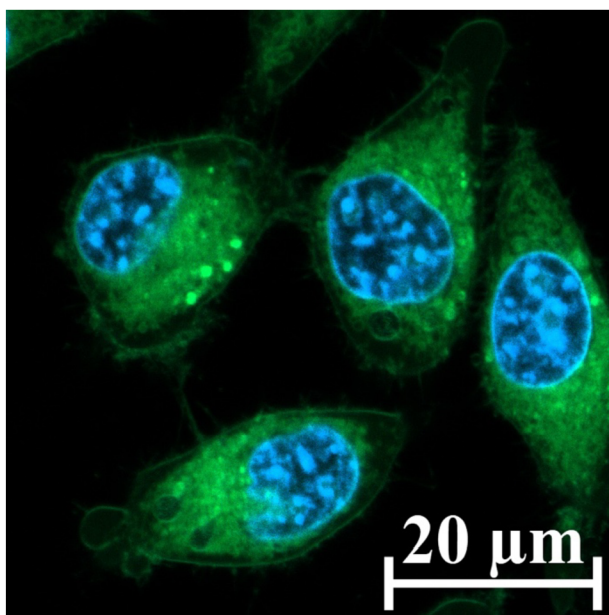
Obr. 18: Kontrolní buňky HT-1080 zobrazeny konfokálním mikroskopem.

Nádorová linie SK-BR3 byla roku 1970 získána z pleurální efúze lidského adenokarcinomu prsu. Nadměrně exprimuje gen Her2 a neexprimuje estrogenový receptor alfa. Vyznačuje se epiteliální morfologií s polygonálními až okrouhlými buňkami a adherentním růstem. Tyto buňky často tvoří shluky či malé agregáty, což je pozorovatelné na Obrázku 19 (Ferraro et al., 2019).



Obr. 19: Kontrolní buňky SK-BR3 zobrazeny konfokálním mikroskopem.

Buněčná linie L929 byla v roce 1948 poprvé izolována z pojivové tkáně myši. Kmen L byl jedním z prvních buněčných kmenů, které se začaly kultivovat kontinuálně, a byl odvozen z normální podkožní a tukové tkáně 100 dní starého myšičího samce. Buňky L929 se vyznačují adherentním růstem a různorodou morfologií zahrnující vřetenovitý, zaoblený či kulatý tvar v závislosti na kultivačních podmínkách a počtu pasáží (Ma et al., 2012). Na Obrázku 20 je snímek buněk L929 s převažujícím vřetenovitým tvarem, přičemž stejná morfologie buněk byla zkoumána také v publikaci Toz et al. (2017).



Obr. 20: Kontrolní buňky L929 zobrazeny konfokálním mikroskopem.

4.4 Analýza viability buněk – MTT test

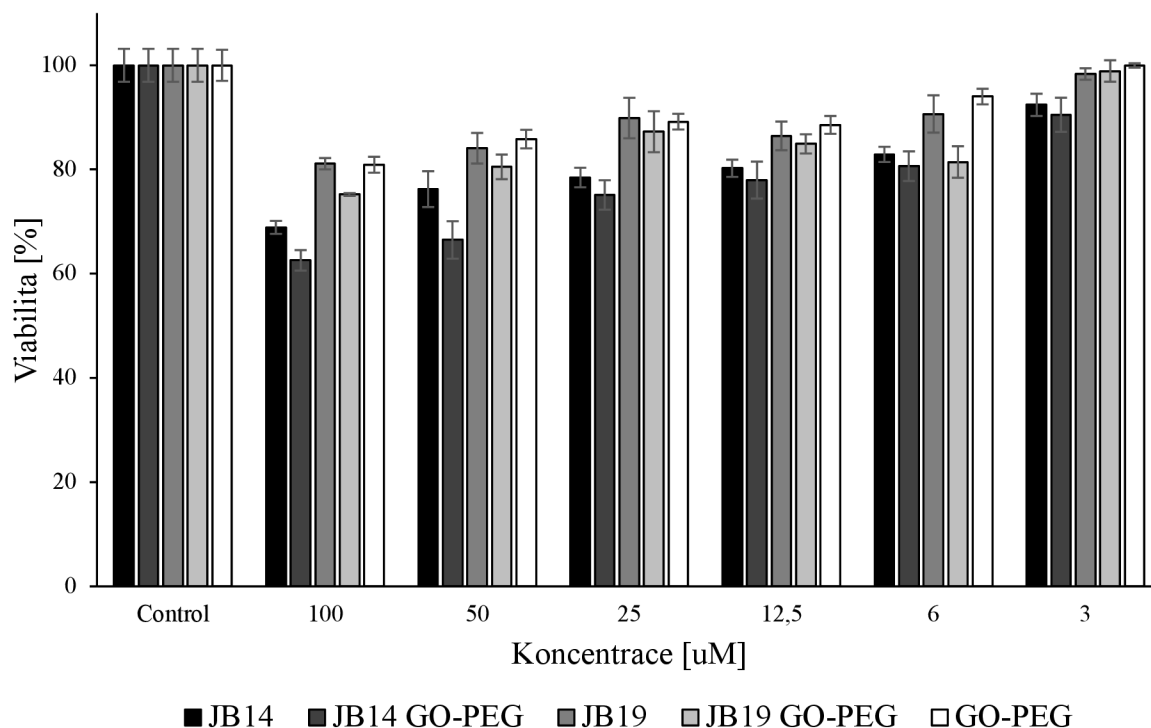
Míra cytotoxicity testovaných látek **JB14**, **JB19**, navázané látky **JB14** na **GO-PEG** (**JB14 GO-PEG**), **JB19** na **GO-PEG** (**JB19 GO-PEG**) a samotné nanoplatformy **GO-PEG** byla stanovena pomocí MTT testu na třech buněčných liniích. Testy byly provedeny na nádorové buněčné linii HT-1080 a SK-BR3, a nenádorové buněčné linii L929. Buňky byly ovlivněny testovanými látkami o koncentraci 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM, 6 μM a 3 μM po dobu 72 hodin, a následně byla změřena absorbance při 570 nm a referenční vlnové délce 650 nm. Data ze spektrofotometrického měření byla dále zpracována v programu Excel, ve kterém byla vyhodnocena viabilita příslušných buněčných linií.

PEGylovaný GO nevykazoval významnou toxicitu u žádné z testovaných buněčných linií. Hodnota viability buněk byla ve všech případech vyšší než 80 %, aniž by docházelo k ovlivnění morfologie buněk. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími pracemi,

kteře rovněž prokázaly absenci toxicity GO-PEG (Liu et al., 2008; Du et al., 2014; Giusto et al., 2022). Nanonosiče GO-PEG mají tedy potenciál být používány bez závažnějších vedlejších účinků.

Experiment prokázal, že buněčná linie HT-1080 byla citlivější vůči působení látky **JB14** navázané na **GO-PEG**, a to při nejvyšší studované koncentraci 100 μM . Viabilita buněk byla v tomto případě 63 %. Tento výsledek naznačuje, že byl zachován účinek látky **JB14** i po navázání na GO-PEG. Naopak látka **JB19** navázaná na **GO-PEG** tak toxická nebyla. Současně je patrné, že samotná látka **JB14** působí na buňky o něco méně toxicky než **JB14 GO-PEG**, viabilita buněk byla 69 %, což poukazuje na možnost snížení dávky léčiva díky použití nanoplatformy GO-PEG. V porovnání s ostatními látkami byla nejméně toxická látka **JB19**. V závislosti na specifickém typu buněčné linie může docházet k odlišnému metabolickému zpracování sacharidů po jejich vstupu do buňky (Tataranni et al., 2017). Rozdílná metabolická cesta galaktózy ve srovnání s glukózou by mohla ovlivnit stabilitu a uvolňování cisplatin. Tento jev může být jedním z potenciálních důvodů odlišné citlivosti buněk HT-1080 na testované látky **JB14** a **JB19**. Se snižující se koncentrací došlo téměř u všech testovaných látek ke zvýšení viability buněk (Obrázek 21).

HT-1080 - ovlivnění 72 hodin

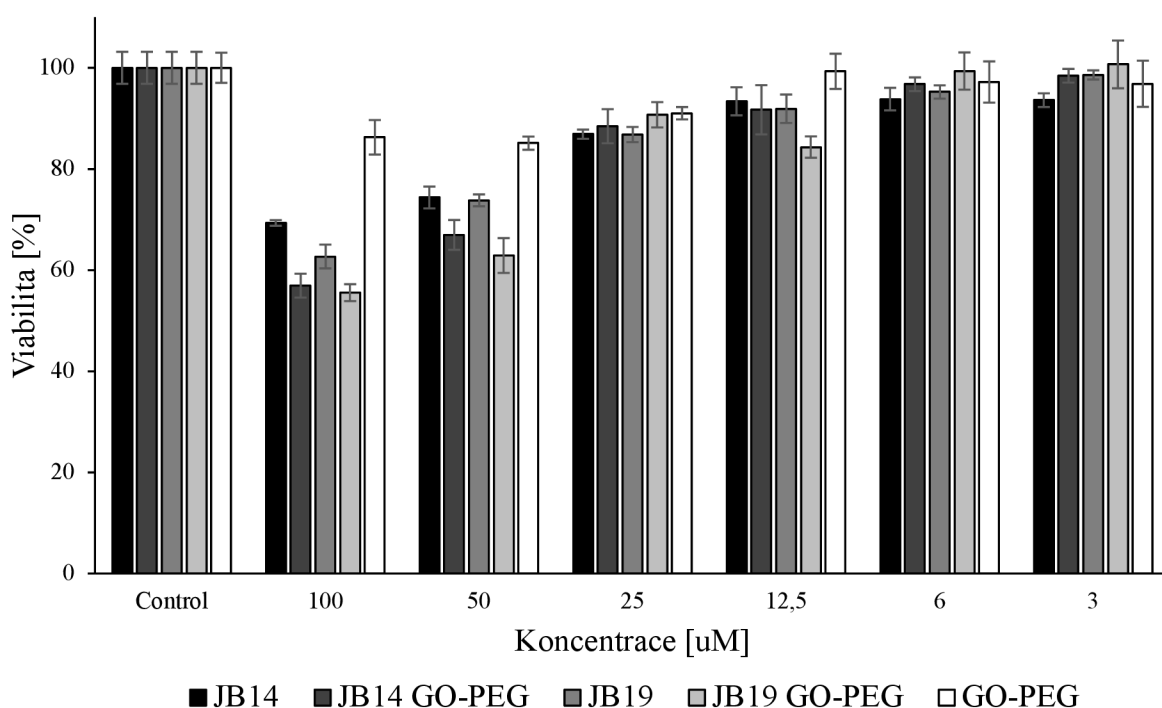


Obr. 21: Výsledky analýzy viability buněk HT-1080 – procentuální vyjádření viability buněk ovlivněných látkou JB14, JB14 navázanou na GO-PEG, JB19 a látkou JB19 navázanou na GO-PEG po dobu 72 hodin.

Druhý experiment byl zaměřen na buněčnou linii SK-BR3. Z Obrázku 22 je patrné, že více cytotoxicky na tuto buněčnou linii působila látka **JB19** navázaná na **GO-PEG** o koncentraci 100 μM , viabilita buněk byla 55 %. Při stejné koncentraci projevila látka **JB14 GO-PEG** podobnou toxicitu, viabilita buněk dosáhla 57 %. Méně toxicky oproti navázaným látkám na GO-PEG působily samotné látky **JB14** a **JB19**, což naznačuje, že použití nanoplatfomy GO-PEG umožňuje aplikaci menšího množství léčiv. S klesající koncentrací testovaných látek bylo téměř u všech měření pozorováno zvýšení viability buněk.

V našem případě byl sledován obdobný výsledek jako ve studii Huang et al. (2015), ve které prezentovali protinádorový účinek cisplatinu v porovnání s cisplatinou navázanou na nosiči trastuzumabu, a to *in vitro* na buněčných liniích MDA-MB-231, MCF-7 a SK-BR3. Za účelem navázání léčiva na trastuzumab byla cisplatinu funkcionalizovaná dvěma axiálními ligandy kyseliny jantarové. Bylo zjištěno, že koncentrace cisplatinu vyvolávající 50 % inhibici růstu (IC_{50}) linie SK-BR3 po 72hodinovém ovlivnění byla $20,73 \pm 0,09 \mu\text{M}$. Nicméně cytotoxicita cisplatinu po chemické modifikaci byla výrazně nižší, zejména u buněk SK-BR3 byla hodnota IC_{50} větší než 50 μM . Snížená cytotoxicita se předpokládá v důsledku relativní kinetické inertnosti oktaedrické struktury.

SK-BR3 - ovlivnění 72 hodin

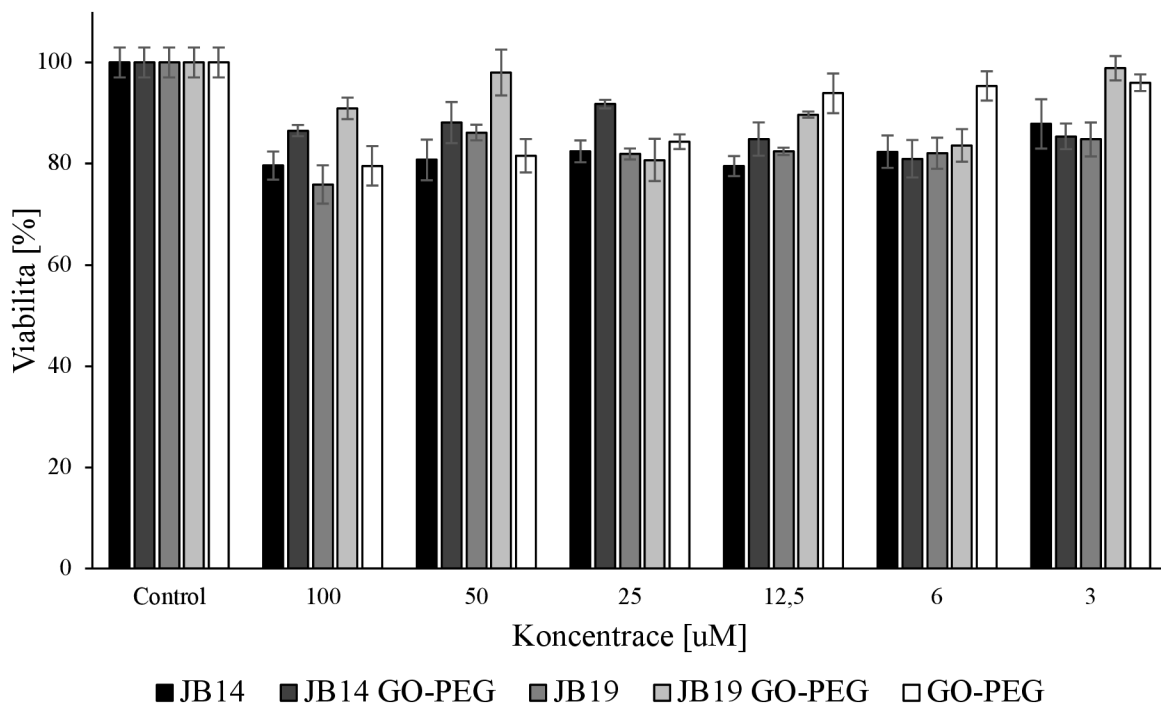


Obr. 22: Výsledky analýzy viability buněk SK-BR3 – procentuální vyjádření viability buněk ovlivněných látkou JB14, JB14 navázanou na GO-PEG, JB19 a látkou JB19 navázanou na GO-PEG po dobu 72 hodin.

Nenádorová linie L929 byla inkubována s látkami o stejných koncentracích, avšak látky nebyly pro tuto buněčnou linii tolik cytotoxické (Obrázek 23). Kromě látky **JB19** při nejvyšší koncentraci dosáhla viabilita buněk u zbývajících měření hodnot vyšších než 80 %. Přičemž hodnota viability se významně neměnila se snižující se koncentrací látek. Tyto výsledky jsou známkou selektivity testovaných látek vůči nádorovým buňkám, díky jejich zvýšenému příjmu sacharidů, který je známý jako Warburgův efekt.

Stejný účinek platiny konjugované s glukózou na buněčné linii L929 byl popsán v publikaci Quan et al. (2020), kdy byly buňky ovlivněny po dobu 48 hodin. Navíc byl testován účinek na nádorové buněčné linii HeLa a HepG2, jejichž buňky mají vyšší rychlost metabolismu sacharidů. Oproti nádorovým buněčným liniím byla toxicita testované sloučeniny pro buňky L929 výrazně nižší. U sloučeniny o koncentraci 100 μM , 50 μM a 25 μM dosáhla viabilita buněk L929 až dvojnásobné hodnoty. Obecně by tak modifikace platinových léčiv glukózou mohla zvýšit jejich účinnost vůči nádorovým buňkám, a snížit toxicitu pro zdravé buňky.

L929 - ovlivnění 72 hodin

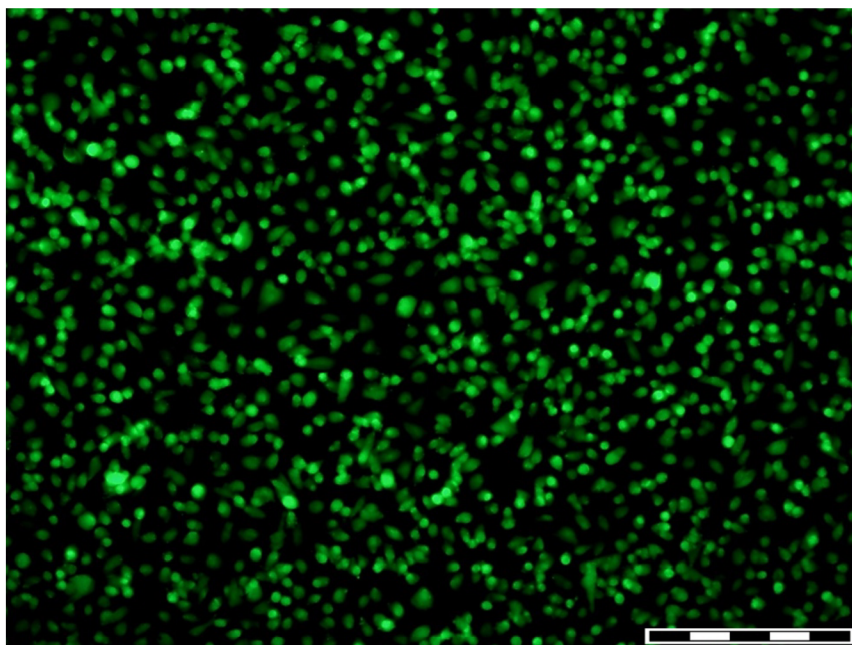


Obr. 23: Výsledky analýzy viability buněk L929 – procentuální vyjádření viability buněk ovlivněných látkou JB14, JB14 navázanou na GO-PEG, JB19 a látkou JB19 navázanou na GO-PEG po dobu 72 hodin.

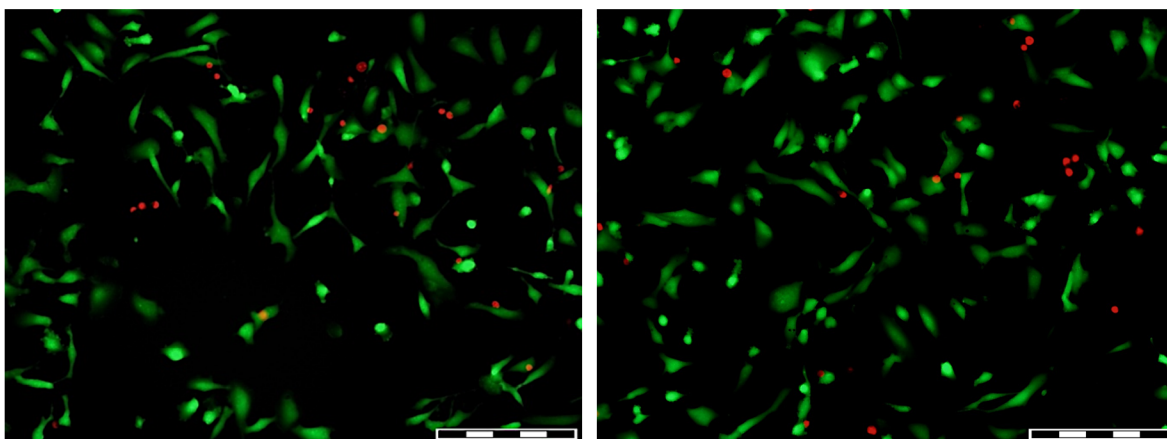
4.5 Analýza viability buněk fluorescenčním mikroskopem

Pro porovnání a potvrzení výsledků z MTT testu byla provedena analýza viability buněk prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Analýza byla opět provedena na třech buněčných liniích, konkrétně HT-1080, SK-BR3 a L929. Buňky byly ovlivněny testovanými látkami **JB14**, **JB19**, **JB14 GO-PEG** a **JB19 GO-PEG** o koncentraci 100 μM po dobu 72 hodin. Ke značení metabolicky aktivních buněk byl využit kalcein AM, kdy po excitaci zářením o vlnové délce 490 nm živé buňky emitovaly zelené záření o vlnové délce 515 nm. Naopak ke značení mrtvých buněk byl použit propidium jodid, a barvivo uvnitř buněk po ozáření světlem o vlnové délce 535 nm emitovalo červené záření při 617 nm. Fluorescence byla posléze snímána programem Quick Photo Camera 3.0.

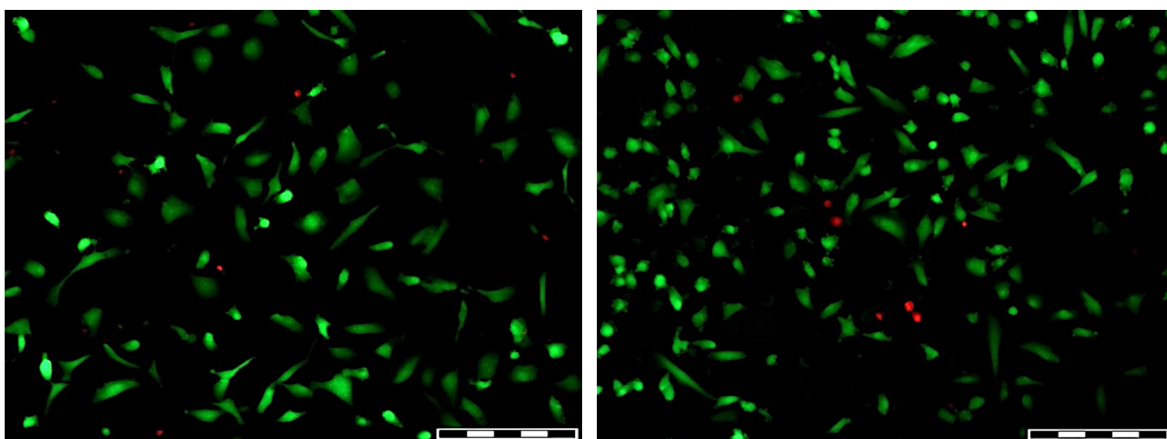
Viabilita buněčné linie HT-1080 byla po obarvení kalceinem AM a propidium jodidem zaznamenána fluorescenčním mikroskopem (Obrázek 24–26). Kontrolní neovlivněné buňky poskytovaly zelenou fluorescenci, což naznačuje vysokou metabolickou aktivitu těchto buněk (Obrázek 24). Po 72hodinové inkubaci s testovanými látkami bylo pozorováno zpomalení buněčné proliferace oproti kontrolním buňkám. Vedle úbytku zeleně fluoreskujících buněk došlo také k nárůstu červeně fluoreskujících buněk, které indikují buněčnou smrt. Tento jev se projevil nejvýrazněji u látky **JB14** a také **JB14** navázané na **GO-PEG**. Výsledky tedy kvalitativně korespondují s výsledky z MTT testu.



Obr. 24: Viabilita kontrolních buněk HT-1080 inkubovaných 72 hodin v médiu MEM, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřítka: 200 μm .

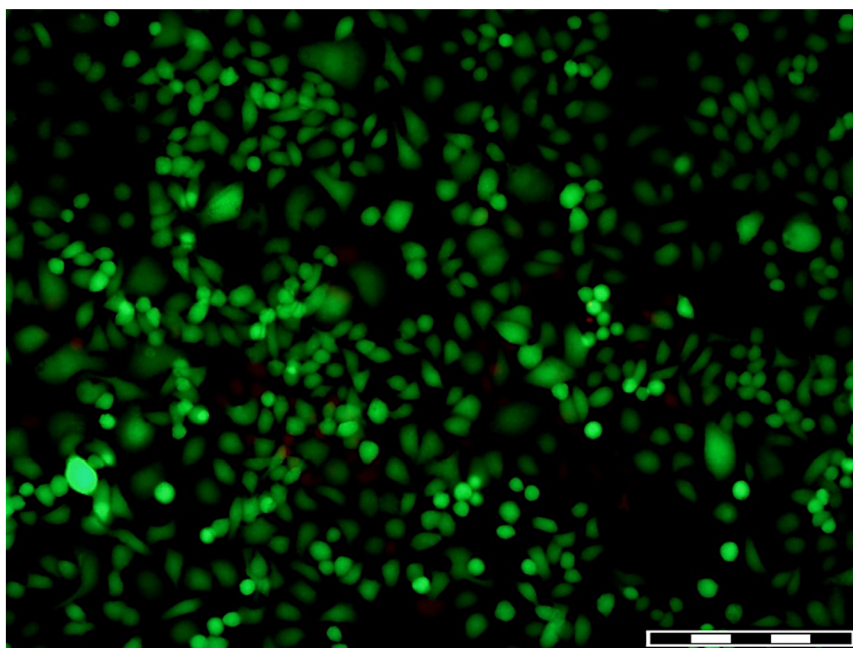


Obr. 25: Viabilita buněk HT-1080 ovlivněných JB14 (vlevo) a JB14 GO-PEG (vpravo) po dobu 72 hodin, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřitko: 200 μm .

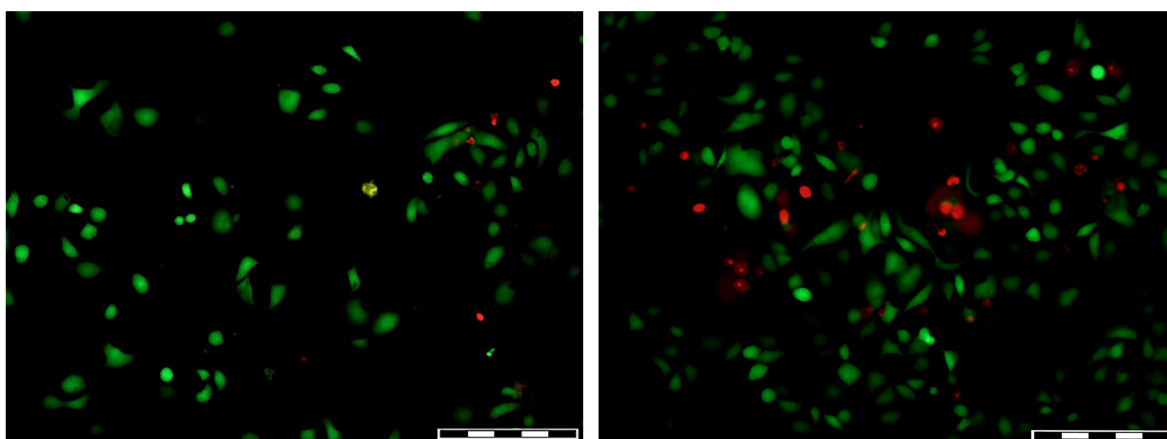


Obr. 26: Viabilita buněk HT-1080 ovlivněných JB19 (vlevo) a JB19 GO-PEG (vpravo) po dobu 72 hodin, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřitko: 200 μm .

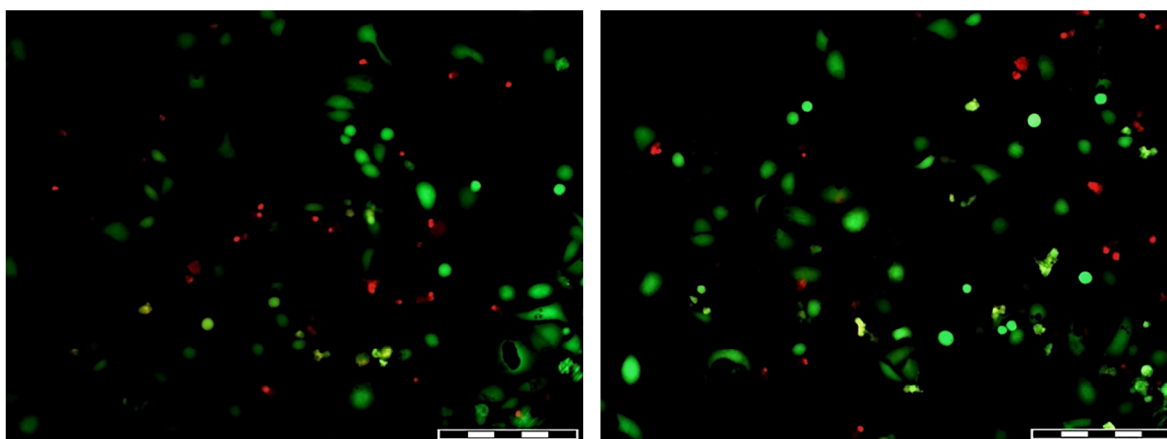
Stejným způsobem byla fluorescenčními barvivy obarvena buněčná linie SK-BR3, a následně zobrazena fluorescenčním mikroskopem. Na základě výsledků prezentovaných na Obrázku 27 je patrné, že většina kontrolních buněk byly zeleně fluoreskující živé buňky. Po aplikaci testovaných látek došlo ke zvýšení počtu mrtvých buněk vykazujících červenou fluorescenci (Obrázek 28 a 29). Pouze u buněk ovlivněných látkou **JB14** nebyl nárůst tak signifikantní (Obrázek 28). Současně byla pozorována inhibice proliferace buněk, což bylo zřejmé u ovlivněných buněk ve srovnání s buňkami kontrolními.



Obr. 27: Viabilita kontrolních buněk SK-BR3 inkubovaných 72 hodin v médiu DMEM, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřitko: 200 μ m.

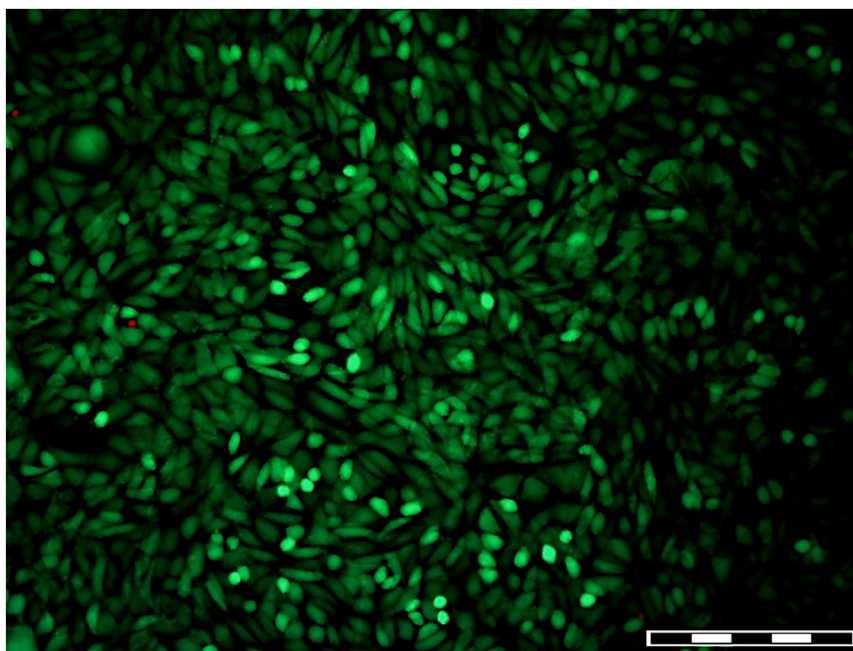


Obr. 28: Viabilita buněk SK-BR3 ovlivněných JB14 (vlevo) a JB14 GO-PEG (vpravo) po dobu 72 hodin, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřitko: 200 μ m.

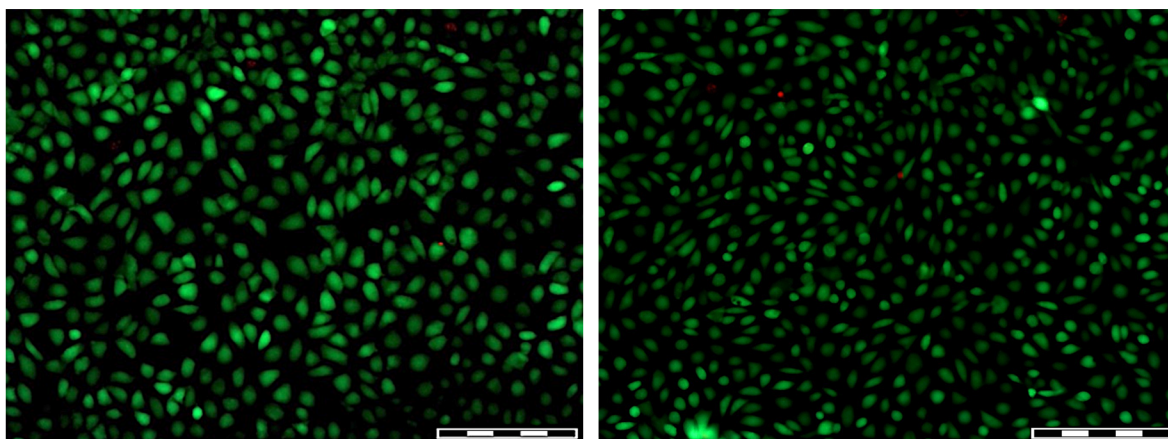


Obr. 29: Viabilita buněk SK-BR3 ovlivněných JB19 (vlevo) a JB19 GO-PEG (vpravo) po dobu 72 hodin, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřitko: 200 μ m.

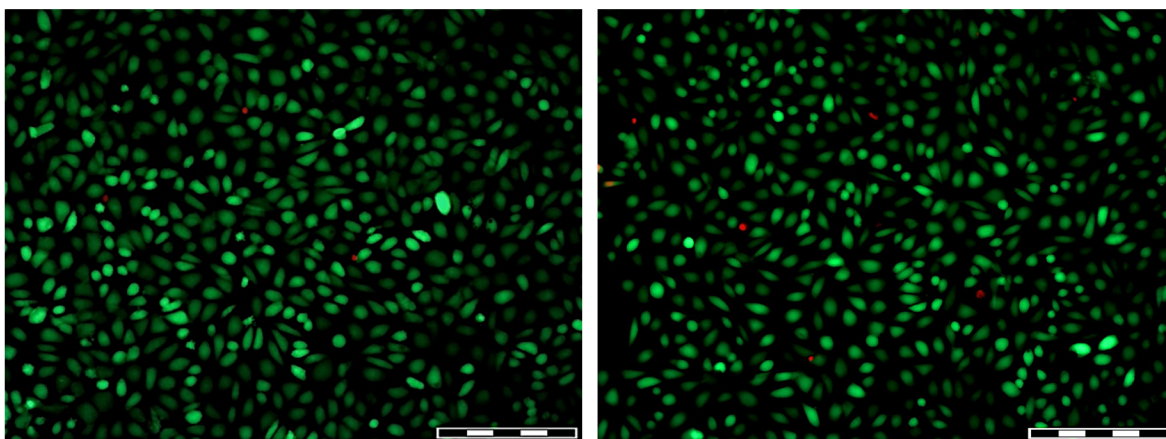
Na závěr byla obarvena fluorescenčními barvivy taktéž nenádorová buněčná linie L929, a byla snímána jejich fluorescence (Obrázek 30–32). Na všech snímcích buněk L929 výrazně převažovala zelená fluorescence, a jednalo se tedy o buňky metabolicky aktivní. Tato pozorování kvalitativně odpovídala výše prezentovaným výsledkům MTT testu. Vzhledem k tomu lze předpokládat, že testované látky mohou být selektivní vůči nádorovým buněčným liniím.



Obr. 30: Viabilita kontrolních buněk L929 inkubovaných 72 hodin v médiu EMEM, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřitko: 200 μ m.



Obr. 31: Viabilita buněk L929 ovlivněných JB14 (vlevo) a JB14 GO-PEG (vpravo) po dobu 72 hodin, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřitko: 200 μ m.



Obr. 32: Viabilita buněk L929 ovlivněných JB19 (vlevo) a JB19 GO-PEG (vpravo) po dobu 72 hodin, zobrazena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Měřítko: 200 μ m.

5 ZÁVĚR

Nanonosiče na bázi grafen oxidu jsou atraktivním materiálem pro biologické a medicínské aplikace, zejména díky svým unikátním vlastnostem, které umožňují efektivní transport a dodání léčiv do cílových buněk. Za účelem zvýšení biokompatibility nanočástic GO se jejich povrch modifikuje aplikací biopolymerů. Nanonosiče, nesoucí vhodná léčiva, mohou být účinně využity v terapii nádorových onemocnění. Cisplatina je léčivo schválené pro léčbu rakoviny varlat a vaječníků, nicméně stále probíhají výzkumy s cílem zlepšit její efektivitu. Navázání cisplatiny na nanoplatformu GO-PEG navíc může přispět k redukci nežádoucích účinků samotného léčiva.

V rámci teoretické části předložené diplomové práce byly podrobně popsány nanonosiče léčiv, včetně jejich klasifikace a využití při léčbě nádorových onemocnění. Rešerše se dále zabírala charakteristikou grafen oxidu, možnostmi jeho funkcionalizace, a mechanismem účinku cisplatiny, která je klíčovým cytostatikem v chemoterapii.

Experimentální část diplomové práce byla v první řadě zaměřena na přípravu nanoplatformy na bázi GO, jejíž povrch byl funkcionalizován PEGem. Nanoplatforma byla detailně charakterizována pomocí mikroskopických (AFM, SEM) a také spektroskopických metod (FTIR, RAMAN). Následně byly na povrch připraveného GO-PEG navázány deriváty cisplatiny, a byla stanovena koncentrace úspěšně navázaného léčiva AAS měřením. Biologická část diplomové práce byla zaměřena na *in vitro* test životaschopnosti buněk (MTT) za účelem vyhodnocení protinádorového efektu nanoplatformy s navázaným léčivem, který byl dále potvrzen prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Před ovlivněním studovanými látkami byly buněčné linie navíc zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu.

Úspěšná funkcionalizace GO PEGem byla prokázána spektroskopickou metodou FTIR, která byla doplněna mikroskopickou metodou SEM. Po zobrazení nanočástic GO a GO-PEG skenovacím elektronovým mikroskopem bylo provedeno měření jejich infračerveného spektra. Infračervené spektrum GO-PEG obsahovalo většinu píků hlavních funkčních skupin PEGu, což potvrdilo zdárnou PEGylaci.

Po navázání a stanovení navázané koncentrace derivátů cisplatiny **JB14** a **JB19** byla provedena analýza viability buněk MTT testem a fluorescenční mikroskopii. Výsledky MTT testu naznačují, že nanoplatforma GO-PEG nejeví výraznou toxicitu vůči žádné z testovaných buněčných linií a má potenciál být aplikována s minimálními vedlejšími účinky. Navíc nenádorová buněčná linie L929 projevila nižší citlivost vůči působení

testovaných sloučenin ve srovnání se studovanými nádorovými buněčnými liniemi HT-1080 a SK-BR3. Tato skutečnost napovídá tomu, že testované látky vykazují vyšší selektivitu vůči nádorovým buněčným liniím. Protinádorový efekt testovaných derivátů cisplatiny byl patrný především u buněčné linie SK-BR3. Konkrétně látka **JB19** navázaná na nanoplatformu **GO-PEG**, která na tuto buněčnou linii působila nejtoxičtěji při nejvyšší studované koncentraci 100 μM . Tyto výsledky byly pozorovány i při analýze viability buněk prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu.

Testované deriváty cisplatiny nejsou zdaleka tak účinné jako cisplatina samotná, ale navázáním na nanoplatformu GO-PEG došlo k mírnému nárůstu protinádorového efektu. Na základě získaných perspektivních výsledků by následná studie mohla být zaměřena na hodnocení protinádorové aktivity nově syntetizovaných derivátů cisplatiny navázaných na nanoplatformě GO-PEG na širším spektru nádorových linií.

6 POUŽITÁ LITERATURA

Almeida J. P. M., Chen A. L., Foster A., Drezek R. (2011) *In vivo* biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine* **6**, 815–835.

Alshawwa S. Z., Kassem A. A., Farid R. M., Mostafa S. K., Labib G. S. (2022) Nanocarrier Drug Delivery Systems: Characterization, Limitations, Future Perspectives and Implementation of Artificial Intelligence. *Pharmaceutics* **14**, 883.

Bae Y. H., Park K. (2011) Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *Journal of Controlled Release* **153**, 198–205.

Bamrungsap S., Zhao Z., Chen T., Wang L., Li Ch., Fu T., Tan W. (2012) Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine* **7**, 1253–1271.

Bober Z., Bartusik-Aebisher D., Aebisher D. (2022) Application of Dendrimers in Anticancer Diagnostics and Therapy. *Molecules* **27**, 3237.

Boukhalov D. W., Katsnelson M. I. (2009) Chemical functionalization of graphene. *Journal of Physics: Condensed Matter* **21**, 344205.

Bozzuto G., Molinari A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine* **10**, 975–999.

Caminade A. M., Turrin C. O. (2014) Dendrimers for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* **2**, 4055–4066.

Dasari S., Tchounwou P. B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* **740**, 364–378.

Dilruba S., Kalayda G. V. (2016) Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **77**, 1103–1124.

Dresselhaus M. S., Jorio A., Hofmann M., Dresselhaus G., Saito R. (2010) Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy. *Nano Letters* **10**, 751–758.

Dreyer D. R., Park S., Bielawski C. W., Ruoff R. S. (2010) The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* **39**, 228–240.

Du L., Wu S., Li Y., Zhao X., Ju X., Wang Y. (2014) Cytotoxicity of PEGylated graphene oxide on lymphoma cells. *Bio-Medical Materials and Engineering* **24**, 2135–2141.

Esmaeili Y., Bidram E., Zarrabi A., Amini A., Cheng C. (2020) Graphene oxide and its derivatives as promising In-vitro bio-imaging platforms. *Scientific Reports* **10**, 18052.

Ferraro D. A., Patella F., Zanivan S., Donato C, Aceto N., Giannotta M., Dejana E., Diepenbruck M., Christofori G., Buess M. (2019) Endothelial cell-derived nidogen-1 inhibits migration of SK-BR-3 breast cancer cells. *BMC Cancer* **19**, 312.

- Fuertes M., Castilla J., Alonso C., Pérez J. (2003) Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Current Medicinal Chemistry* **10**, 257–266.
- Geim A. K., Novoselov K. S. (2007) The rise of graphene. *Nature Materials* **6**, 183–191.
- Ghosh S. (2017) Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* **88**, 102925.
- Giusto E., Žárská L., Beirne D. F., Rossi A., Bassi G., Ruffini A., Montesi M., Montagner D., Ranc V., Panseri S. (2022) Graphene Oxide Nanoplatforms to Enhance Cisplatin-Based Drug Delivery in Anticancer Therapy. *Nanomaterials* **12**, 2372.
- Gmeiner W. H., Ghosh S. (2015) Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnology Reviews* **3**, 111–122.
- Guo Z., Chakraborty S., Monikh F. A., Varsou D., Chetwynd A., Afantitis A., Lynch I., Zhang P. (2021) Surface Functionalization of Graphene-Based Materials: Biological Behavior, Toxicology, and Safe-By-Design Aspects. *Advanced Biology* **5**, 2100637.
- Haley B., Frenkel E. (2008) Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **26**, 57–64.
- Huang R., Wang Q., Zhang X., Zhu J., Sun B. (2015) Trastuzumab-cisplatin conjugates for targeted delivery of cisplatin to HER2-overexpressing cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **72**, 17–23.
- Charmi J., Nosrati H., Mostafavi Amjad J., Mohammadkhani R., Danafar H. (2019) Polyethylene glycol (PEG) decorated graphene oxide nanosheets for controlled release curcumin delivery. *Heliyon* **5**, e01466.
- Chenthamara D., Subramaniam S., Ramakrishnan S. G., Krishnaswamy S., Essa M. M., Lin F. H., Qoronfle M. W. (2019) Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomaterials Research* **23**, 20.
- Chrastina A., Massey K. A., Schnitzer J. E. (2011) Overcoming *in vivo* barriers to targeted nanodelivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **3**, 421–437.
- Jain N. K., Nahar M. (2010) PEGylated Nanocarriers for Systemic Delivery. In: *Cancer Nanotechnology* **624**, 221–234.
- Janaszewska A., Lazniewska J., Trzepiński P., Marcinkowska M., Klajnert-Maculewicz B. (2019) Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules* **9**, 330.
- Jia Y., Jiang Y., He Y., Zhang W., Zou J., Magar K. T., Boucetta H., Teng CH., He W. (2023) Approved Nanomedicine against Diseases. *Pharmaceutics* **15**, 774.
- Jiříčková A., Jankovský O., Sofer Z., Sedmidubský D. (2022) Synthesis and Applications of Graphene Oxide. *Materials (Basel)* **15**, 920.

- Keller H. U., Hunziker I. P., Sordat B., Niggli V., Sroka J. (2000) Protein kinase C isoforms involved in regulation of cell shape and locomotion of human fibrosarcoma HT1080 cells. *International Journal of Cancer* **88**, 195–203.
- Kiew S. F., Kiew L. V., Lee H. B., Imae T., Chung L. Y. (2016) Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. *Journal of Controlled Release* **226**, 217–228.
- Kuila T., Bose S., Mishra A. K., Khanra P., Kim N. H., Lee J. H. (2012) Chemical functionalization of graphene and its applications. *Progress in Materials Science* **57**, 1061–1105.
- Kunjachan S., Pola R., Gremse F., Theek B., Ehling J., Moeckel D., Hermanns-Sachweh B., Pechar M., Ulbrich K., Hennink W. E., Storm G., Lederle W., Kiessling F., Lammers T. (2014) Passive vs. Active Tumor Targeting using RGD-and NGR-modified Polymeric Nanomedicines. *Nano Letters* **14**, 972–981.
- Lin G., Mi P., Chu C., Zhang J., Liu G. (2016) Inorganic Nanocarriers Overcoming Multidrug Resistance for Cancer Theranostics. *Advanced Science* **3**, 1600134.
- Liu Z., Robinson J. T., Sun X., Dai H. (2008) PEGylated Nano-Graphene Oxide for Delivery of Water Insoluble Cancer Drugs. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 10876–10877.
- Loutfy S. A., Salaheldin T. A., Ramadan M. A., Farroh K. Y., Abdallah Z. F., Youssef T. (2017) Synthesis, Characterization and Cytotoxic Evaluation of Graphene Oxide Nanosheets: *In Vitro* Liver Cancer Model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* **18**, 955–961.
- Luiz H., Oliveira Pinho J., Gaspar M. M. (2023) Advancing Medicine with Lipid-Based Nanosystems—The Successful Case of Liposomes. *Biomedicines* **11**, 435.
- Ma Z., Hu Y., Jiang G., Hou J., Liu R., Lu Y., Liu Ch. (2012) Spontaneous generation of germline characteristics in mouse fibrosarcoma cells. *Scientific Reports* **2**, 743.
- Majumder N., Das G. N., Das S. K. (2020) Polymeric micelles for anticancer drug delivery. *Therapeutic Delivery* **11**, 613–635.
- Mishra B., Patel B. B., Tiwari S. (2010) Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **6**, 9–24.
- Mitchell M. J., Billingsley M. M., Haley R. M., Wechsler M. E., Peppas N. A., Langer R. (2021) Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **20**, 101–124.
- Muñoz R., Singh D. P., Kumar R., Matsuda A. (2019) Chapter 22 - Graphene Oxide for Drug Delivery and Cancer Therapy. In: *Nanostructured Polymer Composites for Biomedical Applications*, 447–488.

- Negi A., Bijalwan K., Rawat J., Sharma H., Dwivedi C. (2021) Synthesis and characterization of the nanocomposites of graphene oxide in polyethylene glycol (PEG). *Materials Today: Proceedings* **45**, 4742–4745.
- Novoselov K. S., Fal'ko V. I., Colombo L., Gellert P. R., Schwab M. G., Kim K. (2012) A roadmap for graphene. *Nature* **490**, 192–200.
- Pan Y., Sahoo N. G., Li L. (2012) The application of graphene oxide in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **9**, 1365–1376.
- Paredes J. I., Villar-Rodil S., Martínez-Alonso A., Tascón J. M. D. (2008) Graphene Oxide Dispersions in Organic Solvents. *Langmuir* **24**, 10560–10564.
- Park H., Otte A., Park K. (2022) Evolution of Drug Delivery Systems: From 1950 to 2020 and Beyond. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* **342**, 53–65.
- Quan L., Lin Z., Lin Y., Wei Y., Lei L., Li Y., Tan G., Xiao M., Wu T. (2020) Glucose-modification of cisplatin to facilitate cellular uptake, mitigate toxicity to normal cells, and improve anti-cancer effect in cancer cells. *Journal of Molecular Structure* **1203**, 127361.
- Ranganathan R., Madanmohan S., Kesavan A., Baskar G., Krishnamoorthy Y., Santosham R., Ponraju D., Rayala S. K., Venkatraman G. (2012) Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 1043–1060.
- Saini R., Saini S., Sharma S. (2010) Nanotechnology: The Future Medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* **3**, 32–33.
- Sattari S., Adeli M., Beyranvand S., Nemati M. (2021) Functionalized Graphene Platforms for Anticancer Drug Delivery. *International Journal of Nanomedicine* **16**, 5955–5980.
- Spinato C., Ménard-Moyon C., Bianco A. (2014) Chemical Functionalization of Graphene for Biomedical Applications. In: *Functionalization of Graphene* **1**, 95–138
- Su C., Liu Y., Li R., Wu W., Fawcett J. P., Gu J. (2019) Absorption, distribution, metabolism and excretion of the biomaterials used in Nanocarrier drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **143**, 97–114.
- Tataranni T., Agriesti F., Ruggieri V., Mazzoccoli C., Simeon V., Laurenzana I., Scrima R., Pazienza V., Capitanio N., Piccoli C. (2017). *Oncotarget* **8**, 41265–41281.
- Toz T., Kiremitçi A., Sera Çakmak A., Ünsal Tan O., Palaska E., Gümüşderelioğlu M., Özcan M. (2017) A comparative study on monomer elution and cytotoxicity of different adhesive restoration materials. *Journal of Adhesion Science and Technology* **31**, 414–429.
- Wang X.Y., Narita A., Müllen K. (2017) Precision synthesis versus bulk-scale fabrication of graphenes. *Nature Reviews Chemistry* **2**, 0100.

Werner M. E., Cummings N. D., Sethi M., Wang E. C., Sukumar R., Moore D. C., Wang A. Z. (2013) Preclinical Evaluation of Genexol-PM, a Nanoparticle Formulation of Paclitaxel, as a Novel Radiosensitizer for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **86**, 463–468.

Wu M., Li H., Liu R., Gao X., Zhang M., Liu P., Fu Z., Yang J., Zhang-Negrerie D., Gao Q. (2016) Galactose conjugated platinum(II) complex targeting the Warburg effect for treatment of non-small cell lung cancer and colon cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry* **110**, 32–42.

Yu B., Tai H. C., Xue W., Lee L. J., Lee R. J. (2010) Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Molecular membrane biology* **27**, 286–298.

Yu H., Zhang B., Bulin C., Li R., Xing R. (2016) High-efficient Synthesis of Graphene Oxide Based on Improved Hummers Method. *Scientific Reports* **6**, 36143.

Zhang L., Gu F., Chan J., Wang A., Langer R., Farokhzad O. (2008) Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **83**, 761–769.

Zhao X., Si J., Huang D., Li K., Xin Y., Sui M. (2020) Application of star poly(ethylene glycol) derivatives in drug delivery and controlled release. *Journal of Controlled Release* **323**, 565–577.

Zielińska A., Carreiró F., Oliveira A. M., Neves A., Pires B., Venkatesh D. N., Durazzo A., Lucarini M., Eder P., Silva A. M., Santini A., Souto E. B. (2020) Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* **25**, 3731.