

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Ema Paciorková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Grafenové kvantové tečky – jejich cytotoxicita
a využití pro bioaplikace**

Bakalářská práce

Ema Paciorková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Markéta Havrdová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Ema PACIORKOVÁ
Osobní číslo: R20713
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Grafenové kvantové tečky – jejich cytotoxicita a využití pro bioaplikace
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Studentka má za úkol sepsat teoretickou část zaměřenou na vybraný nanomateriál a zpracovat experimentální část, která bude popisovat cytotoxicitu grafenových kvantových teček (GQDs).

V úvodu teoretické části by měla zmínit obecný přínos nanotechnologie a nanomateriálů pro medicínu a následně by práci měla zaměřit na uhlíkové nanomateriály s důrazem na GQDs. Teoretická část by měla být rozdělena do kapitol, které popisují rozdíly mezi uhlíkovými a grafenovými kvantovými tečkami včetně jejich syntéz a fyzikálních vlastností. Také by měly být zpracované kapitoly, které se zabývají biokompatibilitou a bioaplikací těchto nanomateriálů.

V experimentální části se studentka seznámí s testováním toxicity nanomateriálů v laboratoři tkáňových kultur. Bude pracovat s předem charakterizovaným vzorkem GQDs, který aplikuje zdravým či nádorovým buněčným liniím. Značené buňky budou zobrazeny mikroskopicky a provedou se standardní laboratorní testy ke stanovení buněčné viability, intracelulárního oxidativního stresu a buněčného cyklu.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vědecké odborné články z databáze WOS, například jako tyto:

Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications; Preparation of Graphene Quantum Dots for Bioimaging Application; Graphene Quantum Dots for Cell Proliferation, Nucleus Imaging, and Photoluminescent Sensing Applications

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Markéta Havrdová, Ph.D.**
Katedra experimentální fyziky

Datum zadání bakalářské práce: 6. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 15. března 2022

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Ema Paciorková
Název práce:	Grafenové kvantové tečky – jejich cytotoxicita a využití pro bioaplikace
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Markéta Havrdová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou grafenových kvantových teček, pojednává o jejich biokompatibilitě s živými systémy a cytotoxickém vlivu na vybrané buněčné linie.

Teoretická část práce je zaměřena na popis uhlíkových nanomateriálů, popisuje rozdíly mezi uhlíkovými a grafenovými kvantovými tečkami. Tato část rovněž pojednává o způsobech syntézy grafenových kvantových teček a charakterizuje vlastnosti těchto nanomateriálů, vzhledem k tomu, že se jedná o klíčové informace pro budoucí vývoj biokompatibilních nanomateriálů.

V experimentální části byl pozorován efekt grafenových kvantových teček působících na vybrané buněčné linie. S využitím kolorimetrického testu byl studován vliv nanomateriálů na buněčnou viabilitu. Následně bylo za přítomnosti fluorescenční sondy monitorováno ovlivnění produkce reaktivních forem kyslíku v buňkách značených grafenovými tečkami. Prostřednictvím konfokální mikroskopie byla sledována distribuce těchto nanočástic v intracelulárním prostředí. Na závěr bylo pomocí průtokové cytometrie měřeno, jaký dopad mají grafenové kvantové tečky na buněčný cyklus.

Klíčová slova:	Nanomateriály, grafenové kvantové tečky, cytotoxicita, biokompatibilita, buněčná viabilita
Počet stran:	73
Počet příloh:	6
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's name and surname:	Ema Paciorková
Title:	Graphene quantum dots – cytotoxicity and bioapplications
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor:	Mgr. Markéta Havrdová, Ph.D.
The year of presentation:	2023

Summary:

This bachelor thesis aims at the problematics of graphene quantum dots, it discusses its biocompatibility with live systems and cytotoxicity in selected cell lines.

The theoretical part is focused on the description of carbon nanomaterials and defines the differences between carbon and graphene quantum dots. The ways of graphene quantum dots synthesis and characterization of properties of these nanomaterials are also included in this work, because it is important for the future development of biocompatible nanomaterials.

The influence of graphene quantum dots incubated with selected cell lines was examined in the experimental part of the thesis. The impact of these nanomaterials on cell viability was studied with the use of a colorimetric assay. Then in the presence of a fluorescence probe, the effect on the production of reactive oxygen species was monitored. The intracellular distribution of these nanoparticles was observed using confocal microscopy and the impact of graphene quantum dots on the cell cycle was measured by flow cytometry.

Key words:	Nanomaterials, graphene quantum dots, cytotoxicity, biocompatibility, cell viability
Number of pages:	73
Number of appendices:	6
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně na základě uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Markéty Havrdové, Ph.D.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala vedoucí své práce Mgr. Markétě Havrdové, Ph.D. za veškeré rady, ochotu, čas, vedení, pomoc při zpracování teoretické i experimentální části této bakalářské práce a rovněž za možnost pracovat v Laboratoři tkáňových kultur Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů. Dále chci poděkovat panu Mgr. Martinu Petrovi, Ph.D. a panu Mgr. Davidu Panáčkovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků, jejich syntézu a charakterizaci pro experimentální část této práce. Na závěr také děkuji své rodině a přátelům za nepřetržitou podporu v průběhu mého vysokoškolského studia.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Uhlíkové nanomateriály.....	3
3.1.1	Uhlíkové kvantové tečky (CQDs).....	3
3.1.2	Grafenové kvantové tečky (GQDs)	5
3.1.3	Grafen a oxid grafenu	5
3.2	Uhlíkové kvantové tečky vs. grafenové kvantové tečky	6
3.3	Syntéza GQDs	8
3.3.1	Top-down techniky	8
3.3.2	Bottom-up techniky	9
3.4	Fyzikální vlastnosti GQDs.....	9
3.4.1	Strukturní vlastnosti GQDs.....	9
3.4.2	Povrchové vlastnosti GQDs.....	10
3.4.3	Optické vlastnosti GQDs	11
3.4.4	Elektronové a elektrochemické vlastnosti GQDs	11
3.4.5	Magnetické vlastnosti GQDs	12
3.5	Biokompatibilita a cytotoxicita GQDs	12
3.6	Bioaplikace GQDs	17
3.6.1	Bioimaging (Zobrazovací metody).....	17
3.6.2	Biosensing (Detekční metody)	18
3.6.3	Distribuce léčiv	19
4	Materiál a metody	21
4.1	Biologický materiál	21
4.1.1	Kultivace a pasážování	21

4.2	Fyzikální materiál (N-GQDs a N-GQDs se single atoms)	22
4.3	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	24
4.3.1	Použité chemikálie	24
4.3.2	Použité soupravy	25
4.3.3	Použité roztoky a jejich příprava	25
4.4	Seznam použitých přístrojů a zařízení	25
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	26
4.5.1	MTT Assay	26
4.5.2	Měření produkce ROS (reaktivních forem kyslíku)	27
4.5.3	Konfokální mikroskopie	28
4.5.4	Průtoková cytometrie	28
5	Výsledky	31
5.1	Měření cytotoxicity GQDs metodou MTT Assay	31
5.2	Měření oxidačního stresu v důsledku produkce ROS	33
5.3	Vizualizace distribuce GQDs konfokální mikroskopii	34
5.4	Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie	36
6	Diskuse	41
7	Závěr	45
8	Literatura	46
9	Přílohy	54
9.1	Seznam příloh	54

Seznam použitých zkratek

A-375	buňky lidského melanomu
CCK-8	cell counting kit-8
CDK	cyklin-dependentní kináza
CHO	karbonylová skupina
CLSM	konfokální laserový skenovací mikroskop
CM-H ₂ DCFDA	chlormethylový derivát 2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetátu
CNTs	uhlíkové nanotrubičky
CO	oxid uhelnatý
CO ₂	oxid uhličitý
COCH ₃	acetylová skupina
COOH	karboxylová skupina
CQDs	uhlíkové kvantové tečky
CVD	chemická depozice z plynné fáze
dH ₂ O	deionizovaná voda
DLS	dynamický rozptyl světla
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

FA-N-GQDs	grafenové kvantové tečky obsahující dusíkový heteroatom a kyselinu listovou
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
GBNs	nanomateriály založené na grafenu
GOs	oxidy grafenu
GQDs	grafenové kvantové tečky
GQD3-F	grafenové kvantové tečky pasivované polyethylenglykolem
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HCT116	buňky lidské rakoviny tlustého střeva
HeLa	buňky lidského cervikálního karcinomu
HET-1A	epiteliální buňky jícnu
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital
HR-TEM	vysokorozlišovací transmisní elektronová mikroskopie
HT-1080	buňky lidského fibrosarkomu
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
L929	myší fibroblasty
LDH	laktátdehydrogenáza
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital
MCF-7	buňky lidské rakoviny prsu
MG-63	buňky lidského osteosarkomu
MGC-803	buňky lidské rakoviny žaludku
MIA PaCa-2	buňky lidské rakoviny pankreatu

MTT	roztok 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu
NaCl	chlorid sodný
Na ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan sodný
NG	grafen dopovaný dusíkovým atomem
NGA	kyselina grafenová dopovaná dusíkovým atomem
NGA-D	grafenové kvantové tečky získané z grafenové kyseliny dopované dusíkovým atomem
N-GQDs	grafenové kvantové tečky dopované dusíkovým atomem
N-GQDs-Cu ²⁺	grafenové kvantové tečky dopované dusíkovým atomem s navázaným měďnatým iontem
N-GQDs-Mn ²⁺	grafenové kvantové tečky dopované dusíkovým atomem s navázaným manganatým iontem
NH ₂	aminová skupina
NIH/3T3	myší fibroblasty
NO	oxid dusnatý
NPs	nanočástice
·O ₂ ⁻	superoxid
OH	hydroxylová skupina
·OH	hydroxylový radikál
OH-GQDs	hydroxylované grafenové tečky
Pb ²⁺	olovnatý iont
PI	propidium jodid
pRF-GQDs	grafenové kvantové tečky modifikované atomy síry a dusíku
QCE	quantum confinement effect
QDs	kvantové tečky

Raw264,7	myší makrofágy
RFU	relativní fluorescenční jednotky
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
sGQDs	grafenové kvantové tečky se schopností autoagregace
SH-GQDs	grafenové kvantové tečky s thiolovými skupinami
SW620	buňky lidského kolorektálního karcinomu
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TIRFM	mikroskopie s totálním odrazem excitačního záření
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Typická struktura funkcionalizované uhlíkové kvantové tečky a chemické struktury, které mohou být nalezeny na povrchu CQDs. Převzato z (Yuan <i>et al.</i> , 2022).	4
Obrázek č. 2: a) Grafen, b) Oxid grafenu, c) Redukovaný oxid grafenu. Převzato z (Shareena <i>et al.</i> , 2018).	6
Obrázek č. 3: Principy top-down technik (nalevo) a bottom-up technik (napravo). Převzato z (Perini <i>et al.</i> , 2020).	8
Obrázek č. 4: Precipitace prekurzorových molekul u bottom-up technik vedoucí k tvorbě nanočástic. Převzato z (Tehrani <i>et al.</i> , 2019).....	9
Obrázek č. 5: Výsledky testů viability po inkubaci A-375 a HeLa buněk se čtyřmi typy GQDs při koncentracích 0–44,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Převzato z (Rajender <i>et al.</i> , 2019).....	15
Obrázek č. 6: Mechanismus uptake GQDs konjugovaných s doxorubicinem (DOX) a jejich akumulace v buněčném jádře prostřednictvím kaveolární raft-dependentní endocytózy a receptorem zprostředkované endocytózy. Převzato z (Wang <i>et al.</i> , 2013).	20
Obrázek č. 7: A) Adherentní buněčná linie NIH/3T3 myších fibroblastů při měřítku 50 μm , B) Nádorová adherentní buněčná linie HeLa lidského karcinomu děložního čípku při měřítku 50 μm	21
Obrázek č. 8: N-GQDs vyobrazené metodou HR-TEM. Měřítko je 5 nm. Převzato z (Panacek <i>et al.</i> , 2022).....	23
Obrázek č. 9: Charakteristika optických a fluorescenčních vlastností NGA-D. Převzato z (Panacek <i>et al.</i> , 2022).....	24
Obrázek č. 10: Schéma buněčného cyklu a jeho dílčích fází se zvýrazněním jednotlivých kontrolních bodů a vyobrazením průběhu dané fáze v nákresu buněk.....	29

Seznam grafů

Graf č. 1: Prvkové zastoupení v N-GQDs-Mn ²⁺ měřené prostřednictvím metody XPS.....	23
Graf č. 2: Výsledky měření účinku N-GQDs, N-GQDs-Mn ²⁺ a N-GQDs-Cu ²⁺ v koncentracích 50, 100, 150, 200, 250, 300 a 400 µg·ml ⁻¹ na viabilitu buněčné linie NIH/3T3 po 24h inkubaci.....	31
Graf č. 3: Výsledky měření účinku N-GQDs, N-GQDs-Mn ²⁺ a N-GQDs-Cu ²⁺ v koncentracích 50, 100, 150, 200, 250, 300 a 400 µg·ml ⁻¹ na viabilitu buněčné linie HeLa po 24h inkubaci.....	32
Graf č. 4: Výsledky měření produkce ROS buněčnou linií NIH/3T3 po 24h inkubaci s N-GQDs, N-GQDs-Mn ²⁺ a N-GQDs-Cu ²⁺ aplikovaných v koncentracích 50, 200 a 400 µg·ml ⁻¹	33
Graf č. 5: Výsledky měření produkce ROS buněčnou linií HeLa po 24h inkubaci s N-GQDs, N-GQDs-Mn ²⁺ a N-GQDs-Cu ²⁺ aplikovaných v koncentracích 50, 200 a 400 µg·ml ⁻¹	34
Graf č. 6: Výsledky měření vlivu N-GQDs na buněčný cyklus linie NIH/3T3 po inkubaci 24 h při koncentracích 50 a 200 µg·ml ⁻¹	36
Graf č. 7: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Mn ²⁺ na buněčný cyklus linie NIH/3T3 po inkubaci 24 h při koncentraci 50 µg·ml ⁻¹	37
Graf č. 8: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Cu ²⁺ na buněčný cyklus linie NIH/3T3 po inkubaci 24 h při koncentracích 50 a 200 µg·ml ⁻¹	37
Graf č. 9: Výsledky měření vlivu N-GQDs na buněčný cyklus linie HeLa po inkubaci 24 h při koncentracích 50, 200 a 400 µg·ml ⁻¹	38
Graf č. 10: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Mn ²⁺ na buněčný cyklus linie HeLa po inkubaci 24 h při koncentracích 50, 200 a 400 µg·ml ⁻¹	39
Graf č. 11: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Cu ²⁺ na buněčný cyklus linie HeLa po inkubaci 24 h při koncentracích 50, 200 a 400 µg·ml ⁻¹	39

1 Úvod

V posledních letech prošla oblast nanotechnologií intenzivním rozvojem a zaznamenala významný pokrok a uplatnění v řadě vědeckých polí. Nanotechnologie využívají poznatky z chemie, biologie, fyziky, mechaniky i informačních technologií. Mnoho nanočástic je díky svým charakteristickým vlastnostem považováno za biokompatibilní, což je vlastnost nezbytná pro jejich užití v medicínských sférách (Zdrojewicz *et al.*, 2015). Nanomateriály využívané v medicíně se vykazují unikátními charakteristikami, jako jsou např. průměrná velikost 1–100 nm, vysoké kvantové výtěžky, rezistence vůči fotobleachingu a významné magnetické, elektrické a fluorescenční schopnosti. V posledních dvou desetiletích byla v rámci biomedicínského výzkumu vyvíjena především terapeutika cílená pro léčbu rakoviny, diabetu, bolestí, astmatu, alergií a infekcí (Aguilar *et al.*, 2015).

Mezi jedny z nejvyužívanějších nanočástic v biomedicíně patří uhlíkové nanomateriály, které nachází využití především v biosensoringu, regenerativní medicíně a distribuci léčiv. Jejich využitelnost pro medicínské účely je ovlivněna velikostí, tvarem, nábojem, povrchovými vlastnostmi a chemickým složením částic. K nejdůležitějším uhlíkovým nanočásticím řadíme např. fullereny, nanotrubičky, grafen či uhlíkové a grafenové tečky (Lewinski *et al.*, 2008).

Vzhledem k výrazně nižší vykazované cytotoxicitě a zvýšené biokompatibilitě v živých systémech oproti již zmíněným uhlíkovým nanočásticím se hovoří o velkém biomedicínském potenciálu tzv. grafenových kvantových teček, které mohou být využívány např. jako fluorofory především kvůli svým optickým vlastnostem a odolnosti vůči fotobleachingu (Perini *et al.*, 2020). Kromě těchto kvalit grafenové tečky také vykazují řadu dalších charakteristik, díky kterým mohou být v rámci biomedicíny využity, k nim patří např. schopnost prostupovat biologickými membránami, antimikrobiální účinky, antidiabetická aktivita atd. (Henna *et al.*, 2020).

2 Cíle práce

1. Vypracování literárního přehledu na téma uhlíkových nanomateriálů se zaměřením na grafenové kvantové tečky, jejich biokompatibilitu a cytotoxicitu.
2. Popsání vlivu grafenových kvantových teček na buněčnou viabilitu, produkci reaktivních forem kyslíku, intracelulární distribuci a buněčný cyklus u vybraných buněčných linií pomocí příslušných laboratorních technik.

3 Literární přehled

3.1 Uhlíkové nanomateriály

Jako nanomateriály jsou označovány struktury, které mají alespoň jeden ze svých rozměrů nanometrický. Jedná se o široce využitelné struktury, které mají vysoké uplatnění především v elektronice, biomedicině, průmyslu, technologiích nebo kosmetice. Nanomateriály nabývají různých podob, přičemž alespoň jedna z dimenzí jejich struktury měří od 1 do 100 nm. Jeden z typů nanočástic, které mají vysoké potenciální využití v biomedicině označujeme jako uhlíkové nanomateriály. Tyto struktury se vyznačují mimořádnými elektrickými, termickými, chemickými a mechanickými vlastnostmi. Uhlíkaté nanomateriály lze rozdělit podle rozměrů na nanomateriály s nulou dimenzemi (např. uhlíkové kvantové tečky a grafenové kvantové tečky), nanomateriály s jednou dimenzí (např. uhlíkové nanotrubičky) a nanomateriály se dvěma dimenzemi (např. grafen) (Han *et al.*, 2016).

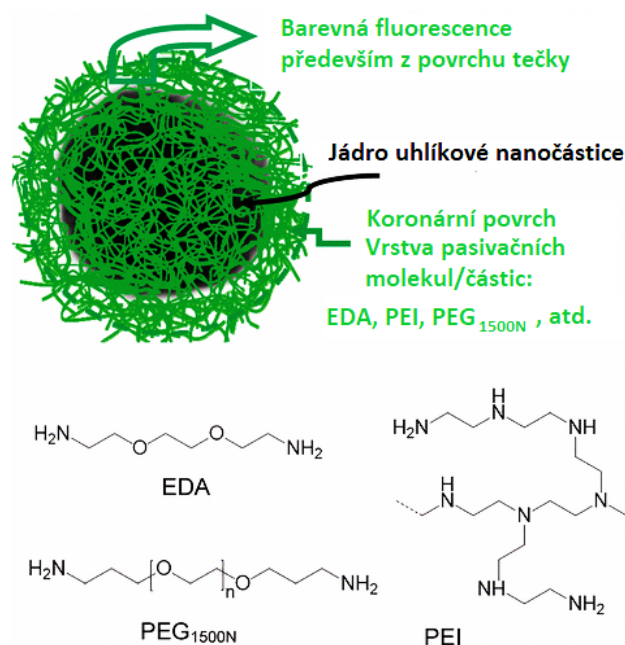
Využití a uplatnitelnost uhlíkových nanomateriálů souvisí s jejich mimořádnými vlastnostmi, mezi které řadíme např. vysokou tepelnou a elektrickou vodivost, unikátní optické vlastnosti jako je např. fluorescence, obrovský povrch, aj. V biomedicínských oborech se pak často využívá uhlíkových nanočástic, které se svými rozměry velikostně blíží biomolekulám (Diez-Pascual, 2021).

Grafenové kvantové tečky vycházejí svými vlastnostmi z uhlíkových kvantových teček a grafenu. Z tohoto důvodu jsou následující kapitoly věnovány pouze těmto vybraným nanomateriálům.

3.1.1 Uhlíkové kvantové tečky (CQDs)

Uhlíkové kvantové tečky patří díky své nízké cytotoxicitě mezi vysoce biokompatibilní nanomateriály, což umožňuje jejich četné bioaplikace. CQDs jsou uhlíkové nanomateriály, které obvykle v průměru nedosahují větší velikosti než 10 nm. Schopnosti CQDs závisí jednak na jejich velikosti, tvaru, deformacích a povrchové pasivaci. Tyto nanočástice jsou fotoluminiscenční, chemicky stabilní a v porovnání s organickými barvivy jsou také odolnější vůči fotobleachingu. Při porovnávání excitačních a emisních spekter organických barviv a CQDs bylo zjištěno, že CQDs mají výrazně širší excitační spektra a naopak velice úzká spektra emisní, což lze uplatnit v rámci bioimagingu. Povrch uhlíkových kvantových teček může být dle potřeby modifikován umístěním funkčních skupin

(viz obrázek č. 1), které mohou zajistit např. jejich hydrofilní či hydrofobní charakter. Mezi skupiny, kterými může být povrch funkcionalizován lze zařadit např. NH_2 skupiny, OH skupiny, CO skupiny, atd. (Singh *et al.*, 2018).



Obrázek č. 1: Typická struktura funkcionalizované uhlíkové kvantové tečky a chemické struktury, které mohou být nalezeny na povrchu CQDs. Převzato z (Yuan *et al.*, 2022).

Uhlíkové kvantové tečky jsou buňkami snadno zachytitelné a lehce prostupují biologickými membránami. Po internalizaci lze pozorovat fluorescenční signál z intracelulárních oblastí, ve kterých došlo k akumulaci nanočástic, CQDs emitují světelné záření nejčastěji ve vlnových délkách odpovídajících modrému a zelenému světlu, což může do jisté míry využívané fluorescenční metody limitovat. Místa akumulace závisí především na typu označované buněčné linie a laboratorních podmínkách, avšak nejčastěji dochází k bohatému shromažďování v buněčné cytoplazmě a podle některých studií dochází k jisté akumulaci v buněčném jádře (Datta *et al.*, 2014; Havrdova *et al.*, 2021). Dále CQDs nacházejí využití v biosensoringu, kde slouží k detekci celé řady molekulárních substancí, kovových iontů a hodnot pH. Je možné je dle potřeb modifikovat funkčními skupinami, které pak zajistí např. lepší hydrofilní vlastnosti vzorku (Havrdova *et al.*, 2016). Uhlíkové kvantové tečky lze také uplatnit při distribuci léčiv do buněk, jelikož jsou tato terapeutika kovalentně vázaná s funkčními skupinami na povrchu teček. CQDs tedy mohou zprostředkovávat diagnózu, terapii, ale také vyhodnocování buněčné odpovědi na podávaná léčiva (Ge *et al.*, 2021).

3.1.2 Grafenové kvantové tečky (GQDs)

Grafenové kvantové tečky jsou relativně novým objevem z hlediska nanotechnologických výzkumů, jedná se o nanočástice na uhlíkaté bázi, jež jsou tvořeny nanofragmenty grafenu a mohou být jedno či vícevrstvé. Vykazují minimální cytotoxicitu, což zvyšuje šance na jejich uplatnění ve sférách moderní medicíny (Kelarakis, 2015).

GQDs ve svých laterálních rozměrech častokrát nepřesahují 10 nm, a jelikož jsou právě v této laterální dimenzi větší než ve svojí výšce, která obvykle spadá do rozmezí 0,4–4 nm, vykazují anizotropní morfologii. Transmisní elektronová mikroskopie odhalila grafenové mřížky, do kterých jsou situovány uhlíkové atomy těchto nanomateriálů (Pierrat *et al.*, 2020). Oproti uhlíkovým kvantovým tečkám vykazují GQDs podstatně vyšší krystalinitu, mají tedy pravidelněji uspořádanou vnitřní konformaci a odráží se to mimo jiné i na jejich elektrických vlastnostech, jelikož jsou GQDs díky svým grafenovým fragmentům elektricky vodivé. Podobně jako u uhlíkových kvantových teček, také grafenové tečky mohou mít svůj povrch modifikován velkým množstvím funkčních skupin nebo mohou být povrchově pasivovány, přičemž tyto dvě vlastnosti mohou výrazně ovlivňovat schopnost fotoluminiscence a elektrické vlastnosti těchto nanočástic (Chung *et al.*, 2021).

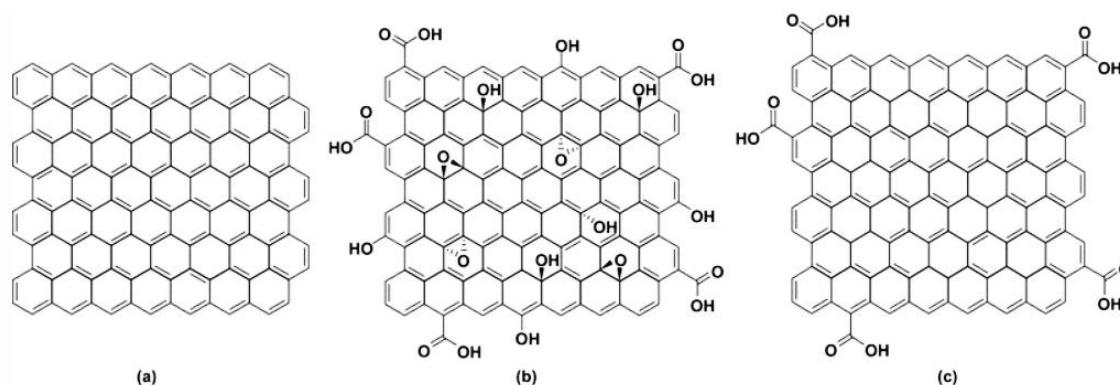
K nejvyužívanějším metodám syntézy, při kterých dochází ke vzniku grafenových kvantových teček patří tzv. top-down a bottom-up metody. Top-down metody jsou jednoznačně preferovanou technikou, jelikož bottom-up metody zahrnují komplexní operace, které vyžadují optimalizaci laboratorních podmínek, jež nejsou jednoduše zajistitelné. Principem top-down technik je štěpení levného uhlíkatého materiálu, který je na uhlík bohatý, na menší fragmenty. K těmto metodám řadíme např. chemické oxidace, hydrotermické metody nebo ultrazvukové metody. Mezi tzv. bottom-up metody řadíme např. mikrovlnnou metodu nebo metodu molekulární karbonizace. U bottom-up technik slouží jako výchozí materiál nízkomolekulární látky např. kyselina citronová či aminokyseliny (Zhao *et al.*, 2020; Panacek *et al.*, 2022).

3.1.3 Grafen a oxid grafenu

Grafen je tvořen jedinou ultratenkou 2D vrstvou atomů uhlíků, které jsou těsně uspořádány do pravidelné hexagonální sítě (viz obrázek č. 2), která poskytuje tomuto materiálu mimořádné fyzikálně-chemické schopnosti. Je to momentálně nejtenčí známý materiál na planetě. Mezi nejvýznamnější charakteristiky grafenu řadíme vysokou elektrickou a tepelnou vodivost, obrovský povrch, velkou vnitřní sílu a optické vlastnosti (Xia *et al.*, 2019).

Grafen je v nanotechnologiích bohatě využíván jako výchozí materiál pro tvorbu GBNs (graphene-based nanomaterials), mezi které patří např. uhlíkové nanotrubičky (CNTs), oxidy grafenu (GOs), fullereny a grafenové kvantové tečky (GQDs) (Yang *et al.*, 2018). Jelikož mají vrstvy grafenu obrovský povrch, lze je využít pro adsorpci molekulárních terapeutik a jejich distribuci do buněk. Dále lze využívat grafen k diagnostickým a antibakteriálním aplikacím, jelikož bakteriální viabilita po styku s grafenem klesá. Grafen (viz obrázek č. 2) však vykazuje jistou cytotoxicitu v důsledku vyvolávání oxidačního stresu, což může vést k rozvratu buňky a její následné apoptóze (Byun, 2015).

Oxidy grafenu jsou nanomateriály odvozené od chemické struktury grafenu, jedná se o jedno či vícevrstevné pláty těsně shlukovaných atomů uhlíku, které vytváří krystalickou mřížku. Tato vrstva je z obou stran krytá četnými funkčními skupinami obsahujícími atomy kyslíku (viz obrázek č. 2).



Obrázek č. 2: a) Grafen, b) Oxid grafenu, c) Redukovaný oxid grafenu. Převzato z (Shareena *et al.*, 2018).

3.2 Uhlíkové kvantové tečky vs. grafenové kvantové tečky

Uhlíkové kvantové tečky (CQDs) a grafenové kvantové tečky (GQDs) řadíme k uhlíkovým nanomateriálům s nula dimenzemi. Oba typy zmíněných nanočástic se ve velkém množství charakteristik shodují. Pak jsou zde však zásadní rozdíly, kterými jsou definovány jejich odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Uhlíkové i grafenové tečky jsou oproti anorganickým kvantovým tečkám (QDs) mnohem šetrnější vůči životnímu prostředí, dají se snadno a levně připravit, jsou vysoce udržitelné, mají mimořádné optoelektronické vlastnosti, jsou chemicky inertní a fotostabilní. Vykazují se mezi uhlíkovými nanomateriály

pravděpodobně nejvyšší biokompatibilitou, což umožňuje vývoj biomedicínských technik využívajících tyto uhlíkové nanočástice (Ghosh *et al.*, 2021).

Grafenové tečky jsou oproti těm uhlíkovým více krystalické. Tato skutečnost je způsobená jejich konstitucí, jelikož GQDs jsou tvořené vrstvami grafenových plátů, které utváří uhlíkové atomy v sp^2 hybridizaci. Takovéto uspořádání zajišťuje vysokou míru pravidelnosti, čímž se GQDs liší od CQDs, jelikož uhlíkové tečky mohou obsahovat uhlíkové atomy jak v hybridizaci sp^2 , tak v hybridizaci sp^3 . Grafenové tečky jsou krystalické, přičemž uhlíkové tečky mohou být krystalické nebo amorfni. Oba typy nanočástic se také liší v kinetických vlastnostech, jelikož grafenové tečky vykazují oproti CQDs větší vazebnou afinitu, kdežto uhlíkové tečky vykazují oproti GQDs vyšší maximální kinetickou rychlost. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny také povrchovými odlišnostmi. Oba nanomateriály mají elektro i fotokatalytické funkce (Walther *et al.*, 2020). CQDs i GQDs jsou v moderní medicíně velice žádanými nanočásticemi především díky svým unikátním fotoluminiscenčním schopnostem. Uhlíkové kvantové tečky mají nejvyšší optickou adsorpci v UV oblasti 230–320 nm, kdežto u grafenových kvantových teček je rozsah optické adsorpce v rozmezí 270–390 nm. GQDs se zároveň vyznačují výraznějším kvantovým výtěžkem než CQDs převážně kvůli své vysoké míře krystalinity, která vzniká v důsledku jejich vrstevnatého uspořádání. Vliv na fluorescenční schopnosti obou nanomateriálů má především velikost částic, excitační vlnová délka, polarita rozpouštědla či míra povrchové oxidace (Alaghmandfard *et al.*, 2021).

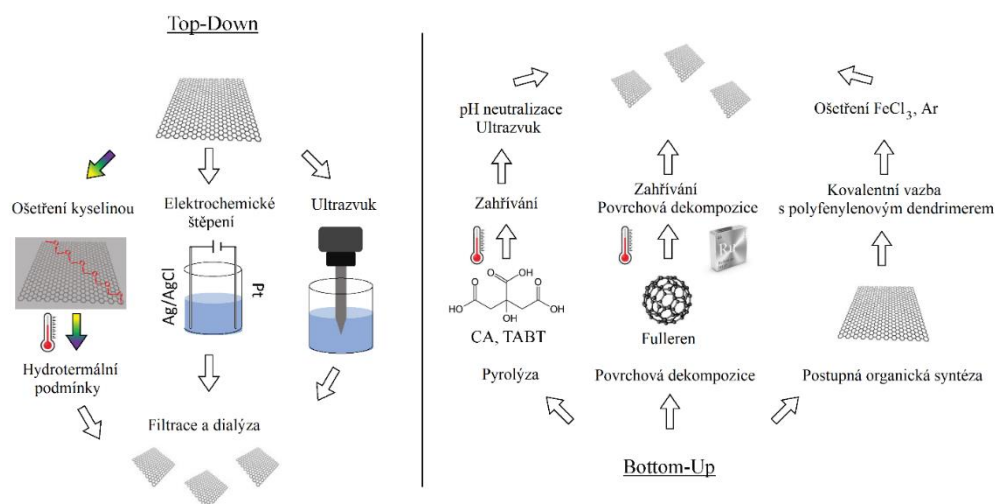
Syntéza CQDs i GQDs je jednoduchá a není příliš nákladná. Oba typy se produkují tzv. top-down a bottom-up metodami, přičemž u CQDs se uplatňují především bottom-up techniky, u GQDs se využívají převážně metody druhého typu (Lin *et al.* 2016; Tajik *et al.*, 2020).

Z hlediska biomedicíny jsou oba tyto materiály díky své fotostabilitě, multifotonové excitaci, biokonjugaci a elektrochemiluminiscenci vysoce využitelné v zobrazovacích a diagnostických metodách jako fluorescenční próby (Choppadandi *et al.*, 2021). Dále jsou tyto nanomateriály studovány pro své potenciální použití při distribuci léčiv. Terapeutika se v tomto případě vážou díky kombinaci vazby, která se vytváří mezi funkčními skupinami na povrchu teček a léčivou látkou, elektrostatickým interakcím mezi pozitivně nabitým léčivem a záporně nabitým povrchem kvantové tečky a hydrofilii těchto nanočástic. Dále GQDs a CQDs nacházejí využití jako optické senzory či v biomonitoringu (Molaei, 2019).

Biokompatibilita je definována jako schopnost látky fungovat v živém systému bez spouštění jakýchkoliv nežádoucích biologických odpovědí, tuto schopnost grafenové tečky vykazují více než všechny ostatní uhlíkové nanomateriály a kovové nanomateriály, proto se uvažuje o jejich širokém využití v moderní medicíně a biologických oborech (Ghaffarkhah *et al.*, 2022).

3.3 Syntéza GQDs

Syntetické metody produkce grafenových kvantových teček lze rozdělit do dvou velkých skupin, jedná se o tzv. top-down techniky a bottom-up techniky (viz obrázek č. 3). Většinou jsou to metody ne příliš nákladné a relativně jednoduše proveditelné (Lin *et al.*, 2016). Top-down metody slouží pro hromadnou produkci GQDs, kdežto bottom-up techniky jsou využívány při syntéze jednotlivých GQDs (Tajik *et al.*, 2020).



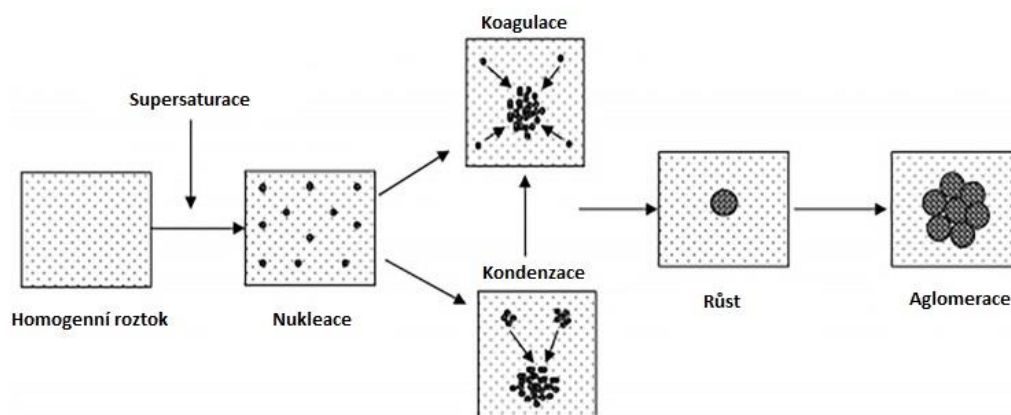
Obrázek č. 3: Principy top-down technik (nalevo) a bottom-up technik (napravo). Převzato z (Perini *et al.*, 2020).

3.3.1 Top-down techniky

U těchto metod přípravy grafenových teček dochází k rozštěpení či nařezání makroskopického prekursorového materiálu na nanosegmenty působením chemických, elektrochemických nebo fyzikálních dějů. Mezi prekursorové materiály mohou patřit např. grafen, oxid grafenu, uhlíkové nanotrubičky či fullereny (Biswas *et al.*, 2021). Mezi nejčastěji prováděné top-down metody patří chemická oxidace, hydrotermální metody, mikrovlnné a ultrazvukové metody, elektrochemické štěpení, CVD metody aj. (Shen *et al.*, 2021).

3.3.2 Bottom-up techniky

Bottom-up techniky využívají precipitace prekurzorových molekul, přičemž dochází k jejich polymerizaci a vytváří se požadované nanočástice (viz obrázek č. 4), jejich výsledkem jsou grafenové kvantové tečky o rozměrech různých velikostí (Tehrani *et al.*, 2019). Bottom-up techniky zahrnují fúzi prekurzorových molekul jako jsou např. kyselina citronová či glukóza (Ghaffarkhah *et al.*, 2022). Při těchto metodách nejprve dochází k tvorbě klastrů, které se následně shlukují do kompaktnějších celků – nanočástic (Abou El-Nour *et al.*, 2010). K nejvýznamnějším metodám patří např. karbonizace, mikrovlnná pyrolýza, hydrotermální a solvotermální techniky (Cui *et al.*, 2021).



Obrázek č. 4: Precipitace prekurzorových molekul u bottom-up technik vedoucí k tvorbě nanočástic. Převzato z (Tehrani *et al.*, 2019).

3.4 Fyzikální vlastnosti QDs

Grafenové kvantové tečky díky svým rozměrům, povrchu, kvantovému charakteru a také okrajům vykazují mimořádné, atypické vlastnosti strukturní, povrchové, optické, elektrické, elektrochemické a magnetické.

3.4.1 Strukturní vlastnosti QDs

Grafenové kvantové tečky jsou nanočástice, které v laterálních rozměrech obvykle nedosahují více než 10 nm. Nejčastěji mají kruhovitý nebo eliptický tvar, přičemž se mohou vyskytovat také ve tvaru trojúhelníku, čtverce nebo šestiúhelníku. Oproti regulérním uhlíkovým kvantovým tečkám se vyznačují vyšší krystalinitou, mají vysoce uspořádanou vnitřní strukturu, což ovlivňuje jejich fyzikální vlastnosti. Jsou tvořeny jednou či málo vrstvami grafenu a jeho krystalickou mřížkou utvářenou uhlíkovými atomy v sp^2 hybridizaci. Pokud se tečky skládají

z většího množství grafenových vrstev, vzdálenost mezi pláty je 0,334 nm či více v případě, že jsou na povrchu teček navázané funkční skupiny. Fyzikálně-chemické vlastnosti jsou velmi ovlivněny způsobem syntézy těchto nanočástic, ale také defekty a deformacemi ve struktuře teček (Zheng *et al.*, 2014).

3.4.2 Povrchové vlastnosti GQDs

GQDs mají ke svému objemu obrovský povrch, který lze modifikovat četnými funkčními skupinami, které mají zásadní vliv na jejich optické i elektrické vlastnosti. Modifikace povrchu může vést ke změnám ve fluorescenci teček, jelikož dochází k přenosu elektrického náboje mezi samotnou grafenovou tečkou a jejími funkčními skupinami, taktéž může vést ke změně dipólového momentu nanočástice, redoxního potenciálu či její tzv. bandgap, což charakterizuje energii, které musí elektron dosahovat, aby mohl být přenesen z valenční vrstvy do vodivostní vrstvy. Dipólový moment tečky závisí především na jejím tvaru, typu funkčních skupin a jejich pozici. GQDs mohou být modifikovány např. OH, CHO, COCH₃ či COOH skupinami. U grafenových teček upravených kyslíkovými funkčními skupinami dochází ke snížení bandgap a tzv. rudému posuvu (Henna *et Pramod*, 2020).

Do povrchu nanočástic jsou často také inkorporovány heteroatomy, které mají za úkol vylepšit a optimalizovat fyzikální vlastnosti grafenových teček (Henna *et Pramod*, 2020). V případě, že u některých GQDs není dobře laditelná jejich fluorescenční schopnost nebo neposkytují vysoký kvantový výtěžek, lze tyto nedostatky vylepšit např. adicí atomů dusíku či síry do struktury nanočástice. Možnost heteroatomů penetrovat se do struktury GQDs a modulovat jejich vlastnosti je zajištěna díky okrajovým vlastnostem a tzv. „quantum confinement“ efektu (Benitez-Martinez *et Valcarcel*, 2015).

Typy okrajů GQDs jsou podmíněny metodou své přípravy. Nejstabilnějšími jsou tzv. „cikcak“ (zig-zag) či křeslovité (armchair) okraje. Spolu s celkovým tvarem grafenové tečky okraje ovlivňují elektronové, magnetické i optické vlastnosti (Sheng *et al.*, 2012). Díky svým povrchovým vlastnostem jsou GQDs konjugovatelné např. s dalšími nanomateriály prostřednictvím π - π vazby za vzniku hybridních nanomateriálů, s protilátkami, proteiny a také s malými nukleovými kyselinami (Mansuriya *et Altintas*, 2020).

3.4.3 Optické vlastnosti GQDs

Grafenové kvantové tečky mají silnou optickou absorpční vlnovou oblast v UV oblasti, což je dáno π - π přechody mezi uhlíkovými vazbami. Rozsah optické absorpce se tedy pohybuje v rozmezí 270–390 nm (Alaghmandfard *et al.*, 2021). Mají nastavitelné fluorescenční schopnosti a jejich emisní záření může být excitováno velkým množstvím vlnových délek (tzv. multifotonová excitace), zároveň však také mohou emitovat světlo o různých vlnových délkách, např. záření v UV, modré, zelené, žlutozelené, žluté i červené oblasti. Tato vlastnost je vysoce využitelná v zobrazovacích metodách. Tyto vlastnosti jsou umožněny vlivem tzv. „quantum confinement efektu“ (QCE), což je jev zajišťující změnu fyzikálních vlastností při zmenšení do nanometrických rozměrů. QCE nastává, když se nanočástice vyskytují v menších rozměrech, než kterých dosahuje tzv. Bohrov poloměr, což je nejpravděpodobnější vzdálenost mezi protonem a elektronem ve vodíkovém atomu. Nejčastěji po excitaci v UV oblasti emitují GQDs modré a zelené světlo. Emise grafenových teček je závislá především na vlnové délce excitačního záření, pH prostředí, typu rozpouštědla a rozměrech. GQDs se vyznačují vysokou stabilitou pod UV zářením a nízkým fotobleachingem, což představuje jejich výhodu oproti tradičním organickým fluorescenčním barvivům. Schopnost fotoluminiscence je taktéž ovlivněná konstitucí teček, jelikož jejich vnitřní emise determinuje grafenové jádro a povrchovou emisi modifikující funkční skupiny (Zhu *et al.*, 2017).

3.4.4 Elektronové a elektrochemické vlastnosti GQDs

GQDs jsou uhlíkaté nanočástice tvořené lehkými atomy vyznačující se nízkou dielektrickou konstantou a relativní permitivitou (Zhu *et al.*, 2017). GQDs jsou elektrochemicky mnohem stabilnější než CQDs a jejich počáteční potenciál se blíží hodnotě 0 V pravděpodobně vzhledem k urychlenému elektronovému přenosu způsobenému zvýšeným množstvím uhlíkových atomů v sp^2 hybridizaci. Vlastnosti jejich elektronového transportu závisí na vztahu mezi jádrem kvantové tečky, povrchovými funkčními skupinami, jenž modifikují její povrch a jejími heteroatomy. Efektivní elektronový přenos je zajištěn vlivem obrovského povrchu kvantových teček ve vztahu k jejich objemu a charakterem okrajů. V případě, že grafenová kvantová tečka nese četné kyslíkové funkční skupiny, pak se v určitých ohledech mohou její vlastnosti podobat oxidu grafenu (GO). Pokud jsou tyto kyslíkové funkční skupiny ve velké míře zastoupeny v neokrajových oblastech tečky, pak v důsledku narušení vodivé sítě sp^2 uhlíkových atomů dochází ke zhoršení elektronového transportu. Naopak pokud

jsou tyto funkční skupiny situovány v okrajových regionech, pak se takto upravené grafenové tečky vykazují katalytickou aktivitou (Zheng *et al.*, 2014).

3.4.5 Magnetické vlastnosti GQDs

Magnetické vlastnosti grafenových kvantových teček jsou ovlivněny jejich spinově polarizovanými elektronovými stavy, geometrií a okrajovými jevy. Okraje v cikcak a křeslovité konformaci dokážou narušit spinovou polarizaci a způsobit tak nulový magnetický moment kvantové tečky. Magnetický moment tečky mohou ovlivnit např. prázdné prostory, strukturní defekty a deformace v krystalické mřížce těchto nanočástic. U nízkodefektních částic se vyskytuje tzv. paramagnetismus, tzn. jejich atomy mají trvalý magnetický moment (Chung *et al.*, 2021).

Trojúhelníkové a hexagonální grafenové tečky s křeslovitými okraji mají vždy energetické mezery mezi nejvyšším obsazeným molekulovým orbitalem (HOMO) a nejnižším neobsazeným molekulovým orbitalem (LUMO), což způsobuje jejich nulový magnetismus. Základní stavy trojúhelníkových grafenových teček s cikcak okraji jsou spinově polarizované a celkový spin se lineárně mění s rozměry nanočástice (Ma *et Li*, 2012).

3.5 Biokompatibilita a cytotoxicita GQDs

Grafenové kvantové tečky se vyznačují mimořádnou biokompatibilitou, tedy schopností fungovat v živých systémech bez toho, aniž by jejich příčinou docházelo k vyvolání nepříznivé biologické odpovědi. Jejich biokompatibilita vychází mimo jiné také z jejich skvělé rozpustnosti ve vodě. V rámci uhlíkových nanomateriálů se jedná o nejméně cytotoxické částice vůbec. I přes svou vysokou slučitelnost s živými organismy se však mohou v *in vitro* a *in vivo* testech projevovat toxicky a mohou ovlivňovat řadu buněčných dějů a stavů jako jsou např. buněčná viabilita, oxidační stres, buněčný cyklus, vstup do organel a proliferace (Hadad *et al.*, 2020; Henna *et Pramod*, 2020).

Nejčastějším způsobem buněčného uptake a internalizace grafenových kvantových teček je endocytóza, a to především tzv. kaveolární raft-dependentní endocytóza a méně často také receptor-dependentní endocytóza, která využívá klathrinových funkcí. Byl pozorován vliv sGQDs na buněčné linie L929 (myší fibroblasty), HT-1080 (buňky lidského fibrosarkomu), MIA PaCa-2 (buňky lidské rakoviny pankreatu), HeLa (buňky lidského cervikálního adenokarcinomu) a MG-63 (buňky lidského osteosarkomu). Pro experiment byly mikrovlnnou syntézou z extraktu hroznových pecek vytvořeny GQDs se schopností

autoagregace (sGQDs). Ve výsledku došlo po 6 až 8 hodinách inkubace všech uvedených buněčných linií s grafenovými tečkami k jejich internalizaci do buněčného jádra. Efektivní internalizace do jádra buňky a jeho selektivní označování může vést k vývoji léčiv cílených pro působení v této oblasti. U buněčné linie myších fibroblastů L929 byl dále *in vitro* testy zkoumán vliv sGQDs na buněčnou proliferaci a buněčný cyklus. I přes působení vysokých koncentrací (do $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sGQDs na linii L929 po dobu 24 hodin nedošlo k prokázané tvorbě reaktivních forem kyslíku a zároveň díky vstoupení grafenových teček do jádra došlo k urychlení buněčné proliferace. Po 4 hodinách inkubace byla pozorována zvýšená efektivita S fáze buněčného cyklu, kdy došlo k eskalaci z 8,76 % na 16,7 % a po 6–8 hodinách na 29,9 %. V inkubovaných fibroblastech byla prokázána zvýšená koncentrace molekul DNA. Následně byl prostřednictvím CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) pozorován vstup sGQDs (díky schopnosti autoagregace při velikosti částic 50–60 nm ve vodném roztoku) do jádra, přičemž buňky byly zároveň obarveny DAPI. Po 8 hodinách došlo k vyžáření silně modré fluorescence v této oblasti a po excitaci červeným laserem byla vidět jasně červená emise grafenových teček v oblasti buněčného jádra. Průnik sGQDs do samotných fibroblastů byl zaznamenán po 2 hodinách, kdežto vstup do buněčného jádra po 6–8 hodinách inkubace (Kumawat *et al.*, 2017).

V jiném experimentu byly provedeny testy viability u buněčné linie MCF-7 (buňky lidské rakoviny prsu) po 24 hodinách inkubace s FA-N-GQDs (tečky obsahující dusíkový heteroatom konjugované s kyselinou listovou). Čtyři typy FA-N-GQDs byly syntetizovány amidovou reakcí z N-GQDs. Připravené skupiny kvantových teček se lišily v celkovém obsahu dusíku, od prvního typu po čtvrtý se jeho koncentrace zvyšuje. Kyselina listová se váže na nadměrně exprimované receptory pro kyselinu listovou, které produkují MCF-7 buňky, takže byly zároveň provedeny metody pro detekci rakovinných buněk, kdy FA-N-GQDs měly znázornit MCF-7 buňky díky svému modrému emisnímu záření. Po provedení testů byly FA-N-GQDs vyhodnoceny jako vhodné pro užití v detekci rakovinových buněk, přičemž nejintenzivnější emisí se vyznačoval čtvrtý typ obsahující největší množství dusíku. Pro životaschopnostní testy byla využita CCK-8 metoda. Po inkubaci s jednotlivými tečkami na mikrodestičce bylo zjištěno, že viabilita buněk činí 97,35 %, 96,56 %, 85,25 % a 83,36 %. Nejvíce cytotoxický se tedy ukázal být typ čtvrtý, který měl nejvyšší obsah dusíku, zároveň ale poskytoval nejintenzivnější emisí. Ve všech čtyřech případech však bylo procento viability nadstandardní, jelikož se cytotoxický standard pohybuje od 50 % do 70 %. Grafenové kvantové tečky konjugované s kyselinou listovou tedy mají potenciál pro využití v detekčních metodách

a vyznačují se nízkou cytotoxicitou, přičemž jejich biokompatibilita je ovlivnitelná obsahem dusíku (Feng *et al.*, 2020).

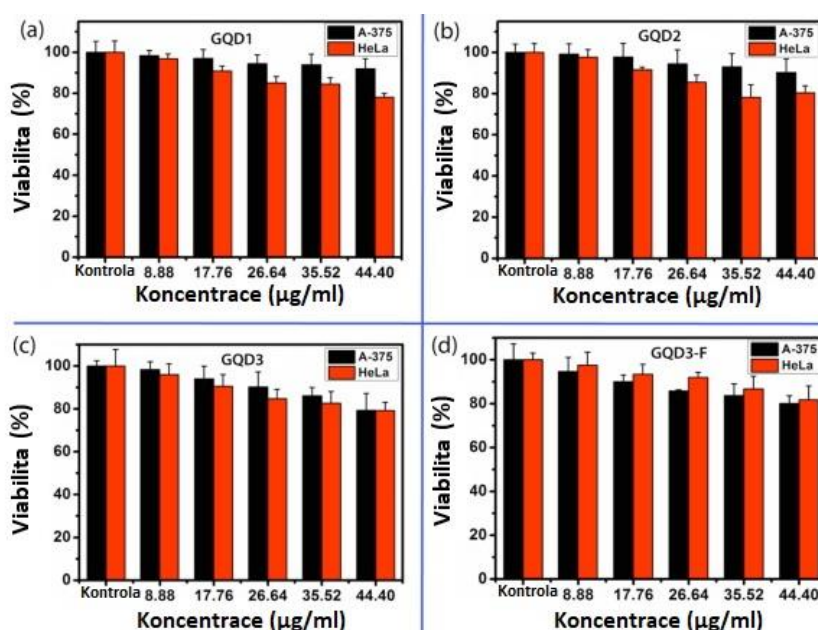
Další studie porovnává toxický vliv GOs a GQDs na rakovinové buněčné linie MGC-803 (buňky lidské rakoviny žaludku) a MCF-7. Po inkubaci obou buněčných linií s oběma typy nanomateriálů byla díky TEM prokázána akumulace obou částic v cytoplazmě, přičemž GQDs byly lokalizovány rovněž v endoplazmatickém retikulu, GOs nikoliv. Prostřednictvím TEM nešla prokázat internalizace částic do buněčného jádra. Uptake byl prokázán efektivnější u grafenových kvantových teček vzhledem k menším rozměrům v porovnání s oxidem grafenu. Bylo zjištěno, že naprostá většina GQDs byla do buňky přijata prostřednictvím kaveolární raft-dependentní endocytózy. U buněk inkubovaných s GOs byla prokazatelně vyšší míra apoptotických buněk než při inkubaci s grafenovými tečkami. Díky fluorescenční mikroskopii bylo pozorováno, že jsou grafenové tečky schopny prostupovat do buněčného jádra, což naznačuje jejich potenciální využití v distribuci léčivých látek s účinkem v této lokalitě. Částice grafen oxidu i přes fluorescenční analýzu byly nalezeny pouze v cytoplazmě a do buněčného jádra tedy nevnikaly. Při dalších testech bylo zjištěno, že oproti GOs vykazují u obou linií grafenové tečky vyšší celkovou biokompatibilitu díky nižší produkci reaktivních forem kyslíku a menšímu poškození mitochondriální membrány v důsledku depolarizace (Wu *et al.*, 2013).

Ačkoliv GQDs dokážou kvůli své chemické struktuře vyvolat tvorbu kyslíkových radikálů a v důsledku tohoto procesu také oxidační stres v buňce, stále mohou pomáhat udržet redukčně-oxidační rovnováhu, která je v buňce nastolená, a to především díky jejich schopnosti fungovat jak donor, tak také akceptor elektronů. Klíčová je tedy dávka grafenových kvantových teček. GQDs mohou působit fototoxicky, dokážou tedy generovat reaktivní formy kyslíku po vystavení excitačnímu záření (Ruan *et al.*, 2018).

Dále byly prováděny studie pro posouzení cytotoxicity GQDs v rámci radioterapeutických procedur. Pro zjištění bezpečných koncentrací těchto nanočástic byly testovány buňky dvou linií – SW620 (buňky lidského kolorektálního karcinomu) a HCT116 (buňky lidské rakoviny tlustého střeva). Po třídní inkubaci SW620 buněk s GQDs v koncentracích 50, 100 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nedošlo u inkubovaných buněk v porovnání s buňkami kontrolními k žádným výrazným změnám. U buněčné linie HCT116 za stejných podmínek došlo po třech dnech ke snížení citlivosti buněk vůči GQDs a poklesu růstu. Obě buněčné linie inkubované s GQDs v koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po třech dnech zůstaly proliferativní a během

dvou dnů nedošlo k výrazným poklesům v buněčné viabilitě, proto byla tato koncentrace vyhodnocena jako vyhovující pro následné radioterapeutické studie (Ruan *et al.*, 2018).

Byl zkoumán vliv rozpouštědla využitého při mikrovlnné top-down syntéze na utvářené grafenové kvantové tečky a jejich vliv na biokompatibilitu s A-375 (buňky lidského melanomu) a HeLa buňkami. Prostřednictvím tří různých rozpouštědel (DMF, DMSO a voda) byly vytvořeny čtyři typy GQDs, přičemž čtvrtý typ byl navíc pasivován polyethylenglykolem (GQD1, GQD2, GQD3, GQD3-F). Buněčné linie byly 24 hodin inkubovány s čtyřmi různými variantami GQDs v koncentracích 0–44,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, testy viability byly provedeny s využitím kolorimetrického MTT testu (viz obrázek č. 5).



Obrázek č. 5: Výsledky testů viability po inkubaci A-375 a HeLa buněk se čtyřmi typy GQDs při koncentracích 0–44,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Převzato z (Rajender *et al.*, 2019).

Při koncentraci 44,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla zjištěna nejvyšší viabilita u A-375 buněk inkubovaných s prvním typem kvantových teček (GQD1), hodnota činila 92 %. Naopak nejnižší viabilita byla pozorována u A-375 a HeLa buněk inkubovaných se třetím typem teček (GQD3), kdy hodnota v obou případech dosahovala 79 %. U GQD3-F došlo oproti nepasivovanému typu (GQD3) ke zvýšení buněčné životaschopnosti u obou linií na 81 %. Roztoky využití v průběhu syntetického procesu a zároveň použítá pasivační činidla tedy ovlivňují kromě strukturních vlastností GQDs také jejich samotnou biokompatibilitu (Rajender *et al.*, 2019).

Při experimentu zaměřeném na syntézu luminiscenčních grafenových kvantových teček s vysokým kvantovým výtěžkem byl zároveň prověřován jejich vliv na morfologii, integritu cytoplazmatické membrány, hladinu ROS a míru apoptózy buněk linie HeLa. Jako první byl proveden test, který umožňoval mikroskopické pozorování morfologických změn podnícených inkubací s GQDs. HeLa buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C s GQDs o koncentracích 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mikroskopicky bylo vyhodnoceno, že se u buněk vystavených oběma koncentracím neprokázaly žádné viditelné morfologické změny. Mimo to bylo zjištěno, že se v obou případech GQDs internalizují do cytoplazmatické membrány a cytoplazmy. Díky CLSM byly GQDs při pozorování zhodnoceny jako výrazně fotoluminiscenční i při nižší koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, což poukazuje na jejich využití v zobrazovacích metodách. Dále byly měřeny životaschopnosti HeLa buněk za aplikace CCK-8 testu, kdy byly buňky inkubovány při GQD koncentracích 12,5, 25, 50, 100 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po provedení testů viability bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací GQDs zároveň stoupá také jejich cytotoxicita a klesá biokompatibilita, přičemž u nejvyšší koncentrace (200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla výsledná životaschopnost vyměřena na 80 %. Třetí test se zabýval integritou cytoplazmatické membrány vystavených buněk. Pomocí LDH testu byly v supernatantu spektrofotometricky proměřeny koncentrace LDH. HeLa buňky byly inkubovány a ošetřeny stejně jako při provedení předchozího testu. Koncentrace LDH v supernatantu byla přímo úměrná rostoucí koncentraci GQDs. U použitých koncentrací 12,5 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo v porovnání s kontrolními buňkami pouze k mírnému narušení buněčné integrity, přičemž buňky inkubované s GQDs o koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazovaly oproti kontrole 50% nárůst v obsahu LDH. Následně byly díky roztoku obsahujícímu 2,7-dichlorfluorescein diacetát provedeny testy pro zjištění hladiny reaktivních forem kyslíku. Test byl prováděn za stejných podmínek jako dva předchozí testy a při stejných koncentracích GQDs. Nárůst ROS se ukázal být přímo úměrný aplikovaným koncentracím GQDs, přičemž u buněk inkubovaných s GQDs v koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k rapidnímu nárůstu kyslíkových radikálů. Jako poslední byl vyhodnocen obsah buněk procházejících apoptózou při využití stejných podmínek jako v ostatních testech. Tyto koncentrace byly vyhodnoceny s využitím Annexinu V konjugovaným s FITC a za přídavku PI, přičemž analýza byla provedena prostřednictvím průtokové cytometrie. Ve vzorcích HeLa buněk se při užití nízkých koncentrací (12,5 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vyskytovalo zanedbatelné množství apoptotických buněk a při hodnocení buněk inkubovaných při nejvyšší koncentraci GQDs bylo stále 80 % vystavených buněk naživu. Dávky a použité koncentrace grafenových teček tedy hrají zásadní

roli v jejich biokompatibilitě a cytotoxicitě, přičemž toxické účinky obecně narůstají se zvyšujícím se obsahem GQDs ve vzorku (Jiang *et al.*, 2015).

3.6 Bioaplikace GQDs

Grafenové kvantové tečky mají díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem široké využití v moderní medicíně a biologii. Právě díky své hydrofilii, chemické inertnosti a optickým vlastnostem nacházejí tyto nanočástice uplatnění např. u zobrazovacích metod (bioimagingu), jako biosenzory či při distribuci léčiv do buněk. Mimo jiné jsou to také antibakteriální a antimikrobiální činitele s katalytickými a fotokatalytickými účinky (Kansara *et al.*, 2022).

3.6.1 Bioimaging (Zobrazovací metody)

Vzhledem ke svým mimořádným fotoluminiscenčním vlastnostem, skvělé rozpustnosti ve vodě, chemické inertnosti, fotostabilitě, odolnosti vůči fotobleachingu a biokompatibilitě s buňkami jak v *in vitro* tak v *in vivo* studiích se dají grafenové kvantové tečky využívat v zobrazovacích biologických a medicínských metodách. Jedná se o mnohem výhodnější fluorescenční sondy, než jsou organická barviva či polovodičové kvantové tečky z důvodu své vysoké fotostability a odolnosti vůči fotobleachingu (Karmakar *et al.*, 2021). Emise GQDs je obvykle excitována zářením v UV oblasti, což může být děj škodlivý pro živé buňky a biosystémy. V rámci zobrazovacích technik se často studuje významná schopnost multifotonové excitace. Emise GQDs je ovlivnitelná mimo jiné také typem okrajů a hodnotami pH okolního prostředí (např. cikcak okraje a alkalické prostředí vyvolávají u GQDs intenzivní emisní záření) (Wang *et al.*, 2014; Kortel *et al.*, 2020).

Za účelem provedení *in vitro* zobrazovacích testů vytvořil Zhu *et al.*, 2017, grafenové kvantové tečky se silně zelenou emisí z plátů oxidu grafenu prostřednictvím jednokrokové solvotermální syntézy. Ve výsledku vznikly GQDs vysoce biokompatibilní a vhodné pro označování buněčných struktur. V experimentu prováděném jinou vědeckou skupinou byly jednoduchou syntézou z grafitového prášku sestrojeny zeleně emitující GQDs pro zobrazení lidských jaterních rakovinných buněk. V porovnání s tradičně využívanými fluorescenčními barvivy Alexa Fluor 488 a fluoresceinem vykazují grafenové kvantové tečky mnohem vyšší fotostabilitu než zmíněna barviva. Experiment *in vitro* prováděný vědeckou skupinou Zheng *et al.*, 2014, zahrnoval konjugaci GQDs s inzulinem, takto modifikované kvantové tečky byly prostřednictvím metody TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence

Microscopy) pozorovány v interakci s inzulinovými receptory živých buněk. Docházelo ke vzniku miniaturních klastrů takto upravených nanočástic, u kterých byl detekován laterální pohyb k cytoplazmatické membráně a dále také vertikální pohyb mezi cytosolem a oblastmi cytoplazmatické membrány. Grafenové kvantové tečky mají tedy velké uplatnění především při pozorování dynamiky buněčných dějů. V rámci *in vivo* testů byl proveden vědeckou skupinou Nurunnabi *et al.*, 2013, experiment, při kterém byly myším intravenózně podány hydroxylované GQDs se zelenou fluorescencí. Fluorescenční signál byl pozorován 12 hodin po vpravení v místě nádorového bujení, což indikuje, že by mohly být GQDs využitelné pro zobrazování povrchových tkání např. u rakoviny kůže. Naopak v hluboko uložených tkáních a orgánech nebyl fluorescenční signál *in vivo* detekován kvůli excitaci a emisi o příliš krátké vlnové délce (Wang *et al.*, 2014; Kortel *et al.*, 2020).

3.6.2 Biosensing (Detekční metody)

Grafenové kvantové tečky mohou být rovněž využity pro detekce např. kovových iontů, či biomarkerů. Byl sestaven fotoluminiscenční sensor založený na GQD-aptamerové sondě a oxidu grafenu pro detekci Pb^{2+} iontů, přičemž GQD-aptamer sloužil jako fluorofor pro jejich zachycení. Pro efektivní odhalení Pb^{2+} iontů byl uplatněn efektivní přenos elektronů mezi GQD-aptamerem a GO. Takto sestavený nanosenzor měl lineární rozsah do 400 nm, ale jeho detekční limit činil až 0,6 nm. Jelikož se jak GQDs, tak GO vyznačují vynikající biokompatibilitou, lze tento sensor využívat v *in vitro* a *in vivo* studiích jako snímací systém (Wang *et al.*, 2020).

Pro detekci biomarkerů byly sestaveny biosenzory snímající např. kyselinu askorbovou, DNA, aminokyseliny či dopamin. Pro detekci kyseliny askorbové byl vytvořen biosenzor založený na GQDs emitující oranžové světlo. Kyselina askorbová dokáže pohlcovat hydroxidové radikály a obnovovat fluorescenci GQDs zhašenou o-benzochinonem. Díky tomuto mechanismu je zmíněná metoda velice výhodná především díky své univerzálnosti a vysoké selektivitě (Wang *et al.*, 2020).

Kromě detekce iontů kovů a biomarkerů se GQDs mohou využívat také k nalézání rakovinných buněk v biologických systémech. Hodnoty pH těchto tkání jsou obvykle nižší než pH tkání zdravých. Pro tyto účely byla vytvořena např. pH-respivní sonda založená na GQDs, jejíž povrch byl modifikován atomy síry a dusíku (pRF – GQDs). Tyto sondy lze využívat pro odlišení zdravých buněk od buněk nádorových, jelikož při změně pH dochází zároveň ke změně ve vyzařované fluorescenci (Wang *et al.*, 2020).

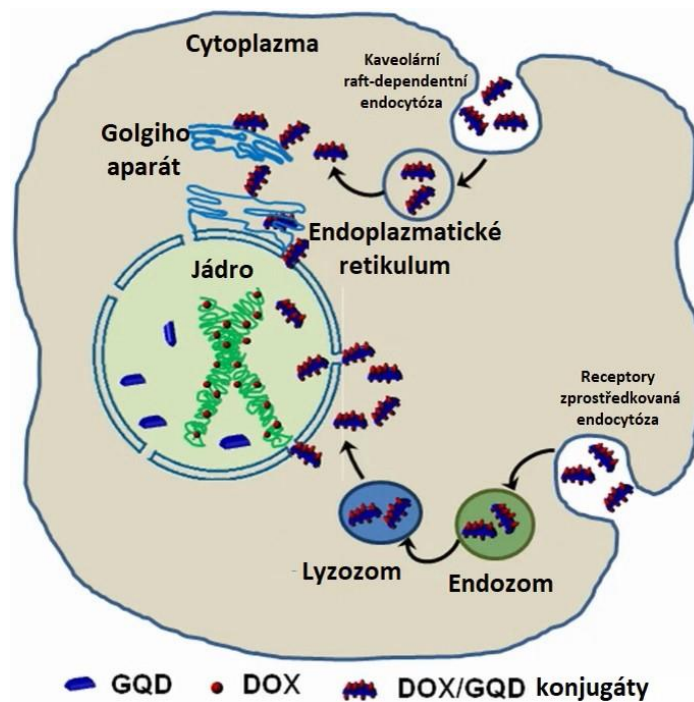
3.6.3 Distribuce léčiv

Díky svému obrovskému povrchu dokážou tyto nanočástice vázat velké množství terapeutických látek, které jsou následně vnášeny do cílových oblastí. Mezi často distribuovaná léčiva patří např. doxorubicin (DOX) či docetaxel, které se využívají v rakovinové léčbě (Gulzar *et al.*, 2016). GQDs poskytují pro vazbu s chemoterapeutiky velký počet vazebných míst, pro navázání terapeutik aromatického charakteru jsou také využívány π -orbitály v grafenové mřížce, tvořené uhlíkovými atomy v sp^2 hybridizaci. Dochází zde ke vzniku tzv. patrových interakcí, díky kterým se léčiva mohou skládat na sebe bez toho, aniž by docházelo k tvorbě kovalentních vazeb (Zhao *et al.*, 2020).

Nejzkoumanější oblastí pro využití GQDs z terapeutického hlediska je rakovinová léčba, tato skutečnost je dána díky zobrazovacím a distribučním schopnostem těchto nanočástic. GQDs v rakovinové léčbě dokážou efektivně akumulovat léčiva jako jsou např. doxorubicin (DOX) či cisplatina v buněčném jádře (viz obrázek č. 6), urychlit štěpení DNA a cytotoxicitu těchto léčiv v jádrech rakovinných buněk. V experimentu došlo ke konjugaci GQDs s biotinem, který zajistil jejich spolehlivé rozpoznání biotinovými receptory, které jsou nadměrně exprimovány rakovinnými buňkami. Na povrchu takto upravených kvantových teček byly navázány molekuly DOX působením π - π interakcí a díky skvělým adsorpčním schopnostem. Vzhledem k fotoluminiscenci grafenových kvantových teček mohl být pozorován dynamický proces přenosu DOX do buněčného jádra (Iannazzo *et al.*, 2017).

Při kombinaci GQDs s ionty mědi vykazovaly buňky inkubované upravenými kvantovými tečkami několikanásobně vyšší aktivitu při štěpení DNA než při použití stejně modifikovaných částic grafen oxidu (GO), tzn. GQDs dokážou zefektivnit nukleázovou aktivitu buněk. Po aplikaci GQDs bez předchozích úprav bylo zjištěno, že GQDs oproti GOs výrazně urychlují akumulaci DOX v buněčném jádře (viz obrázek č. 6) (Wang *et al.*, 2013).

Pro účely rakovinové léčby mohou být GQDs vpravovány tzv. aktivním cílením, kdy dochází při tvorbě GQD nosičů ke konjugaci s protilátkami pro selektivní usmrcení nádorových buněk fyzisorpcí, takto potažené částice jsou směřovány do míst s výskytem odpovídajících antigenů. Nevýhodami této metody jsou přítomnosti totožných biomarkerů rovněž ve zdravých buňkách a neefektivní cílení *in vivo* v důsledku přítomnosti četných biologických bariér, které mohou zpomalovat distribuci nanočástic (Gulzar *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2017).

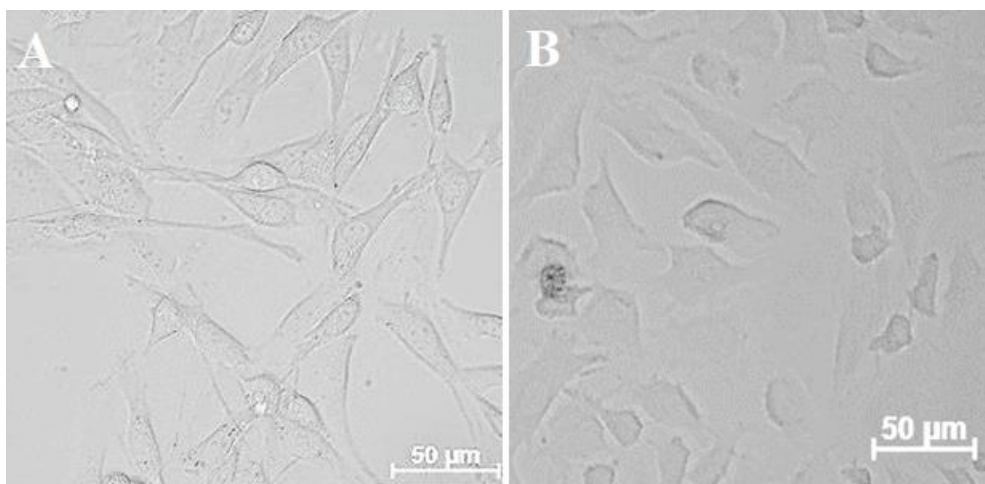


Obrázek č. 6: Mechanismus uptake GQDs konjugovaných s doxorubicinem (DOX) a jejich akumulace v buněčném jádře prostřednictvím kaveolární raft-dependentní endocytózy a receptorem zprostředkované endocytózy. Převzato z (Wang *et al.*, 2013).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

K provedení následných experimentů byly využity dvě buněčné linie. Jednak linie adherentních myších fibroblastů NIH/3T3 (American Type Culture Collection, USA, kat. č.: CRL-1658) (viz obrázek č. 7) a také nádorová linie adherentních HeLa buněk lidského karcinomu děložního hrdla (American Type Culture Collection, USA, kat. č.: CRM-CCL-2) (viz obrázek č. 7).



Obrázek č. 7: A) Adherentní buněčná linie NIH/3T3 myších fibroblastů při měřítku 50 µm, B) Nádorová adherentní buněčná linie HeLa lidského karcinomu děložního čípku při měřítku 50 µm.

4.1.1 Kultivace a pasážování

S adherentními buněčnými liniemi NIH/3T3 a HeLa byly prováděny veškeré úkony v *in vitro* podmínkách, bylo tedy třeba dané buňky kultivovat v inkubátoru s vnitřní teplotou 37 °C v atmosféře obohacené o 5 % CO₂. Buňky rostly v kultivačních lahvích s kultivačním médiem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), které má nízký obsah glukózy. Veškerá práce s buňkami probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Při kultivaci bylo důležité uchovávat rovnoměrný nárůst buněk na dně láhve, proto je bylo nutné pravidelně pasážovat. Při pasážování bylo odsáto původní médium pomocí vakuové odsávačky. Buňky byly promyty PBS pufrem, aby došlo k odstranění fetálního bovinního séra (FBS), které bylo obsaženo v médiu, jelikož FBS inhibuje proteolytickou aktivitu trypsinu, který byl aplikován po promytí a odsátí PBS pufrem (Vrtacnik *et al.*, 2014). Buňky ošetřené trypsinem byly umístěny do inkubátoru po dobu 3 minut, účinkem trypsinu

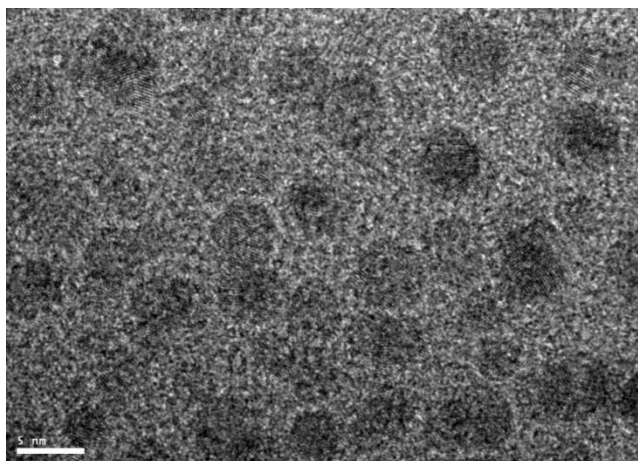
došlo k odlepení adherentních buněk od plastového dna kultivační lahve. Přidáním čerstvého kultivačního média do lahve bylo díky přítomnosti FBS zastaveno působení tohoto enzymu. Dále byly buňky spočítány a byl zjištěn potřebný objem buněčné suspenze pro další experimenty.

4.2 Fyzikální materiál (N-GQDs a N-GQDs se single atoms)

V této bakalářské práci byly použity grafenové kvantové tečky dopované dusíkem (N-GQDs). Vzhledem k rychlému vývoji nanomateriálů se jednalo o modifikované grafenové tečky s ionty kovů (manganu a mědi) na jejich povrchu. Tyto ionty lze označit jako tzv. single atoms, které mohou fungovat jako nanokatalyzátory a jsou v této době studované (Zhao *et al.*, 2020). Konkrétně byly ke značení buněk využity tři typy vzorků: samotné grafenové tečky (N-GQDs) a N-GQDs se single atoms (N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺). Zásobní koncentrace N-GQDs činila 1 mg·ml⁻¹, u vzorků N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ byla 1,5 mg·ml⁻¹.

Tyto nanomateriály byly syntetizovány z kyseliny grafenové dopované dusíkem stejným způsobem, jaký byl popsán ve článku vědecké skupiny Panacek *et al.*, 2022, akorát s již uvedenými typy single atoms. Syntéza spočívala v reakci fluorografenu s azidem sodným, tato reakce vedla k produkci grafenového derivátu dopovaného dusíkem (NG). Následně byl tento derivát oxidován působením kyseliny dusičné a jeho velikost byla příslušně upravena. Tento proces vedl k vytvoření fluorescenční kyseliny grafenové (NGA) dopované dusíkem a karboxylovými kyselinami. Na molekuly takto upravené kyseliny byly navázány single atoms a prostřednictvím hydrotermálních technik byly vyrobeny grafenové kvantové tečky, jejichž vlastnosti byly dále optimalizovány. Charakterizace nanomateriálu byla provedena pokročilými přístroji pro HR-TEM, XPS, DLS (měření zeta potenciálu) a fluorescenční spektroskopii.

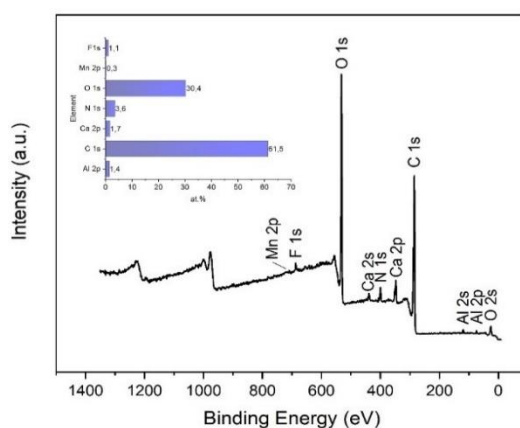
Díky velikostní distribuci snímku grafenových kvantových teček pořízeném prostřednictvím metody HR-TEM byla velikost nanomateriálu stanovena na 3–5 nm (viz obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: N-GQDs vyobrazené metodou HR-TEM. Měřítko je 5 nm. Převzato z (Panacek *et al.*, 2022).

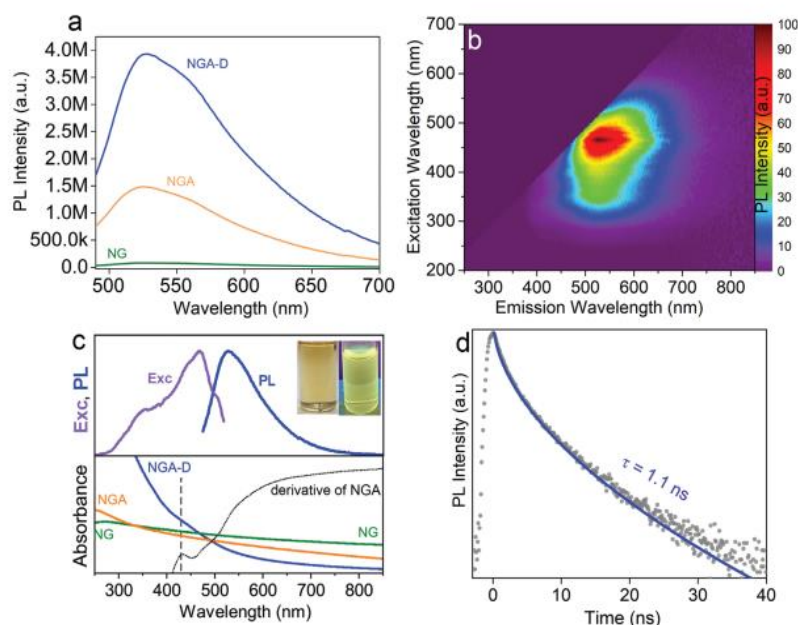
Prostřednictvím metody XPS bylo změřeno zastoupení jednotlivých prvků v nanočásticích N-GQDs-Mn²⁺ (viz graf č. 1), u ostatních typů nanočástic nebyl tento snímek poskytnut, jelikož bude zahrnut v budoucí publikaci. Výstupy z rentgenové fotoelektronové spektroskopie byly propůjčeny Mgr. Martinem Petrem, Ph.D.

Dále byly Mgr. Davidem Panáčkem, Ph.D. metodou DLS změřeny zeta potenciály jednotlivých typů grafenových teček, kdy bylo zjištěno, že povrchový náboj N-GQDs odpovídá hodnotě 0,7 mV, N-GQDs-Mn²⁺ mají povrchový náboj -5,5 mV a u N-GQDs-Cu²⁺ byl změřen náboj -16,1 mV. Hodnoty zeta potenciálů jsou důležité z hlediska buněčného uptake nanočástic či cytotoxicity. Ale jelikož mají dané nanomateriály hodnoty zeta potenciálu neutrální až záporné, lze usuzovat, že NPs budou vykazovat toxicitu podstatně nižší než v případě nanočástic, které by se vyznačovaly hodnotami kladnými (Havrdova *et al.*, 2016).



Graf č. 1: Prvkové zastoupení v N-GQDs-Mn²⁺ měřené prostřednictvím metody XPS.

Prostřednictvím různých fluorescenční spektroskopie byly charakterizovány fotoluminiscenční vlastnosti syntetizovaných grafenových kvantových teček (viz obrázek č. 9).



Obrázek č. 9: Charakteristika optických a fluorescenčních vlastností NGA-D, a) Porovnání fotoluminiscenčních spekter grafenu (NG), grafenové kyseliny (NGA) a grafenových teček (NGA-D) ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm, $0,5$ mg·ml⁻¹), b) Excitačně-emisní barevná mapa grafenových teček, c) UV-VIS absorpční spektrum NG, NGA a NGA-D (se svými deriváty) při excitaci $\lambda_{\text{ex}} = 467$ nm a fotoluminiscenční spektrum NGA-D při $\lambda_{\text{em}} = 527$ nm, vložka v horním panelu představuje vodnou disperzi NGA-D při působení okolního světla a při ozáření světlem o $\lambda = 365$ nm, d) Časová závislost rozkladu fotoluminiscence ($\lambda_{\text{em}} = 527$ nm) s odpovídající exponenciální funkcí (modrá linie) pro odvození životnosti fluorescence. Převzato z (Panacek *et al.*, 2022).

4.3 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.3.1 Použité chemikálie

- kultivační médium s nízkým obsahem glukózy Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, kat. č.: 1906036)
- MTT roztok 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (5 mg·ml⁻¹) (Sigma Aldrich, kat. č.: CT01-5)

- deionizovaná voda (dH₂O)
- dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, kat. č.: 472301)
- 0,25% trypsin v EDTA (Sigma Aldrich, kat. č.: T4049)
- fluorescenční sonda pro stanovení ROS CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific, kat. č.: C6827)
- 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) (5 mg·ml⁻¹) (Sigma Aldrich, kat. č.: D9542-5MG)

4.3.2 Použité soupravy

- BD CycletestTM Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences, kat. č.: 340242)

4.3.3 Použité roztoky a jejich příprava

- 1x fosfátový PBS pufr (pH 7,4)

Do zásobní lahve byl přilít 1 l deionizované vody, následně bylo přidáno 80,06 g NaCl, 2,01 g KCl, 2,45 g KH₂PO₄ a 17,8 g Na₂HPO₄. Po promíchání vznikl pufrovací roztok 10x PBS. Pro přípravu 1x PBS pufru byl smíchán 10x PBS pufr s deionizovanou vodou v poměru 1:9.

4.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- světelný mikroskop CKX31 (Olympus)
- konfokální mikroskop LSM 980 (Zeiss)
- CO₂ inkubátor NB-203XL (N-Biotek)
- vakuová odsávačka F-36 (Fazzini)
- laminární box (Biohazard Bioban)
- suchá vyhřívaná lázeň (Major Science)
- vodní lázeň Julabo PURA 10 (Thermo Fisher Scientific)
- průtokový cytometr BD FACSVTMerse (BD Biosciences)
- multidetekční reader Infinite M200 PRO (Tecan)
- třepačka MS 3 Digital (Ika Works)
- počítadlo buněk TC10TM Automated Cell Counter (Bio-Rad)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 MTT Assay

Pro vyhodnocení cytotoxicity grafenových teček působících na vybrané buněčné linie byla provedena MTT Assay. Jedná se o kolorimetrickou metodu, díky které lze stanovit viabilitu buněk z hlediska funkčnosti mitochondriálních enzymů. V případě vitality buněk dochází při styku buněk se žlutými krystaly methylnitrotetrazoliových solí (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrotetrazolium bromid) k jejich konverzi vlivem buněčných mitochondriálních enzymů na fialové krystaly formazanu. Intenzita tohoto fialového zbarvení je detekovatelná spektrofotometricky, přičemž rostoucí intenzita je přímo úměrná viabilitě buněk. V případě vysoké cytotoxicity aplikované látky je intenzita zbarvení nižší nebo žádná (Sladowski *et al.*, 1993).

Buněčná viabilita byla měřena u obou buněčných linií po použití N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ v koncentracích 50, 100, 150, 200, 250, 300 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vždy po 24h inkubaci. Po zpasáží buněk, jejich spočítání a vhodném naředění byla suspenze napipetována (100 μl /jamka) do 96-jamkové destičky, přičemž do každé jamky bylo aplikováno $1\cdot 10^4$ buněk. Destička s buňkami byla kultivována po dobu 24 h v inkubátoru, následně byly do jamek s výjimkou kontrolních jamek přidány příslušné vzorky tak, aby se v jamce vyskytovaly ve zmíněných koncentracích. Každý vzorek byl při dané koncentraci opakován v triplikátu. Takto ošetřené buňky byly inkubovány po dobu 24 h. Následně byl aplikován MTT roztok dle článku Havrdova *et al.*, 2016. Po uplynulé inkubační době byl obsah jamek vyklepnut do výlevky a jamky byly promyty vždy 100 μl PBS pufru. Byla smíchána směs kultivačního média a MTT roztoku, po promíchání byla tato směs aplikována do jednotlivých jamek vždy po 100 μl . Následovala inkubace buněk s MTT roztokem po dobu 4 h. Následně bylo k MTT roztoku přidáno na jamku vždy 100 μl DMSO. Destička byla po aplikaci rozpouštědla přenesena na míchačku a po dostatečném promíchání byla prostřednictvím multidetekčního readeru Tecan infinite M200 vyhodnocena intenzita fialového zbarvení při záření o vlnové délce 570 nm. Na základě výsledných absorbancí u buněk se vzorky a absorbancí v kontrolních jamkách byly zjištěny hodnoty buněčných viabilit, které byly vyneseny do grafů. Měření bylo pro každou buněčnou linii opakováno třikrát, výsledek je tedy průměrem těchto tří měření.

4.5.2 Měření produkce ROS (reaktivních forem kyslíku)

Mezi nejvýznamnější kyslíkové radikály vyvolávající buněčný oxidační stres řadíme především H_2O_2 , $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ a NO . Tyto látky mají potenciál vyvolávat poškození DNA či RNA, vnitrobuněčnou oxidaci proteinů a také peroxidaci lipidových membrán. Proti těmto radikálům působí řada antioxidantních intracelulárních enzymů jako jsou např. superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza. V nízkých koncentracích mají kyslíkové radikály především signalizační funkci (Wu *et Yotnda*, 2011).

K detekci produkce intracelulárních reaktivních forem kyslíku byla využita fluorescenční próba CM-H₂DCFDA (chlormethylový derivát 2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetátu), která při kontaktu s buňkami prochází buněčnou membránou a internalizuje se do jejich nitra. Sonda je před aplikací nefluoreskující, po vniku však dochází účinkem buněčných esteráz k odštěpení acetátové skupiny a takto opatřené molekuly mohou být oxidovány celou řadou kyslíkových radikálů, což vede k tvorbě zeleného fluorescenčního produktu. Rostoucí intenzita měřené fluorescence je přímo úměrná buněčné produkci ROS (Testa *et al.*, 2011).

K měření produkce kyslíkových radikálů byly využity buněčné linie NIH/3T3 a HeLa, které byly značeny grafenovými nanočásticemi (N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺). Postup přípravy buněk byl stejný jako v případě měření buněčné viability, přičemž aplikované koncentrace činily pouze 50, 200 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, aby byly zvýrazněny rozdíly v produkcích ROS. Označené buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin. Všechny vzorky byly aplikovány v dané koncentraci třikrát.

Dále byly buňky připraveny na samotné měření produkce ROS dle článku Havrdova *et al.*, 2016. Fluorescenční próba byla připravena dle doporučení výrobce. 50 μg sondy bylo rozpuštěno ve 173 μl DMSO, tento roztok byl promíchán. Příslušný roztok byl smíchán s PBS pufrem v poměru 1:100. Po preparaci pracovního roztoku a vyklepnutí obsahu destičky bylo do každé jamky aplikováno vždy 50 μl roztoku. Po dvacetiminutové inkubaci byla destička podrobena měření při excitační vlnové délce 492 nm a emisní vlnové délce 527 nm. Měření vedlo k získání hodnot intenzity fluorescence, tato data byla následně využita pro tvorbu grafů produkce reaktivních forem kyslíku. Každé měření bylo opakováno třikrát, výsledné grafy byly vytvořeny z průměrů výstupních hodnot těchto tří nezávislých měření.

4.5.3 Konfokální mikroskopie

Jedná se o optickou metodu, která umožňuje vysokorozlišovací vizualizaci biologických vzorků. Oproti klasické fluorescenční mikroskopii se vykazuje podstatně větším rozlišením, především díky možnosti eliminace nezaostřeného fluorescenčního záření vzhledem k přítomnosti konfokálních clon, které tuto fluorescenci blokují a na fotonásobič tedy dopadá především ostré světlo. Na rozdíl od fluorescenční mikroskopie také umožňuje zobrazování objektů ve 3D (Elliott, 2020).

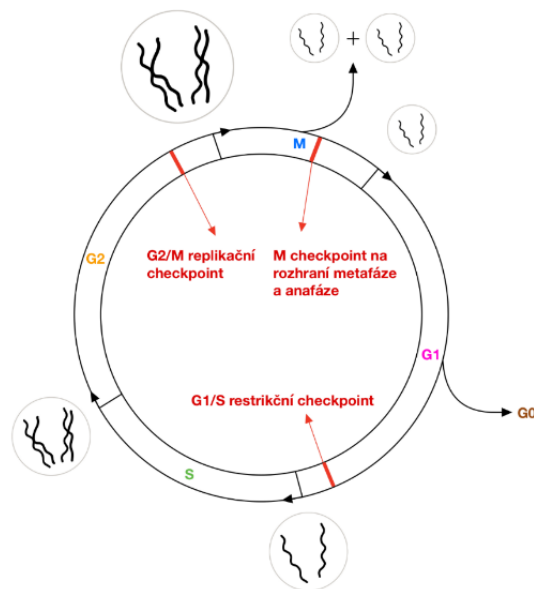
Pro vizualizaci grafenových kvantových teček internalizovaných v buňkách byly využity buněčné linie NIH/3T3 a HeLa. V první řadě došlo ke zpasáží buněčné kultury, v důsledku čehož byla získána buněčná suspenze, která byla po smíchání s příslušným objemem čerstvého média aplikována do čtyř vizualizačních misek pro konfokální mikroskopii (1. – vzorek N-GQDs, 2. – vzorek N-GQDs-Mn²⁺, 3. vzorek – N-GQDs-Cu²⁺, 4. vzorek – kontrola). Pro tato měření byly využity speciální zobrazovací misky se ztenčeným dnem pro konfokální mikroskopii μ -Dish 35 mm (Ibidi). Každá z misek obsahovala 1000 μ l buněčné suspenze s médiem a zároveň také $1 \cdot 10^4$ buněk. Pro získání nejlepší možné fluorescence byly aplikovány nanočástice v koncentraci 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po 48h inkubaci byly jednotlivé obsahy misek vyklepnuty a misky byly promyty 500 μ l PBS pufru, následně bylo do misky aplikováno dalších 500 μ l PBS pufru pro následné zobrazení. Dále byly jednotlivé vzorky pozorovány prostřednictvím konfokální mikroskopie. K vyobrazení buněk se vzorky nanočástic bylo využito excitační záření o vlnové délce 445 nm. Jelikož byl fluorescenční signál zaznamatelný až při vyšší akumulaci nanomateriálů v buňkách, byly pro studium distribuce grafenových teček kontrolní buňky a buňky inkubované s N-GQDs po vizualizaci naznačeny 20 μ l barviva DAPI, které vykazuje intenzivní modrou fluorescenci a váže se na DNA v buněčném jádře.

4.5.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je hojně využívaná metoda pro analýzu všemožných charakteristik biologických komponent, tato technologie umožňuje studium celistvých buněk či buněčných organel a lze díky ní charakterizovat povahu analyzovaných částic ve vzorku. Analyzované komponenty převedené do suspenze pronikají průtokovou celou jednotlivě za sebou, jsou zde ozařovány a zároveň excitovány laserovým paprskem. Při ozáření dochází k rozptylu světla na dané částici. Rozptylová informace odpovídá strukturním a morfologickým vlastnostem částice. Laser dopadající na částici zároveň vyvolává její excitaci, což vede

k vyzáření fluorescenčního emisního záření. Intenzita fluorescence je pak přímo úměrná množství fluorescenční próby navázané na danou komponentu. Průtoková cytometrie je využívána k získávání celé řady dat, např. informace o buněčném cyklu, proliferaci, membránovém potenciálu atd. (Jaroszeski *et* Radcliff, 1999)

Jak již bylo zmíněno, průtokovou cytometrii lze využít mimo jiné pro analýzu buněčného cyklu, ten představuje cyklický sled událostí, který spojuje proběhlé buněčné dělení s dělením následujícím. Do tzv. interfáze se řadí G1, S a G2 fáze. G1 fáze představuje přípravu buňky na očekávanou DNA replikaci, v nadcházející S fázi pak dochází k samotné syntéze DNA a v G2 fázi se buňka chystá na následné buněčné dělení, které probíhá v tzv. M fázi, která již není součástí interfáze. V rámci buněčného cyklu existují také fáze G0, což jsou klidové etapy, ve kterých buňky aktivně nepodléhají buněčnému cyklu (viz obrázek č. 10) (Schafer, 1998).



Obrázek č. 10: Schéma buněčného cyklu a jeho dílčích fází se zvýrazněním jednotlivých kontrolních bodů a vyobrazením průběhu dané fáze v nákrese buněk.

Buněčný cyklus je komplexní série událostí, která vyžaduje spolehlivou regulaci. Tato regulační činnost je poskytnuta především tzv. CDK (cyklin-dependentní kinázy) a cykliny, které dohromady vytvářejí komplexy a umožňují průchod skrz tzv. checkpointy, což jsou body v průběhu buněčného cyklu, které rozhodují, zda bude buňce dovoleno vstoupit do jeho další fáze. Rozlišujeme tři checkpointy – G1/S, G2/M a M. G1/S restrikční checkpoint je ovlivňován především výživou a velikostí buňky, G2/M replikační checkpoint reaguje na poškození DNA či chyby v její replikaci, poslední checkpoint se nachází na rozhraní metafáze a anafáze,

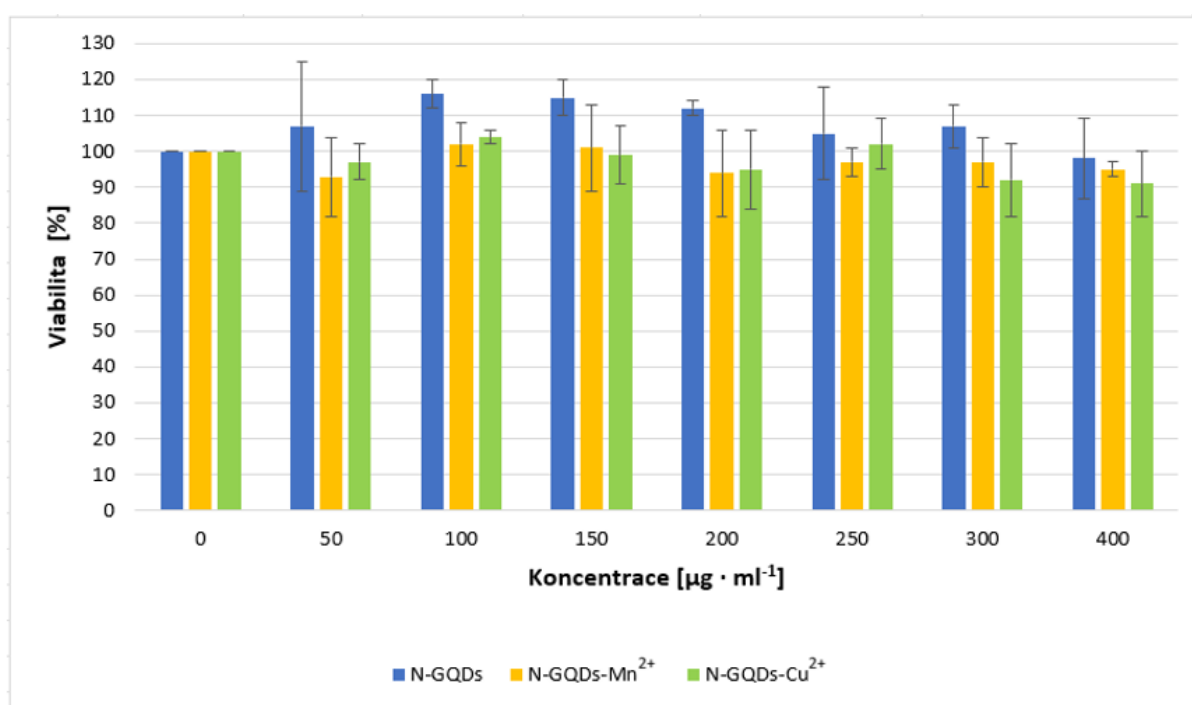
kde závisí na připojení chromozomů k mitotickému vřeténku. V případě, že v průběhu cyklu dojde k poruše, je aktivita cyklin-CDK komplexu zablokována a opětovná aktivace nastává v okamžiku vyřešení tohoto problému (Wenzel *et* Singh, 2018).

Pro analýzu vlivu grafenových kvantových teček na buněčný cyklus byly využity buněčné linie NIH/3T3 a HeLa. Po zpasážování buněk byla buněčná suspenze smíchána s médiem aplikována do kultivační destičky, přičemž na jamku připadlo 100 μl a zároveň $1 \cdot 10^4$ buněk. Takto připravená destička se nechala inkubovat po dobu 24 h. Po inkubaci byly buňky v destičce označeny vzorky kvantových teček tak, aby se zde vyskytovaly v koncentracích 50, 200 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Každý vzorek byl aplikován v příslušné koncentraci do tří různých jamek. Příprava buněk pro průtokovou cytometrii probíhala dle návodu kitu. Po 24 h bylo před samotným měřením do každé jamky aplikováno 25 μl roztoku A kitu pro průtokovou cytometrii BD CycletestTM Plus DNA Reagent Kit. Destička byla inkubována po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po uplynulé době bylo do každé jamky dále aplikováno 20 μl roztoku B již zmíněného kitu. Kultivační destička byla opět inkubována po dobu dalších deseti minut při pokojové teplotě. Následně bylo aplikováno vždy 20 μl roztoku C na jamku, po posledních deseti minutách inkubace, při které byla destička opatřena hliníkovou fólií a uložena do lednice. Následně proběhla analýza vlivu kvantových teček na průběh buněčného cyklu pomocí průtokového cytometru přímo z destičky.

5 Výsledky

5.1 Měření cytotoxicity GQDs metodou MTT Assay

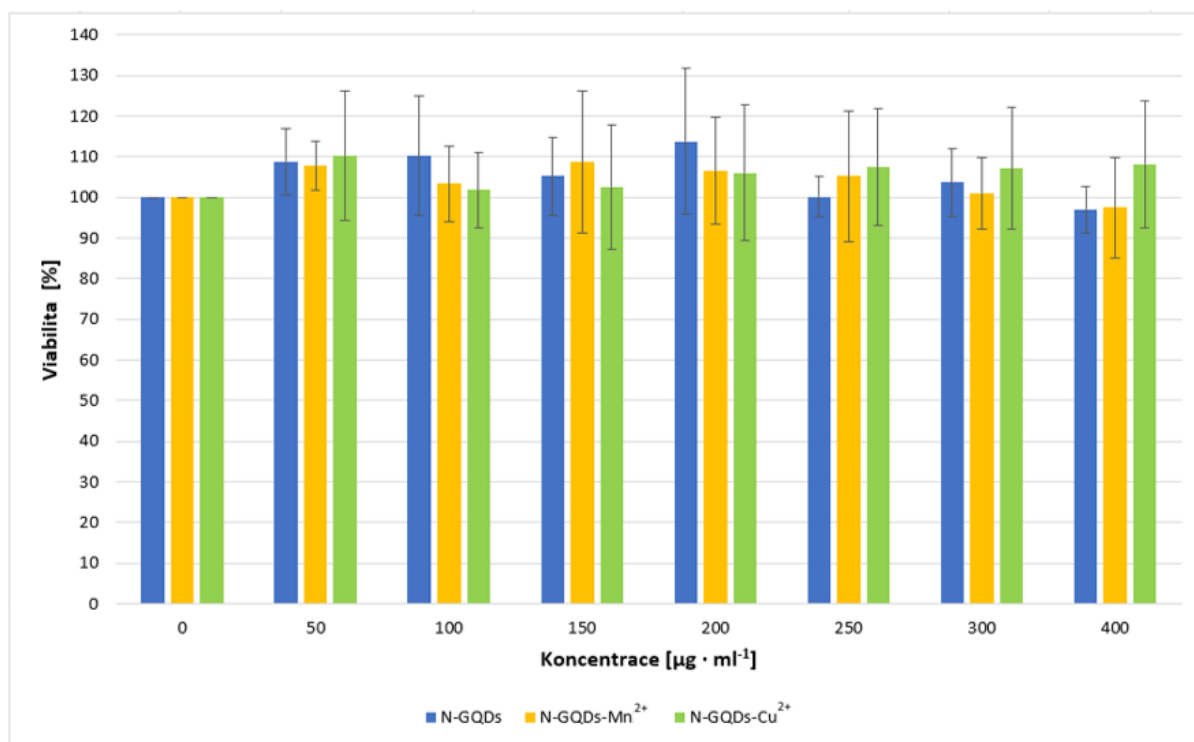
Za účelem vyhodnocení potenciálního cytotoxického působení grafenových kvantových teček na vybrané buněčné linie byla využita MTT Assay. Jedná se o metodu, která umožňuje stanovení buněčné viability na základě intenzity fialového zabarvení suspenze v důsledku přítomnosti formazanu, který vzniká přeměnou methyltetrazoliových solí funkčními mitochondriálními enzymy (Sladowski *et al.*, 1993). Měřen byl účinek N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ působících na linie NIH/3T3 (viz graf č. 2) a HeLa (viz graf č. 3) při koncentracích 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 24h inkubaci.



Graf č. 2: Výsledky měření účinku N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ v koncentracích 50, 100, 150, 200, 250, 300 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na viabilitu buněčné linie NIH/3T3 po 24h inkubaci.

Z grafu č. 2 buněčných viabilit lineie NIH/3T3 lze vyčíst, že při použití každé z daných koncentrací nanočástic nedošlo k úpadku viability pod 90 %, což indikuje nízkou toxicitu použitých nanomateriálů. Viability buněk u všech použitých materiálů nabývají, při postupu koncentrační řadou, určitých podobností, tzn. při změně koncentrace z 50 na 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dochází ke zvýšení viability. U koncentrace 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se viabilita ve všech případech mírně snižuje, tento pokles je zaznamenán i při koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poté se při přechodu

na koncentraci $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ viabilita zvyšuje (v případě N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺) nebo snižuje (v případě N-GQDs). Při koncentraci $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nastává u N-GQDs a N-GQDs-Mn²⁺ mírný nárůst, u vzorku N-GQDs-Cu²⁺ dochází k poklesu a při nejvyšší koncentraci $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pak nastává snížení viability ve všech případech.

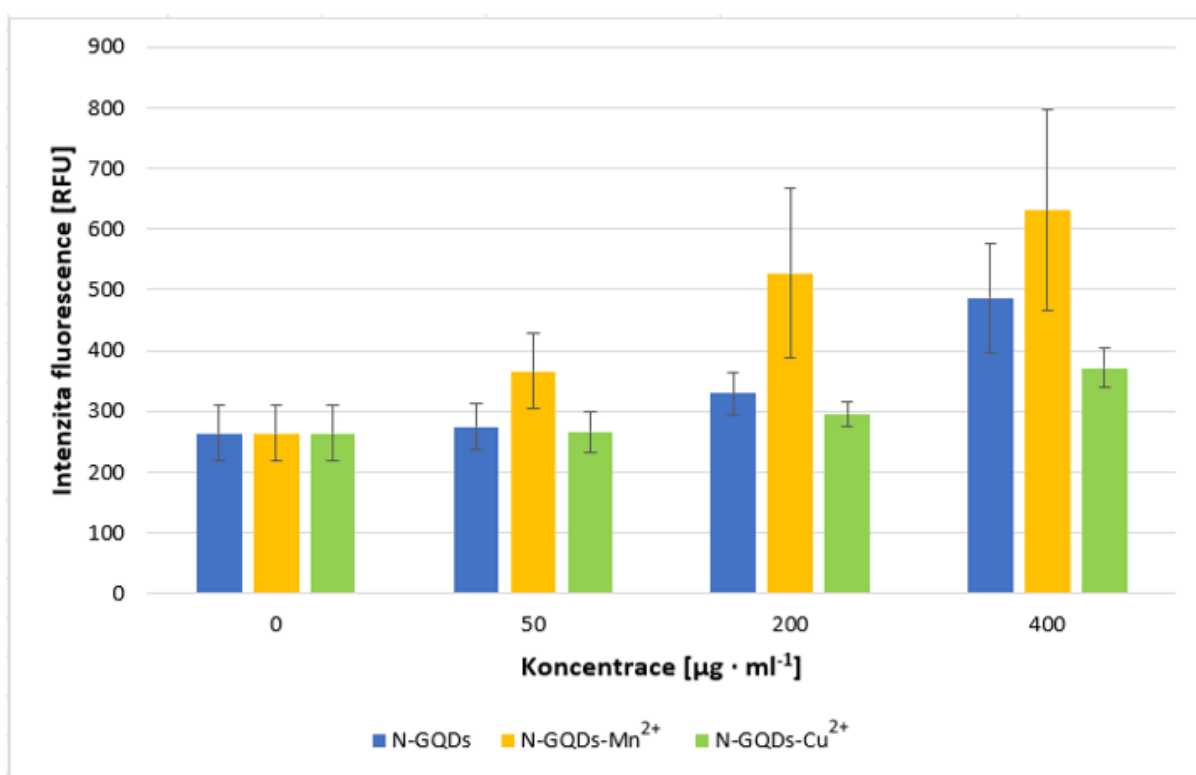


Graf č. 3: Výsledky měření účinku N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ v koncentracích 50, 100, 150, 200, 250, 300 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na viabilitu buněčné linie HeLa po 24h inkubaci.

U grafu č. 3 lze při použití N-GQDs pozorovat navýšení viability u linie HeLa při změně z koncentrace 50 na 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, naopak u N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ probíhá mírný pokles, při přechodu na koncentraci 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se naopak zvyšuje viabilita u N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ a klesá v případě N-GQDs. U koncentrace 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k zvýšení viability buněk v případě vzorků N-GQDs a N-GQDs-Cu²⁺, u vzorku N-GQDs-Mn²⁺ se viabilita naopak snížila. Změna na koncentraci 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vedla ke snížení viability buněk inkubovaných s N-GQDs a N-GQDs-Mn²⁺, naopak u buněk inkubovaných s N-GQDs-Cu²⁺ vedla změna k nárůstu. Při koncentraci 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se vyskytl jak nárůst (N-GQDs) a pokles (N-GQDs-Mn²⁺), tak stagnace buněčné viability (N-GQDs-Cu²⁺). U nejvyšší aplikované koncentrace 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo s výjimkou buněk inkubovaných s N-GQDs-Cu²⁺ ke snížení životaschopnosti buněk. U žádného použitého vzorku a koncentrace nedošlo k naměření buněčné viability nižší než 90 %. Tyto výsledky jsou v souladu s řadou studií, které potvrzují nízký vliv grafenových teček na buněčnou viabilitu (Feng *et al.*, 2020).

5.2 Měření oxidačního stresu v důsledku produkce ROS

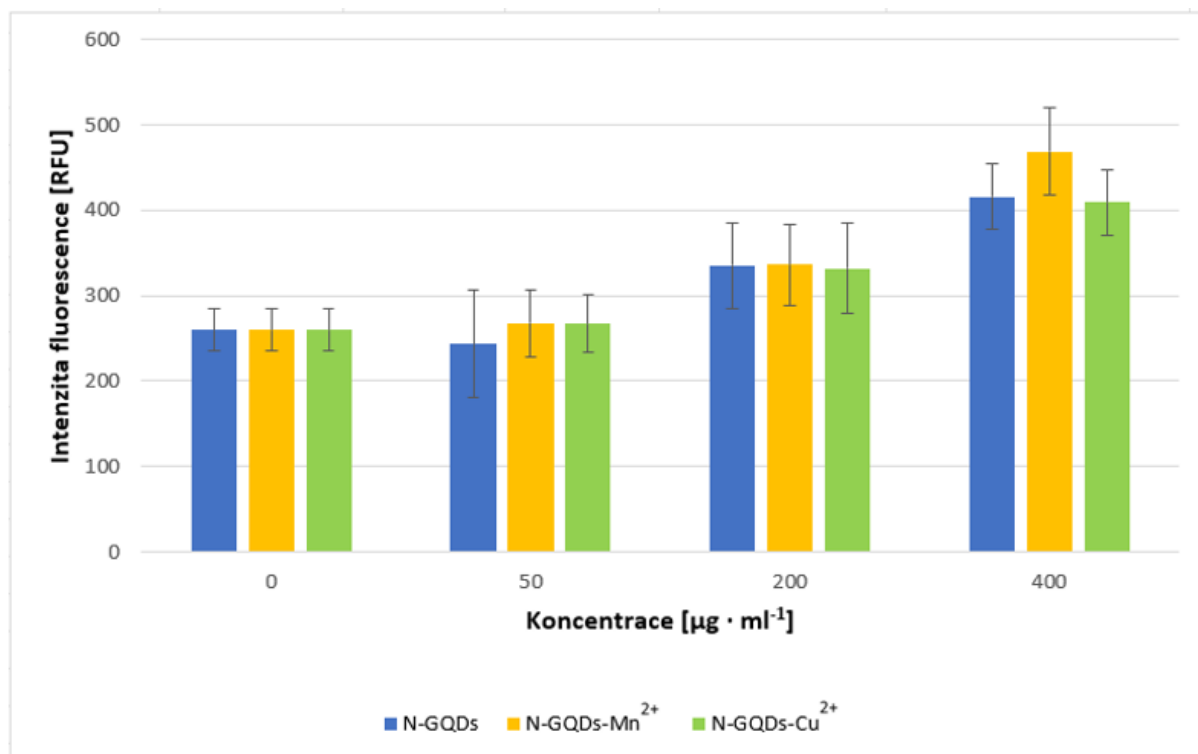
Pro měření produkce intracelulárních reaktivních forem kyslíku (ROS) buňkami inkubovanými s grafenovými tečkami byla využita fluorescenční próba CM-H₂DCFDA. Molekula próby reaguje s celou řadou ROS, tyto reakce vedou k oxidaci sondy, která v důsledku generuje fluorescenci. Intenzita naměřené fluorescence je přímo úměrná produkci kyslíkových radikálů buňkami (Testa *et al.*, 2011). Pro účely měření produkce ROS byly buněčné linie NIH/3T3 (viz graf č. 4) a HeLa (viz graf č. 5) po dobu 24 h inkubovány s N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ za aplikovaných koncentrací 50, 200 a 400 µg·ml⁻¹.



Graf č. 4: Výsledky měření produkce ROS buněčnou linií NIH/3T3 po 24h inkubaci s N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ aplikovaných v koncentracích 50, 200 a 400 µg·ml⁻¹.

Graf č. 4 u linie NIH/3T3 vyobrazuje skutečnost, že při postupu od nejnižší po nejvyšší koncentraci u všech nanomateriálů dochází ke zvyšování produkce ROS, přičemž nejvýznamnější produkci lze pozorovat u buněk inkubovaných s N-GQDs-Mn²⁺, kdežto nejnižší produkce ROS byla zaznamenána u buněk se vzorkem N-GQDs-Cu²⁺. Ve vyšších koncentracích vyvolávají grafenové kvantové tečky tvorbu zvýšeného množství kyslíkových

radikálů, a tudíž mohou v těchto koncentracích vyvolávat intenzivnější oxidační stres. Avšak buňky ošetřené N-GQDs-Mn²⁺ vykazovaly ze všech nejvyšší produkci kyslíkových radikálů.



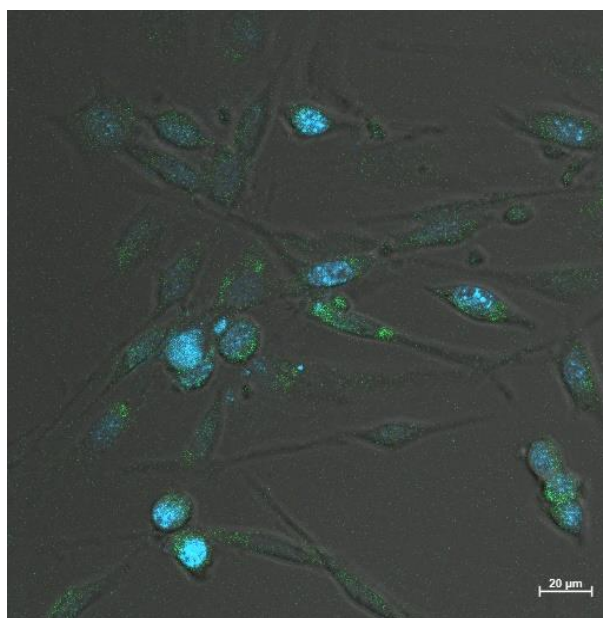
Graf č. 5: Výsledky měření produkce ROS buněčnou linií HeLa po 24h inkubaci s N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ aplikovaných v koncentracích 50, 200 a 400 µg·ml⁻¹.

Z grafu č. 5 buněčné linie HeLa lze vypořadovat rostoucí produkci ROS se zvyšující se koncentrací všech nanočástic. U nejvyšší koncentrace produkovaly kyslíkové radikály nejintenzivněji buňky značené N-GQDs-Mn²⁺. Produkce ROS je mezi buňkami značenými N-GQDs a N-GQDs-Cu²⁺ vyrovnaná.

5.3 Vizualizace distribuce GQDs konfokální mikroskopií

Pro vizualizaci fluorescence grafenových kvantových teček internalizovaných do buněk linií NIH/3T3 a HeLa byla využita konfokální mikroskopie, která poskytuje oproti klasickým fluorescenčním mikroskopickým metodám podstatně větší rozlišení. O vysokorozlišovací mikroskopickou metodu se jedná mimo jiné také kvůli tomu, že před zobrazením dochází k vyselektování zaostřené fluorescence, a výsledný obraz je tedy velice ostrý (Elliott, 2020). Distribuce byla pozorována u vzorků N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ při koncentraci 400 µg·ml⁻¹. Inkubace s grafenovými nanočásticemi trvala

48 hodin (přílohy č. 1, 2 a 3). Pozorována byla také čistá suspenze s buňkami, která sloužila jako kontrola pro porovnání s označenými buňkami (příloha č. 4). Pro vyobrazení byla využita excitační vlnová délka 445 nm, která následně vybudila zelenou fotoluminiscenci nanočástic. Pro posuzování distribuce grafenových teček v buňkách byly kontrolní buňky obarveny barvivem DAPI (příloha č. 5), které se vyznačuje intenzivní modrou fluorescencí v oblasti buněčného jádra. Taktéž byl zachycen snímek, na kterém lze pozorovat fluorescenci v buňkách s N-GQDs po 24h inkubaci a DAPI (příloha č. 6). V rámci buněčné linie NIH/3T3 bylo pozorovatelné intenzivní emisní záření, avšak na úkor vysoké koncentrace nanočástic došlo u těchto buněk k narušení integrity a nanočástice tedy pronikaly přes membránu mnohem snadněji. U buněčné linie HeLa nebyla pozorována téměř žádná fluorescence u buněk označených grafenovými tečkami, tudíž tyto snímky nebyly mezi výsledky zařazeny.



Příloha č. 6: NIH/3T3 označené N-GQDs a barvivem DAPI v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem. Měřítko je 20 μm .

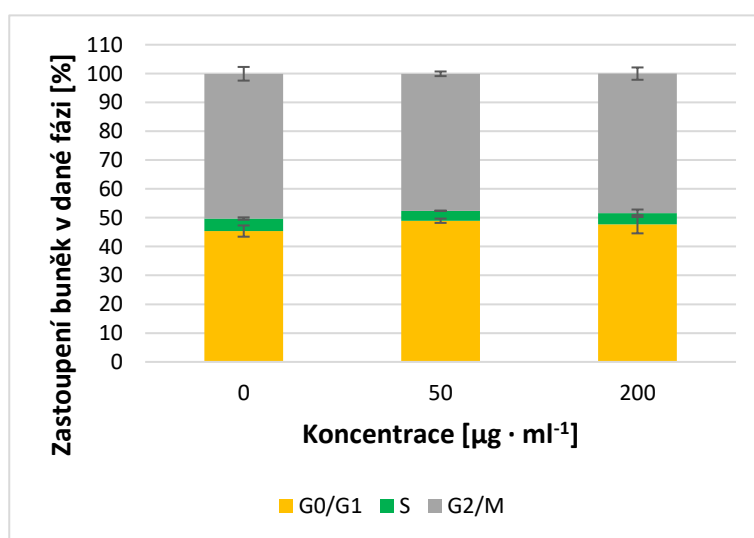
U NIH/3T3 buněk označených grafenovými tečkami byla nejvyšší míra fluorescence pozorována u těch inkubovaných s N-GQDs-Mn²⁺ (příloha č. 2). Kontrolní snímek (příloha č. 4) dle očekávání nevykazoval žádnou fluorescenční aktivitu. Buňky inkubované s N-GQDs (příloha č. 1) a N-GQDs-Mn²⁺ (příloha č. 2) po dobu 48 hodin vyzařovaly fluorescenci také v buněčném jádře pravděpodobně díky jejich výskytu v apoptotickém stádiu, kdežto u buněk s N-GQDs-Cu²⁺ (příloha č. 3) došlo k nashromáždění fluorescence při vnějším ohraničení buněčného jádra v cytoplazmě, přičemž fluorescence zde není příliš silná.

Na snímku (příloha č. 5), kde jsou buňky obarveny fluoroforem DAPI dochází k vyzáření intenzivní modré fluorescence v oblasti buněčného jádra dle očekávání. Poslední snímek zachycuje buňky značené N-GQDs a zároveň DAPI (příloha č. 6), zde lze pozorovat, že N-GQDs jsou distribuovány především okolo buněčného jádra ale povětšinou v jeho bezprostřední blízkosti, kdežto DAPI je asociováno především s DNA v buněčném jádře.

5.4 Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

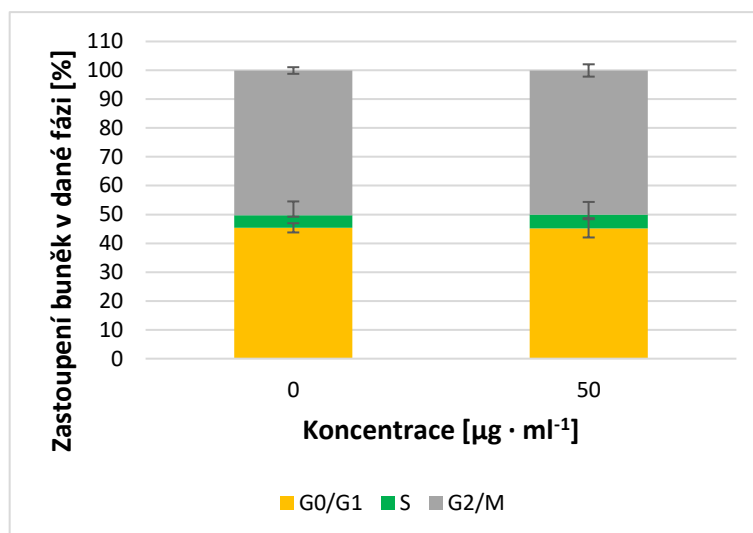
Za účelem vyhodnocení vlivu grafenových kvantových teček na buněčný cyklus byla využita průtoková cytometrie. Průtoková cytometrie je analytickou metodou umožňující proměrování jednotlivých buněk a díky tomu také určení fází buněčného cyklu. Vliv N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ na buněčný cyklus, za použití koncentrací 50, 200 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, byl pozorován u linií NIH/3T3 (viz grafy č. 6, 7 a 8) a HeLa (viz grafy č. 9, 10 a 11), přičemž vzorky působily na buňky po dobu 24 hodin. Data získaná u buněčné linie NIH/3T3 při nejvyšší koncentraci 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nemohla být zahrnuta, vzhledem k technickým komplikacím v průběhu jejich získávání, u buněk ošetřených N-GQDs-Mn²⁺ nebyla ze stejného důvodu zahrnuta ani data z měření při koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Graf č. 6 znázorňuje výsledky působení N-GQDs na buněčnou linii NIH/3T3. Bylo naměřeno minimální zastoupení buněk v S fázi, jak v případě označených buněk, tak u buněk kontrolních. Největší počet buněk byl pozorován ve fázích G0/G1 a G2/M. Není pozorován žádný výrazný trend zvyšování množství buněk ve fázích při rostoucí koncentraci.



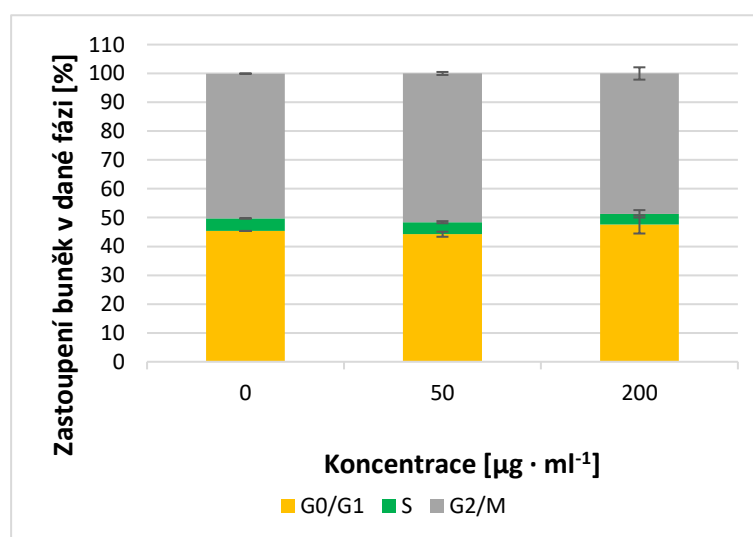
Graf č. 6: Výsledky měření vlivu N-GQDs na buněčný cyklus linie NIH/3T3 po inkubaci 24 h při koncentracích 50 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

V grafu č. 7, který vyobrazuje výsledky působení N-GQDs-Mn²⁺ na buňky linie NIH/3T3 při koncentraci 50 µg·ml⁻¹, lze oproti kontrole zaznamenat nepatrné navýšení počtu buněk v S fázi na úkor buněk v G0/G1 fázi, avšak v rámci odchylek se nejednalo o významný rozdíl. Buňky označené nanočásticemi nevykazují oproti kontrolním buňkám žádné výraznější změny v buněčném cyklu.

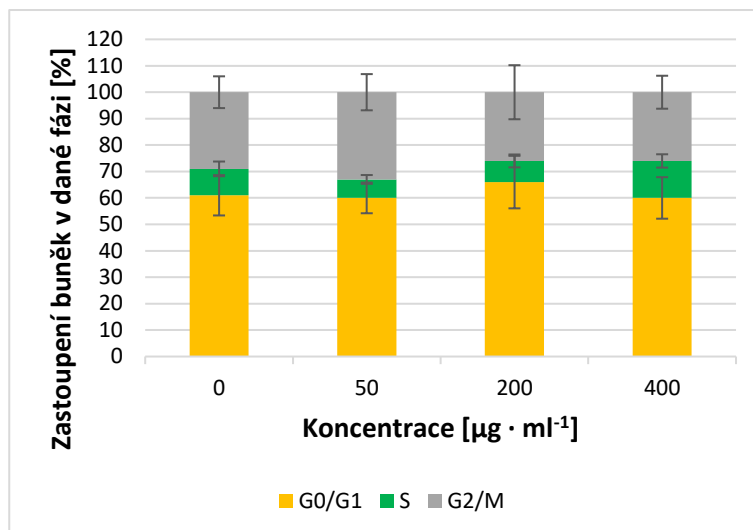


Graf č. 7: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Mn²⁺ na buněčný cyklus linie NIH/3T3 po inkubaci 24 h při koncentraci 50 µg·ml⁻¹.

Graf č. 8 znázorňuje výsledky měření vlivu N-GQDs-Cu²⁺ v koncentracích 50 a 200 µg·ml⁻¹ na buňky linie NIH/3T3. Oproti kontrole nebyly naměřeny u buněk označených vzorky výrazné rozdíly v jednotlivých fázích.



Graf č. 8: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Cu²⁺ na buněčný cyklus linie NIH/3T3 po inkubaci 24 h při koncentracích 50 a 200 µg·ml⁻¹.

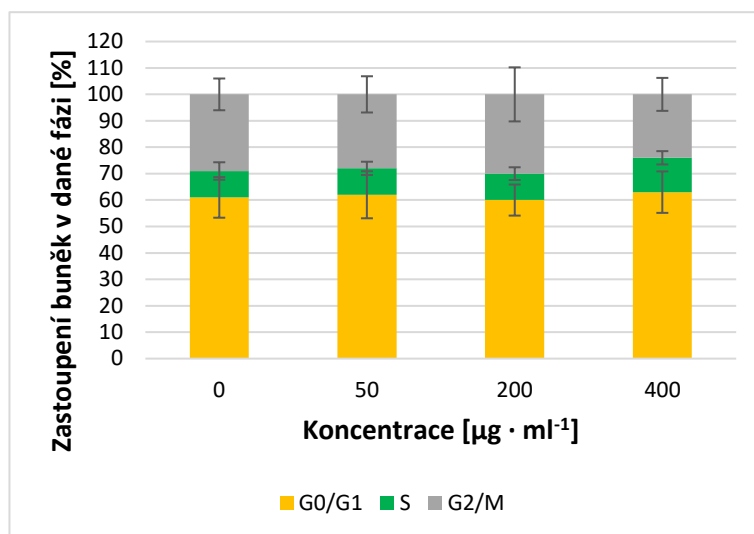


Graf č. 9: Výsledky měření vlivu N-GQDs na buněčný cyklus linie HeLa po inkubaci 24 h při koncentracích 50, 200 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

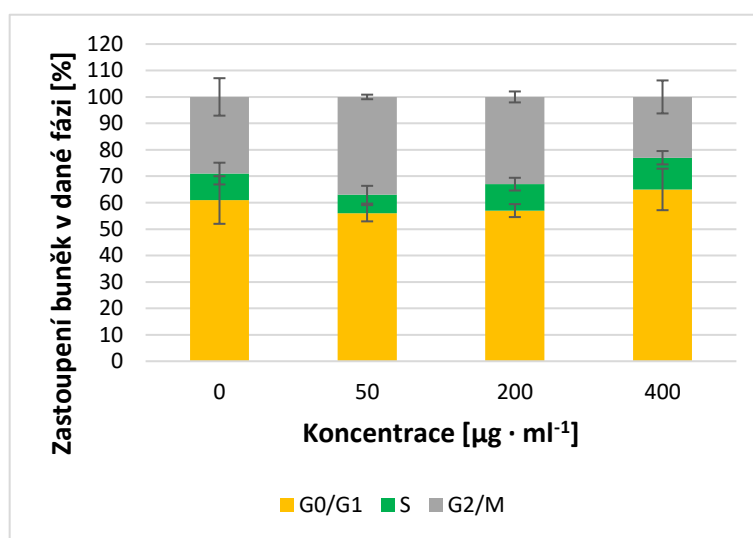
Graf č. 9 znázorňuje výsledky měření vlivu N-GQDs působících na buněčnou linii HeLa. U všech aplikovaných koncentrací lze pozorovat nejvyšší zastoupení buněk ve fázi G0/G1 (okolo 60 % buněk). Přičemž nejnižší podíly buněk v této fázi byly u aplikovaných koncentrací 50 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a naopak nejvyšší při koncentraci 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Podíl buněk ve fázi G2/M se pohyboval okolo 20 až 30 %, přičemž nejmenší množství buněk v této fázi bylo naměřeno při koncentracích 200 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, naopak největší u koncentrace 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Buňky v S fázi tvoří nejmenší podíl zkoumaných buněk (cca 10 %), nejnižší počet buněk v této fázi byl zaznamenán u koncentrace 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a nejvyšší při 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. S rostoucí koncentrací vzorku byl naměřen nárůst v podílu buněk u S fáze, v rámci ostatních fází tento trend nebyl pozorován, jev by mohl být zapříčiněn replikací DNA u většího množství buněk. fázi tento trend nebyl pozorován, jev by mohl být zapříčiněn replikací DNA u většího množství buněk.

Podobně jako v grafu č. 9 i u grafu č. 10 lze pozorovat nejvyšší procentuální zastoupení HeLa buněk ve fázi G0/G1. Naopak nejnižší podíl buněk byl zachycen v S fázi. Výsledné hodnoty jsou velice podobné mezi koncentracemi 50 a 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Nejméně buněk v G2/M fázi bylo naměřeno při koncentraci 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Jediný pozorovatelný trend lze zaznamenat u buněk v S fázi, kde se jejich počet zvyšuje s rostoucí koncentrací, což by mohlo naznačovat postupné snižování buněčné proliferace (Sun *et al.*, 2015).

S výjimkou buněk v S fázi u nejvyšší koncentrace nelze pozorovat výraznější rozdíly oproti kontrole.



Graf č. 10: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Mn²⁺ na buněčný cyklus linie HeLa po inkubaci 24 h při koncentracích 50, 200 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.



Graf č. 11: Výsledky měření vlivu N-GQDs-Cu²⁺ na buněčný cyklus linie HeLa po inkubaci 24 h při koncentracích 50, 200 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

V grafu č. 11 byly zachyceny výsledky analýzy vlivu N-GQDs-Cu²⁺ na buněčnou linii HeLa. S rostoucí koncentrací lze pozorovat mírnější nárůst zastoupení buněk v G0/G1 fázi, tento jev by mohl znamenat zadržení buněk v této fázi a potenciální nastupující apoptózu nebo zdržení díky checkpointu G1/S, který kontroluje velikost a výživu buňky (Wenzel *et* Singh, 2018). Zároveň dochází k plynulému výraznému nárůstu množství buněk

v S fázi, což by mohlo naznačovat potlačení buněčné proliferace s rostoucí koncentrací (Sun *et al.*, 2015). Naopak došlo k poklesu v početnosti buněk ve fázi G2/M. V případě buněk značených N-GQDs-Cu²⁺ tedy má koncentrace pravděpodobně výraznější vliv na buněčný cyklus.

6 Diskuse

V experimentální části bylo studováno, jaký vliv mají klasické grafenové tečky (N-GQDs) a grafenové tečky s navázanými single atoms (N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺) na některé buněčné funkce (viabilita, produkce ROS, buněčný cyklus) a byla měřena jejich distribuce a fluorescence v buněčných liniích NIH/3T3 a HeLa. Grafenové kvantové tečky jsou vzhledem ke svému uhlíkovému původu a mimo jiné také skvělé rozpustnosti ve vodě považovány za vysoce biologicky kompatibilní. (Hadad *et al.*, 2020; Henna *et al.*, 2020; Biswas *et al.*, 2021).

Zároveň byly porovnány rozdíly v působení jednotlivých nanočástic mezi sebou. Dle vědecké skupiny Luthen *et al.*, 2007, mohou Mn²⁺ ionty v některých případech navozovat změny buněčné proliferace v důsledku možné inhibice fosforylace signálních proteinů. Skupina Suwalsky *et al.*, 1998, uvedla, že Cu²⁺ ionty mají v některých případech schopnost způsobit odchylky v permeabilitě membrán nebo vodivostní změny iontových přenašečů.

Testy viability prokázaly, že u obou buněčných linií byla výsledná viabilita při využití všech koncentrací N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ vyšší než 90 %, což dle očekávání poukazuje na vysokou biokompatibilitu grafenových teček s buněčnými liniemi, a tudíž jejich nízkou cytotoxicitu. V případě buněk NIH/3T3 se nejvyšší viabilitou po inkubaci vyznačovaly buňky inkubované s čistými N-GQDs při všech koncentracích. U N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ došlo oproti N-GQDs k mírnému poklesu. Jednotlivé vzorky grafenových teček působících na linii HeLa měly přibližně vyrovnané vlivy na viabilitu. Obecně lze říct, že při nejvyšší koncentraci (400 µg·ml⁻¹) dochází k poklesu buněčné viability a lze očekávat, že by při dalším navyšování dávky nastal ještě větší pokles. Výsledky dále naznačují skutečnost, že Mn²⁺ a Cu²⁺ ionty navázané na částicích nemají výraznější vliv na buněčnou viabilitu.

Feng *et al.*, 2020, aplikovali FA-N-GQDs na nádorové buňky MCF-7 (buňky lidské rakoviny prsu), tyto grafenové tečky působily na buňky po dobu 24 h. Vyhodnocení viability bylo provedeno testem CCK-8, přičemž výsledné hodnoty klesly pod hodnotu 90 %, avšak stále se jedná o nadstandardní výstup. Rozdíl ve vlastních hodnotách viabilit a těch získaných z publikace, tzn. pokles pod 90 %, mohl být zapříčiněn např. funkcionalizací teček kyselinou listovou.

Výsledky této práce ukazují, že i za téměř neovlivněnou viabilitou může být schovaný značný oxidační stres, se kterým se buňky musí vyrovnat. Ten může být vyvolán intracelulární distribucí nanomateriálu nebo případně přímo reakcí s některými organelami (Dayem *et al.*, 2017). V obou případech byl zaznamenán při postupném zvyšování koncentrací nanočástic nárůst v buněčné produkci ROS, přičemž nejvyšší eskalace nastala v případě buněk označených N-GQDs-Mn²⁺. U linie NIH/3T3 byla nejméně intenzivní tvorba ROS zaznamenána u buněk ošetřených N-GQDs-Cu²⁺, kdežto v případě linie HeLa byla produkce u buněk inkubovaných s N-GQDs a N-GQDs-Cu²⁺ velice vyrovnaná. Zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku u buněk inkubovaných s N-GQDs-Mn²⁺ odpovídá poznatku v publikaci skupiny Bonke *et al.*, 2015, která uvádí, že Mn²⁺ ionty mají potenciál indukovat produkci H₂O₂ v mitochondriích.

Další možností podmínění produkce ROS může být rozdílný povrchový náboj nanomateriálů. U N-GQDs byl naměřen zeta potenciál 0,7 mV, přičemž tento typ nanočástic vyvolával u linie NIH/3T3 nejnižší produkci ROS, u nádorové linie HeLa byla výsledná produkce velice vyrovnaná s výsledky u buněk značených N-GQDs-Cu²⁺. N-GQDs-Cu²⁺ měly povrchový náboj -16,1 mV, jedná se tedy o hodnotu nižší než v případě N-GQDs-Mn²⁺ (-5,5 mV), které vyvolávaly nejintenzivnější oxidační stres. V případě, že by platilo pravidlo čím nižší povrchový náboj částice, tím intenzivnější oxidační stres, musely by ve výsledku buňky značené N-GQDs-Cu²⁺ produkovat nejvíce ROS, což rozporuje výstup z měření. Goodman *et al.*, 2004, uvedli, že v důsledku negativního náboje cytoplazmatické membrány, budou nanočástice se záporným povrchovým nábojem při kontaktu membrány více inertní než nanočástice s nábojem kladným. U NPs s kladným povrchovým nábojem je tudíž větší pravděpodobnost porušení membrány a vyvolání buněčného stresu. V provedeném experimentu tedy povrchový náboj podle všeho není hlavní příčinou navýšení produkce kyslíkových radikálů.

Vzhledem k fluorescenčním schopnostem těchto grafenových kvantových teček byla pozorována jejich emise a zároveň distribuce těchto nanočástic v buňkách, které s nimi byly inkubovány. Tato vizualizace proběhla při excitační vlnové délce 445 nm za účelem získání co nejkvalitnějších výsledků. Buněčná linie HeLa při vizualizaci nevykazovala téměř žádnou fotoluminiscenci, i přesto, že inkubace probíhala po dobu 48 h při koncentraci 400 µg·ml⁻¹. Z tohoto důvodu nebyly snímky této buněčné linie zahrnuty ve výsledcích. U NIH/3T3 buněk byla zaznamenána podstatně výraznější fotoluminiscence, avšak u buněk inkubovaných

s N-GQDs (příloha č. 1) a N-GQDs-Mn²⁺ (příloha č. 2) byly tečky pozorovány i uvnitř buněčného jádra, jelikož po 48h inkubaci mohla být integrita buněčného jádra narušena a vést k buněčné smrti. K získání optimální fluorescence by bylo potřeba inkubovat buňky s tečkami po delší dobu, avšak delší vystavení buněk tečkám může působit proti buněčné viabilitě. Buňky inkubované s N-GQDs-Cu²⁺ (příloha č. 3) vyzařovaly velice slabou fluorescenci, ale je patrné, že proběhla agregace těchto nanočástic výhradně v cytoplazmě při vnější části buněčného jádra. Podobný výsledek přinesl snímek buněk inkubovaných s N-GQDs a zároveň barvených DAPI (příloha č. 6), kdy lze pozorovat jasně modrou fotoluminiscenci v buněčném jádře způsobenou DAPI a agregaci grafenových teček v cytosolu okolo buněčného jádra.

Podobné výsledky získali také Su *et al.*, 2020, kteří pozorovali metodou CLSM modrou fluorescenci N-GQDs vybuzenou excitačním zářením o vlnové délce 405 nm u HeLa buněk inkubovaných s nanočásticemi po dobu 24 hodin. Sledovali shromáždění N-GQDs především v cytosolu okolo buněčného jádra a účinnou internalizaci teček do nitra buněk díky jejich nanometrickým rozměrům.

V rámci testů cytotoxicity bylo rovněž provedeno měření za účelem studia vlivu vybraných grafenových teček na buněčný cyklus linií NIH/3T3 a HeLa. Pozorovány byly účinky N-GQDs, N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ při koncentracích 50, 200 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 24h inkubaci. Data získaná u buněk NIH/3T3 označených nanočásticemi ve vysokých koncentracích (400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, u N-GQDs-Mn²⁺ také 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nemohla být vzhledem k technickým komplikacím při měření uvedena. V případě potenciálního využití těchto nanočástic v protinádorové léčbě, by nebylo vhodné aplikovat grafenové tečky značené Mn²⁺ iontem, jelikož ze všech aplikovaných NPs podněcovaly největší změny v buněčném cyklu zdravých buněk. U buněčné linie NIH/3T3 bylo naměřeno nejvyšší zastoupení buněk ve fázích G0/G1 a G2/M, při aplikaci N-GQDs byla tato množství velice vyrovnaná. V případě N-GQDs-Mn²⁺ a N-GQDs-Cu²⁺ byl mírně větší podíl sledován u fáze G2/M, což by mohlo znamenat, že single atoms na povrchu teček podporují dělení zdravých buněk. U žádného použitého nanomateriálu nebyl se zvyšující se koncentrací zjištěn výraznější postupný nárůst počtu buněk ve fázích, rozdíly v použitých koncentracích tedy pravděpodobně nemají v tomto případě příliš velký vliv.

U nádorové linie HeLa lze pozorovat odlišné výsledky měření, jelikož ve všech případech bylo na rozdíl od NIH/3T3 největší zastoupení buněk v G0/G1 fázi (60 až 70 %), buňky v G2/M fázi tvořily 20 až 40 % a buňky v S fázi tvořily nejmenší podíl (5 až 10 %), přičemž podíl buněk v této fázi je větší než u NIH/3T3. Vysoké zastoupení buněk v G0/G1 fázi

naznačuje, že většina buněk neprochází až do S fáze, což může mít za následek potenciální navození apoptózy (Liu *et al.*, 2020). U buněk značených N-GQDs-Cu²⁺ lze vidět plynulý nárůst buněk v G0/G1 a S fázi a zároveň pokles ve fázi G2/M. Při nejvyšší koncentraci je podíl buněk v G0/G1 fázi téměř 70 %, taktéž zde došlo k mírnému vzrůstu oproti kontrole. V případě buněk označených N-GQDs-Cu²⁺ by tedy při rostoucí koncentraci mohla být zastavena schopnost se dělit, a tudíž by došlo k navození buněčné smrti, což by v případě nádorové linie mohlo být výhodné. Publikace skupiny Thit *et al.*, 2012, uvádí, že Cu²⁺ ionty dokážou významně indukovat apoptózu buněk. U ostatních nanočástic nebyl tento postupný nárůst zachycen. Výraznější zastoupení HeLa buněk v G0/G1 a S fázi oproti NIH/3T3 může souviset s nádorovým charakterem linie HeLa. V rámci protinádorové léčby, by bylo nejvýhodnější z použitých nanočástic aplikovat grafenové tečky značené Cu²⁺, jelikož mají největší potenciál vyvolávat buněčnou smrt.

Skupina Li *et al.*, 2018, provedla měření vlivu OH-GQDs na buněčnou linii HET-1A při koncentracích 25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při 24h a 48h inkubaci. S rostoucí koncentrací došlo po 24h inkubaci s grafenovými tečkami k postupnému zvyšování podílu buněk v G0/G1 fázi, kdy se při koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hodnota oproti kontrole (60 %) pohybovala okolo 80 %. Naopak v S fázi došlo v porovnání s kontrolou (okolo 25 %) k výraznému snížení počtu (při 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v S fázi až 10 %), počet buněk v G2/M fázi zůstal srovnatelný s hodnotami kontroly (5–10 %). Po 48h byl zaznamenán stejný trend, avšak s výraznějšími změnami, kdy finální zastoupení při nejvyšší koncentraci v G0/G1 fázi činilo přibližně 90 %, v S fázi okolo 5 % a zbývající buňky byly v G2/M fázi. Oproti vlastním získaným výsledkům měření na NIH/3T3 a HeLa buňkách zde bylo výrazně větší množství buněk zastoupeno v G0/G1 fázi, a to již při nízkých koncentracích. Tento jev byl pravděpodobně vyvolán hydroxylovou funkční skupinou, kterou byl povrch grafenových teček modifikován.

7 Závěr

V rámci teoretické části této bakalářské práce byla nastíněna problematika uhlíkových nanomateriálů se zaměřením na grafenové kvantové tečky. Byly popsány charakteristiky těchto nanočástic, především jejich syntéza, fyzikální vlastnosti, biokompatibilita s živými systémy a využití pro bioaplikace.

Předmětem experimentální části této práce bylo testování vlivu grafenových kvantových teček na různé funkce zdravých i nádorových buněk. Bylo tedy zjištěno, že grafenové tečky nemají u zdravých ani nádorových buněk významný cytotoxický vliv a jejich viabilita se po inkubaci s nanočásticemi příliš nemění. Při měření produkce ROS, nastal nejvyšší nárůst ve tvorbě reaktivních radikálů u buněk značených N-GQDs-Mn²⁺. Grafenové tečky se v této práci neprojevily jako ideální pro vizualizaci při nízkých koncentracích. Při vysokých koncentracích působících po delší dobu je zobrazení efektivnější, avšak může dojít k souběžnému narušení buněčných struktur. Zároveň byla u buněk pozorována distribuce nanočástic v cytoplazmě okolo jádra. Výsledky průtokové cytometrie odhalily, že N-GQDs-Mn²⁺ jsou nežádoucí pro aplikaci při protinádorové léčbě, jelikož významně narušují buněčný cyklus zdravých buněk. N-GQDs-Cu²⁺ byly vyhodnoceny jako nejvhodnější pro účely protirakovinné léčby, jelikož mají potenciál snižovat buněčnou proliferaci.

8 Literatura

- Abdal Dayem A., Hossain M. K., Lee S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y. Cho, S. G. (2017): The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 120.
- Abou El-Nour K. M. M., Eftaiha A., Al-Warthan A., Ammar R. A. A. (2010): Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* 3: 135–140.
- Aguilar Z. P., Aguilar Y., Xu H., Jones B., Dixon J., Xu H., Wang Y. A. (2010): Nanomaterials in medicine. *ECS Transactions* 33: 69–74.
- Alaghmandfard A., Sedighi O., Rezaei N. T., Abedini A. A., Khachatourian A. M., Toprak M. S., Seifalian A. (2021): Recent advances in the modification of carbon-based quantum dots for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* 120: 111756.
- Benitez-Martinez S., Valcarcel M. (2015): Graphene quantum dots in analytical science. *Trends in Analytical Chemistry* 72: 93–113.
- Biswas M. C., Islam M. T., Nandy P. K., Hossain M. M. (2021): Graphene quantum dots (GQDs) for bioimaging and drug delivery applications: A review. *ACS Materials Letters* 3: 889–911.
- Bonke E., Zwicker K., Drose S. (2015): Manganese ions induce H₂O₂ generation at the ubiquinone site of mitochondrial complex II. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 580: 75–83.
- Byun J. (2015): Emerging frontiers of graphene in biomedicine. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 145–151.
- Choppadandi M., Guduru A. T., Gondaliya P., Arya N., Kalia K., Kumar H., Kapusetti G. (2021): Structural features regulated photoluminescence intensity and cell internalization of carbon and graphene quantum dots for bioimaging. *Materials Science and Engineering: C* 129: 112366.
- Chung S., Revia R. A., Zhang M. (2021): Graphene quantum dots and their applications in bioimaging, biosensing, and therapy. *Advanced Materials* 33: e1904362.

- Cui L., Ren X., Sun M., Liu H., Xia L. (2021): Carbon dots: synthesis, properties and applications. *Nanomaterials* 11: 3419.
- Datta K. K. R., Kozak O., Ranc V., Havrdova M., Bourlinos A. B., Safarova K., Hola K., Tomankova K., Zoppellaro G., Otyepka M., Zbořil R. (2014): Quaternized carbon dot-modified graphene oxide for selective cell labelling – controlled nucleus and cytoplasm imaging. *Chemical Communications* 50: 10782–10785.
- Diez-Pascual A. M. (2021): Carbon-based nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 7726.
- Elliott A. D. (2020): Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry* 92: e68.
- Feng S., Pan J., Li C., Zheng Y. (2020): Folic acid-conjugated nitrogen-doped graphene quantum dots as a fluorescent diagnostic material for MCF-7 cells. *Nanotechnology* 31: 135701.
- Ge G., Li L., Wang D., Chen M., Zeng Z., Xiong W., Wu X., Guo C. (2021): Carbon dots: Synthesis, properties and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B* 9: 6553–6575.
- Ghaffarkhah A., Hosseini E., Kamkar M., Sehat A. A., Dordanihaghighi S., Allahbakhsh A., Kuur C., Arjmand M. (2022): Synthesis, applications, and prospects of graphene quantum dots: A comprehensive review. *Small* 18: e2102683.
- Ghosh D., Sarkar K., Devi P., Kim K., Kumar P. (2021): Current and future perspectives of carbon and graphene quantum dots: From synthesis to strategy for building optoelectronic and energy devices. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 135: 110391.
- Goodman C. M., McCusker C. D., Yilmaz T., Rotello V. M. (2004): Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry* 15: 897–900.
- Gulzar A., Yang P., He F., Xu J., Yang D., Xu L., Jan M. O. (2016): Bioapplications of graphene constructed functional nanomaterials. *Chemico-Biological Interactions* 262: 69–89.

- Hadad C., Gonzalez-Dominguez J. M., Armelloni S., Mattinzoli D., Ikehata M., Istif A., Ostric A., Cellesi F., Alfieri C. M., Messa P., Ballesteros B., Da Ros T. (2020): Graphene quantum dots: From efficient preparation to safe renal excretion. *Nano Research* 14: 674–683.
- Han X., Li S. H., Peng Z. L., Al-Yuobi A. R. O., Bashammakh A. S. O., El-Shahawi M. S., Leblanc R. M. (2016): Interactions between carbon nanomaterials and biomolecules. *Journal of Oleo Science* 65: 1–7.
- Havrdova M., Hola K., Skopalik J., Tomankova K., Petr M., Cepe K., Polakova K., Tucek J., Bourlinos A. B., Zboril R. (2016): Toxicity of carbon dots – Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon* 99: 238–248.
- Havrdova M., Urbancic I., Tomankova K. B., Malina L., Strancar J., Bourlinos A. B. (2021): Self-targeting of carbon dots into the cell nucleus: Diverse mechanisms of toxicity in NIH/3T3 and L929 cells. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 5608.
- Henna T. K., Pramod K. (2020): Graphene quantum dots redefine nanobiomedicine. *Materials Science and Engineering* 110: 110651.
- Iannazzo D., Pistone A., Salamo M., Galvagno S., Romeo R., Giofre S. V., Branca C, Visalli G., Di Pietro A. (2017): Graphene quantum dots for cancer targeted drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 518: 185–192.
- Jarozeski M. J., Radcliff G. (1999): Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology* 11: 37–53.
- Jiang D., Chen Y., Li N., Li W., Wang Z., Zhu J., Zhang H., Liu B., Xu S. (2015): Synthesis of luminescent graphene quantum dots with high quantum yield and their toxicity study. *PLOS One* 10: e0144906.
- Kansara V., Shukla R., Flora S. J. S., Bahadur P., Tiwari S. (2022): Graphene quantum dots: Synthesis, optical properties and navigational applications against cancer. *Materials Today Communications* 31: 103359.
- Karmakar S., Das T. K., Kundu S., Maiti S., Saha A. (2021): Recent advances in synthesis and biological applications of graphene quantum dots. *Journal of the Indian Chemical Society* 98: 100069.

- Kelarakis A. (2015): Graphene quantum dots: In the crossroad of graphene, quantum dots and carbogenic nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 20: 354–361.
- Kortel M., Mansuriya B. D., Vargas S. N., Altintas Z. (2020): Graphene quantum dots as flourishing nanomaterials for bio-imaging, therapy development, and micro-supercapacitors. *Micromachines* 11: 866.
- Kumawat, M.K., Thakur, M., Gurung, R.B., Srivastava R. (2017): Graphene quantum dots for cell proliferation, nucleus imaging, and photoluminescent sensing applications. *Scientific Reports* 7: 15858.
- Lewinski N., Colvin V., Drezek R. (2008): Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4: 26-49.
- Li M., Gu M., Tian. X., Xiao. B., Lu S., Zhu W., Yu L., Shang Z. (2018): Hydroxylated graphene quantum dots induce DNA damage and disrupt mikrotubule structure in human esophageal epithelial cells. *Toxicological Sciences* 164: 339–352.
- Lin J., Chen X., Huang P. (2016): Graphene-based nanomaterials for bioimaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 105: 242–254.
- Liu H., Li Z., Huo S., Wei Q., Ge L. (2020): Induction of G0/G1 phase arrest and apoptosis by CRISPR/Cas9-mediated knockout of CDK2 in A375 melanocytes. *Molecular and Clinical Oncology* 12: 9–14.
- Ma W. L., Li S. S. (2012): Electric-field-induced spin depolarization in graphene quantum dots. *Physical Review B* 86: 045449.
- Mansuriya B. D., Altintas Z. (2020): Applications of graphene quantum dots in biomedical sensors. *Sensors* 20: 1072.
- Molaei M. J. (2019): A review on nanostructured carbon quantum dots and their applications in biotechnology, sensors, and chemiluminescence. *Talanta* 196: 456–478.
- Nurunnabi M., Khatun Z., Huh K. M., Park S. Y., Lee D. Y., Cho K. J., Lee Y. K. (2013): *In vivo* biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. *ACS Nano* 7: 6858–6867.

- Panacek D., Zdrzil L., Langer M., Sedajova V., Badura Z., Zoppellaro G., Yang Q., Nguyen E. P., Alvarez-Diduk R., Hruby V., Kolarik J., Chalmpes N., Bourlinos A. B., Zboril R., Merkoçi A., Bakandritsos A., Otyepka M. (2022): Graphene Nanobeacons with High-Affinity Pockets for Combined, Selective, and Effective Decontamination and Reagentless Detection of Heavy Metals. *Small* 18: 2201003.
- Perini G., Palmieri V., Ciasca G., De Spirito M., Papi M. (2020): Unravelling the potential of graphene quantum dots in biomedicine and neuroscience. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 3712.
- Pierrat P., Gaumet J. (2020): Graphene quantum dots: Emerging organic materials with remarkable and tunable luminescence features. *Tetrahedron Letters* 61: 152554.
- Rajender G., Goswami U., Giri P. K. (2019): Solvent dependent synthesis of edge-controlled graphene quantum dots with high photoluminescence quantum yield and their application in confocal imaging of cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science* 541: 387–398.
- Ruan J., Wang Y., Li F., Jia R., Zhou G., Shao C., Zhu L., Cui M., Yang D. P., Ge S. (2018): Graphene quantum dots for radiotherapy. *ACS Applied Materials and Interfaces* 10: 14342–14355.
- Schafer K. A. (1998): The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology* 35: 461–478.
- Shareena T. P. D., McShan D., Dasmahapatra A. K., Tchounwou P. B. (2018): A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health. *Nano-Micro Letters* 10: 53.
- Shen J. L., Chen W. F., Yang Z. H., Lv G., Cao J., Li D. Y., Liu X. (2021): A critical review of graphene quantum dots: Synthesis and application in biosensors. *Nano* 16: 2130001.
- Sheng W. D., Korkusinski M., Güçlü A. D., Zielinski M., Potasz P., Kadantsev E. S., Voznyy O., Hawrylak P. (2012): Electronic and optical properties of semiconductor and graphene quantum dots. *Frontiers of Physics* 7: 328–352.
- Singh I., Arora R., Dhiman H., Pahwa R. (2018): Carbon quantum dots: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences* 15: 219–230.

- Sladowski D., Steer S. J., Clothier R. H., Balls M. (1993): An improved MTT assay. *Journal of Immunological Methods* 157: 203–207.
- Su J., Zhang X., Tong X., Wang X., Yang P., Yao F., Guo R., Yuan C. (2020): Preparation of graphene quantum dots with high quantum yield by a facile one-step method and applications for cell imaging. *Materials Letters* 271: 127806.
- Sun Y., Tang S., Xiao X. (2015): The effect of GADD45a on furazolidone-induced S-phase cell-cycle arrest in human hepatoma G2 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 29: 489–495.
- Tajik S., Dourandish Z., Zhang K., Beitollahi H., Le Q. V., Jang H. W., Shokouhimehr M. (2020): Carbon and graphene quantum dots: a review on syntheses, characterization, biological and sensing applications for neurotransmitter determination. *RSC Advances* 10: 15406.
- Tehrani A. A., Omranpoor M. M., Vatanara A., Seyedabadi M., Ramezani V. (2019): Formation of nanosuspensions in bottom-up approach: theories and optimization. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 27: 451–473.
- Testa M. P., Alvarado O., Wournell A., Lee J., Guilford F. T., Henriksen S. H., Phillips T. R. (2011): Screening assay for oxidative stress in a feline astrocyte cell line, G355-5. *Journal of Visualized Experiments* 53: e2841.
- Thit A., Selck H., Bjerregaard H. (2012): Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6): effects on proliferation, cell cycle progression and cell death. *Toxicology In Vitro* 27: 1596–1601.
- Vrtacnik P., Kos S., Bustin S. A., Marc J., Ostanek B. (2014): Influence of trypsinization and alternative procedures for cell preparation before RNA extraction on RNA integrity. *Analytical Biochemistry* 463: 38–44.
- Walther B. K., Dinu C. Z., Guldi D. M., Sergeev V. G., Creager S. E., Cooke J. P., Guiseppi-Elie A. (2020): Nanobiosensing with graphene and carbon quantum dots: Recent advances. *Materials Today* 39: 23–46.
- Wang C., Wu C., Zhou X., Han T., Xin X., Wu J., Zhang J., Guo S. (2013): Enhancing cell nucleus accumulation and DNA cleavage activity of anti-cancer drug via graphene quantum dots. *Scientific Reports* 3: 2852.

- Wang D., Chen J. F., Dai L. (2014): Recent advances in graphene quantum dots for fluorescence bioimaging from cells through tissues to animals. *Particle and Particle Systems Characterization* 32: 515–523.
- Wang Z., Hu T., Liang R., Wei M. (2020): Application of zero-dimensional nanomaterials in biosensing. *Frontiers in Chemistry* 8: 320.
- Wenzel E. S., Singh A. T. K. (2018): Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo* 32: 1–5.
- Wu C., Wang C., Han T., Zhou X., Guo S., Zhang J. (2013): Insight into the cellular internalization and cytotoxicity of graphene quantum dots. *Advanced Healthcare Materials* 2: 1613–1619.
- Wu D., Yotnda P. (2011): Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. *Journal of Visualized Experiments* 57: e3357.
- Xia M., Xie Y., Yu C., Chen G., Li Y., Zhang T., Peng Q. (2019): Graphene-based nanomaterials: the promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications. *Journal of Controlled Release* 307: 16–31.
- Yang G., Li L., Lee W. B., Ng M. C. (2018): Structure of graphene and its disorders: a review. *Science and Technology of Advanced Materials* 19: 613–648.
- Yao C., Tu Y., Ding L., Li C., Wang J., Fang H., Huang Y., Zhang K., Lu Q., Wu M., Wang Y. (2017): Tumor-cell specific nuclear targeting of functionalized graphene quantum dots *in vivo*. *Bioconjugate Chemistry* 28: 2608–2619.
- Yuan D., Wang P., Yang L., Quimby J. L., Sun Y. P. (2022): Carbon “quantum” dots for bioapplications. *Experimental Biology and Medicine* 247: 300–309.
- Zdrojewicz Z., Waracki M., Bugaj B., Pypno D., Cabała K. (2015): Medical applications of nanotechnology. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 69: 1196–1204.
- Zhao M., Zhang N., Yang R., Chen D., Zhao Y. (2021): Which is better for nanomedicine: Nanocatalysts or single-atom catalysts? *Advanced Healthcare Materials* 10: 2001897.

- Zhao C., Song X., Liu Y., Fu Y., Ye L., Wang N., Wang F., Li L., Mohammadniaei M., Zhang M., Zhang Q., Liu J. (2020): Synthesis of graphene quantum dots and their applications in drug delivery. *Journal of Nanobiotechnology* 18: 142.
- Zheng X. T., Ananthanarayanan A., Luo K. Q., Chen P. (2014): Glowing graphene quantum dots and carbon dots: Properties, syntheses, and biological applications. *Small* 11: 1620–1636.
- Zhu S., Song Y., Wang J., Wan H., Zhang Y., Ning Y., Yang B. (2017): Photoluminescence mechanism in graphene quantum dots: Quantum confinement effect and surface/edge state. *Nano Today* 13: 10–1.

9 Přílohy

9.1 Seznam příloh

Příloha č. 1: NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci s N-GQDs při koncentraci $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

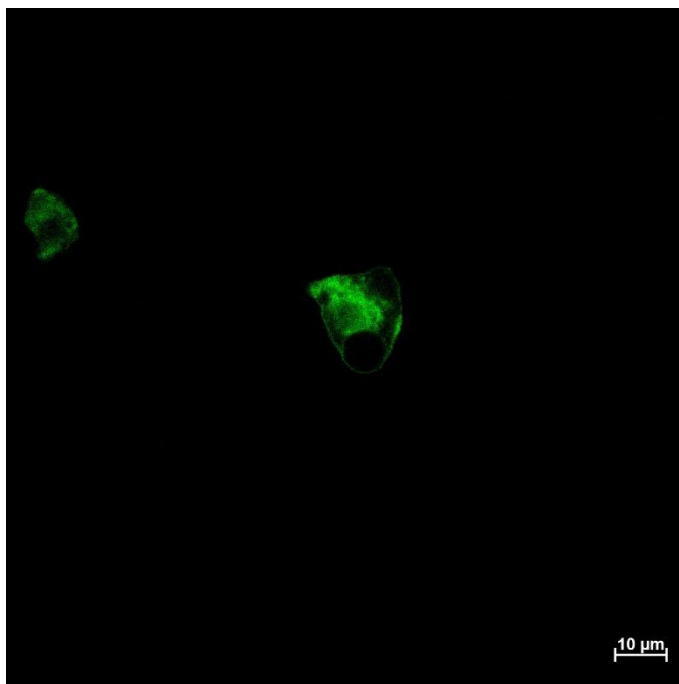
Příloha č. 2: NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci s N-GQDs-Mn²⁺ při koncentraci $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Příloha č. 3: NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci s N-GQDs-Cu²⁺ při koncentraci $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

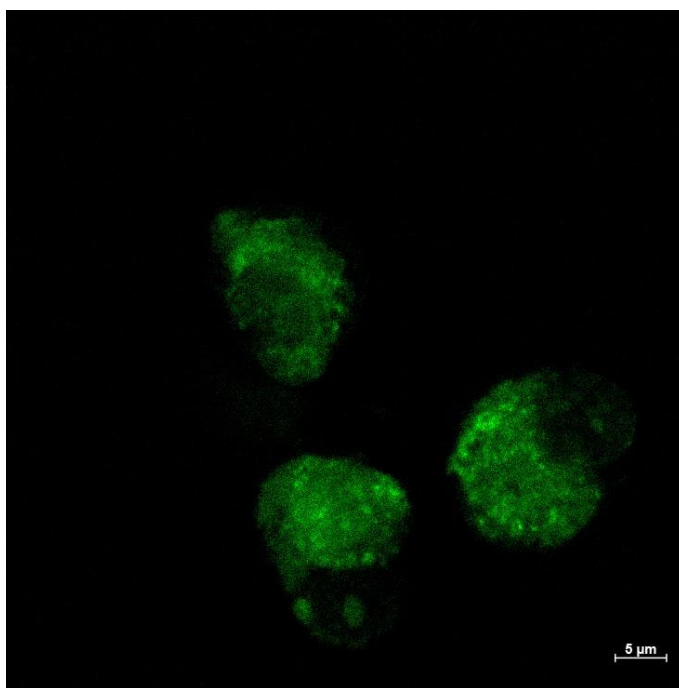
Příloha č. 4: Kontrolní NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci.

Příloha č. 5: NIH/3T3 označené barvivem DAPI v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem.

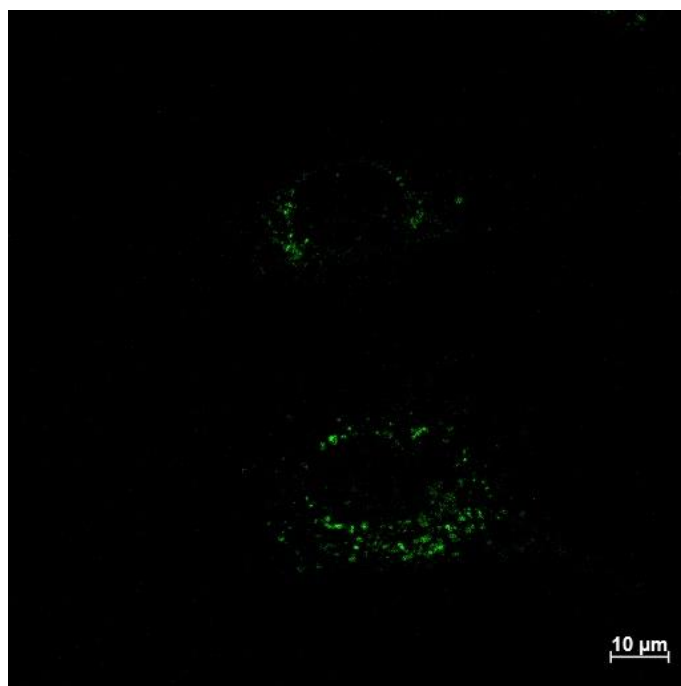
Příloha č. 6: NIH/3T3 označené N-GQDs a barvivem DAPI v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem.



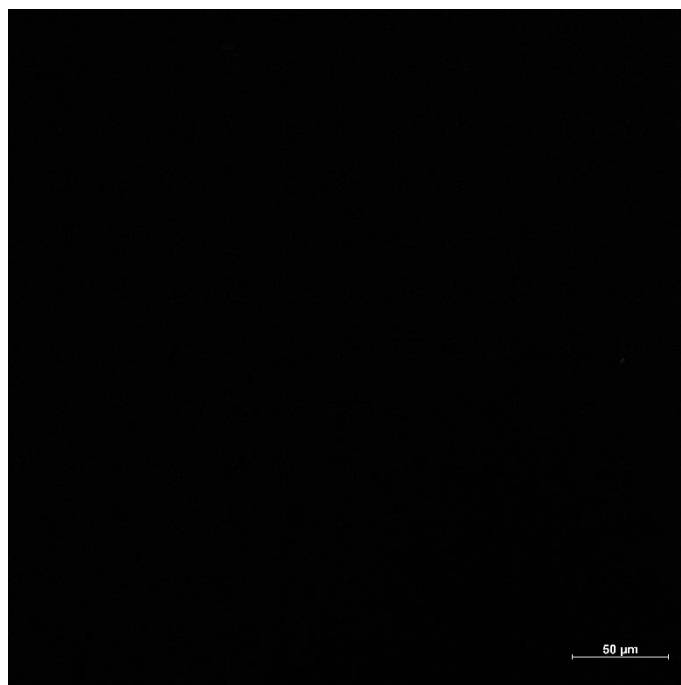
Příloha č. 1: NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci s N-GQDs při koncentraci $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Měřítko je $10 \mu\text{m}$.



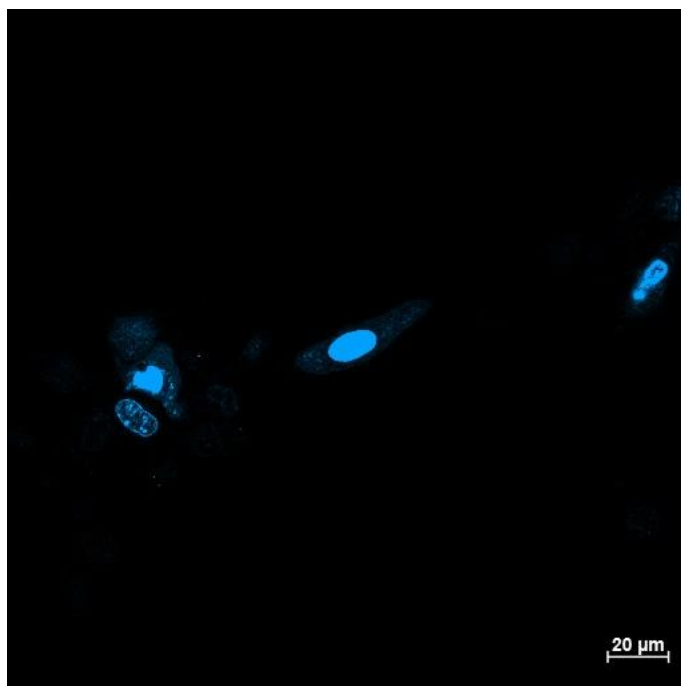
Příloha č. 2: NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci s N-GQDs-Mn²⁺ při koncentraci $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Měřítko je $5 \mu\text{m}$.



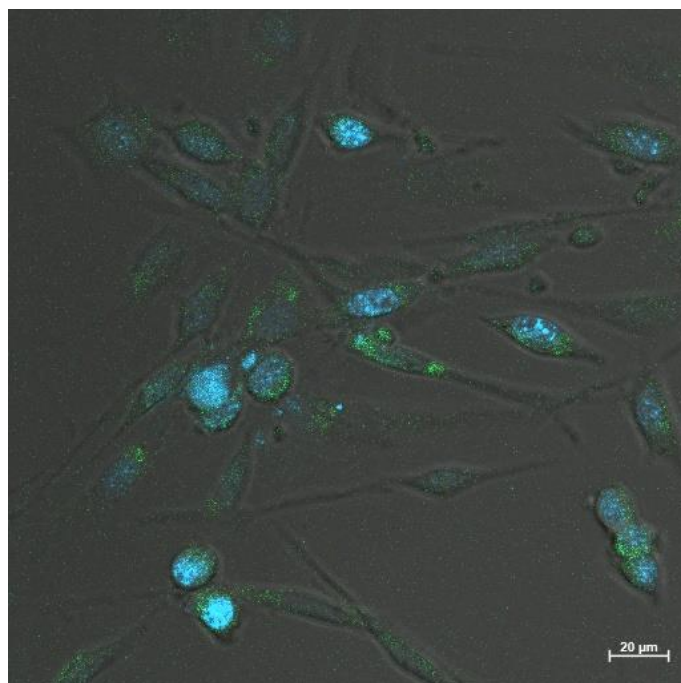
Příloha č. 3: NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci s N-GQDs-Cu²⁺ při koncentraci 400 µg·ml⁻¹. Měřítko je 10 µm.



Příloha č. 4: Kontrolní NIH/3T3 v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem po 48h inkubaci. Měřítko je 50 µm.



Příloha č. 5: NIH/3T3 označené barvivem DAPI v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem. Měřítka je 20 μm.



Příloha č. 6: NIH/3T3 označené N-GQDs a barvivem DAPI v PBS vizualizovány konfokálním mikroskopem. Měřítka je 20 μm.