

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

NORA ŠLEKIENĖ

**GRAFENO / GRAFENO OKSIDO
FUNKCIONALIZAVIMAS IR JO BEI JO DARINIŲ TAIKYMAS
NANOMEDICINOJE**

Daktaro disertacijos santrauka
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (05T)

2016, KAUNAS

Disertacija rengta 2012–2016 m. Kauno technologijos universitete, Matematikos ir gamtos mokslų fakultete, Mikrosistemų ir nanotechnologijų mokslo centre. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Valentinas SNITKA (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T)

Lietuvių kalbos redaktorė:

Violeta Meiliūnaitė

Leidykla „Technologija“

Chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

prof. dr. Virgilijus VALEIKA (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T) – **pirmininkas**;

prof. dr. Vitalis BRIEDIS (Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija, 08B);

prof. dr. Gintaras BUIKA (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T);

dr. Yuriy BUTENKO (Europos kosmoso agentūra (ESA–ESTEC), Nyderlandai, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T).

prof. habil. dr. Juozas Vidas GRAŽULEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, 05T);

Disertacija ginama viešame Chemijos inžinerijos mokslo krypties tarybos posėdyje, kuris įvyks 2017 m. sausio 19 d. 13 val. Kauno technologijos universiteto disertacijų gynimo salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-403, 44249, Kaunas, Lietuva.

Tel. (+370) 37 30 00 42; faksas (+370) 37 32 41 44, el. paštas: doktorantura@ktu.lt

Disertacijos santrauka išsiųsta 2016 m. gruodžio 19 d.

Su disertacija galima susipažinti internete (adresu <http://ktu.edu>) ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, 44239, Kaunas).

ĮVADAS

„Grafenas gali būti nuostabiausia kada nors atrasta medžiaga. Tačiau kam ji reikalinga?“ – John Colapinto, „The New Yorker“ žurnalistas.

Kai Andre Geim, Mančesterio universiteto fizikos profesorius, ir kolega atrado neįprastą naują medžiagą, vadinamą grafenu, jis parašė trijų puslapių straipsnį apie jų atradimus. Žurnalas „Nature“ jį atmetė du kartus, nes recenzentai teigė, kad neįmanoma izoliuoti stabilios dvimatės medžiagos ir kad tai nėra pakankama mokslo pažanga. Tačiau 2004 metais straipsnis „Elektrinio lauko efektas atominio storio anglies plėvelėse“ buvo publikuotas „Science“ žurnale ir apstulbino mokslininkus – mokslinė fantastika tapo realybe.

Grafenas, dvimatė sp^2 -hibridizuota anglis, šiuo metu yra intensyviausiai tiriama medžiaga. Vieno atomo storio anglies atomų, išdėstytų korio forma, lakštas yra stipriausia ir ploniausia medžiaga pasaulyje ir puikus elektros ir šilumos laidininkas. Taikymo požiūriu ši dvimatė medžiaga laikoma perspektyvesne nei kiti nanostruktūros anglies alotropai (1-mačiai nanovamzdeliai arba 0-mačiai fulerenai) (Georgakilas et al., 2012).

Intensyvūs pastarųjų metų grafeno tyrimai žada chemijos ir elektros inžinerijos perversmą. Grafeno pagrindo medžiagų cheminė inžinerija taiko fizinius mokslus (nanografeną gręžimo skysčių našumo pagerinimui, integruoto grafeno dispersiją didelio našumo skysčių veikimui, grafenu sustiprinti kompozitai įmaišyti į gumą gali pagerinti jos tvirtumą, laidumą, nepralaidumą ir t. t.) ir gyvosios gamtos mokslus. Grafenas ir jo vediniai naudojami biologiniams taikymams dėl daugybės pageidaujamų grafeno savybių, pvz.: didelio savitojo paviršiaus ploto ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$), mechaninio stiprio (Jungo modulis, $\sim 1100 \text{ GPa}$), elektrinio laidumo ($200,000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), šiluminio laidumo ($\sim 5000 \text{ W/m/K}$) ir biologinio suderinamumo, žemos kainos, lanksčiai plečiamos gamybos ir paprasto grafeno oksido biologinio / cheminio funkcionalizavimo (Jiang, 2011; Guo ir Dong, 2011). Grafeno oksidas (GO) lengvai jungiasi su daugybe kitų nanomastelio medžiagų, leisdamas kurti naujus taikymus vaistų pristatymo, vėžio terapijos, audinių inžinerijos, diagnostikos ir organizmų atvaizdų gavimo srityse (Wu, An ir Hulme, 2015).

Esminė problema, kurią reikia išspręsti prieš plačiau taikant grafeną nanomedicinoje, yra šios naujos medžiagos potencialus trumpalaikis ir ilgalaikis toksiškumas. Ankstesni tyrimai atskleidė, kad GO ir jo hibridinės struktūros mažai toksiškos ląstelėms, tačiau vis dar yra prieštaringų pranešimų. Kelios grupės atliko eksperimentus, tiriančius grafeno poveikius ir tinkamumą nanomedicinoje, tačiau šis klausimas vis dar nėra išaiškintas ir reikalingi tolesni tyrimai.

Darbo tikslas – susintetinti naujas hibridines nanostruktūras funkcionalizuojant grafeną / grafeno oksidą su porfiriniais ir doksorubicinu bei ištirti ir įvertinti jų panaudojimo galimybes kaip vaisto pernešimo platformą nanomedicinoje.

Darbo uždaviniai:

1. Metodų, skirtų grafeno / grafeno oksido funkcionalizavimui su organinėmis molekulėmis sukūrimas ir optimizavimas, bei gautų struktūrų fiziko-cheminis charakterizavimas.
2. Metodų, skirtų naujų hibridinių makromolekulių sintezei naudojant grafeno oksidą su organinėmis molekulėmis, sukūrimas ir optimizavimas bei gautų struktūrų fiziko-cheminis charakterizavimas.
3. Grafeno oksido nanodalelių sąveikos su lipidine membrana, kaip modelinės sistemos įvertinant nanodalelių sąveiką su biomembranomis, sąveikos tyrimas.
4. Nustatyti grafeno oksido pernašos į gyvas ląsteles būdą ir grafeno oksido toksiškumą skirtingoms ląstelių linijoms.
5. Nustatyti funkcionalizuoto grafeno oksido su doksorubicinu toksiškumą vėžinėms ląstelėms.

Mokslinis naujumas

Sukurta nauja grafeno oksido su hematoporfirinu (GO-HP) funkcionalizavimo kovalentiniu būdu metodologija. Susintetintos naujos grafeno pagrindo hibridinės nanostruktūros (GO-HP) ir makromolekulės (GO/TPyP). Ištirta nanodalelių (GO, ZnO ir TiO₂) sąveika su lipidine membrana bei jų įtaka lipidinės membranos dinamikai ir vientisumui. Pirmą kartą įvertinta grafeno oksido bei grafeno oksido su suformuota baltymų „karūna“ įtaka skirtingų ląstelių linijų (kininio žiurkėno kiaušidžių bei pelės hepatomos MH-22A) gyvybingumui ir funkcionalizuoto grafeno oksido su doksorubicinu įtaka pelės hepatomos MH-22A ląstelių gyvybingumui.

Ginamieji teiginiai

1. Susintetintos hibridinės grafeno ir porfirino struktūros gali būti susijungusios tarpusavyje per nekovalentines sąveikas, o grafeno oksido ir porfirino – tiek per nekovalentines sąveikas, tiek kovalentiniu ryšiu.
2. Dėl GO, ZnO ir TiO₂ skirtingų fiziko-cheminių savybių (nanodalelių dydžio, formos, zeta potencialo) skiriasi jų sąveikos mechanizmai su sintetinėmis lipidinėmis membranomis (suformuotomis iš DOPS ir DOPC fosfolipidų).

3. Vežinės MH-22A ląstelės geriau absorbuoja grafeno oksido nanodaleles lyginant su sveikomis CHO ląstelėmis.

4. GO funkcionalizavimas doksorubicinu sustiprina doksorubicino priešvėžinį poveikį. Toksinio priešvėžinio vaisto – doksorubicino – koncentracija gali būti sumažinta daugiau nei 10000 kartų naudojant hibridinį grafeno oksido ir doksorubicino junginį.

Disertacijos struktūra ir aprobavimas

Disertacija susideda iš įvado (I skyrius), literatūros apžvalgos (II skyrius), medžiagų ir tyrimų metodologijos (III skyrius), rezultatų (IV skyrius) ir išvadų (V skyrius). Įvade pateikta darbo idėja ir motyvacija, tikslas, pagrindiniai uždaviniai ir ginamieji teiginiai. Disertacijos pabaigoje pateiktas naudotos literatūros sąrašas, autorės publikacijų bei konferencijų sąrašai. Disertacijos puslapių skaičius yra 133, numeruotų paveikslų skaičius – 76, lentelių – 10. Naudotos literatūros sąrašą sudaro 269 šaltinių.

Disertacijos tyrimo rezultatai buvo paskelbti 4 publikacijose, įtrauktose į *Web of Science Thomson Reuters* duomenų bazę, ir 1 publikacija tarptautinėse duomenų bazėse. Disertacijos rezultatai pristatyti 10-yje tarptautinių konferencijų (iš jų – 3 kvietiniai pranešimai).

Trumpiniai

AJM – atominės jėgos mikroskopas

BLM – dvisluoksnė lipidinė membrana (angl. *bilayer lipid membrane*)

BSA- jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*)

CHO – kininio žiurkėno kiaušidžių ląstelės (angl. *Chinese hamster ovary*)

DOPC – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinas

DOPE – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminas

DOPS – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serinas

DOX – doksorubicinas

FCS – fluorescencinė koreliacinė spektroskopija (angl. *fluorescence correlation spectroscopy*)

FeTPPS₄ – geležies mezo-tetra (4-sulfonatofenil) porfinas

HP – hematoporfirinas

G – grafenas

GO – grafeno oksidas

MH-22A – pelės hepatomos MH-22A ląstelės

SAF – superkritinio kampo fluorescencija (angl. *supercritical angle fluorescence*)

SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas

TPyP – mezo-tetra (4-piridil) porfinas

TPPS₄ – 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatofenil) porfiras

UAF – mažesnio nei kritinio kampo fluorescencija (angl. *undercritical angle fluorescence*)

1. NAUDOTOS MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

Darbe naudotos cheminės medžiagos buvo chemiškai arba analitiškai gryni prekybiniai reagentai.

1.1. Grafeno funkcionalizavimas mezo-tetra (4-sulfonatofenil) porfiriniais

TPPS₄ ir FeTPPS₄ porfirinų tirpalai paruošiami ištirpinant miltelius dejonizuotame vandenyje ir skiedžiant iki 10⁻⁵ M koncentracijos. Paruošti tirpalai filtruojami pro 200 nm porų dydžio membraninius filtrus. Grįžtamasis protonų atsipalaidavimo / prisijungimo procesas (TPPS₄) buvo reguliuojamas pridendant HCl arba NaOH į tirpalą ir kontroliuojant pH (pH-150 M, *Gomel Plant of Measuring Devices*). Porfirinų tirpalai užlašinami ant komercinių grafeno plėvelių (padengimas apie 95 %, plėvelės suformuotos ant Si/SiO₂ padėklų) užlašinimo ir džiovinimo metodu (lašas – 5 μl) ir nuplaunami dejonizuotu vandeniu.

1.2. Grafeno funkcionalizavimas hematoporfirinu

Darbinis hematoporfirino (HP) tirpalas paruošiamas ištirpinant miltelius dejonizuotame vandenyje ir skiedžiant iki 10⁻⁵ M koncentracijos. GO dispersija paruošiama praskiedžiant 510 μl GO (500 mg/l) su 500 μl dejonizuoto vandens, o HP tirpalas– 500 μl HP (10⁻⁵ M) su 500 μl dejonizuoto vandens. Kad būtų pasiekta rūgštinė aplinka, į mišinį įlašinamas 1 μl koncentruotos sieros rūgšties. Esterifikacijos reakcijos tarp hematoporfirino ir grafeno oksido grįžtamumas buvo kontroliuojamas kambario temperatūroje UV-Vis spektroskopija, naudojant H₂SO₄ arba NaOH tirpalus pH pakeitimui.

Buvo išmatuoti HP (10⁻⁶ M)/GO (500 mg/l) tirpalų mišiniai su ir be katalizatoriaus (H₂SO₄) esant įvairiems medžiagų santykiams: 1:2, 1:5, 1:10, 1:12.75, 1:20 (pagal tūrį). Fluorescencijos matavimai atlikti naudojant USB2000 spektrometrą ir žadinant mėlyną lazeriu (473 nm). HP/GO paviršių γ santykis buvo apskaičiuotas pagal formulę:

$$\gamma = \frac{S_{HP}}{S_{GO}} \quad (1)$$

čia S_{HP} yra HP paviršiaus plotas, S_{GO} – GO paviršiaus plotas.

1.3. Grafeno oksido funkcionalizavimas (geležies) mezo-tetra (4-piridil) porfinu

Mezo-tetra (4-piridil) porfinas buvo ištirpintas nejonizuotame vandenyje kambario temperatūroje rūgštinėje aplinkoje (pH-2, 5x10⁻⁴ M koncentracija);

koloidas įgavo žalsvą spalvą. 500 mg/L koncentracijos grafeno oksido dispersija buvo praskiesta dejonizuotu vandeniu. Suspensijos pH buvo reguliuojamas HCl tirpalu, norint pasiekti 1,5–2,3 pH, ir 1 % CaCO₃, norint pasiekti pH nuo 5,4 iki 9,1. Sugerties ir fluorescencijos spektrų matavimai buvo atlikti sumaišius 5×10⁻⁴ M porfiriną su įvairiomis grafeno oksido koncentracijomis kambario temperatūroje. Prieš atliekant Ramano sklaidos ir AJM matavimus paruoštas mėginys buvo užlašintas ant stiklo ar aukso paviršiaus ir paliktas džiuiti ~ 1 val.

1.4. Grafeno oksido funkcionalizavimas doksorubicinu

Dokсорubicinas (DOX) buvo ištirpintas ir praskiestas dejonizuotame vandenyje iki 0,05 µg/ml koncentracijos. Sonifikuota grafeno oksido dispersija (500 mg/L) buvo atskiestas dejonizuotu vandeniu, gaunant 6,25 µg/ml koncentraciją, ir sumaišyta su dokсорubicinu. Paruošta dispersija buvo patalpinta ultragarsinėje vonelėje su šildymu (~40 °C) 1 valandai, siekiant katalizuoti kovalentinių ryšių tarp GO karboksi- ir DOX amino grupių susidarymą.

1.5. Naudoti analitiniai metodai

Šiame darbe buvo naudojami skirtingi analitiniai metodai siekiant apibūdinti susintetintus junginius: Ramano spektroskopija ir vaizdinimas, atominės jėgos mikroskopija, skenuojantis elektronų mikroskopas, Furjė infraraudonųjų spindulių spektroskopija, superkritinio kampo fluorescencinė bei koreliacinė ir UV-Vis spektroskopija.

1.6. Statistinė eksperimentinių duomenų analizė

Eksperimentiniai duomenys buvo apdorojami naudojantis *Microsoft Excel* 2010, *OriginLab Corporation OriginPro* 8.5, SPIP, NOVA 1.1.0.1840, *MATLAB* 7.12.0, *GIMP2*, *CrystalSleuth*, *ImageJ* programine įranga.

Molekulių formulės buvo nubraižytos naudojantis *HyperChem* 5.02 programine įranga. Molekulinės mechanikos optimizavimas buvo atliktas taikant Niutono-Rafsono algoritmą.

Statistinė analizė tarp dviejų nepriklausomų grupių buvo atlikta pagal Stjudento *t*-testą. Statistiniai skaičiavimai buvo atlikti remiantis pateikta formule:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}\right)\left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}\right)}} \quad (2)$$

čia \bar{x} matavimų aibės aritmetinis vidurkis, N- matavimų skaičius.

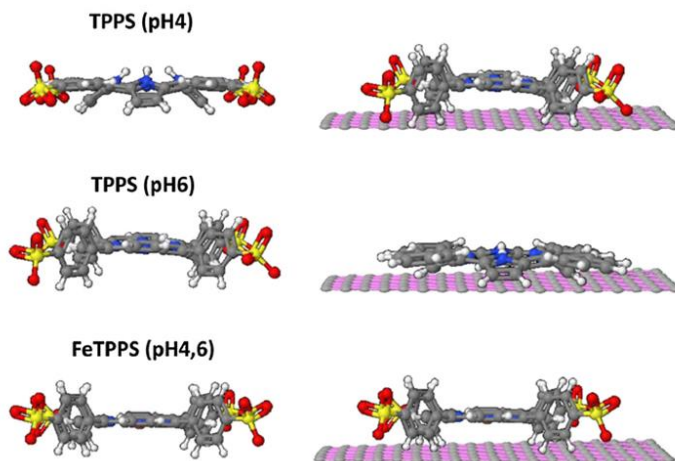
Išskaičiuotas stebėtas reikšmingumo lygmuo arba *p* reikšmės (mažiausias reikšmingumo lygmuo, su kuriuo teisinga nulinė hipotezė (H₀) gali būti atmesta turimiems duomenims) (**p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,005). Nulinė

hipotezė (H_0) – tikrinamoji hipotezė. Paprastai H_0 formuluojama, kad skirtumo nėra. Dažniausiai tai teiginys, kad populiacijos parametras yra lygus konkrečiai reikšmei arba skirstiniai sutampa.

2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

2.1. Grafeno funkcionalizavimas mezo-tetra (4-sulfonatofenil) porfinais

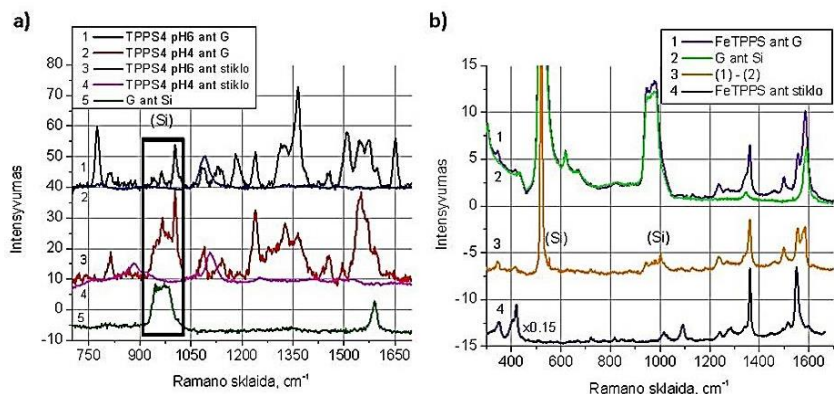
Atliktas nekovalentinis geležies ir mezo-tetra (4-sulfonatofenil) porfino ($FeTPPS_4$ ir $TPPS_4$) funkcionalizavimas su vienasluoksniu grafenu per π - π ryšius tarp TPPS pirolo bei fenilo žiedų ir GO paviršiaus. Buvo pastebėta, kad porfirino makrociklo protonavimas arba centrinio metalo atomo buvimas TPPS šeimoje vaidina svarbų vaidmenį molekulių struktūrai ir orientacijai sąveikaujant su vienasluoksniu grafenu (žr. 2.1 pav.).



2.1 pav. TPPS ir $FeTPPS$ molekulių konfigūracija vandeninėje terpėje ir virš grafeno paviršiaus

Diprotonuoto $TPPS_4$ sąveika su grafenu sukelia porfirino makrociklo deprotonavimo procesą. Grafeno G ir 2D smailių poslinkis į trumpesniųjų bangų pusę po sąveikos gali būti lemtas elektronų krūvio perdavimo iš $TPPS_4$ molekulės grafenui. Buvo nustatytas Ramano signalo sustiprinimas, kuris gali būti paaiškinamas šiuo krūvio perdavimo fenomenu dėl stiprios nekovalentinės sąveikos, kuri vyksta tarp TPPS pirolo ir fenilo žiedų ir grafeno paviršiaus. Centrinio metalo (geležies) atomo buvimas porfirino makrocikle yra svarbus $FeTPPS_4$ molekulės vientisumui sąveikos metu, ir nepaisant krūvio perdavimo efekto, susilpnina Ramano signalus. Deprotonuoto $TPPS_4$ sąveikos su grafenu

metu vyksta atominiai pokyčiai, dėl kurių atsiranda naujos Ramano juostos (žr. 2.2 pav.).

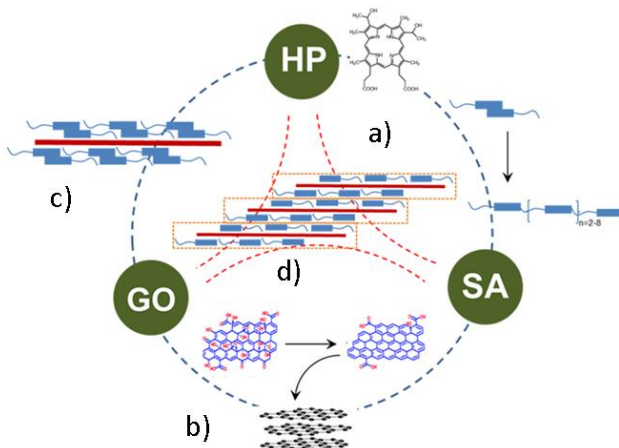


2.2 pav. a) TPPS₄ ir b) FeTPPS₄ Ramano spektrai pamatuoti ant grafeno bei stiklo paviršių

Porfirino makrociklo centrinių metalo atomų įvairovė bei galimybė keisti vandenilių prisijungimą prie porfirino molekulės suteikia daug galimybių kuriant naujas grafeno-porfirino nanomedžiagas su pageidaujamosiomis savybėmis.

2.2. Grafeno funkcionalizavimas hematoporfirinu

Grafeno oksido funkcionalizavimas hematoporfirinu buvo vykdomas per kovalentinę sąveiką tarp HP karboksi- ir GO hidroksi- grupių. Neutralioje pH terpėje stabilūs GO-HP nanodariniai buvo gauti naudojant esterifikacijos reakciją, katalizuotą sieros rūgštimi. Buvo gauti „sluoksniuoti“ GO-HP nanodariniai, sudaryti iš hematoporfirino oligomerų, monosluoksniais adsorbuotų ant GO paviršiaus (2.3 pav.).



2.3 pav. Procesų, vykstančių a) HP bei b) GO esant $\text{pH} \sim 2$, c) tarp HP ir GO esant $\text{pH} \sim 7$ ir d) esant $\text{pH} \sim 2$, schema

Nustatyta, kad esant rūgštiniam pH iš esmės pakeičia HP molekulių monomerų-dimerų pusiausvyra, suaktyvėja liuminescencinis intensyvumas bei HP molekulės ant GO paviršiaus formuoja monosluoksnį. Gauti rezultatai patvirtina esterifikacijos reakcijų naudojimo koncepciją GO-HP darinių formavimui, kuri parodė grafeno, kaip nanonešiklio, svarbą naujoms funkcinėms medžiagoms su pažangiomis savybėmis.

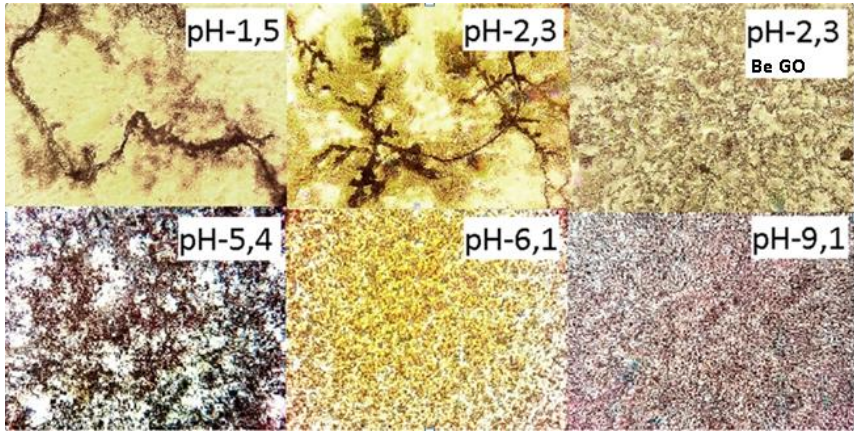
2.3. Grafeno oksido funkcionalizavimas doksorubicinu

GO funkcionalizavimas su priešvėžiniu vaistu doksorubicinu buvo vykdomas per kovalentinę sąveiką tarp GO karboksi- bei DOX amino grupių. Gauti nano- ir mikro- kompozitai, sudaryti iš doksorubicino, adsorbuoti ant GO. Tokių hibridinių ir 3D struktūrų formavimasis leidžia sukurti funkcinius nano- ir mikrokompozitus, kuriuose grafenas atlieka netoksiško nanonešėjo ir tuo pačiu medžiagos, sustiprinančios priešvėžinį poveikį, vaidmenį.

Nustatyta, kad galima sudaryti pažangias makromolekules, naudojant grafeno pagrindo medžiagą – grafeno oksidą. GO/DOX mišinys leido 10000 sumažinti DOX vaisto koncentraciją, siekiant susilpninti nepageidaujamus šalutinius poveikius. GO bei priešvėžinio vaisto hibridus galima naudoti kaip vaisto-vaisto pernašos sistemą vėžiui gydyti ir jo teragnostikai.

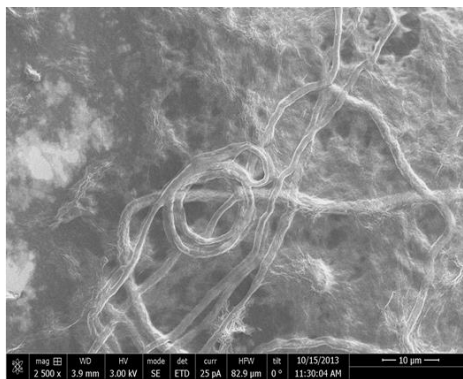
2.4. Grafeno oksido funkcionalizavimas katijoniniu meza-tetra (4-piridil) porfinu (TPyP)

GO/TPyP hibridinės struktūros buvo susintetintos savitvarkio formavimosi būdu dėl joninės sąveikos. Tyrimas atskleidė trimačių skaidulų tipo struktūrų susidarymą rūgštinėmis sąlygomis ir lapus primenančių GO/TPyP struktūrų susidarymą šarminiame tirpale (2.4 pav.).



2.4 pav. Optinės GO/TPyP arba TPyP agregatų tirpaluose nuotraukos (125x) esant skirtingoms pH vertėms

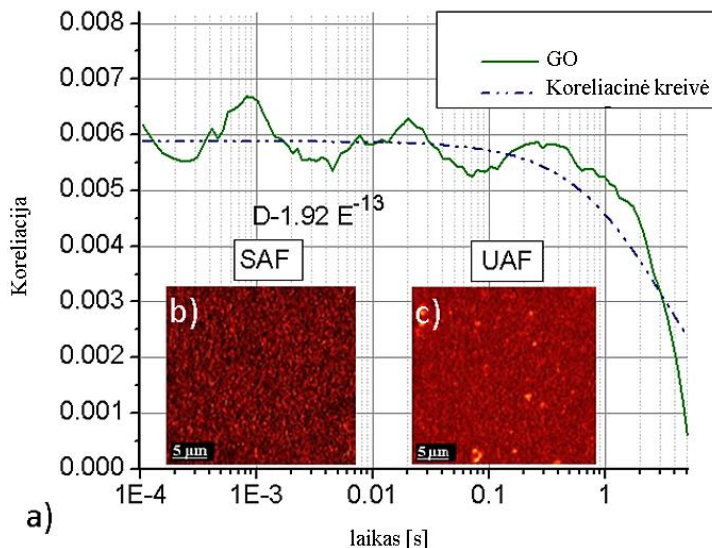
Gautų struktūrų charakterizavimas parodė, kad susintetintų skaidulų skersmuo gali svyruoti nuo dešimčių iki šimtų nano metrų ir sudaryti tinklą primenančias struktūras (2.5 pav.). Tokio tipo susintetintos grafeno pagrindo makromolekulės gali būti naudojamos kaip pagrindas audinių inžinerijoje.



2.5 pav. Hibridinių GO/TPyP struktūrų SEM nuotraukos

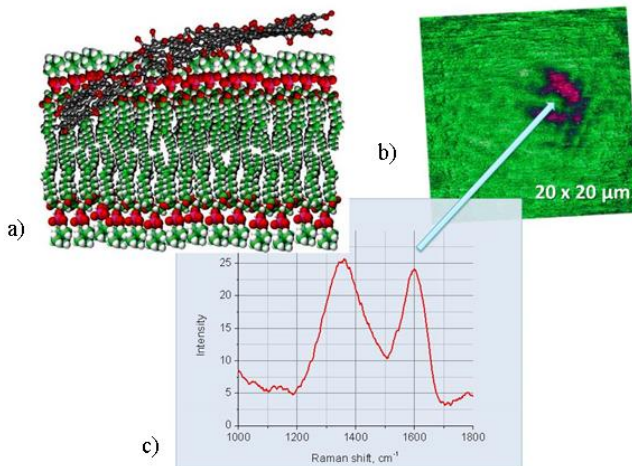
2.5. Dvisluoksnės lipidinės membranos sąveika su GO nanodalelėmis

Buvo pastebėta, kad GO yra fluorescuojanti nedidinaminė medžiaga (žr. 2.6 pav.) ir dėl šių charakteristikų ją galima aptikti ant lipidinės membranos. GO fluorescencija labiau pastebima mažesnio nei kritinio kampo fluorescencijos (UAF) kanale, todėl tai taip pat yra tinkamas būdas atskirti lipidų fluorescenciją nuo GO fluorescencijos.



2.6 pav. a) GO koreliacijos kreivė ir paskaičiuotas GO difuzijos koeficientas (D), GO dribsnių fluorescencijos 2D nuotrauka: b) SAF kanale, c) UAF kanale

Norint patvirtinti nanodalelių prikibimą prie membranų paviršiaus, buvo naudoti fluorescencinės koreliacinės spektroskopijos (FCS) matavimai, parodantys nanodalelių poveikį lipidinių membranų difuzijai. Dvisluoksnės lipidinės membranos (BLM) difuzija pastebimai sumažėjo vietoje, kurioje GO dribsniai buvo matomi ant membranos paviršiaus (lipidinės membranos D sumažėjo nuo $2,5 E^{-12} m^2 s^{-1}$ iki $5-7 E^{-13} m^2 s^{-1}$). Galimas GO dribsnio ir lipidinės membranos sąveikos modelis pateiktas 2.7 pav.



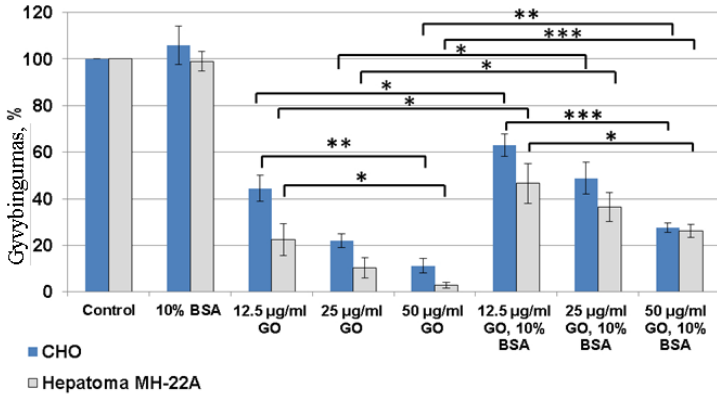
2.7 pav. Grafeno oksido patekimo į membraną modelis

Jis atitinka kitų mokslininkų pasiūlytus modelius, kurie aiškina, kad GO dribsnis įpjauja lipidinę membraną. Tai paaiškina, kodėl dalis grafeno oksido dribsnio nebuvo matoma ir konfokalinėje nuotraukoje (2.7 pav. b), tačiau ją buvo galima aptikti naudojant Ramano spektroskopiją (2.7 pav. c) ir išmatavus lipidų difuzijos pokyčius šalia GO dribsnio.

2.6. Grafeno oksido įsisavinimas skirtingų ląstelių ir jo toksiškumas

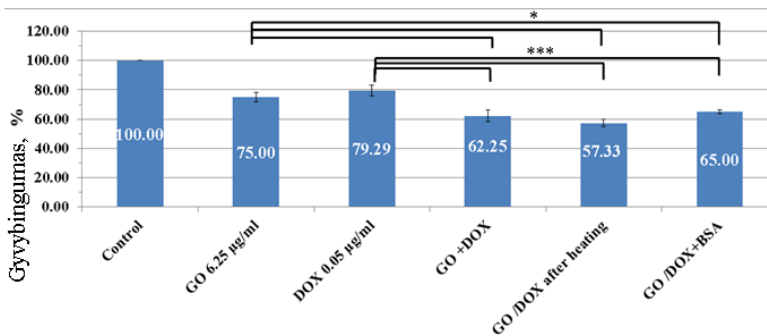
Cito- ir biosuderinamumo įvertinimas yra svarbus žingsnis vystant grafeno oksidą kaip naują perspektyvią medžiagą *in vivo* biomedicino taikymams. Šiame darbe tirtas GO su jaučio serumo albuminu (BSA) ir be jo poveikis sveikų (kininio žiurkėno kiaušidžių) ir vėžinių (pelių hepatomos MH-22A) ląstelių gyvybingumui bei atliktas GO pasiskirstymo ląstelių viduje *in vitro* įvertinimas.

Duomenys parodė, kad apdorojus tik BSA ląstelių gyvybingumas nesiskyrė nuo kontrolinių. MH-22A ląstelių gyvybingumas mažėjo, didėjant GO (12,5–50,0 μg/ml) koncentracijai nuo 22 % iki 3 %, po apdorėjimo GO (12,5–50,0 μg/ml)-BSA (10 %) ląstelių gyvybingumas sumažėjo nuo 47 % iki 26 %. Gauti rezultatai rodo, kad MH-22A ląstelių gyvybingumas buvo didesnis naudojant GO-BSA. Ta pati tendencija pastebėta ir su CHO ląstelėmis: ląstelių gyvybingumas mažėja, didėjant GO koncentracijai nuo 44 % iki 11%, naudojant GO-BSA – nuo 59 % iki 28 %. GO poveikis ląstelių gyvybingumo sumažėjimui buvo stipresnis MH-22A ląstelių atveju (2.8 pav.).



2.8 pav. CHO ir MH-22A ląstelių gyvybingumas po poveikio su BSA, GO ir GO-BSA esant skirtingoms GO koncentracijoms (duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų)

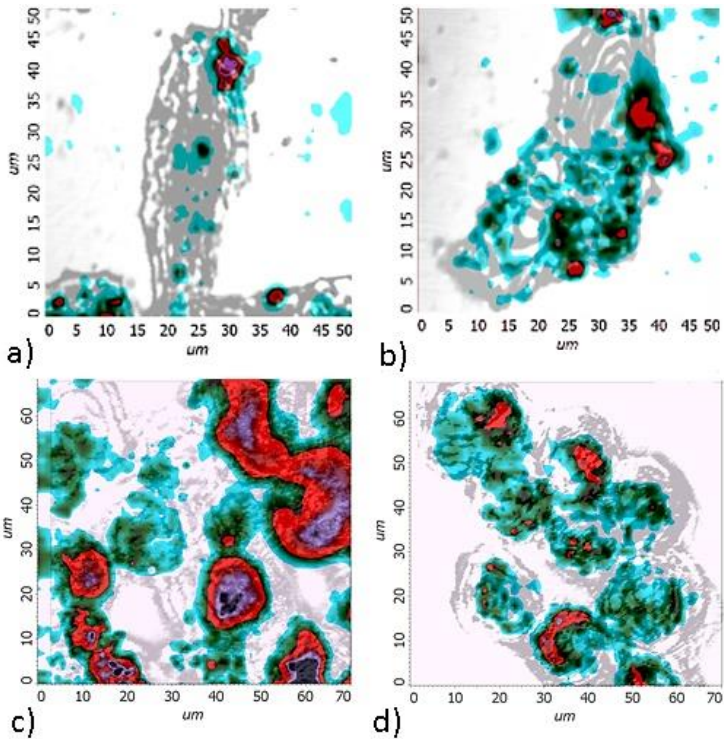
Be to, buvo įvertinta funkcionalizuoto su dokсорubicinu GO įtaka vėžinių MH-22A ląstelių gyvybingumui, siekiant sumažinti DOX koncentraciją iki 0,05 µg/ml. Rinkoje yra kelios komercinės dokсорubicino vaistų formos, pvz., tirpalas injekcijoms „ADRIAMYCIN“ arba lipidų kompleksas „DOXIL“. Abiejų paminėtų vaistų koncentracija yra 2 mg/ml. Norint išvengti perdozavimo simptomų (traukulių, nepaaiškiamo kraujavimo) ir pašalinių poveikių (pykinimo, vėmimo, viduriavimo, prasto apetito, rausvos spalvos šlapimo, ašarojimo, prakaitavimo, laikino plaukų slinkimo ir t. t.) DOX koncentracija eksperimentuose su hepatomos ląstelėmis buvo sumažinta net 10000 kartų. MH-22A ląstelių gyvybingumo rezultatai pateikiami 2.9 pav.



2.9 pav. Pelės hepatomos MH-22A ląstelių gyvybingumas po poveikio su GO, DOX, GO/DOX ir GO/DOX+BSA (duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų)

Funkcionalizuoto GO naudojimas su vėžio vaistu doksorubicinu net esant labai žemoms DOX koncentracijoms (0,05 $\mu\text{g/ml}$) atskleidė, kad hepatomos ląstelių gyvybingumas buvo apie 20 procentų mažesnis nei naudojant DOX vaistą atskirai – atitinkamai nuo 79 % iki 62 % ir 57 %.

GO pasiskirstymui ląstelių viduje įvertinti buvo naudojamas Ramano vaizdinimas, kuris atskleidė, kad MH-22A ląstelių atveju GO užimama apie > 60 % paviršiaus ploto, o CHO atveju – apie 20 % (2.10 pav.). GO susitelkęs keliuose ląstelių vietose, daugiausiai jo galima rasti ląstelių citoplazmos srities periferijoje.



2.10 pav. Grafeno oksido pasiskirstymo ląstelėse Ramano spektro žemėlapis (Spektroskopinė Ramano mikroskopija) a) CHO ląstelėje, b) MH-22A ląstelėse, c) MH-22A ląstelėje paveikus funkcionalizuotu GO/DOX, d) MH-22A ląstelėje paveikus funkcionalizuotu GO/DOX su papildomu baltymų sluoksniu (optinės konfokalinės nuotraukos yra pateiktos kaip pagrindas, ant kurio yra pateikti Ramano vaizdinimo rezultatai)

GO citotoksiškumas buvo tirtas dviejose ląstelių linijose, naudojant kolonijų formavimosi analizės metodą. Tyrimo rezultatai parodė, kad ląstelių gyvybingumas mažėjo didėjant GO koncentracijai (CHO ląstelių atveju nuo 44 % iki 11 %, MH-22A ląstelių atveju – nuo 22 % iki 3 %). Nustatyta, kad 50 µg/ml GO buvo kritinė koncentracija (mirė beveik visos ląstelės). Funkcionalizuoto GO naudojimas su vėžio vaistu doksorubicinu net esant labai žemoms koncentracijoms parodė statistiškai reikšmingą rezultatą – hepatomos ląstelių gyvybingumas buvo apie 20 procentų mažesnis nei naudojant DOX atskirai. Kai nanodalelės buvo naudojamos pridėjus 10 % BSA, ląstelių gyvybingumas buvo aukštesnis dėl baltymų vainiko susidarymo ant nanodalelių. Ląstelių kolonijų susidarymo vertinimo optiniu vaizdinimu rezultatai patvirtino ląstelių gyvybingumo tyrimo rezultatus. GO pasiskirstymo ląstelių viduje Ramano vaizdinimo rezultatai rodo, kad MH-22A ląstelių gyvybingumas sumažėjo todėl, kad didesnis GO kiekis buvo sukauptas šiose ląstelėmis lyginant su CHO ląstelėmis arba su ląstelėmis, kuriose GO nebuvo funkcionalizuotas. Stiprią GO įtaką ląstelių membranų morfologijai ir ryšių tinklo tarp ląstelių augimui patvirtino AFM vaizdinimas. AFM duomenys aiškiai rodo, kad GO įtaka atskiroms ląstelių linijoms skiriasi.

3. IŠVADOS

1. Naujos hibridinės nanostruktūros buvo susintetintos funkcionalizuojant: grafeną su (geležies) mezo-tetra (4-sulfonatofenil) porfinais (FeTPPS ir TPPS), grafeno oksidą su hematoporfirinu (HP), grafeno oksidą su mezo-tetra (4-piridil) porfinu (TPyP) ir grafeno oksidą su priešvėžiniu vaistu – doksorubicinu (DOX). Susintetintų nanostruktūrų tyrimas ir vertinimas buvo atliktas naudojant Ramano spektroskopiją ir vaizdinimą, atominės jėgos mikroskopiją, skenuojantį elektronų mikroskopą, Furjė spektroskopiją, superkritinio kampo fluorescencinę ir UV-Vis spektroskopijas.

2. Grafeno funkcionalizavimas su (geležies) mezo-tetra (4-sulfonatofenil) porfinais buvo atliktas susidarant stipriai nekovalentinei sąveikai tarp TPPS₄ molekulių pirolo ir fenilo žiedų, esančių arti grafeno paviršiaus. Protonų prisijungimas prie porfirino makrociklo arba centrinio metalo atomo (Fe) buvimas TPPS₄ šeimoje sąveikos su viensluoksniu grafenu metu daro įtaką TPPS₄ molekulės struktūrai ir orientacijai grafeno atžvilgiu. Diprotonuoto TPPS₄ sąveika su grafenu sukelia porfirino makrociklo deprotonavimo procesą; jo metu buvo pastebėtas G ir 2D smailių poslinkis į trumpesniųjų bangų pusę, kuris gali būti lemtas elektronų krūvio perdavimo iš TPPS₄ molekulės grafenui, dėl kurio yra chemiškai sustiprinami Ramano signalai. Deprotonuoto TPPS₄ sąveikos su grafenu metu vyksta atominiai pokyčiai, dėl kurių atsiranda naujos Ramano juostos. Geležies atomo buvimas porfirino makrocikle suteikia FeTPPS₄ molekulei stabilumo sąveikos metu, ir nepaisant krūvio perdavimo efekto, susilpnina Ramano signalus.

3. Grafeno oksido funkcionalizavimas hematoporfirinu sukuria daugiasluoksnį nanokompozitą, sudarytą iš hematoporfirino oligomerų, adsorbuotų ant grafeno oksido. Naudojant esterifikacijos reakciją, katalizuotą sieros rūgštimi, buvo susintetinti vandeninėje terpėje stabilūs GO-HP nanokompozitai esant neutraliam pH.

4. Grafeno oksido sintezės su katijoniniu mezo-tetra (4-piridil) porfinu dėl savaiminio formavimosi metu buvo susintetintos hibridinės GO/TPyP nanoskaidulų tipo struktūros. Buvo nustatyta, kad trimatės skaidulos formuojasi rūgštinėje terpėje, o GO/TPyP dribsnio tipo struktūros susidaro šarminiame tirpale. Gautų skaidulinių struktūrų skersmuo gali būti nuo dešimčių iki šimtų nanometrų ir sudaryti tinklą primenančią struktūrą. Dėl nanoskaidulų formavimosi hibridinis katijoninio porfirino-grafeno oksido junginys nėra tinkamas vaistų pernašai. Tačiau, šios tinklą primenančios struktūros gali būti naudojamos audinių inžinerijos tikslams.

5. Grafeno oksido funkcionalizavimo su priešvėžiniu vaistu doksorubicinu metu buvo sukurti nano- ir mikrokompozitai, sudaryti iš doksorubicino, adsorbuoto ant grafeno oksido paviršiaus per kovalentines jungtis

ir nekovalentines, pvz. elektrostatinę ir π - π ryšio, sąveikas. Tokių grafeno oksido-doksorubicino hibridinių junginių susidarymas atveria kelią efektyvių vaisto-vaisto pernašos sistemų, skirtų vėžio gydymui ir teranostikai kūrimui.

6. Lipidinės membranos, kaip nanodalelių sąveikos su biomembranomis modelis, buvo suformuotos iš neutralių 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholino (DOPC) ir neigiamai įkrautų 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serino (DOPS) fosfolipidų. Lipidų difuzinis judrumas ir struktūrinis vientisumas buvo tiriamas superkritinio kampo fluorescencine spektroskopija ir fluorescencine koreliacine spektroskopija; lipidinių membranų sąveikos vietoje su grafeno oksidu ir ZnO nanodalelėmis, lipidų judrumas ženkliai sulėtėjo (D- $5.7 \text{ E-13 m}^2 \text{ s}^{-1}$), taip pat buvo aptikta silpna sąveika (D- $4.91 \text{ E-12 m}^2 \text{ s}^{-1}$) tarp stabilios TiO_2 nanodalelių dispersijos ir lipidinės membranos.

7. Grafeno oksido patekimas į ląstelę vyksta įsiskverbiant grafeno oksido lakštams į membraną. Grafeno oksido citotoksiškumas buvo tiriamas dvejose ląstelių linijose, naudojant kolonijų formavimosi analizės būdą. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad ląstelių gyvybingumas mažėjo, didėjant grafeno oksido koncentracijai (kininio žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląstelių atveju nuo 44 % iki 11 %, pelių hepatomos MH-22A (MH-22A) ląstelių atveju – nuo 22 % iki 3 %). Ramano vaizdinimo rezultatai, kurie rodo grafeno oksido pasiskirstymą ląstelių viduje, atskleidžia, kad lyginant su CHO ląstelėmis, MH-22A ląstelių gyvybingumas buvo mažesnis dėl į šias ląsteles patekusio didesnio grafeno oksido kiekio.

8. Nustatyta, kad grafeno oksido funkcionalizavimas doksorubicinu sustiprina doksorubicino priešvėžinį poveikį. Nustatytas statistiškai reikšmingas rezultatas – MH-22A ląstelių gyvybingumas buvo apytiksliai 20 % mažesnis, nei naudojant doksorubiciną atskirai (atitinkamai nuo 57 % iki 79 %).

4. LITERATŪRA

1. GEORGAKILAS, Vasilios, et al. Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. *Chemical Reviews*, 2012, 112.11: 6156-6214
2. GUO, Shaojun; DONG, Shaojun. Graphene nanosheet: synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40.5: 2644-2672
3. JIANG, Hongji. Chemical preparation of graphene-based nanomaterials and their applications in chemical and biological sensors. *Small*, 2011, 7.17: 2413-2427
4. WU, Si-Ying; AN, Seong Soo A.; HULME, John. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 9

AUTORIAUS PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Mokslinės informacijos instituto duomenų bazės „ISI Web of Science“ leidiniuose, turinčiuose citavimo indeksą

1. **Grinceviciute, N.**, Snopok, B., & Snitka, V. (2014). Functional two-dimensional nanoarchitectures based on chemically converted graphene oxide and hematoporphyrin under the sulfuric acid treatment. *Chemical Engineering Journal*, 255, 577-584 [IF-4.3]
2. Naumenko, D., Naumenko, I., **Grinceviciute, N.**, & Snitka, V. (2015). The interaction of iron and metal-free meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphines with CVD graphene: a comparative Raman spectroscopy study. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(1), 94-99 [IF-2.7]
3. Batiuskaite, D., **Grinceviciute, N.**, & Snitka, V. (2015). Impact of graphene oxide on viability of Chinese hamster ovary and mouse hepatoma MH-22A cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 1195-1200 [IF-3.2]
4. Rodaite-Riseviciene, R., **Grinceviciute, N.**, Selskis, A., & Snitka, V. (2016). Synthesis of hybrid graphene-porphyrin micro/nanofiber structures by ionic self-assembly. *Materials Letters*, 164, 160-164 [IF-2.5]

Kitų tarptautinių duomenų bazių leidiniuose

1. **Grinceviciute, N.**, Verdes, D., Snitka, V. (2015) Effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on supported lipid bilayers. *Nanomedicine Research*, 2(3), 00030

Konferencijų sąrašas

1. D. Naumenko, I. Naumenko, **N. Grinceviciute**, V. Snitka. Raman spectroscopy characterisation of interaction of graphene with iron or metal-free meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphines. International Conference on Diamond and Carbon Materials 2013. 2-5 September 2013. Riva del Garda, Italy
2. A. Bukontaite, **N. Grinceviciute**, V. Snitka. The study of electroporation of various impulses on cell morphology" The International Conference of Natural and Life sciences 2014 COINS 3-8 March 2014 Vilnius, Lithuania
3. D.Batiuskaite, **N.Grinceviciute**, V.Snitka. Impact of graphene oxide on viability of mouse hepatoma MH-22A cells. 2014 International Conference of Advanced Materials 2-4 July 2014, Aveiro, Portugal
4. R. Žūkienė, **N. Grincevičiūtė**, L. Ramanauskaitė, V. Snitka. The effect of bovine serum albumin-coated zinc oxide nanoparticles on cell viability and ROS generation. The XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society. 18-20 June 2014, Birštonas, Lithuania
5. V. Snitka, **N. Grinceviciute**. Synthesis and properties of gold-oligoaniline-graphene composite. ICCE-22 Malta, July 13-19, 2014 Saint Julien, Malta
6. **N. Grinceviciute**, B. Snopok, V. Snitka. Functional two-dimensional nanoarchitectures based on chemically converted graphene oxide and hematoporphyrin under the sulfuric acid treatment. Faraday Discussion 175. Physical Chemistry of functionalised Biomedical Nanoparticles 17-19 September 2014, Bristol, UK
7. **N. Grinceviciute**, L. Ramanauskaitė, V. Snitka. Investigation of bilayer lipid membranes on nanostructured Au and Ag substrates by surface enhanced Raman spectroscopy. ImagineNano 2015, 9-13 March, 2015, Bilbao, Spain
8. V.Snitka, L.Ramanauskaite, **N. Grinceviciute**, H.Xu. Plasmonic nanoprobe for surface enhanced Raman spectroscopy of biological molecules EMN Phuket Meeting 2015, 05 4-7, Phuket, Thailand
9. V. Snitka, L. Ramanauskaite, **N. Grinceviciute** and H. Xu. Investigation of amyloidogenic proteins interaction with lipid bilayers using local plasmonic probes. META'15, the 6th International Conference on Metamaterials, Photonic Crystals and Plasmonics August 4-7, 2015 New York City, USA
10. V. Snitka, L. Ramanauskaite, **N. Grinceviciute**. Synthesis of hybrid graphene-porphyrin nanofiber structures by ionic self-assembly. EMN Meeting Energy Materials Nanotechnology, 2015, 12 8-12, Hong Kong, China

CURRICULLUM VITAE

NORA ŠLEKIENĖ (GRINCEVIČIŪTĖ)

1986-03-20

nora.grinceviciute@ktu.lt

Išsilavinimas

2005 m. baigė Vilniaus Gabijos gimnaziją.

2010 m. baigė Kauno medicinos universitetą (dabar – Lietuvos sveikatos mokslų universitetas), Farmacijos fakultetą. Įgijo farmacijos magistro kvalifikacinį laipsnį ir vaistininko profesinę kvalifikaciją.

2012–2016 m. studijavo doktorantūros studijose Kauno technologijos universitete, Matematikos ir gamtos mokslų fakultete, Mikrosistemų ir nanotechnologijų mokslo centre (Technologijos mokslai, Chemijos inžinerija, 05T).

Darbo patirtis

2010–2012 UAB *Sicor Biotech*, Kokybės kontrolės užtikrinimo vadovė mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros skyriui.

2011–2016 UAB *Eurovaistinė*, vaistininkė.

2012–2016 Projekto jaunesnioji mokslo darbuotoja, Mikrosistemų ir nanotechnologijų mokslo centras, Kauno technologijos universitetas.

Stażuotės užsienio institucijose

2014 06 ir 2014 10 Ciuricho universitete, Chemijos fakultete, Ciurichas (Šveicarija).

2015 05 CNR Medžiagų institute, Trieste (Italija).

Nuo 2016 07 Europos kosmoso agentūroje, Noordwijk (Nyderlandai)

Pasiekimai

2015 ir 2016 m. laimėta Lietuvos mokslo tarybos stipendija už akademinis pasiekimus

2015 m. laimėta Kauno technologijos universiteto stipendija aktyviausiųjų doktorantų konkurse.

2016 m. laimėtas Lietuvos mokslo tarybos paskelbtas konkursas stažuotei metams į Europos kosmoso agentūrą (Nyderlandai).

ABSTRACT

Graphene, the two-dimensional sp^2 -hybridized carbon, is currently the most intensively studied material. The intensive research about graphene in recent years is promising a revolution in chemical and electrical engineering. Chemical Engineering of graphene-based materials applies physical sciences (nano-graphene for improving drilling fluids performance, integrated graphene dispersion to create high performance fluids, graphene-enhanced composites added to rubber can increase its strength, conductivity and impermeability and etc.) and life sciences. The bio-applications (drug delivery, cancer therapeutics, tissue engineering, diagnostics, and bioimaging) of graphene and its derivatives is due to many desirable properties, such as high specific surface area, mechanical strength, electrical conductivity, thermal conductivity of graphene and bio-compatibility, low cost, scalable production, and facile biological/chemical functionalization of GO. The critical issue to be resolved before further applications of graphene in nanomedicine is the potential short and long-term toxicity of this new nanomaterial. Many previous investigations have shown GO and its hybrid structures to induce low cell toxicity, but reports remain conflicting. A number of groups have performed experiments to explore the suitability in nanomedicine and effects of graphene, but this question still is not properly understood and needs further investigations.

The aim of the thesis is the synthesis of new hybrid nanostructures by functionalisation of graphene/graphene oxide with porphyrins and doxorubicin, also the investigation and evaluation of it as a possible drug delivery platform in nanomedicine. In order to achieve the goal, the following **tasks** were established:

1) Development and optimisation of methods for the functionalisation of graphene/graphene oxide nanoparticles with organic molecules and characterisation of physicochemical properties of functionalised structures.

2) Development and optimisation of methods to synthesise new hybrid macromolecules using graphene oxide with organic molecules and characterisation of synthesised macromolecules.

3) Analysis of graphene oxide nanoparticles interaction with lipid membranes, as a model for nanoparticles interaction with bio-membranes.

4) Determining the mechanism of graphene oxide transfer into the living cell and the possible toxicity of graphene oxide in different cell lines.

5) Determining the toxicity of functionalised graphene oxide with doxorubicin for cancer cells.

During this study, the novel methodology of graphene oxide functionalization with hematoporphyrin (GO-HP) by chemical covalent binding was designed. New graphene-based hybrid nanostructures (GO-HP) and macromolecules (GO/TPyP) were synthesized. The interaction of GO, ZnO and

TiO₂ nanoparticles with lipid membranes was performed and the influence of nanoparticles on lipid membranes dynamics and membranes disruption was evaluated. For the first time, the impact of graphene oxide and graphene oxide with protein “corona” on viability for different cell lines (Chinese hamster ovary and mouse hepatoma MH-22A cells) was determined. Likewise, the impact of graphene oxide and functionalized graphene oxide with doxorubicin on viability of mouse hepatoma MH-22A cells was evaluated.

Conclusions of the thesis:

1. The new hybrid nanostructures were synthesised by functionalisation of: graphene with iron and metal-free meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphines (FeTPPS and TPPS), graphene oxide with hematoporphyrin (HP), graphene oxide with meso-tetra (4-pyridyl) porphine (TPyP) and graphene oxide with anticancer drug- doxorubicin (DOX). The investigation and evaluation of synthesised nanostructures has been performed by Raman spectroscopy and imaging, Atomic force microscopy, Scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, Supercritical angle fluorescence and UV-Vis spectroscopies.

2. The graphene functionalisation with iron and metal-free meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphines was carried out by a strong non-covalent interaction through pyrrole and desulphonated phenyl rings of closely located planar TPPS molecules on the graphene surface. The protonation of porphyrin macrocycle or the existence of a central metal atom for the TPPS family plays an important role in the molecular conformation and orientation when interacting with a single-layer graphene. Interaction between diprotonated TPPS and graphene causes the deprotonation process of porphyrin macrocycle, during which a shift in the direction of shorter wavelength for the G and 2D peaks was noticed, this could be caused by the transfer of electron charge from the TPPS molecule to graphene and it chemically strengthens Raman signals. During the interaction between deprotonated TPPS and graphene atomic changes take place, because of which new Raman bands appear. The presence of an iron atom in the porphyrin macrocycle provides stability for the FeTPPS molecule during the interaction and weakens the Raman signals, despite the effect of charge transfer.

3. The functionalisation of graphene oxide with hematoporphyrin leads to the nanocomposite of a layered structure composed of hematoporphyrin oligomers adsorbed on the surface of graphene oxide in a monolayer through covalent, electrostatic and *p*-stacking interactions. Nanocomposites stable in aqueous media at neutral pH hematoporphyrin/graphene oxide were obtained as a result of esterification reaction catalysed by sulfuric acid.

4. A synthesis of graphene oxide with cationic meso-tetra (4-pyridyl) porphine due to ionic self-assembly leads that a hybrid graphene oxide/TPyP nanofibre-type structures was synthesised. The investigation revealed a three-

dimensional fibre structure formation under the acid conditions and leaf-like structures of the graphene oxide/TPyP assemblies under the alkaline conditions of the solution. The characterisation of obtained structures has shown the fibres can vary in diameter from tens to hundreds of nanometres and produce a network-like structure. Due this formation of the nanofibres the proposed cationic porphyrin-graphene oxide synthesis method is not suitable for drug delivery. Indeed, these network-like structures can be used in tissue engineering purposes.

5. The functionalisation of graphene oxide with the anticancer drug doxorubicin leads to the nano- and microcomposites composed of doxorubicin adsorbed on the surface of graphene oxide through covalent and non-covalent interactions, such as electrostatic and π - π stacking interactions. The formation of such graphene oxide/doxorubicin hybrid opens the way to create drug-drug delivery systems for treating cancer and theranostics.

6. Lipid membranes, as a model for nanoparticle interactions with biomembranes, have been formed of neutral 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) on negatively charged 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) phospholipids. The diffusion mobility and structural integrity of lipids was investigated by supercritical angle fluorescence spectroscopy and fluorescence correlation spectroscopy; after the interaction of lipid membrane with the graphene oxide and ZnO nanoparticle membrane slowed down significantly ($D = 5.7 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), also the weak interaction ($D = 4.91 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) was found between a stable dispersion of TiO₂ nanoparticles and lipid bilayer membranes.

7. It was approved that the transfer of graphene oxide into the cell proceeds through penetration into the membrane. The cytotoxicity of graphene oxide was investigated with the two cell lines using a colony-forming assay. Research results have shown that the viability of the cells decreased with increasing concentrations of graphene oxide (in the case of Chinese hamster ovary cells from 44% to 11%, mouse hepatoma MH-22A cells, from 22% to 3%). Raman imaging results of graphene oxide intracellular distribution in the cells suggest that the viability of MH-22A cells was decreased because a larger volume of graphene oxide was accumulated in these cells in comparison with Chinese hamster ovary cells.

8. It was found that the functionalised graphene oxide with doxorubicin strengthens the effect of doxorubicin, as an anticancer drug. It was revealed that a statistically significant result, the viability of MH-22A cells, was approx. 20% lower than using doxorubicin separately (from 57% to 79%, respectively).

UDK 546.26 + 615](043.3)

SL344. 2016-11-24, 1,75 leidyb. apsk. 1. Tiražas 50 egz. Užsakymas 430.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas

Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas