

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Biotechnologia

Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr inż. Bartłomiej Dąbrowski

Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do komórek ssaczych

Promotor:

Prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka

Promotor pomocniczy:

Dr inż. Agnieszka Żuchowska

Warszawa 2024

Streszczenie

Utleniony grafen (GO, ang. *graphene oxide*), będący bogatą w tlenowe grupy funkcyjne pochodną grafenu, wykazuje potencjalne zastosowanie w medycynie. Dzięki dużej powierzchni właściwej oraz możliwości modyfikacji powierzchni, może on służyć jako nośnik leków m. in. w chemioterapii, terapii genetycznej i terapii fotodynamicznej. Do tej pory zaproponowano wiele nośników leków na bazie utlenionego grafenu, które zwiększają selektywne uwalnianie leku lub umożliwiają łączenie kilku strategii w celu uzyskania synergistycznego efektu terapeutycznego. Jednak pomimo wielu badań, zaproponowane nośniki leków nie znalazły faktycznego zastosowania w medycynie. Jest to wynikiem niewystarczającego scharakteryzowania właściwości biologicznych utlenionego grafenu oraz luk w wiedzy na temat oddziaływań utlenionego grafenu z komórkami. Do skutecznego wykorzystania utlenionego grafenu w medycynie niezbędne jest lepsze poznanie zjawiska wnikania GO do komórek ssaczy. Efektywność wnikania GO do komórek może zależeć m. in. od rozmiaru płatków GO, modyfikacji jego powierzchni oraz od rodzaju komórek. Podczas oceny wnikania GO do komórek należy również uwzględnić zjawiska wpływające na GO w środowisku *in vivo*. Wprowadzony do krwioobiegu GO oddziałuje ze składnikami osocza, które adsorbują na jego powierzchni. W ramach niniejszego doktoratu zbadano jak rozmiar płatków oraz inkubacja z ludzką surowicą wpływają na efektywność wnikania GO do wybranych typów komórek ssaczy. Badania przeprowadzono na nowotworowych i prawidłowych komórkach płuc oraz na prawidłowej linii komórek nabłonka żyły pępowinowej. Pierwszym etapem badań było uzyskanie frakcji utlenionego grafenu o różnych rozmiarach płatków oraz inkubacja uzyskanych frakcji z komercyjnie dostępną surowicą ludzką. Do dalszych badań wybrano dwie frakcje utlenionego grafenu różniące się rozmiarami płatków. Z każdej frakcji wyodrębniono próbki dodatkowo inkubowane z ludzką surowicą krwi. Następnie oceniono wpływ badanych frakcji utlenionego grafenu na żywotność i aktywność metaboliczną komórek. W kolejnym kroku frakcje utlenionego grafenu zostały wyznakowane fluorescencyjnie i określono ich efektywność wnikania do komórek oraz wewnątrzkomórkową lokalizację. Badania przeprowadzono na trzech liniach komórkowych z wykorzystaniem standardowych technik hodowli komórek. W celu lepszego odwzorowania warunków *in vivo* na drugim etapie badań do hodowli komórek użyto mikrosystemu *Cell-on-a-Chip*. Zaproponowany mikrosystem umożliwił podawanie zawiesiny utlenionego grafenu do komórek zarówno w warunkach ciągłego jak i przerywanego przepływu. Wykorzystanie mikrosystemu do hodowli komórek pozwoliło dokonać wstępnej oceny wpływu warunków przepływu zawiesiny GO podczas

inkubacji z komórkami na wewnątrzkomórkową lokalizację oraz efektywność wnikania GO do komórek. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że inkubacja z surowicą obniża efektywność wnikania GO do komórek. Ponadto większe płatki wnikały do komórek z większą efektywnością niż mniejsze. Zauważono również różnice w efektywności wnikania GO do komórek ze względu na typ komórki. Dodatkowo stwierdzono wzrost efektywności wnikania GO do komórek w warunkach ciągłego podawania zawiesiny GO podczas inkubacji w porównaniu do inkubacji prowadzonej w warunkach przepływu przerywanego.

Słowa kluczowe: utleniony grafen, hodowle komórkowe, wnikanie do komórek, Cell-on-a-Chip

Abstract

Graphene oxide (GO), a derivative of graphene rich in oxygen functional groups, shows potential applications in medicine. Due to its large specific surface area and surface modification possibilities, it can serve as a drug carrier in chemotherapy, gene therapy, and photodynamic therapy. Many GO-based drug carriers have been proposed that enhance selective drug release or allow the combination of several strategies to achieve a synergistic therapeutic effect. However, despite numerous studies, the proposed drug carriers have not found actual applications in medicine. This is due to insufficient characterization of the biological properties of graphene oxide and gaps in knowledge regarding its interactions with cells. To effectively utilize graphene oxide in medicine, it is essential to better understand the phenomenon of GO internalization into mammalian cells. The efficiency of GO cellular uptake may depend on factors such as the size of GO flakes, surface modifications, and the type of cells. When assessing GO uptake by cells, it is also necessary to consider phenomena affecting GO in the *in vivo* environment. Once introduced into the bloodstream, GO interacts with plasma components that adsorb onto its surface. In this doctoral thesis, we investigated how the size of GO flakes and incubation with human serum affect the efficiency of GO uptake by selected types of mammalian cells. The studies were conducted on cancer and normal lung cell lines, as well as a normal line of umbilical vein epithelial cells. The first stage of the research involved obtaining fractions of graphene oxide with different flake sizes and incubation of these fractions with commercially available human serum. Two fractions of graphene oxide differing in flake size were selected for further studies. Samples from each fraction were incubated with human blood serum. The impact of the studied graphene oxide fractions on cell viability and metabolic activity was then assessed. In the next step, the graphene oxide fractions were fluorescently labeled, and their cellular uptake efficiency and intracellular localization were determined. The studies were conducted on three cell lines using standard cell culture techniques. To better replicate *in vivo* conditions, a *Cell-on-a-Chip* microsystem was used in the second stage of the studies. The proposed microsystem enabled the delivery of graphene oxide suspension to cells under both continuous flow and stopped flow conditions. The use of the microsystem for cell culture allowed for a preliminary assessment of the impact of flow conditions of the GO suspension during incubation with cells on intracellular localization and the efficiency of GO uptake. Based on the conducted research, it was found that incubation with serum reduced the efficiency of GO uptake by cells. Additionally, larger flakes were taken up by cells more efficiently than smaller ones. Differences in the efficiency of GO uptake by cells were also

observed for different cell types. Furthermore, it was determined that graphene oxide was taken up more efficiently by cells under continuous suspension flow conditions during incubation compared to stopped flow conditions during incubation.

Keywords: *graphene oxide, cell cultures, cellular uptake, Cell-on-a-Chip*

Spis treści

I. Część literaturowa.....	11
1. Wstęp	11
2. Utleniony grafen – właściwości i zastosowanie	12
3. Utleniony grafen w zastosowaniach biomedycznych	14
3.1. Rola hodowli komórkowych w badaniach dotyczących GO.....	14
3.1.1. Typy hodowli komórkowych	15
3.1.2. Hodowle Cell-on-a-Chip	17
3.1.3. Materiały do wytwarzania mikrosystemów Cell-on-a-Chip.....	18
3.1.4. Otrzymywanie mikrosystemów	19
3.1.5. Zastosowanie mikrosystemów Cell-on-a-Chip	21
3.1.6. Podsumowanie	24
3.2. Zastosowanie GO w chemioterapii	25
3.3. Zastosowanie GO w terapii genowej	30
3.4. Zastosowanie GO w terapii fotodynamicznej	31
3.5. Zastosowanie GO w teranostyce.....	32
3.6. Utleniony grafen w medycynie – podsumowanie	33
4. Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do komórek	34
4.1. Endocytoza	34
4.2. Wnikanie GO do komórek ssaczy.....	37
4.3. Wpływ typu komórki na wnikanie GO	37
4.4. Wpływ rozmiaru płatków GO na wnikanie do komórek	40
4.5. Wpływ modyfikacji powierzchni GO na wnikanie do komórek	42
5. Podsumowanie	45
II. Część doświadczalna.....	48
1. Cel pracy	48
2. Materiały i metody badań.....	49
2.1. Charakterystyka fizykochemiczna, frakcjonowanie oraz przygotowanie próbek... 49	
2.2. Hodowla komórkowa	52
2.3. Otrzymywanie mikroukładów przepływowych	54

2.4.	Badanie cytotoksyczności utlenionego grafenu	56
2.5.	Badanie wnikania utlenionego grafenu do komórek.....	58
2.6.	Badanie lokalizacji utlenionego grafenu w komórkach.....	59
2.7.	Badanie prawdopodobnego mechanizmu wnikania utlenionego grafenu do komórek 61	
3.	Wyniki	63
3.1.	Charakterystyka utlenionego grafenu	63
3.1.1.	Ocena wielkości płatków utlenionego grafenu	63
3.1.2.	Charakterystyka grup funkcyjnych.....	66
3.1.3.	Ocena struktury i składu pierwiastkowego utlenionego grafenu.....	67
3.1.4.	Podsumowanie i wnioski.....	69
3.2.	Ocena cytotoksyczności frakcji utlenionego grafenu.....	69
3.2.1.	Analiza aktywności metabolicznej komórek	70
3.2.1.1.	Aktywność metaboliczna komórek linii A549 inkubowanych z GO ..	70
3.2.1.2.	Aktywność metaboliczna komórek linii LL-24 inkubowanych z GO..	72
3.2.1.3.	Aktywność metaboliczna komórek linii HUVEC inkubowanych z GO	74
3.2.2.	Ocena żywotności komórek inkubowanych z GO.....	75
3.2.3.	Podsumowanie, dyskusja i wnioski	76
3.3.	Ocena wnikania utlenionego grafenu do komórek	79
3.3.1.	Efektywność wnikania GO do komórek linii A549	79
3.3.2.	Efektywność wnikania GO do komórek linii LL-24.....	82
3.3.3.	Efektywność wnikania GO do komórek linii HUVEC	85
3.3.4.	Wnioski i dyskusja	87
3.4.	Próba oceny mechanizmu wnikania utlenionego grafenu do komórek ssaczyh ...	89
3.4.1.	Cytotoksyczność inhibitorów	90
3.4.1.1.	Cytotoksyczne działanie inhibitorów na komórki linii A549	90
3.4.1.2.	Cytotoksyczne działanie inhibitorów na komórki linii LL-24	91
3.4.1.3.	Cytotoksyczne działanie inhibitorów na komórki linii HUVEC.....	92
3.4.1.4.	Wnioski.....	93
3.4.2.	Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek	93
3.4.2.1.	Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek A549	94
3.4.2.2.	Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek LL-24	94

3.4.2.3.	Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek HUVEC.....	95
3.4.3.	Wnioski.....	97
3.5.	Badania lokalizacji wewnątrzkomórkowej utlenionego grafenu.....	98
3.5.1.	Lokalizacja GO w komórkach A549	99
3.5.2.	Lokalizacja GO w komórkach LL-24	105
3.5.3.	Lokalizacja GO w komórkach HUVEC	110
3.5.4.	Obrazy 3D	115
3.5.5.	Wnioski.....	115
3.6.	Badania lokalizacji wewnątrzkomórkowej utlenionego grafenu w warunkach przepływowych (<i>Cell-on-a-Chip</i>)	117
3.6.1.	Lokalizacja GO w komórkach inkubowanych przez 48h i z jednorazowym podaniem próbki.....	120
3.6.1.1.	Lokalizacja GO w monokulturach: A549, HUVEC, LL-24.....	120
3.6.1.2.	Lokalizacja GO w kokulturze A549/HUVEC	122
3.6.1.3.	Lokalizacja GO w kokulturze HUVEC/LL-24.....	123
3.6.1.4.	Lokalizacja GO w kokulturze A549/LL-24	124
3.6.2.	Lokalizacja GO w komórkach inkubowanych przez 1 h w warunkach przepływowych	125
3.6.2.1.	Lokalizacja GO w komórkach A549	125
3.6.2.2.	Lokalizacja GO w komórkach LL-24.....	126
3.6.2.3.	Lokalizacja GO w komórkach HUVEC	127
3.6.2.4.	Ilościowa analiza obrazu	128
3.6.3.	Podsumowanie i wnioski.....	129
III	Podsumowanie i wnioski końcowe.....	131
IV	Bibliografia	133

I. Część literaturowa

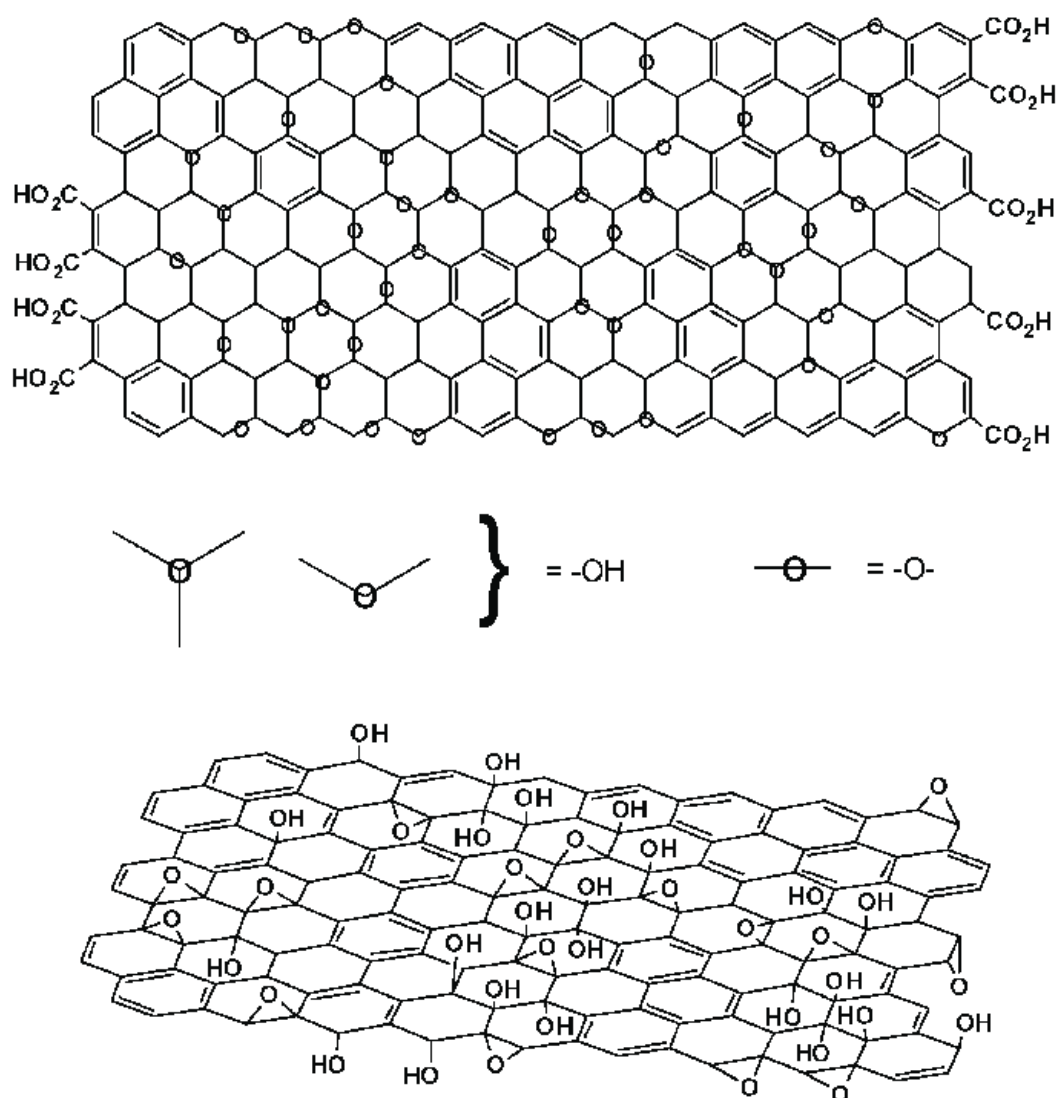
1. Wstęp

Utleniony grafen (GO, ang. *graphene oxide*) jest pochodną grafenu o szerokim potencjalnym zastosowaniu^{1,2}. Duża powierzchnia właściwa oraz obecność grup tlenowych w strukturze utlenionego grafenu umożliwiają efektywne dołączanie do niego cząsteczek takich jak nanocząstki lub leki przeciwnowotworowe. Ponadto modyfikacja powierzchni umożliwia poprawę właściwości biologicznych utlenionego grafenu, np. poprzez zmniejszenie cytotoksyczności. Powyższe zalety sprawiły, że GO może znaleźć potencjalne zastosowanie w medycynie m. in. jako nośnik leków. W celu opracowania skutecznego nośnika leków z wykorzystaniem utlenionego grafenu wymagana jest znajomość jego właściwości biologicznych, w szczególności drogi wnikania do wnętrza komórek. Jednak pomimo wielu prac dotyczących wnikania GO do komórek, nadal istnieją luki w wiedzy dotyczącej tej tematyki, a uzyskane wyniki są niejednoznaczne. Jednym z powodów rozbieżności w wynikach są różnice pomiędzy fizykochemicznymi właściwościami GO użytego do badań. Nie ustanowiono jednego standardowego protokołu syntezy GO. W związku z tym płatki GO uzyskane w dwóch różnych laboratoriach badawczych mogą różnić się rozmiarem oraz ilością grup tlenowych. Parametry te (wielkość płatków, ilość grup tlenowych) wpływają na proces wnikania utlenionego grafenu do komórek. W rezultacie użycie dwóch próbek GO różniących się tymi parametrami może prowadzić do uzyskania sprzecznych wyników. Dodatkowo, proces wnikania utlenionego grafenu do komórek może zależeć od wielu czynników takich jak typ komórki i modyfikacje powierzchni płatków GO użytych do badań. W celu zapobiegania agregacji i obniżeniu cytotoksyczności utleniony grafen modyfikuje się polimerami, które mogą wpłynąć na proces wnikania GO do komórek. Ponadto w warunkach *in vivo*, zanim GO wniknie do komórek, oddziałuje z cząsteczkami płynów ustrojowych organizmu. Skutkiem takiego oddziaływania może być zmiana struktury utlenionego grafenu lub adsorpcja cząsteczek na powierzchni płatka GO³. Może to powodować zmianę sposobu oddziaływania GO z komórkami. Wiele dotychczasowych badań wnikania GO przeprowadzono wykorzystując jeden typ komórek, GO zmodyfikowany w jeden konkretny sposób lub bez uwzględniania wpływu oddziaływań składników płynów ustrojowych na utleniony grafen. W rezultacie dysponujemy badaniami przeprowadzonymi w różnych warunkach, których wyniki są niemożliwe do porównania. W celu lepszego wypełnienia luk w wiedzy o oddziaływaniach GO-komórka, należy poznać wpływ wyżej wymienionych parametrów na proces wnikania GO do komórek. Ponadto, dalsze badania GO powinny wykorzystywać bardziej zaawansowane

modele badawcze niż standardowa hodowla komórkowa. Większość badań dotyczących tej tematyki opiera się na zastosowaniu standardowych, dwuwymiarowych (2D) modeli komórkowych, które nie odzwierciedlają w pełni warunków *in vivo*. W rezultacie wyniki uzyskane za pomocą standardowych hodowli mogą nie mieć przełożenia na faktyczne zachowanie utlenionego grafenu w organizmie żywym. Luki wiedzy spowodowane niejednoznacznymi wynikami badań wskazują na dalszą potrzebę prowadzenia badań nad procesem wnikania GO do komórek. W części literaturowej niniejszej pracy zostaną omówione właściwości i zastosowanie utlenionego grafenu. Następnie zostaną omówione modele komórkowe wykorzystywane w badaniach biologicznych. Na końcu zostaną podsumowane dotychczasowe prace dotyczące wnikania GO do komórek.

2. Utleniony grafen – właściwości i zastosowanie

Grafen jest jedną z alotropowych form węgla otrzymanych w 2004 roku przez Andre Geim'a i Konstantina Novoselova⁴. Płatek grafenu jest pojedynczą warstwą grafitu o grubości 1 atomu. Atomy węgla w grafenie posiadają hybrydyzację sp^2 i są zorganizowane w heksagonalną sieć zawierającą zdelokalizowane elektrony π . Grafen posiada bardzo dużą powierzchnię właściwą, której teoretyczna wartość wynosi $2630 \text{ m}^2/\text{g}$. Dzięki doskonałym właściwościom elektrycznym i mechanicznym⁵⁻⁷, znalazł potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach, między innymi w konstrukcji sensorów i paneli fotowoltaicznych⁸. Do rodziny materiałów grafenowych zalicza się również nanorurki węglowe⁹, fulereny¹⁰ oraz utleniony grafen⁵. Utleniony grafen posiada grupy tlenowe na swojej powierzchni takie jak grupy hydroksylowe, alkoholowe i karboksylowe. Najbardziej rozpowszechnionym modelem budowy utlenionego grafenu jest model Lerfa-Klinowskiego (Ryc.1).



Ryc. 1 Model Lerfa-Klinowksiego opisujący strukturę utlenionego grafenu ⁵.

Najbardziej rozpowszechnioną metodą otrzymywania GO jest zmodyfikowana metoda Hummera wykorzystująca podejście „top-down”. Polega ona na działaniu dużym potencjałem oksydacyjnym w postaci nadmanganianu potasu na grafit ^{5,8}. Ze względu na obecność grup tlenowych w strukturze GO zaburzeniu ulega sieć elektronów π co skutkuje pogorszeniem właściwości elektrycznych w porównaniu z grafenem. Jednocześnie obecność grup tlenowych zapobiega agregacji GO w wodzie oraz umożliwia kowalencyjną modyfikację powierzchni cząsteczki utlenionego grafenu. Ponadto, utleniony grafen może być funkcjonalizowany niekowalencyjnie poprzez oddziaływania hydrofobowe ^{5,11}. Wiele grup badawczych modyfikowało powierzchnię utlenionego grafenu białkami ^{12,13}, aptamerami ¹⁴, polimerami ¹⁵ i innymi cząsteczkami ¹⁶, w rezultacie zmieniając jego właściwości. Modyfikacje powierzchni GO mogą zapobiegać agregacji płatków i zmniejszać jego cytotoksyczność. W naszym zespole

badawczym prowadzone są badania materiałów grafenowych pod kątem ich zastosowań biomedycznych. Dzięki funkcjonalizacji GO poli(winylopirolidonem) (PVP) badany materiał był bezpieczny dla komórek ¹⁷. Innym przykładem takiej modyfikacji jest modyfikacja poli(glikolem etylenowym) (PEG) ¹⁵. Utleniony grafen nie agreguje w wodzie jednak może agregować w roztworach soli o stężeniu fizjologicznym oraz mediach komórkowych. Modyfikacja utlenionego grafenu PEG zapobiega agregacji i zmniejsza jego niepożądany wpływ na żywotność i funkcjonowanie komórek. Są to jedne z wielu przykładów modyfikacji jakimi można poddać GO w celu poprawy jego właściwości biologicznych. Oprócz modyfikacji powierzchni na cytotoksyczność utlenionego grafenu ma wpływ, czas inkubacji, typ komórek oraz stężenie i właściwości fizykochemiczne GO. Tak jak w przypadku innych właściwości biologicznych GO, nie można wyciągnąć jednoznacznych konkluzji na temat wpływu tego materiału na żywotność komórek. Jest to spowodowane różnicami w fizykochemicznych właściwościach badanego GO oraz stosowaniem różnych modyfikacji powierzchni, które uniemożliwiają porównywanie wyników.

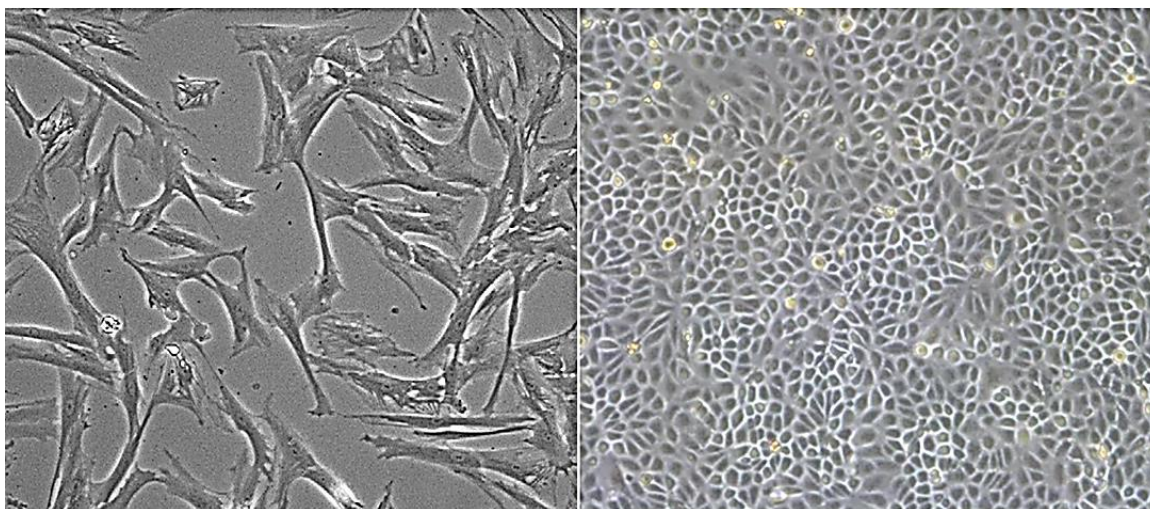
3. Utleniony grafen w zastosowaniach biomedycznych

Dzięki dużej powierzchni właściwej, stabilności w wodzie oraz możliwości funkcjonalizacji kowalencyjnej jak i niekowalencyjnej, utleniony grafen znalazł potencjalne zastosowanie w systemach oczyszczania wody, systemach fotokatalitycznego przekształcania dwutlenku węgla, konstrukcji biosensorów, inżynierii tkankowej oraz w medycynie ^{1,18}. W kontekście niniejszej pracy szczególnie interesujące są biomedyczne zastosowania utlenionego grafenu. Wiele grup badawczych wykazało, że nośniki leków wykorzystujące GO mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych. Niestety do tej pory żaden z zaproponowanych nośników GO nie został zakwalifikowany do testów klinicznych. Dokładniejsze poznanie właściwości biologicznych GO, w tym procesu wnikania do komórek, pozwoli na szybsze opracowanie nośnika, który znajdzie faktyczne zastosowanie w medycynie. Poniżej omówiono przykłady wykorzystania GO w terapiach przeciwnowotworowych, świadczących o potencjale tego materiału jako nośnika leków.

3.1. Rola hodowli komórkowych w badaniach dotyczących GO

Hodowle komórkowe stanowią model badawczy w badaniach podstawowych. Umożliwiają one poznanie właściwości biologicznych badanych materiałów oraz badanie procesów zachodzących w komórkach. Zaletą hodowli komórkowych jest możliwość ścisłej kontroli środowiska hodowlanego. Komórki w hodowli powinny mieć zapewnione

odpowiednie pH, temperaturę oraz substancje niezbędne do prawidłowego funkcjonowania. Istnieje wiele typów hodowli komórkowych różniących się stopniem złożoności oraz wiernością odwzorowania warunków *in vivo*.¹⁹.



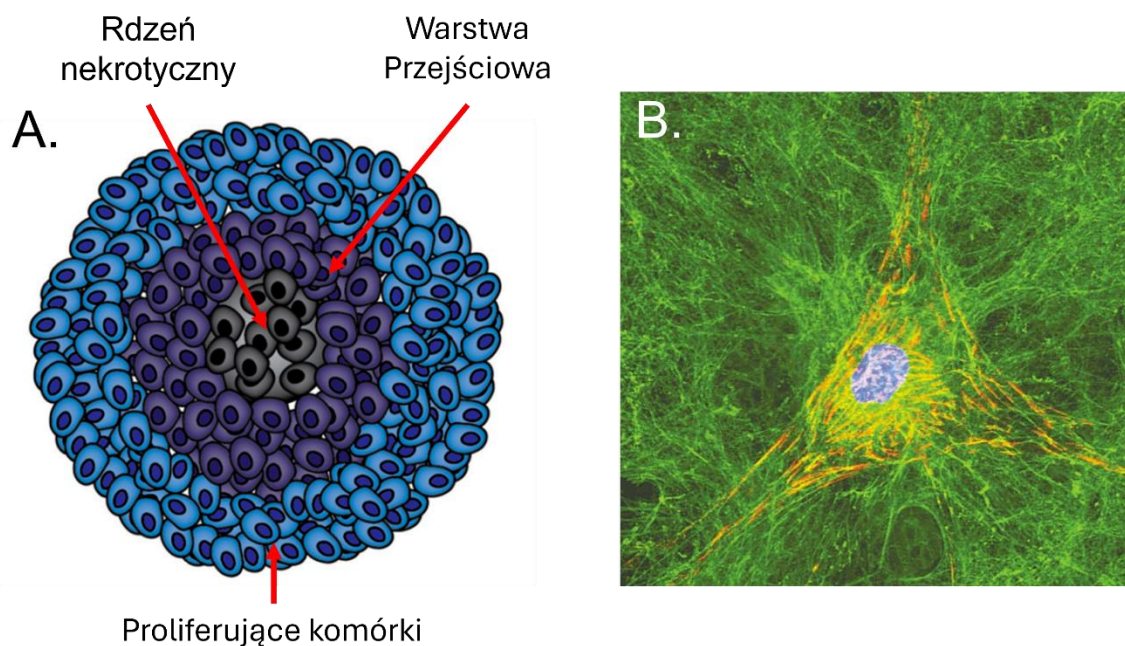
Ryc. 2 Komórki hodowane w postaci monowarstwy: komórki fibroblastopodobne (po lewej)²⁰ i komórki epitelialne (po prawej)²¹.

3.1.1. Typy hodowli komórkowych

Najprostszym i najbardziej rozpowszechnionym typem hodowli komórkowej jest hodowla w postaci monowarstwy (hodowla dwuwymiarowa (2D)). Komórki w tej hodowli są przyczepione do podłoża hodowlanego i zanurzone w medium hodowlanym (Ryc. 6). Zaletą takich hodowli jest ich prostota, ponieważ procedury prowadzenia hodowli 2D są standardowe, powtarzalne i szeroko rozpowszechnione. Najwięcej podstawowych badań na komórkach wykonuje się przy pomocy komórek hodowanych właśnie w postaci monowarstwy. Wadą tego typu hodowli jest jednak słabe odwzorowanie warunków *in vivo*. Komórki „rozciągnięte” na podłożu hodowlanym tracą swoją natywną morfologię. Ponadto, są one pozbawione macierzy komórkowej i oddziaływań z innymi komórkami tkanki, z której się wywodzą. Monowarstwa jest potrzebnym i wygodnym modelem badania zachowania pojedynczych linii komórkowych, jednak do lepszego odzwierciedlania warunków *in vivo* potrzebne jest zastosowanie bardziej złożonych modeli komórkowych¹⁹.

Hodowle przestrzenne (trójwymiarowe (3D)) lepiej niż standardowa hodowla 2D odzwierciedlają warunki *in vivo*. W porównaniu z hodowlami 2D, morfologia komórek w takich hodowlach jest bardziej zbliżona do naturalnej morfologii komórek *in vivo*. W warunkach hodowli 3D komórki są zdolne do wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej oraz połączeń międzykomórkowych (Ryc. 7). Przykładami takich hodowli jest wielowarstwa

komórkowa, sferoidy, hodowle w hydrożelu oraz hodowle na rusztowaniach (*ang. scaffolds*). Wielowarstwę komórkową można otrzymać, gdy komórki rosnące w monowarstwie osiągnęły 100% konfluencji i dalej proliferują. Komórki z dolnych warstw mają ograniczony dostęp do substancji odżywczych. Z czasem dolna warstwa obumiera i hodowla traci przyczepność z podłożem. Agregaty i sferoidy to aglomeraty przyczepionych do siebie komórek. Podobnie jak w wielowarstwie komórki w środku sferoidu mają ograniczony dostęp do składników odżywczych. Z czasem w sferoidzie wytwarza się rdzeń nekrotyczny. Sferoidy są dobrym modelem nieukrwionego guza nowotworowego. Innymi przykładami hodowli 3D są hodowle wykorzystujące hydrożele lub rusztowania (*ang. scaffolds*). W hodowlach z hydrożelem komórki są zamknięte w hydrożelowej siatce. Dzięki modyfikacji właściwości hydrożelu można sterować środowiskiem hodowli. Z kolei rusztowania o różnych topografiach pozwalają na tworzenie zaawansowanych modeli tkankowych^{19,22,23}.



Ryc. 3 A) Budowa sferoidu. Rdzeń nekrotyczny (komórki czarne), warstwa przejściowa (komórki fioletowe) i komórki proliferujące (komórki niebieskie)²². Komórka w hodowli 3D wytwarzająca połączenia z rusztowaniem²³.

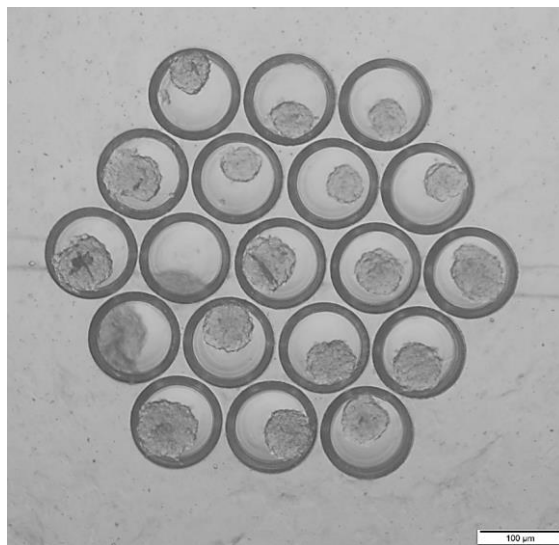
Hodowle komórkowe możemy również podzielić ze względu na liczbę linii komórkowych hodowanych razem. Monokultury są hodowlami, w których występuje tylko jeden rodzaj komórek. Są one modelami badawczymi powszechnie wykorzystywanymi w badaniach. Jednak organy i tkanki składają się z więcej niż jednego rodzaju komórek. Ponadto, oddziaływania pomiędzy różnymi rodzajami komórek odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu

komórek *in vivo*. W celu otrzymania modeli badawczych lepiej odwzorowujących warunki *in vivo* stosuje się ko- i multikultury komórek. Są to hodowle w których hodowane są jednocześnie dwa (kokultura) lub wiele (multikultura) typów komórek. W kokulturach i multikulturach komórki różnych typów oddziałują na siebie i współtworzą macierz międzykomórkową. Odtworzenie tych zależności jest niemożliwe w przypadku monokultur. Dlatego modele komórkowe wiernie odtwarzające warunki *in vivo* muszą się składać z wielu typów komórek¹⁹.

3.1.2. Hodowle Cell-on-a-Chip

Dynamicznie rozwijającym się kierunkiem badań jest wykorzystanie mikrosystemów przepływowych do hodowli komórek. Mikrosystemy przepływowe to urządzenia w których operuje się małymi objętościami płynu (od 10^{-9} do 10^{-18} L) za pomocą struktur których najmniejsze wymiary wynoszą od dziesiątek do setek mikrometrów^{24,25}. Narzędzia te znalazły zastosowanie w systemach diagnostycznych, screeningu leków, genetyce, proteomice, inżynierii tkankowej oraz w hodowli komórek (*Cell-on-a-Chip*, *Organ-on-a-Chip*)²⁶. Hodowle komórkowe w mikrosystemie różnią się od hodowli w makroskali (hodowle standardowe). Pierwsza, oczywista różnica, to inne wymiary hodowli. Podczas hodowli monowarstwowych komórek w makroskali, komórki hodowane są w dużych, mililitrowych objętościach medium. W mikrosystemie o wymiarach wyrażanych w mikrometrach stosunek objętości do powierzchni hodowli jest mniejszy niż w hodowli w makroskali. W związku z tym, procesy wymiany masy zachodzą szybciej w mikrosystemach. W mikroskali gradienty stężenia substancji są dużo mniejsze niż w hodowli standardowej. Należy zauważyć, że duże stosunki powierzchni do objętości hodowli są bardziej zbliżone do warunków *in vivo* niż kultury prowadzone w makroskali^{27,28}. Kolejną ważną różnicą jest możliwość zapewnienia hodowli w mikrosystemie warunków przepływowych. Komórki w hodowli z przepływem wystawione są na naprężenia ścinające przepływającego medium, co lepiej odzwierciedla warunki *in vivo*. Ponadto, małe objętości próbek i mikrometryczne wymiary oznaczają również mniejsze koszty prowadzenia hodowli i możliwość zastosowania wysokoprzepustowych technik prowadzenia hodowli. Jednak jedną z najważniejszych zalet prowadzenia hodowli w mikrosystemie jest jego kompatybilność z hodowlami 3D (Ryc.9). Dzięki implementacji rusztowań, hydrożeli, membran oraz rozplanowaniu mikrostruktur dopasowanych do potrzeb hodowli mikrosystemy przepływowe odgrywają ważną rolę w opracowywaniu modeli badawczych tkanek i organów²⁷⁻²⁹. W ramach niniejszej pracy również zastosowano hodowle w mikrosystemach *Cell-on-a-*

Chip. Umożliwiły one porównanie efektywności procesu wnikania GO do komórek hodowanych w mikrosystemie i w makroskali.



Ryc. 4 Hodowla sferoidów linii MCF-7/HMF w mikroukładzie. Wartość skali wynosi 100 μm ¹⁷.

3.1.3. Materiały do wytwarzania mikrosystemów *Cell-on-a-Chip*

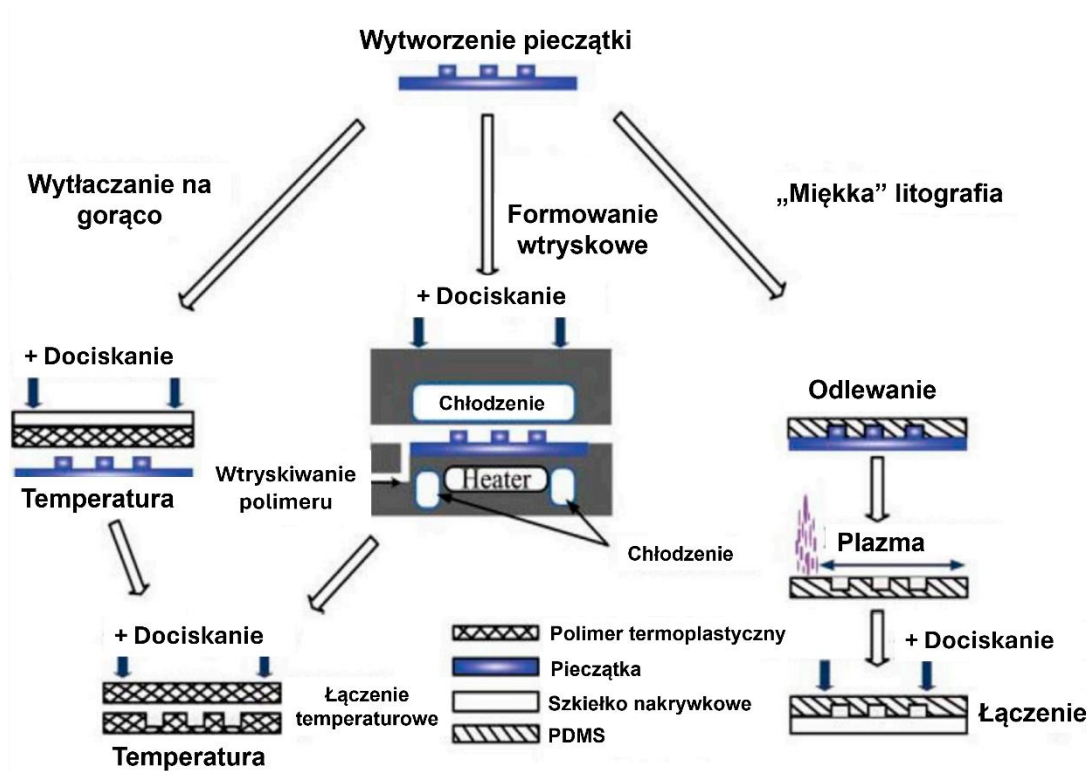
Właściwości mikroukładu zależą od materiału, z którego został wytworzony. Do materiałów wykorzystywanych w systemach *Cell-on-a-Chip* zalicza się szkło, żywice epoksydowe i polimery. Szkło jest inertne chemicznie, kompatybilne z próbkami biologicznymi i transparentne co umożliwia mikroskopową obserwację hodowli. Jednak szklane mikrosystemy są trudne w produkcji co ogranicza zastosowanie mikrosystemów wytworzonych wyłącznie ze szkła. Z kolei żywice epoksydowe cechują się wysoką rozdzielczością umożliwiającą wykonywanie bardzo małych mikrostruktur, jednak duży koszt procesu wytwarzania mikrosystemów z ich udziałem ogranicza ich użycie. Najbardziej rozpowszechnioną grupą materiałów do wytwarzania mikrosystemów *Cell-on-a-Chip* są polimery. Zaletami polimerów są niski koszt i prostota wytwarzania mikrosystemów. Dodatkowo, polimery stanowią grupę materiałów o różnych właściwościach, dzięki czemu można dobrać odpowiedni polimer do zamierzonego celu. Do szeroko wykorzystywanych materiałów w tej grupie zalicza się poli(dimetylosiloksan) (PDMS) oraz poli(metakrylan metylu) (PMMA) ²⁴. PDMS jest najpopularniejszym materiałem stosowanym do wytwarzania mikrosystemów. Jest tanim elastomerem, łatwo wytwarza się w nim mikrostruktury, jest transparentny, hydrofobowy, nietoksyczny dla komórek i przepuszczalny dla gazów. Powyższe właściwości czynią go idealnym materiałem do prototypowania mikrosystemów służących do hodowli komórek. Jest również elastyczny dzięki czemu może być wykorzystywany do

wytwarzania membran i ruchomych części mikroukładów, np. mikrozaworów. Wadą PDMS może być jednak jego chłonność wobec wprowadzanych do mikrosystemów substancji, które mogą dyfundować wewnątrz polimeru. Przepuszczalność dla gazów oznacza również, że ciecze wewnątrz mikroukładu mogą wyparować. Jest to niekorzystne z punktu widzenia hodowli komórkowej, w której komórki muszą być stale zanurzone w cieczy²⁴. PMMA jest polimerem termoplastycznym, również powszechnie używanym do prototypowania mikrosystemów. Tak jak PDMS jest transparentny, jednak nieprzepuszczalny dla gazów. Dlatego w celu wykorzystania PMMA do wytwarzania mikrosystemów do hodowli komórek, należy go połączyć z materiałem przepuszczalnym dla gazów²⁴.

3.1.4. Otrzymywanie mikrosystemów

Mikrosystemy można wytwarzać zarówno na skalę przemysłową i w warunkach laboratoryjnych. Metody replikacyjne są najbardziej rozpowszechnionymi metodami wytwarzania mikrosystemów. Wyróżnia się 3 podstawowe replikacyjne metody wytwarzania mikroukładów: „miękka” litografia (ang. *soft lithography*), wytłaczanie na gorąco (ang. *hot embossing*) i formowanie wtryskowe (ang. *injection molding*) (Ryc. 8). „Miękka” litografia, nazywana inaczej metodą odlewu, wymaga wstępnego przygotowania pieczątki, będącej negatywem mikrosystemu. Pieczętkę można wykonać z polimeru za pomocą druku 3D, mikrofrezowania lub fotolitografii. W fotolitografii wykorzystuje się fotorezyst, substancję twardniejącą po naświetleniu światłem o odpowiedniej długości fali, np. SU-8. Rozprowadzony na podłożu fotorezyst przykrywa się maską odwzorowującą rozmieszczenie mikrostruktur. Po naświetleniu fotorezyst twardnieje z wyjątkiem miejsc przykrytych maską. Następnie odmywa się niestwardniały fotorezyst. Metoda ta jest prosta i charakteryzuje się dużą rozdzielczością. Na tak przygotowaną pieczętkę wylewa się nieusieciowaną masę prepolimerową (np. PDMS) i zostawia do polimeryzacji. Otrzymaną płytkę z mikrostrukturami wiąże się z drugą płytką, wykonaną z polimeru lub szkła, przy użyciu plazmy tlenowej. Jest to najpopularniejsza metoda prototypowania mikrosystemów w laboratorium z użyciem elastomerów³⁰.

Wytłaczanie na gorąco i formowanie wtryskowe są metodami wytwarzania układów z użyciem polimerów termoplastycznych, np. PMMA. W wytłaczaniu na gorąco podgrzany polimer jest dociskany do matrycy przy pomocy prasy. Natomiast w formowaniu wtryskowym ogrzany polimer jest wtlaczany do nieruchomej matrycy. Płytki mikrosystemów otrzymanych tymi metodami łączy się z sobą na gorąco³⁰.



Ryc. 5 Metody replikacyjne stosowane do wytwarzania mikrosystemów ³¹.

Rozwój technik druku 3D pozwolił na wykorzystanie ich do wytwarzania mikrosystemów. Techniki druku 3D są tanie i proste w wykonaniu, jednak ich wadą jest niska precyzja w odwzorowaniu pustych w środku struktur, ograniczony wybór materiałów oraz niska rozdzielczość w osi „z”. Do technik druku 3D zalicza się modelowanie za pomocą stopionego materiału (FDM, ang. *Fused Deposition Modeling*), stereolitografię (SLA), cyfrowe przetwarzanie światła (DLP, ang. *Digital Light Processing*), Multi-Jet Printing (MJP) i polimeryzację dwufotonową ³⁰.

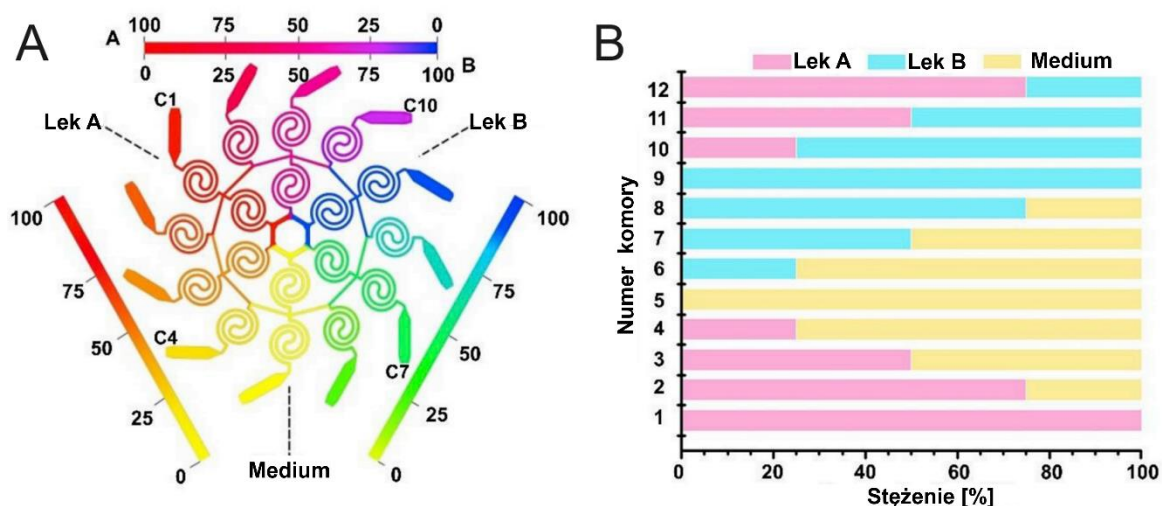
FDM opiera się na drukowaniu rozgrzanego polimeru za pomocą gorącej dyszy. Polimer po wydostaniu się z dyszy zastyga w pożądaną strukturę. Zaletą tej techniki jest jej prostota wytwarzania mikroukładów. Wadą FDM jest mała wytrzymałość mechaniczna uzyskanych struktur i niska precyzja odwzorowania mikrostruktur ³⁰. Stereolitografia i DLP mają podobną zasadę działania. W obu metodach wykorzystuje się fotoczułe żywice i źródło promieniowania UV. W przypadku SLA źródłem promieniowania jest laser, natomiast w przypadku DLP jest to wyświetlacz LCD. Zbiornik z fotoczułą żywicą zostaje naświetlony przez diody LED lub laser, warstwa po warstwie. W SLA laser naświetla warstwę punktowo, natomiast w DLP każdy punkt warstwy jest naświetlany jednocześnie. Naświetlona żywica twardnieje a nieutwardzona żywica zostaje odmyta ³⁰. Polimeryzacja dwufotonowa jest techniką podobną do stereolitografii. Wykorzystuje promieniowanie o małej energii i zjawisko jednoczesnej

absorpcji dwóch fotonów. Dzięki temu uzyskać można wyższą rozdzielczość niż w przypadku stereolitografii ³⁰. Multi-Jet Printing jest techniką, w której również wykorzystywane są żywice światłoczułe. Krople żywicy są dozowane przez dysze drukarskie w postaci mikrokropeli warstwa po warstwie. Żywica twardnieje pod wpływem naświetlenia promieniowaniem UV ³⁰.

Istnieje wiele metod wytwarzania mikroukładów. W warunkach laboratoryjnych najbardziej popularnymi metodami wytwarzania mikroukładów są metoda odlewu i druk 3D. Umożliwiają one szybkie prototypowanie mikroukładów. Umożliwia to zaprojektowanie i wytworzenie mikroukładu dopasowanego do charakteru prowadzonych badań.

3.1.5. Zastosowanie mikrosystemów Cell-on-a-Chip

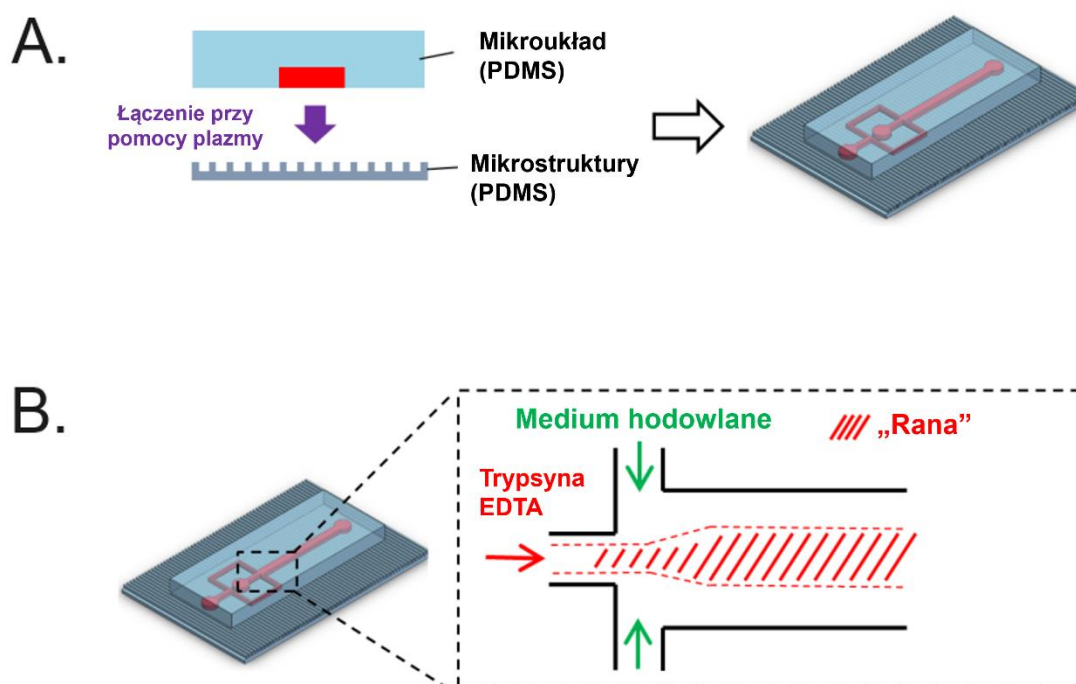
Mikrosystemy *Cell-on-a-Chip* znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach badań. Przykładami zastosowań hodowli komórek w mikroukładach przepływowych są mikroukłady do screeningu leków, badanie procesu gojenia się ran lub badanie cytotoksyczności nanomateriałów. *Shen i współpracownicy* opracowali mikrosystem do jednoczesnej oceny cytotoksyczności kilku substancji. Mikrosystem wytworzono metodą odlewu, natomiast pieczętkę wykonano za pomocą litografii. Materiałami użytymi do fabrykacji urządzenia były PDMS i szkło. Trzy otwory wlotowe umożliwiały podanie 3 substancji jednocześnie, a sieć mikrokanałów i mikromieszalników pozwoliła na uzyskanie mieszanin podanych substancji. W mikroukładzie było 12 mikrokomór hodowlanych, w których możliwe było testowanie 12 wariantów mieszanin jednocześnie (Ryc.10). Działanie mikrosystemu sprawdzono na komórkach linii MCF-7 i HepG2, odpowiednio liniach nowotworowych piersi i wątroby. Oceniono działanie doksorubicyny, cisplatyny oraz ich mieszaniny na komórki tych linii. Otrzymane wyniki zostały porównane z testami wykorzystującymi standardowe hodowle komórkowe. W rezultacie stwierdzono, że otrzymany układ jest odpowiedni do wysokoprzepustowego screeningu leków i ich mieszanin ³².



Ryc. 6 A) Schemat mikroukładu. Sieć kanałów i mikromieszalników umożliwia otrzymanie gradientu stężeń dla mieszaniny substancji wprowadzonych do mikroukładu. B) Procentowy skład mieszanin w każdej komorze ³².

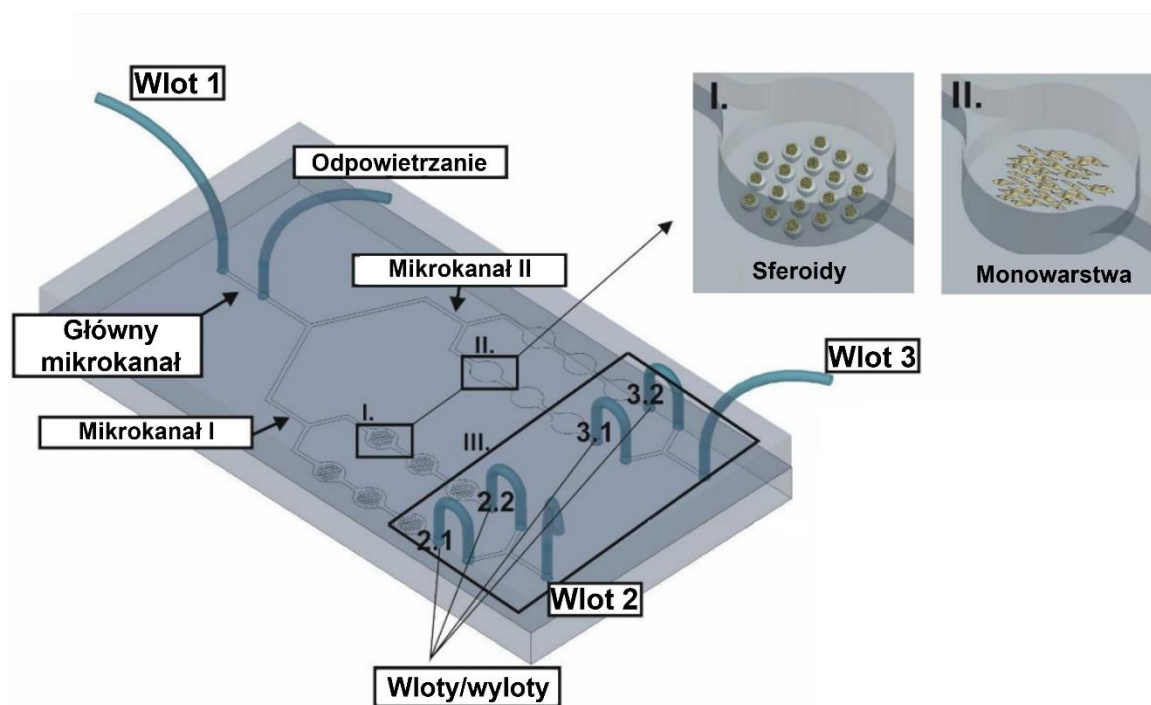
Innym zastosowaniem mikrosystemów *Cell-on-a-Chip* są modele gojenia się ran. Modelem rany jest monowarstwa komórek przedzielona strefą wolną od komórek. „Gojenie rany” polega na migracji komórek z monowarstwy i stopniowym zapelnianiu wolnej przestrzeni. Modele gojenia ran pozwalają na lepsze zrozumienie procesu gojenia oraz screening materiałów o potencjalnym zastosowaniu w opatrunkach. Kluczowym parametrem ocenianych podczas tych badań jest szybkość migracji komórek zaangażowanych w gojenie się ran ³³. Lee i współpracownicy opracowali mikrosystem umożliwiający powtarzalne generowanie „rany”. Mikroukład składał się z 2 części (Ryc. 11A). Jedna zawierała mikrokanal, komorę hodowlaną oraz wloty i wyloty. Druga zawierała mikrostruktury wykonane metodą odlewu przy pomocy pieczętki. Pieczętkę wytworzono techniką litografii z poli(uretanu-akrylanu) (PUA). Wykonano płytki posiadające mikrostruktury o różnych rozmiarach, które umożliwiały wymuszenie orientacji komórek w hodowli. Pozwoliło to na ocenę zależności szybkości gojenia od ukształtowania rany. Modelem badawczym była monowarstwa fibroblastów NIH-3T3. W celu wytworzenia „rany” przez środek monowarstwy przepuszczono skupiony strumień tripsyny o określonej szerokości. Trypsyna wymyła komórki ze środka monowarstwy tworząc „ranę” (Ryc.11B). Za pomocą obserwacji mikroskopowej badano tempo migracji komórek przy różnym ukształtowaniu rany. Zaproponowany model cechuje się prostotą i powtarzalnym generowaniem ran o tej samej szerokości co umożliwia porównanie wyników dla różnych eksperymentów. Ulepszanie komórkowych modeli ran umożliwi

ograniczenie badań procesu gojenia ran na zwierzętach, które obecnie są źródłem kontrowersji na tle bioetycznym³⁴.



Ryc. 7 A) Otrzymywanie mikroukładu. B) Wymywanie komórek ze środka kanału przy pomocy Trypsyny EDTA. Powstała pusta przestrzeń pomiędzy dwoma monowarstwami komórek imituje przerwanie ciągłości tkanki na skutek odniesienia rany³⁴.

W naszym zespole badawczym opracowano mikroukład do jednoczesnej hodowli komórek w postaci monowarstwy i sferoidów (Ryc. 12). Mikroukład został wykonany z PDMS z wykorzystaniem metody miękkiej litografii. Składał się z mikrokanalów oraz mikrokomór hodowlanych. Komory hodowlane do hodowli sferoidów posiadały mikrostudzienki umożliwiające łatwe formowanie sferoidów. W zależności od typu prowadzonej hodowli, powierzchnia mikrokomór została zmodyfikowana fibronektyną (2D, monowarstwa) lub poli(alkoholem winylowym) (PVA) (3D, sferoidy). Opracowany mikrosystem umożliwił ocenę cytotoksyczności utlenionego grafenu względem nowotworowych komórek jelita (HT-29), wątroby (HepG2) i piersi (MCF-7). Zauważono różnicę w odpowiedzi na utleniony grafen pomiędzy komórkami w postaci monowarstwy i w postaci sferoidów. Zaproponowany mikroukład przepływowy może zostać wykorzystany do badań różnic w działaniu nanomateriałów na komórki w hodowlach 2D i 3D³⁵.



Ryc. 8 Schemat mikroukładu do badania GO na komórkach hodowanych w postaci monowarstwy i sferoidów³⁵.

3.1.6. Podsumowanie

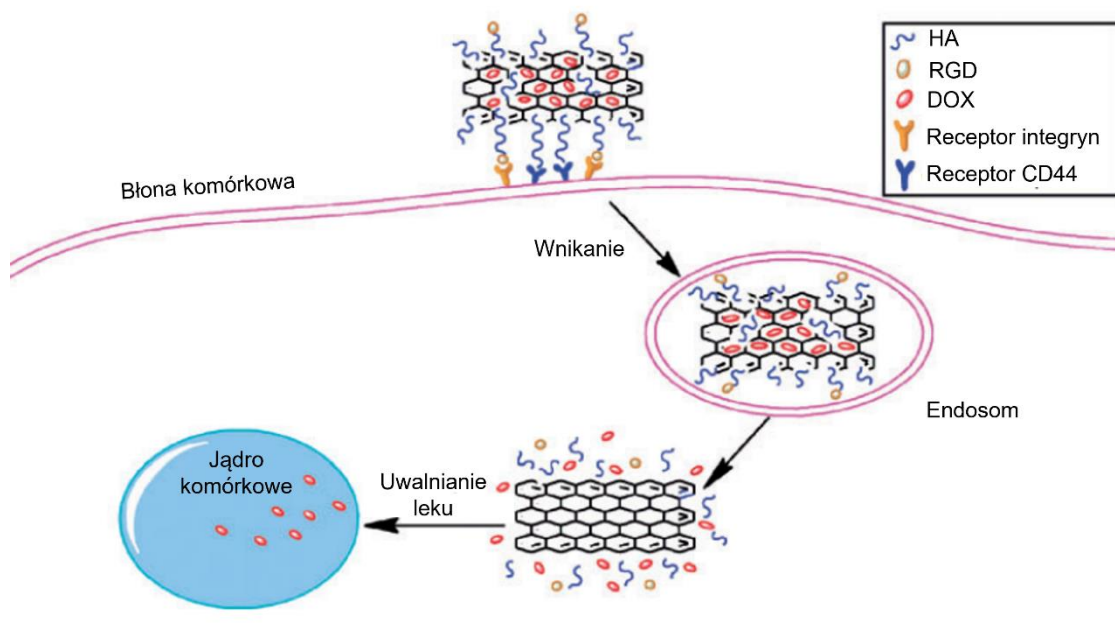
Hodowle komórkowe są modelem badawczym wykorzystywanym w badaniach podstawowych. Ważnymi parametrami w hodowli komórek są temperatura, pH, skład medium hodowlanego. Znalazły zastosowanie w badaniu funkcjonowania komórek, screeningu leków i innych biologicznie aktywnych substancji a także w opracowywaniu zaawansowanych modeli komórkowych odzwierciedlających warunki *in vivo*. Wyróżnia się różne typy hodowli komórkowych różniących się przestrzennym ułożeniem komórek i stopniem skomplikowania: monowarstwa, wielowarstwa, sferoidy, hodowle w hydrożelach i rusztowaniach. Monowarstwa jest najbardziej rozpowszechnionym typem hodowli komórkowej. Jej procedury są bardzo dobrze poznane i odtwarzalne. Jednak komórki hodowane w monowarstwie różnią się od komórek *in vivo*. Zastosowanie hodowli trójwymiarowych, zwłaszcza kokultur, lepiej odzwierciedla warunki panujące w żywym organizmie. W warunkach 3D możliwe jest odtworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej i oddziaływań komórkowych. Szczególnie dynamicznie rozwijającym się kierunkiem jest rozwój hodowli 3D z wykorzystaniem mikroukładów przepływowych. Dzięki zapewnieniu warunków przepływowych oraz mikrometrowym wymiarom, hodowle *Cell-on-a-Chip* lepiej odwzorowują warunki *in vivo* niż standardowe hodowle prowadzone w makroskali.

3.2. Zastosowanie GO w chemioterapii

Utleniony grafen oceniano pod kątem opracowywania nowych nośników leków wykorzystywanych w chemioterapii. Popularnie wykorzystywaną strategią jest modyfikacja płatków utlenionego grafenu polimerem zwiększającym jego biokompatybilność, a następnie dołączenie leku. Polimerem użytym do tego typu modyfikacji może być poli(glikol etylenowy) (PEG)³⁶, kwas poliakrylowy (PAA)³⁷, poli(L-lizyna) (PLL)³⁸ a także polimery pochodzenia naturalnego: alginian sodu (SA)³⁹ i chitozan (CS)⁴⁰. Lekami użytymi podczas badań były popularne leki przeciwnowotworowe takie jak paklitaksel (PTX)⁴¹, doksorubicyna (DOX)³⁸, 5-fluorouracyl (5-FU)⁴², kamptotecyna (CPT)⁴³ i 1,3-bis(2-chloroetylo)-1-nitrozomocznik (BCNU)⁴⁴. *Xu i współpracownicy* porównali działanie PTX na nowotworowe komórki linii A549 (nowotwór płuc) oraz MCF-7 (nowotwór piersi) podanego w stanie wolnym oraz związanym z GO modyfikowanym PEG. Paklitaksel jest substancją słabo rozpuszczalną w wodzie co ogranicza jego użycie w terapii przeciwnowotworowej. PTX związany z hydrofilowym GO-PEG wykazał się większą cytotoksycznością niż jego odpowiednik, niezwiązany z zaproponowanym nośnikiem⁴¹. Natomiast *Lu i współpracownicy* zbadali GO modyfikowany PAA pod kątem dostarczania leku przeciwnowotworowego do komórek linii GL261 (komórek glejaka). Wykazano, że GO-PAA z dołączonym 1,3-bis(2-chloroetylo)-1-nitrozomocznikiem (BCNU) wniknął do komórek z większą wydajnością niż sam lek. W rezultacie BCNU związany z GO-PAA wykazywał zwiększoną cytotoksyczność względem komórek glejaka niż BCNU niezwiązanych z GO-PAA⁴⁴.

Nośniki leków oparte na utlenionym grafenie można dodatkowo wzbogacić o cząsteczki selektywnie zwiększające dostarczanie leków do docelowych komórek nowotworowych. Błony komórek niektórych nowotworów wykazują zwiększoną ilość receptorów w porównaniu z błoną komórek prawidłowych. Przykładami takich receptorów są receptory kwasu foliowego (FA, ang. *folic acid*)⁴³, kwasu hialuronowego (HA, ang. *hyaluronic acid*)⁴⁵ oraz transferryny (Tf)⁴⁶. Utleniony grafen związany z lekiem i cząsteczką ligandu odpowiedniego receptora (np. FA, HA lub Tf) będzie efektywniej wniknął do komórek wykazujących nadekspresję odpowiadających im receptorów w porównaniu do komórek o mniejszej liczbie tych receptorów. Pozwoli to na ograniczenie niepożądanego działania leku na komórki prawidłowe. *Zhao i współpracownicy* otrzymali utleniony grafen modyfikowany PEG z obecnymi grupami kwasu foliowego (FA) jako nośnik dla doksorubicyny (GO-PEG-FA/DOX). GO-PEG-FA/DOX odznaczał się zwiększonym efektem cytotoksycznym w porównaniu do swojego odpowiednika nieposiadającego grup FA względem komórek nowotworu wątroby HepG2. Skuteczność jego

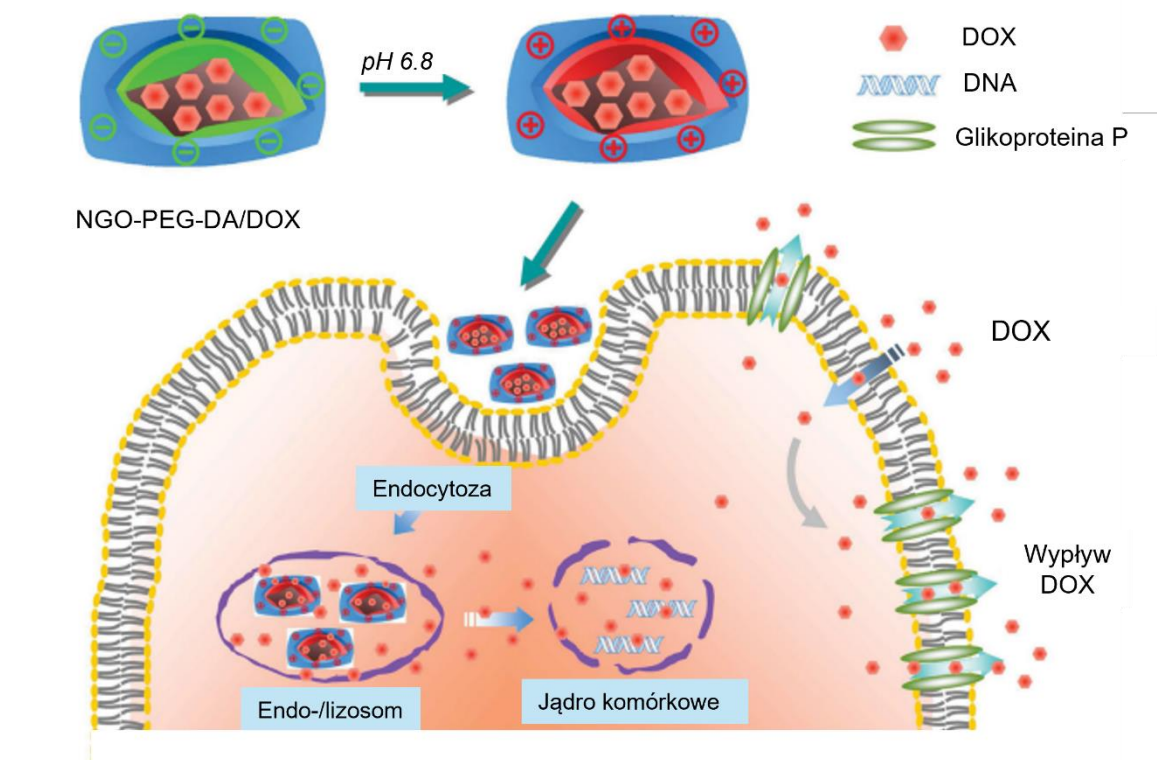
działania była porównywalna z wolną DOX. Jednocześnie, GO-PEG-FA/DOX wykazał dużo niższą niż DOX toksyczność względem prawidłowych komórek linii wątroby linii LSEC. Na tej podstawie można stwierdzić, że modyfikacja zawierająca FA działa selektywnie na komórki nowotworowe linii HepG2 ⁴⁷. Z kolei *Guo i współpracownicy* opracowali nośnik leków z wykorzystaniem zarówno HA jak i peptydu RGD (Arg-Gly-Asp) jako cząsteczek zwiększających efektywność wnikania nośnika do komórek nowotworowych (Ryc.2). Zarówno kwas hialuronowy jak i peptyd RGD są ligandami receptorów, których nadekspresję zauważono w komórkach wybranych linii nowotworowych. Nośnik złożony z GO-HA-RGD i związany z dokсорubicyną charakteryzował się zwiększoną efektywnością wnikania oraz większym efektem cytotoksycznym niż lek związany z nośnikiem nie posiadającym peptydu RGD. Badania przeprowadzono na komórkach nowotworu jajnika SKOV-3 ⁴⁵.



Ryc. 9 Prawdopodobny mechanizm selektywnego wnikania GO-FA-RGD/DOX do komórek SKOV-3 ⁴⁵ (HA – kwas hialuronowy; RGD – peptyd Arg-Gly-Asp; DOX – dokсорubicyna).

Modyfikacja nośników cząsteczkami oddziałującymi z receptorami jest tylko jedną ze strategii poprawiania przeciwnowotworowych właściwości leków. Innym istotnym aspektem jest uzyskanie kontrolowanego uwalniania leku w komórkach nowotworowych. Można tego dokonać opracowując nośniki leków wykorzystujące unikalne właściwości środowiska nowotworu (niskie pH, duża aktywność metaboliczna) jak i czynniki zewnętrzne (promieniowanie, pole magnetyczne) ^{48–50}. *Liu i współpracownicy* opracowali nośnik leków wrażliwy na zmiany pH. Utleniony grafen zmodyfikowano PEG oraz poli(chlorowodorkiem

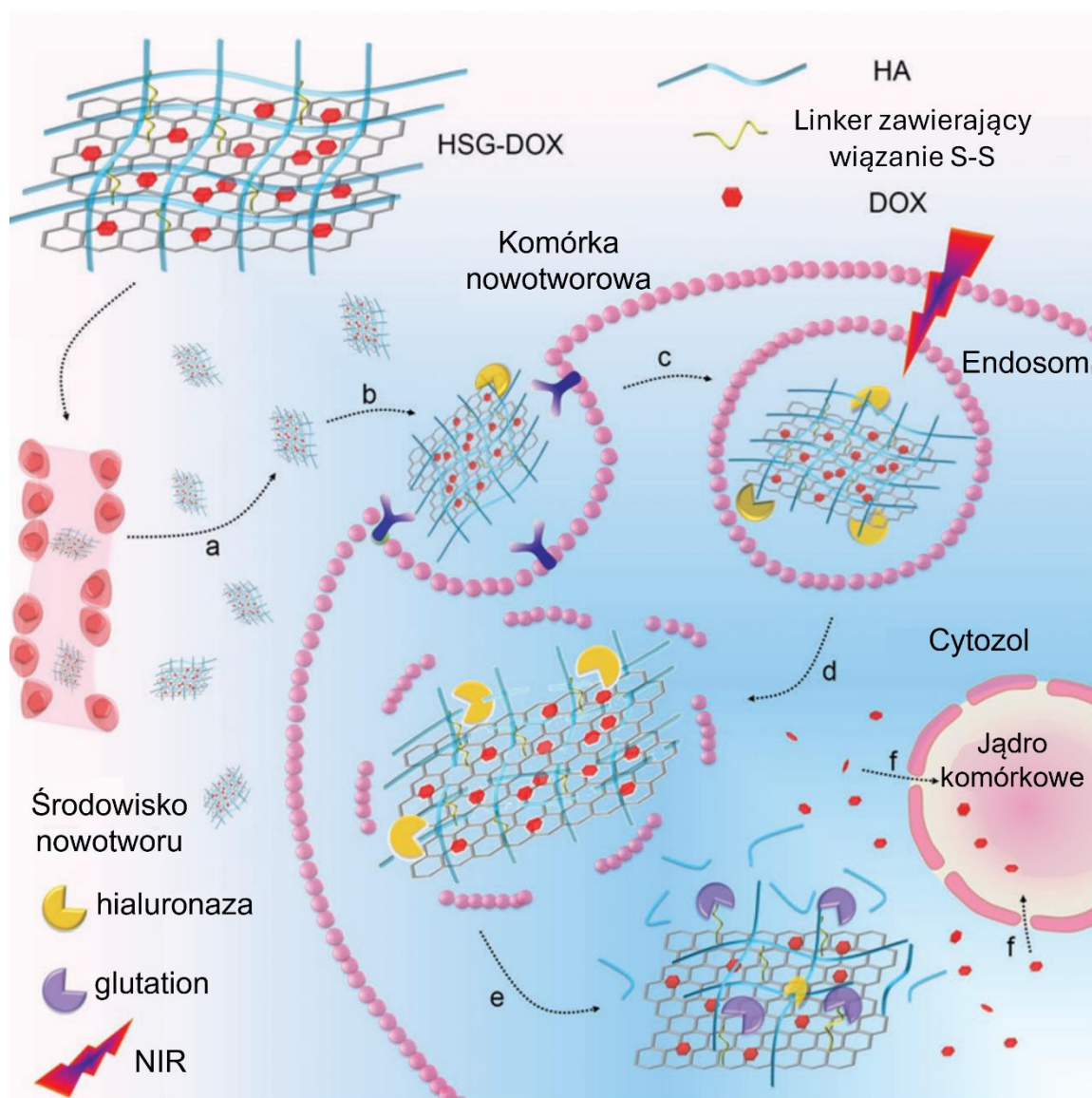
allil aminy) (PAH) z dołączonym bezwodnikiem 2,3-dimetylomaleinowym (DA) (GO-PEG-PAH-DA/DOX). Z nośnikiem związano DOX. W nowotworowym środowisku o pH $\approx 6,8$ DA odłącza się od PAH zmieniając ładunek powierzchniowy nośnika. W rezultacie następuje uwalnianie dokсорubicyny z powierzchni nośnika. W warunkach lizosomalnego pH ($\approx 5-5,5$) następuje protonacja DOX i przyspieszenie uwalniania nośnika (Ryc.3). Wykazano, że GO-PEG-PAH-DA/DOX jest bardziej cytotoksyczny niż wolna DOX, zarówno wobec nowotworowych komórek piersi linii (MCF-7) jak i lekoodpornego wariantu tej linii (MCF-7/ADR). Oceniono również możliwość wykorzystania GO-PEG-PAH-DA/DOX w terapii kombinowanej łączącej chemioterapię i terapię fototermiczną. W badaniach wykorzystano promieniowanie o długości fali 808 nm i gęstości mocy 0,5 W/cm². Lekoodporny wariant komórek nowotworu piersi inkubowany z GO-PEG-PAH-DA/DOX wystawiono na działanie promieniowania przez 5 min. Żywotność komórek inkubowanych z lekiem i poddanych działaniu promieniowania oraz nienapromieniowanych wynosiła odpowiednio 55% i 21% kontroli. Zastosowanie promieniowania bez inkubacji z lekiem i nośnikiem nie miało wpływu na żywotność komórek. Synergistyczny efekt fototermiczny i cytotoksyczny wywołany przez lek związany z nośnikiem pozwala sądzić, że GO może znaleźć zastosowanie w kombinowanych terapiach przeciwnowotworowych⁴⁸.



Ryc. 10 Schematyczne przedstawienie dostarczania dokсорubicyny DOX związanej z nośnikiem (GO-PEG-PAH-DA/DOX) do lekoodpornych komórek MCF-7/ADR⁴⁸ (DOX – dokсорubicyna; NGO – nano-utleniony grafen; PEG – poli(glikol etylenowy); DA – bezwodniki 2,3-dimetylomaleinowy).

Kolejnym czynnikiem, który charakteryzuje mikrośrodowisko nowotworu jest podwyższone stężenie glutationu (GSH) w porównaniu do mikrośrodowiska wzrostu komórek prawidłowych. Glutation jest enzymem odpowiedzialnym za tiosiłę wiązań disiarczkowych. Yin i współpracownicy opracowali nośnik, który wykorzystywał podwyższone stężenie GSH w środowisku nowotworu do kontrolowanego uwalniania leku. Dodatkowo, kontrolowane uwalnianie leku osiągnięto wykorzystując fototermiczne właściwości GO. Utleniony grafen kowalencyjnie zmodyfikowano kwasem hialuronowym, który stanowił jednocześnie stabilizator całego kompleksu i czynnik zapewniający specyficzne wchłanianie do komórek nowotworowych o podwyższonej ekspresji receptora HA. Kwas hialuronowy połączony był z GO za pomocą cysteiny posiadającej wiązanie disiarczkowe. Nośnik leków został związany z dokсорubicyną, której uwalnianie z powierzchni GO utrudniała sieć kwasu hialuronowego. Po wprowadzeniu do komórki na drodze endocytozy nośnik został zamknięty w lizosomie. Uwolnienie cząsteczki z lizosomu nastąpiło pod wpływem efektu fototermicznego indukowanego przez promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR, ang. *near infra red*). Następnie, szkielet hialuronowo-cysteinowy został zdegradowany przez działanie

hialuronaz i glutationu, co w konsekwencji spowodowało uwolnienie DOX do cytoplazmy (Ryc.4). Kontrolowane uwalnianie DOX zostało zbadane na nowotworowych komórkach piersi linii MDA-MB-231 ⁵⁰.



Ryc. 11 Schemat wieloetapowego uwalniania DOX z nośnika leku opartego na GO ⁵⁰ (DOX – doksorubicyna; HA – kwas hialuronowy; HSG-DOX – utleniony grafen modyfikowany cysteiną i związany z doksorubicyną).

Huang i współpracownicy wykorzystali zewnętrzne pole magnetyczne w celu zapewnienia zwiększonej akumulacji leku w komórkach nowotworowych. Utleniony grafen został zmodyfikowany magnetycznymi nanocząstkami żelaza (GO-Fe₃O₄). Następnie do GO-Fe₃O₄ został dołączony chitozan (CS) i poli(glikol etylenowy). Nośnik leków został związany z cząsteczkami doksorubicyny (GO-Fe₃O₄-Ch-PEG/DOX). Cytotoksyczność leku związanego z

nośnikiem oceniono na komórkach glejaka, linii U87. Wykazano, że po zastosowaniu pola magnetycznego dochodzi do zwiększonej akumulacji GO-Fe₃O₄-CS-PEG/DOX w komórkach U87, w porównaniu do próby, w której nie zastosowano pola magnetycznego. Wyniki te wskazują na potencjał zastosowania takiego nośnika w połączeniu z zewnętrznym polem magnetycznym do kontrolowanego uwalniania leku do komórek nowotworowych⁴⁹.

Dzięki modyfikacjom powierzchni utlenionego grafenu możliwe jest kontrolowane uwalnianie leku w miejscu nowotworu. W tym celu wykorzystuje się charakterystyczne cechy środowiska nowotworowego takie jak obniżone pH, zwiększone stężenie GSH, większa niż u komórek prawidłowych liczba receptorów błonowych. Ponadto akumulację GO i leku w komórkach nowotworowych można uzyskać poprzez zastosowanie pola magnetycznego i modyfikację utlenionego grafenu nanocząstkami magnetycznymi. Powyższe przykłady pokazują potencjał GO jako nośnika leków przeciwnowotworowych.

3.3. Zastosowanie GO w terapii genowej

Zastosowanie utlenionego grafenu jako nośnika cząsteczek o znaczeniu terapeutycznym nie ogranicza się do chemioterapii. Terapia genowa jest dynamicznie rozwijającą się strategią leczenia chorób genetycznych. Polega na wprowadzeniu do komórek cząsteczek rekombinowanych kwasów nukleinowych, które wpływają na profil ekspresji genów⁵¹. Podobnie tak jak w przypadku leków przeciwnowotworowych, GO znalazł zastosowanie w terapii genowej jako nośnik kwasów nukleinowych. *Wang i współpracownicy* zaproponowali nośnik krótkiego interferującego RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) do selektywnej terapii genowej komórek z nadekspresją receptorów kwasu foliowego (FA). Nośnik otrzymany na drodze modyfikacji GO poli(glikolem etylenowym) (PEG) i poli(etylenoiminą) (PEI) związany z siRNA wyciszającym onkogenny gen *Stat3* (GO-PEG-PEI-FA/siRNA). Badania przeprowadzono na nowotworowych komórkach wątroby linii SMMC-7721. Wykazano, że nośnik zawierający FA charakteryzował się lepszą efektywnością transfekcji niż nośnik bez tej cząsteczki⁵². Utleniony grafen może znaleźć również zastosowanie w terapii genowej, w której efektywność transfekcji jest kontrolowana za pomocą promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR). *Feng i współpracownicy* zmodyfikowali powierzchnię utlenionego grafenu za pomocą PEG i PEI. W swojej pracy oceniali efektywność transfekcji plazmidowego DNA kodującego białko EFGR. Badania przeprowadzono na komórkach nowotworu szyjki macicy. Wykazano, że użycie promieniowania NIR zwiększa efektywność transfekcji w kontrolowany sposób⁵³.

Przedstawione przykłady obrazują potencjalne zastosowanie GO w terapii genowej. Tak jak w przypadku chemioterapii, dzięki zastosowaniu modyfikacji GO oraz promieniowania możliwe jest kontrolowane uwalnianie cząsteczek terapeutycznych do komórek.

3.4. Zastosowanie GO w terapii fotodynamicznej

Utleniony grafen można również zastosować jako nośnik fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej (PDT, ang. *photodynamic therapy*). PDT polega na wprowadzeniu do komórki cząsteczki fotouczulacza. Pod wpływem promieniowania fotouczulacz generuje reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Te z kolei doprowadzają do stresu oksydacyjnego i śmierci komórki. Do przykładowych fotouczulaczy można zaliczyć meso-tetrafenyloporfiryne (TPP)¹⁷, ftalocyjaninę cynku (ZnPc)⁵⁴ i sinoporfirynę sodową (DVDMS)⁵⁵. Yan i współpracownicy porównali cytotoksyczny efekt wolnej DVDMS i DVDMS związanej z utlenionym grafenem modyfikowanym PEG. Badania zostały przeprowadzone na komórkach glejaka linii U87MG. W celu indukcji efektu fotodynamicznego komórki z fotouczulaczem zostały wystawione na działanie promieniowania o długości fali 630 nm. Fotouczulacz związany z nośnikiem był bardziej cytotoksyczny dla komórek nowotworowych niż fotouczulacz niezwiązany z nośnikiem⁵⁵. Z kolei Dong i współpracownicy ocenili skuteczność terapii PDT z wykorzystaniem ZnPC jako fotouczulacza i GO-PEG jako nośnika. Otrzymany kompleks GO-PEG/ZnPC wprowadzono do nowotworowych komórek piersi linii MCF-7 i poddano działaniu promieniowania o długości fali 400nm. Bez zastosowania promieniowania żywotność komórek inkubowanych z GO-PEG/ZnPC wynosiła 85% żywotności kontroli. Z kolei zastosowanie promieniowania obniżyło żywotność komórek inkubowanych z GO-PEG/ZnPC do 60% kontroli. Wyniki badań pokazały, że utleniony grafen może być użyty jako nośnik ftalocyjaniny cynku w terapii fotodynamicznej⁵⁴.

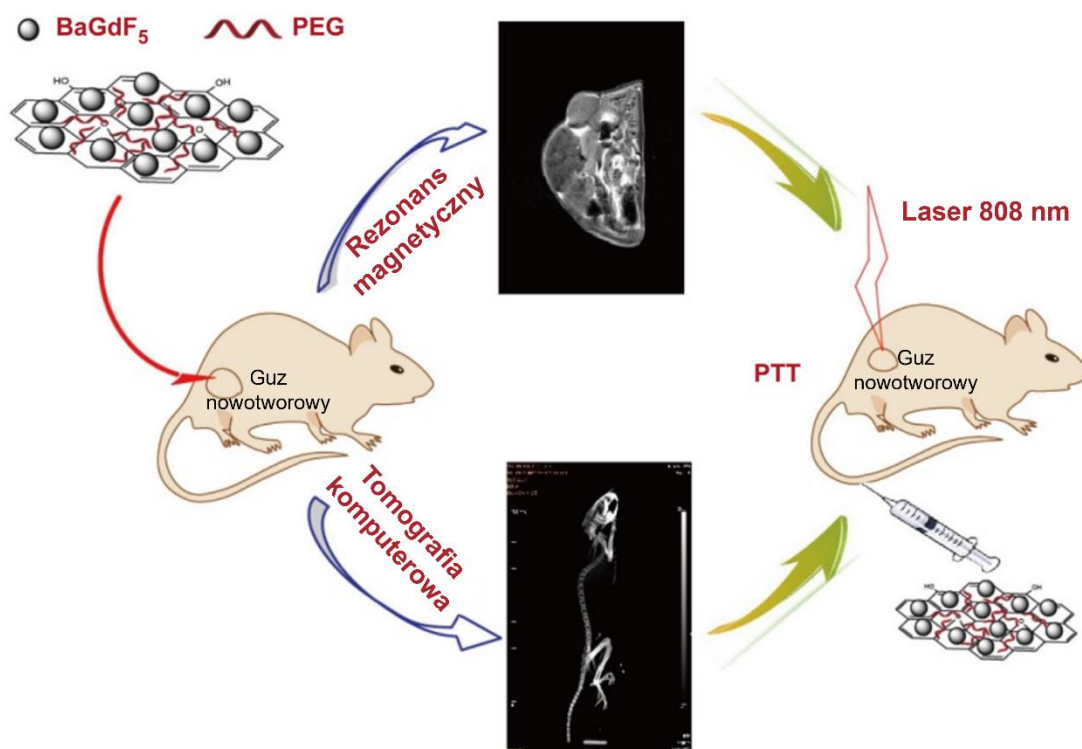
Nasz zespół badawczy również oceniał efektywność terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem GO jako nośnika. Utleniony grafen został zmodyfikowany poli(winylopirolidonem) (PVP) oraz aminami. Do nośnika przyłączono niekowalencyjnie fotouczulacz - meso-tetrafenyloporfiryne (TPP). Oceniono cytotoksyczność zmodyfikowanego GO związanego z TPP oraz określono efektywność TPP związanego z zmodyfikowanym GO jako fotouczulacza. Badania przeprowadzono na kokulturze prawidłowych i nowotworowych komórek piersi (odpowiednio linie HMF i MCF-7). Komórki hodowano w mikrosystemie typu *Cell-on-a-Chip* w postaci monowarstwy i sferoidów. Zaproponowany komórkowy model badawczy lepiej odwzorowuje warunki *in vivo* niż standardowa monokultura hodowana w

postaci monowarstwy. Badania pokazały, że użycie zmodyfikowanego GO jako nośnika zwiększa efektywność PDT z użyciem meso-tetrafenyloporfiryny. Ponadto wykazano, że hodowla sferoidów jest bardziej podatna na działanie GO-TPP niż monowarstwa komórek. Nasze badanie wykazało zarówno potencjał GO jako nośnika leków w PDT jak i potrzebę rozwijania modeli komórkowych bardziej zbliżonych do warunków *in vivo*, niż standardowa hodowla w postaci monowarstwy. Dodatkowo, podjęto próbę oceny wnikania GO związanego z TPP do komórek linii HMF i MCF-7. Nasz zespół badawczy jako dotychczas jedyny przeprowadził tego typu badania przy użyciu mikrosystemów przepływowych ¹⁷.

3.5. Zastosowanie GO w teranostyce

Pod pojęciem teranostyka kryje się koncepcja łącząca diagnostykę z jednoczesną terapią. W kontekście nośników leków oznacza to związanie na jednym nośniku cząsteczki umożliwiającej obrazowanie i cząsteczki działającej terapeutycznie. Dzięki dużej powierzchni właściwej i możliwości modyfikacji powierzchni, utleniony grafen stał się przedmiotem badań wykorzystujących podejście teranostyczne. Nośniki oparte na GO wykorzystywane do jednoczesnego obrazowania i podania leku łączą wyżej wspomniane strategie terapeutyczne (tzn. chemioterapię, terapię genową, PTD) z technikami obrazowania takimi jak rezonans magnetyczny (MRI) ⁵⁶, tomografia komputerowa (CT)⁵⁶, obrazowanie fotoakustyczne (PA) ⁵⁷, powierzchniowo wzmocnioną spektroskopię Ramana (SERS) ⁵⁸ i obrazowanie fluorescencyjne ⁵⁹.

Zhang i współpracownicy ocenili możliwości GO-PEG modyfikowanego pentafluorkiem gadolinu baru (BaGdF₅) (GO-PEG-BaGdF₅) jako platformy do jednoczesnego obrazowania CT/MRI i terapii fototermicznej (Ryc. 5). Badania zostały przeprowadzone na komórkach nowotworu macicy linii HeLa oraz myszach. Wykazano, że zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* GO-PEG-BaGdF₅ działał jako czynnik kontrastujący w obrazowaniu CT/MRI. Ponadto po zastosowaniu promieniowania o długości fali 808 nm GO-PEG-BaGdF₅ wykazywał efekt fototermiczny zarówno w komórkach HeLa jak i w guzie nowotworowym myszy ⁵⁶.



Ryc. 12 Zasada działania nośnika GO-PEG-BaGdF₅ w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem myszy jako modelu badawczego⁵⁶ (PEG- poli(glikol etylenowy); PTT -terapia fototermiczna).

Chen i współpracownicy zmodyfikowali GO poli(winylopirolidonem) (PVP) oraz nanocząstkami złota opłaszczonymi polianiliną (Au@PANI). Użycie nanocząstek złota umożliwiło wykonanie obrazowania komórek, do których wniknął nośnik, z użyciem powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (SERS). Polianilina, charakteryzująca się efektywną konwersją promieniowania na ciepło, została wykorzystana jako czynnik fototermiczny. Ponadto do nośnika została dołączona doskorubicyna (DOX). Badania przeprowadzono na komórkach nowotworu piersi 4T1. Wykazano synergistyczne działanie cytotoksycznego działania DOX i terapii fototermicznej z wykorzystaniem polianiliny. Zaproponowany nośnik z dołączonym lekiem umożliwił jednocześnie obrazowanie komórek za pomocą SERS, kontrolowane uwalnianie doksorubicyny oraz wykazywał efekt fototermiczny względem komórek linii 4T1⁵⁸.

3.6. Utleniony grafen w medycynie – podsumowanie

Powyższe badania pokazują ogromny potencjał utlenionego grafenu. Dzięki dużej powierzchni właściwej, łatwej funkcjonalizacji oraz zdolności konwersji promieniowania w ciepło znalazł on potencjalne zastosowanie w chemioterapii oraz terapiach: genowej, fototermicznej, fotodynamicznej i terapiach kombinowanych. Ponadto, wykazano możliwość

kontrolowanego uwalniania cząsteczek terapeutycznych z powierzchni GO dzięki wykorzystaniu unikalnych cech środowiska komórki nowotworowej lub zewnętrznych bodźców takich jak promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni czy pole magnetyczne. Do utlenionego grafenu można również dołączyć cząsteczki umożliwiające obrazowanie w technikach powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana (SERS), rezonansu magnetycznego (MRI) i tomografii komputerowej (CT). Możliwe jest również związanie GO z lekiem i jednoczesna modyfikacja powierzchni utlenionego grafenu cząsteczką umożliwiającą obrazowanie komórek. W przyszłości, zastosowanie takiego nośnika w terapii pozwoliłoby na jednoczesną diagnozę i leczenie tkanek/organów dotkniętych zmianami chorobowymi. Jednym z wymogów projektowania efektywnych nośników leków z wykorzystaniem tlenku grafenu jest dogłębne poznanie procesu wnikania GO do komórek. Pomimo wielu badań dotyczących tej tematyki wiele kwestii związanych z wnikaniem GO do komórek wymaga wyjaśnienia. W następnym rozdziale niniejszej pracy dokonano podsumowania dotychczasowej wiedzy na temat wnikania utlenionego grafenu do komórek.

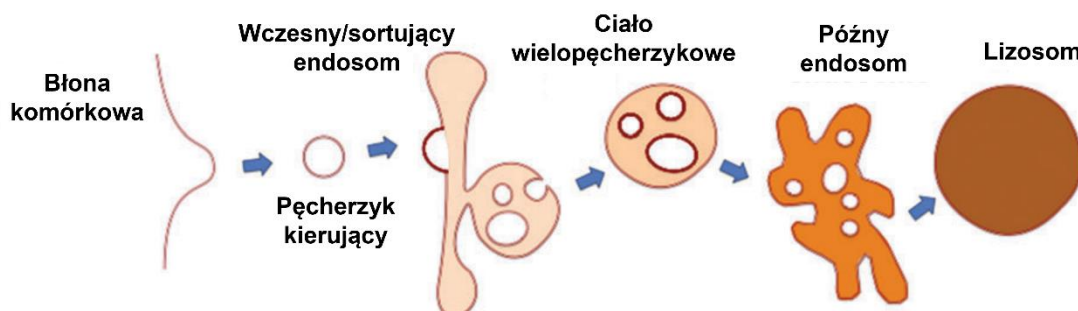
4. Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do komórek

Utleniony grafen wykazuje szerokie potencjalne zastosowanie jako nośnik leków, czynników regulujących ekspresję genów lub cząsteczek umożliwiających obrazowanie. Jednak do tej pory żaden z zaproponowanych nośników nie został wdrożony^{60,61}. Jest to spowodowane lukami w wiedzy na temat biologicznych właściwości utlenionego grafenu. Szczególnie istotne jest kompleksowa ocena procesu wnikania GO do komórek. Wnikanie utlenionego grafenu do komórek jest procesem zależnym od wielu czynników takich jak typ komórek, wielkość płatków oraz modyfikacje powierzchni GO. Wpływ każdego z tych czynników musi zostać kompleksowo poznany, zanim utleniony grafen znajdzie realne zastosowanie w biomedycynie. W ramach części literaturowej niniejszej pracy podsumowany zostanie dotychczasowy stan wiedzy na temat wnikania GO do komórek z wyszczególnieniem czynników które mogą wpływać na ten proces.

4.1. Endocytoza

Endocytozę uznaje się za główny mechanizm wnikania GO do komórek. Jest procesem obejmującym szereg szlaków, na drodze których komórka wchłania składniki ze środowiska zewnętrznego. Główny schemat endocytozy obejmuje: 1) Kontakt materiału z błoną komórkową, 2) Opłaszczenie materiału przez błonę komórkową, 3) Zamknięcie materiału w pęcherzyku transportowym. Z pęcherzyka transportowego materiał trafia przez szereg

błonowych struktur komórkowych (wczesny endosom, ciało wielopęcherzykowe, późny endosom) do lizosomu (Ryc.13) ⁶². Materiał może wydostać się z tego szlaku i przedostać bezpośrednio do cytoplazmy ⁶³.



Ryc. 13 Pęcherzyki biorące udział w wewnątrzkomórkowym transporcie substancji ⁶².

Wyróżnia się różne typy endocytozy: klatrynozależna endocytoza (CME, ang. *Clathrin-Mediated Endocytosis*), szybka endofilinozależna endocytoza (FEME, ang. *Fast Endophilin-Mediated Endocytosis*), endocytoza niezależna od klatryny/zależna od GEEC (CLIC/GEEC ang. *Clathrin independent carrier/ glycosylphosphatidylinositol-anchored protein enriched early endocytic compartment*), makropinocytozę i fagocytozę (Ryc.14) ⁶⁴. Endocytoza za pośrednictwem kaweolin również jest tradycyjnie proponowana jako mechanizm wnikania wielu substancji. Jednak najnowsze genetyczne badania pokazują, że rola tego szlaku we wchłanianiu substancji nie jest potwierdzona, a kaweoliny mogą brać udział w innych mechanizmach endocytozy ^{65,66}.

CME jest do tej pory najlepiej poznany mechanizm endocytozy. Jest obecna we wszystkich typach komórek i jest główną drogą, na drodze której komórka pobiera składniki odżywcze. Domeny bogate w klatrynę stanowią od 0,5-2% powierzchni komórki. Po otoczeniu materiału przez pęcherzyk odrywa się on do błony komórkowej po jej wewnętrznej stronie za pośrednictwem dynaminy. Pęcherzyk opłaszczony klatryną może mieć do 100 nm co jest równocześnie górną granicą wielkości wchłanianych cząstek. Jednak uważa się, że mogą one zwiększyć swoje rozmiary, dzięki elongacji za pośrednictwem aktyn. Umożliwiłoby to internalizację tą drogą cząsteczek większych niż 100 nm. Elongacja pęcherzyków może jednak spowolnić cały proces endocytozy zmieniając jego kinetykę ⁶⁴.

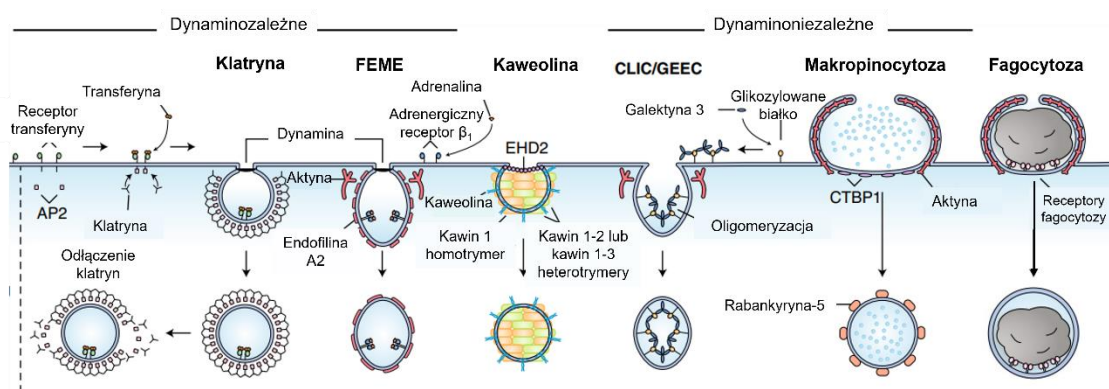
Endofilinozależna endocytoza (FEME) jest szybko zachodzącym rodzajem endocytozy, w którym formowanie pęcherzyków transportujących następuje w mniej niż 10 s. Jest procesem niezależnym od klatryny a cząsteczką pośredniczącą w tym rodzaju endocytozy jest dynamina. FEME jest indukowana poprzez przyłączanie się specyficznych ligandów do receptorów.

Poznanymi cząsteczkami wchłanianymi tym szlakiem są transbłonowe receptory odpowiadające za migrację i przekazywanie sygnałów czynników wzrostu. Pęcherzyki wytworzone w procesie endofilinozależnej endocytozy (FEME) mają tubularny kształt, 60-80 nm średnicy i kilkaset nanometrów długości ⁶⁴.

CLIC/GEEC jest rodzajem endocytozy niezależnym ani od klatryny, ani od dynaminy. Pęcherzyki transportowe mają podobny kształt i wielkość jak w FEME. W odróżnieniu od FEME, nie jest to mechanizm indukowany wiązaniem ligandów. CLIC/GEEC bierze udział między innymi w internalizacji receptora kwasu hialuronowego CD44 ⁶⁴.

Makropinocytoza odpowiada za wchłanianie cząstek większych niż 200 nm. Podczas tego procesu błona komórkowa otacza wypustkami porcję płynu po zewnętrznej stronie komórki, zamykając wszystkie znajdujące się w niej substancje. W formowaniu wypustek po zewnętrznej stronie błony komórkowej bierze udział aktyna. Następnie błona komórkowa powraca do pierwotnego kształtu jednocześnie pobierając porcję płynu do wnętrza komórki. Po wewnętrznej stronie błony formuje się makropinosom otaczający pobrany materiał. Obecność tego mechanizmu w komórce jest zależna od typu komórki. Makropinocytoza może być procesem konstytutywnym (nie wymagającym indukcji) lub indukowanym ligandami, np. EGFR ⁶⁴.

Fagocytoza odpowiada za pobieranie cząstek większych niż 500 nm, jednak w niektórych przypadkach może pobierać cząstki o mniejszych rozmiarach. Występuje w wyspecjalizowanych komórkach układu odpornościowego oraz w niektórych komórkach nie będących fagocytami. Jest procesem indukowanym przez połączenie ligandu z receptorem. Błona komórkowa ściśle otacza fagocytowaną cząstkę aż do jej całkowitego oplaszczenia i uformowania fagosomu.



Ryc. 14 Zestawienie różnych mechanizmów endocytozy ⁶⁴.

4.2. Wnikanie GO do komórek ssaczych

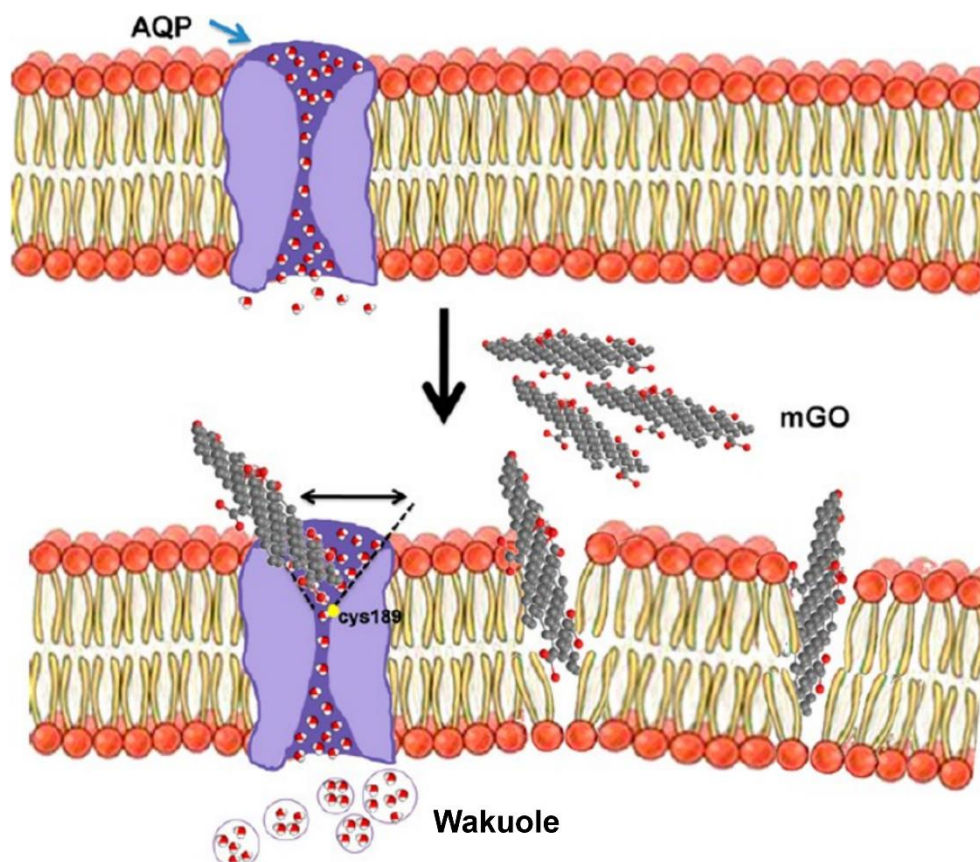
Endocytozę uważa się za główny mechanizm odpowiedzialny za wnikanie GO do komórek ssaczych. *Chatterje i współpracownicy* ocenili wnikanie GO z wykorzystaniem monowarstwy nowotworowych komórek wątroby HepG2. Płatki GO miały 40 nm średnicy. Mechanizm wnikania oceniono za pomocą cytometrii przepływowej i inhibitorów endocytozy. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że utleniony grafen wnika do komórek HepG2 głównie na drodze klatrynozależnej endocytozy i makropinocytozy ⁶⁷. *Huang i współpracownicy* wykorzystali powierzchniowo wzmocnioną spektroskopię Ramana (SERS) oraz mikroskopię konfokalną do badania wnikania GO do nowotworowych komórek szyjki macicy linii Ca Ski. Utleniony grafen został zmodyfikowany nanocząstkami złota, które wzmacniały sygnał analityczny w technice SERS. Dodatkową modyfikację stanowił PEG zapobiegający agregacji GO w roztworach. W celu określenia mechanizmu wnikania GO do komórek użyto inhibitorów szlaków endocytozy. Również w tym przypadku stwierdzono, że głównym mechanizmem wnikania jest klatrynozależna endocytoza ⁶⁸. Do podobnych wniosków doszli *Wang i współpracownicy*. Zbadali oni wnikanie GO modyfikowanego PEG i PEI na komórkach nowotworowych wątroby HepG2, HuH7 oraz PLC/PRF/5 ⁶⁹.

4.3. Wpływ typu komórki na wnikanie GO

Badania przeprowadzone na różnych typach komórek wykazały, że droga wnikania GO zależy od typu komórek. *Linares i współpracownicy* ocenili wnikanie GO do trzech typów komórek: nowotworowej linii mięsaka osteogennego Saos-2, mysich makrofagów białaczki RAW-264.7 oraz nowotworu wątroby HepG2. Do badań użyto płatków utlenionego grafenu o rozmiarach ok. 100 nm, które było modyfikowane poli(glikolem etylenowym). Komórki linii Saos-2 wchłaniały GO na drodze makropinocytozy, natomiast do makrofagów RAW 264.7 GO wnikał na drodze makropinocytozy i klatrynozależnej endocytozy. Fagocytoza nie była głównym mechanizmem wnikania GO w przypadku makrofagów. Natomiast komórki HepG2 wchłaniały utleniony grafen za pośrednictwem makropinocytozy, klatrynozależnej endocytozy i fagocytozy. Ponadto ustalono, że efektywność wnikania GO również zależy od typu komórki. Najwięcej GO wniknęło do komórek osteoblastów a najmniej do komórek makrofagów ⁷⁰. Różnice w efektywności wnikania GO do osteoblastów i makrofagów potwierdziły badania przeprowadzone przez *Matesanz i współpracowników*. Utleniony grafen inkubowano z komórkami linii Saos-2, RAW-264.7 oraz linii mysich preosteoblastów MC3T3-E1. Płatki GO zostały zmodyfikowane rozgałęzionym i nierozgałęzionym PEG a ich rozmiary wynosiły odpowiednio 190 nm i 95 nm. Komórki Saos-2 i MC3T3-E1 wykazały się większą

efektywnością wnikania GO niż makrofagi RAW-264.7. Dodatkowo ustalono, że na efektywność wnikania GO do komórek miał wpływ stopień rozgałęzienia PEG. Utleniony grafen zmodyfikowany nierozgałęzionym PEG wnikał do komórek z większą efektywnością niż jego rozgałęziony odpowiednik ⁷¹. Istnieją również badania, w wyniku których stwierdzono, że GO nie wnika do pewnych typów komórek. Z kolei na podstawie badań *Yue i współpracowników* można wywnioskować, że istnieją linie komórkowe, do których GO nie wnika. Analizowali oni wnikanie GO do komórek mysich makrofagów PMØ, mysich nowotworowych makrofagów J774A.1, mysich komórek raka płuc LLC, ludzkich komórek raka piersi MCF-7, komórek linii HepG2 oraz ludzkich komórek nabłonka żyły pępowinowej HUVEC. Oceniono dwie frakcje GO o różnych średnich rozmiarach płatków: 350 nm i 2000 nm. Utleniony grafen wnikał jedynie do komórek makrofagów J774A.1 i PMØ. Nie udało się zlokalizować GO we wnętrzu komórek LLC, MCF-7, HUVEC i HepG2 ⁷². Wyniki tych badań dotyczące linii HepG2 stoją w sprzeczności z wynikami badań *Chatterjee i współpracowników* ⁶⁷. Różnice we wnikaniu GO do różnych typów komórek zbadali również *Chowdhury i współpracownicy*. Badanym materiałem były utlenione wstążki grafenowe (O-GNR) modyfikowane PEG i 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosforyloetanolaminą (DSPE). Rozmiar utlenionych wstążek grafenowych wynosił od 125 do 220 nm. Badania zostały przeprowadzone na komórkach MCF-7, komórkach nowotworu płuc A549, płodowych fibroblastach płuc MRC5, nowotworze jajnika HeLa oraz płaskonabłonkowym nowotworze linii A431. O-GNR-PEG-DSPE wnikało do komórek HeLa i A431 na drodze makropinocytozy i w mniejszym stopniu, klatrynozależnej endocytozy. Nie zaobserwowano, aby badany materiał wnikał do komórek linii A549, MCF-7 i MRC5 ⁷³. Płatki GO, które nie wnikały do komórki na drodze endocytozy mogą ulegać adhezji na błonie komórkowej. *Lammel i współpracownicy* zbadali oddziaływanie GO o rozmiarach 100-300 nm z komórkami linii HepG2. Zdjęcia otrzymane przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) nie potwierdziły wniknięcia GO na drodze endocytozy. Zaobserwowano natomiast akumulację płatków GO na błonie komórkowej oraz przebijanie błony przez płatki GO. Jest to wynik odmienny od rezultatów badań *Chatterjee i współpracowników* ⁶⁷, w których GO wnikał do komórek HepG2 na drodze endocytozy. Jednak w obu badaniach zastosowano różne metody oceny wnikania GO do komórek, różne stężenia GO oraz płatki GO o różnych rozmiarach i modyfikacjach powierzchni. Może to być przyczyną odmiennych wyników badań. Oddziaływania utlenionego grafenu z błoną komórkową bez jej przenikania zaobserwował *Wu i współpracownicy*. Badania przeprowadzili na komórkach nowotworu piersi linii MCF-7. Częstki GO o rozmiarach 500-4000 nm nie przeniknęły do wnętrza komórek. Uległy adsorpcji

na błonie, nakłuwały ją i oddziałując z akwaporynami zwiększały przepuszczalność błony komórkowej (Ryc.15) (72).



Ryc. 15 Oddziaływanie GO z błoną komórkową i akwaporynami ⁷⁴ (AQP – akwaporyny; mGO – utleniony grafen mikrometrowych rozmiarów).

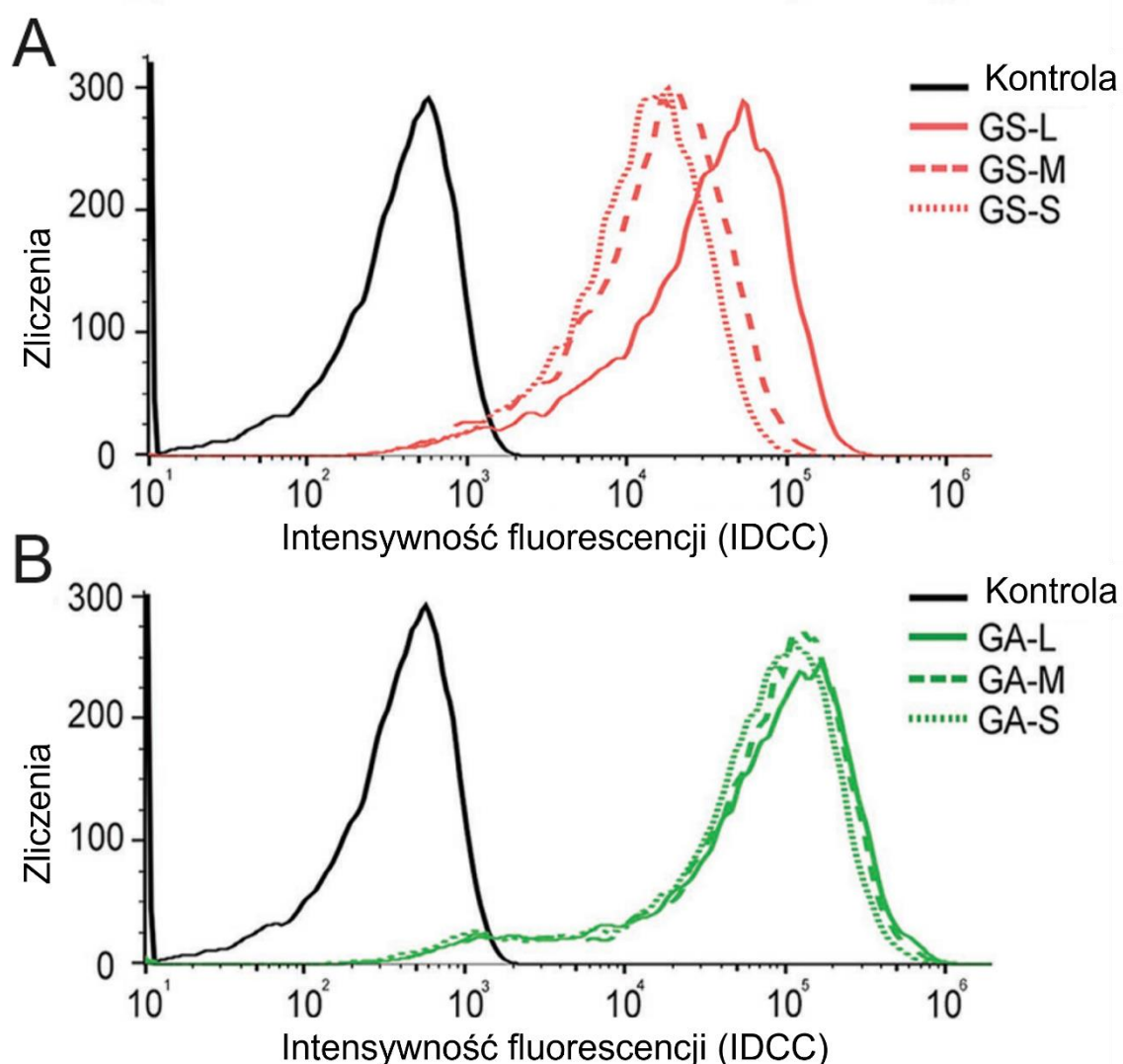
Wnikanie utlenionego grafenu do komórek przeprowadzono z użyciem różnych typów komórek, np. osteoblastów, makrofagów lub komórek nowotworowych pochodzących z różnych tkanek. W zależności od typu komórki inkubowanej z GO, płatki utlenionego grafenu wnikały przez błonę komórkową na drodze endocytozy, przebijały ją lub ulegały adhezji po zewnętrznej stronie błony komórkowej. W niektórych przypadkach nie stwierdzono żadnego oddziaływania między komórkami wybranymi do badań a utlenionym grafenem. W przypadku niektórych linii otrzymano sprzeczne wyniki badań co może być rezultatem użycia do eksperymentów płatków GO o odmiennych rozmiarach i modyfikacji powierzchni. W celu lepszego zrozumienia sposobu wnikania utlenionego grafenu do różnych typów komórek oraz cech komórek wpływających na wnikanie GO należy prowadzić dalsze badania. Ustanowienie

jednego, standardowego protokołu dla badań wnikania GO do komórek ułatwiłoby porównywanie wyników uzyskanych przez różne zespoły badawcze.

4.4. Wpływ rozmiaru płatków GO na wnikanie do komórek

Efektywność wnikania GO do komórek jest skomplikowanym procesem zależący od wielu czynników. Jednym z najważniejszych jest rozmiar płatków utlenionego grafenu. Rozmiar płatków ma wpływ na mechanizm endocytozy, na drodze którego GO wnika do komórek. Na przykład fagocytoza zachodzi dla cząstek większych niż 500 nm, podczas gdy klatrynozależna endocytoza preferuje wnikanie cząstek o rozmiarach ok. 100 nm. Wielkość płatków GO może mieć również wpływ na efektywność wnikania utlenionego grafenu do komórek.

Tu i współpracownicy przeprowadzili badania nad wpływem rozmiarów płatków oraz ładunku powierzchniowego na wnikanie GO do komórek MCF-7. Oceniono frakcje GO o trzech różnych średnich rozmiarach płatków: 200, 550 i 1000 nm. Dodatkowo każda frakcja GO została zmodyfikowana trzema różnymi cząsteczkami. W ten sposób, w obrębie każdej frakcji otrzymano trzy grupy GO o różnych ładunkach powierzchniowych. Zerowy ładunek został uzyskany poprzez modyfikację powierzchni GO rozgałęzionym poliglicerolem (hPG). Ładunki dodatni i ujemny zostały uzyskane poprzez modyfikację GO przy pomocy hPG połączonego odpowiednio z grupami aminowymi i sulfonowymi. Do każdej próbki przyłączono również znacznik fluorescencyjny umożliwiający pomiar efektywności wnikania. Oceniono wnikanie GO przy pomocy cytometrii przepływowej. Największa frakcja GO wnikała na drodze fagocytozy niezależnie od ładunku. Mniejsze, pozytywnie naładowane frakcje wnikały na drodze klatrynozależnej endocytozy. Małe, negatywnie naładowane cząsteczki wnikały do wnętrza komórek za pośrednictwem receptorów sulfonowych. Próbkę o zerowym ładunku nie wniknęły do komórek. Określono wzajemną zależność ładunku i rozmiaru płatków GO na efektywność wnikania. Efektywność wnikania próbek naładowanych dodatnio nie zależała od rozmiarów. Natomiast w przypadku próbek naładowanych dodatnio efektywność wnikania rosła wraz ze zwiększaniem się rozmiaru płatków (Ryc.16) ⁷⁵.



Ryc. 16 Zależność efektywności wnikania GO do komórek od rozmiaru płatków dla A) utlenionego grafenu modyfikowanego grupami sulfonowymi (GS) B) utlenionego grafenu modyfikowanego aminami (L, M, S – płatki o średniej wielkości wynoszącej odpowiednio 200, 550 i 1000 nm; IDCC - kwas 1,1'-bis(4-sulfobutylo)indodikarbocyanino-5-karboksylowy, znacznik fluorescencyjny)⁷⁵.

Podobną zależność zaobserwowano dla ludzkich makrofagów THP-1. Mendes i współpracownicy inkubowali GO o różnych rozmiarach płatków z makrofagami linii THP-1. Frakcje GO miały rozmiary 46, 277 i 453 nm. Przy pomocy mikroskopii elektronowej zaobserwowano, że efektywność wnikania wzrastała wraz ze wzrostem wielkości płatków⁷⁶. Odmienny trend został zaobserwowany w mysich mioblastach linii C2C12. Otrzymano dwie frakcje GO modyfikowanego albuminą bydlęcą (BSA, ang. *bovine serum albumin*) i z dołączonym wskaźnikiem fluorescencyjnym o różnych wielkościach płatków: 160-680 nm i 490-1230 nm. Mniejsze cząstki były internalizowane za pośrednictwem CME, większe były poddane fagocytozie. Płatki o mniejszych rozmiarach wnikały do komórek efektywniej niż

większe płatki ⁷⁷. Do podobnych wniosków doszedł *Li i współpracownicy* w przypadku komórek wątroby. Ocenili wnikanie GO o rozmiarach płatków 12-170 nm i 240-926 nm do mysich komórek wątroby KUP5 i Hepa 1-6 oraz do ludzkich komórek wątroby linii LSEC. Mniejsze płatki wniknęły do wszystkich linii za pośrednictwem CME. Większe natomiast uległy fagocytozie i zostały wchłonięte przez komórki KUP5. W dwóch pozostałych liniach nie zauważono internalizacji dużych płatków GO. Zamiast tego uległy one adsorpcji na błonie komórkowej. Podobnie jak w poprzednim przykładzie, mniejsze płatki wnikały z większą efektywnością ⁷⁸. Proces wnikania utlenionego grafenu do komórek oceniono również na makrofagach linii J774A.1. Otrzymano 3 frakcje GO różniące się rozmiarami: 50-350 nm, 350-750 nm i 750-1300 nm. Utleniony grafen został zmodyfikowany albuminą bydlęcą (BSA) i znacznikiem fluorescencyjnym. Również w tym przypadku wraz ze wzrostem rozmiarów płatków malała efektywność wnikania. Duże płatki GO (750-1300 nm) zostały lokalizowane głównie na błonie komórkowej ⁷⁹. Większą efektywność wnikania mniejszych płatków GO zauważyli również *Russier i współpracownicy*. Badania przeprowadzone na monocytach pochodzących z makrofagach hMDM i mysich makrofagach mIPM. Płatki GO o średnich rozmiarach 130 nm wnikały do komórek z większą efektywnością niż płatki o średniej wielkości 1320 nm ⁸⁰.

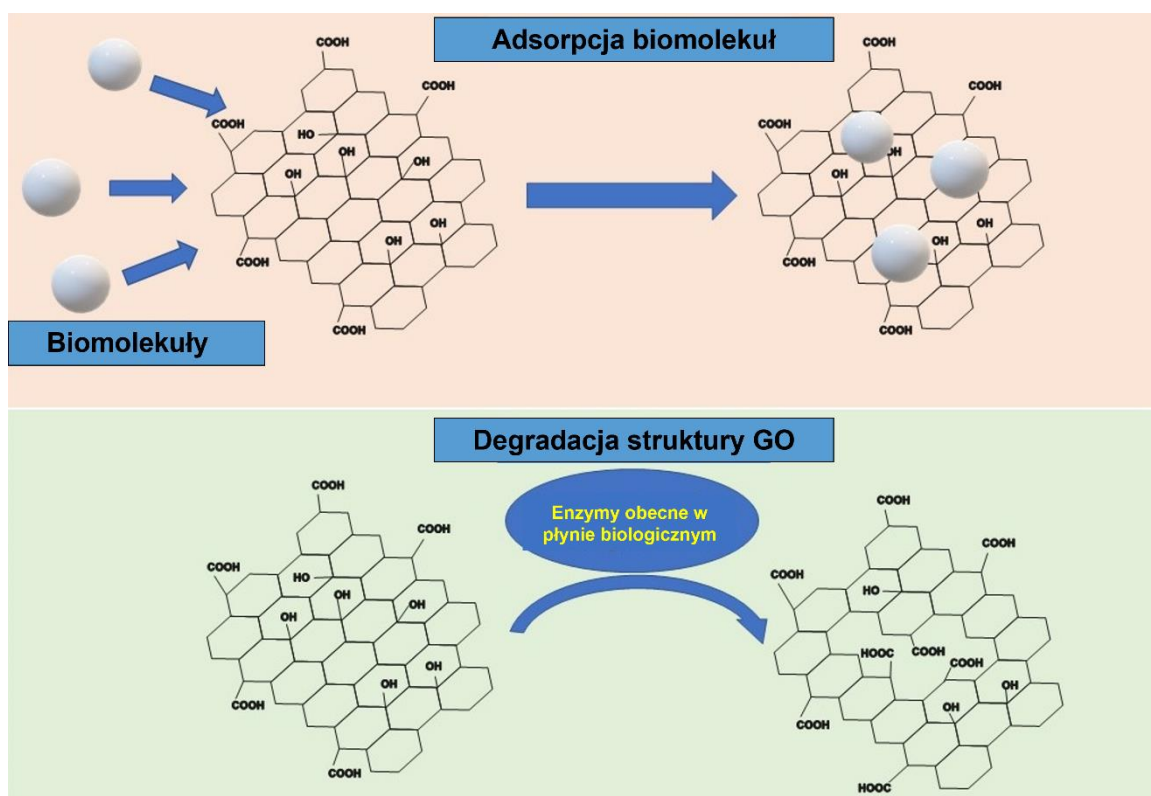
Wielkość płatków utlenionego grafenu może mieć wpływ na mechanizm wnikania GO do komórek. Płatki o rozmiarach większych niż kilkaset nanometrów mogą wnikać na drodze fagocytozy, podczas za wnikanie mniejszych płatków odpowiedzialne są inne mechanizmy, np. klatrynozależna endocytoza. Na podstawie wyników dotychczasowych badań można stwierdzić, że w wielu przypadkach wraz ze wzrostem wielkości płatków maleje efektywność wnikania GO do komórek. Należy jednak pamiętać, że wielkość płatków nie jest jedynym parametrem mającym wpływ na efektywność wnikania GO do komórek.

4.5. Wpływ modyfikacji powierzchni GO na wnikanie do komórek

Powierzchnia płatka utlenionego grafenu składa się z hydrofilowych domen bogatych w grupy tlenowe oraz hydrofobowych domen pierścieni aromatycznych. Dzięki temu utleniony grafen może być modyfikowany zarówno kowalencyjnie jak i niekowalencyjnie. Częsteczki modyfikujące powierzchnię grafenu mogą zmieniać jego ładunek powierzchniowy, zapobiegać agregacji i oddziaływać z receptorami obecnymi na błonie komórkowej. Modyfikacja powierzchni GO jest kluczowym parametrem wpływającym na proces wnikania GO do komórek. W uprzednio wspomnianych badaniach *Tu i współpracowników*, modyfikacja powierzchni GO zmieniła jego ładunek powierzchniowy i wpłynęła na proces jego wnikania

do komórek nowotworu piersi linii MCF-7 ⁷⁵. Luo i współpracownicy zbadali wpływ trzech modyfikacji powierzchni na efektywność wnikania GO do komórek. GO pokryto albuminą bydlęcą (BSA), poli(etyloiminą) (PEI) i poli(glikolem etylenowym) (PEG). Badania przeprowadzono na komórkach makrofagów linii PMØ i nowotworowych makrofagów linii J774.A1. Modyfikacja powierzchni BSA i PEG obniżała efektywność wnikania w porównaniu do niezmodyfikowanego GO i PEI ⁸¹. W rozdziale poświęconym zastosowaniu utlenionego grafenu jako nośnik leków, omówiono w jaki sposób można zwiększyć efektywność wnikania GO do komórek, dzięki modyfikacji powierzchni płatka. Dołączenie do GO cząsteczek będących ligandami komórkowych receptorów błonowych zwiększa efektywność zachodzenia endocytozy mediowanej przez te receptory. Przykładami takich cząsteczek są kwas hialuronowy ⁵⁰ i mannoza ⁸².

Utleniony grafen może ulegać również samorzutnej modyfikacji, będącej wynikiem jego kontaktu z płynami ustrojowymi organizmu żywego. Wprowadzone do organizmu płatki GO są wystawione na działanie substancji obecnych w płynach ustrojowych takich jak krew, płyn płucny lub soki trawienne. Zawarte w płynach ustrojowych cząsteczki mogą modyfikować GO ⁸³. Modyfikacja GO przez składniki płynów ustrojowych może przejawiać się w zmianach strukturalnych płatka GO lub adsorpcji cząsteczek na jego powierzchni (Ryc.17). Pod wpływem enzymów zawartych w płynach ustrojowych możliwa jest degradacja szkieletu węglowego płatka utlenionego grafenu lub redukcja grup funkcyjnych na jego powierzchni. Dodatkowo białka i inne składniki osocza mogą ulegać adsorpcji na płatku GO. Modyfikacja GO przez składniki płynów ustrojowych mogą mieć wpływ na efektywność wnikania GO do komórek.



Ryc. 17 Biotransformacja materiału *in vivo*: adsorpcja biologicznie aktywnych cząsteczek (góra). Degradacja strukturalna materiału (dół) ⁸⁴.

Renero-Lecuna i współpracownicy zmodyfikowali GO białkami surowicy symulując formowanie białkowej korony (ang. *protein corona*) na powierzchni płátka. Na podstawie zdjęć TEM stwierdzono, że białka surowicy mogą pośredniczyć we wnikanii GO do komórek HeLa ⁸⁵. Innymi składnikami surowicy mogącymi pośredniczyć we wnikanii GO do komórek są lipoproteiny. *Alnasser i współpracownicy* zbadali rolę lipoprotein Apo-AI we wnikanii grafenu do ludzkich embrionalnych komórek nerek HEK-293T charakteryzujących się nadekspresją receptorów lipoprotein Apo-AI. Rozmiar płatków grafenu wynosił ok. 300 nm. Płatki grafenu inkubowano z komórkami HEK-293T w ludzkiej surowicy z i bez dodatku lipoprotein kompetytywnych do Apo-AI. Efektywność wnikanii oceniono przy pomocy cytometrii przepływowej i Ramanowskiego mikrospektroskopowego mapowania XY. Badania wykazały, że lipoproteina Apo-AI pośredniczy w procesie wnikanii grafenu do badanych komórek. Chociaż badanie dotyczyło grafenu a nie jego utlenionej formy, zwraca ono uwagę na znaczenie składników ludzkiej surowicy w wnikanii materiałów grafenowych do komórek ⁸⁶. Powyższe badania pokazały, że składniki płynów biologicznych mogą mieć pozytywny wpływ na efektywność wnikanii GO do komórek. Jednakże badania innych grup badawczych wskazują na to, że modyfikacja GO składnikami płynów ustrojowych może hamować wnikanie

GO do komórek. *Qi i współpracownicy* zbadali efekt modyfikacji GO przez składniki płynu płucnego na wnikanie do makrofagów J774A.1. Utleniony grafen był inkubowany w dwóch analogach naturalnego płynu płucnego: sztucznym płynie płucnym (ALF, ang. *artificial lung fluid*) oraz roztworze Gamble'a. Badanie wykazało częściową redukcję grup tlenowych pod wpływem obu roztworów. Ponadto inkubacja GO zarówno w ALF jak i w roztworze Gamble'a hamowała wnikanie GO do komórek. Utleniony grafen inkubowany z ALF uległ adsorpcji na błonie komórkowej. GO inkubowany z roztworem Gamble'a w ogóle nie wykazywał interakcji z komórkami. GO nie ulegający biotransformacji został zlokalizowany w cytoplazmie komórek³. Z kolei *Guarnieri i współpracownicy* zasymulowali biotransformację GO w sokach trawiennych. Badania zostały przeprowadzone na nowotworowej linii jelita grubego Caco-2. Zaobserwowano zahamowanie wchłaniania GO do komórek prawdopodobnie ze względu na agregację utlenionego grafenu w sokach trawiennych⁸⁷. *Hu i współpracownicy* zbadali zjawisko biotransformacji utlenionego grafenu w ludzkim osoczu pochodzącym od 102 donorów. Zaobserwowali zarówno zmiany w strukturze badanego materiału jak i adsorpcję komponentów osocza na płatkach GO. Zarówno GO inkubowany z surowicą jak i nieinkubowany z surowicą ludzką wniknął do komórek ludzkich zarodkowych fibroblastów płuc linii HELF. Nie udało się ilościowo porównać efektywności wnikania jednak zauważono, że biotransformacja ma znaczący wpływ na obniżenie cytotoksyczności GO⁸⁸.

Modyfikacja powierzchni utlenionego grafenu znacząco wpływa na przebieg procesu wnikania GO do komórek. Częsteczkami modyfikującymi mogą być polimery, białka oraz ligandy receptorów błonowych komórek. Szczególnym rodzajem modyfikacji GO jest ta zachodząca samorzutnie w płynach ustrojowych organizmu żywego. Składniki soków trawiennych, płynu płucnego lub osocza krwi mogą przyczyniać się do defektów węglowego szkieletu płatka GO lub ulegać adsorpcji na jego powierzchni. Dogłębna ocena modyfikacji GO zachodzących *in vivo* jest bardzo ważne w kontekście biomedycznych zastosowań GO jako nośnika leków, kwasów nukleinowych i czynników umożliwiających obrazowanie.

5. Podsumowanie

Utleniony grafen jest pochodną grafenu posiadającą grupy tlenowe. Dzięki jednoczesnej obecności tych grup oraz występowaniu domen hydrofobowych na powierzchni płatka, utleniony grafen może być modyfikowany kowalencyjnie i niekowalencyjnie. Dodatkowo posiada dużą powierzchnię właściwą. W rezultacie GO posiada potencjalne zastosowanie w medycynie. Do tej pory zaproponowano wiele nośników zaprojektowanych w oparciu o GO, które mogłyby zostać wykorzystane w chemioterapii, terapii genowej, terapii fotodynamicznej

oraz w terapiach kombinowanych. Kontrolowane uwalnianie leków z nośników GO uzyskuje się poprzez wykorzystanie różnic środowiskowych pomiędzy tkankami prawidłowymi i chorobowymi albo poprzez wykorzystanie zewnętrznego promieniowania lub pola magnetycznego działającego w miejscu występowania komórek chorobowych. Utleniony grafen zmodyfikowany czynnikami wrażliwymi na zmianę pH lubo podwyższone stężenie glutationu będzie efektywnie uwalniał lek tylko w środowisku nowotworowym. Inną strategią kontrolowanego uwalniania leków będzie modyfikacja GO ligandami wybranych receptorów. Niektóre komórki nowotworowe charakteryzują się zwiększoną liczbą receptorów kwasu foliowego (FA) lub hialuronowego (HA) na swojej powierzchni. Modyfikacja utlenionego grafenu cząsteczkami FA lub HA zwiększy efektywność dostarczania leków do komórek nowotworowych. Z kolei dołączenie do GO nanocząstek magnetycznych zwiększy akumulację nośnika i leku w miejscu poddanym działaniu pola magnetycznego. Zaproponowano również wykorzystanie GO jako nośnika fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej (PDT). Utleniony grafen można również zostać wykorzystany w nośnikach wykorzystujących podejście teranostyczne. Dołączenie do GO cząsteczki umożliwiającej obrazowanie oraz leku umożliwi jednoczesną detekcję zmiany chorobowej i uwalnianie leku do komórek chorobowych.

Pomimo, szerokiego potencjalnego zastosowania w medycynie, żaden z zaproponowanych nośników zaprojektowanych w oparciu o GO nie znalazł rzeczywistego zastosowania. Jest to wynikiem niewystarczającej wiedzy na temat biologicznych właściwości GO, w szczególności na temat procesu jego wnikania do komórek. Do tej pory przeprowadzono wiele badań w celu poznania tego procesu. Chociaż rezultaty tych badań nie są jednoznaczne uważa się, że głównym mechanizmem wnikania GO do komórek jest endocytoza. Wyszczególnia się różne rodzaje endocytozy: klatrynozależna endocytoza, endofilinozależna endocytoza, endocytozę niezależną od klatryny/zależną od GEEC, makropinocytozę oraz fagocytozę. Mechanizm oraz efektywność wnikania GO do komórek zależy od typu komórki. Dodatkowo na przebieg wnikania oraz jego efektywność mają wpływ wielkość płatków utlenionego grafenu oraz modyfikacja powierzchni GO. Wyniki większości badań świadczą o tym, że im mniejsze płatki, tym bardziej efektywne wnikanie GO do komórek. Wraz ze wzrostem wielkości płatków rośnie prawdopodobieństwo ich adhezji po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Efektywność wnikania GO do komórek można zmienić poprzez modyfikacje GO cząsteczkami, które zmieniają jego ładunek powierzchniowy, zapobiegają agregacji lub są ligandami receptorów odpowiedzialnych za procesy endocytozy. Cząsteczkami takimi są polimery, białka oraz cząsteczki takie jak kwas hialuronowy lub mannoza. Modyfikacja GO może również zachodzić pod wpływem czynników zawartych w płynach ustrojowych, takich jak płyn płucny, soki

trawienne i surowica krwi. W wyniku kontaktu ze składnikami płynów ustrojowych może dojść do powstawania defektów w strukturze płatka GO oraz adsorpcji cząsteczek na powierzchni płatka.

Pomimo wielu badań, które dostarczyły informacji na temat wnikania GO do komórek dalsze badania są wymagane w celu dogłębnego poznania tego procesu. Płatki utlenionego grafenu użyte do badań przez poszczególne grupy badawcze różnią się wielkością płatków, użytymi modyfikacjami płatków. W rezultacie dochodzi do sprzecznych wyników badań dotyczących wnikania GO do komórek. Ponadto należy włożyć jeszcze wiele pracy w poznanie wpływu samorzutnych modyfikacji GO w płynach ustrojowych na efektywność wnikania GO do komórek. Jest to szczególnie ważne w kontekście zastosowań utlenionego grafenu jako nośnika leków. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że wszystkie badania zostały przeprowadzone na monokulturach komórek hodowanych w postaci monowarstwy w makroskali. Jest to model komórkowy, który nie odwzorowuje warunków *in vivo*. W celu dogłębnego poznania natury oddziaływań GO-komórka istotne jest przeprowadzenie badań z wykorzystaniem modeli komórkowych wierniej odtwarzających środowisko organizmu żywego.

II. Część doświadczalna

1. Cel pracy

Grafen otrzymany w 2004 roku przez Andre Geim'a i Konstantina Novoselova wzbudził natychmiastowe zainteresowanie w wielu dziedzinach nauki⁸⁹⁻⁹¹. Utleniony grafen jest jedną z pochodnych grafenu, która charakteryzuje się obecnością grup tlenowych, m.in. grup hydroksylowych i karboksylowych, dołączonych do szkieletu węglowego. W porównaniu do grafenu, utleniony grafen wykazuje większą biokompatybilność i stabilność w roztworach wodnych. Ponadto, jest stosunkowo łatwy w funkcjonalizacji, zarówno kowalencyjnej jak i niekowalencyjnej⁵. Dzięki tym właściwościom utleniony grafen znalazł potencjalne zastosowanie w biologii i medycynie jako nośnik leków, czynnik wykorzystywany w obrazowaniu oraz terapiach przeciwnowotworowych². Jednym z najważniejszych etapów oddziaływań materiał-komórka jest proces internalizacji materiału do komórek. Bez dokładnej oceny tego zjawiska oraz wiedzy jakie parametry wpływają na jego przebieg, nie można projektować skutecznych nośników leków, czynników do obrazowania i terapii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem danego materiału. Niestety pomimo wielu badań, obecnie żaden nośnik leków ani terapia z użyciem utlenionego grafenu nie przeszła etapu badań przedklinicznych. Związane jest to m.in. z luką wiedzy dotyczącej zjawiska wnikania utlenionego grafenu do komórek. Trudności ze sformułowaniem jednoznacznych wniosków związane są z różnicami w fizykochemicznych właściwościach badanego GO oraz w różniących się warunkach przeprowadzanych badań. Ponadto, większość testów wykonywanych jest w warunkach standardowej hodowli *in vitro*, która nie uwzględnia specyfiki procesów zachodzących *in vivo*.

Celem niniejszej pracy, mającej charakter badań podstawowych, było pozyskanie wiedzy na temat wnikania utlenionego grafenu do komórek ssaczych. W wyniku badań oceniono efektywności wnikania utlenionego grafenu (GO) do komórek ssaczych w zależności od wielkości płatków GO, jego kontaktu z surowicą ludzką, typu komórki (komórki nabłonkowe/śródbłonkowe/fibroblasty, nowotworowe/prawidłowe) oraz rodzaju hodowli komórkowej (hodowla standardowa/mikrosystemy *Cell-on-a-chip*, hodowla statyczna/przepływowa). Wedle obecnej wiedzy literaturowej, w niniejszej pracy po raz pierwszy dokonano jednoczesnej oceny wpływu wymienionych wyżej parametrów na efektywność wnikania utlenionego grafenu do komórek ssaczych.

Niniejsza praca doktorska miała na celu znalezienie odpowiedzi na następujące pytania:

- Czy wielkość płatków utlenionego grafenu ma wpływ na efektywność jego wnikania do komórek ssaczych?
- Czy kontakt utlenionego grafenu z surowicą ma wpływ na jego efektywność wnikania do komórek ssaczych?
- Czy efektywność wnikania utlenionego grafenu do komórek ssaczych zależy od typu komórek?
- Jaka jest wewnątrzkomórkowa lokalizacja utlenionego grafenu po wniknięciu do komórek?

Ponadto, w ramach niniejszej pracy, dokonano pierwszej próby oceny wnikania utlenionego grafenu do komórek z użyciem modelu komórkowego opartego o technologię Cell-on-a-Chip. Uzyskane wyniki przyczyniły się do zdobycia informacji pomagających w lepszym zrozumieniu zjawiska internalizacji utlenionego grafenu do komórek ssaczych w warunkach bliższych warunkom *in vivo* niż standardowo wykorzystywane metody hodowli komórkowych.

2. Materiały i metody badań

2.1. Charakterystyka fizykochemiczna, frakcjonowanie oraz przygotowanie próbek

Aparatura

- Spektroskop Ramana (Nicolet Almega);
- Analizator elementarny CHNS (VARIO EL III);
- Spektroskop FTIR (Nicolet iS5);
- Analizator cząstek (Zetasizer Nano ZS);
- Skaningowy mikroskop elektronowy (Carl Zeiss Auriga 60);
- Wytrząsarka (Biosan);
- Wirówka Universal 320R (Hettich);
- Waga analityczna (Metler Toledo).

Odczynniki

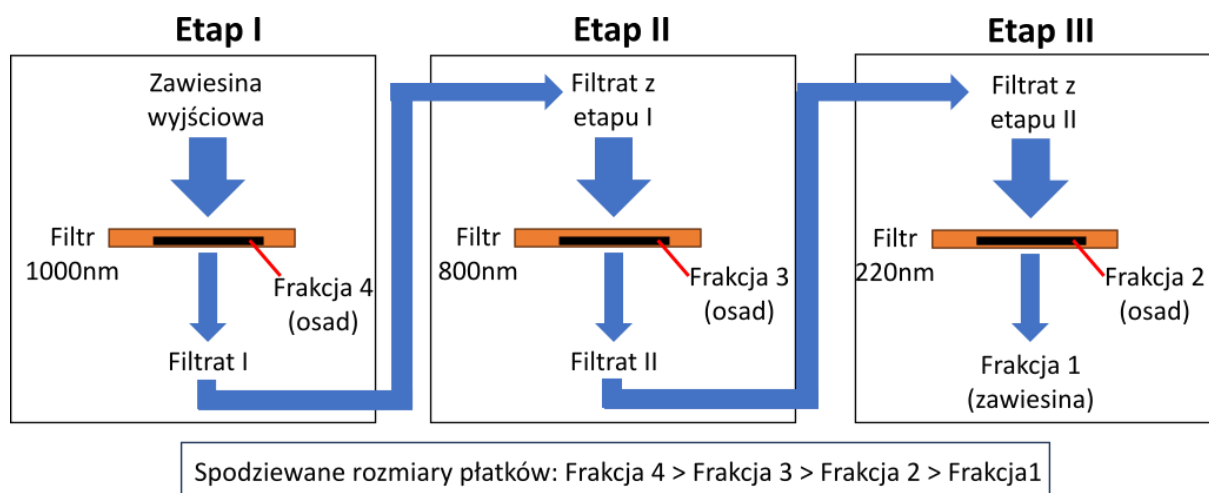
- Surowica ludzka (BIOWEST, ang. *Human Serum AB male*);
- Sterylna woda;
- Izotiocyanian fluoresceiny FITC (Sigma Aldrich);
- Poli(winylopirolidon) (PVP) (Sigma Aldrich).

Drobny sprzęt laboratoryjny

- Filtry strzykawkowe (Whatman, Filtrakon).

Fracjonowanie i przygotowanie próbek

Zawiesinę utlenionego grafenu uzyskano z Laboratorium Grafenowego, Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechniki Warszawskiej. Poszczególne frakcje, różniące się wymiarami płatków otrzymano na drodze filtracji. Zawiesinę początkową utlenionego grafenu o stężeniu ok. 5 mg/ml pobrano do strzykawki i przepuszczono przez filtr strzykawkowy zgodnie ze schematem (Ryc.18). Podczas etapu I zastosowano filtr o rozmiarach porów wynoszących 1000 nm. Osad odzyskano z filtra wymywając go sterylną wodą z zastosowaniem odwróconego przepływu i oznaczono jako frakcję 4 (GO4). Filtrat zebrano i filtrowano przez filtr 800 nm. Etapy II i III przeprowadzono w sposób analogiczny z wykorzystaniem filtrów o rozmiarach porów wynoszących 800 i 220 nm. Uzyskane osady oznaczono kolejno jako frakcja 3 (GO3) oraz frakcja 2 (GO2). Filtrat otrzymany w Etapie III oznaczono jako frakcję 1 (GO1). Wszystkie frakcje wirowano (9600 rpm, 0,5 h). Osady zważono i zawieszono w sterylnej wodzie doprowadzając zawiesinę każdej frakcji do stężenia 1 mg/ml. W celu poprawy stabilności próbek w roztworach wodnych, zmodyfikowano je niekwalencyjnie poli(winylopirolidonem) (PVP). Dodatkowo, próbki użyte w badaniach efektywności wnikania i lokalizacji wewnątrzkomórkowej, kwalencyjnie zmodyfikowano izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) ¹⁷.



Ryc. 18 Schemat procedury frakcjonowania zawiesiny utlenionego grafenu.

Określenie rozmiarów płatków dla poszczególnych frakcji

Potencjał zeta i rozkład wielkości cząstek poszczególnych frakcji GO zmierzono z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *dynamic light scattering*). DLS jest szybką i wygodną metodą do wstępnej oceny efektywności użytej metody frakcjonowania, jednak zaprojektowana jest z myślą o cząstkach sferycznych. W związku z tym przeprowadzono dodatkowe pomiary wielkości płatków z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM, ang. *scanning electron microscopy*). Otrzymano zdjęcia kilkudziesięciu płatków z każdej frakcji. Płatki zwymiarowano przy pomocy programu ImageJ. Wielkość poszczególnych płatków wyrażono jako długość największego wymiaru płatka.

Inkubacja z surowicą ludzką

Z frakcji GO2 i GO4 wydzielono próbki do inkubacji z komercyjnie dostępną ludzką surowicą krwi. W tym celu każdą próbkę utlenionego grafenu zmieszano z 4-krotnym nadmiarem surowicy krwi⁸⁷. Próbki umieszczono na wytrząsarce bez dostępu do światła i inkubowano przez 6 dni. Następnie, zawiesinę odwirowano (9500 rpm, 0,5 h). Osad zawieszono w sterylnej wodzie, doprowadzając zawiesinę każdej frakcji do stężenia 1 mg/ml. Otrzymane próbki oznaczono odpowiednio GO2B i GO4B. Dodatkowo, identyczną procedurę zastosowano dla wyjściowej mieszaniny utlenionego grafenu. Ta próbka została wykorzystana do fizykochemicznej charakterystyki badanego materiału inkubowanego z ludzką surowicą.

Charakterystyka fizykochemiczna

Zawiesinę wyjściową inkubowaną i nieinkubowaną z ludzką surowicą scharakteryzowano z wykorzystaniem spektroskopii FTIR, spektroskopii Ramana oraz analizy elementarnej.

2.2. Hodowla komórkowa

Linie komórkowe

- A549 – ludzka linia komórkowa gruczolakoraka płuc (*American Type Culture Collection, ATCC*);
- LL-24– ludzkie fibroblasty wyizolowane z tkanki płucnej (*American Type Culture Collection, ATCC*);
- HUVEC – ludzka linia komórkowa nabłonka żyły pępowinowej (Lonza, Szwajcaria);

Aparatura

- Inkubator HERA-Cell 150 (Thermo Scientific);
- Wirówka Universal 320R (Hettich);
- Komora laminarna Lamil 10 (Karstulan Metalli OY);
- Mikroskop odwrócony (Olympus IX 71).
- Pompa perystaltyczna (Ismatec)

Drobny sprzęt laboratoryjny

- Płytki do liczenia gęstości zawiesiny komórkowej z komorą Thoma (Brand);
- Butelki do hodowli komórkowej (Sarstedt);
- Płytki wielodołkowe (Grainer);
- Pipety serologiczne, pipety Pasteura, falkony, ependorfy (Nest).

Odczynniki

- Buforowana sól fizjologiczna (PBS) (Sigma Aldrich);
- TrypleExpress™ (Life Technologies);
- Podstawowe medium hodowlane – McCoy's 5a (Sigma Aldrich);
- Podstawowe medium hodowlane – (DMEM, ang. *Dulbecco Essential Medium Eagle*), (Sigma Aldrich);
- Podstawowe medium hodowlane – EGM-2, (ang. *Endothelial Cell Growth Medium*) (Promocell);

- Suplement do medium EGM-2 (Promocell);
- Płodowa surowica bydlęca, FBS, ang. *Fetal Bovine Serum* (Gibco);
- Penicylina/Streptomycyna (Sigma Aldrich);
- L-glutamina (Sigma Aldrich).

Rutynowa hodowla komórkowa

Składy mediów hodowlanych dla poszczególnych linii:

- Medium hodowlane komórek A549: 88%_{v/v} DMEM, 10%_{v/v} FBS, 1%_{v/v} antybiotyki – Penicylina i Streptomycyna, 1%_{v/v} L-glutamina (Sigma Aldrich);
- Medium hodowlane komórek LL-24: 84%_{v/v} McCoy's 5a, 15%_{v/v} FBS, 1%_{v/v} antybiotyki – Penicylina i Streptomycyna;
- Medium hodowlane komórek HUVEC: EGM-2, 1 fiołka suplementu dostarczana przez producenta;

Objętości podane w protokole dotyczą hodowli w butelce o powierzchni wzrostu 25 cm². Komórki pasażowano po przekroczeniu 70% konfluencji. W tym celu, z butelki hodowlanej usuwano zużyte medium. Komórki przemywano roztworem PBS (1X). Następnie, do butelki hodowlanej dodawano 1 ml roztworu TrypleExpress™. Komórki inkubowano w inkubatorze (37°C, 5% CO₂), monitorując stopień odklejenia komórek przy pomocy mikroskopu optycznego. W zależności od linii komórkowej pełne odklejenie komórek trwało od 3-15 min. Następnie, w celu neutralizacji działania TrypleExpress™, do butelki dodawano 2 ml świeżego medium. Połowę zawiesiny komórkowej przenoszono do nowej butelki hodowlanej i uzupełniano ok. 5 ml świeżego medium. Drugą połowę, wykorzystywano do testów (opis poniżej) lub bankowano.

Wysiewanie komórek na płytki testowej

Zawiesinę komórkową otrzymaną w trakcie rutynowego pasażu przenoszono do probówki typu falkon (15 ml) i wirowano przy następujących parametrach:

- 2000 rpm, 3 min dla komórek A549
- 1000 rpm, 5 min dla komórek HUVEC i LL-24.

Następnie, supernatant znad komórek zlewano a otrzymany pelet zawieszano w 1 ml świeżego medium. Gęstość komórek określano przy pomocy komory Thoma. Zawiesinę komórek rozcieńczano do osiągnięcia gęstości 10⁵ komórek/ml. Następnie, zawiesinę komórek o

gęstości 10^5 komórek/ml wysiewano w zależności od przeprowadzanego testu na płytkę 96-dołkową, płytkę 24-dołkową lub szalkę hodowlaną do obserwacji komórek przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

Wprowadzanie komórek do mikroukładu

Zawiesinę komórkową o gęstości 10^5 komórek/ml wprowadzano do mikroukładu za pomocą pompy perystaltycznej ($10\ \mu\text{l}/\text{min}$). Medium w mikroukładzie wymieniano po upływie 24 h, przy prędkości przepływu wynoszącym $4\ \mu\text{l}/\text{min}$. Wprowadzanie komórek oraz morfologia komórek była monitorowana przy pomocy odwróconego mikroskopu.

2.3. Otrzymywanie mikroukładów przepływowych

Aparatura

- Drukarka 3D (DLP, Flashforge Hunter 3D Printer);
- Lampa UV (Anycubic);
- Waga techniczna (RADWAG);
- Waga analityczna (Metler Toledo);
- Eksykator z pompą próżniową (Kartell);
- Suszarka laboratoryjna (Binder);
- Plazma tlenowa (Diener Electronics);
- Pompa perystaltyczna (Ismatec).

Drobny sprzęt laboratoryjny

- Szkiełka mikroskopowe 0,13 mm (Ultramedic);
- Opakowania do sterylizacji (Medal SC);
- Sztance biopsyjne o średnicy 1mm (KAI Biopsy Punch Miltex);
- Wężyki Tygon R3607 o średnicy wewnętrznej 0,19 mm i grubości ścianki 0,91 mm (Ismatec).

Odczynniki

- Żywica do druku 3D (Funtodo, Deep Black);
- Poli(dimetylosiloksan), PDMS, Sylgrad 184 (Dow Corning);
- Alkohol etylowy (POCh);
- Izopropanol (POCh);
- Dopamina (Sigma Aldrich);
- Bufor Tris-HCl (Sigma Aldrich)

Wykonanie mikroukładu

Matrycę mikroukładu wykonano za pomocą druku 3D techniką DLP. Projekt pieczętki został wykonany w programie AutoCad a następnie przekonwertowany na plik kompatybilny z drukarką 3D. Wysokość warstw wynosiła 50 μm a czas naświetlania warstwy 2 s. Po wydrukowaniu pieczętka została przemyta kilkakrotnie izopropanolem, utwardzona przy pomocy lampy UV (25W, 30 min) oraz pozostawiona do całkowitego wysuszenia i dodatkowego utwardzenia (60°C, 24 h). Mikroukład składał się z dwóch części, górnej - płytki wykonanej w poli(dimetylosiloksanie) (PDMS) oraz dolnej, którą stanowiło szkiełko mikroskopowe. Górną, polimerową płytkę zawierającą odwzorowane z matrycy mikrostruktury, wykonano metodą odlewu. W tym celu, zmieszano pre-polimer z czynnikiem sieciującym w stosunku 10:1. Tak przygotowany PDMS wymieszano i odgazowano, z wykorzystaniem eksykatora połączonego z pompą próżniową. Następnie, płynny pre-polimer wylano na uprzednio przygotowaną pieczętkę i wstawiono do suszarki laboratoryjnej w celu usieciowania (60°C, 1,5 h). W usieciowanej płytce wykonano otwory wlotowe i wylotowe przy pomocy sztancy biopsyjnej o średnicy 1 mm. Tak przygotowaną płytkę polimerową i szkiełko mikroskopowe odtłuszczono, przemyto izopropanolem i trwale połączono przy użyciu plazmy tlenowej (160 W, 23 s).

Przygotowanie mikroukładu do badań

Mikroukłady sterylizowano (125°C, 1 h). Po sterylizacji do mikroukładów podłączono wężyki uprzednio wysterylizowane w alkoholu etylowym i przemyte sterylną wodą. Powierzchnię mikrokanalów gotowego mikroukładu zmodyfikowano w celu zwiększenia przyczepności komórek. W tym celu do mikroukładu wprowadzono roztwór polidopaminy w buforze Tris-HCl (pH 8,5) (2 mg/ml) i inkubowano ok. 1 h. Następnie, mikroukład przemyto wodą. Do tak przygotowanego mikroukładu wprowadzono komórki.

2.4. Badanie cytotoksyczności utlenionego grafenu

Aparatura

- Czytnik płytek wielodołkowych; CYTATION 3 (Biotek);
- Odwrócony mikroskop fluorescencyjny (Olympus IX71);
- Myjka ultradźwiękowa (Elmasonic).

Odczynniki

- Zawiesiny badanych frakcji utlenionego grafenu (GO₂, GO₄ oraz ich odpowiedniki inkubowane w surowicy) o stężeniu 1 mg/ml;
- AlamarBlue®, (AbD Serotec);
- Kalceina-AM, (CAM *ang. Calcein-AM*) (Sigma Aldrich);
- Jodek propidyny, (PI, *ang. Propidium iodide solution*) (Sigma Aldrich);
- NucBlue® Live reagent (ThermoFisher);
- NucGreen® Dead reagent (ThermoFisher).

Określanie aktywności metabolicznej

Do określenia aktywności metabolicznej komórek wykorzystano test alamarBlue®, który wykorzystuje zdolność żywych komórek do przekształcania rezazuryny do rezorufiny. W odróżnieniu od rezazuryny, rezorufina wykazuje właściwości fluorescencyjne. Intensywność fluorescencji rezazuryny jest miarą aktywności metabolicznej komórek.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem standardowych technik hodowli. Zawiesiny komórek linii A549, HUVEC i LL-24 o gęstości 10⁵ komórek/ml wysiano na płytkę 96-dółkową. Objętość wszystkich roztworów podawanych na jeden dołek płytki wynosiła 100 µl. Po 24 h od wysiania oceniono wyjściową aktywność metaboliczną komórek. W tym celu, sporządzono 10% roztwór alamarBlue® w medium hodowlanym. Otrzymany roztwór podano komórkom po uprzednim odciągnięciu zużytego medium z dołków. Następnie, płytkę z komórkami inkubowano (37°C, 5% CO₂). Po upływie 30 min oceniono intensywność fluorescencji z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych (długość fali wzbudzenia: 552 nm, długość fali emitowanej: 583 nm). Następnie, sporządzono roztwory frakcji GO, o stężeniach 50 i 100 µg/ml, w mediach hodowlanych. Niezmodyfikowany utleniony grafen wykazuje tendencję do agregacji, co w rezultacie ma negatywny wpływ na żywotność i proliferację komórek. W celu zapobiegnięcia agregacji płatków GO, badane próbki zmodyfikowano z wykorzystaniem PVP oraz poddano działaniu ultradźwięków. Roztwór

alamarBlue® został odciągnięty z nad komórek i zastąpiony zawiesinami próbek utlenionego grafenu. Próbę kontrolną stanowiły komórki, do których zamiast zawiesiny utlenionego grafenu dodano świeże medium hodowlane. Następnie, komórki były inkubowane w świeżym medium hodowlanym przez 48 h (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie medium we wszystkich dołkach zostało wymienione na świeże i ponownie oceniono aktywność metaboliczną komórek z wykorzystaniem testu alamarBlue®. Po przeprowadzonej analizie roztwór alamarBlue® z nad komórek został wymieniony na świeże medium hodowlane. Pomiar aktywności metabolicznej powtórzono po kolejnych 24 h. Intensywność fluorescencji komórek przedstawiono jako średnią z minimum 3 pomiarów. Wpływ badanego materiału na aktywność metaboliczną komórek oceniano poprzez porównanie intensywności fluorescencji próbki do intensywności fluorescencji kontroli mierzonych tego samego dnia.

Ocena żywotności komórek

W celu oceny żywotności komórek A549 i LL-24 wykorzystano barwienie różnicowe estrem kalceiny (CAM) oraz jodkiem propidyny (PI). Ester kalceiny ulega hydrolizie w cytoplazmie żywych komórek. W wyniku tej reakcji powstaje emitująca zielony sygnał fluorescencji kalceina (długość fali wzbudzenia: 490 nm, długość fali emitowanej: 515 nm). Jodek propidyny wnika jedynie przez uszkodzone błony martwych komórek. W wyniku interkalacji z DNA w jądrze komórkowym jodek propidyny emituje czerwony sygnał fluorescencji (długość fali wzbudzenia: 535 nm, długość fali emitowanej: 617 nm). Roztwór wykorzystany w barwieniu komórek zawierał ester kalceiny w stężeniu 1 µg/ml i jodek propidyny w stężeniu 4 µg/ml. Do oceny żywotności komórek linii HUVEC wykorzystano barwniki NucBlue® Live oraz NucGreen® Dead. NucBlue® jest przepuszczalny dla błon komórkowych i barwi na niebiesko jądra wszystkich komórek (długość fali wzbudzenia: 360 nm, długość fali emitowanej: 460 nm). NucGreen® jest nieprzepuszczalny dla błon komórkowych i barwi na zielono jedynie jądra komórek martwych (długość fali wzbudzenia: 504 nm, długość fali emitowanej: 523 nm). Roztwór wykorzystany w barwieniu komórek zawierał po 1 kropli (opakowania barwników firmowo zaopatrzone były w wkraplacz) obu barwników na 1 ml medium. Komórki inkubowano z zawiesiną próbek GO o stężeniu 100 µg/ml w sposób analogiczny do procedury testu aktywności metabolicznej. Po 48 h inkubacji medium wymieniono na świeże. Po kolejnych 24 h medium z nad komórek wymieniono na roztwory barwników i inkubowano przez 15 min. Oceny żywotności dokonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX71.

2.5. Badanie wnikania utlenionego grafenu do komórek

Aparatura

- Cytometr przepływowy (CytoFlex).

Drobny sprzęt laboratoryjny

- Wortexs (Labnet);
- Probówki do pomiarów cytometrycznych (CytoFlex).

Odczynniki

- Polistyrenowe kulki do kalibracji cytometru (CytoFlex);
- TrypanBlue (Sigma Aldrich);
- Frakcje utlenionego grafenu wyznakowane FITC (GO2, GO4 oraz ich odpowiedniki inkubowane w surowicy: GO2B i GO4B).

Określenie efektywności wnikania utlenionego grafenu do komórek

Wszystkie czynności wykonywano przy ograniczonym dostępie światła. Komórki linii A549, LL-24 i HUVEC wysiano na płytki 24-dołkowe. W tym celu do każdego dołka dodano 1 ml zawiesiny komórek o stężeniu 10^5 komórek/ml. Po 24 h do komórek dodano zawiesiny frakcji GO o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Komórki inkubowano z frakcjami utlenionego grafenu przez 1 lub 48 h (37°C , 5% CO_2). Po upływie czasu inkubacji odciągnięto zawiesiny badanych próbek, komórki przepłukano roztworem PBS (1X) a następnie odklejono je przy pomocy roztworu TrypleExpress®. Po odklejeniu, komórki zawieszono w świeżym medium hodowlanym i odwirowano (2000 rpm, 3 min dla komórek A549 oraz 1000 rpm, 5 min dla komórek linii HUVEC i LL-24). Pelet zawieszono w roztworze PBS (1X) i odwirowano jeszcze raz. Pelet ponownie zawieszono w 1 ml świeżego medium hodowlanego. Do tak przygotowanych próbek dodano TrypanBlue, tak by jego stężenie końcowe wynosiło 0,4 %. Dodatek tego odczynnika hamuje fluorescencję powierzchniową. Dzięki temu sygnał odczytywany z cytometru pochodzi jedynie od utlenionego grafenu wyznaczonego FITC, który wniknął do komórek ⁹². W analogiczny sposób przygotowano również próbki nie zawierające odczynnika TrypanBlue w celu sprawdzenia sygnału pochodzącego jednocześnie z wnętrza i powierzchni komórek. Gęstość komórek wynosiła ok. 10^5 komórek/ml. Próbkę podano do uprzednio skalibrowanego cytometru w celu zmierzenia intensywności sygnału pochodzącego od FITC dołączonego do płatków utlenionego grafenu zlokalizowanych w komórce. Im więcej płatków wniknęło do komórki, tym większa intensywność fluorescencji FITC. Intensywność fluorescencji

pochoǳącej z komórek inkubowanych z frakcjami GO porównano do intensywności fluorescencji kontroli (komórek nieinkubowanych z frakcjami GO). Efektywność wnikania wyrażono jako stosunek intensywności sygnału pochoǳącego z komórek inkubowanych z GO do intensywności sygnału pochoǳącego z kontroli.

2.6. Badanie lokalizacji utlenionego grafenu w komórkach

Aparatura

- Mikroskop konfokalny (Flouview FV10i).

Drobny sprzęt laboratoryjny

- Szalki czterodzielne do obserwacji mikroskopowych (Greiner).

Odczynniki

- Frakcje utlenionego grafenu wyznakowane FITC (GO2, GO4 oraz ich odpowiedniki inkubowane w surowicy: GO2B i GO4B);
- Hoechst 33258 (Invitrogen);
- Koniugat AlexaFluor™633-Falloidyna (Invitrogen);
- BioTracker™ 400 Blue Cytoplasmic Membrane Dye (Sigma Aldrich) - barwnik;
- BioTracker™ 400 Blue Cytoplasmic Membrane Dye (Sigma Aldrich) - bufor;
- 4% roztwór paraformaldehydu (Sigma Aldrich);
- Buforowana sól fizjologiczna (PBS, ang. Phosphate Buffered Saline) (Sigma Aldrich);
- 0,1% roztwór Triton X-100 w PBS (Sigma Aldrich);
- 1% roztwór albuminy surowicy bydlęcej (BSA, ang. Bovine Serum Albumin) (Sigma Aldrich).

Lokalizacja wewnątrzkomórkowa – hodowla standardowa

Zawiesiny komórek linii A549, LL-24 i HUVEC o gęstości 10^5 komórek/ml zostały wysiane na czterodzielne szalki testowe z dnem umożliwiającym obserwację mikroskopową. Do komórek dodano zawiesiny GO2, GO2B, GO4 oraz GO4B o stężeniu 50 µg/ml. Próbkę inkubowano z komórkami przez 1 lub 48 h. Po tym czasie komórki wybarwiano według dwóch różnych protokołów.

Pierwszy z protokołów obejmował utrwalenie komórek i wybarwienie ich barwnikiem Hoechst 33258 oraz koniugatem AlexaFluor™633-Falloidyna. Hoechst 33258 łączy się z DNA w jądrze komórkowym dając niebieski sygnał fluorescencji (długość fali wzbudzenia 352 nm,

długość fali emisji 449 nm). Koniugat AlexaFluor™633-Falloidyna łączy się z F-aktyną obecną w cytoszkielecie komórek wybarwiając go na czerwono (długość fali wzbudzenia 650 nm, długość fali emisji 668 nm). Wszystkie czynności wykonywano przy ograniczonym dostępie światła. Komórki przepłukano roztworem PBS (1X) a następnie inkubowano z 4% roztworem paraformaldehydu przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu, komórki ponownie przepłukano roztworem PBS (1X) i inkubowano z 0,1 % roztworem Triton X-100 przez 20 min. Po ponownym przepłukaniu komórek roztworem PBS (1X) do szalki dodano 1% roztwór surowicy bydlęcej (BSA) i inkubowano przez 1 h. Po upływie tego czasu komórki inkubowano przez 1 h z roztworem koniugatu AlexaFluor™633-Falloidyna, który został uprzednio przygotowany przez zmieszanie barwnika i roztworu 1% BSA w stosunku 1:400_{v/v}. Następnie, komórki przepłukano roztworem PBS (1X) i inkubowano przez 10 min z roztworem Hoechst 33258, który został uprzednio przygotowany przez zmieszanie barwnika i 1% roztworu BSA w stosunku 1:100_{v/v}. Po upływie tego czasu, komórki przepłukano PBS (1X) i dodano do nich świeży roztwór PBS (1X). Tak przygotowaną próbkę wykorzystano do obserwacji mikroskopowej.

Drugi protokół obejmował wybarwienie komórek inkubowanych z frakcjami GO barwnikiem BioTracker™ 400 Blue Cytoplasmic Membrane Dye. Barwnik ten łączy się ze wszystkimi strukturami błonowymi w komórce emitując niebieski sygnał fluorescencji (długość fali wzbudzenia 366 nm, długość fali emisji 441 nm). Wszystkie czynności wykonywano przy ograniczonym dostępie światła. Sporządzono roztwór barwnika poprzez zmieszanie roztworu barwnika z roztworem buforu i zawieszenie go w medium hodowlanym. Na 1 ml medium hodowlanego przypada 10 µl roztworu barwnika i buforu zmieszanych w stosunku 1:1_{v/v}. Tak przygotowany roztwór dodano do komórek i inkubowano (37°C, 5% CO₂) przez 20 min. Po upływie tego czasu, próbkę przepłukano roztworem PBS (1X), dodano do niej medium hodowlane i inkubowano przez kolejne 5 min. Etap ten powtarzano 2-krotnie. Następnie, do komórek dodano świeże medium hodowlane i przeprowadzono obserwację mikroskopową.

W wyniku obserwacji mikroskopowej otrzymano zdjęcia w trybie 2D i 3D, tzw. „Z-stack”. Ponadto, przeprowadzono ilościową analizę intensywności sygnału pochodzącego od zinternalizowanych materiałów grafenowych z wykorzystaniem programu ImageJ. W tym celu, uzyskane z mikroskopu konfokalnego obrazy zapisano w formacie „.tiff”, obrysowano kontury komórek i zmierzono intensywność sygnału za pomocą funkcji „measure”. Dla każdego rodzaju próbki końcowy wynik jest średnią z co najmniej kilku obrazów komórek.

Lokalizacja wewnątrzkomórkowa – hodowla w mikroukładzie przepływowym

Barwienie hodowli w mikroukładzie przepływowym wykonano jedynie za przy pomocy koniugatu AlexaFluor™633-Falloidyna oraz barwnika Hoechst 33258. Dodatkowo płatki frakcji GO4B zostały zmodyfikowane FITC. Procedura barwienia była podobna z procedurą barwienia komórek w makroskali. Wszystkie odczynniki wprowadzano do mikroukładów za pomocą pompy perystaltycznej (4 µl/min, 15 min).

Wykonano badanie lokalizacji wewnątrzkomórkowej utlenionego grafenu dla czasu inkubacji wynoszącego 1 h. Podczas tego badania frakcja utlenionego grafenu GO4B była dostarczana do komórek w sposób ciągły za pomocą pompy perystaltycznej i wężyków przyłączonych do mikroukładu (4 µl/min). Badania przeprowadzono na monokulturach linii A549, HUVEC i LL-24 jedynie dla GO4B o stężeniu 50 µg/ml.

Badanie lokalizacji wewnątrzkomórkowej utlenionego grafenu przeprowadzono również dla czasu inkubacji 48 h. W tym przypadku frakcja GO4B również została wprowadzona do mikroukładu za pomocą pompy perystaltycznej. Jednak w tym przypadku, po wprowadzeniu zawiesiny do mikroukładu przepływ zawiesiny GO4B został zatrzymany. Inkubacja płatków GO4B z komórkami nie odbywał się w warunkach przepływowych. Również w tym przypadku badanie przeprowadzono jedynie dla zawiesiny frakcji GO4B o stężeniu 50 µg/ml. Jednak w tym przypadku oprócz monokultur wykorzystano również kokultury linii A549, HUVEC i LL-24 (HUVEC/LL-24, HUVEC/A549 i A549/LL-24).

2.7. Badanie prawdopodobnego mechanizmu wnikania utlenionego grafenu do komórek

Aparatura

- Cytometr (CytoFlex);
- Czytnik płytek wielodołkowych; CYTATION 3 (Biotek).

Odczynniki

- Chloropromazyna (Sigma Aldrich) – inhibitor endocytozy z wyjątkiem fago- i makropinocytozy;
- Chlorochinon (Sigma Aldrich) – inhibitor klatrynozależnej endocytozy;
- Dynasor (Sigma Aldrich) – inhibitor mechanizmu wnikania zależnego od dynaminy;
- 7-ketocholesterol (Avanti) – inhibitor szlaków niezależnych od klatryny i dynaminy;
- 2-deoksyglukoza (Sigma Aldrich) – inhibitor transportu aktywnego;
- alamarBlue®, (AbD Serotec).

Badanie aktywności metabolicznej

W celu określenia wpływu inhibitorów szlaków endocytozy na aktywność metaboliczną komórek przeprowadzono test alamarBlue® według procedury opisanej w rozdziale 2.4. Czas inkubacji próbek z inhibitorami wynosił 1 lub 48 h. Test przeprowadzono dla następujących stężeń inhibitorów:

- chloropromazyna: 20, 10⁷⁷, 5 µg/ml,
- chlorochina: 128, 64⁹³, 32 µg/ml,
- dynasore: 160, 80⁹⁴, 40 µg/ml,
- 7-ketocholesterol: 24, 12⁹⁵, 6 µg/ml,
- 2-deoksyglukoza: 16, 8⁷⁷, 4 mg/ml.

Środkowe wartości stężeń zostały wybrane na podstawie doniesień literaturowych.

Badanie wpływu inhibitorów na efektywność wnikania utlenionego grafenu do komórek

Badania przeprowadzono analogicznie do cytometrycznych badań efektywności wnikania. Próbką kontrolną były komórki inkubowane z badanymi frakcjami utlenionego grafenu (GO2, GO2B, GO4, GO4B) o stężeniu 50 µg/ml inkubowanych przez 1 h. Próbami badawczymi były komórki inkubowane przez 1 h z frakcjami GO oraz inhibitorami poszczególnych szlaków wnikania o następujących stężeniach:

- chloropromazyna: 20, µg/ml,
- chlorochina: 128, µg/ml,
- dynasore: 160, µg/ml,
- 7-ketocholesterol: 24 µg/ml,
- 2-deoksyglukoza: 16 mg/ml.

Stężenia dobrano na podstawie testów cytotoksyczności przeprowadzonych dla inhibitorów na komórkach linii A549, LL-24 i HUVEC. Zmierzono intensywność sygnału pochodzącego z komórek inkubowanych z inhibitorami endocytozy oraz frakcjami GO (GO2, GO2B, GO4 i GO4B z dołączonym FITC). Następnie porównano intensywność sygnału próbek badawczych do intensywności kontroli. Obniżenie sygnału w próbce z inhibitorem oznaczało zahamowanie wnikania GO do komórek. Zahamowanie wnikania GO do komórek przez dany inhibitor oznaczało, że szlak hamowany przez ten inhibitor bierze udział w procesie wnikania GO do komórek.

3. Wyniki

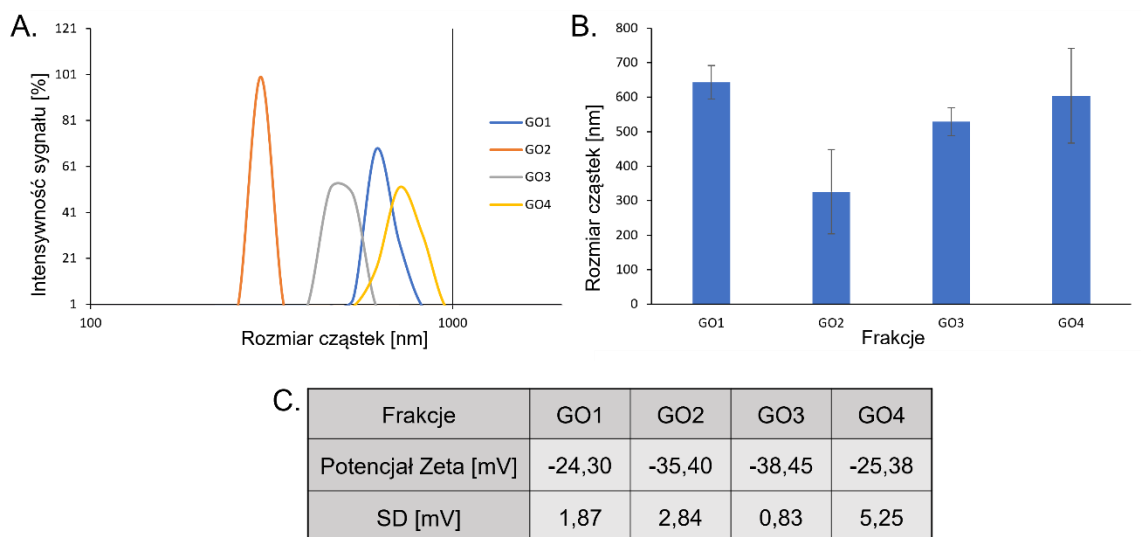
3.1. Charakterystyka utlenionego grafenu

Pierwszym etapem badań było ustalenie wielkości płatków dla każdej z otrzymanych frakcji GO. Ponadto, oceniono w jaki sposób inkubacja z ludzką surowicą wpłynęła na strukturę płatka GO. Wielkość płatków i tym samym skuteczność frakcjonowania sprawdzono z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz mikroskopii elektronowej (SEM). Badania struktury płatków GO zrealizowano za pomocą spektroskopii Ramana, spektroskopii FTIR oraz analizy elementarnej.

3.1.1. Ocena wielkości płatków utlenionego grafenu

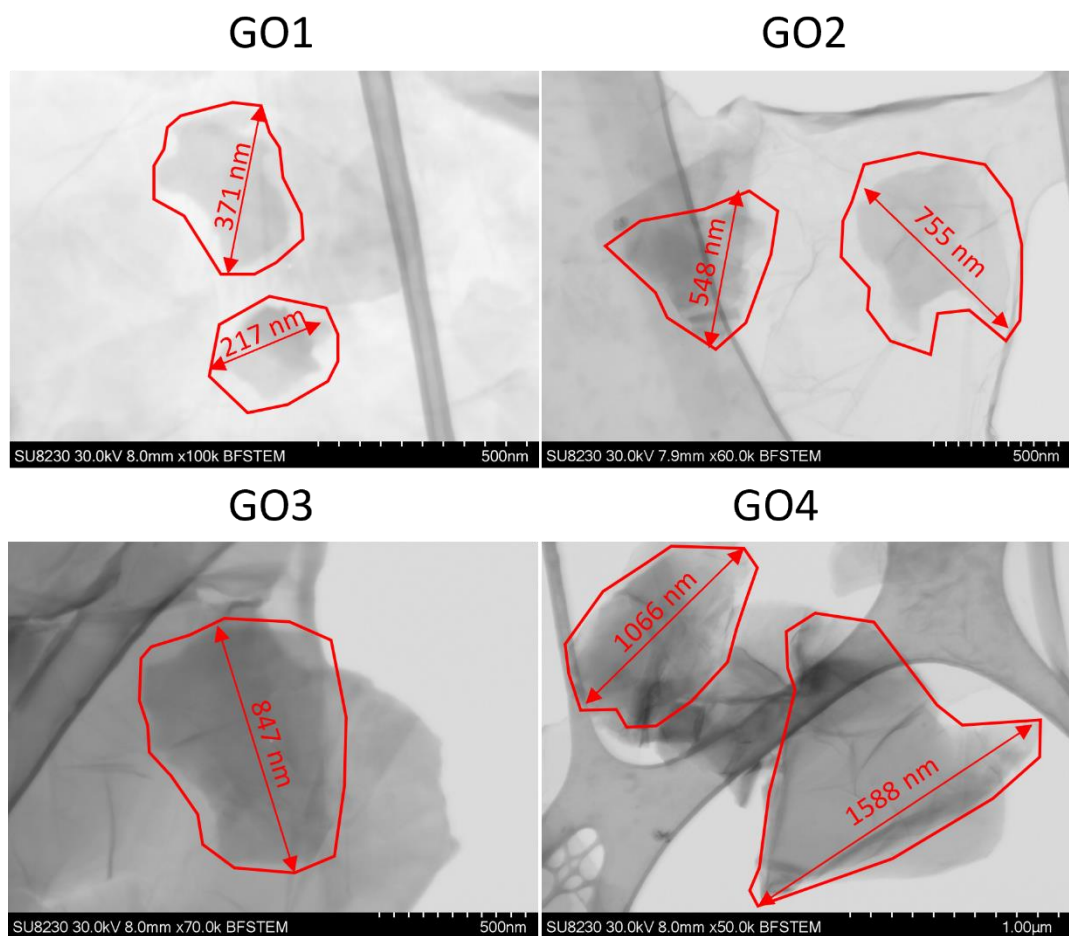
Wyjściową zawiesinę utlenionego grafenu podzielono z wykorzystaniem metody filtracji, na cztery frakcje, które z założenia powinny różnić się między sobą średnią wielkością płatków GO. Do frakcjonowania wyjściowej zawiesiny utlenionego grafenu użyto filtrów strzykawkowych o 3 różnych rozmiarach porów: 220, 800 i 1000 nm. Spodziewano się otrzymać frakcje utlenionego grafenu o rozmiarach płatków <220 nm (GO1), 220-800 nm (GO2), 800-1000 nm (GO3) oraz frakcję o rozmiarach płatków powyżej 1000 nm (GO4).

Określono rozkład wielkości cząstek GO dla poszczególnych frakcji (Ryc. 19). Zakres wielkości płatków dla poszczególnych frakcji określony za pomocą techniki DLS wynosił odpowiednio 642 $\pm$ 48 nm dla frakcji GO1, 325 $\pm$ 122 nm dla frakcji GO2, 529 $\pm$ 40 nm dla frakcji GO3 oraz 603 $\pm$ 137 nm dla frakcji GO4. Przedział rozmiarów cząstek dla frakcji GO2 nie pokrywał się z przedziałami żadnej innej frakcji (Ryc. 19 A). Frakcje GO1, GO3 i GO4 charakteryzowały się niższym stopniem rozdziału, jednak frakcja GO4 miała wyraźnie największe płatki (Ryc. 19 B). Frakcjami najbardziej różniącymi się pod względem wielkości płatków były GO2 i GO4. Wyniki badań DLS stoją w sprzeczności ze spodziewanymi rozmiarami płatków. Teoretycznie najmniejszym rozmiarem płatków powinna charakteryzować się frakcja GO1 jednak płatki tej frakcji są większe niż w przypadku frakcji GO2. Być może wynika to z faktu, że frakcja GO1 jako jedyna była zbierana od razu w formie filtratu, bez potrzeby odzyskiwania osadu z filtra. Dodatkowo, zmierzono potencjał zeta dla każdej frakcji (Ryc. 19 C). We wszystkich przypadkach otrzymano wartości ujemne, co było spodziewanym wynikiem w przypadku materiału posiadającego tlenowe grupy funkcyjne. Dzięki posiadaniu ładunku powierzchniowego otrzymane frakcje były stabilne w wodzie.



Ryc. 19 A) Dystrybucja wielkości cząstek (oś X w skali logarytmicznej). B) Wykres z uśrednionymi wartościami wielkości. C) Wartości potencjałów zeta dla badanych próbek.

W celu dokładniejszego zdefiniowania wielkości płatków GO wykonano zdjęcia przy pomocy mikroskopu elektronowego (SEM) (Ryc. 20). Wielkość płatka była wyrażona jako jego największy wymiar. Po uśrednieniu wyników wielkości płatków dla poszczególnych frakcji wynosiły odpowiednio: 559+/-374 nm dla GO1, 689+/-359 nm dla GO2, 883+/-534 nm dla GO3 oraz 1525+/-961 nm dla frakcji GO4. Rozmiary płatków w poszczególnych frakcjach charakteryzowały się dużym rozrzutem wyników. Jednak średnie wielkości płatków wskazują na różnice w rozkładzie wielkości płatków pomiędzy poszczególnymi frakcjami.



Ryc. 20 Przykładowe zdjęcia SEM dla każdej z otrzymanych frakcji badanego materiału wraz z obrysowanymi, wybranymi i zwymiarowanymi pojedynczymi płatkami utlenionego grafenu.

Pomyślnie dokonano rozdziału wyjściowej zawiesiny GO na frakcje różniące się średnim rozmiarem płatków. Rozmiary płatków określone na podstawie zdjęć SEM znacznie różniły się od rozmiarów płatków określonych na podstawie DLS (Tab.1). Wartości uzyskane za pomocą SEM lepiej odzwierciedlają rzeczywiste rozmiary płatków niż te zmierzone za pomocą DLS. Mimo dużego rozrzutu wyników, można stwierdzić, że frakcje GO1 i GO2 charakteryzowały się wyraźnie mniejszymi płatkami niż frakcja GO4. Ze względu na lepszą korelację ze spodziewanymi rozmiarami płatków oraz mniejszy rozrzut wyników do dalszych badań wytypowano frakcje GO2 i GO4 oraz ich inkubowane w surowicy odpowiedniki (GO2B i GO4B).

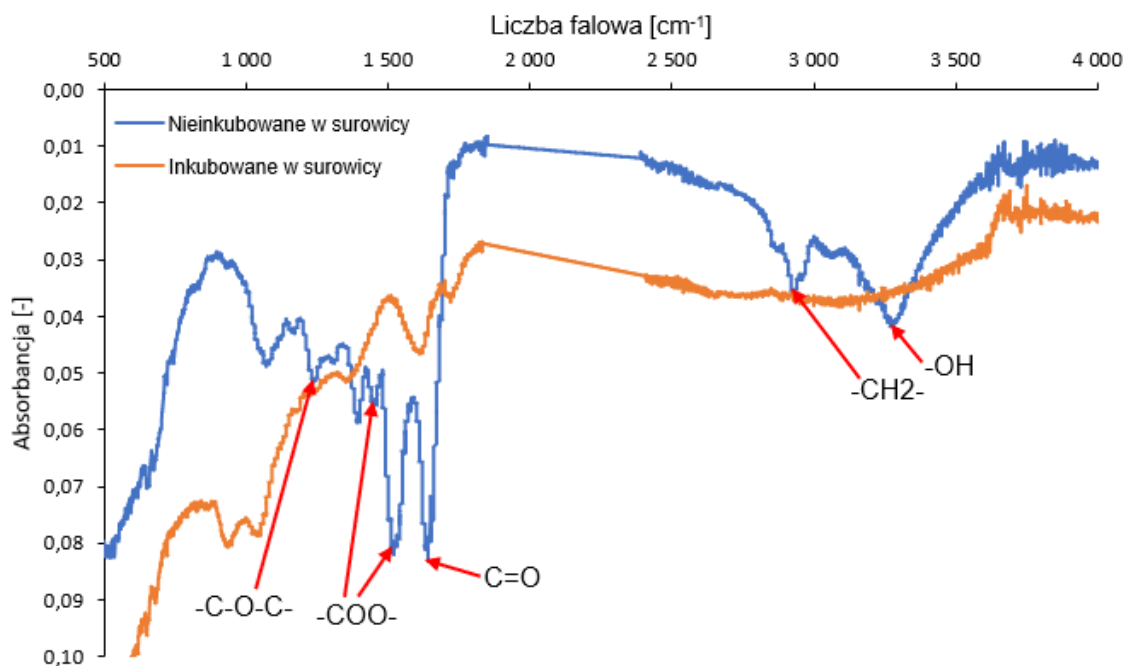
Tab. 1 Zestawienie wyników określania wielkości płatków otrzymanych frakcji utlenionego grafenu.

Próbka	Średni rozmiar [nm]		Spodziewany rozmiar płatków [nm]
	DLS	SEM	
GO1	642+/-48	559+/-374	<200
GO2	325+/-122	689+/-359	200-800
GO3	529+/-40	883+/-534	800-1000
GO4	603+/-137	1525+/-961	>1000

Obecnie nie ma zdefiniowanej jednej, optymalnej i standardowej metody frakcjonowania materiałów grafenowych. Zaproponowane w niniejszej pracy frakcjonowanie na drodze filtracji może prowadzić do niecałkowitego rozdziału frakcji. Płatek utlenionego grafenu w roztworze wodnym może ulegać zwijaniu i przechodzić przez pory, które teoretycznie powinny go zatrzymać. Niestety alternatywne metody takie jak wirowanie, nie przyniosły bardziej zadowalających rezultatów (wyniki nie uwzględnione w pracy). Standaryzacja i udoskonalanie metod frakcjonowania materiałów 2D takich jak pochodne grafenu nadal stanowi duże wyzwanie i perspektywę na przyszłość.

3.1.2. Charakterystyka grup funkcyjnych

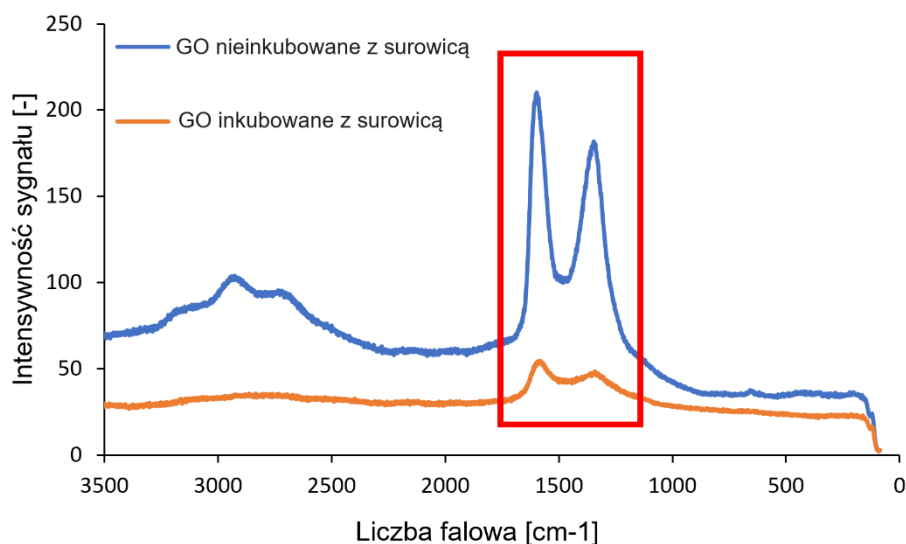
Spektroskopia FTIR umożliwiła określenie charakteru grup funkcyjnych występujących na powierzchni utlenionego grafenu. W przypadku widma FTIR utlenionego grafenu nieinkubowanego z surowicą zauważono sygnały odpowiadające poszczególnym grupom funkcyjnym: 3290 cm^{-1} (OH), 2930 cm^{-1} (CH₂), 1637 cm^{-1} (C=O), 1516 cm^{-1} i 1445 cm^{-1} (–COO–), 1236 cm^{-1} (C–O–C) (Ryc.21). Dzięki tym danym potwierdzono występowanie grup tlenowych na powierzchni utlenionego grafenu nieinkubowanego z surowicą. Analogicznych sygnałów nie zaobserwowano dla płatków utlenionego grafenu inkubowanych z ludzką surowicą. Odmienny kształt linii widma dla GO inkubowanego z ludzką surowicą może być spowodowany adsorpcją składników surowicy na powierzchni płatków utlenionego grafenu. Zanik sygnału pochodzącego od grup tlenowych może również być spowodowany redukcją tych grup, katalizowaną przez składniki surowicy. Otrzymane wyniki są w zgodzie z doniesieniami literaturowymi opisującymi oddziaływanie nanomateriałów z płynami ustrojowymi^{3,83,88}.



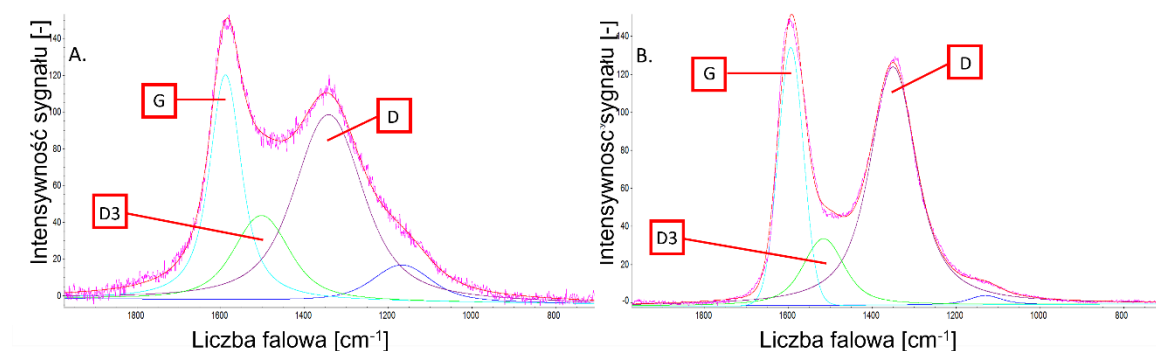
Ryc. 21 Widma FTIR dla utlenionego grafenu inkubowanego (kolor pomarańczowy) i nieinkubowanego z surowicą (kolor niebieski).

3.1.3. Ocena struktury i składu pierwiastkowego utlenionego grafenu

Spektroskopia Ramana umożliwia ocenę struktury szkieletu węglowego utlenionego grafenu. Wykazano, że stosunek intensywności sygnału pasma G (1590 cm^{-1}) do pasma D (1350 cm^{-1}) jest wyższy dla struktur bardziej krystalicznych. Odwrotna zależność występuje między krystalicznością struktury płátka GO a intensywnością pasma D3 (1500 cm^{-1}). Porównano widma utlenionego grafenu inkubowanego i nieinkubowanego z ludzką surowicą. Płatki GO, które nie były inkubowane z surowicą wykazywały dużo wyższe intensywności sygnału w przedziale widma odpowiadające pasmom G i D (Ryc. 22). Może to być spowodowane adsorpcją białek na powierzchni GO co potwierdzałoby wyniki spektroskopii FTIR. Następnie, dokonano dekonwolucji widm i określono intensywności pasm G i D oraz intensywność pasma D3 dla utlenionego grafenu inkubowanego i nieinkubowanego z ludzką surowicą (Ryc. 23A i 23B). Stosunek intensywności pasm G/D nie różnił się znacząco pomiędzy GO inkubowanym i nieinkubowanym z surowicą. Jednakże pole powierzchni pod pikiem dla pasma D3 było większe dla GO inkubowanego z surowicą (Ryc. 23C). Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że w wyniku oddziaływania GO z surowicą, dochodzi do powstawania defektów w krystalicznym szkielecie węglowym GO. Otrzymane wyniki potwierdzają hipotezy o destrukcyjnym wpływie enzymów obecnych w surowicy na strukturę krystaliczną płatków utlenionego grafenu ⁹⁶.



Ryc. 22 Widma Ramana dla utlenionego grafenu inkubowanego i nieinkubowanego z surowicą. Czerwonym prostokątem zaznaczono obszar występowania pasma D i G.



C.	Stosunek G/D (pole pod pikiem)	Stosunek G/D (wysokość piku)	Intensywność Pasma D3 (pole pod pikiem)	Intensywność Pasma D3 (wysokość piku)
GO inkubowany z surowicą	0,60	1,21	9305	46
GO nieinkubowany z surowicą	0,46	1,08	5246	35

Ryc. 23 A) Dekonwolucja widm Ramana dla próbki nieinkubowanej z surowicą. B) Dekonwolucja widm Ramana dla próbki inkubowanej z surowicą. C) Wartości stosunków pasm G i D oraz intensywność pasma D3 dla obu próbek.

Przeprowadzono również analizę elementarną, przedstawiającą procentowy udział poszczególnych pierwiastków w strukturze GO (Tab.2). Wzrost udziału atomów azotu w strukturze płatków GO inkubowanych z surowicą może być kolejnym dowodem na adsorpcję składników surowicy na powierzchni płatków utlenionego grafenu. Atomy azotu mogą pochodzić z wiązań peptydowych białek obecnych w surowicy.

Tab. 2 Analiza elementarna próbek.

Próbka/ skład pierwiastkowy	%N	%C	%H	%O
GO nieinkubowany z surowicą	0,67	23,34	1,60	74,39
GO inkubowany z surowicą	9,59	43,21	5,39	41,81

3.1.4. Podsumowanie i wnioski

W wyniku filtracji otrzymano frakcje utlenionego grafenu różniące się wielkością płatków. Wielkości płatków wynosiły 559+/-374 nm dla frakcji GO1, 689+/-359 nm dla frakcji GO2, 883+/-534 nm dla frakcji GO3 oraz 1525+/-961 nm dla frakcji GO4. Do dalszych badań wybrano frakcje GO2 i GO4, ponieważ najbardziej różniły się rozmiarami płatków. Za pomocą spektroskopii FTIR i spektroskopii Ramana potwierdzono obecność szkieletu węglowego oraz grup tlenowych dla GO nieinkubowanego z surowicą. Wyniki spektroskopii Ramana i FTIR świadczą o powstawaniu defektów w krystalicznej strukturze płatków GO pod wpływem składników surowicy oraz o adsorpcji cząsteczek surowicy na powierzchni płatków GO. Obserwacje te potwierdzają wyniki analizy elementarnej. Dla GO inkubowanego z surowicą zaobserwowano większy składowy udział atomów azotu niż w przypadku GO nieinkubowanego z surowicą. Może to świadczyć o adsorpcji białek i innych cząsteczek bogatych w azot. Uzyskane wyniki potwierdzają, że GO ulega samorzutnym modyfikacjom struktury w wyniku oddziaływań ze składnikami surowicy.

3.2. Ocena cytotoksyczności frakcji utlenionego grafenu

Określenie cytotoksyczności badanego materiału jest kluczowe w celu zrozumienia jego oddziaływania z komórką. Jest to szczególnie ważne podczas badania materiałów o potencjalnym zastosowaniu w medycynie. W badaniach wykorzystano linie komórkowe HUVEC, LL-24 i A549. Linia HUVEC to komórki nabłonka żyły pępowinowej. Ocena wnikania GO do komórek wyściełających naczynia krwionośne jest ważna w kontekście

dożylnego podawania substancji o zastosowaniu biomedycznym. Z kolei komórki linii LL-24 i A549 są odpowiednio prawidłowymi i nowotworowymi komórkami płuc. Jednym z potencjalnych zastosowań GO jest zastosowanie go jako nośnika leków w terapii przeciwnowotworowej. Wykorzystanie komórek linii A549 i LL-24 do badania wnikania GO do komórek, umożliwi wykrycie różnic w wnikaniu GO do komórek prawidłowych i nowotworowych. Ponadto, komórki A549, LL-24 oraz HUVEC różnią się między sobą morfologią. Komórki LL-24 są fibroblastami, komórki A549 to komórki nabłonkowe, natomiast linia HUVEC to komórki śródbłonkowe. Wykorzystanie do badań tych trzech linii komórkowych pozwoli ocenić różnice we wnikaniu GO do komórek o odmiennej morfologii.

3.2.1. Analiza aktywności metabolicznej komórek

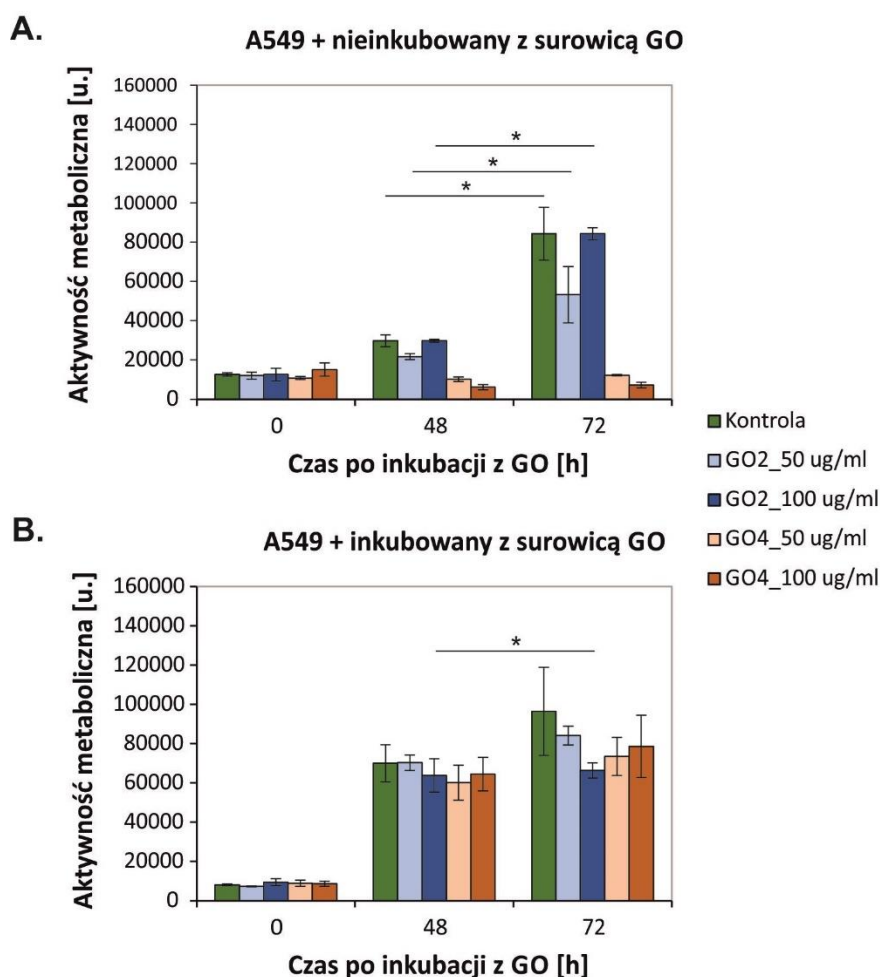
Aby otrzymać rzetelne wyniki badań wnikania GO do komórek, należy sprawdzić, czy GO o stężeniu wybranym do badań nie obniża aktywności metabolicznej komórek. Niska aktywność metaboliczna komórek może skutkować zahamowaniem procesów wnikania GO. Ponadto należy sprawdzić wpływ GO na żywotność komórek, ponieważ potencjalny nośnik leku nie powinien być cytotoksyczny. Stężenie GO musi być dostatecznie wysokie, aby otrzymać wyraźny sygnał analityczny. Jednak zbyt wysokie stężenie GO może okazać się toksyczne dla komórek. Na podstawie poprzednich badań przeprowadzonych w naszym zespole badawczym ustalono, że stężenie 100 $\mu\text{g/ml}$ jest granicznym, nietoksycznym stężeniem GO⁹⁷. Jednakże, badania te zostały przeprowadzone na zawieszinie płatków GO o niezdefiniowanych rozmiarach. W przypadku frakcji o średnich rozmiarach płatków powyżej 1000 nm można się spodziewać, że stężenie 100 $\mu\text{g/ml}$ będzie znacząco obniżać żywotność i aktywność metaboliczną komórek. Dlatego do badań wpływu frakcji GO2, GO2B, GO4 i GO4B na aktywność metaboliczną i żywotność komórek wybrano stężenia 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$. Dodatkowo sprawdzono czy inkubacja GO w surowicy ma wpływ na aktywność metaboliczną i żywotność komórek.

3.2.1.1. Aktywność metaboliczna komórek linii A549 inkubowanych z GO

Aktywność metaboliczna komórek A549 różniła się w zależności od badanej frakcji GO oraz dnia hodowli. Komórki A549 inkubowane z frakcją GO2 charakteryzowały się niższą, natomiast rosnącą w czasie aktywnością metaboliczną niż w przypadku kontroli (Ryc.24 A). Po 72 h od rozpoczęcia inkubacji aktywność metaboliczna komórek A549 inkubowanych z GO2 wzrosła 4,5-krotnie dla stężenia 50 $\mu\text{g/ml}$ i 2-krotnie dla stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$ w porównaniu do początkowej wartości. W przypadku GO4 o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ aktywność metaboliczna A549 nie uległa znaczącym zmianom w czasie, gdzie po 72 h osiągnęła ok. 1,13-krotność

początkowej wartości. W przypadku GO4 o stężeniu 100 µg/ml aktywność metaboliczna komórek nowotworowych płuc zmalała do połowy początkowej wartości po 72 h. Aktywność metaboliczna komórek A549 inkubowanych z GO4 była znacznie niższa niż aktywność metaboliczna próby kontrolnej. Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, że im większe płatki utlenionego grafenu, tym mniejsza aktywność metaboliczna komórek. Aktywność metaboliczna komórek zależała również od stężenia utlenionego grafenu. Zgodnie z przewidywaniami frakcja GO4 o stężeniu 100 µg/ml obniżyła aktywność metaboliczną komórek, podczas gdy GO4 o stężeniu 50 µg/ml nie miał wpływu na aktywność metaboliczną komórek. Aktywność metaboliczna komórek inkubowanych z frakcjami GO nie rosła w czasie tak szybko jak w przypadku komórek kontroli. Jednakże, z wyjątkiem frakcji GO4 o stężeniu 100 µg/ml nie odnotowano spadku aktywności metabolicznej komórek w porównaniu z wartościami początkowymi.

Frakcje GO2B i GO4B nie obniżały aktywności metabolicznej komórek A549 (Ryc. 24 B). Aktywność metaboliczna rosła z każdym dniem hodowli i po 72 h osiągnęła odpowiednio ok. 11-krotność, 7-krotność, 8-krotność oraz 9-krotność wartości początkowej odpowiednio dla próbek 50 µg/ml GO2B, 100 µg/ml GO2B, 50 µg/ml GO4B oraz 100 µg/ml GO4B. Wartości te nie różniły się znacząco od aktywności metabolicznej komórek w kontroli. Może to świadczyć o tym, że składniki surowicy zaadsorbowane na powierzchni płatka zwiększają aktywność metaboliczną komórek. Surowica jest składnikiem pożywek hodowlanych. Zawarte w niej składniki promują wzrost komórek. Dodatkowo, składniki surowicy zaadsorbowane na płatku GO mogą blokować oddziaływania GO z błoną komórkową. Oddziaływania te są prawdopodobną przyczyną obniżania aktywności metabolicznej komórek.



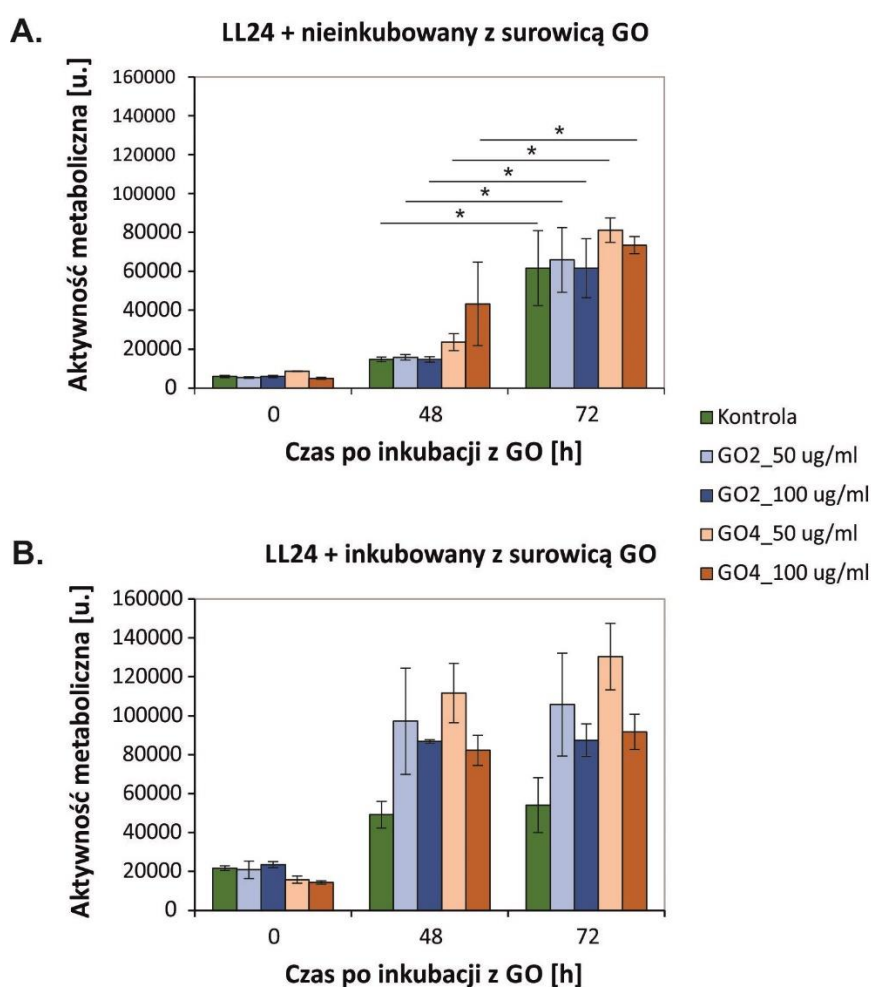
Ryc. 24 Aktywność metaboliczna komórek linii A549 inkubowanych z frakcjami GO bez kontaktu z surowicą (A) oraz frakcjami inkubowanymi z surowicą (B).

3.2.1.2. Aktywność metaboliczna komórek linii LL-24 inkubowanych z GO

Aktywność metaboliczna komórek LL-24, tak jak w przypadku komórek A549 wykazywała się zmianami zależnymi od rodzaju badanego materiału oraz czasu trwania eksperymentu. W przypadku frakcji GO2 i GO4 aktywność metaboliczna LL-24 rosła wraz z czasem. Po 72 h od rozpoczęcia inkubacji osiągnęła ok. 12-krotność wartości początkowej dla frakcji 50 $\mu\text{g/ml}$ GO2, 9-krotność dla frakcji 100 $\mu\text{g/ml}$ GO2, 9-krotność dla frakcji 50 $\mu\text{g/ml}$ GO4 oraz 14-krotność dla frakcji 100 $\mu\text{g/ml}$ GO4 (Ryc. 25 A). Ponadto aktywność metaboliczna komórek inkubowanych z frakcjami GO2 nie różniła się od aktywności metabolicznej kontroli. Po 48 h od rozpoczęcia inkubacji zauważono, że komórki inkubowane z GO4 wykazują wyższą aktywność metaboliczną niż komórki kontroli. Po 72 h od rozpoczęcia inkubacji aktywności metaboliczne komórek inkubowanych z GO4 i kontroli były na tym

samym poziomie. Oznacza to, że próbki utlenionego grafenu nieinkubowanego z surowicą, nie obniżały aktywności metabolicznej komórek LL-24.

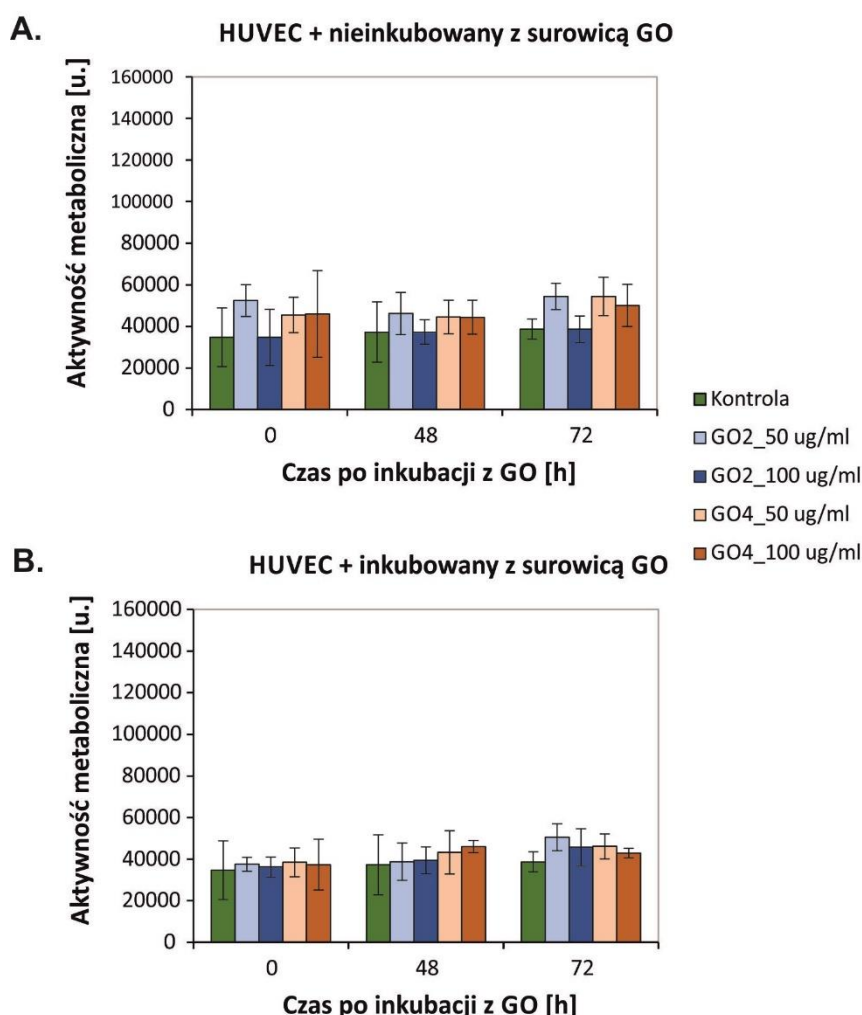
Aktywność metaboliczna komórek LL-24 inkubowanych z frakcjami GO2B i GO4B była większa niż w przypadku kontroli, w każdym dniu eksperymentu. Dodatkowo aktywność metaboliczna komórek inkubowanych z GO2B i GO4B rosła wraz z czasem. Po 72 h od rozpoczęcia inkubacji wartości aktywności metabolicznej wynosiły odpowiednio ok. 5-krotność, 4-krotność, 8-krotność i 6-krotność wartości początkowej dla frakcji 50 µg/ml GO2B, 100 µg/ml GO2B, 50 µg/ml GO4B oraz 100 µg/ml GO4B (Ryc. 25 B). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że składniki surowicy zaadsorbowane na GO zwiększają aktywność metaboliczną komórek.



Ryc. 25 Aktywność metaboliczna komórek linii LL-24 inkubowanych z frakcjami GO bez kontaktu z surowicą (A) oraz frakcjami inkubowanymi z surowicą (B).

3.2.1.3. Aktywność metaboliczna komórek linii HUVEC inkubowanych z GO

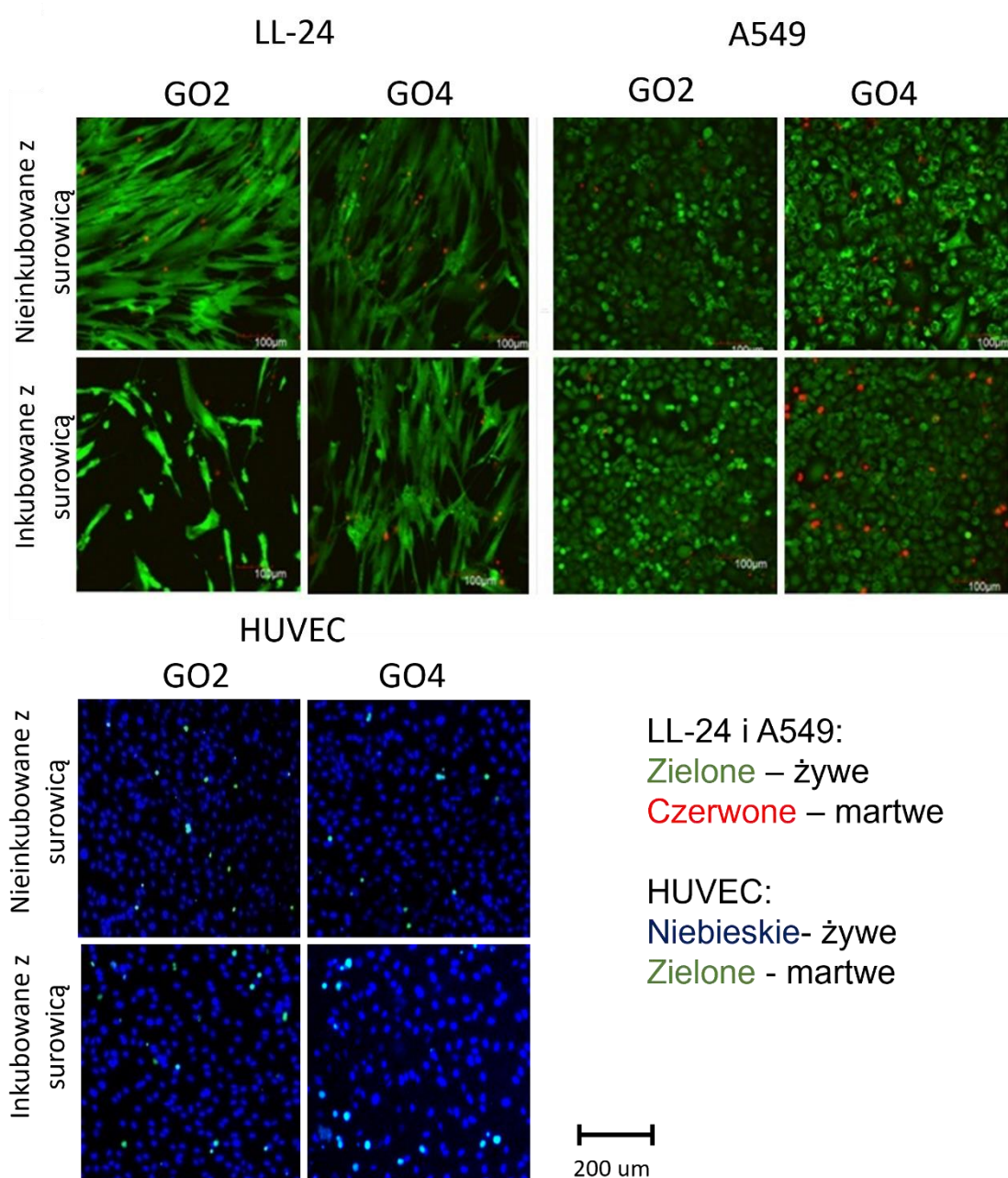
Aktywność metaboliczna komórek linii HUVEC nie zmieniała się znacząco w czasie zarówno w przypadku kontroli jak i badanych frakcji GO (Ryc. 26 A i 26 B). Wartości aktywności metabolicznej komórek inkubowanych z frakcjami GO oraz kontroli nie przekroczyły 1,3-krotności wartości początkowych. Dodatkowo, wartości aktywności metabolicznej dla badanych frakcji GO nie były mniejsze od wartości aktywności metabolicznej komórek kontroli. Oznacza to, że w przypadku komórek linii HUVEC badane próbki utlenionego grafenu nie obniżały ich aktywności metabolicznej. Nie zaobserwowano zwiększonej aktywności metabolicznej komórek inkubowanych z GO2B i GO2B w porównaniu do aktywności metabolicznej kontroli oraz komórek inkubowanych z frakcjami GO2 i GO4.



Ryc. 26 Aktywność metaboliczna komórek linii HUVEC inkubowanych z frakcjami GO bez kontaktu z surowicą (A) oraz frakcjami inkubowanymi z surowicą (B).

3.2.2. Ocena żywotności komórek inkubowanych z GO

Żywotność komórek linii A549, LL-24 oraz HUVEC oceniono z wykorzystaniem barwienia różnicowego (Ryc. 27). Do badania wybrano wyższe badane stężenie frakcji GO2, GO2B, GO4 i GO4B, które wynosiło 100 $\mu\text{g/ml}$. Na podstawie wcześniejszych badań założono, że próbka 50 $\mu\text{g/ml}$ ma mniejszy efekt cytotoksyczny niż 100 $\mu\text{g/ml}$. Dlatego w celu uproszczenia badań, przedstawiono wyniki dla wyższego z dwóch wspomnianych stężeń. Zdjęcia wykonano 72 h od rozpoczęcia inkubacji (ostatni dzień eksperymentu). W przypadku linii A549 i LL-24 czerwony sygnał fluorescencji pochodzi od komórek martwych, a zielony sygnał od żywych komórek. W przypadku komórek HUVEC, żywe komórki emitują niebieską fluorescencję, a martwe komórki zieloną. Najmniej martwych komórek można zauważyć dla komórek linii LL-24 inkubowanych z wszystkimi 4 frakcjami GO oraz dla komórek A549 inkubowanymi z frakcjami GO2 i GO2B. W przypadku linii HUVEC inkubowanej z wszystkimi 4 frakcjami oraz linii A549 inkubowanej z GO4 i GO4B udział komórek martwych był wyższy niż w przypadku linii LL-24. Jednak we wszystkich przypadkach komórek żywych było wielokrotnie więcej niż martwych. Oznacza to, że żywotność komórek wszystkich 3 linii inkubowanych z 4 frakcjami GO utrzymywała się na wysokim poziomie, pomimo zauważalnego spadku żywotności w przypadku linii HUVEC i komórek A549 inkubowanymi z GO4 i GO4B.



Ryc. 27 Żywotność komórek linii LL-24, A549 i HUVEC inkubowanych z frakcjami GO bez kontaktu z surowicą oraz frakcjami GO inkubowanymi z surowicą.

3.2.3. Podsumowanie, dyskusja i wnioski

Inkubacja frakcji GO2, GO4, GO2B i GO4B z komórkami linii A549, LL-24 i HUVEC miała wpływ na aktywność metaboliczną i żywotność komórek. Wpływ ten zależał od frakcji utlenionego grafenu, rodzaju komórek oraz stężenia GO, oraz kontaktu go z surowicą ludzką. Frakcja GO4 znacząco obniżyła aktywność metaboliczną komórek A549. Im większe było stężenie GO4, tym mniejsza była aktywność metaboliczna komórek. Dla komórek

inkubowanych z frakcją GO2 aktywność metaboliczna rosła wraz z czasem inkubacji, jednak jej wartość była mniejsza niż wartość aktywności metabolicznej kontroli. Inkubacja komórek A549 z frakcjami GO2B i GO4B nie obniżała aktywność metabolicznej komórek. Wyniki dla frakcji GO2 i GO2B potwierdzają doniesienia literaturowe, według których płatki utlenionego grafenu o średnicy kilkuset nanometrów nie obniżają aktywności metabolicznej komórek ^{94,98}. Ponadto, istnieją doniesienia o negatywnym wpływie dużych, ponad mikrometrowych płatków na aktywność metaboliczną nowotworowych komórek A549. Potwierdzają one otrzymane w tej pracy wyniki badań dla frakcji GO4 ^{99,100}. Według innych doniesień utleniony grafen nie obniża aktywności metabolicznej komórek A549 aż do stężenia 200 µg/ml ¹⁰¹. Jest to sprzeczne z otrzymanymi wynikami dotyczącymi GO4 o stężeniu 100 µg/ml. Należy jednak podkreślić, że w niniejszej pracy posłużono płatkami GO o większych rozmiarach płatków niż tych których użyli *Chang i współpracownicy* ¹⁰¹. Płatki frakcji GO4 miały 1525±961 nm, podczas gdy we wspomnianym artykule płatki GO osiągały wielkość 780±410 nm. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że większe płatki utlenionego grafenu (frakcja GO4) bardziej obniżają aktywność metaboliczną komórek niż płatki mniejsze (frakcja GO2), co znajduje potwierdzenie w literaturze ⁷⁸. Według innych doniesień literaturowych płatki utlenionego grafenu o wielkości kilkuset nanometrów mogą mieć negatywny wpływ na aktywność metaboliczną komórek ^{102,103}. Sprzeczne doniesienia mogą być spowodowane odmiennymi procedurami przygotowania utlenionego grafenu do badań materiału. Wykazano, że inkubacja w surowicy sprawiła, że frakcja GO4 nie obniżała aktywności metabolicznej komórek A549. Wyniki te znajdują potwierdzenie w literaturze. Adsorpcja składników surowicy może obniżać oddziaływania utleniony grafen-błona komórkowa. W rezultacie materiał nie wykazuje cytotoksyczności względem komórek ¹⁰⁴. Na podstawie barwienia różnicowego można stwierdzić, że żadna z frakcji nie obniżyła znacząco żywotności komórek. Najwięcej martwych komórek zaobserwowano dla frakcji GO4 i GO4B inkubowanych z komórkami A549. Mimo obecności martwych komórek, liczba komórek żywych była wielokrotnie wyższa dla wszystkich frakcji. Nawet komórki A549 inkubowane z GO4 charakteryzowały się wysoką żywotnością, pomimo znacznego spadku aktywności metabolicznej.

W przypadku komórek LL-24 dodatek utlenionego grafenu zwiększał aktywność metaboliczną komórek. Aktywność metaboliczna komórek inkubowana z frakcją GO4 była wyższa niż w przypadku kontroli po 48 h od rozpoczęcia inkubacji. Podobny efekt zauważono w przypadku komórek inkubowanych z frakcjami GO2B i GO4B po 48h i 72 h od rozpoczęcia inkubacji. Nie wiadomo, dlaczego duże płatki frakcji GO4 indukowały ten efekt. Jednak w przypadku frakcji GO2B i GO4B można założyć, że zaadsorbowane na płatkach elementy

surowicy odpowiadały za zwiększenie aktywności metabolicznej komórek LL-24. W przypadku wszystkich próbek aktywność metaboliczna rosła wraz z czasem i nie spadała poniżej wartości aktywności metabolicznej dla kontroli. Nie znaleziono doniesień literaturowych na temat badań oceniających wpływ utlenionego grafenu na komórki LL-24. Jednak badania na innej prawidłowej linii płuc Beas-2B są zbieżne z wynikami niniejszej pracy^{105,106}. Wyniki barwienia różnicowego potwierdzają, że próbki utlenionego grafenu nie były toksyczne względem komórek linii LL-24.

W przypadku linii HUVEC żadna z badanych frakcji GO nie obniżyła aktywności metabolicznej tych komórek. Wartości aktywności metabolicznej kontroli oraz komórek inkubowanych ze wszystkimi 4 frakcjami była podobna i nie zmieniała się w czasie. Wyniki barwienia różnicowego pozwalają przypuszczać, że inkubacja komórek linii HUVEC z wszystkimi 4 frakcjami GO, nieznacznie obniżyła żywotność komórek. Pomimo obecności komórek martwych, liczba komórek żywych była kilkunastokrotnie wyższa. Nie zauważono wyraźnych różnic w żywotności pomiędzy komórkami inkubowanymi z badanymi frakcjami GO. Uzyskane wyniki nie potwierdzają doniesień literaturowych. Wyniki uzyskane przez *Cibecchiniego i współpracowników* świadczą o tym, że GO o stężeniu 50 µg/ml obniżał aktywność metaboliczną komórek HUVEC¹⁰⁷. W pracy *Cao i współpracowników* podobny efekt zaobserwowano dla GO o stężeniu 100 µg/ml¹⁰⁸. Natomiast *Luo i współpracownicy* wykazali, że cytotoksyczność GO zależy od wielkości płatków. Płatki o wielkości mniejszej niż 500 nm w niewielkim stopniu obniżały aktywność metaboliczną komórek, natomiast płatki o rozmiarach 500-5000 nm znacząco obniżyły aktywność metaboliczną komórek HUVEC¹⁰⁹. Powyższe doniesienia literaturowe nie zostały potwierdzone przez badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy. Niejednoznaczność wyników może być wynikiem różnic w rozmiarze, strukturze i modyfikacji GO użytego do badań przez różne zespoły badawcze.

Wpływ badanych próbek utlenionego grafenu na aktywność metaboliczną komórek różnił się w zależności od typu komórek. Inkubacja komórek A549 z GO4 o stężeniu 100 µg/ml znacząco obniżała aktywność metaboliczną komórek. W pozostałych przypadkach inkubacja komórek z frakcjami GO nie obniżała ich aktywności metabolicznej. Wszystkie frakcje utlenionego grafenu nieznacznie obniżyły żywotność komórek HUVEC. Dodatkowo, frakcje GO4 i GO4B obniżyły żywotność komórek A549. Jednak dla każdej frakcji i każdego typu komórki, liczba komórek żywych wielokrotnie przewyższała liczbę komórek martwych. Ze względu na obniżenie aktywności metabolicznej komórek A549 przez frakcję GO4 o stężeniu 100 µg/ml, do dalszych badań przygotowano próbki o stężeniu 50 µg/ml.

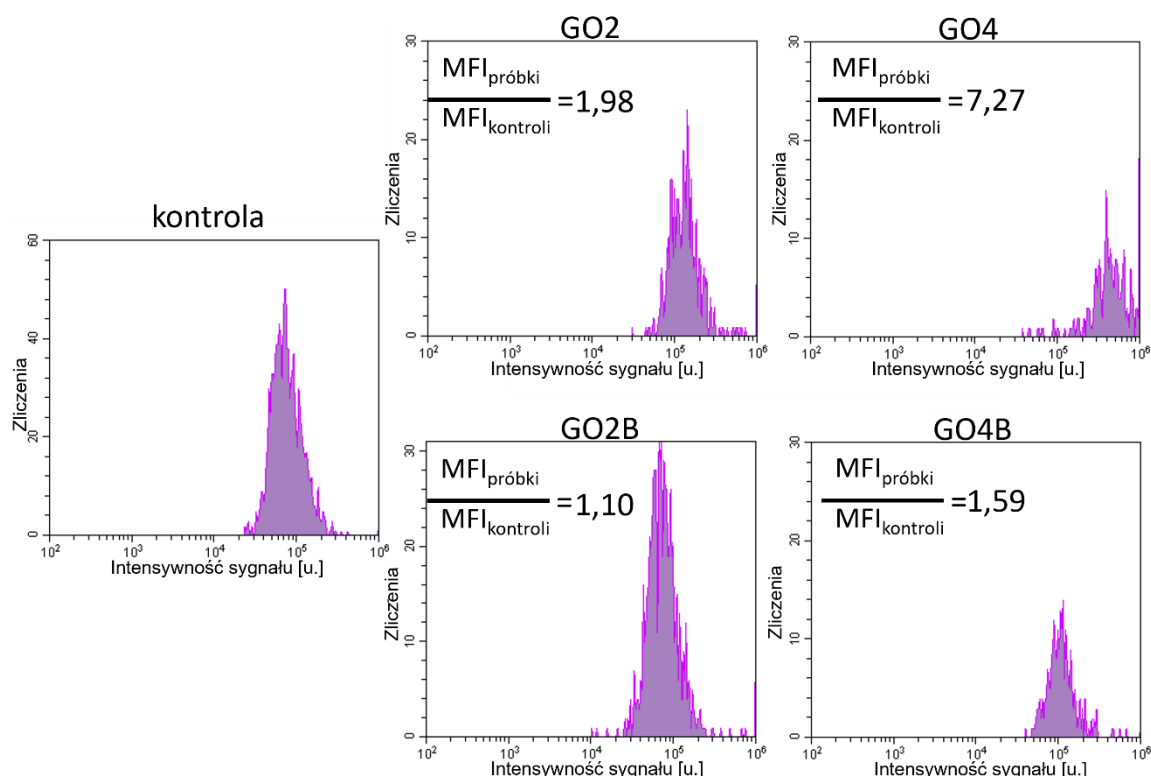
3.3. Ocena wnikania utlenionego grafenu do komórek

Oceniono efektywność wnikania frakcji utlenionego grafenu do komórek linii A549, LL-24 i HUVEC. Do badań wykorzystano frakcje GO różniące się rozmiarami płatków. Ponadto frakcje GO2B i GO4B uległy samorzutnej modyfikacji w ludzkiej surowicy. Użycie frakcji GO2, GO2B, GO4 i GO4B umożliwiło poznanie wpływu rozmiaru płatków oraz inkubacji GO w surowicy na efektywność wnikania. Ponadto oceniono, który z tych czynników ma większy wpływ na proces wnikania GO do komórek. Dodatkowo oceniono jaki wpływ na efektywność wnikania ma typ komórek użytych do badań. Do pomiarów cytometrycznych wykorzystano próbki wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym (FITC) o stężeniu 50 µg/ml. Wybór ten wynika z przeprowadzonych badań aktywności metabolicznej i żywotności badanych komórek oraz doniesień literaturowych. Według doniesień literaturowych, próbki utlenionego grafenu o stężeniu do 50 µg/ml nie wywołują agregacji płytek krwi – zjawiska niekorzystnego w kontekście dożylnego podawania badanego materiału do organizmu żywego ¹¹⁰. Efektywność wnikania utlenionego grafenu do komórek określono po 1 h i 48 h inkubacji próbek z komórkami. Wnikanie materiałów do komórek jest procesem zachodzącym znacznie szybciej niż spadek żywotności czy aktywności metabolicznej komórek, dlatego efektywność wnikania oceniono już po 1 h inkubacji. Dodatkowo, efektywność wnikania określono po 48 h inkubacji z frakcjami GO, ponieważ wedle doniesień literaturowych jest to przybliżony czas półtrwania utlenionego grafenu we krwi naczelnych ¹¹¹ oraz czas, po którym utleniony grafen zostaje usunięty z organizmu myszy ¹¹². We wspomnianych doniesieniach użyto próbek różniących się fizykochemicznie od próbek użytych w niniejszej pracy, niemniej, w związku z ubogą literaturą dotyczącą tej tematyki stanowiły one jedyne dostępne źródła odniesienia.

3.3.1. Efektywność wnikania GO do komórek linii A549

Przeprowadzono pomiary efektywności wnikania badanych próbek GO do komórek nowotworowej linii płuc A549. W przypadku 1 h inkubacji zauważono, że frakcja GO4 wnikała do komórek A549 z największą efektywnością (Ryc.28). Intensywność fluorescencji pochodzącej od FITC związanego z GO4 była ok. 7,27 razy wyższa niż w przypadku intensywności sygnału tła zarejestrowanego dla próby kontrolnej. Efektywność wnikania utlenionego grafenu o mniejszych płatkach była znacznie niższa. Zaobserwowano jedynie ok. 2-krotny wzrost intensywności fluorescencji w porównaniu do próby kontrolnej. Inkubacja z surowicą zahamowała wnikanie płatków utlenionego grafenu do komórek dla obu frakcji (GO2B i GO4B). Płatki frakcji GO2B nie wniknęły do komórek lub efektywność ich wnikania była niska. Stosunek wielkości sygnału próbki do wielkości sygnału kontroli wynosił ok. 1

(Tab. 3). W porównaniu do frakcji GO2B, płatki frakcji GO4B wnikały do komórek A549 z większą efektywnością.



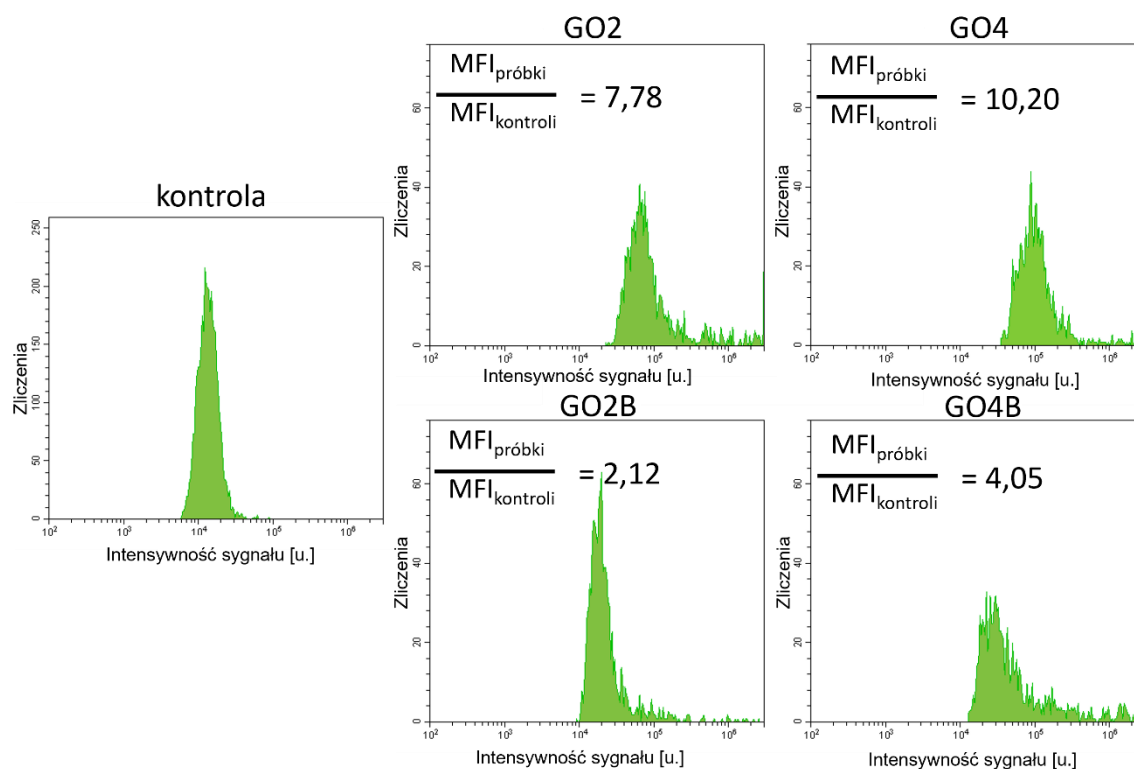
Ryc. 28 Efektywność wnikania próbek GO inkubowanych z komórkami z dodatkiem TrypanBlue dla linii A549 przez 1 h.

W tabeli (Tab. 3) porównano wyniki dla próbek z dodatkiem i bez dodatku barwnika TrypanBlue. Barwnik ten blokuje fluorescencję na powierzchni komórki umożliwiając zarejestrowanie sygnału pochodzącego wyłącznie z jej wnętrza ⁹². W związku z wyeliminowaniem sygnału powierzchniowego spodziewano się zarejestrować niższe wartości sygnału do kontroli dla próbek z dodatkiem TrypanBlue. Jednak zauważono tendencję odwrotną, a wyniki obu zestawów testów są zbliżone. Założono, że różnice wynikają ze zmienności biologicznej próbek, a zarejestrowany sygnał, we wszystkich przypadkach pochodził z wnętrza komórek. W związku z tym, dla 48 h inkubacji próbki przygotowywano bez dodatku barwnika w celu uproszczenia i usprawnienia procedury.

Tab. 3 Efektywność wnikania badanych próbek inkubowanych z komórkami linii A549 przez 1 h.

Próbka	Średnia sygnału próby do kontroli	
	Próbki bez dodatku Trypan Blue	Próbki z dodatkiem Trypan Blue
GO2	1,82	1,98
GO2B	0,99	1,10
GO4	6,54	7,27
GO4B	1,51	1,59

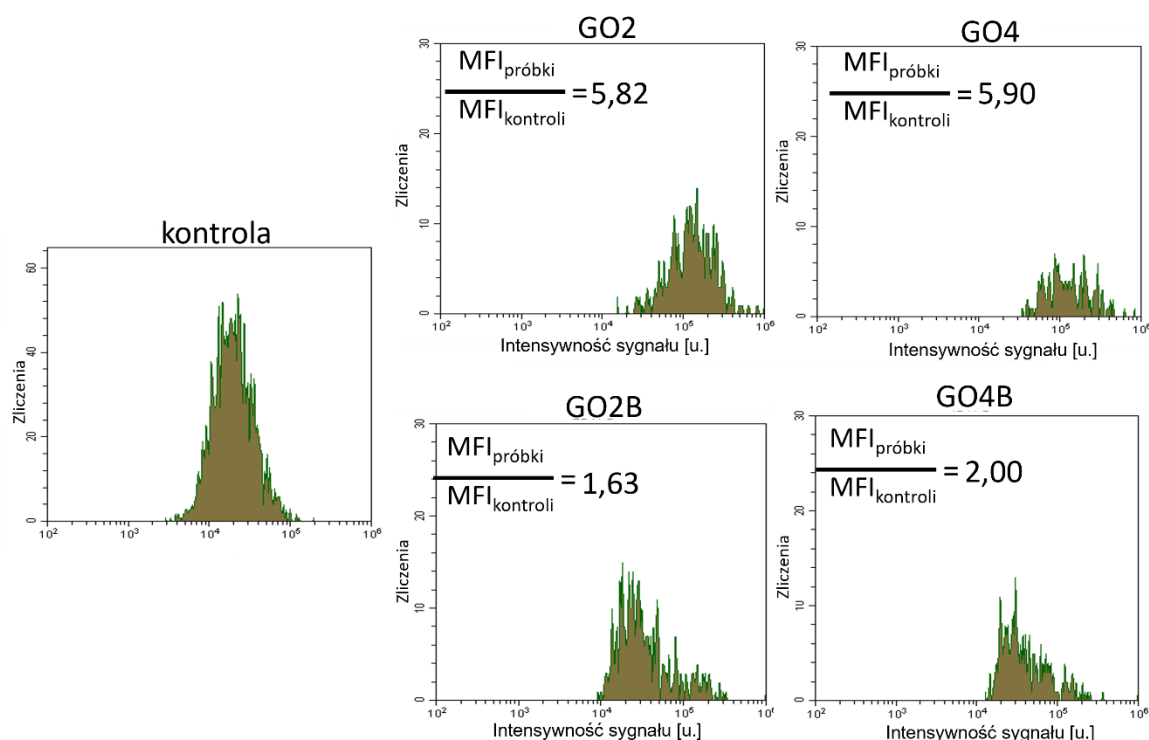
Następnie określono intensywność wnikania badanych próbek do komórek linii A549 dla czasu inkubacji wynoszącego 48 h (Ryc. 29). Efektywność wnikania wynosiła ok. 7,78; 2,12; 10,20 oraz 4,05 odpowiednio dla GO2, GO2B, GO4 i GO4B. Efektywność wnikania dla wszystkich frakcji w przypadku 48 h inkubacji była dużo wyższa niż podczas 1 h inkubacji. Jak się można było spodziewać, zwiększony czas inkubacji przełożył się na większą liczbę płatków utlenionego grafenu zakumulowanego w komórkach. Największy wzrost efektywności wnikania pomiędzy 1 h i 48h inkubacją, z 1,98 do 7,78, zauważono dla GO2. Dla GO4 efektywność wnikania wzrosła z 7,27 do 10,20. Może to świadczyć o tym, że wnikanie mniejszych płatków jest procesem wolniejszym, niż wnikanie płatków o większych rozmiarach. Jednak niezbędne byłoby przeprowadzenie dalszych badań by potwierdzić tę tezę. Wpływ wielkości płatków GO oraz ich inkubacji z surowicą miał ten sam charakter jak w przypadku 1 h inkubacji. Większe płatki wnikały z większą efektywnością, natomiast inkubacja z surowicą silnie ograniczała wnikanie utlenionego grafenu do komórek.



Ryc. 29 Efektywność wnikania próbek GO inkubowanych z komórkami A549 przez 48 h.

3.3.2. Efektywność wnikania GO do komórek linii LL-24

Przeprowadzono pomiary efektywności wnikania badanych próbek GO do prawidłowych komórek linii LL-24 z i bez dodatku TrypanBlue. Po 1 h inkubacji zauważono, że efektywność wnikania dla próbek nieinkubowanych z surowicą była porównywalna dla obu frakcji: 5,82 dla GO2 oraz 5,90 dla GO4 (Ryc.30). Jest to zależność inna niż w przypadku nowotworowych komórek linii A549, dla której zauważono różnicę w efektywności wnikania utlenionego grafenu w zależności od rozmiarów płatków. Może to być wynikiem różnic pomiędzy typami komórek i ich odmiennymi odpowiedziami na czynniki zewnętrzne takie jak płatki utlenionego grafenu ⁷⁰. Zależność między efektywnością wnikania a rozmiarem płatków utlenionego grafenu można natomiast zaobserwować dla próbek inkubowanych z surowicą. Tak jak w przypadku linii A549 większe płatki frakcji GO4B były wchłaniane efektywniej niż mniejsze płatki frakcji GO2B. Efektywność wnikania utlenionego grafenu dla frakcji GO2B i GO4B wynosiła odpowiednio ok. 1,63 oraz 2,00. Tak jak w przypadku linii A549, frakcje GO2B i GO4B wnikały do komórek z mniejszą efektywnością niż frakcje GO2 i GO4. Inkubacja z surowicą ludzką obniżała efektywność wnikania utlenionego grafenu do komórek.



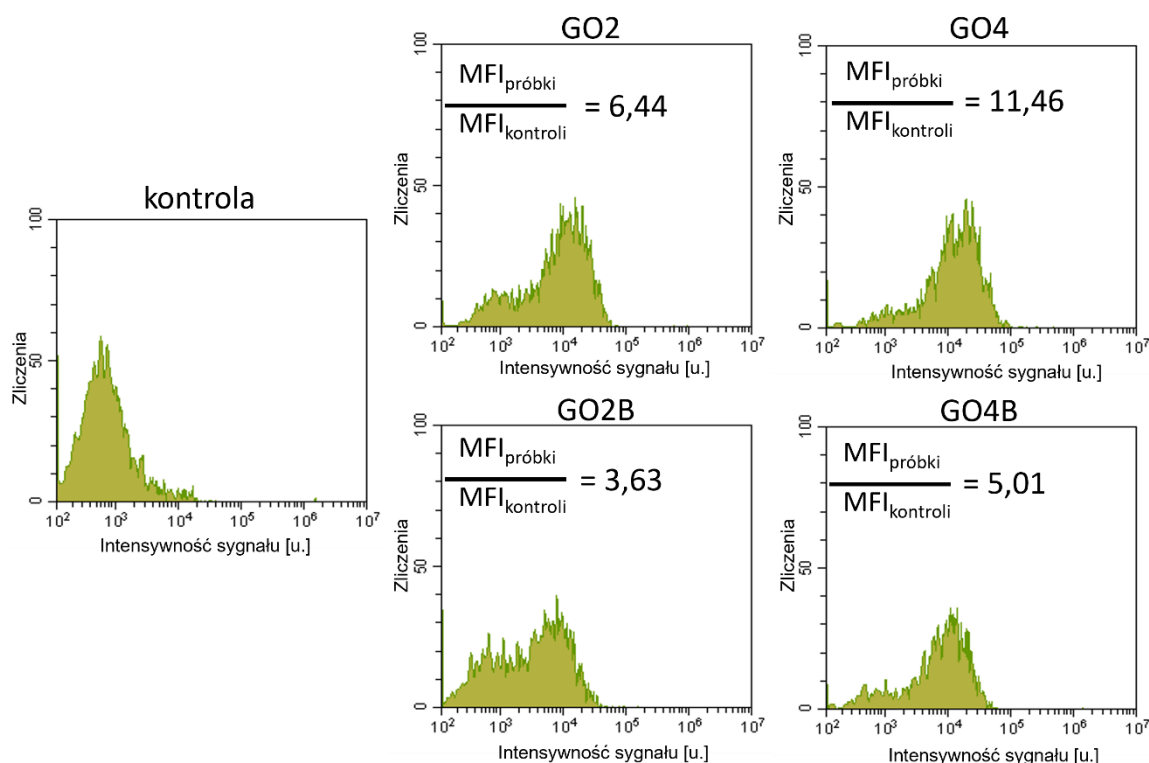
Ryc. 30 Efektywność wnikania próbek GO inkubowanych z komórkami z dodatkiem TrypanBlue dla linii LL-24 przez 1 h.

Dodatek barwnika TrypanBlue nieznacznie obniżał otrzymywane wartości internalizacji co było spodziewanym efektem (Tab. 4). Różnica ta jest niewielka co oznacza, że większość płytek prawdopodobnie wniknęła do wnętrza komórek, a pozostałe uległy adsorpcji na powierzchni błony komórkowej. Jednakże potwierdzenie tego wymagałoby dalszych badań, a różnice w otrzymanych wartościach mogą być spowodowane zmiennością próbek biologicznych tak jak w przypadku linii A549. Wpływ wielkości płytek i inkubacji z surowicą jest taki sam w przypadku próbek inkubowanych jak i nieinkubowanych z surowicą. W związku z tym, dla 48 h inkubacji próbki przygotowywano bez dodatku barwnika w celu uproszczenia i usprawnienia procedury.

Tab. 4 Efektywność wnikania badanych próbek GO inkubowanych z komórkami linii LL-24 przez 1 h.

Próbka	Średnia sygnału próby do kontroli	
	Próbki bez dodatku Trypan Blue	Próbki z dodatkiem Trypan Blue
GO2	6,30	5,82
GO2B	1,75	1,63
GO4	6,31	5,90
GO4B	2,06	2,00

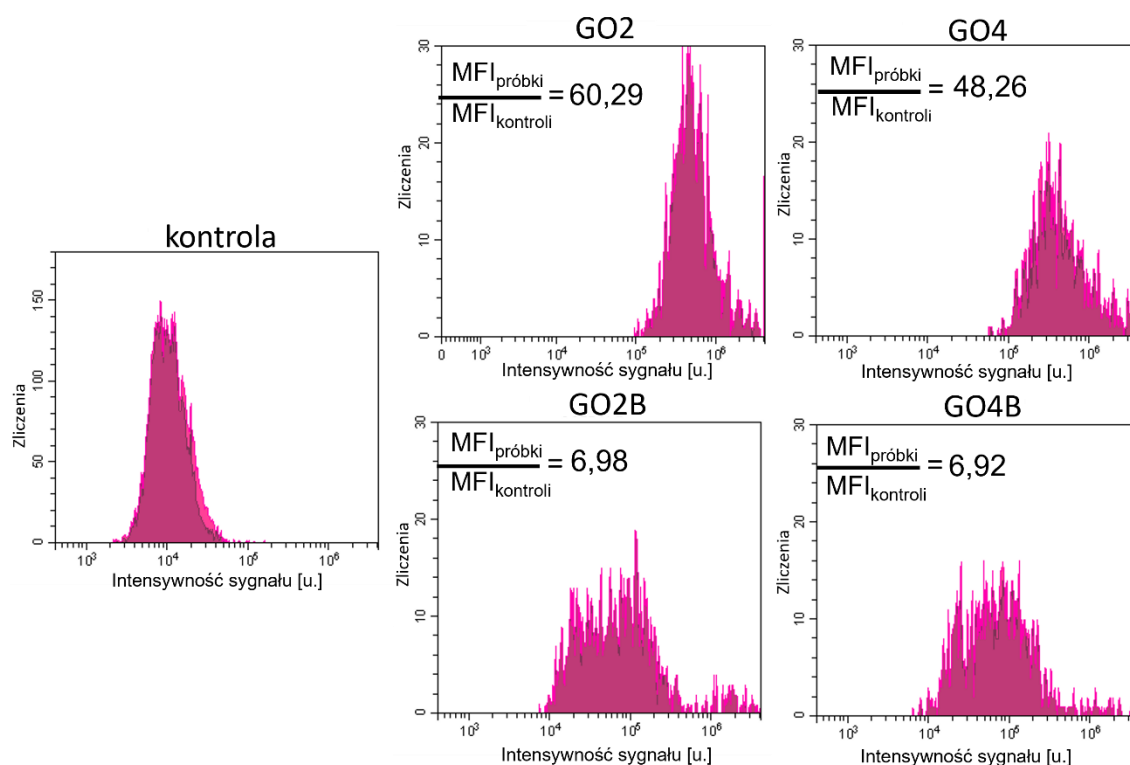
Efektywność wnikania badanych frakcji płatków utlenionego grafenu inkubowanych przez 48 h (Ryc.31) była wyższa w porównaniu z inkubacją 1 h. W przypadku GO2 wartości efektywności wnikania różniły się w niewielkim stopniu: 6,30 i 6,44 odpowiednio dla 1 h i 48 h inkubacji. Dla pozostałych próbek odnotowano znaczny wzrost efektywności akumulacji płatków GO. Efektywność wnikania wynosiła ok. 6,44; 3,63; 11,46 oraz 5,01 odpowiednio dla GO2, GO2B, GO4 i GO4B. Wpływ wielkości płatków oraz inkubacji z surowicą był analogiczny do tego zaobserwowanego dla komórek linii A549, większe płatki wnikały z większą efektywnością a inkubacja z surowicą hamowała wnikanie płatków GO do komórek.



Ryc. 31 Efektywność wnikania próbek GO inkubowanych z komórkami LL-24 przez 48 h.

3.3.3. Efektywność wnikania GO do komórek linii HUVEC

Przeprowadzono pomiary efektywności wnikania frakcji GO2, GO2B, GO4 i GO4B do prawidłowych komórek linii HUVEC z i bez dodatku TrypanBlue. W przypadku 1 h inkubacji GO2 i GO4 z komórkami HUVEC odnotowano wysoką efektywność wnikania w porównaniu z pozostałymi, badanymi liniami komórkowymi: sygnał był odpowiednio 60,29 i 48,26 razy większy w stosunku do kontroli dla GO2 i GO4 (Ryc.32). Może to wskazywać na gwałtowny przebieg internalizacji w pierwszej godzinie inkubacji komórek z frakcjami GO. Ponadto, podobnie jak dla komórek A549 i LL-24 zauważono zahamowanie procesu internalizacji dla frakcji GO inkubowanych z surowicą ludzką. W odróżnieniu od badań na liniach komórkowych płuc, w przypadku komórek inkubowanych z GO2B i GO4B, nie zauważono zwiększonej efektywności wnikania płatków o większych rozmiarach (frakcja GO4B). W przypadku frakcji GO nieinkubowanych z surowicą (GO2 i GO4) efektywność wnikania była wyższa dla frakcji o mniejszych rozmiarach płatków (GO2).



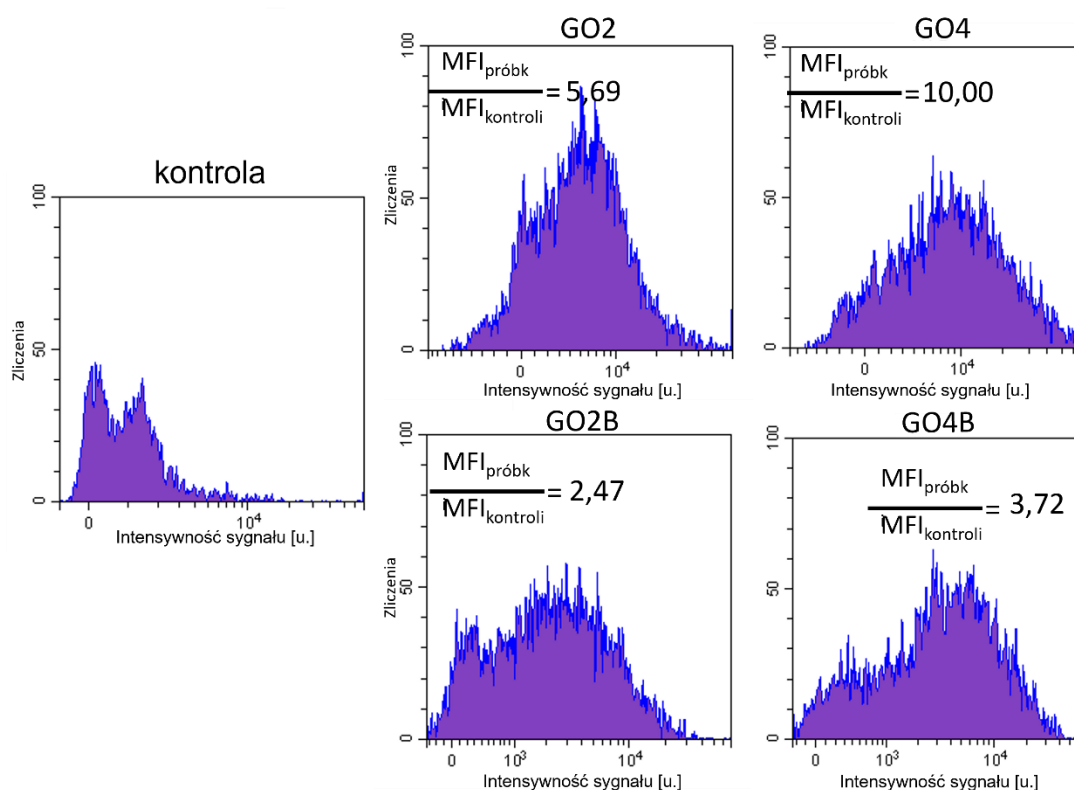
Ryc. 32 Efektywność wnikania próbek inkubowanych z komórkami z dodatkiem TrypanBlue dla linii HUVEC przez 1 h.

W przypadku linii HUVEC wyniki próbek z dodatkiem TrypanBlue oraz próbek bez dodatku tego barwnika były zbliżone (Tab.5) Spodziewano się jednak zarejestrować niższe wartości sygnału do kontroli dla próbek z dodatkiem TrypanBlue. Założono, że różnice wynikają ze zmienności biologicznej próbek, a cały zarejestrowany sygnał, we wszystkich przypadkach, pochodził z wnętrza komórek. W związku z tym, dla 48 h inkubacji próbki przygotowywano bez dodatku barwnika w celu uproszczenia i usprawnienia procedury.

Tab. 5 Efektywność wnikania badanych próbek GO inkubowanych z komórkami linii HUVEC przez 1 h.

Próbka	Średnia sygnału próby do kontroli	
	Próbki bez dodatku Trypan Blue	Próbki z dodatkiem Trypan Blue
GO2	57,79	60,29
GO2B	6,74	6,98
GO4	48,76	48,26
GO4B	6,72	6,92

Po 48 h inkubacji stosunek intensywności fluorescencji komórek inkubowanymi z frakcjami GO do kontroli wynosił odpowiednio 5,69; 2,47; 10,00 oraz 3,72 dla frakcji GO2, GO2B, GO4 i GO4B (Ryc. 33). Tak jak w przypadku 48 h inkubacji frakcji GO z komórkami linii A549 i LL-24, większe płatki wykazywały większą efektywność internalizacji. Podobnie, inkubacja z surowicą ludzką hamowała proces wnikania badanych próbek do komórek linii HUVEC.



Ryc. 33 Efektywność wnikania próbek GO inkubowanych z komórkami linii HUVEC przez 48 h.

3.3.4. Wnioski i dyskusja

Oceniono wpływ inkubacji z surowicą oraz wielkości płatków utlenionego grafenu na jego efektywność wnikania do trzech typów komórek: nowotworowej linii płuc A549, prawidłowych fibroblastów płuc LL-24 oraz prawidłowych komórek śródbłonkowych żyły pępowinowej HUVEC. Dla czasu inkubacji wynoszącego 1 h zauważono, że wpływ tych dwóch badanych czynników jest różny w zależności od typu komórkowego. W przypadku nowotworowych komórek linii A549 zauważono, że zarówno w przypadku materiałów GO nieinkubowanych jak i inkubowanych z surowicą ludzką, efektywność wnikania jest wyższa w przypadku płatków o większych rozmiarach. W przypadku prawidłowych komórek linii LL-24 taką zależność zaobserwowano jedynie dla próbek nieinkubowanych z surowicą. Natomiast w

przypadku linii HUVEC zależność tę zaobserwowano jedynie dla próbek inkubowanych z surowicą. Przyczyną tych różnic mogą być różnice w morfologii oraz funkcjonowaniu poszczególnych typów komórek. W zależności od typu i miejsca pochodzenia komórka może charakteryzować się różną ilością i rodzajem receptorów na swojej powierzchni oraz różnym profilem ekspresji genów, co może przekładać się na odmienne mechanizmy oddziaływania z materiałami takimi jak utleniony grafen ^{69–72,94}.

Niezależnie od typu linii komórkowej inkubacja z komercyjnie dostępną surowicą ludzką hamowała proces internalizacji. Przyczyną takiego zjawiska może być osłabienie fizycznych oddziaływań między płatkami utlenionego grafenu a błoną komórkową przez elementy surowicy zaadsorbowane na powierzchni GO ¹⁰⁴. W wyniku tej zmiany może nastąpić osłabienie powinowactwa płatka utlenionego grafenu do lipidów błony komórkowej. Wedle obecnej wiedzy materiał wprowadzony do organizmu żywego ulega przemianom w wyniku oddziaływań z biologicznie aktywnymi molekułami płynów ustrojowych. Białka i inne składniki surowicy mogą ulec adsorpcji na powierzchni płatka grafenu ¹¹⁰. Wedle doniesień literaturowych wpływ tego zjawiska na efektywność wnikania nie jest jednoznaczny i zależy od rodzaju zaadsorbowanych składników surowicy. W niektórych przypadkach składniki zaadsorbowane na powierzchni materiału mogą pośredniczyć w internalizacji materiału tym samym ułatwiając przeniknięcie przez błonę komórkową ^{85,86}. Jednakże inne badania wykazały, że inkubacja materiału w płynach biologicznych może powodować zahamowanie internalizacji materiału przez komórki ^{3,87}. Dokładne poznanie tego zjawiska wymaga większej ilości, bardziej szczegółowych badań.

Wyniki 48 h inkubacji dla wszystkich trzech typów komórek były spójne. Inkubacja z surowicą miał większy wpływ na efektywność wnikania niż rozmiar płatków. Inkubacja z surowicą hamowała wnikanie utlenionego grafenu do komórek. Ponadto zauważono, że w odróżnieniu od inkubacji 1 h, we wszystkich przypadkach większe płatki wnikały efektywniej do komórek. Jest to efekt odwrotny od spodziewanego. Według współczesnej wiedzy większość materiałów, w tym utleniony grafen dostaje się do komórki na drodze endocytozy ⁸⁴. Większość mechanizmów endocytozy preferuje internalizację cząstek małych, ok. 100 nm ⁶⁴. Wedle doniesień literaturowych małe cząstki wnikają do wnętrza komórek z wyższą efektywnością niż większe, podczas gdy większe cząstki ulegają adhezji po zewnętrznej stronie błony komórkowej ^{79,113,114}. Wyniki innych badań wskazują, że nie jest to uniwersalna zależność ^{115,116}. Rezultaty przedstawione w niniejszej pracy wskazują na bardziej efektywne wnikanie większych płatków. Może to być związane z większą powierzchnią oddziaływań między dużym płatkami a błoną komórkową. Wyniki są sprzeczne z doniesieniami

literaturowymi ^{79,113,114}. Należy tu jednak zaznaczyć, że płatki utlenionego grafenu wykorzystane w badaniach, miały znacznie większe rozmiary niż 100 nm. Istnieje więc podejrzenie, że nie były one internalizowane na drodze mechanizmów dedykowanych cząstkom o rozmiarach ok. 100 nm, takich jak uprzednio wspomniana w doniesieniach literaturowych klatrynozależna endocytoza ⁶⁷⁻⁷⁰. Można więc przypuszczać, że głównymi drogami wnikania były szlaki pozwalające na transport większych cząstek takie jak makropinocytoza lub fagocytoza. Kolejną możliwością jest transport pasywny poprzez mechaniczne przebicie błony. Jednak testy aktywności metabolicznej i żywotności komórek wykonane w ramach pracy wskazywały na zachowanie przez wszystkie typy komórek integralności błony komórkowej nawet dla frakcji o większych rozmiarach płatków. Próby ustalenia dokładnego mechanizmu wymagają dalszej pracy w tym kierunku.

Niniejsze badania są jedną z pierwszych prób oceny jednoczesnego wpływu inkubacji w surowicy i rozmiarów płatków GO na ich efektywność wnikania do komórek ssących różniących się morfologią, pochodzeniem oraz typem. Zaobserwowano, że efekt inkubacji z surowicą ma dominujący wpływ na efektywność wnikania w stosunku do rozmiaru płatków. Zauważono też, że zależności te zmieniają się w czasie i dla różnych typów komórek. W celu dogłębnego poznania zjawiska wnikania utlenionego grafenu do komórek wymagane jest jeszcze dużo pracy, jednak wyniki uzyskane w niniejszych badaniach dodają nowych informacji uzupełniając lukę w wiedzy w tym temacie.

3.4. Próba oceny mechanizmu wnikania utlenionego grafenu do komórek ssących

W celu uzyskania bardziej kompleksowej wiedzy na temat zjawiska wnikania utlenionego grafenu do komórek, dokonano próby poznania mechanizmu jego wnikania. Wiedza ta mogłaby umożliwić poznanie przyczyn różnic w efektywności wnikania dla poszczególnych frakcji GO. W tym celu wykorzystano chemiczne inhibitory szlaków komórkowych odpowiedzialnych za pobieranie cząstek z otoczenia. Chloropromazyna (CH) blokuje szlaki endocytozy z wyjątkiem makropinocytozy i fagocytozy. Jej mechanizm działania nie jest dokładnie poznany jednak uważa się, że prawdopodobnie blokuje ekspresję białka AP-2. Chlorochinon (CQ) jest inhibitorem klatrynozależnej endocytozy i oddziałuje bezpośrednio na klatrynę. Dynasore (Dy) blokuje aktywność dynaminy tym samym blokując dynaminozależne szlaki oraz makropinocytozę i fagocytozę. 7-ketocholesterol (7-K) zapobiega ścisłemu upakowaniu reszt acylowych. W rezultacie blokuje to endocytozę niezależną od klatryny i dynaminy (mechanizm CLIC/GEEC). 2-deoksyglukoza (2-D) jest ogólnym inhibitorem transportu aktywnego. Blokuje

glikolizę tym samym ograniczając ilość ATP i NADH w komórce ⁶⁴. Wspomniane szlaki jak i ich inhibitory zaproponowano w oparciu o dostępną literaturę ⁶⁴

3.4.1. Cytotoksyczność inhibitorów

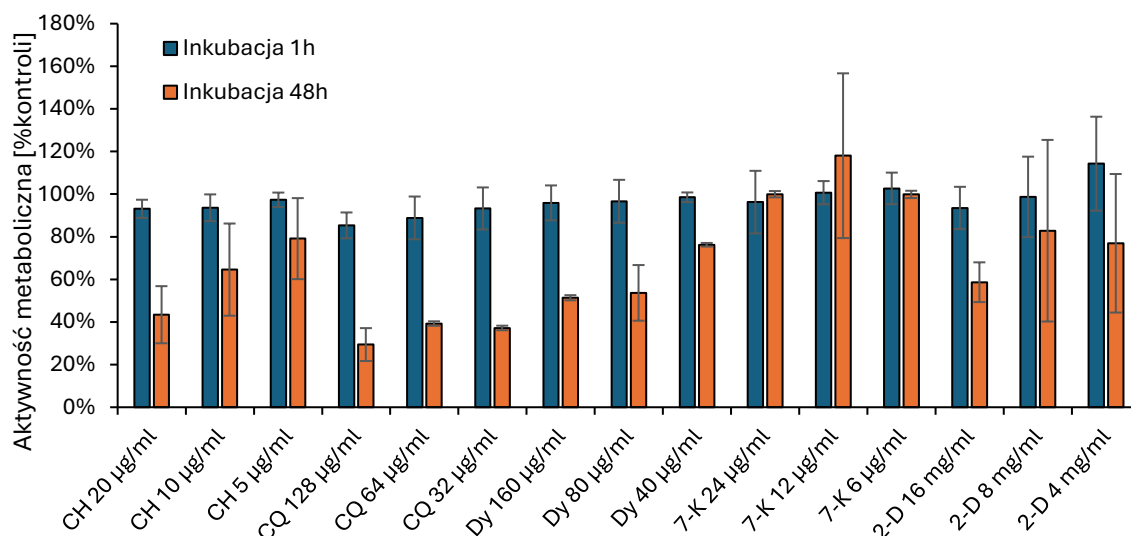
Wyżej wymienione substancje mają ogromny wpływ na funkcjonowanie komórek. W związku z tym pierwszym krokiem było ustalenie bezpiecznego stężenia inhibitorów endocytozy dla komórek. W tym celu wykorzystano test aktywności metabolicznej AlamarBlue™. Rodzaje próbek oraz ich stężenia podsumowano w tabeli (Tab.6). Stężenia inhibitorów były dobrane na podstawie doniesień literaturowych.

Tab. 6 Stężenia inhibitorów szlaków endocytozy.

Inhibitor	Stężenie [µg/ml]			Ref.
Chloropromazyna (CH)	20	10	5	⁷⁷
Chlorochinon (CQ)	128	64	32	⁹³
Dynasore (Dy)	160	80	40	⁹⁴
7-ketocholesterol (7-K)	24	12	6	⁹⁵
2-deoksyglukoza (2-D)	16000	800	400	⁷⁷

3.4.1.1. Cytotoksyczne działanie inhibitorów na komórki linii A549

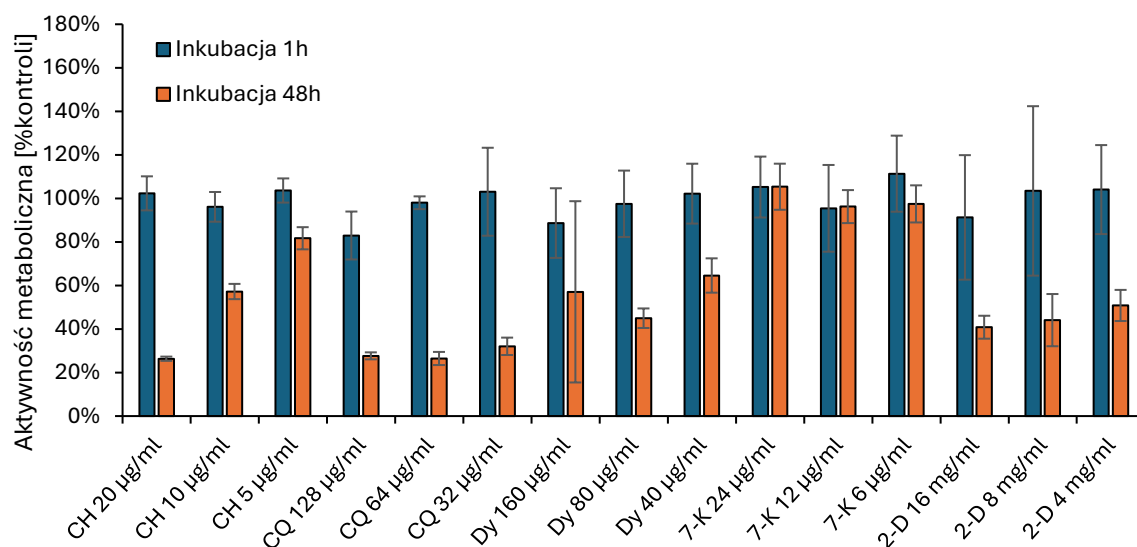
Oceniono wpływ inhibitorów endocytozy na aktywność metaboliczną nowotworowych komórek linii A549 (Ryc.34). Komórki inkubowane z inhibitorami przez 1 h nie wykazały spadku aktywności metabolicznej. Najniższą aktywność metaboliczną odnotowano dla chlorochinonu o stężeniu 128 µg/ml i wynosiła ona 85% aktywności kontroli. Dla czasu inkubacji wynoszącego 48 h odnotowano spadek aktywności metabolicznej komórek. Również w tym przypadku największy spadek aktywności metabolicznej odnotowano dla próbek inkubowanych z chlorochinonem. Dla próbki o najniższym stężeniu chlorochinonu aktywność metaboliczna stanowiła 37% w stosunku do kontroli.



Ryc. 34 Aktywność metaboliczna komórek A549 inkubowanych z wybranymi inhibitorami szlaków endocytozy.

3.4.1.2. Cytotoksyczne działanie inhibitorów na komórki linii LL-24

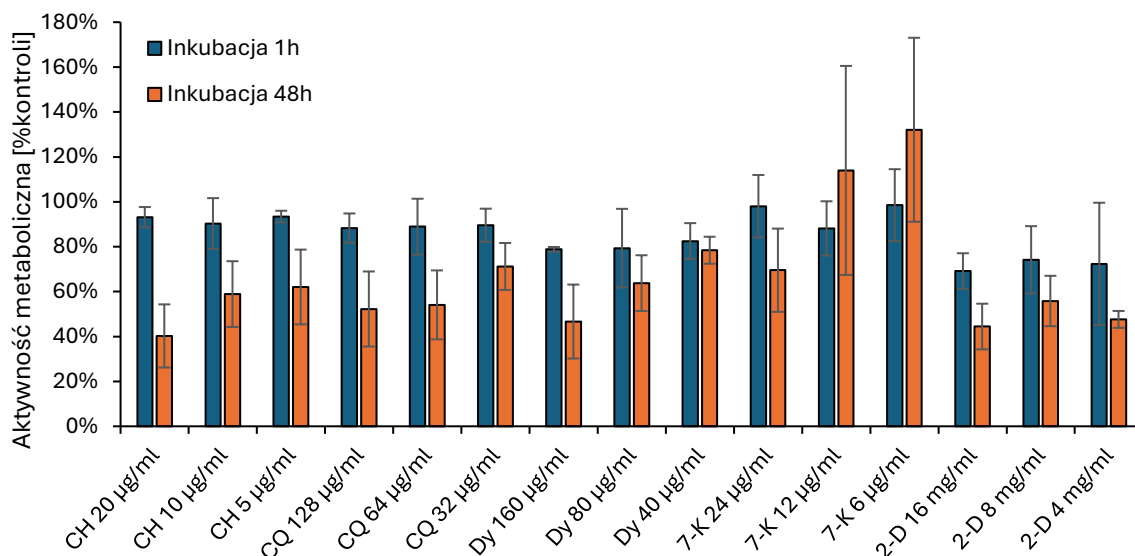
W przypadku prawidłowych komórek linii LL-24 1 h inkubacja z inhibitorami nie obniżyła znacząco aktywności metabolicznej komórek. Duży rozrzut wartości zaobserwowano dla 2-deoksyglukozy. Jednak nawet w tym przypadku najniższe zarejestrowane wartości dla stężeń 16, 8 i 4 mg/ml wynosiły odpowiednio 64%, 65%, 83% kontroli. Wartości średnie wynosiły odpowiednio 91%, 103% i 104%. W przypadku inkubacji 48 h najniższą aktywność metaboliczną zanotowano dla próbek chlorochinonu. Stanowiła ona ok. 30% wartości kontroli (Ryc.35).



Ryc. 35 Aktywność metaboliczna komórek LL-24 inkubowanych z wybranymi inhibitorami szlaków endocytozy.

3.4.1.3. Cytotoksyczne działanie inhibitorów na komórki linii HUVEC

W przypadku prawidłowych komórek linii HUVEC podczas 1 h inkubacji najniższą aktywność metaboliczną odnotowano dla 2-deoksyglukozy (Ryc.36). W tym przypadku aktywność metaboliczna próbek o stężeniu 16, 8 i 4 mg/ml wynosiła odpowiednio 69%, 74% i 72% kontroli. W przypadku 48 h inkubacji z 2-deoksyglukozą aktywność metaboliczna spadała o około połowę dla wszystkich stężeń. Najniższą aktywność metaboliczną zaobserwowano dla najbardziej stężonej próbki chloropromazyny. Stanowiła ona ok. 40% wartości sygnału dla kontroli.



Ryc. 36 Aktywność metaboliczna komórek HUVEC inkubowanych z wybranymi inhibitorami szlaków endocytozy.

3.4.1.4. Wnioski

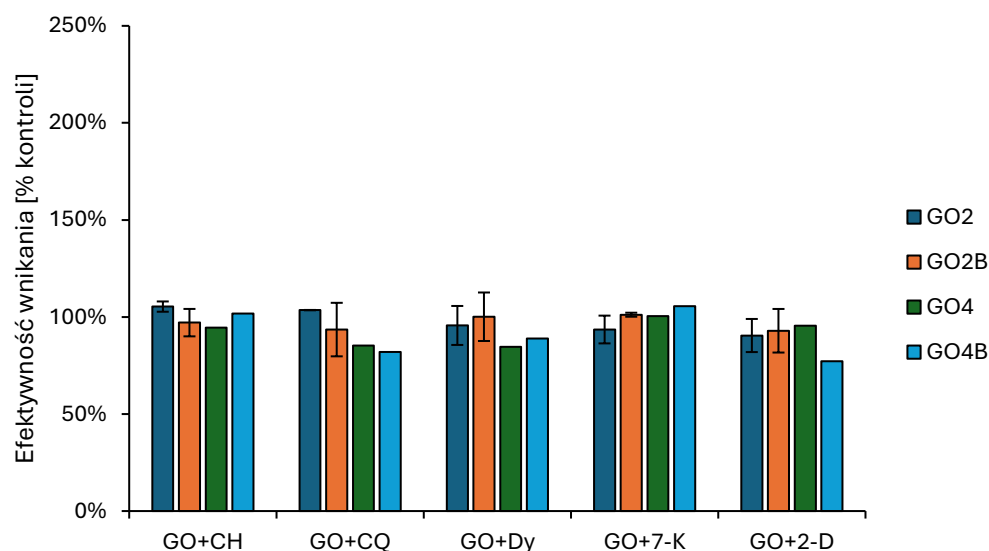
W przypadku 1 h inkubacji aktywność metaboliczna wszystkich komórek utrzymywała się na poziomie bliskim kontroli. Nawet aktywność komórek inkubowanych z najwyższymi stężeniami próbek nie spadła poniżej 70%. Dlatego do dalszych badań użyto chloropromazyny o stężeniu 20 µg/ml, chlorochinonu o stężeniu 128 µg/ml, Dynasoru o stężeniu 160 µg/ml, 7-ketocholesterolu o stężeniu 24 µg/ml oraz 2-deoksyglukozy o stężeniu 16 mg/ml.

3.4.2. Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek

Mechanizm wnikania pochodnych GO do komórek ssaczych oceniano analogicznie do efektywności wnikania. Inhibitory i frakcje GO2, GO2B, GO4 i GO4B inkubowano z komórkami linii A549, LL-24 i HUVEC. Próbą kontrolną były frakcje inkubowane wyłącznie z próbkami utlenionego grafenu. Z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oceniono intensywność fluorescencji wszystkich próbek. Intensywność fluorescencji była proporcjonalna dla efektywności wnikania. Porównano intensywności sygnału utlenionego grafenu inkubowanego z inhibitorami z intensywnością sygnału kontroli. Przyjmuje się, że jeśli inhibitor znacznie obniża wnikanie utlenionego grafenu, blokowany przez niego szlak bierze udział w wchłanianiu grafenu do komórek ⁷⁰. Wyniki przedstawiono jako % intensywności sygnału kontroli.

3.4.2.1. Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek A549

W przypadku frakcji GO2 i GO2B nie zauważono zahamowania wnikania dla wszystkich z badanych próbek, nawet dla 2-deoksyglukozy (2-D). 2-deoksyglukoza jest inhibitorem transportu aktywnego. Brak zahamowania wnikania dla próbki z 2-deoksyglukozą może wskazywać na pasywny charakter mechanizmu wnikania. W przypadku próbek GO4 i GO4B udało się wykonać tylko jeden pomiar (stąd brak odchylenia standardowego na wykresie). Również w tym przypadku nie odnotowano znaczących spadków efektywności wnikania. Największy spadek efektywności wnikania odnotowano dla GO4B inkubowanej z 2-deoksyglukozą. Wynosił on 77% efektywności kontroli. Może to świadczyć o tym, że przynajmniej część transportu odbywa się w sposób aktywny (Ryc.37).

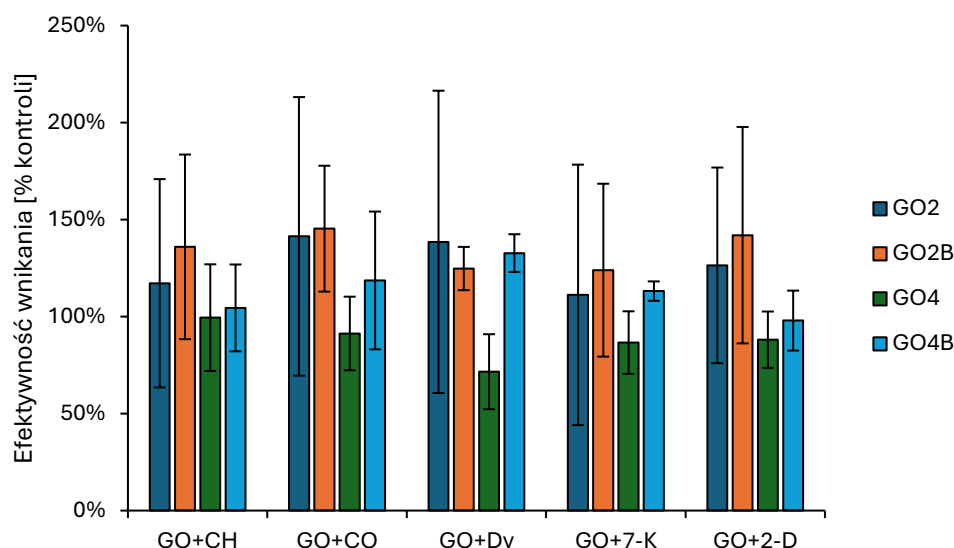


Ryc. 37 Efektywność wnikania próbek utlenionego grafenu do komórek linii A549 w obecności inhibitorów wyrażona jako % efektywności kontroli.

3.4.2.2. Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek LL-24

Pomiary wykonane dla komórek LL-24 cechują się dużym rozrzutem wyników, zwłaszcza dla frakcji GO2 i GO2B. Na podstawie przedstawionych wyników można przypuszczać, że żaden z użytych inhibitorów nie miał wpływu na efektywność wnikania utlenionego grafenu. W przypadku frakcji GO2 i GO2B, płatki badanego materiału prawdopodobnie wniknęły w większej ilości niż w przypadku kontroli, jednak ze względu na duży rozrzut wyników nie można dojść do jednoznacznej konkluzji (Ryc. 38). Największy średni spadek efektywności wnikania zanotowano dla frakcji GO4B inkubowanej z Dynasore. Wynosił on ok. 72%. Jednak również w tym przypadku nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków ze względu na duże

wartości odchylenia standardowego. Przypuszczenia o istotnym wpływie Dynasore na wnikanie płatków poddaje w wątpliwość fakt, że w przypadku 2-deoksyglukozy efekt był mniejszy. 2-deoksyglukoza jest ogólnym inhibitorem wszystkich szlaków endocytozy ⁶⁴. Dlatego efekt hamowania powinien być co najmniej tak samo znaczący jak każdego innego specyficznego inhibitora.



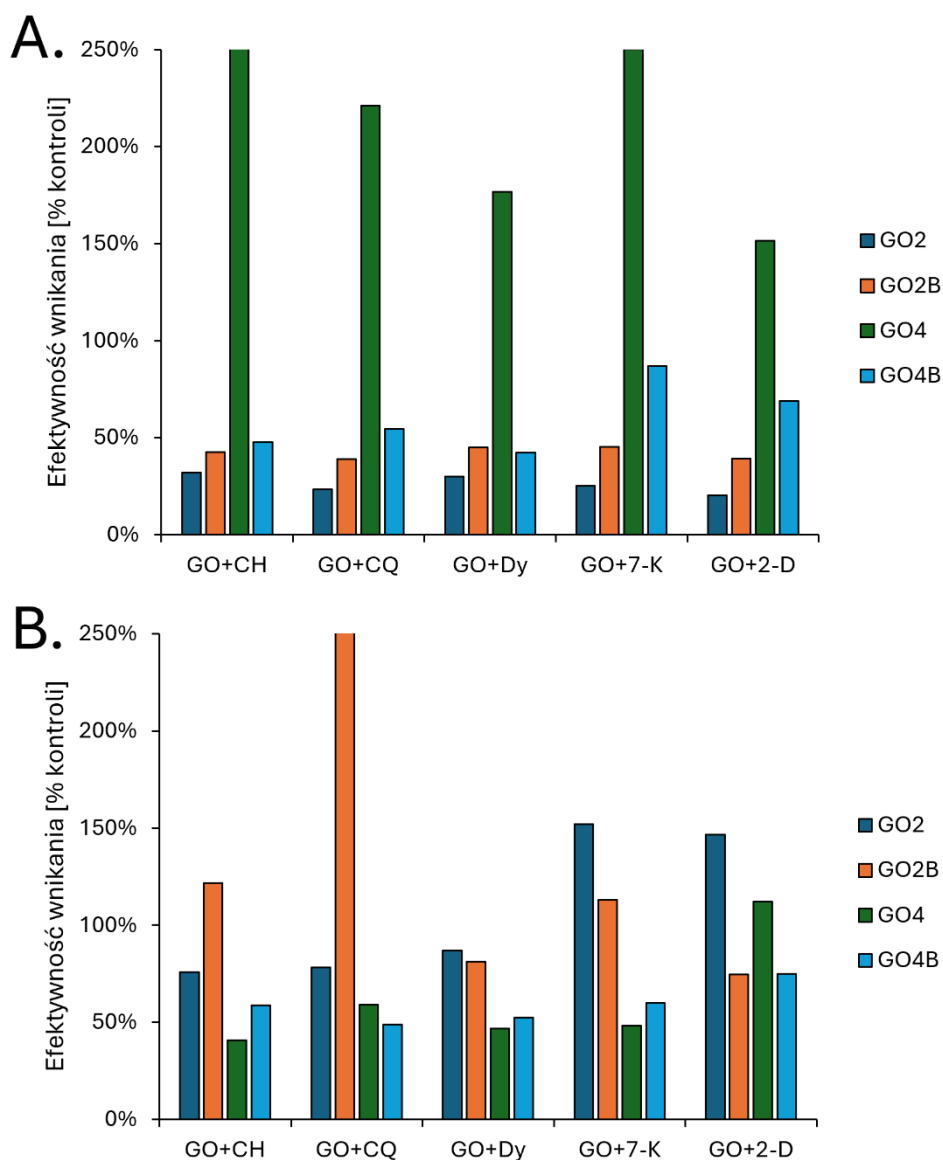
Ryc. 38 Efektywność wnikania próbek utlenionego grafenu do komórek linii LL-24 w obecności inhibitorów wyrażona jako % efektywności kontroli.

3.4.2.3. Badanie mechanizmu wnikania GO do komórek HUVEC

W przypadku prawidłowych komórek HUVEC przeprowadzono dwa niezależne pomiary. Jednak ze względu na bardzo duże rozbieżności wyników przedstawiono je na dwóch oddzielnych wykresach. W przypadku 1 pomiaru (Ryc. 39 A) odnotowano kilkukrotnie wyższą efektywność wnikania w przypadku frakcji GO4 w porównaniu do kontroli. Tak wysokie wartości mogą wskazywać na błąd pomiarowy. Dalsze badania byłyby niezbędne, aby zidentyfikować przyczynę tego błędu. W przypadku frakcji GO2 i GO2B zauważono zahamowanie wnikania w obecności wszystkich inhibitorów. W przypadku GO2 efektywność wnikania spadła do 20-30% w zależności od inhibitora. W przypadku GO2B efektywność wnikania spadła do 40-50% w zależności od inhibitora. Może to oznaczać, że w internalizację grafenu zaangażowany jest więcej niż jeden szlak endocytozy. W przypadku frakcji GO4B najmniejszy wpływ na efektywność wnikania zarejestrowano dla 7-ketocholesterolu. Efektywność wnikania płatków GO4B współinkubowanych z 7-ketocholesterolem wynosiła

87%. Inne specyficzne inhibitory (CH, CQ i Dy) obniżyły efektywność wnikania do ok. 40-55% względem kontroli w zależności od inhibitora. Jednak 2-deoksyglukoza, będąca ogólnym inhibitorem transportu aktywnego, zahamowała wnikanie jedynie do 69% wartości kontrolnej. Teoretycznie 2-deoksyglukoza powinna hamować wnikanie tak samo efektywnie jak inhibitory specyficzne. W celu wyjaśnienia tej sprzeczności potrzebne jest wykonanie większej ilości testów.

W przypadku pomiaru 2 (Ryc.39 B) zauważono kilkukrotnie wyższą efektywność wnikania w przypadku frakcji GO2B współinkubowanej z chlorochinonem w porównaniu do kontroli. Tak jak w przypadku frakcji GO4 w pomiarze 1, ocenienie tego zjawiska wymagałoby dodatkowych badań. 2-deoksyglukoza jedynie w małym stopniu zahamowała wnikanie frakcji GO2B. Efektywność wnikania wynosiła 75% kontroli. W przypadku Dynasore efektywność wnikania GO2B wynosiła 81% kontroli. Pozostałe inhibitory nie hamowały procesu wnikania płatków GO2B do komórek. W przypadku frakcji GO2 7-ketocholesterol i 2-deoksyglukoza nie hamują internalizacji płatków. W przypadku pozostałych inhibitorów efektywność wnikania wynosi 80-90% kontroli. W przypadku GO4 2-deoksyglukoza nie hamowała wnikania. Pozostałe inhibitory obniżały efektywność wnikania do ok.40-60% wartości dla kontroli. W przypadku frakcji GO4B zauważono podobne zjawisko z tą różnicą, że 2-deoksyglukoza obniżała wnikanie do 75% wartości kontroli. Otrzymane wyniki mogą wskazywać na zaangażowanie wielu mechanizmów internalizacji we wnikanie GO do komórek. Tak jak w wyżej opisanych przypadkach zastanawiają wysokie wartości efektywności wnikania dla komórek inkubowanych z 2-deoksyglukozą.



Ryc. 39 Efektywność wnikania próbek utlenionego grafenu do komórek linii HUVEC w obecności inhibitorów wyrażona jako % efektywności kontroli. A) Pomiar 1. B) Pomiar 2.

3.4.3. Wnioski

Tematyka niniejszej pracy nie obejmowała dokładnego poznania szlaków wnikania utlenionego grafenu do komórek. Jednak uzyskanie tych informacji uznano za interesujące uzupełnienie badań. W rezultacie podjęto próbę ustalenia mechanizmu wnikania GO do komórek. Niestety z powodu ograniczonych ram czasowych i materiałowych, nie udało się wykonać zadowalającej liczby powtórzeń testowych dla badanych próbek. W związku z tym wyniki eksperymentów wydają się być sprzeczne i niejednoznaczne. W przypadku komórek A549 i LL-24 nie zauważono wpływu inhibitorów na wnikanie GO do komórek. W tym

przypadku można przypuszczać, że płatki GO wnikały do komórek pasywnie. Prosta dyfuzja przez błonę nie mogła zajść ze względu na duży rozmiar płatków. Bardziej prawdopodobnym mechanizmem wydaje się „przecinanie” błony komórkowej płatków przez płatki i interakcja GO z lipidami błony komórkowej. Jednak ten typ transportu oznaczałby przerwanie błony komórkowej i w następstwie prawdopodobną śmierć komórki. Jednak w toku badań nie zauważono przerwania błon komórkowych ani zwiększonej śmiertelności komórek. Innym wyjaśnieniem jest adsorpcja płatków na zewnętrznej stronie błony komórkowej. Jednak zdjęcia z mikroskopu konfokalnego oraz wyniki testów cytometrycznych efektywności wnikania wskazują na to, że przynajmniej część przeniknęła przez błonę komórkową. Z kolei w przypadku linii HUVEC zauważono wpływ inhibitorów na wnikanie. W tym przypadku mamy prawdopodobnie do czynienia z transportem aktywnym w który jest zaangażowany więcej niż jeden szlak wnikania. Zastanawiający jest jednak efekt silniejszej inhibicji dla inhibitorów konkretnych szlaków wnikania (CH, CQ, Dy i 7-K) niż dla inhibitora transportu aktywnego (2-D). Teoretycznie, zahamowanie całego transportu aktywnego powinno mieć zawsze większy lub równy wpływ na wnikanie niż zahamowanie konkretnego szlaku wnikania ⁷⁷.

Poznanie mechanizmu wnikania materiałów do komórek ssaczych jest bardzo ważnym zagadnieniem w kontekście materiałów o potencjalnym zastosowaniu w medycynie. Dlatego, mimo że nie był to główny cel niniejszej pracy, podjęto próbę poznania mechanizmu wnikania GO do komórek. Niestety niejednoznaczność wyników i niewystarczająca liczba powtórzeń w niektórych przypadkach, uniemożliwiły wyciągnięcie wiążących wniosków. Zjawisko wnikania materiałów do komórek jest niezwykle złożonym zagadnieniem. W celu jego poznania niezbędne są dalsze badania uwzględniające wieloaspektową naturę tego zjawiska.

3.5. Badania lokalizacji wewnątrzkomórkowej utlenionego grafenu

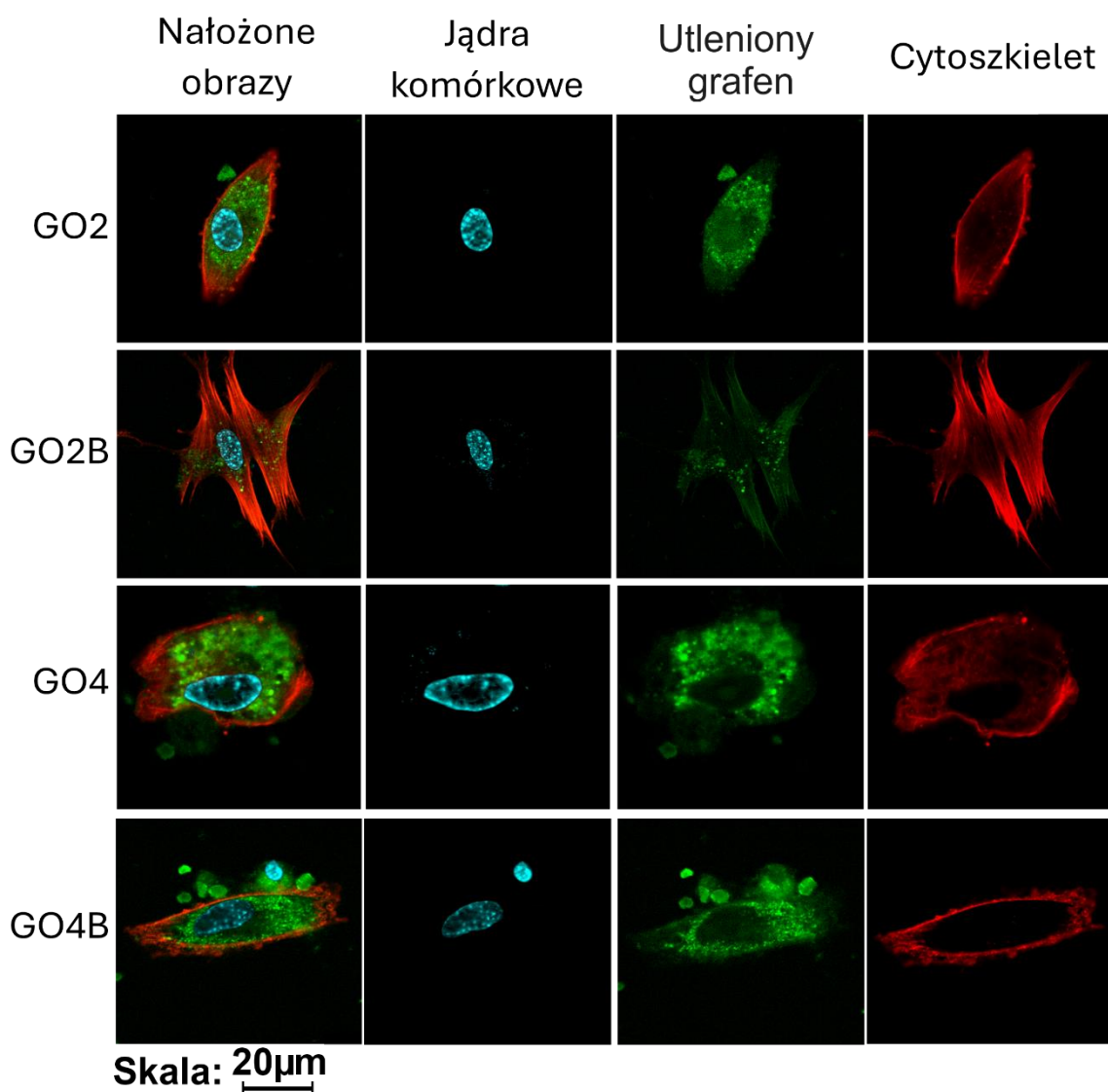
W celu potwierdzenia pomyślniej internalizacji GO do komórek wykonano obserwację z użyciem mikroskopu konfokalnego. Docelowa lokalizacja materiału w komórce może dostarczyć informacji na temat drogi wnikania badanego materiału przez błonę komórkową do wnętrza komórki lub na temat dalszych oddziaływań z komórką. Jeśli materiał znajduje się w cytoplazmie, może on oddziaływać z komórką swobodniej niż materiał zamknięty w organellach takich jak endo-, lizo- czy egzosomy. Może to też oznaczać, że materiał potrafi przedostać się z endosomów i lizosomów do cytoplazmy lub wniknął bez pośrednictwa pęcherzyków endosomalnych. Materiał, który nie jest w stanie wydostać się z endosomów będzie również bardziej podatny na usuwanie go z komórki na drodze egzocytozy. Z kolei

akumulacja materiału w jądrze może świadczyć o jego genotoksyczności lub o potencjalnym zastosowaniu w terapii genowej^{63,117}.

W celu oceny wewnątrzkomórkowej lokalizacji frakcji GO2, GO2B, GO4 i GO4B w komórkach A549, LL-24 i HUVEC wykonano dwa rodzaje barwień. W obu przypadkach frakcje GO były wyznakowane FITC dającym zielony sygnał fluorescencyjny. Wybarwienie jądra komórkowego barwnikiem Hoechst i cytoszkieletu koniugatem AlexaFluor™633-Falloidyna pozwoliło na określenie wewnątrzkomórkowego położenia GO w cytoplazmie i względem jądra komórkowego. Z kolei wybarwienie błon komórkowych barwnikiem BioTracker™ 400 Blue miało za zadanie określenie interakcji między płatkami GO a błonami komórki. Badania przeprowadzono dla 1 h i 48 h inkubacji komórek z próbkami materiału o stężeniu 50 µg/ml. Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Umożliwiło to uzyskanie obrazów z konkretnych płaszczyzn komórki.

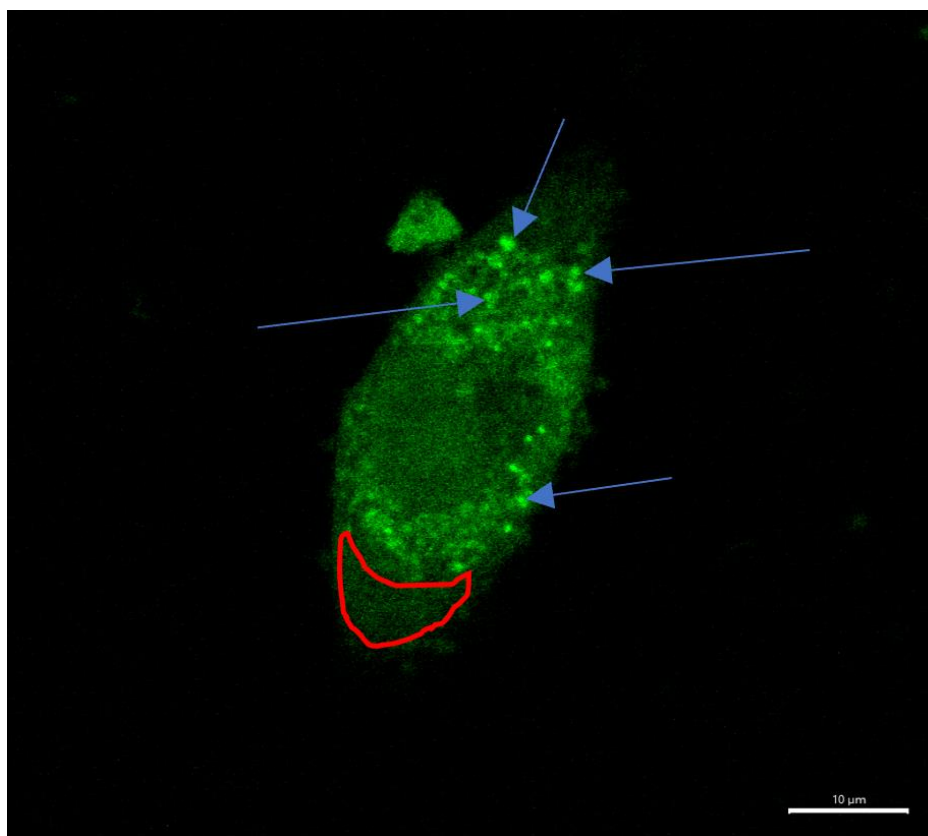
3.5.1. Lokalizacja GO w komórkach A549

Poniżej przedstawiono przykładowe obrazy otrzymane w wyniku wybarwienia jąder (Hoechst) i cytoszkieletu (AlexaFluor™633-Falloidyna) komórek A549 inkubowanych z frakcjami GO przez 1 h (Ryc.40).



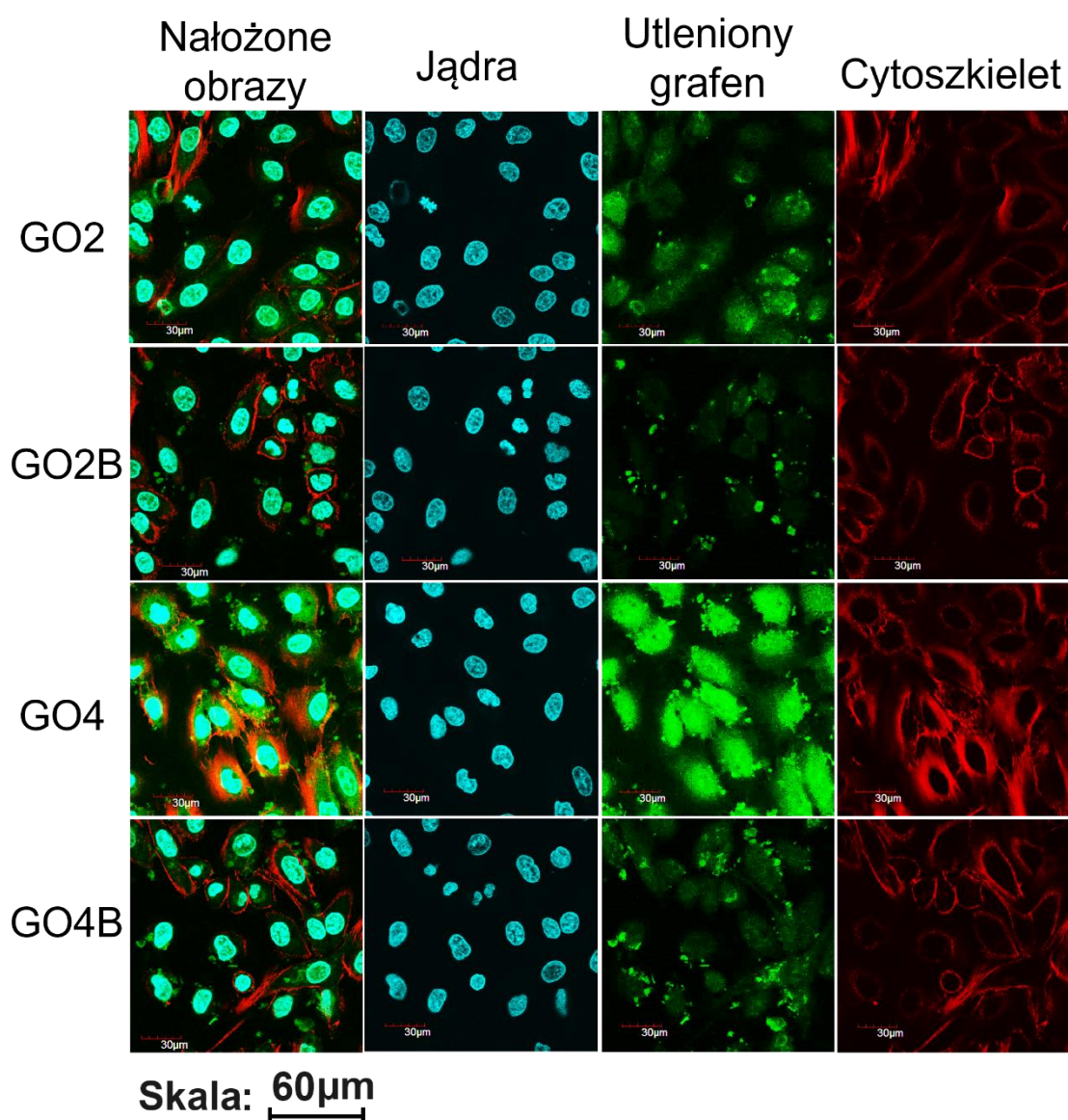
Ryc. 40 Obrazy komórek A549 z wybarwionym cytoszkieletem i jądrem komórkowym inkubowane z próbkami GO przez 1 h.

Zinternalizowany GO był widoczny w postaci zielonego sygnału. Dla wszystkich frakcji GO zaobserwowano sygnał w postaci ziarnistości zlokalizowany w pobliżu jądra komórkowego. Oznacza to, że płatki utlenionego grafenu mogą znajdować się wewnątrz pęcherzyków błonowych komórki takich jak lizosomy i endosomy (Ryc.41). W przypadku frakcji GO4 zaobserwowano sygnał punktowy, jednak nie tak wyraźny jak w przypadku pozostałych frakcji. Prawdopodobnie w tym przypadku początkowo ostry punktowy sygnał uległ rozmyciu w wyniku uwolnienia płatków GO z pęcherzyków do cytoplazmy. Ponadto w przypadku wszystkich frakcji zaobserwowano równomierny w całej objętości komórki sygnał. Pochodzi on od GO prawdopodobnie zdyspergowanego w cytoplazmie w stanie wolnym.



Ryc. 41 Punktowy sygnał od GO zamkniętego w pęcherzykach błonowych (niebieskie strzałki) oraz rozmyty sygnał od GO znajdującego się w cytoplazmie (czerwony obszar).

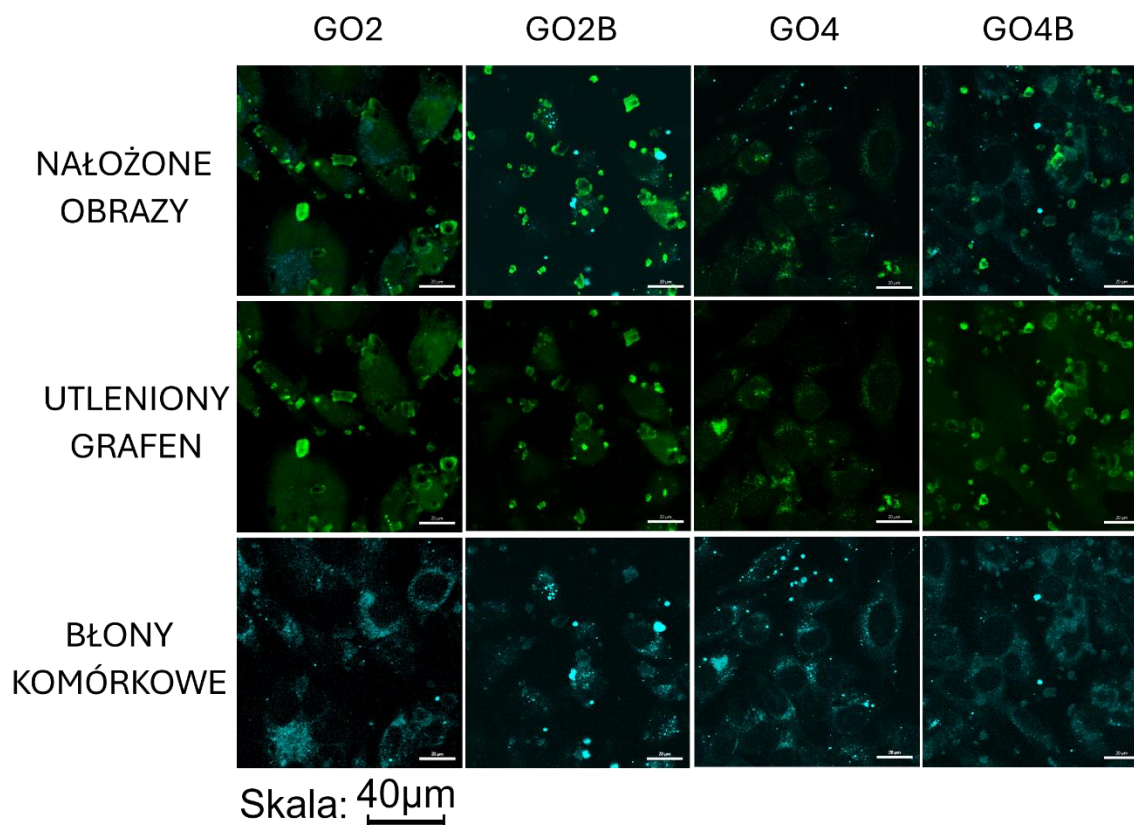
Analogiczne barwienie zostało wykonane dla 48 h inkubacji (Ryc.42). Również w tym przypadku zaobserwowano jednolity, zdyspergowany sygnał. Oznacza to, że płatki wszystkich badanych frakcji GO występowały głównie w stanie wolnym w cytoplazmie. Punktowy sygnał pochodzący od GO mogącego być otoczonym przez organelle komórkowe był mniej zauważalny. Zwiększona obecność GO w cytoplazmie może wynikać z faktu dłuższej inkubacji. Dłuższa inkubacja to więcej czasu na uwolnienie płatka utlenionego grafenu z pęcherzyka błonowego do cytoplazmy.



Ryc. 42 Obrazy komórek A549 z wybarwionym cytoszkieletem i jądrem komórkowym inkubowane z GO przez 48 h.

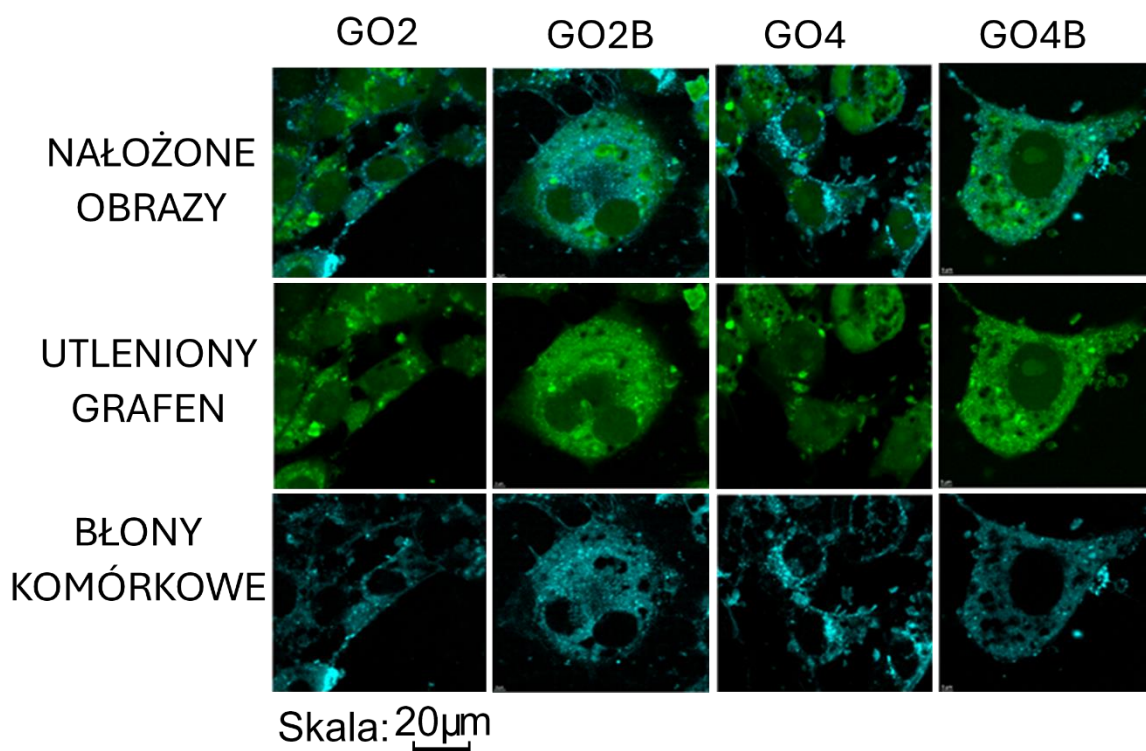
Wybarwiono błony komórkowe w komórkach linii A549 i inkubowano z frakcjami GO przez 1 h (Ryc. 43). Wybarwienie błony komórkowej umożliwiło dokładniejszą ocenę stopnia kolokalizacji badanych próbek z pęcherzykami błonowymi. Dla każdej frakcji zauważono agregaty GO zlokalizowane poza obrysem komórki. Przylegały one do zewnętrznej strony błony komórkowej. W przypadku frakcji GO2, GO2B i GO4B nie odnotowano wyraźnej kolokalizacji utlenionego grafenu i wewnętrznych struktur błonowych. Płatki utlenionego grafenu tych frakcji były zlokalizowane wolne w cytoplazmie. Wynik ten dziwi w kontekście wyraźnego punktowego sygnału komórek z wybarwionym cytoszkieletem i jądrem, ponieważ inkubacja komórek z GO miała w obu przypadkach identyczny przebieg. Należy jednak

pamiętać, że internalizacja materiałów do komórek to proces dynamiczny. W przypadku komórek z wybarwionymi błonami nie wyklucza się, że płatki GO2, GO2B i GO4B również początkowo były zamknięte w lizo- lub endosomach, jednak w chwili uzyskania obrazu większość płatków przedostała się z pęcherzyków błonowych do cytoplazmy. W przypadku frakcji GO4 można zauważyć wyraźny sygnał od utlenionego grafenu zamkniętego w pęcherzykach błonowych.



Ryc. 43 Obrazy komórek A549 z wybarwionymi błonami komórkowymi inkubowane z GO przez 1 h.

Na uwagę zasługuje fakt, że po 48 h inkubacji, dla frakcji GO2, GO2B i GO4B, zauważono kolokalizację utlenionego grafenu i struktur błonowych, natomiast dla GO4 nie (Ryc. 44). Jest to sytuacja odwrotna niż w przypadku inkubacji 1 h. Należy pamiętać, że GO4 odznaczał się najefektywniejszym wnikaniem GO do komórek, natomiast internalizacja i dalsze interakcje materiał-komórka są procesami dynamicznymi. Zauważone różnice mogą być przejawem różnych dynamik procesów związanych z internalizacją GO, charakterystycznych dla poszczególnych frakcji.



Ryc. 44 Obrazy komórek A549 z wybarwionymi błonami komórkowymi inkubowane z GO przez 48h.

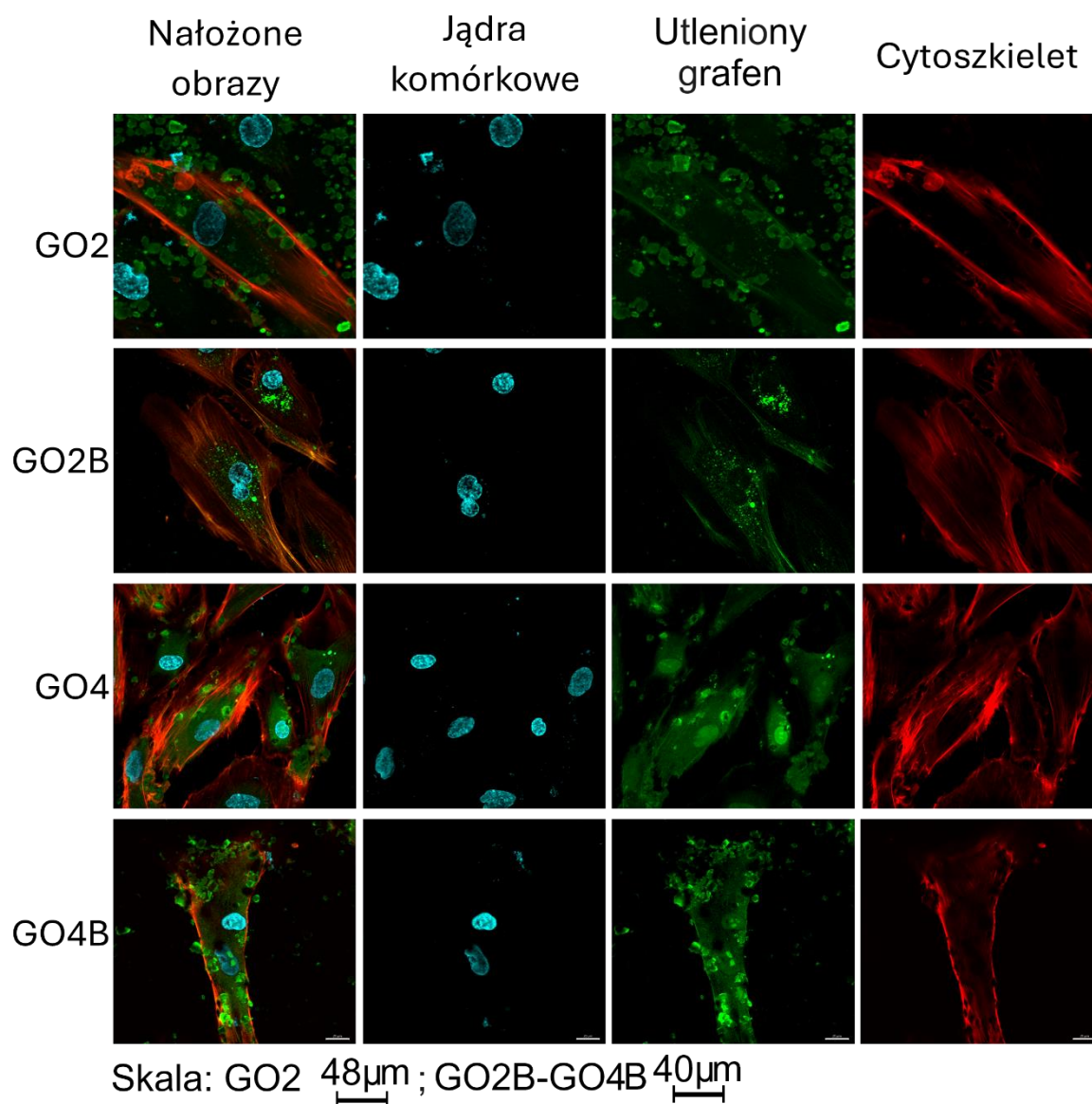
W celu przeprowadzenia analizy ilościowej wykorzystano program ImageJ. Z jego użyciem określono wartości intensywności sygnału pochodzącego od znakowanego FITC utlenionego grafenu, uzyskanego podczas obrazowania komórek (Tab. 7). Tak jak w przypadku pomiaru cytometrycznego (Ryc. 28 i 29) zaobserwowano wyraźny spadek intensywności sygnału dla materiałów GO preinkubowanych z surowicą. Również fakt, że najintensywniejszy sygnał pochodził od GO4 po 48 h inkubacji jest w zgodzie z dotychczasowymi ustaleniami. Zastanawiający jest jednak brak różnic w intensywności sygnału pomiędzy frakcjami GO2 i GO4 dla inkubacji 1 h. Dziwi również mniejszy sygnał dla frakcji GO2 inkubowanej przez 48 h w stosunku do sygnału tej samej frakcji inkubowanej przez 1 h. Wyjaśnienie tych różnic wymagałoby przeprowadzenia dodatkowych badań. Cytometria przepływowa jest metodą wysokoprzepustową umożliwiającą określenie większej ilości próbek niż przeprowadzona z użyciem ImageJ analiza obrazu. Dlatego ilościowe pomiary cytometryczne są bardziej wiarygodne niż analiza obrazu. Niemniej wyniki uzyskane z wykorzystaniem obu tych technik potwierdzają hamujący wpływ preinkubacji GO z surowicą na wnikanie tego materiału do komórek.

Tab. 7 Wartości intensywności sygnału GO w komórkach A549 uzyskanego na podstawie analizy zdjęć przeprowadzone z użyciem programu ImageJ.

Frakcja	Czas inkubacji			
	1 h		48 h	
	Intensywność sygnału [-]	SD	Intensywność sygnału [-]	SD
GO2	6,39	2,12	4,90	2,08
GO2B	3,44	1,99	1,70	0,98
GO4	5,28	2,48	9,06	3,08
GO4B	3,48	1,99	3,77	2,35

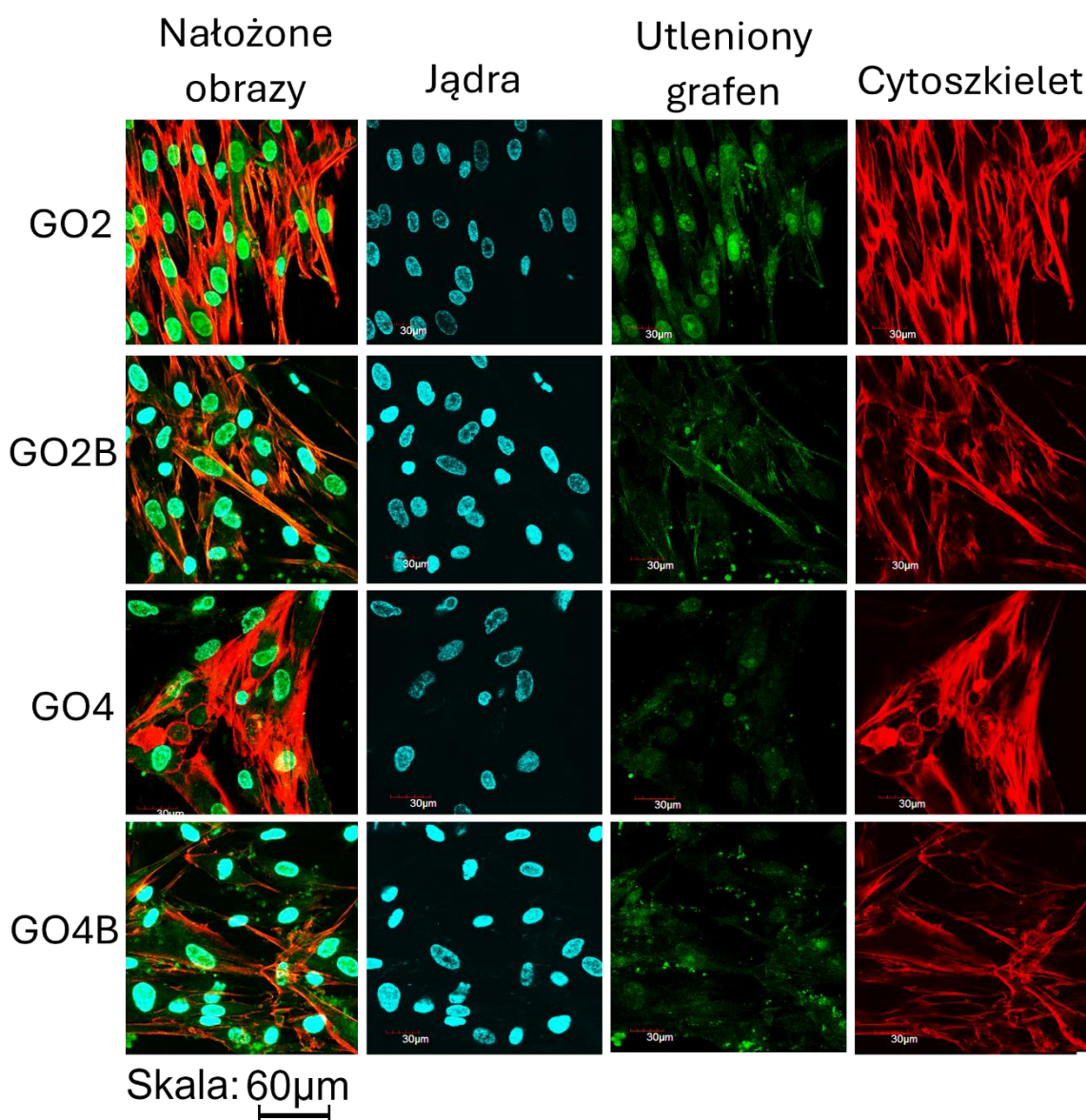
3.5.2. Lokalizacja GO w komórkach LL-24

W przypadku linii LL-24 inkubowanej z GO przez 1 h zauważono agregację większych płatków utlenionego grafenu na powierzchni błony komórkowej (Ryc.45). Zjawisko jest szczególnie widoczne dla GO2 i GO4B. W odróżnieniu od próbek inkubowanych z komórkami A549 tylko dla GO2B zaobserwowano punktowe sygnały GO mogące pochodzić od materiału zamkniętego w lizo- i endosomach. W przypadku GO2 i GO2B utleniony grafen prawdopodobnie nie wniknął lub wniknął tylko w małym stopniu do jądra komórkowego. W przypadku frakcji GO4 i GO4B zauważono odkładanie się GO w jądrze komórkowym. We wszystkich przypadkach większość płatków utlenionego grafenu znajdowała się w cytoplazmie.



Ryc. 45 Obrazy komórek LL-24 z wybarwionym cytoszkieletem i jądrem komórkowym inkubowane z GO przez 1 h.

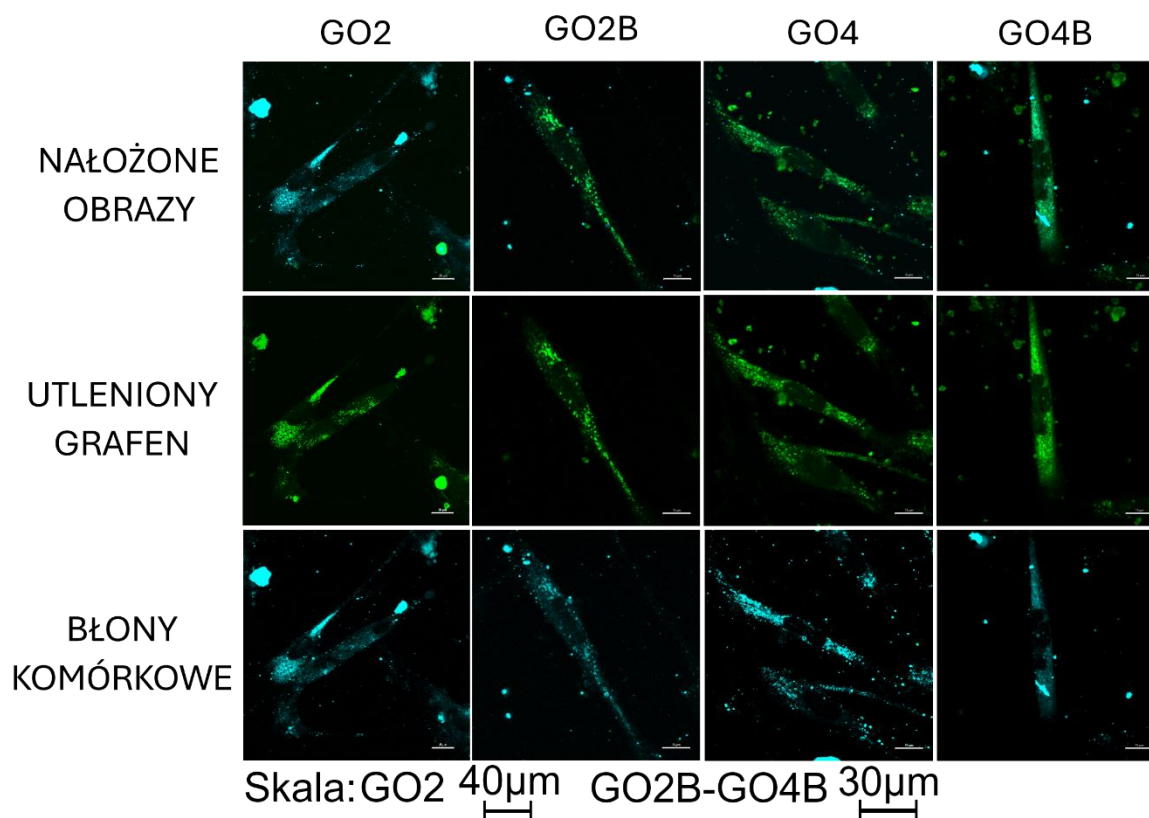
W przypadku 48 h inkubacji można zauważyć prawdopodobną akumulację GO w jądrze komórkowym LL-24 dla GO2, GO4 i GO4B (Ryc.46). We wszystkich przypadkach GO znajdował się wolny w cytoplazmie natomiast nie zauważono wyraźnych punktowych sygnałów świadczących o lokalizacji GO wewnątrz lizo- i endosomów.



Ryc. 46 Obrazy komórek LL-24 z wybarwionym cytoszkieletem i jądrem komórkowym inkubowane z GO przez 48 h.

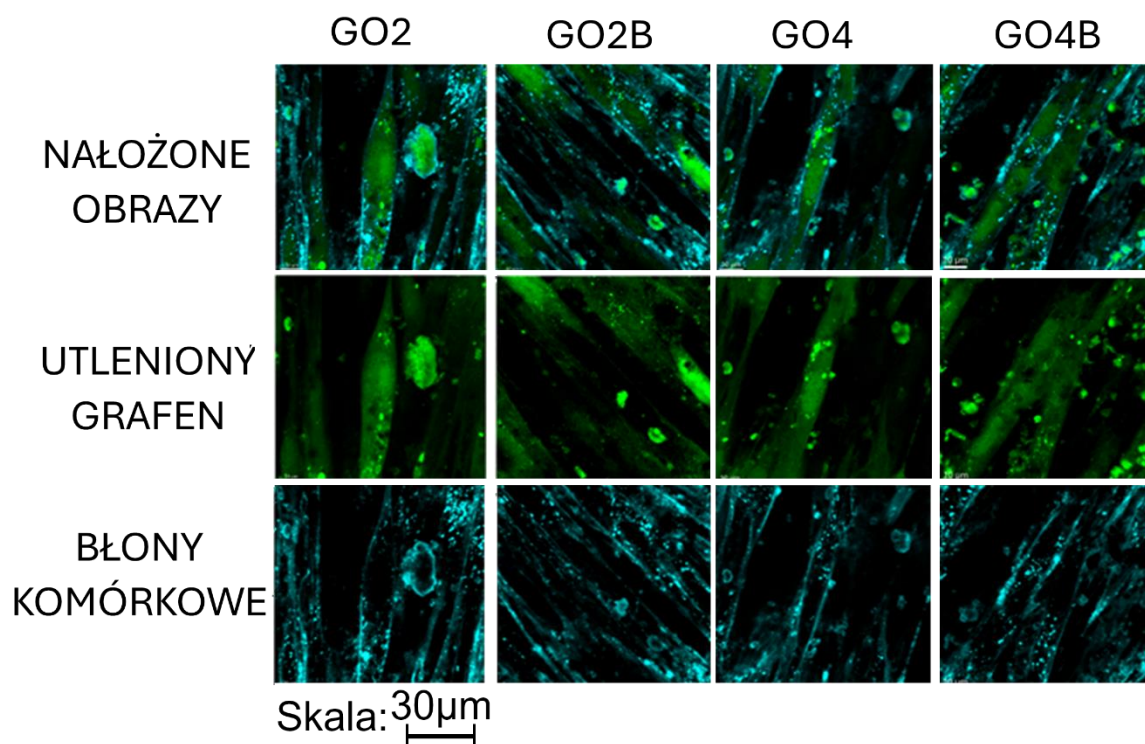
W przypadku komórek z wybarwionymi błonami komórkowymi inkubowanymi z GO przez 1 h wszystkie próbki wykazywały punktowy sygnał i kolokalizację z strukturami błonowymi (Ryc.47). Może to oznaczać, że do prawidłowych komórek linii LL-24 GO wniknął na drodze endocytozy. Interesujący jest fakt dystrybucji sygnałów punktowych wzdłuż osi komórki. W przypadku nowotworowych komórek linii A549 sygnały punktowe były skupione wokół jądra komórkowego. Prawdopodobnie wynika to z różnic w morfologii tych dwóch linii komórkowych. Tak jak w przypadku linii A549 istnieje różnica pomiędzy wynikami badań różniącymi się jedynie typem wykonanego barwienia. Dla GO2, GO4 i GO4B i barwienia cytoszkieletu nie zauważono sygnału punktowego, a dla tych samych próbek i barwienia błon

komórkowych już tak. Również w tym przypadku mogło dojść do zarejestrowania innych etapów tego samego, bardzo dynamicznego procesu, jednak na innych etapach jego realizacji. Oprócz sygnałów punktowych zarejestrowano sygnał świadczący o tym, że część GO znajduje się w cytoplazmie.



Ryc. 47 Obrazy komórek LL-24 z wybarwionymi błonami komórkowymi inkubowane z GO przez 1 h.

Dla próbki inkubowanej przez 48 h (Ryc.48). zauważono zanik sygnału punktowego. GO wszystkich frakcji znajdowało się wolne w cytoplazmie. Na podstawie porównania obrazów dla 1 h i 48 h inkubacji można wnioskować, że w początkowej fazie wnikania GO jest internalizowany do endo- i lizosomów. Następnie, wraz z upływem czasu sukcesywnie przedostaje się do cytoplazmy. Oznaczałoby to, że GO prawdopodobnie wchłaniany jest na drodze endocytozy, jednak potrafi uwolnić się z endosomalnego szlaku i akumulować się w cytoplazmie.



Ryc. 48 Obrazy komórek LL-24 z wybarwionymi błonami komórkowymi inkubowane z GO przez 48 h.

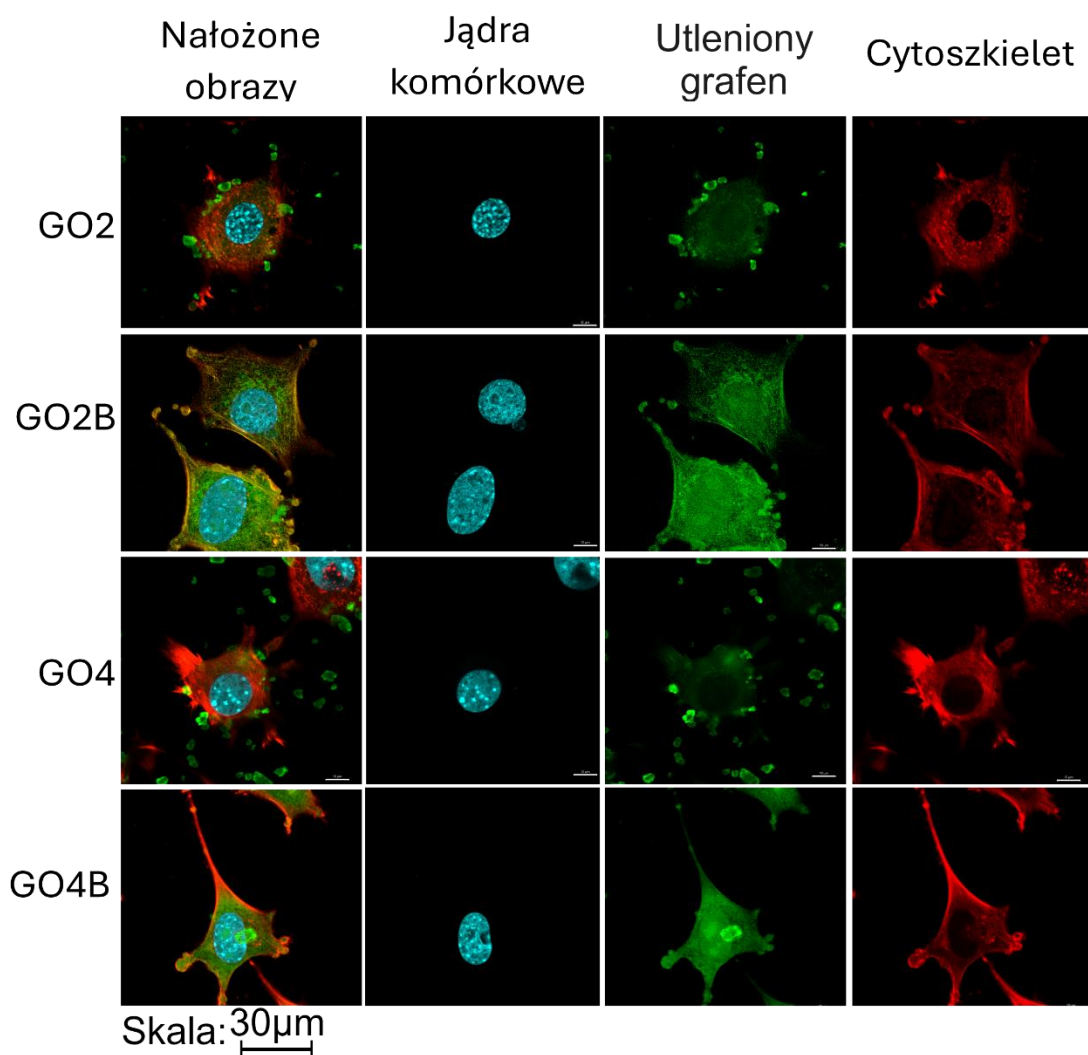
Poniżej zestawiono wartości sygnałów GO uzyskanych na drodze analizy obrazów z wykorzystaniem programu ImageJ (Tab.8). W przypadku inkubacji 1 h wartości sygnału dla GO2 są niższe niż dla GO4. Ponadto intensywność sygnału GO2 jest niższa niż dla GO2B co stoi w sprzeczności z dotychczasowymi wynikami. Dla GO4B zaobserwowano jedynie niewielki spadek intensywności sygnału. W przypadku 48 h inkubacji zaobserwowano mniejsze wartości sygnału dla próbek inkubowanych z surowicą w stosunku do frakcji nieinkubowanych z surowicą. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi na drodze pomiaru cytometrycznego. Zastanawia natomiast mniejsza intensywność sygnału dla GO4B w stosunku do GO2B. Aby wyjaśnić sprzeczności wymagane byłoby uzyskanie i analiza większej liczby zdjęć. Niemniej wyniki dla 48 h inkubacji i dla 1h inkubacji GO4 i GO4B potwierdzają hamujący wpływ surowicy ludzkiej na wnikanie GO do LL-24.

Tab. 8 Wartości intensywności sygnału GO w komórkach LL-24 uzyskanego na podstawie zdjęć.

Frakcja	Czas inkubacji			
	1 h		48 h	
	Intensywność sygnału [-]	SD	Intensywność sygnału [-]	SD
GO2	4,19	2,29	6,21	1,59
GO2B	5,34	0,99	4,22	1,61
GO4	5,02	2,34	5,61	1,93
GO4B	4,34	1,18	3,29	1,39

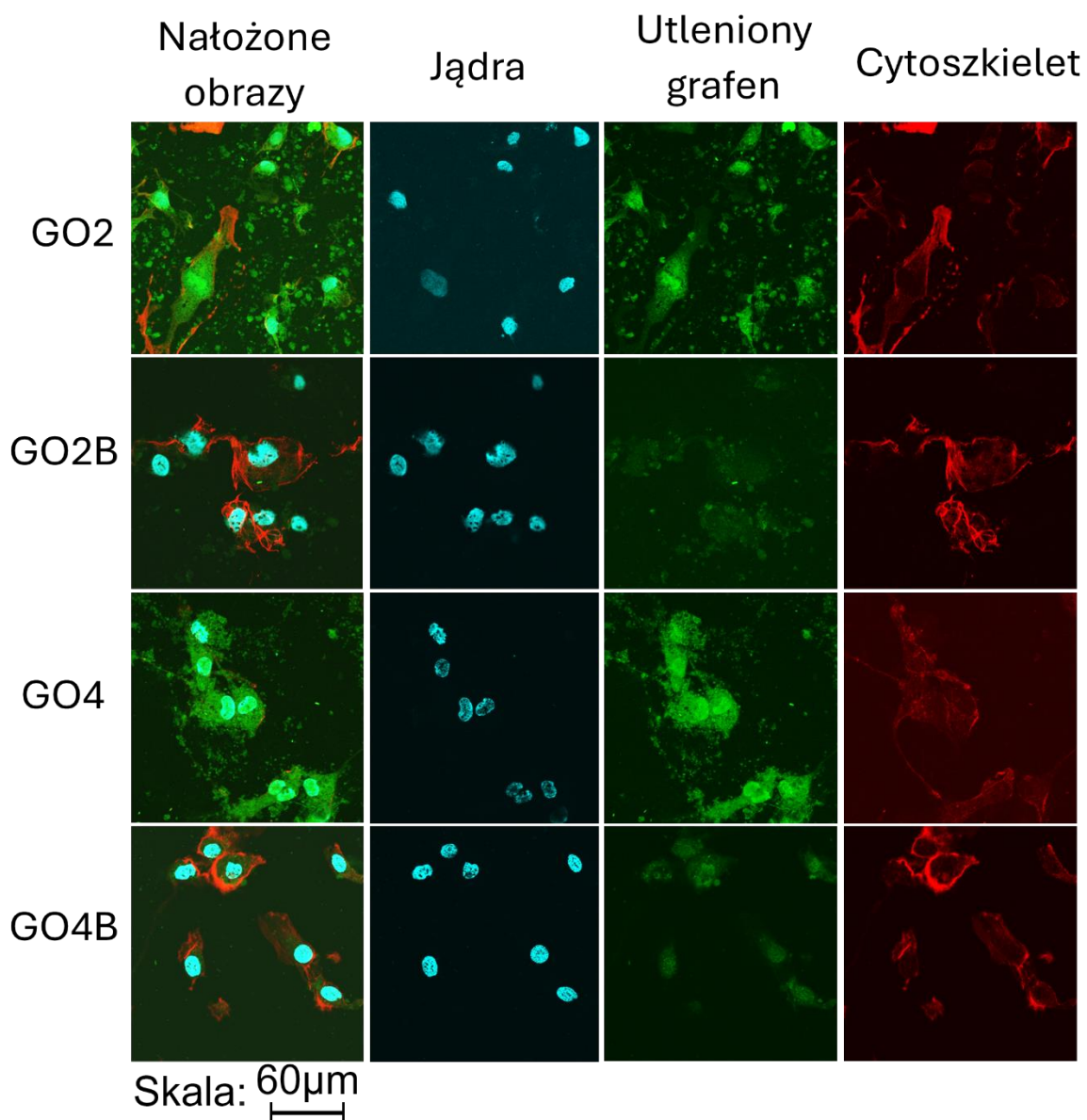
3.5.3. Lokalizacja GO w komórkach HUVEC

Komórkom linii HUVEC wybarwiono cytoszkielet (AlexaFluor™633-Falloidyna) i jądra komórkowe (Hoechst), a następnie inkubowano z GO przez 1 h. Na podstawie otrzymanych zdjęć stwierdzono, że w próbach nieinkubowanych z surowicą utleniony grafen nie wnikał do jądra komórkowego. Z kolei w próbach inkubowanych z surowicą obserwowano wnikanie GO do jąder komórkowych. Ponadto w przypadku frakcji GO2 i GO4 i GO4B większość płatków znajdowała się w cytoplazmie lub zagregowała na powierzchni błony. W przypadku frakcji GO2B zauważono dodatkowo punktowy sygnał pochodzący od GO zamkniętego w endo- i lizosomach (Ryc.49).



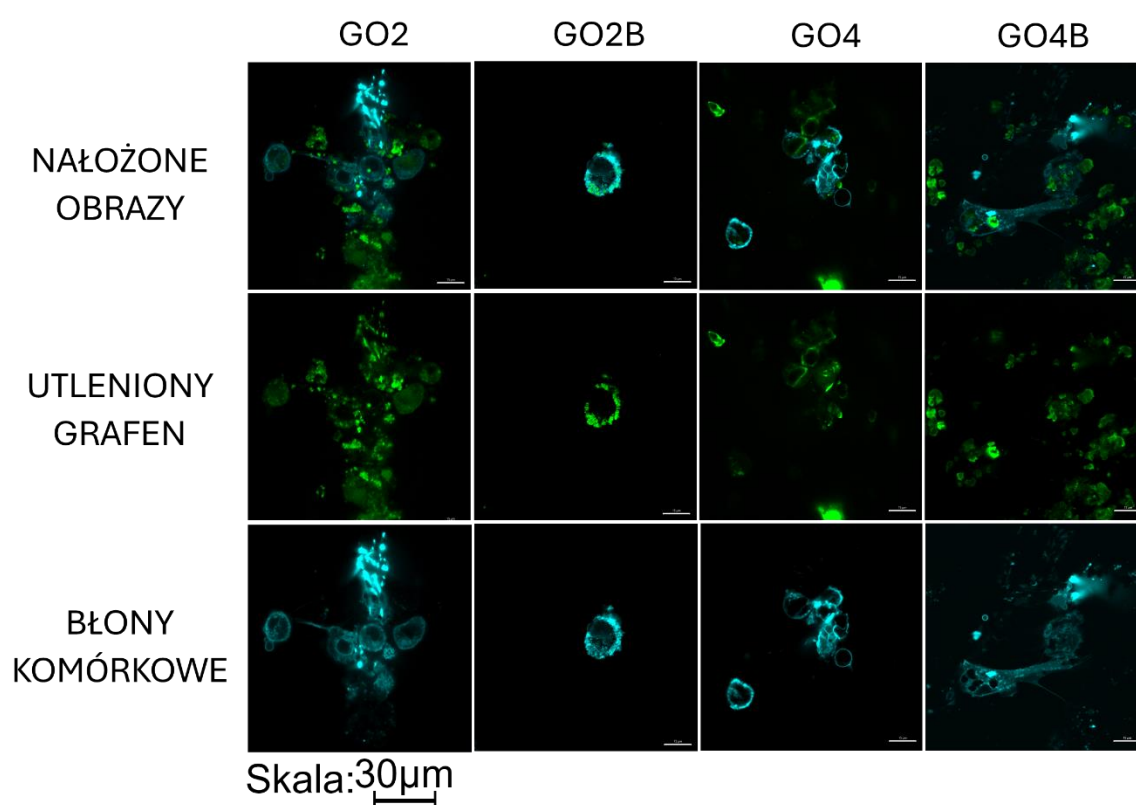
Ryc. 49 Obrazy komórek HUVEC z wybarwionym cytoszkieletem i jądrem komórkowym inkubowane z GO przez 1 h.

W przypadku 48 h inkubacji zauważono trend odwrotny niż w przypadku inkubacji 1 h. GO2 i GO4 wniknęły do jąder komórkowych, natomiast GO2B i GO4B nie wniknęły do jąder komórkowych (Ryc.50). Ponadto dla każdej z prób badanych nie zauważono punkowego sygnału pochodzącego od GO uwięzionego w pęcherzykach błonowych. Jest to zgodne z wynikami otrzymanymi dla komórek LL-24. Również w tym przypadku GO zamknięty jest w endo- i lizosomach prawdopodobnie we wczesnej fazie internalizacji i z czasem przechodząc do cytoplazmy.



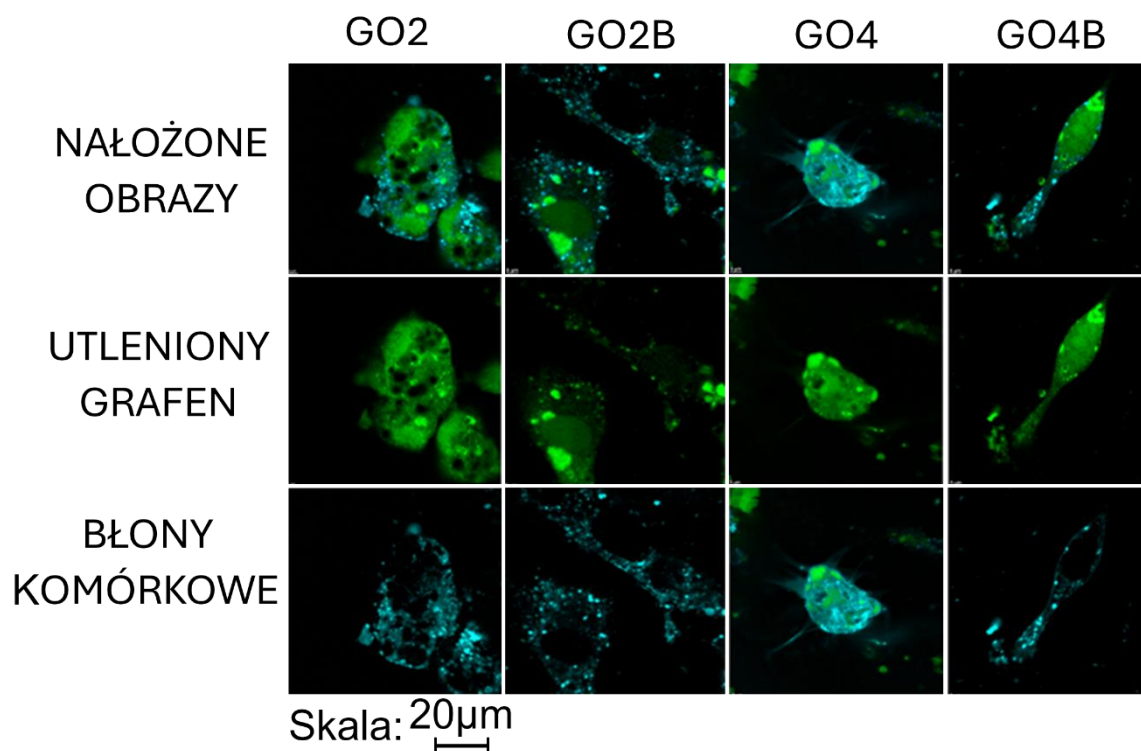
Ryc. 50 Obrazy komórek HUVEC z wybarwionym cytoszkieletem i jądrem komórkowym inkubowane z GO przez 48 h.

W przypadku komórek z wybarwionymi błonami komórkowymi i inkubowanymi 1 h z GO zauważono, że sygnał od płatków GO2B w całości pochodzi z materiału zamkniętego w pęcherzykach błonowych (Ryc.51). W przypadku GO2, GO4 i GO4B stopień kolokalizacji utlenionego grafenu i struktur błonowych był niski. Większość płatków zlokalizowana została w cytoplazmie.



Ryc. 51 Obrazy komórek HUVEC z wybarwionymi błonami komórkowymi inkubowane z GO przez 1 h.

W przypadku 48 h inkubacji (Ryc.52). większość sygnału pochodziła od utlenionego grafenu zlokalizowanego w cytoplazmie. Niewielki sygnał pochodzący od GO zamkniętego w strukturach błonowych zarejestrowano dla GO2B.



Ryc. 52 Obrazy komórek HUVEC z wybarwionymi błonami komórkowymi inkubowane z GO przez 48 h.

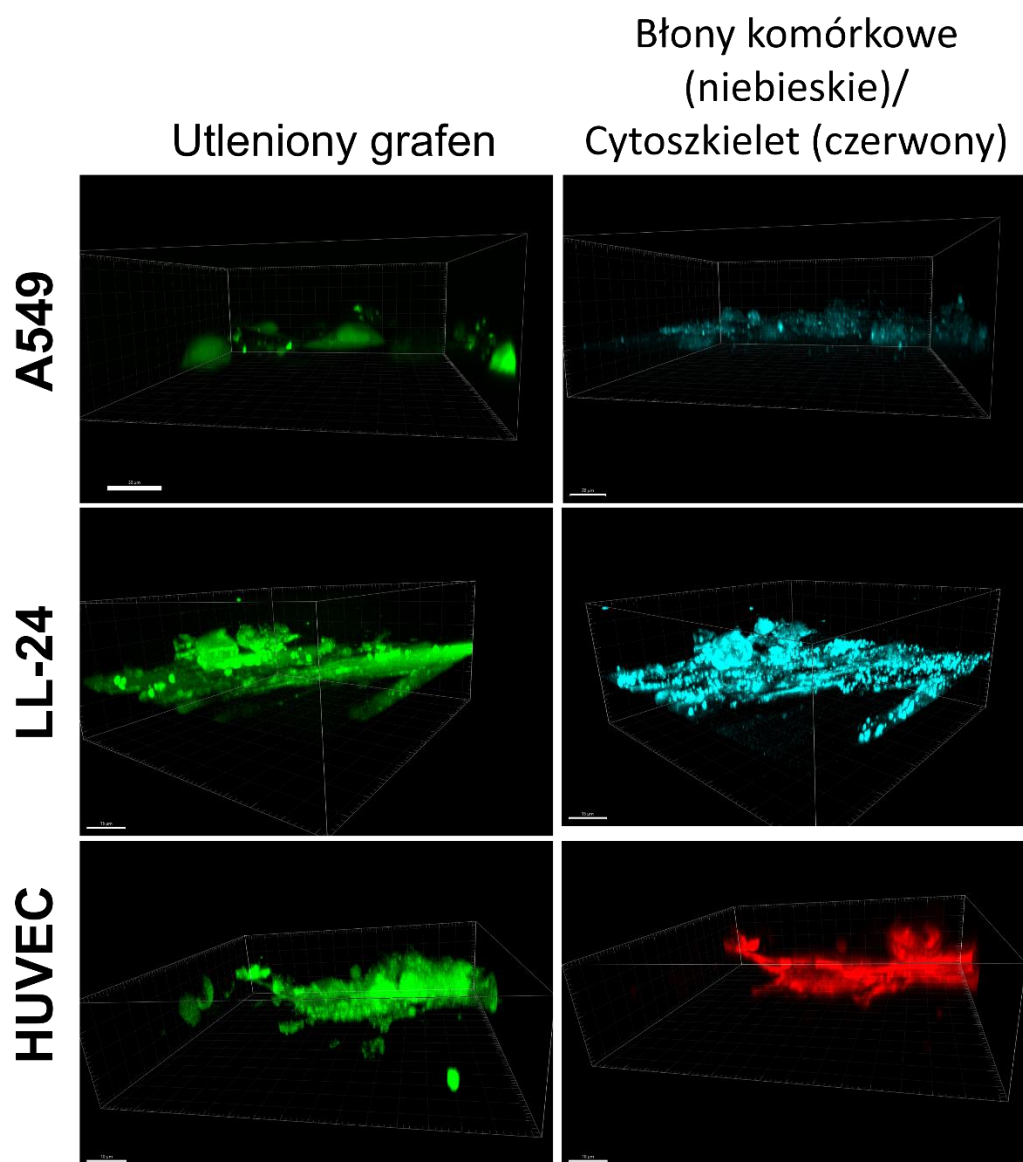
W tabeli przedstawiono wyniki pomiaru sygnału pochodzącego z GO na podstawie uzyskanych zdjęć (Tab.9). Wyniki analizy obrazu dla linii HUVEC są najbardziej zgodne z danymi cytometrycznymi spośród 3 badanych linii. Intensywność sygnału wzrasta wraz z czasem inkubacji, natomiast inkubacja z surowicą hamuje proces wnikania GO do komórek.

Tab. 9 Wartości intensywności sygnału GO w komórkach HUVEC uzyskanego na podstawie zdjęć.

Frakcja	Czas inkubacji			
	1 h		48 h	
	Intensywność sygnału [-]	SD	Intensywność sygnału [-]	SD
GO2	3,98	1,74	8,25	1,76
GO2B	1,61	1,05	4,64	2,09
GO4	3,43	1,94	11,31	2,10
GO4B	1,53	0,88	6,31	2,10

3.5.4. Obrazy 3D

W celu upewnienia się, że utleniony grafen znajduje się w środku komórki, a nie po zewnętrznej stronie błony, wykonano analizę zdjęć 3D wybranych próbek (Ryc.53). Wykonane obrazy 3D potwierdzają, że GO znajdował się w całej objętości komórki.



Ryc. 53 Zdjęcia 3D sygnału pochodzącego od GO zlokalizowanego wewnątrz komórek A549, HUVEC i LL-24.

3.5.5. Wnioski

Oceniono lokalizację płatków utlenionego grafenu w komórkach linii A549, LL-24 i HUVEC. Badania przeprowadzono dla czasów inkubacji wynoszących 1 i 48 h. Określono

położenie GO w komórce względem jądra komórkowego i pęcherzyków błonowych takich jak lizo- i endosomy. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że utleniony grafen, niezależnie od frakcji, zwiększa swoją akumulację wraz z czasem inkubacji z prawidłowymi komórkami HUVEC. Dla linii A549 i LL-24 wyniki analizy obrazu były w tym względzie niejednoznaczne. W przypadku linii A549 i LL-24 sygnał od pęcherzyków błonowych był wyraźny dla czasu inkubacji 1 h i malał po czasie inkubacji równym 48 h. Dla linii HUVEC sygnał od GO w pęcherzykach błonowych został zauważony jedynie dla frakcji GO2B. Ponadto zauważono, że frakcje inkubowane z surowicą mniej efektywnie wnikają do jądra komórkowego. To zjawisko może tłumaczyć zmniejszenie toksyczności frakcji GO4 po inkubacji z surowicą (frakcja GO4B).

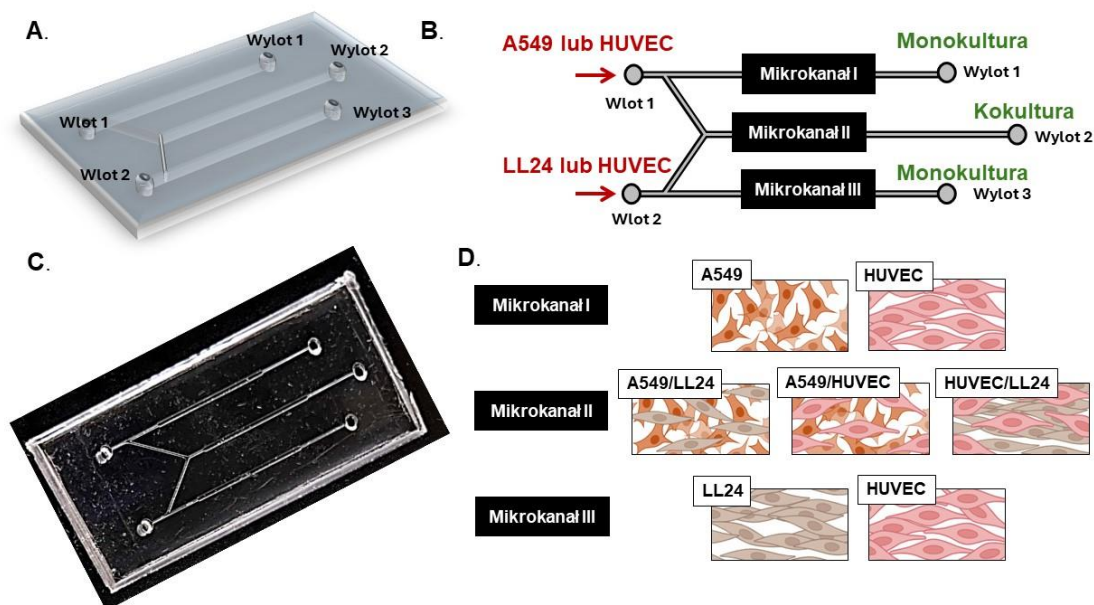
Tak jak już wspomniano, na wczesnym etapie internalizacji (ok. 1 h) utleniony grafen został zlokalizowany nie tylko w cytoplazmie, ale również w pęcherzykach błonowych. Na tej podstawie można założyć, że GO dostał się do wnętrza komórki na drodze endocytozy opłaszczony endosomem. Zauważono również, że wraz z upływem czasu coraz więcej płatków GO znajdowało się w cytoplazmie, a punktowy sygnał od GO otoczonego pęcherzykami błonowymi zanikał. Na podstawie tych obserwacji wysunięto tezę o zdolności GO do przenikania z pęcherzyków szlaków endosomalnych do cytoplazmy. Opłaszczane płatki GO uwalniane z endosomów lokalizowałyby się w cytoplazmie i z czasem wybrane frakcje przenikałyby do jąder komórkowych. W rezultacie można przypuszczać, że GO nie jest wydalany z komórki na drodze egzocytozy. Egzocytoza to proces odwrotny do endocytozy, w wyniku którego komórka wydala na zewnątrz substancje zamknięte w egzosomach ⁶³. Teorię tą wspiera prawidłowość zauważona dla badanych próbek, sukcesywnie opuszczających pęcherzyki endo- i lizosomalne, i przenikających do cytoplazmy. Dzięki temu płatki GO prawdopodobnie nie zostają zamknięte w egzosomach i wydalone na drodze egzocytozy. Potrzeba jednak dalszych badań by zweryfikować tę tezę.

Niniejsze badania dostarczają nowych informacji na temat utlenionego grafenu. Badane frakcje GO charakteryzują się dużymi rozmiarami płatków, jednak wykazano, że nawet płatki większych frakcji mogą być zamykane w pęcherzykach błonowych. Ponadto, udowodniono, że GO zdolny jest do przenikania z endosomu do cytoplazmy. Są to cechy pożądane dla cząsteczki do zastosowań biologicznych. Wyjście ze szlaku endosomalnego umożliwia cząsteczce efektywne oddziaływanie ze środowiskiem komórki. Pomimo zebranych informacji istnieje potrzeba dalszych badań, aby lepiej zrozumieć zjawisko internalizacji GO do komórek.

3.6. Badania lokalizacji wewnątrzkomórkowej utlenionego grafenu w warunkach przepływowych (*Cell-on-a-Chip*)

Wszystkie omówione powyżej badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem standardowych metod hodowli komórkowych - monowarstwy. Do ich prowadzenia wykorzystuje się komercyjnie dostępne naczynia hodowlane (butelki, płytki, szalki) oraz standardowe procedury hodowlane. Ze względu na łatwość i wygodę prowadzenia hodowli, standardowa monowarstwa komórek jest popularnym i szeroko stosowanym modelem badawczym¹¹⁸. Wszystkie doniesienia literaturowe omówione w niniejszej pracy odnosiły się do standardowych hodowli komórkowych w postaci monowarstwy. Nie znaleziono raportów literaturowych odnośnie do wnikania utlenionego grafenu do komórek ssących dotyczących bardziej zaawansowanych modeli komórkowych, takich jak modele otrzymywane przy pomocy mikrosystemów przepływowych typu *Cell-on-a-Chip*. Wykorzystanie mikroukładów przepływowych pozwala na opracowanie modeli komórkowych, które lepiej niż standardowe hodowle komórkowe odzwierciedlają warunki *in vivo*. Ostatnia część badań obejmowała opracowanie mikrosystemu przepływowego do badania procesu wnikania GO do komórek.

Na geometrię opracowanego mikrosystemu (Ryc. 54) składają się 3 połączone ze sobą kanały. Mikrostruktury wykonano w poli(dimetylosiloksanie) (PDMS) metodą odlewu. Pieczętkę wykonano za pomocą druku 3D (w technologii DLP). Płytke PDMS z uzyskanymi strukturami połączono za pomocą plazmy tlenowej ze szkiełkiem mikroskopowym (Rys 54 C). Grubość szkiełka umożliwiła obrazowanie hodowli przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Mikrosystem umożliwia zakładanie kokultur komórkowych (wspólna hodowla dwóch lub więcej linii komórkowych) przy jednoczesnej hodowli monokultur (hodowla jednej linii komórkowej) (Ryc. 54 B). Zawiesiny monokultur komórek wprowadza się za pomocą pompy perystaltycznej przez Wlot 1 i 2. Układ mikrokanalów został zaprojektowany tak by wprowadzane zawiesiny mieszały się w mikrokanale II. Geometria mikrosystemu umożliwia dodatkowo podawanie roztworów do hodowanych w mikrosystemie komórek w dwóch trybach: ciągłym oraz przerywanym. Przepływ ciągły polega na ciągłym, aktywnym wtłaczaniu roztworów do mikrosystemu (przez cały czas trwania inkubacji). Drugi tryb to metoda opierająca się na przepływie przerywanym (stop-flow). Roztwór wtłaczany jest do mikrosystemu przez krótki czas (np. 10 min). Następnie przepływ jest zatrzymywany, a komórki inkubuje się z badanym roztworem przez określony czas (Ryc.55 A). Zawiesina nie płynie podczas trwania inkubacji. Taki projekt mikrosystemu umożliwia opracowanie różnych modeli komórkowych różniących się typem hodowli oraz rodzajem podawania zawiesiny wykorzystując tylko jeden mikrosystem.

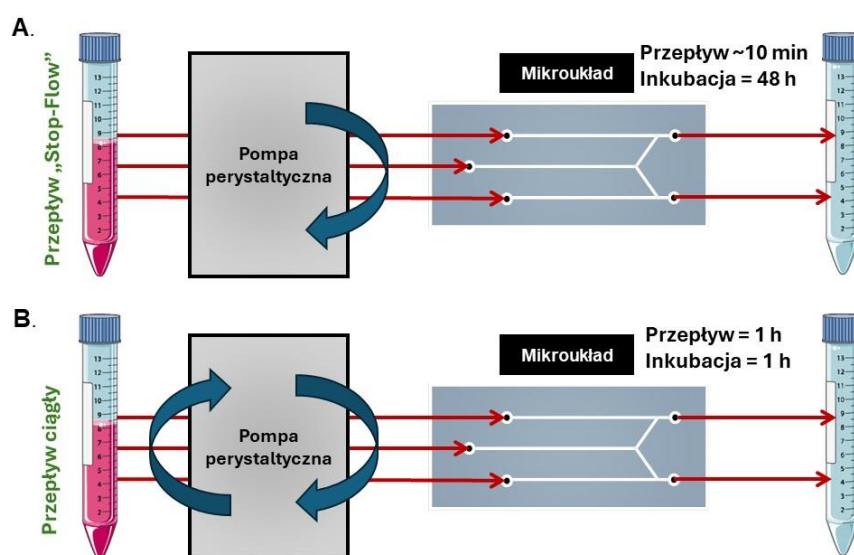


Ryc. 54 A) Schemat geometrii mikrosystemu. B) Wprowadzanie komórek do mikrosystemu. C) Mikroukład otrzymany metodą odlewu. D) Rodzaje hodowli w mikrosystemie.

Komórki w mikrosystemie przepływowym hodowano w postaci monowarstwy, jednak nie w sposób standardowy. Hodowle komórkowe prowadzone w mikroskali lepiej odwzorowują warunki panujące *in vivo* niż hodowle standardowe. Dzieje się tak, ponieważ przestrzeń hodowlana mikrosystemu ma większy stosunek powierzchni do objętości niż standardowa hodowla komórkowa. W rezultacie przebieg zjawisk związanych z wymianą masy i energii jest bardziej zbliżony do tych zachodzących *in vivo*, niż w przypadku standardowej hodowli ¹¹⁹.

W zaprojektowanym mikrosystemie hodowano komórki linii A549, LL-24 oraz HUVEC w wariantach przedstawionych na Ryc. 54 D, w dwóch trybach przepływu, przerywanym i ciągłym. W warunkach *in vivo* komórki rzadko występują w postaci monokultur. Dlatego oprócz monokultur, przeprowadzono ten sam zestaw badań na kokulturach A549/LL-24, A549/HUVEC oraz LL-24/HUVEC. Do hodowli w trybie przerywanego przepływu wprowadzono zawiesinę GO4B i inkubowano z komórkami przez 48 h. Do badań wybrano frakcję GO4B, ponieważ materiał preinkubowany z surowicą lepiej odwzorowuje scenariusz, w którym badany materiał zostaje dożylnie podany do organizmu. Ponadto większy rozmiar płatków (w porównaniu do GO2B) wykazywał się wyższą efektywnością wnikania podczas badań w hodowli standardowej. Stężenie podawanej zawiesiny wynosiło 50 µg/ml. Po upływie okresu inkubacji wybarwiono komórki i uzyskano ich obrazy za pomocą mikroskopu konfokalnego. Następnym krokiem do opracowania modelu komórkowego odzwierciedlającego warunki *in vivo* była hodowla z ciągłym przepływem zawiesiny w trakcie

inkubacji. Częstą drogą podawania biologicznie czynnych materiałów jest dożylna iniekcja. Cząstki materiału cyrkulują w krwioobiegu aż zostaną zinternalizowane w miejscu docelowym. W tym kontekście inkubacja, podczas której zawiesina badanego materiału aktywnie cyrkuluje w hodowli komórkowej, lepiej odzwierciedla warunku *in vivo* niż hodowla standardowa. W celu sprawdzenia jak przepływ ciągły zawiesiny wpływa na internalizację GO do komórek w mikrosystemie przepływowym hodowano jedynie monokultury komórek A549, LL-24 i HUVEC. Każdy mikrosystem zawierał hodowlę jednego typu komórek w 3 powtórzeniach. Zawiesinę GO4B o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ wprowadzano w sposób ciągły do mikrosystemu za pomocą wężyków i pompy perystaltycznej według schematu (Ryc. 55 B). Po 1 h inkubacji przepływ zatrzymywano, komórki wybarwiano i poddawano obserwacji mikroskopowej. Przeprowadzenie 48 h inkubacji z ciągłym podawaniem próbki nie udało się. Wymaga ono dalszych prac optymalizacyjnych nad zaprojektowanym mikrosystemem. Niemniej w ramach niniejszego doktoratu postawiono pierwsze kroki w kierunku opracowania modelu badawczego biorącego pod uwagę zarówno różne typy komórek, cyrkulację badanego materiału w krwioobiegu jak i jego oddziaływanie z surowicą. Jest to interesujący kierunek badań, który w przyszłości może doprowadzić do lepszego zrozumienia zachowania materiałów biomedycznych podawanych dożylnie.



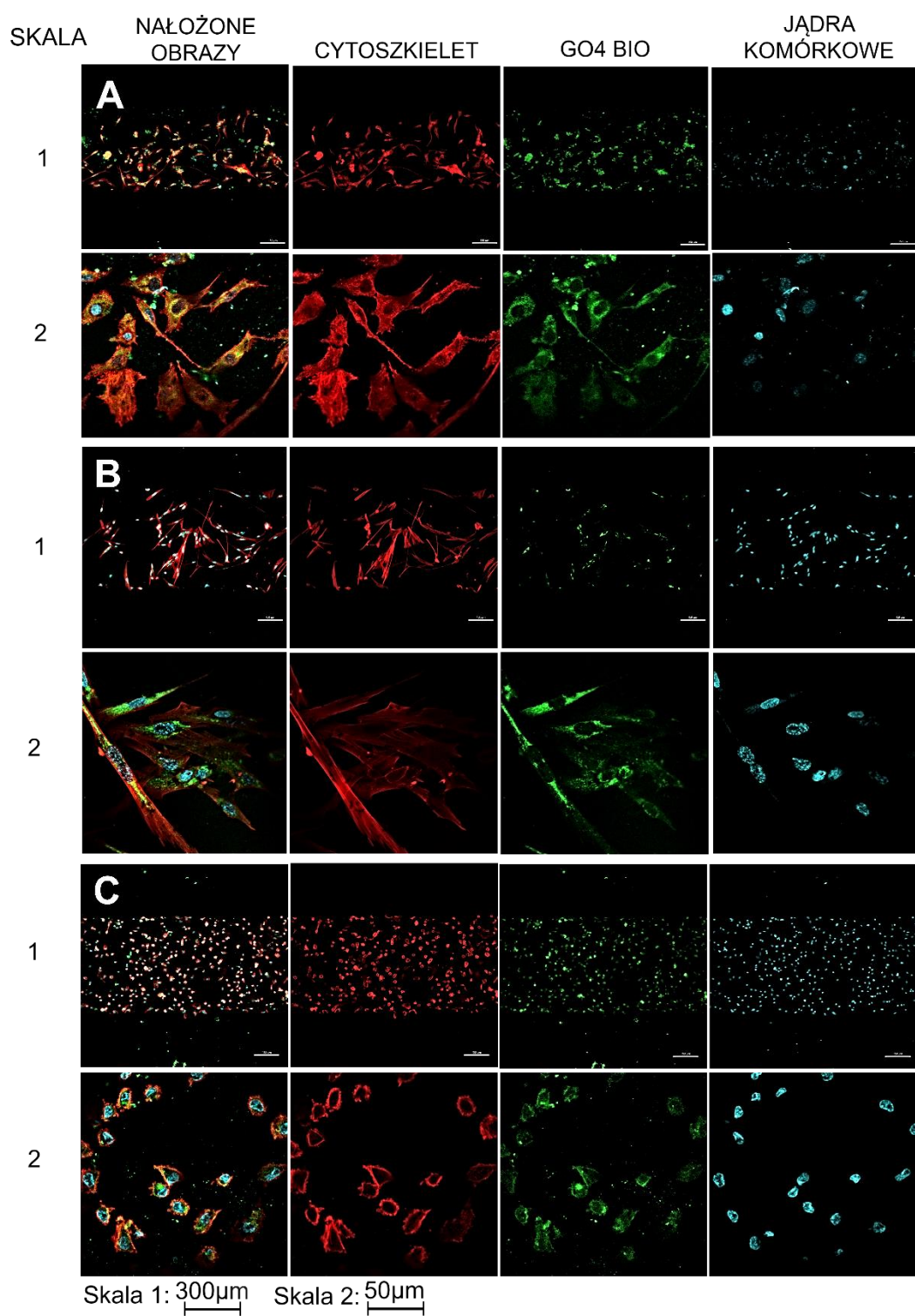
Ryc. 55 Tryby podawania zawiesiny do hodowli: A) Przepływ przerywany „Stop-Flow”. B) Przepływ ciągły.

3.6.1. Lokalizacja GO w komórkach inkubowanych przez 48h i z jednorazowym podaniem próbki

Prowadząc badania z wykorzystaniem mikrosystemu *Cell-on-a-Chip*, w pierwszej kolejności postanowiono przeprowadzić badania analogiczne do badań prowadzonych przy użyciu standardowych metod. W tym celu wykorzystano hodowlę monokultur komórek A549, LL-24 oraz HUVEC z przepływem przerywanym i ich 48 h inkubację z zawiesiną utlenionego grafenu (GO4B). Przeprowadzono analogiczne jak w przypadku hodowli standardowych metody badań - mikroskopię konfokalną (barwienie jąder i cytoszkieletu) oraz ich analizę ilościową z wykorzystaniem programu ImageJ. Jednocześnie, dzięki geometrii mikrosystemu przeprowadzono badania na kokulturach komórkowych - A549/HUVEC, A549/LL-24, HUVEC/LL-24. Porównanie sygnału pochodzącego od monokultur z sygnałem od kokultur dostarcza informację jak oddziaływania pomiędzy komórkami różnych typów mogą wpływać na proces internalizacji GO.

3.6.1.1. Lokalizacja GO w monokulturach: A549, HUVEC, LL-24

Po 48 h inkubacji w mikrosystemie płatki frakcji GO4B wniknęły do komórek linii A549, HUVEC i LL-24 (Ryc. 56). W przypadku linii A549 i LL-24 zauważono punktowe sygnały od GO4B skupionego w pęcherzykach błonowych. Nie zauważono takiego sygnału dla komórek linii HUVEC. Jednak w przypadku wszystkich linii zauważono sygnał od GO4B zdyspergowanego w cytoplazmie komórki.



Ryc. 56 Lokalizacja GO4B w komórkach linii: A) A549; B) LL-24; C) HUVEC hodowanych w mikrosystemie Cell-on-a-Chip po 48 h inkubacji.

Porównano hodowlę w skali mikro i w skali makro pod względem efektywności wnikania (Tab.10). Dla każdej linii komórkowej większy sygnał zarejestrowano dla mikroskali. Większy stosunek powierzchni do objętości niż w standardowych hodowlach może się przekładać na

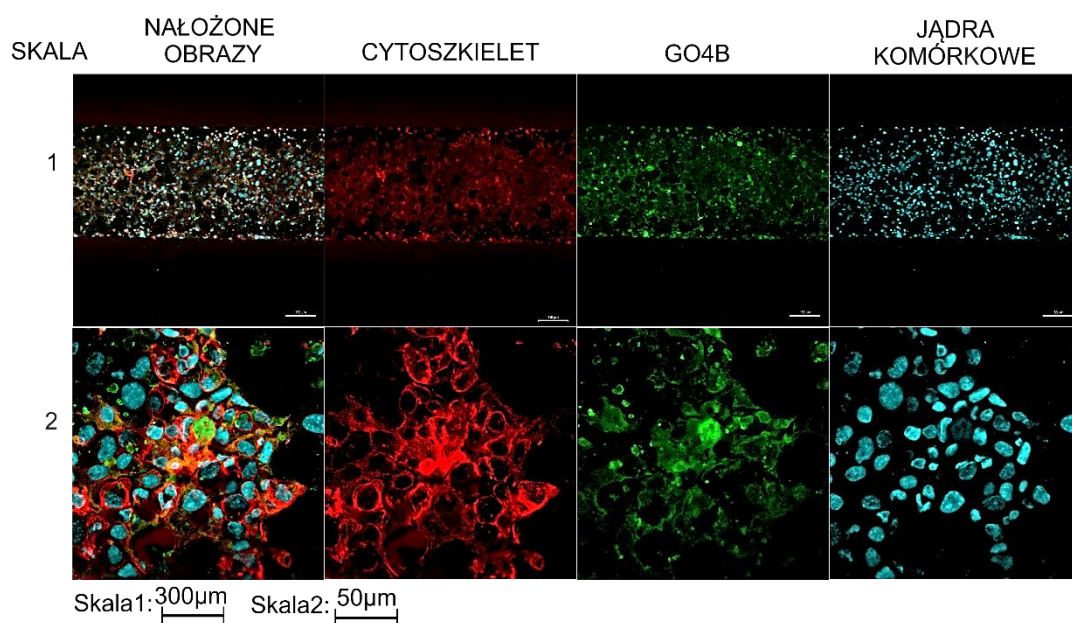
intensywniejszy przebieg procesów transportu masy i wnikania GO do komórek. Potrzeba jednak dalszych eksperymentów by skala hodowli komórkowej wpływa na proces wnikania badanych materiałów do wnętrza komórki.

Tab. 10 Porównanie intensywności wnikania GO4B do komórek A549, HUVEC i LL-24 pomiędzy mikroskalą i makroskalą

Linia komórkowa	Typ hodowli			
	Makroskala		Mikroskala	
	Intensywność sygnału [-]	SD	Intensywność sygnału [-]	SD
A549	3,77	2,35	5,33	0,82
HUVEC	6,31	2,10	9,13	4,34
LL-24	3,29	1,39	5,96	2,51

3.6.1.2. Lokalizacja GO w kokulturze A549/HUVEC

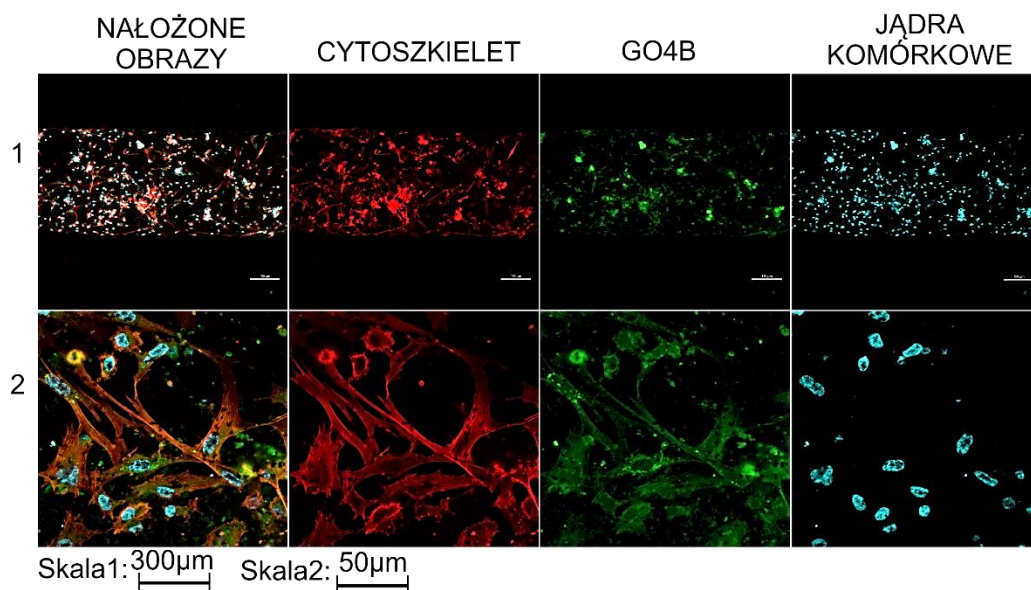
Kokultura komórek nowotworowych komórek linii A549 i prawidłowych komórek linii HUVEC zajęły całą szerokość kanału (Ryc.57). Dzięki temu uzyskano uproszczony model symulujący naczynie krwionośne (mikroukład z wyściełającymi go komórkami HUVEC - komórkami nabłonka żyły) z miejscem występowania nowotworu (komórki A549). Niestety, ze względu na zbliżoną morfologię komórek nie udało się rozróżnić typów komórek w obrębie kokultury. Można jednak zauważyć, że zinternalizowany GO znajdował się głównie w cytoplazmie w stanie wolnym we wszystkich komórkach, niezależnie od ich typu. Nie zauważono punktowych sygnałów od materiału uwięzionego w endo- lub lizosomach. Punktowy sygnał zauważono jednak w przypadku monokultury komórek A549 (Ryc. 56 A). Może to oznaczać, że w przypadku komórek A549 hodowanych w kokulturze z komórkami HUVEC utleniony grafen szybciej przenika z pęcherzyków błonowych do cytoplazmy w porównaniu do komórek w monokulturze.



Ryc. 57 Lokalizacja GO4B w kokulturze komórek linii A549 i HUVEC hodowanych w mikrosystemie Cell-on-a-Chip po 48 h inkubacji.

3.6.1.3. Lokalizacja GO w kokulturze HUVEC/LL-24

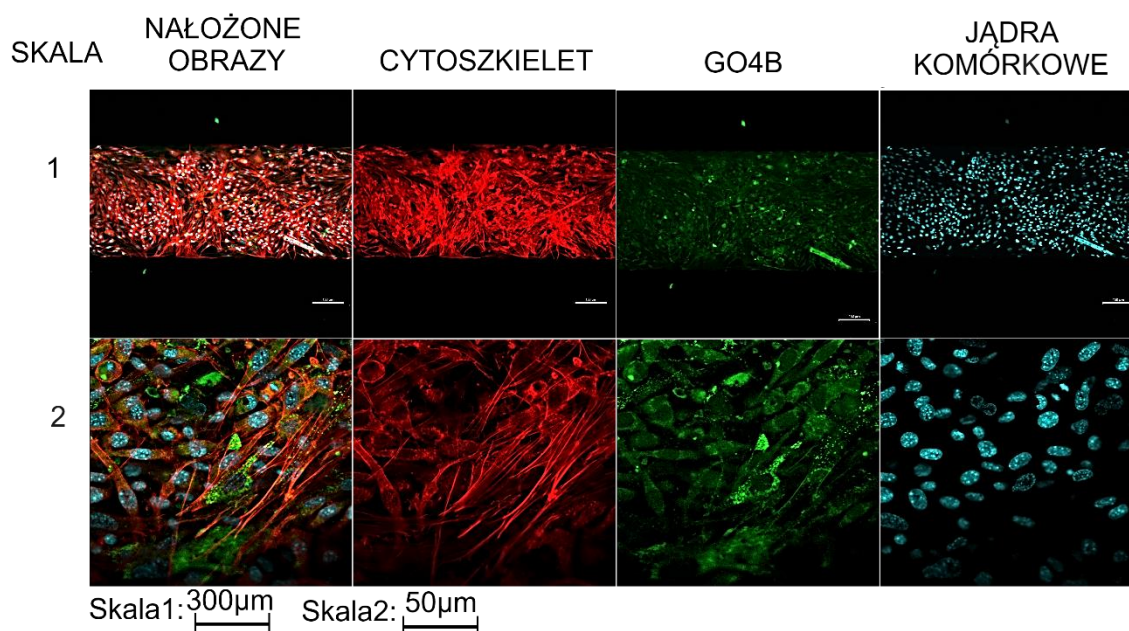
Tak jak kokultura komórek A549/HUVEC miała modelować naczynie krwionośne i tkankę nowotworową, kokultura HUVEC/LL-24 była modelem naczynia krwionośnego i tkanki zdrowej (komórki linii LL-24 są prawidłowymi fibroblastami płuc). W odróżnieniu od poprzedniego modelu (A549/HUVEC) zauważono punktowy sygnał od GO zamkniętego w pęcherzykach błonowych (Ryc. 58). Sygnał ten był wyraźniejszy dla fibroblastycznych komórek LL-24. Ponadto, GO był zlokalizowany w cytoplazmie we wszystkich komórkach. Nie zauważono różnicy pomiędzy kokulturą HUVEC/LL-24 i monokulturami HUVEC i LL-24.



Ryc. 58 Lokalizacja GO4B w kokulturze komórek linii LL-24 i HUVEC hodowanych w mikrosystemie Cell-on-a-Chip po 48 h inkubacji.

3.6.1.4. Lokalizacja GO w kokulturze A549/LL-24

W tkance nowotworowej oprócz komórek nowotworowych istnieją komórki prawidłowe. Kokultura prawidłowych (LL-24) i nowotworowych (A549) komórek płuc została wykorzystana jako model tkanki nowotworowej bardziej zbliżony do warunków *in vivo* niż monokultura. Umożliwił on również ustalenie czy GO preferuje wnikanie do prawidłowych lub nowotworowych komórek, gdyż różnią się one znacznie morfologią i biochemią. Badania pokazały, że utleniony grafen wniknął do komórek niespecyficycznie, bez względu na typ komórki (Ryc. 59). Zauważono jednak, że tak jak w przypadku kokultury HUVEC/LL-24, GO zamknięty w pęcherzykach błonowych zlokalizowany został głównie w komórkach linii LL-24. Zarówno w komórkach LL-24 i A549 GO zlokalizowano w stanie wolnym w cytoplazmie. Nie zaobserwowano sygnału punktowego od komórek A549. Taki sygnał można zauważyć dla monokultury komórek A549. Tak jak w przypadku kokultury A549/HUVEC GO w komórkach A549 szybciej przeniknął do cytoplazmy niż w przypadku monokultury.



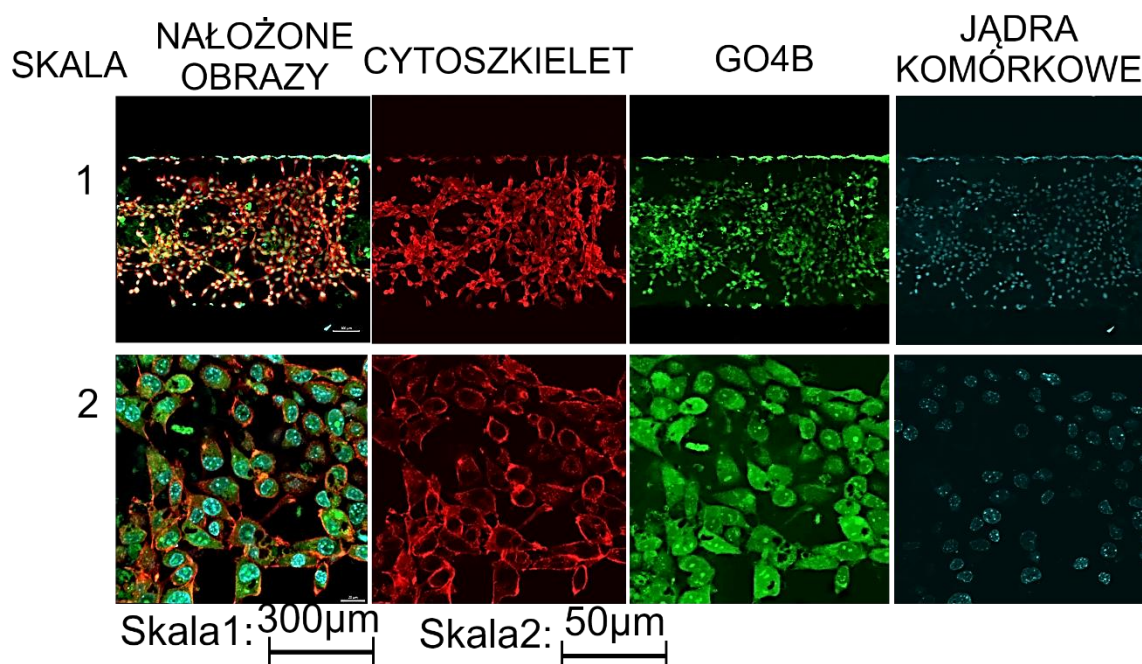
Ryc. 59 Lokalizacja GO4B w kokulturze komórek linii LL-24 i A549 hodowanych w mikrosystemie Cell-on-a-Chip po 48 h inkubacji.

3.6.2. Lokalizacja GO w komórkach inkubowanych przez 1 h w warunkach przepływowych

Po 1 h inkubacji oceniono wewnątrzkomórkową lokalizację GO podawanego w sposób ciągły w komórkach jedynie dla monokultur A549, HUVEC i LL-24. Ze względu na ograniczony czas badań nie przeprowadzono badań dla kokultur. Podejrzewano, że dodatkowe siły uczestniczące w transporcie zawiesiny GO do błony komórkowej podczas ciągłego jej dozowania mogą wpływać na efektywność wnikania płatków GO do komórek. W celu weryfikacji tej tezy porównano sygnał pochodzący od GO uzyskany z wykonanych zdjęć i porównano go z wynikami dla 1 h inkubacji w hodowli standardowej.

3.6.2.1. Lokalizacja GO w komórkach A549

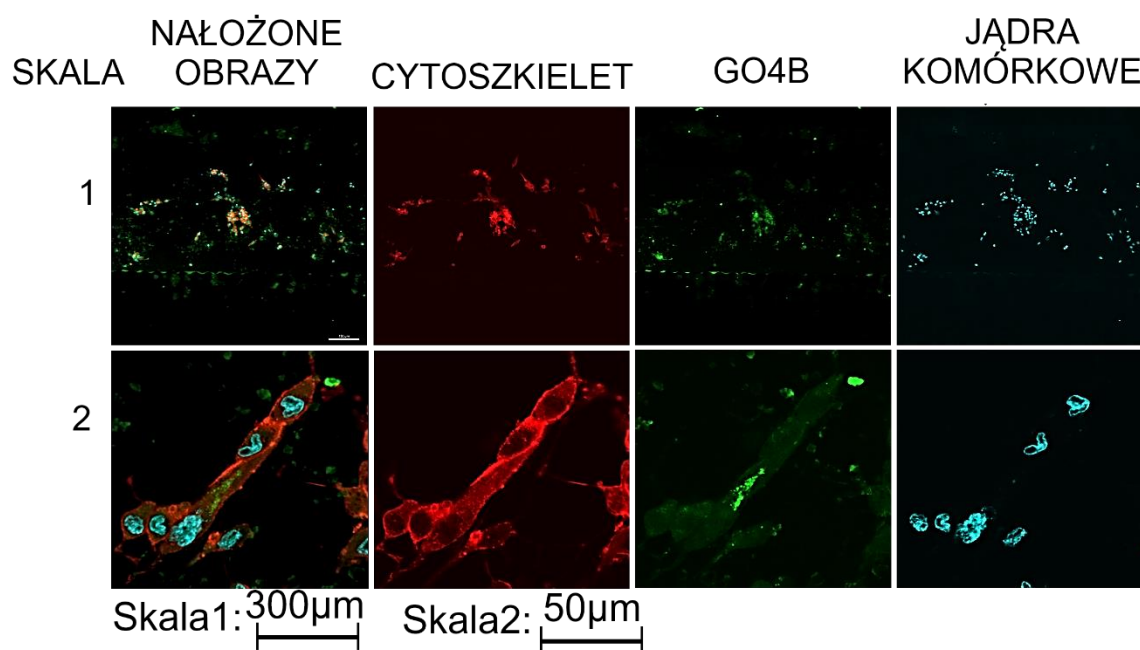
W przypadku linii A549 GO podawany w sposób ciągły zdołał wniknąć do wnętrza komórek (Ryc. 60). Zauważono wyraźny sygnał pochodzący od GO znajdującego się w cytoplazmie i prawdopodobnie w jądrze komórkowym. Nie zauważono jednak punktowego sygnału pochodzącego od GO zamkniętego w pęcherzykach błonowych. Jest to wynik odwrotny do tego uzyskanego w hodowli standardowej, gdzie wyraźnie zauważono GO zamknięty w lizo- i endosomach.



Ryc. 60 Lokalizacja utlenionego grafenu w komórkach A549 hodowanych w mikrosystemie Cell-on-a-Chip przy 1 h inkubacji z cyrkulacją zawiesiny GO4B.

3.6.2.2. Lokalizacja GO w komórkach LL-24

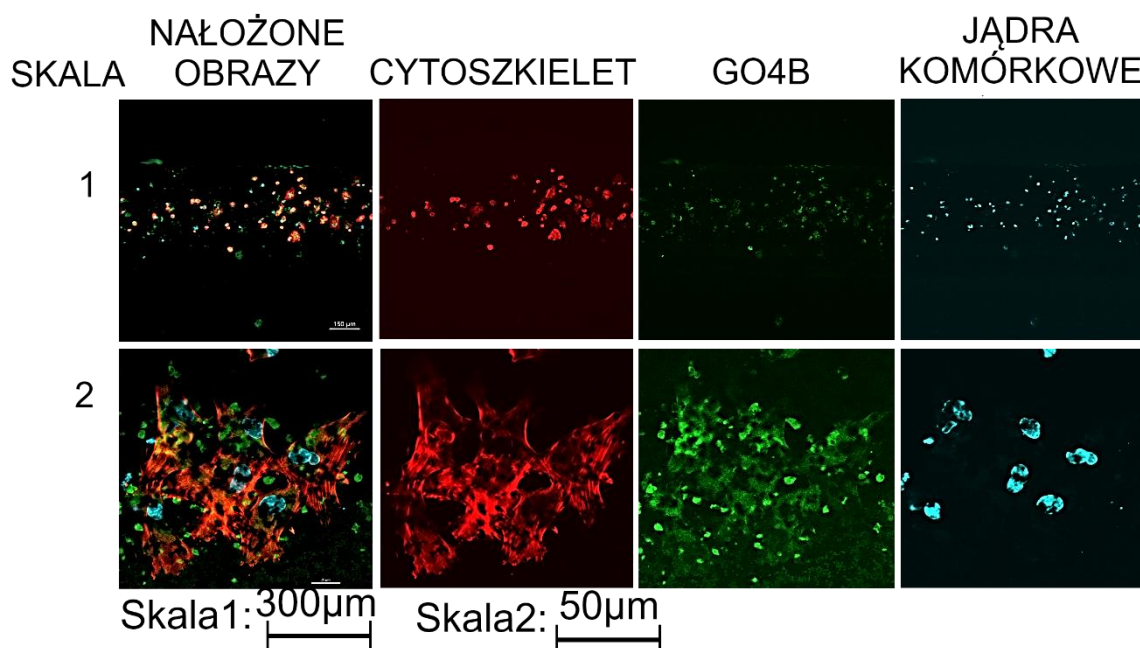
Komórki linii LL-24 ulegały adhezji do powierzchni kanału z mniejszą efektywnością niż komórki A549 (Ryc. 61). Może to wynikać z odmiennej morfologii komórek oraz z faktu, że nowotworowe komórki linii A549 wykazują się efektywniejszą proliferacją niż prawidłowe komórki LL-24. Zaobserwowano sygnał pochodzący z GO zlokalizowanego w endo- i lizosomach oraz w mniejszym stopniu w cytoplazmie. W porównaniu z 1 h inkubacji w warunkach standardowych zauważono, że podczas ciągłego podawania próbki mniej płytków ulega adhezji na błonie komórkowej.



Ryc. 61 Lokalizacja utlenionego grafenu w komórkach LL-24 hodowanych w mikrosystemie Cell-on-a-Chip przy 1 h inkubacji z cyrkulacją zawiesiny GO4B.

3.6.2.3. Lokalizacja GO w komórkach HUVEC

W przypadku linii HUVEC, płatki GO zlokalizowano głównie w cytoplazmie (Ryc. 62). Agregaty GO zaobserwowano również w przestrzeniach międzykomórkowych przyczepionych na zewnątrz komórki. Utleniony grafen prawdopodobnie nie przeniknął do jądra komórkowego. Nie został również zlokalizowany w endo- i lizosomach. W porównaniu do hodowli standardowej zaobserwowano większą ilość agregatów znajdujących się na zewnątrz komórki. Jest to zależność odwrotna niż w przypadku komórek linii LL-24.



Ryc. 62 Lokalizacja utlenionego grafenu w komórkach HUVEC hodowanych w mikrosystemie Cell-on-a-Chip przy 1h inkubacji z cyrkulacją zawiesiny GO4B.

3.6.2.4. Ilościowa analiza obrazu

Dla wszystkich trzech badanych linii komórkowych sygnał od zinternalizowanego GO4B był znacznie wyższy dla hodowli z ciągłym przepływem (Tab.12). Pierwszym etapem procesu wnikania materiału do komórki jest zbliżenie się płatka materiału do błony komórkowej. Dzięki zastosowaniu ciągłego podawania zawiesiny w czasie inkubacji można założyć, że dynamika zbliżania się płatka do błony komórkowej była wyższa niż w przypadku statycznych warunków hodowli standardowej. Na wzrost intensywności wnikania może również mieć wpływ wcześniej wspomniany wysoki stosunek powierzchni do objętości w mikroukładzie, który sprzyja zwiększaniu intensywności procesów wymiany masy. Wyniki te wymagają potwierdzenia w postaci dalszych eksperymentów i użycia innych technik pomiarowych. Niemniej rzucają nowe światło na zagadnienie wnikania GO do komórek i zachęcają do dalszego eksplorowania tej ścieżki badań.

Tab. 11 Porównanie intensywności sygnałów z GO4B uzyskanych na drodze analizy obrazu pomiędzy hodowlą standardową a hodowlą w mikrosystemie *Cell-on-a-Chip* z ciągłym dozowaniem.

Linia komórkowa	Typ hodowli			
	Standardowa, makroskala		Z ciągłym podawaniem próbek	
	Intensywność sygnału [-]	SD	Intensywność sygnału [-]	SD
A549	3,48	1,99	12,65	4,97
HUVEC	1,53	0,88	7,04	3,83
LL-24	4,34	1,18	6,15	2,56

3.6.3. Podsumowanie i wnioski

W celu zbliżenia warunków prowadzonych badań dotyczących wnikania GO do komórek ssaczych do sytuacji *in vivo*, opracowano mikrosystem przepływowy. Zaprojektowane i wytworzone narzędzie *Cell-on-a-Chip* umożliwiło porównanie efektywności wnikania GO w zależności od skali prowadzenia hodowli oraz typu warunków hodowli (hodowla statyczna/przepływowa). W pierwszym przypadku zawiesina komórek była podawana w sposób przerywany. Po wprowadzeniu zawiesiny do mikrokanalów przepływ zostawał wstrzymany na czas inkubacji. Badania przeprowadzone dla 48 h inkubacji wykazały, że komórki hodowane w mikroskali zinternalizowały więcej GO niż komórki w standardowej hodowli w skali makro. Przyczyną tego zjawiska może być wzmożenie procesów przenoszenia masy w skali mikro spowodowane większym stosunkiem powierzchni do objętości hodowli niż w skali makro.

Użycie mikrosystemu umożliwiło również jednoczesne prowadzenie hodowli komórek zarówno w formie monokultur jak i kokultur. Otrzymano trzy kokultury inkubowane z GO4B przez 48h: A549/HUVEC, A549/LL-24 oraz HUVEC/LL-24. Zarówno dla mono- jak i kokultur otrzymano obrazy lokalizacji GO4B. We wszystkich typach hodowli zauważono, że GO znajdował się zdyspergowany w cytoplazmie. Dzięki obrazowaniu kokultur zauważono również, że w komórkach linii LL-24 sygnał od GO był zlokalizowanego w pęcherzykach błonowych, był bardziej zauważalny niż w przypadku komórek dwóch pozostałych linii. Ponadto w komórkach A549 hodowanych w kokulturach nie zauważono punktowego sygnału od GO zlokalizowanego w lizo- lub endosomach. Taki sygnał był widoczny dla monokultury komórek A549. Oprócz tego nie zauważono jednak różnic we wnikaniu GO do komórek różnych linii.

W celu lepszego zrozumienia różnic we wchłanianiu GO przez różne typy komórek z wykorzystaniem hodowli w mikroskali, wymagane jest szczegółowe opracowanie protokołów umożliwiających wykorzystanie innych technik badawczych, takich jak cytometria przepływowa. Niemniej niniejsze badania stanowią pierwszy krok w stronę modeli komórkowych wykorzystujących systemy *Cell-on-a-Chip* do kompleksowego badania zjawiska wnikania materiałów do komórek.

Kolejnym krokiem w celu lepszego odwzorowania warunków *in vivo* z wykorzystaniem hodowli komórkowych, było zastosowanie ciągłego dozowania próbki. Mikrosystem przepływowy można zintegrować z pompą perystaltyczną. Dzięki temu możliwe jest ciągłe podawanie próbki przez cały okres inkubacji. Jest to szczególnie ważne w kontekście materiałów, które do organizmu wprowadzane są na drodze dożylniej iniekcji. Przedostawszy się do krwioobiegu, cyrkulują we krwi do chwili wchłonięcia w miejscu docelowym. Monowarstwa komórek nabłonka żyły pępowinowej (HUVEC) w połączeniu z przepływowym podaniem próbki stanowi dobry model tej sytuacji. Ponadto, wykorzystując również linie komórkowe A549 i LL-24 sprawdzono czy ciągły przepływ próbki ma wpływ na efektywność wnikania. Badania przeprowadzono dla trzech monokultur komórek dla czasu inkubacji wynoszącego 1 h.

W przypadku linii A549 zauważono, że utleniony grafen znajdował się głównie w cytoplazmie. Nie zauważono sygnału od GO zlokalizowanego w pęcherzykach błonowych. Taki sygnał został jednak zarejestrowany dla hodowli standardowej. Może to oznaczać, że więcej płatków dostaje się do wnętrza komórki bez pośrednictwa endosomów, lub to, że pod wpływem przepływu następuje szybsze uwalnianie GO z endo- i lizosomów. Dokładna ocena tych przyczyn wymagałoby dodatkowych badań, które wykraczają poza ramy niniejszej pracy. Można jedynie zakładać, że naprężenia ścinające prawdopodobnie mają wpływ na funkcjonowanie cytoszkieletu komórkowego, który pełni ważną rolę w transporcie substancji do wnętrza komórki¹²⁰. Dodatkowo na uwagę zasługuje fakt odmiennej dynamiki zbliżania się płatka badanego materiału do powierzchni błony komórkowej. W przypadku hodowli standardowej płatek GO opada swobodnie na błonę komórkową, natomiast w przypadku przepływu jego drogę podejścia do błony komórkowej dyktuje pęd i kierunek przepływu zawiesiny.

W przypadku komórek linii LL-24 i HUVEC nie zaobserwowano znaczących różnic w wewnątrzkomórkowej lokalizacji GO w porównaniu z odpowiednimi hodowlami standardowymi. W przypadku linii LL-24 zauważono, że mniej płatków ulega adhezji na błonie komórkowej w porównaniu z hodowlą standardową. Można zakładać, że istnienie ciągłego

strumienia zawiesiny zmniejsza szansę na trwałą adhezję płatka utlenionego grafenu po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Jednak wyniki dla linii HUVEC są sprzeczne z tymi ustaleniami. W tym przypadku więcej agregatów na powierzchni komórek zauważono dla ciągłego podawania próbki. Być może w przypadku linii HUVEC powinowactwo do agregatów GO jest na tyle duże, że komórki wychwytyują agregaty aktywnie płynące w zawiesinie.

Najciekawszym odkryciem jest jednak znaczne zwiększenie efektywności wnikania w stosunku do standardowej hodowli. Może to być spowodowane wyżej wymienionym dużym stosunkiem powierzchni do objętości w skali mikro. Jednak drugim ważnym czynnikiem jest sam ciągły przepływ, który nadając płatkowi pęd dodatkowo może intensyfikować procesy związane z wnikaniem płatka GO do komórek. Zastosowanie modeli przepływowych w ocenie wnikania nanomateriałów do komórek.

Zjawisko wnikania GO do komórek jest skomplikowane i wymaga dalszych badań w celu jego kompleksowego poznania. Rozwijanie nowych modeli komórkowych umożliwia podejście do tego zagadnienia z zupełnie nowej perspektywy. Wykorzystanie mikrosystemów typu *Cell-on-a-Chip* do badania biologicznych właściwości materiałów jest ciekawym i jeszcze niedostatecznie eksplorowanym kierunkiem badań.

III Podsumowanie i wnioski końcowe

Celem niniejszej pracy było ustalenie jak czynniki takie jak wielkość płatka GO, preinkubacja materiału w surowicy ludzkiej, typ komórki oraz typ hodowli wpływają na efektywność wnikania GO do komórek. W tym celu otrzymano frakcje utlenionego grafenu różniące się pod względem średniej wielkości płatków. Ponadto, część próbek inkubowano z komercyjnie dostępną ludzką surowicą krwi. Za pomocą FTIR i spektroskopii Ramana sprawdzono jakie zmiany zachodzą w płatkach utlenionego grafenu po wystawieniu ich na działanie surowicy. Następnie oceniono wpływ badanych frakcji GO na żywotność i aktywność metaboliczną nowotworowych komórek linii A549 oraz prawidłowych komórek linii HUVEC oraz LL-24. Umożliwiło to wytypowanie stężenia próbek używanego w późniejszych etapach pracy. Właściwą część badań stanowiło określenie wpływu wielkości płatków oraz surowicy na efektywność wnikania GO do komórek wyżej wymienionych linii. Ponadto oceniono wewnątrzkomórkową lokalizację badanych próbek GO. Na końcowym etapie badań oceniono efektywność wnikania i wewnątrzkomórkową lokalizację płatków frakcji GO4B z wykorzystaniem modeli komórkowych opartych na mikrosystemie *cell-on-a-chip*. Umożliwiło to określenie różnic pomiędzy procesem wnikania GO do komórek zachodzącym w hodowli standardowej a hodowlą prowadzoną w mikrosystemie przepływowym.

W wyniku przeprowadzonych prac otrzymano frakcje utlenionego grafenu o różnych rozmiarach płatków. Ponadto udowodniono, że ekspozycja płatków GO na surowice ludzka zmienia ich właściwości strukturalne. Składniki surowicy zdolne są do powstawania defektów w węglowym szkielecie GO oraz do adsorpcji na powierzchni płatka. Inkubowany z surowicą materiał ma również inne właściwości biologiczne. Oddziaływanie z surowicą zahamowuje wnikanie GO do komórek. Przyczyna tego zjawiska nie została dogłębnie poznana. Można jednak założyć, że pochodzące z surowicy substancje zaadsorbowane na płatku GO stanowią barierę w kontakcie GO-błona komórkowa. Ponadto inkubacja z surowicą miała większy wpływ na efektywność wnikania niż rozmiar płatków. Wpływ wielkości płatka był zauważalny szczególnie przy 48 h inkubacji, gdzie efektywność wnikania była większa dla większych płatków. Uzyskane wyniki pozwalają założyć, że GO wnikał do komórek na drodze endocytozy. Badania wewnątrzkomórkowej lokalizacji GO ujawniły, że, na wczesnym etapie internalizacji GO najprawdopodobniej jest zamknięty w pęcherzykach błonowych. Następnie wraz z upływem czasu przedostaje się do cytoplazmy, unikając egzocytozy. Jest to cecha pożądana dla materiałów o potencjalnym zastosowaniu w medycynie. Rozwinięcie modelu badawczego o mikrosystemy przepływowe typu Cell-on-a-Chip pokazało, że zastosowanie hodowli w mikroskali i warunkach przepływowych w trakcie inkubacji znacząco zwiększa efektywność wnikania. Prawdopodobną przyczyną takiego stanu rzeczy jest duży stosunek powierzchni do objętości przestrzeni hodowlanej w skali mikro w porównaniu do standardowych hodowli. Ponadto cyrkulacja zawiesiny GO podczas inkubacji dodatkowo intensyfikuje proces wnikania. Warunki hodowli z wykorzystaniem mikroukładu przepływowego są bardziej zbliżone do warunków *in vivo* niż hodowla standardowa. Różnice w intensywności wnikania GO do komórek między tymi modelami wskazują na potrzebę rozwoju modeli komórkowych pozwalających na bardziej wiarygodną ocenę właściwości badanych materiałów.

Niniejsze badania dostarczyły nowych informacji na temat internalizacji GO. Były również próbą zapoczątkowania nowego podejścia do badania zjawiska wnikania z uwzględnieniem typu podawania próbki oraz skali prowadzonej hodowli. Dzięki uzyskanym informacjom możliwe będzie bardziej efektywne opracowywanie materiałów na bazie utlenionego grafenu do zastosowań medycznych. Ponadto opracowany model komórkowy z przepływowym podawaniem próbki może znaleźć szersze zastosowanie w badaniu oddziaływań komórka-nanomateriał.

IV Bibliografia

1. Jiříčková, A., Jankovský, O., Sofer, Z. & Sedmidubský, D. Synthesis and Applications of Graphene Oxide. *Materials* **15**, 920 (2022).
2. Priyadarsini, S., Mohanty, S., Mukherjee, S., Basu, S. & Mishra, M. Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application. *J Nanostruct Chem* **8**, 123–137 (2018).
3. Qi, Y. *et al.* The biotransformation of graphene oxide in lung fluids significantly alters its inherent properties and bioactivities toward immune cells. *NPG Asia Mater* **10**, 385–396 (2018).
4. Novoselov, K. S. *et al.* Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* **306**, 666–669 (2004).
5. R. Dreyer, D., Park, S., W. Bielawski, C. & S. Ruoff, R. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* **39**, 228–240 (2010).
6. Rev. Mod. Phys. 81, 109 (2009) - The electronic properties of graphene. <https://journals.aps.org/rmp/abstract/10.1103/RevModPhys.81.109>.
7. Papageorgiou, D. G., Kinloch, I. A. & Young, R. J. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. *Progress in Materials Science* **90**, 75–127 (2017).
8. Zhu, Y. *et al.* Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials* **22**, 3906–3924 (2010).
9. Simon, J., Flahaut, E. & Golzio, M. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Materials* **12**, 624 (2019).
10. Prato, M. Fullerene Materials. in *Fullerenes and Related Structures* (ed. Hirsch, A.) 173–187 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1999). doi:10.1007/3-540-68117-5_5.
11. Kiew, S. F., Kiew, L. V., Lee, H. B., Imae, T. & Chung, L. Y. Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. *Journal of Controlled Release* **226**, 217–228 (2016).
12. Zhang, J. *et al.* Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization. *Langmuir* **26**, 6083–6085 (2010).
13. Shen, J. *et al.* Covalent attaching protein to graphene oxide via diimide-activated amidation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **81**, 434–438 (2010).

14. 2D graphene oxide–aptamer conjugate materials for cancer diagnosis | npj 2D Materials and Applications. <https://www.nature.com/articles/s41699-021-00202-7>.
15. Zhang, W. *et al.* Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide. *Biomaterials* **32**, 8555–8561 (2011).
16. Zhong, L. & Yun, K. Graphene oxide-modified ZnO particles: synthesis, characterization, and antibacterial properties. *International Journal of Nanomedicine* **10**, 79–92 (2015).
17. Zuchowska, A. *et al.* Nanoconjugates of graphene oxide derivatives and meso-tetraphenylporphyrin: a new avenue for anticancer photodynamic therapies – Cell-on-a-Chip analysis. *New J. Chem.* **44**, 18770–18779 (2020).
18. Zare, P., Aleemardani, M., Seifalian, A., Bagher, Z. & Seifalian, A. M. Graphene Oxide: Opportunities and Challenges in Biomedicine. *Nanomaterials* **11**, 1083 (2021).
19. Hodowla komórek i tkanek - - Stokłosowa - PWN. [medbook.com.pl](https://medbook.com.pl/pl/genetyka-biologia-molekularna/1651-hodowla-komorek-i-tkanek-stanislaw-stoklosowa-3817.html)
<https://medbook.com.pl/pl/genetyka-biologia-molekularna/1651-hodowla-komorek-i-tkanek-stanislaw-stoklosowa-3817.html>.
20. Oleg, S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton’s Jelly and their Potential for Cardio-Vascular Tissue Engineering. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal* **4**, 64–71 (2011).
21. Greb, C. Introduction to Mammalian Cell Culture. (2017).
22. Kamatar, A., Gunay, G. & Acar, H. Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids. *Polymers* **12**, 2506 (2020).
23. Abbott, A. Biology’s new dimension. *Nature* **424**, 870–872 (2003).
24. Niculescu, A.-G., Chircov, C., Bîrcă, A. C. & Grumezescu, A. M. Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 2011 (2021).
25. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–373 (2006).
26. Yeo, L. Y., Chang, H.-C., Chan, P. P. Y. & Friend, J. R. Microfluidic Devices for Bioapplications. *Small* **7**, 12–48 (2011).
27. Young, E. W. K. & Beebe, D. J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1036–1048 (2010).

28. Coluccio, M. L. *et al.* Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectronic Engineering* **208**, 14–28 (2019).
29. Wu, M.-H., Huang, S.-B. & Lee, G.-B. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab Chip* **10**, 939–956 (2010).
30. Gharib, G. *et al.* Biomedical Applications of Microfluidic Devices: A Review. *Biosensors* **12**, 1023 (2022).
31. Gale, B. K. *et al.* A Review of Current Methods in Microfluidic Device Fabrication and Future Commercialization Prospects. *Inventions* **3**, 60 (2018).
32. Shen, S. *et al.* Three-gradient constructions in a flow-rate insensitive microfluidic system for drug screening towards personalized treatment. *Talanta* **208**, 120477 (2020).
33. Shabestani Monfared, G., Ertl, P. & Rothbauer, M. Microfluidic and Lab-on-a-Chip Systems for Cutaneous Wound Healing Studies. *Pharmaceutics* **13**, 793 (2021).
34. Lee, I., Kim, D., Park, G.-L., Jeon, T.-J. & Kim, S. M. Investigation of wound healing process guided by nano-scale topographic patterns integrated within a microfluidic system. *PLOS ONE* **13**, e0201418 (2018).
35. Zuchowska, A. *et al.* 3D and 2D cell models in a novel microfluidic tool for evaluation of highly chemically and microbiologically pure graphene oxide (GO) as an effective drug carrier. *Sensors and Actuators B: Chemical* **302**, 127064 (2020).
36. Li, Y. *et al.* Surface coating-dependent cytotoxicity and degradation of graphene derivatives: towards the design of non-toxic, degradable nano-graphene. *Small* **10**, 1544–1554 (2014).
37. Xu, M. *et al.* Improved In Vitro and In Vivo Biocompatibility of Graphene Oxide through Surface Modification: Poly(Acrylic Acid)-Functionalization is Superior to PEGylation. *ACS Nano* **10**, 3267–3281 (2016).
38. Wu, C. *et al.* Synergistic Anticancer Activity of Photo- and Chemoresponsive Nanoformulation Based on Polylysine-Functionalized Graphene. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 21615–21623 (2014).
39. Fan, L. *et al.* Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules* **93**, 582–590 (2016).

40. Zhao, X. *et al.* Design and Development of Graphene Oxide Nanoparticle/Chitosan Hybrids Showing pH-Sensitive Surface Charge-Reversible Ability for Efficient Intracellular Doxorubicin Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 6608–6617 (2018).
41. Xu, Z. *et al.* Delivery of Paclitaxel Using PEGylated Graphene Oxide as a Nanocarrier. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 1355–1363 (2015).
42. Zhang, B. *et al.* A colon targeted drug delivery system based on alginate modified graphene oxide for colorectal liver metastasis. *Materials Science and Engineering: C* **79**, 185–190 (2017).
43. Tian, J. *et al.* Pegylated folate and peptide-decorated graphene oxide nanovehicle for *in vivo* targeted delivery of anticancer drugs and therapeutic self-monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* **80**, 519–524 (2016).
44. Lu, Y.-J. *et al.* Improving thermal stability and efficacy of BCNU in treating glioma cells using PAA-functionalized graphene oxide. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 1737–1747 (2012).
45. Guo, Y. *et al.* Hyaluronic acid and Arg-Gly-Asp peptide modified Graphene oxide with dual receptor-targeting function for cancer therapy. *J Biomater Appl* **32**, 54–65 (2017).
46. Nasrollahi, F., Varshosaz, J., Khodadadi, A. A., Lim, S. & Jahanian-Najafabadi, A. Targeted Delivery of Docetaxel by Use of Transferrin/Poly(allylamine hydrochloride)-functionalized Graphene Oxide Nanocarrier. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 13282–13293 (2016).
47. Zhao, X. & Liu, P. Biocompatible graphene oxide as a folate receptor-targeting drug delivery system for the controlled release of anti-cancer drugs. *RSC Adv.* **4**, 24232–24239 (2014).
48. Feng, L. *et al.* Smart pH-responsive nanocarriers based on nano-graphene oxide for combined chemo- and photothermal therapy overcoming drug resistance. *Adv Healthc Mater* **3**, 1261–1271 (2014).
49. Huang, Y.-S., Lu, Y.-J. & Chen, J.-P. Magnetic graphene oxide as a carrier for targeted delivery of chemotherapy drugs in cancer therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **427**, 34–40 (2017).

50. Yin, T. *et al.* Redox Sensitive Hyaluronic Acid-Decorated Graphene Oxide for Photothermally Controlled Tumor-Cytoplasm-Selective Rapid Drug Delivery. *Advanced Functional Materials* **27**, 1604620 (2017).
51. Wirth, T., Parker, N. & Ylä-Herttuala, S. History of gene therapy. *Gene* **525**, 162–169 (2013).
52. Wang, C. *et al.* Multi-functionalized graphene oxide complex as a plasmid delivery system for targeting hepatocellular carcinoma therapy. *RSC Adv.* **6**, 22461–22468 (2016).
53. Feng, L. *et al.* Polyethylene Glycol and Polyethylenimine Dual-Functionalized Nano-Graphene Oxide for Photothermally Enhanced Gene Delivery. *Small* **9**, 1989–1997 (2013).
54. Dong, H. *et al.* Poly(ethylene glycol) conjugated nano-graphene oxide for photodynamic therapy. *Sci. China Chem.* **53**, 2265–2271 (2010).
55. Yan, X. *et al.* Enhanced fluorescence imaging guided photodynamic therapy of sinoporphyrin sodium loaded graphene oxide. *Biomaterials* **42**, 94–102 (2015).
56. Zhang, H. *et al.* Graphene oxide-BaGdF₅ nanocomposites for multi-modal imaging and photothermal therapy. *Biomaterials* **42**, 66–77 (2015).
57. Rong, P. *et al.* Fluorescence dye loaded nano-graphene for multimodal imaging guided photothermal therapy. *RSC Adv.* **6**, 1894–1901 (2015).
58. Chen, H. *et al.* Fabrication of Graphene and AuNP Core Polyaniline Shell Nanocomposites as Multifunctional Theranostic Platforms for SERS Real-time Monitoring and Chemo-photothermal Therapy. *Theranostics* **6**, 1096–1104 (2016).
59. Ji, D.-K. *et al.* Receptor-targeting fluorescence imaging and theranostics using a graphene oxide based supramolecular glycomposite. *J. Mater. Chem. B* **3**, 9182–9185 (2015).
60. Abdel-Mageed, H. M., AbuelEzz, N. Z., Radwan, R. A. & Mohamed, S. A. Nanoparticles in nanomedicine: a comprehensive updated review on current status, challenges and emerging opportunities. *Journal of Microencapsulation* **38**, 414–436 (2021).
61. Shafiee, A., Iravani, S. & Varma, R. S. Graphene and graphene oxide with anticancer applications: Challenges and future perspectives. *MedComm* **3**, e118 (2022).
62. Canton, I. & Battaglia, G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2718–2739 (2012).

63. Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chem.* **30**, 263–272 (2019).
64. Rennick, J. J., Johnston, A. P. R. & Parton, R. G. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **16**, 266–276 (2021).
65. Rewatkar, P. V., Parton, R. G., Parekh, H. S. & Parat, M.-O. Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev* **91**, 92–108 (2015).
66. Parton, R. G. & Howes, M. T. Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome. *J Cell Biol* **191**, 439–441 (2010).
67. Chatterjee, N., Eom, H.-J. & Choi, J. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene–cell interactions. *Biomaterials* **35**, 1109–1127 (2014).
68. Huang, J. *et al.* Mechanism of cellular uptake of graphene oxide studied by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Small* **8**, 2577–2584 (2012).
69. Wang, S.-B., Ma, Y.-Y., Chen, X.-Y., Zhao, Y.-Y. & Mou, X.-Z. Ceramide-Graphene Oxide Nanoparticles Enhance Cytotoxicity and Decrease HCC Xenograft Development: A Novel Approach for Targeted Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology* **10**, (2019).
70. Linares, J. *et al.* Endocytic Mechanisms of Graphene Oxide Nanosheets in Osteoblasts, Hepatocytes and Macrophages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 13697–13706 (2014).
71. Matesanz, M.-C. *et al.* The effects of graphene oxide nanosheets localized on F-actin filaments on cell-cycle alterations. *Biomaterials* **34**, 1562–1569 (2013).
72. Yue, H. *et al.* The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials* **33**, 4013–4021 (2012).
73. Mullick Chowdhury, S., Manepalli, P. & Sitharaman, B. Graphene nanoribbons elicit cell specific uptake and delivery via activation of epidermal growth factor receptor enhanced by human papillomavirus E5 protein. *Acta Biomater* **10**, 4494–4504 (2014).
74. Wu, C. *et al.* Vacuolization in Cytoplasm and Cell Membrane Permeability Enhancement Triggered by Micrometer-Sized Graphene Oxide. *ACS Nano* **9**, 7913–7924 (2015).
75. Tu, Z. *et al.* Combination of Surface Charge and Size Controls the Cellular Uptake of Functionalized Graphene Sheets. *Advanced Functional Materials* **27**, 1701837 (2017).

76. Mendes, R. G. *et al.* Size and time dependent internalization of label-free nano-graphene oxide in human macrophages. *Nano Res.* **10**, 1980–1995 (2017).
77. Mu, Q. *et al.* Size-dependent cell uptake of protein-coated graphene oxide nanosheets. *ACS Appl Mater Interfaces* **4**, 2259–2266 (2012).
78. Li, J. *et al.* Lateral size of graphene oxide determines differential cellular uptake and cell death pathways in Kupffer cells, LSECs, and hepatocytes. *Nano Today* **37**, 101061 (2021).
79. Ma, J. *et al.* Crucial Role of Lateral Size for Graphene Oxide in Activating Macrophages and Stimulating Pro-inflammatory Responses in Cells and Animals. *ACS Nano* **9**, 10498–10515 (2015).
80. Russier, J. *et al.* Evidencing the mask effect of graphene oxide: a comparative study on primary human and murine phagocytic cells. *Nanoscale* **5**, 11234–11247 (2013).
81. Luo, N., Ni, D., Yue, H., Wei, W. & Ma, G. Surface-engineered graphene navigate divergent biological outcomes toward macrophages. *ACS Appl Mater Interfaces* **7**, 5239–5247 (2015).
82. Pi, J. *et al.* Mannosylated graphene oxide as macrophage-targeted delivery system for enhanced intracellular M.tuberculosis killing efficiency. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **103**, 109777 (2019).
83. Cai, X. *et al.* Molecular Mechanisms, Characterization Methods, and Utilities of Nanoparticle Biotransformation in Nanosafety Assessments. *Small* **16**, 1907663 (2020).
84. Dąbrowski, B., Żuchowska, A. & Brzózka, Z. Graphene oxide internalization into mammalian cells – a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **221**, 112998 (2023).
85. Renero-Lecuna, C. *et al.* Effect of Size, Shape, and Composition on the Interaction of Different Nanomaterials with HeLa Cells. *Journal of Nanomaterials* **2019**, e7518482 (2019).
86. Alnasser, F. *et al.* Graphene Nanoflake Uptake Mediated by Scavenger Receptors. *Nano Lett.* **19**, 1260–1268 (2019).
87. Guarnieri, D. *et al.* Biotransformation and Biological Interaction of Graphene and Graphene Oxide during Simulated Oral Ingestion. *Small* **14**, 1800227 (2018).
88. Hu, X., Li, D. & Mu, L. Biotransformation of graphene oxide nanosheets in blood plasma affects their interactions with cells. *Environ. Sci.: Nano* **4**, 1569–1578 (2017).

89. Nguyen, B. H. & Nguyen, V. H. Promising applications of graphene and graphene-based nanostructures. *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 023002 (2016).
90. Olabi, A. G., Abdelkareem, M. A., Wilberforce, T. & Sayed, E. T. Application of graphene in energy storage device – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **135**, 110026 (2021).
91. Liang, M., Luo, B. & Zhi, L. Application of graphene and graphene-based materials in clean energy-related devices. *International Journal of Energy Research* **33**, 1161–1170 (2009).
92. FitzGerald, L. I. & Johnston, A. P. R. It's what's on the inside that counts: Techniques for investigating the uptake and recycling of nanoparticles and proteins in cells. *Journal of Colloid and Interface Science* **587**, 64–78 (2021).
93. Wang, L. H., Rothberg, K. G. & Anderson, R. G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *Journal of Cell Biology* **123**, 1107–1117 (1993).
94. Song, S. *et al.* Rho GTPases in A549 and Caco-2 cells dominating the endocytic pathways of nanocarbons with different morphologies. *IJN* **13**, 4391–4404 (2018).
95. Chaudhary, N. *et al.* Endocytic Crosstalk: Cavins, Caveolins, and Caveolae Regulate Clathrin-Independent Endocytosis. *PLOS Biology* **12**, e1001832 (2014).
96. Li, D., Hu, X. & Zhang, S. Biodegradation of graphene-based nanomaterials in blood plasma affects their biocompatibility, drug delivery, targeted organs and antitumor ability. *Biomaterials* **202**, 12–25 (2019).
97. Zuchowska, A. *et al.* Well-defined Graphene Oxide as a Potential Component in Lung Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets* **20**, 47–58 (2020).
98. Jin, C. *et al.* Distribution of Graphene Oxide and TiO₂-Graphene Oxide Composite in A549 Cells. *Biol Trace Elem Res* **159**, 393–398 (2014).
99. Horváth, L. *et al.* Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface. *Carbon* **64**, 45–60 (2013).
100. Hu, W. *et al.* Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano* **4**, 4317–4323 (2010).
101. Chang, Y. *et al.* In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology Letters* **200**, 201–210 (2011).

102. Mittal, S. *et al.* Physico-chemical properties based differential toxicity of graphene oxide/reduced graphene oxide in human lung cells mediated through oxidative stress. *Sci Rep* **6**, 39548 (2016).
103. Duan, G. *et al.* Graphene-Induced Pore Formation on Cell Membranes. *Sci Rep* **7**, 42767 (2017).
104. Duan, G. *et al.* Protein corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane. *Nanoscale* **7**, 15214–15224 (2015).
105. Li, R. *et al.* Surface Oxidation of Graphene Oxide Determines Membrane Damage, Lipid Peroxidation, and Cytotoxicity in Macrophages in a Pulmonary Toxicity Model. *ACS Nano* **12**, 1390–1402 (2018).
106. Vranic, S. *et al.* Live Imaging of Label-Free Graphene Oxide Reveals Critical Factors Causing Oxidative-Stress-Mediated Cellular Responses. *ACS Nano* **12**, 1373–1389 (2018).
107. Cibecchini, G. *et al.* Antiangiogenic Effect of Graphene Oxide in Primary Human Endothelial Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 22507–22518 (2020).
108. Cao, Y., Xiao, W., Li, S. & Qiu, D. A comparative study of toxicity of graphdiyne and graphene oxide to human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Applied Toxicology* **41**, 2021–2030 (2021).
109. Luo, Y., Wang, X. & Cao, Y. Transcriptomic analysis suggested the involvement of impaired lipid droplet biogenesis in graphene oxide-induced cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Chemico-Biological Interactions* **333**, 109325 (2021).
110. Palmieri, V., Perini, G., Spirito, M. D. & Papi, M. Graphene oxide touches blood: in vivo interactions of bio-coronated 2D materials. *Nanoscale Horiz.* **4**, 273–290 (2019).
111. Lin, Y. *et al.* Blood exposure to graphene oxide may cause anaphylactic death in non-human primates. *Nano Today* **35**, 100922 (2020).
112. Zhang, X. *et al.* Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. *Carbon* **49**, 986–995 (2011).
113. Zhang, H. *et al.* Uniform Ultrasmall Graphene Oxide Nanosheets with Low Cytotoxicity and High Cellular Uptake. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 1761–1767 (2013).

114. Bramini, M. *et al.* Graphene Oxide Nanosheets Disrupt Lipid Composition, Ca²⁺ Homeostasis, and Synaptic Transmission in Primary Cortical Neurons. *ACS Nano* **10**, 7154–7171 (2016).
115. Kucki, M. *et al.* Uptake of label-free graphene oxide by Caco-2 cells is dependent on the cell differentiation status. *Journal of Nanobiotechnology* **15**, 46 (2017).
116. Mendes, R. G. *et al.* A size dependent evaluation of the cytotoxicity and uptake of nanographene oxide. *J. Mater. Chem. B* **3**, 2522–2529 (2015).
117. Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 329–347 (2003).
118. Amelian, A., Wasilewska, K., Megias, D. & Winnicka, K. Application of standard cell cultures and 3D *in vitro* tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacological Reports* **69**, 861–870 (2017).
119. Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R. & Fleming, R. M. T. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors and Bioelectronics* **63**, 218–231 (2015).
120. Galbraith, C. g., Skalak, R. & Chien, S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motility* **40**, 317–330 (1998).

PODZIĘKOWANIA

Składam szczególne podziękowania **prof. dr hab. inż. Zbigniewowi Brzózce** oraz **dr inż. Agnieszce Żuchowskiej** nieocenioną pomoc, wsparcie oraz wyrozumiałość, których doświadczyłem przez wszystkie lata pracy nad doktoratem.

Dziękuję **dr inż. Arturowi Małolepszemu** za syntezę utlenionego grafenu (GO).

Dziękuję **dr hab. inż. Arturowi Kasprzakowi** za przeprowadzenie modyfikacji utlenionego grafenu (GO), oraz miłą i owocną współpracę.

Dziękuję **dr inż. Maciejowi Trzaskowskiemu** za analizę utlenionego grafenu z wykorzystaniem Skaningowego Mikroskopu Elektronowego (SEM).

Dziękuję **dr inż. Elżbiecie Święcickiej-Füchsel** za wykonanie analizy elementarnej utlenionego grafenu.

Dziękuję **dr hab. inż. Grażynie Żukowskiej** za pomoc w fizykochemicznej charakteryzacji utlenionego grafenu przy pomocy spektroskopii Ramana i spektroskopii FTIR.

Chciałbym również podziękować członkom Zespołu Biomedycznych Systemów Lab-On-A-Chip, **prof. dr hab. inż. Arturowi Dybko**, **prof. dr hab. inż. Michałowi Chudemu**, **dr hab. inż. Elżbiecie Jastrzębskiej**, **dr hab. inż. Ilonie Grabowskiej-Jadach** oraz **Kasi, Kamilowi, Magdzie, Ani, Oli, Sandrze, Patrycji, Ewelinie, Edycie, Kasprowi, Dominikowi, Asi, Pawłowi, Zuzi** oraz **Oliwii** za wsparcie oraz miłą atmosferę pracy.

Dziękuję swoim studentkom: **Gabrieli Ulanowicz** oraz **Aleksandrze Szlachetce** za zapal, zaangażowanie oraz pomoc w pracach laboratoryjnych.

DOROBIEK NAUKOWY

Prace związana z tematyką doktoratu:

1. Dąbrowski B, Ułanowicz G, Brzózka Z, Żuchowska A. Studies of the interaction of graphene oxide (GO) with endothelial cells under static and flow conditions. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2024;110:1–8. doi:10.1016/j.etap.2024.104541
2. Dąbrowski B, Żuchowska A, Kasprzak A, Żukowska G, Brzózka Z. Cellular uptake of biotransformed graphene oxide into lung cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2023;376:1–9. doi:10.1016/j.cbi.2023.110444
3. Dąbrowski B, Żuchowska A, Brzózka Z. Graphene oxide internalization into mammalian cells – a review. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2023;221:1–11. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112998

Prace niezwiązane z tematyką doktoratu:

1. Kasprzak A, Dąbrowski B, Żuchowska A. A biocompatible poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer octa-substituted with α -cyclodextrin towards the controlled release of doxorubicin hydrochloride from its ferrocenyl prodrug. *RSC Advances*. 2020;10:23440–23445. doi:10.1039/D0RA03694C
2. Żuchowska A, Buta A, Dąbrowski B, Jastrzębska E, Żukowski K, Brzózka Z. 3D and 2D cell models in a novel microfluidic tool for evaluation of highly chemically and microbiologically pure graphene oxide (GO) as an effective drug carrier. *Sensors and Actuators B - Chemical*. 2020;302:127064. doi:10.1016/j.snb.2019.127064
3. Żuchowska A, Dąbrowski B, Jastrzębska E, i in. Cytotoxic properties of graphene derivatives depending on origin and type of cell line. *Journal of Materials Research*. 2020;35:2385–2395. doi:10.1557/jmr.2020.201
4. Żuchowska A, Kasprzak A, Dąbrowski B, Kamińska K, Popławska M, Brzózka Z. Nanoconjugates of graphene oxide derivatives and meso-tetraphenylporphyrin: a new avenue for anticancer photodynamic therapies – Cell-on-a-Chip analysis. *New Journal of Chemistry*. 2020;44:18770–18779. doi:10.1039/D0NJ04189K

Udział w konferencjach:

1. Uczestnictwo w międzynarodowej konferencji Biosensors 2020

Nagrody:

1. Zespołowa nagroda Rektora PW, 2020-2021.